

Universitat de Lleida

Estudi de la regulació redox de Sir2 en *S. cerevisiae*. Implicació de les glutaredoxines Grx3 i Grx4

Núria Vall-Illaura Espinosa

<http://hdl.handle.net/10803/392158>

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

**Estudi de la regulació redox de Sir2
en *S. cerevisiae*.
Implicació de les glutaredoxines Grx3 i Grx4**

Núria Vall-Illaura Espinosa

2016



Universitat de Lleida

**“Estudi de la regulació redox de Sir2
en *S. cerevisiae*.**

Implicació de les glutaredoxines Grx3 i Grx4”

**Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Programa de Doctorat en Salut (0906)**

**Memòria per optar al grau de Doctor
per la Universitat de Lleida.**

**TESI PRESENTADA PER
Núria Vall-Illaura Espinosa**

**TESI DIRIGIDA PER
Dra. Elisa Cabiscol Català**

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

I semblava que tres anys donaven per molt... però aquí estic, ja ha arribat el dia! Fent recompte de tots aquests anys arribes a la conclusió que fent la tesi aprens moltes coses... Cada dia adquireixes nous coneixements, et topes amb nous reptes i problemes i, perquè enganyar-nos, també es passen dies més dolents... Però res es tant greu si es pot compartir amb gent com vosaltres. He tingut la sort de formar part d'un molt bon equip, moltes gràcies...

A l'Elisa, al Kim i al Jordi, per deixar-me formar part d'aquest grup i per haver-me donat la confiança de treballar amb vosaltres.

Especialment a tu Elisa, per haver dirigit aquesta tesi. Gràcies pel suport que m'has donat, per ensenyar-me, per ajudar-me sempre, per la teva perseverança i per les teves ganes per la ciència. Al Kim, pel teu optimisme i per saber trobar sempre la part positiva quan jo no ho veia gaire clar. Al Jordi, gràcies pel teu entusiasme, pel teu interès per la meva feina, per preguntar, proposar i ajudar sempre. Gràcies per les bones estones als dinars i per saber tantes coses!! A la Marta, per despertar el meu interès pel món de la ciència. Amb tu vaig fer els meus primers passos dins d'un laboratori. Amb molta paciència i carinyo em vas ajudar, em vas guiar, em vas ensenyar i d'alguna forma vas contribuir a que em volgués seguir dedicant a aquest món. Moltes gràcies per tot!

A tota la resta del grup. A la Rosa, a l'Anna, la Núria, la Sandra, la Isu, la M^a Alba, al Fabien, a l'Elena...Gràcies per tots els bons moment que hem compartit i que espero seguir compartint! Al Saravanan i a l'Ambika, per la vostra alegria, per preocupar-vos sempre de mi, per ser tant atents i per cuidar tant de tots nosaltres. Per les noves experiències, per les party party que hem compartit i per ser tant bona gent! Thank you very much!!

I especialment a tu Roser, gràcies per cuidar sempre de nosaltres. Per les teves ganes de treballar, per estar sempre disposada a ajudar-nos, per aconseguir que mai ens faltés de res per poder seguir fent experiments... Sense tu, fer aquesta tesi hagués sigut molt més complicat...Gràcies!

A la Celia, al David, a l'Èlia i a la Rosa, sé que estàveu buscant el vostre nom per aquí als agraïments... No cal que us explica que sense dubte heu estat lo millor d'aquesta tesi. Durant aquests anys he après molt sobre oxidacions, tiols i glutaredoxines però sobretot m'heu ensenyat que a la vida, creuar-se amb xoricets com vosaltres val molt la pena...Simplement, gràcies per tot! (i pel poll amb farina!)

Gràcies a tota aquella gent que un dia també va formar part del grup però que ja van seguir el seu camí... A M^a José, por enseñarme, por tu ayuda, por tus reflexiones, pero sobre todo por tu alegría y en general por todos los buenos momentos que hemos compartido. A Stef, gracias por estar siempre aquí y seguir estando (aunque estés en la otra punta de mundo), por preocuparte por mí, por tus consejos y tú apoyo. Se te echa de menos!

A tota la gent que ha anat passant temporalment pel laboratori, especialment a la Naomi per les teves ganes d'aprendre, i a l'Anna, per la teva dedicació (i per adoptar el gat!). Als nous estudiants que heu anat arribat... l'Oriol, la Lourdes, la Tere i les Annes, per les poquetes però bones estones que hem passat.

A tota la gent de fora d'aquest laboratori, que d'alguna manera també m'ha acompanyat durant tot aquest temps... A tota la gent del IRB amb la que he compartit tants bons moments, sopars i festes. Gràcies Anna, Mariona, Núria i Omar...

A l'Enric, la Gemma i l'Eloi, per guiar-me i ajudar-me sempre que ho he necessitat.

Als passatgers del Minibus. Per fer més divertides i amenes les pujades i baixades diàries. Gràcies Anna, Astrid, Sara, Anaïs, Marina, per totes les bones estonetes que hem compartit. Al final vam aconseguir fer pleno!

Gràcies a tota la gent de postcollita, especialment a la Charo i la Laura. Aquests últims mesos han estat difícils, però vosaltres heu aconseguit posar-m'ho una mica més fàcil. Gràcies per haver-me acollit així de bé, per la vostra preocupació i per la confiança que heu dipositat amb mi.

I sobretot, gràcies a la meva família, al Xavier, al David, a la Sara i a la Laura.

Però especialment a vosaltres, Pare i Mare... Gràcies a vosaltres he pogut arribar fins aquí. Gràcies per esforçar-vos cada dia per nosaltres, pel nostre futur, i perquè mai ens faltés de res...

Gràcies Pare, per dedicar tota la teva vida a nosaltres i per lluitar fins l'últim moment pensant també amb nosaltres. Allí on estiguis, sé que estaràs molt orgullós de que hagi arribat fins aquí. Gràcies per tot!

I a tu Mare, gràcies per estar sempre aquí, per fer més fàcil el dia a dia, per pensar sempre amb mi i ajudar-me. Gràcies per incansablement, cuidar sempre de tots!!

I com no, gràcies a la Judit i al Joan, per fer més "divertits" els dies d'escriptura, entre rialles, crits, plors i Hokey Pokeys.

A tu Ramon, gràcies per entendre'm i fer-me costat. I sobretot, per aguantar-me durant tots aquests dies d'escriptura... Gràcies per tots els moments que em regales i per deixar-me compartir aquest camí amb tu.

A la Montse, per haver-me obert les portes de casa seva com si fos la meva i per tractar-me com una filla més.

I finalment i no menys important, moltes gràcies a tu Nina. Per voler estar sempre al meu costat, per totes les hores que m'has estat fent companyia mentre jo escrivia i escrivia...

Moltes gràcies a tots i totes!

RESUM – RESUMEN – ABSTRACT

RESUM

Sir2 de *S. cerevisiae* és la proteïna fundadora de la família d'histona desacetilases NAD⁺ dependents o sirtuïnes, conservada des de bacteris fins a humans. S'ha descrit implicada en diferents processos del llevat, des del control de l'estabilitat genòmica a través del silenciament a regions com els telòmers, els loci d'aparellament *HML* i *HMR* i el rDNA, fins a múltiples processos com l'envelliment, la repressió de gens en la fase diàuxica, el citoesquelet d'actina, la segregació asimètrica de proteïnes oxidades i la resposta a l'estrès oxidatiu. Malgrat això, la seva regulació és molt poc coneguda. L'ortòleg de Sir2 en mamífers, Sirt1, s'ha relacionat amb múltiples desordres com el càncer, malalties neurodegeneratives, cardiopaties, diabetis i envelliment. Així, donada la importància de l'estrès oxidatiu en aquests processos, entendre els mecanismes de regulació de Sir2 en aquesta situació podria suposar un avanç per fer front a aquestes patologies.

En aquest treball s'ha demostrat, tan a partir d'estudis *in vitro* com *in vivo*, que Sir2 es regula mitjançant el seu estat redox, sent l'oxidació de cisteïnes, concretament la glutatiolació, un mecanisme de regulació de la seva activitat. A més, s'ha descrit una nova funció per dues Grxs monotioliques, Grx3 i Grx4, com les tiol-reductases fisiològiques de Sir2. Ambdues participen en el manteniment i la recuperació de l'estat redox de Sir2, fet corroborat també per la interacció física entre Grx3/4 i Sir2. L'absència de Grx3/4, però no de Trx1/Trx2, afecta negativament l'activitat de Sir2, mentre que la desglutatiolació per part de Grx3/4, a través del seu domini GRX, permet recuperar-ne la seva activitat. L'estudi de les diferents cisteïnes de Sir2 ha permès identificar la C469 i especialment la C513 com les millors candidates a ser glutatiolades en condicions d'estrès. A més, les soques mutants en les cisteïnes rellevants de Sir2 presenten un fenotip de major resistència a estrès específic de tiols i a major resistència a l'envelliment cronològic. Aquests descobriments ofereixen noves perspectives en la senyalització redox de les Grxs monotioliques, descrivint Sir2 com un substrat fisiològic regulat per glutatiolació. A més, poden esdevenir importants per entendre l'envelliment i les malalties associades a aquest procés.

RESUMEN

Sir2 de *S. cerevisiae* es la proteína fundadora de la familia de histonas deacetilasas NAD⁺ dependientes o sirtuínas, conservada desde bacterias hasta humanos. Se ha descrito implicada en múltiples procesos de la levadura, desde el control de la estabilidad genómica a través del silenciamiento en regiones como los telómeros, los loci de apareamiento *HML* y *HMR* y el rDNA, hasta múltiples procesos de regulación como el envejecimiento, la represión de genes en fase diáuxica, el citoesqueleto de actina, la segregación asimétrica de proteínas oxidadas y la respuesta al estrés oxidativo. No obstante, su regulación es muy poco conocida. La ortóloga de Sir2 en mamíferos, Sirt1, se ha relacionado con múltiples desórdenes como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, las cardiopatías, la diabetes y el envejecimiento. Dada la importancia del estrés oxidativo en estos procesos, entender los mecanismos de regulación de Sir2 en esta situación podría suponer un avance para hacer frente a estas patologías. En este trabajo se ha demostrado, tanto mediante estudios *in vitro* como *in vivo*, que Sir2 se regula mediante su estado redox, siendo la oxidación de cisteínas, y concretamente la glutationilación, un mecanismo de regulación de su actividad. Además, se ha descrito una nueva función para dos Grxs monotiólicas, Grx3 y Grx4, como las tiol-reductasas fisiológicas de Sir2. Las dos participan en el mantenimiento y en la recuperación del estado redox de Sir2, corroborado también por la interacción física entre Grx3/4 y Sir2. La ausencia de Grx3/4, pero no de Trx1/2, afecta negativamente la actividad de Sir2, mientras que la desglutinationilación por parte de Grx3/4, a través de su dominio GRX, permite la recuperación de su actividad. El estudio de las diferentes cisteínas de Sir2 ha permitido identificar la C469 y especialmente la C513 como las mejores candidatas a ser glutationiladas en condiciones de estrés. Además, las cepas mutantes en cisteínas clave de Sir2 presentan un fenotipo de mayor resistencia al estrés específico de tioles y una mayor resistencia al envejecimiento cronológico. Estos descubrimientos ofrecen nuevas perspectivas en la señalización redox de las Grxs monotiólicas, describiendo Sir2 como un sustrato fisiológico regulado por glutationilación. Además, pueden resultar importantes para entender el envejecimiento y las enfermedades asociadas a este proceso.

ABSTRACT

Sir2 from *S. cerevisiae* is the founding member of a family of NAD⁺-dependent histone deacetylases or sirtuins, conserved from bacteria to human. It has been described to be involved in a variety of functions in yeast, including the control of genomic stability through the silencing of regions such as telomeres, the mating-type loci *HML* and *HMR* and the rDNA. Sir2 has other functions related with aging, repression of genes during the diauxic shift, actin cytoskeleton, asymmetric segregation of oxidized proteins and also the oxidative stress response. Even though, its regulation is mostly unknown. Sir2 mammalian ortholog, Sirt1, has been reported to be involved in cancer, neurodegenerative diseases, cardiopathy, diabetes and aging. Owing to the importance of oxidative stress in these processes, understanding the regulatory mechanism of Sir2 in this condition might be important to face these pathologies.

The present work demonstrated, both *in vitro* and *in vivo*, that Sir2 is regulated by its redox state, being cysteine oxidation, especially glutathionylation, a regulatory mechanism of its activity. In addition, a new role for two monothiol Grxs, Grx3 and Grx4, has been described acting as the physiological thiol-reductases of Sir2. Grx3/4 are involved in the maintenance and the recovery of the redox state of Sir2, being confirmed by the physical interaction between Grx3/4 and Sir2. The absence of Grx3/4, but not Trx1/2, negatively affects Sir2 activity, while Grx3/4-dependent deglutathionylation through its GRX domain leads to the recovery of its activity. The study of Sir2 key cysteines allowed the identification of C469 and particularly, C513 as the main candidates to be glutathionylated upon stress. Furthermore, mutant strains in key cysteine residues of Sir2 display an increased resistance to both disulphide stress and chronological aging. These findings offer new perspectives on monothiol Grxs in redox signalling, describing Sir2 as a physiological substrate regulated by glutathionylation. Moreover, they may have a relevant role in understanding aging and aged-related diseases.

ABREVIATURES

ABREVIATURES

AcLi: Acetat de liti

ADP: Adenosina 5'-difosfat

AMS: Àcid 4-acetamido-4'-maleimidilstilbene-2,2'-disulfonic

ATP: Trifosfat d'adenosina

BPS: Batofenantrolina

BSA: Albúmina sèrica bovina

cDNA: DNA complementari

CDNB: 1-cloro-2,4 dinitroclorobenzè

CLS: Vida cronològica

CoIP: Co-immunoprecipitació

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DEAE: Dietiletanolamina

DEM: Dietilmaleat

DHA: Dehidroascorbat

DMSO: Dimetil sulfòxid

DNA: Àcid desoxiribonucleic

dNTP: Deoxinucleòtid

DSB: Trencaments de doble cadena del DNA

dsDNA: DNA de doble cadena

DTNB: Àcid 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoic

DTT: Ditiotrièitol

EDTA: Àcid etilendiamina-tetracètic

ERCs: Cercles extracromosòmics de rDNA

FAD: Flavina Adenina Dinucleòtid

GFP: Green fluorescent protein

GMP: Monofosfat de guanosina

GPX: Glutatió peroxidasa

GR: Glutatió reductasa

GRX: Glutaredoxina

GSH: Glutatió reduït

GSSG: Glutatió oxidat

GST: Glutatió transferasa

GTP: Trifosfat de guanosina

HPLC: Cromatografia líquida d'alta precisió

IAA: Iodoacetamida

IMS: Espai intermembrana mitocondrial

INAM: Isonicotinamida

KO: *Knock Out*

LB: Medi Luria-Bertani

MCS: Multiple Cloning Site

mRNA: RNA missatge

NA: Àcid nicotínic

NAD: Nicotina adenina dinucleòtid

NAM: Nicotinamida

NEM: N-etilmaleimida	ROS: Espècie reactiva de l'oxigen
NES: Seqüència d'exportació nuclear	RT: Room temperature
NLS: Seqüència de localització nuclear	SDS: Dodecilsulfat sòdic
NOS: Espècie reactiva del nitrogen	SDS-PAGE: SDS-poliacrilamida
NTS: Espaiador no transcrit	SIR: Silent Information Regulator
OD₆₀₀: Densitat òptica a 600 nm	SOD: Superòxid dismutasa
PBS: Tampó fosfat salí	ssDNA: DNA de cadena simple
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa	tBHP: tert-butil hidroperòxid
PDI: Proteïna disulfur isomerasa	TBS-T: Tampó Tris salí amb Tween-20
PEG: Metoxipolietilenglicol maleimida	TCA: Àcid tricloroacètic
PHGPX: Glutatió peroxidasa de fosfolípids	TCEP-HCl: Tris (2-carboxietil)fosfina clorhidrat
PKA: Proteïna quinasa A	TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnediamina
PMF: <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>	TPE: Efecte de posició telomèrica
PMS: 5-metilfenazinium metil sulfat	TRX: Tioredoxina
PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfonil	UPR: Unfolded Protein Response (Resposta a proteïnes mal plegades)
PRX: Peroxiredoxina	Ura: Uracil
PVDF: Difluorur de polivinilidè	WT: Soca salvatge
RC: Restricció calòrica	
rDNA: DNA ribosomal	
RE: Reticle endoplasmàtic	
RENT: <i>Regulator of nucleolar silencing and telophase exit</i>	
RLS: Vida replicativa	
RNA: Àcid ribonucleic	
RNR: Ribonucleòtid reductasa	

ÍNDEX

ÍNDEX

RESUM	13
ABREVIATURES	19
INTRODUCCIÓ.....	33
1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COM A MODEL D'ESTUDI	33
2. L'ESTRÈS OXIDATIU	36
2.1. Espècies reactives de l'oxigen (ROS)	37
2.2. Origen de les ROS.	39
2.2.1. Fonts endògenes.....	39
2.2.2. Fonts exògenes	41
2.3. DANY CAUSAT PER LES ROS.....	42
2.3.1. Dany al DNA	42
2.3.2. Dany als lípids.....	43
2.3.3. Dany a les proteïnes.....	45
3. GLUTATIOLACIÓ	57
3.1. El glutatió.....	58
3.2. Mecanismes de la modificació per glutatiolació:	62
3.3. Especificitat de la glutatiolació:.....	65
3.4. Conseqüències de la glutatiolació:	65
4. DEFENSES ANTIOXIDANTS EN <i>S. CEREVISIAE</i>.....	67
4.1. Sistemes antioxidants enzimàtics.....	69
4.1.1. Catalasa	71
4.1.2. Superòxid dismutasa	72
4.1.3. Sistema tioredoxina	73
5. SISTEMA GLUTAREDOXINA.....	77
5.1. Característiques generals	78
5.2. Classificació	79
5.2.1. Glutaredoxines ditiòliques	80
5.2.2. Glutaredoxines monotiòliques.....	84

6. ESTRUCTURA DEL GENOMA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	101
6.1. Remodelació de la cromatina.....	104
7. LES SIRTUÏNES	106
7.1. Metabolisme del NAD ⁺	107
7.2. Família de les sirtuïnes en <i>S. cerevisiae</i>	109
7.3. Família de sirtuïnes en eucariotes superiors	112
8. SIR2	114
8.1. La proteïna Sir2	114
8.1.1. Estructura de Sir2.....	114
8.1.2. Localització de Sir2.....	118
8.2. Mecanisme d'acció de Sir2.....	121
8.3. Regulació de l'activitat Sir2	123
8.3.1. Regulació per NAD ⁺ i NAM	124
8.3.2. Molècules moduladores de l'activitat Sir2.....	125
8.3.3. Els nivells de NAD ⁺ i la restricció calòrica.....	129
8.4. El complex <i>SIR</i>	132
8.4.1. Extensió del complex <i>SIR</i>	135
8.5. Silenciament al loci d'aparellament <i>HML</i> i <i>HMR</i>	137
8.6. Silenciament als telòmers	139
8.7. Silenciament al rDNA.....	143
8.8. Altres funcions de Sir2.....	149
8.8.1. Sir2 i estrès oxidatiu	149
8.8.2. Sir2 i metabolisme	151
8.8.3. Sir2 i segregació asimètrica.....	153
8.8.4. Sir2 i actina.....	155
8.8.5. Sir2 i envelliment	157
9. ENVELLIMENT EN <i>S. CEREVISIAE</i>	157
9.1. Envelliment Replicatiu.....	158
9.1.1. Sir2 i acumulació de ERCs	159
9.1.2. Segregació asimètrica Sir2-dependent	161
9.1.3. Els nivells de Sir2.....	162

9.1.4. Sir2 i restricció calòrica	162
9.1.5. Via TOR/Sch9 i via Ras-PKA	163
9.2. Envel·liment Cronològic.....	165
9.2.1. Sir2 i restricció calòrica	166
9.2.2. Sir2, acumulació d'etanol i d'àcid acètic	167
9.2.3. Via TOR/S6K i via Ras/AC/PKA.....	168
9.2.4. Estrès oxidatiu.....	170
OBJECTIUS	175
MATERIALS I MÈTODES	179
1. MICROORGANISMES, MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU	179
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	179
1.1.1. Soques.....	179
1.1.2. Medis de cultiu i condicions de creixement.....	180
1.1.3. Condicions d'estrès oxidatiu	181
1.2. <i>Escherichia coli</i>	181
1.2.1. Soques.....	181
1.2.2. Medis de cultiu i condicions de creixement.....	182
1.2.3. Plasmidis	182
2. ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT	183
2.1. Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid.....	183
2.2. Anàlisi del creixement microbià en medi líquid	183
3. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	184
3.1. Extracció de DNA genòmic	184
3.2. Purificació del DNA.....	185
3.3. Amplificació per PCR	185
3.4. Electroforesi del DNA	186
3.5. Digestió amb enzims de restricció.....	187
3.6. Lligació de fragments de DNA	188
3.7. Amplificació i clonació de gens.....	189
3.8. Construcció de mutacions puntuals	190

3.9. Purificació del DNA plasmídic.....	192
3.9.1. Mètode de la “Miniprep”	192
3.9.2. Mètode de la “Jetprep”	192
3.10. Transformació cel·lular	193
3.10.1. Transformació d’ <i>E. coli</i>	193
3.10.2. Transformació de <i>S. cerevisiae</i>	193
3.11. Construcció de soques.....	194
3.11.1. Construcció de mutants nuls	194
3.11.2. Construcció de soques amb mutacions puntuals	195
3.11.3. Construcció de soques amb marcatge GFP	197
3.11.4. Construcció dels mutants <i>NTS1::mURA3</i>	198
3.11.5. Anàlisi de clons per <i>colony PCR</i>	198
3.12. Anàlisi del DNA per seqüenciació.....	200
3.13. Anàlisi de l’expressió gènica	200
3.13.1. Extracció de RNA.....	200
3.13.2. Obtenció del DNA còpia	201
3.13.3. Anàlisi de l’expressió gènica per <i>Real Time PCR</i>	202
4. MÈTODES D’ESTUDI DE PROTEÏNES.....	203
4.1. Obtenció d’extractes cel·lulars de <i>S. cerevisiae</i>	203
4.1.1. Extracció amb tampó de lisi	203
4.1.2. Extracció amb TCA	204
4.1.3. Extracció per calor i detergent.....	205
4.2. Obtenció d’extractes cel·lulars d’ <i>E. coli</i>	205
4.3. Quantificació de la proteïna d’una mostra.....	206
4.4. Tècniques electroforètiques.....	206
4.4.1. Electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE).....	207
4.4.2. Electroforesi en condicions no desnaturalitzants	208
4.5. Immunodetecció de proteïnes o <i>Western Blot</i>	209
4.6. Tinció de proteïnes	212
4.7. Coimmunoprecipitació	213
4.7.1. Coimmunoprecipitació directa.....	214

4.7.2. Coimmunoprecipitació amb paraformaldehid.....	215
4.7.3. Coimmunoprecipitació per la detecció de glutatiolació	215
4.8. Anàlisi de l'estat redox de proteïnes	217
4.8.1. Derivatització amb PEG en proteïna purificada	218
4.8.2. Derivatització amb AMS en extractes totals	218
5. PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	219
5.1. Expressió i purificació de pSir2 recombinant	219
5.2. Expressió i purificació de pGrx3 i pGrx4 recombinants	221
6. ASSAIG DE DESGLUTATIOLACIÓ	223
7. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES.....	225
7.1. Mètodes espectrofotomètrics.....	225
7.1.1. Activitat catalasa	225
7.1.2. Activitat glutatió reductasa	226
7.2. Activitat enzimàtica en gel: zimograma	227
7.2.1. Activitat superòxid dismutasa.....	227
7.3. Determinació de l'activitat histona desacetilasa de Sir2.....	228
8. TÈCNiques DE MICROSCOPIA.....	230
8.1. Visualització de cèl·lules marcades amb GFP	230
8.2. Visualització de cèl·lules tenyides amb DAPI.....	231
8.3. Visualització del citoesquelet d'actina	231
9. ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR MITJANÇANT FACS	232
9.1. Sincronització amb factor α	232
9.2. Tinció amb iodur de propidi	233
10. ALTRES TÈCNiques DETERMINATIVES.....	233
10.1. Determinació de la quantitat de ferro intracel·lular	233
10.2. Determinació dels nivells de GSH total	234
11. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES	235
RESULTATS	239
1. ESTUDI <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITAT DESACETILASA DE SIR2.....	239
1.1. Inducció i purificació de Sir2.....	239

1.2. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'activitat desacetilasa de Sir2.....	241
1.3. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'activitat de Sir2. Tractaments amb H ₂ O ₂	242
1.4. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'activitat de Sir2. Tractaments amb diamida	244
1.5. Estudi <i>in vitro</i> del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades	246
2. ESTUDI DEL PAPER DE GRX3 I GRX4 EN LA DESGLUTATIOLACIÓ DE SIR2	247
2.1. Inducció i purificació de Grx3 i Grx4	248
2.2. Anàlisi de la desglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4	250
2.2.1. Especificitat de la desglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4.....	252
3. INTERACCIÓ ENTRE SIR2 I LES GLUTAREDOXINES GRX3 I GRX4.....	253
3.1. Estudi de la interacció entre Grx3/4 i Sir2 en soques sobreexpressores	253
3.2. Estudi de la interacció entre Grx3/4 i Sir2 en la soca WT.....	254
4. ANÀLISI <i>IN VIVO</i> DE L'ESTAT REDOX DE SIR2	255
4.1. Estudi de la viabilitat cel·lular en condicions d'estrès oxidatiu	256
4.2. Efecte de les glutaredoxines en l'estat redox de Sir2.....	257
4.3. Efecte de l'acumulació de ferro en l'oxidació de Sir2	259
4.4. Estudi de Grx3 i Grx4 com a possibles sistemes reductors de Sir2	261
5. ESTUDI <i>IN VIVO</i> DE LA LOCALITZACIÓ DE SIR2	263
6. ESTUDI <i>IN VIVO</i> DE L'ACTIVITAT DE SIR2	265
6.1. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2	265
6.1.1. Determinació de la validesa de l'assaig	266
6.1.2. Estudi de Grx3 i Grx4 en l'activitat desacetilasa de Sir2. Tractaments amb diamida	267
6.1.3. Estudi de Grx3 i Grx4 en la recuperació de l'activitat desacetilasa de Sir2. Tractaments amb diamida	268
6.1.4. Estudi de Trx1 i Trx2 en l'activitat desacetilasa de Sir2	272
6.1.5. Grx3 i Grx4 en l'activitat desacetilasa de Sir2. Tractaments amb H ₂ O ₂	274
6.1.6. Grx3 i Grx4 en la recuperació de l'activitat de Sir2. Tractaments amb H ₂ O ₂	275
6.2. Anàlisi de l'activitat de Sir2 al rDNA	276
6.3. Anàlisi <i>in vivo</i> de la glutatiolació de Sir2	279
7. PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'ACTIVACIÓ DE SIR2	282
8. ESTUDI <i>IN VITRO</i> DEL PAPER DE LES CISTEÏNES DE SIR2.....	284

8.1. Identificació i construcció dels mutants de les cisteïnes	284
8.2. Inducció i purificació dels mutants Sir2	286
8.3. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'activitat dels mutants Sir2	287
8.4. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'activitat dels mutants Sir2 en condicions d'estrès oxidatiu...	289
8.5. Estudi <i>in vitro</i> de la glutatiolació dels mutants Sir2.	289
8.6. Estudi <i>in vitro</i> del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades	290
9. ESTUDI <i>IN VIVO</i> DEL PAPER DE LES CISTEÏNES DE SIR2.....	292
9.1. Anàlisi <i>in vivo</i> de l'activitat telomèrica de Sir2	292
9.2. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 de les soques mutants. Tractaments amb diamida.....	293
9.3. Anàlisi de l'activitat Sir2 al locus d'aparellament	294
9.4. Organització del citoesquelet d'actina	295
9.5. Estudi del mutant Sir2-C469S i la seva localització.....	296
10. ANÀLISI DE LA RESISTÈNCIA DELS MUTANTS A L'ESTRÈS OXIDATIU	297
10.1. Estudi de la viabilitat cel·lular.....	298
10.2. Estudi de l'efecte en el creixement	298
10.2.1. Tractaments amb diamida i DEM.....	299
10.2.2. Tractaments amb H ₂ O ₂	299
11. ENVELLIMENT CRONOLÒGIC I RESPOSTA ANTIOXIDANT DELS MUTANTS.....	300
11.1. Envel·liment cronològic dels mutants Sir2	300
11.2. Estudi dels nivells totals de glutatió reduït	301
11.3. Anàlisi de l'activitat glutatió reductasa	302
11.4. Estudi dels nivells de Grx3 i Grx4.....	303
11.5. Determinació de l'activitat SOD	304
11.6. Estudi de l'activitat catalasa	305
DISCUSSIÓ	309
1. Sir2, una proteïna conservada des de bacteris fins a humans	309
2. Regulació <i>in vitro</i> de la proteïna Sir2.....	314
3. Regulació <i>in vivo</i> de Sir2 i el paper de Grx3/4.	319
3.1. El ferro com una possible causa de l'oxidació de Sir2	328
3.2. Efecte del H ₂ O ₂ en l'activitat de Sir2	329

3.3. Activació de Sir2 en condicions d'estrès oxidatiu	330
4. Glutaredoxines <i>versus</i> tioredoxines en la regulació de Sir2	331
5. Paper de les cisteïnes de Sir2 <i>in vitro</i>	337
6. Resistència dels mutants Sir2 a l'estrès oxidatiu.....	346
CONCLUSIONS	353
REFERÈNCIES	357
ARTICLE	393

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COM A MODEL D'ESTUDI

El terme llevat és un nom genèric que agrupa una gran varietat de fongs, incloent tan espècies patògenes per plantes i animals, com espècies innòcues i de gran utilitat. Des del punt de vista científic, els llevats han contribuït de manera molt important a elucidar processos bàsics. Algunes espècies de llevat del gènere *Saccharomyces* són capaces de dur a terme el procés de fermentació, propietat que s'ha explotat des de fa molt anys per la producció de pa i begudes alcohòliques. Des del punt de vista científic, ha contribuït de forma molt important a entendre processos bàsics. Concretament, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) és un dels organismes eucariotes unicel·lular més àmpliament utilitzats com a model en estudis de laboratori (Figura 1), juntament amb el llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe*, perquè presenta característiques molt favorables a l'hora de realitzar estudis genètics i bioquímics.

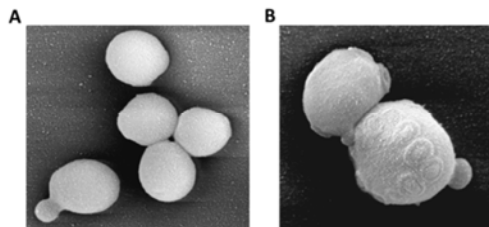


Figura 1. Cèl·lules de *S. cerevisiae*. Imatges obtingudes per microscòpia electrònica de *S. cerevisiae* corresponents a (A) 1-2 generacions i (B) 15-20 generacions (imatges obtingudes de l'estudi d'envelliment realitzat per Gemma Reverter-Branchat).

S. cerevisiae ha estat utilitzat com a model en nombrosos estudis, com els d'envelliment (C. Murakami and Kaerberlein 2009), regulació de l'expressió gènica (Biddick and Young 2009), transducció (Hohmann, Krantz, and Nordlander 2007), anàlisi del cicle cel·lular (Nasheuer et al. 2002), metabolisme (López-Mirabal and Winther 2008), apoptosi (Owsianowski, Walter, and Fahrenkrog 2008) i desordres neurodegeneratius (Miller-Fleming, Giorgini, and Outeiro 2008), entre molts altres

processos biològics. S'ha estimat que fins al 30% dels gens implicats en malalties humanes tenen els seus ortòlegs en el proteoma de llevat (Foury 1997).

S. cerevisiae presenta un genoma petit (Figura 2), només unes vegades superior al del bacteri *Escherichia coli* (*E. coli*), i 200 vegades menor que el de les cèl·lules de mamífer, fet pel qual, es simplifica de forma important l'anàlisi genètic i molecular.

<u>Organisme</u>	<u>Mida genoma (pb)</u>	<u>Nº cromosomes</u> (cèl·lula haploide)
<i>H. sapiens</i>	3,5 x 10 ⁹ pb	23
<i>D. melanogaster</i>	1,6 x 10 ⁸ pb	4
<i>S. cerevisiae</i>	1,4 x 10 ⁷ pb	16
<i>E. coli</i>	4 x 10 ⁶ pb	1

Figura 2. Representació del genoma d'alguns organismes. Es mostra la mida del genoma de *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* i *E. coli*, així com el número de cromosomes del genoma haploide per cada cas.

A diferència del genoma d'organismes multicel·lulars, el genoma del llevat és molt compacte, donat que el 72% de la seqüència correspon a seqüències codificants. La mida mitjana dels gens de llevat és de 1,45 kb i només un 3,8% de les ORFs contenen introns. El genoma no nuclear o DNA mitocondrial codifica pels components de la maquinària traduccional de la mitocòndria i aproximadament el 15% de les proteïnes mitocondrials. Existeixen mutants absents de DNA mitocondrial, que tot no ser incapaços de dur a terme un metabolisme respiratori, són viables i capaços de fermentar substrats com la glucosa. La majoria dels gens del llevat presenten ortòlegs en el genoma humà, incloent gens relacionats amb diverses patologies. De fet, moltes proteïnes humanes poden substituir funcionalment els seus anàlegs en llevat a través del procés de transfecció dels gens humans en el llevat. Aquest avantatge fa del llevat de gemmació un model molt útil per realitzar estudis de fenòmens i processos que tenen lloc en organismes multicel·lulars.

S. cerevisiae presenta dos tipus sexuals: a i α , determinats pels al·lels MATa i MAT α . A partir del creuament d'un soca MATa i una soca MAT α , es poden generar soques

diploides MAT α /MAT α . Aquestes cèl·lules diploides es poden mantenir com a tals o poden esporular si són cultivades en condicions de limitació de nutrients. Pel que fa al creixement de *S. cerevisiae*, es tracta d'un organisme versàtil, capaç d'utilitzar diferents tipus de nutrients per obtenir energia, no obstant, presenta preferència per certs tipus de substrats. Els llevats es caracteritzen per presentar dos tipus de metabolisme ben diferenciats. Per una banda, quan les concentracions al medi de glucosa (fructosa o maltosa) són altes, predomina en *S. cerevisiae* la fermentació alcohòlica d'aquestes fonts de carboni. Però quan aquestes fonts d'energia s'esgoten, el llevat canviarà a un metabolisme oxidatiu, i començarà a respirar l'etanol prèviament produït. El fenomen pel qual *S. cerevisiae* produeix etanol aeròbicament en presència d'altres concentracions de glucosa es coneix amb el nom d'efecte Crabtree. A nivell energètic es tractaria d'un procés evolutivament desfavorable donat que la fermentació és energèticament menys favorable que la respiració, però en canvi, la fermentació afavoreix un creixement ràpid de la població i l'excreció d'etanol inhibeix el creixement d'altres microorganismes que competeixen per la colonització del nínxol. Així doncs, quan les concentracions de glucosa al medi són altes, el creixement de *S. cerevisiae* és caracteritzat per presentar una cinètica de creixement que es divideix en unes fases molt definides (Figura 3).

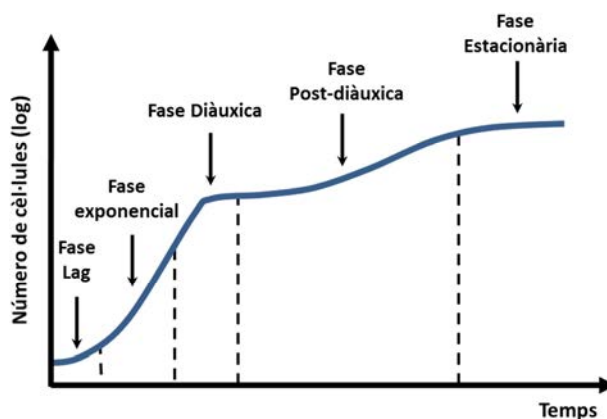


Figura 3. Cinètica de creixement d'un cultiu de *S. cerevisiae*. Es mostren les diferents fases de creixement característiques quan es fa créixer en un medi en presència de glucosa.

La primera d'elles és la fase lag, fase de latència o també coneguda com a fase d'adaptació, en la que no hi ha un increment inicial en el número de cèl·lules del cultiu, sinó que aquestes dediquen un temps d'adaptació al nou ambient. La duració d'aquesta fase dependrà del nombre de cèl·lules del cultiu que es troben metabòlicament actives. Un cop les cèl·lules s'han adaptat a les condicions de creixement, entraran en fase log o fase exponencial, on començaran a dividir-se exponencialment, fermentant la glucosa present al medi de cultiu i excretant els productes metabolitzats, com l'etanol i l'acetat. Quan la glucosa present és limitant, les cèl·lules entraran en fase diàuxica. Aquesta fase es caracteritza pel fet que les cèl·lules reajusten el seu metabolisme i comencen a respirar l'etanol generat prèviament durant la fermentació. A més, a partir d'aquest moment el creixement del cultiu deixa de ser exponencial i es comença a ralentir. Un fet important és que les cèl·lules en aquest moment comencen a induir tots els sistemes de defensa antioxidants per fer front a l'inici d'una situació d'estrès oxidatiu. Una vegada les fonts de carboni alternatives també s'han esgotat, les cèl·lules s'adaptaran a la manca de nutrients inhibint el seu creixement i mantenint-se en un estat hipometabòlic. Aquest canvi s'anomena entrada en fase estacionària, on les cèl·lules es mantenen en fase G0 (Figura 3).

2. L'ESTRÈS OXIDATIU

L'estrès oxidatiu és el dany resultant que sorgeix a causa dels desequilibris redox que tenen lloc a l'interior de la cèl·lula, concretament, degut a un increment dels radicals lliures i/o una menor protecció per part dels sistemes antioxidants. És ben conegut que l'oxigen juga un paper essencial per la vida aeròbica, però a la vegada també n'és perjudicial. Els organismes aeròbics redueixen l'oxigen molecular (O_2) a aigua durant la respiració. No obstant, durant aquest procés, es poden generar espècies reactives derivades de l'oxigen (ROS), les quals són altament reactives. De fet, la principal font de ROS *in vivo* és la reducció incompleta d'aquest O_2 durant la respiració, tot i que també pot ser deguda a altres processos com la resposta cel·lular als xenobiòtics, citocines o invasions bacterianes (Ray, Huang, and Tsuji 2012). La producció en petites quantitats d'aquestes ROS pot ser eficientment detoxificada pels propis sistemes antioxidants dels

quals disposa la cèl·lula, però quan aquestes són produïdes en excés i es trenca l'equilibri redox, és quan es parla d'estrès oxidatiu. Les ROS generades en excés provoquen un dany, ja sigui de forma directa o indirecta, a macromolècules com el DNA (tan nuclear com mitocondrial), els lípids o les proteïnes. De fet, són moltes les evidències que associen l'estrès oxidatiu amb un gran nombre de malalties, com les malalties neurodegeneratives (Shukla, Mishra, and Pant 2011)(Sorolla et al. 2012), càncer (Pelicano, Carney, and Huang 2004), diabetis (Paravicini and Touyz 2006), malalties cardiovasculars com la hipertensió, l'arteriosclerosi i la hipertròfia cardíaca (Marian Valko et al. 2007) o l'envelliment (Haigis, Marcia C. and Yankner 2010). No obstant, la implicació de les ROS en la patogènesi d'aquestes malalties no és limitada simplement al dany macromolecular, sinó que cada vegada són més les evidències que apunten que les diferents senyalitzacions desencadenades per les ROS contribueixen a la patogènesi però també a la supervivència cel·lular. Per exemple, s'ha demostrat que les espècies reactives interaccionen directament amb molècules senyalitzadores per iniciar una cascada de senyalització en una gran varietat de processos cel·lulars, com la proliferació o supervivència, la regulació de gens antioxidants, l'apoptosi, l'envelliment, l'homeòstasi del ferro a través de les proteïnes amb clústers ferro-sofre, resposta al dany al DNA, etc. (Ray, Huang, and Tsuji 2012). A més, són nombrosos els estudis que apunten que proteïnes com les sirtuïnes (Bräutigam et al. 2013)(J.-W. Hwang et al. 2013), factors transcripcionals (L.-O. Klotz et al. 2015) o components de la resposta immune (Gostner et al. 2013), estan regulats mitjançant mecanismes redox.

2.1. Espècies reactives de l'oxigen (ROS)

Les ROS deriven de l'O₂ i representen una gran varietat d'estats d'oxidació de l'O₂, incloent el peròxid d'hidrogen (H₂O₂), l'anió superòxid (O₂⁻), el radical hidroxil (·OH) i altres com l'oxigen singlet (¹O₂).

L'¹O₂ és molt reactiu i és capaç de reaccionar amb la majoria de compostos cel·lulars, com les membranes plasmàtiques o amb les macromolècules com el DNA, els lípids i les proteïnes (Lledias and Hansberg 2000). Aquest es forma quan un dels dos electrons

lliures de l'O₂ capta energia. Això pot succeir, per exemple, quan les substàncies com les flavines, porfirines, les quinones o les clorofil·les en organismes fotosintètics, són excitats amb llum ultravioleta. Un cop excitats, aquests poden transferir la seva energia a l'O₂ i acabar generant finalment el ¹O₂. L'O₂^{•-} es forma quan l'O₂ capta un electró. Això succeeix a la cadena de transport d'electrons, en tots els organismes que respiren. És relativament poc reactiu comparat amb altres radicals, però pot ser convertit a espècies més reactives. Per exemple, quan l'O₂^{•-} reacciona amb el NO[•] genera el peroxinitrit (ONOO⁻), un potent oxidant (Liochev and Fridovich 1999). No obstant, tan sols reacciona amb una taxa important amb les quinones, els fenols, el ferro lliure i el ferro unit a les proteïnes, per exemple amb les proteïnes amb centre Fe-S, i també amb altres radicals com el propi O₂^{•-} i l'òxid nítric (NO). També se sap que té la capacitat d'unir-se a alguns enzims i inhibir-los o disminuir la seva activitat, com succeeix amb el cas dels enzims antioxidants com la catalasa i la glutatió peroxidasa. A més, l'O₂^{•-} és la principal font d'H₂O₂ de la cèl·lula, generat a partir de la seva dismutació per part de la superòxid dismutasa (SOD). A la vegada, el H₂O₂ generat pot ser descomposat per la catalasa en H₂O i O₂ (Figura 4).

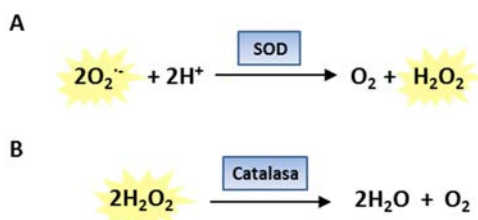


Figura 4. Neutralització de les ROS per part d'enzims antioxidants. (A) La dismutació de l'O₂^{•-} per part de la SOD dóna lloc a la formació de H₂O₂. (B) A la vegada, l'H₂O₂ generat pot ser descomposat per la catalasa en H₂O i O₂.

La major part del H₂O₂ prové de la dismutació de l'O₂^{•-}, tot i que també pot ser produït per algunes oxidases. El H₂O₂ té la capacitat de difondre a través dels compartiments cel·lulars, tot i que tendeix a formar adductes amb carbohidrats, aminoàcids i bases nitrogenades (apartat 2.3 de la Introducció). Una característica de l'H₂O₂ és que pot convertir-se fàcilment en una espècie altament reactiva a través de la reacció de

Fenton (Figura 5), captant un electró que prové del ferro intracel·lular reduït (Fe^{2+}) i generant així el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) i l'ió hidroxil (OH^-). Aquest últim és innocu, doncs es protona per formar aigua. En canvi, el $\cdot\text{OH}$, és un dels compostos més reactius i interacciona amb gran facilitat amb les macromolècules. A més, les formes oxidades que es generen en la reacció de Fenton, poden reaccionar amb l'anió superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a través de la reacció de Haber-Weiss (Figura 5). Aquesta reacció torna a donar formes reduïdes com el Fe^{2+} , generant-se així un cicle de reaccions en el qual, el Fe^{2+} podrà tornar a reaccionar amb l' H_2O_2 a través de la reacció de Fenton i així successivament (Toledano et al. 2003). La degradació de proteïnes amb grups hemo (com l'hemoglobina o el citocrom c), afavoreix la formació del radical hidroxil a través de la reacció de Fenton.

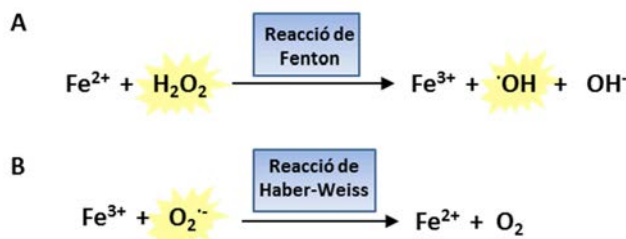


Figura 5. Reaccions de Fenton i de Haber-Weiss. (A) El H_2O_2 pot reaccionar amb el Fe^{2+} reduït a través de la reacció de Fenton donant lloc al radical $\cdot\text{OH}$. (B) El ferro Fe^{3+} oxidat procedent de la reacció de Fenton podrà reaccionar ara amb l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la reacció coneguda com a Haber-Weiss.

2.2. Origen de les ROS.

2.2.1. Fonts endògenes.

En condicions fisiològiques, les ROS són generades per múltiples enzims i en varis compartiments dins la cèl·lula. No obstant, la principal font de ROS intracel·lular (aproximadament un 90%) prové de la fosforilació oxidativa que té lloc a la mitocondria, un procés que utilitza l'oxidació controlada del NADH per generar un gradient de protons a través de la membrana interna mitocondrial. Aquest potencial, és utilitzat per fosforilar l'ADP a través de l'ATP sintasa i acabar generant ATP. Durant

aquest procés, els electrons són transportats per la ubiquinona i el citocrom C a través dels complexos I, II, III i IV de la cadena respiratòria fins al darrer acceptor, el O_2 , que donarà lloc a la formació d' H_2O . En varis moments de la cadena respiratòria, aquests electrons derivats del NADH i del $FADH_2$ poden reaccionar directament amb l'oxigen o altres acceptors d'electrons i generar les ROS (Balaban, Nemoto, and Finkel 2005). La primera evidència de que la cadena respiratòria generava ROS es va publicar l'any 1966 quan es va observar que mitocondries aïllades produïen H_2O_2 . Més tard, es va confirmar que aquest H_2O_2 provenia de la dismutació de l' $O_2^{\cdot -}$ que es generava a l'interior de la mitocondria. Paral·lelament, el descobriment de que la mitocondria contenia la seva pròpia superòxid dismutasa SOD, la MnSOD va confirmar la significança biològica de la producció de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial (Murphy 2009). El principal radical lliure de la majoria dels sistemes biològics és el $O_2^{\cdot -}$, generat per les NADH oxidases com un subproducte de la respiració (Figura 6).

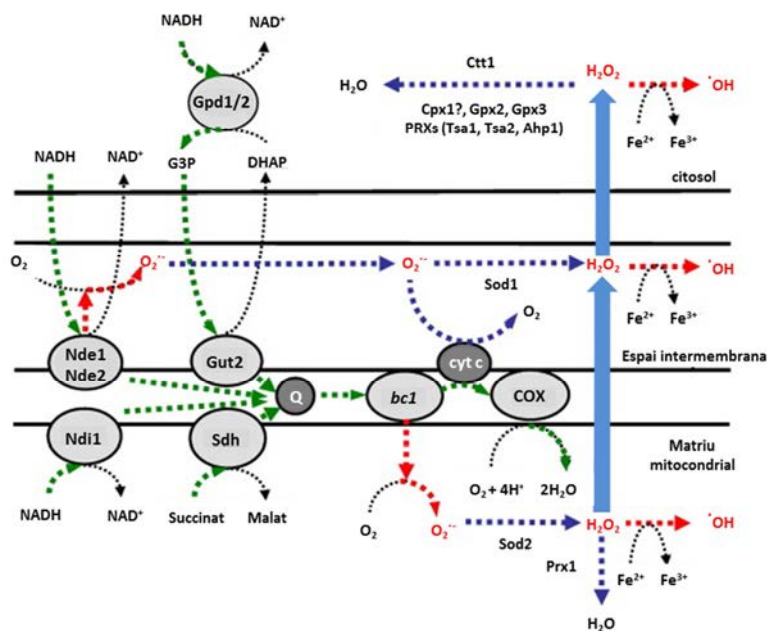


Figura 6. Representació esquemàtica de la cadena respiratòria de *S. cerevisiae*. Es mostra els llocs de formació de ROS, així com els principals enzims antioxidants implicats. *Bc1*, complex citocrom *bc1*; *cyt c*, citocrom c; *cox*, citocrom c oxidasa; *Ctt1*, catalasa T citosòlica; *Gdp*, glicerol-3-fosfat deshidrogenasa associada a NADH citosòlic; *Gpx*, glutatió peroxidasa; *Gut2*, glicerol-3-fosfat oxidoreductasa d'unió a membrana; *Nde*, NADH deshidrogenasa externa; *Ndi1*, NADH deshidrogenasa interna; *Prx*, peroxidoreoxina; *Q*, ubiquinona; *Sdh*, complex succinat deshidrogenasa associat a $FADH_2$; i *SOD*, superòxid dismutasa. Adaptat de (Enrique Herrero et al. 2008).

En eucariotes superiors el complex I i el complex III han estat identificats com els majors productors de $O_2^{\cdot -}$ a la mitocondria. *S. cerevisiae* no disposa de complex I, però sí que presenta 3 NADH deshidrogenases que són insensibles a rotenona i estan localitzades a la membrana interna mitocondrial i són les majors productores de $O_2^{\cdot -}$ (Barbara M. Bakker et al. 2001).

El lumen del reticle endoplasmàtic també presenta un ambient oxidant degut a la generació contínua de GSSG, necessari per la formació de ponts disulfur estructurals durant el plegament i la secreció de proteïnes. Segons alguns autors, les proteïnes del reticle que intervenen en aquest plegament oxidatiu i que suposen una font de ROS per la cèl·lula són l'enzim dependent de FAD, Ero1 i la proteïna disulfur isomerasa PDI (Tu and Weissman 2004). Per tant, el reticle endoplasmàtic és també un dels compartiments on es generen ROS.

En eucariotes superiors, una altra de les grans fonts de producció de ROS endògenes són els fagòcits del propi sistema immune dels organismes. Al trobar-se amb un agent infecciós, les cèl·lules polimorfonuclears i els macròfags experimenten un increment molt agut en el consum d'oxigen conegut amb el nom d'esclat respiratori o esclat oxidatiu, en el qual s'alliberen gran quantitat de ROS. Aquests radicals lliures contribueixen a la destrucció o inactivació de l'agent infecciós però a la vegada també suposen una font de radicals que poden tenir conseqüències, donant lloc a processos patològics.

2.2.2. Fonts exògenes

A banda de les ROS que es generen de manera fisiològica a l'interior de la cèl·lula, els organismes estan exposats de forma constant a múltiples situacions que generen estrès oxidatiu a les cèl·lules, ja sigui en forma de radicació amb llum UV, raigs X o raigs γ , contaminació atmosfèrica, fum del tabac, pesticides com el paraquat o altres compostos de síntesi química com la diamida, la menadiona, el DEM o altres fàrmacs utilitzats actualment en la teràpia contra el càncer. Aquests últims, per exemple, aprofiten el fet que són modificats per enzims cel·lulars i són convertits a un producte

intermedi inestable, el qual acaba reaccionant amb l'oxigen molecular, i genera a part del producte final, un radical superòxid, que generarà toxicitat a les cèl·lules.

2.3. DANY CAUSAT PER LES ROS

A altes concentracions, les ROS poden ser unes importants mediadores del dany en estructures cel·lulars, com els àcids nucleics, els lípids i les proteïnes. L'extensió del dany que l'estrès oxidatiu pot generar als diferents components biològics depèn de varis factors, entre els quals destaca: la concentració de les macromolècules diana, la constant de velocitat de reacció de l'oxidant front a la seva diana, la localització de la diana respecte a l'oxidant, l'aparició de reaccions en cadena, les reaccions de transferència intra- i intermoleculares i la possibilitat i l'abast de les reaccions de reparació o neutralització dels agents oxidants (Davies 2016).

2.3.1. Dany al DNA

El dany al DNA juga un paper essencial en els processos de mutagènesis, carcinogènesis i envelliment. Els processos químics que donen lloc a aquest dany inclouen la hidròlisi, l'exposició a les ROS i a d'altres metabòlits reactius. Aquestes reaccions són desencadenades per l'exposició a químics exògens o inclús poden ser resultat de processos endògens. Entre aquestes, les oxidacions representen el tipus de modificació més comú i divers (Muftuoglu, Mori, and Souza-Pinto 2014).

En el DNA, la pèrdua de bases, la desaminació de la citosina a uracil i de la 5-metilcitosina a timina, i la ruptura de una o de les dues cadenes del DNA, té lloc amb una freqüència baixa però continua. No obstant, aquestes alteracions es veuen considerablement incrementades a causa de l'estrès oxidatiu. De fet, fins al moment s'han descrit més de 100 productes resultants de l'oxidació del DNA, sent els adductes de guanina, sobretot la 8-hidroxi guanina (8-OHG), la més destacada. Conseqüentment, tot aquest dany al DNA pot resultar en una inducció o una aturada en la transcripció, errors de replicació, inestabilitat genòmica i processos associats amb la carcinogènesi.

Pel que fa a l'acció de les diferents ROS, es coneix que el singlet oxigen és més selectiu i, generalment, produeix adductes de guanina, sobretot 8-OHG (Figura 7), mentre que el $\cdot\text{OH}$ genera una gran varietat de modificacions en els quatre tipus de bases nitrogenades del DNA, entre d'altres la 8-OHG (Dizdaroglu et al. 2002), així com modificacions a la desoxiribosa i ruptures de doble cadena i cadena simple al DNA. Per altra banda, el H_2O_2 té molt poca reactivitat per induir aquest tipus de modificacions (Fischer-Nielsen, Jeding, and Loft 1994). No obstant, en moltes cèl·lules es generen modificacions a les bases del DNA quan es troben en presència de H_2O_2 . Això es deu en gran part als metalls de transició, fonamentalment al Fe^{2+} , i que a través de la reacció de Fenton, acaba generant el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$).

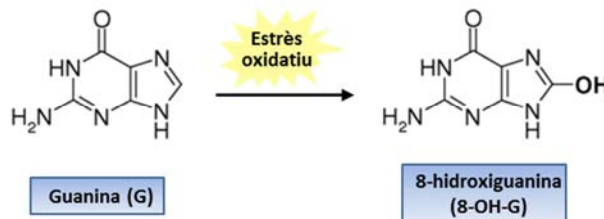


Figura 7. Exemple de dany al DNA causat per l'oxidació de la guanina. Els radicals lliures, com el radical hidroxil, reaccionen amb la guanina, i acaben generant la forma oxidada 8-hidroxi-guanina (8-OHG), un producte de l'oxidació altament mutagènic i carcinogènic (M. Valko et al. 2006).

Al 2006 es va observar per primera vegada el dany oxidatiu al DNA tan mitocondrial com nuclear en regions de cervell de pacients afectats per un deteriorament cognitiu lleu (Jianquan Wang, Markesbery, and Lovell 2006). Més recentment, en l'hipocamp de malalts d'Alzheimer es van observar nivells elevats de 8-OHG (Lovell, Soman, and Bradley 2011).

2.3.2. Dany als lípids

Un altre tipus de components cel·lulars que poden ser susceptibles a l'oxidació deguda a les ROS són els lípids. De fet, els àcids grassos poliinsaturats (PUFA) de les membranes representen una de les principals dianes dels agents oxidants intracel·lulars, donat que

la majoria de les ROS s'originen dins o al voltant de orgànuls rics en membranes i a més, són altament susceptibles a ser oxidats degut als seus dobles enllaços.

La peroxidació lipídica (LPO) és una reacció complexa en la qual els radicals lliures reaccionen amb els PUFA. S'ha demostrat que la LPO indueix alteració de les estructures, de la integritat, fluïdesa, permeabilitat i la pèrdua funcional de les membranes, així com una modificació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i a més, genera productes potencialment tòxics. El cervell és un dels òrgans que consumeix més oxigen i per tant, les conseqüències de l'estrès oxidatiu poden repercutir més ràpidament. El dany oxidatiu en els lípids pren molta força en el cas de les malalties neurodegeneratives, doncs els PUFA són abundants en la bicapa lipídica del cervell (Thanan et al. 2014). De fet, productes de la peroxidació lipídica s'han descrit en nivells elevats en pacients afectats d'Alzheimer, Parkinson, Esclerosi Lateral Amiotròfica i Huntington (Niki 2009) (Reed 2011).

El procés de peroxidació té lloc en tres etapes ben definides: la iniciació, la propagació i la terminació (Figura 8). En el primer tipus de mecanisme mediat per radicals lliures, es creu que el radical hidroxil pot iniciar una reacció de peroxidació lipídica que comença amb l'eliminació d'un electró d'una cadena lateral d'un lípid insaturat, per formar el primer radical alquil ($L\cdot$). Aquest radical format podrà acceptar una molècula de O_2 , generant un radical peroxil ($LOO\cdot$) i que en varies reaccions com la seva reducció a hidroperòxid ($LOOH$), podrà donar lloc a la propagació de la peroxidació al generar un altre alquil ($L\cdot$) en l'àcid gras que es troba contigu a la membrana. La propagació explica el caràcter de reacció en cadena de la peroxidació lipídica, mitjançant la qual, una sola iniciació pot danyar un gran nombre de molècules. La reacció acabarà amb la reacció de radicals contigus, per exemple de tipus alquil, donant lloc a ponts creuats (L-L), o mitjançant la fragmentació de l'àcid gras en un gran nombre de productes com el malondialdehid (un dels marcadors més àmpliament utilitzats) o el 4-hidroxinonenal. A més dels àcids grassos i els seus èsters, també es creu que poden tenir lloc processos anàlegs en altres lípids com els esteroides (Porter, Caldwell, and Mills 1995).

Així, la peroxidació lipídica, a part d'alterar significativament les propietats de les membranes cel·lulars, també té conseqüències pel fet que els productes de la peroxidació generen adductes amb el DNA i les proteïnes (Esterbauer, Schaur, and Zollner 1991), alterant-les i contribuint en processos de carcinogènesi i de tumorigènesi, i nombrosos desordres neurodegeneratius (Hashimoto et al. 2003).

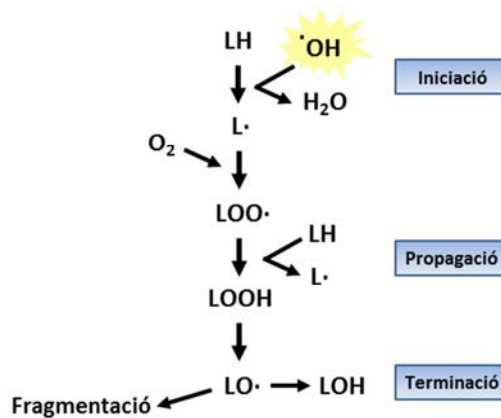


Figura 8. Resum de les principals reaccions de la peroxidació lipídica. LH, lípid intacte; L·, radical lipídic alquil; LOO·, radical lipídic peroxil; LOOH, hidroperòxid lipídic; LO·, radical lipídic alcoxil; LOH, hidròxid lipídic (estable).

2.3.3. Dany a les proteïnes

Les proteïnes són una de les principals dianes del dany oxidatiu, donat que es tracten d'un dels principals components més abundants dels sistemes biològics (E Cabiscol, Tamarit, and Ros 2000). Existeixen diferents factors crítics que determinen el grau d'oxidació de les proteïnes, entre els quals hi destaca la localització cel·lular de la proteïna, la seva estructura, així com la localització i la concentració dels oxidants i antioxidants. *In vivo*, el dany oxidatiu en proteïnes pot alterar la funcionalitat de receptors, proteïnes transportadores, proteïnes estructurals i enzims, afectant diferents processos cel·lulars. A més, les proteïnes oxidades poden ser identificades pel sistema immunitari, desencadenant la generació d'anticossos i una possible reacció autoimmunitària (Peng, Fatenejad, and Craft 1997). Les proteïnes modificades poden difondre o ser transportades a altres compartiments cel·lulars, potenciant així els

efectes perjudicials (Dean et al. 1992). Una altra conseqüència del dany oxidatiu a proteïnes, tot i no ser directa, pot ser l'afectació a altres biomolècules, com el dany al DNA, degut a l'oxidació i pèrdua d'activitat dels enzims de reparació del DNA i/o les histones (Höhn, Jung, and Grune 2014).

Es coneix per exemple, que l' $O_2^{\cdot -}$ pot afectar l'activitat d'enzims, bé inhibint-los o disminuint la seva activitat com és el cas de la catalasa i la glutatió peroxidasa. També inhibeix alguns enzims com l'aconitasa i la fumarasa, amb les corresponents conseqüències al metabolisme energètic (E Cabiscol et al. 2000). Com ja s'ha comentat, una altra conseqüència important de la generació de $O_2^{\cdot -}$ és l'oxidació de proteïnes que contenen centres Fe-S (Liochev and Fridovich 1999) o la formació de grups carbonils (Stadtman and Levine 2003)(Elisa Cabiscol, Tamarit, and Ros 2014). També pot inactivar enzims directament per l'oxidació principalment del grup tiol d'aminoàcids com la metionina o la cisteïna, com és el cas de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (Chris M Grant, Quinn, and Dawes 1999). S'ha descrit que les ROS tenen la capacitat de reaccionar i modificar aminoàcids, pèptids i proteïnes de formes diferents. En general, la selectivitat dels radicals lliures està ben caracteritzada pel cas dels aminoàcids, però és menys clar en el cas de pèptids i proteïnes (Höhn, Jung, and Grune 2014). La susceptibilitat a les modificacions oxidatives difereix entre els diferents aminoàcids, sent la histidina, la cisteïna, la metionina, la leucina i els aminoàcids aromàtics com el triptòfan, la tirosina i la fenilalanina, els més susceptibles a aquests processos oxidatius. L'oxidació del sofre que presenten els aminoàcids metionina i cisteïna els converteix en uns residus altament oxidables per un gran nombre d'espècies reactives, sent un dels mecanismes de senyalització i/o dany més estudiats en les proteïnes. Donada la importància de la modificació dels residus metionina i especialment de cisteïna en aquest treball, es descriuran a continuació:

- **La metionina:**

La metionina (Met), es caracteritza juntament amb la cisteïna perquè són els dos aminoàcids que contenen un àtom de sofre a la seva estructura. No obstant, el fet més rellevant és que ambdues poden ser oxidades i reduïdes, ja sigui no enzimàtica o

enzimàticament. La metionina es caracteritza per oxidar-se donant lloc al sulfòxid de metionina (MetO). Concretament, la seva oxidació introdueix un centre quiral a l'àtom de sofre que dóna lloc a dos epímers diferents, el R-MetO i el S-MetO (Figura 9). Aquests poden ser reduïts de forma específica per les metionina sulfòxid reductasa MsrA i MsrB, respectivament (G. Kim, Weiss, and Levine 2014).

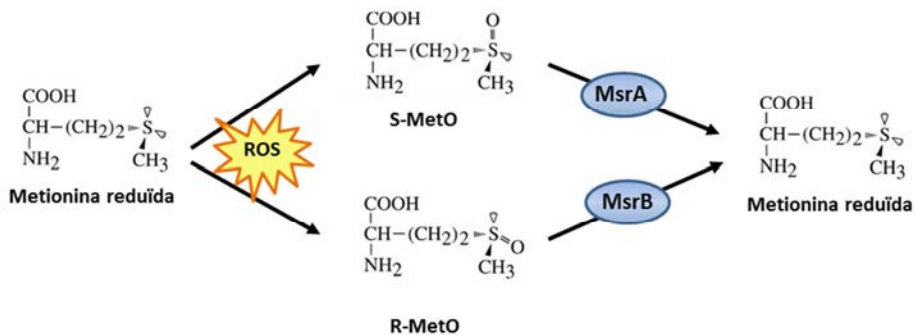


Figura 9. Via de l'oxidació i reducció de la metionina. Les metionines poden ser fàcilment oxidades a partir de les ROS, formant els epímers S-MetO i R-MetO, que seran reduïts estereoespecíficament per la MsrA i la MsrB, respectivament (H.-Y. Kim and Gladyshev 2007).

Des de sempre, l'única funció que se li ha atribuït a la metionina és com a iniciadora en la síntesi de proteïnes. Tot i que sempre s'ha considerat un aminoàcid hidrofòbic que generalment podia ser reemplaçat per altres residus hidrofòbics com la leucina, la isoleucina o la valina sense que això tingués repercussions, cada vegada són més les evidències que apunten que almenys compartiria dues funcions amb la cisteïna: actuaria en la defensa antioxidant i en la regulació de les funcions cel·lulars a través de la seva oxido-reducció (Levine, Moskovitz, and Stadtman). També s'ha descrit que les metionines es posicionen de forma que estableixen un enllaç entre el seu àtom de sofre i els anells dels residus aromàtics, com el triptòfan, la fenilalanina o la tirosina. Aquestes interaccions hidrofòbiques són molt comuns i contribuirien a mantenir l'estabilitat estructural de la proteïna (Valley et al. 2012). Donat que els aminoàcids aromàtics són molt susceptibles a ser oxidats, la interacció amb la metionina establiria la posició òptima necessària per conferir la protecció antioxidant. L'oxidació de Met a MetO no obstant, no permetria l'enllaç hidrofòbic, alterant així l'estructura tridimensional de la proteïna. Això provocaria l'exposició de residus que normalment es

troben més amagats en la proteïna i explicaria l'associació entre l'oxidació de metionines i l'augment de la hidrofobicitat en la superfície de les proteïnes (Chao, Ma, and Stadtman 1997). Aquest fet podria ser rellevant a nivell d'envelliment, on l'augment progressiu de la hidrofobicitat de la superfície de les proteïnes es correlaciona amb un augment del contingut de metionines oxidades (G. Kim, Weiss, and Levine 2014). Donat que l'oxidació de la metionina es tracta d'un procés reversible, els cicles d'oxidació-reducció d'aquests residus poden actuar com a processos reguladors, implicats en la senyalització cel·lular (Hoshi and Heinemann 2001). També s'ha suggerit que l'oxidació de la metionina pot desenvolupar un paper important en el desenvolupament i la progressió de neurodegeneracions com la malaltia de l'Alzheimer i el Parkinson. De fet, es creu que una activitat MsrA reduïda juntament amb la formació de sulfòxids de metionina al pèptid β -amiloide, pot comprometre les defenses antioxidants del cervell i conduir a una major progressió de l'Alzheimer (Moskovitz 2005).

- **La cisteïna:**

La cisteïna es caracteritza per presentar un grup tiol a la seva estructura (Figura 10). Tot i que és codificada per dos codons (UGU i UGC), aquest residu està subrepresentat en les proteïnes de tots els organismes. S'ha descrit que el contingut en cisteïnes en les diferents espècies augmenta proporcionalment amb la complexitat dels mateixos, i a més, aquest fet és exclusiu de la cisteïna, donat que amb els altres residus aquesta tendència no existeix. Així, el contingut de cisteïnes de les proteïnes dels microorganismes del domini *Archaea* només representa un 0,4-0,5%, un 1,2% en el cas de *S. cerevisiae* i un 2,26% en el cas de les proteïnes de mamífers (Miseta and Csutora 2000). Una altra característica de la cisteïna és la reactivitat d'aquest aminoàcid en comparació amb altres aminoàcids. La cadena lateral de les cisteïnes és considerada el nucleòfil més potent de totes les cadenes laterals dels aminoàcids en condicions fisiològiques. Aquesta reactivitat és deguda a la presència del grup tiol. La cisteïna és potser el residu implicat en la senyalització redox més ben caracteritzat. El grup tiol de la cadena lateral de la cisteïna (-SH), pot actuar com una diana de la senyalització redox

i la homeòstasi. La forma protonada del grup tiol (-SH) no és particularment reactiva, però la forma desprotonada (-S⁻) és nucleofílica, ja que és rica en electrons disponibles. Per aquesta raó, no tots els tiols les cisteïnes són igual de reactius. De fet, aquesta reactivitat inherent ve condicionada per una sèrie de factors, incloent l'accessibilitat i la constant de dissociació (pKa) del grup tiol (Wall et al. 2012).

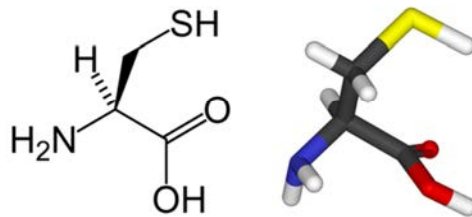


Figura 10. Estructura de l'aminoàcid cisteïna.

D'aquesta forma, els tiols que tenen un pKa relativament baix tendeixen a existir en la seva forma desprotonada (-S⁻) i són per tant, més susceptibles a ser modificats per espècies reactives. La cisteïna és considerada un àcid tripròtic, amb un valor de pKa del grup tiol de 8.2 (Tajc et al. 2004). En general els tiols es consideren àcids suaus però el microambient proteic, és a dir, els aminoàcids que envolten una determinada cisteïna, poden influenciar molt el valor del pKa, especialment si es tracta d'un aminoàcid carregat positivament com una lisina o una arginina (Conte and Carroll 2013). Aquest grup tiol esdevé un fort nucleòfil que pot reaccionar amb oxidants i espècies electrofíliques, tot i que algunes interaccions amb residus específics i metalls poden establir la forma tiolada. Degut a aquesta reactivitat, el grup tiol de la cisteïna pot desenvolupar un paper biològic essencial pel que fa a la catàlisi, i actuar com una diana important de les modificacions postraduccionals. Una altra característica important és que el pKa és important en determinar l'especificitat de les modificacions de les espècies reactives, com el peròxid d'hidrogen o els electròfils. Així, la forma desprotonada pot participar en varies reaccions amb les espècies reactives electrofíliques, demostrant en alguns casos, modificacions específiques de certs residus de cisteïna dins d'una mateixa proteïna per diferents espècies reactives (Renedo et al. 2007). Per tant, el grup tiol reactiu de la cadena lateral del residu de cisteïna pot actuar

com a sensor o interruptor, oscil·lant entre un estat reduït i oxidat en resposta a les fluctuacions en varis ROS/NOS. Depenent de la seva concentració local, els ROS/NOS poden reaccionar amb cisteïnes per formar alguna de les moltes modificacions reversibles (S-nitrosilació, la formació de l'àcid sulfènic, la S-glutatiolació, la formació de ponts disulfur inter- i intramoleculars) o modificacions irreversibles (formació de l'àcid sulfínic i sulfònic)(Figura 11).

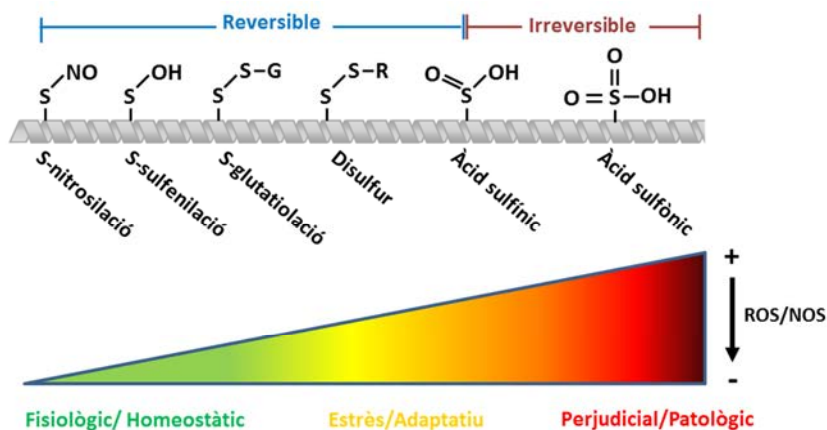


Figura 11. Modificacions oxidatives de l'aminoàcid cisteïna. Es mostren els tipus de modificacions reversibles i irreversibles més comuns que tenen lloc al grup tiol de la cadena lateral del residu de cisteïna. A mesura que els nivells de ROS/NOS augmenten, les proteïnes comencen a experimentar modificacions que es vinculen amb processos. Adaptat de (Murray and Van Eyk 2012).

L'oxidació irreversible de tiols s'ha descrit com un marcador de fallida dels mecanismes protectors i també un indicador de patologia relacionada amb l'estrès oxidatiu. En canvi, les oxidacions reversibles estan relacionades amb la catàlisi enzimàtica i la regulació de l'activitat proteica (Finkel 2003). Algunes d'aquestes modificacions tan reversibles com irreversibles en els residus de cisteïna, es detallen a continuació:

i) Modificacions per Nitrosilació:

La nitrosilació és una modificació redox postraduccional, resultat de la unió covalent de l'ió NO^+ o de les espècies derivades de l'òxid nítric al grup tiol de les cisteïnes. En condicions fisiològiques, la nitrosilació pot modular la funció de proteïnes, jugant així

un paper dinàmic en multitud de processos biològics. Igual que en altres modificacions postraduccionals, la S-nitrosilació pot desencadenar canvis conformacionals en les proteïnes, activar i inhibir l'activitat, alterar les interaccions proteïna-proteïna, afectar l'agregació o modificar-ne la localització intracel·lular.

En mamífers s'ha descrit que aquestes alteracions afecten les vies de transducció de senyal i inclús la funció neuronal (J. Qu et al. 2011). No obstant, en condicions patològiques degut als propis processos d'envelliment o a l'exposició a agents ambientals que generen NO en excés, poden tenir lloc reaccions de nitrosilació aberrants que desencadenen processos de destrucció cel·lular que a la llarga, poden contribuir en processos de neurodegeneració. Algunes de les conseqüències mediades per aquesta modificació redox inclouen el mal plegament de proteïnes, estrès de reticle endoplasmàtic, disfunció mitocondrial, degeneració sinàptica i apoptosi (Cho et al. 2010). A més, aquesta excitotoxicitat associada a aquests tipus d'estrès està implicada en nombrosos desordres neurològics, com per exemple, la malaltia de l'Alzheimer (Q. Zhao, Yu, and Tan 2015). A més a més, els canvis conformacionals resultants de les modificacions per nitrosilació, poden facilitar una posterior oxidació mediada per altres ROS resultant en la formació d'àcid sulfènic, sulfínic i sulfònic. També s'ha descrit que les modificacions per nitrosilació poden influenciar la generació d'altres modificacions postraduccionals addicionals en el residu de cisteïna (Nakamura, , Shichun Tu, Mohd Waseem Akhtar, Carmen R. Sunico, and Okamoto 2014). Per exemple, quan dues cisteïnes es troben molt properes en l'espai, la nitrosilació d'una d'elles pot facilitar la formació d'un pont disulfur entre ambdues. Les cisteïnes nitrosilades també poden reaccionar amb el glutatió (Martínez-ruiz and Lamas 2007) i actuar com a intermediàries de la glutatiolació de proteïnes *in vivo*.

ii) Formació de l'àcid sulfènic, sulfínic i sulfònic:

La sulfenilació o la formació de l'àcid sulfènic (Cys-SOH) és una de les modificacions que sofreix el grup tiol de les cisteïnes degut a la reacció amb les ROS (Figura 12). S'ha vist que en presència d'oxigen molecular o metalls pesats, l'àcid sulfènic pot ser format espontàniament en les proteïnes, inclús en absència d'agents oxidants exògens. No obstant, la major font de generació de Cys-SOH és la reacció del grup tiol amb el H₂O₂ o

el peroxinitrit (Reddie and Carroll 2008). Des del punt de vista químic, l'àcid sulfènic presenta un comportament tan electrofílic com nucleofílic, estant implicat en una gran varietat de reaccions com la catàlisi enzimàtica i la senyalització cel·lular. Els tiols de les proteïnes poden reaccionar amb el grup R-SOH i generar un disulfur mix, constituint així el primer mecanisme de generació de ponts disulfurs en proteïnes. Degut a la seva naturalesa reactiva, l'àcid sulfènic es considera un intermediari transitori en les vies de formació de productes amb tiols oxidats més estables. És per això, que la majoria dels àcids sulfènics generats en els sistemes biològics participen en alguna de les moltes possibles reaccions que poden resultar en la formació de productes oxidats secundaris (com l'àcid sulfínic o sulfònic) o en la regeneració del grup tiol a partir d'un agent reductor (Kettenhofen and Wood 2010).

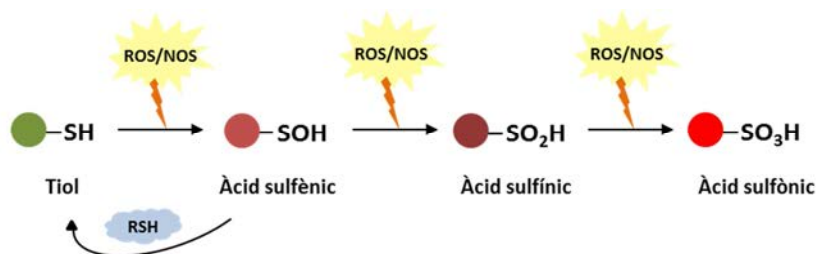


Figura 12. Formació de l'àcid sulfènic, sulfínic i sulfònic. El grup tiol de la cisteïna pot ser oxidat a àcid sulfènic en condicions d'estrès oxidatiu. No obstant, pot ser reduït al tiol original gràcies a l'acció d'un reductor (RSH) o, si les condicions d'estrès oxidatiu persisteixen, es pot acabar generant l'àcid sulfínic o inclús la forma més oxidada i irreversible, com l'àcid sulfònic.

A més d'actuar com a intermediari en la formació de disulfurs, l'àcid sulfènic també és un intermediari en l'oxidació dels tiols a àcid sulfínic (R-SO₂H) i àcid sulfònic (R-SO₃H). De fet, s'estima que un 5% de les cisteïnes de les proteïnes es troben en la forma d'àcid sulfínic o àcid sulfònic (Hamann et al. 2002). L'àcid sulfínic es pot formar a partir de la reacció de l'àcid sulfènic amb oxidants, com el H₂O₂. A diferència dels sulfènics, els sulfínics no reaccionen amb tiols en condicions fisiològiques i no poden ser reduïts pels sistemes reductors de la cèl·lula, com les tioredoxines o el GSH. De fet, l'àcid sulfínic és considerava irreversible fins al descobriment de la sulfiredoxina (Srx), una àcid sulfínic reductasa dependent d'ATP (Biteau, Labarre, and Toledano 2003). Tan l'àcid sulfènic com l'àcid sulfínic s'han descrit com a modificacions que tenen la capacitat de modular

l'activitat de certes proteïnes (T. Murakami et al. 2000)(Fu et al. 2001). L'àcid sulfínic és un intermediari estable, però pot ser oxidat cap a la forma d'àcid sulfònic, la forma més oxidada del grup tiol i considerada com un dany oxidatiu més que una modificació senyalitzadora. Els agents oxidants com l' H_2O_2 i l'àcid nítric, són capaços de formar àcids sulfònics a partir dels tiols. L'oxidació irreversible cap a àcid sulfònic pot desencadenar la inhibició d'una proteïna, la formació d'agregats proteics o la senyalització de la proteïna per a la seva posterior degradació (Tasaki and Kwon 2007).

iii) **Formació de ponts disulfur:**

Es coneix que la formació de ponts disulfur en les proteïnes és una modificació que en condicions normals, té lloc predominantment al reticle endoplasmàtic. Aquest orgànul proveeix d'un ambient oxidant, facilitant la formació de ponts disulfur a les proteïnes recent sintetitzades i que han de ser transportades a altres orgànuls (Go and Jones 2008). De forma contrària, el citoplasma, el nucli i la matriu mitocondrial es consideren ambients reductors. En aquests compartiments, les cisteïnes es mantenen en la seva forma de tiol, gràcies al GSH i a les activitat Trx/Grx (C Berndt, Lillig, and Holmgren 2007). No obstant, en resposta a un senyal extern o degut a condicions d'estrès, aquests orgànuls esdevenen més oxidants, permetent la generació de ponts disulfur en proteïnes, fins que el balanç redox es restableix (Paulsen and Carrol 2010).

- **Mecanismes de formació de ponts disulfur:**

La formació d'un pont disulfur és una reacció de dos electrons que requereix d'un oxidant i un acceptor d'electrons. *In vitro*, els ponts disulfur es poden generar espontàniament per la pèrdua d'electrons de dos grups tiols de les cisteïnes, amb el subseqüent guany d'aquests electrons per part d'un acceptor, com podria ser l'oxigen. No obstant, *in vivo*, el mecanisme de formació de ponts disulfur més comú és la reacció d'intercanvi tiol-disulfur. Aquesta reacció bé pot tenir lloc entre una proteïna i qualsevol altre substrat que contingui un grup tiol, com és el cas del glutatió, o entre una proteïna i una altra proteïna que ja tingui un pont disulfur. En aquest cas es

parlaria d'un pont disulfur intermolecular. Quan el pont disulfur es genera entre dues cisteïnes de la mateixa proteïna s'anomena pont disulfur intramolecular. En les reaccions d'intercanvi, una proteïna i/o molècula com el glutatió, que contingui un grup tiol en la seva forma desprotonada ($-S^-$), desplaça un dels àtoms de sofre que està formant part d'un pont disulfur d'una proteïna ja oxidada. Aquesta reacció resulta en la formació d'un pont disulfur transitori entre les dues proteïnes (o entre una proteïna i el glutatió). En una segona reacció d'intercanvi, el tiol desprotonat romanent, ataca el pont disulfur mix. El resultat d'aquest intercanvi tiol-disulfur és l'oxidació de la proteïna inicialment reduïda i la reducció de l'altre component redox inicialment oxidat (Sevier and Kaiser 2002). La reacció que tindria lloc s'exemplifica a la Figura 13.

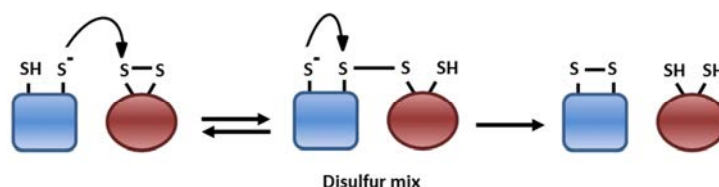


Figura 13. Generació d'un pont disulfur a través d'una reacció d'intercanvi

Aquestes reaccions d'intercanvi també poden tenir lloc a nivell intramolecular. Després que hagi tingut lloc un intercanvi tiol-disulfur, l'estat redox de les cisteïnes pot ser recuperat a través d'un altre cicle catalític dut a terme per alguna altra proteïna, o a partir del glutatió. Més endavant, es detallarà el paper de les tiol oxidoreductases, enzims amb capacitat de catalitzar reaccions d'intercanvi tiol-disulfur per promoure la formació o la reducció de ponts disulfur.

- Conseqüències de la formació de ponts disulfur:

La formació de ponts disulfur pot afectar l'activitat catalítica, les interaccions proteïna-proteïna i inclús, la localització subcel·lular d'una proteïna. De fet, aquest tipus de modificació s'ha descrit implicada en la regulació d'una gran varietat de processos biològics, com l'homeòstasi redox, l'activitat xaperona, el metabolisme, la regulació transcripcional i la traducció de proteïnes. Un dels primers exemples descrits de

regulació a través de la formació de ponts disulfur va ser el cas del factor transcripcional OxyR d'*E. coli* (Figura 14). Els estudis bioquímics van demostrar que aquesta proteïna és sensible a l'oxidació per H_2O_2 i s'activa degut a la formació d'un pont disulfur entre dues de les seves cisteïnes, unint-se així al promotor dels seus gens diana. Un cop activat, aquest factor activa l'expressió de Grx1 (*grxA*) i de la glutatió reductasa (*gorA*), els propis sistemes antioxidants encarregats de reduir el pont disulfur de OxyR i tornar-lo al seu estat reduït inicial, i representant així, un sistema d'autoregulació (Zheng, Aslund, and Storz 1998). Aquests resultats van suposar un dels primers exemples de senyalització redox a través de la formació de ponts disulfur.

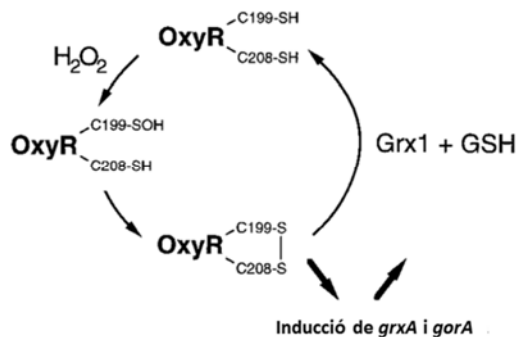


Figura 14. Model d'activació i desactivació de OxyR. Degut a l'exposició a H_2O_2 , C199 de OxyR és oxidada a àcid sulfènic. Aquest intermediari reactiu reacciona amb C208 per formar un pont disulfur estable, activant així a OxyR, que a la vegada activarà la transcripció de Grx1 i de la Glutatió reductasa. Quan el pont disulfur de la forma activada de OxyR és reduït pel sistema glutaredoxina, OxyR torna a la seva forma inactiva, tractant-se d'una resposta completament autoregulada (Zheng, Aslund, and Storz 1998).

En el cas d'eucariotes, el primer exemple descrit de regulació d'una proteïna a partir de la formació de ponts disulfur en resposta a H_2O_2 , va ser el cas del factor transcripcional Yap1 en *S. cerevisiae* (Delaunay, Isnard, and Toledano 2000). En aquest cas, Yap1 s'activa quan es forma un pont disulfur entre dues cisteïnes en resposta a H_2O_2 (Figura 15). Conseqüentment, Yap1 experimenta un canvi conformacional, que emmascara la seqüència NES i per tant, impedeix la interacció Yap1-Crm1, Yap1 s'acumularà al nucli, i induirà la transcripció de gens diana. Igual que en el cas del factor transcripcional OxyR, es tracta d'un mecanisme d'autoregulació, doncs el sistema tioredoxina dependent de Yap1, redueix els ponts disulfurs de Yap1, tornant així a la conformació inicial, on la

seqüència NES queda exposada i pot ser reconeguda per l'exportina Crm1, la qual facilita la sortida de Yap1 del nucli (Wood, Storz, and Tjandra 2004).

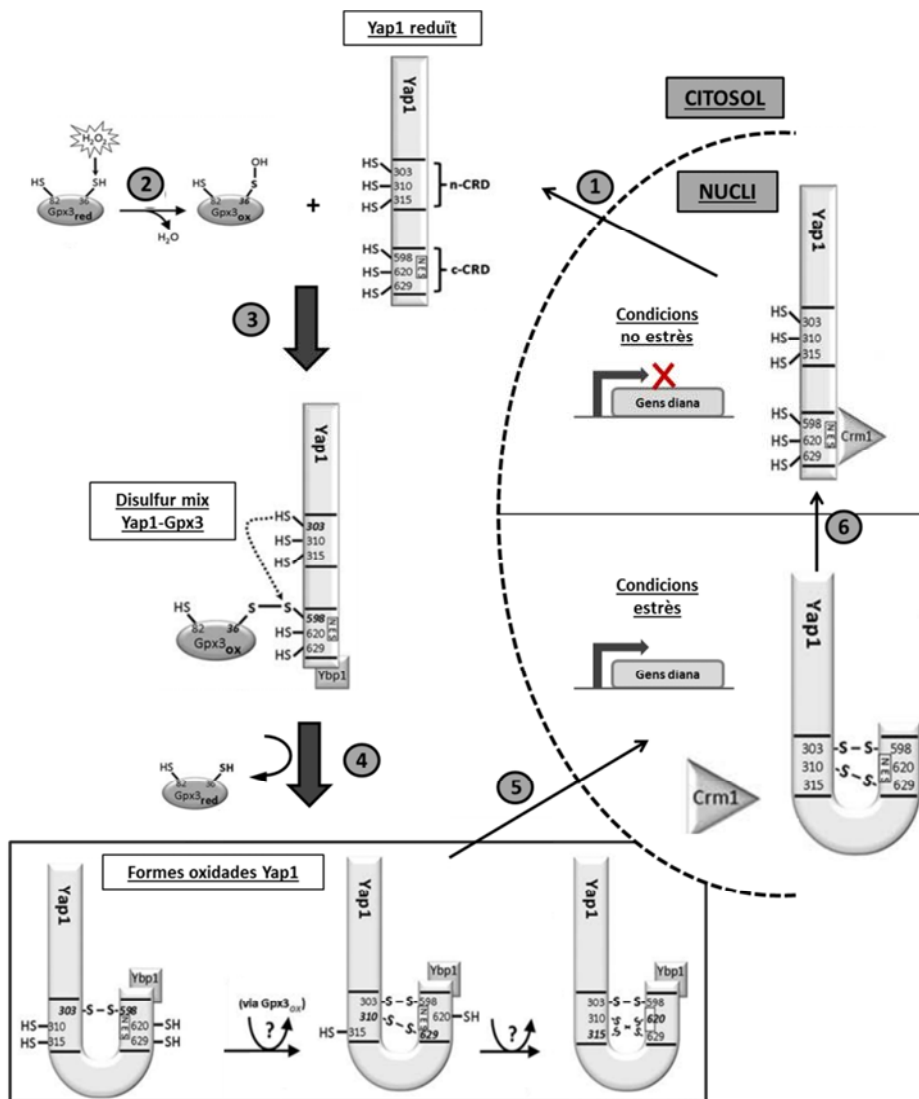


Figura 15. Model d'activació redox Yap1-Gpx3. (1) En condicions control, les cisteïnes de Yap1 es troben reduïdes, deixant accessible el domini NES d'interacció amb Crm1, que mantindrà Yap1 fora del nucli. (2) Quan les cèl·lules es troben sotmeses a un estrès oxidatiu per H₂O₂, la cisteïna del centre actiu de Gpx3 es oxida a àcid sulfènic i que posteriorment, (3) reaccionarà amb C598 de Yap1, generant un disulfur mix Yap1-Gpx3. (4) C303 de Yap1 atacarà al pont disulfur mix, generant un pont disulfur intramolecular, i donant com a Gpx3 reduïda. Altres ponts disulfur intramoleculars són generats de forma Gpx3 dependent. (5) Els ponts disulfur generats en Yap1 permetran emmascarar la senyal NES, Crm1 no reconeixerà a Yap1 i aquesta es podrà acumular al nucli, activant la resposta a estrès oxidatiu, (6) entre la qual es troben les tiorredoxines dependentes de Yap1 que són les que tornaran a Yap1 al seu estat reduït.

Són molts els exemples on s'ha descrit la regulació de processos biològics per la formació de ponts disulfur en proteïnes (Taula 1).

Proteïna	Efecte de l'oxidació	Referència
PTEN	Inactivació	(Kwon et al. 2004)
Cdc25	Inactivació	(Savitsky and Finkel 2002)
PTP2α	Inactivació	(J. Yang et al. 2007)
PKG-1α	Augment afinitat substrats	(Burgoyne et al. 2007)
ASK1	Activació	(Nadeau et al. 2007)
AP-1	Inhibeix unió al DNA	(Abate et al. 1990)
Hsf1	Activació	(Manalo, Lin, and Liu 2002)
FoxO4	Inactivació	(Dansen et al. 2009)
OxyR	Activació	(Zheng, Aslund, and Storz 1998)
Yap1	Activació	(Delaunay, Isnard, and Toledano 2000)
Pap1	Activació	(Vivancos et al. 2004)
Hsp33	Activació	(Ilbert et al. 2007)
HDAC4/DnaJb5	Inactivació	(Ago et al. 2008)

Taula 1. Exemples de proteïnes regulades per la formació de ponts disulfur.

iv) Modificació de proteïnes per S-glutatiolació

La glutatiolació és un altre tipus de modificació dels residus de cisteïna que degut a la importància en aquest treball, se li dedicarà un apartat especial (apartat 3 de la Introducció)

3. GLUTATIOLACIÓ

La glutatiolació és una modificació postraduccional específica dels residus de cisteïna, que consisteix en la unió del tripèptid glutatió al grup tiol de les proteïnes. Tot i que és un modificació coneguda des de fa temps, la idea original es basava en el seu paper com una conseqüència del dany cel·lular, per exemple, degut a radiacions (Modig 1968) o a productes com el paraquat (Brigelius, Lenzen, and Sies 1982). Ara es coneix que la

glutatiolació és promoguda per l'estrès oxidatiu, però també pot tenir lloc en cèl·lules no estressades. Mentre que algunes modificacions, com l'oxidació a àcid sulfònic, són irreversibles i estan més relacionades amb el dany oxidatiu que amb la regulació redox, la glutatiolació es tracta d'un procés reversible.

3.1. El glutatió

El glutatió (GSH) és el millor exemple de defensa antioxidant no enzimàtica. Es tracta d'un tripèptid constituït pels aminoàcids àcid glutàmic, cisteïna i glicina (Figura 16). És sintetitzat al citosol mitjançant els enzims γ -glutamil-cisteïna sintetasa i glutatió sintetasa, codificats per *GSH1* i *GSH2*, respectivament en *S. cerevisiae*. El glutatió suposa el tiol de baix pes molecular més important i abundant en la majoria dels tipus cel·lulars.

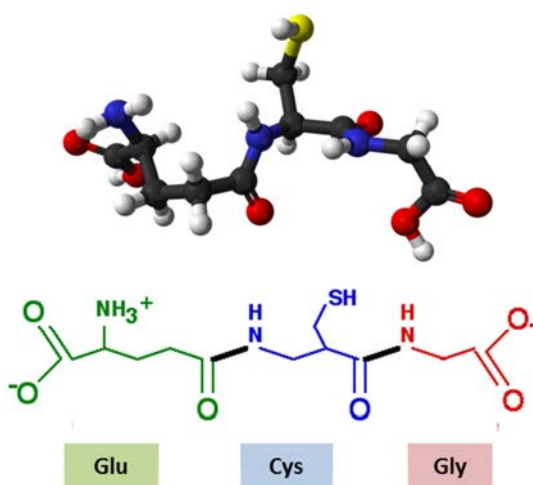


Figura 16. Estructura del glutatió. Aquest antioxidant és un tripèptid (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) format per la unió dels aminoàcids: àcid glutàmic (verd), cisteïna (blau) i glicina (vermell).

En la seva forma reduïda, el glutatió és capaç de protegir les cèl·lules envers les espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen, contribuint així al control de l'homeòstasi redox. Concretament, el GSH assumeix rols essencials pel que fa a la bioreducció, protecció envers l'estrès oxidatiu, detoxificació de xenobiòtics i de metabòlits

endògens tòxics, transport cel·lular, activitats enzimàtiques i metabolisme (Penninckx 2002). En les cèl·lules, el glutatió es pot trobar lliure o unit a les proteïnes. El glutatió lliure es troba predominantment en la seva forma reduïda, però igual que la majoria de molècules que contenen un residu de cisteïna, el glutatió pot ser ràpidament oxidat, formant-se un pont disulfur entre dues molècules de glutatió, generant així la forma oxidada del glutatió (GSSG). La formació d'aquest dímer té lloc quan el glutatió reacciona amb un electró de les ROS o d'una proteïna ja oxidada i esdevé reactiu, especialment cap a altres tiols, sent la glutatió reductasa l'enzim essencial en la conversió del GSSG a GSH (Asnis 1955). El sistema del glutatió actua com el principal tampó redox de les cèl·lules i és per tant, el responsable de l'ambient intracel·lular reductor (Couto, Wood, and Barber 2016), protegint a les cèl·lules dels efectes perjudicials de l'estrès oxidatiu mitjançant la glutatiolació de proteïnes (Cuozzo and Kaiser 1999).

Les cèl·lules en condicions fisiològiques presenten un ambient reductor, amb una concentració de GSH d'entre 1 mM i 10 mM, tan en cèl·lules procariotes com eucariotes, amb un rati de $[GSH]/[GSSG]$ que pot anar de 30:1 a 100:1 (Bass et al. 2004), però pot ser de tan sols 3:1 en compartiments com el lumen del reticle endoplasmàtic. El manteniment òptim del rati GSH/GSSG en la cèl·lula és crític per la supervivència cel·lular i molt important en la regulació de l'estat redox dels tiols de les proteïnes. Canvis en el rati GSH/GSSG poden tenir conseqüències en gran quantitat de proteïnes diana, causant oxidació i reaccions d'intercanvi de disulfurs en residus específics de cisteïnes. Mitjançant l'ús de sondes redox, s'han pogut determinar els potencials redox del glutatió en diferents compartiments de *S. cerevisiae*, amb els quals es va observar que els requeriments del glutatió estaven associats als diferents processos metabòlics que tenen lloc en aquests compartiments (Dardalhon et al. 2008). Així, mentre que la matriu mitocondrial es troba en un ambient més reduït que el citosol (-296 mV a pH= 7,4 respecte -286 mV a pH= 7.0), la membrana interna es troba en un estat més oxidat (-255 mV). En canvi, el nucli i el citosol presenten un ambient redox bastant similar (-291 mV i -286 mV, respectivament a pH= 7.0). Aquesta tendència es va observar també en la línia cel·lular HeLA (Dooley et al. 2004)(Hanson et al. 2004). Val a dir però, que tot i que el citoplasma i el nucli presenten potencials redox

similars en cèl·lules quiescents i diferenciades, aquest no és el cas per les cèl·lules que s'estan dividint; tan en cèl·lules en divisió d'animals i plantes, s'ha vist que els nivells de GSH al nucli són fins a quatre vegades superiors als valors del citoplasma. Per tant, el glutatió jugaria un paper important en la proliferació cel·lular (Pallardó et al. 2009). Una de les possibles formes en les que el GSH nuclear podria influenciar la proliferació cel·lular seria a través de la glutatiolació. De fet, hi ha evidències que la glutatiolació té lloc en un gran nombre de situacions fisiològiques. Un gran nombre de proteïnes nuclears, incloent factors transcripcionals, requereixen d'un ambient relativament reduït per tal que pugui tenir lloc la unió dels factors transcripcionals i l'activació de la resposta transcripcional en resposta a l'estrès oxidatiu (Hudson, Gannon, and Thorpe 2015). Es coneix que l'alteració de les condicions redox del nucli modulen la conformació i l'estabilitat de la cromatina. En canvi, i a diferència de la resta de compartiments, el reticle endoplasmàtic és el més oxidant, necessari per dur a terme el plegament de les proteïnes (-208 mV a pH= 7.0 pel cas de la línia cel·lular HeLA). En canvi,

La importància fisiològica de la molècula de glutatió està relacionada amb les seves propietats físico-químiques (Deponte 2013). El grup tiol fa que el GSH posseeixi propietats nucleofíliques que permeten la seva conjugació amb compostos electrofílics, com les espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen, els xenobiòtics, contaminants, drogues i compostos carcinogènics (Sies 1999)(Dringen et al. 2015). El GSH té capacitat d'unir-se a compostos electrofílics tòxics i eliminar-los a la vacuola a través de bomba conjugada a glutatió Ycf1 (Z. S. Li et al. 1997). De fet, hi ha una connexió entre el GSH i la vida aeròbica. Els alts nivells de GSH presents als cianobacteris i als bacteris fotosintètics apunten a que el GSH va emergir quan les condicions aeròbiques es van estendre a la terra (Fahey 2001). El GSH també pot actuar com un donador d'electrons (cofactor) per alguns enzims antioxidants com les glutatió peroxidases o les glutatió transferases (Board and Menon 2013). Per tant, el GSH sembla haver aparegut en l'evolució com un agent protector envers els danys oxidants. Fins al coneixement actual, sembla que el GSH es troba present en tots els eucariotes. Alguns experiments van concloure que nivells crítics de GSH, que podien representar un 10% dels valors normals del contingut de GSH total, afectaven de forma severa el creixement de *S.*

cerevisiae (Mehdi and Penninckx 1997). Els mutants deficients en el gen *GSH1*, que codifica per un dels enzims involucrats en la biosíntesi del GSH, són incapaços de sintetitzar el tripèptid i requereixen de GSH exogen per sobreviure i créixer en medi mínim. A més, els mutants per *GSH1* van mostrar hipersensibilitat a les ROS, incloent l' H_2O_2 , l'anió superòxid i els hidroperòxids lipídics (Stephen and Jamieson 1996). No obstant, tot i ser hipersensibles als oxidants, són encara capaços d'induir una resposta adaptativa front el H_2O_2 , suggerint que el GSH no és important com a sensor en les respostes a aquest tipus d'estrès (Stephen and Jamieson 1996). Un altre fenotip descrit en aquests mutants és que no tenien capacitat de créixer en fonts de carboni no fermentables, apuntant a la importància del GSH en la funció mitocondrial (C M Grant, Maclver, and Dawes 1996). Estudis més recents van mostrar que el GSH és essencial per mantenir la integritat del genoma mitocondrial (J. C. Lee et al. 2001).

És ben coneguda la importància que juga el glutatió en diferents malalties humanes (Townsend, Tew, and Tapiero 2003). Per exemple, s'ha observat que alteracions en l'homeòstasi del GSH que poden donar lloc a una situació d'estrès oxidatiu, estan relacionades amb malalties neurodegeneratives com la malaltia de Parkinson. En un estudi clínic, els pacients afectats per aquesta malaltia als quals se li administrava GSH, milloraven la seva simptomatologia (Sechi et al. 1996). A més, sembla que hi ha una correlació clara entre l'envelliment i els baixos nivells del rati GSH:GSSG o del GSH total. Un estudi va demostrar que els cervells de rates envellides presentaven menor expressió dels enzims γ -glutamyl-cisteïna sintetasa i glutatió sintetasa, ambdós implicats en la síntesi *de novo* del glutatió, i que això venia acompanyat d'una menor activitat de l'enzim, així com menors nivells de GSH total, fet que també es va observar en ratolins afectats d'Alzheimer (H. Liu et al. 2004). Per una altra banda, s'ha observat que un increment dels nivells intracel·lulars de glutatió, fa a les cèl·lules més resistents a certs agents antitumorals, a radiació i als efectes oxidants. En canvi, les teràpies que disminueixen els nivells de glutatió normalment promouen una sensibilització a certes drogues, a la radiació i a l'oxidació (Traverso et al. 2013).

3.2. Mecanismes de la modificació per glutatiolació:

La glutatiolació de proteïnes pot tenir lloc segons diferents tipus de mecanismes (P Ghezzi 2005):

- i) **Formació per intercanvi tiol-disulfur amb el GSSG:** Aquesta reacció ve determinada per una alteració en el rati GSH/GSSG (Figura 17). Es creu que la glutatiolació normalment té lloc a partir d'aquest mecanisme.



Figura 17. Glutatiolació d'una proteïna per intercanvi tiol-disulfur amb el GSSG.

- ii) **Formació via àcid sulfènic:** Les cisteïnes poden ser oxidades a àcids sulfènics, sulfínics i sulfònics. Els últims són estables i són considerades formes oxidades irreversibles. No obstant, l'àcid sulfènic generat a partir del H_2O_2 , pot reaccionar amb el GSH o amb una altra molècula que contingui un grup tiol i acabar donant lloc a una proteïna glutatiolada (Figura 18). Alternativament, l'àcid sulfènic també pot provenir de l'oxidació a partir del peroxinitrit.

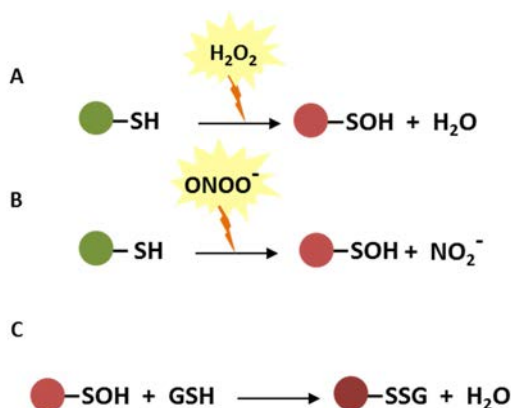


Figura 18. Glutatiolació d'una proteïna via àcid sulfènic. L'àcid sulfènic generat a partir del (A) H_2O_2 o del (B) peroxinitrit (C) pot acabar reaccionant amb el GSH i donar lloc a una proteïna glutatiolada.

iii) **Formació per oxidació directa:** Aquesta reacció normalment està catalitzada per agents oxidants (Figura 19). La diamida seria un exemple d'agent oxidat específic de tiols que podria dur a terme la glutatiolació segons aquest mecanisme.

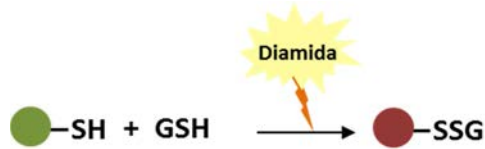


Figura 19. Glutatiolació d'una proteïna per oxidació directa.

La diamida es va utilitzar en aquest treball com un agent capaç de causar la glutatiolació de les proteïnes (Figura 20). Es tracta d'un agent exogen, permeable a les membranes, específic de tiols, capaç d'oxidar reversiblement el GSH a GSSG i de promoure la formació de ponts disulfur mixtes entre proteïna i GSH.

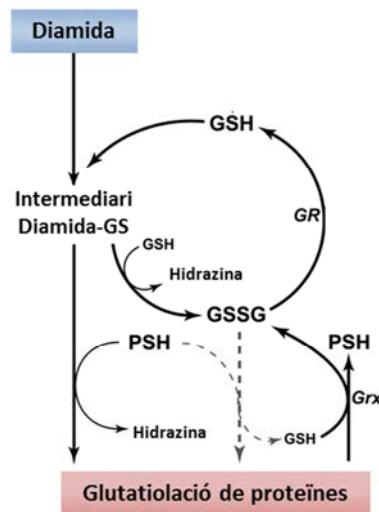


Figura 20. Metabolisme de la diamida. Aquest agent exogen provoca la glutatiolació de proteïnes. L'esquema mostra la via enzimàtica responsable del manteniment del GSH i les dues vies per les quals la diamida indueix la glutatiolació. La glutatió reductasa (GR) converteix el GSSG en GSH mentre que la glutaredoxina (Grx) catalitza la desglutatiolació utilitzant GSH (Lock, Sinkins, and Schilling 2011).

iv) **Formació a partir de nitrotiols:** Els nitrotiols es poden generar a partir de la reacció del NO amb el grup tiol de les proteïnes o del GSH, formant les formes PSNO o

GSNO, respectivament. Aquesta proteïna nitrada podrà reaccionar amb el GSH i s'acabarà generant la glutatiolació de la proteïna (Figura 21A). Per una altra banda, també pot succeir que el nitroglutatió reaccioni amb una proteïna reduïda i aquesta s'acabi glutatiolant (Figura 21B).



Figura 21. Glutatiolació d'una proteïna a partir de nitrotiols. (A) L'oxidació d'un tiol a partir del NO pot donar lloc a la forma oxidada PSNO, que al reaccionar amb el GSH donarà lloc a una proteïna glutatiolada. (B) Alternativament, el NO també pot oxidar el GSH formant el GSNO. Aquest podrà reaccionar amb una proteïna reduïda, glutatiolant-la.

v) **Glutatiolació a partir del radical tiíl:** L' OH^\cdot pot reaccionar tan amb els tiols de les proteïnes com del GSH, i acabar formant un radical tiíl. Aquests podran reaccionar entre ells i generar una proteïna glutatiolada (Figura 22).

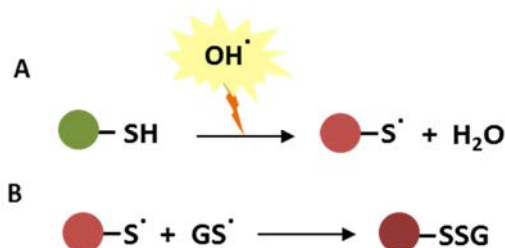


Figura 22. Glutatiolació d'una proteïna a partir del radical tiíl. (A) La reacció del radical hidroxil amb una proteïna reduïda pot donar lloc al radical tiíl. (B) La reacció entre radicals tiíls d'una proteïna i el GSH pot donar lloc a la proteïna glutatiolada.

Es coneix que les glutaredoxines catalitzen eficientment la desglutatiolació de les proteïnes, però també poden reaccionar amb els radicals tiíls del glutatió, facilitant la conversió del radical tiíl a GSSG o transferir el radical tiíl a una proteïna, generant així una glutatiolació en aquesta (Starke, Chock, and Mieyal 2003).

3.3. Especificitat de la glutatiolació:

Pel que fa a l'especificitat de la glutatiolació de proteïnes, es coneix que no tots els grups tiol són igual de susceptibles a ser glutatiolats. S'ha suggerit que almenys són dos els factors que determinen la susceptibilitat d'una cisteïna en concret. Per una banda, és important tan la posició de la cisteïna en l'estructura 3D com l'accessibilitat a la proteïna en concret, donat que el GSH no és una molècula petita. Per l'altra banda, un altre factor determinant és la reactivitat de la cisteïna en qüestió, determinada en gran part pels aminoàcids que l'envolten. Així, els aminoàcids més bàsics afavoreixen el pont disulfur mix entre GSH i proteïna, mentre que si els aminoàcids que envolten la cisteïna són àcids, l'efecte és contrari. D'altra banda, altres factors més específics poden determinar-ne la susceptibilitat. Per exemple, la glutatiolació pot ser reduïda per un altre tiol que es trobi molt proper. Aquest seria el cas de les tioredoxines i les glutaredoxines que presenten les seqüències CXXC, i on cap de les dues cisteïnes pot formar un disulfur mix estable amb el glutatió (Casagrande et al. 2002).

3.4. Conseqüències de la glutatiolació:

La glutatiolació de proteïnes, ja siguin estructurals o funcionals, pot tenir varies conseqüències biològiques. En el cas dels enzims, la glutatiolació normalment implica la inhibició de la seva activitat. Aquest fet és particularment evident en els enzims del metabolisme energètic i de la via glicolítica, i normalment s'explica per la presència d'una cisteïna diana al centre actiu de l'enzim (P Ghezzi 2005). També s'ha descrit la inhibició per glutatiolació de factors transcripcionals com Jun (Klatt, Molina, and Lamas 1999) i NF- κ B (Pineda-Molina et al. 2001). En el cas dels factors transcripcionals, la inhibició acostuma a tenir lloc degut al fet que la glutatiolació incorpora la càrrega negativa del GSH al domini d'unió a DNA que estava carregat positivament, alterant així la unió del factor transcripcional a la seva regió diana del DNA (Brar et al. 2004).

Cal tenir en compte que la glutatiolació d'un residu de cisteïna no suposa el mateix efecte que el produït quan es bloqueja el centre actiu amb un agent alquilant o quan es muta la cisteïna diana (P Ghezzi 2005). Per exemple, els mutants del factor

transcripcional c-Jun sense la cisteïna que s'ha descrit que es glutatiola es poden seguir unint al DNA, però no respon a l'oxidació del tiol. De fet, a diferència de quan es bloqueja la cisteïna, la unió del GSH a una proteïna afecta la seva activitat degut a l'impediment estèric o a canvis en el punt isoelèctric. Per tant, els mecanismes de la glutatiolació són diferents d'altres formes de S-tiolació. La glutatiolació pot tenir altres efectes i per exemple, en el cas de la proteasa HIV-1, la glutatiolació de C95 inhibeix la seva activitat, mentre que la glutatiolació de C67 estabilitza l'enzim (Davis et al. 1996). A més, aquesta modificació redox pot tenir altres funcions. Per exemple, si una cisteïna és glutatiolada, no estarà disponible per altres reaccions oxidatives. En aquest sentit, la glutatiolació pot ser considerada com una forma de protecció de les cisteïnes més sensibles contra l'oxidació a altres formes irreversibles. Així, es permet a la cèl·lula recuperar la funció pròpia de la proteïna una vegada s'ha superat les condicions adverses d'estrès oxidatiu. La Taula 2 mostra alguns dels múltiples exemples dels efectes de la glutatiolació en diferents proteïnes.

Proteïna	Conseqüència	Referència
Anhidrasa carbònica III	Augment activitat fosfatasa	(E Cabisco and Levine 1996)
PTP1B	Inhibició activitat fosfatasa	(Barrett et al. 1999)
STAT3	Inhibició senyalització	(Xie et al. 2009)
HSP70	Guany funció xaperona	(G. Hoppe et al. 2004)
Caspasa 3	Inhibició activitat proteasa	(Z. Huang et al. 2008)
Actina	Disminució polimerització	(J Wang et al. 2001)
GAPDH	Inhibició activitat enzimàtica	(Ravichandran et al. 1994)
SIRT1	Inhibició activitat desacetilasa	(Bräutigam et al. 2013)

Taula 2. Exemple dels efectes de la glutatiolació en diferents proteïnes.

De la taula resum anterior s'arriba a la conclusió que la glutatiolació suposa un mecanisme regulador. No obstant, quan s'estudia la glutatiolació en termes de patologies humanes, s'observa que aquest tipus de modificació es veu augmentada com a conseqüència d'un estrès oxidatiu i que la majoria de vegades comporta una pèrdua de funció de les proteïnes. La Taula 3 mostra un resum de les proteïnes que

s'han detectat en nivells alts de glutatiolació en diferents tipus de condicions i malalties humanes.

Condicció	Teixit/Proteïna diana	Referència
Diabetis	Hb	(Al Abed et al. 2001)
Hiperlipidèmia	Hb	(Niwa et al. 2000)
Insuficiència renal crònica	Hb	(Mandal et al. 2007)
Hemodiàlisi	Hb	(Takayama et al. 2001)
Diabetis tipus 2	Hb	(Sampathkumar et al. 2005)
Anèmia	Hb	(Shet et al. 2012)
Exposició a butadiè	Hb	(Primavera et al. 2008)
Atàxia de Friedreich	Actina de fibroblasts	(Pastore et al. 2003)
Arteriosclerosi	Proteïnes sèriques	(Nonaka et al. 2007)
Estenosis carotídia	Proteïnes sèriques	(Nakamoto et al. 2012)
Alzheimer	Cervell	(Newman et al. 2007)
Esportistes (sans)	Múscul	(Merry et al. 2010)
Fumadors (sans)	Sang total	(Muscat et al. 2004)
Esteatohepatitis no alcohòlica	Fetge	(Piemonte et al. 2008)
*Nens amb obesitat/diabetis tipus 1	Sang total, Hb	(Pastore et al. 2012)

Taula 3. Glutatiolació de proteïnes en diferents condicions patològiques (Pietro Ghezzi 2013).
*Nivells de glutatiolació reduïts.

Només en un cas, es va observar que els nens amb obesitat o amb diabetis tipus 1 presentaven en general uns nivells de glutatiolació reduïts en proteïnes de la sang i a més, també presentaven un rati PSSG/GSH disminuït. En tots aquests casos però, la detecció dels nivells de glutatiolació en proteïnes podria suposar un bon biomarcador d'aquestes patologies.

4. DEFENSES ANTIOXIDANTS EN *S. CEREVISIAE*

Un antioxidant és qualsevol tipus de compost que en baixes concentracions i en presència d'un substrat susceptible a ser oxidat, té la capacitat de retardar o prevenir

l'oxidació d'aquest substrat (Pisoschi and Pop 2015). Les seves funcions impliquen la reducció de les condicions d'estrès oxidatiu a les que està sotmesa la cèl·lula, així com les mutacions en el DNA com a conseqüència d'aquest estrès i altres tipus de dany cel·lular.

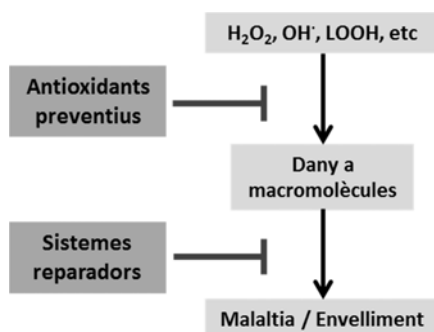


Figura 23. Classificació dels antioxidants segons la seva funció.

De forma general, els antioxidants es poden dividir en dos grans grups: (i) Un tipus d'antioxidants són aquells que prevenen l'aparició d'espècies reactives de l'oxigen i que capturen i neutralitzen els radicals formats (Cheeseman and Slater 1993), limitant així els efectes perjudicials sobre els diferents components cel·lulars (Figura 23). Aquests sistemes es troben presents en compartiments aquosos i poden ser enzimàtics o no enzimàtics. (ii) L'altre tipus de sistemes antioxidants està representat pels sistemes de reparació, que s'encarreguen de reparar les biomolècules danyades (Cheeseman and Slater 1993).

Quan es trenca el balanç redox i els sistemes antioxidants col·lapsen davant d'un estrès oxidatiu, apareixen processos patològics (Figura 24). No obstant, es creu que la situació òptima en condicions fisiològiques és aquella en la que el balanç entre la producció de ROS i les defenses antioxidants evita l'acumulació de dany però a la vegada permet una quantitat de ROS necessària per a què puguin tenir lloc els processos de senyalització (Dröge 2002).

Aquests sistemes antioxidants que asseguren la homeòstasi redox de la cèl·lula inclouen tan sistemes de defensa enzimàtics com les glutaredoxines, les tioredoxines,

la superòxid dismutasa, la catalasa o la glutatió peroxidasa, com sistemes de defensa no enzimàtics com el glutatió, proteïnes com la ferritina, la transferrina o l'albumina, o altres com l'àcid úric, àcid ascòrbic, l'àcid lipoic, la vitamina E, el coenzim Q o la trehalosa, entre d'altres.

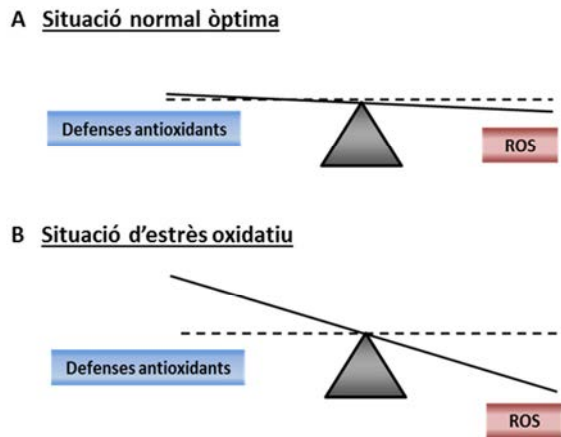


Figura 24. Balanç redox entre la producció de ROS i els sistemes antioxidants de la cèl·lula. (A) Situació fisiològica òptima en la que el balanç entre els antioxidants i els prooxidants es manté lleugerament a favor dels prooxidants, permeten un lleuger estrès oxidatiu necessari pels processos de senyalització i (B) Situació d'estrès oxidatiu en la que la producció de ROS és molt major a la capacitat de les defenses antioxidants de neutralitzar-les, trencant-se així el balanç redox i podent conduir a situacions patològiques (Poljsak, Šuput, and Milisav 2013).

A continuació s'explicaran alguns dels sistemes antioxidants enzimàtics que presenten les cèl·lules de *S. cerevisiae* per front a les condicions d'estrès oxidatiu.

4.1. Sistemes antioxidants enzimàtics

La cèl·lula compta a una gran varietat d'enzims encarregats de detoxificar diferents tipus de ROS i de reparar el dany que aquests causen a les proteïnes. La Taula 4 enumera cada un dels sistemes antioxidants així com les seves funcions presents en *S. cerevisiae*.

Antioxidant	Gen	Localització	Activitat
Catalasa	<i>CTT1</i> <i>CTA1</i>	Cit Per	Catalitzen la reducció del H ₂ O ₂ a H ₂ O i O ₂
Superòxid dismutasa	<i>SOD1</i> <i>SOD2</i>	Cit/Nuc Mit	Catalitzen la dismutació de l'anió superòxid a H ₂ O ₂ i O ₂
Glutatió peroxidasa	<i>GPX1, GPX2</i> <i>GPX3</i>	Cit Cit	Fosfolípid hidroperòxid glutatió peroxidasa Fosfolípid hidroperòxid glutatió peroxidasa, transductor senyal Yap1
Peroxiredoxina	<i>TSA1, TSA2</i> <i>AHP1</i> <i>DOT5</i> <i>PRX1</i>	Cit Cit Nuc Mit	Tioredoxina peroxidasa (2-Cys), activitat xaperona Tioredoxina peroxidasa (2-Cys) amb alquil hidroperòxids Prx (2-Cys) Silenciament telòmers Prx (1-Cys) Tioredoxina peroxidasa
Metionina sulfòxid reductasa	<i>MXR1 (MSRA)</i> <i>MXR2 (MSRB)</i> <i>fRMsr</i>	Cit Mit Cit	Redueix el sulfòxid de metionina (epímer S-MetO) Redueix el sulfòxid de metionina (epímer R-MetO) Redueix Met-R-SO lliures
Tioredoxina	<i>TRX1, TRX2</i> <i>TRX3</i>	Cit Mit	Activitat disulfur oxidoreductasa Activitat disulfur oxidoreductasa
Tioredoxina reductasa	<i>TRR1</i> <i>TRR2</i>	Cit Mit	Redueix Trx1 i Trx2 oxidada Redueix Trx3 oxidada
Glutaredoxina	<i>GRX1</i> <i>GRX2</i> <i>GRX3, GRX4</i> <i>GRX5</i> <i>GRX6, GRX7</i> <i>GRX8</i>	Cit Cit/Mit Nuc Mit Gol Cit	Sulfur oxidoreductasa Sulfur oxidoreductasa Grxs monotioliques Grx monotiolica, síntesi/acoblament centres Fe-S Grx monotiolica Sulfur oxidoreductasa
Síntesi GSH	<i>GSH1, GSH2</i>	Cit	Catalitzen dos passos ATP dependents en la biosíntesi del GSH
Glutatió reductasa	<i>GLR1</i>	Cit/Mit	Recicla GSSG oxidat a GSH reduït
Glutatió transferasa	<i>GTT1</i> <i>GTT2</i> <i>GTO1</i> <i>GTO2, GTO3</i>	ER Mit Per Cit	Catalitza la conjugació de GSH a varis electròfils - Glutatió transferasa tipus Omega Glutatió transferasa tipus Omega
Eritroascorbat	<i>ALO1</i>	Mit	D-arabinono-1,4-lactona oxidasa, Pas final de síntesi de eritroascorbat

Taula 4. Sistemes enzimàtics antioxidants de *S. cerevisiae*. S'especifica el gen, la localització i l'activitat de cada un d'ells. Cit: citosol; Nuc: nucli; Mit: mitocondria; Per: peroxisomes; RE: Reticle endoplasmàtic; Gol: Aparell de Golgi. (Morano, Grant, and Moye-Rowley 2012).

A continuació s'explicaran els sistemes enzimàtics analitzats en aquest treball.

4.1.1. Catalasa

La catalasa és l'enzim responsable de la descomposició del H_2O_2 en H_2O i O_2 , gràcies a les propietats redox del grup hemo de la seva estructura.



S'ha establert que existeixen 3 tipus de catalases capaces de dur a terme la descomposició del H_2O_2 (M. G. Klotz, Klassen, and Loewen 1997): (i) les manganès catalases, descrites només en procariotes, sense grup hemo i conegudes amb el nom de pseudocatalases ja que són resistents als inhibidors comuns de les catalases com el cianur i l'azida; (ii) catalases bifuncionals amb activitat peroxidasa, contenen un grup hemo i són àmpliament distribuïdes en procariotes i alguns eucariotes (Fraaije et al. 1996); i (iii) les catalases pròpiament dites, homotetràmèriques, monofuncionals i amb un grup hemo, que es troben en eucariotes i en algun procariota (Maté et al. 1999).

Concretament, *S. cerevisiae* presenta dues catalases amb un grup hemo. La catalasa T (o Ctt1), una catalasa de localització citosòlica i codificada pel gen *CTT1* (Hartig and Ruis 1986) i la catalasa A (o Cta1), localitzada als peroxisomes i codificada pel gen *CTA1* (Cohen, Rapatz, and Ruis 1988). Se sap que el paper fonamental de la catalasa A és eliminar el H_2O_2 generat per l'acil-CoA oxidasa durant la β -oxidació dels àcids grassos al peroxisoma (Hiltunen et al. 2003). En cèl·lules de llevat, Cta1 es regula en resposta a la glucosa, el grup hemo i l'oxigen. En aquests casos, la resposta transcripcional està regulada pels factors transcripcionals activadors Adr1, Oaf1, Rtg1 i Rtg2 (Hörtner et al. 1982)(Skoneczny and Rytka 2000). Tot i que l'expressió de Cta1 s'indueix en llevat quan aquest creix en àcids grassos com a única font de carboni (Filipits et al. 1993), un mutant nul per *CTA1* encara és viable en aquestes condicions, la qual cosa implica que l'activitat catalasa al peroxisoma no és indispensable. En canvi, el paper fisiològic de la Ctt1 és menys clar, doncs un mutant nul per aquesta catalasa presenta un creixement exponencial en condicions aeròbiques igual que una soca WT (Izawa, Inoue, and Kimura 1996). L'expressió de la catalasa citosòlica està regulada per l'estrès oxidatiu, l'osmòtic i la manca de nutrients. Concretament, aquesta resposta transcripcional està

desencadenada pels factors transcripcionals Msn2/Msn4 (Martínez-Pastor et al. 1996), Hog1 (Schüller et al. 1994), Cyp1 (Winkler et al. 1988), Yap1 (J. Lee et al. 1999) i Zap1 (C.-Y. Wu et al. 2008). La localització d'aquesta catalasa es regula durant la citocinesis, generant cèl·lules filles amb una alt contingut de catalasa T, comparat amb la cèl·lula mare, en un procés Sir2 dependent (Erjavec and Nyström 2007).

A banda dels fenotips dels mutants simples, està ben descrit que el doble mutant per *CTT1* i *CTA1* és hipersensible a H_2O_2 en fase estacionària. A més, tan el doble mutant com els mutants simples són menys capaços de dur a terme una resposta adaptativa a l'estrès per H_2O_2 , comparat amb una soca WT (Izawa, Inoue, and Kimura 1996). Aquests resultats suggereixen que la catalasa no juga un paper essencial per les cèl·lules de llevat en condicions normals de creixement, però sí és important en la resposta adaptativa de les cèl·lules front una situació a estrès oxidatiu per H_2O_2 .

4.1.2. Superòxid dismutasa

La superòxid dismutasa participa en l'eliminació de l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), convertint-lo en H_2O_2 i O_2 .



En *S. cerevisiae* s'han descrit 2 tipus de superòxid dismutases, classificades segons el metall que actua de cofactor; i) Sod1, que conté un àtom de zinc i un àtom de coure (també anomenada CuZnSOD) i de localització citosòlica (Birmingham-McDonogh, Gralla, and Valentine 1988) i ii) Sod2 que conté un àtom de manganès (també anomenada MnSOD)(Steinman 1980) i localitzada a la matriu mitocondrial. A diferència del llevat, en eucariotes superiors també s'ha descrit la Sod3, que és també una CuZnSOD i presenta localització extracel·lular (Hjalmarsson et al. 1987). A diferència dels eucariotes, els procariotes presenten dues formes de SOD, una contenint un àtom de ferro (FeSOD), i una altra amb un àtom de manganès (MnSOD). Més recentment, també s'ha descrit en *Streptomyces* una NiSOD (Lynch and Kuramitsu 2000).

Pel que fa a la Sod1 o CuZnSOD de *S. cerevisiae*, es tracta d'un homodímer que conté dues cisteïnes de cada monòmer conservades, unides formant un pont disulfur essencial per a l'activitat catalítica. Tot i tenir una localització majoritàriament citosòlica, també es va detectar una fracció a l'espai intermembrana (Weisiger and Fridovich 1973), on també participa en la detoxificació de ROS. Sod2 en canvi, és un homotetràmer amb un àtom de manganès en cada subunitat, el quals s'adquireixen gràcies a la xaperona Mtm1, després de l'import de la proteïna a la matriu mitocondrial (Luk et al. 2005). Tan Sod1 com Sod2 estan implicades en la detoxificació de l'anió superòxid generat a la cadena respiratòria. Les mutacions a SOD1 estan associades a una gran varietat de defectes com la sensibilitat a estrès oxidatiu, inhabilitat per créixer en condicions aeròbiques i hipersensibilitat a agents oxidants exògens com la menadiona o el paraquat (Gralla and Valentine 1991)(V D Longo, Gralla, and Valentine 1996) A més, les cèl·lules mutants en Sod1 també són incapaces de dur a terme la síntesi de la metionina i la lisina (Jensen et al. 2004), presenten deficiències en l'aconitasa mitocondrial i són incapaces de sobreviure en fase estacionària. Pel que fa a Sod2, se sap que és essencial per la defensa envers el superòxid generat a la cadena respiratòria i que un mutant nul és hipersensible a l'oxigen i és incapaç de créixer en condicions respiratòries (van Loon, Pesold-Hurt, and Schatz 1986). No obstant, a diferència de Sod1, no sembla que desenvolupi un paper important pel que fa a la defensa envers oxidants externs. Tan *SOD1* com *SOD2* són dels primers gens que es van relacionar amb l'envelliment cronològic en llevat. La deleció de Sod1 o d'ambdues Sod1 i Sod2 redueix dràsticament tan la vida cronològica com replicativa del llevat (V D Longo, Gralla, and Valentine 1996), mentre que la sobreexpressió d'ambdues allarga la supervivència (Paola Fabrizio and Longo 2003).

4.1.3. Sistema tioredoxina

El sistema tioredoxina és un dels principals sistemes antioxidants de les cèl·lules, format per tres proteïnes, encarregades de mantenir l'ambient reductor a través de catalitzar el flux d'electrons des del NADPH, a través de la Trx reductasa (TrxR) i fins a la

tioeredoxina (Trx), que és la que finalment reduirà la proteïna diana utilitzant els seus grups tiol altament conservats (Figura 25) (A Holmgren 1989).

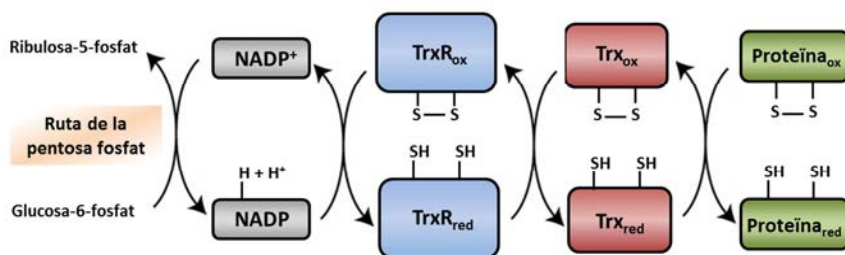


Figura 25. Cascada redox del sistema tioeredoxina. El NADPH + H⁺ generat majoritàriament en la ruta de les pentoses fosfat, redueix la Trx reductasa (TrxR), la qual podrà regenerar la Trx que ha estat oxidada al reduir la seva proteïna diana (S. Lee, Kim, and Lee 2013).

La Trx va ser purificada i descrita per primera vegada com una donadora d'hidrògens de la ribonucleòtid reductasa (RNR) d'*E. coli* el 1964 (Laurent, Colleen, and Peter 1964). La seqüenciació de la proteïna Trx bacteriana va confirmar que conté dues cisteïnes al seu centre actiu (Cys-Gly-Pro-Cys), altament conservades, des dels arqueus fins als mamífers (A Holmgren 1968).

La Trx és una oxidoreductasa que participa en la reducció de tiols, ja sigui d'enzims que formen ponts disulfur durant el seu cicle catalític o, de forma més general, modulant l'estat redox de les proteïnes. Les Trxs presenten una estructura del tipus "tioeredoxina", compartit amb altres famílies de proteïnes com les glutaredoxines, les disulfur isomerasas, les glutatió peroxidases o les glutatió transferases.

L'estructura de la Trx2 consta de cinc fulles β flanquejades per quatre hèlix α , tal com mostra Figura 26. Les dues cisteïnes del centre actiu, Cys31 i Cys34, localitzades a la hèlix $\alpha 2$, poden ser oxidades i formar un pont disulfur. Tot i que la Trx2 de llevat tan sols presenta un 34% d'identitat amb la Trx2 d'*E. coli*, la seqüència humana és un 50% idèntica a la de llevat (Bao et al. 2007).

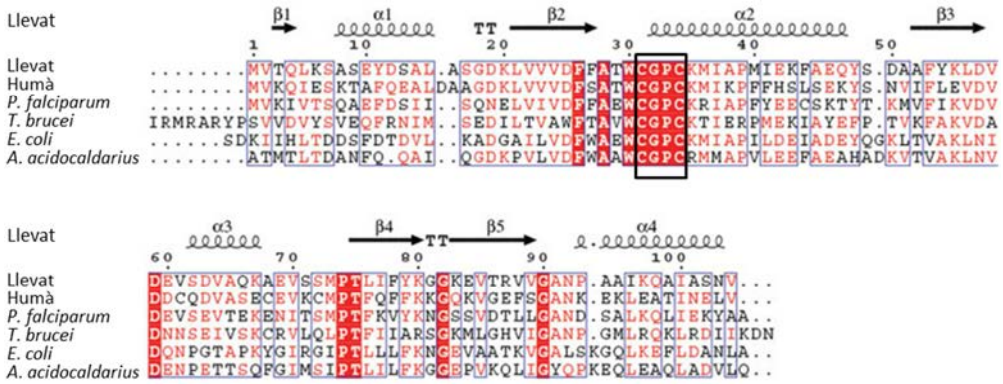


Figura 26. Alineament de seqüències de Trx2 de diferents organismes. Es mostra la similitud entre la seqüència i llevat i les diferents seqüències d'*E. coli*, *P. falciparum*, *T. brucei*, *A. acidocaldarius* i de humà, sent del 34%, 50%, 36%, 40% i 50%, respectivament (Bao et al. 2007).

El mecanisme bàsic d'acció de la tioredoxina és el següent: (i) La Trx en el seu estat reduït presenta una superfície hidrofòbica, conservada en la família de Trx/Grx, per la qual s'uneix a la proteïna substrat, formant un complex. (ii) En segon lloc, un cop format el complex, el grup tiol de C32 actua com un nucleòfil, atacant la proteïna diana per formar un pont disulfur mix transitori (iii) Finalment, C35 ara desprotonada, atacarà al pont disulfur mix, generant així un ditiol a la proteïna diana i un disulfur a la Trx. Al tractar-se d'una reacció reversible, la Trx pot reduir o formar disulfurs depenent del potencial redox del seu substrat (Figura 27). Els canvis conformacionals tan de la Trx com de la proteïna diana tenen lloc durant la unió i els subseqüents passos de transferència d'electrons (Arne Holmgren 1995).

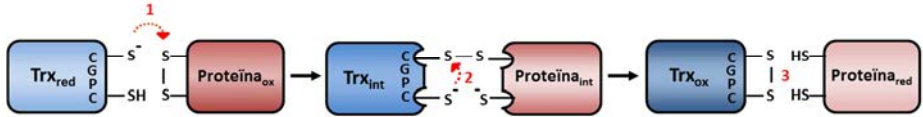


Figura 27. Mecanisme de reducció mitjançant la tioredoxina. Representació enzimàtica de la reacció, (1) iniciada per un atac nucleofílic de la cisteïna de l'extrem N-terminal (Cys32) del domini CGPC conservat, formant un pont disulfur mix amb la proteïna diana. (2) Seguidament, aquest pont disulfur mix és reduït per un atac nucleòfil de la segona cisteïna del domini conservat CGPC (Cys35). (3) La reacció acaba amb la generació de la proteïna reduïda i la conseqüent formació d'un pont disulfur entre les cisteïnes de la tioredoxina (Collet and Messens 2010).

S. cerevisiae conté dues Trx citosòliques, la Trx1 i la Trx2 (Z. R. Gan 1991), i una Trx de localització mitocondrial, la Trx3 (J R Pedrajas et al. 1999). Paral·lelament, conté una tioredoxina reductasa citosòlica, la Trx1, i una mitocondrial, la Trx2, definint així dos sistemes tioredoxina diferents, el citosòlic i el mitocondrial. Tot i que els mutants delecionats per Trx1 i Trx2 són viables, presenten bàsicament tres fenotips principals (Toledano et al. 2013). Un d'ells és una major durada de la fase S (Muller 1991) degut a una ineficient síntesi del DNA que ve donada per una incapacitat de reduir la RNR. La primera evidència d'aquest fenotip i reducció defectiva de la RNR es va donar després de comprovar que el mutant $\Delta trx1\Delta trx2$ presentava uns nivells de dNTPs significativament més reduïts (Koc et al. 2006) i una major acumulació de la forma oxidada de la RNR. El segon fenotip és una auxotròfia pels aminoàcids que contenen sulfurs (Muller 1991), degut a la incapacitat de reduir una reductasa (PAPS reductasa) essencial per l'assimilació del sulfat inorgànic. El tercer gran fenotip és una hipersensibilitat a peròxids (Kuge and Jones 1994)(Garrido and Grant 2002). Donat que TRX també regula als factors transcripcionals Yap1 i Msn2/4, una soca delecionada per ambdues Trx1 i Trx2, té Yap1 constitutivament actiu, suggerint que Trx regula negativament aquest factor a través de la seva reducció (Izawa et al. 1999). Estudis proteòmics han mostrat que en una soca $\Delta trx1\Delta trx2$, les proteïnes com Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, Gpx2 i Mrx1 entre moltes altres, presenten un increment en l'oxidació de les seves cisteïnes, demostrant així la importància de Trx en el control de l'estat redox de les proteïnes antioxidants (Le Moan et al. 2006). El mutant $\Delta trx1\Delta trx2$ és sensible a l'agent reductor DTT però és resistent a la diamida (Eleanor W Trotter and Grant 2002). Ambdues Trx1 i Trx2 són actives com a antioxidants i protegeixen a les cèl·lules front l'estrès oxidatiu induït per les ROS (Kuge and Jones 1994). S'ha demostrat, que en menys de 15 segons després d'una exposició a H_2O_2 , Trx1 i Trx2 ja es troben oxidades i es mantenen així durant 1 hora abans de retornar a la seva forma reduïda (Okazaki et al. 2007). Trx2 sembla jugar un paper essencial com a antioxidant, doncs mutants delecionats per aquesta tioredoxina són hipersensibles a hidroperòxids, mentre que els mutants delecionats per Trx1 presenten la mateixa resistència a l'estrès oxidatiu que una soca WT (Garrido and Grant 2002). No obstant, Trx1 i Trx2 semblen actuar com a antioxidants de forma redundant, amb la única diferència que l'expressió de Trx2 està

fortament regulada en resposta a estrès oxidatiu, mentre que Trx1 actuaria en aquells casos en que Trx2 no pogués actuar eficientment per proveir d'una defensa antioxidant adequada (Garrido and Grant 2002).

Es coneix que les Trxs de llevat presenten funcions similars a les d'altres organismes. En el cas de mamífers, existeixen dues isoformes de la Trx; la Trx1 que tot i ser citosòlica pot ser translocada al nucli i secretada fora de la cèl·lula en determinades circumstàncies i la Trx2, de localització mitocondrial (S. Lee, Kim, and Lee 2013). A més a més, existeix també una forma truncada de la Trx, la Trx80, que a diferència de les anteriors no posseeix activitat oxidoreductasa i no és reduïda per la Trx reductasa (Pekkari and Holmgren 2004). En llevat, se sap que el sistema tioredoxina mitocondrial i el citoplasmàtic es mantenen de forma independent i que les cèl·lules poden sobreviure en absència dels dos sistemes. El sistema mitocondrial estaria implicat en la protecció front l'estrès oxidatiu generat durant el metabolisme respiratori. No obstant, la tioredoxina reductasa mitocondrial Trx2 tindria una funció antioxidant independent, donat que els mutants delecionats per Trx2 són sensibles a estrès oxidatiu, comparat amb els mutants per Trx3, que no es veuen afectats per aquest tipus d'estrès (J R Pedrajas et al. 1999)(E. W. Trotter and Grant 2005).

En conjunt, a part del seu paper protector front l'estrès oxidatiu, les tioredoxines també participarien en múltiples vies de senyalització, fonamentals pels processos cel·lulars com el metabolisme, la proliferació, la diferenciació, la migració i l'apoptosi (S. Lee, Kim, and Lee 2013).

5. SISTEMA GLUTAREDOXINA

Les glutaredoxines (Grx), juntament amb les Trxs, conformen un dels principals sistemes enzimàtics antioxidants de les cèl·lules. El sistema glutaredoxina, a part de la pròpia Grx, també requereix del GSH (que actua com a donant directe d'electrons) i el NADPH, necessari per regenerar el GSH a partir del GSSG (Figura 28).

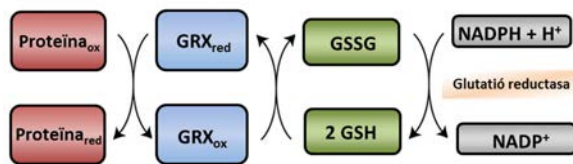


Figura 28. Sistema glutaredoxina. Components del sistema Grx implicats en la reducció de disulfurs proteics o de disulfurs mixtes entre les proteïnes i el GSH. (GRX, glutaredoxina; GSSG, glutatió oxidat i GSH, glutatió reduït)(E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007).

Aquest sistema es descriurà en més detall, donada la implicació de les glutaredoxines en els estudis descrits en aquest treball.

5.1. Característiques generals

Les Grxs són tiol oxidoreductases, de baix pes molecular (10-30 kDa aproximadament), que posseeixen una estructura del tipus tioredoxina, formada per quatre o cinc fulles β flanquejades per tres o més hèlix α i que és comú amb altres proteïnes com les Trxs, les glutatió transferases i les Gpxs (Martin 1995). De fet, les Grxs de bacteris presenten l'estructura de tipus tioredoxina més bàsica, mentre en altres membres de la família tan sols representa una part de l'estructura (Christopher Horst Lillig, Berndt, and Holmgren 2008).

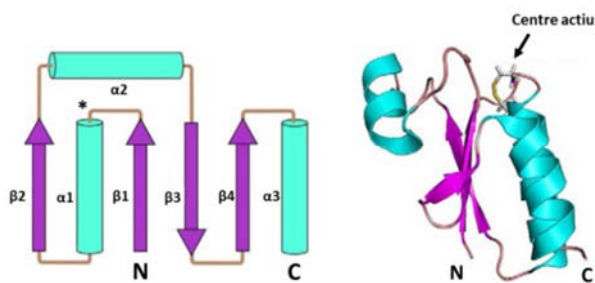


Figura 29. Estructura de la glutaredoxina. (A) La Grx bacteriana exhibeix la representació més bàsica de l'estructura tipus tioredoxina. El centre actiu es localitza al *loop* que connecta l'hèlix $\alpha 1$ amb la làmina $\beta 1$ (*). (B) Estructura de Grx1 oxidada d'*E. coli* (Christopher Horst Lillig, Berndt, and Holmgren 2008).

La funció de Grx és la de reduir els disulfurs proteics i/o els disulfurs mixtes que es formen entre les proteïnes i el glutatió. Per dur a terme aquesta funció i igual que les tioredoxines, utilitzen la cisteïna del seu centre actiu (Figura 29). Aquesta cisteïna es troba a la regió N-terminal i està exposada a la superfície, accessible pel GSH (Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010). Presenta un valor de pKa baix, d'entre 3 o més unitats de pH inferiors al de les Cys lliures, mentre que la Cys més C-terminal no està tan exposada i presenta un valor de pKa més alt (Christopher Horst Lillig, Berndt, and Holmgren 2008).

5.2. Classificació

Està ben establert que les GRXs constitueixen un gran família heterogènia de proteïnes, amb diferències estructurals i funcionals (Alves et al. 2009). De fet, les Grxs s'han dividit en dos grans grups segons l'estructura del seu centre actiu. Les glutaredoxines ditiòliques es caracteritzen per presentar dos residus de cisteïna, amb una seqüència del tipus CPY/FC al centre actiu. Així, les Grxs que presenten una única cisteïna al centre actiu es coneixen amb el nom de monotiòliques i presenten una seqüència del tipus CGFS.

Cada organisme conté diferent nombre de Grxs, ja siguin ditiòliques o monotiòliques, amb les seves respectives localitzacions (Figura 30). Fins al moment, en *E. coli* s'han descrit quatre GRXs; Grx1 i Grx3 com a GRXs ditiòliques clàssiques, Grx2 com a ditiòlica inusual i una GRX monotiòlica anomenada Grx4 (Vlamiš-Gardikas and Holmgren 2002)(Fernandes and Holmgren 2004). En *S. cerevisiae* fins al moment s'han descrit un total de vuit Grxs; Grx1, Grx2 i Grx8 pertanyen al grup de GRXs ditiòliques, mentre que Grx3, Grx4, Grx5, Grx6 i Grx7 conformarien el grup de GRXs monotiòliques (Enrique Herrero and de la Torre-Ruiz 2007)(Christopher Horst Lillig, Berndt, and Holmgren 2008)(Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010). En humans tan sols s'han descrit un total de quatre Grxs. Les dues GRXs ditiòliques són la Grx1 citosòlica, un homòleg funcional tan de Grx1 d'*E. coli* com de llevat i la Grx2 de localització mitocondrial. Les dues GRXs monotiòliques són la Grx3, també coneguda amb el nom de PICOT i homòloga a la Grx3 i Grx4 de llevat (Isakov, Witte, and Altman 2000)(Witte et al. 2000) i la Grx5 de

localització mitocondrial, també altament conservada entre eucariotes. Val a dir però, que en cèl·lules testiculars i en alguns tipus de càncers s'han descrit dues isoformes de Grx2 (Grx2b i Grx2c), de localització citosòlica/nuclear (Lundberg et al. 2001) i que deriven d'un inici de transcripció i *splicing* alternatiu (Lönn et al. 2008). A continuació es descriuran cada una de les GRXs segons a la subfamília a la que pertanyen.

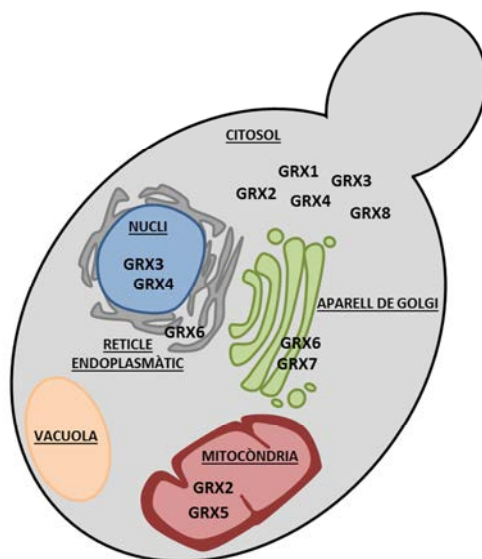


Figura 30. Localització cel·lular de cada una de les GRXs descrites en *S. cerevisiae*. Grxs ditiòliques: Grx1, Grx2 i Grx8; Grxs monitiòliques: Grx3, Grx4, Grx5, Grx6 i Grx7.

5.2.1. Glutaredoxines ditiòliques

La primera evidència de la presència de Grxs ditiòliques data del 1976, quan en cèl·lules d'*E. coli* deficientes en activitat tioredoxina, es va demostrar la presència d'una proteïna dependent de GSH, que es va anomenar glutaredoxina i que tenia la capacitat d'actuar com a donadora d'electrons de la ribonucleòtid reductasa (RNR), actuant així com el seu sistema reductor (A Holmgren 1976). Estudis posteriors, van acabar demostrant la presència de Grxs en bacteris, virus i eucariotes. Com ja s'ha comentat, es caracteritzen per presentar una estructura del tipus tioredoxina.

Les Grxs ditiòliques poden dur a terme la reducció dels ponts disulfurs segons dos mecanismes diferents (Figura 31). Un primer mecanisme implica la utilització de les

dues cisteïnes del centre actiu i és un mecanisme compartit amb les tioredoxines (Bushweller et al. 1992). En aquest cas, la cisteïna que es troba més a l'extrem N-terminal forma un disulfur mix entre la mateixa Grx i la proteïna diana. Seguidament, la segona cisteïna és necessària per resoldre el pont disulfur intermedi, donant lloc a la Grx oxidada. Per recuperar l'estat reduït de l'oxidoreductasa es requereix del GSH. El segon mecanisme té lloc en aquells casos en els que cal reduir ponts disulfur mixtes entre el glutatió i una proteïna diada, és a dir, en les reaccions de desglutiatilació. En aquest cas tan sols es requereix de la cisteïna de l'extrem més N-terminal.

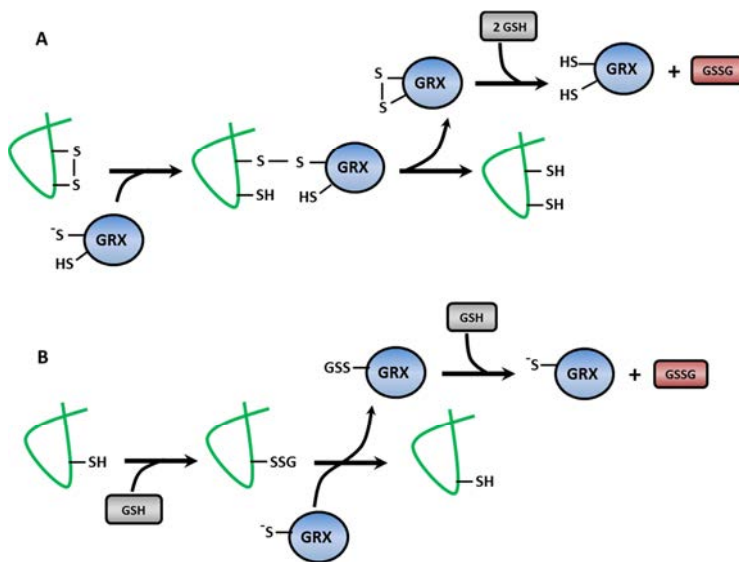


Figura 31. Mecanisme d'acció de les glutaredoxines. (A) Mecanisme de 2-Cys i (B) Mecanisme de 1-Cys. Adaptat de (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007).

De fet, els mutats en els que s'ha substituït la segona cisteïna del centre actiu per una serina, segueixen sent actives en l'assaig HED (Bushweller et al. 1992), basat en determinar la capacitat per part de les Grxs de reduir el pont disulfur mixt format entre el substrat HED (β -hidroxietil disulfur) i el GSH (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007). A més, tot i no tractar-se d'un assaig específic de les Grxs ja que pot ser catalitzada per un gran nombre d'enzims, les Grxs també van demostrar tenir activitat dehidroascorbat reductasa (DHAR) *in vitro* (Washburn and Wells 1999). La reactivitat dels grups tiols depèn en gran mesura del seu pKa i s'ha descrit que per les glutaredoxines ditiòliques

el pKa de les cisteïnes reactives té un valor aproximat de 4 (Z.-R. Gan et al. 1990)(Mieyal et al. 1991)(Foloppe et al. 2001).

▪ **GRX1 i GRX2**

Les GRXs ditiòliques de llevat, tan Grx1 com Grx2, presenten el domini CPYC al centre actiu (Luikenhuis et al. 1998). L'expressió d'ambdues proteïnes està induïda per varies condicions d'estrès (Chris M. Grant et al. 2000), les seves seqüències comparteixen un 64% d'identitat i un 85% de similitud i també comparteixen un lloc d'unió al GSH idèntic (W.-F. Li et al. 2010). Pel que fa a l'estructura tridimensional, és molt similar per Grx1 i Grx2, sent del tipus tioredoxina, amb cinc hèlix α que embolcallen a quatre fulles β , tres d'elles antiparal·leles ($\beta 1$, $\beta 3$ i $\beta 4$) i una fulla ($\beta 2$) paral·lela a l'adjacent $\beta 1$ (Yu et al. 2008)(W.-F. Li et al. 2010). Tot i això, es creu que les seves funcions no són redundants. Mentre que Grx1 conferiria protecció front l'anió superòxid i els hidroperòxids, Grx2 estaria més especialitzada en la protecció front els hidroperòxids. Tot i que les dues GRXs estan presents al citosol, una fracció de Grx2 més gran també es troba localitzada a la mitocondria degut a que presenta un inici de traducció alternatiu (José R Pedrajas et al. 2002)(Porras et al. 2006). La isoforma mitocondrial pot quedar-se associada a la membrana mitocondrial externa o pot ser processada i passar a ser una forma soluble de la matriu mitocondrial. Aquest fet podria ser l'explicació per la qual tot i que l'estrès per H_2O_2 indueix l'expressió de *GRX1* i de *GRX2* de forma similar, l'estrès osmòtic i per calor, causa major expressió de *GRX1*. No obstant, l'entrada de les cèl·lules a fase estacionària indueix més *GRX2* que *GRX1* (Chris M. Grant et al. 2000). S'ha descrit que ambdues Grx1 i Grx2 també estarien implicades en la resistència envers certs químics, com algun herbicida que genera una alta quantitat de radicals hidroxil (Teixeira et al. 2004). Les dues GRXs també són actives com a glutatió peroxidases (Collinson et al. 2002) i com a glutatió transferases (Collinson and Grant 2003).

Pel que fa a Grx1 humana, participa en reaccions de reducció tan de la RNR com del DHA. Està implicada en la regulació de factors transcripcionals i en l'apoptosi, a través de la desglutitació de múltiples proteïnes citosòliques, incloent PTP1B, Ras, actina i procaspasa 3 (Gallogly, Starke, and Mieyal 2009). Grx2, que té un domini peculiar del tipus

CSYC al centre actiu, presenta menor activitat a l'assaig HED, tot i que és molt efectiva desglutatiolant, degut a la seva gran afinitat per ponts disulfur mixtes i, a diferència de Grx1, no s'inhibeix per oxidació dels seus residus de cisteïna estructurals (Lundberg et al. 2001). Es coneix que efectua de forma eficient tan la glutatiolació com la desglutatiolació del complex I mitocondrial (Beer et al. 2004), que a la vegada regularà la producció de superòxid per part d'aquest complex (Taylor et al. 2003). La sobreexpressió de Grx2 disminueix la susceptibilitat a l'apoptosi, prevenint l'alliberació del citocrom c (Enoksson et al. 2005). *In vivo* Grx2 forma un dímer unint un centre Fe-S, per dos residus de cisteïna que no estan conservats en la resta de Grxs, actuant així com a sensor de les condicions d'estrès oxidatiu. La pèrdua del centre Fe-S degut a l'estrès oxidatiu resulta en la formació del monòmer de Grx2 i la conseqüent activació de l'enzim (Christopher Horst Lillig et al. 2005). Per tant, les evidències apunten a que les Grxs, a part d'actuar com a reguladores de l'estat redox, també desenvoluparien altres funcions més especialitzades (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007). Recentment, s'ha descrit en *zebrafish* que Grx2 estaria implicada en el desenvolupament vascular a través de la modulació de l'activitat de la sirtuïna SIRT1, concretament a través de la seva desglutatiolació, i que es tractaria d'un mecanisme conservat entre els vertebrats (Bräutigam et al. 2013).

- **GRX8**

Grx8 va ser de les últimes Grxs en ser caracteritzades (Eckers et al. 2009). Tot i que comparteix un 30% i un 23% d'identitat amb Grx1 i Grx2, respectivament, *in vitro* presenta molt poca activitat oxidoreductasa dependent de GSH (Tang et al. 2014). El fet que al domini catalític presenti un residu de triptòfan flanquejant la seqüència de centre actiu WCPDC, va fer pensar que es podria tractar més d'una Trx que d'una Grx. A més, tot i la seva localització citosòlica, s'ha demostrat que no es necessària per la defensa front l'estrès oxidatiu. De fet, les cèl·lules deficientes en *GRX8* no presenten cap fenotip rellevant (Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010).

5.2.2. Glutaredoxines monotioliques

Les anàlisis de seqüència del genoma de *S. cerevisiae* van revelar l'existència de 3 ORFs, els productes putatius dels quals presentaven una homologia molt alta amb Grx1 i Grx2 de *S. cerevisiae* (M T Rodríguez-Manzanaque et al. 1999). L'homologia era major en l'extrem C-terminal de les proteïnes, però el centre actiu presentava un nou domini CGFS conservat en les 3 proteïnes. Aquestes van ser classificades com a Grxs monotioliques degut a la presència d'un sol residu de cisteïna al centre actiu i van ser anomenades Grx3, Grx4 i Grx5 (M T Rodríguez-Manzanaque et al. 1999). Estudis posteriors van denotar la presència d'aquest tipus de GRXs en bacteris, protozous, fongs, plantes i també animals (Bellí et al. 2002)(Lemaire 2004)(Vilella et al. 2004)(Rouhier, Couturier, and Jacquot 2006). Més tard, es va descriure en *S. cerevisiae* dues GRXs més, Grx6 i Grx7, que tot i considerar-se monotioliques degut a la presència d'una única cisteïna al centre actiu, el domini CGFS en aquest cas no es manté, i passa a ser del tipus CSYS en Grx6 i CPYS en Grx7 (Mesecke, Spang, et al. 2008)(Izquierdo et al. 2008).

Les Grxs monotioliques es caracteritzen per ser estructuralment més complexes i s'han classificat en 2 subgrups; i) les Grxs amb únic domini i ii) les Grxs multidomini, caracteritzades per tenir un domini tipus tioredoxina a l'extrem N-terminal i un o més dominis tipus GRX (Figura 32), units per una seqüència no conservada (Bellí et al. 2002)(Vilella et al. 2004)(Molina et al. 2004).

Així, mentre que Grx5, Grx6 i Grx7 tan sols presenten un únic domini GRX, Grx3 i Grx4 serien un híbrid entre Trx i Grx, doncs es caracteritzen tenir un domini GRX i un domini TRX a l'extrem N-terminal de la proteïna. Aquest domini TRX conté la seqüència WAD/EPCK, que recorda a l'autèntic centre actiu WCGPCK de la Trx (Powis and Montfort 2001).

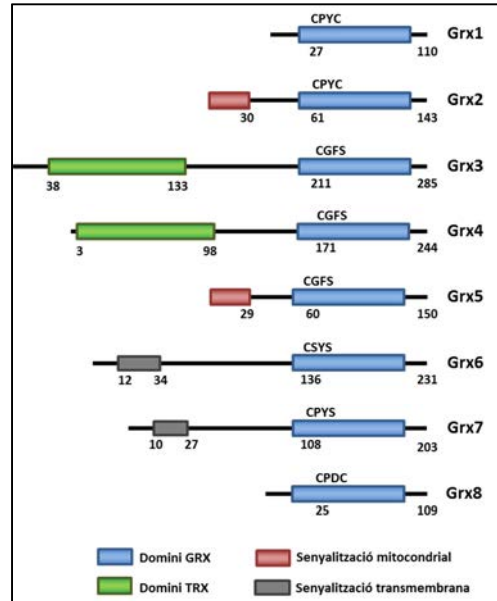


Figura 32. Dominis estructurals de les GRXs de *S. cerevisiae*. S'indiquen cada un dels dominis de les diferents GRXs, així com les seqüències de localització mitocondrial i transmembrana, i la posició de la cisteïna del centre actiu. Adaptat de (Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010).

En el cas de les Grxs monotíoliques el mecanisme d'acció seria el mateix mecanisme de 1-Cys (Enrique Herrero and Ros 2002) descrit pel cas de les Grxs ditioliques, en el qual la cisteïna del centre actiu forma un pont disulfur mix amb el glutatió, per així reduir (desglutatiolar) la proteïna diana (Figura 33). Pel cas de Grx5 s'ha descrit que la cisteïna reactiva localitzada al centre actiu (C60) presenta un valor de pKa de 5, mentre que la cisteïna que no participa en la catàlisi, com C117, el seu valor de pKa és de 8,2 (Tamarit et al. 2003). S'ha descrit que aquesta família de GRXs presenta molt poca activitat oxidoreductasa en assajos enzimàtics específics de GRXs, tot i que són capaces de desglutatiolar diferents proteïnes glutatiolades, tan en procarotes com en eucariotes (Tamarit et al. 2003)(Fernandes et al. 2005)(Gao et al. 2010). També s'ha suggerit que, almenys en el cas de bacteris, hi hauria una relació entre el sistema tioredoxina i glutaredoxina, sent la TrxR la que realment actuaria com a donadora d'electrons d'algunes GRXs i no el GSH, tal i com s'ha descrit pel cas de Grx4 d'*E. coli* (Fernandes et al. 2005) o de Grx5 de llevat (Tamarit et al. 2003). Un altre punt de controvèrsia de les

GRXs monotíliques seria la possibilitat de desenvolupar un mecanisme d'acció que impliqués la utilització d'alguna altra cisteïna que no fos la del centre actiu.

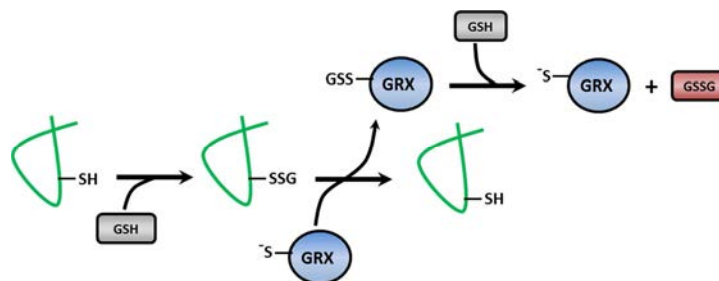


Figura 33. Mecanisme d'acció de les glutaredoxines monotíliques. Les GRXs monotíliques utilitzen la seva única cisteïna del centre actiu per formar un pont disulfur mix amb el GSH, per així desglatiolar la proteïna diana, donant com a resultat l'oxidació de la pròpia Grx (que serà reduïda a través del sistema GRX) i la reducció de la proteïna diana. Adaptat de (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007).

De fet, Grx5 tan de *S. cerevisiae* com d'*E. coli* així com la humana, posseeixen una segona cisteïna conservada a l'extrem més C-terminal de la proteïna, però no totes les GRXs monotíliques, com Grx3 i Grx4, la posseeixen (Figura 34).

sp Q02784 GLRX5_YEAST	-----	0
sp Q03835 GLRX3_YEAST	MPVIEINDQEFTYLTTTAAGDKLIVLYFHTSMAEPCALKQVFEAISNEPSNSVNSVFLS	60
sp P32642 GLRX4_YEAST	MTVVEIKSQDQFTQLTTTNAANKLIVLYFKACWADPCKTMSQVLEAVSEKVRQEDVRFLS	60
sp Q02784 GLRX5_YEAST	-----MFLPKFNPTRSFSPIL--RAK	19
sp Q03835 GLRX3_YEAST	IDADENSEISELFEISAVPYFIIHKGTILKELSGADPKKEYVSLLEDKNSVNSGSSQTH	120
sp P32642 GLRX4_YEAST	IDADEHPEISDLFEIAAVPYVFVIQNGTIVKEISAADPKFVKSLLEILSNASASLANNK	120
sp Q02784 GLRX5_YEAST	TL-----LRYQNRMYLSTEIRKAIEDAIESAPVFLFMKGTPEFPKCGFSR	64
sp Q03835 GLRX3_YEAST	TMENANVNEGSHNDEDDDDDEEEEEETEEQINARLTKLVNAAPVLMFMKGSPEPKCGFSR	180
sp P32642 GLRX4_YEAST	GP----KSTDEESSGSSDDEEETEEINARLVKLVQAAPVLMFMKGSPEPKCGFSR	175
sp Q02784 GLRX5_YEAST	ATIGLLGNQGVDPKFAAYNVLEDPQLREGIKFSEWPTIPQLYVNFKEFIGGCDVITSMA	124
sp Q03835 GLRX3_YEAST	QLVGILREHQ---VRFGFFDILRDESVRQNLKFFSEWPTFPQLYINGEFQGGLDIIKESL	237
sp P32642 GLRX4_YEAST	QLVGILREHQ---IRFGFFDILRDENVRQSLKFFSDWPTFPQLYINGEFQGGLDIIKESI	232
sp Q02784 GLRX5_YEAST	RSSELADLLEEAQALVPEEEEEETKDR	150
sp Q03835 GLRX3_YEAST	EED--PDFLQHALQS-----	250
sp P32642 GLRX4_YEAST	EED--PEYFQHALQ-----	244
..	: : : *	

Figura 34. Alineament múltiple de les seqüències de Grx5, Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae*. En groc es marquen les cisteïnes de cada una de GRXs; en blau, el centre actiu del domini GRX; en verd, el domini TRX de Grx3 i Grx4; en vermell, la seqüència d'importació mitocondrial que es processada en Grx5 madura; en taronja, la cisteïna C-terminal de Grx5. Alineament realitzat amb el software Clustal Omega (1.2.1).

In vitro, s'ha demostrat que en Grx5 la reacció de desglutatiolació s'inicia amb la formació d'un pont disulfur mix entre C60 i el GSH que provoca una reducció del valor del pKa de C117, i que consegüentment, acaba generant la formació d'un pont disulfur entre les dues C60 i C117 (Tamarit et al. 2003). No obstant, *in vivo* es va determinar que C60 (però no C117) és essencial per l'activitat biològica de Grx5 (Bellí et al. 2002). En el cas de Grx3 i Grx4 que no tenen aquesta cisteïna addicional a l'extrem C-terminal, però si que presenten un domini tipus TRX, el debat està en si la funció com a reductor fisiològic la desenvolupa realment el domini TRX o GRX.

▪ **GRX5**

Grx5 es localitza a la matriu mitocondrial i la seva absència és la que causa el fenotip més sever en *S. cerevisiae*: des de dany a les proteïnes cel·lulars, fins a hipersensibilitat a agents oxidants i en general, defectes de creixement (M T Rodríguez-Manzaneque et al. 1999). La primera evidència de que Grx5 estava implicada en la síntesi de centres Fe-S va sorgir quan en mutants nuls per aquesta Grx hi havia una depleció dels enzims que contenen centres Fe-S com l'aconitasa o la succinat deshidrogenasa, amb la consegüent acumulació d'elevats nivells de ferro intracel·lulars (María Teresa Rodríguez-Manzaneque et al. 2002), principalment a la mitocòndria (Rouault and Tong 2005)(Lill, Srinivasan, and Mühlhoff 2014) i els defectes en el creixement en medi respiratori (María Teresa Rodríguez-Manzaneque et al. 2002). Com a conseqüència d'això, el mutant $\Delta grx5$ presenta una auxotrofia per aquells aminoàcids la síntesi dels quals requereix d'enzims que contenen centres Fe-S, com seria el cas de la leucina, lisina i àcid glutàmic. Ara se sap que Grx5 actua com un component de la maquinària d'acoblament de centres Fe-S (sistema ISC), assistint el procés de maduració de les proteïnes amb centres Fe-S, és a dir, actuant en la transferència d'aquests centres a les apoproteïnes, conjuntament amb Isu1 i la xaperona Ssq1 (Bandyopadhyay et al. 2008)(Uzarska et al. 2013). Això indicaria que el principal paper fisiològic de Grx5 a la mitocòndria no seria el d'oxidoreductasa, sinó el de formar complexos amb els centres Fe-S. L'acumulació de ferro també tindria com a conseqüència una acumulació de ROS, i aquestes a la vegada incrementarien els nivells de proteïnes carbonilades. La hipersensibilitat del mutant $\Delta grx5$ a l'estrès oxidatiu també s'explicaria pel fet que el

ferro acumulat desplaçaria el manganès de la Sod2 (MnSOD), inactivant-la (Irazusta et al. 2006)(M. Yang et al. 2006). També s'ha observat que deficiències en *GRX5* provoquen una major glutatiolació de proteïnes específiques, com la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (Shenton et al. 2002). Un estudi va demostrar que alguns dels residus de Grx5 són essencials per l'activitat de la proteïna (Bellí et al. 2002). De fet, mutacions en diferents residus es correlacionen amb uns fenotips concrets, com la sensibilitat a oxidants, l'oxidació constitutiva de proteïnes, defectes en el creixement respiratori, auxotròfia per alguns aminoàcids i acumulació de ferro. Concretament, C60 i G61 són essencials per la funció de Grx5, mentre que altres mutacions en aquesta mateixa regió no presenten fenotips. En canvi, G115 i G116 són importants per la formació de la cavitat d'unió del GSH i la substitució de F50 altera l'estructura de la proteïna i n'inhibeix la funció. No obstant, cap de les modificacions testades en aquest estudi van alterar l'estructura de la proteïna com per arribar a alterar i reduir l'estabilitat de la proteïna (Bellí et al. 2002).

Pel que fa a mamífers, s'ha identificat la presència d'una GRX monotiòlica, Grx5, molt similar a Grx5 de llevat i *zebrafish* i com en *S. cerevisiae*, presenta localització mitocondrial i està relacionada amb la biogènesi de centres Fe-S (Isakov, Witte, and Altman 2000). En un estudi amb un model de *zebrafish*, les mutacions en Grx5 es van associar amb un fenotip hematològic sever, causat per anèmies severes i letalitat embrionària, degut a una insuficient biogènesi dels centres Fe-S i una desregulació de l'activitat de la proteïna de resposta a ferro IRP1 (Wingert et al. 2005). En humans, també es va descriure el primer cas en que la deficiència en Grx5 deguda a una mutació al gen *GRX5* causa anèmia sideroblàstica (Camaschella et al. 2007). Les cèl·lules deficients en Grx5 tenen problemes en les proteïnes Fe-S (citosòliques i mitocondrials) i presenten elevats nivells de ferro mitocondrial (G. Liu et al. 2016). Ara es coneix que aquesta desregulació està causada pel fet que Grx5 és un component bàsic de la maquinària de biosíntesi de centres Fe-S, així com del mantenint de l'homeòstasi del ferro mitocondrial i citosòlic en cèl·lules humanes. La disminució dels nivells de Grx5 té com a conseqüència l'alteració en les proteïnes IRP1 i ferroquelatasa, ambdues essencials per la regulació de l'homeòstasi del ferro cel·lular i la biosíntesi de hemo, respectivament (Ye et al. 2010).

- **GRX3 i GRX4**

Grx3 i Grx4, amb un pes molecular de 28,23 kDa i 27,48 kDa respectivament, es van caracteritzar per primera vegada, juntament amb Grx5, com una nova subfamília de Grxs, caracteritzades per tenir un centre actiu CGFS amb una única cisteïna i diferent al de les GRXs ditiòliques Grx1 i Grx2 (M T Rodríguez-Manzanque et al. 1999). A diferència de Grx5, Grx3 i Grx4 es caracteritzen per tenir un domini addicional fusionat a l'extrem N-terminal de la molècula. En el cas del llevat, ambdues GRXs presenten un domini TRX fusionat al domini GRX (Figura 35), mentre que per exemple, en el cas de Grx3 humana, la proteïna està formada per un domini TRX fusionat a dos dominis GRX (Witte et al. 2000). En *S. cerevisiae*, aquest domini addicional és important per la compartimentalització de Grx3 i Grx4 (Molina et al. 2004) doncs ambdues tenen localització tan citosòlica (Kumánovics et al. 2008) com nuclear (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007). Quan Grx3 i Grx4 són modificades per ser dirigides a la mitocòndria, a diferència de les GRXs ditiòliques, poden substituir la funció de Grx5 (Molina et al. 2004). Per tant, la compartimentalització diferencial de cada una de les GRXs monotíoliques en determinarà la seva funció biològica. Aquest no és el primer cas de GRXs localitzades al nucli, doncs una isoforma humana de Grx2 també s'ha localitzat al nucli, on es creu que podria regular l'estat redox de factors transcripcionals nuclears a través de la glutatiolació (Lundberg et al. 2001).

El fet que tan Grx3 com Grx4 presentin una seqüència conservada al domini TRX que recorda al centre actiu de les Trx (tot i que tan sols conté un residu de Cys), va generar controvèrsia per saber si l'activitat oxidoreductasa la duu a terme el domini TRX o GRX. No obstant, ja es va descriure que el domini GRX era essencial per l'activitat d'ambdues GRXs, així com que el domini TRX no participava activament en la reacció d'oxidoreducció de la proteïna i tan sols es requeria per la localització nuclear d'ambdues GRXs (Molina et al. 2004). Grx4, a diferència de Grx3, només conté dos residus de cisteïna, el del domini TRX i el del domini GRX (Figura 35). S'ha descrit que es requereixen ambdues cisteïnes (la dels dominis TRX i GRX) només quan Grx3 i Grx4 són artificialment dirigides a la mitocòndria, possiblement perquè estableixen el domini GRX en la seva forma activa (Molina et al. 2004).

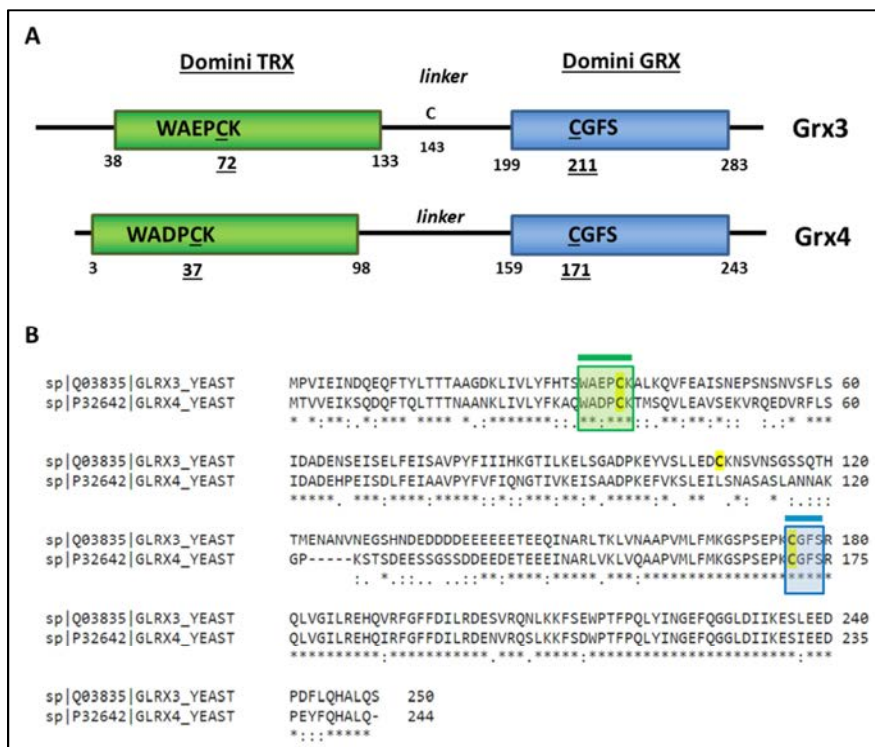


Figura 35. Seqüències de Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae*. (A) Esquema dels dominis TRX (en verd) i dominis GRX (en blau) de Grx3 i Grx4 amb la posició dels seus corresponents aminoàcids d'inici i final. S'indica la seqüència i posició de la seqüència conservada de cada un dels dominis. Adaptat de (Molina et al. 2004). (B) Alineament de les seqüències de Grx3 i Grx4 realitzat amb el software Clustal Omega (1.2.1). Les cisteïnes de cada proteïna es marquen en groc. En verd s'indica la seqüència conservada del domini TRX, i en blau el centre actiu de les proteïnes localitzat al domini GRX.

La funció biològica de Grx3 i Grx4 es va descriure més tard, tot i que la seva localització nuclear apuntava a que possiblement actuaven regulant algun factor transcripcional i per tant, l'expressió gènica. Les primeres evidències d'això van demostrar que tan Grx3 com Grx4 s'encarreguen de regular Aft1 (Pujol-Carrion et al. 2006)(Ojeda et al. 2006). Aft1 és un factor transcripcional que en condicions normals es localitza al citosol, però es transloca al nucli quan hi ha depleció de ferro (Yamaguchi-Iwai et al. 2002), on indueix l'expressió de gens d'assimilació del ferro. En aquests treballs es va demostrar que tan Grx3 com Grx4 interaccionen amb Aft1, tan pel domini TRX com pel domini GRX, i el regulen negativament, transportant-lo de nou al citoplasma. De fet, els mutants $\Delta grx3\Delta grx4$ presenten tots els gens que estan sota el control de Aft1

sobreexpressats, mentre que els mutants simples indueixen tan sols una translocació parcial de Aft1 (Pujol-Carrion et al. 2006). Com a conseqüència d'aquesta sobreexpressió, els mutants $\Delta grx3\Delta grx4$ acumulen grans quantitats de ferro intracel·lular, que genera un estrès oxidatiu endogen en aquestes cèl·lules (Pujol-Carrion et al. 2006).

In vitro es va demostrar que les GRXs monotíliques uneixen centres Fe-S. Quan eren purificades d'*E. coli*, formaven dímers no covalents, unint centres Fe-S a través de la cisteïna del centre actiu del domini GRX i utilitzant dues molècules de GSH com a lligands (Molina-Navarro et al. 2006)(Picciocchi et al. 2007)(Comini et al. 2008). En llevant es va descriure que la unió del ferro a Grx requeria de la seqüència CGFS, nivells suficients de GSH intracel·lulars i la maquinària d'acoblament de centres Fe-S mitocondrial (Mühlenhoff et al. 2010). També es va descriure la interacció física entre les GRXs monotíliques i una altra família de proteïnes, les proteïnes de tipus BOLA, tan en *S. cerevisiae* (Ito et al. 2000) com en *Drosophila* (Giot et al. 2003) i *E. coli* (Butland et al. 2005). La primera estructura cristal·litzada va ser Grx4 d'*E. coli*, on es confirmava que un homodímer Grx4 unia un centre Fe-S a través de la unió covalent amb dues molècules de GSH (Figura 36), les quals interaccionaven amb el lloc d'unió del GSH de cada un dels monòmers (Iwema et al. 2009).

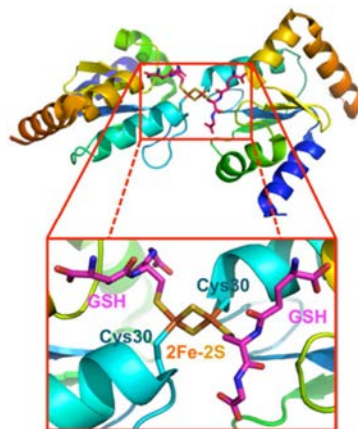


Figura 36. Estructura de l'homodímer de Grx4 d'*E. coli* per cristal·lografia de raigs X. Es mostra una ampliació del lloc d'unió del centre Fe-S a través del GSH. (PDB: 2WCI) (Iwema et al. 2009).

Grx3 i Grx4 formen homodímers unint el centre Fe-S a través del centre actiu CGFS del domini GRX. Així, quan la biosíntesi de centres Fe-S és activa, es promou la multimerització de Aft1 provocant la seva sortida del nucli. Quan els nivells de ferro són baixos o quan hi ha una alteració en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, aquesta via de senyalització deixa de funcionar, permetent que Aft1 s'acumuli al nucli i activi els gens del reguló del ferro. Es creu que Grx3 i Grx4 durien a terme funcions redundants pel que fa al metabolisme del ferro degut a la seva gran similitud de seqüència.

S'ha determinat que la manca de Grx3 i Grx4 comporta una alteració en tots els processos que depenen del ferro, com la biosíntesi d'hemo i la biogènesi de proteïnes citosòliques i mitocondrials amb centres Fe-S, normalment essencials en processos com la síntesi de DNA i la funció ribosomal. La pèrdua d'activitat de tots aquests enzims demostra que tot i els elevats nivells de ferro que aquest mutant acumula, aquest no estaria disponible (Mühlenhoff et al. 2010)(Zhang et al. 2011). Una mutació del residu de cisteïna del centre actiu altera tan la regulació del ferro com les funcions de transport d'aquest per part de Grx3 i Grx4, evita la incorporació de ferro, la formació *in vivo* de homodímers de Grx4 i impedeix la interacció entre Grx3/4 i Aft1 (Ojeda et al. 2006)(Mühlenhoff et al. 2010). En canvi, la mutació del residu de cisteïna del domini TRX té molt poc impacte en la formació d'homodímers i la unió del centre Fe-S *in vitro* (H. Li et al. 2009), així com la unió i transport de ferro i la regulació de Aft1/2 *in vivo* (Mühlenhoff et al. 2010). Més recentment, es va demostrar que, *in vitro*, tan Grx3 com Grx4 formen un heterodímer amb Fra2, unint el centre Fe-S (Figura 37). A més, aquests heterodímers Grx3/4-Fra2 són més estables que els homodímers Grx3/4 (H. Li et al. 2009). També s'ha vist que la unió del ferro al complex Grx3/4-Fra2 es realitza a través de la cisteïna del centre actiu de la Grx, de H103 de Fra i la cisteïna del GSH (H. Li et al. 2011). Fra1 també estaria interaccionant amb Fra2 *in vivo* i per tant, estaria formant part d'aquest mateix complex. L'eliminació del domini TRX no comporta cap efecte en la formació del complex Fra2-Grx3/4 (H. Li et al. 2009).

Així, Grx3 i Grx4 desenvoluparien dues funcions, com a transportadores i com a sensors de ferro. L'eliminació d'aquest centre Fe-S comporta l'aparició d'un fenotip

similar al observat en cèl·lules delecionades per Grx3 i Grx4 (Mühlenhoff et al. 2010)(Lill et al. 2012).

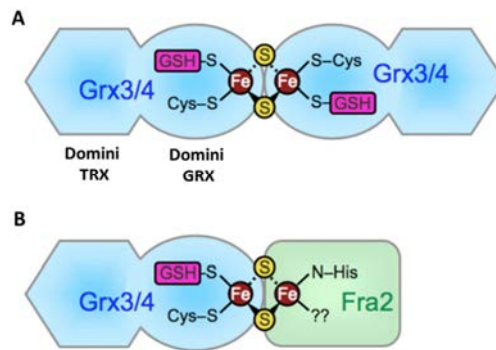


Figura 37. Models proposats d'unió de Grx3/4 als centres Fe-S. (A) Homodímer entre Grx3/4 i el centres Fe-S i (B) Heterodímer Grx3/4-Fra2 i el centre Fe-S (H. Li et al. 2009).

Una altra funció fisiològica que s'ha descrit per Grx3 i Grx4 està relacionada amb la remodelació del citoesquelet d'actina. En llevat, el citoesquelet d'actina està present en dos estats: la forma monomèrica globular o G-actina i la forma polimèrica filamentosa o F-actina. La F-actina a la vegada pot formar tres tipus diferents d'estructures filamentoses: els *patxes* d'actina, els cables d'actina i els anells d'actina (Moseley and Goode 2006)(M. Mishra, Huang, and Balasubramanian 2014). La principal diferència entre cables i *patxes* rau en el fet que els cables representen el màxim nivell de polimerització i organització estructural, estenent-se al llarg de la cèl·lula mare per permetre el transport d'òrgànuls a través de la cèl·lula (Schott, Huffaker, and Bretscher 2002)(Pruyne et al. 2004). En canvi, els *patxes* es correlacionen amb les zones de creixement polaritzat, acumulant-se a les zones de creixement durant la interfase (M. Mishra, Huang, and Balasubramanian 2014). Es coneix que l'actina és susceptible a ser oxidada per les ROS, possiblement pel seu elevat nombre de residus de cisteïna (Farah and Amberg 2007). Quan això succeeix en *S. cerevisiae*, el citoesquelet d'actina es despolaritza i té lloc la despòlimerització dels cables a forma de *patxes*, que s'acumulen arreu de la cèl·lula, iniciant-se una resposta front a l'estrès oxidatiu (Farah and Amberg 2007). Es va demostrar que Grx3 i Grx4 desenvolupen un paper en l'organització del citoesquelet d'actina, tan en condicions normals com en condicions d'estrès oxidatiu

(Pujol-Carrion and de la Torre-Ruiz 2010). Mentre que Grx4 manté la integritat dels cables d'actina, ambdues Grxs participen en la repolarització del citoesquelet en resposta als agents oxidants, i ho fan a través del seu domini TRX, independentment de les cisteïnes catalítiques (Pujol-Carrion and de la Torre-Ruiz 2010). Aquesta funció doncs, és essencial tan per la resposta a estrès oxidatiu com per la viabilitat cel·lular.

En mamífers s'ha descrit la presència d'una glutaredoxina monotiolica, anomenada Grx3 o PICOT, que presenta una alta homologia amb Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae* (Figura 38), identificada per primera vegada a través d'un assaig de doble híbrid en llevat, on es va determinar que Grx3 interaccionava físicament amb la proteïna cinasa C (Witte et al. 2000).

A diferència de Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae*, PICOT presenta un domini GRX addicional (Figura 38), fet que a través d'anàlisis computacionals també s'ha descrit per Grx3 de plantes, nematodes i peixos, però no en fongs, procariotes ni insectes (Witte et al. 2000). No obstant, la funció biològica conservada d'aquestes GRXs apunta a que un sol domini GRX és suficient per dur a terme la seva activitat (Molina-Navarro et al. 2006). Per exemple, Grx5 mitocondrial de llevat que només posseeix el domini GRX, és capaç de revertir el fenotip del mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ quan s'elimina la seqüència d'importació a la mitocòndria (Ojeda et al. 2006).

La primera funció descrita per PICOT en mamífers va ser que la seva sobreexpressió inhibeix l'activació de la cinasa c-Jun i dels factors transcripcionals AP-1 i NF- κ B en cèl·lules T. Aquesta funció depèn tan del domini GRX com TRX, tot i que el domini TRX per si sol ja és suficient per la seva interacció amb PKC (Witte et al. 2000). També es va descriure que Grx3 podria estar modulant positivament l'expressió de IL-4 i TNF- α en rata (N. Kato et al. 2008), i que aquest efecte en l'activació de la transducció podria tenir lloc en resposta a l'estrès oxidatiu (Babichev and Isakov 2001). A part de la senyalització en el sistema immune, Grx3 també s'ha associat amb la hipertròfica cardíaca.

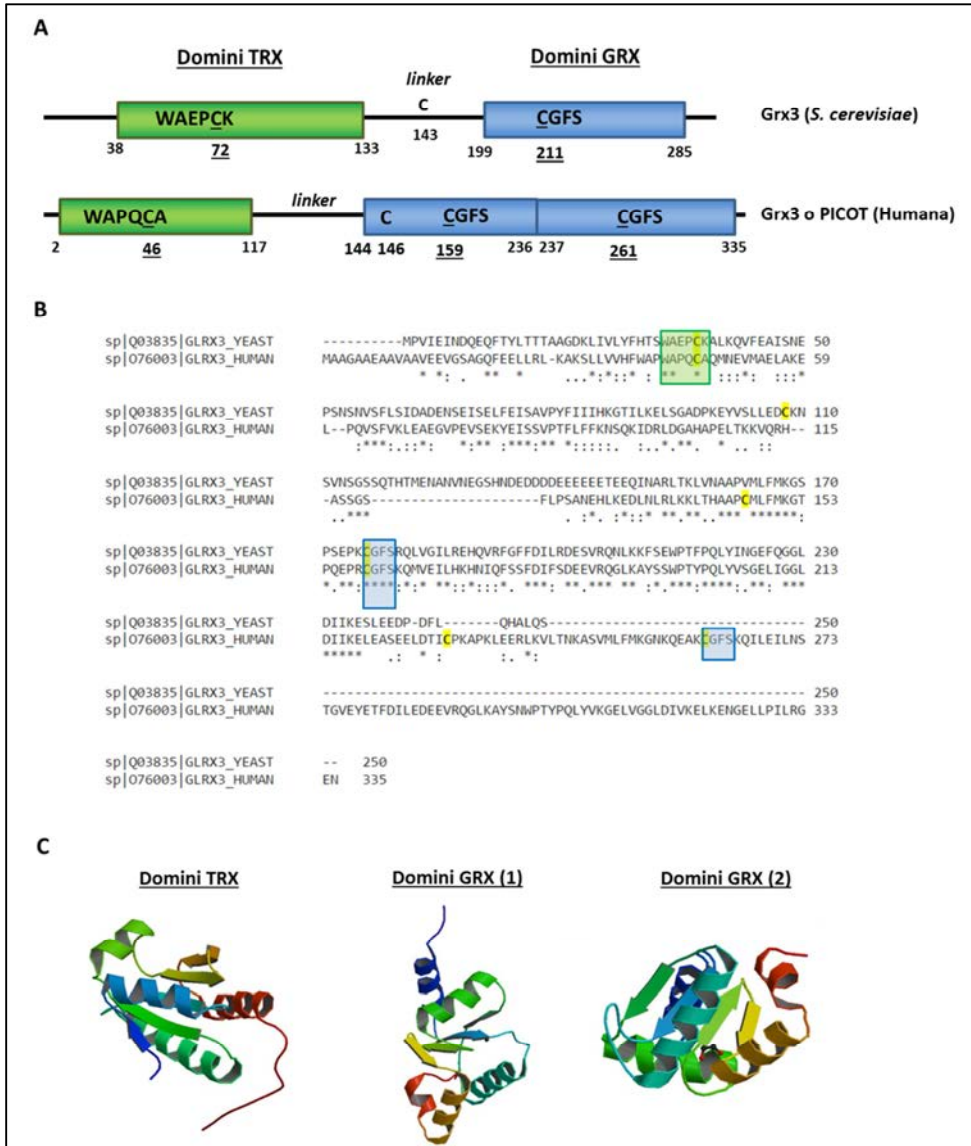


Figura 38. Seqüències de Grx3 de *S. cerevisiae* i Grx3 humana (o PICOT). (A) Esquema dels dominis TRX (en verd) i dominis GRX (en blau) d'ambdues Grx3, amb la posició dels seus corresponents aminoàcids d'inici i final. PICOT presenta dos dominis GRX consecutius. S'indica la seqüència i posició de la seqüència conservada de cada un dels dominis. Adaptat de (Molina et al. 2004)(E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007). (B) Alineament de les seqüències de Grx3 de *S. cerevisiae* i humana realitzat amb el software Clustal Omega (1.2.1). Les cisteïnes de cada proteïna es marquen en groc. En verd s'indica la seqüència conservada del domini TRX, i en blau, el centre actiu de les proteïnes localitzat al domini GRX. (C) Estructura tridimensional de cada un dels dominis que conformen la PICOT: domini TRX (PDB: 2WZ9), primer domini GRX (PDB: 3ZYW) i el segon domini GRX (PDB: 2YAN).

Grx3 s'indueix en cors de rata en resposta a estímuls hipertròfics, suggerint que pot tractar-se d'un modulador negatiu de la hipertròfia cardíaca a través de la inhibició de l'activitat de PKC (Jeong et al. 2006). A favor d'aquesta funció, ratolins *knockout* per Grx3 presenten hipertròfia cardíaca i un increment de la senyalització calcineurina-NFAT (Cha et al. 2008). També s'ha descrit que Grx3 tindria un paper crític en la regulació del creixement cel·lular i la metàstasi en càncer de mama a través de la senyalització NF- κ B (Y. Qu et al. 2011) i que estaria implicada en el procés d'apoptosi (Yun et al. 2013).

Per tant, PICOT participa en diferents funcions reguladores, com en el desenvolupament embrionari, la resposta immune, el càncer o la fisiologia cardíaca. Totes aquestes funcions es desenvoluparien a través de la interacció específica amb altres proteïnes, a través del domini TRX o GRX i segurament en resposta a condicions d'estrès oxidatiu. No obstant, fins al moment no s'havia descrit cap funció enzimàtica de Grx3 i la qüestió era com la funció de Grx3 podia estar regulada per senyals redox. Al 2010, es va descriure per primera vegada que PICOT podria formar un complex quaternari dimèric que implicaria la unió de centres Fe-S (Figura 39) i que la transició entre el complex i la forma monomèrica suposaria el mecanisme regulador de PICOT a través de la senyalització redox (Haunhorst et al. 2010).

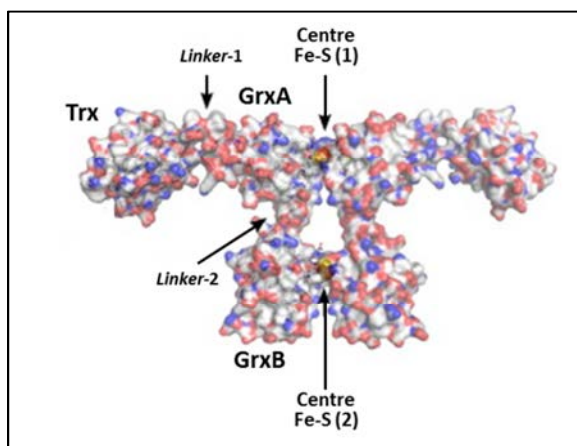


Figura 39. Model hipotètic del complex Grx3/Fe-S (Haunhorst et al. 2010).

Més endavant, estudis en cèl·lules humanes i *zebrafish* van relacionar Grx3 amb el metabolisme del ferro. La depleció de Grx3 està associada amb defectes en la biogènesi de proteïnes amb centres Fe-S i de l'hemo, i una desregulació general del metabolisme del ferro (Haunhorst et al. 2013), semblant al fenotip observat en llevat (Mühlenhoff et al. 2010), i per tant, la funció estaria conservada de llevats a humans. De fet, el model de *zebrafish* deficient en Grx3 presenta alteracions en la maduració de l'hemoglobina, un procés que requereix del ferro. El silenciament de Grx3 humana en cèl·lules HeLa provoca la disminució de l'activitat de proteïnes com IRP1, un dels components implicats en la regulació del ferro. També presenten nivells baixos de ferritina i elevats nivells del receptor de la transferrina (Haunhorst et al. 2013), fenotips característics de la manca d'aquest metall, suggerint que les cèl·lules deficientes en Grx3 són incapaces d'utilitzar eficientment el ferro, i apuntant de nou al paper conservat de les GRXs monotiòliques pel que fa al metabolisme del ferro.

En relació amb això, quan es transformen les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ de llevat amb Grx3 humana o de ratolí, aquestes tenen la capacitat de revertir els defectes en el creixement, sensibilitat als agents oxidants i l'acumulació de ferro intracel·lular (Cheng et al. 2011). En aquest mateix estudi es va demostrar que diferents oxidants tenien la capacitat d'induir de forma diferencial l'expressió de Grx3. Així, la diamida i el tert-butil hidroperòxid (tBHP) indueixen més l'expressió de Grx3 que el H_2O_2 (Cheng et al. 2011). Nivells baixos de Grx3 fan a les cèl·lules més susceptibles a l'estrès oxidatiu, mentre que la seva sobreexpressió és suficient per suprimir la sensibilitat de les cèl·lules a les condicions oxidants i reduir la producció de ROS (Pham et al. 2015). A més a més, també s'ha descrit que Grx3 participaria en el creixement cel·lular, desenvolupament d'òrgans i el funcionament normal del metabolisme durant el creixement i el desenvolupament, donat que embrions de ratolí deficientes en Grx3 presenten defectes morfològics i posterior letalitat. Aquest fet podria ser degut a que Grx3 és essencial per la progressió del cicle cel·lular, donat que fibroblasts de ratolí en fase embrionària tenen alterat el creixement i la progressió del cicle en fase G2/M (Cheng et al. 2011). De la mateixa forma, cèl·lules HeLa KO per Grx3 presenten un retard considerable en la sortida de mitosis i un alt percentatge de cèl·lules binucleades (Cheng et al. 2011).

Tot i els múltiples processos en els que s'ha relacionat Grx3 de mamífers, la seva regulació encara no està ben descrita. En condicions normals s'ha determinat que es localitza al citosol, però és translocada al nucli en resposta a un estrès oxidatiu (Pham et al. 2015), fet que es correlaciona amb un augment de les ROS així com una disminució dels nivells de GSH. A més, aquest canvi de localització depèn de l'agent oxidant, doncs sí que s'observava amb agents com la diamida, el dietilmaleat (DEM) i el 1-cloro-2,4-dinitroclorobenzè (CDNB), un compost que elimina ràpidament el GSH de la cèl·lula. En canvi, el H₂O₂, la hipòxia o la privació de nutrients pràcticament no tenien efectes en la translocació (Pham et al. 2015). En aquest cas, a diferència del que succeeix en llevat, la translocació al nucli no depèn del domini TRX (Molina et al. 2004), sinó que seria el primer domini GRX i ho faria per un mecanisme independent al de la via d'exportació nuclear mediada per Crm1 (Pham et al. 2015).

- **GRX6 i GRX7**

Tan Grx6 com Grx7 van ser descrites posteriorment a Grx3 i Grx4. Tot i estar incloses en el grup de GRX monotioliques, presenten un centre actiu característic, diferent a la seqüència CGFS present en la resta de Grxs monotioliques. Grx6 presenta la seqüència CSYS i Grx7 la seqüència CPYS (Figura 41), que recorden més al de les ditioliques que al de les monotioliques (Mesecke, Mittler, et al. 2008)(Mesecke, Spang, et al. 2008). Ambdues GRXs, a diferència de la resta de monotioliques, són actives en l'assaig HED i posseeixen només un domini GRX a més d'una seqüència de localització transmembrana en el seu extrem N-terminal (Mesecke, Spang, et al. 2008)(Izquierdo et al. 2008). Pel que fa a l'estructura tridimensional, presenten un plegament tipus TRX igual que la resta de GRXs i només es diferencia de Grx1 i Grx2 per la presència de dues cadenes β antiparal·leles addicionals en el domini GRX (Figura 40), al costat del lloc d'unió del GSH (Luo et al. 2010).

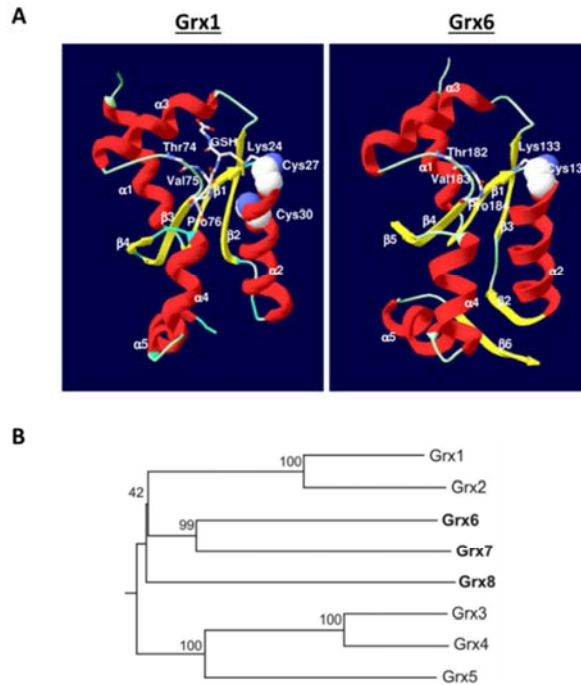


Figura 40. Estructura tridimensional de Grx1 i Grx6 de *S. cerevisiae* i anàlisi filogenètic de les seqüències de les GRXs de *S. cerevisiae*. (A) Es mostra l'estructura tridimensional de Grx1 glutatiolada (PDB: 3C1S) i de Grx6 monomèrica (PDB: 3L4N), utilitzant el software Swiss-PdbViewer 4.0.1. S'indiquen els residus de cisteïna del centre actiu i els residus implicats en la interacció amb el GSH (Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010). (B) Anàlisi filogenètic de les seqüències de les GRXs de *S. cerevisiae* utilitzant el software DNAMAN (Mesecke, Spang, et al. 2008).

La presència de la seqüència transmembrana (Figura 41) va suggerir que ambdues proteïnes havien d'estar associades a membranes i que les seves funcions podien estar relacionades amb la regulació redox dels processos que tenen lloc als compartiments de la maquinària secretora (Tu and Weissman 2004)(Chakravarthi, Jessop, and Bulleid 2006). De fet, es va demostrar que Grx7 es localitza a l'aparell de Golgi, mentre que Grx6 es troba tan a l'aparell de Golgi com al reticle endoplasmàtic (Izquierdo et al. 2008)(Mesecke, Spang, et al. 2008). El centre actiu CS/PYS es troba posicionat al lumen de les vesícules (Rouhier 2010). Tot i que existeixen homòlegs de Grx6 i Grx7 en altres fongs i plantes, la presència del domini transmembrana i per tant, la seva localització, és característica de fongs (Izquierdo et al. 2008).

de les vesícules secretores. De fet, l'equilibri entre proteïnes glutatiolades i desglutatiolades al reticle endoplasmàtic podria ser un mecanisme per regular el rati entre el GSH i el GSSG. Donat que el GSH és important per l'activitat de la maquinària Ero1/PDI (Chakravarthi, Jessop, and Bulleid 2006)(Sevier and Kaiser 2008), aquestes GRXs podrien actuar com a reguladors generals del plegament proteic a través de la seva activitat oxidoreductasa (Carsten Berndt, Lillig, and Holmgren 2008). Recentment, s'ha descrit que un mutant $\Delta grx6$ presenta elevats nivells de calci al citosol comparat amb una soca WT però en canvi, no presenta acumulació de Ca^{2+} al lumen del reticle (Puigpinós, Casas, and Herrero 2015), apuntant a que Grx6 actuaria com una moduladora de l'homeòstasi del calci, funció que possiblement realitzaria a través de la desglutatiolació d'algun transportador de Ca^{2+} (Puigpinós, Casas, and Herrero 2015).

Donat que la presència de Grx6 i Grx7 està restringida a les membranes de fongs, en eucariotes superiors la seva funció hauria de ser realitzada per altres oxidoreductases, com les proteïna disulfur isomerases (PDI). De fet, en mamífers s'ha descrit la regulació redox de varis transportadors de Ca^{2+} , com l'ATPasa SERCA (Raturi, Ortiz-Sandoval, and Simmen 2014) per membres de la família de les PDI (Y. Li and Camacho 2004).

6. ESTRUCTURA DEL GENOMA DE *S. CEREVISIAE*

El genoma dels organismes eucariotes no es troba en forma de polímer lineal, sinó que està empaquetat en una estructura formada per DNA i proteïnes (histones i no histones), que rep el nom de cromatina. Aquesta estructura, a part d'ajudar a reduir la longitud del DNA en varis ordres de magnitud, també estableix les bases per la seva regulació, establint regions de major i menor accessibilitat que permetran regular l'activitat gènica, des de la replicació del DNA, fins a la transcripció, recombinació i reparació.

La unitat bàsica de la cromatina és el nucleosoma que consta de 147 parells de bases (pb), embolcallats en un nucli de proteïnes, format per dues histones H2A, dues H2B, dues H3 i dues histones H4. Aquest octàmer està format per un tetràmer central, conformat per les dues histona H3 i les dues histona H4, i que es troba flanquejat per

dos dímers formats per la histona H2A i H2B cadascun (Figura 42)(Arents and Moudrianakis 1993)(Luger et al. 1997)

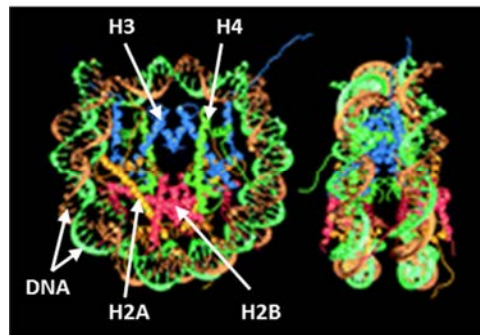


Figura 42. Estructura del nucleosoma. Estructura del nucleosoma mostrada en dues perspectives. S'hi observa la doble hèlix de DNA (verd i taronja) rodejant l'octàmer d'histones format per la histona H3 (blau), H4 (verd), H2A (groc) i H2B (vermell) (Luger et al. 1997).

Els nucleosomes acaben formant un nucleofilament a base d'unir-se entre si a través del DNA espaiador, de longitud variable segons l'espècie. A la vegada, aquests nucleofilaments es tornaran a plegar fins a la formació de cromosomes altament compactats (Figura 43). Una cinquena histona H1 s'uniria al DNA espaiador i al nucleosoma, estabilitzant així la compactació de la cromatina (Zhou et al. 1998).

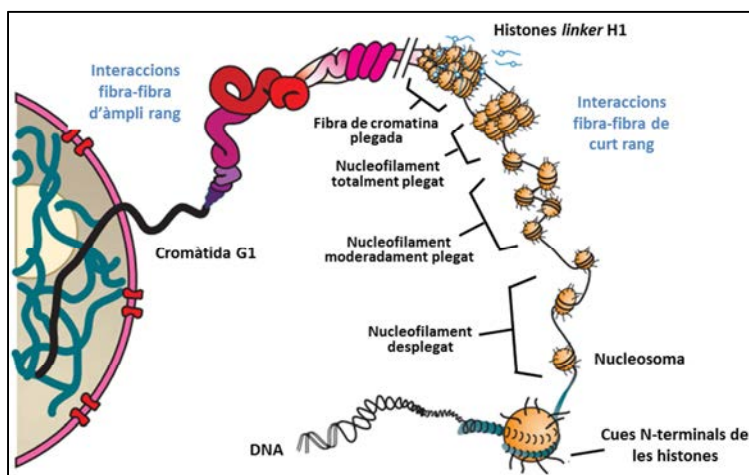


Figura 43. Representació esquemàtica dels nivells de condensació de la cromatina. Es mostra com el DNA forma el nucleosoma juntament amb les histones. Aquest anirà experimentant cada vegada un major grau de plegament fins que finalment acabarà formant la fibra de cromatina, la qual acabarà donant lloc als cromosomes altament compactats. Adaptat de (Hansen 2002).

El grau de compactació i d'organització de la cromatina no és homogeni al llarg del genoma (Dillon 2004), donant lloc a dues formes de cromatina: l'heterocromatina i l'eucromatina, representant la forma de major i menor condensació del genoma, respectivament (Figura 44).

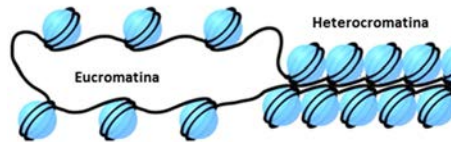


Figura 44. Representació dels diferents graus de compactació de la cromatina. La heterocromatina representa el màxim nivell de condensació de la cromatina, mentre que la eucromatina fa referència al menor grau de condensació.

Originàriament, Emil Heitz al 1928 va definir citològicament l'heterocromatina com la part del cromosoma que es trobava molt tnyida (condensada) en totes les fases del cicle cel·lular, en contraposició de la eucromatina, que experimentava cicles de major i menor tnció (condensació i descondensació) a les diferents fases del cicle cel·lular, en cèl·lules d'insectes. Una altra característica de l'heterocromatina és la seva tendència a localitzar-se en llocs específics del nucli, incloent l'embolcall nuclear i el nuclèol (X. Bi 2014).

La cromatina es tracta d'una estructura flexible i dinàmica que pot ser regulada per diferents mecanismes, entre ells, la modificació de les histones que en formen part. Les histones són proteïnes de baix pes molecular, molt conservades i riques amb residus de lisina i arginina, fet que els hi confereix un caràcter molt bàsic. Estructuralment, les histones tenen dos dominis: el domini globular de la regió C-terminal i un domini no estructurat de la regió N-terminal. Es coneix que mentre que el domini globular participa en la interacció histona-histona i histona-DNA, el domini N-terminal no participa en el manteniment de la integritat estructural del nucleosoma (Luger et al. 1997), sinó que sobresurt de l'estructura global de l'octàmer, participa amb la interacció amb nucleosomes adjacents i és essencial per la condensació de la cromatina (Spencer and Davie 1999). Així, els extrems N-terminals interaccionarien amb altres proteïnes, histones i no histones. De fet, es va observar que la part N-terminal de la

histona H4 s'unia a la histona H2A i H2B del nucleosoma contigu, contribuint així al plegament de la fibra de cromatina (Lenfant et al. 1996)(Luger et al. 1997). Proteïnes no histones, com el cas de Sir3 i Sir4 en llevat, també es poden unir a les cues N-terminal de H3 i H4 (Grunstein 1998). A més, es coneix que aquestes cues de les histones són susceptibles a una gran quantitat de modificacions postraduccionals, les quals seran responsables de la remodelació de la cromatina i per tant, del control de l'expressió dels gens.

En *S. cerevisiae* s'han identificat regions del genoma que estan silenciades o bé són susceptibles a ser-ho. Entre aquestes destaquen el loci d'aparellament, els telòmers i la regió del DNA que codifica pel rRNA (rDNA). En l'apartat 8.4 de la Introducció es detallaran els mecanisme de silenciament en cada una d'aquestes regions del genoma.

6.1. Remodelació de la cromatina

Un dels mecanismes de control de l'estat de l'estructura de la cromatina és la modificació de les histones. Les histones estan subjectes a una gran quantitat de modificacions postraduccionals, que inclouen l'acetilació i la metilació de lisines i arginines, la fosforilació de serines i treonines, la ubiquitinació i sumoilació de lisines i la ribosilació. A més, cada residu de lisina pot acceptar un, dos i inclús tres grups metils, mentre que una arginina pot estar mono- o dimetilada. La majoria d'aquestes modificacions tenen lloc als extrems N- i C-terminal de les cues de les histones, però cada vegada són més els exemples de modificacions que també tenen lloc als dominis centrals de les histones (Peterson and Laniel 2004). Així, les modificacions controlen l'estructura i/o funció de la fibra de cromatina, donant lloc a diferents conseqüències funcionals. De fet, s'ha relacionat que combinacions de modificacions específiques de les histones es correlacionen amb funcions biològiques particulars.

Per exemple, en *S. cerevisiae* l'acetilació de H4K16 bloqueja el plegament de la fibra de cromatina (Shogren-Knaak et al. 2006), mentre que la metilació de H3K4 i de H3K79 està associada amb l'activació transcripcional de la cromatina. En altres organismes com *Drosophila* o vertebrats, és la histona H3K9 la que es troba hipermetilada (Grewal

and Jia 2007). La Figura 45 mostra algunes de les modificacions que tenen lloc a les diferents histones de *S. cerevisiae*.

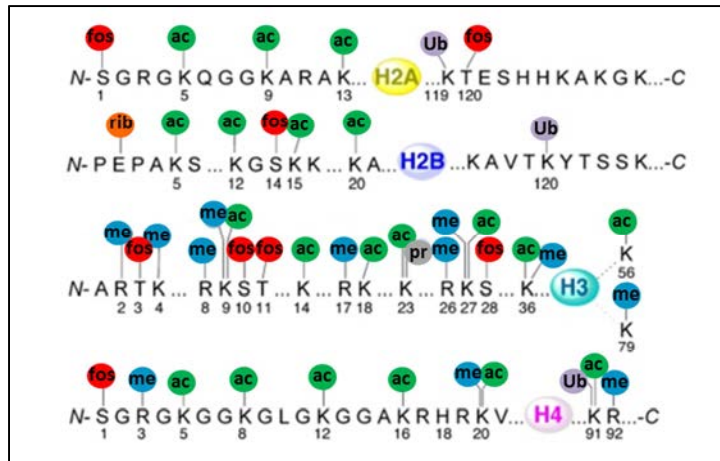


Figura 45. Representació esquemàtica dels extrems de les histones amb les seves modificacions postraduccionals. Es mostren les modificacions tan del domini N-terminal com del C-terminal i del domini globular. Les modificacions s'indiquen: ac, acetilació; me, metilació; fos, fosforilació; pr, propionilació; rib, ribosilació i ub, ubiquitinació. Adaptat de (Chatterjee and Muir 2010).

Des del coneixement que les modificacions de les histones afectaven diferents funcions biològiques, s'han anat descrivint, tant en llevat com en eucariotes superiors, les conseqüències dels diferents tipus de modificacions en cada un dels residus i els enzims que hi participen (Peterson and Lanier 2004). Concretament, la modificació de les histones per acetilació provoca la reducció de la càrrega positiva d'aquestes, i conseqüentment, es produeix una disrupció de les interaccions electrostàtiques entre les histones i el DNA, fent que el nucleosoma adopti una estructura oberta o accessible (Strahl and Allis 2000). Això comportarà la formació d'una estructura de la cromatina menys compactada, facilitant l'accés de la maquinària molecular implicada en el control transcripcional. Contràriament, la desacetilació de les histones produirà l'efecte invers, donant com a resultat una estructura més compactada (Ruthenburg et al. 2007) i conseqüentment, el silenciament transcripcional. Els diferents estats d'acetilació de les histones es mantenen per la combinació específica de les histona acetiltransferases (HATs), que afegeixen grups acetil i de les histona desacetilases (HDACs), que són les encarregades d'eliminar les acetilacions. D'enzims histona desacetilases n'hi ha de

diferents tipus. En el cas de mamífers s'han descrit fins a 18 HDACs diferents, les quals es divideixen en quatre classes segons la seva similitud de seqüència amb els seus homòlegs de llevat (de Ruijter et al. 2003)(Gregoret, Lee, and Goodson 2004). Les HDACs clàssiques són dependents de Zn^{2+} per la seva activitat catalítica i constitueixen les classes I, II i IV. Les HDACs de classe I, molt relacionades amb la Rpd3 de llevat, inclouen la Hos1, Hos2 i Rpd3 en el cas de llevat, i la HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8 en el cas de mamífers. Les HDACs de classe II estan relacionades amb la Hda1 de llevat i engloben la subclasse IIa que inclou la HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9, i la subclasse IIb que inclou la HDAC6 i la HDAC10. En llevat, la classe II inclou la Hda1 i la Hos3. La classe IV consta tan sols de la HDAC11 en el cas de mamífers. Finalment la classe III de HDACs es caracteritzen per ser estructuralment i mecanísticament molt diferents de les altres classes de histona desacetilases, donat que requereixen NAD^+ per catalitzar la reacció de desacetilació (Delcuve, Khan, and Davie 2012), i a més, a diferència de la resta, l'àtom de Zn^{2+} no està implicat en la reacció de desacetilació (Chakrabarty and Balaram 2010). El llevat inclou les sirtuïnes Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 i Hst4, mentre que en mamífers hi ha les homòlogues a la família Sir2/Hst de llevat que inclouen set sirtuïnes diferents, de la Sirt1-Sirt7.

D'entre aquests múltiples enzims, aquest treball es va centrar en les sirtuïnes i concretament en la regulació de Sir2, una histona desacetilasa de *S. cerevisiae* caracteritzada per ser NAD^+ dependent.

7. LES SIRTUÏNES

Tal com s'ha comentat les sirtuïnes són una família d'histona desacetilases dependents de NAD^+ , altament conservada des de bacteris fins a humans. Sir2 és el membre fundador de les sirtuïnes, identificat per primera vegada en *S. cerevisiae* a través de mutacions que donaven lloc a expressions aberrants de regions del genoma que normalment estaven silenciades, tot i que aleshores es desconeixia que es tractava d'una histona desacetilasa (Ivy, Klar, and Hicks 1986)(Rine and Herskowitz 1987). Sir2 és doncs un dels membres d'una família de gens *SIR* (*Silent Information Regulator*), ja que més tard, es van descriure quatre homòlegs de Sir2 addicionals en *S. cerevisiae* que

presentaven una homologia del 30% al 63% amb *SIR2*, anomenats Hst1, Hst2, Hst3 i Hst4 (Brachmann et al. 1995).

7.1. Metabolisme del NAD⁺

El NAD⁺ i el NADH són coenzims essencial que participen en una gran varietat de reaccions redox. A més, el NAD⁺ (Figura 46) i els seus derivats també funcionen com a substrats i molècules senyalitzadores de processos com la senyalització del Ca²⁺, l'estructura de la cromatina, la reparació del DNA o l'envelliment (Lin and Guarente 2003)(Bürkle 2005)(Chini 2009). A més, un metabolisme del NAD⁺ alterat també s'ha relacionat amb càncer, desordres metabòlics i malalties neurodegeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer (Belenky, Bogan, and Brenner 2007)(Zhai et al. 2008)(Imai and Yoshino 2013).

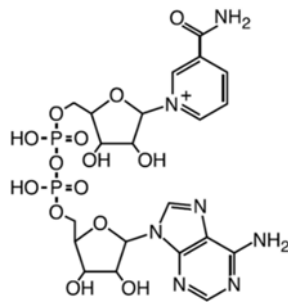


Figura 46. Estructura del NAD⁺

Alguns processos cel·lulars com per exemple la desacetilació dependent de Sir2 requereixen NAD⁺ (Anderson et al. 2002)(Sandmeier et al. 2002). Per tal de mantenir els nivells correctes de NAD⁺ requerits pel funcionament de tots els processos que en consumeixen, les cèl·lules han desenvolupat vies de biosíntesi i senyalització per així poder-ne regular els nivells intracel·lulars. Bàsicament, les cèl·lules poden obtenir NAD⁺ per dues vies; la via de síntesi *de novo* i la via de recuperació (Figura 47).

La via de síntesi *de novo* o via de la kinurenina genera NAD⁺ a partir del triptòfan, bàsicament quan hi ha absència d'àcid nicotínic i nicotinamida. Aquesta via implica la

degradació oxidativa del triptòfan a àcid quinolínic i successives reaccions a partir dels enzims BNA1-6 fins acabar generant NAD^+ . No obstant, les cèl·lules són capaces de reutilitzar els metabòlits intermediaris com la nicotinamida (NAM) i l'àcid nicotínic (NA) i així acabar generant NAD^+ a través de la via de recuperació. Tan els llevats com les cèl·lules de mamífers són capaces d'importar l'àcid nicotínic del medi extracel·lular a través del transportador *TNA1* (Antonio Bedalov et al. 2003)(M. Kato and Lin 2014). De fet, les cèl·lules de llevat sembla que produeixen NAD^+ predominantment per la via de recuperació durant el creixement exponencial (Sporty et al. 2009), donat que els medis convencionals de creixement contenen altes concentracions de niacina i el transportador *TNA1* és molt eficient en el transport d'aquest metabolit (Llorente and Dujon 2000).

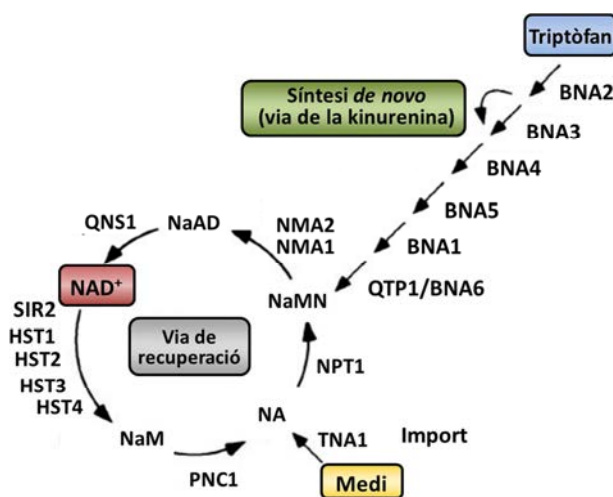


Figura 47. Vies de biosíntesi de NAD^+ en llevat. Es mostra la via de síntesi *de novo* (o via de la kinurenina) i via de recuperació, amb cada un dels enzims implicats (Antonio Bedalov et al. 2003).

La nicotinamida és majoritàriament un producte de la reacció de desacetilació duta a terme per les sirtuïnes de la família *SIR* (Sir2 i els seus homòlegs Hst) i pot ser reconvertida a àcid nicotínic. L'enzim *Npt1* és essencial en la via de recuperació del NAD^+ , donat que és responsable de la reutilització de l'àcid nicotínic i la captació d'aquest del medi extracel·lular (J. S. Smith et al. 2000). Les cèl·lules de llevat deficientes en *NPT1* depenen de la via de síntesi *de novo* com a única font de NAD^+ i la deleció de

NPT1 juntament amb gens de la via de la kinurenina (gens *BNA*) causa letalitat (Panozzo et al. 2002).

7.2. Família de les sirtuïnes en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, el grup de sirtuïnes el conformen 5 membres (Ivy, Klar, and Hicks 1986). Sir2 que és el membre fundador d'una gran família de proteïnes conservades des de bacteris fins a humans, i els seus homòlegs Hst1, Hst2, Hst3 i Hst4 (*Homologs of Sir Two*). Donada la importància de Sir2 en aquest treball, es dedicarà un apartat especial, on es descriurà en detall tan les característiques com la funció d'aquesta proteïna (apartat 8 de la Introducció). Tot i la homologia que presenten Hst1-4 amb Sir2, es creu que aquests gens no serien completament redundants i desenvoluparien algunes funcions diferents *in vivo* (Dutnall and Pillus 2001)(Wierman and Smith 2014).

▪ *HST1*

HST1 es caracteritza per ser el membre que presenta major homologia amb Sir2. La seqüència entre *SIR2* i *HST1* es troba conservada en un 63% (Brachmann et al. 1995), bàsicament en tres regions (Figura 48): el domini catalític (82%) i les dues regions de l'extrem N-terminal i C-terminal menys conservades (M. M. Cockell, Perrod, and Gasser 2000).

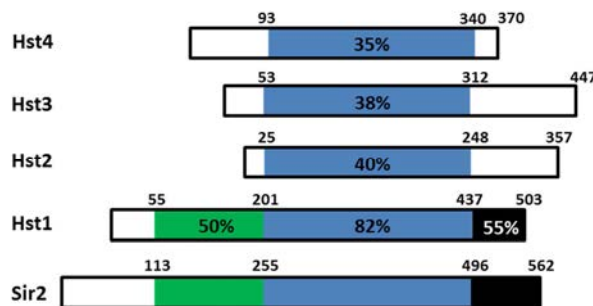


Figura 48. Alineament comparatiu de la família de les proteïnes *SIR2* de *S. cerevisiae*. Sir2 i els seus homòlegs Hst s'han alineat segons els seus dominis conservats, indicant l'identitat de cada un dels dominis. Només la regió C- i N-terminal de Hst1 mostren una identitat significativa amb les mateixes regions de Sir2. Els blocs blancs indiquen les regions de seqüència única de cada un dels membres (M. M. Cockell, Perrod, and Gasser 2000).

Tot i la similitud entre *HST1* i *SIR2*, s'ha descrit que les seves funcions no són redundants (Brachmann et al. 1995)(McCord et al. 2003) i que l'absència de *HST1* no afecta el silenciament ni al rDNA ni al locus d'aparellament (Derbyshire, Weinstock, and Strathern 1996), localitzacions on Sir2 sí actua. Hst1 és un component d'almenys dos complexos diferents. S'uneix a la proteïna d'unió al DNA Sum1 a través d'interaccions amb Rfm1, per així formar un complex que reprimeix els gens d'esperulació durant el creixement vegetatiu (Sutton et al. 2001)(McCord et al. 2003). Hst1 participa també amb el complex Set3c, el qual reprimeix la transcripció de gens específics de meiosi (Pijnappel et al. 2001). Una altra funció en la qual s'ha relacionat Hst1 és la regulació de la biosíntesi *de novo* de NAD⁺, reprimint a través de la seva activitat desacetilasa, els gens *BNA* i el transportador *TNA1* quan els nivells intracel·lulars de NAD⁺ són adequats (Bedalov et al. 2003). Sir2 i Hst1 participen conjuntament en el manteniment de la llargada dels telòmers donat que s'ha descrit que el doble mutant $\Delta sir2 \Delta hst1$ presenta un clar escurçament de la llargada dels telòmers (M. Li et al. 2013). Hst1 presenta baixa afinitat pel NAD⁺, fet que concorda amb que actui com un sensor fisiològic del NAD⁺ i un regulador de la seva biosíntesi (Antonio Bedalov et al. 2003). Així, degut a la seva baixa afinitat comparat amb Sir2, la disminució de l'activitat desacetilasa en resposta a la depleció de NAD⁺ i la conseqüent derepressió dels gens serà molt més pronunciada per aquells gens regulats per Hst1 que pels regulats per Sir2. Finalment, Hst1 també participaria en la regulació de la biosíntesi de la tiamina, reprimint la transcripció dels gens *TH1* (M. Li et al. 2010). Tot i desenvolupar funcions diferents, Sir2 i Hst1 es poden substituir parcialment. La sobreexpressió de *HST1* suprimeix parcialment els defectes de silenciament de les cèl·lules MAT α deficientes en *SIR2* (Brachmann et al. 1995) i en cèl·lules $\Delta hst1$, Sir2 pot substituir la funció de Hst1 (Hickman and Rusche 2007). A més a més, una proteïna quimèrica composta per l'extrem N-terminal de Sir2 i el C-terminal de Hst1 té capacitat de complementar tan les mutacions $\Delta sir2$ com $\Delta hst1$, interaccionant amb Sir4 i Sum1 (Hickman and Rusche 2007)(Mead et al. 2007). No obstant, això tan sols succeeix quan aquestes es sobreexpressen, doncs sota nivells normals d'expressió les proteïnes no són capaces de complementar la funció de l'altra. Per tant, les dues proteïnes durien a terme diferents activitats reguladores: Sir2 funcionaria com un silenciador transcripcional amb repercussions en diferents regions

del genoma, mentre que Hst1 actuaria a nivell local com un repressor transcripcional de certs promotors (Mead et al. 2007).

- **HST2**

Hst2 és l'únic membre de la família de les sirtuïnes de *S. cerevisiae* que és principalment citosòlica donat que conté una seqüència d'exportació nuclear que causa la seva sortida del nucli a través de l'exportina Crm1 (Wilson et al. 2006). No presenta tanta homologia amb Sir2 com Hst1 i es creu que les regions no conservades poden contribuir a les funcions específiques de cada un dels membres de la família Sir2, sobretot la regió N-terminal. De fet, mentre que Hst1 i Sir2 tenen regions N- i C-terminal que comparteixen un 50% i un 55% d'identitat (Figura 48) (M. M. Cockell, Perrod, and Gasser 2000), Hst2 no presenta ni l'extensió N-terminal, ni conserva el domini C-terminal (Perrod et al. 2001).

Hst2 és l'homòleg de Sir2 que s'expressa més en llevat i que presenta major activitat desacetilasa NAD⁺ dependent (M. Kato and Lin 2014). S'ha descrit que silencia al rDNA regulant-se a través de la seva entrada i sortida del nucli (Perrod et al. 2001)(Wilson et al. 2006). La sobreexpressió de *HST2* comporta una reducció del silenciament dependent de Sir2 als telòmers, així com un increment del silenciament i la reducció de la recombinació al rDNA (Perrod et al. 2001)(Lamming et al. 2005). Això es creu que seria degut a que Hst2 podria competir amb Sir2 per algun altre factor necessari pel silenciament telomèric però que no seria Sir4 donat que la sobreexpressió de *HST2* no afecta la localització de Sir4, fent improbable doncs que Hst2 actuï modulant el complex Sir. La disminució dels nivells de Sir2 als telòmers degut a la sobreexpressió de *HST2*, provocaria un increment en la presència de Sir2 al rDNA (Perrod et al. 2001).

- **HST3 i HST4**

Igual que la resta de membres de la família *SIR*, Hst3 i Hst4 també presenten un domini més conservat, amb una identitat amb Sir2 del 38% i del 35%, respectivament (Figura 48)(M. M. Cockell, Perrod, and Gasser 2000). Pel que fa a la funció de Hst3 i Hst4, s'ha observat que els dobles mutants $\Delta hst3\Delta hst4$ presenten defectes en el silenciament dels telòmers i una major inestabilitat genòmica (Brachmann et al. 1995). També s'ha

descriu que *Hst3* i *Hst4* contribueixen conjuntament a la progressió del cicle cel·lular (Brachmann et al. 1995), establint així una relació entre el silenciament i aquests processos cel·lulars fonamentals. Més recentment, es va determinar que la preservació de la integritat genòmica i la correcta progressió a través del cicle cel·lular es duia a terme controlant la desacetilació del residu de lisina 56 de la histona H3 per part de les sirtuïnes *Hst3* i *Hst4* (Celic et al. 2006). En els mutants $\Delta hst3\Delta hst4$ aquesta histona es troba completament hiperacetilada, donant lloc a fenotips com dany espontani al DNA, pèrdua de cromosomes, termosensibilitat i sensibilitat a agents genotòxics (Brachmann et al. 1995)(Celic et al. 2006). Recentment s'ha demostrat que *Hst3* és essencial per mantenir l'estabilitat dels cromosomes (Irene et al. 2016). A més, tot i la diferència de seqüència i de regulació de l'estabilitat entre *Hst3* i *Hst4* (Delgosaie et al. 2014)(Edenberg et al. 2014), s'ha demostrat que *Hst4* pot substituir completament a *Hst3* quan és expressada sota el control del promotor *HST3*, indicant que o el moment o els nivells d'expressió de *Hst3* són crucials en el manteniment dels cromosomes i no les diferències de seqüència entre *Hst3* i *Hst4* (Irene et al. 2016).

7.3. Família de sirtuïnes en eucariotes superiors

Sir2 és el membre fundador de la família de les histona desacetilases NAD^+ dependents, descrita per primera vegada per la seva funció en llevat (Klar, Fogel, and Macleod 1979). Ara es coneix que les sirtuïnes componen una gran família que es troba present des de bacteris fins a humans. Mentre que en bacteris tan sols s'ha descrit la presència d'una única sirtuïna, en mamífers s'han descrit fins a 7 sirtuïnes diferents. Tot i que totes es caracteritzen per tenir el domini sirtuïna conservat, presenten funcions i localitzacions subcel·lulars diferents (Taula 5).

La proteïna *Sirt1* humana és la sirtuïna més ben caracteritzada en mamífers i és també, la que presenta major homologia amb *Sir2*.

Sirtuïna	Localització subcel·lular	Activitat enzimàtica	Funció	Substrat diana
SIRT1	Nucli Citoplasma	Desacetilasa	Formació de la cromatina Biogènesi mitocondrial Oxidació d'àcids grassos Regulació del colesterol i homeòstasi de l'àcid biliar	p53, FOXO1/3, NF- κ b, HIF1 α , CRTC2, PGAM-1, PGC1 α , SREBP, LXR, FXR, LKB1
SIRT2	Citoplasma Nucli	Desacetilasa Demiristoilasa	Regulació del cicle cel·lular Promoció lipòlisi als adipòcits Promoció/Supressió tumoral Neurodegeneració	α -tubulina, FOXO1, FOXO3, p300
SIRT3	Mitocòndria	Desacetilasa Decrotonasa	Regulació de l'activitat mitocondrial Protecció front l'estrès oxidatiu Supressió tumoral	LCAD, ACS2, SOD2, IDH2, HMGCS, OTC, subunitats cadena transport electrònic, ATP sintasa
SIRT4	Mitocòndria	ADP-ribosilasa Desacetilasa Lipoamidasa	Metabolisme de la glucosa Catabolisme d'aminoàcids Supressió tumoral	IDE, ANT2, ANT3, GDH, MCD, PDH
SIRT5	Mitocòndria Citoplasma Nucli	Desacetilasa Demanolinasa Desuccinilasa	Cicle de la urea Metabolisme àcids grassos Metabolisme aminoàcids	CPS1, UOX
SIRT6	Nucli	ADP-ribosilasa Desacetilasa Deacilasa	Estabilitat genòmica, reparació del DNA Metabolisme glucosa i lípids Inflamació	HIF1 α , PARP1, TNF α , GCN5
SIRT7	Nuclèol	Desacetilasa	Biogènesi ribosomes Promoció tumoral	RNA polimerasa I

Taula 5. Localització, activitat enzimàtica, funció i dianes de tipus no-histona de les diferents sirtuïnes de mamífers (Kupis et al. 2016).

Comparteix funcions amb Sir2, com la regulació de l'envelliment, la modulació de la resposta a estrès, però també s'ha descrit implicada en la regulació de múltiples processos cel·lular (Figura 49) com el metabolisme dels lípids i de la glucosa, el càncer, les neurodegeneracions i les malalties cardíques (Giblin, Skinner, and Lombard 2014).

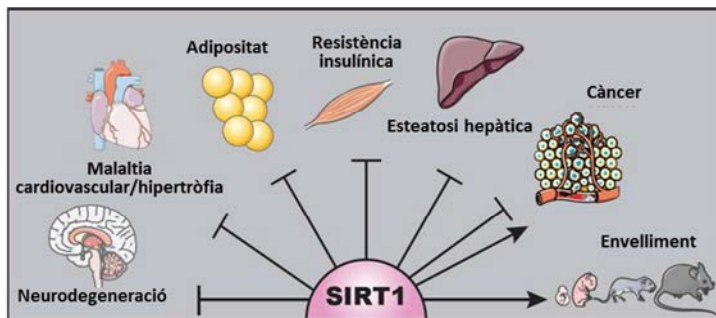


Figura 49. Processos en els quals Sirt1 hi està implicat (Giblin, Skinner, and Lombard 2014).

Per això, entendre els mecanismes de regulació d'aquesta proteïna és de vital importància per fer front a totes aquestes patologies en les quals s'ha vist implicada.

8. SIR2

8.1. La proteïna Sir2

Sir2 és una histona desacetilasa de la família de les sirtuïnes, doncs a diferència de les resta de HDACs, requereix NAD^+ per dur a terme la seva funció. Sir2 és el membre fundador d'una gran família *SIR* (*Silent Information Regulator*) conservada des de bacteris fins a humans (Frye 2000). Va ser descrita per primera vegada en *S. cerevisiae*, on es va relacionar la seva funció amb els loci d'aparellament *HML* i *HMR*, tot i que en aquell moment encara es desconeixia que es tractava d'una histona desacetilasa (Rine et al. 1979). Més endavant però, es va descriure que també actuava als telòmers i al rDNA. Sir2 està codificada per un gen localitzat al cromosoma IV de *S. cerevisiae*, presenta un pes molecular de 63,27 kDa i un punt isoelèctric (pI) de 8,66.

8.1.1. Estructura de Sir2

La família de proteïnes Sir2 presenta un domini catalític altament conservat (Figura 50) d'aproximadament 270 residus i dues extensions N-terminal i C-terminal més variables que podrien participar en funcions més específiques (Buck, Gallo, and Smith 2004). Els estudis preliminars de cristal·lització tan de Sir2 com de la Sirt2 humana van evidenciar que les sirtuïnes consisteixen en dues regions principals; la regió més gran adopta un plegament de tipus Rossmann, típic dels enzims dependents de NAD^+ , compostat per sis hèlix α i sis cadenes β paral·leles. El segon domini és més petit, una mica més variable i està implicat en la unió del zinc. Està format per tres cadenes β antiparal·leles i dues hèlix α . Una sèrie de loops uneixen els dos dominis. Els dos substrats, la histona acetilada i el NAD^+ , s'uneixen a la proteïna per dos llocs oposats d'una cavitat que es troba entre els dos dominis principals de la proteïna (Min et al. 2001)(Buck, Gallo, and Smith 2004)(Marmorstein 2004).

A partir de l'estudi de sirtuïnes de diferents organismes es va conèixer que la majoria dels residus conservats entre les sirtuïnes estan implicats en la formació de la cavitat catalítica, en la unió del NAD^+ i en la coordinació del substrat acetilat. A més, les cisteïnes que coordinen l'àtom de zinc també es troben altament conservades. Mentre que algunes sirtuïnes tan sols posseeixen el domini catalític, altres com Sirt1 humana contenen extensions del domini N- i C-terminal necessaris per la interacció amb altres proteïnes o per la conferència d'especificitat en el reconeixement dels substrats (Greiss and Gartner 2009).

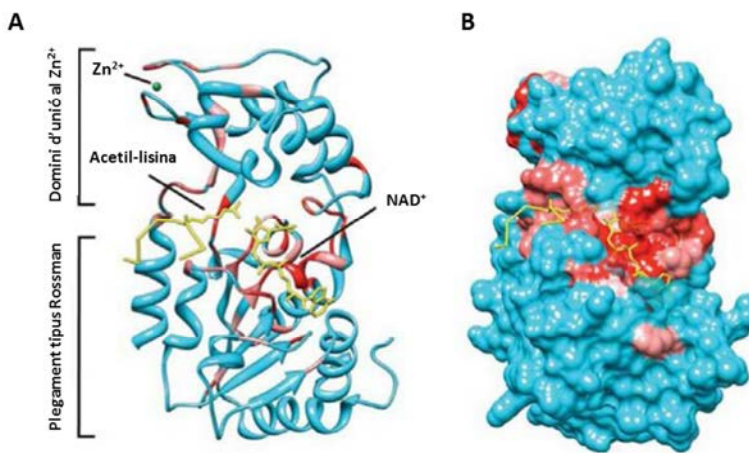


Figura 50. Representació estructural dels residus conservats de les sirtuïnes. (A) Estructura del domini catalític de Hst2 de *S. cerevisiae* unit a un pèptid de la histona H4 acetilada (groc) i a un anàleg del NAD^+ (groc) (K. Zhao et al. 2004). Per la representació es van utilitzar els aminoàcids de la posició 4 a la 204 i de la 213 a la 287, excloent els aminoàcids de 205 a 212 perquè són exclusius de Hst2 i no estan conservats. (B) Estructura on es mostren els residus altament conservats (vermell), utilitzant el software Chimera (Pettersen et al. 2004).

Una de les principals característiques de Sir2 és que presenta un elevat nombre de residus de cisteïna, és a dir, dels 562 aminoàcids que formen l'estructura de Sir2, un 1,96% són cisteïnes. Atès que aquest residu normalment es troba subrepresentat en la majoria dels organismes i que és molt susceptible a ser oxidat, 11 cisteïnes es poden considerar moltes en aquest cas (Figura 51). De fet, la mitjana de cisteïnes en les proteïnes de *S. cerevisiae* es considera del voltant del 1,2% (Miseta and Csutora 2000). Es coneix que quatre cisteïnes, C372, C375, C396 i C399 es troben coordinant un àtom

de Zn^{2+} a través del seu grup tiol. Aquest no participa en l'activitat catalítica de la proteïna, com si succeeix amb el cas de les HDACs de tipus I i II. En aquestes el zinc es troba al centre actiu de les proteïnes i té com a funció incrementar el caràcter nucleòfil d'una molècula d'aigua que a la vegada hidrolitza el grup acetil de la lisina, alliberant-lo com un ió acetat lliure (Finnin et al. 1999). En canvi, en les sirtuïnes, aquest àtom de zinc no participa en la reacció ni es troba localitzat al centre actiu (Figura 52), sinó que contribueix al manteniment de l'estructura de la proteïna.

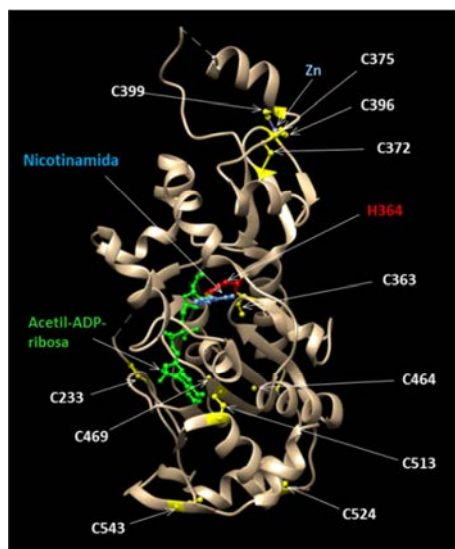


Figura 51. Estructura tridimensional de Sir2 de *S. cerevisiae*. Representació de Sir2 (PDB: 2HJH) amb els productes de la reacció, la nicotinamida i l'acetil-ADP-ribose. Es mostra l'àtom de zinc, la H364 catalítica i cada una de les cisteïnes que formen part de l'estructura de Sir2. Estructura cristal·litzada de Sir2 obtinguda per difracció de raigs X amb una resolució de 1,85Å; software UCSF Chimera.

De fet, s'ha demostrat que, *in vitro*, l'eliminació del zinc en Sir2 de *Plasmodium falciparum* desplega parcialment l'estructura i dona lloc a una proteïna sense activitat (Chakrabarty and Balaram 2010). La reconstitució de l'enzim amb zinc retorna la seva integritat estructural i l'activitat, demostrant doncs la reversibilitat del procés (Chakrabarty and Balaram 2010). Donat que el domini catalític de Sir2 en diferents organismes està altament conservat, el mecanisme d'activació-inactivació de Sir2 a través de la unió reversible de Zn^{2+} degut a l'oxidació de les cisteïnes està probablement molt conservat també. De fet, totes les estructures de Sir2

crystal·litzades fins al moment presenten l'ió zinc coordinat pels tiols de les cisteïnes, i que estan molt conservades per tots els membres de la família Sir2.

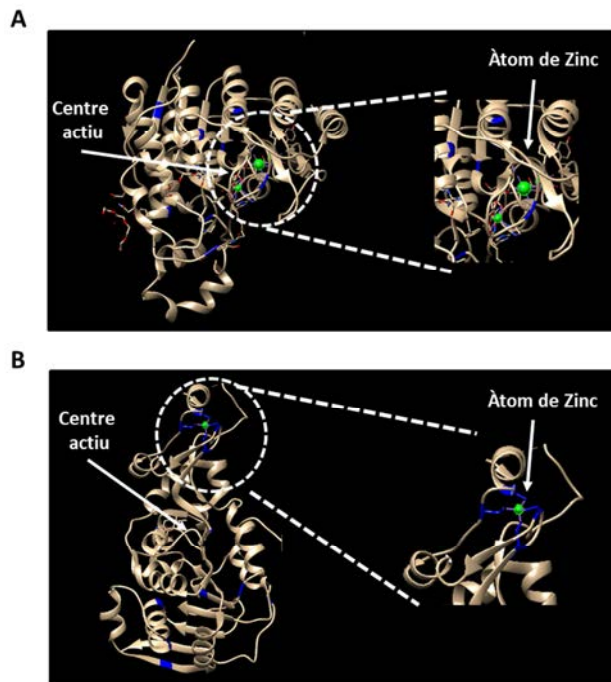


Figura 52. Estructura tridimensional de la HDAC2 humana i de Sir2 de *S. cerevisiae*. Es marquen les cisteïnes en verd, s'indica la localització del centre actiu de la proteïna i en un cercle es marca la zona d'unió a l'àtom de zinc. (A) Es mostra la imatge de la HDAC2 humana (PDB: 4LXZ), on s'observa que l'àtom de zinc es localitza al centre actiu de la proteïna i (B) Imatge de Sir2 de *S. cerevisiae* (PDB: 2HJH) on es mostra com l'àtom de zinc es troba allunyat del centre actiu de la proteïna i per tant no participa en la reacció de desacetilació. Les imatges s'ha obtingut utilitzant el software UCSF Chimera.

Pel que fa a la resta de cisteïnes de Sir2, C363 i C513 presenten la característica de localitzar-se al centre actiu de la proteïna. Concretament, C363 es troba adjacent a la histidina catalítica (H364), mentre que C513 es localitza a la cavitat catalítica de la sirtuïna. C464 i C469 en canvi, podrien estar formant part d'una seqüència d'exportació nuclear (NES) putativa, tot i que Sir2 mai s'ha descrit localitzada fora del nucli. No obstant, són moltes les proteïnes que són regulades mitjançant l'entrada i sortida del nucli, i en moltes d'elles hi intervenen les cisteïnes com a mecanisme regulador. Aquest seria el cas per exemple de Yap1 en *S. cerevisiae* (Delaunay, Isnard, and Toledano 2000), Pap1 en *S. pombe* (Vivancos et al. 2004) o el de la xaperona DnaJb5 en

eucariotes superiors (Ago et al. 2008). Finalment, C233 de l'extrem N-terminal i C524 i C543 de l'extrem N-terminal podrien tenir un paper en l'autoregulació de Sir2. En el cas de la sirtuïna Hst2 de *S.cerevisiae*, s'ha demostrat que l'extrem C-terminal de la proteïna forma una hèlix que es solapa amb el lloc d'unió al NAD⁺, autoregulant així la unió del NAD⁺. En canvi, l'extrem N-terminal està implicat en la formació d'homotrímers de Hst2 (Marmorstein 2004). Així, un mutant *HST2* delecionat per l'extrem N-terminal presenta diferències pel que fa a la unió del NAD⁺ respecte una soca WT, mentre que un mutant delecionat per l'extrem C-terminal és incapaç de forma homotrímers.

8.1.2. Localització de Sir2

S'ha descrit que Sir2 es localitza a les regions de DNA telomèric, així com al lloc d'aparellament i en un subdomini del nuclèol. Una característica dels organismes eucariotes és l'organització del nucli en compartiments subcel·lulars, on té lloc l'acumulació de seqüències de DNA i proteïnes específiques. Un d'aquests compartiments és el nuclèol, el lloc on esdevé la transcripció del rDNA per la polimerasa I i l'acoblament o biogènesi de les subunitats dels ribosomes. Per tant, és aquí on es localitza el rDNA.

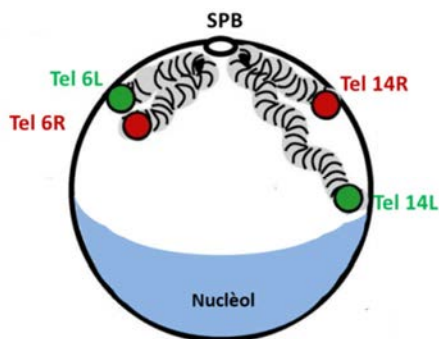


Figura 53. Localització del nuclèol a l'interior del nucli de *S. cerevisiae*. Representació del posicionament del nuclèol així com la organització dels cromosomes; el nuclèol es troba oposat al cos polar del fus (SPB o spindle pole body) i adjacent a l'embolcall nuclear. Els telòmers dels cromosomes es posicionen també a l'embolcall nuclear.

En *S. cerevisiae* el nuclèol es caracteritza per ser una estructura en forma de mitja lluna i que ocupa un terç del volum nuclear (Figura 53). Es localitza adjacent a l'embolcall nuclear i oposat al cos polar del fus (SPB) (Bystricky et al. 2005). El nuclèol es creu que podria actuar com un sensor d'estrès oxidatiu, donat que en condicions d'estrès la cèl·lula respon amb un alliberament de proteïnes nucleolars i un aturada en la transcripció del rDNA.

Pel que fa a Sir2, a partir d'anàlisis per immunolocalització amb anticossos anti-Sir2 es va determinar una forta senyal de Sir2 dins d'un subdomini concret del nucli, juntament amb un patró puntuat més dèbil prop de la perifèria nuclear (Gotta et al. 1997). A través de la co-localització amb Nop1, una proteïna implicada tan en la transcripció com en el processament del rRNA, es va determinar que realment Sir2 es localitzava al nuclèol (Figura 54)(Gotta et al. 1997).

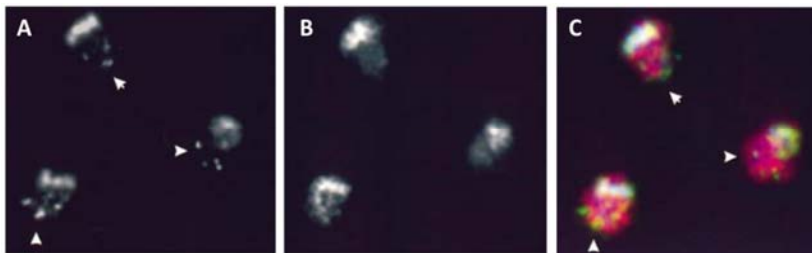


Figura 54. Sir2 co-localitza amb el marcador nucleolar Nop1. (A) Marcatge de Sir2 amb l'anticòs anti-Sir2. (B) Marcatge de Nop1 en les mateixes cèl·lules. (C) Superposició de les senyals de Sir2 (verd) i Nop1 (vermell) i marcatge del DNA (blau). El color blanc apareix quan les tres senyals coincideixen (Gotta et al. 1997).

El fet que les senyals de Sir2 i Nop1 no coincideixen en tota la regió marcada indica que Sir2 i Nop1 es distribueixen en diferents regions dins del nuclèol. A part del senyal al nuclèol, Sir2 també es detectava en forma de patrons puntuats (Figura 54) prop de la perifèria nuclear, igual que s'observa pel cas de Sir3, Sir4 i Rap1. Les imatges van mostrar que existia una mitjana de 3-4 puntuacions per nucli. La co-localització de Sir2 amb la proteïna telomèrica Rap1 va demostrar la presència de Sir2 als telòmers (Figura 55)(Gotta et al. 1997).

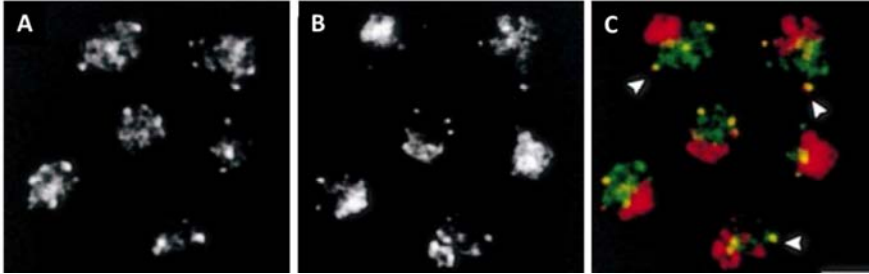


Figura 55. Co-localització de Sir2 amb Rap1 als clústers de telòmers. (A) Senyal de Rap1-GFP. (B) Marcatge de Sir2 amb l'anticòs anti-Sir2. (C) Superposició de les imatges de Rap1-GFP (verd) i Sir2 (vermell). En groc es mostra el solapament de senyals (Gotta et al. 1997).

Així, Sir2 es localitza tan als telòmers com al rDNA. En aquest últim, Sir2 s'uneix preferencialment als espaiadors no transcrits o NTS, regió que conté tan l'origen de replicació com el promotor de la RNA polimerasa I. L'absència de *SIR3* i *SIR4* no afecta la presència de Sir2 al rDNA sinó al contrari, s'incrementa la seva afinitat (Gotta et al. 1997). A diferència d'aquesta regió, l'associació de Sir2 als telòmers es perd tan en soques mutants $\Delta sir3$ o $\Delta sir4$. Així, mentre que la localització de Sir2 als telòmers depèn de la unió amb Sir4 (apartat 8.6 de la Introducció), al rDNA requereix d'altres proteïnes com Net1 i Fob1 (apartat 8.7 de la Introducció). A més, Sir2 també es posiciona al loci d'aparellament *HML* i *HMR* i ho fa per un mecanisme similar al descrit pels telòmers. De fet, es creu que hi podria haver una competició entre les regions subtelomèriques i els loci d'aparellament per les proteïnes Sir2-3-4, donat que es troben en concentracions limitants (Maillet et al. 1996). Pel que fa a la localització de Sir2 al nuclèol, només la deleció de *SIR2* n'altera la funció al rDNA. De fet, en cèl·lules exponencials, ni Sir3 ni Sir4 s'acumulen al nuclèol; tan sols quan Sir4 no és capaç de formar el complex de silenciament als telòmers o al loci *HM*, Sir3 s'acumula al nuclèol de manera Sir2 dependent (Gotta et al. 1997). Sir3 sí que s'uneix al rDNA a més dels telòmers i el loci d'aparellament. No obstant, depenent de la fase de creixement de les cèl·lules, Sir3 presenta diferents localitzacions. Aquests canvis de localització poden estar implicats en la modulació de l'expressió de gens i reflexen la resposta de la cèl·lula front als canvis ambientals, així com l'inici dels processos d'envelliment (Tung et al. 2013).

Més recentment, s'ha descrit que la modificació de Sir2 per sumoilació regula el silenciament dependent de Sir2 a través de la seva localització (Hannan et al. 2015). Es va observar que la sobreexpressió de la SUMO ligasa Siz2 altera el silenciament als telòmers i al loci *HM*, degut a una menor associació de Sir2 en aquestes regions, però no presenta cap efecte en el silenciament al rDNA. Així, es va descriure que Sir2 és sumoilada *in vivo* per Siz2, però no per altres SUMO ligases com Siz1 o Mms21. A més, la interacció de Sir2 amb Sir4 i Net1 és dependent de la sumoilació de Sir2 i la forma sumoilada s'acumula preferentment al nuclèol. De les tres lisines susceptibles a ser sumoilades (K106, K132 i K215), la sumoilació de K215 té un paper principal pel que fa a la regulació de Sir2. En el mutant K215R, Sir2 es segueix unint als telòmers, inclús quan es sobreexpressa *SIZ2*, mantenint així el silenciament telomèric. La fracció Sir2-SUMO no afecta l'activitat desacetilasa de Sir2, però interfereix en la seva interacció amb Sir4, implicant el silenciament als telòmers i al loci d'aparellament, i acumulant-se al nuclèol (Hannan et al. 2015). Així, la modificació postraducciona de Sir2 per sumoilació, almenys pel que fa a la K215, donaria lloc a una interacció diferencial de Sir2 amb altres proteïnes i el reclutament de Sir2 a un determinat loci. Concretament, Sir2-SUMO deixaria d'actuar als telòmers i al loci d'aparellament i s'acumularia a altres llocs, entre ells, al nuclèol (Hannan et al. 2015).

8.2. Mecanisme d'acció de Sir2

Sir2 és una histona desacetilasa del tipus sirtuïna. Això significa que per catalitzar les reaccions de desacetilació requereix del co-substrat NAD^+ . Durant les reaccions de desacetilació, Sir2 transfereix el grup acetil dels residus específics de lisina de les proteïnes substrat a la ADP ribosa del NAD^+ , generant com a subproductes de la reacció la nicotinamida (NAM), l'*O*-acetil-ADP-ribosa i el substrat desacetilat (Figura 56).

La primera evidència que va relacionar la cromatina amb el silenciament transcripcional en llevat va sorgir quan al deletar l'extrem N-terminal de la histona H4 es produïa una derepressió del loci *HM*. Així, es va deduir que les lisines eren importants en el silenciament degut a les seves càrregues positives. No obstant, quan es substituïen les

lisines per arginines, el silenciament quedava abolit tot i la preservació de les càrregues positives.

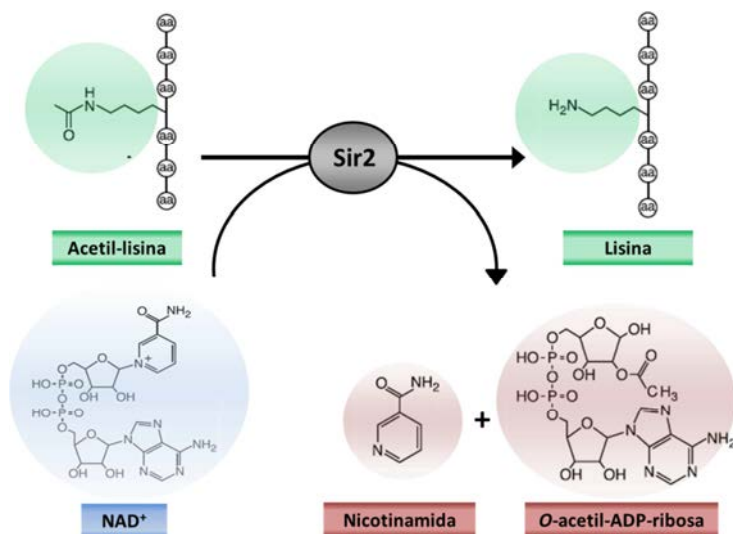


Figura 56. Reacció de desacetilació per Sir2. La funció catalítica de la sirtuïna Sir2 es basa en la desacetilació de les lisines acetilades requerint NAD⁺ com a cofactor i generant com a productes de la reacció la lisina desacetilada, la nicotinamida i l'O-acetil-ADP-ribose.

La idea que l'acetilació de lisines era important pel silenciament transcripcional va sorgir després d'observar que les histones H3 i H4 dels loci *HML* i *HMR* estaven hipoacetilades en comparació amb les del locus *MAT*. A partir d'aquí doncs i després de conèixer que Sir2 realment es tractava d'una histona desacetilasa, es va concloure que la formació de l'heterocromatina implicava la desacetilació de les histones.

Concretament, la reacció de desacetilació Sir2-dependent segueix el següent mecanisme basat en 3 passos principals (Figura 57). En el primer pas de la reacció, l'enllaç glicosídic entre la nicotinamida i la N-ribose es trenca, i l'ADP-ribose es transfereix a l'oxigen del grup acetil per formar l'intermediari O-alkilamida (A A Sauve et al. 2001)(B. C. Smith and Denu 2006). Seguidament a la formació d'aquest intermediari, la histidina catalítica activa el grup 2' alcohol de la N-ribose, la qual ataca l'intermediari, donant lloc a espècies bicíclics i a la lisina desacetilada (Anthony A Sauve et al. 2006). La subseqüent hidròlisi de l'espècie bicíclica dona lloc al

producte *O*-acetil-ADP ribosa. La reacció de desacetilació pot ser potencialment inhibida a través d'una reacció d'intercanvi de bases pel producte de la reacció, la nicotinamida. En aquest procés, la NAM pot atacar l'intermediari *O*-alquilamida per regenerar el NAD⁺ i la lisina acetilada (Anthony A Sauve and Schramm 2003).

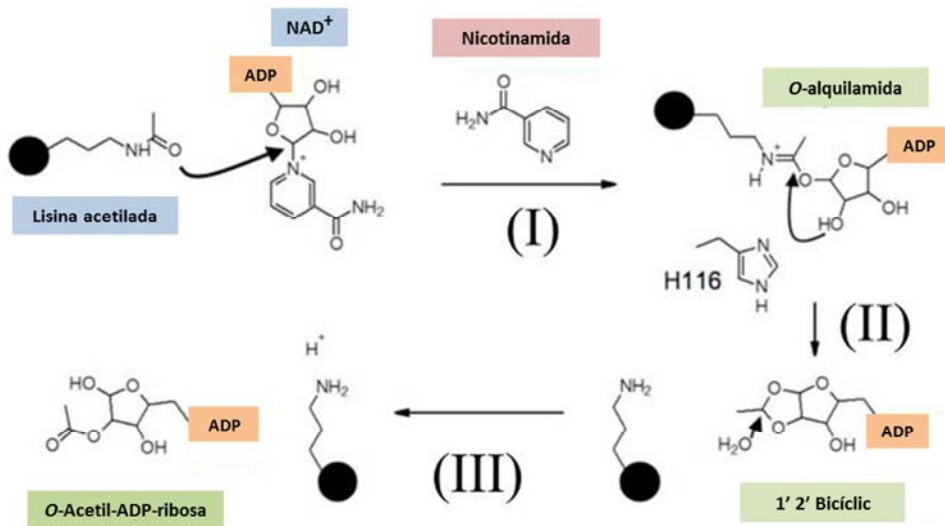


Figura 57. Mecanisme de reacció de desacetilació de Sir2.

Actualment, està ben descrit que Sir2 actua almenys sobre tres loci diferents en *S. cerevisiae*: als loci d'aparellament *HML* i *HMR*, als telòmers i al rDNA. En l'apartat 8.4 de la Introducció es detalla el mecanisme d'acció de Sir2 sobre aquestes regions.

8.3. Regulació de l'activitat Sir2

Donada la implicació de Sir2 en el procés d'envelliment, així com la participació dels ortòlegs en mamífers en nombroses patologies, com envelliment, càncer, homeòstasi metabòlica, desordres inflamatoris, malalties cardiovascular i neurodegeneratives, cada vegada són més les línies d'investigació centrades en el descobriment de noves dianes terapèutiques capaces de modular l'activitat Sir2. S'han descrit algunes vies de la pròpia cèl·lula, així com diferents compostos que tenen capacitat d'activar o inhibir l'activitat Sir2. A continuació es descriuran alguns d'ells.

8.3.1. Regulació per NAD⁺ i NAM

Un dels mecanismes de regulació més ben conegut de Sir2 és que la seva activitat és sensible a les fluctuacions del seu co-substrat NAD⁺. De fet, les modificacions genètiques que alteren els nivells de NAD⁺ tan en llevat com en cèl·lules de mamífer semblen modificar l'activitat de les sirtuïnes. Estudis de cinètica de Sir2 han determinat que aquesta sirtuïna presenta uns valors de Km pel NAD⁺ que van des de 150 µM fins a 500 µM (Anthony A Sauve et al. 2006) fet que es correlaciona amb els nivells de NAD⁺ presents a la cèl·lula. No obstant, petits canvis en el rati NAD⁺/NADH, sense un increment substantiu en els nivells de NAD⁺ totals gairebé no afecta l'activitat de Sir2 donat que el NADH actua com un inhibidor molt poc eficient de l'activitat Sir2 (IC₅₀ de 17 mM)(Schmidt et al. 2004). Així, només aquelles modificacions que representin un canvi real en els nivells totals de NAD⁺ a la cèl·lula, com és el cas de la restricció calòrica (apartat 8.3.3 de la Introducció) podran modular l'activitat de les sirtuïnes.

La NAM en canvi, un dels productes de la reacció de desacetilació, actuaria com un inhibidor endògen no competitiu de l'activitat de Sir2 tan *in vitro* com *in vivo* (Anderson et al. 2003). La constant d'inhibició (Ki) de la NAM s'ha descrit entre els 50 µM i 150 µM (Bitterman et al. 2002)(Anthony A Sauve and Schramm 2003)(Jackson et al. 2003), fet que suggereix que els nivells de nicotinamida endògens en una soca WT, que van dels 10 µM als 150 µM (Anthony A Sauve et al. 2005) són suficients per inhibir l'activitat catalítica de Sir2. L'addició exògena de NAM en cultius de llevat evita la repressió de Sir2 als tres loci de silenciament, augmentant la recombinació al rDNA i escurçant la vida mitjana (Bitterman et al. 2002), tal com succeeix en un mutant $\Delta sir2$. Així, igual que succeeix amb els mutants de Sir2 catalíticament inactius (Armstrong et al. 2002)(G. J. Hoppe et al. 2002) el tractament amb NAM impedeix la localització telomèrica de Sir2 suggerint que l'activitat Sir2 és necessària per la seva localització telomèrica (Bitterman et al. 2002). Es creu que la nicotinamida participaria en una reacció d'intercanvi de bases, a través de l'intermediari ADP-ribosa-Sir2-pèptid acetilat generat durant la reacció de desacetilació. La NAM pot reaccionar amb aquest intermediari, sense deixar-lo disponible per la finalització de la reacció per part de l'enzim i donant lloc a la regeneració del NAD⁺ (Jackson et al. 2003)(Anthony A Sauve and Schramm 2003).

També s'ha observat que la modulació de l'activitat Sir2 a través de la interacció d'aquesta sirtuïna amb altres proteïnes representa un mecanisme regulador important *in vivo* donat que relaciona l'activitat Sir2 amb la generació dels complexos silenciadors (Jason C Tanny et al. 2004). D'aquesta forma, s'evitaria que molècules de Sir2 lliures poguessin desacetilar en regions actives del genoma. Així per exemple, s'ha demostrat que la formació del complex Sir2-Sir4 (que intervé en el silenciament als telòmers i al loci d'aparellament) confereix major resistència a la inhibició per nicotinamida que quan Sir2 es troba lliure o formant el complex RENT (implicat en el silenciament al rDNA). Mentre que la concentració de nicotinamida necessària per inhibir Sir2 lliure és aproximadament 50 μM (Anderson et al. 2003), quan Sir2 es troba formant un complex amb Sir4, es requereixen concentracions de 100 μM (Jason C Tanny et al. 2004). Les regions de Sir2 que participen amb la interacció amb Sir4 i Net1 es troben fora del domini catalític (Cuperus, Shafaatian, and Shore 2000)(M. M. Cockell, Perrod, and Gasser 2000). Per tant, els efectes sobre l'activitat en la formació de complexos implica que l'estat de les parts no conservades de les sirtuïnes influencin el domini catalític.

8.3.2. Molècules moduladores de l'activitat Sir2

Diferents estudis han identificat diversos tipus de petites molècules amb capacitat o bé d'inhibir o activar les sirtuïnes que fins al moment, s'han utilitzat per examinar les activitats biològiques de les sirtuïnes en diferents organismes.

- **Molècules activadores de l'activitat Sir2:**

A banda del co-substrat NAD^+ existeixen poques molècules conegudes que tinguin capacitat d'activar Sir2. Des de la identificació de les activitats enzimàtiques de Sir2 i Sirt1 en mamífers, s'ha potenciat l'estudi de compostos activadors de Sirt1, també coneguts com STACs (*SIRT1-activating compounds*). Dels 18.000 compostos inicialment identificats, només 21 van ser capaços d'activar Sirt1 *in vitro* reduint la K_m pel seu substrat peptídic (Howitz et al. 2003).

La majoria d'aquests compostos són productes naturals de la família dels polifenols, com és el cas del resveratrol (Figura 58).

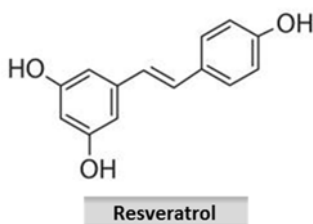


Figura 58. Estructura del resveratrol

Els polifenols amb capacitat activadora de les sirtuïnes es caracteritzen per presentar una estructura similar, basada en un anell amb varis grups hidroxil. El més potent de tots ells és el resveratrol, capaç d'incrementar deu vegades l'activitat Sirt1 (Howitz et al. 2003). Aquest compost es troba present de forma natural al vi i ja s'ha associat amb efectes beneficiosos per la salut, tan en humans com en models de rosegadors (Bhat KPL, Kosmeder, and Pezzuto 2001). L'administració de resveratrol i altres polifenols *in vivo* es va descriure amb capacitat d'incrementar la vida mitjana en llevat (H. Yang et al. 2007), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Zarse et al. 2010), *Drosophila* (C. Wang et al. 2013), peixos (Valenzano et al. 2006) i abelles (Rascón et al. 2012). En llevats, nematodes i *Drosophila*, aquesta extensió de la vida mitjana depèn de *SIR2*.

Inicialment, es va proposar que el resveratrol s'unia a l'extrem N-terminal de les sirtuïnes per induir un canvi conformacional que provocava la disminució de la Km tan pel substrat acetilat com pel NAD^+ (Milne and Denu 2008). A favor d'això, es va observar que les mutacions SIRT1-E230K i Sir2-D223K localitzades a l'extrem N-terminal de la proteïna i molt a prop del centre catalític, impedièren l'activació per resveratrol sense afectar l'activitat basal de la proteïna (H. Yang et al. 2007). No obstant, l'administració en humans va evidenciar que les quantitats de resveratrol finals al plasma eren massa baixes com per explicar que els efectes *in vivo* del resveratrol es basaven en l'activació directa de Sirt1 (Walle et al. 2004). Mentre que la concentració que presenta màxima activació de Sirt1 és de 200 μM resveratrol, al plasma tan sols es

va detectar una concentració de 2 μM . Més tard, es va qüestionar que el resveratrol i la resta d'activadors de segona generació (com SRT1720 i SRT2183), realment estiguessin activant a Sirt1 (Pacholec et al. 2010). Així, en ratolins alimentats amb una dieta alta en greixos, mentre alguns autors no observaven que l'activador SRT1720 baixés els nivells de glucosa en plasma ni millorés la capacitat mitocondrial (Pacholec et al. 2010), altres descrivien un millora de la salut i la vida mitjana de ratolins tractats amb dues dosis de SRT1720 durant dos anys (Minor et al. 2011). Avui en dia, existeixen evidències que el resveratrol sí activaria a les sirtuïnes, però ho duria a terme de forma indirecta, a través de l'activació de l'AMPK, com a sensora inicial que faria incrementar els nivells de NAD^+ i per tant, incrementaria l'activitat de les sirtuïnes (Cantó et al. 2010).

La isonicotinamida (INAM) és un altre tipus de compost amb capacitat activadora de les sirtuïnes (Figura 59). Aquest compost es caracteritza per actuar com un antagonista de la inhibició per nicotinamida i un activador de l'activitat desacetilasa. Per tant, la INAM actua per un mecanisme diferent al del resveratrol.

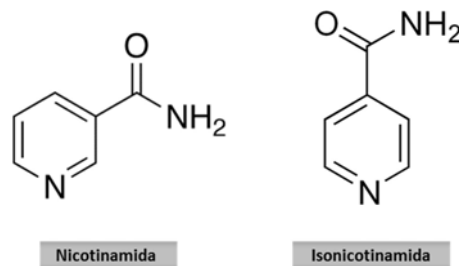


Figura 59. Estructura de la nicotinamida i la isonicotinamida. La nicotinamida es tracta d'un producte de la reacció de desacetilació de Sir2, que a la vegada actua com a inhibidor. La isonicotinamida, en canvi, s'ha descrit com un activador de les sirtuïnes.

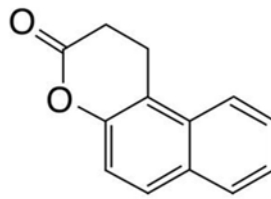
En llevat es va demostrar que la INAM té la capacitat d'incrementar el silenciament transcripcional dependent de Sir2, tan al loci d'aparellament, com al rDNA i als telòmers (Anthony A Sauve et al. 2005). La INAM i altres activadors de Sir2 similars podrien ser especialment efectius actuant com a agonistes en les sirtuïnes humanes, les quals són més fortament inhibides per la nicotinamida que Sir2 de llevats (Anthony A Sauve and Schramm 2003). Per exemple, Sir2 de ratolí presenta un potencial de ser activada 20x comparat amb el 2,5-6x de Sir2 de llevat (Anthony A Sauve and Schramm

2003). Un altre dels mecanismes pels quals s'ha descrit que la INAM activa Sir2 seria a través de l'increment dels nivells de NAD⁺ (McClure et al. 2012). Les cèl·lules de llevat que es fan créixer en un medi sense NA presenten un menor vida replicativa, que pot ser allargada a través del tractament amb INAM d'una forma Sir2 dependent, fet que es correlaciona amb l'increment en els nivells de NAD⁺ (McClure et al. 2012). Aquest increment en els nivells de NAD⁺ induïts per la INAM és dependent dels enzims Pnc1 i Npt1, suggerint doncs que la INAM incrementa el flux a través de la via de recuperació del NAD⁺. A més, la INAM influencia l'expressió de múltiples gens de la biosíntesi del NAD⁺ i de la via de recuperació per promoure l'homeòstasi durant la fase estacionària (McClure et al. 2012).

▪ **Molècules inhibidores de l'activitat Sir2:**

Els inhibidors de les sirtuïnes també poden resultar potencialment beneficiosos com a agents terapèutics. Per exemple, la sobreexpressió de Sirt1 s'ha descrit en nombroses línies cel·lulars cancerígenes (Audrito et al. 2011). A més, els inhibidors de sirtuïnes també s'han proposat com a tractaments per la malaltia de Parkinson (Outeiro et al. 2007), la Leishmaniosis (Vergnes et al. 2005), el virus del VIH (Pagans et al. 2005), etc. A través d'un *screening* fenotípic es va identificar un nou compost, l'esplitomicina, amb capacitat d'inhibir Sir2 (A Bedalov et al. 2001). La inhibició amb aquest compost (Figura 60) és capaç de recrear el fenotip d'un mutant $\Delta sir2$ en *S. cerevisiae*, amb una IC₅₀ de tan sols 60 µM. Un dels efectes del tractament de les cèl·lules de llevat amb esplitomicina és la disrupció del silenciament als telòmers, al loci d'aparellament i al rDNA, fet que vé acompanyat d'una major recombinació al rDNA (7 vegades superior al d'una soca WT), igual que s'observa en el cas del mutant $\Delta sir2$. Pel que fa a la resta del genoma, l'esplitomicina també afecta l'expressió de gens específics de meiosis, i això implica que aquest inhibidor també afecta l'activitat de Hst1. Així, l'esplitomicina inhibeix majoritàriament a Sir2 i en menor mesura també a Hst1 (mentre un 88% dels canvis induïts per l'esplitomicina estan mediat per Sir2, tan sols un 9% estan relacionats amb Hst1). El mecanisme d'acció d'aquest inhibidor es creu que es basaria

en el bloqueig o l'alteració del centre d'unió del substrat acetilat, impeditint l'entrada d'aquest i bloquejant per tant, la reacció de desacetilació (A Bedalov et al. 2001).



Esplitomicina

Figura 60. Estructura de l'esplitomicina

En el cas de la Sirt1 humana la capacitat d'inhibició és més lleu. No obstant, s'ha relacionat la inhibició de Sirt1 amb una menor proliferació de la línia de càncer de mama MCF-7 (Neugebauer et al. 2008). També, en el cas del síndrome del X fràgil, una malaltia causada per l'expansió d'un triplet que provoca el silenciament del gen *FMR1*, s'ha vist que Sirt1 juga un paper important, i que la seva inhibició amb esplitomicina és capaç d'atenuar el silenciament gènic en aquest tipus de síndrome (Biacsi, Kumari, and Usdin 2008). A més de l'esplitomicina, també s'han descrit altres derivats d'aquesta amb capacitat d'inhibir les sirtuïnes. Fins al moment s'han descrit una gran varietat de compostos, com el sirtinol, l'AGK2, el cambinol, la suramina, la tenovina, la salermida, etc. Molts d'ells han estat descrits a partir d'*screenings* en llevat, mentre que d'altres ja s'utilitzaven prèviament pel tractament d'altres tipus de patologies. Aquests inhibidors presenten diferents IC_{50} i diferents especificitats (Lawson et al. 2010)(Villalba and Alcaín 2012).

8.3.3. Els nivells de NAD^+ i la restricció calòrica

A part d'actuar com a co-substrat, el NAD^+ i la seva forma reduïda NADH actuen coma sensors redox que connecten el metabolisme de les biomolècules amb la síntesi de ATP. Així, les proporcions del rati $NAD^+/NADH$ reflexen l'estat redox intracel·lular i són considerades un indicador de l'activitat metabòlica. Per tant, deficiències en la síntesi del NAD^+ , com per exemple la deleció del gen *NPT1* de la via de recuperació, té la

capacitat d'eliminar l'activitat silenciadora de Sir2 (Anderson et al. 2002)(Sandmeier et al. 2002), mentre que la sobreexpressió de *NPT1* confereix major estabilitat al rDNA i una extensió de la vida de les cèl·lules (Anderson et al. 2002), ambdues funcions relacionades amb l'activitat Sir2, tal com es comentarà més endavant.

La restricció calòrica (RC) és un règim dietari que consisteix en reduir la ingesta de calories però mantenint una nutrició adequada. En *S. cerevisiae*, la RC típicament es modela reduint la concentració de glucosa del medi de cultiu del 2% al 0,5% (RC moderada) o al 0,05% (RC extrema). Aquesta condició s'ha vist que és capaç d'activar la proteïna Sir2 i d'estendre la vida mitjana i màxima en un gran nombre d'organismes model, incloent mamífers (Roth et al. 2002). Les dues principals vies per les quals la RC activaria Sir2 són les següents (Figura 61): el primer model es centraria en el canvi metabòlic que es produeix en resposta a la RC. Aquesta condició indueix un canvi en el metabolisme del carboni, que passa de la fermentació a la respiració mitocondrial (Lin et al. 2002). Un dels principals aspectes de la respiració mitocondrial és que per la síntesi d'ATP té lloc l'oxidació del NADH, produint-se així la forma oxidada NAD^+ . Per tant, la RC indueix l'increment intracel·lular del rati NAD^+/NADH a través de la disminució dels nivells de NADH (Lin et al. 2004). Manipulacions genètiques que causen la disminució dels nivells de NADH augmenten l'activitat Sir2 i estenen la vida mitjana de les cèl·lules (Lin et al. 2002)(Lin et al. 2004). No obstant, l'afinitat o sensibilitat de Sir2 envers els seus substrats i/o inhibidors varia en funció de si Sir2 es troba o no formant algun complex amb les altres proteïnes, com Sir3 i Sir4 (Jason C Tanny et al. 2004).

A més, donat el fet que la membrana interna de la mitocòndria és impermeable al NAD^+ i al NADH, el sistema llançadora malat-aspartat juga un paper essencial en el manteniment del rati NAD^+/NADH entre la mitocòndria i el citosol/nucli (B M Bakker et al. 2001). La deleció o el mal funcionament dels components el sistema llançadora del NADH aboleixen l'extensió de la vida mediada per la CR, mentre que la seva sobreexpressió té capacitat d'estendre-la (Easlson et al. 2008).

En mamífers, alteracions en el metabolisme mitocondrial i en el sistema llançadora del NAD^+ també s'han vist implicats en malalties associades a l'edat com la diabetis (Eto

et al. 1999)(Haigis et al. 2006). L'altre model pel qual se suposa que la RC incrementa l'activitat de Sir2 es basa en estudis bioquímics de la inhibició de Sir2.

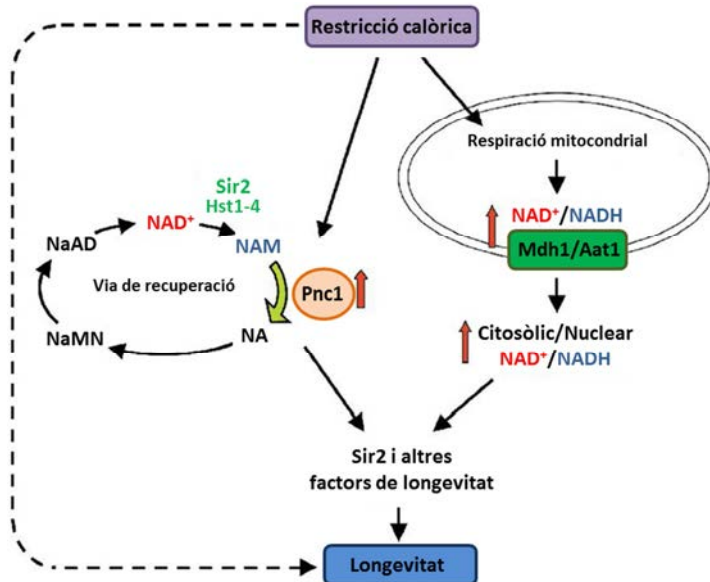


Figura 61. Model d'activació de Sir2 i d'extensió de la vida en llevat a través de la restricció calòrica. La RC induïx la respiració mitocondrial incrementant el rati NAD^+/NADH . La RC també induïx els nivells de proteïna Pnc1, que converteix el NAM en NA, incrementant l'activitat Sir2. Altres mecanismes independents de Sir2 estarien relacionats amb la longevitat a través de la RC (Lu and Lin 2010).

El NAM és un dels productes generats durant la reacció de desacetilació que actua com un potent inhibidor competitiu de Sir2. La nicotinamidasa Pnc1 és responsable de la conversió del NAM en NA (Figura 62) (Ghislain, Talla, and François 2002). Estudis *in vitro* van mostrar que Pnc1 és capaç d'estimular l'activitat de Sir2 (Gallo, Smith, and Smith 2004). A més, *in vivo*, la sobreexpressió de *PNC1* incrementa la vida de les cèl·lules (Anderson et al. 2003) i prevé la inhibició que el NAM produeix en el silenciament telomèric i al rDNA (Gallo, Smith, and Smith 2004). S'ha descrit que la proteïna Pnc1 se sobreexpressa en condicions de RC (Anderson et al. 2003). A més, altres tipus d'estressos ambientals com l'estrès per osmolaritat, salinitat, manca d'aminoàcids o altres tipus d'estressos interns, també induïxen la proteïna Pnc1 (Anderson et al. 2003)(Gallo, Smith, and Smith 2004), sent una resposta mediada

bàsicament pels factors transcripcionals Msn2 i Msn4 (Ghislain, Talla, and François 2002)(Medvedik et al. 2007).

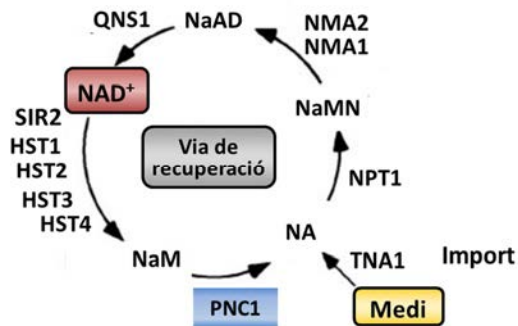


Figura 62. Síntesi de NAD+ a través de la via de la recuperació. L'enzim Pnc1 és responsable de la conversió de la nicotinamida (NAM) a àcid nicotínic (NA) (Antonio Bedalov et al. 2003).

D'aquesta forma es creu que Pnc1 actuaria com un factor essencial en la traducció d'aquestes senyals d'estrès (incloent la RC) cap a l'activació de Sir2 (Lamming, Wood, and Sinclair 2004). A més, l'homòleg de Pnc1 en eucariotes superiors (Nampt) també respon a diversos tipus d'estrès i es suggereix que també actuaria com a mediador en la RC (van der Veer et al. 2005). Així, la CR modula una xarxa complexa de vies metabòliques i de factors de longevitat, entre ells, les sirtuïnes (Guarente and Picard 2005)(Lu and Lin 2010).

8.4. El complex SIR

Sir2 és una histona desacetilasa que tan al locus d'aparellament com als telòmers s'uneix amb les proteïnes Sir3 i Sir4 per formar el complex de silenciament SIR. Aquestes proteïnes Sir es caracteritzen per ser reclutades a diferents regions a través d'interaccions proteïna-proteïna amb Rap1, ORC i Abf1, les quals reconeixen regions específiques de DNA. En el cas del loci *HM*, una proteïna intermediària, Sir1, actua com a pont entre aquestes proteïnes d'unió a DNA i el complex Sir (Rusche, Kirchmaier, and Rine 2003). No obstant, quan es delecionen les tres proteïnes Sir2, Sir3 i Sir4, el silenciament queda completament abolit, mentre que si es deleciona Sir1 el fenotip no

és tant sever. Les proteïnes Sir també interaccionen entre elles; Sir3 i Sir4 interaccionen directament, mentre que Sir4 s'uneix a Sir2. De forma més detallada, s'explicarà el paper de cada una de les proteïnes del complex.

▪ SIR2

Sir2 és la proteïna essencial del complex Sir amb activitat desacetilasa. Posseix el domini catalític C-terminal i el domini N-terminal d'interacció amb una altra de les proteïnes del complex Sir, Sir4 (Figura 63). Se sap que Sir2 interacciona amb Sir4, i que aquesta unió a l'extrem N-terminal en provoca l'estimulació de l'activitat desacetilasa (Hsu et al. 2013). Així, Sir2 actuaria desacetilant les lisines dels extrems N-terminal de les histones H3 i H4, activitat que és essencial pel silenciament (Imai et al. 2000). La desacetilació d'aquestes, permetria la unió de la proteïna Sir3, la qual s'uneix preferentment a histones no acetilades. En canvi, Sir2-Sir4 es van unint a les histones que sí que es troben acetilades, per així poder desacetilar, permetent que Sir3 es vagi unint i que el complex de silenciament s'estengui al llarg de la cromatina.

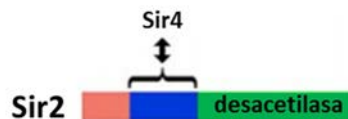


Figura 63. Esquema de l'estructura de Sir2. S'indica la zona que la proteïna que actuaria com a desacetilasa i la zona on interaccionaria amb Sir4 per formar el complex de silenciament *SIR*. Adaptat de (X. Bi 2014).

▪ SIR4

Sir4 és una altra de les proteïnes que actua formant el complex de silenciament. A diferència de Sir2, no presenta activitat enzimàtica, sinó que simplement actua com una proteïna estructural. Sir4 interacciona amb múltiples factors, incloent Sir2, Sir3, Sir1, Yku70, Yku80, Rap1, Esc1 i el nucleosoma a través de diferents dominis (Figura 64). Així, Sir4 s'uneix a les proteïnes d'unio a les seqüències silenciadores i a la vegada, es requereix per l'associació amb Sir2 i Sir3 (Kueng, Oppikofer, and Gasser 2013). El seu

domini C-terminal permet la formació d'homodímers Sir4-Sir4 i també la interacció amb Sir3.

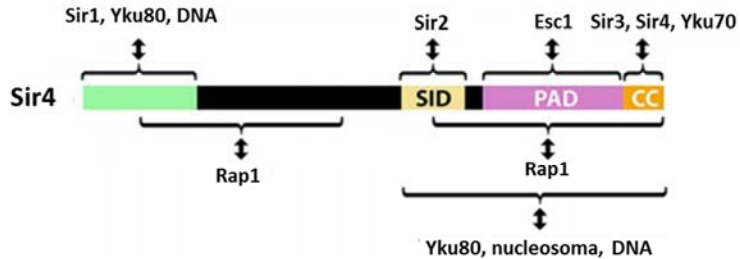


Figura 64. Esquema de l'estructura de Sir4. Es mostren els diferents dominis d'unió a les diferents proteïnes del complex de silenciament. Adaptat de (X. Bi 2014).

Sir4 es creu que iniciaria l'acoblament del complex *SIR* als silenciadors. El domini PAD participa en la immobilització de l'heterocromatina a la perifèria nuclear a través de la unió amb Esc1, una proteïna associada a l'embolcall nuclear. El domini de Sir4 d'interacció amb Sir2 s'uneix amb l'extrem N-terminal de Sir2, estimulando així l'activitat desacetilasa de Sir2 (Hsu et al. 2013). A més, se sap que Sir4 és fosforilada durant la mitosi per les CDKs, fet que coincideix amb l'alliberació parcial del complex SIR durant la mitosi (T Laroche et al. 2000).

▪ ***SIR3***

Sir3, igual que Sir4, tampoc presenta activitat enzimàtica, sinó que actua com una proteïna estructural en el silenciament de la cromatina. Sir3 és reclutada a les seqüències silenciadores independentment del complex Sir2-Sir4 (Rusche, Kirchmaier, and Rine 2003). Aquest membre del complex *SIR* conté regions d'interacció amb Sir4, Rap1 i amb el nucleosoma, així com un domini d'homodimerització (Figura 65). El domini BAH de Sir3 és el que el permet interaccionar amb les cues de l'extrem N-terminal de les histones H3 i H4 (Armache et al. 2011). El domini AAA serviria per unir ATP en altres membres de la superfamília AAA, no obstant, Sir3 no disposa dels residus essencial per la seva unió (Neuwald et al. 1999). S'ha descrit que aquest domini AAA li permetria interaccionar tan amb Sir4 com amb el nucleosoma (Ehrentauf et al. 2011). Finalment, el domini C-terminal permet la formació d'homodímers de Sir3, els qual són

essencials per la formació de l'heterocromatina (Rusche, Kirchmaier, and Rine 2003)(X. Bi 2014), així com per la interacció Sir3-Sir3 entre diferents telòmers, generant agrupacions o clústers de 3-5 telòmers (Ruault et al. 2011).

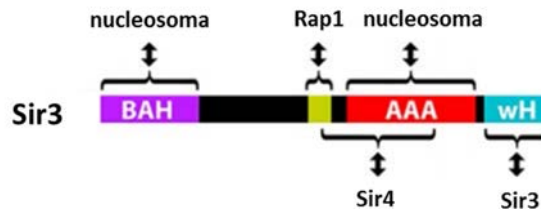


Figura 65. Esquema de l'estructura de Sir3. Es mostren els diferents dominis d'unió als nucleosomes i a les proteïnes del complex de silenciament, així com el domini de formació d'homodímers. Adaptat de (X. Bi 2014).

Més recentment, s'ha descrit que Sir3 també s'uniria a altres regions del genoma, inclús en mutants $\Delta sir2$ i $\Delta sir4$, suggerint que Sir3 desenvoluparia altres funcions a banda de la repressió gènica (Mitsumori et al. 2016).

8.4.1. Extensió del complex SIR

S'ha descrit que per a que pugui tenir lloc l'establiment i la posterior propagació del complex de silenciament, és necessari que es presentin unes condicions: i) l'activitat desacetilasa de Sir2, essencial perquè tingui lloc el silenciament (Imai et al. 2000), ii) la unió de Sir2-4 a les histones acetilades (Oppikofer et al. 2011) i iii) la unió preferent de Sir3 per les histones hipoacetilades. Una vegada les proteïnes Sir s'han unit a les regions de silenciament, es comencen a estendre des de les seqüències silenciadores fins als gens a silenciar. L'abilitat de les proteïnes Sir d'unir-se a les cues de les histones H3 i H4 dels nucleosomes permet a aquestes estendre's a través del cromosoma. Sir3 s'uneix més eficientment a les histones hipoacetilades que les acetilades (Oppikofer et al. 2011). Així, l'activitat desacetilasa de Sir2 és essencial perquè el complex Sir pugui estendre (Liou et al. 2005). El mecanisme d'extensió de les proteïnes Sir implica la desacetilació seqüencial de les histones dels nucleosomes (Figura 66). Un cop les proteïnes del complex SIR s'han reclutat a les regions silenciadores, Sir2 és conduit a la

proximitat del seu substrat, les lisines de les histones H3 i H4 del nucleosoma més proper. La desacetilació per part de Sir2 crearà un lloc d'unió d'alta afinitat per Sir3 i aquest a la vegada, atraurà la unió de més heterodímers Sir2-Sir4, donada l'afinitat de Sir3 per Sir4 (M. Cockell et al. 1995)(Moazed et al. 1997). Aquest procés posicionarà la nova Sir2 reclutada al costat de les histones acetilades (Figura 66). Així, es durà a terme un procés seqüencial de desacetilació i reclutament de noves proteïnes Sir que permetrà al complex de silenciament estendre's al llarg de varies kb de DNA. La unió de proteïnes Sir depen de la concentració local de les tres proteïnes (Kueng, Oppikofer, and Gasser 2013).

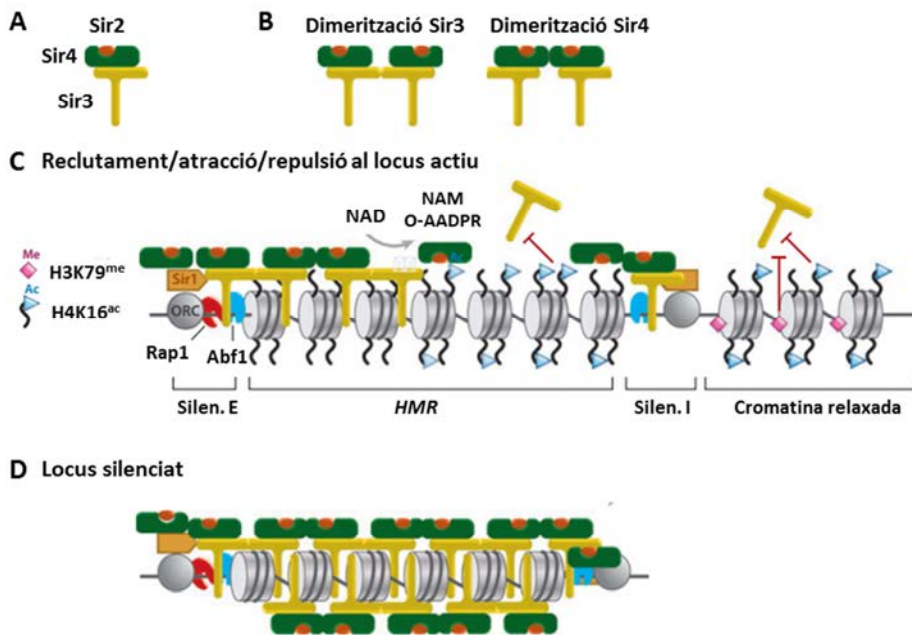


Figura 66. Model d'acoblament de la cromatina silenciada. (A) Representació esquemàtica del complex Sir2-Sir3-Sir4 com a heterotrímer. (B) Formació dels subcomplexes SIR a partir de la dimerització de Sir3 o Sir4 a través dels seus extrems C-terminal. (C) Model d'acoblament del locus *HMR* silenciada, en el que s'observa l'afinitat diferencial entre Sir2-Sir4 i Sir3 per la histona H4K16. (D) La unió del complex SIR donarà lloc a un locus silenciada on hi tindrà lloc la transcripció gènica. Adaptat de (Kueng, Oppikofer, and Gasser 2013).

8.5. Silenciament al loci d'aparellament *HML* i *HMR*

S. cerevisiae té la capacitat de propagar-se com una cèl·lula haploide del tipus sexual a o del tipus sexual α o com una cèl·lula diploide a/ α . La selecció dels gens d'aparellament en aquest organisme és un exemple de procés complex que implica la regulació gènica, l'estructura dels cromosomes i la recombinació homòloga. El tipus sexual de les cèl·lules de *S. cerevisiae* està determinat pels al·lels presents al locus d'aparellament *MAT*. Així, una soca haploide contenint l'al·lel a (i per tant els gens a1 i a2) serà una cèl·lula del tipus a, mentre que una cèl·lula amb l'al·lel α (gens α 1 i α 2) serà del tipus sexual α . El locus *MAT* es troba localitzat al mig del cromosoma III, a unes 100 kb tan del centromèr com del telòmer. A part d'aquest locus *MAT*, totes les cèl·lules presenten un locus *HML* i un locus *HMR* situats un a cada banda del locus *MAT* i prop dels telòmers (Figura 67).

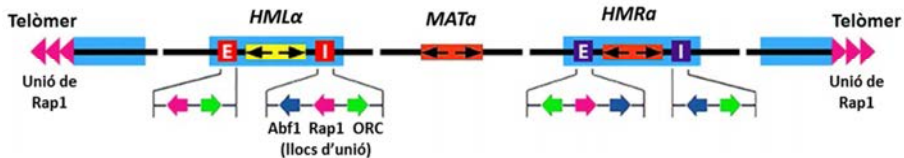


Figura 67. Representació esquemàtica del cromosoma III de cèl·lules *MATa* de *S. cerevisiae*. Es mostren els loci *MAT*, *HMR*, *HML* i els telòmers. S'indiquen els silenciadors E i I flanquejant els loci *HML* i *HMR*, així com els llocs d'unió de proteïnes que participen en el silenciament d'aquestes regions. Adaptat de (X. Bi 2014).

El locus *HML* conté una còpia del gen *MAT* α (o seqüència $Y\alpha$), mentre que el locus *HMR* conté una còpia del gen *MAT*a (o seqüència $Y\alpha$). En condicions normals, aquests dos loci *HML* i *HMR* no s'expressen, és a dir, l'estructura dels nucleosomes en aquesta regió es troba en forma d'heterocromatina altament plegada. Aquestes regions tan sols serviran de donadors de gens en aquells casos en els que per un procés de recombinació, una cèl·lula *MATa* pugui reconvertir-se en una soca del tipus *MAT* α o viceversa, com succeeix amb el cas de les soques homotàiques.

El fet que els *cassettes* d'aparellament (α 1- α 2 i a1-a2) es transcrivin quan es troben al locus *MAT* però que es trobin intactes i silenciats als loci *HML* i *HMR*, implicava que

aquestes regions havien de presentar una configuració silenciada i així es van descriure la presència d'elements silenciadors. Aquests elements es tracten de seqüències silenciadores, anomenades E i I que flanquegen ambdós costats dels loci HM. Cada una d'aquestes conté diversos llocs d'unió per a diferents reguladors que inclouen el complex ORC, el factor de transcripció Rap1 i el factor de transcripció Abf1 (C.-S. Lee and Haber 2015). Així, els elements reguladors en *cis* interaccionen directa o indirectament amb diferents factors reguladors en *trans* per reprimir la transcripció d'aquests gens. A part de les proteïnes ja mencionades, es coneix que en el silenciament hi juga un paper essencial el complex *SIR*, format per les proteïnes Sir1, Sir2, Sir3 i Sir4 (Figura 68). Conjuntament, aquestes proteïnes acaben formant una estructura transcripcionalment silenciada que és alhora resistent a la digestió per endonucleases endògenes. Així, des de les posicions inicials d'unió, el complex Sir s'estén entre 3 i 20 kb a través de la fibra de cromatina (Hecht, Strahl-Bolsinger, and Grunstein 1996)(Strahl-Bolsinger et al. 1997).

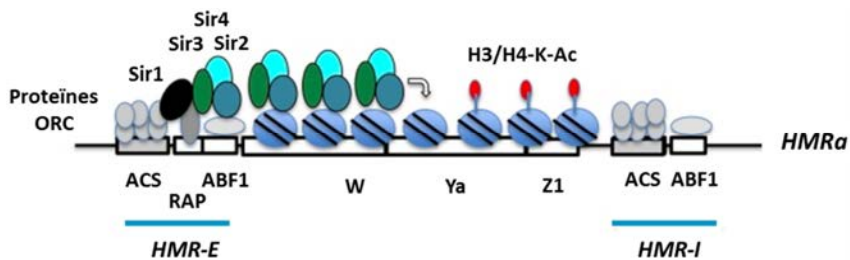


Figura 68. Silenciament al loci d'aparellament *HMR*. Establiment del silenciament al *HMR-E*, a través de la unió de les proteïnes a l'element silenciador *HMR-E*, les quals reclutaran Sir1 i aquesta a la vegada reclutarà el complex Sir2-Sir3-Sir4. L'activitat histona desacetilasa de Sir2 provocarà la desacetilació de les lisines de les histones H3 i H4, fet que permetrà la unió estable del complex Sir3-Sir4 i la desacetilació del nucleosoma següent, donant lloc a una extensió del complex *SIR*. L'extensió del complex té lloc tan des de l'element *HMR-E* com *HMR-I* (Haber 2012).

El silenciament també es veu potenciat pel fet que la localització dels loci *HML* i *HMR* es troba molt propera als telòmers, que també presenten un fenomen de silenciament. De fet, si les seqüències silenciadores *HML-E* o *HMR-E* s'insereixen en altres localitzacions del cromosoma lluny dels telòmers, la seva abilitat de silenciament dels gens adjacents no és tant forta (C.-S. Lee and Haber 2015).

8.6. Silenciament als telòmers

El genoma de la majoria dels organismes eucariotes es divideix en cromosomes linials. Això fa que els seus extrems puguin ser reconeguts per les nucleases cel·lulars i també per la maquinària de reparació del DNA que actua quan hi ha alteracions com trencaments de la doble cadena (DSBs), fet que podria provocar la fusió de cromosomes i finalment, la pèrdua d'informació genètica (Dewar and Lydall 2012). Per evitar que això passi existeixen els telòmers, estructures de nucleoproteïnes que s'encarreguen de protegir els extrems dels cromosomes, tan a través del plegament especial que adopten com de les proteïnes telomèriques que en formen part, protegint així l'estabilitat i la integritat dels cromosomes. Els telòmers de la majoria dels organismes estan composts per repeticions en tàndem i, tot i que en llevat la llargada sigui d'unes 350 bp i en mamífers de varies kb, la seva estructura general i funcions es manté conservada. En llevat aquesta seqüència repetitiva ha experimentat grans canvis al llarg de l'evolució i es caracteritza per ser del tipus $T(G)_{2-3}(TG)_{1-6}$, que difereix molt de la seqüència repetitiva TTAGGG present en molts organismes, incloent mamífers (Malyavko et al. 2014). Igual que en la majoria d'organismes, les regions telomèriques del llevat contenen elements repetitius o subtelomèrics, anomenats TAS (*Telomere Associated Sequences*). *S. cerevisiae* conté dues classes d'aquests elements, el X i el Y' (Figura 69). L'element Y' es troba entre 0 i 4 repeticions en tàndem just abans de les repeticions telomèriques, es pot trobar en la forma curta o llarga, de 5,2 i 6,7 kb, respectivament (Chan and Tye 1983), i no tots els telòmers d'una mateixa soca presenten aquest element (Horowitz, Thorburn, and Haber 1984)(Zakian and Blanton 1988). En canvi, l'element X és més heterogeni pel que fa a seqüència i mida. Molt sovint, entre els elements X i Y' o entre Y' i Y' (quan més d'una repetició es troba present en tàndem) es troben també repeticions TG. Aquestes repeticions són fonts potencials d'inestabilitat genòmica donat que poden recombinar amb les seqüències telomèriques (Aksenova et al. 2013)(Gazy and Kupiec 2013). De fet, es creu que els cromosomes de llevat es pleguen, de manera que hi ha contacte entre les regions terminals i subtelomèriques (Poschke et al. 2012), protegint així els extrems del DNA, d'una forma similar als *loops-T* de mamífers (Griffith et al. 1999).

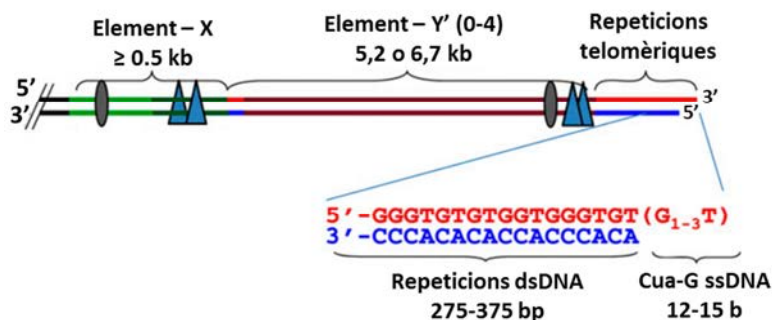


Figura 69. Representació de l'estructura del DNA als telòmers. S'indiquen els elements subtelo mèrics X i Y' així com les repeticions telomèriques terminals. En vermell, cadena rica en G (guanina) amb el seu extrem 3' de ssDNA i en blau, cadena rica en C (citosina) (Wellinger and Zakian 2012).

Una altra característica dels cromosomes del llevat és que no es troben localitzats a l'atzar dins del nucli sinó que es troben agrupats a la perifèria o l'embolcall nuclear (Therizols et al. 2010), de forma que els 32 telòmers totals d'una cèl·lula de llevat haploide s'agrupen en 3-8 clusters (Figura 70). A més, s'ha vist que es troben enriquits en proteïnes *SIR* (Gotta et al. 1996) i de fet, existeix una correlació entre la localització perinuclear i el silenciament en llevat.

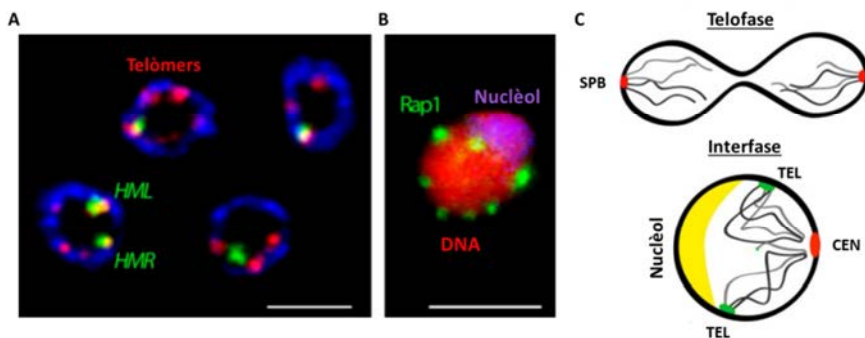


Figura 70. Distribució dels telòmers a l'embolcall nuclear en llevat. (A) Imatge de microscòpia confocal de la localització perifèrica dels telòmers (roig), dels loci *HML* i *HMR* (verd) per FISH i dels poros nuclears visualitzats mitjançant l'anticòs Mab414 (blau). Línia, 2 μM. (B) Agrupament dels telòmers en un nucli diploide visualitzats amb l'anticòs anti-Rap1 (verd), mentre que el nuclèol està marcat amb l'anticòs anti-Nop1 (blau). Els àcids nucleics s'han tenyit amb bromur d'etidi (vermell). Línia, 2 μM. (C) Representació esquemàtica de l'organització que té lloc al nucli durant la telofase de la divisió mitòtica en llevat i en la interfase (Taddei and Gasser 2012).

En aquesta organització, els propis telòmers hi juguen un paper important (Taddei and Gasser 2012). L'associació dels telòmers a la perifèria nuclear requereix d'almenys dues proteïnes de l'embolcall nuclear, Esc1 i Mps3. Esc1 interacciona amb l'extrem C-terminal de Sir4 (Taddei et al. 2004) i Mps3, que també es troba a la perifèria nuclear, s'uneix a Ku i aquesta a la vegada uneix a Sir4 (Figura 71). Es creu que aquestes vies de reclutament són redundants; no obstant, algunes semblen que predominarien més que altres depenent de la fase del cicle cel·lular en la qual es troben les cèl·lules. Així, la via de reclutament dependent de Ku tendeix a dominar durant la fase G1, mentre que la via Sir4/Esc1 ho faria durant la fase S del cicle cel·lular (Hediger et al. 2002). També es podria donar el cas que diferents telòmers fossin dependents de vies diferents de reclutament, és a dir, que el telòmer VI-R depent bàsicament de la via YKu i el telòmer VI-L depent de la via Sir4/Esc1 (Bystricky et al. 2005). S'ha descrit que mutacions en Ku (Ku70 o Ku80) o en proteïnes SIR afecten parcialment la posició telomèrica (Thierry Laroche et al. 1998)(Hediger et al. 2002), però només en un doble mutant $\Delta sir4\Delta ku70$ s'observa una completa deslocalització telomèrica, demostrant doncs que les diferents vies desenvoluparien funcions redundants (Hediger et al. 2002).

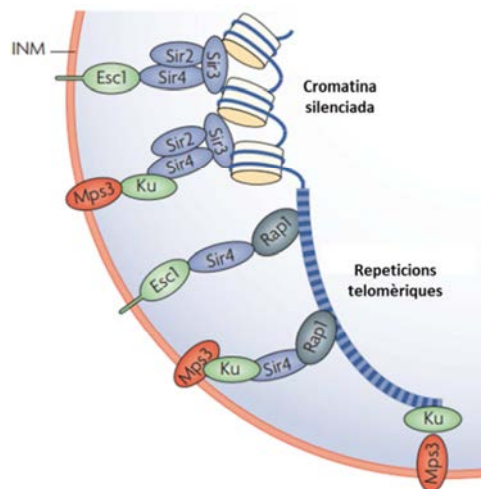


Figura 71. Unió dels telòmers a la perifèria nuclear. Rap1 recluta el complex SIR (Sir2, Sir3 i Sir4) el qual anirà estenent-se al llarg del telòmer i silenciant-lo. Les proteïnes Esc1, Mps3 i Ku participen en la unió dels telòmers a l'embolcall nuclear, a través de la interacció amb Sir4 (Mekhail and Moazed 2010).

S'ha descrit un gran nombre de proteïnes diferents que s'uneixen a les regions subtelomèriques i telomèriques del DNA i actuen com a protecció dels extrems dels cromosomes, en la replicació del DNA i en l'establiment i el manteniment de la cromatina. Entre algunes d'aquestes hi ha la proteïna Rap1, Rif1 i Rif2, Ku70 i Ku80, el complex SIR, el complex CST i la telomerasa.

Un aspecte important dels telòmers és el fet que els gens adjacents als telòmers estan subjectes a silenciament, conegut com efecte de posició telomèrica (*telomere position effect* o TPE) (Gottschling et al. 1990). Aquest fenomen és degut a la naturalesa de la cromatina en forma d'heterocromatina de les regions subtelomèriques. La zona silenciada varia entre soques i entre els extrems dels cromosomes, però pot ser tan gran com 10-15 kb des del final del telòmer (Pryde and Louis 1999). A més, existeix una correlació entre la localització a la perifèria nuclear i el silenciament. Ara es coneix que el complex *SIR*, és a dir, Sir2, Sir3 i Sir4 (Aparicio, Billington, and Gottschling 1991) i el complex YKu, Ku70 i Ku80 (Boulton and Jackson 1998) són essencial pel TPE, tot i que cèl·lules Δku segueixen silenciant si són també absents per *RIF1* i *RIF2* (K. Mishra and Shore 1999). Això podria ser degut a que tan Rif1 com Rif2, Sir3 i Sir4, interaccionen amb el domini C-terminal de Rap1 i l'absència de les proteïnes Rif podria estar reduint la competició amb Sir3 i Sir4 per la interacció amb Rap1.

Sir2, Sir3, Sir4 i Ku s'uneixen als telòmers, fet que promou el TPE (Figura 72). L'extrem C-terminal de Rap1, una proteïna que reconeix específicament la seqüència telomèrica unint-se a les repeticions TG dels telòmers, interacciona tan amb Sir3 com amb Sir4, mentre que Sir4 interacciona amb Sir2 (Moretti et al. 1994)(Moretti and Shore 2001), pel mateix mecanisme que succeeix al loci d'aparellament *HML* i *HMR*, tot i que en aquest cas, la proteïna Sir1 no intervé (Aparicio, Billington, and Gottschling 1991). El complex SIR està present també a les regions subtelomèriques. Així, aquestes interaccions fan que el complex silenciador s'uneixi als telòmers. Una vegada Rap1 s'ha unit a les repeticions telomèriques, l'efecte TPE s'esten al llarg de diverses kb, seguint el mateix mecanisme que té lloc al locus d'aparellament. Aquest fet té lloc gràcies a les interaccions proteïna-proteïna entre Sir3 i Sir4 amb les cues N-terminals de les histones

H3 i H4 (Hecht et al. 1995)(Strahl-Bolsinger et al. 1997). La delecció de les cues N-terminals d'aquestes histones aboleix el TPE (Thompson, Ling, and Grunstein 1994).

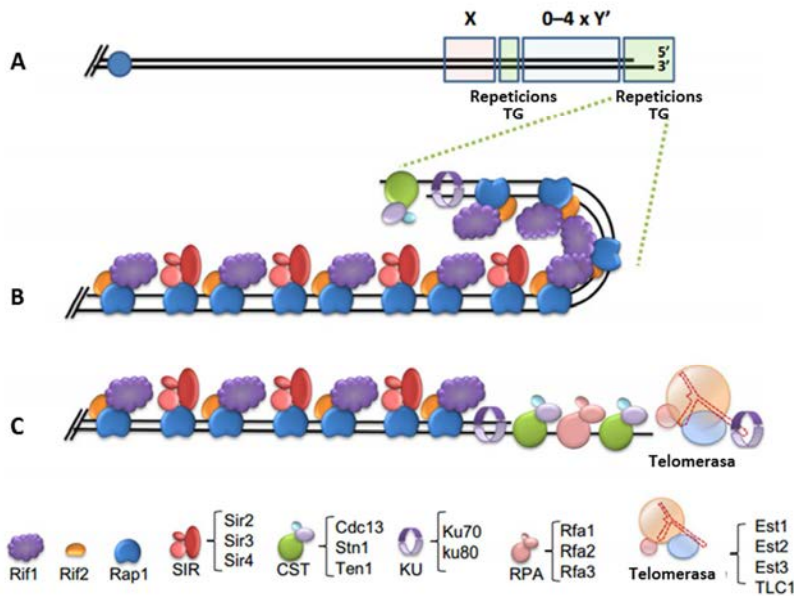


Figura 72. Estructura del telòmer de llevat i de les proteïnes que en formen part. (A) Representació esquemàtica del telòmer, on s'indiquen els elements X i Y' i les proteïnes que en formen part. (B) Estructura plegada del telòmer de llevat, amb les proteïnes que en formen part. Rap1 s'uneix a les repeticions telomèriques; i Rif1, Rif2 i les proteïnes SIR s'uneixen a Rap1. L'heterodímer Ku s'uneix al dsDNA, i el complex CST al ssDNA. (C) La telomerasa és reclutada als telòmers quan es troben en una conformació no plegada (Kupiec 2014).

L'extensió del complex de silenciament també requereix de l'activitat histona desacetilasa de Sir2, donat que la desacetilació (especialment de la histona H4K16) afavoreix les interaccions amb Sir3 i Sir4 (Georg J Hoppe et al. 2002), i per tant, el cicle de reclutament de SIR als telòmers i la conseqüent extensió del silenciament.

8.7. Silenciament al rDNA

El DNA ribosomal (rDNA) és una seqüència de DNA localitzada al cromosoma XII de *S. cerevisiae* i codifica pel RNA ribosomal, encarregat de la traducció de les molècules de mRNA a proteïnes. El rDNA dels eucariotes es caracteritza per ser altament repetitiu, és

a dir, consisteix en 100 o 200 còpies d'aproximadament 9,1 kb, que en *S. cerevisiae* es disposen en tàndem al llarg del cromosoma XII (Long and Dawid 1980)(Torres-Machorro et al. 2010). Cada unitat repetitiva està formada per les regions que codifiquen pel RNA ribosomal, la regió 35S rRNA i la regió 5S rRNA. A banda d'aquests dos gens, existeixen els elements *cis* reguladors implicats en l'expansió i la contracció de les repeticions de rDNA, localitzats majoritàriament a les regions espaiadores intergèniques no transcrites (NTS) anomenades NTS1 i NTS2 (Figura 73). Donada la naturalesa repetitiva del rDNA, és molt comú que puguin perdre's còpies degut a processos de recombinació homòloga entre les diferents repeticions, sent una de les regions més inestables del genoma de llevat (Kobayashi 2006). Aquestes recombinacions poden donar lloc a la formació de cercles extracromosòmics de rDNA (ERCs) que s'acumulen a les cèl·lules mare i es consideren una de les principals causes d'envelliment en *S. cerevisiae* (D. A. Sinclair and Guarente 1997). No obstant, les taxes de recombinació del rDNA són significativament més baixes del que s'esperaria per un tipus de regió tan repetitiva com aquesta, indicant doncs que la recombinació en aquesta regió del genoma està regulada negativament (Petes 1980).

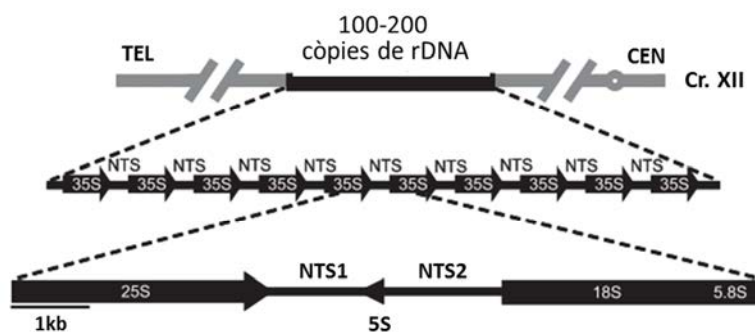


Figura 73. Estructura de la seqüència repetitiva del rDNA en *S. cerevisiae*. Es mostra la seva localització al cromosoma XII. En una ampliació, es mostra l'estructura de cada repetició, de 9,1 kb, formada pel gen 35S rRNA i una regió espaiadora no transcrita (NTS) que es troba dividida pel gen 5S rRNA, en les regions NTS1 i NTS2 (Ha, Sung, and Huh 2012).

Aquesta regulació que els organismes han desenvolupat és essencial pel seu creixement i supervivència, doncs evita els processos de recombinació que causen pèrdua del nombre de repeticions així com la generació de ERCs.

S'ha descrit que el rDNA es localitza a la mateixa zona que el nuclèol (Figura 74) i que a més, s'associa amb l'embolcall nuclear, fet que limitaria la recombinació al segrestar les repeticions de rDNA lluny de la maquinària de recombinació (Mekhail et al. 2008). La unió a l'embolcall nuclear es realitza a través de la unió amb el complex CLIP (*Chromosome Linkage INM Proteins*), que inclou les proteïnes Heh1 i Nur1. Així, el rDNA s'uneix a CLIP a través de la cohibina, un complex format per dues proteïnes Lrs4 i dos homodímers Csm1, com es comentarà més endavant (Taddei and Gasser 2012). El rDNA només es deslocalitzaria transitòriament del nuclèol quan en casos de reparació dels trencaments del DNA de doble cadena és necessària l'associació amb la maquinària de recombinació (Torres-Rosell et al. 2007).

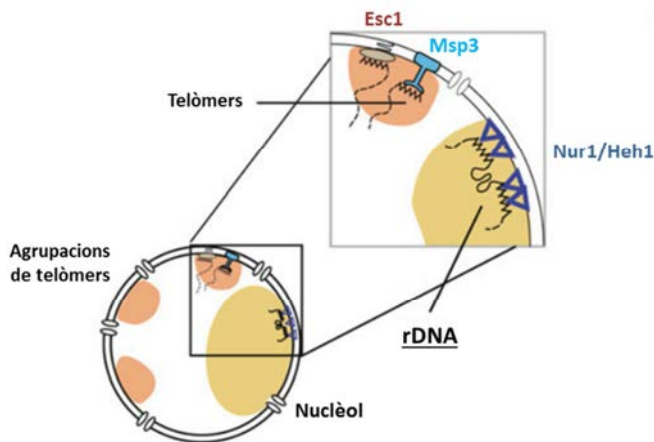


Figura 74. Localització nuclear dels telòmers i el rDNA. El rDNA es troba localitzat al nuclèol, allunyat de la major part del DNA nuclear i a més, s'uneix a la perifèria nuclear a través del complex Nur1/Heh1. Els telòmers també s'acoblen a la perifèria nuclear a través de les proteïnes Esc1 i Msp3 (Taddei and Gasser 2012).

La regulació negativa que té lloc al rDNA està relacionada amb el silenciament gènic per un mecanisme que implica a la proteïna Sir2 (Gottlieb and Esposito 1989)(Imai et al. 2000). No obstant, a diferència del loci d'aparellament i dels telòmers, de totes les proteïnes que formen el complex SIR (Sir2, Sir3 i Sir4), només Sir2 és necessària pel silenciament al rDNA i ho fa a través de la formació del complex RENT (*Regulator of nucleolar silencing and telophase exit*), format també per les proteïnes Net1 (o també coneguda com a Cfi1) (Straight et al. 1999) i Cdc14. S'ha descrit que el complex RENT

s'associa a les regions espaiadores NTS1 i NTS2 (J. Huang and Moazed 2003b). Net1 es localitza al nuclèol i té la funció de reclutar Sir2 al rDNA (Straight et al. 1999). Aquesta també interacciona amb la fosfatasa Cdc14 (Visintin, Hwang, and Amon 1999). La formació d'aquest complex és dependent del cicle cel·lular de les cèl·lules, doncs a final de l'anafase és desestabilitza el complex i Cdc14 i part de Sir2 són alliberats del complex (Shou et al. 1999), permetent a les cèl·lules la sortida de mitosis. Es coneix que aquestes proteïnes silenciadores són reclutades a la regió NTS1 a través de Fob1 (J. Huang and Moazed 2003b), la qual s'uneix específicament a seqüències d'alta recombinació dins de la regió NTS1, promovent la recombinació. Així, tan Fob1 com les seqüències a les que s'uneix, es requereixen per la recombinació del rDNA, sent doncs una regió influenciada tan per un mecanisme estimulador de la recombinació com inhibidor (J. Huang et al. 2006).

La deleció de *SIR2* resulta en un increment dels nivells d'histones H3 i H4 acetilades a la regió 5S del rDNA (Armstrong et al. 2002), un increment de 3 vegades en els nivells d'histona H3 diacetilada (Lys9 i 14) a la regió NTS1/2 (Bryk et al. 2002), fins el doble d'acetilació de H4 a la regió NTS2 (Georg J Hoppe et al. 2002) i també un increment de l'acetilació tan de H3 com de H4 a la regió NTS1 (Buck, Sandmeier, and Smith 2002). La pèrdua de silenciament en les cèl·lules $\Delta sir2$ ve acompanyada d'un increment de la recombinació dependent de Fob1 i un increment en l'acumulació de ERCs. S'ha descrit que això provoca un disminució de la vida d'aquestes cèl·lules, mentre que si s'incrementa la dosi de *SIR2*, es suprimeix la recombinació i s'allarga la vida (M Kaeberlein, McVey, and Guarente 1999).

Una altra proteïna, Tof2, també es recluta a la regió NTS1 a través de Fob1 i actua com un adaptador per reclutar el complex CLIP, format per dues proteïnes Lrs4 i dues Csm1, reguladores negatives de l'intercanvi desigual entre cromàtides germanes i que es requereixen pel silenciament específic de la regió NTS1 (Figura 75). Aquestes proteïnes, com ja s'ha comentat, són les que a la vegada també s'uneixen a Nur1 i Heh1 per acoblar el rDNA a l'embolcall nuclear, fet que estabilitza les repeticions prevenint la seva sortida del nuclèol i evitant la seva exposició a la maquinària de reparació del DNA, limitant la recombinació entre unitats repetitives i promovent l'aliniament entre

cromàtides germanes per evitar recombinacions aberrants (Mekhail and Moazed 2010).

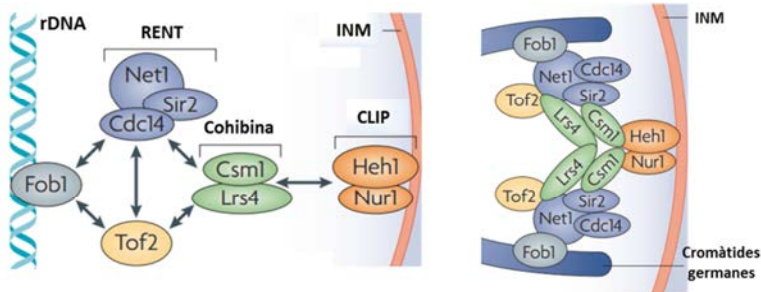


Figura 75. Model de reclutament de proteïnes al rDNA de *S. cerevisiae*. Fob1 s'uneix als espais intergènics del rDNA promovent la recombinació. No obstant, aquesta funció està reprimida per un mecanisme de silenciament dut a terme per diverses proteïnes, com el complex RENT (format per Sir2, Cdc14 i Net1), el complex cohibina (format per Lrs4 i Csm1) i Tof2. La cohibina també interacciona amb el complex CLIP (format per Heh1 i Nur1), fent que les repeticions del rDNA es localitzin a la membrana nuclear (INM) (Mekhail and Moazed 2010).

Tof2, igual que Fob1, jugarien un paper dual en el sentit que són requerides tan per la recombinació del rDNA com pel reclutament d'inhibidors de la recombinació (J. Huang et al. 2006). Més recentment, s'ha descrit que Nsi1 també participa en el silenciament del rDNA interaccionant amb Fob1, Sir2 i Net1. La pèrdua de Nsi1 provoca una menor disminució de l'associació de Sir2 a NTS1 i s'observa una major acetilació també en aquesta regió (Ha, Sung, and Huh 2012).

Així, es suggereix que hi haurien dues vies de silenciament al rDNA. Per una banda, hi hauria una via Sir2 dependent que implicaria la unió de Net1 al rDNA a través de Fob1. Net1 i Fob1 reclutarien Sir2, que duria a terme una organització local del nucleosoma. En la via Sir2 independent, Fob1 reclutaria Tof2 al NTS1, i el complex cohibina (Lrs4/Csm1) s'associaria també a NTS1 a través de la interacció amb Tof2. Aquesta via implica la unió del rDNA a l'embolcall nuclear a través d'aquest del complex CLIP (Taddei and Gasser 2012). La pèrdua tan de Sir2 com del complex cohibina-Heh1 comporta la inestabilitat en les repeticions del rDNA. No obstant, el fet que es tractin de vies independents evidencia el fet que la deleció de *LRS4* o *CSM1* no té efectes en la

localització de Sir2 a la regió NTS1, suggerint que aquestes dues proteïnes actuarien a posteriori al reclutament de Sir2 (J. Huang et al. 2006).

L'instabilitat en aquesta regió del genoma de *S. cerevisiae* provoca la pèrdua del nombre de còpies de rDNA. No obstant, els organismes reverteixen aquesta pèrdua a partir d'un sistema d'amplificació on participa Fob1 (Kobayashi 2006)(Kobayashi 2011). La proteïna Fob1 s'encarrega de bloquejar la forquilla de replicació en una direcció en una regió específica del rDNA, anomenada barrera de la forquilla de replicació (RFB). La unió de Fob1 en aquesta regió RFB provoca trencaments de doble cadena en el DNA (DSBs) induint la recombinació entre cromàtides germanes, que és crítica per l'amplificació (Burkhalter and Sogo 2004), produint variacions en el nombre de còpies de rDNA. La transcripció d'E-pro provoca la dissociació del complex de cohesina que normalment manté unides les cromàtides germanes fins que té lloc la mitosi. La dissociació de la cohesina provoca que els talls en les cromàtides germanes siguin reparats, induint la recombinació desigual entre cromàtides germanes i consegüentment, es genera un canvi en el nombre de còpies de rDNA. Quan el nombre de còpies són els adequats, Sir2 modula l'estructura de la cromatina, silenciant el promotor E-pro (Figura 76).

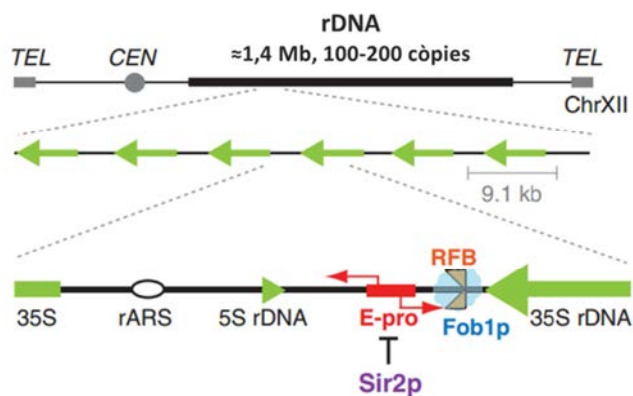


Figura 76. Silenciament del promotor E-pro. Es mostra el rDNA localitzat al cromosoma XII i s'indiquen també la localització dels telòmers i el centròmer. En major detall es pot comprovar les repeticions disposades en tàdem (fletxes verdes). Cada unitat repetitiva presenta una mida de 9,1 kb. En una visió més ampliada es detalla una de les repeticions del rDNA. S'indiquen les regions codificants 35S i 5S, així com l'origen de replicació (rARS). A la regió RFB (taronja) s'hi uneix Fob1 (blau), mentre que el promotor no codificant, E-pro (vermell), és silenciat per la histona desacetilasa Sir2. Adaptat de (Ganley and Kobayashi 2014).

En un mutant $\Delta sir2$, la transcripció E-pro està molt activada (Kobayashi and Ganley 2005), fet que resulta en importants variacions en el nombre de còpies i en inestabilitat en el rDNA (Ganley and Kobayashi 2014). S'ha descrit que Sir2 participa en el reclutament de la cohesina tan a les regions del loci d'aparellament HM com al rDNA, fet que provoca que es bloquegi l'intercanvi entre cromàtides germanes, mantenint així les unitats de rDNA (C.-S. Wu, Chen, and Gartenberg 2011). Mutacions en les subunitats de la cohesina donen lloc a defectes en la supressió de la recombinació i en el silenciament al rDNA (Kobayashi et al. 2004). Per tant, Sir2 i les altres proteïnes silenciadores del complex, desenvolupen un paper essencial en el manteniment de l'estabilitat del rDNA.

8.8. Altres funcions de Sir2

És ben conegut que Sir2 centra la seva funció als telòmers, al loci d'aparellament i al rDNA. No obstant, més recentment s'han anat descrivint altres mecanismes en els quals Sir2 també es troba implicada. Així, Sir2 també participa en la iniciació de la replicació, en la repressió de gens específics durant la fase diàuxica, en la regulació de l'estrès oxidatiu i l'envelliment, l'homeòstasi de proteïnes i el transport d'òrgans durant la divisió cel·lular. A continuació es descriuran algunes d'aquestes funcions.

8.8.1. Sir2 i estrès oxidatiu

Tan Sir2 com l'estrès oxidatiu tenen en comú que són dos factors que afecten la longevitat dels llevats (Merksamer et al. 2013). Les primeres evidències de la relació entre sirtuïnes i estrès oxidatiu remonten als estudis de manipulació genètica de Sir2 en *S. cerevisiae*, *C. elegans* i *D. melanogaster*. La delecció de *SIR2* disminueix dràsticament la vida replicativa del llevat, mentre que la seva sobreexpressió l'augmenta (M Kaeberlein, McVey, and Guarente 1999). La qüestió rau en el fet de si Sir2 podria estendre la vida de les cèl·lules a través de la disminució dels nivells d'estrès oxidatiu. Donat el fet que la sobreexpressió de Sir2 té la capacitat de revertir la menor vida replicativa que presenten les cèl·lules de *S. cerevisiae* tractades amb H_2O_2 i que

Sir2 també participa en la segregació asimètrica entre cèl·lula mare i filla de les proteïnes oxidades (apartat 8.8.3 de la Introducció), es creu que aquesta sirtuïna podria participar en la regulació de la resistència a l'estrès oxidatiu. No obstant, a diferència dels múltiples estudis que donen suport al paper de les sirtuïnes en la regulació dels nivells de ROS en mamífers (Merksamer et al. 2013), pocs estudis han demostrat la participació de Sir2 en la resposta a l'estrès oxidatiu.

Es coneix que Sir2 s'indueix en resposta a l'estrès oxidatiu, ja sigui causat exògenament o en condicions endògenes d'estrès, per exemple en el cas d'un model de Huntington en llevat (Sorolla et al. 2011). A més, Sir2 participa juntament amb el factor transcripcional Hcm1 en la resposta a l'estrès. La interacció de Sir2 amb Hcm1 provoca la localització de Hcm1 al nucli on podrà induir l'expressió de gens antioxidants, entre ells la catalasa i la MnSOD (Rodríguez-Colman et al. 2010)(Rodríguez-Colman et al. 2013). Per una altra banda, les cèl·lules exposades a condicions d'alta osmolaritat induïxen l'activació de la cinasa SAPK a través de Hog1, la qual es requereix per la supervivència en aquestes condicions adverses. No obstant, l'activació continuada d'aquesta via causa la mort cel·lular deguda a una acumulació de ROS; Sir2 actua protegint a les cèl·lules de la mort cel·lular induïda per Hog1, a través de la supressió dels elevats nivells de ROS (Vendrell et al. 2011).

També s'ha descrit que l'absència de Sir2 té la capacitat d'incrementar la resistència a estrès oxidatiu i estrès per calor en cèl·lules de 3 dies, però no en cèl·lules que es troben en fase exponencial (Paola Fabrizio et al. 2005). A posteriori, es va confirmar que Sir2 regula l'estrès oxidatiu i la vida cronològica depenent de la fase de creixement en la que es troben les cèl·lules. La deleció de *SIR2* disminueix la resistència a H₂O₂ i la vida cronològica de les cèl·lules de llevat en fase exponencial, però incrementa tan la resistència a H₂O₂ com la vida cronològica de les cèl·lules que creixen en fase post-diàuxica i estacionària (Kang et al. 2014). Per tant, en fase exponencial Sir2 es troba reprimint l'expressió de gens antioxidants necessaris per la protecció de les cèl·lules front l'estrès oxidatiu, com *SOD1*, *SOD2*, *CTT1*, *CTA1*, *TRX1*, *TRX2*, *GSH1*, *GSH2*, *GRX1* i *GRX2* (Kang et al. 2014). No obstant, és quan s'esgota la glucosa i les cèl·lules passen de fermentar a respirar, les vies PKA i TOR s'inhibeixen i el rati NAD⁺/NADH augmenta,

quan es podria activar el paper protector de Sir2 després d'aquesta fase diàuxica. Es coneix que els nivells de proteïna Sir2 disminueixen en la fase diàuxica, però es considera que aquesta no és la causa de la regulació de la resistència a l'estrès oxidatiu depent de la fase de creixement, donat que per exemple, s'ha descrit que la resistència a H_2O_2 no és directa ni inversament proporcional a la quantitat de Sir2 (Kang et al. 2014). Tot i la implicació de Sir2 en la resistència a l'estrès oxidatiu, segueix sense estar clar perquè Sir2 inhibeix l'expressió de gens antioxidants necessaris per la protecció de les cèl·lules front l'estrès.

Més recentment, s'ha descrit que Sir2, juntament amb Yap1, també participa en en la resposta a l'estrès oxidatiu d'una forma indirecta a través de l'activació del factor transcripcional Hsf1, responsable de la regulació de múltiples gens de resposta a diversos tipus d'estrès en *S. cerevisiae* (Nussbaum et al. 2014). En una cèl·lula $\Delta sir2$ el factor Hsf1 no respon al xoc tèrmic, mentre que la suplementació de les cèl·lules amb precursors del NAD^+ millora la resposta a l'estrès tèrmic en fase estacionària, especialment quan es combina amb la sobreexpressió de Sir2 (Nussbaum et al. 2014). Sir2 és també necessària per l'activació de Hsf1 a través de la resposta UPR (*Unfolded Protein Response*)(Weindling and Bar-Nun 2015).

8.8.2. Sir2 i metabolisme

A part dels telòmers, el rDNA i el loci d'aparellament, Sir2 s'ha descrit unida a diferents gens relacionats amb els processos de fermentació, glicòlisi i traducció a través d'estudis basats en immunoprecipitacions de cromatina i seqüenciació (ChIP-seq). La majoria de processos i gens que es troben altament actius durant la fase exponencial, tendeixen a ser reprimits quan les cèl·lules entren en fase diàuxica (DeRisi, Iyer, and Brown 1997).

Sir2, juntament amb Hst1 i Sum1 participen en la repressió de certs gens durant la fase diàuxica requerint per això, concentracions de NAD^+ suficientment altes. A més, la unió de Sir2 en aquestes ORFs és independent del complex SIR, és a dir, no requereix ni de Sir3 ni de Sir4 però sí que requereix de la proteïna Sum1 (M. Li et al. 2013). Concretament, es va observar que tan Sir2, com Hst1 i Sum1, però no Hst2, es troben

units als gens *PDC1*, *ENO2*, *CDC19*, *TDH3* i *ADH1*. La deleció de *SIR2*, *HST1* i *SUM1* no causa diferències en l'expressió d'aquests gens implicats en la fermentació de la glucosa quan les cèl·lules es troben en fase exponencial, però sí que es va observar que quan aquests mutants entren en fase diàuxica, sobretot els gens *PDC1* i *ENO2* no són reprimits (Figura 77).

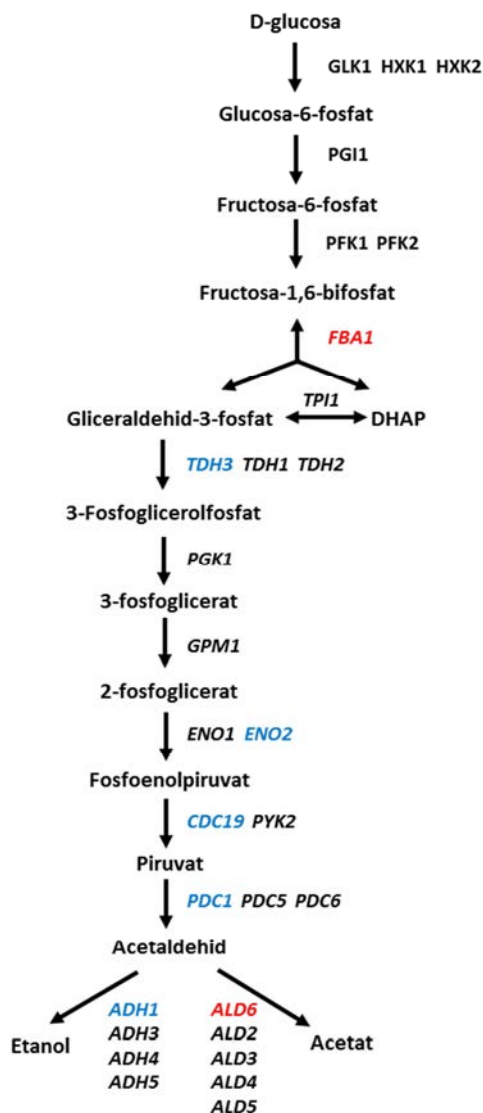


Figura 77. Regulació de la via de la glicòlisi/fermentació en *S. cerevisiae* durant la fase diàuxica. S'indiquen els diferents enzims que participen en la via. En blau es mostren els gens regulats per Sir2, Hst1 i Sum1 durant la fase diàuxica de creixement de les cèl·lules. En vermell, els gens regulats només per Sir2 (M. Li et al. 2013).

En aquesta regulació, Sum1 es requereix per reclutar Sir2, però no Hst1, en les ORFs dels gens implicats en el metabolisme (M. Li et al. 2013). Sir3 i Sir4 tampoc participen en aquesta regulació, tot i que s'ha descrit que l'absència de *SIR4* reforça la unió de Sir2 en aquestes ORFs, fet similar al que succeeix en la reorganització de Sir2 del telòmer al rDNA quan Sir4 no està present (Kennedy et al. 1997)(J. S. Smith et al. 1998).

8.8.3. Sir2 i segregació asimètrica

En les cèl·lules de *S. cerevisiae*, la divisió cel·lular es caracteritza per ser asimètrica (Figura 78), és a dir, els diferents components cel·lulars de la cèl·lula mare no són distribuïts de forma equivalent entre mare i filla durant la divisió (Lord and Wheals 1980).

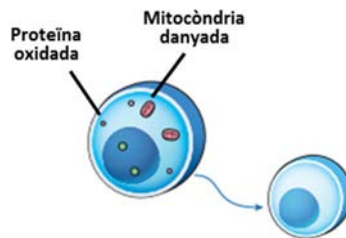


Figura 78. Segregació asimètrica entre cèl·lula mare i cèl·lula filla durant la divisió cel·lular en *S. cerevisiae*. La cèl·lula mare reté les proteïnes oxidades i els orgànuls danyats de forma que no són heretats per la cèl·lula filla.

Així per exemple, la cèl·lula filla no hereta les mitocondries danyades, ni les proteïnes oxidades ni tampoc els cercles extracromosòmics de rDNA que acumula la cèl·lula mare. En aquest sentit, la cèl·lula filla "rejuveneix" donat que la cèl·lula mare manté tot el dany cel·lular acumulat i no li transmet a la seva cèl·lula filla; si no fos així, la vida replicativa de la cèl·lula filla es veuria afectada (D. A. Sinclair and Guarente 1997).

Les primeres evidències que Sir2 estava implicada en la segregació asimètrica van sorgir de l'observació dels mutants $\Delta sir2$, les cèl·lules filles dels quals presenten majors nivells de proteïnes oxidades que les cèl·lules filles de la soca WT (Aguilaniu et al. 2003). Es va observar que després del tractament amb paraquat, els nivells de proteïnes

carbonilades es distribuïen de forma similar entre mare i filla. Així, la major càrrega de proteïnes oxidades presents en les $\Delta sir2$ filles respecte les cèl·lules WT va indicar que Sir2 havia de participar d'alguna forma en la segregació de les proteïnes oxidades durant la citocinesi (Aguilaniu et al. 2003).

Es va observar que la segregació asimètrica que duu a terme Sir2 és independent del posicionament de la sirtuïna a la cromatina silenciada i per tant, de la funció de silenciament (Orlandi et al. 2010). Per dur a terme aquesta funció i a través de l'anàlisi d'interaccions *in silico*, es va determinar que Sir2 interacciona amb múltiples gens incloent components del citoesquelet d'actina, la proteïna motora associada a l'actina Myo2 i amb la calmodulina Cmd1, organitzadora de l'actina. A més dels gens implicats en els processos dependents de l'actina, altres gens del transport RE-Golgi i de l'homeòstasi del RE també interaccionen amb Sir2 (Song et al. 2014).

En relació amb la segregació asimètrica i el transport de proteïnes danyades entre cèl·lula mare i cèl·lula filla, s'ha observat que Sir2 participa amb la resistència a l'estrès oxidatiu que presenten les cèl·lules filles. Així, la deleció de Sir2 afecta la resistència a l'estrès en favor a les cèl·lules mare. Les cèl·lules filles mutants $\Delta sir2$ són més vulnerables a varis tipus d'estrès (Knorre et al. 2010), remarcant el transport Sir2 dependent dels factors adversos que acaben afectant a la resistència de les cèl·lules. També s'ha descrit que just després de la finalització de la citocinesi es produeix una disminució immediata dels nivells de ROS en la descendència, concretament dels nivells de H_2O_2 . Aquest procés és el resultat de la segregació dependent de Sir2 de la catalasa Ctt1, de forma que la cèl·lula filla reb una gran quantitat de l'enzim catalasa no danyat i actiu respecte la cèl·lula progenitora (Erjavec and Nyström 2007). Així, aquest tipus de control de qualitat dota a la cèl·lula filla d'una major capacitat per combatre l'estrès oxidatiu a la qual es pot trobar exposada i evita o retarda el dany oxidatiu inflingit a les seves pròpies proteïnes. A més, en un model de Huntington en llevat s'ha descrit que l'activació de Sir2 disminueix l'agregació de proteïnes poliQ, disminuint la toxicitat que això provoca (Sorolla et al. 2011).

8.8.4. Sir2 i actina

En l'herència asimètrica de mitocondries i proteïnes no danyades en les cèl·lules filles de *S. cerevisiae* hi intervé el citoesquelet d'actina. El citoesquelet es pot trobar en dos estats diferents: la forma globular monomèrica (G-actina) i la forma polimèrica filamentosa (F-actina). La F-actina és una hèlix de doble cadena dinàmica en la qual per un extrem s'hi va unint la G-actina i per l'altre extrem es va desacoblant. L'actina es pot trobar organitzada en cables d'actina, patxes i anells d'actina (Figura 79)(M. Mishra, Huang, and Balasubramanian 2014) i està implicada en una gran varietat de processos, des del procés d'herència i segregació asimètrica (Boldogh, Yang, and Pon 2001)(Bretscher 2003), fins a l'endocitosis (Engqvist-Goldstein and Drubin 2003), l'establiment de la polaritat cel·lular (Pruyne et al. 2004) i la citocinesi (E. Bi 2001).

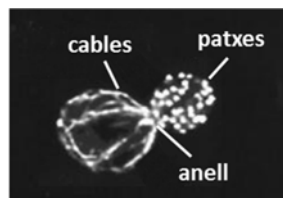


Figura 79. Citoesquelet d'actina en *S. cerevisiae*. La imatge mostra una cèl·lula en divisió on s'observa clarament els cables i els patxes d'actina, que es mantenen durant tot el cicle cel·lular. L'anell d'actina només és visible just abans o durant la citocinesi (Moseley and Goode 2006).

Els cables d'actina s'estenen al llarg de la cèl·lula mare i representen el major grau de polimerització i organització estructural.

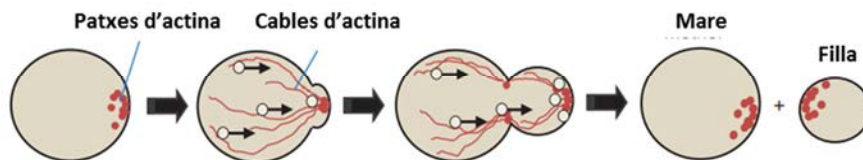


Figura 80. Citoesquelet d'actina i divisió cel·lular en *S. cerevisiae*. Durant la divisió cel·lular, els patxes d'actina es posicionen allí on tindrà lloc la formació de la gemma. Posteriorment, els cables d'actina es posicionen en aquest punt i serveixen de vies pel transport dels diferents constituents i els òrgans cap a la nova cèl·lula filla. Al completar-se la citocinesi, els patxes d'actina s'acumulen a la zona on ha tingut lloc la divisió cel·lular (Nyström and Liu 2014).

Es requereixen pel lliurament d'òrgànuls des de la cèl·lula mare fins la cèl·lula filla i equivaldrien a pistes o vies per les quals es realitzaria aquest transport. Es caracteritzen per ser dinàmics, movent-se en direcció oposada al moviment dels òrgànuls que van des de la cèl·lula mare cap a la gemma durant la divisió cel·lular (Figura 80). Aquest procés es coneix com flux retrògrad dels cables d'actina. En canvi, en condicions normals els patxes d'actina es caracteritzen per acumular-se a la gemma en formació. La formació de patxes també és una conseqüència de l'estrès oxidatiu, és a dir, l'actina és una diana de les ROS possiblement per l'elevat nombre de cisteïnes que conté (Farah and Amberg 2007). Així, en resposta a l'estrès oxidatiu, els cables d'actina es desacoblen, donant lloc a la despolarització del citoesquelet d'actina. Com a resultat, l'actina es despolimeritza i passa a organitzar-se en forma de patxes que es distribueixen al·leatoriament per tota la cèl·lula.

A banda de l'estrès oxidatiu, també s'ha descrit que Sir2 participa en la regulació del citoesquelet d'actina, fet que explica en part, la implicació de Sir2 en la segregació asimètrica. Les primeres evidències del paper de Sir2 remonten de l'observació que els mutants $\Delta sir2$ presenten un defecte en el plegament de l'actina dependent de la xaperonina CCT. Aquesta proteïna es troba altament acetilada en les cèl·lules $\Delta sir2$, tot i que es deconex si això en provoca la dismunió de la seva funció i si es tracta d'una diana de la desacetilasa Sir2 (B. Liu et al. 2010). Posteriorment, es va confirmar que la deleció de *SIR2* redueix el nombre de cables d'actina. En aquests mutants es produeix una disminució de les velocitats del flux retrògrad i del moviment retrògrad mitocondrial (Higuchi et al. 2013). En canvi, la sobreexpressió de *SIR2* produeix l'efecte contrari. Aquest fet està relacionat amb una menor mobilitat mitocondrial i a la segregació de més mitocòndries oxidades respecte les reduïdes entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla (Higuchi et al. 2013). La deleció del repressor transcripcional *SUM1* millora els defectes d'integritat del citoesquelet d'actina, de qualitat mitocondrial i de la vida replicativa que presenten les cèl·lules $\Delta sir2$ (Ryo Higuchi-Sanabria, Jason D. Vevea, Joseph K. Charalel, Maria L. Sapar 2016). A més, els nivells de cables d'actina augmenten, així com la velocitat del flux retrògrad i la funció mitocondrial. Així doncs, *SUM1* actua contrarestant múltiples funcions de *SIR2* (Ryo Higuchi-Sanabria, Jason D. Vevea, Joseph K. Charalel, Maria L. Sapar 2016). En conclusió, Sir2 desenvolupa una

funció en varis aspectes referents al citoesquelet d'actina, els quals incluen la dinàmica dels cables d'actina, el desacoblament i el control de qualitat mitocondrial, funcions que poden acabar afectant al potencial replicatiu d'aquestes cèl·lules.

8.8.5. Sir2 i envelliment

Sir2 també s'ha descrit implicada en el context de l'envelliment. Són múltiples les evidències que apunten que Sir2 actua positivament pel que fa a l'envelliment replicatiu de les cèl·lules, tot i que no sembla tenir els mateixos efectes en l'envelliment cronològic. Pel que fa a les sirtuïnes humanes, també s'han vist relacionades en el procés d'envelliment, com és el cas de la Sirt6. L'envelliment en *S. cerevisiae* i la seva relació amb Sir2 es descriu a l'apartat d'envelliment (apartat 9 de la Introducció).

9. ENVELLIMENT EN *S. CEREVISIAE*

En organismes superiors, l'envelliment es pot considerar com l'acumulació progressiva de canvis en el temps, associats o responsables de la major susceptibilitat a la malaltia o la mort que acompanya a l'increment de l'edat (Harman 1981).

Són diverses les teories que intenten explicar les causes de l'envelliment, no obstant, la teoria de l'envelliment pels radicals lliures (Harman 1956) és la que ha agafat més importància. Segons aquesta teoria, els efectes perjudicials dels radicals lliures en les diferents macromolècules i compartiments cel·lulars serien la causa de l'envelliment. Tot i que alguns autors apunten que l'estrès oxidatiu i els radicals lliures juguen un paper insignificant en l'envelliment, sembla clar que està generat per múltiples causes que inclouen el dany a les estructures i funcions de les molècules, les cèl·lules i els òrgans d'un organisme. Aquestes causes inclouen tan l'estrès oxidatiu, l'escurçament de telòmers, les reaccions secundàries, mutacions, agregació de proteïnes, etc. En un primer moment es va creure de forma errònia que les espècies unicel·lulars eren immortals, donat que els signes de l'envelliment només eren evidents en els organismes multicel·lulars i al fet que per exemple, el llevat de gemmació podia ser

propagat en cultiu indefinidament. No obstant, quan A. Barton va realitzar el seguiment d'una única cèl·lula mare de llevat a través d'anar eliminant les cèl·lules filles, es va adonar que aquestes també morien (Barton 1950). Cada vegada són més els estudis que centren la seva recerca en el fenomen de l'envelliment i *S. cerevisiae* ha contribuït més a la identificació de múltiples gens de mamífers que afecten l'envelliment que qualsevol altre organisme model. Les principals vies d'estudi en el context de l'envelliment i de les malalties associades a l'envelliment són la via de les sirtuïnes i la via de senyalització TOR. En llevat, l'estudi de l'envelliment pot realitzar-se a partir de l'envelliment replicatiu o l'envelliment cronològic. Ambdues formes d'envelliment s'explicaran en més detall a continuació.

9.1. Envelliment Replicatiu

L'envelliment replicatiu (*Replicative Life Span, RLS*) es defineix com el nombre de gemmes o cèl·lules filles que produeix una cèl·lula mare abans de morir (Figura 81). A nivell pràctic, es mesura comptant el nombre de divisions que experimenta una cèl·lula, eliminant les cèl·lules filles generades en cada cicle cel·lular.

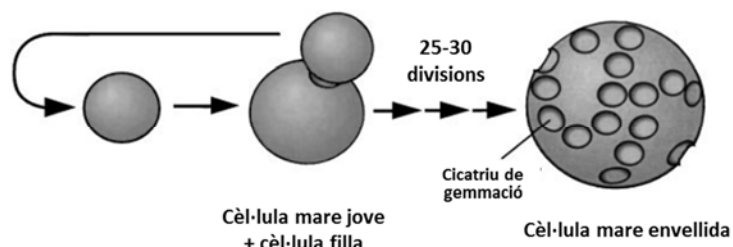


Figura 81. Envelliment replicatiu d'una cèl·lula de *S. cerevisiae*. Una cèl·lula mare verge experimenta una divisió asimètrica, donant lloc a una cèl·lula filla. Cada cicle cel·lular produirà noves cèl·lules filles, fet que provocarà la formació de cicatrius de gemmació a la superfície cel·lular que poden ser utilitzades com una mesura de l'envelliment replicatiu (D. Sinclair, Mills, and Guarente 1998).

L'envelliment replicatiu seria comparable al fenomen d'envelliment experimentat en les cèl·lules de divisió asimètrica en eucariotes superiors, com les cèl·lules mare. Les primeres evidències que relacionaven les sirtuïnes amb l'envelliment van sorgir d'experiments realitzats en el llevat *S. cerevisiae*. En aquests es va establir l'activació de Sir2 com la primera intervenció genètica capaç de promoure la longevitat, donat que la

deleció de Sir2 dóna lloc a una disminució de la vida replicativa, mentre que la seva sobreexpressió l'incrementa (M Kaeberlein, McVey, and Guarente 1999). De fet, es va establir que Sir2 és un dels gens que es troba sobreexpressat en diferents soques que presenten de forma natural una major vida replicativa (Guo et al. 2011). Posteriorment, també es va observar que la sobreexpressió de Sir2 té la capacitat d'allargar la vida tan en models de *C. elegans* (Tissenbaum and Guarente 2001) com en *Drosophila* (Rogina and Helfand 2004). Val a dir però, que mentre alguns estudis no han estat capaços de reproduir aquests mateixos resultats en llevat (Burnett et al. 2011), en altres sí s'ha observat una extensió del RLS degut a la sobreexpressió de Sir2 en altres fons genètics (Stumpferl et al. 2012). Pel que fa a mamífers, Sirt1 també s'ha relacionat amb una gran varietat de malalties associades a l'edat (Wątroba and Szukiewicz 2015). No obstant, la seva sobreexpressió, a diferència dels models ja comentats, no provoca una extensió de la vida, fet que ha generat controvèrsia respecte el paper real de les sirtuïnes en relació amb l'envelliment. Més recentment, es va observar que Sirt6 sí que era capaç d'allargar la vida en ratolins mascles, però no en femelles (Kanfi et al. 2012). No obstant, encara que Sirt1 no moduli de forma directa el procés d'envelliment en mamífers, sembla clar que interacciona amb múltiples vies importants relacionades en aquest procés. Per tant, és essencial entendre els mecanismes pels quals Sir2 afecta la vida replicativa en llevat i com aquesta interactua amb altres vies implicades amb l'envelliment. Els mecanismes pels quals es considera que Sir2 promouria la longevitat replicativa es podrien resumir en els següents blocs (Valter D Longo et al. 2012)(Wasko and Kaeberlein 2014).

9.1.1. Sir2 i acumulació de ERCs

Per una banda, Sir2 estaria implicada en la supressió de la recombinació homòloga que té lloc al rDNA, causant de la formació de cercles extracromosòmics de rDNA (ERCs). Aquestes molècules de DNA circular són capaces d'autoreplicar-se i segregar-se de forma asimètrica durant la divisió cel·lular cap a la cèl·lula mare (Figura 82) (D. A. Sinclair and Guarente 1997). Primerament, es pensava que aquesta acumulació de ERCs al nucli de la cèl·lula mare per sí mateixa podia ser un dels factors limitants causants de

l'envelliment (D. A. Sinclair and Guarente 1997). Així, la deleció de *SIR2* tenia com a resultats una major recombinació dins del rDNA i conseqüentment, major formació de ERCs. No obstant, estudis addicionals van suggerir que Sir2 també podia estar implicada en la modulació de l'estabilitat del rDNA i de l'envelliment d'una forma independent als ERCs (Kobayashi and Ganley 2005).

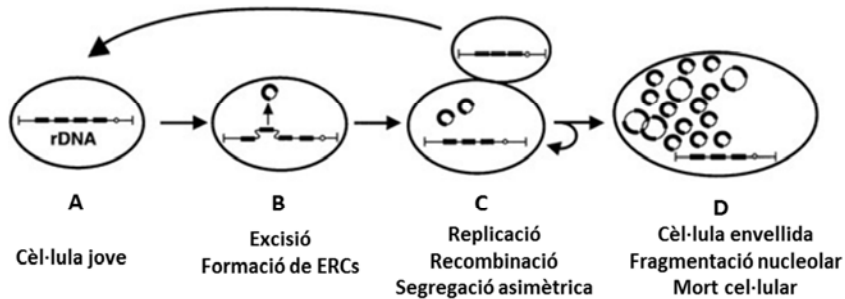


Figura 82. Model d'envelliment per acumulació de ERCs en llevat. (A) A mesura que la cèl·lula mare jove es divideix podent tenir lloc processos de recombinació entre les repeticions del rDNA localitzat al cromosoma XII. (B) La recombinació dins del rDNA pot donar lloc a la formació de ERCs. (C) Durant la fase S, els ERCs són replicats i es segreguen asimètricament, mantenint-se a la cèl·lula mare (D) Els ERCs s'acumulen exponencialment a la cèl·lula mare donant lloc a la fragmentació del nucleol, l'aturada de la divisió cel·lular i finalment, la senescència (D. A. Sinclair and Guarente 1997).

D'aquesta forma, es va establir que més que l'acumulació de ERCs, és la inestabilitat al rDNA la que es correlaciona amb un major envelliment (Ganley and Kobayashi 2014). A més, es creu que el rDNA podria actuar com un sensor del dany al DNA en general, donat que és molt possible que es tracti de la primera part del genoma en desestabilitzar-se ja sigui per factors endògens o exògens que afecten al DNA (Kobayashi 2008). De fet, s'ha establert la teoria de l'envelliment del rDNA en la qual es proposa que el rDNA dóna lloc a l'inici de l'envelliment a través d'un procés que s'inicia amb la divisió cel·lular asimètrica donant lloc a l'acumulació d'inestabilitat al rDNA especialment en les cèl·lules mare. Aquesta inestabilitat escurça directament la vida de les cèl·lules, però a la vegada també produeix altres fenotips d'envelliment, que també poden tenir efectes negatius en la vida de les cèl·lules, i a la vegada, seguir incrementant el nivell d'inestabilitat al rDNA (Ganley and Kobayashi 2014).

9.1.2. Segregació asimètrica Sir2-dependent

Per una altra banda, es coneix que Sir2 també està implicada en la distribució asimètrica de proteïnes oxidades entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla durant la citocinesi (Aguilaniu et al. 2003), fet que millora la capacitat de les cèl·lules filles per respondre a les condicions d'estrès oxidatiu (Knorre et al. 2010). En aquest aspecte, la manca de Sir2 té com a conseqüència una fallida en el mecanisme Sir2-dependent de segregació de proteïnes danyades i/o oxidades, donant lloc a una acumulació d'aquestes en les cèl·lules filles. De fet, les cèl·lules filles d'una soca $\Delta sir2$ hereten major quantitat de dany oxidatiu (Figura 83), fet que contribueix a una disminució de la vida d'aquestes cèl·lules (Erjavec and Nyström 2007). També s'ha observat que en models de Huntington en llevat hi ha una major acumulació d'agregats proteïcs a mesura que les cèl·lules envelleixen i que Sir2 desenvolupa un paper essencial en la protecció d'aquestes cèl·lules, evitant la toxicitat i l'acumulació d'aquests agregats en les cèl·lules (Sorolla et al. 2011).

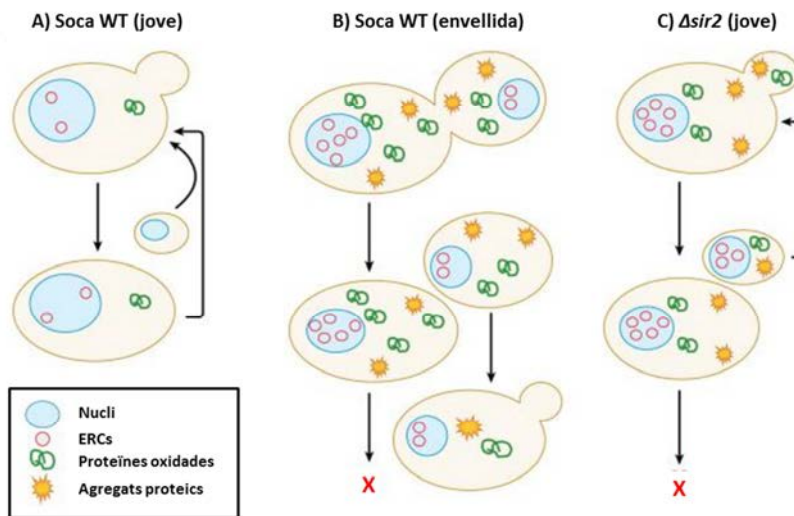


Figura 83. Segregació asimètrica mediada per Sir2 entre cèl·lula mare i cèl·lula filla. (A) Una cèl·lula jove d'una soca WT acumula relativament poc dany (ERCs, proteïnes oxidades i agregats proteïcs) i a més, presenta la capacitat de segregar-los asimètricament, acumulant-se a la cèl·lula mare. (B) En una soca WT envellida, el dany s'acumula en major quantitat, la cèl·lula filla presenta un tamany similar a la cèl·lula mare i hereta els factors d'envelliment, podent donar lloc a un envelliment prematur. (C) En cèl·lules $\Delta sir2$, tot i ser jove, s'acumulen nivells anormals de ERCs i agregats proteïcs. En aquest cas, el dany també es hereta per la cèl·lula filla, limitant així el RLS d'ambdues. Adaptat de (Steinkraus, Kaeberlein, and Kennedy 2008).

9.1.3. Els nivells de Sir2

Una altra característica de Sir2 és que els nivells de proteïna disminueixen amb l'edat (Dang et al. 2009), motiu pel qual es podria explicar perquè la seva sobreexpressió allarga la vida. Aquesta reducció en Sir2 es correlaciona amb el major augment dels nivells d'acetilació a H4K16 prop dels telòmers (Dang et al. 2009). La distribució de Sir2 entre els diferents loci als quals desenvolupa la seva funció també representa un fet important a l'hora de mantenir o millorar el RLS de les cèl·lules. De fet, s'ha demostrat que Rif1 participaria en mantenir els nivells de Sir2 necessaris al rDNA i evitaria que aquesta s'acumulés en altres loci com el d'aparellament (Salvi et al. 2013). La sumoïlació de Sir2 també contribuiria a la longevitat en llevat al mantenir la localització de Sir2 al rDNA (Ha and Huh 2011).

9.1.4. Sir2 i restricció calòrica

Des de fa temps s'ha descrit que la RC permet allargar la vida (tan replicativa com cronològica) en una gran varietat d'organismes, des de llevat fins a primats (Anderson and Weindruch 2012). Els beneficis de la restricció calòrica en l'increment de la vida es van atribuir inicialment a l'activació de Sir2 (mesurada a través del silenciament del marcador *MET15* integrat al rDNA), que tenia lloc a través de l'alteració del rati $NAD^+/NADH$ degut a l'increment de la respiració mitocondrial mediada per la RC (Lin et al. 2002). De fet, també se sap que defectes en el sistema llançadora malat-aspartat mitocondrial responsable de mantenir el balanç $NAD^+/NADH$ entre mitocòndria i citosol/nucli aboleixen l'extensió de la vida mediada per la RC, mentre que la seva sobreexpressió té la capacitat d'estendre-la i requereix de la presència de Sir2 (Easlon et al. 2008). No obstant, també es va observar que en soques sotmeses a restricció calòrica en les quals s'havia deletat tan Fob1 com Sir2 (la deleció de Fob1 suprimeix la menor vida replicativa i la major recombinació al rDNA que té lloc en una soca $\Delta sir2$, prevenint així la mort causada per la toxicitat deguda a l'acumulació de ERCs), hi havia un increment de la vida replicativa d'aquestes cèl·lules, demostrant doncs que l'extensió de la vida per RC no sempre requereix de Sir2 (Matt Kaerberlein et al. 2004) i

que per tant, Sir2 i RC podrien actuar en vies paral·leles modulant la vida replicativa. En aquest cas, també es va proposar que la sirtuïna Hst2 (homòloga de Sirt2 en humans) es podria re-localitzar al rDNA compensant l'absència de Sir2 en les cèl·lules *Δfob1Δsir2*, activant-se en condicions de restricció calòrica i estenent així la vida de les cèl·lules (Lamming et al. 2005). No obstant, es va proposar que tan Hst2 com Hst1 podien compensar la manca de Sir2 i allargar la vida en condicions de restricció calòrica, tot i que existeixen estudis en els que s'ha demostrat que el triple mutant *SIR2, HST1 i HST2* encara és capaç d'allargar la vida en resposta a RC sempre i quan els nivells de ERCs acumulats es mantinguin baixos a través de la deleció de Fob1 (Tsuchiya et al. 2006). Pel que fa a Hst3 i Hst4, la seva deleció dóna lloc a una reducció dràstica del RLS segurament degut a la prevenció de la inestabilitat genòmica a través de la desacetilació la histona H3K56 (Hachinohe, Hanaoka, and Masumoto 2011). L'afirmació que Sir2 es requereix per l'extensió del RLS es basa en l'assumpció que la RC activa Sir2, i tot i que alguns estudis ho han descrit (Reverter-Branchat et al. 2007)(Lu and Lin 2010), altres asseguren que la RC no augmenta el silenciament al rDNA (Riesen and Morgan 2009)(D. L. Smith et al. 2009) ni l'activitat de Sir2 mesurada a través del silenciament dels marcadors *ADE2* i *URA3* i integrats als telòmers (Matt Kaeberlein, Powers, et al. 2005)(Matt Kaeberlein, Hu, et al. 2005). Per tant, el paper de Sir2 en la regulació de l'envelliment a través de la RC, i de les sirtuïnes en general, és encara molt qüestionable, i calen més indicis per poder arribar a un consens sobre la relació entre RC i l'activació de Sir2 (Matt Kaeberlein 2010)(Valter D Longo et al. 2012).

9.1.5. Via TOR/Sch9 i via Ras-PKA

Més recentment, s'ha determinat que l'extensió de la vida a través de la RC podria ser mediada per la via TOR/Sch9 i la via Ras-PKA. Ambdues participen en la regulació del creixement de les cèl·lules, del metabolisme i la resistència a estrès en resposta a la presència de nutrients. No obstant, la RC indueix la reducció de la senyalització d'aquestes dues vies. De fet, mutacions que alteren la senyalització Ras-PKA o TOR/Sch9 són suficients per allargar la vida inclús en condicions d'alta disponibilitat de nutrients, i ho fan tan per un mecanisme independent (Matt Kaeberlein, Powers, et al.

2005) com dependent de Sir2 (i altres sirtuïnes)(Medvedik et al. 2007). La primera evidència de la participació de TOR en envelliment va sorgir d'un estudi que comptava amb 564 mutants diferents. En aquest es va observar que les cèl·lules delecionades per *TOR1* així com per altres gens de la via TOR, com *SCH9*, *URE2*, *ROM2*, *YBR238C*, *RPL31A* i *RPL6B*, presentaven una major vida replicativa (Matt Kaeberlein, Kirkland, et al. 2005).

De manera important, aquestes vies també s'han vist implicades en la modulació de l'envelliment en altres organismes eucariotes superiors com *C. elegans* (Vellai et al. 2003)(Jia, Chen, and Riddle 2004), mosques (Kapahi et al. 2004) i ratolins (Selman et al. 2009)(Lamming et al. 2012). A més, recentment, un estudi ha correlacionat la senyalització i expressió de mTOR amb la longevitat en humans (Passtoors et al. 2013), demostrant així la conservació dels efectes d'aquestes vies pel que fa a l'envelliment en els diferents organismes eucariotes, des de llevats fins a humans (Fontana, Partridge, and Longo 2010). La inhibició farmacològica de TOR amb rapamicina també ha demostrat incrementar el RLS en llevats (Medvedik et al. 2007), nematodes (Robida-Stubbs et al. 2012), mosques (Bjedov et al. 2010) i ratolins (Anisimov et al. 2011). Una menor senyalització per part de la via Ras-PKA i la via TOR/Sch9 també està relacionada amb altres respostes importants per l'envelliment replicatiu com és l'activació de factors transcripcionals de resposta a estrès com Gcn4 i Msn2/4, una major autofàgia o una alteració del metabolisme mitocondrial. A banda d'això, també s'ha descrit que una menor senyalització per TOR dona lloc a una recombinació disminuïda en el rDNA i menor formació de ERCs, suggerint que Sir2 i TOR convergeixen en vies similars rellevants a nivell d'envelliment. Concretament, es coneix que la inhibició del complex TORC1 per rapamicina dona lloc a majors nivells de Pnc1 que a la vegada elimina l'inhibidor de Sir2 NAM i indueixen l'associació de Sir2 al rDNA (Ha and Huh 2011). No obstant, *TORC1* actuaria activant altres sirtuïnes, donat que les soques $\Delta tor1$ i $\Delta sch9$ segueixen sent capaces d'estendre la vida inclús en absència de *SIR2* i *FOB1* (Matt Kaeberlein, Powers, et al. 2005), però no ho fan en un mutant $\Delta sir2 \Delta fob1 \Delta hst2$ (Medvedik et al. 2007). Per tant, la inhibició de la via TOR actuaria activant varies sirtuïnes, entre elles Sir2 i Hst2.

9.2. Envel·liment Cronològic

L'envelliment cronològic (*Chronological Life Span*, CLS) es defineix com el temps que una cèl·lula sobreviu i es manté viable en un estat de no divisió, és a dir, un cop arriba a fase estacionària. La supervivència o viabilitat cel·lular es descriu com la capacitat de formar una colònia. A nivell pràctic, el cultiu de cèl·lules es deixa créixer fins a fase post-diàuxica, que comença aproximadament després de 24 hores de la inoculació inicial i es caracteritza per ser el moment on ja s'ha esgotat la glucosa del medi, la divisió cel·lular s'ha reduït dràsticament i es produeix el canvi de la fermentació al metabolisme respiratori (Werner-Washburne et al. 1996). La fase estacionària s'inicia al final de la fase post-diàuxica, entre 2 i 7 dies depenent del medi de cultiu en el qual creixen les cèl·lules. Es caracteritza per baixes taxes metabòliques i un increment de les defenses antioxidants (que ja es comencen a induir en la fase diàuxica). Les cèl·lules es mantenen en aquest estat durant un temps variable, que pot anar d'uns quants dies fins a setmanes. Els factors que afecten la supervivència inclouen la temperatura, la disposició de nutrients, el pH, la concentració d'àcid acètic (Werner-Washburne et al. 1996)(Mirisola and Longo 2012) i el genotip. S'ha demostrat que les cèl·lules de llevat moren exhibint marcadors apoptòtics (Herker et al. 2004). Es creu que l'apoptosi suposaria un mecanisme adaptatiu que asseguraria la supervivència d'alguns dels membres de la població clonal, donat que les substàncies alliberades per les cèl·lules mortes serien una font de nutrients per la resta de cèl·lules de la població (Herker et al. 2004), fet que es correlacionaria amb la idea de l'existència d'un programa de mort altruista (Paola Fabrizio et al. 2004). Per una altra banda, moltes variacions genètiques en llevat s'han associat amb l'extensió de la vida cronològica i també s'han descrit en eucariotes superiors incloent mamífers. Així, l'estudi de l'envelliment cronològic en llevat permet modelitzar l'envelliment en cèl·lules que no es divideixen en eucariotes superiors, com les neurones (Denoth Lippuner, Julou, and Barral 2014).

Són molts els processos i les vies de senyalització que s'han establert implicades d'alguna forma amb el CLS, fet que ha limitat el desenvolupament d'un mecanisme consens en la regulació de l'envelliment. Sir2 sempre s'ha estudiat com un modulador potencial de l'envelliment, tan replicatiu com cronològic. No obstant, mentre que Sir2 presenta un paper anti-envelliment en el cas del RLS (apartat 9.1 de la Introducció), el

paper que desenvolupa en el CLS no està tan clar i les mateixes manipulacions genètiques que permeten estendre la vida replicativa, sembla que no afecten la vida cronològica o inclús l'escurcen, tenint en aquest cas Sir2 un paper pro-entrelliment.

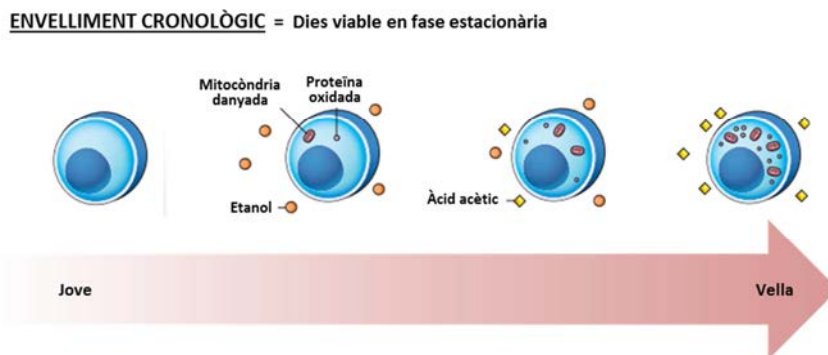


Figura 84. Entrelliment cronològic en *S. cerevisiae*. En l'entrelliment cronològic, l'etanol acumulat és convertit en àcid acètic, causant una resposta de tipus apoptòtica i mort cel·lular. També s'acumulen proteïnes oxidades i mitocondries danyades. Adaptat de (Matt Kaerberlein 2010).

De fet, s'ha demostrat que la deleció de *SIR2* comporta una allargament de la vida cronològica de les cèl·lules. No obstant, el CLS és susceptible a variacions tan de fons genètic de les soques com de les condicions del medi de cultiu. Així, s'ha determinat que la deleció de *SIR2* en soques víniques permet estendre la vida quan aquestes es fan créixer en condicions de laboratori, però l'efecte és contrari quan aquests mateixos mutants es fan créixer en les condicions de producció de vi (Orozco, Matallana, and Aranda 2012).

9.2.1. Sir2 i restricció calòrica

Contràriament al que succeeix amb el RLS, *SIR2* no es requereix per l'extensió del CLS en condicions de RC quan les cèl·lules envelleixen en el seu propi medi de cultiu (D. L. Smith et al. 2007). En canvi, quan aquestes es transfereixen a un medi d'aigua quan han entrat en fase estacionària, presenten una extensió del CLS, i la deleció de *SIR2* és capaç d'extendre'l encara més (Paola Fabrizio et al. 2005). Per tant, sembla que en aquest cas la RC actua en l'extensió del CLS per un mecanisme independent de Sir2. Les

baixes temperatures o l'alta osmolaritat tenen efectes additius a la RC pel que fa a l'extensió del CLS, suggerint que aquests tipus d'estrès i la RC actuen per vies separades. A més, l'efecte de la RC no és específic de la glucosa, donat que tan la RC de galactosa com de fructosa tenen la capacitat d'allargar la vida. De manera important, el creixement en fonts de carboni no fermentables que forcen als llevats a respirar té la capacitat d'allargar la vida i la seva restricció no n'aporta efectes beneficiosos addicionals, fet que demostra que l'elevada capacitat de respiració és un factor determinant en la longevitat cronològica (D. L. Smith et al. 2007). Per tant, Sir2 actuaria impedit o bloquejant l'extensió de la vida cronològica.

9.2.2. Sir2, acumulació d'etanol i d'àcid acètic

Sir2 actua bloquejant l'expressió de gens de resistència a estrès, gens d'esperulació o de resposta a la manca de nutrients i també impedeix l'activació d'Adh2, un enzim implicat en la depleció de l'etanol extracel·lular (Paola Fabrizio et al. 2005).

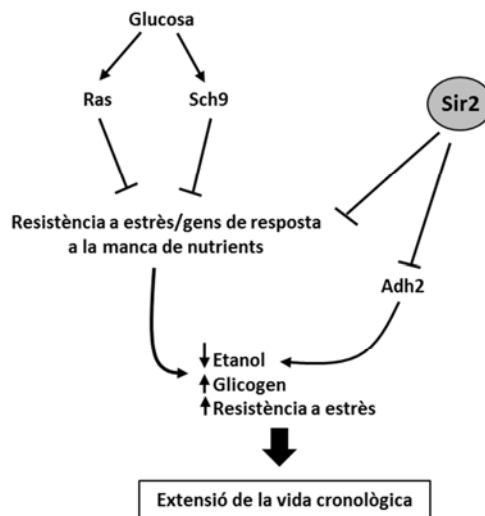


Figura 85. Model de regulació de la resistència a l'estrès i extensió de la vida cronològica Sir2 dependent. En llevats, la glucosa impedeix l'expressió de gens de resistència a estrès, inhibeix l'acumulació de glicogen i promou l'envelliment. Sir2, també inhibeix l'expressió de diversos gens de resistència a estrès, esporulació i enzims de reparació del DNA, l'activitat dels quals és essencial per promoure l'extensió de la longevitat. A més, Sir2 inhibeix l'activitat de Pck1 i d'Adh2, clau pel catabolisme de l'etanol, causant l'acumulació d'etanol i contribuint a una menor supervivència (Paola Fabrizio et al. 2005).

Es coneix que l'acumulació d'àcid acètic i d'etanol al medi pot tenir efectes negatius en el CLS i Sir2 actuaria disminuint el consum d'aquests dos substrats a través de la inhibició de Adh2 i la desacetilació i subseqüent inactivació de Pck1 (Casatta et al. 2013). Així, l'absència de *SIR2* influencia positivament la utilització de l'acetat a través d'una inducció de les vies del glioxilat i la gluconeogènesi (Casatta et al. 2013). Això implica menys tòxics extracel·lulars com l'etanol i l'àcid acètic i un increment dels factors intracel·lulars protectors com el glicogen i la trehalosa. D'aquesta forma, aquestes vies contribueixen a la supervivència i a l'increment de la resistència a l'estrès de les cèl·lules (Figura 85).

9.2.3. Via TOR/S6K i via Ras/AC/PKA

Es creu que hi ha dues vies principals en *S. cerevisiae* que participarien en l'envelliment cronològic (De Virgilio 2012) les quals sense la disponibilitat de nutrients i controlen la seva utilització: la via TOR/S6K i la via Ras/AC/PKA. Presenten gran similitud amb les vies de nematodes, mosques i mamífers. La via TOR/S6K (P Fabrizio et al. 2001) respon en presència d'aminoàcids i altres nutrients com glucosa, i la via Ras/AC/PKA (P Fabrizio et al. 2003) s'activa principalment per glucosa però també pot respondre a altres nutrients (Fontana, Partridge, and Longo 2010). Aquestes dues vies, encara que tenen efectes diferents, es sobreposen parcialment (Figura 86). Un dels modes d'acció és la seva convergència en el regulador de resistència a estrès, que inclou la cinasa Rim15 i els factors transcripcionals Msn2/4 i Gis1 (Cameroni et al. 2004)(Wei et al. 2008). A més de l'estrès, aquests factors també regulen el metabolisme, l'acumulació i la utilització de fonts de carboni intracel·lulars i extracel·lulars (Bonawitz et al. 2007)(Wei et al. 2008). L'activació de factors transcripcionals de resposta a l'estrès oxidatiu seria un dels mecanismes pels quals la menor activitat d'aquestes vies de senyalització allargarien el CLS en llevat. A més, la reducció de TOR provoca l'increment de la producció de ROS mitocondrial durant la fase de creixement exponencial; la producció d'aquestes ROS durant la fase de creixement de les cèl·lules seria suficient per promoure l'extensió de el CLS, fet que podria explicar-se per una resposta adaptativa a l'estrès mitocondrial (o mitohormesis), que es duria a terme per un mecanisme independent a Rim15 (Pan et

al. 2011). Així, els mutants $\Delta sch9$ i $\Delta ras2$ presenten una extensió del CLS (Paola Fabrizio et al. 2005). Una extensió similar del CLS es va observar quan el mutant $\Delta sir2$ es combinava amb el mutant $\Delta sch9$ o amb altres mutacions Ras/cAMP/PKA que redueixen la senyalització per nutrients (Paola Fabrizio et al. 2005). Donat que aquestes dues vies extenen el CLS a través de l'activació de gens de resposta a estrès (Wei et al. 2008), podria ser que Sir2 evités l'extensió completa de la vida cronològica a través de la repressió d'aquests mateixos gens. Aquest fet aniria amb relació a que un mutant presenta més resistència a l'estrès oxidatiu i a l'estrès tèrmic (Paola Fabrizio et al. 2005).

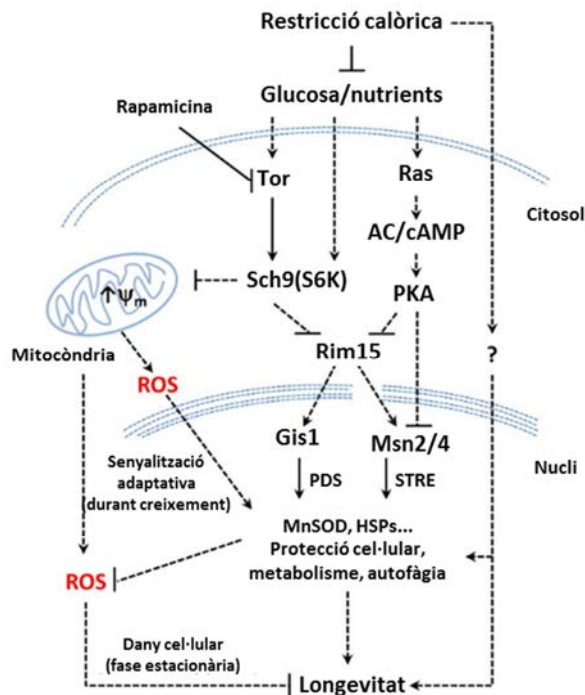


Figura 86. Vies principals de regulació de l'envelliment cronològic en *S. cerevisiae*. Les vies de resposta a nutrients Sch9, Tor i Ras convergeixen a la cinasa Rim15. La restricció calòrica dona lloc a la inhibició de les vies Ras/AC/PKA i Tor/Sch9 i la subsequent activació dels factors transcripcionals Msn2/4 i Gis1 controlats per Rim15. La inhibició de Tor/Sch9 incrementa la respiració mitocondrial i el potencial de membrana durant el creixement, donant lloc a una resposta adaptativa per ROS. Durant la fase estacionària, el senyal Tor i Sch9 reduït així com senyalització adaptativa per ROS disminueixen la producció de ROS, incrementen les respostes a estrès cel·lular i finalment, acaben allargant la vida de les cèl·lules (Valter D Longo et al. 2012).

La inhibició de TOR amb rapamicina també incrementa el CLS en llevat (Powers et al. 2006), i posteriorment es va demostrar el mateix efecte en ratolí (Harrison et al. 2009). També, igual que en llevat, la deleció de *SCH9* també és capaç d'allargar la vida en nematodes, mosques i ratolins (Matt Kaeberlein and Kapahi 2009).

9.2.4. Estrès oxidatiu

Mentre que en el RLS la formació de ERCs i la inestabilitat genòmica juga un paper essencial, en el cas del CLS és l'estrès oxidatiu. Són moltes les teories que intenten explicar la causa de l'envelliment cronològic, no obstant la teoria de dels radicals lliures segueix sent la que pren més força. Una característica de l'envelliment en la majoria de les cèl·lules és l'acumulació de dany oxidatiu, el qual acostuma a precedir la disfunció cel·lular, suggerint que aquest estrès podria tenir un paper essencial en aquesta disfunció (Beckman and Ames 1998). A més s'ha descrit que aquells organismes i tipus cel·lulars amb majors nivells d'antioxidants mantenen durant més temps la seva capacitat fermentativa (Gamero-Sandemetro, Gómez-Pastor, and Matallana 2013) i viuen major temps. Per posar alguns exemples, s'ha descrit que l'aconitasa, un enzim amb centres Fe-S i sensible al superòxid s'inactiva just abans de la fase de major mortalitat (P Fabrizio et al. 2001), mentre que l'acumulació de superòxid a la mitocòndria, dona lloc a una menor supervivència de les cèl·lules en fase estacionària (V D Longo et al. 1999). D'acord amb això, la sobreexpressió de les superòxid dismutases *SOD1* i *SOD2* és capaç d'allargar el CLS tan en llevats (P Fabrizio et al. 2003) com en *Drosophila* (Sun, Molitor, and Tower 2004). Totes aquestes evidències es veuen reforçades per la teoria de la resposta adaptativa a l'estrès mitocondrial (o mitohormesis), que es creu que seria el mecanisme d'acció de la via TOR/Sch9. Són molts els casos en els que s'ha observat que un lleuger augment en els nivells de ROS durant la fase exponencial de creixement de les cèl·lules té capacitat d'estendre la vida cronològica. Per exemple, el creixement inicial amb una font de carboni que indueix la respiració incrementa el CLS en llevat (Reverter-Branchat et al. 2004)(Piper, Harris, and MacLean 2006), també l'allarga la sobreexpressió del factor transcripcional Hap4 (el qual indueix la respiració mitocondrial durant la fase exponencial), la restricció calòrica

que també indueix la respiració (Lin et al. 2002)(Reverter-Branchat et al. 2004) o els nivells de ROS (Goldberg et al. 2009). Això és consistent amb un senyal mitocondrial adaptatiu (Mesquita et al. 2010). Estudis en *C. elegans* també han correlacionat petits increments de ROS mitocondrial durant el creixement i la disminució d'aquestes ROS durant etapes més avançades del creixement com un dels factors pro-longevitat (Schulz et al. 2007)(W. Yang and Hekimi 2010).

Sir2 també s'ha relacionat amb l'estrès oxidatiu en fase estacionària; així, participaria en l'activació del factor transcripcional Hsf1, el qual regula l'expressió de múltiples gens en resposta a diversos tipus d'estrès (Weindling and Bar-Nun 2015). Estudis més recents han publicat que el paper de Sir2 en la resistència a l'estrès oxidatiu i en l'envelliment cronològic depèn de la fase de creixement en la que es troben les cèl·lules. Així, en una soca $\Delta sir2$ i en fase exponencial, les cèl·lules són més resistents a l' H_2O_2 i presenten una vida mitjana cronològica més gran. Contràriament, quan les cèl·lules arriben en fase post-diàuxica i es fan créixer en aigua, les cèl·lules $\Delta sir2$ són menys resistents a H_2O_2 i tenen una vida mitjana cronològica més curta que una soca WT (Kang et al. 2014). Així, l'estat metabòlic és de vital importància en la determinació del paper de Sir2 com a protector o bé accelerant de l'envelliment cel·lular. Com ja s'ha comentat, altres estudis suggereixen que l'absència de *SIR2* podria evitar la repressió de gens de resposta a estrès (Wierman and Smith 2014), que juntament amb una menor senyalització de les vies TOR/S6K i Ras/AC/PKA podria comportar una extensió del CLS.

Resumint, es podria concloure que la regulació coordinada dels sistemes antioxidants degut a l'estrès (hormesis), la restricció calòrica i les mutacions en les vies de senyalització per nutrients promouen la longevitat. Els sistemes de reparació i les modificacions epigenètiques també tindrien un paper essencial en el dany cel·lular i la mortalitat dels organismes envellits.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

En llevat, Sir2 està implicada en múltiples processos importants per a la cèl·lula, com l'estabilitat genòmica, la resistència a l'estrès i l'envelliment. A més, el seu ortòleg en mamífers Sirt1, s'ha relacionat amb malalties com el càncer, la diabetis, les malalties neurodegeneratives, o l'envelliment. Per tant, entendre els mecanismes reguladors de Sir2 és de vital importància per desenvolupar estratègies que en permetin modular la seva activitat i així, fer front als processos patològics. Aquest treball tenia com a objectiu principal estudiar la possible regulació redox de Sir2, fins al moment desconeguda, i les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 com els seus possibles reductors fisiològics.

Objectius:

1. Anàlisi *in vitro* de l'activitat de Sir2 i de Grx3/4 com a possibles tiol-reductases.

- 1.1. Analitzar l'activitat desacetilasa de Sir2 *in vitro* en condicions d'estrès oxidatiu.
- 1.2. Determinar la possible modificació per glutatiolació de Sir2 i la capacitat de Grx3 i Grx4 de reduir Sir2 *in vitro*.

2. Estudi de la regulació redox de Sir2 i del paper de Grx3/4 *in vivo*.

- 2.1. Determinar l'estat redox de Sir2 en soques mutants per les glutaredoxines.
- 2.2. Analitzar la capacitat reductora de les glutaredoxines monotioliques Grx3/4.
- 2.3. Determinar la possible interacció entre Sir2 i Grx3/4.
- 2.4. Detectar la glutatiolació de Sir2 *in vivo*.
- 2.5. Determinar l'activitat de Sir2 *in vivo*.

3. Identificació de les cisteïnes essencials en la regulació de Sir2 i descripció del seu rol fisiològic.

- 3.1. Analitzar la implicació de les diferents cisteïnes en la regulació de Sir2.
- 3.2. Establir el fenotip de les soques mutants de les cisteïnes de Sir2, tan a nivell d'activitat com de resposta a estrès i envelliment.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. MICROORGANISMES, MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1. Soques

Les soques de *S. cerevisiae* utilitzades en aquest estudi van ser les següents:

Soca	Genotip	Descripció	Origen
CML128	MATa ura3-52 his4 leu2-3,112 trp1-1 can1R	Soca salvatge	(Gallego et al. 1997)
MML44	CML128 <i>grx2::LEU2</i>	Deleció de <i>GRX2</i> en CML235	(M T Rodríguez-Manzanaque et al. 1999)
MML405	CML128 <i>grx3::NatMX4</i>	Deleció de <i>GRX3</i> en CML128	(Pujol-Carrion et al. 2006)
MML406	CML128 <i>grx4::kanMX4</i>	Deleció de <i>GRX4</i> en CML128	(Pujol-Carrion et al. 2006)
MML19	CML128 <i>grx5::kanMX4</i>	Deleció de <i>GRX5</i> en CML235	(M T Rodríguez-Manzanaque et al. 1999)
MML449	CML128 <i>grx3::natMX4</i> <i>grx4::kanMX4</i>	Deleció de <i>GRX3</i> i <i>GRX4</i> en CML128	(Pujol-Carrion et al. 2006)
MML594	<i>tetO₇-GRX3-3HA</i>	Regulació de <i>GRX3</i> pel promotor tetO ₂	(Pujol-Carrion et al. 2006)
MML674	<i>tetO₇-GRX4-3HA</i>	Regulació de <i>GRX4</i> pel promotor tetO ₂	(Pujol-Carrion et al. 2006)
MML2045	W303 <i>trx1::natMX4</i> <i>trx2::kanMX4</i>	Deleció de <i>TRX1</i> i <i>TRX2</i> en W303	Dr. Enric Herrero
NVLL1	CML128 <i>SIR2-GFP::hphNT1</i>	Fusió de <i>GFP</i> a <i>SIR2</i> en CML128	Aquest treball
NVLL2	MML449 <i>SIR2-GFP::hphNT1</i>	Fusió de <i>GFP</i> a <i>SIR2</i> en MML449	Aquest treball
NVLL4	CML128 <i>sir2::natMX4</i>	Deleció de <i>SIR2</i> en CML128	Aquest treball
NVLL5	NVLL4 [pNVLL2(<i>SIR2-C363S</i>)]:: <i>LEU2</i>	Soca NVLL4 en la que s'insereix <i>SIR2-C363S</i> amb el plasmidi pNVLL2	Aquest treball
NVLL6	NVLL4 [pNVLL3(<i>SIR2-C469S</i>)]:: <i>LEU2</i>	Soca NVLL4 en la que s'insereix <i>SIR2-C469S</i> amb el plasmidi pNVLL3	Aquest treball
NVLL7	NVLL4 [pNVLL4(<i>SIR2</i>)	Soca NVLL4 en la que s'insereix	Aquest treball

	<i>C513S</i>]:: <i>LEU2</i>	<i>SIR2-C513S</i> amb el plasmidi pNVLL4	
NVLL26	CML128 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de CML128	Aquest treball
NVLL27	NVLL5 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de NVLL5	Aquest treball
NVLL28	NVLL6 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de NVLL6	Aquest treball
NVLL29	NVLL7 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de NVLL7	Aquest treball
NVLL30	NVLL4 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de NVLL4	Aquest treball
NVLL40	MML405 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de MML405	Aquest treball
NVLL36	MML406 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de MML406	Aquest treball
NVLL41	MML449 <i>RDN1-NTS1::mURA3</i>	Inserció del reporter <i>mURA3</i> a la regió <i>NTS1</i> de MML449	Aquest treball

1.1.2. Medis de cultiu i condicions de creixement

Els cultius de *S. cerevisiae* es van fer créixer en medi líquid YPD 2% glucosa si no s'indica el contrari, on llavors s'utilitzava medi sintètic SC, afegint els suplementes auxotròfics corresponents (Concentració final: leucina 0,03 mg/ml, histidina 0,02 mg/ml, uracil 0,02 mg/ml, triptòfan 0,04 mg/ml).

Les taules següents detallen la composició de cadascun dels medis utilitzats en aquest treball.

Medi YPD (2% glucosa)	
Glucosa	20 g/l
Extracte de llevat	10 g/l
Peptona	20 g/l

Medi SC (2% glucosa) Medi definit amb drop-out	
Glucosa	20 g/l
YNB (Yeast Nitrogen Base)	6,7 g/l
Drop-out	1,32 g/l

Els cultius es van fer créixer en un agitador orbital de calor sec amb una agitació de 180 rpm i una temperatura constant de 30°C. Per permetre l'oxigenació del cultiu era important mantenir fixa una relació de Volum cultiu/Volum recipient de 1:5.

1.1.3. Condicions d'estrès oxidatiu

En aquest estudi es van sotmetre les cèl·lules a diferents condicions d'estrès oxidatiu. Concretament, els agents utilitzats van ser el peròxid d'hidrogen (H₂O₂), la diamida i el DEM. La diamida (1,1'-azobis(N,N-dimetilformamida)) té la capacitat de penetrar a la cèl·lula i generar estrès oxidatiu al convertit el glutatió intracel·lular de la forma reduïda a la oxidada (Kosower and Kosower 1995). Indueix l'oxidació d'una gran quantitat de proteïnes (Pietro Ghezzi et al. 2002), reaccionant amb els grups tiols, donant lloc a complexos proteïna-S-diamida que després s'acaben combinant amb el GSH per produir disulfurs mixtes Proteïna-S-SG (Di Simplicio, Lupis, and Rossi 1996). El DEM es caracteritza per reaccionar directament amb el GSH i causar una depleció dels nivells de GSH intracel·lulars (Boylard and Chasseaud 1970). Pels assajos de desglutatiolació es va utilitzar la Di-Eosina-GSSG, un compost capaç de glutatiolar proteïnes i emetre fluorescència. Aquest reactiu va ser cedit pel Dr. Berndt i Hollmgren (Universitat Heinrich-Heine, Düsseldorf). En cas de que no s'indiqui el contrari, tots els compostos es preparaven amb aigua i es dissolien a la concentració d'interès. En cada cas s'indica les concentracions i els temps de tractament i si l'agent oxidant s'afegia al cultiu o directament a la placa.

1.2. *Escherichia coli*

1.2.1. Soques

Les soques d'*E. coli* utilitzades en aquest estudi van ser la DH5α per la majoria de casos, mentre que la BL21 va ser utilitzada per l'expressió de les proteïnes recombinants Grx3 i Grx4.

Soca	Genotip	Origen
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ,m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
BL21	F- <i>ompT hsdSB (rBmB-) gal dcm (DE3)</i>	Invitrogen

1.2.2. Medis de cultiu i condicions de creixement

Els cultius bacterians es van fer créixer a 37°C en medi LB (Luria-Bertani). Quan era necessari s'afegia al medi 0,05 mg/ml de l'antibiòtic ampicil·lina.

Medi LB	
Extracte de llevat	5 g/l
NaCl	10 g/l
Triptona	5 g/l

1.2.3. Plasmidis

Plasmidi	Origen	Descripció	Referència
pDM111a	pGEX-1B	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2, induïble amb IPTG	(J C Tanny et al. 1999)
pDM360	pGEX-4T-1	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-H364Y, induïble amb IPTG	(J C Tanny et al. 1999)
pNV363	pDM111a	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-C363S, induïble amb IPTG	Aquest treball
pNV372	pDM111a	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-C372S, induïble amb IPTG	Aquest treball
pNV464	pDM111a	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-C464S, induïble amb IPTG	Aquest treball
pNV469	pDM111a	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-C469S, induïble amb IPTG	Aquest treball
pNV513	pDM111a	Plasmidi d'expressió de GST-Sir2-C513S, induïble amb IPTG	Aquest treball
pET21a-Grx3	pET21a	Plasmidi d'expressió de Grx3 obtingut per la clonació de la ORF de <i>GRX3</i> (de Met36 a codó stop) a pET21a.	(H. Li et al. 2009)
pET21a-Grx4	pET21a	Plasmidi d'expressió de Grx4 obtingut per la clonació de la ORF de <i>GRX4</i> als llocs NdeI-EcoRI de pET21a.	(H. Li et al. 2009)
YIplac128		Plasmidi integratiu, marcador <i>LEU2</i>	(Gietz and Sugino 1988)
pNVLL1	YIplac128	Plasmidi obtingut de la clonació de la ORF, promotor i terminador de <i>SIR2</i> als llocs Sall-EcoRI de YIplac128, marcador <i>LEU2</i>	Aquest treball
pNVLL2	pNVLL1	Plasmidi contenint la mutació C363S en <i>SIR2</i> , marcador <i>LEU2</i>	Aquest treball
pNVLL3	pNVLL1	Plasmidi contenint la mutació C469S en <i>SIR2</i> , marcador <i>LEU2</i>	Aquest treball
pNVLL4	pNVLL1	Plasmidi contenint la mutació C513S en <i>SIR2</i> , marcador <i>LEU2</i>	Aquest treball
pYM25		Plasmidi integratiu per fusionar la yeGFP al C-terminal de la proteïna	(Janke et al. 2004)

		d'interès, marcador HygR	
pAG25		Conté el mòdul natMX4 per delecionar gens	(Goldstein and McCusker 1999)
pDM704	pRS305	Plasmidi per integrar el gen reporter <i>URA3</i> a la regió NTS1 del DNA ribosomal, marcador <i>LEU2</i>	(J. Huang and Moazed 2003a)

2. ESTUDIS FENOTÍPICS DEL CREIXEMENT

2.1. Anàlisi del creixement microbià en medi sòlid

Per dur a terme mesures de viabilitat cel·lular i analitzar els fenotips de creixement, els cultius d'interès es fan créixer exponencialment en medi líquid, aproximadament a $OD_{600}=0,5$. Posteriorment, es tracten amb l'agent oxidant d'interès, o quan s'indica, el tractament s'afegeix directament a la placa. Es duen a terme 4 dilucions del cultiu a analitzar, 1:5 o 1:10 segons l'experiment, en PBS estèril. Del cultiu inicial i de cada dilució es sembren 2 μ l a la placa d'interès i es deixen créixer a 30°C durant 48 hores.

2.2. Anàlisi del creixement microbià en medi líquid

Per analitzar els fenotips de creixement en medi líquid, els cultius d'interès exponencials es dilueixen fins a una $OD_{600}=0,1$ i es distribueixen en una placa de 24 pouets (*MultiwellTM*, Becton Dickinson Labware). En cada pouet el cultiu es pot sotmetre a diferents tractaments amb l'agent oxidant a analitzar.

Una vegada distribuïts els cultius i els tractaments, la placa s'incuba a la temperatura d'interès i en agitació constant a l'aparell *PowerWave XS* (BioTek Instruments). L'aparell mesura les dades de OD_{600} de cada un dels pouets amb periodicitat de 30 minuts al llarg d'un total de 30 hores aproximadament.

3. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.1. Extracció de DNA genòmic

Protocol:

1. Recollir 10 ml d'un cultiu exponencial crescut en YPD.
2. Centrifugar a 3.000 rpm durant 2 minuts.
3. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb 2 ml d'aigua i separar en dos tubs.
4. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm i eliminar el sobrenedant.
5. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb 200 µl de tampó TNST, 200 µl d'una solució Fenol:Cloroform:Alcohol isoamílic (25:24:1), i un volum similar de *glass beads*.

Tampó TNST	
Tritó X-100	2% (p/v)
SDS	1% (p/v)
NaCl	0,1 M
EDTA	1 mM
Tris-HCl pH=8	10 mM

6. Trencar les cèl·lules al vòrtex a màxima potència durant 3 minuts.
7. Afegir 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA) i barrejar per inversió.
8. Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.
9. Recuperar el sobrenedant sense fer contacte amb la interfase. Transferir el sobrenedant a un tub nou.
10. Afegir al sobrenedant 1 ml d'etanol al 100%. Barrejar suaument per inversió i centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm.
11. Retirar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 400 µl de TE i 3 µl de RNAsa (10 mg/ml).
12. Incubar a 37°C durant 5 minuts per tal d'eliminar el RNA present a la mostra.
13. Afegir 50 µl de NaOAc 3 M a pH=8 i 500 µl de Fenol/Cloroform i barrejar amb el vòrtex durant 1 minut.
14. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm, recollir el sobrenedant i transferir-lo a un tub nou.
15. Afegir 1 ml d'etanol al 100% i barrejar per inversió.
16. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm i descartar el sobrenedant.
17. Rentar dues vegades el pellet amb 1 ml d'etanol al 70%, retirant molt bé el sobrenedant.

18. Deixa assecar el pellet obtingut a RT durant uns minuts fins assegurar-se que no hi ha presència d'etanol.
19. Resuspendre el pellet amb 50 μ l d'aigua milli-Q barrejant bé.
20. Incubar 5 minuts a 65°C per facilitar la resuspensió del DNA i barrejar amb vòrtex.
21. Comprovar la integritat del DNA genòmic en un gel d'agarosa (apartat 3.4., Materials i mètodes). Carrega 1 μ l, 3 μ l i 5 μ l de mostra amb 3 μ l de tampó de carrega 5x i completar amb aigua milli-Q fins a un volum final de 15 μ l.
22. Quantifica el DNA purificat per espectrometria al NanoDrop ND-1000 a 260 nm.
23. Congelar a -20°C el DNA obtingut.

3.2. Purificació del DNA

En alguns casos es necessari dur a terme la purificació de vectors i productes de PCR per tal de poder procedir amb el següent pas del protocol. Pels productes de PCR el kit comercial emprat va ser "*High Pure PCR Product Purification Kit*" (Roche), mentre que pels vectors es va utilitzar el kit "*QIAquick Gel Extraction Kit*" (Qiagen), amb el qual calia córrer prèviament el vector d'interès en un gel d'agarosa. El protocol de purificació es va dur a terme, en els dos casos, seguint les instruccions del fabricant.

3.3. Amplificació per PCR

Durant aquest treball es van dur a terme diferents amplificacions del DNA, mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Per fer-ho es requereix conèixer almenys una part de la seqüència del fragment a amplificar i dissenyar un parell d'oligonucleòtids o primers que actuïn com a encebadors de la DNA polimerasa i que siguin complementaris a cada un dels extrems 3' de la regió a amplificar. Les condicions de la reacció dependran del tipus del DNA a amplificar, la seva mida i de les característiques dels primers dissenyats, però bàsicament una reacció consta d'aquestes etapes:

- i. **Desnaturalització**: Primerament cal assegurar la desnaturalització del DNA, normalment a 94°C, durant 30 segons - 2 minuts.

- ii. **Hibridació:** Es descendeix la temperatura per permetre la unió dels primers a la seva seqüència complementària del DNA motlle. La temperatura en aquest cas depèn de la seqüència i de la especificitat dels primers, paràmetre que ve donat per la seva T_m . S'estableix que la temperatura a utilitzar és: $T_m - 5^\circ\text{C}$. El temps pot oscil·lar entre 30 segons i 2 minuts.
- iii. **Extensió:** Es torna a augmentar la temperatura fins als 72°C per permetre a la DNA polimerasa començar el procés d'extensió de la cadena complementària a partir de l'extrem 3' dels primers i utilitzant el DNA aportat com a motlle per l'elongació. El temps d'extensió s'estableix segons la mida del DNA a amplificar (1 minut /kb de DNA).

Al final de cada cicle, la quantitat de DNA motlle pel següent cicle haurà augmentat el doble. Per tant, el número de cicles totals a realitzar dependrà en part de les especificacions de la polimerasa i de la quantitat de DNA final que es vol obtenir. En aquest treball, segons l'objectiu de la PCR, es van utilitzar diferents polimerases, ja que en alguns casos es prioritzava l'ús d'una polimerasa d'alta fidelitat. Les polimerases utilitzades en cada cas es detallen al seu apartat corresponent.

3.4. Electroforesi del DNA

L'electroforesi del DNA en gel d'agarosa és una tècnica molt utilitzada per separar, visualitzar i purificar molècules o fragments de molècules d'àcids nucleics. Segons l'objectiu final de l'electroforesi i de la mida del DNA a separar, el percentatge del gel d'agarosa a preparar també variarà. En aquest treball es van utilitzar percentatges d'agarosa que oscil·laven entre el 0,8% i el 1,2%. Degut als grups fosfats del DNA que li confereixen càrrega negativa, a l'aplicar un camp elèctric, les molècules de DNA migraran cap a l'ànode i ho faran segons la seva mida i forma. L'ús d'un marcador de mida coneguda permet calcular el pes molecular de les mostres de DNA a analitzar. Per tal de poder visualitzar aquestes molècules de DNA un cop separades al gel d'agarosa, s'utilitza un agent intercalant, com el SYBR[®] Safe que emet fluorescència quan és excitat amb llum ultraviolada.

Protocol:

1. Pesar l'agarosa necessària segons el % del gel a preparar.
2. Dissoldre amb tampó TAE i temperatura.

TAE	
Tris-HCl pH=8	20 mM
EDTA	1 mM
Àcid acètic	10 mM

3. Afegir el SYBR® Safe (*SYBR® Safe DNA Gel Stain*, Invitrogen).
4. Introduir-ho a la cubeta, afegir la tinta i esperar a que polimeritzi el gel.
5. Un cop polimeritzat, submergir la cubeta amb tampó TAE.
6. Carregar el marcador de pesos moleculars (*1 Kb DNA Ladder*, Bioron).
7. Carregar les mostres dissoltes 1:5 amb tampó de càrrega.

Tampó de càrrega	
Blau de bromofenol	0,25% (p/v)
EDTA	6 mM
Glicerol	30% (v/v)

8. Iniciar la cursa aplicant un voltatge constant de 100 V durant 1 hora.
9. Visualitzar el DNA en el gel utilitzant el *Gel Doc EZ Imager* de BioRad.

3.5. Digestió amb enzims de restricció

Un enzim de restricció és una endonucleasa que té la propietat de reconèixer una seqüència específica de nucleòtids dins d'una molècula de DNA i tallar-la en un punt concret anomenat lloc o diana de restricció. Els temps de digestió depèn de les especificacions de cada enzim, però normalment es realitzen digestions d'entre 1-3 hores a 37°C en un bany d'aigua, tot i que poden ajustar-se les condicions segons l'enzim i la naturalesa del DNA a digerir. Un vegada s'ha dut a terme la digestió es procedeix a la inactivació de l'enzim, normalment 20 minuts a 65°C. Finalment, es comprova l'eficiència de la digestió en un gel d'agarosa (apartat 3.4., Materials i mètodes).

Els enzims utilitzats en aquest treball van ser els següents:

Enzim de restricció	Diana de restricció	Casa comercial	DNA digerit
EcoRI	5'- G/AATTC -3'	Sigma	Ylplac128 Producte PCR
Sall	5'- G/TCGAC -3'	Sigma	Ylplac128 Producte PCR
AflII	5'- C/TTAAG -3'	Fermentas	Ylplac128
HindIII	5'- A/AGCTT -3'	Takara	pDM704
SmaI	5'- CCC/GGG -3'	Takara	pDM312

3.6. Lligació de fragments de DNA

En aquest treball es van dur a terme lligacions de fragments de DNA, concretament, en la construcció de les soques mutants dels residus de cisteïna en Sir2. L'objectiu era lligar un fragments de DNA (en el nostre cas, el gen de *SIR2*, amb el seu respectiu promotor i terminador) amb el vector Ylplac128. Tan vector com insert, havien estat prèviament digerits amb enzims de restricció (apartat 3.5., Materials i mètodes) de forma que es pogués produir "l'encaix" entre ambdós. Per tant, una vegada es disposava de l'insert i el vector digerits i purificats (apartat 3.2., Materials i mètodes), es va procedir amb la reacció de lligació. L'enzim utilitzat per dur a terme aquesta lligació va ser la T4 DNA lligasa (Roche). La lligació es va dur a terme a 14°C durant tota la nit, i amb una relació 6:1 d'insert:vector. És important incloure també una lligació control on es substitueix l'insert pel mateix volum d'aigua. Un cop finalitzada, es procedeix a comprovar en un gel d'agarosa si la lligació ha tingut lloc correctament. Finalment, es procedeix amb la transformació de cèl·lules competents d'*E. coli* (apartat 3.10.1., Materials i mètodes) amb el producte de la lligació. De les colònies resultants, es seleccionen alguns clons a l'atzar i es realitza una extracció ràpida del vector seguint el mètode de la *Jetprep* (apartat 3.9.2., Materials i mètodes). Mitjançant un gel d'agarosa, es selecciona un clon positiu (es detectarà mitjançant el seu increment en el seu pes respecte el vector no lligat, degut a l'incorporació de l'insert). En el nostre cas, d'un dels vectors positius es va dur a terme una PCR amb un oligonucleòtid dissenyat sobre el vector i un altre sobre la seqüència de Sir2, per estar segurs que realment la lligació s'havia produït correctament. Un cop comprovat, aquest vector es pot utilitzar

per posteriors aplicacions. En el nostre cas, aquest vector amb l'ínter incorporat es va utilitzar per la construcció de les soques mutants dels residus de cisteïnes de Sir2.

3.7. Amplificació i clonació de gens

En aquest treball es van construir soques mutants dels residus de cisteïnes de Sir2. Per fer-ho, calia clonar el promotor, gen i terminador de *SIR2* en un vector on posteriorment es realitzarien les mutacions d'interès.

Protocol:

1. Amplificar el gen d'interès, en aquest cas *SIR2*, juntament amb el seu promotor i terminador a partir del DNA genòmic de la soca d'interès de *S. cerevisiae*, mitjançant una PCR amb la DNA polimerasa *Platinum Pfx* (Invitrogen) d'alta fidelitat. Els oligonucleòtids per amplificar el gen han d'incloure, apart de la seqüència específica de *SIR2* (en negre a la taula), una seqüència que pugui ser reconeguda per un enzim de restricció que servirà després per clonar en el MCS del vector Ylplac128 (En vermell a la taula; Sall (*Forward*), EcoRI (*Reverse*). En blau, nucleòtids addicionals per facilitar la digestió per part dels enzims).

Disseny oligonucleòtids amplificació <i>SIR2</i>	
Forward 5' – 3'	TATGCTGTCGACAAGCCAAGAGTGTGCTGCT
Reverse 5' – 3'	TCCATCGAATCCCAACGCCTTCTAAATAGT

2. Preparar la mix per PCR seguint les especificacions de la polimerasa *Platinum Pfx*.
3. Iniciar el protocol d'amplificació per PCR amb els següents passos:

Desnaturalització: 94°C – 3 minuts	} 30 cicles
Desnaturalització: 94°C – 15 segons	
Hibridació: 55°C – 30 segons	
Extensió: 68°C – 3.5 minuts	
Extensió final: 68°C – 7 minuts	

4. Verificar l'amplificació en un gel d'agarosa de l'1%.
5. Purificar el producte de la PCR de la resta dels components de la reacció.
6. Digerir amb els enzims de restricció seleccionats (apartat 3.5., Materials i mètodes), tan en el MCS del vector Ylplac128 com de l'ínter (a partir de les dianes introduïdes amb el primer utilitzat per l'amplificació de *SIR2*). Els enzims

utilitzats van ser EcoRI i Sall i les digestions ens van fer primer amb Sall i després amb EcoRI durant 3 hores a 37°C.

7. Valorar la digestió en un gel d'agarosa del 0,8%, utilitzant un estàndard de DNA per determinar la mida de l'insert i el vector digerits comparat amb els controls sense digerir.
8. Realitzar la purificació tan del vector com de l'insert (apartat 3.2., Materials i mètodes).
9. Realitzar la lligació del vector i insert (apartat 3.6., Materials i mètodes).
10. Comprovar en un gel d'agarosa del 1% que la lligació entre vector i insert (producte de PCR) s'ha dut a terme correctament.
11. Transformar amb tot el producte de la lligació les cèl·lules competents DH5α (apartat 3.10.1., Materials i mètodes) i sembrar en plaques LB amb ampicil·lina, que es deixen créixer durant 24 hores a 37°C.
12. Un cop obtingudes les colònies, posar-les a créixer en medi líquid LB+ampicil·lina, i realitzar una extracció ràpida del vector seguint el mètode de la *Jetprep* (apartat 3.9.2., Materials i mètodes).
13. En un gel d'agarosa al 0,8%, comparar els pesos dels diferents vectors i seleccionar aquell que el seu pes coincideix amb el pes molecular teòric esperat de la lligació entre vector i insert. Per assegurar la lligació també es pot dur a terme una PCR.
14. Un cop seleccionat el clon correcte, seguir amb el protocol desitjat.

3.8. Construcció de mutacions puntuals

Per estudiar el paper de les cisteïnes en l'activitat *in vitro* de Sir2, es van construir diferents mutants puntuals de cada una de les cisteïnes d'interès. Es van generar els plasmidis pNV363, pNV372, pNV464, pNV469 i pNV513 a partir del plasmidi pDM111a per tal d'expressar les proteïnes recombinants C363S, C372S, C464S, C469S i C513S, respectivament. Per realitzar la mutagènesi dirigida es va utilitzar el kit *QuikChange Site-Directed mutagenesis kit* de Stratagene. Els passos seguits van ser els següents:

Protocol:

1. Purificar el plasmidi pDM111a a partir de les cèl·lules d'*E. coli* DH5α.
2. Dissenyar cada un dels primers *forward* i *reverse* per cada una de les mutacions a realitzar, seguint les instruccions del kit.

En el codó per l'aminoàcid a modificar (en vermell a la taula), es canvia el nucleòtid (subratllat a la taula), de forma que l'aminoàcid cisteïna canviï a serina. Tots els

oligonucleòtids es van dissenyar d'acord amb la seqüència al voltant del punt on es volia fer el canvi de nucleòtid, sense que resultés alterat el producte de la traducció ni la resta del marc de lectura. La taula següent mostra els oligonucleòtids utilitzats per mutar cada una de les cisteïnes d'interès.

Substitució aminoàcid	Canvi nucleòtid	Oligonucleòtids
C363S	T1087A	F: 5'-CAGATAAACTGGTGCAGAGCCATGGCTCTTTGCT-3' R: 5'-AGCAAAAGAGCCATGGCTCTGCACCAGTTTATCTG-3'
C372S	T1114A	F: 5'- TTTTGCTACTGCCACCAGCGTTACCTGCCATTG -3' R: 5'- CAATGGCAGGTAACGCTGGTGGCAGTAGCAAAA -3'
C464S	G1391C	F: 5'-AGAGCATTTCGCGAAGATATCTTAGAATCTGATTTGTTGATTGC-3' R: 5'-GCAAATCAACAAATCAGATTCTAAGATATCTTCGGAATGCTCT-3'
C469S	T1405A	F: 5'-CGAAGATATCTTAGAATGTGATTTGTTGATTAGCATTGGGACAAGTTT-3' R: 5'-AAACTTGCCCAATGCTAATCAACAAATCACATTCTAAGATATCTTCG-3'
C513S	G1538C	F: 5'-GATTTATCTCTTTTGGGGTACTCTGATGACATTGCAGCTATG-3' R: 5'-CATAGCTGCAATGTCATCAGAGTACCCCAAAAGAGATAAATC-3'

- Iniciar el protocol de PCR amb els primers dissenyats, seguint les instruccions del kit. Utilitzar la DNA polimerasa *PfuTurbo DNA polymerase*. De cada mutació a realitzar, utilitzar 2-3 concentracions de DNA *template*.

Desnaturalització: 95°C – 30 segons	} 12 cicles
Desnaturalització: 95°C – 30 segons	
Hibridació: 55°C – 1 minut	
Extensió: 68°C – 7 minuts	

- Realitzar una digestió durant 1 hora a 37°C amb l'endonucleasa DpnI (1 unitat), que reconeix específicament el DNA metilat, eliminant així el DNA *template* parental però no el de nova síntesi.
- Transformar les cèl·lules DH5α amb el producte de la PCR digerit amb DpnI
- Seleccionar alguns clons i per seqüenciació (apartat 3.12., Materials i mètodes) comprovar que realment la mutació s'ha introduït correctament i que la resta de la seqüència es manté intacta.
- Seleccionar un dels clons correctes i seguir amb el protocol d'interès.

3.9. Purificació del DNA plasmídic

Per la purificació del DNA plasmídic procedent de soques d'*E. coli* es van seguir dues metodologies segons el nombre de mostres i de l'ús pel qual anava dirigit el DNA plasmídic en qüestió. Ambdós mètodes es detallen a continuació:

3.9.1. Mètode de la "Miniprep"

Per extreure el DNA plasmídic bacterià es va utilitzar el *QiAprep SpinMiniprep Kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. La base d'aquest protocol consisteix en un primer pas de lisi alcalina de les cèl·lules bacterianes. Seguidament, s'absorbeix el DNA plasmídic en una membrana de sílice en presència d'elevades quantitats de sal. Finalment, es renta i es recupera el DNA eluint-lo de la membrana.

Protocol:

1. Posar a créixer en 10 ml del medi LB amb ampicil·lina 100 µg/ml, una colònia del cultiu d'*E. coli* contenint el plasmidi d'interès.
2. Deixar créixer durant tota la nit a 37°C.
3. Iniciar el protocol partint de 3 ml de cultiu d'*E. coli* ja crescut i seguir les recomanacions del fabricant.

3.9.2. Mètode de la "Jetprep"

Quan es disposava d'un gran nombre de cultius en els quals calia extreure el DNA plasmídic, es va seguir el mètode de la *Jetprep*.

Protocol:

1. Partir de 1.5 ml d'un cultiu crescut durant tota la nit a 37°C.
2. Centrifugar 1 minut a 13.000 rpm.
3. Descartar el sobrenedant deixant un petit volum, amb el qual es resuspen el pellet de cèl·lules.
4. Afegir 400 µl de la solució única (50 mM Tris-HCl pH=8, 50 mM EDTA). Extemporàniament, complementar-la amb 0,7 mg/ml de lizozima.
5. Agitar bé la barreja durant 1 minut.
6. Fer bullir els tubs durant 1 minut (la barreja agafarà un to blanquinós).

7. Centrifugar les mostres 10 minuts a 13.000 rpm i a temperatura ambient i eliminar l'agregat viscos que es forma.
8. Carregar les mostres d'interès en un gel d'agarosa per tal de seleccionar-les.
9. Amb les mostra/es seleccionades, seguir el protocol precipitant el DNA a temperatura ambient amb 2 volums d'etanol al 100%.
10. Centrifugar les mostres durant 10 minuts a 13.000 rpm a temperatura ambient.
11. Descartar el sobrenedant i deixar assecar el pellet fins que es torni incolor.
12. Resuspendre'l amb 30-75 µl d'aigua o TE suplementat amb 5 µg/ml d'RNAsa.

3.10. Transformació cel·lular

3.10.1. Transformació d'*E. coli*

Protocol:

1. Descongelar en gel 200 µl de cèl·lules competents DH5α.
2. Afegir entre 10-1000 ng del DNA a transformar.
3. Mantenir-ho durant 20 minuts en gel, per tal de que el DNA s'enganxi a la paret
4. Realitzar un xoc tèrmic a 42° durant 45 segons exactes per tal de desestructurar la paret i permetre l'entrada del DNA.
5. Posar ràpidament en gel durant 2 minuts.
6. Resuspendre les cèl·lules amb medi LB en un volum final de 1 ml.
7. Deixa recuperar les cèl·lules durant 1 hora a 37°C per permetre a les cèl·lules recuperar l'estructura de la paret i reorganitzar la maquinària replicativa.
8. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm.
9. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules amb uns 200 µl de medi LB.
10. Plaquejar entre 10-100 µl de cèl·lules en plaques de LB amb l'antibiòtic pel qual han incorporat la resistència, normalment ampicil·lina.
11. Deixar créixer la placa durant tota una nit a 37°C.

3.10.2. Transformació de *S. cerevisiae*

Protocol:

1. Recollir 6 ODs de cèl·lules d'un cultiu exponencial ($OD_{600} = 0,4 - 0,6$), centrifugant 3 minuts a 5.000 rpm. És important recollir cèl·lules amb el mateix fons genètic per fer el control transformant amb H₂O.

2. Rentar el pellet de cèl·lules amb 1 ml d'aigua mili-Q i es transferir-lo a un tub eppendorf estèril.
3. Centrifugar 2 minuts a 10.000rpm, descartar l'aigua i resuspendre les cèl·lules amb 1 ml de AcLi 0,1 M pH=7,5/TE.
4. Centrifugar i resuspendre el pellet suaument amb la barreja de transformació:

Barreja de transformació	
DNA producte PCR o DNA plasmídic	1 µg 100-200 ng
AcLi 1 M	5 µl
TE 10x	5 µl
ssDNA (esperma de salmó)	5 µl

5. Afegir 300 µl de PEG 40%/AcLi 0,1 M/TE i barrejar bé però suaument.
6. Incubar 30 minuts a 30°C en agitació suau.
7. Realitzar un shock tèrmic durant 15 minuts a 42°C.
8. Centrifugar les cèl·lules durant 90 segons a 5.000 rpm.
9. Resuspendre les cèl·lules amb 1 ml de YPD 2% glucosa.
10. Deixar recuperar les cèl·lules 4h a 30°C per tal de permetre que expressin la resistència que han adquirit durant la transformació i que permetrà la selecció selectiva de només aquelles cèl·lules que hagin incorporat el DNA.
11. Plaquejar les cèl·lules en les plaques YPD 2% glucosa contenint l'antibiòtic corresponent al DNA utilitzat a la transformació, o, en plaques de medi mínim en absència de l'auxotròfia que s'ha utilitzat en la transformació.
12. Incubar les plaques durant 2-3 dies a l'estufa a 30°C.

3.11. Construcció de soques

3.11.1. Construcció de mutants nuls

En aquest treball es van construir mutants nuls pel gen *SIR2* seguint el mètode de substitució per homologia de seqüències curtes flanquejades amb el mòdul *natMX4* (resistència a nourseotricina o clonNAT). Partint del plasmidi pAG25, aquest mòdul va ser amplificat mitjançant PCR amb els oligonuclèotids adequats per permetre la posterior recombinació homòloga, segons l'estratègia descrita per (Wach et al. 1994).

Protocol:

1. Purificar el plasmidi pAG25 de la soca d'*E. coli* en el qual es mantenia (apartat 3.10.1., Materials i mètodes) i quantificar la concentració i puresa obtinguda al NanoDrop ND-1000.
2. Dissenyar els oligonucleòtids per dur a terme la PCR, de forma que apart de la seqüència de Sir2 en la qual després de transformar tindrà lloc la recombinació, també incorporin una seqüència corresponent al mòdul *natMX4* (en blau a la taula) en la qual hibridaran durant la PCR i s'anirà amplificant.

Disseny oligonucleòtids <i>sir2::natMX4</i>	
Forward 5' – 3'	ATGACCATCCACATATGAAATACGCCGTATCAAAGACTAGCGAAAAT AA CGTACGCTGCAGGTCGAC
Reverse 5' – 3'	TTAGAGGGTTTTGGGATGTTTCATCTGATGTAACGACATACACGCCCTT AT CATCGATGAATTCGAGCTCG

3. Preparar la barreja de PCR amb 100 ng del plasmidi pAG25 prèviament purificat i els oligonucleòtids dissenyats, seguint el protocol establert per la polimerasa d'alta fidelitat *Expand High Fidelity PCR System* (#11732641001, Roche).

Desnaturalització: 95°C – 5 minuts	} 30 cicles
Desnaturalització: 94°C – 30 segons	
Hibridació: 55°C – 30 segons	
Extensió: 68°C – 4 minuts	
Extensió final: 68°C – 7 minuts	

4. Comprovar que l'amplificació del producte hagi tingut lloc correctament, carregant 1 µl del producte de PCR i en un gel d'agarosa del 0,8%.
5. Finalment, transformar les soques de llevat d'interès amb el producte de la PCR (apartat 3.10.2., Materials i mètodes), on per recombinació es substituirà el gen *SIR2* pel mòdul *natMX4*.
6. Comprovar que la deleció del gen s'ha realitzat correctament, seleccionant a l'atzar diferents clons que hagin crescut a la placa amb l'antibiòtic corresponent, analitzant per *colony PCR* (apartat 3.11.5, Materials i mètodes) i descartant la presència de proteïna mitjançant *Western Blot* (apartat 4.5., Materials i mètodes).

3.11.2. Construcció de soques amb mutacions puntuals

En aquest treball es van construir soques amb mutacions puntuals en els residus de cisteïna d'interès de la proteïna Sir2, seguint el protocol següent:

Protocol:

1. Partir de la seqüència intacta de *SIR2*. En aquest treball, a més de l'ORF, també es va agafar el promotor i el terminador del gen.
2. Purificar el DNA plasmídic YIplac128 de la soca d'*E. coli*.
3. Realitzar el clonatge del promotor, gen i terminador de *SIR2* al vector YIplac128 (apartat 3.7., Materials i mètodes).
4. Realitzar les mutacions d'interès als residus de cisteïna mitjançant el mètode "ExSite" (Weiner and Costa 1994). Els oligonucleòtids per l'amplificació per PCR i introducció de la mutació es dissenyen d'acord amb la seqüència al voltant del punt on es vol fer el canvi de nucleòtid, sense que resulti alterat el producte de la traducció ni la resta del marc de lectura. La taula següent mostra els oligonucleòtids utilitzats per mutar cada una de les cisteïnes d'interès (en vermell es marca el codó que canvia, sent el nucleòtid subratllat el que s'ha modificat).

Cisteïna mutada	Canvi de nucleòtid	Oligonucleòtids
Cys 363	T → A	F: 5' – <u>AGC</u> CATGGCTCTTTTGCTACTGCCACC – 3' R: 5' – CTGCACCAGTTTATCTGTGCTTATTCC – 3'
Cys 469	T → A	F: 5' – <u>AGC</u> ATTGGGACAAGTTTAAAAG – 3' R: 5' – AATCAACAAATCACATTCTAAGATATC – 3'
Cys 513	G → C	F: 5' – <u>TCT</u> GATGACATTGCAGCTATGGTAGCC – 3' R: 5' – GTACCCCAAAGAGATAAATCAAATTC – 3'

5. Iniciar el protocol de PCR amb els primers dissenyats. Utilitzar la DNA polimerasa *PfuTurbo DNA polymerase*. De cada mutació a realitzar, utilitzar 2 concentracions diferents de DNA *template*.

Desnaturalització: 95°C – 30 segons	} 12 cicles
Desnaturalització: 95°C – 30 segons	
Hibridació: 55°C – 1 minut	
Extensió: 68°C – 7,5 minuts	

6. Comprovar que l'amplificació s'hagi dut a terme correctament separant el producte de PCR en un gel d'agarosa del 0,8%.
7. Realitzar la purificació del producte de PCR amb el kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche (apartat 3.2., Materials i mètodes).
8. Lligar el producte de PCR amb la T4 DNA lligasa de Roche (apartat 3.6., Materials i mètodes).

9. Realitzar una digestió durant 1 hora a 37°C amb l'endonucleasa DpnI (1 unitat), que reconeix específicament el DNA metilat i eliminarà el DNA *template* parental però no el de nova síntesi.
10. Transformar les cèl·lules DH5α amb el producte de la PCR digerit amb DpnI.
11. Analitzar els clons obtinguts per seqüenciació (apartat 3.12., Materials i mètodes).
12. Seleccionar un dels clons correctes i seguir amb el protocol d'interès.

3.11.3. Construcció de soques amb marcatge GFP

Per dur a terme el marcatge de Sir2 amb GFP es va utilitzar el plasmidi pYM25. Aquest plasmidi confereix resistència a higromicina i a més, conté un motlle per dur a terme una PCR per fusionar una GFP modificada (gen de la GFP en la qual s'han introduït dues mutacions per incrementar la fluorescència) a l'extrem C-terminal de la proteïna d'interès (Janke et al. 2004).

Protocol:

1. Purificar el plasmidi pYM25 de la soca d'*E. coli* en el qual es manté i quantificar la concentració i puresa obtinguda al NanoDrop ND-1000.
2. Dissenyar els oligonucleòtids per dur a terme la PCR, de forma que a més de la seqüència de *SIR2* en la qual després de transformar tindrà lloc la recombinació, també incorporen una seqüència corresponent al *cassette* GFP (en blau a la taula) en la qual hibridaran durant la PCR i s'anirà amplificant.

Disseny oligonucleòtids Sir2-GFP
F: 5' – CGTGTATGTCGTTACATCAGATGAACATCCAAAACCCCTCGTACGCTGCAGGTCGAC – 3'
R: 5' – ATAATTGAAAGGAAAACAAAATTGTTTGCCATACTATGTACATCGATGAATTCGAGCTCG – 3'

3. Preparar la mix de PCR amb 100 ng del plasmidi pYM25 prèviament purificat i els oligonucleòtids dissenyats, seguint el protocol establert per la polimerasa d'alta fidelitat *Expand High Fidelity PCR System* (#11732641001, Roche). Seguir el següent protocol de PCR:

Desnaturalització: 95°C – 5 minuts	} 30 cicles
Desnaturalització: 94°C – 30 segons	
Hibridació: 52°C – 30 segons	
Extensió: 68°C – 4 minuts	
Extensió final: 68°C – 7 minuts	

4. Comprovar que l'amplificació del producte hagi tingut lloc correctament, carregant 1 µl del producte de PCR i separant-lo en un gel d'agarosa del 0,8%.
5. Transformar les soques de llevat d'interès amb el producte de la PCR, on per recombinació es fusionarà la proteïna GFP a l'extrem C-terminal de la proteïna seleccionada, en aquest cas, Sir2.

3.11.4. Construcció dels mutants *NTS1::mURA3*

Per analitzar l'activitat *in vivo* al DNA ribosomal es van construir soques que incorporessin el gen *URA3* a la regió silenciada *NTS1* que es troba al cromosoma XII codificant pel DNA ribosomal, utilitzant el plasmidi pDM704, cedit pel Dr. Danesh Moazed (J. Huang and Moazed 2003a).

Protocol:

1. Purificar el DNA plasmídic d'*E. coli* amb el mètode de la *Miniprep*.
2. Realitzar les digestions de pDM704 amb HindIII i pDM312 amb SmaI seguint les especificacions del fabricant (apartat 3.5., Materials i mètodes).
3. Transformar les soques de *S. cerevisiae* d'interès i posar a créixer amb la selecció corresponent.
4. Seleccionar els clons que creixen segons l'auxotrofia corresponent.

3.11.5. Anàlisi de clons per *colony PCR*

Per tal d'analitzar si una transformació ha anat bé o no, cal realitzar una comprovació per PCR. D'aquesta forma, detectarem clons positius si aquests han incorporat el fragment de DNA introduït durant la transformació. Per seguir aquesta estratègia cal dissenyar oligonucleòtids específics i utilitzar el DNA genòmic de cada clon. Aquesta tècnica *colony PCR* permet la utilització de cèl·lules senceres com a motlle per a la PCR.

Protocol:

1. Preparar una Mix de PCR com mostra la taula següent i reservar en gel. En aquest cas, els reactius utilitzats per la PCR són de Biotools #10.048.
2. Seleccionar clons aïllats a partir de la placa on han crescut els mutants de la transformació. Agafar una part de la colònia i repartir-la en dos tubs de PCR, mentre que una altra part de la mateixa colònia s'agafa per estriar en una placa.

3. Escalfar al microones els tubs de PCR que contenen les colònies a màxima potència durant 1 minut i ràpidament, posar els tubs en gel.
4. Afegir 25 μ l de la Mix de PCR a cada tub i barrejar amb la pipeta.

Mix (25 μ l volum final)	
Aigua milli-Q	18 μ l
Buffer 10x	2,5 μ l
dNTPs 10 mM	0,5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1,25 μ l
Primer Fw. 25 μ M	1,25 μ l
Primer Rv. 25 μ M	1,25 μ l
Taq Polimerasa (Biotools)	0,25 μ l

Del mateix clon es realitzen dues PCRs consecutives, una positiva i l'altra negativa (Figura 87). La diferència entre ambdues rau en els oligonucleòtids a utilitzar; el *Forward* a utilitzar és idèntic per les dues PCRs i generalment, reconeix una seqüència en el promotor del gen. En canvi, els oligonucleòtids *Reverse* són diferents en les dues PCRs. Un d'ells està dissenyat sobre la seqüència del gen a deleccionar, mentre que l'altre reconeix una seqüència del DNA exogen o *cassette*, que s'ha introduït durant la transformació i que es troba adjacent al promotor del gen que s'ha deleccionat.

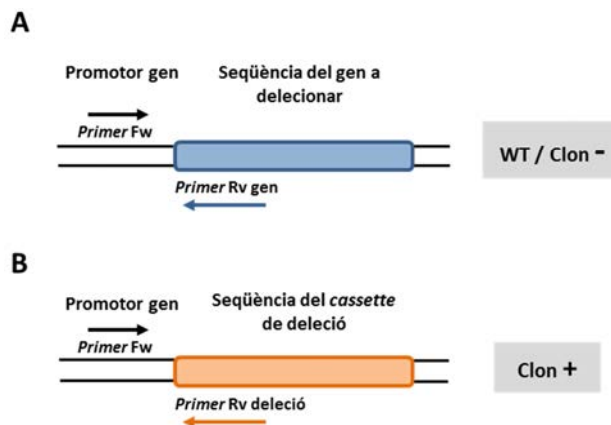


Figura 87. Disseny de la PCR per la comprovació de clons després de la transformació. (A) La PCR amb un *primer Fw* dissenyat sobre el promotor del gen i un *primer Rv* sobre el gen a deleccionar, només amplificarà en la soca WT control o en els clons negatius on la transformació no ha tingut lloc correctament. (B) La PCR amb el *primer Fw* dissenyat sobre el promotor del gen i un *primer* sobre la seqüència del *cassette* de delecció només amplificarà en aquells clons positius on sí que ha tingut lloc la delecció.

D'aquesta forma, un clon WT (o clon negatiu/fals positiu), donarà amplificació de la PCR negativa i no amplificarà la PCR positiva; mentre que un clon positiu (el que es considera que s'ha transformat correctament), serà el que no amplificarà la PCR negativa, però sí que es detectarà amplificació a la PCR positiva. El protocol de PCR que es segueix es el següent:

Desnaturalització: 95°C – 5 minuts	} 30 cicles
Desnaturalització: 94°C – 1 minut	
Hibridació: 55°C – 1,5 minuts	
Extensió: 72°C – 1 minuts	
Extensió final: 72°C – 7 minuts	

5. Analitzar els productes de PCR per electroforesi en un gel d'agarosa del 0,8% per tal de comprovar la presència o absència d'amplicó i la mida del mateix.

3.12. Anàlisi del DNA per seqüenciació

L'anàlisi de les seqüències de DNA mitjançant el protocol de seqüenciació es va dur a terme quan es volia determinar que la introducció de les mutacions puntuals s'hagués produït correctament. Per fer-ho cal dissenyar els oligonucleòtids adequats que hibridin en una part de la seqüència que es vol analitzar i obtenir el DNA, producte de PCR o plasmidi, de la forma més pura possible, evitant sals i utilitzant aigua milli-Q. En aquest treball la seqüenciació es va dur a terme per l'empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), utilitzant el mètode de Sanger.

3.13. Anàlisi de l'expressió gènica

3.13.1. Extracció de RNA

L'extracció de RNA total es va dur a terme utilitzant el kit comercial *RNeasy* Kit (#. 74104 Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar entre 1 i 3 ODs de cèl·lules crescudes exponencialment. El RNA total es va quantificar mitjançant el NanoDrop ND-1000 i es va verificar la seva integritat en un gel d'agarosa del 0,8% lliure de RNAses. La seva integritat s'accepta quan es poden distingir clarament cada una de les unitats ribosomals.

3.13.2. Obtenció del DNA còpia

Per tal d'analitzar l'expressió gènica cal dur a terme la síntesi del DNA complementari. Aquest s'obté a partir del RNA missatger a través de la reacció de transcripció reversa.

Protocol:

1. Partir d'1 µg de RNA de cada mostra.
2. Preparar dues MIX tal com es mostra en les taules següents:

Mix 1 (20 µl volum final reacció)	
dNTPs (Sigma) 10x	1 µl
Hexanucleòtids Mix (#1277081 Roche) 10x	2 µl
RNA	1 µg

3. Completar el volum de la reacció fins a 12 µl amb aigua milli-Q sense RNAses.
4. Iniciar la reacció al termociclador amb un primer pas a 65°C durant 5 minuts i a 4°C durant 15 minuts (Figura 88).

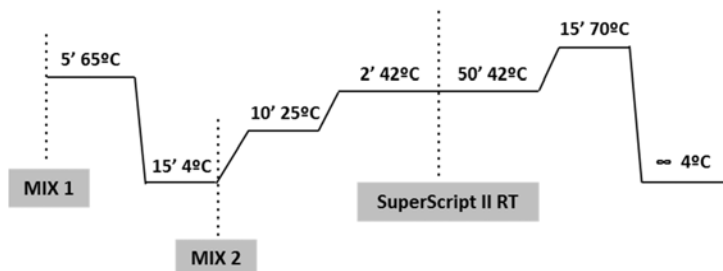


Figura 88. Esquema dels passos de la reacció de la transcripció reversa. La MIX 1, MIX 2 i la transcriptasa reversa *SuperScript II RT* es van afegint en el pas de la reacció que s'indica.

5. Agregar a cada tub 7 µl de la Mix2.

Mix 2 (20 µl volum final reacció)	
Buffer FS 5x	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
RNAse OUT	1 µl

6. Continuar la reacció amb un pas a 25°C durant 10 minuts (moment en el qual hibridaran els hexanucleòtids) i a 42°C durant 2 minuts.

7. Agregar 1 µl de l'enzim *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen).
8. Continuar la transcripció reversa amb uns últims passos a 42°C durant 50 minuts i finalment, 70°C durant 15 minuts per tal d'inactivar l'enzim.
9. El cDNA ja format queda a una concentració de 50 ng/µl ja que només es duu a terme una reacció. Aquest cDNA es pot conservar a -20°C o continuar l'anàlisi de l'expressió gènica per Real Time PCR.

3.13.3. Anàlisi de l'expressió gènica per *Real Time PCR*

Després de realitzar la reacció de la transcripció reversa per convertir el RNA a cDNA, es va procedir a l'anàlisi de l'expressió dels gens mitjançant *Real Time PCR* (RT-PCR). La tècnica RT-PCR permet l'anàlisi específica de l'expressió dels gens d'interès. Per fer-ho utilitza sondes específiques que inclouen dos primers i una sonda marcada amb un fluoròfor i un *quencher* per a cada cDNA a analitzar. Les sondes hibriden amb el cDNA de la mostra i la polimerasa amplifica el fragment limitat pels dos primers, alliberant el *quencher* i permetent així que el fluoròfor emeti llum quan és excitat. Les sondes que es van utilitzar en aquest assaig eren de *Taqman* (Applied Biosystems).

Gen	Nom	Amplicó	Referència
ACT1	Actina	86	Sc04120488_s1
SIR2	<i>Silent Information Regulator 2</i>	92	Sc04106437_s1
YFR057W	Proteïna de localització telomèrica	96	Sc04121532_s1

Es va dur a terme la reacció amb 50 ng de cDNA i utilitzant el kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (# 4304437 Applied Biosystems). Cada reacció es duia a terme per triplicat i en un volum final de 20 µl.

Protocol:

1. Preparar reaccions de 20 µl (3 repeticions per gen i mostra).
2. Afegir 1 µl del cDNA obtingut (apartat 3.13.2., Materials i mètodes). D'aquesta forma s'estarà partint de 50 ng de cDNA.
3. Afegir 8 µl d'aigua milli-Q i 10 µl de *Universal PCR MasterMix* (Applied Biosystems). Barreja suaument.
4. Preparar tubs per cada un dels gens a analitzar i per mostra.

5. Dividir la mix preparada anteriorment per cada mostra segons els gens a analitzar.
6. Afegir 3,5 µl de la sonda *Taqman* (Applied Biosystems).
7. Carregar la placa amb 20 µl de cada mostra (de cada mostra es fan 3 repeticions).
8. Utilitzar el film *Microseal® 'B' Adhesive Seals, Optical* (BioRad) per cobrir la placa.
9. Centrifugar la placa durant 1 minut.
10. Posar la placa al termociclador *CFX96 Real Time System* (BioRad).
11. Iniciar el programa de PCR de la següent manera:
 - a. Xoc tèrmic (hold) 95°C durant 3 minuts
 - b. 40 Cicles d'amplificació i detecció:
 - i. 95°C durant 10 segons (desnaturalització)
 - ii. 55°C durant 30 segons (hibridació i elongació)
12. Analitzar els resultats utilitzant el *software Bio-Rad CFX Manager version 3.1*.

4. MÈTODES D'ESTUDI DE PROTEÏNES

4.1. Obtenció d'extractes cel·lulars de *S. cerevisiae*

4.1.1. Extracció amb tampó de lisi

Per l'obtenció d'extractes cel·lulars de llevat es va realitzar el trencament de les cèl·lules mitjançant un procediment mecànic. Tot el protocol es va dur a terme en gel i utilitzant tamps freds per preservar la integritat de les proteïnes.

Protocol:

1. Créixer els cultius en medi líquid fins a la OD₆₀₀ d'interès.
2. Recollir les cèl·lules per centrifugació a 5.000 rpm durant 3 minuts a 4°C.
3. Descartar el sobrenedant i rentar el pellet de cèl·lules dues vegades amb PBS fred.

PBS	
Na ₂ HPO ₄	58 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	17 mM
NaCl	68 mM

4. Resuspendre les cèl·lules amb tampó de lisi. El volum de tampó de lisi a utilitzar es de 5 µl/OD recollida, tot i que pot variar depenent de com concentrat es vol obtenir l'extracte.

Tampó de lisi	
Imidazol	25 mM
EDTA pH=7	2 mM

5. Afegir els inhibidors de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail Set IV*, Millipore).
6. Afegir a cada mostra 3/4 parts de *glass beads* (Sigma).
7. Sotmetre les mostres a ruptura mecànica al *Rybolyzer*, durant 3 cicles de 45 segons cada un.
8. Recuperar l'extracte cel·lular i centrifugar a 4°C durant 15 minuts a 12.000 rpm.
9. Recuperar el sobrenedant i quantificar proteïna pel mètode de Bradford (apartat 4.3., Materials i mètodes).
10. Preparar les mostres a la concentració de proteïna d'interès.

4.1.2. Extracció amb TCA

Quan l'objectiu de l'estudi era analitzar l'estat redox de Sir2, l'obtenció dels extractes es va dur a terme amb àcid tricloroacètic (TCA) per tal de fixar l'estat redox de les proteïnes i que no es produïssin modificacions durant el protocol d'extracció.

Protocol:

1. Créixer els cultius en medi líquid fins a la OD₆₀₀ d'interès.
2. Afegir TCA al cultiu de forma que quedi al 20%.
3. Recollir les cèl·lules per centrifugació a 5.000 rpm durant 3 minuts a 4°C, i igualant molt bé el número de ODs recollits de cada cultiu (per analitzar l'estat redox es partia d'un total de 5 ODs).
4. Descartar el sobrenedant i rentar les cèl·lules dues vegades amb TCA al 12,5%.
5. Resuspendre les cèl·lules amb TCA al 12,5% i afegir 3/4 parts de *glass beads*.
6. Sotmetre les mostres a ruptura mecànica al *rybolyzer*, durant 3 cicles de 45 segons.
7. Recuperar l'extracte cel·lular i centrifugar durant 1 minut a 10.000 rpm.
8. Rentar el pellet dues vegades amb 100 µl d'acetona freda.
9. Resuspendre el pellet amb 100 µl tampó de resuspecció.

Tampó de resuspecció	
Tris-HCl pH=8	0,67 M
SDS	1% (p/v)
EDTA	1 mM

10. Resuspendre l'extracte durant 1 hora a 30°C en agitació de 800 rpm.
11. Posteriorment, les mostres poden ser preparades per córrer en un gel SDS-PAGE.

4.1.3. Extracció per calor i detergent

En alguns casos es va optar per extreure proteïna d'una forma alternativa més ràpida mitjançant la ruptura mecànica i detergent.

Protocol:

1. Fer créixer els cultius en medi líquid fins a la OD₆₀₀ d'interès.
2. Recollir les cèl·lules per centrifugació a 5.000 rpm durant 3 minuts a 4°C, i igualant molt bé el número de ODs recollits de cada cultiu.
3. Descartar el sobrenedant i rentar el pellet de cèl·lules dues vegades amb PBS fred.
4. Resuspendre les cèl·lules amb Tampó de lisi/Solució reductora/Solució solubilitzadora (2:1:1).

Tampó de lisi	
Imidazol	25 mM
EDTA pH=7	2 mM

Solució reductora	
Tris-HCl pH=6,8	0,5 M
EDTA	10 mM
SDS	5% (p/v)
β-mercaptoetanol	15% (p/v)

Solució solubilitzadora	
Sacarosa	20% (p/v)
Blau de bromofenol	0,05% (p/v)
Azida sòdica	0,1% (p/v)

5. Bullir les mostres a 95°C durant 3 minuts.
6. Afegir 3/4 parts de *glass beads* (Sigma) i agitar durant 1 minut utilitzat un vòrtex.
7. Tornar a bullir les mostres durant 3 minuts més a 95°C.
8. Centrifugar les mostres durant 2 minuts a 14.000 rpm.
9. Recuperar el sobrenedant, que seran els extractes proteics ja preparats per ser carregats en un gel SDS-PAGE.

4.2. Obtenció d'extractes cel·lulars d'*E. coli*

Per obtenir extractes d'*E. coli* (per exemple, quan es volia comprovar que la inducció de Sir2 amb IPTG havia tingut lloc correctament), es va procedir de la forma següent.

Protocol:

1. Recollir les ODs de cultiu necessàries i centrifugar 1 minut a 13.000 rpm.
2. Descartar el sobrenedant i rentar el pellet de cèl·lules dues vegades amb PBS fred.
3. Resuspendre les cèl·lules amb parts iguals de PBS i tampó de càrrega.
4. Agitar les mostres al vòrtex i fer bullir a 95°C durant 5 minuts.
5. Realitzar una centrifugació ràpida i sonicar 5 segons per disminuir la viscositat.
6. Centrifugar 2 minuts a 10.000 rpm.
7. Carregar les mostres en un gel SDS-PAGE.

4.3. Quantificació de la proteïna d'una mostra

En aquest treball es va utilitzar el mètode de Bradford. Es tracta d'un dels mètodes colorimètrics per a la determinació de la quantitat de proteïna d'una mostra (Bradford 1976), basat en la unió de les proteïnes al colorant *Blau de Coomassie* G-250 que canvia de color en funció de la concentració de proteïna. Aquesta unió provoca un increment en el màxim d'absorció del colorant de 465 a 595 nm. En aquest treball es va utilitzar el *BioRad Protein Assay* (BioRad), basat en aquest mètode. La recta patró es va realitzar amb albúmina sèrica bovina (BSA). El mètode de Bradford presenta la limitació que les mostres que contenen altes concentracions de detergent com el SDS presenten grans interferències. Per tant, en aquests casos no es podia dur a terme la quantificació de les mostres.

4.4. Tècniques electroforètiques

L'electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) és una de les tècniques més utilitzades per analitzar barreges de proteïnes. Aquests gels es formen per la polimerització de l'acrilamida per acció d'un agent entrecreuador, la bisacrilamida, en presència d'un iniciador i un catalitzador. Com a iniciador es sol utilitzar el TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) i com a catalitzador l'ió persulfat ($S_2O_8^{2-}$) que s'afegeix en forma de persulfat amònic. La porositat del gel la determinen les concentracions i les proporcions relatives de poliacrilamida i bisacrilamida. Així, la majoria de les proteïnes es separen bé dins d'un rang entre 5-12%. En aquest treball es van dur a terme

electroforesis desnaturalitzants o SDS-PAGE, tan en condicions reductores com no reductores i també, electroforesis en condicions natives o no desnaturalitzants.

4.4.1. Electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE)

L'electroforesi en condicions desnaturalitzants o SDS-PAGE utilitza la presència d'un detergent iònic, el dodecil sulfat sòdic (SDS) que es conjuga amb les proteïnes en una proporció fixa SDS/aminoàcid. D'aquesta forma les proteïnes adquireixen una càrrega neta negativa. Això permet la separació de les proteïnes segons el seu pes molecular en un sistema d'electroforesi discontinua (Laemmli 1970). En aquest treball es va utilitzar el sistema *Miniprotean II* (BioRad).

▪ Preparació dels gels SDS-PAGE:

Preparar el gel concentrador i el gel separador, seguint les taules següents i tenint en compte que segons el tipus de proteïna que es vol separar, el percentatge d'acrilamida del gel pot variar entre el 5% i el 12%, normalment.

	Gel concentrador	Gel separador
Tris-HCl pH=8,9	125 mM	375 mM
Acilamida/Bisacilamida (30:0,8)(p/p)	5% (v/v)	7-15% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
Persulfat amònic	0,005% (p/v)	0,005% (p/v)
TEMED	0,025% (v/v)	0,025% (v/v)

▪ Preparació de les mostres per SDS-PAGE:

Les mostres que es volen analitzar mitjançant electroforesi en condicions desnaturalitzats o SDS-PAGE cal prepara-les amb una solució que contingui un detergent iònic i una solució que li confereixi densitat i color per tal de facilitar la seva càrrega al gel.

Protocol:

1. Obtenir els extractes proteics totals seguint el protocol més adient segons l'objectiu (apartat 4.1., Materials i mètodes).

2. Addicionar 1/2 volum de solució reductora i 1/2 volum de solució solubilitzadora.

Solució reductora	
Tris-HCl pH=6,8	0,5 M
EDTA	10 mM
SDS	5% (p/v)
β -mercaptoetanol	15% (p/v)

Solució solubilitzadora	
Sacarosa	20% (p/v)
Blau de bromofenol	0,05% (p/v)
Azida sòdica	0,1% (p/v)

3. Bullir la mostra durant 3 minuts a 95°C.
4. Realitzar una centrifugada ràpida.
5. Carregar les mostres al gel.

▪ **Preparació de les mostres en condicions no reductores:**

En alguns casos interessa analitzar les mostres en condicions no reductores, per exemple, per la detecció de la glutatiliació. En aquests casos les mostres es preparen igual però no s'afegeix β -mercaptoetanol (o DTT) a la solució reductora i no es bullen les mostres. La resta del protocol és igual a la forma descrita anteriorment.

▪ **Condicions de la cursa:**

1. Carregar entre 5-20 μ g de proteïna per carril.
2. Omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi.

Tampó d'electroforesi	
Tris-HCl pH=8,8	50 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (p/v)

3. S'inicia la cursa a un amperatge constant de 15 mA/gel fins que el front de proteïna supera el gel separador, on es comença a incrementar l'amperatge a 25 mA/gel.

4.4.2. Electroforesi en condicions no desnaturalitzants

L'electroforesi en condicions no desnaturalitzants es va dur a terme quan interessava preservar la integritat dels complexos proteics o l'estructura de les proteïnes, per exemple en l'anàlisi d'activitats enzimàtiques, com el cas de l'activitat SOD en gel. En

aquests casos, l'electroforesi es duia a terme sense SDS i en condicions no reductores (sense β -mercaptoetanol ni DTT). Les proteïnes migren segons el seu pes molecular, forma i càrrega degut a que no s'afegeix cap detergent iònic a la mostra ni cap agent desnaturalitzant i/o reductor.

▪ **Preparació dels gels per l'electroforesi no desnaturalitzant:**

La preparació dels gels es duu a terme de la mateixa manera descrita a l'apartat anterior però sense afegir el SDS. La cursa es realitza a les mateixes condicions elèctriques que les descrites anteriorment, però a 4°C per evitar l'escalfament de les mostres i la seva conseqüent desnaturalització.

▪ **Preparació de les mostres per l'electroforesi no desnaturalitzant:**

Per evitar la desnaturalització de les proteïnes, l'extracte proteic s'obté sense SDS ni agents reductors, només s'incorpora la sacarosa (5%) i el blau de bromofenol (0,0125%).

▪ **Condicions de la cursa:**

1. Carregar entre 5-20 μ g de proteïna per carril.
2. Omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi (sense SDS).

Tampó d'electroforesi	
Tris-HCl pH=8,8	50 mM
Glicina	192 mM

3. Iniciar la cursa a un amperatge constant de 15 mA/gel fins que el front de proteïna supera el gel separador, on es comença a incrementar l'amperatge a 25 mA/gel.

4.5. Immunodetecció de proteïnes o *Western Blot*

La immunodetecció, coneguda com a *Western Blot*, és una tècnica que permet la detecció de proteïnes específiques aprofitant la capacitat dels anticossos d'unir-se als seus antígens. Un cop es disposa de les proteïnes separades en un gel mitjançant

electroforesis, aquestes poden ser transferides a una membrana a partir de l'aplicació d'un camp elèctric i ser detectades amb anticossos específics.

▪ **Transferència de les proteïnes del gel a la membrana:**

En aquest treball es van utilitzar membranes de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) amb un porus de 0,45 μm (*Millipore*) per la detecció de la majoria de les proteïnes, o membranes també de PVDF però d'un porus de 0,2 μm quan les proteïnes a detectar eren de baix pes molecular. Es van utilitzar sistemes semisecs: *Hoeffer Semiphor* (GE Healthcare) i *ECL semidry* (Amersham Biosciences).

Protocol:

1. Submergir la membrana de PVDF en metanol durant 1 minut per hidratar-la, ja que es tracta d'una membrana hidrofòbica.
2. Eliminar el metanol i deixar incubant la membrana amb tampó de transferència durant un mínim de 15 minuts.

Tampó de transferència	
Tris-HCl	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375% (p/v)
Metanol	10% (v/v)

3. Submergir dos papers de filtre (papers Whatman) en tampó de transferència.
4. Un cop finalitzada l'electroforesi, incubar el gel durant 1-2 minuts amb tampó de transferència.
5. Realitzar el muntatge del sandvitx seguint l'ordre:
(+) ànode–paper Whatman–membrana–gel–paper Whatman–càtode (-)
6. Condicions elèctriques: 1 mA/cm² de membrana i generalment, durant 1 hora, tot i que quan es vol realitzar la detecció de proteïnes d'alt pes molecular (>100 kDa) es pot incrementar el temps de transferència.

▪ **Bloqueig de la membrana:**

1. Un cop s'han transferit les proteïnes del gel a la membrana, cal dur a terme el bloqueig d'aquesta per evitar unions inespecífiques anticòs-membrana.
2. Per fer-ho s'utilitza la solució proteica comercial *I-block* (Tropix). Aquesta solució s'utilitza diluïda al 0,3 % en PBS i s'afegeix 0,1% Tween-20.

Solució de bloqueig	
I-block	0,3% (p/v)
Tween-20	0,1% (v/v)

3. Es dur a terme el bloqueig durant almenys 1 hora a temperatura ambient.

▪ **Immunodetecció:**

1. Un cop bloquejada, incubar la membrana amb l'anticòs primari corresponent a la dilució d'interès amb tampó 95% TBS-T(v/v)/5% solució de bloqueig (v/v).

TBS-T	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	125 mM
Tween-20	0,1% (v/v)

2. Realitzar la incubació amb l'anticòs. El temps dependrà de cada anticòs, tot i que normalment es realitzen incubacions de 1 hora a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. La taula següent detalla els anticossos primaris utilitzats en aquest treball.

Anticòs primari	Dilució	Origen	Referència
Anti-Sir2	1/2.000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6666
Anti-Grx3/Grx4	1/1.000	Dr. Lill	-
Anti-HA	1/2.000	Roche	1867423
Anti-GFP	1/5.000	Clontech	632381
Anti-GSH	1/1.000	Abcam	ab19534

3. Realitzar 3 rentats de 10 minuts amb tampó 95% TBS-T (v/v)/5% solució de bloqueig (v/v).

4. Incubar amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa de rave diluït amb tampó 95% TBS-T (v/v)/5% solució de bloqueig (v/v).

Anticòs secundari	Dilució	Origen	Referència
HRP-IgG mouse	1/40.000	Pierce	31430
HRP-IgG rabbit	1/40.000	Pierce	31460
HRP-IgG goat	1/25.000	Thermo Scientific	A-10549
HRP-IgG rat	1/4.000	Molecular Probes	A-10549

5. Fer 5 rentats de 5 minuts amb TBS-T.
6. Incubar la membrana amb el substrat de la peroxidasa *Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore).
7. Adquirir la imatge utilitzant la càmera CCD de *ChemIDoc XRS* (BioRad) en posició de quimioluminiscència.
8. Analitzar i quantificar les imatges amb el programa *Image Lab 4.0.1* de BioRad.

4.6. Tinció de proteïnes

Un cop les proteïnes s'han separat en un gel de poliacrilamida o s'han transferit a una membrana de PVDF, poden ser detectades amb diferents mètodes. En aquest treball es va utilitzar la tinció amb *Blau de Coomassie*. Aquest tipus de tinció es va utilitzar tan per la tinció de gels de poliacrilamida com de membranes de PVDF on la quantitat de proteïna era prou elevada. Aquest mètode de tinció té una sensibilitat de 0,2 a 0,6 µg de proteïna (Fairbanks, Steck, and Wallach 1971).

Protocol:

1. Tenyir el gel o membrana durant un mínim de 30 minuts amb una cubeta contenint la solució de tinció.
2. Passat el temps de tinció, procedir amb la decoloració del gel o de la membrana amb la solució de decoloració. Un cop destenyit, adquirir la imatge al Densitòmetre GS800 (BioRad).

La composició de la solució de tinció i de decoloració es mostra a les taules següents. Cal destacar que la composició de les solucions pels gels i membranes és la mateixa, excepte que pels gels conté isopropanol que és el que reacciona amb el SDS per tal de permetre que el colorant s'uneixi a les proteïnes, mentre que la solució per les membranes conté metanol per tal d'assegurar que les proteïnes es quedin adherides a la membrana.

Solució de tinció - Membranes	
Àcid acètic	10% (v/v)
Blau brillant de Coomassie R-250	0,1% (p/v)
Metanol	50% (v/v)

Solució decoloració - Membranes	
Àcid acètic	10% (v/v)
Metanol	50% (v/v)

Solució de tinció - Gels	
Àcid acètic	10% (v/v)
Blau brillant de Coomassie R-250	0,1% (p/v)
Isopropanol	25% (v/v)

Solució de decoloració - Gels	
Àcid acètic	10% (v/v)
Isopropanol	10% (v/v)

4.7. Coimmunoprecipitació

La immunoprecipitació (IP) és una tècnica basada en la precipitació d'una proteïna fent ús d'un anticòs específic que la reconeixerà. Quan en un extracte cel·lular s'afegeix l'anticòs que reconeix la proteïna diana que es vol immunoprecipitar, es formarà un complex anticòs-antigen, que podrà ser recuperat de la resta de proteïnes mitjançant un suport sòlid, com l'agarosa, en el qual s'ha immobilitzat prèviament, la proteïna A o proteïna G. Aquestes proteïnes A o G presenten la característica de reconèixer i unir-se als anticòs, concretament a les IgG, interactuant amb la cadena pesada d'aquestes. Per tant, el complex proteïna-anticòs-proteïna A-agarosa podrà ser retintut en un suport sòlid, en el qual es realitzaran rentats per eliminar la resta de proteïnes presents a l'extracte cel·lular o les proteïnes presents degut a les unions inespecífiques. Finalment, els diferents components del complex podran ser separats entre ells i eluïts de l'agarosa, i ser analitzats mitjançant SDS-PAGE, seguit normalment d'un *Western Blot* per tal de verificar la identitat de l'antigen.

La coimmunoprecipitació (CoIP) és una tècnica utilitzada freqüentment en l'estudi d'interaccions entre proteïnes. Es realitza de la mateixa manera que una IP però aprofita el fet que la proteïna precipitada per l'anticòs també coimmunoprecipita amb altres proteïnes que estaven interaccionant amb ella. Per tant, es pot assumir, que les dues proteïnes estan interaccionant *in vivo*. En aquest treball es van dur a terme tres tipus de coimmunoprecipitacions; CoIP directa i CoIP amb paraformaldehid i una CoIP on es van canviar algunes condicions per tal de poder detectar la glutatiolació de Sir2.

4.7.1. Coimmunoprecipitació directa

Protocol:

1. Fer créixer 100 ml de cultiu fins a fase exponencial ($OD_{600}=0,5-0,6$).
2. Recollir les cèl·lules centrifugant a 5.000 rpm durant 2 minuts. A partir d'aquest moment, realitzar tot el protocol en fred.
3. Rentar el pellet 2 vegades amb TBS (20 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl).
4. Centrifugar a 4.600 rpm durant 2 minuts.
5. Recollir les cèl·lules amb 1 ml de TBS.
6. Guardar el pellet sec congelat a -20°C o seguir amb el protocol.
7. Resuspendre les cèl·lules amb 1 ml de tampó de lisi.

Tampó de lisi	
Hepes-KOH pH=7,5	50 mM
NaCl	140 mM
EDTA	1 mM
Tritó X-100	1% (p/v)
Deoxicolat-Na	0,1% (p/v)
Inhibidors de proteases	1x

8. Afegir *glass beads* i trencar les cèl·lules al *ribolyzer*, 4 vegades durant 45 segons.
9. Recuperar l'extracte cel·lular.
10. Realitzar dues sonicacions durant 15 segons.
11. Centrifugar 10 minuts a 4°C i 12.000 rpm i recuperar el sobrenedant.
12. Quantificar la proteïna pel mètode de Bradford.
13. Agafar 4 mg de proteïna i diluir-los amb tampó de lisi fins a 1 ml.
14. Afegir 50 μl de l'anticòs α -Sir2 i incubar a 4°C durant 2 hores a la nòria.
15. Afegir 50 μl de proteïna G-agarosa (Roche Applied Science) durant 2h a 4°C a la nòria.
16. Carregar tot el volum d'immunoprecipitat a les columnes de centrifugació *spin columns* (Pierce #69705).
17. Centrifugar a 2.000 rpm durant 45 segons.
18. Realitzar 6 rentats amb tampó de lisi.
19. Eluir les proteïnes de la matriu d'agarosa, afegint 40 μl del tampó d'elució (prèviament escalfat a 65°C).

Tampó d'elució	
Tris-HCl pH=8	50 mM
EDTA	10 mM
β -mercaptoetanol	5% (v/v)
SDS	4,7% (p/v)

20. Incubar durant 10 minuts a 65°C al *thermomixer* (sense agitació).
21. Recollir l'eluït per centrifugació a 2.000 rpm durant 45 segons.
22. Recuperar l'eluït, afegir la solució solubilitzadora i carregar en un gel SDS-PAGE.

4.7.2. Coimmunoprecipitació amb paraformaldehid

En el cas de la immunoprecipitació amb paraformaldehid es procedeix de la mateixa manera que amb la CoIP directa però amb unes variacions a l'inici i al final del protocol.

Protocol:

1. Fer créixer els cultius exponencialment i tractar-los amb un 1% de paraformaldehid (pFA) durant 20 minuts a temperatura ambient, agitant manualment cada 5 minuts. D'aquesta forma s'aconsegueix que el pFA penetri a les cèl·lules i generi entrecreuaments entre proteïnes que es troben a una distància molt propera entre elles.
2. Aturar el procés de fixació afegint 125 mM glicina durant 5 minuts a temperatura ambient.
3. Recollir les cèl·lules centrifugant a 5.000 rpm durant 2 minuts i seguir el mateix protocol descrit per la CoIP directa (veure apartat 4.7.1 de Materials i Mètodes).
4. Una vegada recuperat l'eluït i preparat per SDS-PAGE, bullir durant 20 minuts a 95°C amb l'objectiu de revertir les interaccions produïdes a causa del tractament amb pFA.

4.7.3. Coimmunoprecipitació per la detecció de glutatiolació

Protocol:

1. Recollir 100 ml de cultiu crescut a una $OD_{600}=0,7$ aproximadament.
2. Recollir les cèl·lules centrifugant a 5.000 rpm durant 2 minuts.
3. Rentar el pellet de cèl·lules: 2 vegades amb TBS per les cèl·lules no tractades i 4 vegades per les cèl·lules que han estat tractades amb un agent oxidant.
4. Guardar el pellet sec congelat a -20°C o seguir amb el protocol.

5. Resuspendre les cèl·lules amb 1 ml de tampó de lisi contenint 50 mM NEM per tal que tots els grups tiols quedin bloquejats i així, assegurar-se que la glutatiolació detectada és deguda a la modificació *in vivo* i no durant el protocol de la IP.

Tampó de lisi	
Hepes-KOH pH=7,5	50 mM
NaCl	140 mM
EDTA	1 mM
Tritó X-100	1% (p/v)
Deoxicolat-Na	0,1% (p/v)
NEM	50 mM
Inhibidors de proteases	1x

6. Afegir *glass beads* i trencar les cèl·lules al *ribolyzer*, 4 vegades durant 45 segons.
7. Punxar el tub i recuperar l'extracte, centrifugant 1 minut a 2.500 rpm.
8. Realitzar una sonicació durant 15 segons, dues vegades en gel.
9. Centrifugar 10 minuts a 4°C i 12.000 rpm i recollir el sobrenedant obtingut.
10. Mesurar la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford.
11. Agafar 4 mg i diluir amb tampó de lisi fins a 1 ml.
12. Afegir 50 µl de l'anticòs α-Sir2 i incubar a 4°C durant 1 hora a la nòria.
13. Afegir 50 µl de proteïna G-agarosa (Roche Applied Science; Ref. 117.194.160.01) durant 1h a 4°C a la nòria.
14. Carregar tot el volum d'immunoprecipitat a les columnes de centrifugació *spin columns* (Pierce #69705).
15. Centrifugar a 2.000 rpm durant 45 segons.
16. Realitzar 4 rentats amb tampó de lisi (els 2 primers rentats amb tampó de lisi contenint 50 mM NEM, i els dos darrers amb tampó de lisi sense NEM).
17. Eluir les proteïnes de la matriu d'agarosa, afegint 40 µl del tampó d'elució (sense cap agent reductor per evitar la pèrdua del GSH).

Tampó d'elució	
Tris-HCl pH=8	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	4,7% (p/v)

18. Incubar durant 30 minuts a 30°C al *thermomixer* (sense agitació).
19. Recollir l'eluí per centrifugació a 2.000 rpm durant 45 segons.

20. Recuperar tot l'eluit i afegir la solució solubilitzadora per ser carregat en un gel SDS-PAGE.

4.8. Anàlisi de l'estat redox de proteïnes

En el present treball es van dur a terme aproximacions per analitzar l'estat redox de Sir2. Per fer-ho es va utilitzar dos compostos (Figura 89): el compost AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt) i el compost MeO-PEG-Mal (Methoxypolyethylene glycol maleimide).

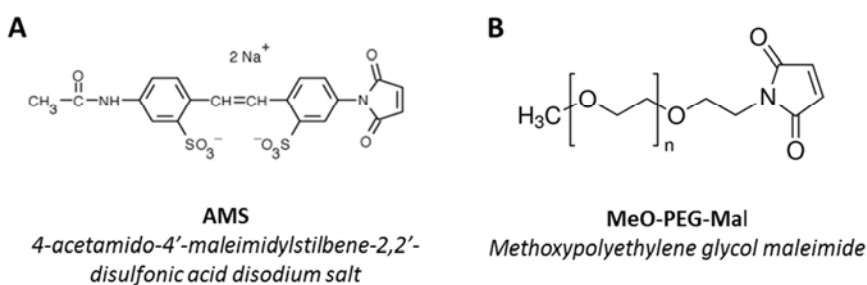


Figura 89. Compostos utilitzats per determinar l'estat redox de les proteïnes. (A) L'AMS es caracteritza per ser una maleimida (s'uneix als grups tiols) i presenta un pes molecular de 536,44 Da. (B) El PEG també és una maleimida però presenta un pes molecular de 5 kDa.

Ambdós compostos es caracteritzen per ser maleïmides, és a dir, tenen la capacitat de reaccionar amb els residus de cisteïna d'una proteïna quan aquests es troben en el seu estat reduït. El seu alt pes molecular (536,44 Da l'AMS i 5 kDa el PEG), els converteixen en reactius òptims per l'estudi de l'estat redox de les proteïnes. Al unir-se a una cisteïna augmentarà el pes molecular de la proteïna d'estudi, uns 500 Da en el cas de l'AMS i 5 kDa en el cas del PEG. Mitjançant una separació per SDS-PAGE i un posterior *Western Blot* contra la proteïna d'interès, es podrà detectar aquest canvi en el pes molecular. Així, com més residus de cisteïna reduïts presenti una proteïna, més increment en el pes molecular d'aquesta s'observarà. Per tant, es poden detectar els canvis en l'estat redox d'una proteïna en diferents condicions mitjançant derivatitzacions amb AMS.

4.8.1. Derivatització amb PEG en proteïna purificada

El compost PEG es va utilitzar quan es volia determinar el nombre de cisteïnes oxidades de Sir2, quan l'anàlisi es duia a terme a partir de la proteïna purificada.

Protocol:

1. Una vegada es disposa de la proteïna purificada, es tracta amb els agents oxidants.
2. Diluir la mostra amb tampó 50 mM Tris-HCl pH=8, 5 mM EDTA, 5% SDS.
3. Realitzar el bloqueig dels tiols, amb 1 mM NEM durant 30 minuts a 30°C.
4. Reduir les cisteïnes oxidades amb 2,5 mM DTT durant 20 minuts a 30°C.
5. Derivatitzar les cisteïnes (les que prèviament s'havien oxidat, però que ara estan reduïdes amb DTT) amb 10 mM PEG durant 20 minuts a 30°C.
6. Separar les mostres en un gel SDS-PAGE en condicions reductores.
7. Finalment, realitzar un *Western Blot*, en el cas d'aquest treball un anti-Sir2 per saber el nombre de cisteïnes totals de Sir2 que s'han oxidat.

4.8.2. Derivatització amb AMS en extractes totals

En el cas en que es va voler determinar l'estat redox de Sir2 *in vivo* utilitzant extractes totals, es va utilitzar el compost AMS.

Protocol:

1. Fer créixer els cultius en medi líquid fins a la OD₆₀₀ d'interès.
2. Afegir TCA al cultiu de forma que quedi al 20%.
3. Recollir 5 ODs de cèl·lules per centrifugació a 5.000 rpm durant 3 minuts a 4°C, i igualant molt bé el número de ODs recollits de cada cultiu.
4. Descartar el sobrenedant i rentar les cèl·lules dues vegades amb 12,5% TCA.
5. Resuspendre les cèl·lules amb 12,5% TCA i afegir 3/4 parts de *glass beads* (Sigma).
6. Sotmetre les mostres a ruptura mecànica al *Rybolizer*, 3 cicles de 45 segons.
7. Recuperar l'extracte cel·lular i centrifugar durant 1 minut a 10.000 rpm.
8. Rentar el pellet dues vegades amb 100 µl d'acetona freda.
9. Resuspendre el pellet amb 94 µl del tampó de resuspensió.

Tampó de resuspensió	
Tris-HCl pH=8	0,67 M
SDS	1% (p/v)
EDTA	1 mM

10. Posteriorment, dividir la resuspensió en 2 tubs. Un dels tubs contindrà 50 µl de l'extracte resuspès (serà el control sense AMS), mentre que en l'altre tub hi haurà els 44 µl d'extracte restants on s'hi afegiran 6 µl d'AMS 125 mM, de forma que la concentració final serà de 15 mM.
11. Incubar les mostres durant 1 hora a 30°C en agitació a 800 rpm.
12. Finalment, preparar les mostres per ser separades per SDS-PAGE (apartat 4.4.1., Materials i mètodes) amb SRx3, SSx4 i DTT. Es separen les proteïnes en un gel d'acrilamida i, posteriorment, realitzar un *Western Blot* anti-Sir2.

5. PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

5.1. Expressió i purificació de pSir2 recombinant

Per tal d'analitzar l'activitat *in vitro* de Sir2 calia obtenir la proteïna Sir2p recombinant. Per això es van utilitzar els plasmidis pDM111a i pDM360 (J C Tanny et al. 1999) cedits pel professor Danesh Moazed (Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School). El plasmidi pDM111a, induïble amb IPTG, conté la seqüència de la proteïna Sir2 fusionada a glutatió-S-transferasa (GST) a l'extrem N-terminal. Mentre que el plasmidi pDM360, també induïble amb IPTG, conté la seqüència de la proteïna Sir2 però amb una mutació a la histidina catalítica (H364Y), generant d'aquesta manera una proteïna no funcional.

Els plasmidis pNV363, pNV372, pNV464, pNV469 i pNV513 van ser construïts en aquest treball a partir del plasmidi pDM111a i contenen les mutacions puntuals a les cisteïnes de Sir2; C363S, C372S, C464S, C469S i C513S, respectivament. En aquests, Sir2 era també induïble per IPTG i permetia dur a terme la purificació a partir de la proteïna de fusió GST.

▪ **Expressió de Sir2:**

1. Fer créixer les cèl·lules d'*E. coli* DH5α amb els plasmidis corresponents, pDM111a i pDM360, o els mutants pNV363, pNV372, pNV464, pNV469 i pNV513, durant tota la nit a 37°C amb medi LB contenint 100 µg/ml d'ampicil·lina.
2. Inocular 250 ml de cultiu LB amb ampicil·lina amb 1 ml del pre-inòcul crescut durant tota la nit.

3. Deixar créixer entre 4 i 6 hores a 37°C fins a una absorbància de 0,4-0,8.
4. Induir l'expressió de Sir2p afegint 1mM IPTG (Sigma) i deixant incubar durant 4 hores a 30°C.
5. Recollir les cèl·lules i comprovar si s'ha induït correctament en un gel SDS-PAGE.
6. Procedir amb la purificació o congelar les cèl·lules a -20°C.

▪ **Purificació de Sir2:**

1. Resuspendre les cèl·lules amb 10 ml de tampó de lisi.

Tampó de lisi	
Tris-HCl pH=8	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM

2. Afegir 1.26 g de *Cell Lytic Express* (Sigma), juntament amb 500 µl d'inhibidors de proteases d'*E. coli* (Sigma).
3. Deixar 20 minuts a temperatura ambient, barrejant per inversió i rotant tot sovint.
4. Augmentar la concentració de DTT a 10 mM i de NP-40 a l'1% final, barrejar i augmentar la concentració de NaCl fins a 350 mM.
5. Sonicar les cèl·lules fins a disminuir la viscositat (Sonicador *Soniprep 150*).
6. Centrifugar a 35.000 rpm durant 1 hora a 4°C (*Optima L-100 XP Ultracentrifuge*, Beckman Coulter).
7. Carregar 1,250 ml de *GST-Sepharose* (Amersham) en una columna (*Roche*).
8. Equilibrar la columna amb 6-10 volums de tampó de lisi.
9. Carregar el sobrenedant de la centrifugació a la columna. Recollir la primera elució, és a dir, tot allò que no s'ha enganxat a la resina, per tal de comprovar el rendiment d'unió (Fracció S0).
10. Rentar la columna amb 2 volums de tampó de lisi (Fracció S1).
11. Rentar la columna amb 20 volums de tampó de rentat 1 (Fracció S2).

Tampó de rentat 1	
Tris-HCl pH=8	20 mM
NaCl	1 M
Tween-20	0,1% (v/v)
DTT	1 mM

12. Rentar la columna amb 4 volums de tampó de rentat 2 (Fracció S3).

Tampó de rentat 2	
Hepes-KOH pH=7,6	20 mM
NaCl	350 mM
DTT	1 mM

13. Tapar-la i afegir 62,5 U de trombina (Sigma) resuspesa amb 1,25 ml de PBS.
14. Deixar digerint a la nòria durant 2 hores a temperatura ambient i en rotació.
15. Recuperar el volum de líquid de la columna.
16. Rentar la columna amb 6 ml de PBS.
17. Recollir el volum de rentat (6 ml).
18. Concentrar l'eluit de la columna, més tot el volum de rentat amb un *microcon* amb un *cut-off* de 50kDa fins a un volum final de 200 μ l.
19. Mesurar la concentració de proteïna pel mètode de Bradford.
20. Fer alíquotes, congelar ràpidament amb nitrogen líquid i conservar la proteïna purificada a -80°C .

5.2. Expressió i purificació de pGrx3 i pGrx4 recombinants

Per dur a terme els assajos de glutatiolació calia disposar de Grx3 i Grx4 recombinants. Per obtenir-les es van utilitzar els plasmidis induïbles amb IPTG, pET21a-Grx3 i pET21a-Grx4 cedits per la Dra. C. Outten (University of South Carolina, USA). Tan la ORF de Grx3 com de Grx4 van ser amplificades a partir del DNA genòmic de *S. cerevisiae* i clonades al plasmidi pET21a (Novagen) per generar pET21a-Grx3 i pET21a-Grx4, respectivament. Grx3 va ser clonada a partir del segon codó d'inici (Met36) fins al codó stop, ja que s'havia determinat que el primer codó d'inici no era utilitzat *in vivo* (H. Li et al. 2009)

▪ **Expressió de Grx3 i Grx4:**

1. Fer créixer les cèl·lules d'*E. coli* BL21 amb els plasmidis corresponents, pET21a-Grx3 i pET21a-Grx4 durant tota la nit a 37°C amb medi LB contenint 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicil·lina.
2. Inocular 250 ml de cultiu LB amb 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicil·lina amb 1 ml del pre-inòcul crescut durant tota la nit.
3. Deixar créixer 4-6 hores a 37°C fins que arriben a una absorbància de 0,4-0,8.
4. Induir l'expressió de Grx3 i Grx4 afegint 1 mM IPTG (Sigma) i deixant incubar durant 4 hores a 30°C .

5. Recollir les cèl·lules i comprovar si s'ha induït correctament en un gel d'acrilamida.
6. Un cop comprovada la inducció, procedir amb la purificació o congelar les cèl·lules a -20°C.

▪ **Purificació de Grx3 i Grx4:**

Per dur a terme la purificació d'ambdues Grx3 i Grx4 es van dur a terme dues separacions consecutives, una cromatografia d'intercanvi aniònic seguida d'una cromatografia de gel filtració. Bàsicament, els passos que es van dur a terme són els següents:

Protocol:

1. Recollir per centrifugació les cèl·lules BL21 on prèviament s'havia realitzat la inducció de Grx3 i Grx4.
2. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pellet de cèl·lules amb tampó 50 mM Tris-HCl pH=8 juntament amb inhibidors de proteases d'*E. coli* (Sigma).
3. Lisar les cèl·lules mitjançant sonicació i eliminar les restes cel·lulars centrifugant 10 minuts a 10.000 rpm i a 4°C.
4. Carregar l'extracte cel·lular a una columna d'intercanvi aniònic DEAE, equilibrada amb tampó 25 mM Bis-Tris pH=6,5.
5. Per tal de recuperar les fraccions que contenen Grx3 (i Grx4), eluir amb un gradient de sal 1 M NaCl, del 0% al 100% durant 60 minuts, i recollir l'eluit a diferents temps.
6. Carregar una mostra de cada fracció recollida en un gel SDS-PAGE per tal de saber en quin percentatge de NaCl elueix Grx3 (i Grx4).
7. Agrupar i concentrar les diferents fraccions que contenen Grx3 (o Grx4) fins a un volum de 2 ml.
8. Carregar la fracció concentrada en una columna de gel filtració Sephacryl S-100 (GE Healthcare), prèviament equilibrada amb tampó 25 mM Tris-HCl pH=7,5, per tal de separar Grx3 (o Grx4) de la resta de proteïnes que hi estiguin presents.
9. Recollir fraccions de l'eluit a diferents temps, i carregar una mostra de cada fracció en un gel SDS-PAGE per tal de saber quines són les fraccions que contenen Grx3 (o Grx4).
10. Recollir i tornar a concentrar les fraccions que contenen Grx3 (o Grx4).
11. Quantificar la proteïna mitjançant el mètode de Bradford (apartat 4.3., Materials i mètodes).
12. Fer alíquotes, congelar ràpidament amb nitrogen líquid i conservar la proteïna purificada a -80°C.

6. ASSAIG DE DESGLUTATIOLACIÓ

Per dur a terme els assajos de desglutatiolació de Sir2 per part de Grx3 i Grx4 es va utilitzar un compost fluorescent, la Di-Eosina-GSSG, cedit pels Drs. Berndt i Hollmgren (Universitat Heinrich-Heine, Düsseldorf) i descrits per primera vegada per Raturi i Mutus (Raturi and Mutus 2007).

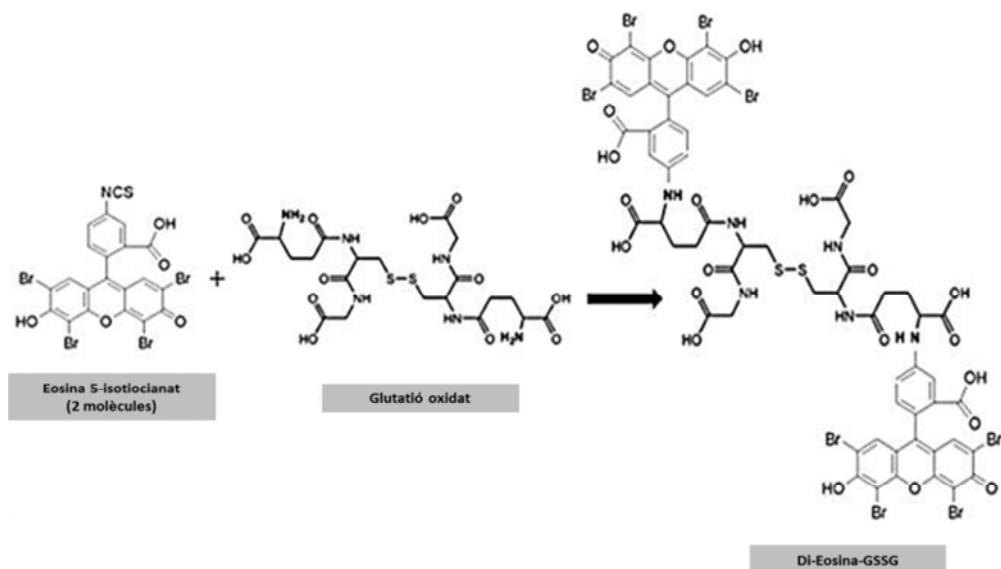


Figura 90. Síntesi de la Di-Eosina-GSSG. La Di-E-GSSG està formada per dues molècules de Eosina 5-isotiocianat i una molècula de GSSG (Coppo et al. 2016).

L'ús d'aquesta molècula permet dur a terme un assaig fluorimètric molt sensible que permet la detecció de glutatiolacions i per tant, també permet detectar l'activitat d'un enzim amb capacitat de desglutatiolar proteïnes diana, com les Grxs. L'assaig es basa en la molècula de Di-Eosina-GSSG, formada per dues molècules de eosina unides a cada una de les molècules de glutatió que formen el GSSG (Figura 90). La proximitat de les molècules de eosina no permet que es produeixi fluorescència, però quan l'enllaç disulfur es trenca perquè el compost es combina amb la proteïna diana glutatiolant-la, la fluorescència incrementa fins a 70 vegades el valor inicial.

Protocol:

El protocol de desglutatiolació de Sir2 per part de Grx3 i Grx4 es detalla a continuació en cada un dels passos que es van dur a terme:

▪ **Reducció de Sir2, Grx3 i Grx4:**

1. Incubar la proteïna recombinant Sir2 prèviament purificada (apartat 5.1., Materials i mètodes) amb 10 mM DTT durant 30 minuts a 25°C per tal de reduir-la completament.
2. Eliminar l'excés de DTT, passant Sir2 reduïda per les columnes PD Spin-Trap G-25 amb tampó 50 mM fosfat sòdic pH=6,5.
3. Incubar la proteïna recombinant Grx3 com Grx4, prèviament purificades (apartat 5.2., Materials i mètodes) amb 10 mM DTT juntament amb 10 mM TCEP-HCl (Tris (2-carboxietil)fosfina clorhidrat)(Sigma) durant 30 minuts a 25°C.
4. Eliminar l'excés de DTT i de TCEP-HCl, passant Grx3 i Grx4 reduïdes per les columnes PD Spin-Trap G-25 en tampó 50 mM fosfat sòdic pH=6,5.

▪ **Glutatiolació de Sir2:**

1. Incubar la proteïna Sir2 reduïda amb un excés 4x de Di-Eosina-GSSG durant 30 minuts a 25°C.
2. Eliminar l'excés del compost Di-Eosina-GSSG utilitzant columnes PD Spin-Trap G-25 en tampó 50 mM fosfat sòdic pH=6,5.

▪ **Desglutatiolació de Sir2:**

1. Incubar la proteïna Sir2 glutatiolada (5 µM) a 25°C entre 0 i 60 minuts amb un excés 2.5x de Grx3 o Grx4, prèviament reduïdes.
2. Després del temps de desglutatiolació, afegir 1/2 volum de solució reductora, 1/2 volum de solució solubilitzadora i 50 mM de IAA (Iodoacetamina) per mantenir les cisteïnes bloquejades i evitar la possible oxidació a posteriori.
3. Separar les mostres en un gel SDS-PAGE en condicions no reductores.
4. Observar la glutatiolació de Sir2 al gel en forma d'una banda fluorescent ($\lambda_{ex}=525$ nm i $\lambda_{em}=545$ nm).
5. Realitzar un *Western Blot* anti-Sir2 de les mostres obtingudes en cada condició per tal de quantificar els nivells totals de Sir2.
6. Analitzar i quantificar tan les bandes fluorescentes del gel (Sir2 glutatiolada) i les bandes del *Western Blot* (Sir2 total) amb el programa *Image Lab 4.0.1* de BioRad.

7. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

7.1. Mètodes espectrofotomètrics

Algunes de les activitats enzimàtiques analitzades en aquest treball es van estudiar mitjançant mètodes espectrofotomètrics, fent ús de l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401. Els assajos d'activitat es van realitzar a partir d'extractes proteics totals obtinguts segons l'apartat (apartat 4.1.1, Materials i mètodes) i només variant el tipus de tampó utilitzat per la seva obtenció.

7.1.1. Activitat catalasa

La catalasa és un enzim antioxidant que està implicat en la descomposició del H_2O_2 en aigua i oxigen, prevenint així l'oxidació de biomolècules. Es va analitzar l'activitat catalasa mesurant la disminució del H_2O_2 a partir de la disminució de l'absorbància a 240 nm (Jakubowski, Biliński, and Bartosz 2000).



Figura 91. Reacció de la catalasa. La catalasa descomposa l' H_2O_2 en aigua i oxigen.

Protocol:

1. S'obtenen els extractes proteics amb 50 mM tampó fosfat sòdic pH=7.
2. En una cubeta de quars s'afegeix ($V_f=100 \mu\text{l}$):
 - Solució extemporània de 35 mM H_2O_2
 - Ajustar a 100 μl amb tampó 0,1 M fosfat sòdic pH=7
 - Barrejar ràpidament 1-10 μl d'extracte proteic (sense diluir o diluït segons el medi i la fase de creixement de les cèl·lules)
3. S'espera 5 segons i es mesura la velocitat de disminució de l'absorbància a 240 nm durant 1 minut.
4. Es repeteix l'activitat amb 3-4 quantitats diferents de l'extracte proteic a fi d'obtenir un valor promig.
5. L'activitat s'expressa com U/mg de proteïna. Es defineix una unitat d'activitat enzimàtica (U) com la quantitat d'enzim necessària per catalitzar la descomposició

de 1 μmol de H_2O_2 per minut. (Coeficient d'extinció molar del H_2O_2 a 240 nm, $\epsilon = 45,66 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

7.1.2. Activitat glutatió reductasa

La glutatió reductasa (GR) és un enzim dependent de NADPH que catalitza la reducció del glutatió oxidat (GSSG) a glutatió reduït (GSH), el qual, posteriorment serà utilitzat per la glutatió peroxidasa (GPx) per la reducció del H_2O_2 (Figura 92)

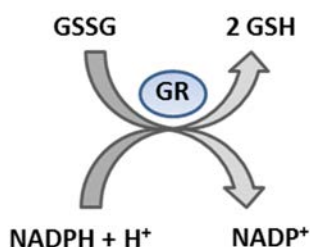


Figura 92. Activitat glutatió reductasa. La glutatió reductasa utilitza el NADPH per convertir el glutatió oxidat (GSSG) en glutatió reduït (GSH), generant NADP^+ .

En aquest treball es va mesurar l'activitat glutatió reductasa a partir de la mesura de l'oxidació del NADPH a NADP^+ , la qual ve acompanyada per una disminució en l'absorbància a 340 nm, i que és directament proporcional a l'activitat glutatió reductasa de la mostra (Carlberg and Mannervik 1985).

Protocol:

1. Obtenir els extractes proteics amb 50 mM tampó fosfat sòdic pH=7,4.
2. Afegir en una cubeta de quars s'afegeix ($V_f=1 \text{ ml}$):
 - Solució de GSSG \rightarrow Concentració final: 4 mM
 - Solució de NADPH \rightarrow Concentració final: 150 μM
 - Ajustar a 1 ml amb tampó 50 mM tampó fosfat sòdic pH=7,4
 - Barrejar l'extracte proteic (sense diluir o diluït segons la fase de creixement de les cèl·lules).
3. Esperar 1 minut i mesurar la velocitat de disminució de l'absorbància a 340 nm durant 2-3 minuts.

4. Repetir l'activitat amb 3-4 quantitats diferents de l'extracte proteic a fi d'obtenir un valor mig.
5. Expressar l'activitat com U/mg de proteïna. Definir una unitat d'activitat enzimàtica (U) com la quantitat d'enzim necessària per consumir 1 μmol de NADPH per minut. (Coeficient d'extinció molar del NADPH a 340 nm, $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7.2. Activitat enzimàtica en gel: zimograma

La determinació de l'activitat enzimàtica en gel d'acrilamida (zimograma) és una tècnica electroforètica que permet determinar l'activitat d'un enzim. L'extracte cel·lular ha de ser separat en gels d'acrilamida en condicions no desnaturalizants (natives) per tal d'evitar la pèrdua d'activitat de l'enzim a analitzar.

7.2.1. Activitat superòxid dismutasa

Per determinar l'activitat superòxid dismutasa es va dur a terme un assaig basat en la conversió del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-thiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en un precipitat blau (Formazan) que es redueix per l'acció del superòxid generat a partir de la reacció del 5-metilfenazinium metil sulfat (PMS) amb l'oxigen (Figura 93). La presència de llum és necessària per aconseguir l'excitació del PMS (Beauchamp and Fridovich 1971). El superòxid generat serà eliminat per acció de la superòxid dismutasa, donant lloc a bandes blanques al gel, on no hi haurà producció de formazan.

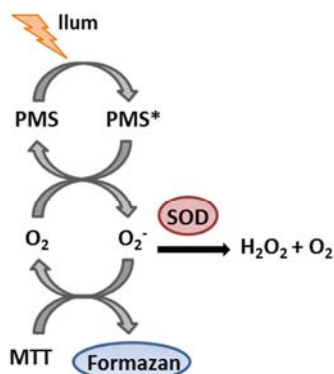


Figura 93. Activitat superòxid dismutasa. El PMS és oxidat en presència de llum, generant O₂⁻, que utilitzarà el MTT per reduir-se a Formazan, un precipitat blau. La zona del gel sense coloració blava serà deguda a l'activitat SOD, ja que aquesta utilitzarà l'ió per generar H₂O₂ i O₂.

Protocol:

1. Preparar un gel de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants.
2. Obtenir els extractes proteics sense SDS.
3. Carregar el gel amb 15-30 µg de proteïna per carril i iniciar la cursa a 15-20 mA, amb tampó d'electroforesi sense SDS i a 4°C per evitar la inactivació de l'enzim.
4. Incubar el gel amb la solució de reacció en presència de llum intensa fins a l'aparició de bandes incolores sobre el fons fosc del gel.

Solució de reacció	
Tris-HCl 50mM pH=8,5	80 ml
MTT	0,3 mM
PMS	0,25 mM
MgCl ₂	2 mM

5. Un cop finalitzada la reacció, rentar el gel amb aigua milli-Q.
6. Capturar la imatge al densitòmetre GS800 (BioRad).
7. Quantificar les bandes amb el programa *Quantity One* (BioRad).

7.3. Determinació de l'activitat histona desacetilasa de Sir2

Per analitzar l'activitat desacetilasa de Sir2 *in vitro* es va utilitzar el kit comercial *HDAC Fluorimetric Assay/Drug Discovery Kit* de Enzo Life Sciences (ref. BML-AK500). Aquest kit permet realitzar assajos per mesurar l'activitat histona desacetilasa a partir d'un substrat acetilat.

En un primer pas de l'assaig, el substrat és desacetilat, en el nostre cas per Sir2, fet que provocarà que sigui sensibilitzat i en un segon pas, al barrejar-se amb el revelador, generarà un fluoròfor que podrà ser quantificat (Figura 94).

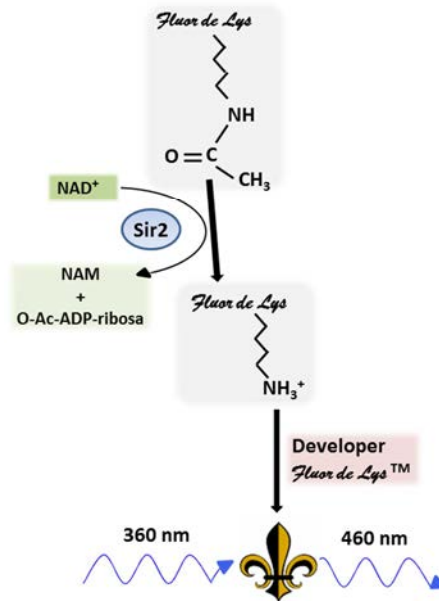


Figura 94. Activitat desacetilasa Sir2. L'activitat Sir2 es pot determinar mitjançant la desacetilació d'un pèptid acetilat per part de Sir2 en presència de NAD^+ . El substrat desacetilat, en presència d'un revelador acabarà generant fluorescència.

Protocol:

L'assaig es va dur a terme seguint les instruccions del fabricant, en un volum final de 100 μl i en plaques de 96 pous. Els passos que es van seguir van ser els següents:

1. Sotmetre la proteïna Sir2 recombinant (normalment 5 μg) als tractaments que correspongui en cada cas, normalment durant 10 minuts a temperatura ambient i a les concentracions d'interès, en un volum final de 25 μl . Realitzar totes les dilucions necessàries amb el propi *assay buffer* del kit.

Assay buffer	
Tris-HCl pH=8,0	50 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
MgCl₂	1 mM

2. Quan l'agent utilitzat és el peròxid d'hidrogen, aturar la reacció a partir de l'addició de la catalasa (2 unitats), l'enzim responsable de la descomposició del H_2O_2 en H_2O i O_2 .

3. Quan s'indica, després del tractament amb l'agent oxidant, afegir un agent reductor, com 25 mM DTT o 50 mM GSH durant 10 minuts a temperatura ambient, per analitzar la possible reversibilitat de l'oxidació.
4. Iniciar l'assaig afegint 25 µl del substrat acetilat *Fluor de Lys® substrate*, juntament amb 500 µM del co-substrat NAD⁺, diluïts amb *assay buffer*. Incubar durant 30 minuts a 30°C per permetre la reacció de desacetilació.
5. Afegir 50 µl del revelador *Fluor de Lys® developer* amb 0,5 mM NAM per tal d'aturar la reacció de desacetilació, durant 15 minuts a temperatura ambient.
6. Procedir a llegir la fluorescència (deguda a la desacetilació del substrat) amb l'aparell *Infinite M200* de TECAN, utilitzant el programa *I-control 1.4* (Infinite Reader) i seleccionant unes longituds d'ona d'excitació de λ_{ex} = 350-380 nm i d'emissió de λ_{em} = 440-480 nm.
7. Realitzar un control sense enzim per tal de determinar la fluorescència basal.

8. TÈCNiques DE MICROSCOPIA

8.1. Visualització de cèl·lules marcades amb GFP

Per tal d'analitzar la localització de Sir2 és va dur a terme la construcció de les soques on es marcava la proteïna d'interès, en aquest cas Sir2, amb la proteïna GFP (apartat 3.11.3., Materials i mètodes). Aquesta proteïna emet fluorescència verda quan és excitada a una determinada longitud d'ona. Per tant, mitjançant microscòpia de fluorescència es pot analitzar la localització cel·lular d'aquesta proteïna. Per aquests estudis es va utilitzar el microscopi de fluorescència Olympus DP30 BW.

Protocol:

1. Recollir entre 0,5 – 1 OD de cèl·lules i centrifugar 45 segons a 12.000 rpm per tal d'eliminar el medi de cultiu (per tal d'evitar problemes d'autofluorescència del propi medi YPD).
2. Resuspendre les cèl·lules amb 20-40 µl de PBS.
3. Disposar 2 µl de les cèl·lules resuspeses en un portaobjectes, cobrir amb un cobreobjectes i procedir a l'anàlisi a través del microscopi.
4. Utilitzar el filtre pertinent per la visualització de les cèl·lules. En el cas de la GFP cal utilitzar un filtre amb un rang d'excitació de 470-495 nm i un rang d'emissió de 510-550 nm.

5. Adquirir diferents imatges tan del camp visible com del UV i de diferents localitzacions del portaobjectes.

8.2. Visualització de cèl·lules tenyides amb DAPI

A fi de corroborar la presència d'una proteïna al nucli quan aquesta s'analitzava mitjançant el seu marcatge amb GFP, cal dur a terme una tinció nuclear *in vivo* utilitzant el compost DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) en els mateixos cultius d'interès.

Protocol:

1. Recollir entre 0,5 – 1 OD de cèl·lules i centrifugar 45 segons a 12.000 rpm per tal d'eliminar el medi de cultiu.
2. Permeabilitzar la paret per permetre la posterior entrada del DAPI a la cèl·lula, resuspenent les cèl·lules amb etanol 30% i immediatament, tornar a centrifugar per tal d'eliminar l'etanol.
3. Incubar les cèl·lules amb 1 µg/ml DAPI en PBS durant 10 minuts a 30°C i protegides de la llum.
4. Centrifugar les cèl·lules 45 segons a 10.000 rpm per tal d'eliminar el DAPI i realitzar dos rentats amb PBS.
5. Disposar 2 µl de les cèl·lules resuspeses en un portaobjectes, cobrir amb un cobreobjectes i procedir a l'anàlisi a través del microscopi.
6. Adquirir les imatges fent ús del filtre UV ($\lambda_{\text{excitació}}$: 358 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$: 461 nm).

8.3. Visualització del citoesquelet d'actina

Amb l'objectiu d'analitzar l'estructura del citoesquelet d'actina de les cèl·lules, es va realitzar un marcatge de l'actina (F-actina) utilitzant la rodamina-fal·loïdina.

Protocol:

1. Recollir 1 ml de cèl·lules crescudes exponencialment a una absorbància d'aproximadament $OD_{600}=0,5$, centrifugant 5 minuts a 3.000 rpm.
2. Fixar les cèl·lules amb 4% formaldehid, durant un mínim de 10 minuts a temperatura ambient i en agitació constant.
3. Centrifugar les cèl·lules a 3.000 rpm durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant.

4. Fixar les cèl·lules durant tota la nit amb 4% formaldehid en PBS i a temperatura ambient.
5. Centrifugar les cèl·lules a 3.000 rpm durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant.
6. Rentar el pellet cel·lular amb 0,06% dietiletanolamina (DEAE) en PBS.
7. Centrifugar les cèl·lules a 3.000 rpm durant 5 minuts.
8. Rentar dues vegades el pellet cel·lular amb 100 μ l de PBS.
9. Centrifugar 5 minuts a 3.000 rpm.
10. Resuspendre les cèl·lules amb 50 μ l de PBS.
11. Afegir 0,6 μ M rodamina-fal·loïdina (Sigma) i deixar incubant durant tota una nit protegit de la llum.
12. Rentar 5 vegades amb PBS, centrifugant 5 minuts a 3.000 rpm.
13. Resuspendre les cèl·lules amb la solució de muntatge MOWIOL.
14. Disposar 2 μ l de les cèl·lules resuspeses en un portaobjectes, cobrir amb un cobreobjectes i procedir a l'anàlisi a través del microscopi.
15. Adquirir les imatges fent ús del filtre UV ($\lambda_{\text{excitació}}$: 540 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$: 565 nm).

9. ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR MITJANÇANT FACS

9.1. Sincronització amb factor α

S. cerevisiae es caracteritza per presentar dos tipus sexuals: MATa i MAT α . Les cèl·lules haploides dels tipus sexuals oposats poden fusionar-se i donar lloc a una cèl·lula diploide. Així, les cèl·lules MAT α sintetitzen el factor α , que és secretat al medi extracel·lular i podrà ser reconegut per receptors d'una cèl·lula MATa, i a l'inrevés. Les cèl·lula MATa, al detectar el factor α es sincronitzen en fase G1 del cicle cel·lular, preparant-se per la fusió. Aquesta característica pot ser utilitzada al laboratori per sincronitzar cèl·lules del tipus MATa a través de l'addició del factor α .

Protocol:

1. Créixer el cultiu en medi YPD 2% glucosa fins a fase exponencial.
2. Afegir al cultiu el factor α a una concentració final de 5 μ g/ml i incubar les cèl·lules durant 120 minuts a 30°C.
3. Centrifugar les cèl·lules 5 minuts a 5000 rpm i a temperatura ambient per eliminar el factor α . Eliminar el sobrenedant.
4. Rentar les cèl·lules dues vegades amb medi YPD 2% glucosa.

5. Resuspendre les cèl·lules ja sincronitzades en fase G1 amb medi YPD glucosa i procedir amb la tinció amb iodur de propidi.

9.2. Tinció amb iodur de propidi

La tinció del DNA amb iodur de propidi permet la detecció del contingut de DNA de les cèl·lules quan aquestes s'analitzen per citometria de flux (FACS). Les cèl·lules presentaran una única còpia del material genètic (1N) o dues còpies (2N) si ja han passat per la fase S. Així, es pot determinar la fase del cicle cel·lular en la que es troben les cèl·lules a través de la tinció amb iodur de propidi, un fluoròfor de tipus intercalant amb afinitat pel DNA i el RNA de doble cadena.

Protocol:

1. Recollir 0,3 ml d'un cultiu crescut en medi YPD ($OD_{600}=0,5-1$) i afegir 1ml d'etanol absolut. Incubar 1h a 4°C (es poden mantenir fins a 2 setmanes).
2. Centrifugar 5 minuts a 2500 rpm. Eliminar el sobrenedant.
3. Afegir al pellet de cèl·lules 510 µl de la solució SSC (0,15M NaCl; 15 mM citrat sòdic pH=7) contenint RNAsa (200 µg/ml) per eliminar el RNA i que aquest no sigui reconegut pel iodur de propidi.
4. Incubar a 50°C durant 1-2 hores (o tota una nit).
5. Afegir 106 µl de SSC contenint Proteasa K (100 µg/ml).
6. Vortexar 3 segons.
7. Incubar 1 hora a 50°C. Evitar temps d'incubació més llargs.
8. Afegir 1 ml de la solució SSC contenint Iodur de propidi (3-5 µg/ml)
9. Incubar a la foscor i a temperatura ambient durant mínim 1 hora.
10. Sonicar durant 10 segons.
11. Vortexar 3 segons.
12. Analitzar les cèl·lules per citometria de flux.

10. ALTRES TÈCNIQUES DETERMINATIVES

10.1. Determinació de la quantitat de ferro intracel·lular

Aquest mètode es basa en la reducció i solubilització del ferro present en una mostra i la posterior quantificació del canvi d'absorbància que té lloc quan un agent quelant del

ferro (batofenantrolina, BPS) s'uneix a aquest metall. Es tracta d'un mètode adaptat per llevat (Tamarit et al. 2006) del mètode colorimètric descrit prèviament (Fish 1988).

Protocol:

1. Recollir 5 ODs (2×10^8 de cèl·lules) centrifugant 1 minut a 10.000 rpm.
2. Rentar el pellet de cèl·lules dues vegades amb H_2O milli-Q.
3. Resuspendre el pellet cel·lular amb 3% àcid nítric (v/v).
4. Deixar incubant a $98^\circ C$ durant 12 hores.
5. Realitzar una centrifugació a 6.000 rpm durant 5 minuts.
6. Recuperar 400 μl del sobrenedant i afegir àcid ascòrbic de forma que quedi a una concentració final de 6 mg/ml per tal de desenvolupar la reacció de reducció del Fe^{+3} a Fe^{+2} .
7. Afegir acetat d'amoni a partir d'una solució saturada, per tal d'ajustar el pH a 5,4.
8. Mesurar a l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401 la diferència entre l'absorbància a $\lambda=535$ nm i $\lambda=680$ nm.
9. Afegir el sulfonat de batofenantrolina (BPS) de forma que quedi a una concentració final de 34 $\mu g/mg$.
10. Mesurar a l'espectrofotòmetre la diferència entre l'absorbància a $\lambda=535$ nm i $\lambda=680$ nm.
11. En paral·lel, fer un blanc amb tots els reactius de l'assaig, però sense cèl·lules, per tal de mesurar l'absorbància no específica.
12. La concentració final de ferro s'obté extrapolant els resultats d'una corba estàndard preparada amb sulfat amònic ferrós.
13. Determinar el nombre i el volum mig de les cèl·lules utilitzant un comptador Coulter Z2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) per donar els resultats en concentració molar.

10.2. Determinació dels nivells de GSH total

Per poder estimar els nivells de GSH intracel·lulars totals, es va utilitzar la sonda comercial fluorescent *ThioTrackerTM Violet* (Invitrogen). Aquesta sonda presenta la capacitat de reaccionar amb els tiols reduïts de les cèl·lules. Aprofitant el fet de que el GSH representa la majoria dels grups tiols lliures de la cèl·lula, aquesta sonda permet dur-ne a terme una estimació en cèl·lules vives.

Protocol:

1. Créixer els cultius de les cèl·lules d'interès fins a fase exponencial.
2. Realitzar els tractaments amb els agents oxidants d'interès.
3. Recollir les cèl·lules centrifugant 2 minuts a 10.000 rpm.
4. Eliminar el medi de cultiu i rentar amb 1 ml de medi SC.
5. Centrifugar 2 minuts a 10.000 rpm i eliminar el medi de cultiu.
6. Resuspendre el pellet cel·lular amb 1 ml d'una solució contenint 20 μ M de la sonda en medi SC. Paral·lelament, realitzar un control amb 1 OD de cèl·lules, incubant amb 1 ml de medi SC sense sonda.
7. Deixar incubant en agitació suau durant 30 minuts a 30°C.
8. Centrifugar 2 minuts a 10.000 rpm i eliminar el sobrenedant.
9. Resuspendre les cèl·lules amb 100 μ l de medi SC.
10. Procedeix a llegir la fluorescència (deguda a la unió de la sonda al GSH) amb l'aparell *Infinite M200* de TECAN, utilitzant el programa *I-control 1.4* (Infinite Reader) i seleccionant unes longituds d'ona d'excitació de λ_{ex} = 404 nm i d'emissió de λ_{em} = 526 nm.

11. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

Tots els experiments es van repetir un mínim d'almenys tres vegades fent créixer cultius independents. Amb l'objectiu de determinar si les diferències observades en els experiments eren significatives, es va aplicar el test-T, representant els valors com la mitja \pm error estàndard. En tots els casos la significació estadística ve donada pel valor $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***)).

RESULTATS

RESULTATS

1. ESTUDI *IN VITRO* DE L'ACTIVITAT DESACETILASA DE SIR2

Estudis anteriors relacionen el paper de Sir2 en la resposta front a l'estrès oxidatiu, per exemple en la inducció de gens antioxidants, ja sigui directa o indirectament. A més, també es coneix que Sir2 participa en la regulació de l'envelliment i que aquest, està relacionat també amb l'estrès oxidatiu. A més, Sir2 presenta la particularitat de tenir un nombre relativament elevat de residus de cisteïna a la seva estructura, 11 en total. L'oxidació parcial de les cisteïnes s'ha descrit com una modificació postraduccional molt comú de l'estructura tridimensional de les proteïnes i s'ha vist relacionada amb processos de transport, regulació, senyalització o com a conseqüència d'un estrès oxidatiu. Així, d'acord amb el paper de Sir2 en la regulació de l'estrès oxidatiu i tenint en compte el nombre de cisteïna que aquesta sirtuïna posseeix, es va decidir analitzar la possible regulació redox de Sir2. Per aquest motiu, es va començar analitzant els efectes a nivell d'activitat de sotmetre la proteïna recombinant Sir2 a condicions d'estrès oxidatiu, utilitzant dos agents oxidants: H₂O₂ i diamida. Mentre que el H₂O₂ pot provocar l'oxidació de diferents aminoàcids, la diamida és un agent molt selectiu dels residus de cisteïna, generant bàsicament glutatiolacions i ponts disulfur.

1.1. Inducció i purificació de Sir2

Amb l'objectiu d'analitzar l'activitat *in vitro* de Sir2, primerament, es va obtenir la proteïna recombinant a partir d'*E. coli*. Mitjançant la transformació del plasmidi pDM111a (GST-Sir2) en cèl·lules DH5α, es va expressar la proteïna de fusió GST-Sir2 per poder procedir amb la seva purificació. Abans però, calia una comprovació prèvia tan de la inducció amb IPTG com de la purificació (Figura 95).

Els resultats obtinguts mostraven que Sir2 s'havia induït correctament. La banda, d'uns 89 kDa representa la proteïna de fusió GST-Sir2 (63 kDa de Sir2 i 26 kDa de GST). Així, es va procedir a la seva purificació seguint el protocol descrit a l'apartat (apartat 5.1 de Materials i Mètodes) de materials i mètodes. Aquest protocol aprofitava el fet que Sir2 estava fusionada a GST, per tal de poder-la captar mitjançant una resina de glutatió.

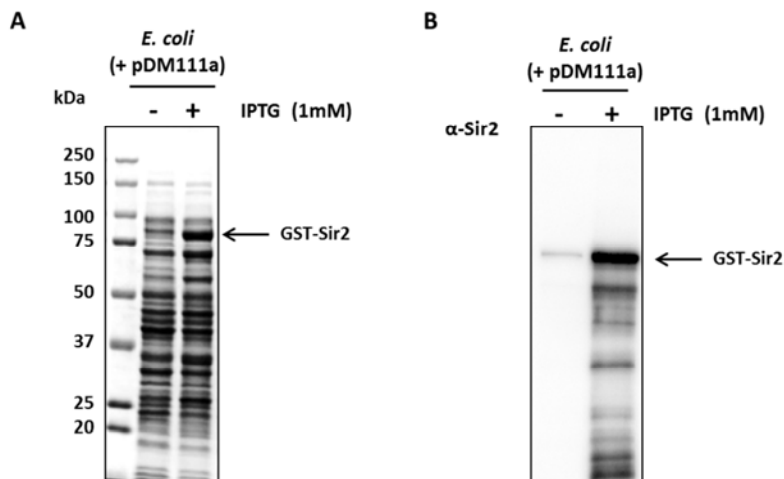


Figura 95. Comprovació de la inducció de l'expressió de la proteïna de fusió GST-Sir2. Es mostra l'extracte d'*E. coli* contenint el plasmidi pDM111a sense induir i induït amb IPTG 1mM durant 4 hores a 30°C. La proteïna de fusió presenta un pes molecular de 89 kDa. (A) Gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie* i (B) *Western Blot* anti-Sir2.

Posteriorment, i per evitar possibles interferències de la GST, es va dur a terme una digestió amb trombina, donada la presència d'un lloc específic de digestió entre GST i Sir2, la qual cosa permetia obtenir la proteïna Sir2 purificada (Figura 96).

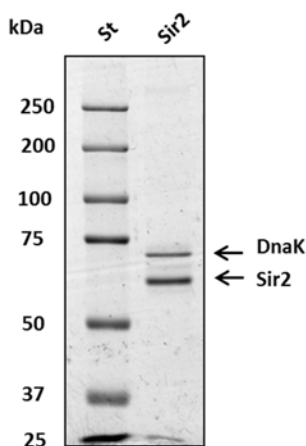


Figura 96. Comprovació de la purificació de la proteïna recombinant Sir2. Mitjançant un gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie* es va comprovar la purificació. Es detecta la presència de Sir2 (63 kDa) i DnaK d'*E. coli* (69 kDa).

Els resultats mostren que Sir2 co-purifica amb una altra proteïna. Per verificar la identitat de Sir2 i conèixer la identitat de l'altra proteïna, es va dur a terme una identificació per empremta peptídica o PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*), ionitzant els pèptids generats després de la digestió trípica amb un espectròmetre de masses MALDI-TOF *AutoflexSpeed* (Bruker Daltonics). Després d'adquirir l'espectre de masses amb el *software FlexControl version 3.0 software* (Bruker Daltonics) es van identificar les proteïnes mitjançant similitud amb la digestió trípica teòrica de la base de dades *Swiss-Prot*, utilitzant el *MASCOT* (versió 2.3, Matrix Sciences) com a motor de cerca. Els resultats van mostrar que la banda de 63 kDa era efectivament Sir2, mentre que l'altra proteïna de 69 kDa que co-purificava amb Sir2 era la xaperona DnaK d'*E. coli*.

1.2. Anàlisi *in vitro* de l'activitat desacetilasa de Sir2

Per tal de determinar l'activitat desacetilasa de Sir2 *in vitro* es va utilitzar el kit comercial *HDAC Fluorimetric Assay/Drug Discovery Kit*. L'assaig es basa en la desacetilació per part de l'enzim del substrat *Fluor de Lys*[®], que es tracta bàsicament d'un pèptid que incorpora una lisina acetilada. Al produir-se la reacció de desacetilació, el substrat reacciona amb la substància reveladora i permet detectar la fluorescència emesa pel fluoròfor. Així, a major activitat desacetilasa, major fluorescència emesa. Es va determinar l'activitat de la proteïna recombinant Sir2 i a més, es va utilitzar com a control negatiu una proteïna Sir2 no funcional que contenia la histidina catalítica mutada per una tirosina (H364Y). Aquesta proteïna Sir2-H364Y recombinant es va obtenir transformant les cèl·lules DH5 α amb el plasmidi pDM360 (GST-Sir2-H364Y) i seguint els mateixos passos que per la proteïna Sir2-WT.

En els resultats d'activitat obtinguts per ambdues proteïnes recombinants, mostrats a la Figura 97, s'observa que Sir2 presenta la major activitat desacetilasa en el seu estat reduït. A més, el fet que el tractament amb DTT o GSH no faci augmentar els nivells d'activitat, indica que Sir2 ha estat purificada en el seu estat reduït.

La proteïna Sir2-H364Y catalíticament inactiva, tal com s'esperava, no va mostrar activitat en cap condició, inclús quan era tractada amb DTT o GSH.

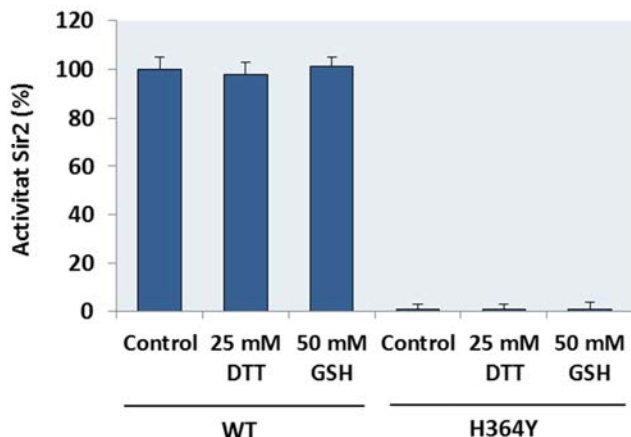


Figura 97. Activitat desacetilasa de les proteïnes recombinants Sir2 i Sir2-H364Y (5 µg – 1.5 µM) mesurada mitjançant l'assaig *Fluor de Lys*. La mesura es va determinar amb i sense el tractament amb 25 mM GSH i 50 mM DTT durant 10 minuts a temperatura ambient.

1.3. Anàlisi *in vitro* de l'activitat de Sir2. Tractaments amb H₂O₂

Per determinar l'efecte de l'estrès oxidatiu per H₂O₂ en l'activitat desacetilasa de Sir2 es va seguir l'esquema descrit a la Figura 98.

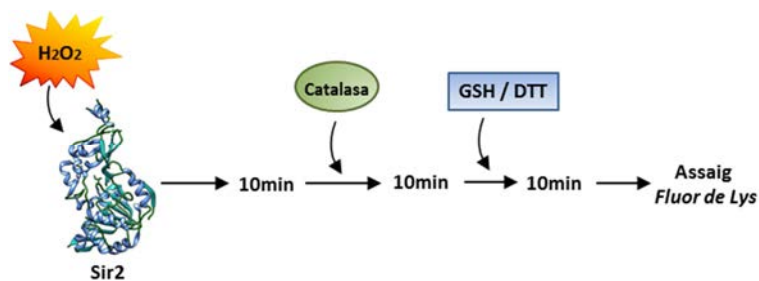


Figura 98. Esquema del protocol per la determinació de l'activitat desacetilasa de Sir2. La proteïna recombinant Sir2 es va tractar amb H₂O₂ durant 10 minuts a temperatura ambient i es va eliminar el H₂O₂ mitjançant l'addició de catalasa durant 10 minuts. Quan s'indica, es tractava durant 10 minuts més amb un agent reductor com el DTT o el GSH abans de procedir a mesurar l'activitat desacetilasa mitjançant l'assaig *Fluor de Lys*.

La Figura 99 mostra els resultats obtinguts quan Sir2 es sotmetia a l'efecte de l'H₂O₂.

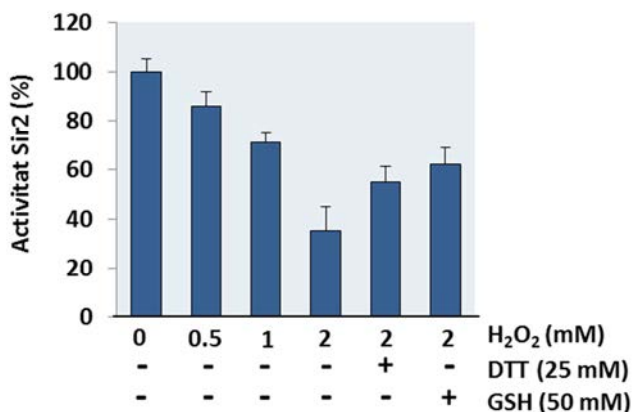


Figura 99. Efecte de l'H₂O₂ en l'activitat Sir2. L'activitat de Sir2 (5 µg – 1.5 µM) es va mesurar mitjançant l'assaig *Fluor de Lys* després del tractament durant 10 minuts a temperatura ambient amb diferents concentracions de H₂O₂. Quan s'indica, després de l'oxidació es va tractar durant 10 minuts més, amb 25mM DTT o 50 mM GSH abans de mesurar l'activitat desacetilasa.

Els resultats mostren que a major concentració d'H₂O₂, major pèrdua d'activitat Sir2. No obstant, inclús a concentracions de H₂O₂ altes (2mM), Sir2 encara manté una activitat del 40%, indicant que Sir2 seria poc sensible a l'estrès per H₂O₂. Quan després del tractament s'incuba Sir2 amb un agent reductor, com el DTT o el GSH, s'observa que l'activitat es recupera parcialment. Tot i això, la recuperació no és completa. Aquest fet podia ser degut a tres possibilitats: i) que el H₂O₂ provoqués l'oxidació d'aminoàcids diferents a les cisteïnes, importants per l'activitat, com podria ser per exemple, la histidina catalítica ii) que els grups tiols s'oxidessin a formes irreversibles iii) que l'oxidació amb H₂O₂ hagués provocat la pèrdua parcial de l'àtom de zinc i la reducció no revertís aquest efecte.

Per comprovar si la pèrdua d'activitat era deguda a la pèrdua de zinc, es va fer un assaig en el qual es recuperava conjuntament amb DTT i clorur de zinc (ZnCl₂). En aquest cas però, tampoc es va poder millorar la recuperació, la qual cosa apuntava a que Sir2 és oxidada a formes irreversibles o no reversibles per agents redactors.

1.4. Anàlisi *in vitro* de l'activitat de Sir2. Tractaments amb diamida

L'activitat Sir2 també es va determinar quan la proteïna recombinant es sotmetia a un estrès per diamida. La diamida és un agent oxidant amb capacitat de glutatiolar proteïnes en presència de GSH i d'estimular la formació de ponts disulfur, tan a nivell intramolecular com intermolecular. Tal com es mostra en l'esquema de la Figura 100, al tractar-se d'un assaig *in vitro*, la diamida s'utilitzava juntament amb baixes dosis de GSH per permetre el procés de glutatiolació. Igual que en el cas del H_2O_2 , en alguns casos tan sols es realitzava el tractament oxidant, mentre que en altres, s'analitzava l'activitat després d'afegir també, GSH o DTT.

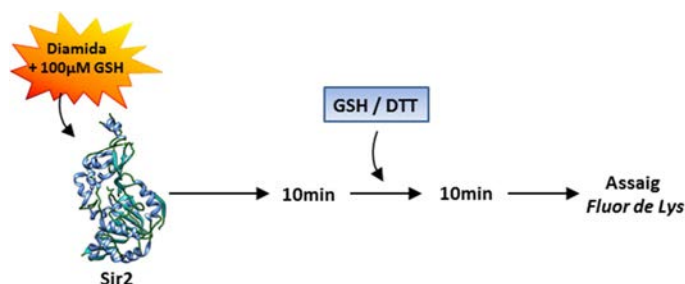


Figura 100. Esquema del protocol per la determinació de l'activitat desacetilasa de Sir2. La proteïna recombinant Sir2 va ser tractada amb diamida, juntament amb 100 µM de GSH, durant 10 minuts a temperatura ambient. Quan s'indica, es tractava durant 10 minuts més amb un agent reductor com el DTT o el GSH abans de procedir a mesurar l'activitat desacetilasa mitjançant l'assaig *Fluor de Lys*.

Els resultats (Figura 101) mostren que aquest agent oxidant també indueix la pèrdua d'activitat *in vitro* de Sir2, però es tracta d'un procés reversible, doncs l'activitat es recupera si posteriorment s'afegeix un agent reductor com el DTT o el GSH. A diferència del que succeïa amb l' H_2O_2 , quan s'afegeix un agent reductor després del tractament amb diamida, la recuperació és gairebé completa amb 70 µM diamida i molt alta que es tracta amb 150 µM diamida.

Per conèixer quin paper podia jugar el zinc en aquestes condicions, també es va provar de recuperar l'activitat amb DTT juntament amb $ZnCl_2$. Després del tractament amb diamida, es va incubar durant 30 minuts la proteïna amb DTT i diferents concentracions de $ZnCl_2$. Els resultats van mostrar que l'aportació de zinc seguia sent incapaç de

recuperar totalment l'activitat, ja que cap de les concentracions utilitzades van permetre millorar els nivells de recuperació.

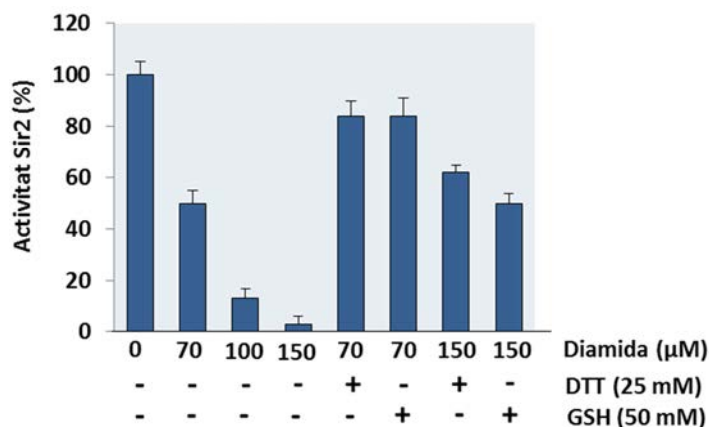


Figura 101. Efecte de la diamida en l'activitat Sir2. La proteïna Sir2 (5 μg – 1.5 μM) es va mesurar mitjançant l'assaig *Fluor de Lys*, després del tractament durant 10 minuts a temperatura ambient amb diferents concentracions de diamida juntament amb 100 μM de GSH. Quan s'indica, després de l'oxidació es va tractar durant 10 minuts més, amb 25mM de DTT o 50 mM de GSH abans de fer la mesura d'activitat desacetilasa.

Per comprovar si la diamida, juntament amb baixes concentracions de GSH estava glutatiolant Sir2, es va realitzar un *Western Blot* anti-GSH. Les mateixes condicions de diamida per assajar l'activitat desacetilasa, en les quals es detectava la disminució de l'activitat, van ser utilitzades per comprovar la glutatiolació de Sir2 (Figura 102).

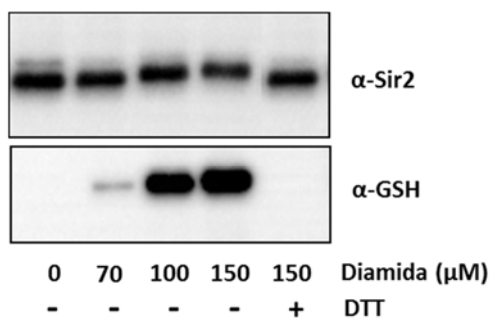


Figura 102. Glutatiolació *in vitro* de Sir2. La proteïna Sir2 purificada (5 μg – 1.5 μM) va ser tractada amb diamida a les concentracions indicades, juntament amb 100 μM de GSH durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, va ser separada en un gel SDS-PAGE no reductor i es va realitzar un *Western Blot* anti-GSH per detectar la glutatiolació i anti-Sir2 per determinar els nivells totals de proteïna Sir2.

Els resultats obtinguts demostren que Sir2 perd activitat desacetilasa quan es glutatiola. A concentracions creixents de diamida, major és la pèrdua d'activitat i major el grau de glutatiolació de Sir2 detectat. L'addició de DTT després del tractament amb diamida, reverteix la glutatiolació, tal com era d'esperar. Per tant, aquests resultats, juntament amb els obtinguts en l'assaig d'activitat, apunten que hi ha glutatiolació i que l'oxidació de cisteïnes inactiva Sir2 d'una forma majoritàriament reversible.

Amb el fi de verificar la glutatiolació de Sir2 és van dur a terme diferents intents per identificar-la per empremta peptídica o PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*), ionitzant els pèptids generats després de la digestió de la proteïna amb un espectròmetre de masses MALDI-TOF *AutoflexSpeed* (Bruker Daltonics). Tot i que es van realitzar digestions tan amb tripsina com amb quimiotripsina i pepsina, mai es va poder arribar ni a identificar els pèptids que contenien cisteïnes, i per tant, va ser impossible validar la glutatiolació per aquesta tècnica.

1.5. Estudi *in vitro* del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades

Un cop comprovat que Sir2 es glutatiola *in vitro* i que l'oxidació d'aquesta proteïna comporta la seva inactivació, es va determinar el nombre de residus de cisteïna que s'oxiden quan Sir2 es sotmet a condicions d'estrès oxidatiu per diamida. Per dur a terme aquest objectiu es va utilitzar una maleimida, concretament el PEG (*Methoxypolyethylene glycol maleimide*), que presenta la característica d'unir-se a les cisteïnes que es troben en el seu estat reduït. El PEG presenta un pes molecular de 5 kDa, provocant així un augment en el pes molecular de Sir2 proporcional al nombre de molècules de PEG unides als grups tiol.

Després d'obtenir la proteïna Sir2 recombinant i tractar-la o no amb les concentracions de diamida d'interès juntament amb 100 μ M GSH, es va realitzar la derivatització amb PEG. Així, al separar les mostres en un gel SDS-PAGE reductor i realitzar un *Western Blot* anti-Sir2 es detectarà un increment de pes molecular en Sir2 proporcional al nombre de cisteïnes oxidades durant el tractament amb diamida (Figura 103).

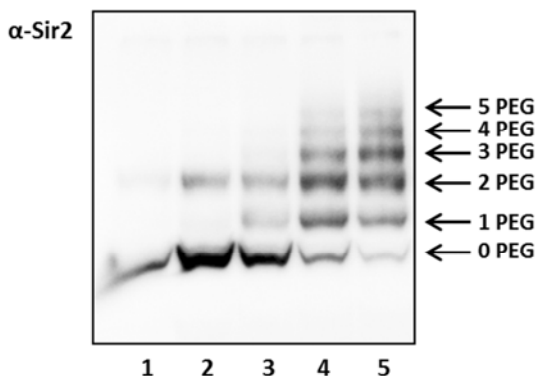


Figura 103. Determinació del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades durant el tractament amb diamida. La proteïna recombinant Sir2 va ser tractada amb diamida o diamida + GSH durant 10 minuts a temperatura ambient. Després de diluir-la amb tampó 50 mM Tris-HCl pH=8 es va incubar 30 minuts a 30°C amb 1 mM NEM. Posteriorment, es va tractar amb 2,5 mM DTT durant 20 minuts a 30°C i es va incubar amb 10 mM PEG durant 30 minuts a 30°C. Finalment es van separar les mostres en un gel SDS-PAGE reductor per realitzar un *Western Blot* anti-Sir2 on es mostra; 1: Sir2 control, 2: Sir2 + 10 μ M diamida, 3: Sir2 + 10 μ M diamida/10 μ M GSH, 4: Sir2 + 100 μ M diamida/100 μ M GSH i 5: Sir2 + 150 μ M diamida/100 μ M GSH.

Els resultats mostren una única banda en la condició control (carril 1) a l'altura de Sir2, indicant absència de cisteïnes oxidades. Per contra, en la condició de tractament amb només diamida (carril 2), apareix una nova banda resultant de la unió de dues molècules de PEG, indicant que en aquest cas s'ha generat un pont disulfur. Quan a més de la diamida s'afegeix GSH (carril 3) apareix una nova banda que equivaldria a un sol PEG i estaria indicant una monoglutatiolació de Sir2. En els casos en que s'augmentava les concentracions de diamida/GSH apareixen bandes amb 3, 4 i 5 molècules de PEG, que podrien explicar-se per una barreja de formes poliglutatiolades de Sir2, a més de la presència d'un o més ponts disulfur. Amb 150 μ M diamida/100 μ M GSH les formes amb 2 i 3 cisteïnes oxidades són les majoritàries i quasi no es detecta Sir2 reduït.

2. ESTUDI DEL PAPER DE GRX3 I GRX4 EN LA DESGLUTATIOLACIÓ DE SIR2

La glutatiolació, una modificació transcripcional en la qual el GSH present a la pròpia cèl·lula pot reaccionar no enzimàticament amb els grups tiol de les cisteïnes, s'ha

descriu que està implicada en la regulació de la funció de diverses proteïnes. Un dels enzims que pot catalitzar la reducció de les proteïnes glutatiliades són les Grxs. En llevat, les úniques Grxs que s'han descrit que poden tenir una localització nuclear com Sir2, són Grx3 i Grx4. A més, les Grxs, d'acord amb el descrit per Deponte and Lillig (Deponte and Horst Lillig 2015), presenten una superfície carregada positivament que podria ser beneficiosa per la interacció d'aquestes amb els grups carboxil negativament carregats del glutatió. De forma contrària, les Trxs, segons aquests mateixos autors, presentarien una superfície carregada positivament que no afavoriria aquesta interacció amb el glutatió. A més, fins al moment, no existeixen evidències clares respecte la presència de les Trxs al nucli. Una altra evidència descrita per Jung and Thomas apuntaria que les glutaredoxines tenen la capacitat de desglutatiolar proteïnes glutatiliades de cèl·lules hepàtiques de rata, amb molta major eficiència que les tioredoxines (C. H. Jung and Thomas 1996).

Donat que en els experiments previs es va demostrar que l'activitat desacetilasa de Sir2 depèn del seu estat redox, concretament, que la seva oxidació (almenys per glutatiolació) comporta una pèrdua de l'activitat però que es tracta d'un procés reversible per agents reductors, ens vam qüestionar si les Grxs eren capaces de revertir també aquest procés en Sir2. Per tant, es va analitzar el paper d'ambdues Grxs monotíliques, després d'expressar-les i purificar-les d'*E. coli*.

2.1. Inducció i purificació de Grx3 i Grx4

Per poder dur a terme els assajos de desglutatiolació de Sir2 es requeria de les proteïnes recombinants Grx3 i Grx4. Per obtenir-les, es va transformar les cèl·lules competents BL21 amb els plasmidis pET21a-Grx3 i pET21a-Grx4, per poder induir l'expressió de Grx3 i Grx4, respectivament. Igual que en el cas de Sir2, la inducció d'ambdues proteïnes es va dur amb 1 mM IPTG i posteriorment, es va comprovar la bona inducció en un gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie*. Tal com mostren els resultats (Figura 104), la inducció de Grx3 i Grx4 va tenir lloc correctament. Així, es va procedir amb el protocol de purificació d'ambdues proteïnes seguint el protocol detallat a l'apartat (apartat 5.2 de Materials i Mètodes) de materials i mètodes.

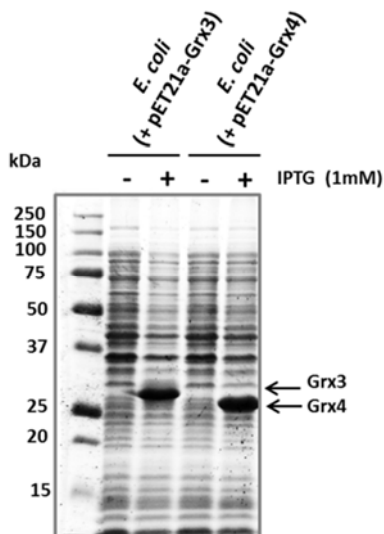


Figura 104. Comprovació de la inducció de l'expressió de les proteïnes Grx3 i Grx4. Gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie* on es mostra l'extracte d'*E. coli* contenint el plasmidi pET21a-Grx3 i pET21a-Grx4 sense induir i induït amb IPTG 1mM durant 4 hores a 30°C. Les proteïnes Grx3 i Grx4 tenen un pes molecular de 28,1 kDa i 27,5 kDa, respectivament.

Bàsicament, es va utilitzar una columna d'intercanvi aniónic DEAE. Les proteïnes unides a la columna, entre elles Grx3 (o Grx4) es van eluir amb NaCl i posteriorment, es van carregar en una columna Sephacryl S-200 per tal de recuperar Grx3 (o Grx4). La puresa es va comprovar en un gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie*.

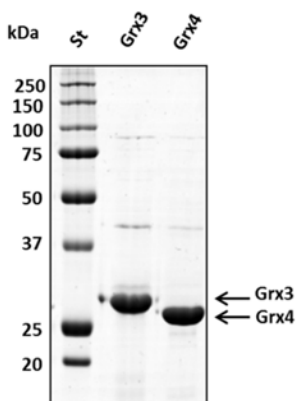


Figura 105. Comprovació de la purificació de les proteïnes recombinants Grx3 i Grx4. Mitjançant un gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie* es va comprovar la purificació de Grx3 i Grx4 amb un pes molecular de 28,1 kDa i 27,5 kDa, respectivament.

Els resultats (Figura 105) mostren que ambdues Grxs van ser purificades amb una alta puresa, la qual cosa va permetre continuar amb els assajos corresponents.

2.2. Anàlisi de la desglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4

Un vegada comprovat que Sir2 es glutatiola *in vitro* i que aquesta oxidació comporta la pèrdua d'activitat desacetilasa, es va voler estudiar quin era el paper de les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 pel que fa a aquesta modificació i si eren o no capaces de desglutiatolar Sir2. Per dur a terme aquest estudi es va procedir a realitzar un assaig basat en el compost Di-Eosina-GSSG, format per la reacció entre la eosina i el GSSG. Aquest presenta una fluorescència basal però augmenta fins a 70x quan el glutatió reacciona amb la proteïna a estudiar, en aquest cas, quan Sir2 es glutatiola. La primera aproximació que es va dur a terme va ser verificar si realment, la Di-Eosina-GSSG és capaç de glutatiolar Sir2. A més, donat que Sir2 co-purifica amb la xaperona DnaK d'*E. coli* (Figura 96) i que aquesta presenta un residu de cisteïna a la seva estructura, es va voler comprovar que l'oxidació amb el compost Di-Eosina-GSSG és específica de Sir2 i no de DnaK. Per comprovar-ho, es va realitzar una prova amb la proteïna recombinant Sir2, sense tractar-la o tractant-la amb el compost Di-Eosina-GSSG. Posteriorment, es van separar les dues mostres en un gel SDS-PAGE no reductor per detectar la fluorescència (l'oxidació de Sir2) i posteriorment, es va realitzar una tinció amb *Blau de Coomassie* per assegurar la presència de Sir2.

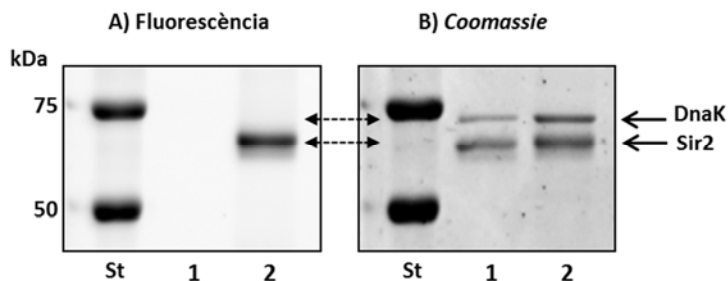


Figura 106. Glutatiolació de Sir2 amb el compost Di-Eosina-GSSG. Amb l'objectiu de comprovar que Sir2 podia ser glutatiolada, es va tractar la proteïna recombinant Sir2 (5 μ M) amb la Di-Eosina-GSSG (20 μ M) durant 30 minuts a 25°C. La mostra (1) control sense tractar i (2) la mostra tractada, es van separar en un gel SDS-PAGE no reductor. (A) Detecció de la fluorescència deguda a la glutatiolació i (B) Tinció del gel amb *Blau de Coomassie*.

Sir2 sí que és capaç de ser glutatiolada pel compost Di-Eosina-GSSG (Figura 106). Quan es realitza el tractament, al gel es pot detectar una banda fluorescent (que no apareix a la condició control), i que indica que Sir2 s’ha glutatiolat. A més, la banda fluorescent apareix a l’altura del pes molecular de Sir2 (63 kDa), i no apareix una segona banda a l’altura de la DnaK (69 kDa), la qual cosa indica que tot i que aquesta xaperona presenta un residu de cisteïna, aquesta no és oxidada, sent tota la fluorescència detectada exclusiva de la glutatiolació de Sir2. Així, la proteïna Sir2 purificada va ser tractada amb Di-Eosina-GSSG i després incubada sense (control) o amb Grx3 o Grx4 a diferents temps. Finalment, cada mostra va ser separada en un gel SDS-PAGE no reductor per analitzar la glutatiolació i en paral·lel, es va obtenir una mostra de cada temps per comprovar els nivells totals de Sir2 mitjançant un *Western Blot* anti-Sir2.

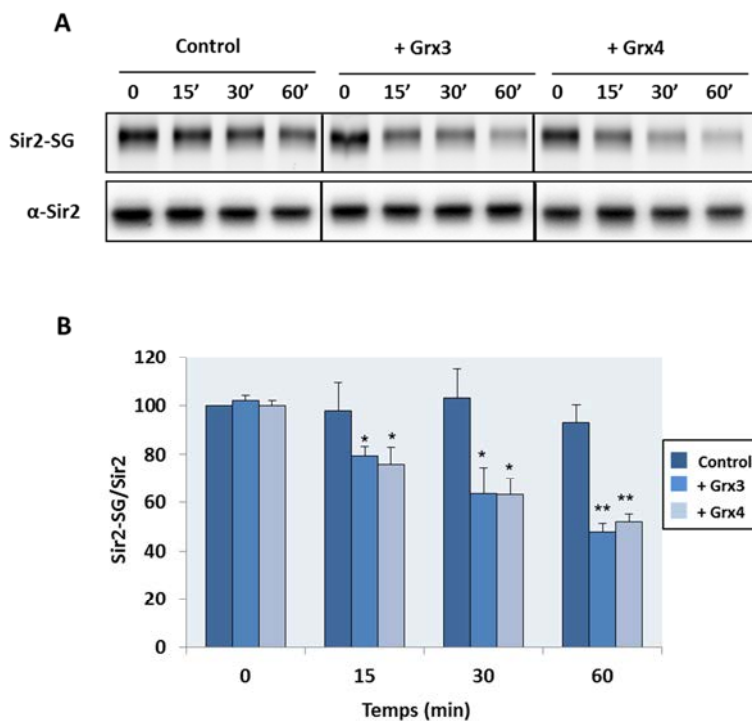


Figura 107. Deglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4. La proteïna recombinant Sir2 (5 μM), prèviament glutatiolada amb el compost Di-Eosina-GSSG, es va incubar sense (control) o amb Grx3 o Grx4 (12.5 μM) durant 0, 15, 30 o 60 minuts. (A) Les mostres van ser separades en un gel SDS-PAGE no reductor per tal de determinar els nivells de Sir2 glutatiolada mitjançant fluorescència, i els nivells de Sir2 total mitjançant un *Western Blot* anti-Sir2. (B) Quantificació relativa dels nivells de Sir2 glutatiolada (Sir2-SG) respecte els nivells de Sir2 totals. La cinètica aproximada seria de $5,6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ si s’assumeix que a temps zero Sir2 es troba completament monoglutatiolada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Els resultats (Figura 107) mostren que tan Grx3 com Grx4 són capaces de desglutatiolar Sir2, encara que no es tracti d'un procés catalític. Els efectes de la desglutatiolació són més clars a mesura que el temps d'incubació amb les glutaredoxines és també major, tot i que als 15 minuts ja s'observen diferències significatives respecte la condició control sense els enzims reductors.

2.2.1. Especificitat de la desglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4

Per corroborar el paper específic de Grx3 i Grx4 en la desglutatiolació de Sir2 i que aquesta no era deguda a un factor inespecífic, es va dur a terme el mateix experiment de forma idèntica, però en aquest cas, ambdues glutaredoxines van ser prèviament incubades amb IAA amb la intenció de bloquejar-ne les cisteïnes i per tant, evitar que poguessin dur a terme el procés de desglutatiolació (Figura 108A). A més, es va dur a terme la reacció de desglutatiolació amb la proteïna recombinant Grx3 mutant per C211 (Figura 108B), que correspon a la cisteïna catalítica de la glutaredoxina. D'aquesta forma, es podria comprovar per una banda l'especificitat de Grx3 en la desglutatiolació de Sir2, i per una altra, es podria establir que realment el residu C211 presenta activitat catalítica, i no la resta de cisteïnes de Grx3. Per últim, es va dur a terme el mateix assaig de desglutatiolació però substituint les glutaredoxines per GSH a altes concentracions, semblats a la fisiològiques, 1 mM i 3 mM (Figura 108C).

En els resultats es pot observar que en tots els casos, és a dir, quan es bloquegen les cisteïnes de les glutaredoxines, quan Grx3 presenta la cisteïna catalítica mutada o quan s'incuba amb concentracions fisiològiques de GSH, Sir2 segueix estant glutatiolada, apuntant que la desglutatiolació de Sir2 requereix específicament de Grx3 i/o Grx4. A més, el fet que la incubació amb Grx3-C211S no sigui capaç de desglutatiolar Sir2 està indicant que és requereix de l'activitat de Grx3 i que a més, aquesta activitat la duu a terme C211 i no la resta de cisteïnes de la proteïna.

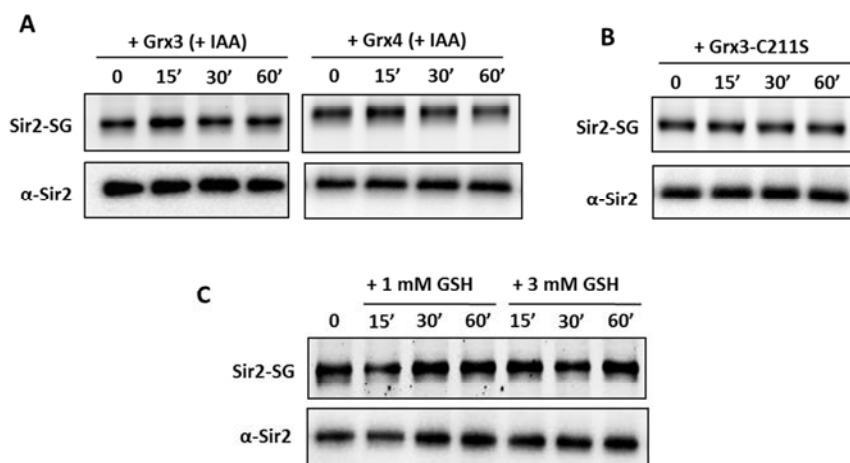


Figura 108. Comprovació de l'especificitat de la deglutatiolació de Sir2 mitjançant Grx3 i Grx4. La proteïna recombinant Sir2 (5 μ M), prèviament glutatiolada amb la Di-Eosina-GSSG, es va incubar durant 0, 15, 30 o 60 minuts (A) amb Grx3 o Grx4 (12,5 μ M) prèviament tractades amb 50 mM IAA, (B) amb el mutant Grx3-C211S (12,5 μ M) i (C) amb 1 mM o 3 mM de GSH. En tots els casos, les mostres van ser separades en un gel SDS-PAGE no reductor per tal de determinar els nivells de Sir2 glutatiolada mitjançant fluorescència i els nivells de pSir2 total mitjançant un *Western Blot* anti-Sir2.

3. INTERACCIÓ ENTRE SIR2 I LES GLUTAREDOXINES GRX3 I GRX4

En els resultats presentats anteriorment es va demostrar que l'activitat *in vitro* de Sir2 depèn del seu estat redox i que es tracta d'un procés reversible. A més, una de les modificacions postraduccionals que inhibeixen l'activitat de Sir2 és la glutatiolació. Tal com es va demostrar, aquesta oxidació mediada pel glutatió pot ser revertida per les glutaredoxines Grx3 i Grx4, la qual cosa va portar a analitzar el paper d'aquestes oxidoreductases *in vivo*. Primerament però, es va analitzar si realment existia interacció *in vivo* entre ambdues proteïnes i Sir2.

3.1. Estudi de la interacció entre Grx3/4 i Sir2 en soques sobreexpressores

Per analitzar la possible interacció entre Sir2 i Grx3 i Grx4 es va decidir realitzar immunoprecipitacions. Primer, es va immunoprecipitar Sir2 en les soques sobreexpressores per Grx3 (*tetO₇-GRX3-3HA*) i Grx4 (*tetO₇-GRX4-3HA*) i es va analitzar la presència d'aquestes glutaredoxines per *Western Blot*. Tal com mostren els resultats

(Figura 109), quan es va immunoprecipitar Sir2 es va poder detectar la presència, tan de Grx3 com de Grx4, mitjançant *Western Blot* anti-HA. La soca WT es va utilitzar com a control, doncs no sobreexpressava ni tenia el marcatge amb l'epítot HA de Grx3 ni Grx4.

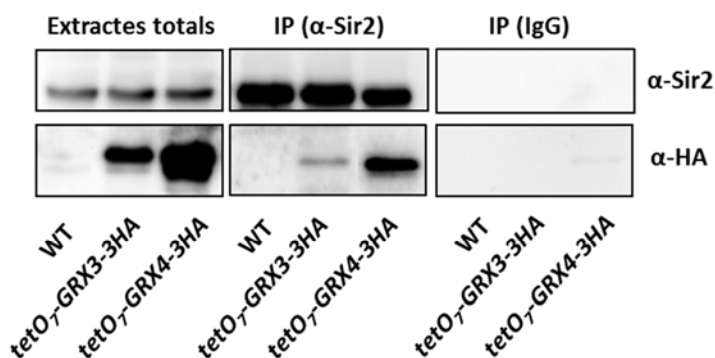


Figura 109. Detecció de la interacció entre Sir2 i Grx3/4 en les soques sobreexpressores. Sir2 va ser immunoprecipitada amb un anticòs anti-Sir2 i ProteïnaG-Agarosa en la soca WT i en les soques sobreexpressores *tetGRX3-HA* i *tetGRX4-HA* crescudes exponencialment en YPD. La immunoprecipitació amb IgG i la soca WT sense marcatge HA van ser utilitzades com a control negatiu. La detecció de Grx3 i Grx4 es va dur a terme mitjançant un *Western Blot* anti-HA.

Val a dir que encara que tan la soca *tetO₇-GRX3-3HA* com *tetO₇-GRX4-3HA* presenten GRX sota el mateix promotor, la soca *tetO₇-GRX4-3HA* presenta uns nivells molt més elevats de Grx4 que la sobreexpresora de Grx3. Això provoca que també immunoprecipiti més Grx4 que Grx3.

3.2. Estudi de la interacció entre Grx3/4 i Sir2 en la soca WT

Per poder corroborar els resultats mostrats anteriorment, però amb quantitats fisiològiques de Grx3 i Grx4, es va dur a terme el mateix assaig d'immunoprecipitació amb la soca WT, emprant un anticòs capaç de detectar la presència d'ambdues Grx3 i Grx4. Igual que en l'experiment anterior, es va immunoprecipitar Sir2 i després es va analitzar la presència de Grx3/4. Els resultats (Figura 110) mostren que existeix interacció entre Sir2 i Grx3 i Grx4, en concordança amb el que s'havia descrit amb les soques sobreexpressores i per tant, es va confirmar que Sir2 està interaccionant físicament amb Grx3 i Grx4. Els resultats d'interacció obtinguts recolzarien el que

anteriorment s'havia descrit en aquest treball, és a dir, que ambdues glutaredoxines monotioliques tenen la capacitat de desglutatiolar Sir2, almenys *in vitro*.

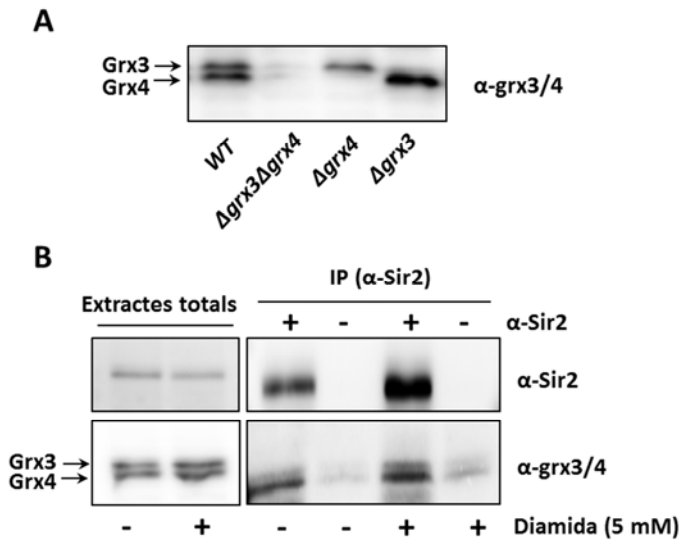


Figura 110. Detecció de la interacció entre Sir2 i Grx3/4 en la soca WT. (A) Detecció dels nivells endògens de Grx3 i Grx4 utilitzant un anticòs anti-Grx3/4 capaç de reconèixer ambdues glutaredoxines. (B) Sir2 va ser immunoprecipitada amb un anticòs anti-Sir2 i ProteïnaG-Agarosa en la soca WT crescuda exponencialment en YPD, tractada o no amb diamida 5 mM durant 1 hora. La detecció de Grx3 i Grx4 a l'immunoprecipitat es va dur a terme mitjançant un *Western Blot* anti-Grx3/4.

Cal destacar que no es van detectar diferències d'interacció entre Sir2 i Grx3/4 entre la condició control, i la condició tractada amb 5 mM de diamida durant 1 hora.

4. ANÀLISI *IN VIVO* DE L'ESTAT REDOX DE SIR2

Una vegada descrit que tan Grx3 com Grx4 són capaces de desglutatiolar Sir2 *in vitro* i que a més, aquestes dues oxido-reductases estan interaccionant físicament amb Sir2 *in vivo*, ens vam preguntar quin era l'estat redox de Sir2 i quin paper podien desenvolupar aquestes glutaredoxines monotioliques en aquest cas, tan en condicions normals com d'estrès oxidatiu.

4.1. Estudi de la viabilitat cel·lular en condicions d'estrès oxidatiu

En primer lloc calia determinar quines eren les condicions d'estrès oxidatiu per diamida a les quals es podien sotmetre les cèl·lules sense que arribessin a ser letals. Per això, es van realitzar assajos de viabilitat en placa, de la soca WT i de les soques mutants per les Grxs d'interès, després de tractar les cèl·lules en cultiu 1 hora amb concentracions de 4 mM i 5 mM diamida.

Tal com mostren els resultats (Figura 111), les concentracions de 4 mM i 5 mM diamida no afecten la viabilitat de cap de les soques d'interès, per tant, aquestes condicions d'estrès oxidatiu podien ser utilitzades per les posteriors anàlisis de l'estat redox de Sir2.

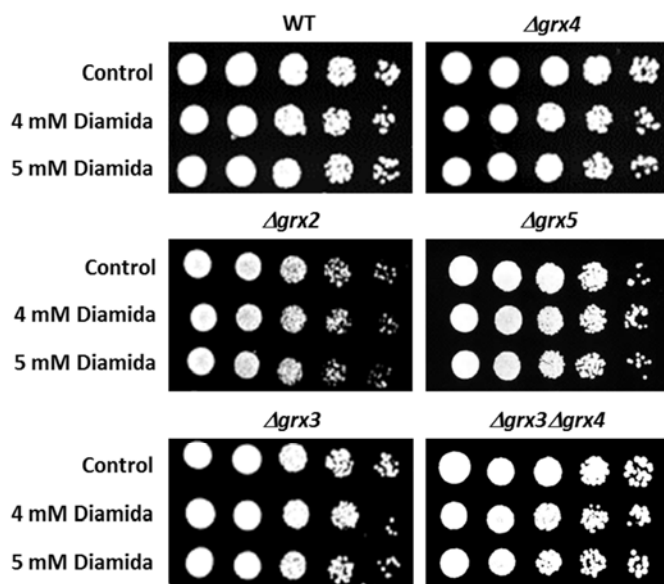


Figura 111. Estudi de viabilitat cel·lular a l'estrès per diamida. Els cultius de les diferents soques d'interès creixuts exponencialment en YPD van ser tractats durant 1 hora amb diamida 4 mM o 5 mM i posteriorment, es van fer dilucions serials (1:5) i es van sembrar les cèl·lules en plaques YPD, les quals es van deixar créixer durant 2 dies a l'estufa a 30°C, a excepció de les soques $\Delta grx5$ i $\Delta grx3\Delta grx4$ que es van deixar durant 3 dies degut al seu temps de generació més lent.

4.2. Efecte de les glutaredoxines en l'estat redox de Sir2

En els resultats anteriorment presentats, es va concloure que l'activitat *in vitro* de Sir2 depèn del seu estat redox d'una forma reversible i que les glutaredoxines monotioliques Grx3 i Grx4 són capaces de desglutatiolar Sir2 *in vitro*. D'acord amb aquests resultats, ens vam plantejar estudiar quin efecte podria tenir *in vivo* la manca de les glutaredoxines pel que fa a l'estat redox de Sir2. A fi de dur a terme la monitorització *in vivo* de l'estat redox de les cisteïnes de Sir2 es va realitzar un assaig basat en el compost AMS (*4'-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid*). Igual que altres derivats de la maleïmida, l'AMS presenta la característica d'unir-se a les cisteïnes que es troben en el seu estat reduït. L'AMS presenta un pes molecular de 536 kDa, característica que provocarà un augment en el pes molecular de les proteïnes proporcional al nombre de maleïmides unides als grups tiol. És a dir, com més nombre de cisteïnes reduïdes presenti Sir2, major increment en el pes molecular es detectarà. L'objectiu d'aquest estudi era analitzar les diferències de l'estat redox de Sir2 en una soca WT respecte les soques delecionades per les glutaredoxines Grx3 i Grx4, ambdues de localització nuclear i citosòlica. Per confirmar que les possibles diferències observades eren degudes específicament a l'absència de Grx3 i Grx4 i no a la resta de glutaredoxines, es va realitzar el mateix assaig però amb les soques delecionades per la glutaredoxina ditiòlica Grx2, de localització citosòlica, i la monotiolica Grx5 que presenta localització mitocondrial. Així, la soca WT i les soques delecionades per les glutaredoxines d'interès van ser tractades en cultiu amb concentracions de 4 mM i 5 mM diamida durant 1 hora i posteriorment, es va seguir el protocol descrit a continuació (Figura 112).

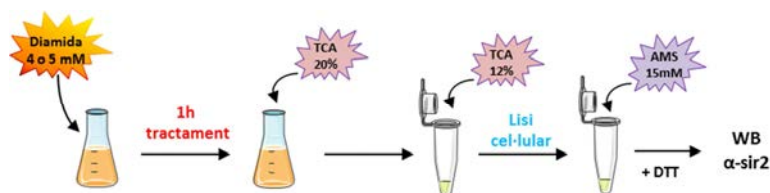


Figura 112. Protocol de determinació de l'estat redox de Sir2. Les cèl·lules crescudes exponencialment en YPD van ser tractades amb 4 mM o 5 mM diamida durant 1 hora i ràpidament, es va afegir 20% TCA al cultiu per tal de mantenir l'estat redox de les proteïnes. Es va obtenir l'extracte cel·lular amb TCA al 12,5% i posteriorment, es va derivatitzar amb AMS utilitzant un tampó contenint 1% SDS. Finalment, es va afegir DTT i es va realitzar un *Western Blot* anti-Sir2.

La Figura 113 mostra com varia l'estat redox de Sir2 quan es tracta amb 4 mM o 5 mM diamida durant 1 hora respecte la condició control.

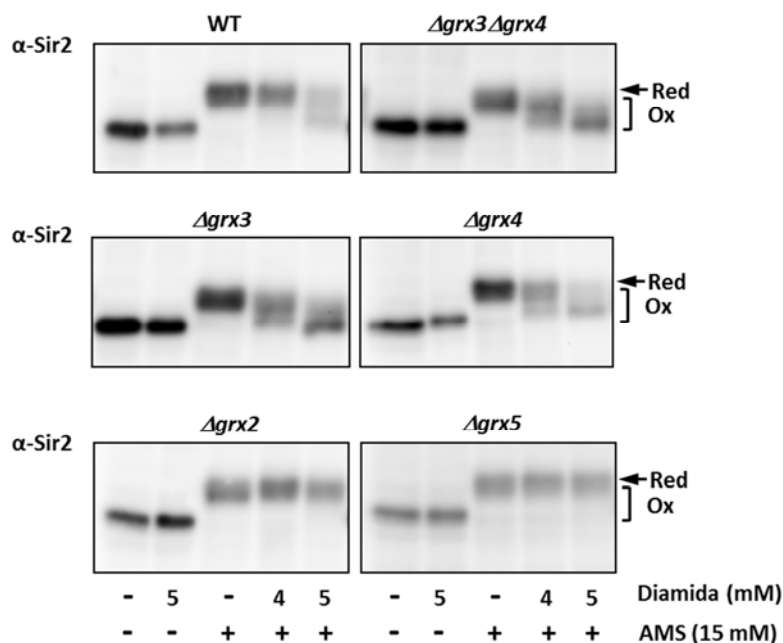


Figura 113. Anàlisi de l'estat redox de Sir2. Per analitzar l'estat redox de Sir2, les diferents soques d'interès van ser tractades amb 4 mM o 5 mM diamida durant 1 hora, es van recollir les cèl·lules amb TCA i els tiols lliures de les proteïnes van ser modificats per la reacció amb l'AMS. Les mostres van ser separades en un gel SDS-PAGE i Sir2 va ser detectada mitjançant un *Western Blot* anti-Sir2.

Si s'analitzen els resultats obtinguts en la soca WT, es pot observar com l'estat redox de Sir2 presenta modificacions quan les cèl·lules són sotmeses a condicions d'estrès oxidatiu. A diferència de la concentració de 4 mM diamida, quan es tracten les cèl·lules amb 5 mM diamida, la mobilitat de Sir2 canvia. S'observa una *smear* que ens indica que Sir2 no està completament oxidada, però sí que algunes de les seves cisteïnes s'han oxidat. Contràriament, si s'analitza el tractament amb 4 mM diamida en les soques $\Delta grx3$, $\Delta grx4$ i $\Delta grx3 \Delta grx4$ s'observa que en aquest cas, alguna de les cisteïnes sí que s'ha oxidat, a diferència del que s'observava en la mateixa condició de la soca WT. De la mateixa manera, tan en els mutants simples com en el doble mutant per les glutaredoxines, quan es tracten amb concentracions de 5 mM diamida, s'observa una banda de menor pes molecular més intensa, que ens estaria indicant que la majoria de

les cisteïnes de Sir2 s'han oxidat en aquestes condicions de tractament. Pel que fa a les soques $\Delta grx2$ i $\Delta grx5$ utilitzades com a controls, els resultats van ser sorprenents, donat que no es va observar oxidació de Sir2 en les condicions d'estrès oxidatiu establertes. Tot i que no va ser objectiu d'aquest estudi, una explicació podria ser que aquestes dues soques mutants presentessin algun sistema antioxidant induït que fes les cèl·lules més resistents front a l'estrès oxidatiu per diamida a les quals se les va sotmetre.

Cal dir que degut a l'elevat nombre de cisteïnes que presenta Sir2, 11 en total, resulta impossible determinar de forma exacta el nombre de cisteïnes oxidades i reduïdes. Així, aquesta tècnica va permetre comparar l'estat redox de Sir2 de les diferents soques d'una forma més qualitativa que no pas quantitativa. Assumint aquesta limitació però tenint en compte les clares diferències observades, es pot arribar a la conclusió que Sir2 està més oxidada quan les glutaredoxines Grx3 i Grx4 no hi estan presents.

4.3. Efecte de l'acumulació de ferro en l'oxidació de Sir2

Com ja es ben conegut, el ferro, juntament amb l' H_2O_2 generat de forma endògena a les cèl·lules, a través del mecanisme conegut com la reacció de Fenton, poden estar implicats en la generació de radicals lliures que, a la vegada, poden oxidar proteïnes, entre d'altres macromolècules. Tal com està descrit a la bibliografia (Pujol-Carrion et al. 2006) i mostren els resultats (Figura 114A), les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ acumulen elevats nivells de ferro intracel·lular. Aquest fet podria estar relacionat amb la major oxidació de Sir2 que presenten aquests mutants. Per descartar-ho i reforçar el rol protector específic de Grx3 i Grx4, es va afegir al medi de cultiu YPD, diferents concentracions de batofenantrolina (BPS), un quelant del ferro, que segresta el ferro present al medi. D'aquesta forma, la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ es va fer créixer amb el medi YPD contenint diferents concentracions de BPS, i posteriorment, es van analitzar els nivells de ferro intracel·lular d'aquestes cèl·lules.

Tal com mostren els resultats (Figura 114B), el medi YPD + 70 μM de BPS permet disminuir el ferro de les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ a nivells similars als que presenta una soca WT. Per tant, utilitzant aquesta concentració de BPS (70 μM), es va procedir a realitzar

el mateix assaig d'anàlisi de l'estat redox de Sir2 en la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ amb el compost AMS (Figura 114C).

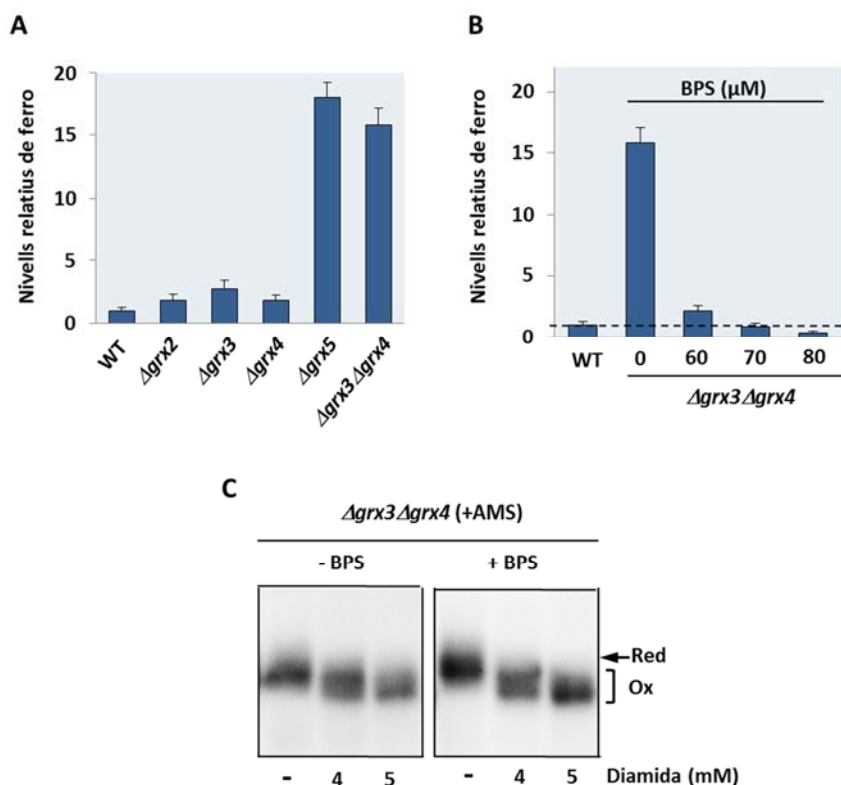


Figura 114. Anàlisi de l'efecte del ferro en l'oxidació de Sir2. (A) Les soques de les cèl·lules d'interès van ser digerides amb àcid nítric i es van mesurar els nivells de ferro total, indicats respecte la soca WT. (B) Les cèl·lules de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ es van fer créixer amb medi YPD contenint diferents concentracions del quelant de ferro BPS, i es va mesurar el ferro total respecte la soca WT. (C) Es determina l'estat redox de Sir2 amb les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes amb medi YPD contenint 70 μ M de BPS.

Quan s'analiza l'estat redox de Sir2 en la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ en aquestes condicions, s'observa que se segueix oxidant quan es tracta amb 4 mM i 5 mM diamida, igual que passava quan s'anализava amb les cèl·lules que sí acumulaven ferro. A més, tal com mostra la Figura 113, la soca $\Delta grx5$ no presenta una major oxidació de Sir2 i no obstant, també acumula nivells de ferro similars a $\Delta grx3\Delta grx4$. Per tant, això ens estaria demostrant que el ferro no és el responsable de l'oxidació de Sir2, sinó que es tracta

d'un procés únicament degut a l'absència de Grx3 i Grx4, indicant que podrien estar jugant un paper protector de Sir2 front l'oxidació per diamida.

4.4. Estudi de Grx3 i Grx4 com a possibles sistemes reductors de Sir2

Donats els resultats anteriors en els quals es demostrava que Grx3 i Grx4 desenvolupen un paper protector de Sir2 front a l'oxidació per diamida, es va voler estudiar si aquestes dues glutaredoxines monotioliques també eren capaces d'actuar com a sistemes fisiològics reductors de Sir2. Per demostrar-ho es va analitzar l'estat redox de Sir2 seguint la mateixa metodologia de l'AMS descrita anteriorment. En aquest cas però, es van realitzar tractaments amb diamida de les soques d'interès durant 1 hora i posteriorment, es van rentar les cèl·lules i es van deixar recuperar amb medi YPD durant 1 hora o 2 hores. El procediment que es va seguir s'esquemmatitza a la Figura 115:

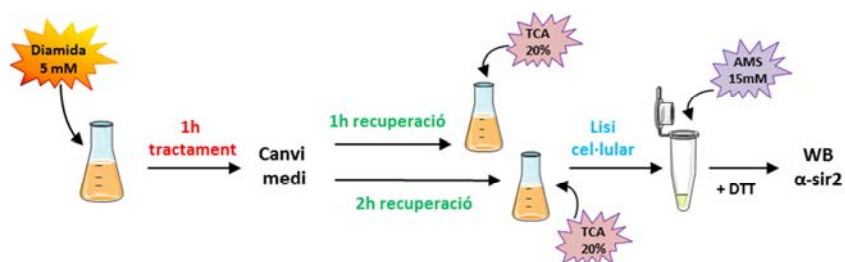


Figura 115. Protocol de determinació de la recuperació de l'estat redox de Sir2. Les cèl·lules, després de ser tractades amb 5mM diamida durant 1 hora, es renten i es deixen recuperar durant 1 hora o 2 hores amb medi YPD fresc. Després del temps de recuperació s'afegeix 20% TCA al cultiu per tal de mantenir l'estat redox de les proteïnes. S'obté l'extracte cel·lular amb TCA al 12,5% i posteriorment, es derivatitza amb AMS. Finalment, es realitza un *Western Blot* anti-Sir2.

La Figura 116 mostra els resultats referents a l'estat redox de Sir2 de la soca WT i les soques mutants per Grx3, Grx4 o ambdues. En tots els casos, es mostren les mostres sense AMS, i les mostres que sí han estat derivatitzades amb AMS.

Tal com mostren els resultats d'anàlisi de Grx3 i Grx4 com a possibles sistemes reductors de Sir2 (Figura 116), existeixen clares diferències entre la soca WT i la soca

Δgrx3Δgrx4. Concretament, als 60 minuts però sobretot als 120 minuts, es pot apreciar com la soca WT ha estat capaç de recuperar parcialment l'estat redox de Sir2, mentre que la soca *Δgrx3Δgrx4* han estat totalment incapaç de fer-ho. Pel que fa als mutants simples, la soca *Δgrx3* té un comportament més similar a la *Δgrx3Δgrx4* que a la *Δgrx4*, la qual presenta un patró més similar a la soca WT. És important recalcar la limitació de la tècnica pel que fa a una quantificació exacta del nombre de cisteïnes recuperades degut a l'elevat nombre de residus de cisteïna que presenta Sir2. No obstant, sí que es pot distingir de forma qualitativa que, a diferència de la soca *Δgrx3Δgrx4* la soca WT sí que és capaç de reduir Sir2.

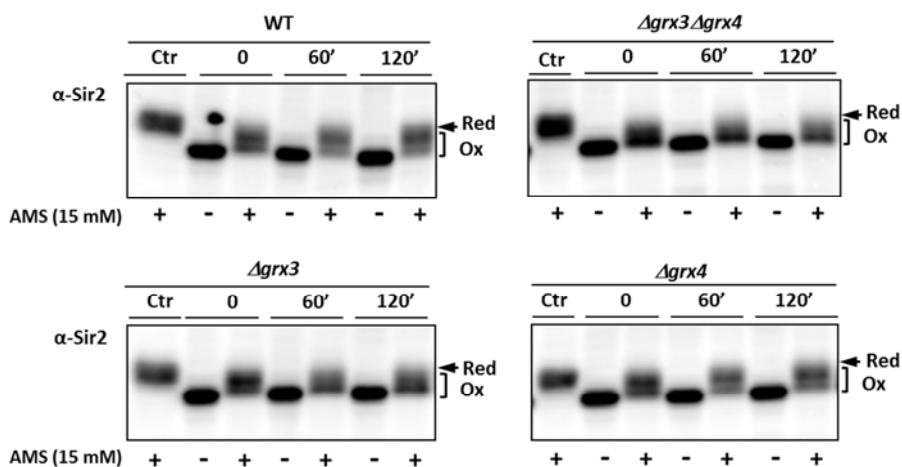


Figura 116. Recuperació de l'estat redox de Sir2. Anàlisi de l'estat redox de Sir2 de les diferents soques, després de ser tractades durant 1 hora amb 5 mM diamida i deixar-les recuperar durant 60' o 120' amb medi nou. Després de recollir les cèl·lules amb TCA i modificar els tiols lliures amb AMS, es va procedir a separar les mostres en un gel SDS-PAGE per analitzar-les en un *Western Blot* anti-Sir2. (Ctr, control sense tractar; 0, tractament sense recuperació, 60', tractament i recuperació d'1h; 120', tractament i recuperació de 2h).

Per tant, aquests resultats apunten a que Grx4 i sobretot Grx3, a part de protegir Sir2 front l'oxidació, també actuen com els seus sistemes reductors fisiològics.

5. ESTUDI *IN VIVO* DE LA LOCALITZACIÓ DE SIR2

Sir2 sempre s'ha descrit com una proteïna de localització nuclear (Gotta et al. 1997). Es coneix que depenent de les condicions, s'acumula més al nucleòl (concretament al rDNA) o als telòmers. No obstant, no existeixen evidències que indiquin que sigui transportada fora del nucli en les condicions fins ara testades. Tot i això, encara no es coneixia quin paper presentava Sir2 a nivell de localització en una soca mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. Grx3 i Grx4 s'han descrit implicades en la regulació de l'entrada i sortida del nucli d'algunes proteïnes com és el cas del factor transcripcional Aft1 (Pujol-Carrion et al. 2006). En aquest treball, es va voler estudiar la localització de Sir2 en aquest cas i conèixer si existeixen diferències respecte la localització en una soca WT. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 117.

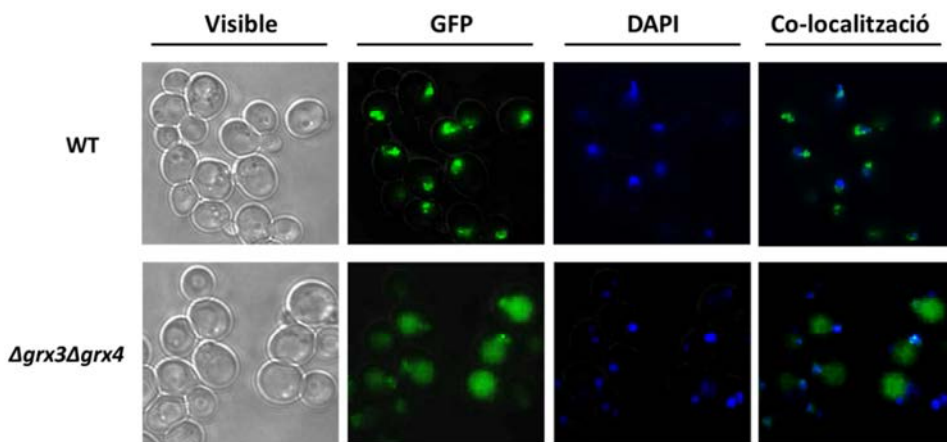


Figura 117. Anàlisi de la localització de Sir2 en la soca WT i la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ mitjançant microscòpia de fluorescència. Les cèl·lules es van deixar créixer exponencialment en medi YPD i es van obtenir les següents imatges: visible (òptica de contrast interdifereencial), GFP (senyal de Sir2-GFP obtingut utilitzant el filtre verd i representada també en verd), DAPI (tinció nuclear amb DAPI i obtinguda amb el filtre ultravioleta) i co-localització (superposició de les imatges de visible, GFP i DAPI).

En una soca WT, el senyal Sir2-GFP co-localitza amb el marcatge nuclear (Figura 117) indicant que Sir2 presenta una localització estrictament nuclear i coincidint amb els resultats ja descrits fins al moment. Pel que fa a la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ el senyal Sir2-GFP no és tan clara com en la soca WT, observant-se un patró puntuat però també un

senyal de fluorescència inespecífica (donat que en cèl·lules no marcades amb GFP es seguia observant) que emmascara lleugerament el senyal de Sir2. Aquesta autofluorescència podria procedir, probablement, de la vacuola d'aquestes cèl·lules. No obstant, el senyal puntuat específic de Sir2 co-localitza amb DAPI, demostrant la localització nuclear de Sir2.

D'altra banda, també es va analitzar l'efecte de la diamida en la localització de Sir2, seguint la mateixa metodologia d'anàlisi de Sir2-GFP per microscòpia de fluorescència (Figura 118).

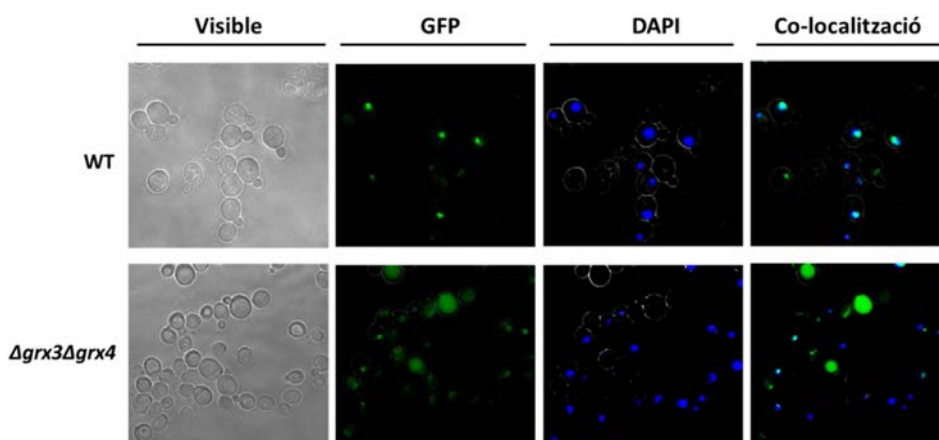


Figura 118. Anàlisi de la localització de Sir2 en condicions d'estrès per diamida. Les cèl·lules es van deixar créixer exponencialment en medi YPD, es van tractar amb 5 mM diamida durant 60' i es van obtenir les següents imatges: visible (òptica de contrast interferencial), GFP (senyal de Sir2-GFP obtingut utilitzant el filtre verd i representada també en verd), DAPI (tinció nuclear amb DAPI i obtinguda amb el filtre ultravioleta) i co-localització (superposició de les imatges de visible, GFP i DAPI).

Igual que en condicions de no tractament, l'estrès per diamida tampoc afecta la localització nuclear de Sir2 (Figura 118). Per tant, Sir2 presenta una localització estrictament nuclear, tan en la soca WT com en absència de Grx3 i Grx4, almenys en totes les condicions analitzades en aquest estudi.

6. ESTUDI *IN VIVO* DE L'ACTIVITAT DE SIR2

El silenciament transcripcional en llevat s'ha descrit en algunes localitzacions com al loci d'aparellament *HMR*, però també a les regions subtelomèriques i a les repeticions del DNA ribosomal (rDNA). Tots aquests loci silenciats tenen en comú que requereixen de l'activitat histona desacetilasa de Sir2. Per tant, l'anàlisi del silenciament als telòmers i/o al rDNA podrien ser unes bones aproximacions per estudiar l'activitat de Sir2 en les condicions d'interès. Així doncs, en aquest treball es va decidir estudiar l'activitat de Sir2 en aquests loci del genoma de *S. cerevisiae*, en les mateixes condicions d'estrès oxidatiu en les que s'havia detectat que Sir2 s'oxidava i que Grx3 i Grx4 jugaven un paper important com a sistemes reductors d'aquesta sirtuïna.

6.1. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2

Un cop analitzat el paper de Grx3 i Grx4 en l'estat redox de Sir2 i haver comprovat que aquestes dues Grxs poden actuar com els seus sistemes fisiològics reductors, ens vam plantejar quin efecte tenien en l'activitat de Sir2. Per això, donat que està descrit que un dels loci en els que actua Sir2 és el telòmer, es va analitzar l'activitat de Sir2 en aquesta regió. Sir2, juntament amb les proteïnes Sir3, Sir4 i Rap1, forma un complex silenciador que, al unir-se als telòmers en silencia la transcripció. Per tal de mesurar l'activitat desacetilasa en aquesta regió del genoma es va analitzar l'expressió d'un gen telomèric, concretament del gen *YFR057W*, situat a aproximadament 1 kb de distància del telòmer dret del cromosoma VI i que es troba sota la regulació de Sir2 (Vega-Palas, Martín-Figueroa, and Florencio 2000). Tot i que no es coneix la funció exacta de *YFR057W*, es creu que podria actuar com a gen pleiotròpic de resistència a drogues ja que presenta una seqüència consens per Stb5, la qual forma un heterodímer amb Pdr1. Pdr1 s'encarrega d'activar gens implicats en la resistència a drogues (Shahi et al. 2010).

D'aquesta forma, d'acord a l'esquema mostrat (Figura 119) quan Sir2 és activa, es produeix el silenciament i per tant, l'expressió del gen *YFR057W* serà molt reduïda. Contràriament, quan Sir2 no hi és present o no és activa, la regió telomèrica no estarà silenciada i augmentarà l'expressió del gen *YFR057W*. Així, per analitzar l'activitat de

Sir2, es va analitzar l'expressió d'aquest gen mitjançant RT-PCR després de sotmetre les cèl·lules a les condicions d'estrès oxidatiu d'interès.

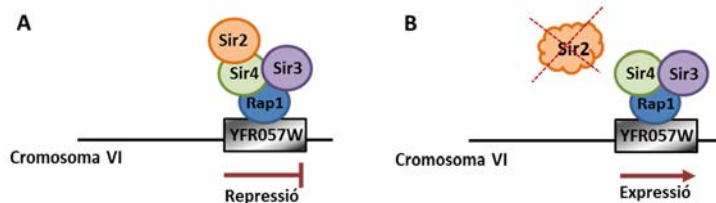


Figura 119. Silenciament als telòmers a través del complex SIR. (A) En condicions normals, Sir2 s'uneix al complex de silenciament SIR format per Sir3 i Sir4, que a la vegada s'uneix a la proteïna Rap1. Al formar-se aquest complex de silenciament sobre els telòmers, no podrà tenir lloc la transcripció dels gens d'aquest locus, en aquest cas, del gen *YFR057W*. (B) Quan Sir2 s'inactiva, no es podrà formar el complex de silenciament i per tant, sí que tindrà lloc transcripció del gen *YFR057W*.

6.1.1. Determinació de la validesa de l'assaig

Donat que les cèl·lules compten amb tota una família d'histona desacetilases, la primera aproximació que es va dur a terme va ser analitzar l'especificitat de Sir2 pel que fa al silenciament de *YFR057W* i així comprovar si es tractava d'un bon assaig per analitzar l'activitat de la nostra sirtuïna d'interès. Per dur-ho a terme, es van analitzar els nivells d'expressió en una soca WT i en una soca $\Delta sir2$ (Figura 120), tan en condicions normals com després del tractament amb un inhibidor específic de sirtuïnes com és la nicotinamida (NAM). Els resultats (Figura 120) van mostrar que en una soca $\Delta sir2$, l'expressió d'aquest gen augmenta 100 vegades respecte la soca WT, indicant que l'expressió d'aquest és específica de la presència de Sir2. De la mateixa manera, quan s'inhibeix Sir2 amb NAM, l'expressió del gen telomèric augmenta de forma similar a la soca $\Delta sir2$. A més, el fet que els nivells d'expressió entre la soca $\Delta sir2$ i la soca $\Delta sir2$ tractada amb NAM siguin similars, ens està indicant que en el procés de silenciament d'aquest, no intervenen altres sirtuïnes, a part de Sir2, que ens poguessin estar interferint en l'assaig.

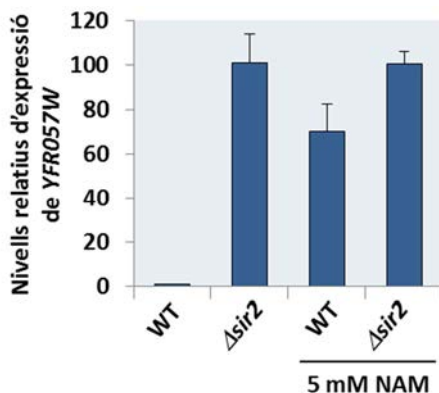


Figura 120. Validació de l'assaig d'anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2. A partir de la determinació de l'expressió del gen telomèric *YFR057W* per RT-PCR es va poder analitzar l'activitat de la soca WT i la soca $\Delta sir2$ en condicions normals i després del tractament amb 5 mM NAM durant 1 hora. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

Per tant, l'anàlisi de l'expressió de *YFR057W* és un assaig vàlid i molt específic per estudiar l'activitat desacetilasa de Sir2 al telòmer.

6.1.2. Estudi de Grx3 i Grx4 en l'activitat desacetilasa de Sir2. Tractaments amb diamida

Un cop comprovada la validesa de l'assaig es va procedir a analitzar l'activitat de Sir2 en les condicions d'interès. Donat que en els experiments anteriors es va demostrar que Grx3 i Grx4 eren importants per mantenir i recuperar l'estat redox de Sir2, es va voler analitzar com afectava l'absència d'aquestes dues Grxs a nivell d'activitat de Sir2. És per això que es va analitzar l'expressió d'aquest gen mitjançant RT-PCR en la soca WT i en la soca $\Delta grx3\Delta grx4$, en condicions de no tractament i després del tractament durant 1 hora amb 4 mM i 5 mM diamida (Figura 121).

Tal com es pot observar, es produeix un augment de l'expressió de *YFR057W* en les condicions de tractament amb diamida respecte la condició control, indicant que Sir2 està perdent activitat quan es sotmet a condicions d'estrès oxidatiu per diamida. A més, aquesta pèrdua d'activitat Sir2 és major quan la concentració de diamida

augmenta. En tots els casos, les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ perden més activitat Sir2 quan es sotmeten a les mateixes condicions d'estrès oxidatiu que la soca WT.

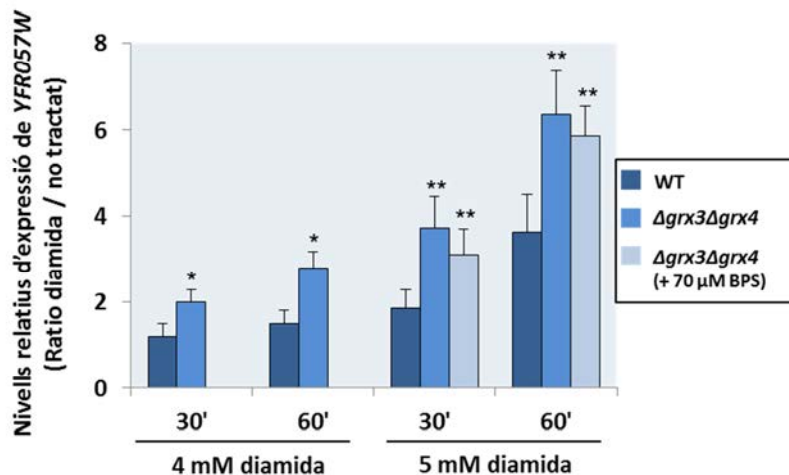


Figura 121. Anàlisi del paper de Grx3/4 en l'activitat telomèrica de Sir2. Les cèl·lules de la soca WT i de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes exponencialment en YPD (o YPD + 70 μ M de BPS) van ser tractades durant 30' o 60' amb 4 mM o 5 mM diamida i es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6.1.3. Estudi de Grx3 i Grx4 en la recuperació de l'activitat desacetilasa de Sir2.

Tractaments amb diamida

En experiments anteriors, es va demostrar que Grx3 i Grx4 tenen la capacitat de recuperar l'estat redox de Sir2 després que s'hagués oxidat degut a l'efecte de la diamida. Donats els resultats, també es va voler determinar quin paper podien tenir aquestes Grxs a nivell de recuperació de l'activitat de Sir2.

Per fer-ho es va dur a terme el mateix assaig d'anàlisi dels nivells d'expressió del gen *YFR057W*, però en aquest cas, la soca WT i la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ van ser tractades durant 1 hora amb 5 mM diamida, es van rentar les cèl·lules per eliminar la diamida i es van deixar recuperar amb medi YPD durant 60 minuts o 120 minuts. Per evitar possibles interferències del ferro, tot i que prèviament ja s'havia demostrat que no afectava a

l'estat redox de Sir2, la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ es va fer créixer amb YPD + 70 μM de BPS, de forma que els nivells de ferro intracel·lulars eren similars als de la soca WT. Finalment, es van analitzar els nivells d'expressió del gen *YFR057W* en ambdues soques mitjançant RT-PCR.

Els resultats de recuperació de l'activitat telomèrica de Sir2 (Figura 122) mostren clares diferències entre la soca WT i la soca $\Delta grx3\Delta grx4$. Mentre que la soca WT és capaç de recuperar parcialment l'activitat Sir2 als 120 minuts de recuperació després del tractament amb diamida (els nivells d'expressió del gen *YFR057W* són menors als 120' que al minut 0), la soca mutant per Grx3 i Grx4 no només és completament incapaç de fer-ho, sinó que s'observa un augment de l'expressió després de l'eliminació de la diamida.

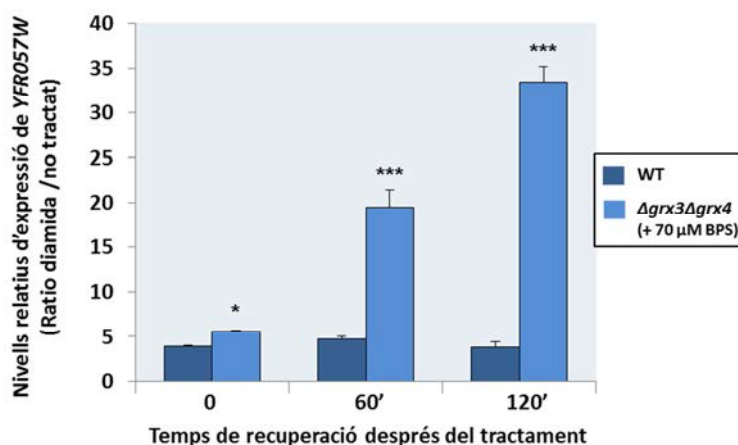


Figura 122. Anàlisi de la recuperació de l'activitat telomèrica de Sir2. Les cèl·lules de la soca WT i de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes exponencialment en YPD i YPD + 70 μM de BPS, respectivament, van ser tractades durant 60' amb 5 mM diamida i després del tractament es van deixar recuperar amb medi nou durant 60' o 120'. Es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Per tant, a part del paper d'aquestes dues Grxs en la recuperació de l'estat redox de Sir2, es demostra que aquestes també són importants *in vivo* per la recuperació de l'activitat de Sir2, després que la cèl·lula hagi estat exposada a unes condicions d'estrès oxidatiu per diamida.

6.1.3.1. Activitat telomèrica i tractament amb diamida

Quan es va analitzar l'activitat telomèrica de Sir2 en una soca WT i en una soca $\Delta grx3\Delta grx4$ quan es recuperaven durant 60' i 120' després d'un tractament oxidant amb diamida, es va observar que en el cas del doble mutant, al cap de 120' de recuperació, Sir2 seguia perdent activitat respecte als 60' de recuperació. Per trobar una explicació a aquest fenomen, es van realitzar alguns experiments. Una possible explicació d'aquesta pujada en l'expressió del gen *YFR057W* i la no completa recuperació en la soca WT podia ser deguda que tot i que es van rentar les cèl·lules després del tractament, hi seguís havent una petita acumulació intracel·lular de diamida. Per demostrar-ho es van realitzar assajos de viabilitat (Figura 123) amb la soca WT i la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ en condicions control (no tractament) i després de tractar-les durant 1 hora amb 5 mM diamida. A més, les cèl·lules sotmeses al tractament amb diamida durant 1 hora, es van dividir en dues condicions; en un cas es van deixar créixer les cèl·lules amb el mateix medi de cultiu durant 1h i 2h més (això suposava un total de 2h i 3h de tractament), mentre que en un altre cas, després del tractament oxidant, es va eliminar el medi de cultiu i es van deixar recuperar les cèl·lules durant 1h i 2h. Els resultats es mostren a la figura següent:

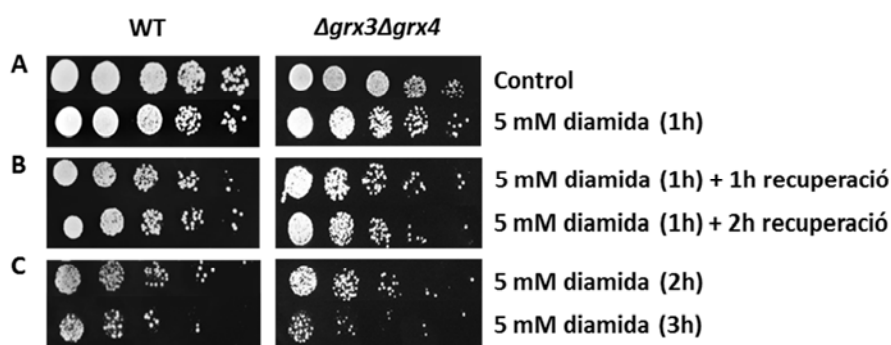


Figura 123. Assaig de viabilitat cel·lular després del tractament amb diamida. Les cèl·lules WT i $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes exponencial amb medi YPD van ser sembrades en plaques YPD (dilucions 1:5) en condicions de A) no tractament (control) i després de tractar-les durant 1h amb 5 mM diamida, B) tractades durant 1h amb 5mM diamida i deixar-les recuperar en medi nou durant 1h i 2h i C) tractades durant 1h amb 5 mM diamida i deixar-les créixer amb el mateix medi durant 2h i 3h.

Els resultats obtinguts a la Figura 123 van demostrar que el fet que després de la recuperació durant 1h i 2h amb medi sense diamida, les cèl·lules fossin lleugerament menys viables que després de 1h de tractament sense recuperació, estava indicant que és molt possible que a l'interior de la cèl·lula encara estiguin presents petites quantitats de diamida que podrien estar provocant un petit dany a les cèl·lules. A més, el tractament amb diamida durant 2h i 3h demostra que el dany causat per la diamida és acumulatiu. Per tant petites concentracions de diamida presents a l'interior de la cèl·lula durant temps llargs podrien explicar la pèrdua d'activitat del mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ als 120' de recuperació. Per una altra banda, es va dur a terme una altra aproximació per explicar aquest possible efecte de la diamida durant l'assaig de recuperació. En aquest cas, es va realitzar un assaig de creixement en medi líquid. D'una banda es van tractar les dues soques WT i $\Delta grx3\Delta grx4$ amb 1,5 mM diamida i es va analitzar el creixement de les cèl·lules. D'altra banda, es va realitzar un tractament amb 5 mM diamida durant 1 hora, es van centrifugar les cèl·lules per eliminar la diamida, es van resuspendre amb nou medi YPD i es va analitzar el creixement. Els resultats obtinguts en ambdós casos es mostren a la Figura 124.

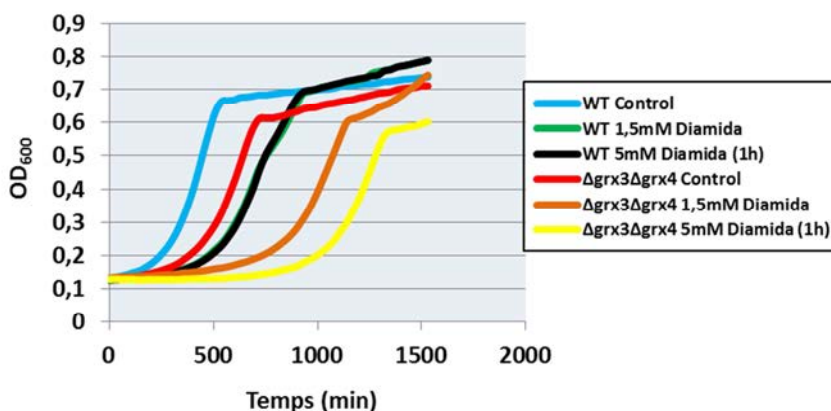


Figura 124. Estudi del creixement cel·lular després del tractament amb diamida. Anàlisi en medi líquid del creixement de les soques WT i $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes amb medi YPD en les diferents condicions: no tractament (control), tractament amb 1,5 mM diamida i després de realitzar un tractament amb 5 mM diamida, centrifugar les cèl·lules i resuspendre-les amb medi nou sense l'agent oxidant durant 1h.

Els resultats van mostrar que les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ presenten una fase d'adaptació (o fase *lag*) més alta que les cèl·lules de la soca WT quan són tractades amb 1,5 mM diamida. A més, les cèl·lules WT presenten la mateixa fase *lag* tan si es tracten amb 1,5 mM diamida com si es tracten amb 5 mM diamida i després es posen a créixer en medi nou sense diamida. En canvi, el doble mutant presenta una fase *lag* més llarga quan es tracta amb 5 mM diamida durant 1h, que quan s'afegeix 1,5 mM diamida al medi de cultiu. Per tant, aquests efectes de la diamida explicarien perquè la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ segueix perdent activitat Sir2 a les 2h de recuperació.

6.1.4. Estudi de Trx1 i Trx2 en l'activitat desacetilasa de Sir2

Les diferents aproximacions presentades fins al moment així com els estudis existents a la bibliografia apunten a que les Grxs són els enzims que participarien en la desglutatiolació de proteïnes. No obstant, sempre ha existit una certa controvèrsia sobre aquest paper de les Grxs i alguns autors el posen en dubte, assegurant que realment serien les Trxs les que durien a terme la funció de desglutatiolació. A més, donat que Grx3 i Grx4 posseeixen tan un domini GRX i un domini TRX, sempre s'ha especulat que l'activitat catalítica d'aquestes Grxs la duria a terme el domini TRX i no el domini GRX. Tot i això, ja s'ha descrit que en mamífers les Grxs catalitzen eficientment les reaccions de desglutatiolació (C.-H. Jung and Thomas 1996) i a més, són nombrosos els estudis que apunten a que les Grxs serien les responsables de la glutatiolació reversible de les proteïnes (Gallogly and Mieyal 2007)(Carsten Berndt, Lillig, and Holmgren 2008)(Deponte and Horst Lillig 2015). En aquest treball s'ha demostrat que tan *in vitro* com *in vivo*, Grx3 i Grx4 són capaces de protegir a Sir2 front l'oxidació i que quan aquesta s'oxida, són capaces de desglutatiolar-la. A més, *in vitro* també es va determinar que realment és la cisteïna catalítica (posicionada al domini GRX de Grx3) la que desenvolupa l'activitat de desglutatiolació. Tot i això, es va voler determinar que realment Trx1 i Trx2 no estiguessin participant en la regulació de Sir2. Fins al moment no s'ha descrit amb certesa la presència de cap Trx al nucli; Trx1 i Trx2 en principi presenten localització citosòlica, mentre que Trx3 es localitza a la mitocòndria. Per estar segurs, es va voler determinar la localització tan de Trx1 com de Trx2 mitjançant

el marcatge d'aquestes proteïnes amb GFP. En aquest cas, es mostren els resultats obtinguts per la localització de Trx2-GFP (Figura 125).

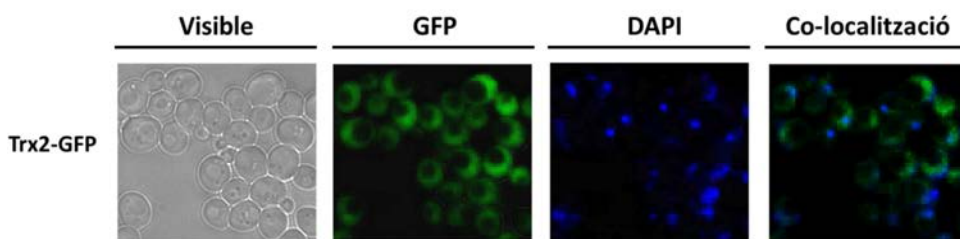


Figura 125. Anàlisi de la localització de Trx2 mitjançant microscòpia de fluorescència. Les cèl·lules es van deixar créixer exponencialment en medi YPD i es van obtenir les següents imatges: visible (òptica de contrast interferencial), GFP (senyal de Sir2-GFP obtingut utilitzant el filtre verd i representada també en verd), DAPI (tinció nuclear amb DAPI i obtinguda amb el filtre ultravioleta) i co-localització (superposició de les imatges de visible, GFP i DAPI).

Els resultats referents a la localització de Trx2-GFP semblen mostrar que Trx2 es localitza al citosol (Figura 125). No sembla que existeixi co-localització entre el nucli (marcatge amb DAPI, blau) i Trx2 (marcatge amb GFP, verd). Pel que fa a Trx1, el patró de localització era igual al de Trx2 tot i que el marcatge de Trx1-GFP no era tan intens, possiblement degut a una menor quantitat dels nivells de proteïna de Trx1 respecte els de Trx2.

A part de la localització de les Trxs, també es va determinar com afecta l'absència de Trx1 i Trx2 a l'activitat *in vivo* de Sir2. Seguint la mateixa metodologia en la que s'ha demostrat que Grx3 i Grx4 són necessàries per recuperar l'activitat *in vivo* de Sir2 després d'un tractament oxidant, es va analitzar que succeïa en el cas d'una soca mutant $\Delta trx1\Delta trx2$ (Figura 126). En aquest cas els resultats van ser molt clars. Mentre que una soca $\Delta grx3\Delta grx4$ és completament incapaç de recuperar l'activitat *in vivo* de Sir2 després de estar sotmesa a una tractament amb diamida, la soca $\Delta trx1\Delta trx2$ presenta un patró similar al de la soca WT, és a dir, la pèrdua d'activitat després de 1 hora de tractament (sense recuperació) no és tan gran com en el cas de la $\Delta grx3\Delta grx4$ i a més, una vegada finalitzada la recuperació de 120' després del tractament amb diamida l'activitat de Sir2 ha augmentat (hi ha més silenciament), a diferència del que succeeix amb el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. Per tant, els resultats indiquen que l'activitat de

Sir2 no depèn de la presència ni de Trx1 ni de Trx2 però sí es veu afectada per l'absència de Grx3 i Grx4, apuntant a una regulació de Sir2 específica de Grx3 i Grx4.

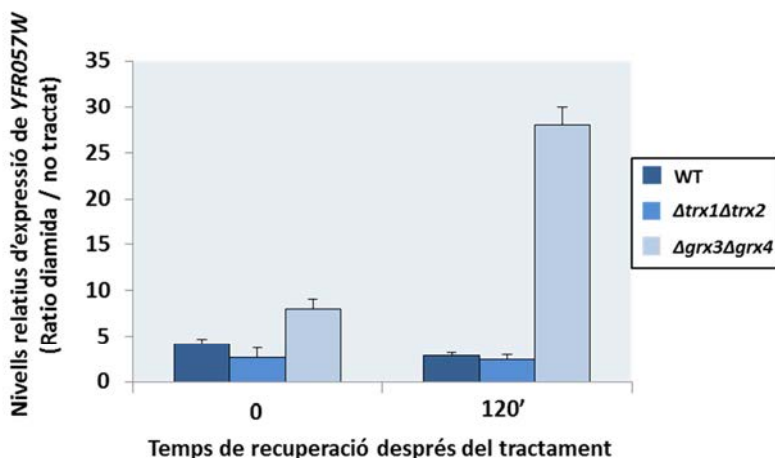


Figura 126. Anàlisi del paper de Trx1 i Trx2 en l'activitat telomèrica de Sir2. Les cèl·lules de la soca WT, de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ i de la soca $\Delta trx1\Delta trx2$ crescudes exponencialment en YPD, van ser tractades durant 60' amb 5 mM diamida i després del tractament es van deixar recuperar amb medi nou durant 120'. Es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

6.1.5. Grx3 i Grx4 en l'activitat desacetilasa de Sir2. Tractaments amb H_2O_2

Donats els resultats *in vivo* en els quals es va demostrar que l'oxidació per diamida de Sir2 provocava una disminució de l'activitat telomèrica i que Grx3 i Grx4 eren capaces de recuperar l'estat redox de Sir2 (apartat 4.4, Resultats) i també la seva activitat telomèrica (apartat 6.1.3, Resultats) es va plantejar que succeiria quan les cèl·lules eren sotmeses a un estrès per H_2O_2 . Així, es van sotmetre les cèl·lules a un tractament d'1 hora amb 0.5 mM d' H_2O_2 i posteriorment, es va analitzar l'expressió del gen telomèric *YFR057W* mitjançant RT-PCR (Figura 127).

L'activitat telomèrica de Sir2 també disminueix quan les cèl·lules són tractades amb H_2O_2 , igual que succeïa quan el tractament es duia a terme amb diamida. No obstant i contràriament al cas de la diamida, no existeixen diferències significatives entre

ambdues soques, és a dir, el muntant per les Grxs presenta uns nivells d'inactivació de Sir2 molt similars als observats en la soca WT.

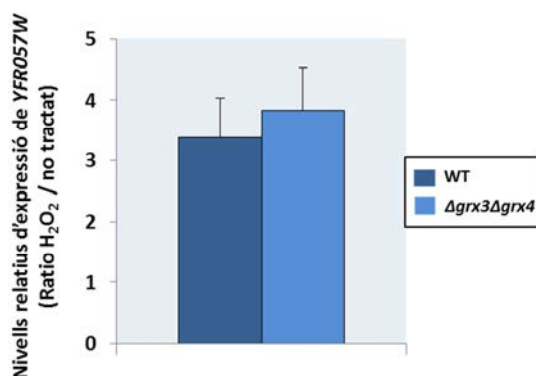


Figura 127. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 en condicions d'estrès per H₂O₂. Les cèl·lules de la soca WT i de la soca *Δgrx3Δgrx4* crescudes exponencialment en YPD van ser tractades durant 60' amb H₂O₂ 0.5 mM i posteriorment, es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

6.1.6. Grx3 i Grx4 en la recuperació de l'activitat de Sir2. Tractaments amb H₂O₂.

En resultats anteriorment presentats es va demostrar que Grx3 i Grx4 presenten un paper fonamental en la recuperació de l'activitat de Sir2 telomèrica després d'un tractament amb diamida (apartat 6.1.3, Resultats). A fi d'analitzar el paper d'aquestes glutaredoxines en la recuperació de l'activitat de Sir2 després d'un estrès amb H₂O₂, es va dur a terme el tractament amb 0.5 mM H₂O₂ durant 1 hora, es va canviar el medi de cultiu i finalment, es van deixar recuperar les cèl·lules durant 2 hores amb medi fresc. Posteriorment, per RT-PCR es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* en aquestes condicions (Figura 128).

Els resultats de recuperació de l'activitat telomèrica de Sir2 després de sotmetre les cèl·lules a un estrès per H₂O₂ van demostrar que Grx3 i Grx4 no són capaces de recuperar l'activitat *in vivo* de Sir2, fet que sí succeïa quan l'estrès es duia a terme amb diamida. Aquest fet explicaria l'oxidació de cisteïnes de Sir2 a altres formes diferents a

la glutatiolació o l'oxidació d'altres aminoàcids diferents a les cisteïnes. A la vegada però, recalcaria l'important paper de la glutatiolació en la regulació de l'activitat i el paper regulador que desenvolupen les glutaredoxines desglutiant Sir2.

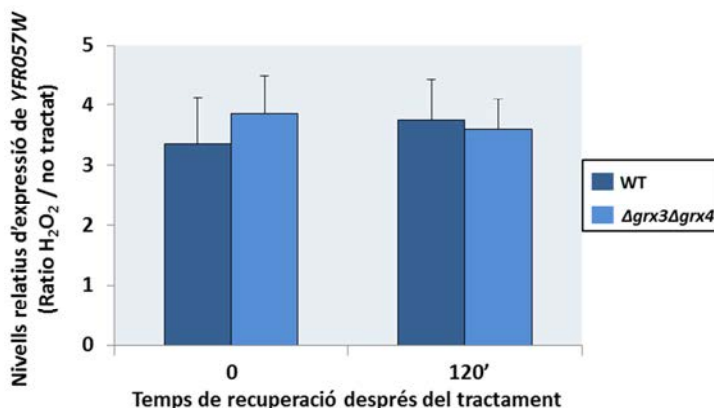


Figura 128. Anàlisi de la recuperació de l'activitat telomèrica de Sir2 en condicions d'estrès per H₂O₂. Les cèl·lules de la soca WT i de la soca Δgrx3Δgrx4 crescudes exponencialment en YPD van ser tractades durant 60' amb H₂O₂ 0.5 mM i després del tractament es van deixar recuperar amb medi nou durant 120'. Es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

6.2. Anàlisi de l'activitat de Sir2 al rDNA

La funció de Sir2 també s'ha descrit localitzada a les regions repetitives del DNA ribosomal, on degut a la seva activitat silenciadora, prevé la formació de cercles extracromosòmics generats per recombinació, l'acumulació dels quals s'ha vist implicada en un envelliment prematur (D. A. Sinclair and Guarente 1997). El rDNA de *S. cerevisiae* presenta una seqüència repetida 150 vegades en tàndem al cromosoma XII (Figura 129). Una unitat de rDNA (9,1 Kb) consisteix en dos gens que són transcrits; el gen pel transcrit de 35S rRNA i el gen pel transcrit de 5S rRNA. A banda d'aquests dos gens, existeixen els elements *cis* reguladors, majoritàriament en les dues regions NTS1 i NTS2 que no són transcrites. Aquests elements *cis* estan implicats en l'expansió i la contracció de les repeticions de rDNA.

Concretament, s'ha descrit que Net1 i també Sir2, dues de les proteïnes que formen part del complex silenciador RENT juntament amb Cdc14, estan associades a les regions

NTS1 i NTS2 del rDNA (J. Huang and Moazed 2003b). A més, es coneix que Fob1, un regulador positiu de la recombinació del rDNA, recluta el seu propi inhibidor, Sir2, al rDNA.

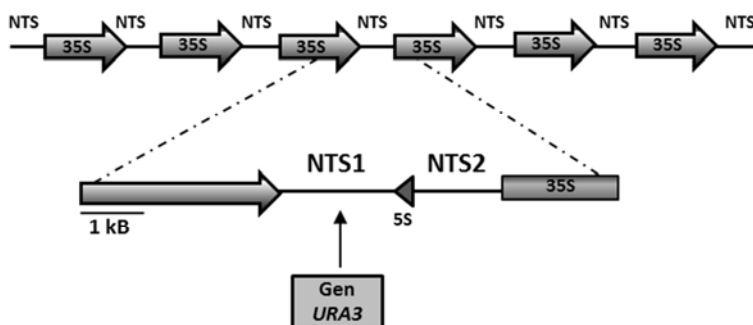


Figura 129. Estructura repetitiva del rDNA de *S. cerevisiae* i ampliació d'una unitat de 9,1 Kb del rDNA. Els gens que codifiquen pel RNA ribosomal es troben disposats en 150 unitats repetides en tàndem al cromosoma XII. Cada repetició genera un precursor 35S rRNA i 5S rRNA. Les regions 35S codificants estan separades pels espaiadors no transcrits (NTS), els quals estan separats en NTS1 i NTS2 pel gen 5S. El gen reporter *URA3* per analitzar el silenciament es va inserir on s'indica (regió NTS1).

Per tant, en absència de la funció silenciadora de Sir2 augmentarà la taxa de recombinació que donarà lloc a un augment en l'acumulació de ERCs i consegüentment, una disminució de la vida mitjana d'aquestes cèl·lules (Ganley et al. 2009). Així, sabent el paper que desenvolupa Sir2 al rDNA, es va decidir analitzar la seva activitat a partir de la integració del gen reporter *URA3* a les regions NTS1 i NTS2 del rDNA de les soques d'interès (Figura 129). D'aquesta forma, mitjançant el creixement de les soques amb medi sense uracil (Ura), es pot analitzar l'activitat silenciadora. Com major és el silenciament a la regió NTS1, menor serà l'expressió de *URA3* i consegüentment, major serà la dificultat per créixer en aquest medi deficient en Ura. Aquest assaig es va realitzar amb la soca WT, les soques deficientes per Grx3 i Grx4, o ambdues, i la soca $\Delta sir2$ com a control. Tal com mostren els resultats de l'assaig (Figura 130), en la placa control (amb medi complet) no s'observen diferències de creixement entre les diferents soques, a excepció de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$, que sembla estar una mica menys crescuda degut al major temps de generació que presenta aquest mutant.

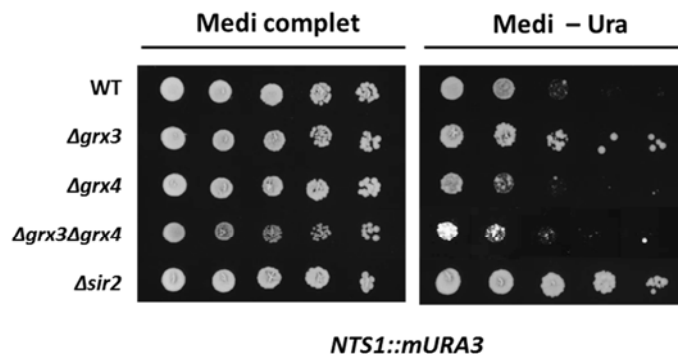


Figura 130. Assaig d'activitat Sir2 al rDNA. Les soques WT, *Δgrx3*, *Δgrx4*, *Δgrx3Δgrx4* i *Δsir2* que tenien inserit el gen *URA3* a la regió NTS1 del rDNA es van sembrar en plaques SC, en medi complet (control) i en medi sense Ura després de realitzar dilucions seriades (1:5), per comprovar així el silenciament per part de Sir2 en aquesta regió. La soca *Δsir2* s'utilitza com a control de l'assaig. El control de l'assaig correspon al creixement en placa amb medi complet, que no presenta cap limitació pel creixement de les cèl·lules.

Pel que fa als resultats obtinguts en placa amb medi SC sense Ura, només aquelles cèl·lules on Sir2 no estigui silenciant en aquesta regió NTS1 del rDNA, podran créixer fàcilment en aquesta placa, doncs es podrà expressar el gen *URA3* i per tant, la seva absència al medi no els hi suposarà una limitació pel creixement. Tal com es pot observar, la soca *Δsir2* utilitzada com a control pot créixer sense dificultats en aquest cas. En canvi, quan es compara la soca WT amb les mutants per les Grxs, s'observa que *Δgrx3* creix més fàcilment que la resta de soques, inclús que la soca WT. En canvi, la soca *Δgrx4* no presenta diferències significatives respecte la soca WT. En referència a la soca *Δgrx3Δgrx4*, podria semblar que presenta un creixement més lent que la resta de soques (segons la placa control amb medi complet). No obstant, tot i tenir en compte això, semblaria que en la placa sense Ura presenta un creixement similar o inclús menor al de la soca WT, tot i que els resultats per aquest cas no són molt clars. Donats aquests resultats, es va intentar determinar l'activitat en aquesta regió del genoma després de tractar les cèl·lules amb diferents concentracions de diamida. Tot i que es van realitzar alguns intents, els resultats no van ser prou clars, donat que resultava difícil discernir entre el poc creixement degut al tractament amb l'agent oxidant o degut al silenciament al rDNA. Per tant, es van decidir no tenir en compte aquests resultats donada la seva poca fiabilitat.

6.3. Anàlisi *in vivo* de la glutatiolació de Sir2

Els resultats obtinguts fins al moment en aquest treball van mostrar que Sir2 es glutatiola *in vitro*, que aquesta modificació provoca una disminució de la seva activitat desacetilasa i que Grx3 i Grx4 participen en la desglutatiolació de Sir2. *In vivo*, l'activitat telomèrica de Sir2 es veu afectada negativament pel tractament oxidant i una soca mutant per Grx3 i Grx4 és incapaç de recuperar l'activitat després del tractament oxidant, fet que sí succeeix en una soca WT. A nivell d'activitat al rDNA, també s'ha observat que l'absència de Grx3 provoca una menor activitat silenciadora per part de Sir2. Per això, es va voler determinar si en les condicions en les que presenta menor activitat, Sir2 s'està glutatiolant, i per determinar-ho, es va procedir a la detecció de GSH mitjançant la immunoprecipitació de Sir2. L'assaig ideal hauria estat poder establir diferències de glutatiolació entre la soca WT i la soca mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. No obstant, durant tot el treball es van tenir problemes a l'hora de detectar Sir2 després d'obtenir els extractes de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$. Sempre que aquests s'obtenien seguint una metodologia que no era precipitant la proteïna amb TCA, Sir2 s'acabava degradant durant el processament de la mostra, tal com mostra la Figura 131.

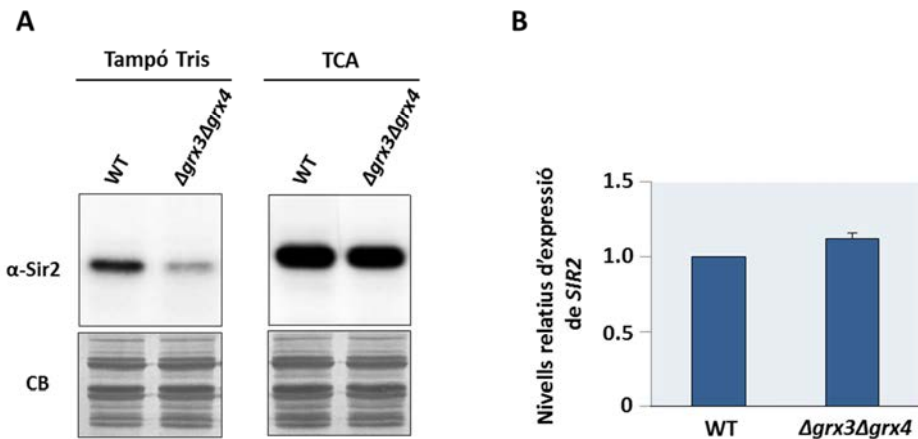


Figura 131. Nivells de pSir2 i de mRNA de SIR2. (A) *Western Blot* anti-Sir2 per determinar els nivells de Sir2 en una soca WT i en una soca $\Delta grx3\Delta grx4$, obtenint els extractes amb tampó Tris o amb TCA. Es mostra la tinció amb *Blau de Coomassie* com a control de càrrega. (B) Anàlisi dels nivells d'expressió de SIR2 d'una soca WT i una soca $\Delta grx3\Delta grx4$ mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen ACT1 va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

No obstant, els nivells endògens de Sir2 eren els mateixos en ambdues soques, WT i $\Delta grx3\Delta grx4$, tal com mostra el *Western Blot* realitzat en extractes obtinguts amb TCA (Figura 131A), i els nivells de mRNA de *SIR2* analitzats per RT-PCR (Figura 131B). El problema doncs, era a posteriori, durant l'obtenció dels extractes cel·lulars.

Així, va resultar impossible immunoprecipitar Sir2 en la soca $\Delta grx3\Delta grx4$, donat que aquesta es degradava durant el protocol d'immunoprecipitació. Per tant, la determinació de la glutatiolació de Sir2 *in vivo* es va dur a terme només amb la soca WT, els mutants simples $\Delta grx3$ i $\Delta grx4$ i la soca $\Delta sir2$ com a control negatiu. Per fer-ho es va immunoprecipitar Sir2, en cèl·lules en condicions normals i en cèl·lules sotmeses a estrès oxidatiu amb diamida. Amb l'objectiu de bloquejar els grups tiol i evitar que fossin modificats durant el processament de la mostra, es van obtenir els extractes amb un tampó que contenia N-etilmaleimida (NEM). Tal com mostren els resultats (Figura 132) tan en la soca WT com en els mutants $\Delta grx3$ i $\Delta grx4$, s'observa glutatiolació de Sir2 quan les cèl·lules són sotmeses a condicions d'estrès oxidatiu.

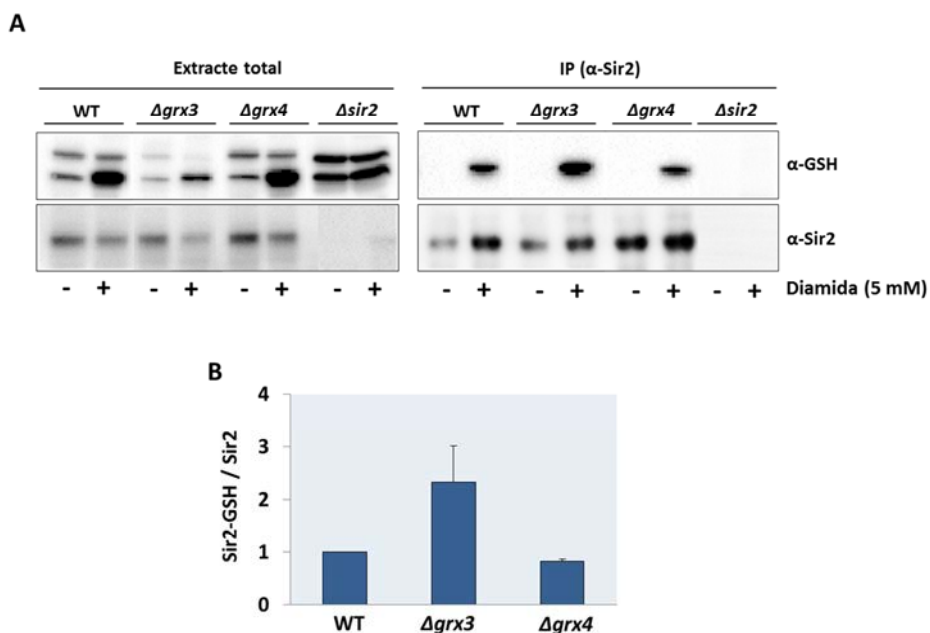


Figura 132. Anàlisi de la glutatiolació *in vivo* de Sir2. (A) Sir2 va ser immunoprecipitada amb un anticòs anti-Sir2 i ProteïnaG-Agarosa en les soques WT, $\Delta grx3$, $\Delta grx4$ i $\Delta sir2$ crescudes exponencialment en YPD i tractades o no amb 5 mM diamida durant 1 hora. La detecció de GSH a l'immunoprecipitat es va dur a terme mitjançant *Western Blot* anti-GSH. (B) Quantificació dels nivells de glutatiolació de Sir2 respecte el total de Sir2 immunoprecipitada en cada soca.

Tenint en compte els nivells de Sir2 que es van immunoprecipitar en cada soca, clarament la proteïna Sir2 de la soca *Δgrx3* presenta un grau de glutatiolació molt més elevat que la WT i la soca *Δgrx4*. Com a control de l'assaig, es va utilitzar la soca *Δsir2*, en la qual no es va detectar cap banda en el *Western Blot* anti-GSH, indicant que la banda detectada en la resta de soques era glutatiolació específica de Sir2. Sabent doncs que en condicions d'estrès oxidatiu Sir2 es glutatiola *in vivo* tan en la soca WT com en la soca *Δgrx4* i sobretot en la *Δgrx3*, es va estudiar quin paper desenvolupen aquestes Grxs en la desglutatiolació de Sir2 després de deixar recuperar les cèl·lules durant 120' una vegada finalitzat el tractament amb diamida. Per fer-ho, es va realitzar igualment una immunoprecipitació de Sir2 per poder detectar així els nivells de GSH. Els resultats obtinguts tan per la soca WT com pels mutants *Δgrx3* i *Δgrx4* es mostren a la Figura 133.

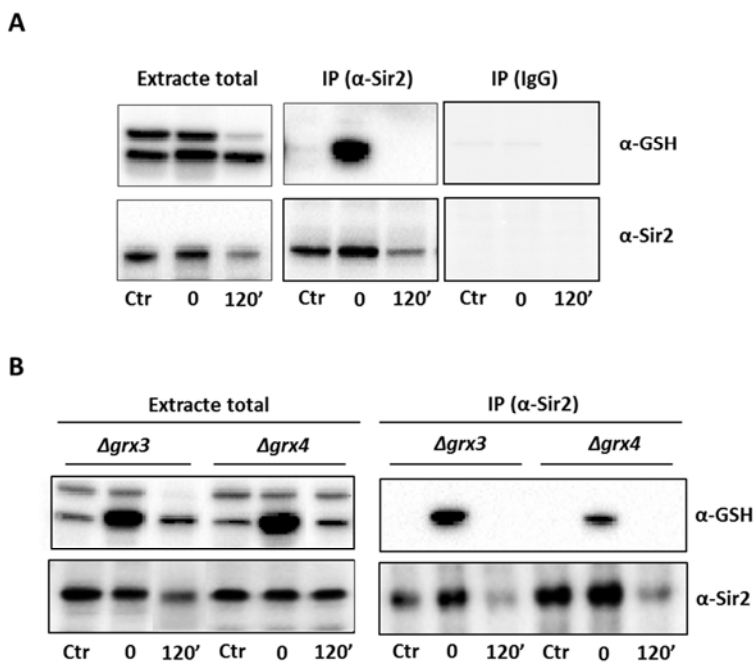


Figura 133. Anàlisi de la glutatiolació *in vivo* de Sir2 després del temps de recuperació. Sir2 va ser immunoprecipitada amb un anticòs anti-Sir2 i ProteïnaG-Agarosa en (A) la soca WT i (B) en les soques *Δgrx3*, *Δgrx4*, crescudes exponencialment en YPD i tractades o no amb 5 mM diamida durant 1 hora. Després del temps de tractament es van deixar recuperar durant 2 hores amb medi nou (120') o es van recollir directament (0). La detecció de GSH a l'immunoprecipitat es va dur a terme mitjançant un *Western Blot* anti-GSH.

En aquest cas però, tot i que tampoc es detecta glutatiolació després dels 120' de recuperació, la quantitat de Sir2 immunoprecipitada és molt menor. Tot i que aquest experiment es va repetir diverses vegades, no es va aconseguir immunoprecipitar més Sir2. Degut això, es podria donar el cas que Sir2 seguís estant glutatiolada però degut als baixos nivells immunoprecipitats resulta impossible detectar-ho mitjançant un *Western Blot* anti-GSH. En aquesta condició doncs, potser seria interessant realitzar alguna altra aproximació per tal d'acabar confirmant la glutatiolació o no de Sir2 en aquests mutants després del temps de recuperació.

7. PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'ACTIVACIÓ DE SIR2

Fins al moment s'ha descrit com l'estrès oxidatiu inactiva la proteïna Sir2 i com l'absència de Grx3 i Grx4 no permet la recuperació de l'activitat Sir2 després que aquesta disminueixi degut al tractament de les cèl·lules amb un agent oxidant. No obstant, quan s'analitzaven els resultats obtinguts en condicions de no tractament, es va observar que la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ sempre presenta major activitat Sir2 al telòmer que la soca WT (Figura 134):

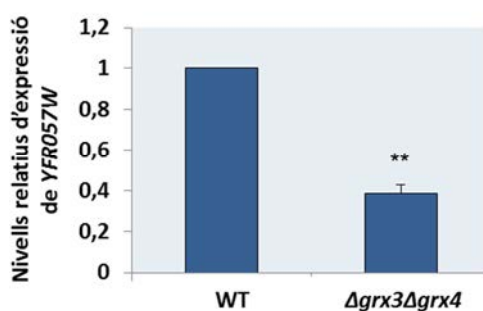


Figura 134. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2. Es va determinar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR en les cèl·lules de la soca WT i de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ crescudes exponencialment en YPD. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

S'ha descrit que la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ acumula elevats nivells de ferro intracel·lulars i això, entre d'altres coses comporta un major estrès oxidatiu en aquestes cèl·lules

(Pujol-Carrion et al. 2006). El fet que la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ presenti major activitat telomèrica Sir2 que una soca WT pot portar a pensar que un estrès oxidatiu fort sí que comporta la inactivació de Sir2, però que un estrès oxidatiu més lleu (com podria ser l'estrès endogen que presenta de per si un mutant $\Delta grx3\Delta grx4$) tindria com a conseqüència una major activació de Sir2. Per estudiar més aquesta regulació, es va analitzar que succeïa en una soca WT quan en comptes de sotmetre-la a un estrès amb 4 mM o 5 mM de diamida, es reduïa a 2 mM diamida. De la mateixa manera, després del tractament oxidant amb 2 mM diamida, es va analitzar l'activitat telomèrica de Sir2 (Figura 135):

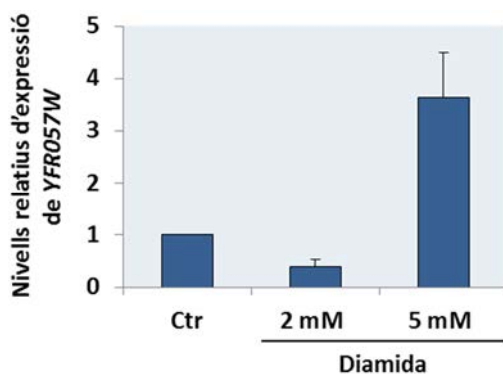


Figura 135. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 després de l'estrès per diamida. La soca WT creixia exponencialment en YPD i va ser tractada amb 2 mM i 5 mM diamida durant 60' i posteriorment, es va analitzar l'expressió del gen *YFR057W* mitjançant RT-PCR. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió.

La Figura 135 mostra l'activitat de Sir2 quan les cèl·lules es sotmeten a un tractament 2 mM diamida i 5 mM diamida respecte la condició control. Tal com ja s'havia demostrat anteriorment, el tractament de les cèl·lules amb 5 mM diamida inhibeix l'activitat Sir2. No obstant, quan les cèl·lules van ser sotmeses a un tractament amb 2 mM diamida, es va observar que l'activitat Sir2 augmentava respecte la condició control. Per tant, aquest fet també apuntava que condicions lleus d'estrès oxidatiu poden induir una activació de l'activitat telomèrica de Sir2, mentre que condicions més intenses d'estrès oxidatiu en provocarien la seva inactivació.

8. ESTUDI *IN VITRO* DEL PAPER DE LES CISTEÏNES DE SIR2

La regulació redox utilitza la propietat d'alguns grups tiols dels residus de cisteïna de les proteïnes per oxidar-se de forma versàtil i reversible. Les diferents sensibilitats a aquesta oxidació, a part de dependre del pKa, també s'ha descrit que depenen de l'agent oxidant al qual estan sotmesos, així com al compartiment on els ROS són generats, degut a la possibilitat de difusió a través de la membrana i de l'accessibilitat dels grups tiols sensibles.

En aquest treball s'ha demostrat que Sir2 és una proteïna regulada mitjançant el seu estat redox. Per això, es va decidir analitzar quines cisteïnes podrien ser les principals candidates implicades en la regulació de Sir2.

8.1. Identificació i construcció dels mutants de les cisteïnes

Primerament es va dur a terme un estudi dels residus de cisteïna de Sir2 que podien ser interessants a nivell de regulació de Sir2. Aquesta sirtuïna presenta un total de 11 residus de cisteïna (Figura 136).

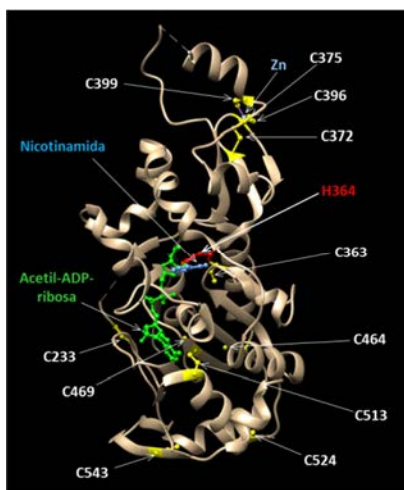


Figura 136. Estructura tridimensional de la proteïna Sir2 obtinguda per cristal·lografia de raigs X. S'indiquen els productes de la reacció de desacetilació, la nicotinamida i l'acetil-ribosil-ADP, així com l'àtom de zinc i cada un dels residus de cisteïna que en conformen la seva estructura. Estructura cristal·litzada de Sir2 (Codi PDB: 2HJH) obtinguda per difracció de raigs X amb una resolució de 1,85Å; software UCSF Chimera.

Tenint en compte que Sir2 és una proteïna nuclear, es va analitzar si algun dels residus de cisteïna podia estar implicat en la regulació de la seva localització cel·lular, com s'ha descrit per exemple per Yap1 (Delaunay, Isnard, and Toledano 2000). Mitjançant el servidor NetNES 1.1 es va cercar l'existència d'alguna seqüència d'exportació nuclear (NES). Els resultats (Figura 137) van mostrar que existeix una possible seqüència NES, entre C464 i C469 que podria tenir un paper en la regulació de Sir2.

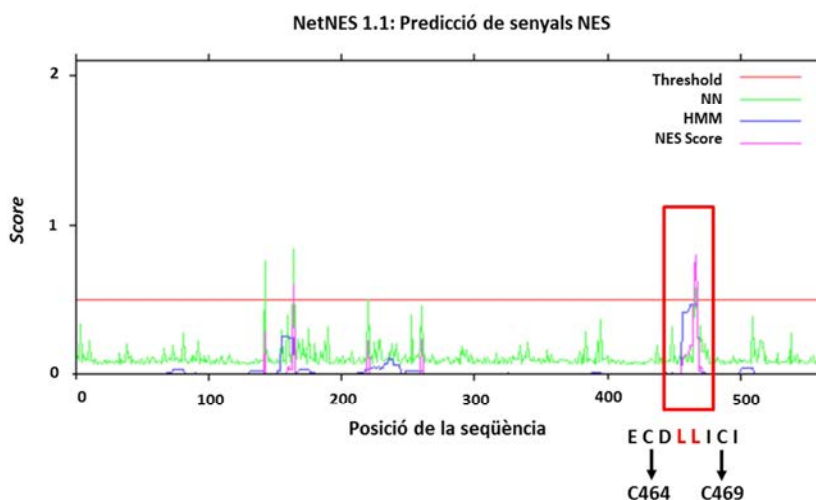


Figura 137. Anàlisi de la presència de seqüències NES a l'estructura de Sir2. Es va utilitzar el servidor NetNES 1.1, el qual va predir una possible seqüència, que es trobaria entre les cisteïnes C464 i C469.

Analitzant la resta de l'estructura de Sir2 es van seleccionar altres cisteïnes com a possibles candidates reguladores: i) una de les quatre cisteïnes C372, C375, C396 i C399 que estan coordinant l'àtom de zinc, ii) C363 adjacent a la histidina catalítica i iii) C513, que es troba a la cavitat catalítica i molt accessible a la superfície, fet que facilita una possible modificació redox d'aquesta. D'acord amb aquest criteri es va decidir realitzar mutagènesi dirigida de les cisteïnes seleccionades. Així, a partir de la mutació de les cisteïnes per serines es van obtenir les proteïnes recombinants mutants: Sir2-C363S, Sir2-C372S, Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S. Les mutacions es van realitzar sobre el plasmidi original pDM111a que contenia la proteïna de fusió GST-Sir2, de forma que al

generar-se els mutants, es podia induir l'expressió mitjançant IPTG i dur a terme la purificació utilitzant una resina de glutatí, igual que es feia per la proteïna Sir2-WT.

8.2. Inducció i purificació dels mutants Sir2

Es va transformar les cèl·lules DH5 α amb cada un dels plasmidis contenint les proteïnes Sir2 mutades als residus d'interès, es va induir l'expressió amb IPTG i es va comprovar la correcta inducció (Figura 138):

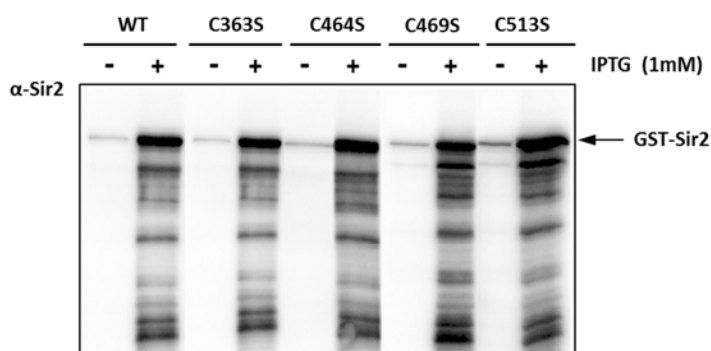


Figura 138. Comprovació de la inducció de l'expressió de les proteïnes de fusió GST-Sir2 mutants. Western Blot anti-Sir2 dels extractes d'*E. coli* contenint cada un dels plasmidis amb les GST-Sir2 mutades, sense induir i induïdes amb IPTG 1mM durant 4 hores a 30°C. La proteïna de fusió presenta un pes molecular de 89 kDa.

La Figura 138 mostra que en tots els casos, Sir2 s'ha induït correctament després del tractament amb IPTG. Posteriorment, es va procedir amb la purificació, utilitzant resines de glutatí amb afinitat per la GST. Un cop realitzada la digestió amb trombina i haver obtingut cada un dels mutants Sir2, es va realitzar la comprovació de la purificació mitjançant un gel SDS-PAGE i la seva posterior tinció amb *Blau de Coomassie*.

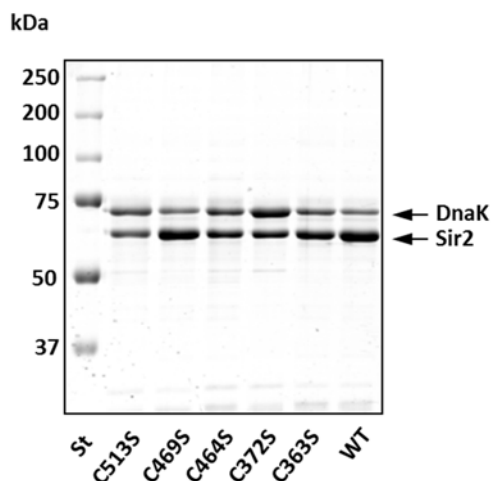


Figura 139. Comprovació de la purificació de les proteïnes recombinants Sir2. El gel SDS-PAGE tenyit amb *Blau de Coomassie* permet detectar la presència de les proteïnes recombinants Sir2-WT (63 kDa), mutants de les cisteïnes (63 kDa) i DnaK d'*E. coli* (69 kDa).

Els resultats (Figura 139) mostren com Sir2 co-purifica en tots els casos amb la xaperona DnaK d'*E. coli*. Donat que no apareixen altres proteïnes i que ja es va determinar en assajos previs que aquesta xaperona no interferia, es va procedir a realitzar els assajos d'interès.

8.3. Anàlisi *in vitro* de l'activitat dels mutants Sir2

Amb l'objectiu de determinar l'activitat desacetilasa *in vitro* dels mutants Sir2, es va utilitzar el kit comercial *Fluor de Lys* (Figura 140).

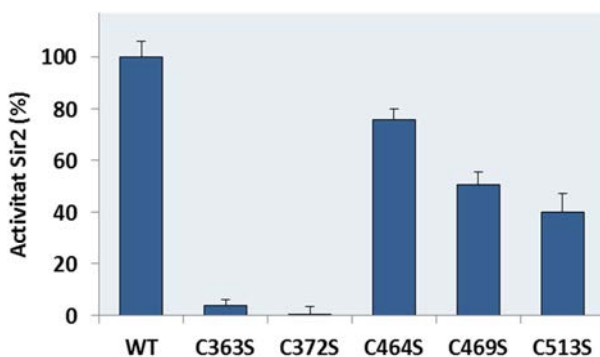


Figura 140. Activitat desacetilasa de les proteïnes recombinants Sir2-WT i dels mutants. La mesura es determina mitjançant l'assaig *Fluor de Lys* i utilitzant 5 µg de cada una de les proteïnes (1.5 µM).

Els resultats de l'activitat de cada un dels mutants (Figura 140) mostren que Sir2-C363S (cisteïna adjacent a la histidina catalítica) i Sir2-C372S (una de les cisteïnes que uneix l'àtom de zinc) gairebé no presenten activitat desacetilasa, mentre que els mutants Sir2-C464S i Sir2-C469S (que formarien part d'una putativa seqüència NES) presenten una activitat més reduïda respecte la proteïna Sir2-WT (76% i 50%, respectivament). El mutant Sir2-C513S (cisteïna localitzada a la cavitat catalítica de la sirtuïna) presenta un 40% de l'activitat respecte la proteïna WT. En el cas de Sir2-C363S i Sir2-C372S, es va decidir realitzar un tractament amb DTT i GSH per comprovar si l'absència d'activitat Sir2 en aquests mutants es podia recuperar (Figura 141A). A més, en el cas del mutant Sir2-C372S també es va addicionar zinc en forma de $ZnCl_2$, per comprovar si l'absència d'activitat desacetilasa era deguda a la pèrdua de l'àtom de zinc (Figura 141B).

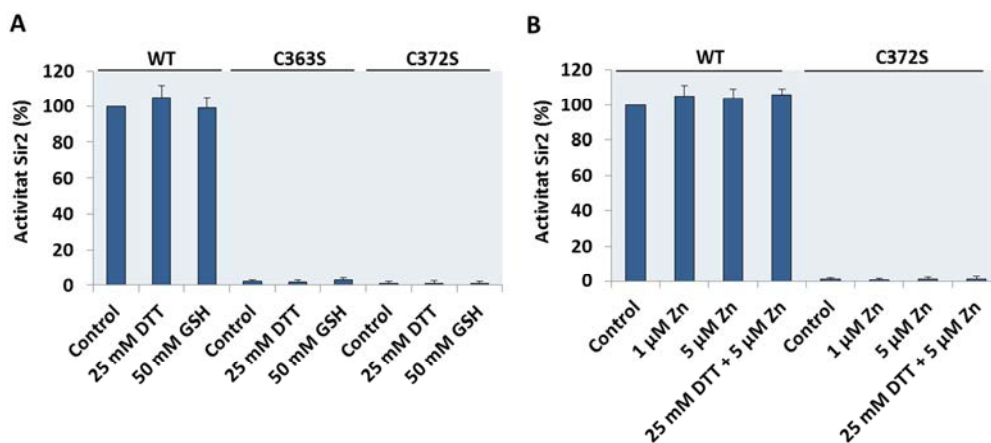


Figura 141. Efecte dels agents reductors i del $ZnCl_2$ en l'activitat dels mutants Sir2-C363S i Sir2-C372S. (A) Activitat desacetilasa de la proteïna Sir2-WT (5μ g – 1.5μ M) i els mutants Sir2-C363S i Sir2-C372S (10μ M) mesurada mitjançant l'assaig *Fluor de Lys* després del tractament durant 10 minuts a temperatura ambient amb 25 mM DTT o 50 mM GSH. (B) Activitat desacetilasa de la proteïna Sir2-WT (5μ g – 1.5μ M) i la proteïna mutant Sir2-C372S (10μ M) mesurada mitjançant l'assaig *Fluor de Lys* després del tractament durant 10 minuts a temperatura amb 1 μ M $ZnCl_2$, 5 μ M $ZnCl_2$ o 5 μ M $ZnCl_2$ juntament amb 25 mM DTT.

En cap cas, el tractament amb agents reductors com el DTT o el GSH no va millorar l'activitat del mutant Sir2-C363S ni del mutant Sir2-C372S (Figura 141A). En el mutant Sir2-C372S l'addició de zinc o zinc juntament amb DTT tampoc va permetre augmentar

l'activitat desacetilasa (Figura 141B), sent dos mutants completament inactius en totes les condicions analitzades.

8.4. Anàlisi *in vitro* de l'activitat dels mutants Sir2 en condicions d'estrès oxidatiu

Coneixent la pèrdua d'activitat dels mutants Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S respecte la Sir2-WT, es va decidir analitzar que succeïa quan es sotmetia a aquestes proteïnes recombinants a condicions d'estrès oxidatiu per diamida (Figura 142).

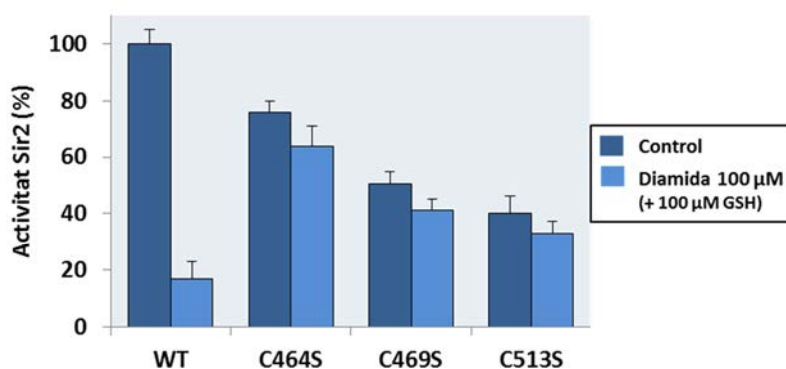


Figura 142. Efecte de la diamida en l'activitat desacetilasa de Sir2. L'activitat de la proteïna Sir2-WT i els mutants Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S (5 µg – 1.5 µM) es va mesurar mitjançant l'assaig *Fluor de Lys* en condicions normals i després del tractament durant 10 minuts amb 100 µM diamida juntament amb 100 µM GSH.

Els resultats mostren que en tots els mutants la inactivació respecte la condició control era pràcticament indetectable, a diferència del que succeeix amb la proteïna Sir2-WT.

8.5. Estudi *in vitro* de la glutatiolació dels mutants Sir2.

Sabent que el tractament amb diamida pràcticament no tenia efecte pel que fa a la pèrdua d'activitat desacetilasa dels mutants, es va voler estudiar la possible glutatiolació *in vitro* de Sir2. Per això, cada una de les diferents proteïnes recombinants WT i mutants, es van sotmetre a un tractament amb diamida/GSH i es va analitzar la glutatiolació de Sir2 mitjançant *Western Blot* anti-GSH (Figura 143).

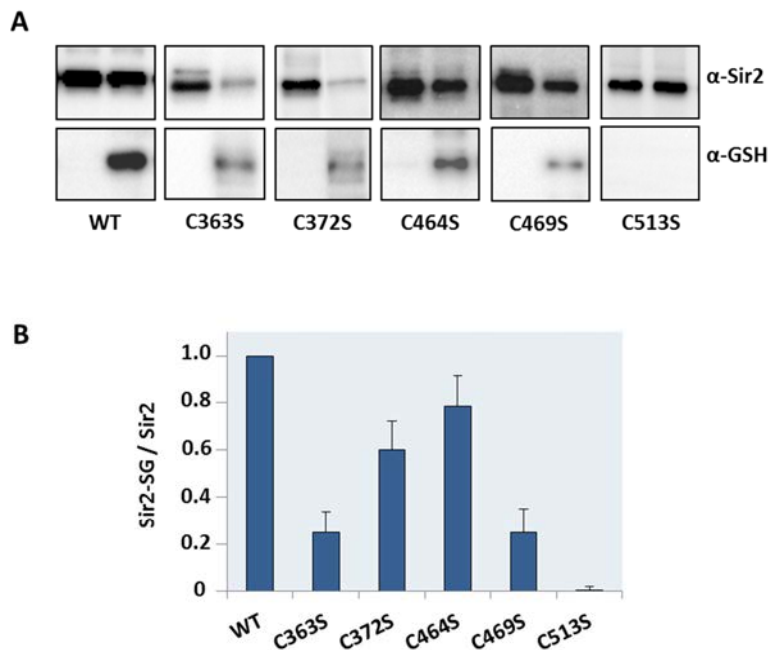


Figura 143. Determinació de la glutatiolació dels mutants Sir2. (A) La proteïna Sir2-WT i els mutants Sir2-C363S, Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S ($5 \mu\text{g} - 1,5 \mu\text{M}$) van ser tractats o no amb $100 \mu\text{M}$ diamida juntament amb $100 \mu\text{M}$ GSH durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, les mostres es van separar en un gel SDS-PAGE no reductor i es va realitzar un *Western Blot* anti-Sir2 per determinar els nivells totals de Sir2 i anti-GSH per estudiar la glutatiolació. (B) Quantificació relativa dels nivells de glutatiolació de Sir2 (Sir2-SG) respecte els nivells de Sir2 totals.

La quantificació de Sir2 glutatiolada respecte els nivells de Sir2 totals (Figura 143B) mostra que els mutants es glutatiolen en menor grau que la Sir2-WT, sent els mutants Sir2-C363S i Sir2-C469S els que presentaven nivells de glutatiolació més baixos. El mutant Sir2-C513S no presenta glutatiolació, almenys detectable per *Western Blot*.

8.6. Estudi *in vitro* del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades

Donades les diferències en l'activitat i en els nivells de glutatiolació es va voler determinar si existien diferències entre les proteïnes mutants en quant al nombre de cisteïnes oxidades. Per dur a terme aquest estudi, la proteïna Sir2-WT i cada un dels mutants van ser tractats o no amb diamida juntament amb GSH i es va seguir la mateixa metodologia que la utilitzada amb la proteïna Sir2-WT, basada en la unió de la

maleimida PEG a les cisteïnes reduïdes. La unió del PEG, de 5 kDa, incrementa el pes molecular de Sir2 proporcional al nombre de molècules PEG unides als grups tiol reduïts. La separació de les mostres en un gel SDS-PAGE reductor seguit d'un *Western Blot* anti-Sir2 permet la detecció d'un increment de pes molecular en Sir2 proporcional al nombre de cisteïnes oxidades durant el tractament amb diamida. El nombre de cisteïnes oxidades en cada un dels mutants es mostra a la Figura 144.

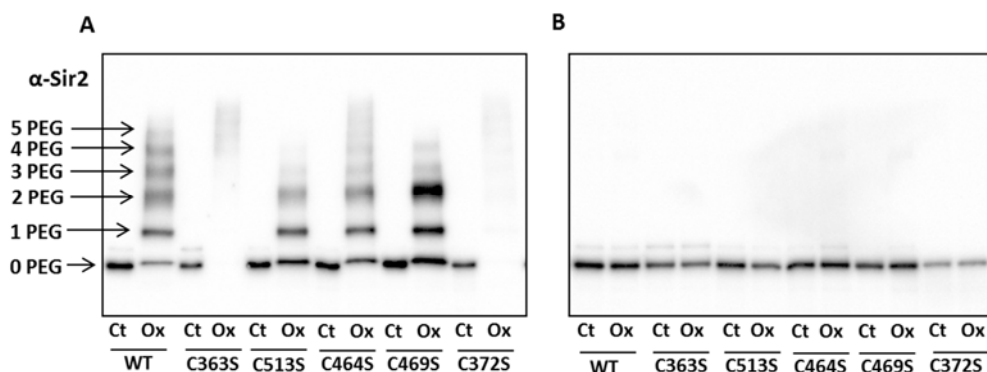


Figura 144. Determinació del nombre de cisteïnes de Sir2 oxidades després del tractament amb diamida. Les proteïnes recombinants Sir2-WT i els mutants van ser tractades amb 100 μM diamida o 100 μM diamida + 100 μM GSH durant 10 minuts a temperatura ambient. Després de diluir-les amb tampó 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5% SDS, es van incubar 30 minuts a 30°C amb 1 mM NEM. Es van tractar amb 2,5 mM DTT durant 20 minuts a 30°C i es van incubar amb 10 mM PEG durant 30 minuts a 30°C. Finalment es van separar les mostres en un gel SDS-PAGE reductor seguit d'un *Western Blot* anti-Sir2; Ct: control i Ox: oxidada. (A) Mostres amb PEG i (B) Mostres sense PEG.

L'anàlisi del nombre de cisteïnes oxidades tan en la proteïna Sir2-WT com amb els diferents mutants va mostrar clares diferències entre cada un dels mutants. En la Figura 144A, s'observa que mentre que Sir2-WT presenta fins a un màxim de 5 molècules de PEG unides després del tractament amb diamida, és a dir, hi ha una barreja de formes oxidades que va de 1 a 5 cisteïnes, els mutants C469S i C513S presenten un patró menys oxidat. En ambdós casos es detecten dues bandes principals corresponents a 1 i 2 PEGs units que equivaldrien, en el primer cas, a una glutatiolació, i el segon podria tractar-se bé de dues glutatiolacions o bé d'un pont disulfur intramolecular. El mutant C464S en canvi, presenta un patró d'oxidació més similar a la proteïna WT. En els mutants C363S i C372S no s'aconsegueix observar bandes

definides, sinó que presenten un patró altament oxidat possiblement degut a la inestabilitat *in vitro* d'aquests mutants. La Figura 144B mostra les mateixes proteïnes en les mateixes condicions però sense PEG.

9. ESTUDI *IN VIVO* DEL PAPER DE LES CISTEÏNES DE SIR2

A fi de conèixer la rellevància fisiològica de les cisteïnes de Sir2 es va decidir construir, d'acord amb els resultats obtinguts prèviament *in vitro*, les soques mutants per les cisteïnes C363, C469 i C513. Així, es va clonar la seqüència de Sir2, amb el seu propi promotor i terminador, al plasmidi Ylplac128 sobre el qual es van realitzar la mutació d'interès i, posteriorment, es va transformar en la soca $\Delta sir2$, per acabar expressant Sir2-C363S, Sir2-C469S o Sir2-C513S.

9.1. Anàlisi *in vivo* de l'activitat telomèrica de Sir2

La primera aproximació que es va dur a terme va ser analitzar l'activitat Sir2 de la soca WT i les soques mutants a partir de l'anàlisi de l'activitat desacetilasa basada en l'expressió del gen telomèric *YFR057W*.

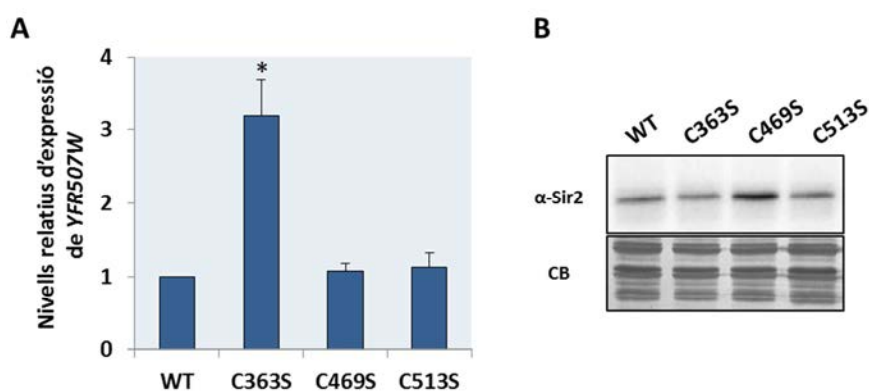


Figura 145. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 en les soques mutants. (A) A partir de la determinació de l'expressió del gen telomèric *YFR057W* per RT-PCR es va poder analitzar l'activitat de la soca WT i les soques mutants en condicions control. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió. (B) *Western blot* anti-Sir2 d'extractes cel·lulars (10 μ g) de la soca WT i els mutants. La tinció amb *Blau de Coomassie* (CB) es va utilitzar com a control de càrrega. * $p < 0,05$.

Els resultats (Figura 145A) van mostrar que mentre que les soques mutants Sir2-C469S i Sir2-C513S mantenien la mateixa activitat que una soca WT, la soca Sir2-C363S presentava menys activitat Sir2 al telòmer. No obstant, els nivells de proteïna Sir2 entre les diferents soques no variaven significativament (Figura 145B).

9.2. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 de les soques mutants. Tractaments amb diamida.

En l'experiment anterior, es va demostrar els mutants Sir2 presenten la mateixa activitat Sir2 als telomèrs que una soca WT, exceptuant el mutant Sir2-C363S en que s'observa més reduïda. Donat que *in vitro* es va determinar que l'estrès per diamida prevenia la pèrdua d'activitat desacetilasa en els mutants Sir2, es va decidir analitzar si aquest mateix fenotip s'observava *in vivo*. Per fer-ho es va dur a terme el mateix assaig d'anàlisi dels nivells d'expressió del gen *YFR057W* per RT-PCR, però en aquest cas, després de tractar les soques durant 1 hora amb 5 mM diamida (Figura 146). Els resultats van mostrar que igual que succeïa *in vitro* amb les proteïnes recombinants, el tractament de les soques mutants amb diamida prevenia l'oxidació de les soques Sir2-C469S i Sir2-C513S, i especialment del mutant Sir2-C363S.

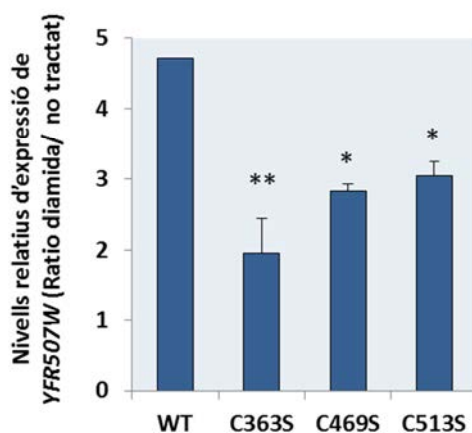


Figura 146. Anàlisi de l'activitat telomèrica de Sir2 en les soques mutants després del tractament amb diamida. A partir de la determinació de l'expressió del gen telomèric *YFR057W* per RT-PCR es va poder analitzar l'activitat de la soca WT i les soques mutants Sir2 després del tractament amb 5 mM diamida durant 60'. L'expressió del gen *ACT1* va ser utilitzada com a control intern per la normalització dels nivells d'expressió. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Així, l'estrès per diamida provoca una major pèrdua d'activitat en la soca WT que en els mutants Sir2.

9.3. Anàlisi de l'activitat Sir2 al locus d'aparellament

L'aparellament entre cèl·lules haploides en *S. cerevisiae* requereix del reconeixement per part d'una cèl·lula, per exemple del tipus sexual *MAT α* , d'una hormona anomenada factor α , secretada per una cèl·lula del tipus sexual oposat, és a dir, una cèl·lula *MAT α* . Sir2 és l'encarregada del silenciament al loci d'aparellament HM i per tant, encarregada de la determinació del tipus sexual de les cèl·lules. El tractament de cèl·lules del tipus sexual *MAT α* amb el factor α impedeix la seva entrada en fase S i per tant, permet sincronitzar-les a final de fase G1 d'una manera Sir2-dependent. Per tant, un mutant Δ *sir2* és incapaç de ser sincronitzat pel factor α .

En aquest treball i tenint en compte el paper de Sir2 en la sincronització després del tractament amb el factor α , es va decidir estudiar aquesta característica en els mutants Sir2. La soca WT, els mutants Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S, així com la soca Δ *sir2* com a control negatiu, es van deixar créixer exponencialment i es van tractar amb el factor α durant dues hores. Mitjançant citometria es va determinar la fase del cicle cel·lular en la que es trobaven les diferents soques (Figura 147).

Els perfils de FACS obtinguts mostren clarament com la soca WT s'ha sincronitzat en fase G1, mentre que el mutant Δ *sir2* és completament incapaç de fer-ho. Pel que fa als diferents mutants, tots presenten un perfil similar al de la soca WT, és a dir, l'addició del factor α sí que ha permès sincronitzar les cèl·lules en fase G1 del cicle cel·lular. Per tant, pel que fa al loci d'aparellament, els mutants Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S es poden unir a aquesta regió del genoma i presenten activitat desacetilasa a diferència del que succeeix en el mutant delecionat per *SIR2*.

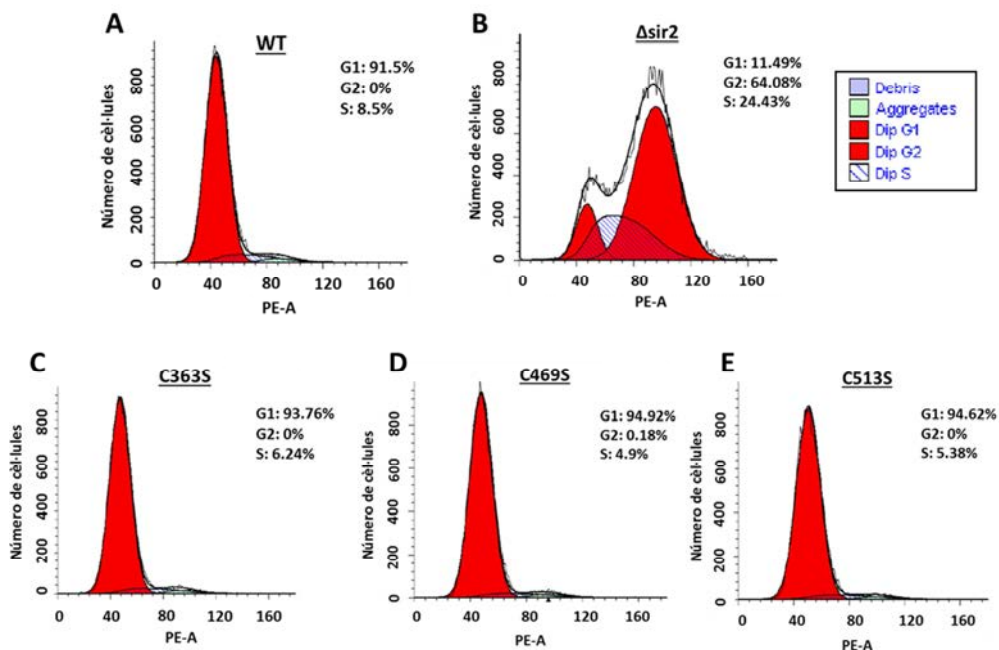


Figura 147. Anàlisi per FACS després de l'addició de factor α . Les soques WT, $\Delta sir2$ i els mutants C363S, C469S i C513S crescudes exponencialment amb YPD van ser tractades amb factor α (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durant 120 minuts a 30°C i, posteriorment es van tenyir amb iodur de propidi per analitzar per FACS la capacitat de sincronització en fase G1.

9.4. Organització del citoesquelet d'actina

Sir2 també participa en la regulació del citoesquelet d'actina. La primera evidència va sorgir de l'observació que els mutants $\Delta sir2$ presenten un defecte en el plegament de l'actina dependent de la xaperonina CCT, la qual es troba altament acetilada en cèl·lules $\Delta sir2$ (B. Liu et al. 2010). Posteriorment, es va confirmar que la deleció de *SIR2* redueix el nombre de cables d'actina. En aquests mutants es produeix una disminució de les velocitats del flux retrògrad i del moviment retrògrad mitocondrial (Higuchi et al. 2013). És per això que en aquest treball es va decidir analitzar si els mutants Sir2 presenten un fenotip similar al mutant $\Delta sir2$ pel que fa a l'actina. L'anàlisi del citoesquelet d'actina es va realitzar tan en condicions control com d'estrès oxidatiu per diamida (Figura 148).

Els resultats van mostrar que en tant en condicions control com després de la condicions d'estrès oxidatiu, els mutants es comporten igual que una soca WT. És a dir, en la condició control són perfectament visibles els cables d'actina en totes les soques, mentre que l'estrès amb diamida indueix la formació de patxes en totes les soques per igual.

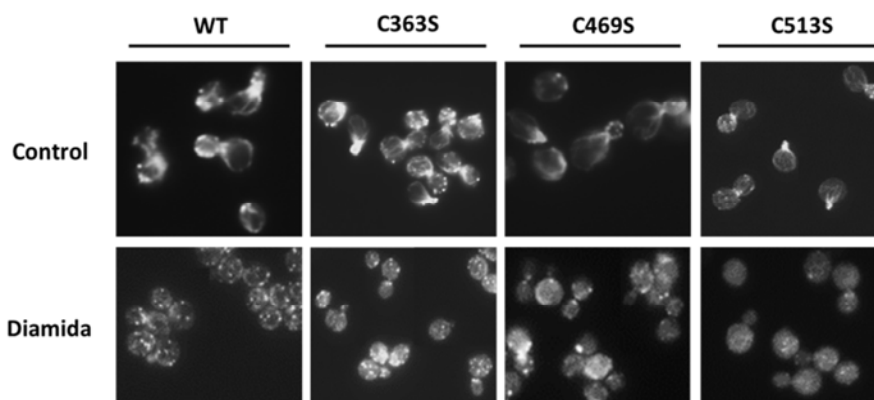


Figura 148. Anàlisi del citoesquelet d'actina en la soca WT i els mutants Sir2. Les cèl·lules es van deixar créixer exponencialment en medi YPD, es van tractar o no amb 5 mM diamida durant 1 hora i es va realitzar el marcatge de l'actina amb rodamina-fal·loïdina. Les imatges es van adquirir utilitzant el filtre UV.

L'actina és diana de les ROS, possiblement pel seu elevat nombre de cisteïnes, actuant així com una sensora; l'oxidació de l'actina pot senyalitzar donant lloc a una resposta apoptòtica o a un envelliment accelerat (Farrugia and Balzan 2012). No obstant, els mutants Sir2 tampoc presenten una alteració en l'actina respecte la soca WT.

9.5. Estudi del mutant Sir2-C469S i la seva localització

Donat que es va observar que *in silico* les cisteïnes C464 i C469 podrien estar formant part d'una seqüència NES putativa, es va decidir realitzar el marcatge amb GFP de Sir2 en la soca mutant Sir2-C469S per tal de poder estudiar la seva localització mitjançant microscòpia de fluorescència. Així, es podria determinar si aquesta cisteïna intervé en la regulació de la localització de Sir2 mitjançant la seva modificació per glutatiliació o la

formació de ponts disulfur entre les cisteïnes C464 i C469. Els resultats de localització de Sir2 en aquesta soca, tan en condicions control com després d'un estrès per diamida es mostren a la Figura 149.

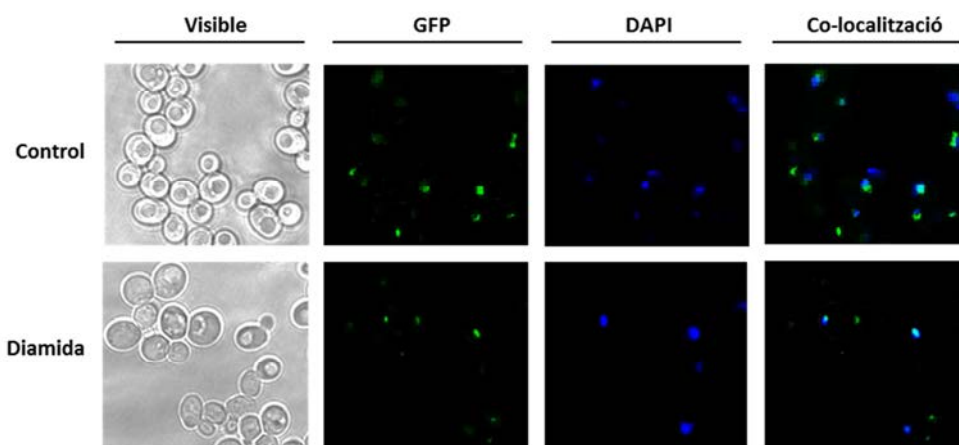


Figura 149. Anàlisi de la localització de Sir2-C469S-GFP en condicions control i en estrès per diamida. Les cèl·lules es van deixar créixer exponencialment en medi YPD, es van tractar o no amb 5 mM diamida durant 1 hora i es van obtenir les següents imatges: visible (òptica de contrast interferencial), GFP (senyal de Sir2-GFP obtingut utilitzant el filtre verd i representada també en verd), DAPI (tinció nuclear amb DAPI i obtinguda amb el filtre ultravioleta) i co-localització (superposició de les imatges de visible, GFP i DAPI).

En aquest treball ja es va demostrar que el tractament amb diamida no afecta la localització nuclear de Sir2 ni en una soca WT ni en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. Aquests resultats van mostrar que l'absència d'aquesta cisteïna tampoc afecta a la localització de Sir2, ni en condicions control ni després d'un estrès per diamida, indicant que probablement aquesta regió NES teòrica no té un paper fisiològic real.

10. ANÀLISI DE LA RESISTÈNCIA DELS MUTANTS A L'ESTRÈS OXIDATIU

A fi de conèixer com responien els mutants Sir2 quan es sotmetien a condicions d'estrès oxidatiu, es van realitzar assajos de creixement en medi líquid i assajos de viabilitat en placa.

10.1. Estudi de la viabilitat cel·lular

Una de les primeres aproximacions que es va dur a terme va ser analitzar la viabilitat cel·lular en medi sòlid dels mutants Sir2 quan es sotmetien a condicions d'estrès oxidatiu. Per això, les soques WT, Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S es van créixer fins a fase exponencial i es van plaquejar en plaques contenint 2 mM o 2,3 mM diamida i 3 mM dietilmaleat (DEM) (Figura 150). El DEM és un agent que reacciona directament amb el GSH i causa una depleció dels nivells de GSH intracel·lulars (Boylard and Chasseaud 1970).

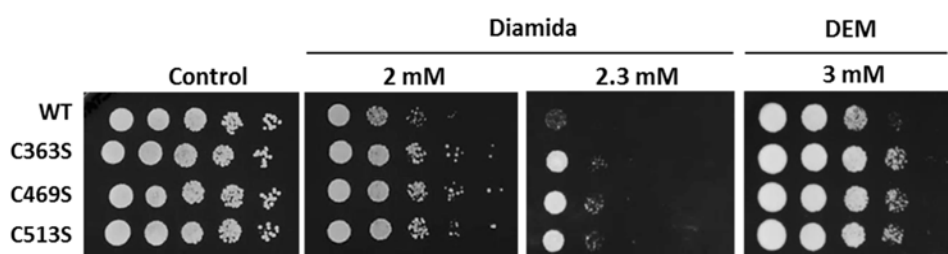


Figura 150. Viabilitat de les soques mutants a la diamida i al DEM. La soca WT i els mutants C363S, C469S i C513S es van créixer exponencialment en YPD i posteriorment, es van realitzar dilucions seriades 1:5 en plaques YPD sense, amb diamida (2 mM i 2,3 mM diamida) i amb 3 mM DEM.

Els resultats mostren que els tres mutants són més resistents que la soca WT, tan al tractament amb diamida com amb DEM.

10.2. Estudi de l'efecte en el creixement

Donats els resultats anteriors, es va mesurar l'efecte en el creixement de les soques mutants després de sotmetre-les a condicions d'estrès oxidatiu. Així, es va sotmetre els cultius crescuts en medi líquid als tractaments d'interès i es va analitzar el creixement cel·lular (OD_{600}) durant 30 hores en l'aparell *PowerWave XS* (BioTek Instruments) que mesura les dades de OD_{600} de cada un dels pouets amb una periodicitat de 30 minuts al llarg d'un total de 30 hores aproximadament.

10.2.1. Tractaments amb diamida i DEM

La primera aproximació que es va dur a terme va ser analitzar el creixement de les soques WT i dels mutants en medi líquid quan es sotmetien al tractament amb 2 mM diamida i 1,5 mM DEM (Figura 151).

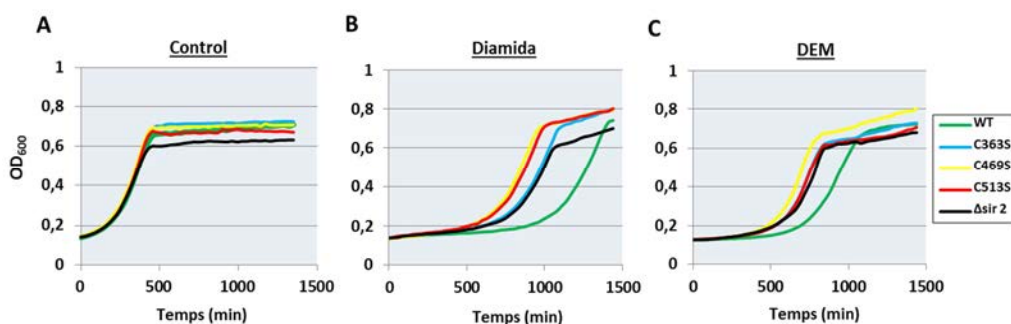


Figura 151. Estudi del creixement cel·lular de les soques mutants en condicions d'estrès per diamida i DEM. Anàlisi del creixement de les soques WT, C363S, C469S i C513S amb medi YPD. (A) Control (B) amb 2 mM diamida i (C) amb 1,5 mM DEM.

Els resultats obtinguts mostren que en la condició control totes les soques creixen d'igual manera. En presència de 2 mM diamida o 1,5 mM DEM, tots els cultius presenten un retard en el creixement o fase lag, que és menys acusat en els mutants Sir2 que en la soca WT. El mutant $\Delta sir2$ presenta un fenotip similar al dels mutants Sir2. Aquests resultats, anirien amb concordança amb els resultats obtinguts en la mesura de la viabilitat cel·lular en placa, on també s'observa clarament com els mutants Sir2 presenten major resistència a l'estrès oxidatiu que la soca WT.

10.2.2. Tractaments amb H₂O₂

Per analitzar l'efecte del H₂O₂ en el creixement dels mutants Sir2 es va dur a terme el mateix anàlisi de creixement, sotmetent les cèl·lules a 0,5 mM H₂O₂ i a 1 mM H₂O₂ (Figura 152). A diferència del que succeïa amb els agents oxidants específics dels grups tiols (diamida i DEM), quan s'analitza el creixement dels mutants amb H₂O₂ no s'observen diferències entre la soca WT i els mutants Sir2 en cap de les dues

concentracions d' H_2O_2 estudiades, indicant que la major resistència a estrès que presenten els mutants és específica d'agents oxidants que afecten els grups tiols.

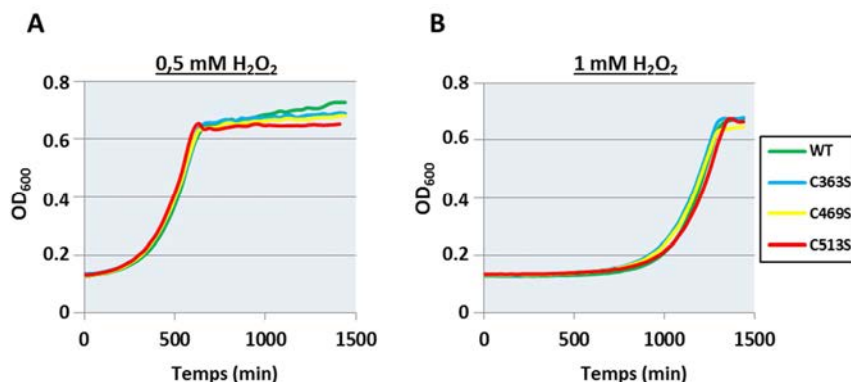


Figura 152. Estudi del creixement cel·lular de les soques mutants en condicions d'estrès oxidatiu per H_2O_2 . Anàlisi en medi líquid del creixement de les soques WT, C363S, C469S i C513S crescudes amb medi YPD (A) amb 0,5 mM H_2O_2 o (B) amb 1 mM H_2O_2 .

11. ENVELLIMENT CRONOLÒGIC I RESPOSTA ANTIOXIDANT DELS MUTANTS

Amb l'objectiu d'entendre la causa per la qual els mutants en les cisteïnes de Sir2 són més resistents a alguns agents oxidants respecte una soqueta WT i conèixer-ne les conseqüències, es va decidir analitzar tan l'envelliment cronològic com l'expressió o l'activitat d'alguns enzims antioxidants, com les glutaredoxines, la glutatió reductasa, la superòxid dismutasa o la catalasa, així com els nivells de GSH total.

11.1. Envel·liment cronològic dels mutants Sir2

Es coneix que l'estrès oxidatiu està relacionat amb l'envelliment. Per conèixer si la major resistència a l'estrès que presenten els mutants tenia conseqüències en nivell d'envelliment, es va decidir analitzar si existien diferències pel que fa a l'envelliment cronològic entre una soqueta WT i les soques mutants Sir2. Els cultius crescuts fins a una OD₆₀₀ = 0,5 es van considerar dia 0. Es van recollir les cèl·lules als 3, 10, 19, 24 i 27 dies i es van sembrar en plaques SC.

Els resultats de creixement obtinguts els diferents dies en cada una de les soques, es mostren a la Figura 153.

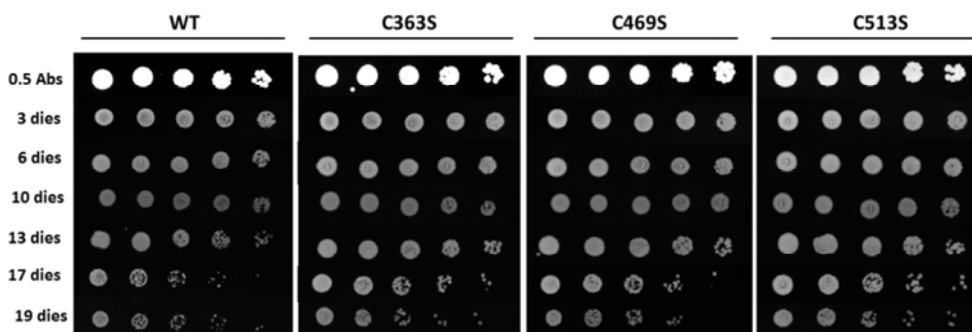


Figura 153. Estudi de l'envelliment cronològic. Els cultius de la soca WT i els mutants Sir2 es van fer créixer fins a fase exponencial en medi SC complementat amb les auxotròfies His, Trp, Leu i Ura i es van recollir cèl·lules a $OD_{600}=0,5$, 3 dies de creixement, 10 dies, 19 dies, 24 dies i 27 dies. Es van realitzar dilucions seriades (1:5), es van sembrar en plaques SC + His, Trip, Leu i Ura i es van deixar créixer durant 2 dies a l'estufa a 30°C.

L'anàlisi de l'envelliment cronològic demostra que els mutants Sir2 envelleixen menys ràpidament que una soca WT. Donat aquest resultat, es va decidir analitzar diferents defenses antioxidants que poguessin explicar tan el fenotip de major resistència a diamida i DEM, com la vida cronològica més llarga que aquests presenten.

11.2. Estudi dels nivells totals de glutatió reduït

Una de les molècules importants en la resposta a un estrès redox és el GSH. Per analitzar els nivells de GSH reduït en aquestes soques es va utilitzar la sonda fluorescent *ThioTrackerTM Violet*, que té la capacitat d'unir-se als grups tiols lliures. El GSH representa la majoria dels grups tiols reduïts de la cèl·lula; així doncs la reacció d'aquests amb la sonda fluorescent permetrà realitzar una estimació aproximada de la quantitat intracel·lular de GSH total. Els resultats obtinguts per les diferents soques es mostren a la Figura 154. Els resultats no van mostrar diferències significatives entre la soca WT i els diferents mutants Sir2, ni en la condició control ni quan les cèl·lules es sotmetien a 1 hora de tractament amb 2 mM diamida o 5 mM diamida. Per tant, es va

descartar que un increment en els nivells de glutatió reduït en les soques mutants en Sir2 fos el responsable de la major resistència a estrès.

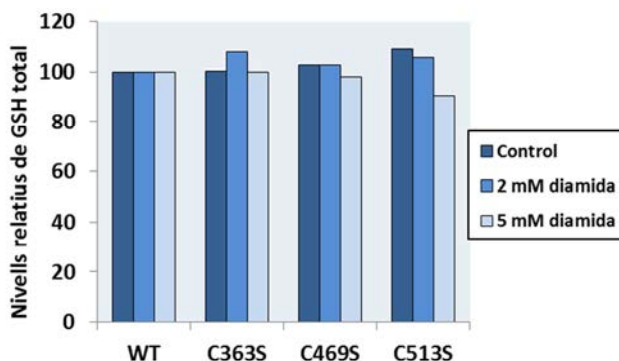


Figura 154. Estimació dels nivells de GSH reduït. Els nivells de GSH es van quantificar amb la sonda fluorescent *ThiolTrackerTM Violet*. Les soques WT, Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S es van fer créixer en YPD fins a fase exponencial i es van tractar amb 1 mM o 2 mM diamida. Després d'1 hora de tractament, les cèl·lules (1 OD) es van resuspendre amb medi SC + 20 μ M de la sonda durant 30 minuts a 30°C. Les cèl·lules es van rentar, resuspendre amb medi SC i es va mesurar la fluorescència (λ_{ex} = 404 nm i λ_{em} = 526 nm). S'indica el valor relatiu dels mutants respecte la soca WT.

11.3. Anàlisi de l'activitat glutatió reductasa

En *S. cerevisiae* existeix una única glutatió reductasa, *Glr1*, que redueix el GSSG a GSH. La seva absència en cèl·lules $\Delta glr1$ implica una major sensibilitat a estrès oxidatiu. Donat que els mutants Sir2 presenten una major resistència a estrès oxidatiu, es va decidir analitzar l'activitat glutatió reductasa (Figura 155).

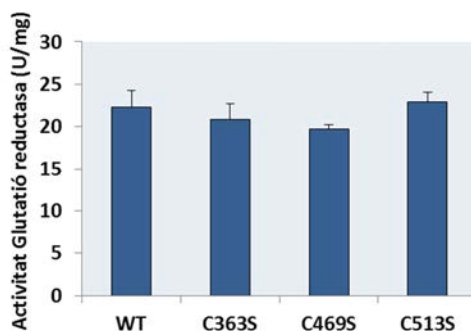


Figura 155. Determinació de l'activitat glutatió reductasa. Les cèl·lules de la soca WT i les soques mutants es van fer créixer en medi YPD fins a fase exponencial. Després d'obtenir els extractes cel·lulars amb 50 mM tampó fosfat sòdic pH=7,4, es va analitzar l'activitat per espectrofotometria, mesurant l'oxidació del NADPH a 340 nm.

Els resultats d'activitat glutatió reductasa (Figura 155) no van mostrar diferències significatives entre la soca WT i els mutants Sir2. Per tant, la major resistència a l'estrès per diamida i DEM tampoc es pot explicar per una major activitat glutatió reductasa.

11.4. Estudi dels nivells de Grx3 i Grx4

Donat que ni la quantificació de GSH total ni de l'activitat reductasa van mostrar diferències significatives que poguessin explicar la major resistència dels mutants a l'estrès per diamida i DEM, es va decidir analitzar si els nivells de les proteïnes Grx3 i Grx4 eren diferents entre els mutants i la soca WT. Per fer-ho, es van obtenir els extractes totals de cada una de les soques, es van separar en un gel SDS-PAGE i a partir d'un *Western Blot* amb un anticòs capaç de reconèixer tan Grx3 com Grx4, es van quantificar els nivells d'ambdues Grxs (Figura 156).

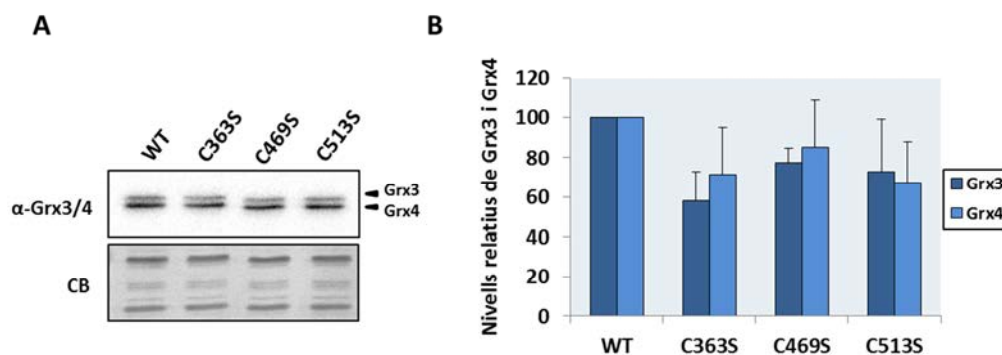


Figura 156. Determinació dels nivells de proteïna Grx3 i Grx4. Els cultius de la soca WT i dels mutants Sir2, es van créixer en medi YPD fins a fase exponencial. (A) *Western Blot* anti-Grx3/4 després d'obtenir els extractes cel·lulars i separar-los en un gel SDS-PAGE. (B) Quantificació dels nivells de Grx3 i Grx4 a partir del *Western Blot*, respecte la quantitat de proteïna total (Gel tenyit amb *Blau de Coomassie*).

Els resultats van mostrar que no existeixen diferències significatives pel que fa als nivells de Grx3 i Grx4 entre la soca WT i les soques mutants Sir2. Per tant, aquestes, com a sistema enzimàtic antioxidant tampoc serien les responsables directes de la major resistència de les soques mutants a l'estrès per diamida i DEM.

11.5. Determinació de l'activitat SOD

Un altre dels enzims antioxidants que es va analitzar va ser l'activitat de la superòxid dismutasa. Quan es va realitzar els experiments per determinar la viabilitat cel·lular de les soques, no es va veure que els mutants Sir2 presentessin major resistència a l'estrès per H_2O_2 . No obstant, i amb l'objectiu de trobar una explicació al fet que els mutants sí que són més resistents a l'estrès per diamida i DEM, es va provar d'analitzar si realment existien canvis en l'activitat d'aquest enzim, que de forma indirecta poguessin explicar aquest fenotip de major resistència. L'anàlisi de l'activitat Sod1 o CuZnSod (de localització citosòlica) i la Sod2 o MnSod (de localització mitocondrial) es van dur a terme mitjançant la mesura de l'activitat SOD en gel (zimograma). Es van dur a terme anàlisis de les activitats a diferents temps (exponencial $OD_{600}=3$, 24h i 48h de creixement), mostrats a la Figura 157.

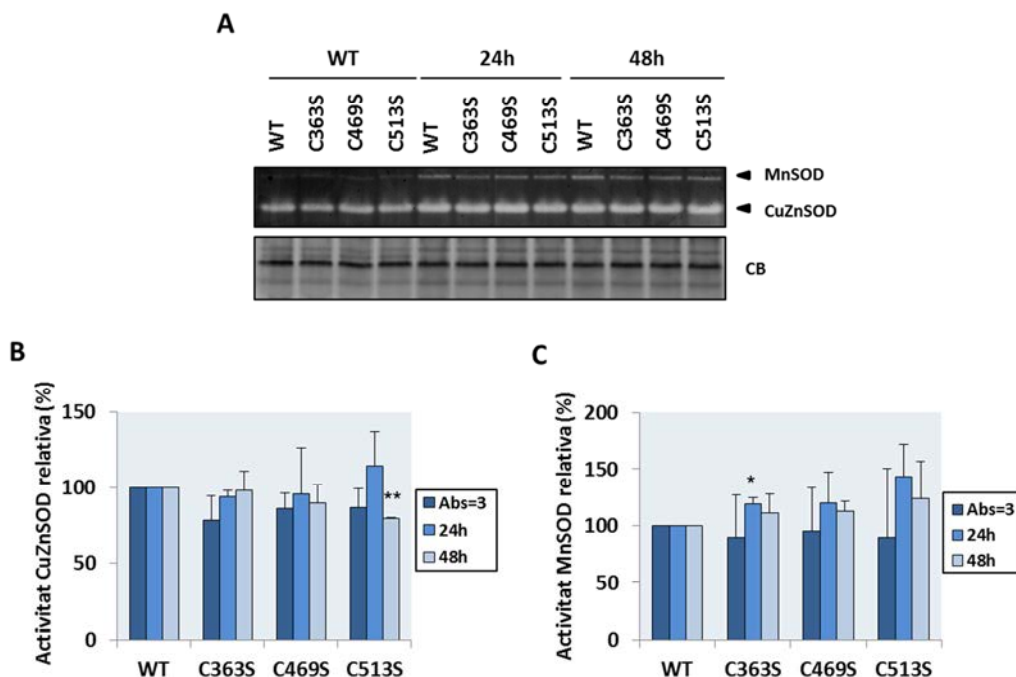


Figura 157. Determinació de l'activitat SOD en gel. La soca WT i les soques mutants es van fer créixer en medi YPD fins a una $OD_{600}=3$, 24h i 48h. (A) L'activitat SOD de la soca WT i els mutants es va determinar després d'obtenir els extractes cel·lulars amb tampó 50 mM fosfat sòdic pH=7 i carregar-ne 20 μ g en un gel natiu en condicions no desnaturalitzants. (B) Quantificació de l'activitat Sod1 relativa a l'activitat de la soca WT. (C) Quantificació de l'activitat Sod2 relativa a l'activitat de la soca WT. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Els resultats de l'activitat Sod1 (CuZnSOD) van demostrar que no existeixen diferències significatives a cap dels temps de creixement analitzats entre l'activitat de la soca WT i l'activitat dels mutants, amb excepció de la soca Sir2-C513S, on a temps de creixement de 48h sembla tenir menys activitat Sod1 que la soca WT (Figura 157B), encara que la diferència és menor. Pel que fa a l'activitat Sod2 (MnSOD), en general tampoc es van detectar diferències significatives entre l'activitat dels mutants i l'activitat de la soca WT. Només el mutant Sir2-C363S presenta major activitat Sod2 a les 24h de creixement respecte la soca WT (Figura 157C). En general els resultats no es poden considerar gaire concloents i sembla que les diferències, si existeixen, serien mínimes i no explicarien el fenotip de major resistència dels mutants Sir2.

11.6. Estudi de l'activitat catalasa

En *S. cerevisiae* existeixen dues catalases Ctt1, de localització citosòlica i Cta1, localitzada als peroxisomes i mitocondria, i codificades pels gens *CTT1* i *CTA1*, respectivament. Tot i que aquest enzim no tindria un efecte directe en la detoxificació de l'estrès generat per la diamida i el DEM, es va decidir analitzar la seva activitat per detectar possibles diferències entre la soca WT i els mutants. L'activitat es va analitzar a diferents temps de creixement: exponencial ($OD_{600}=3$), 48h i 72h (Figura 158).

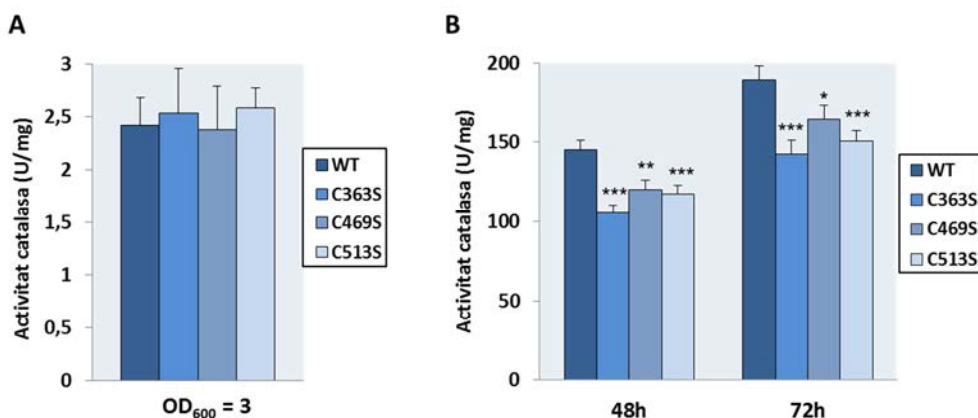


Figura 158. Activitat catalasa a diferents temps de creixement. Les soques WT i mutants es van fer créixer en medi YPD fins a una $OD_{600}=3$, 48h i 72h. Els extractes cel·lulars es van obtenir amb tampó 50 mM fosfat sòdic pH=7 i es va dur a terme l'anàlisi de l'activitat per espectrofotometria a 240 nm. L'activitat es va normalitzar per la quantitat de proteïna total. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

L'anàlisi de l'activitat catalasa quan les soques estaven en fase exponencial ($OD_{600}=3$) no va mostrar diferències significatives entre la soca WT i les soques mutants (Figura 158A). En cultius crescuts fins a 48h i 72h (Figura 158B) els resultats van mostrar una menor activitat catalasa en tots els mutants respecte la soca WT. No obstant, quan es va analitzar la viabilitat cel·lular quan les cèl·lules es sotmetien a un estrès per H_2O_2 , no es van observar diferències després de 24 hores de creixement entre la soca WT i els mutants, apuntant que totes les soques eren igual de resistents a aquest agent.

DISCUSSION

DISCUSSIÓ

1. Sir2, una proteïna conservada des de bacteris fins a humans

Les sirtuïnes són una família d'histona desacetilases NAD^+ dependents, descrites després de la identificació de Sir2 de *S. cerevisiae*, una proteïna descoberta a partir d'un *screening* de gens necessaris pel silenciament transcripcional del loci d'aparellament en el llevat de gemmació (Klar, Fogel, and Macleod 1979). Les sirtuïnes estan presents en tots els regnes de la vida i varien en nombre en les diferents espècies, anant des d'una única sirtuïna en bacteris fins a set de diferents en vertebrats, amb diferents localitzacions i funcions especialitzades. Es va determinar que aquestes proteïnes es troben presents en tots les espècies analitzades, exceptuant dues algues vermelles i alguns arqueus (Greiss and Gartner 2009). Pel que fa a l'estructura, s'han pogut cristal·litzar varies sirtuïnes de diferents organismes (Finnin, Donigian, and Pavletich 2001)(Min et al. 2001)(Avalos et al. 2002)(Chang et al. 2002)(K. Zhao et al. 2003). L'anàlisi dels residus conservats va mostrar que la majoria estan implicats en la formació de la cavitat catalítica, en la unió del NAD^+ i en la coordinació del substrat acetilat. A més, les cisteïnes que coordinen l'àtom de zinc també es troben altament conservades. Mentre que algunes sirtuïnes tan sols posseeixen el domini catalític, altres com Sirt1 humana contenen extensions del domini N- i C-terminal necessaris per la interacció amb altres proteïnes o per la conferència d'especificitat en el reconeixement dels substrats (Greiss and Gartner 2009). D'entre les diferents sirtuïnes humanes, Sirt1 és la que comparteix una major homologia amb Sir2 de llevat, donat que és la que presenta major similitud i identitat de seqüència (Figura 159) Sirt1 està implicada en la remodelació de la cromatina desacetilant varies histones, entre les quals hi ha la H3K9ac, H3K14ac, H4K16ac i H1K26ac (Vaquero et al. 2004), algunes d'elles compartides amb la seva homòloga Sir2. En *S. cerevisiae*, Sir2 s'ha relacionat amb el silenciament dels telòmers, el loci d'aparellament, el rDNA i també s'ha descrit implicada en el procés d'envelliment, en la regulació de l'estrès oxidatiu, la segregació asimètrica d'òrgànuls i proteïnes durant la divisió cel·lular, el citoesquelet d'actina i el metabolisme. En eucariotes superiors, les sirtuïnes també estan relacionades amb el silenciament transcripcional, l'envelliment, la regulació de múltiples processos

patològics, l'apoptosi i la regulació metabòlica. Moltes d'aquestes funcions en eucariotes superiors no estan relacionades amb la desacetilació de les histones i de fet, s'han descrit molts substrats diferents a les histones. Sirt1 és la sirtuïna més ben caracteritzada de mamífers i és predominantment nuclear, encara que també desenvolupa algunes funcions al citoplasma (Tanno et al. 2007). Interacciona i regula múltiples substrats de tipus histona i no histona com p53 (Vaziri et al. 2001), NF- κ B (Yeung et al. 2004), PPAR γ (Picard et al. 2004), PGC1- α (Rodgers et al. 2005) i factors transcripcionals FOX (Brunet et al. 2004)(Motta et al. 2004). Estudis moleculars han descrit que Sirt1 està implicada tan en la regulació de nombrosos processos cel·lulars, des del metabolisme dels lípids i la glucosa, fins la modulació de la resposta a l'estrès, l'envelliment, el càncer, les malalties cardíaques i les neurodegeneracions (Giblin, Skinner, and Lombard 2014). Sir2 de *S. cerevisiae* és estrictament nuclear, tal com s'ha descrit en aquest treball a través del marcatge de la proteïna amb GFP.

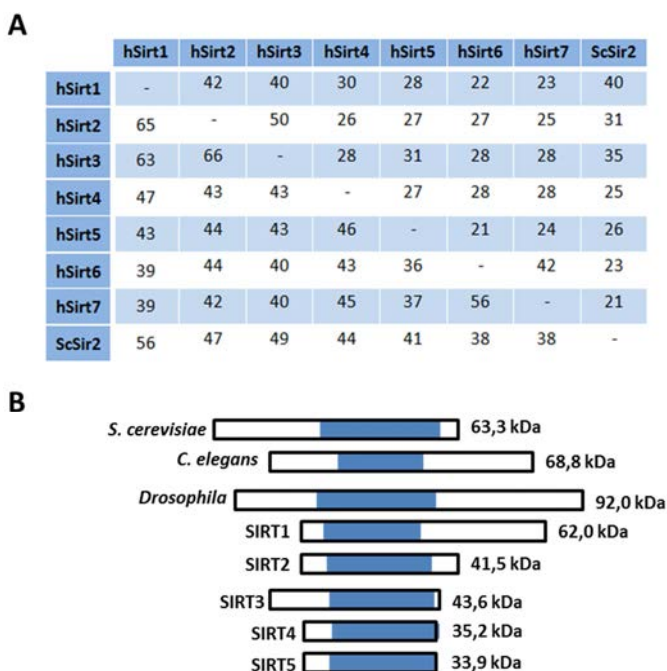


Figura 159. Comparació de les seqüències de diferents sirtuïnes. (A) Identitat i similitud de seqüència entre les diferents sirtuïnes humanes i Sir2 de *S. cerevisiae*. Els diferents números representen el percentatge d'identitat de seqüència i similitud de cada parell de seqüències (Voelter-Mahlknecht and Mahlkecht 2006). (B) Comparació esquemàtica de Sir2 de *S. cerevisiae*, *C. elegans* i *Drosophila* amb cinc sirtuïnes humanes. Els dominis que presenten homologia es marquen en fosc i s'indica el pes molecular de cada proteïna.

Fins al moment, les úniques modificacions postraduccionals descrites per Sir2 de llevat són la fosforilació i la sumoilació. S'ha demostrat que la fosforilació de Sir2 a S473 està regulada per la via cAMP-PKA i la cinasa CK2 i això determina una reducció de la vida replicativa del llevat (Kang et al. 2015). La fosforilació de S23 i de Y400 es va determinar a través d'assajos globals de detecció de proteïnes fosforilades en *S. cerevisiae* i tot i que es coneix que són específiques de certes fases del cicle cel·lular, la seva funció exacta roman desconeguda (Holt et al. 2009)(Swaney et al. 2013). La sumoilació regula el silenciament de Sir2 a través de la modulació de la seva localització. Concretament, la sumoilació de K215, però no de K106 ni K132, provoca l'acumulació de Sir2 al nuclèol (Hannan et al. 2015). En canvi, per Sirt1 de mamífers s'han descrit diferents tipus de modificacions (Figura 160). Entre elles s'inclou múltiples fosforilacions (Sasaki et al. 2008)(Zschoernig and Mahlknecht 2009), de les quals s'han identificat fins a 15 llocs diferents. A més, un lloc de sumoilació (Y. Yang et al. 2007), dos llocs de nitrosilació (Kornberg et al. 2010) i tres per glutatiolació (Caito et al. 2010)(Zee et al. 2010).

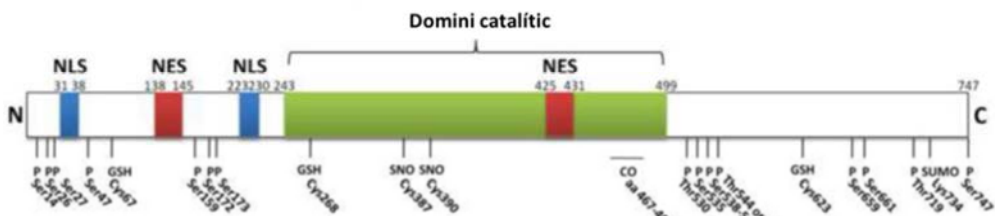


Figura 160. Esquema de les modificacions postraduccionals de Sirt1. Sirt1 de mamífers consta de 747 aminoàcids, un domini catalític (verd), dues seqüències de localització nuclear (blau) i dues seqüències d'exportació nuclear (vermell). Modificacions: P, fosforilació; GSH, glutatiolació; SNO, nitrosilació; CO, carbonilació; SUMO, sumoilació (J. Hwang et al. 2013).

Una de les principals característiques tant de Sir2 com de Sirt1 és l'elevat nombre de cisteïnes que presenten a la seva estructura; 11 residus de cisteïna en el cas de Sir2 i fins a 19 residus en el cas de Sirt1 (Figura 161). La presència d'aquest nombre de cisteïnes en Sir2 (un 1,96% sent un 1,2% la mitjana de cisteïnes en *S. cerevisiae*), juntament amb el paper que Sir2 desenvolupa pel que fa a la resposta a l'estrès oxidatiu, apunta a que aquesta sirtuïna podria ser regulada mitjançant el seu estat redox.

sp P06700 SIR2_YEAST	MTIPHKYAVSKTS---ENKVSNTVSPQTQDKDAIRKQPDDI-----INNDEPSHKIKIVA	52
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	MA-DEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGLERSPGEPGGAAPERE	59
	*: . * : : : : : : * : * : . * : . :	
sp P06700 SIR2_YEAST	QPDSLRENTTDDPLGHTKAALGEVASMELKPT-NDMDPLAVSAASVVSMSNDVLKPETPK	111
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	VPAARG-----CPGAAAAALWREAEAFAAAGGGEQAQAT-----AAAGEGDN	103
	* : * * : * * * . * . * : : : * . . * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	GPIISK--NPSNGIFYGSPFTK--RESLNARMFLKYYGAHKF-----	150
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	GPGLQGSPREPLADNLYDEDDDEGEEEEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESD	163
	** : . * : * . . . * . * : * * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	-----LDTYLPEDLNLSLYIYLIKLLGFVQDQALIGTINSIVHINSQERVQDLG-	200
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	EEDRASHASSDWTPRRIGPYTFVQQ-----HLMIGTDPRT-----ILKDLLP	207
	. : * . * : . : : : : : : : : : * * * : : * * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	SAISVTNVEDPLAKKQTVRLIKDLQRAINKVLCRLRLSNFFTIDHFIQKLHTARKILVL	260
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	ETIPPELDDMTLWQIVINI-----LSEPPKRRKRKIDINTIEDAVKLLQECCKIIVL	259
	: * : * : : : : : : : . * : : * : : * : : * : * : * * * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	TGAGVSTSLGIPDFRSSEGFYSKIK--HLGLDDPQDVFNYNIFMHDPVFNFIANMVLPP	318
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	TGAGVSVSCGIPDFRSRDIYARLAVDFPDLDPQAMFDIEYFRKDRPFFKFAKAIYYPG	319
	***** * ***** * : * : : . * * * : * : * * * * : * * * * : * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	EKIYSPHLSFIKMLQMKGLLRNYTQNIIDNLESYAGISTDKLVQCHGFSFATATVTCIHWN	378
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	QFQPSLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIIDTLEQVAGIQ--RIIQCHGFSFATASCLICKYK	377
	: * * * * : : * : * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	LPGERIFNKIRNLELPLCPYCYKRRREYFPEGYNNKVGVAASQGSMSERPPYILNSYGLV	438
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	VDCEAVRGDIFNQVVRCPRCPADE-----PLAIM	407
	: * : . * * * * * * * : : :	
sp P06700 SIR2_YEAST	KPDITFFGEALPNKFHKSIREDILECDLLICIGTSLKVAPVSEIVNMVPSHPVQVLINRD	498
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	KPEIVVFGENLPEQFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILINRE	467
	* : * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	PVKHAEFDLSLLGYCDIAAMVAQCGWTIPHKKNWDLKKNFKCQE--KDKGVYVVT	555
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	PLPHLHFDVLLGDCDVIINELCHRLGGEYAKLCCNPVKLSEITEKPPRTQKELAYLS--	525
	* : * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	DEHPKTL-----	562
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	ELPPTLHVSESSSPERTSPDSSVIVTLLDQAAKSNDDLVDVSESKGCEEEKPQEVQTS	585
	: * . * :	
sp P06700 SIR2_YEAST	-----	562
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	RNVESIAEQMENPDLKNVGSSTGKNERTSVAGTVRKCPNVRVAKEQISRRLDGNQYFLF	645
sp P06700 SIR2_YEAST	-----	562
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	PPNRYIFHGAEVYSDSEDDVLSSSSCGSNSDSGTQSPSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDE	705
sp P06700 SIR2_YEAST	-----	562
sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	PDVPERAGGAGFGTDGDDQEAINEAISVKQEVTDMNYPNKS	747

Figura 161. Alineament entre les seqüències Sir2 de *S. cerevisiae* i Sirt1 humana. Els residus de cisteïna de cada seqüència, 11 en el cas de Sir2 i 19 en el cas de Sirt1, es marquen en groc. Alineament realitzat amb el software Clustal Omega (1.2.1).

A més, a l'inici d'aquest treball ja existien algunes evidències que Sirt1 podria estar regulada per un mecanisme redox. Les primeres evidències van sorgir de la descripció de la glutatiolació *in vitro* de C67 (Zee et al. 2010), una cisteïna localitzada a l'extrem N-terminal de la proteïna però no conservada en Sir2 de *S. cerevisiae*. Es va descriure que els oxidants tenen la capacitat de modificar covalentment Sirt1, disminuint la seva activitat enzimàtica i marcant la proteïna per ser degradada (Caito et al. 2010). A més, la sobreexpressió de Grx1 n'evita la seva degradació (Caito et al. 2010). El fet que l'activitat i els nivells de proteïna Sirt1 disminueixin en condicions d'inflamació crònica i envelliment on també tenen lloc condicions d'estrès oxidatiu, van a favor de la regulació redox de la proteïna (J. Hwang et al. 2013). Analitzant les seqüències de Sir2 i Sirt1 (Figura 161) s'observa que només alguns residus de cisteïna estan conservats.

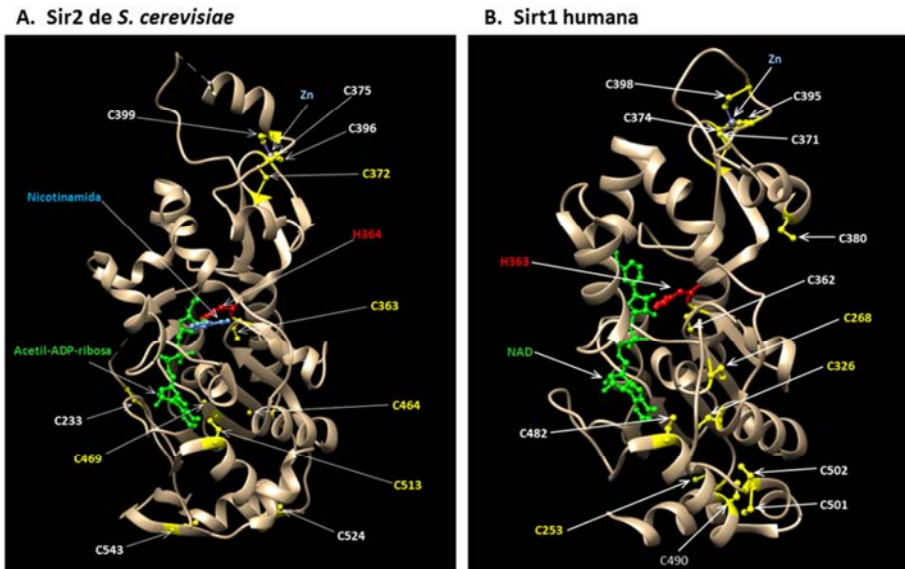


Figura 162. Estructura tridimensional de Sir2 de *S. cerevisiae* i Sirt1 humana. (A) Representació de Sir2 (PDB: 2HJH) amb els productes de la reacció, la nicotinamida i l'acetil-ADP-ribosa. Es mostra l'àtom de zinc, la H364 catalítica i cada una de les cisteïnes que formen part de l'estructura de Sir2. Estructura cristal·litzada de Sir2 obtinguda per difracció de raigs X amb una resolució de 1,85Å (B) Representació de Sirt1 (PDB: 4I5I) amb el substrat NAD⁺. Es mostra l'àtom de zinc, la H363 catalítica i cada una de les cisteïnes que formen part de l'estructura de Sirt1. En groc es marquen els residus de cisteïna que s'han descrit glutatiolats (Bräutigam et al. 2013). Estructura cristal·litzada de Sir2 obtinguda per difracció de raigs X amb una resolució de 1,85Å. Imatges modelades amb el software UCSF Chimera.

Entre ells, la cisteïna del centre actiu, adjacent a la histidina catalítica (C363 en Sir2 i C362 en Sirt1), les cisteïnes que coordinen l'àtom de zinc (C372, C375, C396 i C399 en Sir2 i C371, C374, C395 i C398 respectivament en Sirt1) i una altra cisteïna que es localitza a la cavitat catalítica (C513 en Sir2 i C482 en Sirt1). No obstant, cap de les cisteïnes que es van detectar modificades per glutatiolació en Sirt1 (Bräutigam et al. 2013) està conservada en Sir2, tot i que a nivell estructural, la posició d'aquestes es manté bastant conservada (Figura 162).

En aquest treball s'ha descrit que Sir2 està regulada mitjançant el seu estat redox, sent la glutatiolació una de les formes d'oxidació a les quals està sotmesa i les glutaredoxines Grx3 i Grx4 els seus sistemes reductors fisiològics. Les funcions en les que s'ha descrit la participació de Sir2 es caracteritzen per tenir en comú l'estrès oxidatiu. Per tant, l'estrès oxidatiu estaria actuant com un mecanisme de regulació de l'activitat de Sir2, que permetria a aquesta histona desacetilasa desencadenar les respostes adequades per fer front a aquesta situació d'estrès cel·lular.

2. Regulació *in vitro* de la proteïna Sir2

Sabent tot això resulta interessant estudiar si en Sir2 aquest mecanisme de regulació redox es troba conservat i si existeix algun sistema fisiològic que actuï com a reductor, regulant així, l'estat redox de Sir2. A partir de la proteïna recombinant purificada es van dur a terme tot un seguit d'estudis de l'activitat *in vitro*, emprant l'assaig *Fluor de Lys*. Com a control negatiu de l'assaig es va determinar l'activitat de la proteïna mutant per la histidina catalítica (Sir2-H364Y), altament conservada entre sirtuïnes de diferents espècies (Figura 163). Com era d'esperar, es va corroborar que el mutant Sir2-H364Y no presenta activitat desacetilasa.

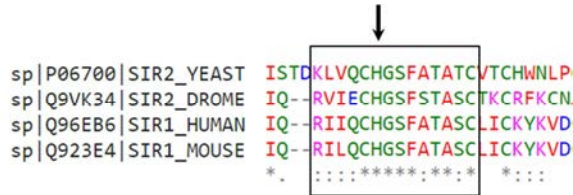


Figura 163. Alineament entre les seqüències Sir2 de *S. cerevisiae*, Sir2 de *D. melanogaster*, Sirt1 de ratolí i Sirt1 humana. Es mostra la part central de la seqüència i en un requadre s'assenyala el centre catalític amb el residu d'histidina conservat. Alineament realitzat amb el *software* Clustal Omega (1.2.1).

Pel que fa a l'activitat de la proteïna WT, l'addició d'agents reductors no en varia l'activitat (Figura 97), fet que implica que la proteïna es purifica en el seu màxim estat reduït, tal com s'observa també amb el tractament amb la PEG maleimida (Figura 103). El tractament amb agents oxidants, com l' H_2O_2 i la diamida, va demostrar que Sir2 és sensible a l'estrès oxidatiu (més sensible a la diamida que a l' H_2O_2), inhibint-se la seva activitat, però sent quasi recuperada completament amb agents reductors com el DTT i el GSH després d'una oxidació per diamida (Figura 101). En canvi, la recuperació és molt menor quan es tracta la proteïna amb H_2O_2 . Aquest fet podria tenir almenys tres explicacions no excloents. La primera seria l'oxidació dels tiols a formes irreversibles per DTT o GSH com l'àcid sulfínic o l'àcid sulfònic. La segona seria l'oxidació d'aminoàcids diferents de les cisteïnes; l' H_2O_2 es caracteritza per oxidar altres residus com per exemple les histidines. Si la histidina catalítica s'oxidés, és probable que Sir2 perdés la seva activitat. I tercera, es podria explicar per la pèrdua del metall que presenta Sir2. Les histona desacetilases es caracteritzen per presentar un àtom de zinc a la seva estructura, que en el cas de les sirtuïnes (a diferència del que succeeix amb les HDACs de tipus I i II) no participa en l'activitat catalítica de l'enzim ni es troba localitzat al centre actiu, sinó que contribueix al manteniment de l'estructura. En Sir2 aquest àtom de zinc es troba coordinat per quatre residus de cisteïna: C372, C375, C396 i C399, i la seva mutació a alanina aboleix completament la funció de silenciament al rDNA, telòmers i loci d'aparellament (Sherman et al. 1999). Estudis realitzats amb Sir2 de *P. falciparum* han descrit que la pèrdua de l'àtom de zinc provoca un desplegament parcial de l'estructura de la proteïna que acaba resultant en la pèrdua de l'activitat de

l'enzim (Chakrabarty and Balaram 2010). Així, l'oxidació de Sir2 per H_2O_2 pot causar la pèrdua de l'àtom de zinc, possiblement per l'oxidació de les cisteïnes que l'uneixen, fet ja descrit en algunes proteïnes com Hsp33 (Jakob, Eser, and Bardwell 2000) o Trx2 (Collet et al. 2003), en les quals s'ha demostrat que constitueixen les principals dianes de modificacions oxidatives reversibles i per tant, suposen una forma de regulació de l'activitat proteica. Per estudiar si l'absència de recuperació completa de l'activitat era deguda a la pèrdua de l'àtom de zinc, es va tractar la proteïna amb DTT i $ZnCl_2$ donat que està descrit que la reconstitució de l'enzim amb zinc, després que aquest hagi estat eliminat, en permet la recuperació de l'activitat en *P. falciparum* (Chakrabarty and Balaram 2010). No obstant, cap de les concentracions de $ZnCl_2$ utilitzades ni la combinació de $ZnCl_2$ amb DTT va permetre una recuperació de l'activitat. De totes maneres, cal tenir en compte que el tractament amb H_2O_2 podria estar oxidant les cisteïnes d'unió al zinc a formes irreversibles o formes no reversibles per agents reductors, fet que provocaria que el zinc no pogués ser acceptat per les cisteïnes, tot i ser aportat exògenament. En el tractament amb diamida, tot i que els agents reductors permeten una major recuperació de l'activitat Sir2 en comparació amb el tractament amb H_2O_2 , aquesta tampoc era del 100%. No obstant, i igual que en el cas de l' H_2O_2 , l'aportació de zinc en forma de $ZnCl_2$ tampoc va incrementar la recuperació de l'activitat, fet que indica que segurament la diamida, a altes concentracions, genera formes d'oxidació irreversibles o més probablement, podria ser que l'oxidació d'algunes cisteïnes provoca canvis estructurals no reversibles en el temps que dura l'experiment.

De totes maneres, la pèrdua d'activitat Sir2 correlaciona amb glutatiolació, després d'un estrès per diamida, tal com es va determinar per *Western Blot* i amb l'assaig Di-Eosina-GSSG. De fet, l'anàlisi de cisteïnes oxidades emprant PEG maleimida va mostrar que s'oxiden fins a un màxim de 5 cisteïnes (Figura 103). Quan Sir2 es tracta amb concentracions de diamida/GSH on la proteïna perd una activitat superior al 80%, la forma predominant deixa de ser la forma reduïda i s'observen diferents formes d'oxidació, que inclouen poliglutiolacions i és possible que també ponts disulfur, sent majoritàries les formes que presenten 1, 2 i 3 cisteïnes oxidades. Tot això explicaria que algunes cisteïnes de Sir2 no contribueixen de forma directa (en la catàlisi) ni indirecta

(estructuralment) en l'activitat de Sir2, mentre que hi hauria una o algunes altres cisteïnes que la seva modificació per oxidació comportaria la pèrdua de l'activitat, ja sigui perquè la modificació bloqueja la reacció de desacetilació o bé perquè l'oxidació comporta un canvi estructural que impedeix a la sirtuïna desenvolupar la seva funció. Per tant, aquests resultats relacionen la glutatiolació amb la inactivació de Sir2 *in vitro*, tractant-se d'un procés reversible; és a dir, mentre l'oxidació de cisteïnes provoca la inactivació de la proteïna, la reducció l'activa.

Amb l'objectiu de determinar un possible reductor fisiològic de Sir2, es va decidir analitzar la capacitat de Grx3 i Grx4 de reduir Sir2 i observar l'efecte en l'activitat de Sir2 *in vitro*, donat que les dues proteïnes es localitzen al nucli igual que Sir2 i per tant, podrien ser unes bones candidates en el control redox de Sir2 *in vivo*.

Així, es va poder determinar la capacitat de Grx3/4 d'actuar com a tiol-reductases de Sir2 després del tractament amb Di-Eosina-GSSG. Aquest assaig, a banda de corroborar la glutatiolació de Sir2 determinada a través de *Western Blot*, també va permetre descartar la glutatiolació de DnaK, que presenta 1 residu de cisteïna i co-purifica amb Sir2. Es va demostrar que la glutatiolació de Sir2 després del tractament amb Di-Eosina-GSSG és revertida per Grx3 i Grx4 (Figura 107). La cinètica calculada per aquesta reacció, assumint que Sir2 es troba completament monoglutatiolada a temps zero és de $5,6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Això mostra que l'eficiència de desglutatiolació de Grx3 i Grx4 no és gaire alta. No obstant, no és la primera vegada que es descriuen aquestes eficiències per les Grxs monotíliques: Grx5 requeria 60 minuts a un pH òptim per desglutatiolar aproximadament un 65% de l'anhidrasa carbònica III (Tamarit et al. 2003). Aquests resultats són similars als obtinguts per Grx3 i Grx4 emprant Sir2 com a substrat, on en una hora s'observa un 50% de desglutatiolació. Encara que les Grxs monotíliques puguin ser considerades enzims catalíticament ineficients, cal tenir en compte que l'assaig es va dur a terme a pH=6,5. Tot i que aquest pH no és l'òptim, la glutatiolació de Sir2 per Di-Eosina-GSSG a pHs més alts causava la formació d'agregats de Sir2 d'alt pes molecular, que inclús no eren capaços d'entrar al gel SDS-PAGE. Així a pH=8 més d'un 50% de Sir2 es trobava en forma d'agregats, els quals mai s'havien observat *in vivo*, fet que indica que possiblement es tractava d'unes estructures artefactuals

causades específicament per la Di-Eosina-GSSG. A pH=6,5 aquests agregats no s'observaven i se seguia observant glutatiolació de Sir2, fet indicatiu que el pKa de les cisteïnes reactives es bastant baix. L'especificitat de l'activitat tiol-reductasa de Grx3 i Grx4 es va confirmar amb diferents aproximacions (Figura 108): i) el bloqueig de les cisteïnes de Grx3 i Grx4 abans de ser incubades amb Sir2 no permet la desglutatiolació de Sir2 ii) el tractament de Sir2 amb concentracions fisiològiques de GSH semblants a les que es podrien trobar al nucli no varien els nivells de glutatiolació de Sir2 i iii) la proteïna mutant Grx3-C211S és completament incapaç de desglutatiolar Sir2.

Per tant, sabent això, es va analitzar si Grx3 i Grx4 també tenien la capacitat de recuperar l'activitat de Sir2 *in vitro*, una vegada aquesta havia estat sotmesa a una condició d'estrès oxidatiu. Es van dur a terme dues aproximacions; i) utilitzant les proteïnes Grx3 i Grx4 recombinants i ii) immunoprecipitant Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae* i utilitzar l'immunoprecipitat en el tractament de Sir2 oxidada. Malgrat es van dur a terme diferents intents, no es va poder recuperar l'activitat de Sir2 amb Grx3 o Grx4 *in vitro* per motius experimentals. No obstant això, en conjunt els resultats van confirmar per una banda que Sir2 es desglutatiola específicament per Grx3 i Grx4 i que a més, aquestes ho fan a través del domini GRX, que és on es localitza la C211. Tan Grx3 com Grx4 es diferencien de la resta de Grxs pel fet de presentar a més d'un domini GRX, un domini TRX addicional unit a través d'una seqüència *linker* a l'extrem N-terminal del domini GRX (Figura 164). El centre actiu de la proteïna es localitza al domini GRX; no obstant, el domini TRX també posseeix una seqüència que recorda al típic centre actiu conservat en les Trxs, tot i que tan sols conté una única cisteïna enlloc de les 2 cisteïnes de les Trxs. Cada un d'aquests dominis conté una cisteïna (la de centre actiu o domini GRX i la del domini TRX). A més, Grx3 es caracteritza per presentar una cisteïna addicional a la seqüència *linker*.

S'ha descrit que el domini GRX és essencial per l'activitat oxidoreductasa tan de Grx3 com de Grx4 i que el domini TRX tan sols participa en la localització nuclear d'aquestes Grxs (Molina et al. 2004). Tot i això, existeix controvèrsia sobre si les Grxs actuarien realment com a Trxs a través del seu domini TRX. Els resultats d'aquest treball demostren que, per una banda Grx3 i Grx4 actuen específicament en la desglutatiolació

de Sir2 i per una altra, confirmen que l'activitat tiol-reductasa és específica del domini GRX, donat que el mutant Grx3-C211S és incapaç de desglutatiolar Sir2.

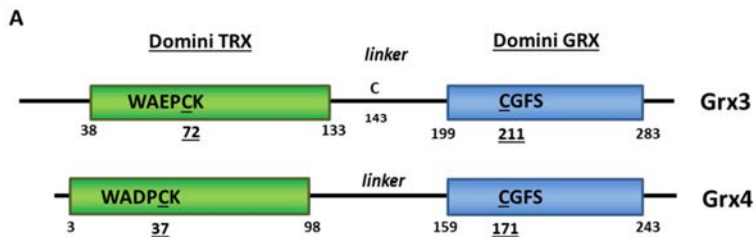


Figura 164. Esquema de Grx3 i Grx4 de *S. cerevisiae*. Tan Grx3 com Grx4 es caracteritzen per presentar un domini GRX (blau) a més d'un domini TRX (verd). En cada cas s'indica la seqüència conservada i la seva posició en cada un dels dominis. Adaptat de (Molina et al. 2004).

Així, tots aquests resultats *in vitro* apunten a que Sir2 és regulada mitjançant el seu estat redox i que Grx3 i Grx4 podrien actuar com els seus sistemes reductors fisiològics. És per això que es va iniciar l'estudi *in vivo* d'aquestes Grxs, tan a nivell de regulació de l'estat redox de Sir2 com de la seva activitat.

3. Regulació *in vivo* de Sir2 i el paper de Grx3/4.

Les Grxs són oxidoreductases implicades en la reducció dels ponts disulfur proteics o els ponts disulfur mixtes entre el GSH i les proteïnes. A més, Grx3 i Grx4 presenten una localització nuclear igual que Sir2. Donat a tot això i a les evidències observades *in vitro* en aquest treball, es va decidir analitzar el paper d'ambdues Grxs monotíliques en la regulació de l'estat redox i l'activitat *in vivo* de Sir2. Així, es va analitzar com la manca de diferents Grxs afecta a l'estat redox de Sir2. L'anàlisi realitzat amb la metodologia de derivatització amb AMS va permetre realitzar una determinació qualitativa de l'estat redox de Sir2, però no quantitativa del nombre exacte de cisteïnes oxidades, donat que aquesta maleïda només aporta un canvi en el pes molecular de la proteïna de 500 Da per cisteïna unida. Tot i això, es va poder distingir clarament patrons de major i menor oxidació entre les diferents soques (Figura 113). Mentre que en la condició control, la soca WT i el mutant $\Delta grx4$ presenten un patró redox de Sir2 similar, el doble mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ i el mutant $\Delta grx3$ es caracteritzen pel fet que Sir2 es troba lleugerament

més oxidat. Al sotmetre les cèl·lules a estrès per diamida es va comprovar que el tractament amb 4 mM diamida provoca un increment de l'estat oxidat de Sir2 tan en els mutants simples com en el doble mutant per Grx3 i Grx4, mentre que en aquesta mateixa condició, Sir2 de la soca WT no presenta modificacions. Aquest canvi però, és més evident amb el tractament amb 5 mM diamida, en el que tot i que Sir2 de la soca WT presenta una barreja entre formes oxidades i reduïdes, els mutants per Grx3 i Grx4 presenten la majoria de Sir2 en la seva forma oxidada. Grx3 i Grx4 no només participen en la protecció de Sir2 front a l'estrès per diamida sinó que també es va demostrar que tenien la capacitat d'actuar com les seves tiol-reductases, retornant-la al seu estat reduït després d'una condició d'estrès oxidatiu, sent Grx3 la que presentaria un paper més rellevant en la regulació de Sir2 (Figura 116).

Els mutants delecionats per Grx2 i Grx5 es van utilitzar com a control de l'assaig donat que presenten una localització citosòlica i mitocondrial, respectivament, i per tant, no haurien d'estar implicades en la regulació de Sir2, almenys de forma directa. L'absència d'aquestes dues Grxs no té efectes sobre l'estat redox de Sir2, ja que tan en la condició control com en el cas dels tractaments amb diamida, Sir2 es troba principalment en el seu estat reduït i inclús s'oxida menys que una soca WT després del tractament amb diamida (Figura 113). Aquest resultat, tot i ser sorprenent, es va repetir en les diferents rèpliques de l'experiment. Hi ha diversos factors que podrien explicar aquests resultats. Pel que fa a Grx2 se sap que està implicada en la resposta a estrès oxidatiu. La seva expressió s'indueix en resposta a varies condicions d'estrès com l'oxidatiu, l'osmòtic, el tèrmic i en resposta a fonts de carboni no fermentables i a l'entrada en fase estacionària (C M Grant et al. 2000). A més, es va demostrar que l'absència de *GRX2* provoca una disminució en el nivell de proteïnes glutatiolades. També, s'ha descrit que l'absència de *GRX2* causa una sobreexpressió de 2,5 vegades en els nivells de mRNA de *GRX1* (Luikenhuis et al. 1998). Per tant, la manca de Grx2 podria tenir com a conseqüència la inducció d'alguna resposta front l'estrès oxidatiu, fet que podria explicar perquè no s'observa oxidació de Sir2 quan aquest mutant es sotmet a un estrès per diamida.

La major resistència a l'oxidació de Sir2 en un mutant $\Delta grx5$ és encara un misteri. Se sap que aquest mutant acumula alts nivells de ferro, fet que provoca un major dany oxidatiu a les cèl·lules. A més, l'absència de *GRX5* s'ha relacionat amb una inactivació dels enzims que contenen centres Fe-S (María Teresa Rodríguez-Manzaneque et al. 2002), dificultats de creixement tan en medi ric com en medi mínim, sensibilitats als agents oxidants i a l'estrès osmòtic i un increment en el nombre de proteïnes oxidades (M T Rodríguez-Manzaneque et al. 1999). És per això que els resultats van ser encara més sorprenents que pel cas de Grx2. Una possibilitat que podria explicar aquest fenotip podria ser la inducció d'algun gen antioxidant. En relació amb això, s'ha descrit que aquest mutant presenta una inducció de *HSP26* d'unes 8,5 vegades superior al de la soca WT, però en canvi, també una repressió de *GRX4* (Bellí et al. 2004). Per tant, tot i que no es descarta una major inducció d'algun gen antioxidant tan en $\Delta grx2$ com en $\Delta grx5$, caldria dur a terme més assajos per trobar una explicació sobre aquests resultats. Observats els canvis en l'estat redox de Sir2, es va analitzar si aquests tenien conseqüències a nivell d'activitat de la sirtuïna *in vivo*, mesurant l'activitat als telòmers i al rDNA. En el silenciament telomèric hi participa el complex SIR, és a dir, Sir3, Sir4, Sir2 i altres proteïnes com Rap1 (Figura 165). Aquestes s'uneixen als telòmers i van extenent el complex de silenciament fins distàncies que poden arribar als 3 kb des de l'inici del telòmer (Strahl-Bolsinger et al. 1997).

La validesa de l'assaig de silenciament telomèric va ser corroborada analitzant l'expressió del gen *YFR057W* en una soca WT i en un mutant $\Delta sir2$, tan en condicions normals com després del tractament amb NAM, un inhibidor de sirtuïnes (Anderson et al. 2003). Els resultats van mostrar que mentre en una soca WT gairebé no es detecta expressió del gen, en un mutant $\Delta sir2$ l'expressió es troba considerablement incrementada, fins a 100 vegades respecte una soca WT, fet indicatiu que en absència de Sir2 no hi ha silenciament (Figura 120). Altres sirtuïnes com Hst1 s'han descrit que presenten funcions redundants amb Sir2 (M. Li et al. 2013), o que en alguns casos poden actuar compensant l'absència de Sir2. El fet que nivells d'expressió en un $\Delta sir2$ fossin els mateixos en la condició control respecte la de tractament amb NAM, va confirmar que Sir2 és l'única sirtuïna implicada en el silenciament de *YFR057W*, i que

totes les possibles diferències observades en futurs assajos serien degudes a alteracions en Sir2 i no a l'activitat d'altres sirtuïnes com les Hst.

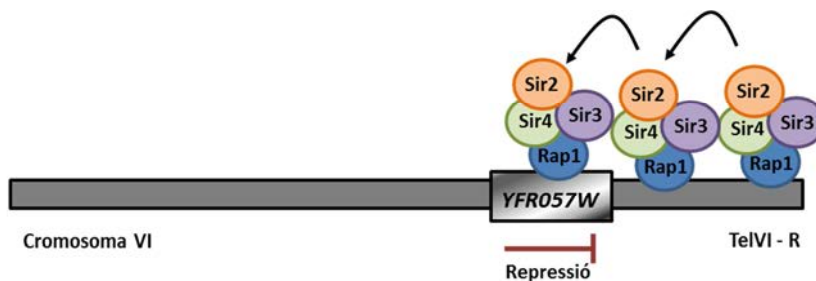


Figura 165. Silenciament del gen *YFR057W*. El complex SIR silencia als telòmers, extenent-se fins a 3 kb des de l'inici del telòmer, on es troba localitzat el gen *YFR057W*, el qual està sota el control de Sir2. La unió del complex SIR provoca el silenciament i per tant, aquest gen no es podrà expressar.

Aquesta anàlisi, en concordança amb la regulació de l'estat redox de Sir2 per Grx3/4 va demostrar que ambdues Grxs participen també en el manteniment de l'activitat telomèrica Sir2-dependent (Figura 121). A més, es va observar que ambdues Grxs són essencials per la recuperació de l'activitat de Sir2 al telòmer donat que mentre una soca WT recupera parcialment l'activitat telomèrica de Sir2 quan s'elimina l'estrès, la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ és incapaç de fer-ho. L'efecte prooxidant del ferro es va descartar al créixer la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ en un medi amb BPS, reduint l'acumulació intracel·lular d'aquest metall. Aquest mutant no només no podia recuperar l'activitat de Sir2 sinó que aquesta seguia disminuint a mesura que passava el temps, augmentant l'expressió del gen *YFR057W* fins 20-30 vegades (Figura 122). Una possible explicació d'aquest fet podria ser que tot i rentar les cèl·lules per eliminar la diamida del medi de cultiu, la diamida acumulada a l'interior de la cèl·lula continués oxidant. Això explicaria perquè Sir2 segueix perdent activitat en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ i perquè en la soca WT no s'observa una recuperació completa de l'activitat. Per demostrar-ho, es van dur a terme diferents experiments. En tots ells es va arribar a la conclusió que petites quantitats de diamida acumulades durant el temps ja són suficients per seguir causant aquesta pèrdua d'activitat Sir2 en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ (Figura 123 i Figura 124). Per tant, la major oxidació de Sir2 en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ en una condició d'estrès, podria inhibir l'activitat desacetilasa ja sigui per l'oxidació directa d'algun dels residus

de Sir2 essencials per l'activitat o bé perquè l'oxidació provoca un canvi conformacional que redueix l'activitat Sir2 o impedeix la unió eficient de Sir2 a la resta de proteïnes del complex SIR. Igual que en el cas dels telòmers, l'absència de Grx3/4 també afecta al silenciament Sir2-dependent al rDNA. En aquesta regió, Sir2 actua amb la resta de proteïnes del complex RENT silenciant i per tant, evitant la recombinació entre les unitats repetitives que formen el rDNA i mantenint l'estabilitat genòmica. Concretament, Sir2 i la resta de proteïnes que formen part del complex RENT estan associades a les regions NTS1 i NTS2 del rDNA (J. Huang and Moazed 2003b). L'anàlisi del silenciament d'aquesta regió a través de la integració del gen reporter *URA3* a la regió NTS1 (Figura 166) va permetre observar que les diferents soques (auxòtrofes per URA) presenten creixements diferents en absència d'uracil al medi.

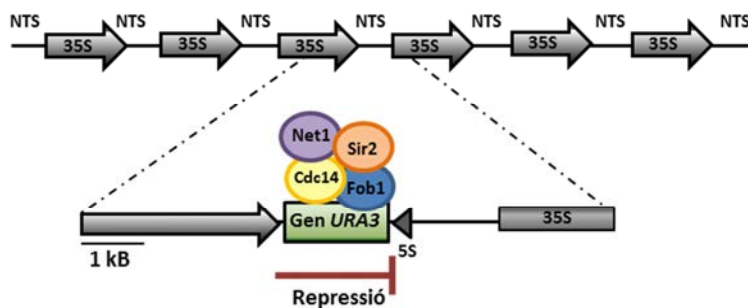


Figura 166. Estructura repetitiva del rDNA de *S. cerevisiae*. Sir2 i la resta de proteïnes que formen part del complex RENT s'uneixen i silencien la regió NTS1 del rDNA. A partir de la integració del gen reporter *URA3* en aquesta regió es pot estudiar el creixement de les cèl·lules en medi sense Ura i per tant, va permetre conèixer el grau de silenciament en aquesta regió.

El mutant $\Delta grx3$ és el que presenta major creixement i per tant, menor silenciament, especialment quan es sotmet a un estrès per diamida, amb un fenotip més similar al d'un mutant $\Delta sir2$ (Figura 130). El mutant $\Delta grx4$ en canvi, presenta un patró similar a la soca WT. La major rellevància de Grx3 respecte a Grx4 en la regulació de Sir2 en aquest cas podria estar relacionada amb el paper més important que assumeix Grx3 en el manteniment de l'estat redox de Sir2, on es va observar que el mutant $\Delta grx3$ és menys capaç de mantenir i recuperar l'estat redox de Sir2 que el mutant $\Delta grx4$ (Figura 116). Pel que fa al doble mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ els resultats no van ser tan clars. Igual que en el

cas dels telòmers, la resta de sirtuïnes no estarien afectant al silenciament en aquesta regió, sinó que les diferències serien únicament degudes a l'oxidació de Sir2. Hst1 no presenta cap funció al rDNA, donat que la seva absència no n'altera el silenciament (Derbyshire, Weinstock, and Strathern 1996)(Perrod et al. 2001). En canvi, Hst2 sí podria afectar indirectament el silenciament al rDNA però només quan se sobreexpressa. Només en aquesta condició, Hst2 actuaria reclutant algun factor essencial pel silenciament de Sir2 als telòmers. Així, la impossibilitat de Sir2 per silenciar els telòmers provocaria un augment de la seva presència al rDNA, on podria tenir lloc un major silenciament (Perrod et al. 2001). Això però, no succeiria en condicions fisiològiques. Finalment, pel que fa a Hst3 i Hst4, no existeixen evidències que actuïn al rDNA i per tant, tot indica que les diferències obtingudes són degudes exclusivament a Sir2 i no a la resta de sirtuïnes de *S. cerevisiae*.

La major oxidació de Sir2 en absència de Grx3/4 va en concordança amb una major pèrdua d'activitat Sir2 *in vivo*, fet també corroborat prèviament *in vitro*. A més es va demostrar que Sir2 es glutatiola *in vivo* en aquestes mateixes condicions en les que s'observa la pèrdua d'activitat (Figura 132). L'objectiu inicial era determinar possibles diferències de glutatiolació entre la soca WT i el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. No obstant, aquest doble mutant presenta problemes quan s'intenta obtenir un extracte sense TCA; Sir2 es degrada en aquest mutant, i ho fa a posteriori, un cop s'ha obtingut l'extracte cel·lular. Possiblement, això és degut a que en condicions normals Sir2 ja està més oxidada en aquest mutant que en una soca WT, fet que ajuda a que sigui més fàcilment degradada tot i que els protocols d'extracció es realitzin amb inhibidors de proteases i mantenint les condicions de fred en tot moment. Això va impedir que en aquest mutant es pogués identificar la glutatiolació de Sir2 amb aquesta tècnica i per tant, només es va poder realitzar amb la soca WT i amb els mutants simples de les glutaredoxines. Es va observar que és el mutant $\Delta grx3$ el que presenta majors nivells de glutatiolació (Figura 132), fet que es relaciona amb el fenotip de major oxidació, menor recuperació de l'estat redox i menor activitat en aquest mutant, apuntant una vegada més al paper més important de Grx3 a nivell fisiològic.

El paper de Grx3 i Grx4 com a reductors fisiològics de Sir2 està d'acord amb la interacció física entre ambdues Grxs i Sir2, demostrada tan amb les soques sobreexpressores de Grx3 i Grx4 com amb la soca WT, fet que va donar especial importància a aquesta interacció (Figura 109 i Figura 110). Val a dir que la immunoprecipitació inversa, utilitzant un anticòs anti-HA conjugat a Proteïna A-agarosa (per precipitar Grx3 i Grx4 en les soques sobreexpressores) es va realitzar però no es va detectar presència de Sir2. No obstant, donat que la interacció era clara tan en els sobreexpressors com en la soca WT i que els controls negatius no van mostrar senyal, els resultats semblen prou sòlids com per donar validesa a la interacció. Per tant, aquesta interacció física dóna força al paper de Grx3 i Grx4 en la regulació de Sir2.

Un dels mecanismes de regulació de l'activitat de les proteïnes és mitjançant la regulació de la seva localització subcel·lular. S'han descrit nombroses proteïnes la funció de les quals es regula, per exemple, mitjançant l'entrada i la sortida del nucli o a l'inrevés. Un clar exemple és el cas del factor transcripcional Aft1, que en condicions normals de creixement es localitza al citosol, però es transloca al nucli en condicions de dèficit de ferro (Yamaguchi-Iwai et al. 2002), i ho fa a través de la interacció amb Grx3/4 (Pujol-Carrion et al. 2006). El factor transcripcional Hcm1 també es transloca del citosol al nucli en situacions d'estrès, sent Sir2 important per aquest canvi de localització (Rodriguez-Colman et al. 2010). Aquests no són els únics exemples de proteïnes regulades per aquest mecanisme. De fet, en eucariotes superiors s'ha descrit que la localització de Sirt1 depèn del seu estat redox i que es transloca del nucli al citosol quan les cèl·lules són exposades a agents oxidants com l' H_2O_2 o l'extracte de fum de tabac (Caito et al. 2010). Per això es va decidir analitzar si aquest també podia ser el cas de Sir2. Els resultats mostren però, que la pèrdua d'activitat Sir2 no està relacionada amb un canvi de localització subcel·lular d'aquesta, ja que per microscòpia es va descartar que sortís del nucli ni en condicions d'estrès oxidatiu ni en absència de Grx3/4 (Figura 117 i Figura 118). Per tant, l'oxidació implicaria una pèrdua directa de l'activitat desacetilasa o una incapacitat d'interaccionar amb altres proteïnes, però no un canvi de localització.

En global, els resultats *in vitro* encaixen amb els fenotips descrits *in vivo* (Figura 167). En el primer cas, es va determinar que el tractament amb agents oxidants provoca una disminució de l'activitat desacetilasa de Sir2, que està relacionada amb una oxidació per glutatiolació. Aquesta oxidació *in vitro* és reversible, és a dir, els agents oxidants permeten recuperar parcialment l'activitat de Sir2, mentre que Grx3 i Grx4 són capaces de desglutatiolar Sir2 i ho fan específicament a través de la cisteïna del domini GRX. *In vivo*, l'absència de Grx3 i Grx4 causa una major oxidació de Sir2 que es veu incrementada quan les cèl·lules estan sotmeses a condicions d'estrès oxidatiu. En canvi, els alts nivells de ferro no estan implicats en l'oxidació de Sir2 (veure apartat 3.1).

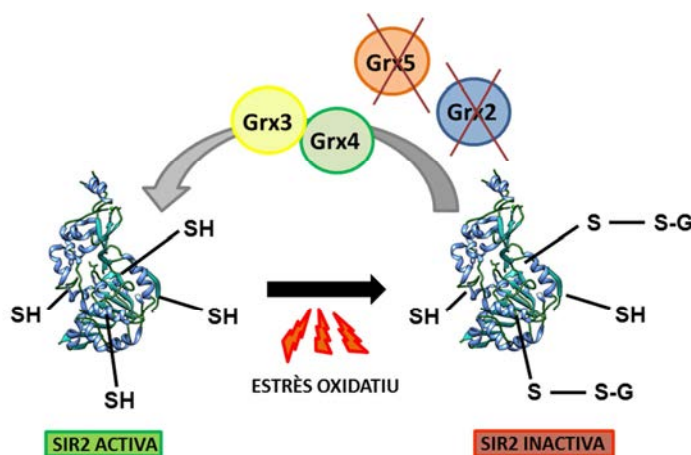


Figura 167. Mecanisme d'inactivació de Sir2 per glutatiolació i recuperació de l'activitat per Grx3/4.

A banda de protegir Sir2 front l'oxidació, Grx3 i Grx4 també són capaces de recuperar l'estat redox de Sir2, retornant-la al seu estat reduït. L'oxidació de Sir2, especialment en els mutants delecionats per Grx3/4 implica la pèrdua del silenciament Sir2-dependent, tan als telòmers com al rDNA. A més, tots aquests resultats queden reforçats per la descripció que tan Grx3 i Grx4 interaccionen amb Sir2.

És ben conegut que les modificacions reversibles representen una forma de regulació de les proteïnes, a diferència de les modificacions irreversibles, que acostumen a estar associades a un dany oxidatiu causat per un excés en la producció de ROS/NOS i/o a una resposta deficient dels sistemes antioxidants de la cèl·lula, encara que també poden tenir un paper positiu; la modificació pot marcar la proteïna oxidada perquè

sigui degradada. Existeixen tres mecanismes principals de regulació redox (Figura 168), i que podrien explicar la glutatiolació de Sir2.

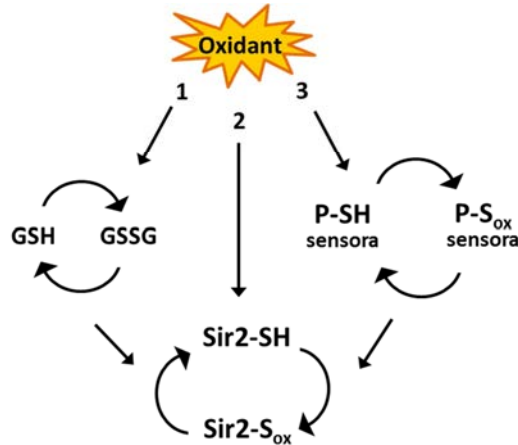


Figura 168. Possibles mecanismes d'oxidació de Sir2. L'exposició de les cèl·lules a les ROS pot causar l'oxidació selectiva de tiols i la consegüent transmissió d'un determinat senyal. Això pot succeir segons 3 vies diferents: (1) Model termodinàmic d'alteració dels tampons redox cel·lulars com el GSH. (2) Oxidació directa de Sir2. (3) Oxidació facilitada en la qual una proteïna sensora extremadament reactiva que facilita l'oxidació de Sir2.

Un dels mecanismes es basa en el principi de la termodinàmica en el qual les parelles tiol/disulfur es troben en equilibri, sent el potencial redox de la cèl·lula el que determina el rati entre les formes oxidades i reduïdes (Schafer and Buettner 2001)(Kemp, Go, and Jones 2008). El glutatió actua com el principal tampó redox. Quan l'ambient cel·lular es torna més oxidant, el rati GSH:GSSG disminueix i té lloc un increment en el contingut de disulfurs a través de reaccions d'intercanvi (Figura 168, via 1), que provocarien la glutatiolació de Sir2 amb la consegüent resposta cel·lular. Els tiols de les proteïnes varien en el seu potencial redox; això significa que els tiols presenten diferents sensitivitats als canvis i uns es troben més reduïts que altres en un determinat rati GSH:GSSG. Les reaccions d'intercanvi catalitzades per les glutaredoxines i les tioredoxines retornen la cèl·lula a l'equilibri inicial (C Berndt, Lillig, and Holmgren 2007)(Gallogly and Mielal 2007). Un mecanisme alternatiu és específic de la resposta cel·lular a un determinat oxidant i es basa en les propietats de les proteïnes diana que en són sensibles (Figura 168, via 2). En aquest cas, Sir2 seria

oxidada transitòriament per permetre una resposta determinada i després tornar a ser reduïda a través de sistemes enzimàtics, en concret, Grx3 i Grx4. La presència de proteïnes que presenten diferents sensibilitats a ser oxidades acaba permetent l'activació de diferents respostes depenent del nivell i el tipus d'oxidant al qual es troben exposades. Els processos de senyalització que es duen a terme a través d'aquest mecanisme requereixen que el grup o grups tiols siguin suficientment reactius per tal de poder ser oxidats inclús en presència dels agents antioxidants cel·lulars.

Finalment, també es pot donar el cas que Sir2 fos oxidada a través d'una proteïna sensora, caracteritzada per presentar tiols molt reactius, que al ser oxidats, faciliten l'oxidació d'altres proteïnes diana a través d'interaccions proteïna-proteïna i d'intercanvi de tiols (Figura 168, via 3). La possibilitat de que Sir2 actués com a proteïna sensora és gairebé nul·la donat que en aquest treball s'ha demostrat que tot i oxidarse, no semblaria prou sensible per poder desenvolupar aquest rol.

3.1. El ferro com una possible causa de l'oxidació de Sir2

Una possible explicació a la major oxidació de Sir2 en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ és que presenta nivells elevats de ferro intracel·lular (Pujol-Carrion et al. 2006). És ben conegut que el ferro pot contribuir a augmentar els nivells d'estrès oxidatiu amb la possible oxidació de macromolècules, entre elles les proteïnes. Sabent això, es podria determinar que els alts nivells de ferro de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ són la causa de la major oxidació de la proteïna Sir2, i no la manca en sí de Grx3 i Grx4. Si aquesta hipòtesi fos certa, s'esperaria que el mutant $\Delta grx5$, que també acumula ferro (María Teresa Rodríguez-Manzaneque et al. 2002), presentés una major oxidació de Sir2 causada pels elevats nivells de ferro intracel·lular. Donat que els resultats van mostrar que això no era així, aquesta hipòtesi es va descartar parcialment. No obstant, alguns autors apunten que el mutant $\Delta grx5$ acumula el ferro majoritàriament a la mitocòndria (Rouault and Tong 2005)(Lill, Srinivasan, and Mühlhoff 2014). Per tant, donada la localització nuclear de Sir2, no es descarta que en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ Sir2 sí estigui més oxidada degut a l'acumulació d'aquest metall. Per tant, es va analitzar l'estat redox de Sir2 de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ en absència d'alts nivells de ferro. Per aconseguir-ho, es

van fer créixer les cèl·lules $\Delta grx3\Delta grx4$ en medi contenint diferents concentracions del quelant de ferro BPS fins reduir el ferro a nivells similars al de la soca WT. L'estat redox analitzat en aquesta condició de no excés de ferro va demostrar que Sir2 es seguia oxidant igual que succeïa sense BPS (Figura 114). Per tant, l'anàlisi global de tots els resultats va permetre arribar a la conclusió que la única causa possible de la major oxidació de Sir2 és deguda a la manca de les glutaredoxines Grx3 i Grx4 i no a altres factors com els elevats nivells de ferro d'aquesta soca.

3.2. Efecte del H_2O_2 en l'activitat de Sir2

El paper de Grx3 i Grx4 en el manteniment i recuperació de l'estat redox de Sir2 i per tant, de l'activitat tan *in vitro* com *in vivo*, sembla clar en el cas d'un estrès per diamida, és a dir, quan s'oxiden els tiols de Sir2. No obstant, es va voler determinar que succeïa en el cas de l' H_2O_2 . Mentre que la diamida es caracteritza per ser un agent que indueix bàsicament la formació de ponts disulfur i glutatiolacions a través dels grups tiols de les cisteïnes, l' H_2O_2 és més inespecífic i pot oxidar altres residus. Per això, es va determinar l'expressió del gen *YFR057W* després de sotmetre les cèl·lules a un estrès amb 0,5 mM H_2O_2 durant 1 hora. Igual que en el cas de la diamida, el H_2O_2 també provoca una disminució de l'activitat telomèrica de Sir2, tot i que no existeixen diferències significatives entre la soca WT i la soca $\Delta grx3\Delta grx4$. Aquests resultats recolzen els resultats *in vitro*, on el H_2O_2 també causa una reducció de l'activitat desacetilasa de Sir2. La pèrdua d'activitat en aquest cas, podia ser o bé deguda a l'oxidació dels grups tiol de les cisteïnes (com succeeix en el cas de la diamida) o bé a l'oxidació dels tiols i altres aminoàcids diferents a les cisteïnes. No obstant, en el cas dels assajos de recuperació de l'activitat després d'aquest tractament amb H_2O_2 , ni la soca WT ni la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ eren capaces de recuperar l'activitat Sir2. El fet que les cèl·lules WT no siguin capaces de fer-ho és indicatiu que possiblement s'han produït oxidacions irreversibles, ja sigui en cisteïnes o en altres residus importants per l'activitat com la histidina catalítica, explicació que aniria en concordança amb els resultats obtinguts *in vitro* on la recuperació no es completa amb l'ús d'agents reductors com el DTT o el GSH. Pel que fa al mutant $\Delta grx3\Delta grx4$, el fet que l'activitat Sir2 no estigui més reduïda

que en una soca WT indica que les Grxs en aquest cas no tenen cap funció sobre Sir2 i per tant, es pot descartar la modificació per glutatiolació.

3.3. Activació de Sir2 en condicions d'estrès oxidatiu

En aquest treball es va determinar que les diferents condicions d'estrès oxidatiu per diamida a les quals es sotmetien les cèl·lules induïen una oxidació de Sir2 que estava lligada a una pèrdua d'activitat desacetilasa tan *in vitro* com *in vivo*. No obstant, en certes condicions semblava que Sir2 podia activar-se. Això es va observar en l'estudi de l'activitat telomèrica *in vivo*. En condicions fisiològiques (no estrès), el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ presenta major silenciament del gen *YFR057W* telomèric i per tant, major activitat Sir2 que una soca WT (Figura 134). L'absència de Grx3 i Grx4 no altera la localització de Sir2 i l'únic efecte sobre aquesta sirtuïna (almenys descrit en aquest treball) és una major oxidació de Sir2 respecte una soca WT en condicions fisiològiques. Això va portar a pensar que es podria donar el cas que una certa oxidació de Sir2, com la que succeeix en condicions fisiològiques en aquest mutant pogués comportar una activació de la sirtuïna. És a dir, baixos nivells d'estrès oxidatiu podrien promoure l'activació, mentre que condicions d'estrès més intenses inactivarien la proteïna. De fet, no seria la primera vegada que es descriu que les ROS activen o inhibeixen una via de senyalització, tot depenent del context (Morgan and Liu 2011).

Per corroborar si aquesta hipòtesi podia ser certa, es va tractar la soca WT amb una concentració més baixa de diamida. Així, mentre concentracions de 4 mM i 5 mM diamida provoquen una pèrdua d'activitat Sir2, una concentració de diamida de 2 mM indueix una certa activació de Sir2, mesurada com major silenciament del gen *YFR057W* (Figura 135). Així, podria ser que el tractament amb 2 mM diamida en una soca WT simulés l'estrès similar al que causa en Sir2 l'absència de Grx3 i Grx4 en la soca mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. Un resultat similar es va observar en l'assaig de silenciament al rDNA. L'activitat Sir2 al rDNA de la soca $\Delta grx3\Delta grx4$ en condicions fisiològiques està augmentada (Figura 130). Això indica que aquest mutant presenta un major silenciament de la regió NTS1 en aquestes condicions. Donats aquests resultats, es va estudiar si *in vitro*, baixes concentracions de diamida o de H_2O_2 també podien activar

l'activitat desacetilasa, però en cap cas es va observar activació. En conclusió, tot i que les evidències *in vivo* apunten a que realment Sir2 estaria modulada per les ROS, de forma que depenent dels nivells d'estrès oxidatiu induïrien una resposta d'activació o inhibició, caldria aprofundir més sobre l'activació d'aquesta sirtuïna i les implicacions que això comporta.

4. Glutaredoxines versus tioredoxines en la regulació de Sir2

Donat que en aquest treball es va descriure que l'activitat de Sir2 depèn del seu estat redox, en un inici es va decidir estudiar quin sistema fisiològic reductor podia participar en aquesta regulació. Tan les Grxs com les Trxs es caracteritzen per ser els principals sistemes enzimàtics de la cèl·lula que participen en la regulació de l'estat redox de les proteïnes, ja sigui reduint els ponts disulfurs intermoleculars, intramoleculars o els ponts disulfurs mixtes entre les proteïnes i el glutatió (Enrique Herrero et al. 2008). Per tant, ambdós sistemes podrien ser possibles candidats com a reguladors de l'activitat Sir2. No obstant, vàries evidències reforcen el paper de les Grxs i descarten a les Trxs com a reguladores de Sir2. En *S. cerevisiae* s'han descrit fins a 8 glutaredoxines diferents, amb diferents localitzacions i cada una especialitzada en la realització de funcions diverses (Enrique Herrero, Bellí, and Casas 2010). Fins al moment, Grx3 i Grx4 són els únics sistemes enzimàtics antioxidants descrits que sense cap dubte, presenten localització nuclear en *S. cerevisiae*. Pel que fa a les Trxs, en *S. cerevisiae* se n'han descrit tres; Trx1 i Trx2 de localització citosòlica i Trx3 localitzada a la mitocòndria. Tot i que un estudi a gran escala, basat en el marcatge global amb GFP de totes les proteïnes, ha descrit que Trx1 i Trx2 es localitzen tan al nucli com al citosol (Huh et al. 2003), altres estudis més recents determinen que ambdues Trxs es troben exclusivament al citosol (Greetham et al. 2010)(Toledano et al. 2013). En aquest treball es va intentar corroborar també la localització de Trx1 i Trx2. Per microscòpia es va comprovar que ambdues proteïnes estan al citosol i malgrat no es pot descartar definitivament, no semblava que hi hagués presència al nucli (Figura 125). Així, donada la estricta localització nuclear de Sir2 tan en condicions normals com en condicions d'estrès oxidatiu, Trx1 i Trx2 no podrien actuar com el seu sistema reductor.

D'altra banda, alguns autors posen en dubte que les Grxs participin en els processos de desglutiatolació de proteïnes, assegurant que són les Trxs les que assumirien aquest rol (Greetham et al. 2010). *In vitro*, les Grxs no presenten activitat en l'assaig HED (E Herrero and de la Torre-Ruiz 2007), però són les principals encarregades de la desglutiatolació *in vitro* en cèl·lules de mamífer (Chrestensen, Starke, and Mieyal 2000). A més, *in vivo* són molts els estudis que defensen les Grxs com els enzims responsables de la desglutiatolació, tan en llevats com plantes i eucariotes superiors (Tamarit et al. 2003)(Beer et al. 2004)(Carsten Berndt, Lillig, and Holmgren 2008)(Rouhier 2010)(Bräutigam et al. 2013)(Nolin et al. 2014)(X. Liu et al. 2015)(Deponte and Horst Lillig 2015)(Peskin et al. 2016), i són pocs els que ho farien a favor de les Trxs (Greetham et al. 2010). A part de les evidències que donen un major suport a les Grxs com a enzims amb capacitat de desglutiatolar, en aquest treball es van observar fenotips clars tan pel que fa a l'estat redox com a l'activitat de Sir2 en absència de Grx3 i Grx4. A més, el seu paper en la regulació de Sir2 es va corroborar al descriure la interacció directa entre ambdues Grxs i Sir2. Per descartar finalment el paper de les Trxs en aquesta regulació, es va determinar l'activitat telomèrica de Sir2 a través de l'assaig d'expressió de *YFR057W*. Els resultats van mostrar que l'absència de Trx1 i Trx2 no causa una major pèrdua d'activitat telomèrica quan les cèl·lules es sotmeten a un tractament amb diamida respecte una soca WT (Figura 126), a diferència del que sí succeeix en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. A més, a l'estudiar l'efecte de les Trxs en la recuperació de l'activitat Sir2 un cop finalitzat el tractament oxidant, es va poder observar que el mutant $\Delta trx1\Delta trx2$ presenta un patró gairebé idèntic al de la soca WT (Figura 126), resultat completament contrari a l'obtingut amb el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$. Per tant, aquests resultats confirmen el paper de Grx3 i Grx4 en la regulació de l'activitat de Sir2 i n'exclouen a Trx1 i Trx2. A més, sent un aspecte que sempre ha generat gran debat, els experiments *in vitro* indiquen que la funció de regulació de les Grxs es duria a terme a través del domini GRX i no del domini TRX, en concordança amb el que s'ha descrit en aquest treball.

Estudis recents realitzats per Deponte i Lillig confirmen que les Grxs presenten les característiques òptimes per actuar en els processos de desglutiatolació, a diferència de les Trxs (Deponte and Horst Lillig 2015). Tot i que tan les Grxs com les Trxs

presenten una àmplia varietat d'activitats redox *in vitro*, es coneix que *in vivo* presenten diferents especificitats de substrat. Les primeres evidències per entendre la interacció d'aquestes oxidoreductases amb les seves proteïnes diana van sorgir d'estudis realitzats amb la proteïna híbrida Prx-Grx de *Haemophilus influenza* (S. J. Kim et al. 2003). En aquests es va determinar que tan la complementarietat estructural com electrostàtica entre Grx/Trx i substrat és essencial per la interacció i funció d'aquests enzims sobre el seu substrat. A més, es va observar que és en el potencial de superfície on Grx i Trx difereixen més (Figura 169)(Bunik et al. 1999). De l'anàlisi del potencial electrostàtic es pot concloure que tan Trx1 humana citosòlica com Trx2 humana mitocondrial presenten un patró de distribució de la càrrega similar, amb un superfície carregada negativament independentment del estat redox (Figura 169A-D).

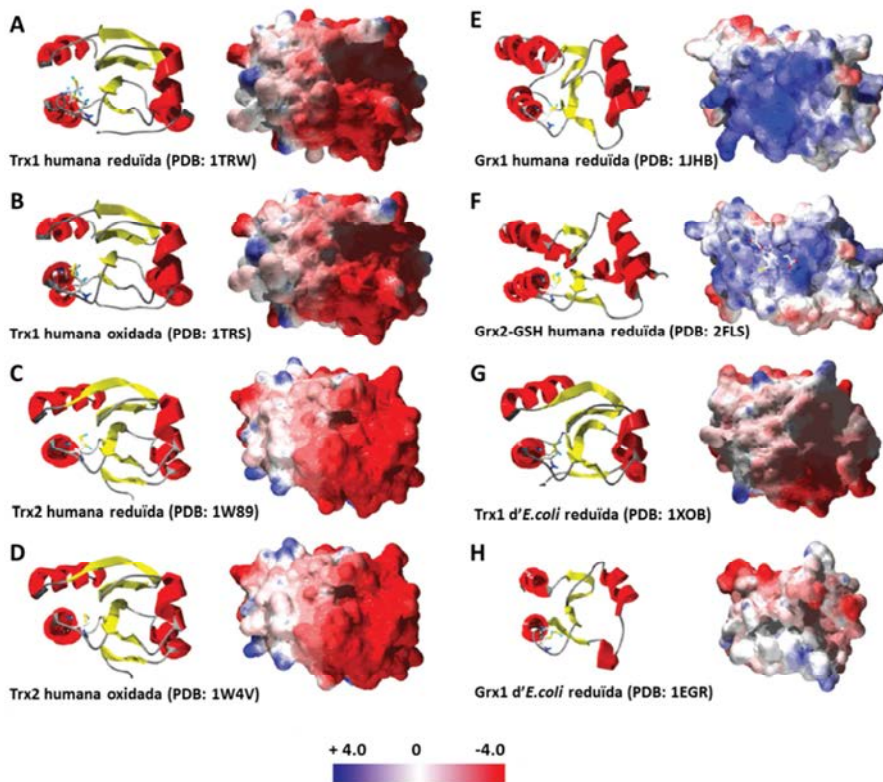


Figura 169. Potencial electrostàtic de la superfície al voltant del centre actiu de diferents membres de les Grxs i les Trxs. Representació del potencial electrostàtic de la superfície de: (A) Trx1 humana reduïda (PDB: 1TRW), (B) Trx1 humana oxidada (PDB: 1TRS), (C) Trx2 humana reduïda (PDB: 1W89), (D) Trx2 humana oxidada (PDB: 1W4V), (E) Grx1 humana reduïda (PDB: 1JHB), (F) Grx2 humana unida a GSH (2FLS), (G) Trx1 d'*E. coli* reduïda (1XOB) i (H) Grx1 d'*E. coli* reduïda (1EGR) (Deponte and Horst Lillig 2015).

En canvi, Grx1 humana citosòlica (Figura 169E) i Grx2 humana mitocondrial (Figura 169F) presenten ambdues una superfície carregada positivament, que podria afavorir la interacció entre aquestes proteïnes i el grup carboxil carregat negativament del glutatió (Figura 169F). La distribució de la càrrega en les superfícies de Trx1 i Grx1 *d'E. coli* és neutra (Figura 169G-H), fet que podria explicar perquè ambdues proteïnes presenten la mateixa especificitat de substrat, almenys en el cas de la ribonucleòtid reductasa i la fosfoadenil sulfat reductasa (Laurent, Colleen, and Peter 1964)(A Holmgren 1979)(C H Lillig et al. 1999). Sabent això, en aquest treball ens vam preguntar si Grx3 i Grx4 presenten també aquest patró, fet que reforçaria el paper d'aquestes oxidoreductases en la regulació redox de Sir2 a través de la glutatiolació. Seguint la mateixa metodologia, es va dur a terme la modelització del domini GRX de Grx3 i Grx4 i es va determinar el potencial electrostàtic d'ambdues (Figura 170).

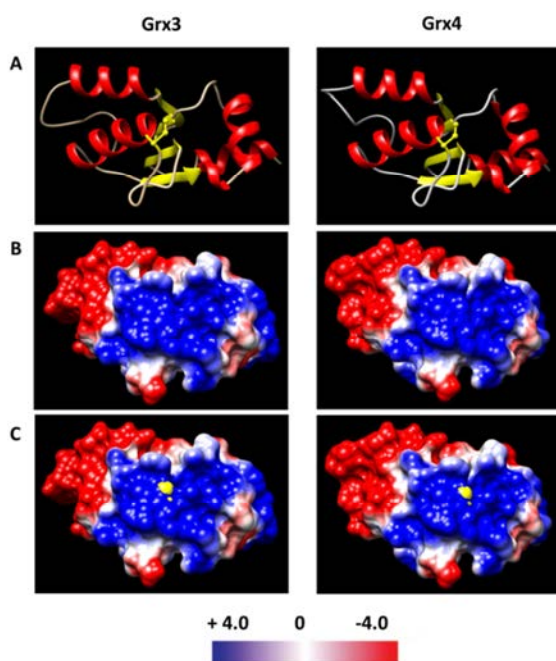


Figura 170. Potencial electrostàtic de superfície del domini GRX de Grx3 i Grx4. El domini GRX de Grx3 i Grx4 es va modelar amb el servidor Swiss Model, utilitzant el domini GRX de Grx3 humana com a motlle (PDB: 3ZYW). (A) Representació de l'estructura del domini GRX de Grx3 i Grx4. En groc es marca l'única cisteïna present al centre actiu d'ambdues Grx3 i Grx4. (B) Potencial electrostàtic de superfície de les estructures mostrades en A. (C) Imatge igual que B però s'indica la cisteïna en groc (C211 en Grx3 i C171 en Grx4). Els potencials electrostàtics es van modelar utilitzant el *software* UCSF d'acord amb la Llei de Coulomb i amb una constant dielèctrica de 4.0. Codi de color: +4.0 (blau), 0 (neutre), -4.0 (vermell).

L'anàlisi del potencial electrostàtic d'ambdues Grx3 i Grx4 va permetre corroborar que la superfície es troba majoritàriament carregada positivament, especialment al voltant de la cisteïna catalítica, fet que aniria amb concordança amb el descrit per Grx1 i Grx2 humana. Aquesta característica afavoriria la interacció d'aquestes proteïnes amb la superfície carregada negativament del glutatió (Deonte and Horst Lillig 2015) i per tant, faria de Grx3 i Grx4 uns enzims ideals en la desglutatiolació de proteïnes. En global doncs, són moltes les evidències que van a favor de les Grxs en la regulació de les proteïnes a través de la desglutatiolació i en aquest treball, s'han descrit diversos fenotips que estableixen la implicació d'aquestes proteïnes en la regulació de Sir2. A més, en el curs de la realització d'aquest treball es va descriure el paper de Grx2 en la desglutatiolació de Sirt1 en un model de *zebrafish* (Bräutigam et al. 2013) i més tard, Grx1 en un model de ratolí (Shao et al. 2014). Així, en *S. cerevisiae*, Grx3 i Grx4 podrien presentar dues funcions diferenciades depenent de la seva localització. Es coneix que Grx3 i Grx4 formen homodímers i heterodímers Fra2-Grx3/4, unint un centre Fe-S (Figura 171) i participant així en la regulació del metabolisme del ferro (H. Li et al. 2009).

En el cas dels homodímers Grx3/4, la unió del centre Fe-S requereix de la participació del centre actiu CGFS del domini GRX de la Grx, concretament de la cisteïna i de dues molècules de GSH. En canvi, en el cas dels heterodímers Grx3/4-Fra2, la unió del centre Fe-S es duria a terme a través d'un residu d'histidina de Fra2, de la cisteïna del centre actiu de la Grx i d'una cisteïna del GSH unit a la Grx (H. Li et al. 2009).

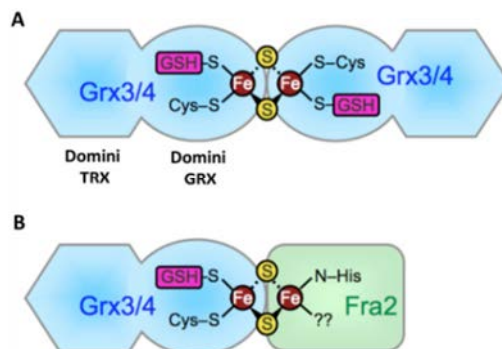


Figura 171. Models proposats d'unió de Grx3/4 als centres Fe-S. (A) Homodímer entre Grx3/4 i el centre Fe-S i (B) Heterodímer Grx3/4-Fra2 i el centre Fe-S (H. Li et al. 2009).

Quan la biosíntesi de centres Fe-S és activa, aquesta via de senyalització promou la multimerització de Aft1 de forma que provoca la seva exportació del nucli. Quan els nivells de ferro són baixos o quan hi ha una alteració en la biogènesi mitocondrial de centres Fe-S, aquesta via de senyalització deixa de funcionar, permetent que Aft1 s'acumuli al nucli i activi els gens del reguló del ferro.

Es creu que Grx3 i Grx4 durien a terme funcions redundants pel que fa al metabolisme del ferro degut a la seva gran similitud de seqüència. En ambdós models, aquesta funció de Grx3 i Grx4 al citosol implica l'ús de la cisteïna del seu centre actiu, fet que les inhabilita com a tiol-reductases. En aquest treball es proposa que tan Grx3 com Grx4 podrien funcionar diferencialment segons la seva localització subcel·lular. Així, al citoplasma i en condicions reductores Grx3 i Grx4 participarien en la regulació del metabolisme del ferro a través de la unió dels centres Fe-S. No obstant, en condicions d'estrès oxidatiu, Grx3 i Grx4 deixarien d'unir centres Fe-S en forma d'homodímers i/o heterodímers i passarien a actuar com a monòmers, i és en aquest moment quan actuarien al nucli en la regulació de Sir2 a través de la desglutatiolació. I de fet, no és la primera vegada que es planteja que Grx3/4 podrien presentar un paper dual depenent de la seva localització i de l'estat de la pròpia cèl·lula. Un estudi realitzat amb Grx3 humana apunta que aquest mecanisme d'acció podria estar conservat en humans (Pham et al. 2015). En aquest estudi es va demostrar que en condicions normals Grx3 es localitza al citosol, però és translocada al nucli en resposta a un estrès oxidatiu, fet que es correlaciona amb un augment de les ROS així com una disminució dels nivells de GSH. A més, aquest canvi de localització depèn de l'agent oxidant, doncs sí que s'observava amb agents com la diamida, el dietilmaleat (DEM) i el 1-cloro-2,4-dinitroclorobenzè (CDNB), un compost que elimina ràpidament el GSH de la cèl·lula. En canvi, el H₂O₂, la hipòxia o la deprivació de nutrients pràcticament no tenien efectes en la translocació (Pham et al. 2015). Així, són moltes les evidències que corroboren els resultats d'aquest treball amb la funció tiol-reductasa de Grx3 i Grx4. L'interès en la regulació redox a través de la glutatiolació reversible implicant a les Grxs ha incrementat durant l'última dècada, tan en relació a diferents condicions fisiològiques com patològiques, entre elles la diabetis, les malalties neurodegeneratives i el càncer

(Dalle-Donne et al. 2011)(Allen and Mieyal 2012)(Mieyal and Chock 2012)(Go and Jones 2013).

5. Paper de les cisteïnes de Sir2 *in vitro*

Tenint en compte que la glutatiolació de Sir2 comporta una pèrdua d'activitat desacetilasa, es va analitzar la rellevància d'alguns dels seus residus de cisteïna (Figura 172). En *S. cerevisiae*, quatre cisteïnes, C372, C375, C396 i C399 es troben coordinant un àtom de Zn^{2+} a través del seu grup tiol, el qual no es localitza al centre actiu però participa en el manteniment de l'estructura de la proteïna. Les cisteïnes que coordinen l'àtom de zinc, com passa en proteïnes com per exemple en Hsp33 (Jakob, Eser, and Bardwell 2000), Trx2 (Collet et al. 2003) o Keap1 en mamífers (Dinkova-Kostova, Holtzclaw, and Wakabayashi 2005), poden ser les dianes de modificacions oxidatives reversibles i per tant, constitueixen una nova forma de regulació. Així, l'estat redox d'aquestes cisteïnes regula la unió del metall, que a la vegada modula la conformació i la funció de la proteïna.

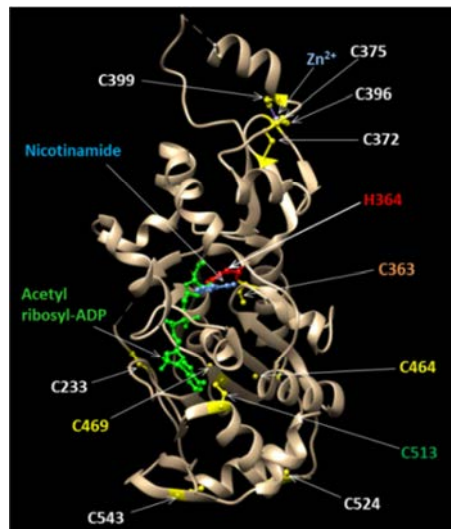


Figura 172. Estructura tridimensional de Sir2 de *S. cerevisiae*. Representació de Sir2 (PDB: 2HJH) amb els productes de la reacció, la nicotinamida i l'acetil-ADP-ribosa. Es mostra l'àtom de zinc, la H364 catalítica i cada una de les cisteïnes que formen part de l'estructura de Sir2. Estructura cristal·litzada de Sir2 obtinguda per difracció de raigs X amb una resolució de 1,85Å; software UCSF Chimera.

Dues cisteïnes, C363 i C513 es localitzen al centre actiu. C363 es troba adjacent a la histidina catalítica (H364), mentre que C513 també es troba a la cavitat catalítica i a més, està molt exposada a la superfície de la proteïna. Segons l'anàlisi *in silico*, C464 i C469 que també estan al centre actiu, podrien estar formant part d'una seqüència NES, tot i que Sir2 mai s'ha descrit localitzada fora del nucli i en aquest treball tampoc es va observar que fos així. No obstant, són moltes les proteïnes que són regulades mitjançant l'entrada i sortida del nucli i en algunes d'elles hi intervenen les cisteïnes com a mecanisme regulador, com és el cas de Yap1 en *S. cerevisiae* (Delaunay, Isnard, and Toledano 2000), Pap1 en *S. pombe* (Vivancos et al. 2004) o el de la xaperona DnaJb5 en eucariotes superiors (Ago et al. 2008). Per tant, aquestes dues cisteïnes podrien tenir un paper important pel que fa a la regulació per canvis en la localització de Sir2, a través de la modificació del seu estat redox. Finalment, C233 de l'extrem N-terminal i les C524 i C543 de l'extrem C-terminal podrien tenir un paper en l'autoregulació de Sir2. En el cas de la sirtuïna Hst2 de *S. cerevisiae*, s'ha demostrat que l'extrem C-terminal de la proteïna forma una hèlix que es solapa amb el lloc d'unió al NAD⁺, autoregulant així la seva unió. En canvi, l'extrem N-terminal està implicat en la formació d'homotrímerns d'Hst2 (Marmorstein 2004). Així, un mutant *HST2* delecionat per l'extrem C-terminal presenta diferències pel que fa a la unió del NAD⁺ respecte una soca WT, mentre que un mutant delecionat per l'extrem N-terminal és incapaç de formar homotrímerns. Per tant, Sir2 podria seguir un mecanisme de regulació semblant al cas de Hst2, tot i que els extrems N-terminal i C-terminal de les diferents sirtuïnes són més variables i no es troben tan conservats. Coneixent tota aquesta informació, es van seleccionar aquells residus de cisteïna de Sir2 que podien presentar major rellevància a nivell de regulació redox, per així dur a terme mutacions puntuals de cisteïna per serina i analitzar els efectes en la regulació de Sir2. Durant la realització d'aquest treball es va descriure la identificació de diferents cisteïnes modificades per glutatiolació en models de *zebrafish* (Bräutigam et al. 2013) i ratolí (Shao et al. 2014), la majoria d'elles localitzades molt properes al lloc d'unió del NAD⁺, tot i que cap d'elles es troba conservada en Sir2 (Figura 173).

1	-----MADEAA---LALQPGGSPSAAGADREAASS-----PAGEPLRKRPRRDGPGLG	45	Q96E86	SIR1_HUMAN
1	-----MADGENKRAESA-----EPDEPLKPKRRLLELS	28	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
1	-----MADEVA---LALQAAGSPSAAAA-MEAASQ---PADEPLRKRPRRDGPGLG	44	Q923E4	SIR1_MOUSE
1	MTIPHMKYAVSKTSENKVSNTVSPQ---DKDAIRKQPDIIINDEPSHKKI KVAQPDLSL	57	P06700	SIR2_YEAST
46	RSP--GHPGGAAPEREVFAAARCP---GAAAAALWREAEAEAAAGGQEAQATAAGE	100	Q96E86	SIR1_HUMAN
29	---GD---SEHSATAGADTLDEKP---ARMDESQALSIINN	61	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
45	RSP--GEPSSAAVA---PAAAG--EAASAAAALWREAAGAA--ASAEREAPATAVAGD	95	Q923E4	SIR1_MOUSE
58	RETNTTDPDLGHT---KAALGE---VASMELKPT---NDMDPLAVSAASV	97	P06700	SIR2_YEAST
101	GDNGPGLQGSPREPLADNLYDEDDDEGEEREEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGPHSC	160	Q96E86	SIR1_HUMAN
62	NNT---RPT-EP---GO---PADPEPEISELTDGCVHPNGPTSP	95	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
96	GDNGSLGR---EPRAADDPDDDEGEEREEAAAAAAGYRDNLLDGLLNGPHSC	152	Q923E4	SIR1_MOUSE
98	VMSNDVLKPE-TPK---GPI---IISKNPSNGIYGP---SPTKR	133	P06700	SIR2_YEAST
161	E--SDE---EDRASHASSDWTFRPRIGPYTFVQO-----HLMIGTDPD-----	199	Q96E86	SIR1_HUMAN
96	DLLRDD---DDCSSRASSDWTPOPOIGSYRFIQO-----HIMRGTDPR-----	136	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
153	E--SD---DDRTSHASSDWTFRPRIGPYTFVQO-----HLMIGTDPD-----	191	Q923E4	SIR1_MOUSE
134	ESLNARMLKYGAHKFLDYLPEDLNSLYIYLIKLLGFVVKDQALIGTINSIVHINSO	193	P06700	SIR2_YEAST
200	TILKDLLPETIPPELDD---MT--L--WQIVINILSEPPKRRKRRKDINTIEDAVKL	249	Q96E86	SIR1_HUMAN
137	AILKDLLPETVLPPELDD---MT--L--WQIINI-SEPPKRRKRRKDINTLEDVVRL	185	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
192	TILKDLLPETIPPELDD---MT--L--WQIVINILSEPPKRRKRRKDINTIEDAVKL	241	Q923E4	SIR1_MOUSE
194	ERVDLGS-AISVTVNVEDPPLAKKOTVRLIKDLORAIN--KVLCTRLRLSNFPTIDHFIOR	250	P06700	SIR2_YEAST
250	LQEKKIIVLVTGAGVSVCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPQAMFDIYFRKDRPRP	309	Q96E86	SIR1_HUMAN
186	INERKKIIVLVTGAGVSVCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPQAMFDIYFRDRPRP	245	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
242	LQEKKIIVLVTGAGVSVCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPQAMFDIYFRKDRPRP	301	Q923E4	SIR1_MOUSE
251	LHTARKIIVLVTGAGVSVSLGIPDFRSSEGPYSKIK--HLGLDDPDVFNVYFMHDSVSP	308	P06700	SIR2_YEAST
310	FKFAKIIYPGQFQPSLCHKPIALSDEKGGKLLRNYTONIDTLEQVAGIQ--RIIQCHGSFA	367	Q96E86	SIR1_HUMAN
246	FKFAKIIYPGQFQPSLCHKPIALSDEKGGKLLRNYTONIDTLEQVAGIQ--KIIQCHGSFA	303	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
302	FKFAKIIYPGQFQPSLCHKPIALSDEKGGKLLRNYTONIDTLEQVAGIQ--RIIQCHGSFA	359	Q923E4	SIR1_MOUSE
309	YNIANMVLPEKIIYSPHLSPIKMLQKGGKLLRNYTONIDNLESYAGISTDKLVHGSFA	368	P06700	SIR2_YEAST
368	TASCLIKYKVDCEAVRGDIPNQVVRCPKCPAD-----	401	Q96E86	SIR1_HUMAN
304	TASCLIKKHKVDCEAIREDFNQVVRCPKCPAD-----	337	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
360	TASCLIKYKVDCEAVRGDIPNQVVRCPKCPAD-----	393	Q923E4	SIR1_MOUSE
369	TATVTHWNLGGERIFNKRINLEPLVYIKRRREYFPEGYNKVGVAASQGSMSERP	428	P06700	SIR2_YEAST
402	---EPLAIMKPEIVFFGENLPEQPHRAMKYDKDEVLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPH	457	Q96E86	SIR1_HUMAN
338	---VPIAIMKPEIVFFGENLPEFFPHRAMKQDKDEVLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPH	393	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
394	---EPLAIMKPEIVFFGENLPEQPHRAMKYDKDEVLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPH	449	Q923E4	SIR1_MOUSE
429	PYILNSYGVLPKPIDTFPFGALPNKPKHSIREDLLELLIGTSLKVPVSEIVNVMVPS	488	P06700	SIR2_YEAST
458	EVQQLINREPLPHLHFVVELLGGDCDVIINELCHRLGGYAKLCCNPKLSEITEKPPRT	517	Q96E86	SIR1_HUMAN
394	DVPQVILINREPLPHLHFVVELLGGDCDVIINELCHRLGGYAKLCCNPKLSEITEKPAAP	453	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
450	EVQQLINREPLPHLHFVVELLGGDCDVIINELCHRLGGYAKLCCNPKLSEITEKPPRP	509	Q923E4	SIR1_MOUSE
489	HVPQVILINRDFVXHAFFDLSLGCDIAAMVAQKCGWTIPHKKNWDLKKNKFKCQEKDK	548	P06700	SIR2_YEAST
518	QKELAYLSELPPT-PLHVSDESS-----SPE---R-----TSPPDSSVIIVT-L	555	Q96E86	SIR1_HUMAN
454	EHTENTSADHSHADAEHIENTSADHSHADAEHIENTSADRDADAKHTENTPTDHADAERTK	513	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
510	QKELVHLESELPPT-PLHVSDESS-----SPE---R-----TVQDSSVIAT-L	547	Q923E4	SIR1_MOUSE
549	GVVYVTSDEHPKTL-----	562	P06700	SIR2_YEAST
556	LDQAAKSNDLVDVSESKCGM-----EEKPQEVQTSRNV--ESIA-----	592	Q96E86	SIR1_HUMAN
514	NTSADHANAHTENTSDAACKVDEENTDRLRVEVEMRRRCWRSRICQSPISKRLGASQ	573	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
548	VDQATNNVNDLEVSSESCV-----EEKPQEVQTSRNV--ENIN-----	584	Q923E4	SIR1_MOUSE
563	-----	562	P06700	SIR2_YEAST
593	-----EQMENPDL---KNVGSSTGEKNERTSVAETVRKQWPNRVAKEQISRRLDGNQ	641	Q96E86	SIR1_HUMAN
574	STEISAHTERSKADAVNTDDAACVDEENTDRLRVEVEMRRRCWRSRICQSPISKRLGASQ	633	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
585	-----VENPDF---KAVGSSTADKNERTSVAETVRKQWPNRVAKEQISRRLDGNQ	631	Q923E4	SIR1_MOUSE
563	-----	562	P06700	SIR2_YEAST
642	YLFPLPNRYIFHGAEVYSDSEDDVLSSSSCGNSDSTGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFPYNG	701	Q96E86	SIR1_HUMAN
634	YLFQAPNRYVPHGAEVYSSSEDE--SSSSCGSSEDSGSPQHEDS--EVEENGAA	682	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
632	YLFVPPNRYIFHGAEVYSDSEDDVLSSSSCGNSDSTGTCQSPSLEEPLEDESEIEEFPYNG	691	Q923E4	SIR1_MOUSE
563	-----	562	P06700	SIR2_YEAST
702	LEDEDPVPERAGGAGPGTDGDDQEAINEASVKQEVTDMMYPSNKS	747	Q96E86	SIR1_HUMAN
683	MTDKE-----TDTEVQDSEHRLQT-HCTQHTQ--	710	E7F8W3	E7F8W3_DANRE
692	LEDDTERPEACGSGPGADGGDQEVVNEAIATRQELTDVNYPSDKS	737	Q923E4	SIR1_MOUSE
563	-----	562	P06700	SIR2_YEAST

Figura 173. Alineament de les seqüències de Sir2 de *S. cerevisiae* i Sirt1 humana, zebrafish (*Danio rerio*) i ratolí. En rosa, es mostra el domini catalític de Sirt1. S'indiquen les cisteïnes que s'han descrit glutatiolades: blau, Sirt1 humana i de zebrafish (Bräutigam et al. 2013); verd, Sirt1 de ratolí (Shao et

al. 2014). Les cisteïnes de Sir2 de *S. cerevisiae* C363, C372, C464S, C469 i C513 analitzades en aquest treball es marquen en vermell. Totes aquestes cisteïnes s'assenyalen amb una fletxa. En un cercle, les cisteïnes que s'han descrit desglutatiolades per zfGrx2 (Bräutigam et al. 2013). En rectangles, les cisteïnes conservades en la unió del Zn^{2+} . E7F8W3 és la proteïna no caracteritzada, codificada pel gen *SIRT1* de *zebrafish*. Aliniament realitzat amb el software ClustalW.

En aquest treball es van seleccionar les C363, C372, C464, C469 i C513, per realitzar les mutacions puntuals i realitzar els assajos *in vitro*. La selecció del residu C363 es va dur a terme atenent a la seva localització en el centre actiu de la proteïna, ja que era probable que una modificació d'aquesta cisteïna comportaria la inactivació de l'enzim. Concretament, la glutatiolació tindria com a conseqüència un bloqueig de la cavitat impedit l'entrada del substrat. No obstant, es tracta d'una cisteïna localitzada bastant a l'interior, poc exposada i per tant, menys accessible. El residu C372, participa en la unió de l'àtom de zinc i per tant, en l'establiment de la integritat estructural de la proteïna; podria tenir un paper en la regulació de l'activitat de Sir2. D'altra banda i com ja s'ha comentat, C464 i C469 podrien formar part d'una seqüència NES i tot i que en aquest treball no s'hagin descrit canvis en la localització subcel·lular de Sir2, no es podia descartar a priori aquesta regulació. Finalment, el residu C513 situat a la cavitat catalítica és un dels residus d'unió al NAD^+ i per tant, un bloqueig d'aquesta també podria tenir repercussions en l'activitat de Sir2. De fet, l'estudi realitzat amb *zebrafish* demostra que una cisteïna localitzada al centre catalític de la proteïna és glutatiolada i reduïda per Grx2 (Bräutigam et al. 2013). Donat que en aquest treball mai es va detectar la formació de dímers de Sir2 ni altres tipus de multímers *in vivo*, es va decidir no analitzar els residus més localitzats a l'extrem N-terminal de la proteïna (el C233) ni els dos localitzats a l'extrem C-terminal (C524 i C543).

Els resultats *in vitro* van mostrar que totes les proteïnes mutants purificades presenten menor activitat desacetilasa que la proteïna WT. Mentre que els mutants Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S presenten un 76%, un 50% i un 40% de l'activitat de la proteïna WT, respectivament, els mutants Sir2-C363S i Sir2-C372S són pràcticament inactius (Figura 140). El tractament d'ambdues Sir2-C363S i Sir2-C372S amb DTT i GSH tampoc va recuperar-ne l'activitat. C363 es localitza adjacent a la histidina catalítica, acceptora de H^+ . Per tant, la mutació d'aquest residu pot comportar un canvi estructural que

inactivi l'enzim. Pel que fa a C372, l'explicació més plausible en aquest últim cas és que la pèrdua de l'àtom de zinc altera l'estructura de la proteïna i la inestabilitza, donada la participació d'aquest metall en el manteniment de l'estructura de les sirtuïnes (Chakrabarty and Balaram 2010). De fet, els mutants Sir2-C363S i Sir2-C372S són molt inestables sota oxidació. Així, quan es tracten amb diamida, aquests mutants podrien estar altament oxidats o bé formar agregats, fet que explicaria perquè no presenten activitat desacetilasa *in vitro*. El tractament del mutant Sir2-C372S amb ZnCl₂ juntament amb DTT, no va permetre recuperar l'activitat d'aquest mutant (Figura 141). Per tant, això apunta a que forma agregats o s'oxida irreversiblement. Per una altra banda, l'activitat desacetilasa de les proteïnes mutants que sí presenten activitat *in vitro*, és a dir, Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S, es va analitzar en condicions d'estrès per diamida, i a diferència del que succeeix amb la proteïna WT, els mutants no s'inactiven. Per tant, les mutacions confereixen a Sir2 resistència a l'oxidació de tiols i com a conseqüència, a la pèrdua d'activitat. Això podria ser degut a que el residu mutat sigui diana d'oxidació i això afecti l'activitat; per tant, la seva absència evita la pèrdua de l'activitat en condicions d'estrès. Una altra possibilitat seria que la mutació induís un canvi en la conformació de la proteïna que provoqués la pèrdua d'activitat (com ja s'observa en la condició control) però que a la vegada impedisís que residus que en la proteïna WT s'oxiden, aquí no puguin ser oxidats, per exemple, perquè es troben menys exposats a la superfície de la proteïna. En relació a la resistència a la inactivació, es va descriure que mentre la proteïna WT presenta fins a un màxim de 5 cisteïnes oxidades (mesurat pel nombre de molècules de PEG maleimida unides), en els mutants Sir2-C469S i Sir2-C513S s'observen només les formes amb 1 i 2 cisteïnes oxidades (Figura 144). El mutant Sir2-C464S en canvi, presenta un patró d'oxidació més similar a la proteïna WT. Tot i que el tractament oxidant tampoc inactiva l'enzim, sí que és el que es troba més glutatiolat després de ser sotmès al tractament amb diamida. A més, corroborant aquest fet, es va observar que els mutants es glutatiolen en menor mesura que una proteïna WT, excepte la proteïna Sir2-C513S on no es van detectar evidències de glutatiolació (Figura 143). La manca de glutatiolació de Sir2-C513S (almenys a nivells detectables per *Western Blot*) indicaria que la C513 és la principal diana d'aquesta modificació i per tant, la seva absència podria explicar perquè aquest mutant no perd

activitat desacetilasa quan es sotmet a condicions d'estrès per diamida. No obstant, això també succeeix en els mutants Sir2-C363S i Sir2-C469S. Tenint en compte que amb les concentracions de diamida/GSH emprades el nombre de cisteïnes que s'oxiden està al voltant de 2-3, és probable que malgrat C513 sigui la diana principal, no sigui l'única. Per tant, sembla que el patró de cisteïnes modificades i especialment, la glutatiolació, es podria correlacionar amb l'activitat i la susceptibilitat que aquests mutants presenten a ser oxidats. Val a dir, que tot i que es va intentar la identificació de les cisteïnes glutatiolades, emprant diferents tècniques proteòmiques, amb diferents tipus de digestions (amb tripsina, quimiotripsina i també amb pepsina) i diferents sistemes de detecció, no es va aconseguir aquest objectiu.

La resistència a la inactivació (i per tant a la oxidació) descrita *in vitro* també va ser confirmada *in vivo* amb la construcció de les soques mutants Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S, amb el propi promotor i terminador de Sir2 per tal que els nivells d'expressió de la sirtuïna fossin els fisiològics. Es va decidir construir aquells mutants que *in vitro* presentaven menor grau de glutatiolació. El mutant Sir2-C363S, el qual no presenta activitat *in vitro* podria servir com a control *in vivo*. També va resultar d'especial interès la construcció del mutant Sir2-C469S, ja que de les dues cisteïnes del NES putatiu, és el que *in vitro* presenta un patró d'oxidació i una activitat menor a la proteïna WT. El mutant Sir2-C513S també es va construir, donat que no es glutatiolava *in vitro* i que està localitzat a l'entrada de la cavitat catalítica, altament exposat a la superfície.

Les anàlisis d'activitat van mostrar que a diferència del que succeïa *in vitro*, en una condició control, els mutants presenten un fenotip molt similar a una soca WT. Per una banda, Sir2 participa en la regulació del citoesquelet d'actina. En un mutant $\Delta sir2$ es redueixen els cables d'actina i el flux retrògrad dels cables d'actina (Higuchi et al. 2013), mentre que la sobreexpressió de *SIR2* produeix l'efecte contrari. En aquest treball, l'anàlisi i la comparació dels resultats obtinguts entre la soca WT i els mutants Sir2 va mostrar que no existeixen diferències pel que fa al citoesquelet d'actina en forma de patxes i de cables, ni en condicions normals ni després del tractament amb un agent

oxidant (Figura 148). Per tant, sembla que els mutants Sir2 segueixen preservant l'activitat necessària per dur a terme aquesta funció.

Pel que fa al loci d'aparellament, Sir2 s'uneix als loci *HML* i *HMR*, juntament amb la resta dels membres del complex SIR, silenciant-los. (Figura 174). Així, una soca mutant $\Delta sir2$ és estèril donat que no es pot formar el complex SIR i no es produeix el silenciament en aquestes regions. Per tant, tot i el tractament amb factor α , una soca $\Delta sir2$ no atura el cycle cel·lular i com a conseqüència, no es sincronitza.

Els resultats van demostrar que els mutants no presenten el mateix fenotip que el mutant $\Delta sir2$, és a dir, són capaços de sincronitzar-se, igual que una soca WT (Figura 147). Tot i que aquest assaig és qualitatiu i no permet discernir entre més o menys activitat, sí que es pot establir que els mutants de les cisteïnes no es comporten igual que un $\Delta sir2$.

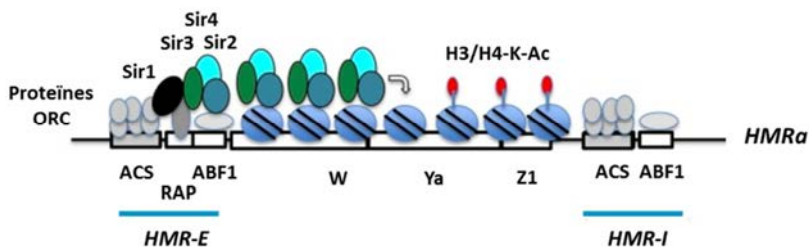


Figura 174. Silenciament al loci d'aparellament *HML* i *HMR*. Establiment del silenciament al *HMR-E*, a través de la unió de les proteïnes a l'element silenciador *HMR-E*, les quals reclutaran Sir1, i aquesta la vegada reclutada al complex Sir2-Sir3-Sir4. L'activitat histona desacetilasa de Sir2 provocarà la desacetilació de les lisines de les histones H3 i H4, fet que permetrà la unió estable del complex Sir3-Sir4 i el posicionament dels nucleosomes, així com la desacetilació del nucleosoma següent, donant lloc a una extensió del complex *SIR*. L'extensió del complex té lloc tan des de l'element *HMR-E* com *HMR-I* (Haber 2012).

Per una altra banda, Sir2-C469S i Sir2-C513S presenten una activitat telomèrica igual a la soca WT, mentre que el mutant Sir2-C363S presenta una disminució de 3 vegades en l'expressió del gen telomèric (Figura 145). Aquesta pèrdua d'activitat és molt modesta comparat amb la disminució d'unes 100 vegades que s'observa en un mutant $\Delta sir2$. Per tant, tot i que Sir2-C363S presenta menor activitat, aquest enzim està lluny de ser totalment inactiu, com sí succeïa *in vitro*. A diferència de la inestabilitat de la proteïna

Sir2-C363S observada *in vitro*, *in vivo* els nivells de proteïna són iguals als de la soca WT. La presència de xaperones o de les pròpies Grx3 i Grx4 podrien contribuir a l'estabilitat de la proteïna, fet que explicaria que l'abolició de l'activitat no fos completa. No obstant, en condicions d'estrès oxidatiu, la pèrdua d'activitat telomèrica en tots els mutants és menor a la soca WT, presentant certa resistència a la inactivació, com ja succeïa *in vitro* (Figura 146). Això indica que aquestes cisteïnes són essencials per la regulació redox de l'activitat Sir2 (Figura 175), essent diana de les modificacions redox; la seva absència prevé l'oxidació i per tant, la pèrdua d'activitat. Caldria estudiar però, si un doble o triple mutant per aquestes cisteïnes manté totalment l'activitat Sir2 després d'un estrès. De fet però, el patró d'oxidació *in vitro* va mostrar que mentre que en la proteïna WT es poden arribar a oxidar fins a 5 residus de cisteïna, en els mutants Sir2-C469S i Sir2-C513S només se n'oxiden dos com a màxim. Això va a favor de la hipòtesi que l'absència d'aquests residus n'evita l'oxidació. En general, els resultats semblen indicar que C469 i C513 serien les millors candidates per a ser regulades per glutatiolació (Figura 176).

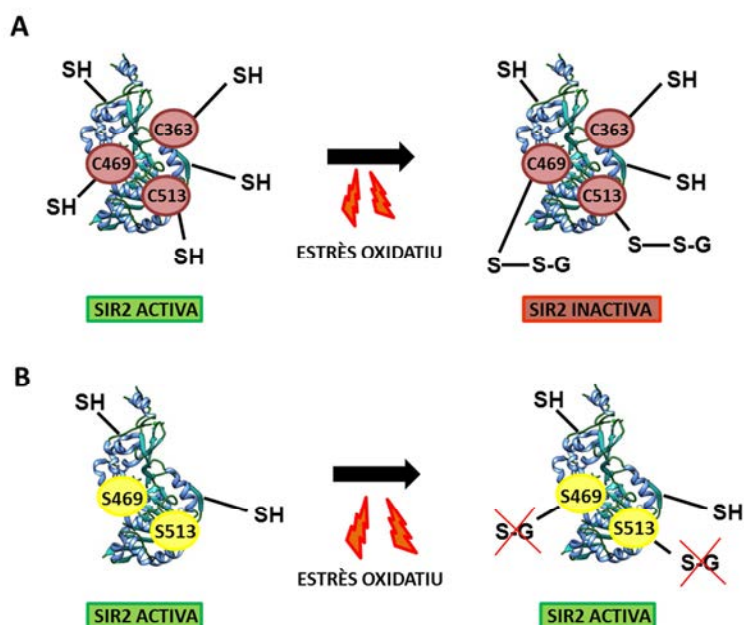


Figura 175. Cisteïnes implicades en la regulació de l'activitat de Sir2 per glutatiolació. (A) En condicions d'estrès oxidatiu, les cisteïnes C469 i C513 es glutatiolen i Sir2 s'inactiva. (B) Els mutants C469S i C513S no poden glutatiolar-se i Sir2 es manté en la seva forma activa.

Com ja s'ha comentat, les tècniques proteòmiques utilitzades no van permetre la identificació dels pèptids que contenen les cisteïnes C469 i C513, i per tant, per espectrometria de masses no es va poder comprovar sense dubte quin residu es glutatiolava. En canvi, el pèptid que conté la C363 es va detectar com a no modificat, encara que això no descarta que també es pugui glutatiolar. El fet que aquesta cisteïna es trobi menys exposada a la superfície dificultaria l'accés del GSH a l'interior de la cavitat catalítica. No obstant, la mutació d'aquest residu sí que podria induir un canvi de conformació a la proteïna, de forma que les cisteïnes C469 i C513 que abans sí s'oxidaven, deixessin d'estar tant exposades i no poguessin ser glutatiolades. Això podria acabar explicant perquè aquests mutants són més resistents a la inactivació per oxidació.

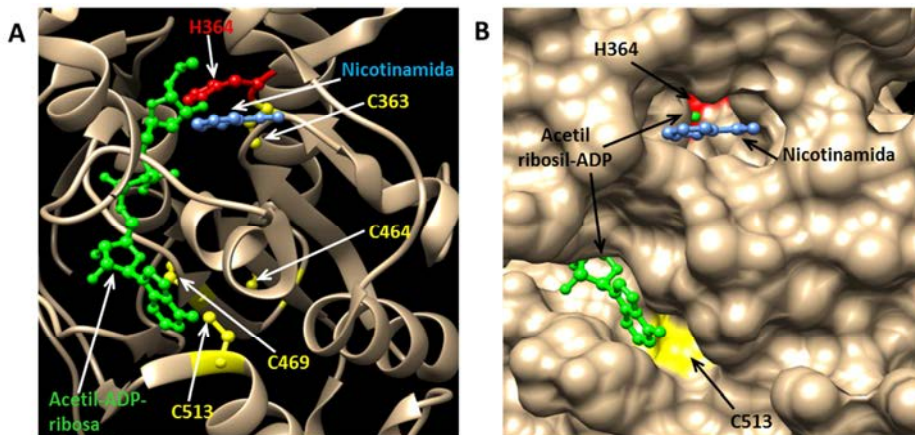


Figura 176. Estructura tridimensional de la cavitat catalítica de Sir2. (A) Representació de Sir2 (PDB: 2HJH) amb els dos productes de la reacció, la nicotinamida i l'acetil-ADP-ribosa. Es marca la histidina catalítica (H364, en vermell), i totes les Cys presents en aquesta àrea (C363, C469 i C513, en groc). (B) Representació de la superfície corresponent a la mateixa àrea que en A. Es marca la H364 en vermell i les cisteïnes en groc. S'observa com el residu C513 està molt exposat a la superfície de la proteïna. Representacions realitzades amb el software UCSF Chimera.

Els resultats també van demostrar que la C469 no estaria implicada en la regulació de Sir2 a través de la seva localització, ja que la localització subcel·lular de Sir2-C469S no es veu afectada ni en condicions control ni en condicions d'estrès per diamida (Figura 149). Aquests resultats, juntament als obtinguts amb la soca WT i $\Delta grx3\Delta grx4$ indiquen

que probablement la seqüència NES identificada *in silico* no és real i la proteïna de llevat només es localitza al nucli.

6. Resistència dels mutants Sir2 a l'estrès oxidatiu

En aquest treball s'ha descrit que Sir2 està regulada mitjançant l'estat redox; és a dir, condicions d'estrès oxidatiu indueixen la inactivació de Sir2. D'altra banda, aquesta sirtuïna es troba relacionada amb la resposta de l'estrès oxidatiu. De fet, s'ha descrit que en fase exponencial, Sir2 es troba reprimint l'expressió de gens antioxidants necessaris per la protecció de les cèl·lules front l'estrès oxidatiu, com *SOD1*, *SOD2*, *CTT1*, *CTA1*, *TRX1*, *TRX2*, *GSH1*, *GSH2*, *GRX1* i *GRX2* (Kang et al. 2014). Per tant, podria donar-se el cas que Sir2, al inactivar-se, pogués donar lloc a la transcripció de gens antioxidants necessaris per fer front a les condicions d'estrès oxidatiu. Prèviament ja s'havia descrit que el mutant $\Delta sir2$, depenent de la fase de creixement, presenta una major resistència a diferents tipus d'estrès, com l'estrès oxidatiu causat per menadiona i H_2O_2 i l'estrès per calor, i que això depèn de l'activitat Sir2 donat que el mutant Sir2-H364Y es comporta com un mutant $\Delta sir2$ (Paola Fabrizio et al. 2005)(Kang et al. 2014).

L'anàlisi de resposta a estrès dels mutants Sir2 mesurada tan a través del creixement en medi líquid com la viabilitat cel·lular en medi sòlid, va mostrar que tots els mutants presenten major resistència (igual que un mutant $\Delta sir2$) comparat a una soca WT (Figura 150 i Figura 151). Això succeïa amb un estrès induït per agents oxidants dels grups tiol, com la diamida, que indueix glutatiolacions (Lock, Sinkins, and Schilling 2011) i el DEM, caracteritzat per reaccionar directament amb el GSH i causar una depleció dels nivells de GSH intracel·lulars (Boyland and Chasseaud 1970). En canvi, aquest fenotip de major resistència dels mutants no s'observa amb el tractament amb H_2O_2 , denotant l'especificitat de la regulació de Sir2 a través dels seus tiols (Figura 152).

Tot i que en els mutants generats en aquest treball no s'ha descrit una menor activitat telomèrica, sí que podria donar-se el cas que l'activitat silenciadora de Sir2 en altres regions del genoma es vegi afectada negativament, i per tant, permeti l'expressió de tota una sèrie de gens antioxidants que fan a les cèl·lules més resistents a l'estrès

oxidatiu. És a dir, podria succeir que en els mutants, les interaccions amb les proteïnes Sir3 i Sir4 del complex SIR es puguin mantenir donat que (almenys en el cas de Sir4) té lloc a través d'una seqüència de Sir2 prèvia a l'inici de la regió catalítica de l'enzim. Per tant, les mutacions analitzades no alterarien aquesta regió, però sí podrien afectar altres zones/regions de la proteïna implicades en la unió a altres proteïnes o factors transcripcionals. Tal com ja s'ha comentat, un mutant $\Delta sir2$ presenta tota una sèrie gens de resposta a estrès induïts respecte una sòca WT. Per tant, si els mutats també presenten una major inducció en els gens antioxidants, podria explicar-se perquè presenten també major resistència a l'estrès oxidatiu específic de tiols.

Tenint en compte que la resistència a l'estrès oxidatiu és un factor clau en l'envelliment cronològic, es va analitzar aquest fenotip, observant-se una major longevitat en les soques mutants respecte la sòca WT (Figura 153). L'envelliment es caracteritza per ser un procés causat per l'acumulació dels efectes perjudicials dels radicals lliures en les diferents macromolècules i compartiments cel·lulars. Durant aquest, el balanç redox acostuma a desequilibrar-se, anant a favor de les condicions oxidants. Per tant, una major resistència a l'estrès en aquests mutants podria explicar l'increment en la vida cronològica que presenten. Per conèixer la causa d'aquesta resistència, en aquest treball es va analitzar varis tipus de resposta antioxidant en aquests mutants (Figura 154-Figura 158). Primerament, l'estudi es va centrar en les respostes antioxidants que estan més centrades en l'oxidació dels tiols. Així, es va analitzar els nivells intracel·lulars de GSH total, l'activitat glutatió reductasa i els nivells de proteïna Grx3 i Grx4. En cap cas però, es van detectar diferències significatives entre els mutants i la sòca WT. Altres sistemes antioxidants analitzats, com la SOD i la catalasa, tampoc poden explicar la major resistència dels mutants a l'estrès per diamida i DEM, ni la major longevitat.

Analitzant els resultats, una possible explicació de la major resistència a estrès oxidatiu que aquests mutants presenten, podria estar relacionada amb el paper que Sir2 desenvolupa juntament amb el factor transcripcional Hcm1. En llevat, Hcm1, de la família forkhead, a més de tenir un paper en el cicle cel·lular, s'ha descrit que participa en la biogènesi mitocondrial i en la resistència a l'estrès oxidatiu, i que Sir2 regula positivament la localització nuclear de Hcm1, permetent així l'activitat d'aquest factor

transcripcional al nucli, induint la resposta a estrès (Rodríguez-Colman et al. 2010). Així, la incapacitat dels mutants Sir2 a ser inactivats per glutatiolació podria permetre la funció conjunta de Sir2 i Hcm1 en l'increment de la resistència a l'estrès oxidatiu. A més, també s'ha descrit que altres forkhead com Fkh1 i Fkh2 interaccionen amb Sir2 tan en condicions normals com en condicions d'estrès oxidatiu (Linke et al. 2013). A més, tot i que en llevat no s'ha demostrat, en eucariotes superiors els factors Fox són substrats de Sirt1 (Giblin, Skinner, and Lombard 2014). Sir2, tot i que es desconeix el mecanisme exacte, participa en la regulació dels forkheads, regulant així la resposta a estrès. No obstant, en aquest treball no es va observar que els mutants presentin una major activitat SOD en fase exponencial, com sí s'ha descrit pel cas del mutant sobreexpressor de Hcm1 (Rodríguez-Colman et al. 2010). Si la resposta de resistència a l'estrès es regulés a través de Hcm1, s'esperaria que almenys aquest sistema antioxidants estigués induït en els mutants. A més, cal tenir en compte que la funció Sir2-Hcm1 en resposta a estrès s'ha descrit en condicions d'estrès per H₂O₂. Per tant, aquest podria suposar un mecanisme de resposta diferent al que estaria succeint en el descrit en aquest treball.

També cal tenir en compte però, que mentre que als telòmers i al loci d'aparellament els mutants Sir2 no es comporten ni presenten un mateix fenotip que un mutant $\Delta sir2$, la resistència a l'estrès que presenten sí que és compartida entre el mutant deletat per *SIR2* i els mutants puntuals de les cisteïnes estudiats en aquest treball. Per tant, això és indicatiu que no en totes les regions del genoma el mode d'acció de Sir2 és el mateix. En condicions normals, Sir2 podria ser activa als telòmers i al loci d'aparellament formant el complex SIR i al rDNA, formant el complex RENT, però perdre activitat al glutatiolar-se les cisteïnes C469 i C513. L'absència d'aquestes en els mutants en prevé la glutatiolació i també, la pèrdua d'activitat silenciadora en aquestes regions. No obstant, semblaria que en altres regions del genoma, Sir2 podria actuar de forma diferent. L'absència de les cisteïnes indueix una resistència a l'estrès específic de tiols. Les explicacions a aquest fenotip podrien ser vàries. Es podria donar el cas que malgrat les mutacions en les cisteïnes no afecten l'activitat desacetilasa de la sirtuïna (donat que segueixen sent actives als telòmers i als loci d'aparellament), sí que induïssin un canvi conformacional que impedisís la unió i el silenciament de Sir2 a gens

de resposta antioxidant. Com s'ha comentat, en fase exponencial Sir2 es troba reprimint l'expressió de gens antioxidants necessaris per la protecció de les cèl·lules front l'estrès oxidatiu (Kang et al. 2014). Per tant, la no unió de Sir2 en aquests gens en permetria la seva expressió, d'una forma similar al que succeeix en un mutant $\Delta sir2$. De fet, els mutants Sir2 descrits en aquest treball presenten una major extensió del CLS (igual que un mutant $\Delta sir2$), que bé podria estar relacionat amb que són incapaços de reprimir els gens de resposta a estrès o bé que no estarien inhibint els enzims Pck1 i Adh2 implicats en el catabolisme de l'àcid acètic i de l'etanol, l'acumulació dels quals es perjudicial per les cèl·lules. També podria ser que Sir2 actués de forma indirecta, a través de la unió a altres proteïnes o factors transcripcionals (probablement diferents a Hcm1) implicats en algun tipus de resposta antioxidant específica de tiols. Igual que en mamífers, Sir2 podria actuar sobre substrats de tipus no histona; Sir2 podria seguir sent activa, però el canvi conformacional induït per la mutació C469S i C513S podria emascarar el lloc de reconeixement de Sir2 amb el seu hipotètic substrat, impeding la seva desacetilació i/o reclutament i permet així que aquest s'uneixi i indueixi gens de resposta a estrès. Per tant, tenint en compte les diferents possibilitats, seria interessant analitzar en detall el mecanisme de resistència, donada les possibles implicacions en la comprensió dels processos associats tan a múltiples patologies com a l'envelliment.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'activitat de Sir2 *in vitro* depèn del seu estat redox, sent l'oxidació de cisteïnes per glutatiolació, un mecanisme d'inactivació reversible.
2. Grx3 i Grx4 són capaces de desglutatiolar Sir2 *in vitro* i ho fan a través del centre actiu localitzat al domini GRX. *In vivo*, l'estat redox de Sir2 depèn de la presència de Grx3 i en menor mesura de Grx4, actuant ambdues com les seves tiol-reductases fisiològiques. La interacció física de Sir2 amb Grx3 i Grx4 reforça el paper d'aquesta funció.
3. Grx3 i Grx4 presenten un potencial electrostàtic de superfície positiu que afavoreix la interacció amb el GSH carregat negativament. Aquest fet les converteix amb enzims ideals per dur a terme la desglutatiolació de Sir2, a diferència de les tioredoxines, amb un potencial de superfície negatiu.
4. L'oxidació de Sir2 que s'observa en el mutant $\Delta grx3\Delta grx4$ no està causada per l'acumulació de ferro, sinó per la manca de Grx3 i Grx4.
5. L'absència de Grx3 i Grx4 no afecta a la localització nuclear de Sir2, ni en condicions control ni en condicions d'estrès oxidatiu. Per tant, sembla que la localització no és un mecanisme de regulació de Sir2.
6. Grx3 i Grx4 eviten parcialment la pèrdua d'activitat telomèrica de Sir2 quan les cèl·lules es sotmeten a un estrès, i en permeten la seva recuperació una vegada que aquest finalitza. En canvi, les tioredoxines no intervenen en la regulació de l'activitat telomèrica de Sir2.
7. El mutant $\Delta grx3$ presenta menys silenciament al rDNA, apuntant que de les dues glutaredoxines, és la que presenta un paper més important en la regulació de Sir2.
8. En les condicions experimentals utilitzades, sembla que el H_2O_2 no participa en la regulació redox de Sir2.
9. Es coneix que al citosol, Grx3 i Grx4 actuen en el metabolisme del ferro formant homodímers i heterodímers Fra2-Grx3/4. Els resultats d'aquest treball indiquen que, en el nucli, actuen en la seva forma monomèrica reduint Sir2.
10. Tot i que l'activitat de Sir2 es veu afectada negativament en condicions d'estrès oxidatiu, diversos resultats preliminars obren la possibilitat que condicions lleus d'estrès podrien activar la sirtuïna.

11. La mutagènesi dirigida ha permès estudiar el paper de diferents cisteïnes en la regulació redox de Sir2. Les proteïnes mutants Sir2-C363S i Sir2-C372S no presenten activitat *in vitro*, fet que s'explica per la seva major inestabilitat i possiblement una major oxidació o formació d'agregats proteïcs. Les proteïnes Sir2-C464S, Sir2-C469S i Sir2-C513S presenten menor activitat *in vitro* respecte una proteïna Sir2-WT. A més, l'estrès per diamida no redueix l'activitat de les proteïnes mutants *in vitro*, a diferència del que succeeix amb la proteïna Sir2-WT.
12. La proteïna Sir2-C513S no es glutatiola *in vitro*, sent aquesta cisteïna molt susceptible a la glutatiolació donat a la seva localització molt exposada a la superfície de Sir2. La resta de proteïnes mutants presenten uns nivells de glutatiolació inferiors a la proteïna WT.
13. Les soques mutants Sir2-C469S i Sir2-C513S presenten la mateixa activitat telomèrica que la soca WT, mentre que en el mutant Sir2-C363S l'activitat és més reduïda. No obstant, en condicions d'estrès per diamida, la pèrdua d'activitat Sir2 dels mutants es troba parcialment previnguda, igual que succeeix *in vitro*, fet que es podria correlacionar amb el menor grau d'oxidació en aquesta situació.
14. A diferència del mutant $\Delta sir2$, les soques Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S són capaces de sincronitzar-se per addició del factor α . Això significa que presenten silenciament en el locus d'aparellament HM igual o similar a una soca WT.
15. Sir2-WT-GFP es localitza al nucli tan en condicions control com després d'un estrès oxidatiu. Sir2-C469S-GFP també es localitza al nucli en totes les condicions analitzades. Per tant, el NES identificat *in silico* sembla no tenir un paper fisiològic real com a tal.
16. Les soques mutants Sir2-C363S, Sir2-C469S i Sir2-C513S són més resistents que una soca Sir2-WT al tractament amb diamida i a l'envelliment cronològic. Això indica que aquestes cisteïnes tenen un paper en la regulació de Sir2 i per tant, en la funció que aquesta desenvolupa envers la resposta a l'estrès oxidatiu.
17. L'anàlisi de diferents sistemes de defensa antioxidants entre la soca WT i les diferents soques mutants Sir2 no va mostrar diferents significatives.
18. En conjunt, els resultats demostren que Sir2 està regulada mitjançant la glutatiolació reversible per Grx3/4, essent C469 i C513 les cisteïnes essencials *in vivo*. Aquesta regulació té importància en la resistència a l'estrès i l'envelliment.

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

-A-

- Abate, C, L Patel, F J Rauscher, and T Curran. 1990. "Redox Regulation of Fos and Jun DNA-Binding Activity in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 249 (4973): 1157–61.
- Ago, Tetsuro, Tong Liu, Peiyong Zhai, Wei Chen, Hong Li, Jeffery D. Molkenin, Stephen F. Vatner, and Junichi Sadoshima. 2008. "A Redox-Dependent Pathway for Regulating Class II HDACs and Cardiac Hypertrophy." *Cell* 133 (6): 978–93.
- Aguilaniu, Hugo, Lena Gustafsson, Michel Rigoulet, and Thomas Nyström. 2003. "Asymmetric Inheritance of Oxidatively Damaged Proteins during Cytokinesis." *Science (New York, N.Y.)* 299 (5613): 1751–53.
- Aksenova, Anna Y, Patricia W Greenwell, Margaret Dominska, Alexander A Shishkin, Jane C Kim, Thomas D Petes, and Sergei M Mirkin. 2013. "Genome Rearrangements Caused by Interstitial Telomeric Sequences in Yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (49): 19866–71.
- Al Abed, Y, S VanPatten, H W Li, J A Lawson, G A FitzGerald, K R Manogue, and R Bucala. 2001. "Characterization of a Novel Hemoglobin-Glutathione Adduct That Is Elevated in Diabetic Patients." *Molecular Medicine* 7 (9): 619–23.
- Allen, Erin M.G., and John J. Mieyal. 2012. "Protein-Thiol Oxidation and Cell Death: Regulatory Role of Glutaredoxins." *Antioxidants & Redox Signaling* 17 (12): 1748–63.
- Alves, Rui, Ester Vilaprinyo, Albert Sorribas, and Enrique Herrero. 2009. "Evolution Based on Domain Combinations: The Case of Glutaredoxins." *BMC Evolutionary Biology* 9 (January): 66.
- Anderson, Rozalyn M, Kevin J Bitterman, Jason G Wood, Oliver Medvedik, Haim Cohen, Stephen S Lin, Jill K Manchester, Jeffrey I Gordon, and David A Sinclair. 2002. "Manipulation of a Nuclear NAD⁺ Salvage Pathway Delays Aging without Altering Steady-State NAD⁺ Levels." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18881–90.
- Anderson, Rozalyn M, Kevin J Bitterman, Jason G Wood, Oliver Medvedik, and David A Sinclair. 2003. "Nicotinamide and PNC1 Govern Lifespan Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nature* 423 (6936): 181–85.
- Anderson, Rozalyn M, and Richard Weindruch. 2012. "The Caloric Restriction Paradigm: Implications for Healthy Human Aging." *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council* 24 (2): 101–6.
- Anisimov, Vladimir N, Mark A Zabezhinski, Irina G Popovich, Tatiana S Piskunova, Anna V Semenchenko, Margarita L Tyndyk, Maria N Yurova, Svetlana V Rosenfeld, and Mikhail V Blagosklonny. 2011. "Rapamycin Increases Lifespan and Inhibits Spontaneous Tumorigenesis in Inbred Female Mice." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (24): 4230–36.
- Aparicio, O M, B L Billington, and D E Gottschling. 1991. "Modifiers of Position Effect Are Shared between Telomeric and Silent Mating-Type Loci in *S. Cerevisiae*." *Cell* 66 (6): 1279–87.
- Arents, G, and E N Moudrianakis. 1993. "Topography of the Histone Octamer Surface: Repeating Structural Motifs Utilized in the Docking of Nucleosomal DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (22): 10489–93.
- Armache, Karim-Jean, Joseph D Garlick, Daniele Canzio, Geeta J Narlikar, and Robert E Kingston. 2011. "Structural Basis of Silencing: Sir3 BAH Domain in Complex with a Nucleosome at 3.0 Å Resolution." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6058): 977–82.
- Armstrong, Christopher M, Matt Kaeberlein, Shin Ichiro Imai, and Leonard Guarente. 2002. "Mutations in *Saccharomyces Cerevisiae* Gene SIR2 Can Have Differential Effects on in Vivo Silencing Phenotypes and in Vitro Histone Deacetylation Activity." *Molecular Biology of the Cell* 13 (4): 1427–38.
- Asnis, R E. 1955. "A Glutathione Reductase from *Escherichia Coli*." *The Journal of Biological Chemistry* 213 (1): 77–85.
- Audrito, Valentina, Tiziana Vaisitti, Davide Rossi, Daniela Gottardi, Giovanni D'Arena, Luca Laurenti, Gianluca Gaidano, Fabio Malavasi, and Silvia Deaglio. 2011. "Nicotinamide Blocks Proliferation and Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells through Activation of the p53/miR-34a/SIRT1 Tumor Suppressor Network." *Cancer Research* 71 (13): 4473–83.

Avalos, Jose L, Ivana Celic, Shabazz Muhammad, Michael S Cosgrove, Jef D Boeke, and Cynthia Wolberger. 2002. "Structure of a Sir2 Enzyme Bound to an Acetylated p53 Peptide." *Molecular Cell* 10 (3): 523–35.

-B-

- Babichev, Y, and N Isakov. 2001. "Tyrosine Phosphorylation of PICOT and Its Translocation to the Nucleus in Response of Human T Cells to Oxidative Stress." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 495 (January): 41–45.
- Bakker, B M, K M Overkamp, van Maris AJ, P Kötter, M A Luttik, van Dijken JP, and J T Pronk. 2001. "Stoichiometry and Compartmentation of NADH Metabolism in Saccharomyces Cerevisiae." *FEMS Microbiology Reviews* 25 (1): 15–37.
- Bakker, Barbara M., Karin M. Overkamp, Antonius J a Van Maris, Peter Kötter, Marijke a H Luttik, Johannes P. Van Dijken, and Jack T. Pronk. 2001. "Stoichiometry and Compartmentation of NADH Metabolism in Saccharomyces Cerevisiae." *FEMS Microbiology Reviews* 25 (1): 15–37.
- Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel. 2005. "Mitochondria, Oxidants, and Aging." *Cell* 120 (4): 483–95.
- Bandyopadhyay, Sibali, Filipe Gama, Maria Micaela Molina-Navarro, José Manuel Gualberto, Ronald Claxton, Sunil G Naik, Boi Hanh Huynh, et al. 2008. "Chloroplast Monothiol Glutaredoxins as Scaffold Proteins for the Assembly and Delivery of [2Fe-2S] Clusters." *The EMBO Journal* 27 (7): 1122–33.
- Bao, Rui, Yuxing Chen, Ya-Jun Tang, Joel Janin, and Cong-Zhao Zhou. 2007. "Crystal Structure of the Yeast Cytoplasmic Thioredoxin Trx2." *Proteins* 66 (1): 246–49.
- Barrett, W C, J P DeGnore, S König, H M Fales, Y F Keng, Z Y Zhang, M B Yim, and P B Chock. 1999. "Regulation of PTP1B via Glutathionylation of the Active Site Cysteine 215." *Biochemistry* 38 (20): 6699–6705.
- Barton, A A. 1950. "Some Aspects of Cell Division in Saccharomyces Cerevisiae." *Journal of General Microbiology* 4 (1): 84–86.
- Bass, Rosemary, Lloyd W. Ruddock, Peter Klappa, and Robert B. Freedman. 2004. "A Major Fraction of Endoplasmic Reticulum-Located Glutathione Is Present as Mixed Disulfides with Protein." *Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 5257–62.
- Beauchamp, Charles, and Irwin Fridovich. 1971. "Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels." *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276–87.
- Beckman, K B, and B N Ames. 1998. "The Free Radical Theory of Aging Matures." *Physiological Reviews* 78 (2): 547–81.
- Bedalov, A, T Gatbonton, W P Irvine, D E Gottschling, and J A Simon. 2001. "Identification of a Small Molecule Inhibitor of Sir2p." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15113–18.
- Bedalov, Antonio, Maki Hirao, Jeffrey Posakony, Melisa Nelson, and Julian A Simon. 2003. "NAD⁺-Dependent Deacetylase Hst1p Controls Biosynthesis and Cellular NAD⁺ Levels in Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular and Cellular Biology* 23 (19): 7044–54.
- Beer, S. M., E. R. Taylor, S. E. Brown, C. C. Dahm, N. J. Costa, M. J. Runswick, and M. P. Murphy. 2004. "Glutaredoxin 2 Catalyzes the Reversible Oxidation and Glutathionylation of Mitochondrial Membrane Thiol Proteins: Implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense." *Journal of Biological Chemistry* 279 (46): 47939–51.
- Belenky, Peter, Katrina L Bogan, and Charles Brenner. 2007. "NAD⁺ Metabolism in Health and Disease." *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 12–19.
- Bellí, Gemma, María Micaela Molina, José García-Martínez, José E Pérez-Ortín, and Enrique Herrero. 2004. "Saccharomyces Cerevisiae Glutaredoxin 5-Deficient Cells Subjected to Continuous Oxidizing Conditions Are Affected in the Expression of Specific Sets of Genes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12386–95.
- Bellí, Gemma, Julio Polaina, Jordi Tamarit, María Angeles De La Torre, María Teresa Rodríguez-Manzanegue, Joaquim Ros, and Enrique Herrero. 2002. "Structure-Function Analysis of Yeast Grx5 Monothiol Glutaredoxin Defines Essential Amino Acids for the Function of the Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37590–96.

- Bermingham-McDonogh, O, E B Gralla, and J S Valentine. 1988. "The Copper, Zinc-Superoxide Dismutase Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*: Cloning, Sequencing, and Biological Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (13): 4789–93.
- Berndt, C, C H Lillig, and A Holmgren. 2007. "Thiol-Based Mechanisms of the Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Implications for Diseases in the Cardiovascular System." *American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology* 292 (3): H1227–36.
- Berndt, Carsten, Christopher Horst Lillig, and Arne Holmgren. 2008. "Thioredoxins and Glutaredoxins as Facilitators of Protein Folding." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (4): 641–50.
- Bhat KPL, J W Kosmeder, and J M Pezzuto. 2001. "Biological Effects of Resveratrol." *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (6): 1041–64.
- Bi, E. 2001. "Cytokinesis in Budding Yeast: The Relationship between Actomyosin Ring Function and Septum Formation." *Cell Structure and Function* 26 (6): 529–37.
- Bi, Xin. 2014. "Heterochromatin Structure: Lessons from the Budding Yeast." *IUBMB Life* 66 (10): 657–66.
- Biacsi, Rea, Daman Kumari, and Karen Usdin. 2008. "SIRT1 Inhibition Alleviates Gene Silencing in Fragile X Mental Retardation Syndrome." *PLoS Genetics* 4 (3): e1000017.
- Biddick, Rhiannon, and Elton T Young. 2009. "The Disorderly Study of Ordered Recruitment." *Yeast (Chichester, England)* 26 (4): 205–20.
- Biteau, Benoît, Jean Labarre, and Michel B Toledano. 2003. "ATP-Dependent Reduction of Cysteine-Sulphinic Acid by *S. Cerevisiae* Sulphiredoxin." *Nature* 425 (6961): 980–84.
- Bitterman, Kevin J, Rozalyn M Anderson, Haim Y Cohen, Magda Latorre-Esteves, and David A Sinclair. 2002. "Inhibition of Silencing and Accelerated Aging by Nicotinamide, a Putative Negative Regulator of Yeast sir2 and Human SIRT1." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 45099–107.
- Bjedov, Ivana, Janne M Toivonen, Fiona Kerr, Cathy Slack, Jake Jacobson, Andrea Foley, and Linda Partridge. 2010. "Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*." *Cell Metabolism* 11 (1): 35–46.
- Board, Philip G., and Deepthi Menon. 2013. "Glutathione Transferases, Regulators of Cellular Metabolism and Physiology." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830 (5). Elsevier B.V.: 3267–88.
- Boldogh, I R, H C Yang, and L A Pon. 2001. "Mitochondrial Inheritance in Budding Yeast." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (6): 368–74.
- Bonawitz, Nicholas D, Marc Chatenay-Lapointe, Yong Pan, and Gerald S Shadel. 2007. "Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression." *Cell Metabolism* 5 (4): 265–77.
- Boulton, S J, and S P Jackson. 1998. "Components of the Ku-Dependent Non-Homologous End-Joining Pathway Are Involved in Telomeric Length Maintenance and Telomeric Silencing." *The EMBO Journal* 17 (6): 1819–28.
- Boyland, E, and L F Chasseaud. 1970. "The Effect of Some Carbonyl Compounds on Rat Liver Glutathione Levels." *Biochemical Pharmacology* 19 (4): 1526–28.
- Brachmann, C B, J M Sherman, S E Devine, E E Cameron, L Pillus, and J D Boeke. 1995. "The SIR2 Gene Family, Conserved from Bacteria to Humans, Functions in Silencing, Cell Cycle Progression, and Chromosome Stability." *Genes & Development* 9 (23): 2888–2902.
- Bradford, M M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (May): 248–54.
- Brar, S S, C Grigg, K S Wilson, W D Holder Jr., D Dreau, C Austin, M Foster, et al. 2004. "Disulfiram Inhibits Activating Transcription Factor/cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein and Human Melanoma Growth in a Metal-Dependent Manner in Vitro, in Mice and in a Patient with Metastatic Disease." *Mol Cancer Ther* 3 (9): 1049–60.
- Bräutigam, Lars, Lasse Dahl Ejby Jensen, Gereon Poschmann, Staffan Nyström, Sarah Bannenberg, Kristian Dreij, Klaudia Lepka, et al. 2013. "Glutaredoxin Regulates Vascular Development by Reversible Glutathionylation of Sirtuin 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (50): 20057–62.
- Bretscher, Anthony. 2003. "Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast: The Tracks, Motors, and Receptors." *The Journal of Cell Biology* 160 (6): 811–16.

- Brigelius, R, R Lenzen, and H Sies. 1982. "Increase in Hepatic Mixed Disulphide and Glutathione Disulphide Levels Elicited by Paraquat." *Biochemical Pharmacology* 31 (8): 1637–41.
- Brunet, Anne, Lora B Sweeney, J Fitzhugh Sturgill, Katrin F Chua, Paul L Greer, Yingxi Lin, Hien Tran, et al. 2004. "Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5666): 2011–15.
- Bryk, Mary, Scott D Briggs, Brian D Strahl, M Joan Curcio, C David Allis, and Fred Winston. 2002. "Evidence That Set1, a Factor Required for Methylation of Histone H3, Regulates rDNA Silencing in *S. Cerevisiae* by a Sir2-Independent Mechanism." *Current Biology: CB* 12 (2): 165–70.
- Buck, Stephen W, Christopher M Gallo, and Jeffrey S Smith. 2004. "Diversity in the Sir2 Family of Protein Deacetylases." *Journal of Leukocyte Biology* 75 (6): 939–50.
- Buck, Stephen W, Joseph J Sandmeier, and Jeffrey S Smith. 2002. "RNA Polymerase I Propagates Unidirectional Spreading of rDNA Silent Chromatin." *Cell* 111 (7): 1003–14.
- Bunik, V, G Raddatz, S Lemaire, Y Meyer, J P Jacquot, and H Bisswanger. 1999. "Interaction of Thioiodoxins with Target Proteins: Role of Particular Structural Elements and Electrostatic Properties of Thioiodoxins in Their Interplay with 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 8 (1): 65–74.
- Burgoyne, Joseph R, Melanie Madhani, Friederike Cuello, Rebecca L Charles, Jonathan P Brennan, Ewald Schröder, Darren D Browning, and Philip Eaton. 2007. "Cysteine Redox Sensor in PKG α Enables Oxidant-Induced Activation." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5843): 1393–97.
- Burkhalter, Martin D, and José M Sogo. 2004. "rDNA Enhancer Affects Replication Initiation and Mitotic Recombination: Fob1 Mediates Nucleolytic Processing Independently of Replication." *Molecular Cell* 15 (3): 409–21.
- Bürkle, Alexander. 2005. "Poly(ADP-Ribose). The Most Elaborate Metabolite of NAD $^{+}$." *The FEBS Journal* 272 (18): 4576–89.
- Burnett, Camilla, Sara Valentini, Filipe Cabreiro, Martin Goss, Milán Somogyvári, Matthew D Piper, Matthew Hoddinott, et al. 2011. "Absence of Effects of Sir2 Overexpression on Lifespan in *C. Elegans* and *Drosophila*." *Nature* 477 (7365): 482–85.
- Bushweller, J H, F Aslund, K Wüthrich, and A Holmgren. 1992. "Structural and Functional Characterization of the Mutant *Escherichia Coli* Glutaredoxin (C14----S) and Its Mixed Disulfide with Glutathione." *Biochemistry* 31 (38): 9288–93.
- Butland, Gareth, José Manuel Peregrín-Alvarez, Joyce Li, Wehong Yang, Xiaochun Yang, Veronica Canadian, Andrei Starostine, et al. 2005. "Interaction Network Containing Conserved and Essential Protein Complexes in *Escherichia Coli*." *Nature* 433 (7025): 531–37.
- Bystricky, Kerstin, Thierry Laroche, Griet van Houwe, Marek Blaszczyk, and Susan M Gasser. 2005. "Chromosome Looping in Yeast: Telomere Pairing and Coordinated Movement Reflect Anchoring Efficiency and Territorial Organization." *The Journal of Cell Biology* 168 (3): 375–87.

-C-

- Cabiscol, E, and R L Levine. 1996. "The Phosphatase Activity of Carbonic Anhydrase III Is Reversibly Regulated by Glutathiolation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (9): 4170–74.
- Cabiscol, E, E Piulats, P Echave, E Herrero, and J Ros. 2000. "Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 27393–98.
- Cabiscol, E, J Tamarit, and J Ros. 2000. "Oxidative Stress in Bacteria and Protein Damage by Reactive Oxygen Species." *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 3 (1): 3–8.
- Cabiscol, Elisa, Jordi Tamarit, and Joaquim Ros. 2014. "Protein Carbonylation: Proteomics, Specificity and Relevance to Aging." *Mass Spectrometry Reviews* 33 (1): 21–48.
- Caito, Samuel, Saravanan Rajendrasozhan, Suzanne Cook, Sangwoon Chung, Hongwei Yao, Alan E Friedman, Paul S Brookes, and Irfan Rahman. 2010. "SIRT1 Is a Redox-Sensitive Deacetylase That Is Post-Translationally Modified by Oxidants and Carbonyl Stress." *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9): 3145–59.

- Camaschella, Clara, Alessandro Campanella, Luigia De Falco, Loredana Boschetto, Roberta Merlini, Laura Silvestri, Sonia Levi, and Achille Iolascon. 2007. "The Human Counterpart of Zebrafish Shiraz Shows Sideroblastic-like Microcytic Anemia and Iron Overload." *Blood* 110 (4): 1353–58.
- Cameroni, Elisabetta, Nicolas Hulo, Johnny Roosen, Joris Winderickx, and Claudio De Virgilio. 2004. "The Novel Yeast PAS Kinase Rim 15 Orchestrates G0-Associated Antioxidant Defense Mechanisms." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (4): 462–68.
- Cantó, Carles, Lake Q Jiang, Atul S Deshmukh, Chikage Matak, Agnes Coste, Marie Lagouge, Juleen R Zierath, and Johan Auwerx. 2010. "Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle." *Cell Metabolism* 11 (3): 213–19.
- Carlberg, I, and B Mannervik. 1985. "Glutathione Reductase." *Methods in Enzymology* 113 (January): 484–90.
- Casagrande, Simona, Valentina Bonetto, Maddalena Fratelli, Elisabetta Gianazza, Ivano Eberini, Tania Massignan, Mario Salmona, Geng Chang, Arne Holmgren, and Pietro Ghezzi. 2002. "Glutathionylation of Human Thioredoxin: A Possible Crosstalk between the Glutathione and Thioredoxin Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 9745–49.
- Casatta, Nadia, Alessandra Porro, Ivan Orlandi, Luca Brambilla, and Marina Vai. 2013. "Lack of Sir2 Increases Acetate Consumption and Decreases Extracellular pro-Aging Factors." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (3): 593–601.
- Celic, Ivana, Hiroshi Masumoto, Wendell P Griffith, Pamela Meluh, Robert J Cotter, Jef D Boeke, and Alain Verreault. 2006. "The Sirtuins hst3 and Hst4p Preserve Genome Integrity by Controlling Histone h3 Lysine 56 Deacetylation." *Current Biology : CB* 16 (13): 1280–89.
- Cha, Hyeeseon, Ji Myoung Kim, Jae Gyun Oh, Moon Hee Jeong, Chang Sik Park, Jaeho Park, Hyeon Joo Jeong, et al. 2008. "PICOT Is a Critical Regulator of Cardiac Hypertrophy and Cardiomyocyte Contractility." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45 (6): 796–803.
- Chakrabarty, Subhra Prakash, and Hemalatha Balaram. 2010. "Reversible Binding of Zinc in Plasmodium Falciparum Sir2: Structure and Activity of the Apoenzyme." *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (9). Elsevier B.V.: 1743–50.
- Chakravarthi, Seema, Catherine E Jessop, and Neil J Bulleid. 2006. "The Role of Glutathione in Disulphide Bond Formation and Endoplasmic-Reticulum-Generated Oxidative Stress." *EMBO Reports* 7 (3): 271–75.
- Chan, C S, and B K Tye. 1983. "A Family of Saccharomyces Cerevisiae Repetitive Autonomously Replicating Sequences That Have Very Similar Genomic Environments." *Journal of Molecular Biology* 168 (3): 505–23.
- Chang, Jeong-Ho, Hyun-Chul Kim, Kwang-Yeon Hwang, Joon-Won Lee, Stephen P Jackson, Stephen D Bell, and Yunje Cho. 2002. "Structural Basis for the NAD-Dependent Deacetylase Mechanism of Sir2." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34489–98.
- Chao, C C, Y S Ma, and E R Stadtman. 1997. "Modification of Protein Surface Hydrophobicity and Methionine Oxidation by Oxidative Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 2969–74.
- Chatterjee, Champak, and Tom W Muir. 2010. "Chemical Approaches for Studying Histone Modifications." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (15): 11045–50.
- Cheeseman, K H, and T F Slater. 1993. "An Introduction to Free Radical Biochemistry." *British Medical Bulletin* 49 (3): 481–93.
- Cheng, Ning-Hui, Wei Zhang, Wei-Qin Chen, Jianping Jin, Xiaojiang Cui, Nancy F Butte, Lawrence Chan, and Kendal D Hirschi. 2011. "A Mammalian Monothiol Glutaredoxin, Grx3, Is Critical for Cell Cycle Progression during Embryogenesis." *The FEBS Journal* 278 (14): 2525–39. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08178.x.
- Chini, Eduardo Nunes. 2009. "CD38 as a Regulator of Cellular NAD: A Novel Potential Pharmacological Target for Metabolic Conditions." *Current Pharmaceutical Design* 15 (1): 57–63.
- Cho, Dong-hyung, Tomohiro Nakamura, Jianguo Fang, Piotr Cieplak, Zelong Gu, and Stuart A Lipton. 2010. "NIH Public Access" 324 (5923): 1–11.
- Chrestensen, C A, D W Starke, and J J Mieyal. 2000. "Acute Cadmium Exposure Inactivates Thioltransferase (Glutaredoxin), Inhibits Intracellular Reduction of Protein-Glutathionyl-

- Mixed Disulfides, and Initiates Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (34): 26556–65.
- Cockell, M M, S Perrod, and S M Gasser. 2000. "Analysis of Sir2p Domains Required for rDNA and Telomeric Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 154 (3): 1069–83.
- Cockell, M, F Palladino, T Laroche, G Kyrion, C Liu, A J Lustig, and S M Gasser. 1995. "The Carboxy Termini of Sir4 and Rap1 Affect Sir3 Localization: Evidence for a Multicomponent Complex Required for Yeast Telomeric Silencing." *The Journal of Cell Biology* 129 (4): 909–24.
- Cohen, Gerald, Winfried Rapatz, and Helmut Ruis. 1988. "Sequence of the *Saccharomyces Cerevisiae* CTA1 Gene and Amino Acid Sequence of Catalase A Derived from It." *European Journal of Biochemistry* 176 (1): 159–63.
- Collet, Jean-Francois, Jonathan Conrad D'Souza, Ursula Jakob, and James C A Bardwell. 2003. "Thioredoxin 2, an Oxidative Stress-Induced Protein, Contains a High Affinity Zinc Binding Site." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 45325–32.
- Collet, Jean-Francois, and Joris Messens. 2010. "Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins." *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (8): 1205–16.
- Collinson, Emma J, and Chris M Grant. 2003. "Role of Yeast Glutaredoxins as Glutathione S-Transferases." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22492–97.
- Collinson, Emma J, Glen L Wheeler, Ester Ocón Garrido, Angela M Avery, Simon V Avery, and Chris M Grant. 2002. "The Yeast Glutaredoxins Are Active as Glutathione Peroxidases." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16712–17.
- Comini, Marcelo A, Jochen Rettig, Natalie Dirdjaja, Eva-Maria Hanschmann, Carsten Berndt, and R Luise Krauth-Siegel. 2008. "Monothiol Glutaredoxin-1 Is an Essential Iron-Sulfur Protein in the Mitochondrion of African Trypanosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (41): 27785–98.
- Conte, Mauro Lo, and Kate S. Carroll. 2013. "The Chemistry of Thiol Oxidation and Detection." *Oxidative Stress and Redox Regulation* 9789400757: 1–42.
- Coppo, Lucia, Sergio J Montano, Alicia C Padilla, and Arne Holmgren. 2016. "Determination of Glutaredoxin Enzyme Activity and Protein S-Glutathionylation Using Fluorescent Eosin-Glutathione." *Analytical Biochemistry* 499 (April): 24–33.
- Couto, Narciso, Jennifer Wood, and Jill Barber. 2016. "The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network." *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier.
- Cuozzo, J W, and C A Kaiser. 1999. "Competition between Glutathione and Protein Thiols for Disulphide-Bond Formation." *Nature Cell Biology* 1 (3): 130–35.
- Cuperus, G, R Shafaatian, and D Shore. 2000. "Locus Specificity Determinants in the Multifunctional Yeast Silencing Protein Sir2." *The EMBO Journal* 19 (11): 2641–51.
- D-
- Dalle-Donne, Isabella, Graziano Colombo, Nicoletta Gagliano, Roberto Colombo, Daniela Giustarini, Ranieri Rossi, and Aldo Milzani. 2011. "S-Glutathiolation in Life and Death Decisions of the Cell." *Free Radical Research* 45 (1): 3–15.
- Dang, Weiwei, Kristan K Steffen, Rocco Perry, Jean a Dorsey, F Brad Johnson, Ali Shilatifard, Matt Kaerberlein, Brian K Kennedy, and Shelley L Berger. 2009. "Histone H4 Lysine 16 Acetylation Regulates Cellular Lifespan." *Nature* 459 (7248): 802–7.
- Dansen, Tobias B, Lydia M M Smits, Miranda H van Triest, Peter L J de Keizer, Dik van Leenen, Marian Groot Koerkamp, Anna Szybowska, et al. 2009. "Redox-Sensitive Cysteines Bridge p300/CBP-Mediated Acetylation and FoxO4 Activity." *Nature Chemical Biology* 5 (9): 664–72.
- Dardalhon, Michèle, Chitranshu Kumar, Ismail Iraqui, Laurence Vernis, Guy Kienda, Agata Banach-Latapy, Tiantian He, et al. 2008. "Redox-Sensitive YFP Sensors Monitor Dynamic Nuclear and Cytosolic Glutathione Redox Changes." *Free Radical Biology & Medicine* 52 (11-12): 2254–65.
- Davies, Michael J. 2016. "Protein Oxidation and Peroxidation." *The Biochemical Journal* 473 (7). Portland Press Limited: 805–25.
- Davis, David A., Karen Dorsey, Paul T. Wingfield, Stephen J. Stahl, Joshua Kaufman, Henry M. Fales, and Rodney L. Levine. 1996. "Regulation of HIV-1 Protease Activity through Cysteine Modification." *Biochemistry* 35 (7): 2482–88.

- De Ruijter, Annemieke J M, Albert H van Gennip, Huib N Caron, Stephan Kemp, and André B P van Kuilenburg. 2003. "Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family." *The Biochemical Journal* 370 (Pt 3): 737–49.
- De Virgilio, Claudio. 2012. "The Essence of Yeast Quiescence." *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2). The Oxford University Press: 306–39.
- Dean, Roger T., Janusz Gebicki, Steven Gieseg, Adrienne J. Grant, and Jeremy A. Simpson. 1992. "Hypothesis: A Damaging Role in Aging for Reactive Protein Oxidation Products?" *Mutation Research/DNAging* 275 (3-6): 387–93.
- Delanay, A, A D Isnard, and M B Toledano. 2000. "H₂O₂ Sensing through Oxidation of the Yap1 Transcription Factor." *The EMBO Journal* 19 (19): 5157–66.
- Delcuve, Geneviève P, Dilshad H Khan, and James R Davie. 2012. "Roles of Histone Deacetylases in Epigenetic Regulation: Emerging Paradigms from Studies with Inhibitors." *Clinical Epigenetics* 4 (1): 5.
- Delgosaie, Neda, Xiaojing Tang, Evgeny D Kanshin, Elizabeth C Williams, Adam D Rudner, Pierre Thibault, Mike Tyers, and Alain Verreault. 2014. "Regulation of the Histone Deacetylase Hst3 by Cyclin-Dependent Kinases and the Ubiquitin Ligase SCFCdc4." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13186–96.
- Denoth Lippuner, Annina, Thomas Julou, and Yves Barral. 2014. "Budding Yeast as a Model Organism to Study the Effects of Age." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (2). The Oxford University Press: 300–325.
- Deponte, Marcel. 2013. "Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5). Elsevier B.V.: 3217–66.
- Deponte, Marcel, and Christopher Horst Lillig. 2015. "Enzymatic Control of Cysteinyll Thiol Switches in Proteins." *Biological Chemistry* 396 (5): 401–13.
- Derbyshire, M K, K G Weinstock, and J N Strathern. 1996. "HST1, a New Member of the SIR2 Family of Genes." *Yeast (Chichester, England)* 12 (7): 631–40.
- DeRisi, J L, V R Iyer, and P O Brown. 1997. "Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5338): 680–86.
- Dewar, James M, and David Lydall. 2012. "Similarities and Differences between 'Uncapped' Telomeres and DNA Double-Strand Breaks." *Chromosoma* 121 (2): 117–30.
- Di Simplicio, P, E Lupis, and R Rossi. 1996. "Different Mechanisms of Formation of Glutathione-Protein Mixed Disulfides of Diamide and Tert-Butyl Hydroperoxide in Rat Blood." *Biochimica et Biophysica Acta* 1289 (2): 252–60.
- Dillon, Niall. 2004. "Heterochromatin Structure and Function." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 96 (8): 631–37.
- Dinkova-Kostova, Albena T, W David Holtzclaw, and Nobunao Wakabayashi. 2005. "Keap1, the Sensor for Electrophiles and Oxidants That Regulates the Phase 2 Response, Is a Zinc Metalloprotein." *Biochemistry* 44 (18): 6889–99.
- Dizdaroglu, Miral, Pawel Jaruga, Mustafa Birincioglu, and Henry Rodriguez. 2002. "Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement." *Free Radical Biology and Medicine* 32 (11): 1102–15.
- Dooley, Colette T., Timothy M. Dore, George T. Hanson, W. Coyt Jackson, S. James Remington, and Roger Y. Tsien. 2004. "Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators." *Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22284–93.
- Dringen, Ralf, Maria Brandmann, Michaela C. Hohnholt, and Eva Maria Blumrich. 2015. "Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes." *Neurochemical Research* 40 (12). Springer US: 2570–82.
- Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95.
- Dutnall, Robert N., and Lorraine Pillus. 2001. "Deciphering NAD-Dependent Deacetylases." *Cell* 105 (2): 161–64.

-E-

- Easlon, Erin, Felicia Tsang, Craig Skinner, Chen Wang, and Su-Ju Lin. 2008. "The Malate-Aspartate NADH Shuttle Components Are Novel Metabolic Longevity Regulators Required for Calorie Restriction-Mediated Life Span Extension in Yeast." *Genes & Development* 22 (7): 931–44.

- Eckers, Elisabeth, Melanie Bien, Vincent Stroobant, Johannes M Herrmann, and Marcel Deponte. 2009. "Biochemical Characterization of Dithiol Glutaredoxin 8 from *Saccharomyces Cerevisiae*: The Catalytic Redox Mechanism Redux." *Biochemistry* 48 (6): 1410–23.
- Edenberg, Ellen R, Ajay A Vashisht, Benjamin R Topacio, James A Wohlschlegel, and David P Toczyski. 2014. "Hst3 Is Turned over by a Replication Stress-Responsive SCF(Cdc4) Phospho-Degron." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16): 5962–67.
- Ehrentraut, Stefan, Markus Hassler, Mariano Oppikofer, Stephanie Kueng, Jan M Weber, Jonathan W Mueller, Susan M Gasser, Andreas G Ladurner, and Ann E Ehrenhofer-Murray. 2011. "Structural Basis for the Role of the Sir3 AAA+ Domain in Silencing: Interaction with Sir4 and Unmethylated Histone H3K79." *Genes & Development* 25 (17): 1835–46.
- Engqvist-Goldstein, Asa E Y, and David G Drubin. 2003. "Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (January): 287–332.
- Enoksson, Mari, Aristi Potamitou Fernandes, Stefanie Prast, Christopher Horst Lillig, Arne Holmgren, and Sten Orrenius. 2005. "Overexpression of Glutaredoxin 2 Attenuates Apoptosis by Preventing Cytochrome c Release." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 (3): 774–79.
- Erjavec, Nika, and Thomas Nyström. 2007. "Sir2p-Dependent Protein Segregation Gives Rise to a Superior Reactive Oxygen Species Management in the Progeny of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26): 10877–81.
- Esterbauer, H, R J Schaur, and H Zollner. 1991. "Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes." *Free Radical Biology & Medicine* 11 (1): 81–128.
- Eto, K, Y Tsubamoto, Y Terauchi, T Sugiyama, T Kishimoto, N Takahashi, N Yamauchi, et al. 1999. "Role of NADH Shuttle System in Glucose-Induced Activation of Mitochondrial Metabolism and Insulin Secretion." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5404): 981–85.

-F-

- Fabrizio, P, Lee-Loung Liou, Vanessa N Moy, Alberto Diaspro, Joan Selverstone Valentine, Edith Butler Gralla, and Valter D Longo. 2003. "SOD2 Functions Downstream of Sch9 to Extend Longevity in Yeast." *Genetics* 163 (1): 35–46.
- Fabrizio, P, F Pozza, S D Pletcher, C M Gendron, and V D Longo. 2001. "Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast." *Science (New York, N.Y.)* 292 (5515): 288–90.
- Fabrizio, Paola, Luisa Battistella, Raffaello Vardavas, Cristina Gattazzo, Lee-Loung Liou, Alberto Diaspro, Janis W Dossen, Edith Butler Gralla, and Valter D Longo. 2004. "Superoxide Is a Mediator of an Altruistic Aging Program in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Cell Biology* 166 (7): 1055–67.
- Fabrizio, Paola, Cristina Gattazzo, Luisa Battistella, Min Wei, Chao Cheng, Kristen McGrew, and Valter D Longo. 2005. "Sir2 Blocks Extreme Life-Span Extension." *Cell* 123 (4): 655–67.
- Fabrizio, Paola, and Valter D Longo. 2003. "The Chronological Life Span of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Aging Cell* 2 (2): 73–81.
- Fahey, Robert C. 2001. "Novel Thiols of Prokaryotes." *Annual Review of Microbiology* 55: 333–56.
- Fairbanks, G, T L Steck, and D F Wallach. 1971. "Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane." *Biochemistry* 10 (13): 2606–17.
- Farah, Michelle E, and David C Amberg. 2007. "Conserved Actin Cysteine Residues Are Oxidative Stress Sensors That Can Regulate Cell Death in Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 18 (4): 1359–65.
- Farrugia, Gianluca, and Rena Balzan. 2012. "Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast." *Frontiers in Oncology* 2. Frontiers Media SA: 64.
- Fernandes, Aristi Potamitou, Malin Fladvad, Carsten Berndt, Cecilia Andrésen, Christopher Horst Lillig, Peter Neubauer, Maria Sunnerhagen, Arne Holmgren, and Alexios Vlamis-Gardikas. 2005. "A Novel Monothiol Glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia Coli* Can Serve as a Substrate for Thioredoxin Reductase." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24544–52.

- Fernandes, Aristi Potamitou, and Arne Holmgren. 2004. "Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far beyond a Simple Thioredoxin Backup System." *Antioxidants & Redox Signaling* 6 (1): 63–74.
- Filipits, M, M M Simon, W Rapatz, B Hamilton, and H Ruis. 1993. "A *Saccharomyces Cerevisiae* Upstream Activating Sequence Mediates Induction of Peroxisome Proliferation by Fatty Acids." *Gene* 132 (1): 49–55.
- Finkel, Toren. 2003. "Oxidant Signals and Oxidative Stress." *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2): 247–54.
- Finnin, M S, J R Donigian, A Cohen, V M Richon, R A Rifkind, P A Marks, R Breslow, and N P Pavletich. 1999. "Structures of a Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors." *Nature* 401 (6749): 188–93.
- Finnin, M S, J R Donigian, and N P Pavletich. 2001. "Structure of the Histone Deacetylase SIRT2." *Nature Structural Biology* 8 (7): 621–25.
- Fischer-Nielsen, A, I B Jeding, and S Loft. 1994. "Radiation-Induced Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Its Prevention by Scavengers." *Carcinogenesis* 15 (8): 1609–12.
- Fish, Wayne W. 1988. *Metallbiochemistry Part A. Methods in Enzymology*. Vol. 158. Methods in Enzymology. Elsevier. doi:10.1016/0076-6879(88)58067-9.
- Foloppe, N, J Sagemark, K Nordstrand, K D Berndt, and L Nilsson. 2001. "Structure, Dynamics and Electrostatics of the Active Site of Glutaredoxin 3 from *Escherichia Coli*: Comparison with Functionally Related Proteins." *Journal of Molecular Biology* 310 (2): 449–70.
- Fontana, Luigi, Linda Partridge, and Valter D Longo. 2010. "Extending Healthy Life Span—from Yeast to Humans." *Science (New York, N.Y.)* 328 (5976): 321–26.
- Foury, Françoise. 1997. "Human Genetic Diseases : A Cross-Talk between Man and Yeast." *Gene* 195 (1): 1–10.
- Fraaije, Marco W, Hanno P Roubroeks, Wilfred R Hagen, and Wilicm J H Van Berkel. 1996. "Purification and Characterization of an Intracellular Catalase-Peroxidase from *Penicillium Simplicissimum*." *Eur. J. Biochem* 235: 192–98.
- Frye, R A. 2000. "Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (2): 793–98.
- Fu, Xiaoyun, Sean Y. Kassim, William C. Parks, and Jay W. Heinecke. 2001. "Hypochlorous Acid Oxygenates the Cysteine Switch Domain of Pro-Matrilysin (MMP-7): A Mechanism for Matrix Metalloproteinase Activation and Atherosclerotic Plaque Rupture by Myeloperoxidase." *Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 41279–87.
- G-
- Gallego, Carme, Eloi Gari, Neus Colomina, Enrique Herrero, E Gari, and M Aldea. 1997. "The Cln3 Cyclin Is down-Regulated by Translational Repression and Degradation during the G1 Arrest Caused by Nitrogen Deprivation in Budding Yeast." *The EMBO Journal* 16 (0261-4189; 23): 7196–7206.
- Gallo, Christopher M, Daniel L Smith, and Jeffrey S Smith. 2004. "Nicotinamide Clearance by Pnc1 Directly Regulates Sir2-Mediated Silencing and Longevity." *Molecular and Cellular Biology* 24 (3): 1301–12.
- Gallogly, Molly M, and John J Mieyal. 2007. "Mechanisms of Reversible Protein Glutathionylation in Redox Signaling and Oxidative Stress." *Current Opinion in Pharmacology* 7 (4): 381–91.
- Gallogly, Molly M, David W Starke, and John J Mieyal. 2009. "Mechanistic and Kinetic Details of Catalysis of Thiol-Disulfide Exchange by Glutaredoxins and Potential Mechanisms of Regulation." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (5): 1059–81.
- Gamero-Sandemetrio, Esther, Rocío Gómez-Pastor, and Emilia Matallana. 2013. "Zymogram Profiling of Superoxide Dismutase and Catalase Activities Allows *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Species Differentiation and Correlates to Their Fermentation Performance." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10): 4563–76.
- Gan, Z R. 1991. "Yeast Thioredoxin Genes." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (3): 1692–96.
- Gan, Zhong-Ru, Mohinder K. Sardana, John W. Jacobs, and Mark A Polokoff. 1990. "Yeast thioltransferase—The Active Site Cysteines Display Differential Reactivity." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 282 (1): 110–15.

- Ganley, Austen R D, Satoru Ide, Kimiko Saka, and Takehiko Kobayashi. 2009. "The Effect of Replication Initiation on Gene Amplification in the rDNA and Its Relationship to Aging." *Molecular Cell* 35 (5): 683–93.
- Ganley, Austen R D, and Takehiko Kobayashi. 2014. "Ribosomal DNA and Cellular Senescence: New Evidence Supporting the Connection between rDNA and Aging." *FEMS Yeast Research* 14 (1): 49–59.
- Gao, Xing-Huang, Mirko Zaffagnini, Mariette Bedhomme, Laure Michelet, Corinne Cassier-Chauvat, Paulette Decottignies, and Stéphane D Lemaire. 2010. "Biochemical Characterization of Glutaredoxins from *Chlamydomonas Reinhardtii*: Kinetics and Specificity in Deglutathionylation Reactions." *FEBS Letters* 584 (11): 2242–48.
- Garrido, Ester Ocón, and Chris M Grant. 2002. "Role of Thioredoxins in the Response of *Saccharomyces Cerevisiae* to Oxidative Stress Induced by Hydroperoxides." *Molecular Microbiology* 43 (4): 993–1003.
- Gazy, Inbal, and Martin Kupiec. 2013. "Genomic Instability and Repair Mediated by Common Repeated Sequences." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (49): 19664–65.
- Ghezzi, P. 2005. "Regulation of Protein Function by Glutathionylation." *Free Radic Res* 39 (6): 573–80.
- Ghezzi, Pietro. 2013. "Protein Glutathionylation in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830 (5). Elsevier B.V.: 3165–72.
- Ghezzi, Pietro, Brie Romines, Maddalena Fratelli, Ivano Eberini, Elisabetta Gianazza, Simona Casagrande, Teresa Laragione, Manuela Mengozzi, Leonore A Herzenberg, and Leonard A Herzenberg. 2002. "Protein Glutathionylation: Coupling and Uncoupling of Glutathione to Protein Thiol Groups in Lymphocytes under Oxidative Stress and HIV Infection." *Molecular Immunology* 38 (10): 773–80.
- Ghislain, Michel, Emmanuel Talla, and Jean M François. 2002. "Identification and Functional Analysis of the *Saccharomyces Cerevisiae* Nicotinamidase Gene, PNC1." *Yeast (Chichester, England)* 19 (3): 215–24. doi:10.1002/yea.810.
- Giblin, William, Mary E Skinner, and David B Lombard. 2014. "Sirtuins: Guardians of Mammalian Healthspan." *Trends in Genetics : TIG* 30 (7): 271–86.
- Gietz, R D, and A Sugino. 1988. "New Yeast-*Escherichia Coli* Shuttle Vectors Constructed with in Vitro Mutagenized Yeast Genes Lacking Six-Base Pair Restriction Sites." *Gene* 74 (2): 527–34.
- Giot, L, J S Bader, C Brouwer, A Chaudhuri, B Kuang, Y Li, Y L Hao, et al. 2003. "A Protein Interaction Map of *Drosophila Melanogaster*." *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1727–36.
- Go, Young-Mi, and Dean P Jones. 2008. "Redox Compartmentalization in Eukaryotic Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1780 (11): 1273–90.
- Go, Young-Mi, and Dean P Jones. 2013. *Thiol/disulfide Redox States in Signaling and Sensing. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 48.
- Goldberg, Alexander A, Simon D Bourque, Pavlo Kyryakov, Christopher Gregg, Tatiana Boukhviner, Adam Beach, Michelle T Burstein, et al. 2009. "Effect of Calorie Restriction on the Metabolic History of Chronologically Aging Yeast." *Experimental Gerontology* 44 (9): 555–71.
- Goldstein, Alan L., and John H. McCusker. 1999. "Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast* 15 (14): 1541–53. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K.
- Gostner, Johanna M, Kathrin Becker, Dietmar Fuchs, and Robert Sucher. 2013. "Redox Regulation of the Immune Response." *Redox Report : Communications in Free Radical Research* 18 (3): 88–94.
- Gotta, M, T Laroche, A Formenton, L Maillet, H Scherthan, and S M Gasser. 1996. "The Clustering of Telomeres and Colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 Proteins in Wild-Type *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Cell Biology* 134 (6): 1349–63.
- Gotta, M, S Strahl-Bolsinger, H Renauld, T Laroche, B K Kennedy, M Grunstein, and S M Gasser. 1997. "Localization of Sir2p: The Nucleolus as a Compartment for Silent Information Regulators." *The EMBO Journal* 16 (11): 3243–55.

- Gottlieb, Shoshanna, and Rochelle Easton Esposito. 1989. "A New Role for a Yeast Transcriptional Silencer Gene, SIR2, in Regulation of Recombination in Ribosomal DNA." *Cell* 56 (5): 771–76.
- Gottschling, D E, O M Aparicio, B L Billington, and V A Zakian. 1990. "Position Effect at S. Cerevisiae Telomeres: Reversible Repression of Pol II Transcription." *Cell* 63 (4): 751–62.
- Gralla, E. B., and J. S. Valentine. 1991. "Null Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* Cu,Zn Superoxide Dismutase: Characterization and Spontaneous Mutation Rates." *Journal of Bacteriology* 173 (18): 5918–20.
- Grant, C M, S Luikenhuis, A Beckhouse, M Soderbergh, and I W Dawes. 2000. "Differential Regulation of Glutaredoxin Gene Expression in Response to Stress Conditions in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta* 1490 (1-2): 33–42.
- Grant, C M, F H Maclver, and I W Dawes. 1996. "Glutathione Is an Essential Metabolite Required for Resistance to Oxidative Stress in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Current Genetics* 29 (6): 511–15.
- Grant, Chris M, Kathryn A Quinn, and Ian W Dawes. 1999. "Differential Protein S-Thiolation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Isoenzymes Influences Sensitivity to Oxidative Stress." *Molecular And Cellular Biology* 19 (4): 2650–56.
- Grant, Chris M., Sandra Luikenhuis, Anthony Beckhouse, Malin Soderbergh, and Ian W. Dawes. 2000. "Differential Regulation of Glutaredoxin Gene Expression in Response to Stress Conditions in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1490 (1-2): 33–42.
- Greetham, Darren, Jill Vickerstaff, Daniel Shenton, Gabriel G Perrone, Ian W Dawes, and Chris M Grant. 2010. "Thioredoxins Function as Deglutathionylase Enzymes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *BMC Biochemistry* 11 (January): 3.
- Gregoretti, Ivan V, Yun-Mi Lee, and Holly V Goodson. 2004. "Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis." *Journal of Molecular Biology* 338 (1): 17–31.
- Greiss, Sebastian, and Anton Gartner. 2009. "Sirtuin/Sir2 Phylogeny, Evolutionary Considerations and Structural Conservation." *Molecules and Cells* 28 (5): 407–15.
- Grewal, Shiv I S, and Songtao Jia. 2007. "Heterochromatin Revisited." *Nature Reviews. Genetics* 8 (1): 35–46.
- Griffith, J D, L Comeau, S Rosenfield, R M Stansel, A Bianchi, H Moss, and T de Lange. 1999. "Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop." *Cell* 97 (4): 503–14.
- Grunstein, Michael. 1998. "Yeast Heterochromatin: Regulation of Its Assembly and Inheritance by Histones." *Cell* 93 (3): 325–28.
- Guarente, Leonard, and Frédéric Picard. 2005. "Calorie Restriction--the SIR2 Connection." *Cell* 120 (4): 473–82.
- Guo, Zhenhua, Aleksandra B Adomas, Erin D Jackson, Hong Qin, and Jeffrey P Townsend. 2011. "SIR2 and Other Genes Are Abundantly Expressed in Long-Lived Natural Segregants for Replicative Aging of the Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Yeast Research* 11 (4): 345–55.

-H-

- Ha, Cheol Woong, and Won-Ki Huh. 2011. "The Implication of Sir2 in Replicative Aging and Senescence in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Aging (Albany, NY. Online)* 3 (3): 319–24.
- Ha, Cheol Woong, Min-Kyung Sung, and Won-Ki Huh. 2012. "Nsi1 Plays a Significant Role in the Silencing of Ribosomal DNA in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nucleic Acids Research* 40 (11): 4892–4903.
- Haber, James E. 2012a. "Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 191 (1): 33–64.
- Haber, James E. 2012b. "Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 191 (1): 33–64.
- Hachinohe, Mayumi, Fumio Hanaoka, and Hiroshi Masumoto. 2011. "Hst3 and Hst4 Histone Deacetylases Regulate Replicative Lifespan by Preventing Genome Instability in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 16 (4): 467–77.
- Haigis, Marcia C, Raul Mostoslavsky, Kevin M Haigis, Kamau Fahie, Danos C Christodoulou,

- Andrew J Murphy, David M Valenzuela, et al. 2006. "SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic Beta Cells." *Cell* 126 (5): 941–54.
- Haigis, Marcia C. and Yankner, Bruce a. 2010. "The Aging Response." *NIH Public Access* 40 (2): 333–44.
- Hamann, Michael, Tiequan Zhang, Suzanne Hendrich, and James A Thomas. 2002. "Quantitation of Protein Sulfinic and Sulfonic Acid, Irreversibly Oxidized Protein Cysteine Sites in Cellular Proteins." *Methods in Enzymology* 348 (January): 146–56.
- Hannan, Abdul, Neethu Maria Abraham, Siddharth Goyal, Imlitoshi Jamir, U Deva Priyakumar, and Krishnaveni Mishra. 2015. "Sumoylation of Sir2 Differentially Regulates Transcriptional Silencing in Yeast." *Nucleic Acids Research* 43 (21): 10213–26.
- Hansen, Jeffrey C. 2002. "Conformational Dynamics of the Chromatin Fiber in Solution: Determinants, Mechanisms, and Functions." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31 (January): 361–92.
- Hanson, George T., Robert Aggeler, Devin Oglesbee, Mark Cannon, Roderick A. Capaldi, Roger Y. Tsien, and S. James Remington. 2004. "Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators." *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 13044–53.
- Harman, D. 1956. "Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry." *Journal of Gerontology* 11 (3): 298–300.
- Harman, D. 1981. "The Aging Process." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (11): 7124–28.
- Harrison, David E, Randy Strong, Zelton Dave Sharp, James F Nelson, Clinton M Astle, Kevin Flurkey, Nancy L Nadon, et al. 2009. "Rapamycin Fed Late in Life Extends Lifespan in Genetically Heterogeneous Mice." *Nature* 460 (7253): 392–95.
- Hartig, Andreas, and Helmut Ruis. 1986. "Nucleotide Sequence of the *Saccharomyces Cerevisiae* CTT1 Gene and Deduced Amino-Acid Sequence of Yeast Catalase T." *European Journal of Biochemistry* 160 (3): 487–90.
- Hashimoto, Mika, Takahiro Sibata, Hiroaki Wasada, Shinya Toyokuni, and Koji Uchida. 2003. "Structural Basis of Protein-Bound Endogenous Aldehydes: Chemical and Immunochemical Characterizations of Configurational Isomers of a 4-Hydroxy-2-Nonenal-Histidine Adduct." *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 5044–51.
- Haunhorst, Petra, Carsten Berndt, Susanne Eitner, José R Godoy, and Christopher Horst Lillig. 2010. "Characterization of the Human Monothiol Glutaredoxin 3 (PICOT) as Iron-Sulfur Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (2): 372–76.
- Haunhorst, Petra, Eva-Maria Hanschmann, Lars Bräutigam, Oliver Stehling, Bastian Hoffmann, Ulrich Mühlenthoff, Roland Lill, Carsten Berndt, and Christopher Horst Lillig. 2013. "Crucial Function of Vertebrate Glutaredoxin 3 (PICOT) in Iron Homeostasis and Hemoglobin Maturation." *Molecular Biology of the Cell* 24 (12): 1895–1903.
- Hecht, A, T Laroche, S Strahl-Bolsinger, S M Gasser, and M Grunstein. 1995. "Histone H3 and H4 N-Termini Interact with SIR3 and SIR4 Proteins: A Molecular Model for the Formation of Heterochromatin in Yeast." *Cell* 80 (4): 583–92.
- Hecht, A, S Strahl-Bolsinger, and M Grunstein. 1996. "Spreading of Transcriptional Repressor SIR3 from Telomeric Heterochromatin." *Nature* 383 (6595): 92–96.
- Hediger, Florence, Frank R Neumann, Griet Van Houwe, Karine Dubrana, and Susan M Gasser. 2002. "Live Imaging of Telomeres: γ Ku and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast." *Current Biology : CB* 12 (24): 2076–89.
- Herker, Eva, Helmut Jungwirth, Katharina A Lehmann, Corinna Maldener, Kai-Uwe Fröhlich, Silke Wissing, Sabrina Büttner, Markus Fehr, Stephan Sigrist, and Frank Madeo. 2004. "Chronological Aging Leads to Apoptosis in Yeast." *The Journal of Cell Biology* 164 (4): 501–7.
- Herrero, E, and M a de la Torre-Ruiz. 2007. "Monothiol Glutaredoxins: A Common Domain for Multiple Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 64 (12): 1518–30.
- Herrero, Enrique, Gemma Bellí, and Celia Casas. 2010. "Structural and Functional Diversity of Glutaredoxins in Yeast." *Current Protein & Peptide Science* 11 (8): 659–68.
- Herrero, Enrique, and Joaquim Ros. 2002. "Glutaredoxins and Oxidative Stress Defense in Yeast." *Methods in Enzymology* 348 (January): 136–46.
- Herrero, Enrique, Joaquim Ros, Gemma Bellí, and Elisa Cabiscol. 2008. "Redox Control and

- Oxidative Stress in Yeast Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780 (11): 1217–35.
- Hickman, Meleah A, and Laura N Rusche. 2007. "Substitution as a Mechanism for Genetic Robustness: The Duplicated Deacetylases Hst1p and Sir2p in *Saccharomyces Cerevisiae*." *PLoS Genetics* 3 (8): e126.
- Higuchi, Ryo, Jason D Vevea, Theresa C Swayne, Robert Chojnowski, Vanessa Hill, Istvan R Boldogh, and Liza A Pon. 2013. "Actin Dynamics Affect Mitochondrial Quality Control and Aging in Budding Yeast." *Current Biology : CB* 23 (23): 2417–22.
- Hiltunen, J Kalervo, Anu M Mursula, Hanspeter Rottensteiner, Rik K Wierenga, Alexander J Kastaniotis, and Aner Gurvitz. 2003. "The Biochemistry of Peroxisomal Beta-Oxidation in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Microbiology Reviews* 27 (1): 35–64.
- Hjalmarsson, K, S L Marklund, A Engström, and T Edlund. 1987. "Isolation and Sequence of Complementary DNA Encoding Human Extracellular Superoxide Dismutase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (18): 6340–44.
- Hohmann, Stefan, Marcus Krantz, and Bodil Nordlander. 2007. "Yeast Osmoregulation." *Methods in Enzymology* 428 (January): 29–45.
- Höhn, Annika, Tobias Jung, and Tilman Grune. 2014. "Pathophysiological Importance of Aggregated Damaged Proteins." *Free Radical Biology and Medicine* 71. Elsevier: 70–89.
- Holmgren, A. 1968. "Thioredoxin. 6. The Amino Acid Sequence of the Protein from *Escherichia Coli* B." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 6 (4): 475–84.
- Holmgren, A. 1976. "Hydrogen Donor System for *Escherichia Coli* Ribonucleoside-Diphosphate Reductase Dependent upon Glutathione." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (7): 2275–79.
- Holmgren, A. 1979. "Glutathione-Dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides. Purification and Characterization of Thioredoxin from *Escherichia Coli*." *The Journal of Biological Chemistry* 254 (9): 3664–71.
- Holmgren, A. 1989. "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (24): 13963–66.
- Holmgren, Arne. 1995. "Thioredoxin Structure and Mechanism: Conformational Changes on Oxidation of the Active-Site Sulfhydryls to a Disulfide." *Structure* 3 (3): 239–43.
- Holt, Liam J, Brian B Tuch, Judit Villén, Alexander D Johnson, Steven P Gygi, and David O Morgan. 2009. "Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5948): 1682–86.
- Hoppe, G. J., J. C. Tanny, A. D. Rudner, S. A. Gerber, S. Danaie, S. P. Gygi, and D. Moazed. 2002. "Steps in Assembly of Silent Chromatin in Yeast: Sir3-Independent Binding of a Sir2/Sir4 Complex to Silencers and Role for Sir2-Dependent Deacetylation." *Molecular and Cellular Biology* 22 (12): 4167–80.
- Hoppe, Georg J, Jason C Tanny, Adam D Rudner, Scott A Gerber, Sherwin Danaie, Steven P Gygi, and Danesh Moazed. 2002. "Steps in Assembly of Silent Chromatin in Yeast: Sir3-Independent Binding of a Sir2/Sir4 Complex to Silencers and Role for Sir2-Dependent Deacetylation." *Molecular and Cellular Biology* 22 (12): 4167–80.
- Hoppe, George, Yuh Cherng Chai, John W. Crabb, and Jonathan Sears. 2004. "Protein S-Glutathionylation in Retinal Pigment Epithelium Converts Heat Shock Protein 70 to an Active Chaperone." *Experimental Eye Research* 78 (6): 1085–92.
- Horowitz, H, P Thorburn, and J E Haber. 1984. "Rearrangements of Highly Polymorphic Regions near Telomeres of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 4 (11): 2509–17.
- Hörtner, H, G Ammerer, E Hartter, B Hamilton, J Rytka, T Bilinski, and H Ruis. 1982. "Regulation of Synthesis of Catalases and Iso-1-Cytochrome c in *Saccharomyces Cerevisiae* by Glucose, Oxygen and Heme." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 128 (1): 179–84.
- Hoshi, T, and S Heinemann. 2001. "Regulation of Cell Function by Methionine Oxidation and Reduction." *The Journal of Physiology* 531 (Pt 1): 1–11.
- Howitz, Konrad T, Kevin J Bitterman, Haim Y Cohen, Dudley W Lamming, Siva Lavu, Jason G Wood, Robert E Zipkin, et al. 2003. "Small Molecule Activators of Sirtuins Extend *Saccharomyces Cerevisiae* Lifespan." *Nature* 425 (6954): 191–96.
- Hsu, Hao-Chi, Chia-Lin Wang, Mingzhu Wang, Na Yang, Zhi Chen, Rolf Sternglanz, and Rui-Ming Xu. 2013. "Structural Basis for Allosteric Stimulation of Sir2 Activity by Sir4 Binding." *Genes & Development* 27 (1): 64–73.

- Huang, Julie, Ilana L Brito, Judit Villén, Steven P Gygi, Angelika Amon, and Danesh Moazed. 2006. "Inhibition of Homologous Recombination by a Cohesin-Associated Clamp Complex Recruited to the rDNA Recombination Enhancer." *Genes & Development* 20 (20): 2887–2901.
- Huang, Julie, and Danesh Moazed. 2003b. "Association of the RENT Complex with Nontranscribed and Coding Regions of rDNA and a Regional Requirement for the Replication Fork Block Protein Fob1 in rDNA Silencing." *Genes & Development* 17 (17): 2162–76.
- Huang, Zhishan, John T Pinto, Haiteng Deng, and John P Richie. 2008. "Inhibition of Caspase-3 Activity and Activation by Protein Glutathionylation." *Biochemical Pharmacology* 75 (11): 2234–44.
- Hudson, Devin A, Shawn A Gannon, and Colin Thorpe. 2015. "Oxidative Protein Folding: From Thiol-Disulfide Exchange Reactions to the Redox Poise of the Endoplasmic Reticulum." *Free Radical Biology & Medicine* 80 (March): 171–82.
- Huh, Won-Ki, James V Falvo, Luke C Gerke, Adam S Carroll, Russell W Howson, Jonathan S Weissman, and Erin K O'Shea. 2003. "Global Analysis of Protein Localization in Budding Yeast." *Nature* 425 (6959): 686–91.
- Hwang, Jae-Woong, Hongwei Yao, Samuel Caito, Isaac K Sundar, and Irfan Rahman. 2013. "Redox Regulation of SIRT1 in Inflammation and Cellular Senescence." *Free Radical Biology & Medicine* 61C (March). Elsevier: 95–110.
- Hwang, Jae-woong, Hongwei Yao, Samuel Caito, Isaac K Sundar, and Irfan Rahman. 2013. "Redox Regulation of SIRT1 in Inflammation and Cellular Senescence." *Free Radical Biology & Medicine* 61 (August): 95–110.
- I-
- Ilbert, Marianne, Janina Horst, Sebastian Ahrens, Jeannette Winter, Paul C F Graf, Hauke Lilie, and Ursula Jakob. 2007. "The Redox-Switch Domain of Hsp33 Functions as Dual Stress Sensor." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (6): 556–63.
- Imai, S, C M Armstrong, M Kaeberlein, and L Guarente. 2000. "Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 Is an NAD-Dependent Histone Deacetylase." *Nature* 403 (6771): 795–800.
- Imai, S, and J Yoshino. 2013. "The Importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the Systemic Regulation of Metabolism and Ageing." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 15 Suppl 3 (September): 26–33.
- Irazusta, Verónica, Elisa Cabiscol, Gemma Reverter-Branchat, Joaquim Ros, and Jordi Tamarit. 2006. "Manganese Is the Link between Frataxin and Iron-Sulfur Deficiency in the Yeast Model of Friedreich Ataxia." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12227–32.
- Irene, Carmela, James F Theis, David Gresham, Patricia Soteropoulos, and Carol S Newlon. 2016. "Hst3p, a Histone Deacetylase, Promotes Maintenance of Saccharomyces Cerevisiae Chromosome III Lacking Efficient Replication Origins." *Molecular Genetics and Genomics* : MGG 291 (1): 271–83.
- Isakov, N, S Witte, and A Altman. 2000. "PICOT-HD: A Highly Conserved Protein Domain That Is Often Associated with Thioredoxin and Glutaredoxin Modules." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (11): 537–39.
- Ito, T, K Tashiro, S Muta, R Ozawa, T Chiba, M Nishizawa, K Yamamoto, S Kuhara, and Y Sakaki. 2000. "Toward a Protein-Protein Interaction Map of the Budding Yeast: A Comprehensive System to Examine Two-Hybrid Interactions in All Possible Combinations between the Yeast Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3): 1143–47.
- Ivy, J M, A J Klar, and J B Hicks. 1986. "Cloning and Characterization of Four SIR Genes of Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular and Cellular Biology* 6 (2): 688–702.
- Iwema, Thomas, Antoine Picciocchi, Daouda A K Traore, Jean-Luc Ferrer, Franck Chauvat, and Lilian Jacquamet. 2009. "Structural Basis for Delivery of the Intact [Fe2S2] Cluster by Monothiol Glutaredoxin." *Biochemistry* 48 (26): 6041–43.
- Izawa, S, Y Inoue, and A Kimura. 1996. "Importance of Catalase in the Adaptive Response to Hydrogen Peroxide: Analysis of Acatalasaemic Saccharomyces Cerevisiae." *The Biochemical Journal* 320 (Pt 1): 61–67.

- Izawa, S, K Maeda, K Sugiyama, J Mano, Y Inoue, and A Kimura. 1999. "Thioredoxin Deficiency Causes the Constitutive Activation of Yap1, an AP-1-like Transcription Factor in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28459–65.
- Izquierdo, Alicia, Celia Casas, Ulrich Mühlenhoff, Christopher Horst Lillig, and Enrique Herrero. 2008. "Saccharomyces Cerevisiae Grx6 and Grx7 Are Monothiol Glutaredoxins Associated with the Early Secretory Pathway." *Eukaryotic Cell* 7 (8): 1415–26.

-J-

- Jackson, Michael D, Manning T Schmidt, Norman J Oppenheimer, and John M Denu. 2003. "Mechanism of Nicotinamide Inhibition and Transglycosidation by Sir2 Histone/protein Deacetylases." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 50985–98.
- Jakob, U, M Eser, and J C Bardwell. 2000. "Redox Switch of hsp33 Has a Novel Zinc-Binding Motif." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (49): 38302–10.
- Jakubowski, W, T Biliński, and G Bartosz. 2000. "Oxidative Stress during Aging of Stationary Cultures of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Free Radical Biology & Medicine* 28 (5): 659–64.
- Janke, Carsten, Maria M. Magiera, Nicole Rathfelder, Christof Taxis, Simone Reber, Hiromi Maekawa, Alexandra Moreno-Borchart, et al. 2004. "A Versatile Toolbox for PCR-Based Tagging of Yeast Genes: New Fluorescent Proteins, More Markers and Promoter Substitution Cassettes." *Yeast* 21 (11): 947–62.
- Jensen, Laran T., Raylene J. Sanchez, Chandra Srinivasan, Joan Selverstone Valentine, and Valeria Cizewski Culotta. 2004. "Mutations in *Saccharomyces Cerevisiae* Iron-Sulfur Cluster Assembly Genes and Oxidative Stress Relevant to Cu,Zn Superoxide Dismutase." *Journal of Biological Chemistry* 279 (29): 29938–43.
- Jeong, Dongtak, Hyeseon Cha, Eunyoung Kim, Misuk Kang, Dong Kwon Yang, Ji Myoung Kim, Pyoung Oh Yoon, et al. 2006. "PICOT Inhibits Cardiac Hypertrophy and Enhances Ventricular Function and Cardiomyocyte Contractility." *Circulation Research* 99 (3): 307–14.
- Jia, Kailiang, Di Chen, and Donald L Riddle. 2004. "The TOR Pathway Interacts with the Insulin Signaling Pathway to Regulate *C. Elegans* Larval Development, Metabolism and Life Span." *Development (Cambridge, England)* 131 (16): 3897–3906.
- Jung, C H, and J A Thomas. 1996. "S-Glutathiolated Hepatocyte Proteins and Insulin Disulfides as Substrates for Reduction by Glutaredoxin, Thioredoxin, Protein Disulfide Isomerase, and Glutathione." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 335 (1): 61–72.
- Jung, Che-Hun, and James A. Thomas. 1996. "S-Glutathiolated Hepatocyte Proteins and Insulin Disulfides as Substrates for Reduction by Glutaredoxin, Thioredoxin, Protein Disulfide Isomerase, and Glutathione." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 335 (1): 61–72.

-K-

- Kaeberlein, M, M McVey, and L Guarente. 1999. "The SIR2/3/4 Complex and SIR2 Alone Promote Longevity in *Saccharomyces Cerevisiae* by Two Different Mechanisms." *Genes & Development* 13 (19): 2570–80.
- Kaeberlein, Matt. 2010. "Lessons on Longevity from Budding Yeast." *Nature* 464 (7288): 513–19.
- Kaeberlein, Matt, Di Hu, Emily O Kerr, Mitsuhiro Tsuchiya, Eric A Westman, Nick Dang, Stanley Fields, and Brian K Kennedy. 2005. "Increased Life Span due to Calorie Restriction in Respiratory-Deficient Yeast." *PLoS Genetics* 1 (5): e69.
- Kaeberlein, Matt, and Pankaj Kapahi. 2009. "Cell Signaling. Aging Is RSKy Business." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5949): 55–56.
- Kaeberlein, Matt, Kathryn T Kirkland, Stanley Fields, and Brian K Kennedy. 2004. "Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast." *PLoS Biology* 2 (9): E296.
- Kaeberlein, Matt, Kathryn Kirkland, Stanley Fields, and Brian Kennedy. 2005. "Genes Determining Yeast Replicative Life Span in a Long-Lived Genetic Background." *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (4): 491–504.
- Kaeberlein, Matt, R Wilson Powers, Kristan K Steffen, Eric A Westman, Di Hu, Nick Dang, Emily O Kerr, Kathryn T Kirkland, Stanley Fields, and Brian K Kennedy. 2005. "Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients." *Science (New York, N.Y.)*

- 310 (5751): 1193–96.
- Kanfi, Yariv, Shoshana Naiman, Gail Amir, Victoria Peshti, Guy Zinman, Liat Nahum, Ziv Bar-Joseph, and Haim Y Cohen. 2012. "The Sirtuin SIRT6 Regulates Lifespan in Male Mice." *Nature* 483 (7388): 218–21. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 218–21.
- Kang, Woo Kyu, Yeong Hyeock Kim, Hyun Ah Kang, Ki-Sun Kwon, and Jeong-Yoon Kim. 2015. "Sir2 Phosphorylation through cAMP-PKA and CK2 Signaling Inhibits the Lifespan Extension Activity of Sir2 in Yeast." *eLife* 4 (January). eLife Sciences Publications Limited: e09709.
- Kang, Woo Kyu, Yeong Hyeock Kim, Byoung-Soo Kim, and Jeong-Yoon Kim. 2014. "Growth Phase-Dependent Roles of Sir2 in Oxidative Stress Resistance and Chronological Lifespan in Yeast." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 52 (8): 652–58.
- Kapahi, Pankaj, Brian M Zid, Tony Harper, Daniel Koslover, Viveca Sapin, and Seymour Benzer. 2004. "Regulation of Lifespan in Drosophila by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway." *Current Biology : CB* 14 (10): 885–90.
- Kato, Michiko, and Su-Ju Lin. 2014. "Regulation of NAD⁺ Metabolism, Signaling and Compartmentalization in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *DNA Repair* 23 (November): 49–58.
- Kato, Natsumi, Satoru Motohashi, Takuya Okada, Tomoko Ozawa, and Keisuke Mashima. 2008. "PICOT, Protein Kinase C Theta-Interacting Protein, Is a Novel Regulator of FcepsilonRI-Mediated Mast Cell Activation." *Cellular Immunology* 251 (1): 62–67.
- Kemp, Melissa, Young-Mi Go, and Dean P Jones. 2008. "Nonequilibrium Thermodynamics of Thiol/disulfide Redox Systems: A Perspective on Redox Systems Biology." *Free Radical Biology & Medicine* 44 (6): 921–37.
- Kennedy, B K, M Gotta, D A Sinclair, K Mills, D S McNabb, M Murthy, S M Pak, T Laroche, S M Gasser, and L Guarente. 1997. "Redistribution of Silencing Proteins from Telomeres to the Nucleolus Is Associated with Extension of Life Span in *S. Cerevisiae*." *Cell* 89 (3): 381–91.
- Kettenhofen, Nicholas J, and Matthew J Wood. 2010. "Formation, Reactivity, and Detection of Protein Sulfenic Acids." *Chemical Research in Toxicology* 23 (11): 1633–46.
- Kim, Geumsoo, Stephen J Weiss, and Rodney L Levine. 2014. "Methionine Oxidation and Reduction in Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2): 901–5.
- Kim, Hwa-Young, and Vadim N Gladyshev. 2007. "Methionine Sulfoxide Reductases: Selenoprotein Forms and Roles in Antioxidant Protein Repair in Mammals." *The Biochemical Journal* 407 (3). Portland Press Limited: 321–29.
- Kim, Seung Jun, Joo Rang Woo, Young Sun Hwang, Dae Gwin Jeong, Dong Hae Shin, Kanghwa Kim, and Seong Eon Ryu. 2003. "The Tetrameric Structure of Haemophilus Influenza Hybrid Prx5 Reveals Interactions between Electron Donor and Acceptor Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (12): 10790–98.
- Klar, A J, S Fogel, and K Macleod. 1979. "MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in SACCCHAROMYCES CEREVISIAE." *Genetics* 93 (1): 37–50.
- Klatt, P., E. P. Molina, and S. Lamas. 1999. "Nitric Oxide Inhibits c-Jun DNA Binding by Specifically Targeted S-Glutathionylation." *Journal of Biological Chemistry* 274 (22): 15857–64.
- Klotz, Lars-Oliver, Cristina Sánchez-Ramos, Ignacio Prieto-Arroyo, Pavel Urbánek, Holger Steinbrenner, and Maria Monsalve. 2015. "Redox Regulation of FoxO Transcription Factors." *Redox Biology* 6. Elsevier: 51–72.
- Klotz, M G, G R Klassen, and P C Loewen. 1997. "Phylogenetic Relationships among Prokaryotic and Eukaryotic Catalases." *Molecular Biology and Evolution* 14 (9): 951–58.
- Knorre, Dmitry A, Irina A Kulemzina, Maxim I Sorokin, Sergey A Kochmak, Natalya A Bocharova, Sviatoslav S Sokolov, and Fedor F Severin. 2010. "Sir2-Dependent Daughter-to-Mother Transport of the Damaged Proteins in Yeast Is Required to Prevent High Stress Sensitivity of the Daughters." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (22): 4501–5.
- Kobayashi, Takehiko. 2006. "Strategies to Maintain the Stability of the Ribosomal RNA Gene Repeats--Collaboration of Recombination, Cohesion, and Condensation." *Genes & Genetic Systems* 81 (3): 155–61.
- Kobayashi, Takehiko. 2008. "A New Role of the rDNA and Nucleolus in the Nucleus--rDNA Instability Maintains Genome Integrity." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 30 (3): 267–72.
- Kobayashi, Takehiko. 2011. "Regulation of Ribosomal RNA Gene Copy Number and Its Role in Modulating Genome Integrity and Evolutionary Adaptability in Yeast." *Cellular and*

- Molecular Life Sciences : CMLS* 68 (8): 1395–1403.
- Kobayashi, Takehiko, and Austen R D Ganley. 2005. "Recombination Regulation by Transcription-Induced Cohesin Dissociation in rDNA Repeats." *Science (New York, N.Y.)* 309 (5740): 1581–84.
- Kobayashi, Takehiko, Takashi Horiuchi, Prasad Tongaonkar, Loan Vu, and Masayasu Nomura. 2004. "SIR2 Regulates Recombination between Different rDNA Repeats, but Not Recombination within Individual rDNA Genes in Yeast." *Cell* 117 (4): 441–53.
- Koc, Ahmet, Christopher K Mathews, Linda J Wheeler, Michael K Gross, and Gary F Merrill. 2006. "Thioredoxin Is Required for Deoxyribonucleotide Pool Maintenance during S Phase." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (22): 15058–63.
- Kornberg, Michael D, Nilkantha Sen, Makoto R Hara, Krishna R Juluri, Judy Van K Nguyen, Adele M Snowman, Lindsey Law, Lynda D Hester, and Solomon H Snyder. 2010. "GAPDH Mediates Nitrosylation of Nuclear Proteins." *Nature Cell Biology* 12 (11). Nature Publishing Group: 1094–1100.
- Kosower, Nechama S., and Edward M. Kosower. 1995. "Diamide: An Oxidant Probe for Thiols." In *Methods in Enzymology*, 251:123–33. Methods in Enzymology. Elsevier.
- Kueng, Stephanie, Mariano Oppikofer, and Susan M Gasser. 2013. "SIR Proteins and the Assembly of Silent Chromatin in Budding Yeast." *Annual Review of Genetics* 47 (18): 275–306.
- Kuge, S, and N Jones. 1994. "YAP1 Dependent Activation of TRX2 Is Essential for the Response of Saccharomyces Cerevisiae to Oxidative Stress by Hydroperoxides." *The EMBO Journal* 13 (3): 655–64.
- Kumánovics, Attila, Opal S Chen, Liangtao Li, Dustin Bagley, Erika M Adkins, Huilan Lin, Nin N Dingra, et al. 2008. "Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (16): 10276–86.
- Kupiec, Martin. 2014. "Biology of Telomeres: Lessons from Budding Yeast." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (2): 144–71.
- Kupis, Wioleta, Jan Palyga, Ewa Tomal, and Ewa Niewiadomska. 2016. "The Role of Sirtuins in Cellular Homeostasis." *Journal of Physiology and Biochemistry*.
- Kwon, Jaeyul, Seung-Rock Lee, Kap-Seok Yang, Younghee Ahn, Yeun Ju Kim, Earl R Stadtman, and Sue Goo Rhee. 2004. "Reversible Oxidation and Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN in Cells Stimulated with Peptide Growth Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16419–24.
- L-
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85.
- Lamming, Dudley W, Magda Latorre-Esteves, Oliver Medvedik, Stacy N Wong, Felicia a Tsang, Chen Wang, Su-Ju Lin, and David a Sinclair. 2005. "HST2 Mediates SIR2-Independent Life-Span Extension by Calorie Restriction." *Science (New York, N.Y.)* 309 (5742): 1861–64.
- Lamming, Dudley W, Jason G Wood, and David A Sinclair. 2004. "Small Molecules That Regulate Lifespan: Evidence for Xenohormesis." *Molecular Microbiology* 53 (4): 1003–9.
- Lamming, Dudley W, Lan Ye, Pekka Katajisto, Marcus D Goncalves, Maki Saitoh, Deanna M Stevens, James G Davis, et al. 2012. "Rapamycin-Induced Insulin Resistance Is Mediated by mTORC2 Loss and Uncoupled from Longevity." *Science (New York, N.Y.)* 335 (6076): 1638–43.
- Laroche, T, S G Martin, M Tsai-Pflugfelder, and S M Gasser. 2000. "The Dynamics of Yeast Telomeres and Silencing Proteins through the Cell Cycle." *Journal of Structural Biology* 129 (2-3): 159–74.
- Laroche, Thierry, Sophie G. Martin, Monica Gotta, Hazel C. Gorham, Fiona E. Pryde, Edward J. Louis, and Susan M. Gasser. 1998. "Mutation of Yeast Ku Genes Disrupts the Subnuclear Organization of Telomeres." *Current Biology* 8 (11): 653–57.
- Laurent, C Torvard, Moore E Colleen, and Reichard Peter. 1964. "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides." *The Journal of Biological Chemistry* 239 (10): 3436–44.
- Lawson, Michael, Urszula Uciechowska, Jörg Schemies, Tobias Rumpf, Manfred Jung, and Wolfgang Sippl. 2010. "Inhibitors to Understand Molecular Mechanisms of NAD(+)-

- Dependent Deacetylases (sirtuins)." *Biochimica et Biophysica Acta* 1799 (10-12): 726–39.
- Le Moan, Natacha, Gilles Clement, Sophie Le Maout, Frédérique Tacnet, and Michel B Toledano. 2006. "The Saccharomyces Cerevisiae Proteome of Oxidized Protein Thiols: Contrasted Functions for the Thioredoxin and Glutathione Pathways." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (15): 10420–30.
- Lee, Cheng-Sheng, and James E Haber. 2015. "Mating-Type Gene Switching in Saccharomyces Cerevisiae." *Microbiology Spectrum* 3 (2): MDNA3–0013 – 2014.
- Lee, J, C Godon, G Lagniel, D Spector, J Garin, J Labarre, and M B Toledano. 1999. "Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (23): 16040–46.
- Lee, Ji Chul, Melissa J. Straffon, Tae Yong Jang, Vincent J. Higgins, Chris M. Grant, and Ian W. Dawes. 2001. "The Essential and Ancillary Role of Glutathione in Saccharomyces Cerevisiae Analysed Using a Grande gsh1 Disruptant Strain." *FEMS Yeast Research* 1 (1): 57–65.
- Lee, Samuel, Soo Min Kim, and Richard T Lee. 2013. "Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance." *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (10): 1165–1207.
- Lemaire, Stéphane D. 2004. "The Glutaredoxin Family in Oxygenic Photosynthetic Organisms." *Photosynthesis Research* 79 (3): 305–18.
- Lenfant, F, R K Mann, B Thomsen, X Ling, and M Grunstein. 1996. "All Four Core Histone N-Termini Contain Sequences Required for the Repression of Basal Transcription in Yeast." *The EMBO Journal* 15 (15): 3974–85.
- Levine, R L, J Moskovitz, and E R Stadtman. "Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation." *IUBMB Life* 50 (4-5): 301–7.
- Li, Haoran, Daphne T Mapolelo, Nin N Dingra, Greg Keller, Pamela J Riggs-Gelasco, Dennis R Winge, Michael K Johnson, and Caryn E Outten. 2011. "Histidine 103 in Fra2 Is an Iron-Sulfur Cluster Ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 Complex and Is Required for in Vivo Iron Signaling in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (1): 867–76.
- Li, Haoran, Daphne T Mapolelo, Nin N Dingra, Sunil G Naik, Nicholas S Lees, Brian M Hoffman, Pamela J Riggs-Gelasco, Boi Hanh Huynh, Michael K Johnson, and Caryn E Outten. 2009. "The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteinylyl and Histidyl Ligation." *Biochemistry* 48 (40): 9569–81.
- Li, Mingguang, Brian J Petteys, Julie M McClure, Veena Valsakumar, Stefan Bekiranov, Elizabeth L Frank, and Jeffrey S Smith. 2010. "Thiamine Biosynthesis in Saccharomyces Cerevisiae Is Regulated by the NAD⁺-Dependent Histone Deacetylase Hst1." *Molecular and Cellular Biology* 30 (13): 3329–41.
- Li, Mingguang, Veena Valsakumar, Kunal Poorey, Stefan Bekiranov, and Jeffrey S Smith. 2013. "Genome-Wide Analysis of Functional Sirtuin Chromatin Targets in Yeast." *Genome Biology* 14 (5): R48.
- Li, Wei-Fang, Jiang Yu, Xiao-Xiao Ma, Yan-Bin Teng, Ming Luo, Ya-Jun Tang, and Cong-Zhao Zhou. 2010. "Structural Basis for the Different Activities of Yeast Grx1 and Grx2." *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (7): 1542–47.
- Li, Yun, and Patricia Camacho. 2004. "Ca²⁺-Dependent Redox Modulation of SERCA 2b by ERp57." *The Journal of Cell Biology* 164 (1): 35–46.
- Li, Z S, Y P Lu, R G Zhen, M Szczypka, D J Thiele, and P A Rea. 1997. "A New Pathway for Vacuolar Cadmium Sequestration in Saccharomyces Cerevisiae: YCF1-Catalyzed Transport of Bis(glutathionato)cadmium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1): 42–47.
- Lill, Roland, Bastian Hoffmann, Sabine Molik, Antonio J Pierik, Nicole Rietzschel, Oliver Stehling, Marta A Uzarska, Holger Webert, Claudia Wilbrecht, and Ulrich Mühlenhoff. 2012. "The Role of Mitochondria in Cellular Iron-Sulfur Protein Biogenesis and Iron Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (9): 1491–1508.
- Lill, Roland, Vasundara Srinivasan, and Ulrich Mühlenhoff. 2014. "The Role of Mitochondria in Cytosolic-Nuclear Iron-sulfur Protein Biogenesis and in Cellular Iron Regulation." *Current Opinion in Microbiology* 22 (December): 111–19.
- Lillig, C H, A Prior, J D Schwenn, F Aslund, D Ritz, A Vlamis-Gardikas, and A Holmgren. 1999. "New Thioredoxins and Glutaredoxins as Electron Donors of 3'-Phosphoadenylylsulfate Reductase." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7695–98.

- Lillig, Christopher Horst, Carsten Berndt, and Arne Holmgren. 2008. "Glutaredoxin Systems." *Biochimica et Biophysica Acta* 1780 (11): 1304–17.
- Lillig, Christopher Horst, Carsten Berndt, Olivia Vergnolle, Maria Elisabet Lönn, Christoph Hudemann, Eckhard Bill, and Arne Holmgren. 2005. "Characterization of Human Glutaredoxin 2 as Iron-Sulfur Protein: A Possible Role as Redox Sensor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23): 8168–73.
- Lin, Su-Ju, Ethan Ford, Marcia Haigis, Greg Liszt, and Leonard Guarente. 2004. "Calorie Restriction Extends Yeast Life Span by Lowering the Level of NADH." *Genes & Development* 18 (1): 12–16.
- Lin, Su-Ju, and Leonard Guarente. 2003. "Nicotinamide Adenine Dinucleotide, a Metabolic Regulator of Transcription, Longevity and Disease." *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2): 241–46.
- Lin, Su-Ju, Matt Kaerberlein, Alex A Andalis, Lori A Sturtz, Pierre-Antoine Defossez, Valeria C Culotta, Gerald R Fink, and Leonard Guarente. 2002. "Calorie Restriction Extends Saccharomyces Cerevisiae Lifespan by Increasing Respiration." *Nature* 418 (6895): 344–48.
- Linke, Christian, Edda Klipp, Hans Lehrach, Matteo Barberis, and Sylvia Krobitsch. 2013. "Fkh1 and Fkh2 Associate with Sir2 to Control CLB2 Transcription under Normal and Oxidative Stress Conditions." *Frontiers in Physiology* 4 (July): 173.
- Liochev, Stefan I, and Irwin Fridovich. 1999. "Superoxide and Iron: Partners in Crime." *IUBMB Life* 48 (2): 157–61.
- Liou, Gunn-Guang, Jason C Tanny, Ryan G Kruger, Thomas Walz, and Danesh Moazed. 2005. "Assembly of the SIR Complex and Its Regulation by O-Acetyl-ADP-Ribose, a Product of NAD-Dependent Histone Deacetylation." *Cell* 121 (4). Elsevier: 515–27.
- Liu, Beidong, Lisa Larsson, Antonio Caballero, Xinxin Hao, David Oling, Julie Grantham, and Thomas Nyström. 2010. "The Polarisome Is Required for Segregation and Retrograde Transport of Protein Aggregates." *Cell* 140 (2): 257–67.
- Liu, Gang, Yongwei Wang, Gregory J Anderson, Clara Camaschella, Yanzhong Chang, and Guangjun Nie. 2016. "Functional Analysis of GLRX5 Mutants Reveals Distinct Functionalities of GLRX5 Protein." *Journal of Cellular Biochemistry* 117 (1): 207–17.
- Liu, Honglei, Hong Wang, Swapna Shenvi, Tory M Hagen, and Rui-Ming Liu. 2004. "Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019 (June): 346–49.
- Liu, Xiaobin, Jamieson Jann, Christy Xavier, and Hongli Wu. 2015. "Glutaredoxin 1 (Grx1) Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells From Oxidative Damage by Preventing AKT Glutathionylation." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (5): 2821–32.
- Lledias, F, and W Hansberg. 2000. "Catalase Modification as a Marker for Singlet Oxygen." *Methods in Enzymology* 319 (January): 110–19.
- Llorente, B, and B Dujon. 2000. "Transcriptional Regulation of the Saccharomyces Cerevisiae DAL5 Gene Family and Identification of the High Affinity Nicotinic Acid Permease TNA1 (YGR260w)." *FEBS Letters* 475 (3): 237–41.
- Lock, Jeffrey T, William G Sinkins, and William P Schilling. 2011. "Effect of Protein S-Glutathionylation on Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Aortic Endothelial Cells." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (2): H493–506.
- Long, E O, and I B Dawid. 1980. "Repeated Genes in Eukaryotes." *Annual Review of Biochemistry* 49 (January): 727–64.
- Longo, V D, E. B. Gralla, and J S Valentine. 1996. "Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in Saccharomyces Cerevisiae. Mitochondrial Production of Toxic Oxygen Species in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (21): 12275–80.
- Longo, V D, L L Liou, J S Valentine, and E B Gralla. 1999. "Mitochondrial Superoxide Decreases Yeast Survival in Stationary Phase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365 (1): 131–42.
- Longo, Valter D, Gerald S Shadel, Matt Kaerberlein, and Brian Kennedy. 2012. "Replicative and Chronological Aging in Saccharomyces Cerevisiae." *Cell Metabolism* 16 (1): 18–31.
- Lönn, Maria Elisabet, Christoph Hudemann, Carsten Berndt, Valeria Cherkasov, Francisco Capani, Arne Holmgren, and Christopher Horst Lillig. 2008. "Expression Pattern of Human Glutaredoxin 2 Isoforms: Identification and Characterization of Two Testis/cancer Cell-Specific Isoforms." *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (3): 547–57.
- López-Mirabal, H. Reynaldo, and Jakob R. Winther. 2008. "Redox Characteristics of the

- Eukaryotic Cytosol." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1783 (4): 629–40.
- Lord, P G, and A E Wheals. 1980. "Asymmetrical Division of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 142 (3): 808–18.
- Lovell, Mark a, Sony Soman, and Melissa a Bradley. 2011. "Oxidatively Modified Nucleic Acids in Preclinical Alzheimer's Disease (PCAD) Brain." *Mechanisms of Ageing and Development* 132 (8-9). Elsevier Ireland Ltd: 443–48.
- Lu, Shu-Ping, and Su-Ju Lin. 2010. "Regulation of Yeast Sirtuins by NAD(+) Metabolism and Calorie Restriction." *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (8). Elsevier B.V.: 1567–75.
- Luger, K, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent, and T J Richmond. 1997. "Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution." *Nature* 389 (6648): 251–60.
- Luikenhuis, S, G Perrone, I W Dawes, and C M Grant. 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): 1081–91.
- Luk, Edward, Mei Yang, Laran T. Jensen, Yves Bourbonnais, and Valeria Cizewski Culotta. 2005. "Manganese Activation of Superoxide Dismutase 2 in the Mitochondria of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 22715–20.
- Lundberg, M, C Johansson, J Chandra, M Enoksson, G Jacobsson, J Ljung, M Johansson, and A Holmgren. 2001. "Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (28): 26269–75.
- Luo, Ming, Yong-Liang Jiang, Xiao-Xiao Ma, Ya-Jun Tang, Yong-Xing He, Jiang Yu, Rong-Guang Zhang, Yuxing Chen, and Cong-Zhao Zhou. 2010. "Structural and Biochemical Characterization of Yeast Monothiol Glutaredoxin Grx6." *Journal of Molecular Biology* 398 (4): 614–22.
- Lynch, M, and H Kuramitsu. 2000. "Expression and Role of Superoxide Dismutases (SOD) in Pathogenic Bacteria." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2 (10): 1245–55.
- M-
- Maillet, L, C Boscheron, M Gotta, S Marcand, E Gilson, and S M Gasser. 1996. "Evidence for Silencing Compartments within the Yeast Nucleus: A Role for Telomere Proximity and Sir Protein Concentration in Silencer-Mediated Repression." *Genes & Development* 10 (14): 1796–1811.
- Malyavko, Alexander N, Yuliya Y Parfenova, Maria I Zvereva, and Olga A Dontsova. 2014. "Telomere Length Regulation in Budding Yeasts." *FEBS Letters* 588 (15): 2530–36.
- Manalo, Dominador J, Zheng Lin, and Alice Y-C Liu. 2002. "Redox-Dependent Regulation of the Conformation and Function of Human Heat Shock Factor 1." *Biochemistry* 41 (8): 2580–88.
- Mandal, Amit Kumar, Murali Woodi, Varun Sood, Patnam Rajagopalan Krishnaswamy, Anjali Rao, Sudarshan Ballal, and Padmanabhan Balaram. 2007. "Quantitation and Characterization of Glutathionyl Haemoglobin as an Oxidative Stress Marker in Chronic Renal Failure by Mass Spectrometry." *Clinical Biochemistry* 40 (13-14): 986–94.
- Marmorstein, R. 2004. "Structure and Chemistry of the Sir2 Family of NAD+-Dependent Histone/protein Deacetylases." *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt 6): 904–9.
- Martin, Jennifer L. 1995. "Thioredoxin — a Fold for All Reasons." *Structure* 3 (3): 245–50.
- Martínez-Pastor, M T, G Marchler, C Schüller, A Marchler-Bauer, H Ruis, and F Estruch. 1996. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Zinc Finger Proteins Msn2p and Msn4p Are Required for Transcriptional Induction through the Stress Response Element (STRE)." *The EMBO Journal* 15 (9): 2227–35.
- Martínez-ruiz, Antonio, and Santiago Lamas. 2007. "Signalling by NO-Induced Protein S-Nitrosylation and S-Glutathionylation : Convergences and Divergences" 75: 220–28.
- Maté, M J, M Zamocky, L M Nykyri, C Herzog, P M Alzari, C Betzel, F Koller, and I Fita. 1999. "Structure of Catalase-A from *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Molecular Biology* 286 (1): 135–49.
- McClure, Julie M, Margaret B Wierman, Nazif Maqani, and Jeffrey S Smith. 2012. "Isonicotinamide Enhances Sir2 Protein-Mediated Silencing and Longevity in Yeast by Raising Intracellular NAD+ Concentration." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 20957–66.

- McCord, Ron, Michael Pierce, Jianxin Xie, Sandeep Wonkatal, Carolyn Mickel, and Andrew K Vershon. 2003. "Rfm1, a Novel Tethering Factor Required to Recruit the Hst1 Histone Deacetylase for Repression of Middle Sporulation Genes." *Molecular and Cellular Biology* 23 (6): 2009–16.
- Mead, Janet, Ron McCord, Laura Youngster, Mandakini Sharma, Marc R Gartenberg, and Andrew K Vershon. 2007. "Swapping the Gene-Specific and Regional Silencing Specificities of the Hst1 and Sir2 Histone Deacetylases." *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2466–75.
- Medvedik, Oliver, Dudley W Lamming, Keyman D Kim, and David A Sinclair. 2007. "MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces Cerevisiae*." *PLoS Biology* 5 (10): e261.
- Mehdi, K, and M J Penninckx. 1997. "An Important Role for Glutathione and Gamma-Glutamyltranspeptidase in the Supply of Growth Requirements during Nitrogen Starvation of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 6 (1 997): 1885–89.
- Mekhail, Karim, and Danesh Moazed. 2010. "The Nuclear Envelope in Genome Organization, Expression and Stability." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (5): 317–28.
- Mekhail, Karim, Jan Seebacher, Steven P Gygi, and Danesh Moazed. 2008. "Role for Perinuclear Chromosome Tethering in Maintenance of Genome Stability." *Nature* 456 (7222): 667–70.
- Merksamer, Philip I, Yufei Liu, Wenjuan He, Matthew D Hirschey, Danica Chen, and Eric Verdin. 2013. "The Sirtuins, Oxidative Stress and Aging: An Emerging Link." *Aging* 5 (3): 144–50.
- Merry, Troy L, Glenn D Wadley, Christos G Stathis, Andrew P Garnham, Stephen Rattigan, Mark Hargreaves, and Glenn K McConell. 2010. "N-Acetylcysteine Infusion Does Not Affect Glucose Disposal during Prolonged Moderate-Intensity Exercise in Humans." *The Journal of Physiology* 588 (Pt 9): 1623–34.
- Mesecke, Nikola, Sarah Mittler, Elisabeth Eckers, Johannes M Herrmann, and Marcel Deponte. 2008. "Two Novel Monothiol Glutaredoxins from *Saccharomyces Cerevisiae* Provide Further Insight into Iron-Sulfur Cluster Binding, Oligomerization, and Enzymatic Activity of Glutaredoxins." *Biochemistry* 47 (5): 1452–63.
- Mesecke, Nikola, Anne Spang, Marcel Deponte, and Johannes M Herrmann. 2008. "A Novel Group of Glutaredoxins in the Cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance." *Molecular Biology of the Cell* 19 (6): 2673–80.
- Mesquita, Ana, Martin Weinberger, Alexandra Silva, Belém Sampaio-Marques, Bruno Almeida, Cecília Leão, Vítor Costa, Fernando Rodrigues, William C Burhans, and Paula Ludovico. 2010. "Caloric Restriction or Catalase Inactivation Extends Yeast Chronological Lifespan by Inducing H₂O₂ and Superoxide Dismutase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (34): 15123–28.
- Mieyal, John J., and P. Boon Chock. 2012. "Posttranslational Modification of Cysteine in Redox Signaling and Oxidative Stress: Focus on S-Glutathionylation." *Antioxidants & Redox Signaling* 16 (6): 471–75.
- Mieyal, John J., David W. Starke, Stephen A. Gravina, Chantal Dothey, and James S. Chung. 1991. "Thioltransferase in Human Red Blood Cells: Purification and Properties." *Biochemistry* 30 (25). American Chemical Society: 6088–97.
- Miller-Fleming, Leonor, Flaviano Giorgini, and Tiago F Outeiro. 2008. "Yeast as a Model for Studying Human Neurodegenerative Disorders." *Biotechnology Journal* 3 (3): 325–38.
- Milne, Jill C, and John M Denu. 2008. "The Sirtuin Family: Therapeutic Targets to Treat Diseases of Aging." *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (1): 11–17.
- Min, J, J Landry, R Sternglanz, and R M Xu. 2001. "Crystal Structure of a SIR2 Homolog-NAD Complex." *Cell* 105 (2): 269–79.
- Minor, Robin K, Joseph A Baur, Ana P Gomes, Theresa M Ward, Anna Csiszar, Evi M Mercken, Kotb Abdelmohsen, et al. 2011. "SRT1720 Improves Survival and Healthspan of Obese Mice." *Scientific Reports* 1 (January). Nature Publishing Group: 70.
- Mirisola, Mario G, and Valter D Longo. 2012. "Acetic Acid and Acidification Accelerate Chronological and Replicative Aging in Yeast." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (19): 3532–33.
- Miseta, Attila, and Peter Csutora. 2000. "Relationship between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms." *Molecular Biology and Evolution* 17 (8): 1232–39.
- Mishra, K, and D Shore. 1999. "Yeast Ku Protein Plays a Direct Role in Telomeric Silencing and

- Counteracts Inhibition by Rif Proteins." *Current Biology : CB* 9 (19): 1123–26.
- Mishra, Mithilesh, Junqi Huang, and Mohan K Balasubramanian. 2014. "The Yeast Actin Cytoskeleton." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (2). The Oxford University Press: 213–27.
- Mitsumori, Risa, Tomoe Ohashi, Kazuto Kugou, Ayako Ichino, Kei Taniguchi, Kunihiro Ohta, Hiroyuki Uchida, and Masaya Oki. 2016. "Analysis of Novel Sir3 Binding Regions in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biochemistry*, March.
- Moazed, D, A Kistler, A Axelrod, J Rine, and A D Johnson. 1997. "Silent Information Regulator Protein Complexes in *Saccharomyces Cerevisiae*: A SIR2/SIR4 Complex and Evidence for a Regulatory Domain in SIR4 That Inhibits Its Interaction with SIR3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2186–91.
- Modig, H. 1968. "Cellular Mixed Disulphides between Thiols and Proteins, and Their Possible Implication for Radiation Protection." *Biochemical Pharmacology* 17 (2): 177–86.
- Molina, María Micaela, Gemma Bellí, María Angeles de la Torre, María Teresa Rodríguez-Manzanegue, and Enrique Herrero. 2004. "Nuclear Monothiol Glutaredoxins of *Saccharomyces Cerevisiae* Can Function as Mitochondrial Glutaredoxins." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 51923–30.
- Molina-Navarro, Maria Micaela, Celia Casas, Lidia Piedrafita, Gemma Bellí, and Enrique Herrero. 2006. "Prokaryotic and Eukaryotic Monothiol Glutaredoxins Are Able to Perform the Functions of Grx5 in the Biogenesis of Fe/S Clusters in Yeast Mitochondria." *FEBS Letters* 580 (9): 2273–80.
- Morano, Kevin A., Chris M. Grant, and W. Scott Moye-Rowley. 2012. "The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 190 (4): 1157–95.
- Moretti, P, K Freeman, L Coodly, and D Shore. 1994. "Evidence That a Complex of SIR Proteins Interacts with the Silencer and Telomere-Binding Protein RAP1." *Genes & Development* 8 (19): 2257–69.
- Moretti, P, and D Shore. 2001. "Multiple Interactions in Sir Protein Recruitment by Rap1p at Silencers and Telomeres in Yeast." *Molecular and Cellular Biology* 21 (23): 8082–94.
- Morgan, Michael J, and Zheng-gang Liu. 2011. "Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF- κ B Signaling." *Cell Research* 21 (1). Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences: 103–15.
- Moseley, James B, and Bruce L Goode. 2006. "The Yeast Actin Cytoskeleton: From Cellular Function to Biochemical Mechanism." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 70 (3): 605–45.
- Moskovitz, Jackob. 2005. "Methionine Sulfoxide Reductases: Ubiquitous Enzymes Involved in Antioxidant Defense, Protein Regulation, and Prevention of Aging-Associated Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta* 1703 (2): 213–19.
- Motta, Maria Carla, Nullin Divecha, Madeleine Lemieux, Christopher Kamel, Delin Chen, Wei Gu, Yvette Bultsma, Michael McBurney, and Leonard Guarente. 2004. "Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors." *Cell* 116 (4): 551–63.
- Muftuoglu, Meltem, Mateus P. Mori, and Nadja C. de Souza-Pinto. 2014. "Formation and Repair of Oxidative Damage in the Mitochondrial DNA." *Mitochondrion* 17. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society.: 164–81.
- Mühlenhoff, Ulrich, Sabine Molik, José R Godoy, Marta A Uzarska, Nadine Richter, Andreas Seubert, Yan Zhang, et al. 2010. "Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster." *Cell Metabolism* 12 (4): 373–85.
- Muller, E G. 1991. "Thioredoxin Deficiency in Yeast Prolongs S Phase and Shortens the G1 Interval of the Cell Cycle." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (14): 9194–9202.
- Murakami, Christopher, and Matt Kaeberlein. 2009. "Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 27: 3–7.
- Murakami, T, M Nojiri, H Nakayama, M Odaka, M Yohda, N Dohmae, K Takio, T Nagamune, and I Endo. 2000. "Post-Translational Modification Is Essential for Catalytic Activity of Nitrile Hydratase." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 9 (5): 1024–30.
- Murphy, Michael P. 2009. "How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species." *Biochemical Journal* 417 (1): 1–13.
- Murray, Christopher I., and Jennifer E. Van Eyk. 2012. "Chasing Cysteine Oxidative Modifications: Proteomic Tools for Characterizing Cysteine Redox Status." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5 (5): 1–11.

Muscat, Joshua E., Wayne Kleinman, Stephen Colosimo, Allison Muir, Philip Lazarus, Jong Park, and John P. Richie. 2004. "Enhanced Protein Glutathiolation and Oxidative Stress in Cigarette Smokers." *Free Radical Biology and Medicine* 36 (4): 464–70.

-N-

- Nadeau, Philippe J, Steve J Charette, Michel B Toledano, and Jacques Landry. 2007. "Disulfide Bond-Mediated Multimerization of Ask1 and Its Reduction by Thioredoxin-1 Regulate H₂O₂-Induced c-Jun NH₂-Terminal Kinase Activation and Apoptosis." *Molecular Biology of the Cell* 18 (10): 3903–13.
- Nakamoto, Morito, Makoto Hirose, Miho Kawakatsu, Toshiyuki Nakayama, Yoshishige Urata, Kensaku Kamata, Makio Kaminogo, Tao Sheng Li, and Izumi Nagata. 2012. "Serum S-Glutathionylated Proteins as a Potential Biomarker of Carotid Artery Stenosis." *Clinical Biochemistry* 45 (16-17). The Canadian Society of Clinical Chemists: 1331–35.
- Nakamura, Tomohiro, Shu-ichi, Shichun Tu, Mohd Waseem Akhtar, Carmen R. Sunico, and Stuart A. Lipton Okamoto. 2014. "Aberrant Protein S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases." *Neuron* 78 (4): 596–614.
- Nasheuer, Heinz-Peter, Richard Smith, Christina Bauerschmidt, Frank Grosse, and Klaus Weisshart. 2002. "Initiation of Eukaryotic DNA Replication: Regulation and Mechanisms." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72 (January): 41–94.
- Neugebauer, Robert C, Urszula Uchiechowska, Rene Meier, Henning Hruby, Vassil Valkov, Eric Verdin, Wolfgang Sippl, and Manfred Jung. 2008. "Structure-Activity Studies on Splitomicin Derivatives as Sirtuin Inhibitors and Computational Prediction of Binding Mode." *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (5): 1203–13.
- Neuwald, A F, L Aravind, J L Spouge, and E V Koonin. 1999. "AAA+: A Class of Chaperone-like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes." *Genome Research* 9 (1): 27–43.
- Newman, Shelley F, Rukhsana Sultana, Marzia Perluigi, Rafella Coccia, Jian Cai, William M Pierce, Jon B Klein, Delano M Turner, and D Allan Butterfield. 2007. "An Increase in S-Glutathionylated Proteins in the Alzheimer's Disease Inferior Parietal Lobule, a Proteomics Approach." *Journal of Neuroscience Research* 85 (7): 1506–14.
- Niki, Etsuo. 2009. "Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects." *Free Radical Biology and Medicine* 47 (5). Elsevier Inc.: 469–84.
- Niwa, Toshimitsu, Chika Naito, A. H M Mawjood, and Kiyohiro Imai. 2000. "Increased Glutathionyl Hemoglobin in Diabetes Mellitus and Hyperlipidemia Demonstrated by Liquid Chromatography/electrospray Ionization- Mass Spectrometry." *Clinical Chemistry* 46 (1): 82–88.
- Nolin, James D, Jane E Tully, Sidra M Hoffman, Amy S Guala, Jos L van der Velden, Matthew E Poynter, Albert van der Vliet, Vikas Anathy, and Yvonne M W Janssen-Heininger. 2014. "The glutaredoxin/S-Glutathionylation Axis Regulates Interleukin-17A-Induced Proinflammatory Responses in Lung Epithelial Cells in Association with S-Glutathionylation of Nuclear Factor κB Family Proteins." *Free Radical Biology & Medicine* 73 (August): 143–53.
- Nonaka, Kazuki, Noriaki Kume, Yoshishige Urata, Shinji Seto, Takaaki Kohno, Sumihisa Honda, Soji Ikeda, et al. 2007. "Serum Levels of S-Glutathionylated Proteins as a Risk-Marker for Arteriosclerosis Obliterans." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 71 (1): 100–105.
- Nussbaum, Inbal, Esther Weindling, Ritta Jubran, Aviv Cohen, and Shoshana Bar-Nun. 2014. "Deteriorated Stress Response in Stationary-Phase Yeast: Sir2 and Yap1 Are Essential for Hsf1 Activation by Heat Shock and Oxidative Stress, Respectively." *PloS One* 9 (10): e1111505.
- Nyström, Thomas, and Beidong Liu. 2014. "The Mystery of Aging and Rejuvenation—a Budding Topic." *Current Opinion in Microbiology* 18 (April): 61–67.

-O-

Ojeda, Luis, Greg Keller, Ulrich Muhlenhoff, Julian C Rutherford, Roland Lill, and Dennis R Winge. 2006. "Role of Glutaredoxin-3 and Glutaredoxin-4 in the Iron Regulation of the Aft1 Transcriptional Activator in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological*

- Chemistry* 281 (26): 17661–69.
- Okazaki, Shoko, Tsuyoshi Tachibana, Akira Naganuma, Nariyasu Mano, and Shusuke Kuge. 2007. "Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing and Transduction of H₂O₂ Stress Signal." *Molecular Cell* 27 (4): 675–88.
- Oppikofer, Mariano, Stephanie Kueng, Fabrizio Martino, Szabolcs Soeroes, Susan M Hancock, Jason W Chin, Wolfgang Fischle, and Susan M Gasser. 2011. "A Dual Role of H4K16 Acetylation in the Establishment of Yeast Silent Chromatin." *The EMBO Journal* 30 (13): 2610–21.
- Orlandi, Ivan, Maurizio Bettiga, Lilia Alberghina, Thomas Nyström, and Marina Vai. 2010. "Sir2-Dependent Asymmetric Segregation of Damaged Proteins in ubp10 Null Mutants Is Independent of Genomic Silencing." *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 (5): 630–38.
- Orozco, Helena, Emilia Matallana, and Agustín Aranda. 2012. "Wine Yeast Sirtuins and Gcn5p Control Aging and Metabolism in a Natural Growth Medium." *Mechanisms of Ageing and Development* 133 (5): 348–58.
- Outeiro, Tiago Fleming, Eirene Kontopoulou, Stephen M Altmann, Irina Kufareva, Katherine E Strathearn, Allison M Amore, Catherine B Volk, et al. 2007. "Sirtuin 2 Inhibitors Rescue Alpha-Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5837): 516–19.
- Owsianowski, Esther, David Walter, and Birthe Fahrenkrog. 2008. "Negative Regulation of Apoptosis in Yeast." *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (7): 1303–10.

-P-

- Pacholec, Michelle, John E Bleasdale, Boris Chrnyk, David Cunningham, Declan Flynn, Robert S Garofalo, David Griffith, et al. 2010. "SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (11): 8340–51.
- Pagans, Sara, Angelika Pedal, Brian J North, Katrin Kaehlcke, Brett L Marshall, Alexander Dorr, Claudia Hetzer-Egger, et al. 2005. "SIRT1 Regulates HIV Transcription via Tat Deacetylation." *PLoS Biology* 3 (2): e41.
- Pallardó, Federico V, Jelena Markovic, José Luís García, and José Viña. 2009. "Role of Nuclear Glutathione as a Key Regulator of Cell Proliferation." *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1-2): 77–85.
- Pan, Yong, Elizabeth A Schroeder, Alejandro Ocampo, Antoni Barrientos, and Gerald S Shadel. 2011. "Regulation of Yeast Chronological Life Span by TORC1 via Adaptive Mitochondrial ROS Signaling." *Cell Metabolism* 13 (6): 668–78.
- Panozzo, Cristina, Magdalena Nawara, Catherine Suski, Roza Kucharczyka, Marek Skoneczny, Anne Marie Bécam, Joanna Rytka, and Christopher J Herbert. 2002. "Aerobic and Anaerobic NAD⁺ Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEBS Letters* 517 (1-3): 97–102.
- Paravicini, Tamara M., and Rhian M. Touyz. 2006. "Redox Signaling in Hypertension." *Cardiovascular Research* 71 (2): 247–58.
- Passtoors, Willemijn M, Marian Beekman, Joris Deelen, Ruud van der Breggen, Andrea B Maier, Bruno Guigas, Evelyn Derhovanessian, et al. 2013. "Gene Expression Analysis of mTOR Pathway: Association with Human Longevity." *Aging Cell* 12 (1): 24–31.
- Pastore, Anna, Paolo Ciampalini, Giulia Tozzi, Lia Pecorelli, Chiara Passarelli, Enrico Bertini, and Fiorella Piemonte. 2012. "All Glutathione Forms Are Depleted in Blood of Obese and Type 1 Diabetic Children." *Pediatric Diabetes* 13 (3): 272–77.
- Pastore, Anna, Giulia Tozzi, Laura Maria Gaeta, Enrico Bertini, Valentina Serafini, Silvia Di Cesare, Valentina Bonetto, et al. 2003. "Actin Glutathionylation Increases in Fibroblasts of Patients with Friedreich's Ataxia: A Potential Role in the Pathogenesis of the Disease." *Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 42588–95.
- Paulsen, CE, and KS Carrol. 2010. "Orchestrating Redox Signaling Networks Through Regulatory Cysteine Switches." *ACS Chem Biol* 5 (1): 47–62.
- Pedrajas, J R, E Kosmidou, A Miranda-Vizueté, J A Gustafsson, A P Wright, and G Spyrou. 1999. "Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Thioredoxin System in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (10): 6366–73.
- Pedrajas, José R, Pablo Porras, Emilia Martínez-Galisteo, C Alicia Padilla, Antonio Miranda-

- Vizuete, and J Antonio Bárcena. 2002. "Two Isoforms of *Saccharomyces Cerevisiae* Glutaredoxin 2 Are Expressed in Vivo and Localize to Different Subcellular Compartments." *The Biochemical Journal* 364 (Pt 3): 617–23.
- Pekkari, Klas, and Arne Holmgren. 2004. "Truncated Thioredoxin: Physiological Functions and Mechanism." *Antioxidants & Redox Signaling* 6 (1): 53–61.
- Pelicano, Helene, Dennis Carney, and Peng Huang. 2004. "ROS Stress in Cancer Cells and Therapeutic Implications." *Drug Resistance Updates* 7 (2): 97–110.
- Peng, S L, S Fatenejad, and J Craft. 1997. "Scleroderma: A Disease Related to Damaged Proteins?" *Nature Medicine* 3 (3): 276–78.
- Penninckx, Michel J. 2002. "An Overview on Glutathione in *Saccharomyces* versus Non-Conventional Yeasts." *FEMS Yeast Research* 2 (3): 295–305.
- Perrod, S, M M Cockell, T Laroche, H Renauld, A L Ducrest, C Bonnard, and S M Gasser. 2001. "A Cytosolic NAD-Dependent Deacetylase, Hst2p, Can Modulate Nucleolar and Telomeric Silencing in Yeast." *The EMBO Journal* 20 (1-2): 197–209.
- Peskin, Alexander V, Paul E Pace, Jessica B Behring, Louise N Paton, Marjolein Soethoudt, Markus M Bachschmid, and Christine C Winterbourn. 2016. "Glutathionylation of the Active Site Cysteines of Peroxiredoxin 2 and Recycling by Glutaredoxin." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (6): 3053–62.
- Peterson, Craig L, and Marc-André Laniel. 2004. "Histones and Histone Modifications." *Current Biology: CB* 14 (14): R546–51.
- Petes, T D. 1980. "Unequal Meiotic Recombination within Tandem Arrays of Yeast Ribosomal DNA Genes." *Cell* 19 (3): 765–74.
- Pettersen, Eric F, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, and Thomas E Ferrin. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry* 25 (13): 1605–12.
- Pham, Khanh, Rituraj Pal, Ying Qu, Xi Liu, Han Yu, Stephen L Shiao, Xinquan Wang, et al. 2015. "Nuclear Glutaredoxin 3 Is Critical for Protection against Oxidative Stress-Induced Cell Death." *Free Radical Biology & Medicine* 85 (August): 197–206.
- Picard, Frédéric, Martin Kurtev, Namjin Chung, Acharawan Topark-Ngarm, Thanaset Senawong, Rita Machado De Oliveira, Mark Leid, Michael W McBurney, and Leonard Guarente. 2004. "Sirt1 Promotes Fat Mobilization in White Adipocytes by Repressing PPAR-Gamma." *Nature* 429 (6993): 771–76.
- Picciochi, Antoine, Cyril Saguez, Alain Boussac, Corinne Cassier-Chauvat, and Franck Chauvat. 2007. "CGFS-Type Monothiol Glutaredoxins from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and Other Evolutionary Distant Model Organisms Possess a Glutathione-Ligated [2Fe-2S] Cluster." *Biochemistry* 46 (51): 15018–26.
- Piemonte, Fiorella, Stefania Petrini, Laura Maria Gaeta, Giulia Tozzi, Enrico Bertini, Rita Devito, Renata Boldrini, Matilde Marcellini, Enzo Ciacco, and Valerio Nobili. 2008. "Protein Glutathionylation Increases in the Liver of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (8 Pt 2): e457–64.
- Pijnappel, W W, D Schaft, A Roguev, A Shevchenko, H Tekotte, M Wilm, G Rigaut, B Séraphin, R Aasland, and A F Stewart. 2001. "The *S. Cerevisiae* SET3 Complex Includes Two Histone Deacetylases, Hos2 and Hst1, and Is a Meiotic-Specific Repressor of the Sporulation Gene Program." *Genes & Development* 15 (22): 2991–3004.
- Pineda-Molina, E, P Klatt, J Vázquez, a Marina, M de Lacoba, D Pérez-Sala, and S Lamas. 2001. "Glutathionylation of the p50 Subunit of {NFκB}: A Mechanism for Redox Induced Inhibition of DNA Binding." *Biochemistry*. 40: 14134–42.
- Piper, Peter W, Nicholas L Harris, and Morag MacLean. 2006. "Preadaptation to Efficient Respiratory Maintenance Is Essential Both for Maximal Longevity and the Retention of Replicative Potential in Chronologically Ageing Yeast." *Mechanisms of Ageing and Development* 127 (9): 733–40.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, and Aneta Pop. 2015. "The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97. Elsevier Masson SAS: 55–74.
- Poljsak, Borut, Dušan Šuput, and Irina Milisav. 2013. "Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 956792.
- Porrás, Pablo, C Alicia Padilla, Martin Krayl, Wolfgang Voos, and J Antonio Bárcena. 2006. "One

- Single in-Frame AUG Codon Is Responsible for a Diversity of Subcellular Localizations of Glutaredoxin 2 in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16551–62.
- Porter, N A, S E Caldwell, and K A Mills. 1995. "Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids." *Lipids* 30 (4): 277–90.
- Poschke, Heiko, Martina Dees, Michael Chang, Sandeep Amberkar, Lars Kaderali, Rodney Rothstein, and Brian Luke. 2012. "Rif2 Promotes a Telomere Fold-Back Structure through Rpd3L Recruitment in Budding Yeast." *PLoS Genetics* 8 (9): e1002960.
- Powers, R Wilson, Matt Kaerberlein, Seth D Caldwell, Brian K Kennedy, and Stanley Fields. 2006. "Extension of Chronological Life Span in Yeast by Decreased TOR Pathway Signaling." *Genes & Development* 20 (2): 174–84.
- Powis, G, and W R Montfort. 2001. "Properties and Biological Activities of Thioredoxins." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30 (January): 421–55.
- Primavera, Alessandra, Silvia Fustinoni, Antonino Biroccio, Sabrina Ballerini, Andrea Urbani, Sergio Bernardini, Giorgio Federici, Enrico Capucci, Maurizio Manno, and Mario Lo Bello. 2008. "Glutathione Transferases and Glutathionylated Hemoglobin in Workers Exposed to Low Doses of 1,3-Butadiene." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 17 (11): 3004–12.
- Pruyne, David, Aster Legesse-Miller, Lina Gao, Yuqing Dong, and Anthony Bretscher. 2004. "Mechanisms of Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (January): 559–91.
- Pryde, F E, and E J Louis. 1999. "Limitations of Silencing at Native Yeast Telomeres." *The EMBO Journal* 18 (9): 2538–50.
- Puigpinós, Judit, Celia Casas, and Enrique Herrero. 2015. "Altered Intracellular Calcium Homeostasis and Endoplasmic Reticulum Redox State in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Lacking Grx6 Glutaredoxin." *Molecular Biology of the Cell* 26 (1): 104–16.
- Pujol-Carrion, Nuria, Gemma Belli, Enrique Herrero, Antoni Nogues, and Maria Angeles de la Torre-Ruiz. 2006. "Glutaredoxins Grx3 and Grx4 Regulate Nuclear Localisation of Aft1 and the Oxidative Stress Response in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 21): 4554–64.
- Pujol-Carrion, Nuria, and Maria Angeles de la Torre-Ruiz. 2010. "Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces Cerevisiae* Play a Role in Actin Dynamics through Their Trx Domains, Which Contributes to Oxidative Stress Resistance." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (23): 7826–35.
- Q-
- Qu, Jing, Tomohiro Nakamura, Gang Cao, Emily A Holland, Scott R Mckercher, and Stuart A Lipton. 2011. "S-Nitrosylation Activates Cdk5 and Contributes to Synaptic Spine Loss Induced by β -Amyloid Peptide." *Proc Natl Acad Sci USA* 2011: 1–6.
- Qu, Ying, Jinhua Wang, Partha S Ray, Hua Guo, Jian Huang, Miyung Shin-Sim, Bolanle A Bukoye, et al. 2011. "Thioredoxin-like 2 Regulates Human Cancer Cell Growth and Metastasis via Redox Homeostasis and NF- κ B Signaling." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 212–25.
- R-
- Rascón, Brenda, Basil P Hubbard, David A Sinclair, and Gro V Amdam. 2012. "The Lifespan Extension Effects of Resveratrol Are Conserved in the Honey Bee and May Be Driven by a Mechanism Related to Caloric Restriction." *Aging* 4 (7): 499–508.
- Raturi, Arun, and Bulent Mutus. 2007. "Characterization of Redox State and Reductase Activity of Protein Disulfide Isomerase under Different Redox Environments Using a Sensitive Fluorescent Assay." *Free Radical Biology & Medicine* 43 (1): 62–70.
- Raturi, Arun, Carolina Ortiz-Sandoval, and Thomas Simmen. 2014. "Redox Dependence of Endoplasmic Reticulum (ER) Ca²⁺ Signaling." *Histology and Histopathology* 29 (5): 543–52.
- Ravichandran, Veerasamy, Tamas Seres, Toshinori Moriguchi, James A. Thomas, and Richard B. Johnston. 1994. "S-Thiolation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Induced by the Phagocytosis-Associated Respiratory Burst in Blood Monocytes." *Journal of Biological Chemistry* 269 (40): 25010–15.

- Ray, Paul D., Bo Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. 2012. "Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling." *Cellular Signalling* 24 (5). Elsevier Inc.: 981–90.
- Reddie, Khalilah G., and Kate S. Carroll. 2008. "Expanding the Functional Diversity of Proteins through Cysteine Oxidation." *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (6): 746–54.
- Reed, Tanea T. 2011. "Lipid Peroxidation and Neurodegenerative Disease." *Free Radical Biology and Medicine* 51 (7). Elsevier Inc.: 1302–19.
- Renedo, Marta, Javier Gayarre, Carlota A. García-Domínguez, Andrea Pérez-Rodríguez, Alicia Prieto, F. Javier Cañada, José M. Rojas, and Dolores Pérez-Sala. 2007. "Modification and Activation of Ras Proteins by Electrophilic Prostanoids with Different Structure Are Site-Selective." *Biochemistry* 46 (22): 6607–16.
- Reverter-Branchat, Gemma, Elisa Cabiscol, Jordi Tamarit, and Joaquim Ros. 2004. "Oxidative Damage to Specific Proteins in Replicative and Chronological-Aged *Saccharomyces Cerevisiae*: Common Targets and Prevention by Calorie Restriction." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31983–89.
- Reverter-Branchat, Gemma, Elisa Cabiscol, Jordi Tamarit, M Alba Sorolla, M Angeles de la Torre, and Joaquim Ros. 2007. "Chronological and Replicative Life-Span Extension in *Saccharomyces Cerevisiae* by Increased Dosage of Alcohol Dehydrogenase 1." *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 11): 3667–76.
- Riesen, Michèle, and Alan Morgan. 2009. "Calorie Restriction Reduces rDNA Recombination Independently of rDNA Silencing." *Aging Cell* 8 (6): 624–32.
- Rine, J, and I Herskowitz. 1987. "Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression from HML and HMR in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 116 (1): 9–22.
- Rine, J, J N Strathern, J B Hicks, and I Herskowitz. 1979. "A Suppressor of Mating-Type Locus Mutations in *Saccharomyces Cerevisiae*: Evidence for and Identification of Cryptic Mating-Type Loci." *Genetics* 93 (4): 877–901.
- Robida-Stubbs, Stacey, Kira Glover-Cutter, Dudley W Lamming, Masaki Mizunuma, Sri Devi Narasimhan, Elke Neumann-Haefelin, David M Sabatini, and T Keith Blackwell. 2012. "TOR Signaling and Rapamycin Influence Longevity by Regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO." *Cell Metabolism* 15 (5): 713–24.
- Rodgers, Joseph T, Carlos Lerin, Wilhelm Haas, Steven P Gygi, Bruce M Spiegelman, and Pere Puigserver. 2005. "Nutrient Control of Glucose Homeostasis through a Complex of PGC-1alpha and SIRT1." *Nature* 434 (7029): 113–18.
- Rodríguez-Colman, María José, Gemma Reverter-Branchat, M Alba Sorolla, Jordi Tamarit, Joaquim Ros, and Elisa Cabiscol. 2010. "The Forkhead Transcription Factor Hcm1 Promotes Mitochondrial Biogenesis and Stress Resistance in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (47): 37092–101.
- Rodríguez-Colman, María José, M Alba Sorolla, Núria Vall-Llaura, Jordi Tamarit, Joaquim Ros, and Elisa Cabiscol. 2013. "The FOX Transcription Factor Hcm1 Regulates Oxidative Metabolism in Response to Early Nutrient Limitation in Yeast. Role of Snf1 and Tor1/Sch9 Kinases." *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (8): 2004–15.
- Rodríguez-Manzaneque, M T, Joaquim Ros, Elisa Cabiscol, Albert Sorribas, and Enrique Herrero. 1999. "Grx5 Glutaredoxin Plays a Central Role in Protection against Protein Oxidative Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8180–90.
- Rodríguez-Manzaneque, María Teresa, Jordi Tamarit, Gemma Bellí, Joaquim Ros, and Enrique Herrero. 2002. "Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/sulfur Enzymes." *Molecular Biology of the Cell* 13 (4): 1109–21.
- Rogina, Blanka, and Stephen L Helfand. 2004. "Sir2 Mediates Longevity in the Fly through a Pathway Related to Calorie Restriction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 15998–3.
- Roth, George S, Mark A Lane, Donald K Ingram, Julie A Mattison, Dariush Elahi, Jordan D Tobin, Denis Muller, and E Jeffrey Metter. 2002. "Biomarkers of Caloric Restriction May Predict Longevity in Humans." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5582): 811.
- Rouault, Tracey A, and Wing-Hang Tong. 2005. "Iron-Sulphur Cluster Biogenesis and Mitochondrial Iron Homeostasis." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (4): 345–51.
- Rouhier, Nicolas. 2010. "Plant Glutaredoxins: Pivotal Players in Redox Biology and Iron-Sulphur Centre Assembly." *The New Phytologist* 186 (2): 365–72.
- Rouhier, Nicolas, Jérémy Couturier, and Jean-Pierre Jacquot. 2006. "Genome-Wide Analysis of

- Plant Glutaredoxin Systems." *Journal of Experimental Botany* 57 (8): 1685–96.
- Ruault, Myriam, Arnaud De Meyer, Isabelle Loiodice, and Angela Taddei. 2011. "Clustering Heterochromatin: Sir3 Promotes Telomere Clustering Independently of Silencing in Yeast." *The Journal of Cell Biology* 192 (3): 417–31.
- Rusche, Laura N, Ann L Kirchmaier, and Jasper Rine. 2003. "The Establishment, Inheritance, and Function of Silenced Chromatin in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Annual Review of Biochemistry* 72 (January): 481–516.
- Ruthenburg, Alexander J, Haitao Li, Dinshaw J Patel, and C David Allis. 2007. "Multivalent Engagement of Chromatin Modifications by Linked Binding Modules." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 983–94.
- Ryo Higuchi-Sanabria, Jason D. Vevea, Joseph K. Charalel, Maria L. Sapor, Liza A. Pon. 2016. "The Transcriptional Repressor Sum1p Counteracts Sir2p in Regulation of the Actin Cytoskeleton, Mitochondrial Quality Control and Replicative Lifespan in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbial Cell* 3 (2). Shared Science Publishers: 79–88.

-S-

- Salvi, Jayesh S, Janet N Y Chan, Christopher Pettigrew, Tony T Liu, Jane D Wu, and Karim Mekhail. 2013. "Enforcement of a Lifespan-Sustaining Distribution of Sir2 between Telomeres, Mating-Type Loci, and rDNA Repeats by Rif1." *Aging Cell* 12 (1): 67–75.
- Sampathkumar, Rangasamy, Muthuswamy Balasubramanyam, Sadasivannair Sudarshala, Mohan Rema, Viswanathan Mohan, and Padmanabhan Balam. 2005. "Increased Glutathionylated Hemoglobin (HbSSG) in Type 2 Diabetes Subjects with Microangiopathy." *Clinical Biochemistry* 38 (10): 892–99.
- Sandmeier, Joseph J, Ivana Celic, Jef D Boeke, and Jeffrey S Smith. 2002. "Telomeric and rDNA Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae* Are Dependent on a Nuclear NAD(+) Salvage Pathway." *Genetics* 160 (3): 877–89.
- Sasaki, Tsutomu, Bernhard Maier, Katarzyna D Koclega, Maksymilian Chruszcz, Wendy Gluba, P Todd Stukenberg, Wladek Minor, and Heidi Scoble. 2008. "Phosphorylation Regulates SIRT1 Function." *PLoS One* 3 (12): e4020.
- Sauve, A A, I Celic, J Avalos, H Deng, J D Boeke, and V L Schramm. 2001. "Chemistry of Gene Silencing: The Mechanism of NAD+-Dependent Deacetylation Reactions." *Biochemistry* 40 (51): 15456–63.
- Sauve, Anthony A, Robyn D Moir, Vern L Schramm, and Ian M Willis. 2005. "Chemical Activation of Sir2-Dependent Silencing by Relief of Nicotinamide Inhibition." *Molecular Cell* 17 (4): 595–601.
- Sauve, Anthony A, and Vern L Schramm. 2003. "Sir2 Regulation by Nicotinamide Results from Switching between Base Exchange and Deacetylation Chemistry." *Biochemistry* 42 (31): 9249–56.
- Sauve, Anthony A, Cynthia Wolberger, Vern L Schramm, and Jef D Boeke. 2006. "The Biochemistry of Sirtuins." *Annual Review of Biochemistry* 75 (January). Annual Reviews: 435–65.
- Savitsky, Pavel A., and Toren Finkel. 2002. "Redox Regulation of Cdc25C." *Journal of Biological Chemistry* 277 (23): 20535–40.
- Schafer, F Q, and G R Buettner. 2001. "Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/glutathione Couple." *Free Radical Biology & Medicine* 30 (11): 1191–1212.
- Schmidt, Manning T, Brian C Smith, Michael D Jackson, and John M Denu. 2004. "Coenzyme Specificity of Sir2 Protein Deacetylases: Implications for Physiological Regulation." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (38): 40122–29.
- Schott, Daniel, Tim Huffaker, and Anthony Bretscher. 2002. "Microfilaments and Microtubules: The News from Yeast." *Current Opinion in Microbiology* 5 (6): 564–74.
- Schüller, C, J L Brewster, M R Alexander, M C Gustin, and H Ruis. 1994. "The HOG Pathway Controls Osmotic Regulation of Transcription via the Stress Response Element (STRE) of the *Saccharomyces Cerevisiae* CTT1 Gene." *The EMBO Journal* 13 (18): 4382–89.
- Schulz, Tim J, Kim Zarse, Anja Voigt, Nadine Urban, Marc Birringer, and Michael Ristow. 2007. "Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis Elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress." *Cell Metabolism* 6 (4): 280–93.

- Sechi, G, M G Deledda, G Bua, W M Satta, G A Deiana, G M Pes, and G Rosati. 1996. "Reduced Intravenous Glutathione in the Treatment of Early Parkinson's Disease." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 20 (7): 1159–70.
- Selman, Colin, Jennifer M A Tullet, Daniela Wieser, Elaine Irvine, Steven J Lingard, Agharul I Choudhury, Marc Claret, et al. 2009. "Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Signaling Regulates Mammalian Life Span." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5949): 140–44.
- Sevier, Carolyn S, and Chris A Kaiser. 2002. "Formation and Transfer of Disulphide Bonds in Living Cells." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (11): 836–47.
- Sevier, Carolyn S, and Chris A Kaiser. 2008. "Ero1 and Redox Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum." *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (4): 549–56.
- Shahi, Puja, Kailash Gulshan, Anders M Näär, and W Scott Moye-Rowley. 2010. "Differential Roles of Transcriptional Mediator Subunits in Regulation of Multidrug Resistance Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Biology of the Cell* 21 (14): 2469–82.
- Shao, Di, Jessica L Fry, Jingyan Han, Xiuyun Hou, David R Pimentel, Reiko Matsui, Richard A Cohen, and Markus M Bachschmid. 2014. "A Redox-Resistant Sirtuin-1 Mutant Protects against Hepatic Metabolic and Oxidant Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (11): 7293–7306.
- Shenton, Daniel, Gabriel Perrone, Kathryn A Quinn, Ian W Dawes, and Chris M Grant. 2002. "Regulation of Protein S-Thiolation by Glutaredoxin 5 in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16853–59.
- Sherman, J M, E M Stone, L L Freeman-Cook, C B Brachmann, J D Boeke, and L Pillus. 1999. "The Conserved Core of a Human SIR2 Homologue Functions in Yeast Silencing." *Molecular Biology of the Cell* 10 (9): 3045–59.
- Shet, A.S., S.M. Pinto, G. Mitra, and A.K. Mandal. 2012. "Glutathionyl Hemoglobin Is Elevated in Iron Deficiency Anemia." *Acta Haematologica* 127 (1): 26–30.
- Shogren-Knaak, Michael, Haruhiko Ishii, Jian-Min Sun, Michael J Pazin, James R Davie, and Craig L Peterson. 2006. "Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions." *Science (New York, N.Y.)* 311 (5762): 844–47.
- Shou, W, J H Seol, A Shevchenko, C Baskerville, D Moazed, Z W Chen, J Jang, H Charbonneau, and R J Deshaies. 1999. "Exit from Mitosis Is Triggered by Tem1-Dependent Release of the Protein Phosphatase Cdc14 from Nucleolar RENT Complex." *Cell* 97 (2): 233–44.
- Shukla, Varsha, Santosh K. Mishra, and Harish C. Pant. 2011. "Oxidative Stress in Neurodegeneration." *Advances in Pharmacological Sciences* 2011: 1–13.
- Sies, H. 1999. "Glutathione and Its Role in Cellular Functions." *Free Radic Biol Med* 27 (99): 916–21.
- Sinclair, D A, and L Guarente. 1997. "Extrachromosomal rDNA Circles--a Cause of Aging in Yeast." *Cell* 91 (7): 1033–42.
- Sinclair, D, K Mills, and L Guarente. 1998. "Aging in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Annual Review of Microbiology* 52 (January): 533–60.
- Skoneczny, M, and J Rytka. 2000. "Oxygen and Haem Regulate the Synthesis of Peroxisomal Proteins: Catalase A, Acyl-CoA Oxidase and Pex1p in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*; the Regulation of These Proteins by Oxygen Is Not Mediated by Haem." *The Biochemical Journal* 350 Pt 1 (August): 313–19.
- Smith, Brian C, and John M Denu. 2006. "Sir2 Protein Deacetylases: Evidence for Chemical Intermediates and Functions of a Conserved Histidine." *Biochemistry* 45 (1): 272–82.
- Smith, Daniel L, Chonghua Li, Mirela Matecic, Nazif Maqani, Mary Bryk, and Jeffrey S Smith. 2009. "Calorie Restriction Effects on Silencing and Recombination at the Yeast rDNA." *Aging Cell* 8 (6): 633–42.
- Smith, Daniel L., Julie M. McClure, Mirela Matecic, and Jeffrey S. Smith. 2007. "Calorie Restriction Extends the Chronological Lifespan of *Saccharomyces Cerevisiae* Independently of the Sirtuins." *Aging Cell* 6 (5): 649–62.
- Smith, J S, C B Brachmann, I Celic, M A Kenna, S Muhammad, V J Starai, J L Avalos, et al. 2000. "A Phylogenetically Conserved NAD⁺-Dependent Protein Deacetylase Activity in the Sir2 Protein Family." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6658–63.
- Smith, J S, C B Brachmann, L Pillus, and J D Boeke. 1998. "Distribution of a Limited Sir2 Protein Pool Regulates the Strength of Yeast rDNA Silencing and Is Modulated by Sir4p." *Genetics* 149 (3): 1205–19.

- Song, Jia, Qian Yang, Junsheng Yang, Lisa Larsson, Xinxin Hao, Xuefeng Zhu, Sandra Malmgren-Hill, et al. 2014. "Essential Genetic Interactors of SIR2 Required for Spatial Sequestration and Asymmetrical Inheritance of Protein Aggregates." *PLoS Genetics* 10 (7): e1004539.
- Sorolla, M Alba, Clara Nierga, M José Rodríguez-Colman, Gemma Reverter-Branchat, Alicia Arenas, Jordi Tamarit, Joaquim Ros, and Elisa Cabiscol. 2011. "Sir2 Is Induced by Oxidative Stress in a Yeast Model of Huntington Disease and Its Activation Reduces Protein Aggregation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510 (1). Elsevier Inc.: 27–34.
- Sorolla, M Alba, María José Rodríguez-Colman, Núria Vall-Llaura, Jordi Tamarit, Joaquim Ros, and Elisa Cabiscol. 2012. "Protein Oxidation in Huntington Disease." *BioFactors (Oxford, England)* 38 (3): 173–85.
- Spencer, V A, and J R Davie. 1999. "Role of Covalent Modifications of Histones in Regulating Gene Expression." *Gene* 240 (1): 1–12.
- Sporty, Jennifer, Su-Ju Lin, Michiko Kato, Ted Ognibene, Benjamin Stewart, Ken Turteltaub, and Graham Bench. 2009. "Quantitation of NAD⁺ Biosynthesis from the Salvage Pathway in Saccharomyces Cerevisiae." *Yeast (Chichester, England)* 26 (7): 363–69.
- Stadtman, E. R., and R. L. Levine. 2003. "Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins." *Amino Acids* 25 (3-4): 207–18.
- Starke, David W., P. Boon Chock, and John J. Mieyal. 2003. "Glutathione-Thiyl Radical Scavenging and Transferase Properties of Human Glutaredoxin (thioltransferase): Potential Role in Redox Signal Transduction." *Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14607–13.
- Steinkraus, K A, M Kaeberlein, and B K Kennedy. 2008. "Replicative Aging in Yeast: The Means to the End." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24 (January): 29–54.
- Steinman, H M. 1980. "The Amino Acid Sequence of Copper-Zinc Superoxide Dismutase from Bakers' Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 255 (14): 6758–65.
- Stephen, D. W S, and Derek J. Jamieson. 1996. "Glutathione Is an Important Antioxidant Molecule in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae." *FEMS Microbiology Letters* 141 (2-3): 207–12.
- Strahl, B D, and C D Allis. 2000. "The Language of Covalent Histone Modifications." *Nature* 403 (6765): 41–45.
- Strahl-Bolsinger, S, A Hecht, K Luo, and M Grunstein. 1997. "SIR2 and SIR4 Interactions Differ in Core and Extended Telomeric Heterochromatin in Yeast." *Genes & Development* 11 (1): 83–93.
- Straight, A F, W Shou, G J Dowd, C W Turck, R J Deshaies, A D Johnson, and D Moazed. 1999. "Net1, a Sir2-Associated Nucleolar Protein Required for rDNA Silencing and Nucleolar Integrity." *Cell* 97 (2): 245–56.
- Stumpferl, Stefan W, Sue E Brand, James C Jiang, Boguslawa Korona, Anurag Tiwari, Jianliang Dai, Jae-Gu Seo, and S Michal Jazwinski. 2012. "Natural Genetic Variation in Yeast Longevity." *Genome Research* 22 (10): 1963–73.
- Sun, Jingtao, John Molitor, and John Tower. 2004. "Effects of Simultaneous over-Expression of Cu/ZnSOD and MnSOD on Drosophila Melanogaster Life Span." *Mechanisms of Ageing and Development* 125 (5): 341–49.
- Sutton, A, R C Heller, J Landry, J S Choy, A Sirko, and R Sternglanz. 2001. "A Novel Form of Transcriptional Silencing by Sum1-1 Requires Hst1 and the Origin Recognition Complex." *Molecular and Cellular Biology* 21 (10): 3514–22.
- Swaney, Danielle L, Pedro Beltrao, Lea Starita, Ailan Guo, John Rush, Stanley Fields, Nevan J Krogan, and Judit Villén. 2013. "Global Analysis of Phosphorylation and Ubiquitylation Cross-Talk in Protein Degradation." *Nature Methods* 10 (7): 676–82.

-T-

- Taddei, Angela, and Susan M Gasser. 2012. "Structure and Function in the Budding Yeast Nucleus." *Genetics* 192 (1): 107–29.
- Taddei, Angela, Florence Hediger, Frank R Neumann, Christoph Bauer, and Susan M Gasser. 2004. "Separation of Silencing from Perinuclear Anchoring Functions in Yeast Ku80, Sir4 and Esc1 Proteins." *The EMBO Journal* 23 (6): 1301–12.
- Tajc, Stephen G, Blanton S Tolbert, Ravi Basavappa, and Benjamin L Miller. 2004. "Direct Determination of Thiol pKa by Isothermal Titration Microcalorimetry." *Journal of the American Chemical Society* 126 (34): 10508–9.

- Takayama, Fumio, Shuichi Tsutsui, Masanobu Horie, Kaoru Shimokata, and Toshimitsu Niwa. 2001. "Glutathionyl Hemoglobin in Uremic Patients Undergoing Hemodialysis and Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis." *Kidney International* 59 (February): S155–58.
- Tamarit, Jordi, Gemma Belli, Elisa Cabiscol, Enrique Herrero, and Joaquim Ros. 2003. "Biochemical Characterization of Yeast Mitochondrial Grx5 Monothiol Glutaredoxin." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25745–51.
- Tamarit, Jordi, Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, and Joaquim Ros. 2006. "Colorimetric Assay for the Quantitation of Iron in Yeast." *Analytical Biochemistry* 351 (1): 149–51.
- Tang, Yajun, Jiahai Zhang, Jiang Yu, Ling Xu, Jihui Wu, Cong-Zhao Zhou, and Yunyu Shi. 2014. "Structure-Guided Activity Enhancement and Catalytic Mechanism of Yeast grx8." *Biochemistry* 53 (13): 2185–96.
- Tanno, Masaya, Jun Sakamoto, Tetsuji Miura, Kazuaki Shimamoto, and Yoshiyuki Horio. 2007. "Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD⁺-Dependent Histone Deacetylase SIRT1." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6823–32.
- Tanny, J C, G J Dowd, J Huang, H Hilz, and D Moazed. 1999. "An Enzymatic Activity in the Yeast Sir2 Protein That Is Essential for Gene Silencing." *Cell* 99 (7): 735–45.
- Tanny, Jason C, Donald S Kirkpatrick, Scott A Gerber, Steven P Gygi, and Danesh Moazed. 2004. "Budding Yeast Silencing Complexes and Regulation of Sir2 Activity by Protein-Protein Interactions." *Molecular and Cellular Biology* 24 (16): 6931–46.
- Tasaki, Takafumi, and Yong Tae Kwon. 2007. "The Mammalian N-End Rule Pathway: New Insights into Its Components and Physiological Roles." *Trends in Biochemical Sciences* 32 (11): 520–28.
- Taylor, Ellen R, Fiona Hurrell, Richard J Shannon, Tsu-Kung Lin, Judy Hirst, and Michael P Murphy. 2003. "Reversible Glutathionylation of Complex I Increases Mitochondrial Superoxide Formation." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19603–10.
- Teixeira, Miguel C, João P Telo, Nuno F Duarte, and Isabel Sá-Correia. 2004. "The Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Induces the Generation of Free-Radicals and Associated Oxidative Stress Responses in Yeast." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (3): 1101–7.
- Thanan, Raynoo, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Shiho Ohnishi, Ning Ma, Somchai Pinlaor, Puangrat Yongvanit, Shosuke Kawanishi, and Mariko Murata. 2014. "Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (1): 193–217.
- Therizols, Pierre, Tarn Duong, Bernard Dujon, Christophe Zimmer, and Emmanuelle Fabre. 2010. "Chromosome Arm Length and Nuclear Constraints Determine the Dynamic Relationship of Yeast Subtelomeres." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5): 2025–30.
- Thompson, J S, X Ling, and M Grunstein. 1994. "Histone H3 Amino Terminus Is Required for Telomeric and Silent Mating Locus Repression in Yeast." *Nature* 369 (6477): 245–47.
- Tissenbaum, H A, and L Guarente. 2001. "Increased Dosage of a Sir-2 Gene Extends Lifespan in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 410 (6825): 227–30.
- Toledano, Michel B, Agnes Delaunay, Benoit Biteau, and Daniel Spector. 2003. "Oxidative Stress Responses in Yeast." *Yeast Stress Responses* 1: 242–87.
- Toledano, Michel B, Agnès Delaunay-Moisan, Caryn E Outten, and Aeid Igbaria. 2013. "Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast." *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (13): 1699–1711.
- Torres-Machorro, Ana Lilia, Roberto Hernández, Ana María Cevallos, and Imelda López-Villaseñor. 2010. "Ribosomal RNA Genes in Eukaryotic Microorganisms: Witnesses of Phylogeny?" *FEMS Microbiology Reviews* 34 (1): 59–86.
- Torres-Rosell, Jordi, Ivana Sunjevaric, Giacomo De Piccoli, Meik Sacher, Nadine Eckert-Boulet, Robert Reid, Stefan Jentsch, Rodney Rothstein, Luis Aragón, and Michael Lisby. 2007. "The Smc5-Smc6 Complex and SUMO Modification of Rad52 Regulates Recombinational Repair at the Ribosomal Gene Locus." *Nature Cell Biology* 9 (8): 923–31.
- Townsend, Danyelle M., Kenneth D. Tew, and Haim Tapiero. 2003. "The Importance of Glutathione in Human Disease." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57 (3-4): 145–55.
- Traverso, Nicola, Roberta Ricciarelli, Mariapaola Nitti, Barbara Marengo, Anna Lisa Furfaro, Maria Adelaide Pronzato, Umberto Maria Marinari, and Cinzia Domenicotti. 2013. "Role of

- Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance" 2013.
- Trotter, E. W., and C. M. Grant. 2005. "Overlapping Roles of the Cytoplasmic and Mitochondrial Redox Regulatory Systems in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Eukaryotic Cell* 4 (2): 392–400.
- Trotter, Eleanor W, and Chris M Grant. 2002. "Thioredoxins Are Required for Protection against a Reductive Stress in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Microbiology* 46 (3): 869–78.
- Tsuchiya, Mitsuhiro, Nick Dang, Emily O Kerr, Di Hu, Kristan K Steffen, Jonathan A Oakes, Brian K Kennedy, and Matt Kaerberlein. 2006. "Sirtuin-Independent Effects of Nicotinamide on Lifespan Extension from Calorie Restriction in Yeast." *Aging Cell* 5 (6): 505–14.
- Tu, Benjamin P., and Jonathan S. Weissman. 2004. "Oxidative Protein Folding in Eukaryotes: Mechanisms and Consequences." *Journal of Cell Biology* 164 (3): 341–46. doi:10.1083/jcb.200311055.
- Tung, Shu-Yun, Kuan-Wei Lee, Jia-Yang Hong, Sue-Ping Lee, Hsiao-Hsuan Shen, and Gunn-Guang Liou. 2013. "Changes in the Genome-Wide Localization Pattern of Sir3 in *Saccharomyces Cerevisiae* during Different Growth Stages." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 7 (January): e201304001.

-U-

- Uzarska, Marta A, Rafal Dutkiewicz, Sven-Andreas Freibert, Roland Lill, and Ulrich Mühlenhoff. 2013. "The Mitochondrial Hsp70 Chaperone Ssq1 Facilitates Fe/S Cluster Transfer from Isu1 to Grx5 by Complex Formation." *Molecular Biology of the Cell* 24 (12): 1830–41.

-V-

- Valenzano, Dario R, Eva Terzibasí, Tyrone Genade, Antonino Cattaneo, Luciano Domenici, and Alessandro Cellierino. 2006. "Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate." *Current Biology* : CB 16 (3): 296–300.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160 (1): 1–40.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84.
- Valley, Christopher C, Alessandro Cembran, Jason D Perlmutter, Andrew K Lewis, Nicholas P Labello, Jiali Gao, and Jonathan N Sachs. 2012. "The Methionine-Aromatic Motif Plays a Unique Role in Stabilizing Protein Structure." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (42): 34979–91.
- van der Veer, Eric, Zengxuan Nong, Caroline O'Neil, Brad Urquhart, David Freeman, and J Geoffrey Pickering. 2005. "Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor Regulates NAD⁺-Dependent Protein Deacetylase Activity and Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Maturation." *Circulation Research* 97 (1): 25–34.
- van Loon, A P, B Pesold-Hurt, and G Schatz. 1986. "A Yeast Mutant Lacking Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Is Hypersensitive to Oxygen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11): 3820–24.
- Vaquero, Alejandro, Michael Scher, Donghoon Lee, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and Danny Reinberg. 2004. "Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin." *Molecular Cell* 16 (1): 93–105.
- Vaziri, H, S K Dessain, E Ng Eaton, S I Imai, R A Frye, T K Pandita, L Guarente, and R A Weinberg. 2001. "hSIR2(SIRT1) Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase." *Cell* 107 (2): 149–59.
- Vega-Palas, M A, E Martín-Figueroa, and F J Florencio. 2000. "Telomeric Silencing of a Natural Subtelomeric Gene." *Molecular & General Genetics* : MGG 263 (2): 287–91.
- Vellai, Tibor, Krisztina Takacs-Vellai, Yue Zhang, Attila L Kovacs, László Orosz, and Fritz Müller. 2003. "Genetics: Influence of TOR Kinase on Lifespan in *C. Elegans*." *Nature* 426 (6967): 620. doi:10.1038/426620a.
- Vendrell, Alexandre, Mar Martínez-Pastor, Alberto González-Novo, Amparo Pascual-Ahuir, David

- A Sinclair, Markus Proft, and Francesc Posas. 2011. "Sir2 Histone Deacetylase Prevents Programmed Cell Death Caused by Sustained Activation of the Hog1 Stress-Activated Protein Kinase." *EMBO Reports* 12 (10): 1062–68.
- Vergnes, Baptiste, Laurent Vanhille, Ali Ouaiissi, and Denis Sereno. 2005. "Stage-Specific Antileishmanial Activity of an Inhibitor of SIR2 Histone Deacetylase." *Acta Tropica* 94 (2): 107–15.
- Vilella, Felipe, Rui Alves, María Teresa Rodríguez-Manzaneque, Gemma Bellí, Swarna Swaminathan, Per Sunnerhagen, and Enrique Herrero. 2004. "Evolution and Cellular Function of Monothiol Glutaredoxins: Involvement in Iron-Sulphur Cluster Assembly." *Comparative and Functional Genomics* 5 (4): 328–41.
- Villalba, José M, and Francisco J Alcaín. 2012. "Sirtuin Activators and Inhibitors." *BioFactors (Oxford, England)* 38 (5): 349–59.
- Visintin, R, E S Hwang, and A Amon. 1999. "Cfi1 Prevents Premature Exit from Mitosis by Anchoring Cdc14 Phosphatase in the Nucleolus." *Nature* 398 (6730): 818–23.
- Vivancos, Ana P, Esther A Castillo, Nic Jones, José Ayté, and Elena Hidalgo. 2004. "Activation of the Redox Sensor Pap1 by Hydrogen Peroxide Requires Modulation of the Intracellular Oxidant Concentration." *Molecular Microbiology* 52 (5): 1427–35.
- Vlamiš-Gardikas, Alexios, and Arne Holmgren. 2002. "Thioredoxin and Glutaredoxin Isoforms." *Methods in Enzymology* 347 (January): 286–96.
- Voelter-Mahlknecht, Susanne, and Ulrich Mahlke. 2006. "Cloning, Chromosomal Characterization and Mapping of the NAD-Dependent Histone Deacetylases Gene Sirtuin 1." *International Journal of Molecular Medicine* 17 (1): 59–67.
- W-
- Wach, A, A Brachat, R Pöhlmann, and P Philippsen. 1994. "New Heterologous Modules for Classical or PCR-Based Gene Disruptions in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast (Chichester, England)* 10 (13): 1793–1808.
- Wall, Stephanie B., Joo Yeun Oh, Anne R. Diers, and Aimee Landar. 2012. "Oxidative Modification of Proteins: An Emerging Mechanism of Cell Signaling." *Frontiers in Physiology* 3 SEP (September): 1–9.
- Walle, Thomas, Faye Hsieh, Mark H DeLegge, John E Oatis, and U Kristina Walle. 2004. "High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 32 (12): 1377–82.
- Wang, Chunxu, Charles T Wheeler, Thomas Alberico, Xiaoping Sun, Jeanne Seeberger, Mara Laslo, Edward Spangler, Bradley Kern, Rafael de Cabo, and Sige Zou. 2013. "The Effect of Resveratrol on Lifespan Depends on Both Gender and Dietary Nutrient Composition in *Drosophila Melanogaster*." *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35 (1): 69–81.
- Wang, J, E S Boja, W Tan, E Tekle, H M Fales, S English, J J Mieyal, and P B Chock. 2001. "Reversible Glutathionylation Regulates Actin Polymerization in A431 Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47763–66.
- Wang, Jianquan, William R Markesbery, and Mark a Lovell. 2006. "Increased Oxidative Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA in Mild Cognitive Impairment." *Journal of Neurochemistry* 96 (3): 825–32.
- Washburn, M P, and W W Wells. 1999. "The Catalytic Mechanism of the Glutathione-Dependent Dehydroascorbate Reductase Activity of Thioltransferase (glutaredoxin)." *Biochemistry* 38 (1): 268–74.
- Wasko, Brian M, and Matt Kaeberlein. 2014. "Yeast Replicative Aging: A Paradigm for Defining Conserved Longevity Interventions." *FEMS Yeast Research* 14 (1): 148–59.
- Wątroba, Mateusz, and Dariusz Szukiewicz. 2015. "The Role of Sirtuins in Aging and Age-Related Diseases." *Advances in Medical Sciences* 61: 52–62.
- Wei, Min, Paola Fabrizio, Jia Hu, Huanying Ge, Chao Cheng, Lei Li, and Valter D Longo. 2008. "Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9." *PLoS Genetics* 4 (1): e13.
- Weindling, Esther, and Shoshana Bar-Nun. 2015. "Sir2 Links the Unfolded Protein Response and the Heat Shock Response in a Stress Response Network." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (3): 473–78.

- Weiner, Michael P, and Gina L Costa. 1994. "Manual Rapid PCR Mutagenesis Supplement." *Genome Research* 4: S131–36.
- Weisiger, R A, and I Fridovich. 1973. "Mitochondrial Superoxide Simutase. Site of Synthesis and Intramitochondrial Localization." *The Journal of Biological Chemistry* 248 (13): 4793–96.
- Wellinger, Raymund J, and Virginia A Zakian. 2012. "Everything You Ever Wanted to Know about *Saccharomyces Cerevisiae* Telomeres: Beginning to End." *Genetics* 191 (4): 1073–1105.
- Werner-Washburne, M, E L Braun, M E Crawford, and V M Peck. 1996. "Stationary Phase in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Microbiology* 19 (6): 1159–66.
- Wierman, Margaret B, and Jeffrey S Smith. 2014. "Yeast Sirtuins and the Regulation of Aging." *FEMS Yeast Research* 14 (1): 73–88.
- Wilson, Jeanne M, Viet Q Le, Collin Zimmerman, Ronen Marmorstein, and Lorraine Pillus. 2006. "Nuclear Export Modulates the Cytoplasmic Sir2 Homologue Hst2." *EMBO Reports* 7 (12): 1247–51.
- Wingert, Rebecca A, Jenna L Galloway, Bruce Barut, Helen Foott, Paula Fraenkel, Jennifer L Axe, Gerhard J Weber, et al. 2005. "Deficiency of Glutaredoxin 5 Reveals Fe-S Clusters Are Required for Vertebrate Haem Synthesis." *Nature* 436 (7053): 1035–39.
- Winkler, H, G Adam, E Mattes, M Schanz, A Hartig, and H Ruis. 1988. "Co-Ordinate Control of Synthesis of Mitochondrial and Non-Mitochondrial Hemoproteins: A Binding Site for the HAP1 (CYP1) Protein in the UAS Region of the Yeast Catalase T Gene (CTT1)." *The EMBO Journal* 7 (6): 1799–1804.
- Witte, S, M Villalba, K Bi, Y Liu, N Isakov, and A Altman. 2000. "Inhibition of the c-Jun N-Terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB Pathways by PICOT, a Novel Protein Kinase C-Interacting Protein with a Thioredoxin Homology Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (3): 1902–9.
- Wood, Matthew J, Gisela Storz, and Nico Tjandra. 2004. "Structural Basis for Redox Regulation of Yap1 Transcription Factor Localization." *Nature* 430 (7002): 917–21.
- Wu, Chang-Yi, Amanda J Bird, Lisa M Chung, Michael A Newton, Dennis R Winge, and David J Eide. 2008. "Differential Control of Zap1-Regulated Genes in Response to Zinc Deficiency in *Saccharomyces Cerevisiae*." *BMC Genomics* 9 (January): 370.
- Wu, Ching-Shyi, Yu-Fan Chen, and Marc R Gartenberg. 2011. "Targeted Sister Chromatid Cohesion by Sir2." *PLoS Genetics* 7 (2): e1002000.

-X-

- Xie, Yi, Sutapa Kole, Patricia Precht, Michael J. Pazin, and Michel Bernier. 2009. "S-Glutathionylation Impairs Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation and Signaling." *Endocrinology* 150 (3): 1122–31.

-Y-

- Yamaguchi-Iwai, Yuko, Ryo Ueta, Ayako Fukunaka, and Ryuzo Sasaki. 2002. "Subcellular Localization of Aft1 Transcription Factor Responds to Iron Status in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18914–18.
- Yang, Hongying, Joseph A Baur, Allen Chen, Christine Miller, Jeffrey K Adams, Anne Kisielewski, Konrad T Howitz, Robert E Zipkin, and David A Sinclair. 2007. "Design and Synthesis of Compounds That Extend Yeast Replicative Lifespan." *Aging Cell* 6 (1): 35–43.
- Yang, Jing, Arnoud Groen, Simone Lemeer, Anne Jans, Monique Slijper, S. Mark Dier, Jeroen Den Hertog, and David Barford. 2007. "Reversible Oxidation of the Membrane Distal Domain of Receptor PTPα Is Mediated by a Cyclic Sulfenamide." *Biochemistry* 46 (3): 709–19.
- Yang, Mei, Paul A Cobine, Sabine Molik, Amornrat Naranuntarat, Roland Lill, Dennis R Winge, and Valeria C Culotta. 2006. "The Effects of Mitochondrial Iron Homeostasis on Cofactor Specificity of Superoxide Dismutase 2." *The EMBO Journal* 25 (8): 1775–83.
- Yang, Wen, and Siegfried Hekimi. 2010. "A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis Elegans*." *PLoS Biology* 8 (12): e1000556.
- Yang, Yonghua, Wei Fu, Jiandong Chen, Nancy Olashaw, Xiaohong Zhang, Santo V Nicosia, Kapil Bhalla, and Wenlong Bai. 2007. "SIRT1 Sumoylation Regulates Its Deacetylase Activity and Cellular Response to Genotoxic Stress." *Nature Cell Biology* 9 (11): 1253–62.

- Ye, Hong, Suh Young Jeong, Manik C Ghosh, Gennadiy Kovtunovych, Laura Silvestri, Danilo Ortillo, Naoya Uchida, John Tisdale, Clara Camaschella, and Tracey A Rouault. 2010. "Glutaredoxin 5 Deficiency Causes Sideroblastic Anemia by Specifically Impairing Heme Biosynthesis and Depleting Cytosolic Iron in Human Erythroblasts." *The Journal of Clinical Investigation* 120 (5): 1749–61.
- Yeung, Fan, Jamie E Hoberg, Catherine S Ramsey, Michael D Keller, David R Jones, Roy A Frye, and Marty W Mayo. 2004. "Modulation of NF-kappaB-Dependent Transcription and Cell Survival by the SIRT1 Deacetylase." *The EMBO Journal* 23 (12): 2369–80.
- Yu, Jiang, Nan-Nan Zhang, Pei-Dong Yin, Pei-Xin Cui, and Cong-Zhao Zhou. 2008. "Glutathionylation-Triggered Conformational Changes of Glutaredoxin Grx1 from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proteins* 72 (3): 1077–83.
- Yun, Nuri, Chiho Kim, Hyeseon Cha, Woo Jin Park, Hirohiko Shibayama, Il-Seon Park, and Young J Oh. 2013. "Caspase-3-Mediated Cleavage of PICOT in Apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432 (3): 533–38.
- Z-
- Zakian, V A, and H M Blanton. 1988. "Distribution of Telomere-Associated Sequences on Natural Chromosomes in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 8 (5): 2257–60.
- Zarse, K, S Schmeisser, M Birringer, E Falk, D Schmoll, and M Ristow. 2010. "Differential Effects of Resveratrol and SRT1720 on Lifespan of Adult *Caenorhabditis Elegans*." *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme* 42 (12): 837–39.
- Zee, Rebecca S, Chris B Yoo, David R Pimentel, David H Perlman, Joseph R Burgoyne, Xiuyun Hou, Mark E McComb, Catherine E Costello, Richard A Cohen, and Markus M Bachschmid. 2010. "Redox Regulation of Sirtuin-1 by S-Glutathiolation." *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (7): 1023–32. doi:10.1089/ars.2010.3251.
- Zhai, R Grace, Fan Zhang, P Robin Hiesinger, Yu Cao, Claire M Haueter, and Hugo J Bellen. 2008. "NAD Synthase NMNAT Acts as a Chaperone to Protect against Neurodegeneration." *Nature* 452 (7189): 887–91.
- Zhang, Yan, Lili Liu, Xiaorong Wu, Xiuxiang An, JoAnne Stubbe, and Mingxia Huang. 2011. "Investigation of in Vivo Diferric Tyrosyl Radical Formation in *Saccharomyces Cerevisiae* Rnr2 Protein: Requirement of Rnr4 and Contribution of Grx3/4 AND Dre2 Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41499–509.
- Zhao, Kehao, Xiaomei Chai, Adrienne Clements, and Ronen Marmorstein. 2003. "Structure and Autoregulation of the Yeast Hst2 Homolog of Sir2." *Nature Structural Biology* 10 (10): 864–71.
- Zhao, Kehao, Robyn Harshaw, Xiaomei Chai, and Ronen Marmorstein. 2004. "Structural Basis for Nicotinamide Cleavage and ADP-Ribose Transfer by NAD(+)-Dependent Sir2 Histone/protein Deacetylases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (23): 8563–68.
- Zhao, Qing-fei, Jin-tai Yu, and Lan Tan. 2015. "S-Nitrosylation in Alzheimer ' S Disease," no. January 2014: 268–80.
- Zheng, M, F Aslund, and G Storz. 1998. "Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation." *Science (New York, N.Y.)* 279 (5357): 1718–21.
- Zhou, Y B, S E Gerchman, V Ramakrishnan, A Travers, and S Muyldermans. 1998. "Position and Orientation of the Globular Domain of Linker Histone H5 on the Nucleosome." *Nature* 395 (6700): 402–5.
- Zschoernig, Barbara, and Ulrich Mahlknecht. 2009. "Carboxy-Terminal Phosphorylation of SIRT1 by Protein Kinase CK2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381 (3): 372–77.

ARTICLE

