

## **NOTE TO USERS**

**This reproduction is the best copy available.**

UMI<sup>®</sup>



Université de Sherbrooke

**Abc3, UN TRANSPORTEUR VACUOLAIRE EXPRIMÉ EN CARENCE DE FER  
CHEZ LA LEVURE À FISSION.**

Par

M. Benoît Pouliot

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

16 avril 2010

Évaluateurs :

Dr Simon Labbé, Département de Biochimie

Dr François Bachand, Département de Biochimie

Dre Christine Lavoie, Département de Pharmacologie



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-65638-9  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-65638-9

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## Résumé

### **Abc3, UN TRANSPORTEUR VACUOLAIRE EXPRIMÉ EN CARENCE DE FER CHEZ LA LEVURE À FISSION.**

Par M. Benoît Pouliot  
Département de Biochimie  
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie  
16 avril 2010

De nombreux processus métaboliques nécessitent la présence de fer en tant que cofacteur. Paradoxalement, la surabondance en fer peut contribuer à la formation de dérivés oxygénés hautement réactifs qui sont toxiques pour la cellule. Ceci fait en sorte que sa concentration intracellulaire doit être finement régulée. Chez la levure à fission, *Schizosaccharomyces pombe*, plusieurs mécanismes participent à l'établissement de l'homéostasie du fer. Parmi ces mécanismes, on y retrouve des protéines de transport du fer à la surface cellulaire, ainsi que d'autres responsables de la séquestration de l'ion à l'intérieur de la vacuole. Un rôle pour la vacuole consiste à emmagasiner le fer afin de détoxifier la cellule s'il est trop abondant. Du même coup, la vacuole sert de réservoir qui pourra redonner le fer plus tard à la cellule si cette dernière croît en condition de rareté pour cet élément. La voie par laquelle le fer peut ressortir de la vacuole n'a cependant pas encore été identifiée.

L'objectif de cette étude est d'identifier le transporteur responsable du relâchement du fer de la vacuole vers le compartiment cytosolique. Nos recherches ont permis d'identifier un candidat, un transporteur transmembranaire de type ABC (*ATP binding cassette*) nommé Abc3, dont l'expression augmente de 16.9 fois en carence de fer selon des études comparatives par biopuces à ADN.

Tout d'abord, l'étude de la régulation du gène *abc3*<sup>+</sup> a été effectuée selon la présence ou non de fer dans le milieu de culture. L'expression du gène *abc3*<sup>+</sup> a été comparée avec d'autres gènes codant pour d'autres protéines de la même famille. Seul le gène *abc3*<sup>+</sup> a montré une expression variant selon le statut en fer. Il est réprimé en présence de fer et activé en carence de ce dernier. Par la suite, des éléments en *cis* du promoteur *abc3*<sup>+</sup> pouvant être responsables de la régulation selon le statut en fer ont été analysés. Parmi ces derniers, nous avons démontré que seul l'élément de régulation le plus près du cadre de lecture est fonctionnel permettant la répression du gène *abc3*<sup>+</sup> en présence de fer. Un essai fonctionnel permettant de montrer l'importance de la protéine Abc3 a été mis au point. Ainsi, une souche nulle pour le gène *abc3*<sup>+</sup> montre une perte de croissance en présence de céruléine, un antibiotique qui inhibe la biosynthèse des acides gras. La souche *abc3*Δ mutante est également sensible à la présence du chélateur de fer, le 2,2-dipyridyl (Dip), lorsque le système de transport de surface constitué de Fio1 et de Fip1 est inactivé. Une protéine Abc3 portant une étiquette fluorescente exprimée sous le contrôle du promoteur endogène *abc3*<sup>+</sup> a permis de localiser la protéine Abc3-GFP au niveau des vacuoles en carence de fer. Des analyses de profils transcriptionnels ont indiqué que l'expression forcée du gène *abc3*<sup>+</sup> en présence de fer active le répresseur Fep1. La surexpression du transporteur Abc3 libérerait plus de fer de la vacuole ce qui aurait pour effet d'activer Fep1, résultant en la répression de la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer à la surface cellulaire.

Les résultats obtenus sur Abc3 suggèrent fortement que cette protéine pourrait être impliquée dans l'exportation du fer de la vacuole vers le cytoplasme de la levure lorsque cette dernière croît en carence de fer.

**Mots clefs** : homéostasie du fer, transporteur ABC, protéine transmembranaire vacuolaire, régulation transcriptionnelle, *Schizosaccharomyces pombe*.

## Table des matières

|  |      |
|--|------|
| <b>Liste des figures</b> .....   | IV   |
| <b>Liste des tableaux</b> .....  | V    |
| <b>Liste des abréviations</b> .....  | V    |
| <b>Résumé</b> .....  | VIII |
| <b>Introduction</b> .....  | 1    |
| 1. L'homéostasie du fer .....  | 1    |
| 2. L'organisme modèle <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 3    |
| 2.1. Les facteurs de transcription responsables de la régulation du transport du fer<br>chez <i>S. cerevisiae</i> .....                            | 3    |
| 2.1.1. Aft1 / Aft2 .....   | 3    |
| 2.1.2. Yap5 .....  | 7    |
| 2.2. Les facteurs protéiques responsables de la régulation post-traductionnelle<br>associée à l'homéostasie du fer chez <i>S. cerevisiae</i> ..... | 9    |
| 2.2.1. Cth1/Cth2 .....   | 9    |
| 2.3. Le transport du fer dépendant des réductases .....  | 11   |
| 2.3.1. Fre1 à Fre7 .....   | 11   |
| 2.3.2. Fet3-Ftr1 .....   | 13   |
| 2.4. Le transport du fer utilisant les récepteurs de sidérophores .....  | 15   |
| 2.4.1. Arn1/Arn2/Arn3/Arn4 .....   | 15   |
| 2.4.2. Fit1/Fit2/Fit3 .....  | 17   |
| 2.5. Le transport du fer de faible affinité .....  | 18   |
| 2.5.1. Fet4 .....  | 18   |
| 2.5.2. Smf1/Smf2 .....   | 20   |

|  |    |
|--|----|
| 2.6. L'entreposage du fer à la vacuole.....  | 22 |
| 2.6.1. Ccc1.....   | 23 |
| 2.6.2. Fet5-Fth1.....  | 24 |
| 2.6.3. Smf3.....   | 26 |
| 2.6.4. Fre6.....   | 26 |
| 3. L'organisme modèle <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                         | 28 |
| 3.1. La régulation transcriptionnelle du transport du fer chez <i>S. pombe</i> ..... | 30 |
| 3.1.1. Fep1.....   | 30 |
| 3.1.2. Php4.....   | 34 |
| 3.2. Le système de transport du fer dépendant de la réductase Frp1.....              | 37 |
| 3.2.1. Frp1/Frp2.....  | 37 |
| 3.2.2. Fio1-Fip1.....  | 38 |
| 3.3. Le transport du fer via les récepteurs de sidérophores.....                     | 40 |
| 3.3.1. Sib1/Sib2.....  | 40 |
| 3.3.2. Str1/ Str2/ Str3.....   | 41 |
| 3.4. L'entreposage du fer à la vacuole.....  | 43 |
| 3.4.1. Pcl1.....   | 43 |
| 4. La famille des transporteurs à <i>ATP-binding cassette</i> (ABC).....             | 45 |
| 4.1. Structure des transporteurs ABC.....  | 45 |
| 4.2. Caractérisation des transporteurs ABC de <i>S. pombe</i> .....                  | 49 |
| 5. Hypothèse de recherche.....   | 51 |
| 6. Objectifs de recherche.....   | 52 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Résultats</b> .....   | 53  |
| Manuscrit : <i>abc3</i> <sup>+</sup> encode an iron-regulated vacuolar ABC-type transporter<br>in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ..... | 53  |
| Résumé.....  | 55  |
| Abstract.....  | 57  |
| Introduction.....  | 58  |
| Materials and methods.....   | 62  |
| Results.....   | 69  |
| Discussion.....  | 94  |
| Acknowledgments.....   | 99  |
| References.....  | 100 |
| <b>Discussion</b> .....  | 109 |
| I. Caractérisation du transporteur Abc3.....   | 109 |
| I.I. Quantification du contenu en fer des vacuoles.....  | 109 |
| I.II. Essai de transport employant le substrat fluorescent bimane-GS.....  | 114 |
| I.III. Identification du signal peptidique responsable de la localisation<br>cellulaire de Abc3.....                                     | 118 |
| I.IV. Caractérisation de la topologie membranaire du transporteur Abc3.....  | 121 |
| <b>Remerciements</b> .....   | 124 |
| <b>Références</b> .....  | 125 |

## Liste des figures

### Introduction

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Réaction de Fenton.....  | 2  |
| Figure 2. Bases moléculaires de la réponse à la carence en fer chez <i>S. cerevisiae</i> ..... | 4  |
| Figure 3. Bases moléculaires de la réponse à la carence en fer chez <i>S. pombe</i> .....      | 29 |
| Figure 4. Représentation du répresseur transcriptionnel Fep1.....                              | 32 |
| Figure 5. Architecture générale des transporteurs ABC.....                                     | 46 |
| Figure 6. Modèle de fonctionnement des transporteurs ABC.....                                  | 48 |

### Résultats

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Structural features of Abc3 and its close homologue from <i>S. cerevisiae</i> Ycfl.....  | 70 |
| Figure 2. <i>abc3</i> <sup>+</sup> transcript levels are down- regulated by iron in a Fep1-dependent manner.....   | 72 |
| Figure 3. Iron responsiveness of the <i>abc3</i> <sup>+</sup> promoter.....  | 75 |
| Figure 4. Analysis of the proximal <i>abc3</i> <sup>+</sup> promoter sequences required to repress gene expression under both basal and iron-replete conditions.....                                 | 77 |
| Figure 5. A single GATA element in the <i>abc3</i> <sup>+</sup> promoter is sufficient to regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner.....                                     | 78 |
| Figure 6. Fep1 binds to the <i>abc3</i> <sup>+</sup> promoter <i>in vivo</i> in an iron-dependent manner.....  | 81 |
| Figure 7. Vacuolar localization of a functional Abc3-GFP fusion protein and the contribution of Abc3 to cell growth under low iron conditions.....   | 83 |
| Figure 8. Iron accumulates in <i>abc3</i> Δ mutant cells.....  | 86 |
| Figure 9. Abc3 is an integral membrane protein biosynthetically regulated by cellular iron levels.....   | 89 |
| Figure 10. Disruption of the <i>abc3</i> <sup>+</sup> gene increases <i>frp1</i> <sup>+</sup> mRNA levels, whereas its transcriptional activation decreases <i>frp1</i> <sup>+</sup> expression..... | 92 |

**Liste des tableaux****Résultats**

Tableau 1. Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts.....65

**Liste des abréviations**

|              |   |
|--------------|---|
| A            | alanine   |
| a.a.         | acide aminé                                       |
| ABC          | <i>ATP-binding cassette</i>                       |
| ADN          | acide déoxyribonucléique                          |
| ARE          | élément AU riche                                  |
| ARN          | acide ribonucléique                               |
| ARNm         | ARN messenger                                     |
| ATP          | adénosine triphosphate                            |
| bimane-GS    | bimane-S-glutathion                               |
| BPS          | acide bathophénanthrolinedisulfonique             |
| C            | cystéine  |
| Ca           | calcium   |
| Cd           | cadmium   |
| ChIP         | immunoprécipitation de la chromatine              |
| Co           | cobalt  |
| Co-IP        | co-immunoprécipitation                            |
| CRD          | domaine riche en cystéines                        |
| Cu           | cuivre  |
| Cycle TCA    | cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs) |
| Cys          | cystéine  |
| D            | aspartate   |
| DEAE-Dextran | diéthylaminoéthyl-Dextran                         |

|                |  |
|----------------|--|
| Dip            | 2,2'-dipyridyl   |
| DTM            | domaine transmembranaire                                       |
| E              | glutamate  |
| F              | phénylalanine  |
| FAD            | flavine adénine dinucléotide                                   |
| Fe             | fer  |
| Fe-S           | centre fer-soufre  |
| FRET           | <i>fluorescence resonance energy transfer</i>                  |
| G              | glycine  |
| GFP            | protéine fluorescente verte                                    |
| GPI            | glycosylphosphatidylinositol                                   |
| GSH            | glutathion   |
| H              | histidine  |
| ICP-MS         | <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i>            |
| Ile            | isoleucine   |
| K              | lysine   |
| K <sub>m</sub> | constante de Michaelis-Menten                                  |
| K <sub>D</sub> | constante de dissociation                                      |
| L              | leucine  |
| Leu            | leucine  |
| MCIB           | monochlorobimane   |
| MSD            | <i>membrane spanning domain</i>                                |
| Mn             | manganèse  |
| NADPH          | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite |
| NBD            | domaine d'attachement aux nucléotides                          |
| NES            | signal d'exportation nucléaire                                 |

|                      |   |
|----------------------|---|
| Ni                   | nickel                                    |
| NLS                  | signal de localisation nucléaire          |
| nM                   | nanomolaire                               |
| NTE                  | extension N-terminale                     |
| P                    | proline                                   |
| <i>p-bodies</i>      | <i>cytoplasmic processing bodies</i>      |
| <i>P-loop</i>        | boucle de liaison aux phosphates de l'ATP |
| Pro                  | proline                                   |
| Q                    | glutamine                                 |
| R                    | arginine                                  |
| RE                   | réticulum endoplasmique                   |
| S                    | sérine                                    |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyce cerevisiae</i>            |
| <i>S. pombe</i>      | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>          |
| T                    | thréonine                                 |
| TTP                  | tristétraproline                          |
| TZF                  | <i>tandem zinc finger</i>                 |
| X                    | n'importe lequel des acides aminés        |
| Y                    | tyrosine                                  |
| ZF                   | doigt de zinc                             |
| Zn                   | zinc                                      |
| μM                   | micromolaire                              |
| φ                    | acide aminé aliphatique                   |
| 3'-UTR               | régions 3' non-codantes                   |
| 5'-UTR               | régions 5' non-traduites                  |

## Introduction

### 1. L'homéostasie du fer

Le fer est un élément essentiel pour la grande majorité des organismes. Le fait que le fer puisse se retrouver sous deux états électroniques lui confère une propriété importante qui lui est propre. On retrouve le fer sous la forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ), qui est un accepteur d'électron, et sous la forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), qui est un donneur d'électron. Cette capacité à échanger des électrons fait en sorte que le fer se retrouve impliqué en tant que cofacteur pour de nombreuses réactions enzymatiques. Il peut être coordonné directement par certains acides aminés ou faire partie de complexes tels les centres fer-soufre (Fe-S) et le groupement prosthétique hème. Les métalloenzymes fer-dépendantes peuvent être impliquées dans diverses réactions, incluant des réactions d'oxydoréduction, de fixation de l'oxygène ou de transport d'électrons (Hediger *et al*, 2002).

Les organismes doivent surmonter deux obstacles afin d'utiliser correctement le fer qui leur est indispensable. Tout d'abord, bien que le fer soit un élément que l'on retrouve en abondance dans l'environnement, sa biodisponibilité est très limitée (Kosman, 2003). En effet, seule la forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ) est assimilable. Dans des conditions physiologiques où l'oxygène est présent, le fer se retrouve à l'état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et génère des polymères d'hydroxydes de fer qui sont insolubles (Hediger *et al*, 2002). Afin de solutionner ce problème, les organismes possèdent des mécanismes qui rendent possible l'absorption de fer dans leur milieu. Certains de ces mécanismes seront décrits dans les sections suivantes.

Le second obstacle est la toxicité cellulaire du fer lorsque sa concentration est trop élevée. Une cellule qui acquiert une trop grande quantité de fer par rapport à ses besoins se

retrouve avec des ions  $\text{Fe}^{2+}$  libres. Sous cette forme, l'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et forme le dérivé hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), ainsi que le radical hydroxyle ( $\bar{\text{O}}\text{H}$ ). La génération de ces composés est décrite comme étant la réaction de Fenton représentée à la figure 1 (Halliwell & Gutteridge, 1992). Le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) est hautement réactif. Il possède la capacité d'oxyder plusieurs macromolécules de la cellule. L'augmentation de la production de  $\cdot\text{OH}$  affecte l'intégrité des protéines, des lipides ainsi que des acides nucléiques (Halliwell & Gutteridge, 1992). Il devient donc primordial pour la cellule de s'assurer du juste équilibre des niveaux de fer, afin d'éviter un surplus de ce dernier.



**Figure 1. Réaction de Fenton.**

L'homéostasie du fer se définit donc comme le niveau d'équilibre où la concentration de fer répond aux besoins cellulaires sans excéder ces derniers. Jusqu'à maintenant aucune voie excrétrice de fer permettant l'élimination de ces derniers n'a été identifiée chez les eucaryotes unicellulaires. Cela suggère que son homéostasie est principalement régulée au niveau de son absorption, de sa distribution et de son entreposage (Kaplan, 2002).

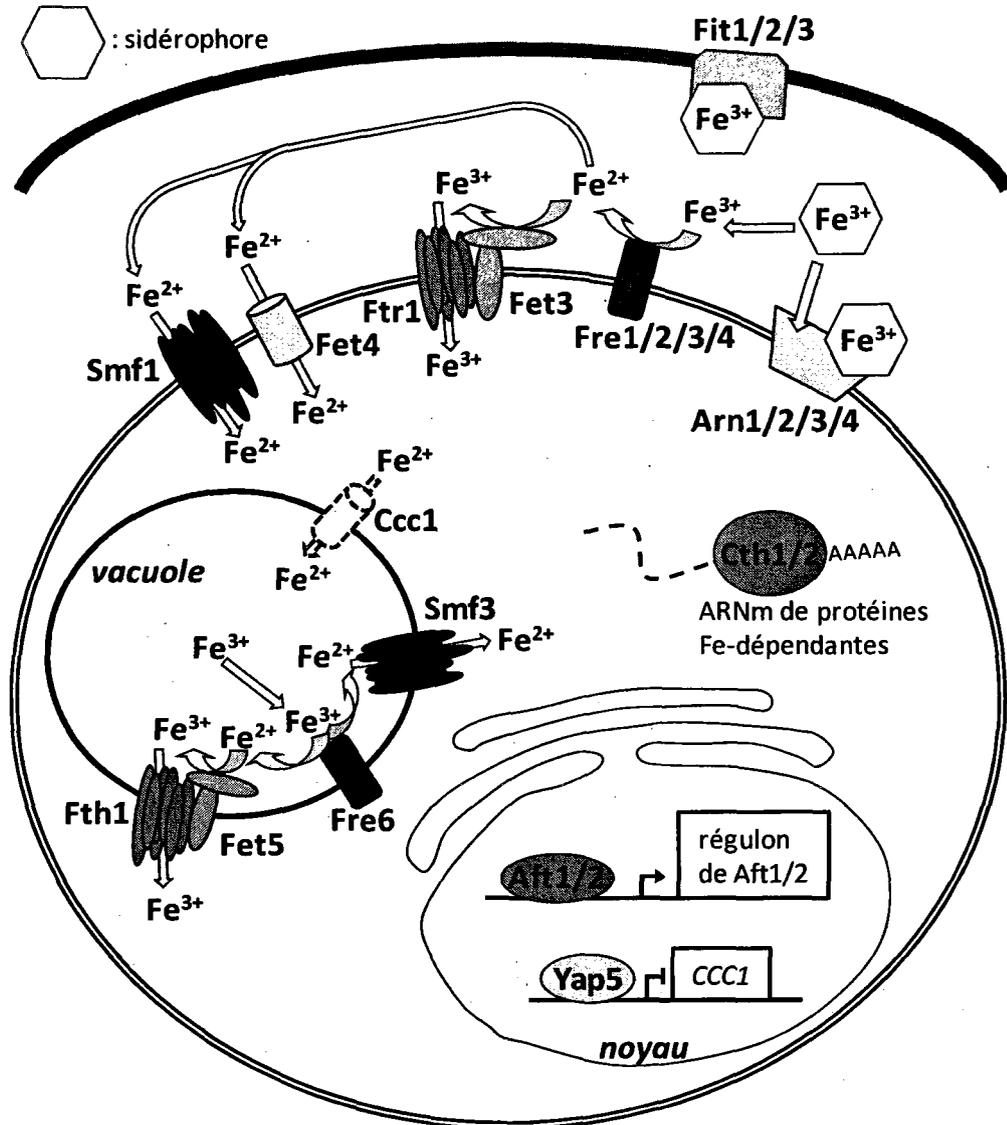
## 2. L'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires de la régulation de l'homéostasie du fer chez la cellule, divers modèles sont employés. Un des modèles eucaryotes le plus employé est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les études effectuées avec cette levure ont été favorisées grâce à sa maniabilité génétique et à la disponibilité de données innombrables issues du séquençage de son génome (Goffeau *et al*, 1996). Plusieurs découvertes sur l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae* ont servi de point de référence afin d'élucider des mécanismes homéostatiques importants chez d'autres organismes. Les voies d'acquisition du fer et leurs modes de régulation chez la levure *S. cerevisiae* sont assez bien connus. Ils sont illustrés à la figure 2 et seront décrits plus en détails dans les sections qui suivent.

### 2.1. Les facteurs de transcription responsables de la régulation du transport du fer chez *S. cerevisiae*

#### 2.1.1. Aft1 / Aft2

Les gènes qui codent pour les protéines nécessaires à la réduction et au transport du fer sont régulés selon la concentration intracellulaire en fer. Ces gènes sont activés en carence de fer et réprimés en présence d'un excédent de fer. Cette régulation transcriptionnelle fer-dépendante est principalement régit par le facteur de transcription Aft1. Tous les gènes dont l'expression varie selon le statut en fer et qui sont régulés par Aft1 font partie de ce qui est appelé le « régulon du fer ». Lorsque le fer disponible devient limitant, Aft1 est importé au noyau et active la transcription du régulon du fer (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995, Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002).



**Figure 2. Bases moléculaires de la réponse à la carence en fer chez *S. cerevisiae*.**

Le système de transport du fer à la surface des cellules est formé des réductases Fre1 à Fre4, du complexe de haute affinité Fet3-Ftr1, des transporteurs de faible affinité Fet4 et Smf1, ainsi que des récepteurs de sidérophores Arn1 à Arn4. Le transport des sidérophores est favorisé par les protéines Fit1, Fit2 et Fit3 présentes dans la paroi cellulaire. L'export du fer contenu dans la vacuole implique la réductase Fre6, le complexe de haute affinité Fet5-Fth1 et le transporteur Smf3. La transcription et la traduction de Ccc1, responsable de l'import du fer dans la vacuole, sont arrêtées en absence de fer. En carence de fer, les activateurs transcriptionnels Aft1 et Aft2 sont actifs, tandis que Yap5 est inactif. Les régulateurs post-transcriptionnels Cth1 et Cth2 se lient aux ARNm de protéines fer-dépendantes et entraînent leur dégradation.

Le régulateur transcriptionnel Aft1 a initialement été découvert à la suite d'une étude génétique visant à identifier des souches mutantes dans lesquelles le régulon du fer demeure fortement exprimé en présence de hautes concentrations en fer (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). L'une des souches mutantes isolées contenait une mutation de type « gain de fonction » dans le gène *AFT1*. Plus précisément, la fonction d'Aft1 était affectée à la suite d'une substitution faux-sens qui entraînait le changement d'un résidu cystéine en phénylalanine (C291F). Cette mutation fait en sorte que Aft1 demeure actif en tout temps (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). Cette découverte fut appuyée par la suite avec la démonstration de la capacité d'Aft1 à se lier à la chromatine en réponse à la carence en fer et avec la perte d'expression du régulon du fer chez une souche nulle pour le gène *AFT1* (Casas *et al*, 1997, Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995).

Le gène *AFT1* code pour une protéine de 690 acides aminés (a.a.). L'activité de la protéine est régulée par un changement de localisation cellulaire selon le statut en fer (Ueta *et al*, 2003, Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). En présence de fer, Aft1 est inactif et demeure dans le cytoplasme. Lors d'une carence en fer, Aft1 est importé au noyau et active la transcription de ses gènes cibles. Lorsque le niveau de fer redevient suffisant, Aft1 est exporté au cytoplasme. Le processus d'importation-exportation de Aft1 est appuyé par la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'exportation nucléaire (NES), de même que par l'identification de partenaires protéiques impliqués dans ce transport nucléocytoplasmique (Ueta *et al*, 2003, Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). Il a été rapporté qu'en présence de fer Aft1 homodimérise. Suite à cette homodimérisation, l'exportine Msn5 s'ajoute au complexe et entraîne l'exportation nucléaire de Aft1 (Ueta *et al*, 2007). Les mécanismes moléculaires précis qui expliquent la capacité de Aft1 à jauger le statut en fer ne sont toujours pas connus. Ils semblent toutefois impliquer les protéines Fra1/2 et Grx3/4

puisque en l'absence de l'une ou l'autre de ces paires de protéines, Aft1 est constitutivement actif et nucléaire (Kumanovics *et al*, 2008, Pujol-Carrion *et al*, 2006, Ojeda *et al*, 2006).

L'activité transcriptionnelle de Aft1 au noyau est possible grâce à deux régions distinctes de la protéine. Sa région N-terminal hautement basique est responsable de la liaison à l'ADN, plus spécifiquement, elle se lie à la séquence consensus  $A/T^G/A$ CACCC contenue dans les régions 5' non-traduites (5'-UTR) des gènes du régulon du fer (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1996). Sa région C-terminal, quant à elle, est essentielle pour l'activation de la transcription et contient de nombreux résidus glutamines, aspartates et glutamates (Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002).

L'analyse du génome de *S. cerevisiae* a permis d'identifier un second régulateur transcriptionnel partageant 39% d'homologie avec la protéine Aft1. Ce gène code pour Aft2, une protéine de 416 a.a. (Blaiseau *et al*, 2001, Rutherford *et al*, 2001, Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). Une souche nulle pour le gène *AFT2* ne présente pas de phénotypes de déficiences majeures reliées à l'homéostasie du fer. Cependant, chez une souche nulle pour les deux facteurs transcriptionnels Aft1 et Aft2, on observe une diminution de la croissance sur un milieu appauvri en fer plus marquée que chez une souche nulle pour Aft1 seulement (Rutherford *et al*, 2001). La surexpression du gène *AFT2* à l'intérieur d'une souche *AFT1* nulle permet de contrôler l'expression du régulon du fer de façon fer-dépendante. Ce résultat est soutenu par l'augmentation de l'acquisition du fer mesurée à l'aide du radio-isotope  $^{59}\text{Fe}$  (Blaiseau *et al*, 2001, Rutherford *et al*, 2001). Ces premiers résultats ont suggéré l'implication de Aft2 dans le contrôle de l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*. Des essais transcriptionnels à l'aide de gènes rapporteurs et d'immunoprécipitation de la chromatine

(ChIP) ont démontré que Aft2 peut se lier directement aux promoteurs de gènes régulés par Aft1 (Courel *et al*, 2005, Rutherford *et al*, 2003). Une analyse complète des gènes régulés par Aft1 et Aft2 a été effectuée par micropuces à ADN. Cette dernière a confirmée que leur rôle était partiellement redondant puisqu'ils régulent plusieurs gènes communs. Chacun possède toutefois des gènes qu'ils régulent de manière indépendante l'un de l'autre (Courel *et al*, 2005, Rutherford *et al*, 2003). Un examen plus approfondi des promoteurs de ces gènes indique que bien qu'ils puissent s'associer aux mêmes promoteurs, Aft1 possède une forte préférence pour la séquence de reconnaissance TGCACCC, tandis que Aft2 se lie davantage à la séquence  ${}^G/C$ TGCACCC (Courel *et al*, 2005). Le rôle du régulateur transcriptionnel Aft2 n'est pas encore complètement défini. Le modèle actuel, basé principalement sur les données de biopuces à ADN, propose que Aft1 active principalement la transcription des gènes impliqués dans les systèmes d'acquisition du fer présents à la surface cellulaire. Quant à Aft2, les gènes qu'il régule sont essentiellement impliqués dans l'entreposage et l'utilisation du fer dans des compartiments intracellulaires (Courel *et al*, 2005).

### 2.1.2. Yap5

Récemment, un troisième régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse au fer a été identifié. En présence de fer, Yap5 active la transcription d'un gène impliqué dans l'entreposage du fer. Ce gène, *CCCI*, code pour un transporteur vacuolaire qui permet de diminuer le fer dans le cytoplasme en l'entreposant dans la vacuole (Li *et al*, 2008). Ce sentier sera développé davantage dans l'une des sections suivantes.

Le niveau d'expression de la protéine Yap5 est constitutif peu importe le niveau de fer auquel la cellule est confronté. La localisation nucléaire de la protéine de fusion GFP-Yap5 est également invariable et se trouve en permanence au noyau. Des analyses par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont également démontrées que GFP-Yap5 est constitutivement lié au promoteur du gène qu'il régule (Li *et al*, 2008). Selon le modèle actuel, l'activation de la transcription en présence de fer serait induite par un changement conformationnel du facteur de transcription lui-même.

La protéine Yap5 a une taille de 245 a.a. Du côté N-terminal de la protéine on retrouve un domaine de type « leucine zipper ». En général, ce domaine est impliqué dans la liaison à l'ADN, de même que dans la dimérisation de ce type de facteur de transcription. Yap5 fait partie de la sous-famille *YAP* dont on connaît huit membres chez *S. cerevisiae*. Les membres de cette sous-famille contrôlent la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes en réponse à différents stimulus environnementaux (Fernandes *et al*, 1997). Du côté C-terminal de la protéine, on retrouve deux domaines riches en cystéines (CRDs). Le CRD localisé vers le centre de la protéine contient quatre cystéines, alors que le second en contient trois. Des essais transcriptionnels à l'aide de gènes rapporteurs ont démontré qu'en mutant simultanément les deux CRDs, cela entraînait une perte de la capacité d'activation de la transcription en présence de fer. Un des mécanismes possibles pour expliquer le fonctionnement de l'activité régulatrice de Yap5 est qu'en présence de fer les cystéines contenues dans les CRDs formeraient des ponts disulfures entre elles entraînant un changement conformationnel de la protéine (Li *et al*, 2008).

## 2.2. Les facteurs protéiques responsables de la régulation post-traductionnelle associée à l'homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*

### 2.2.1. Cth1/Cth2

L'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnelle impliqué dans l'homéostasie du fer a été démontré chez *S. cerevisiae*. L'analyse des résultats de biopuces à ADN comparant l'expression génique selon le statut en fer chez une souche de type sauvage montre la présence de gènes dont l'expression varie, mais en sens opposé à celle des gènes qui codent pour les transporteurs de surface (Puig *et al*, 2005). Ces gènes voient leur expression diminuer significativement en carence de fer. Ils sont régulés par la protéine Cth2. Cette protéine contient un motif de type « tandem zinc finger » (TZF) qui est caractéristique des membres de la famille de protéines de type tristétraproline (TTP). Ces protéines ont la particularité de se lier à l'ARN au niveau des régions 3' non-codantes (3'-UTR). Des membres de cette famille de protéines sont impliqués dans la régulation de la dégradation d'ARN messagers (ARNm). Afin de vérifier cette possibilité, une souche nulle pour le gène *CTH2* a été générée. Cette dernière a présenté une croissance ralentie en carence de fer (Puig *et al*, 2005). Ce phénotype supportait un rôle dans l'homéostasie du fer. Un gène homologue à *CTH2* a été identifié dans le génome de *S. cerevisiae*. Il s'agit du gène *CTH1*. La protéine Cth1 montre 46% d'identité avec celle de Cth2 (Puig *et al*, 2005). Les protéines Cth1 et Cth2 ont une taille de 325 et de 285 a.a., respectivement. Une souche possédant une délétion simple pour le gène *CTH1* ne présente pas de sensibilité à la carence en fer. Par contre, une souche déjà mutante pour le gène *CTH2* et dont son gène *CTH1* est inactivé souffre davantage d'un défaut de croissance en présence d'un chélateur de fer en comparaison avec une mutante pour le gène *CTH2* seulement (Puig *et al*, 2005). L'expression ectopique du

gène *CTH1* dans la souche nulle pour les gènes *CTH1* et *CTH2* permet de restaurer en partie la perte de fonction causé par l'inactivation de ces deux dernières composantes (Puig *et al*, 2005). *CTH1* et *CTH2* sont tous deux des gènes régulés par les facteurs de transcription Aft1 et Aft2. Leur expression est induite en carence de fer et réprimée en présence de fer (Puig *et al*, 2005, Puig *et al*, 2008).

Tel que mentionné précédemment, Cth1 et Cth2, contiennent un motif de type TZF. Le motif TZF est impliqué dans la liaison aux éléments AU riche (ARE) présent dans les régions 3'-UTR des ARNm cibles. Cette liaison entraîne la dégradation des ARNm. Ce mécanisme de régulation a été confirmé pour Cth1 et Cth2 puisque la mutation des AREs de gènes cibles stabilise ces ARNm en conditions qui induisent habituellement leur dégradation (en carence de fer) (Puig *et al*, 2005, Puig *et al*, 2008). Le sentier de dégradation de ces ARNm est en partie identifié et implique la protéine Dhh1 qui fait partie de la famille des protéines à boîte DEAD (Pedro-Segura *et al*, 2008). Cette dégradation s'effectue à l'intérieur des « cytoplasmic processing bodies » (*p-bodies*) présents à l'intérieur du cytosol des cellules (Pedro-Segura *et al*, 2008). Les « cytoplasmic processing bodies » sont retrouvés chez les cellules eucaryotes et correspondent à des régions à l'intérieur du cytoplasme où se concentrent des protéines impliquées et spécialisées dans la dégradation d'ARNm spécifiques (Kulkarni *et al*, 2010).

Des études à l'aide de biopuces à ADN montrent que l'absence de Cth2 entraîne une expression plus soutenue de certains gènes qui sont normalement éteints en carence de fer (Puig *et al*, 2005). Aussi, ces études montrent que l'expression de Cth1 ou Cth2 dans une souche nulle pour les deux gènes (*cth1Δcth2Δ*) modulent le niveau de plusieurs transcrits

(Puig *et al*, 2008). Cependant, bien que les protéines régulatrices Cth1 et Cth2 contrôlent la dégradation d'ARNm communs, plusieurs des transcrits qu'ils régulent sont exclusifs à l'une ou l'autre des deux protéines (Puig *et al*, 2008). La collection des ARNm que Cth2 régule est au moins cinq fois plus importante que celle contrôlée par Cth1. La nature des transcrits régulés par Cth1 et Cth2 suggère que dans les conditions où le fer est limitant, ces derniers qui codent pour des protéines fer-dépendantes sont dégradés. Le but serait d'économiser le fer étant donné la rareté du cofacteur dans la cellule. Cth1 et Cth2 ciblent donc principalement les ARNm des protéines impliquées dans l'entreposage du fer ou de son utilisation pour le déroulement de sentiers métaboliques pouvant être interrompus au cours du cycle cellulaire.

### **2.3. Le transport du fer dépendant des réductases**

#### **2.3.1. Fre1 à Fre7**

Les organismes possèdent des systèmes adaptés aux conditions changeantes du milieu afin d'obtenir un apport optimal en nutriments qui leur sont essentiels. Dans le cas de l'acquisition du fer, deux systèmes d'importation sont connus. Un système dit de faible affinité et un second dit de haute affinité. Le second système est lui-même divisé en deux voies : une assimilation dépendante des réductases de surface et une autre dépendante de la captation de sidérophores, qui sont de petites molécules organiques qui séquestrent le  $Fe^{3+}$  de l'environnement.

L'assimilation de fer dépendante de l'activité des réductases de surface est un moyen pour la cellule de solubiliser le fer présent dans le milieu en vue de le transporter à travers la

membrane plasmique. L'activité des réductases consiste essentiellement à réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  afin de permettre à la machinerie de transport de le faire entrer dans la cellule. La première réductase de surface à avoir été identifiée est *Fre1* (Dancis *et al*, 1990). Le gène codant pour cette protéine a été identifié à la suite d'essais de complémentation chez une souche nulle pour l'activité réductase. Une souche nulle pour le gène *FRE1* engendre un phénotype de perte de croissance sur un milieu de culture carencé en fer, ainsi qu'une forte diminution de l'activité réductase à la surface de la cellule (Dancis *et al*, 1990). Les mesures quantitatives de l'activité réductase produite par *Fre1* ont montré qu'elle est responsable de plus de 90% de l'activité réductase de surface (Dancis *et al*, 1992). L'expression du gène *FRE1* est sous le contrôle du facteur de transcription *Aft1*. Le gène est induit en carence de fer et réprimé lorsque les cellules croissent en présence de fer (Dancis *et al*, 1992, Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). Une analyse plus approfondie de la séquence protéique de *Fre1* indique que la protéine possède sept domaines transmembranaires (DTMs). La protéine contient aussi des domaines de liaison au FAD et au NADPH. Ces deux cofacteurs sont essentiels à l'activité réductase et le mécanisme d'action impliquerait un transfert d'électrons à partir du NADPH vers le  $\text{Fe}^{3+}$  pour la réduction de ce dernier (Lesuisse *et al*, 1996, Shatwell *et al*, 1996).

À la suite du séquençage du génome de *S. cerevisiae*, six nouveaux cadres de lecture codant pour des réductases ont été identifiés sur la base de leur homologie de séquence. Ces gènes ont été nommés *FRE2* à *FRE7*. Des analyses transcriptionnelles ont démontré que cinq gènes sur six sont régulés de manière fer-dépendante. De plus, le facteur de transcription *Aft1* est le principal régulateur de ces gènes (Georgatsou & Alexandraki, 1994, Georgatsou & Alexandraki, 1999, Martins *et al*, 1998). Curieusement, le gène *FRE7* est le seul locus qui

n'est pas régulé selon la concentration en fer, mais par celle du cuivre (Georgatsou *et al*, 1997, Georgatsou & Alexandraki, 1999, Martins *et al*, 1998). Pour ce qui est de leur localisation cellulaire, les protéines Frel à 4 se retrouvent à la surface des cellules, tandis que Fre6 se situe à la membrane vacuolaire. Leurs rôles en liens avec leurs localisations cellulaires seront discutés dans les sections qui suivent.

### 2.3.2. Fet3-Ftr1

L'étape suivant la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  est son transport à l'intérieur de la cellule. Ce rôle est accompli par l'action combinée de deux protéines : Fet3 et Ftr1. La première composante, Fet3, a été découverte lors d'un criblage génétique visant à restaurer le transport du fer dans une souche déficiente pour l'assimilation de ce dernier (mais possédant une activité réductase intacte) (Askwith *et al*, 1994). Le gène *FET3* code pour une protéine de 636 a.a. Étonnamment, l'analyse de sa séquence montrait la présence d'un seul DTM, suggérant une incapacité à pouvoir transporter des ions métalliques de façon autonome (Askwith *et al*, 1996). La séquence de la protéine révèle un motif homologue aux multicuivres oxydases. Certains des membres de cette famille sont responsables de l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ . L'appellation « multicuivre » vient du fait que quatre atomes de cuivre par protéine sont essentiels en tant que cofacteur pour l'activité oxydase. Le mécanisme d'action de la multicuivre oxydase est le suivant : une protéine oxyde quatre molécules de fer de façon séquentielle en utilisant des électrons provenant des atomes de cuivre qu'elle contient. Une fois les quatre atomes de fer oxydés, Fet3 réduit l'oxygène moléculaire en eau. La réaction globale catalysée par l'enzyme ferroxidase est la suivante :

$$4\text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}.$$

Le transporteur de fer de haute affinité a été identifié peu de temps après Fet3 par une approche similaire (Stearman *et al*, 1996). Le gène qui a été identifié est *FTR1* et code pour une protéine de 404 a.a. Ftr1 possède sept DTMs. Les DTMs 1 et 4 contiennent deux motifs REXLE. Ces motifs sont les sites de liaison des ions de fer. Lorsque les résidus glutamates (E) de ces motifs sont mutés, la protéine devient non-fonctionnelle et ne restaure pas la capacité pour les cellules à croître sur un milieu carencé en fer (Stearman *et al*, 1996).

Des études de localisation cellulaire ont confirmés la présence de Fet3 et Ftr1 à la surface cellulaire. De plus, ces études utilisant la microscopie à fluorescence ont démontré que l'expression d'une seule de ces protéines dans une souche nulle pour les deux gènes (*fet3Δftr1Δ*) entraînait la rétention de la protéine orpheline au réticulum endoplasmique (RE) (Stearman *et al*, 1996). Cette observation et d'autres résultats moléculaires ont montré que les deux protéines, Fet3 et Ftr1, s'assemblent lors de leur synthèse et mûrissent ensemble le long du sentier de sécrétion afin de se retrouver associées en un complexe à la surface des cellules. L'assemblage de Fet3 et Ftr1 a également été démontrée par des expériences de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Singh *et al*, 2006).

De façon attendue, les gènes codant pour Fet3 et Ftr1 font partie du régulon du fer contrôlé par Aft1 (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995). Bien que la réoxydation du fer en  $Fe^{3+}$  par Fet3 puisse paraître contradictoire par rapport à l'étape de réduction médiée par la réductase de surface, cela s'explique par le fait que le  $Fe^{3+}$  associé à des complexes hydroxydes dans l'environnement ne peut pas être utilisé directement par Ftr1 pour entrer à l'intérieur de la cellule (Askwith *et al*, 1996, Stearman *et al*, 1996).

## 2.4. Le transport du fer utilisant les récepteurs de sidérophores

### 2.4.1. Arn1/Arn2/Arn3/Arn4

Tel que mentionné précédemment, le fer peut se retrouver complexé à des sidérophores. Ces petites molécules organiques sont synthétisées, puis sécrétées par plusieurs microorganismes incluant les bactéries Gram négatives et positives, ainsi que plusieurs espèces de levures (Byers & Arceneaux, 1998). Ces composés de très faibles masses moléculaires (~1.5 kDa) possèdent une affinité très élevée pour le  $\text{Fe}^{3+}$ , ce qui permet la capture du fer dans l'environnement. La levure *S. cerevisiae*, quant à elle, ne produit pas de sidérophores, mais peut assimiler ceux produits par d'autres organismes (Lesuisse *et al*, 1987, Neilands, 1995). L'un des moyens pour récupérer le fer complexé aux sidérophores fait appel aux réductases de surface Fre1 à Fre4 (Yun *et al*, 2001). Ces dernières, grâce à leur bombardement électronique, déclenche le relâchement des ions  $\text{Fe}^{3+}$  des sidérophores en permettant la réduction de ces derniers en  $\text{Fe}^{2+}$ . Une fois relâchés, les ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont transportés via la voie de transport de haute affinité formée de Fet3-Ftr1 (Yun *et al*, 2000b). Le second moyen pour récupérer le fer complexé est d'importer les composés fer-sidérophores en entiers sans leur dissociation préalable. Les sidérophores présents dans le milieu sont d'abord captés par des récepteurs de surface. La liaison des complexes est suivie par leur internalisation par endocytose. Par la suite, deux hypothèses sont avancées. Le fer pourrait être relâché suite à sa réduction dans le cytosol ou encore, le complexe fer-sidérophore pourrait être dégradé résultant en la libération du fer.

Le premier récepteur de sidérophores à avoir été identifié découle d'une approche mettant à profit son activité de transport du ferrioxamine. Le gène *SIT1* code pour un

récepteur qui restaure la croissance d'une souche mutante incapable de croître sur un milieu n'ayant que le sidérophore ferrioxamine comme seule source de fer (Lesuisse *et al*, 1998). Par la suite, grâce à des analyses comparatives à partir du génome de *S. cerevisiae*, des gènes codant pour des protéines hautement similaires ont été identifiés. Le récepteur Taf1 est essentiel pour l'importation du triacétylfusarine (Heymann *et al*, 1999). Enb1 a comme ligand spécifique l'entérobactine (Heymann *et al*, 2000). De son côté, Arn1 permet le transport du ferrichrome (Heymann *et al*, 2000).

Au cours de cette période, une seconde équipe de recherche procédait à des analyses par biopuces à ADN. Cette étude visait à identifier de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme du fer. Parmi les gènes régulés selon le statut en fer, ceux codant pour quatre protéines homologues ont été identifiés : *ARN1*, *ARN2*, *ARN3* et *ARN4* (Yun *et al*, 2000a). Trois d'entre elles, *ARN2*, *ARN3* et *ARN4*, correspondent aux récepteurs de sidérophores *TAF1*, *SIT1* et *ENB1*, respectivement. La nomenclature des *ARN1* à *ARN4* sera employée dans les sections qui suivent pour simplifier le texte.

Selon les analyses topologiques, Arn1, Arn2, Arn3 et Arn4 contiendraient quatorze DTMs. Malgré le grand nombre de DTMs, ces protéines ne forment pas des transporteurs par lesquels les sidérophores transitent, mais agissent plutôt comme des récepteurs (Philpott, 2006). Lorsqu'exprimés, ces récepteurs ne sont pas localisés en permanence à la surface cellulaire. Il a été démontré que Arn1 et Arn3 trafiquent via un mécanisme de régulation post-traductionnel. Les données amassées actuellement sur ces protéines ont permis d'élaborer un modèle. En absence de ligands, Arn1 et Arn3 resteraient au golgi et au niveau des endosomes. Si du ferrichrome, un ligand pour Arn1 et Arn3, est présent dans le milieu,

ce dernier va pénétrer à l'intérieur de la cellule par endocytose de phase fluide. Une fois à l'intérieur, le ferrichrome atteint les endosomes où sont présents Arn1 et Arn3 et va se lier au domaine récepteur situé dans les portions C-terminales des protéines Arn1 et Arn3 (Kim *et al*, 2002, Moore *et al*, 2003). Le domaine récepteur possède une forte affinité pour son ligand ( $K_D = 8 \text{ nM}$ ). Cette liaison entraîne un changement de localisation des protéines Arn1 et Arn3 vers la membrane plasmique. Une fois situé à la surface cellulaire, le récepteur est en mesure de lier une seconde molécule au niveau de son domaine de transport. Ce deuxième domaine possède une affinité plus faible pour ce composé ( $K_D = 1.2 \text{ }\mu\text{M}$ ). Cette liaison est suivie par l'ubiquitinylation du transporteur, ce qui induit son internalisation (Kim *et al*, 2005). C'est à l'intérieur de l'endosome que le sidérophore est libéré du domaine de transport et relargué vers le cytoplasme où le fer pourra répondre aux besoins de la cellule. Actuellement, le mécanisme par lequel le sidérophore est relargué de la lumière de l'endosome vers le cytoplasme est inconnu. Le récepteur toujours actif est recyclé à la membrane plasmique pour un nouveau cycle de transport (Philpott, 2006).

#### 2.4.2. Fit1/Fit2/Fit3

Un second groupe de protéines associées au transport des sidérophores a été découvert à partir des mêmes résultats de biopuces à ADN (Yun *et al*, 2000a). Les gènes *FIT1*, *FIT2* et *FIT3* sont régulés de façon dépendante de Aft1 et Aft2, donc ils sont induits en carence de fer. La protéine Fit1 possède une taille de 528 a.a., tandis que Fit2 et Fit3 sont constitués de 153 et 204 a.a., respectivement. Les protéines Fit1 et Fit3 partagent le plus d'homologie avec 61% d'identité, incluant une séquence d'acides aminés répétitive d'environ 60 résidus. Cette séquence est présente quatre fois chez Fit1 et deux fois chez Fit3.

En plus de cette séquence répétée, les protéines Fit1, Fit2 et Fit3 contiennent une séquence signale pour leur maturation à travers le sentier de sécrétion et une séquence d'attachement de type ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Protchenko *et al*, 2001). Les protéines Fit1, Fit2 et Fit3 atteignent la membrane plasmique, puis sont transférées à la paroi cellulaire suite au clivage de leur ancre GPI. Ce processus s'accompagne d'une liaison au  $\beta$ -1-6-glycan qui est un constituant de la paroi cellulaire. La localisation des protéines Fit1, Fit2 et Fit3 a été confirmée par microscopie à fluorescence (Protchenko *et al*, 2001).

Des analyses quantitatives comparant diverses souches ont été menées. L'étude d'une souche mutante pour les trois composantes (*fit1* $\Delta$ *fit2* $\Delta$ *fit3* $\Delta$ ) n'a pas d'effet sur l'efficacité du transport du fer de haute affinité. Cette même souche présente cependant une diminution d'environ 50% pour la quantité de ferrichrome présent à la surface des cellules. L'abolition de l'un ou l'autre des gènes *FIT* est suffisant pour provoquer une perte significative de l'acquisition des sidérophores à l'intérieur des cellules (Protchenko *et al*, 2001). Ces résultats démontrent l'implication spécifique des protéines Fit1, Fit2 et Fit3 dans le transport des sidérophores. Leur rôle consiste à retenir les sidérophores dans la paroi cellulaire. Ceci a pour effet d'augmenter l'efficacité du transport au niveau de la membrane plasmique via les récepteurs Arn1 à Arn4.

## **2.5. Le transport du fer de faible affinité**

### **2.5.1. Fet4**

En plus du système d'acquisition du fer de haute affinité, *S. cerevisiae* possède un système d'importation du fer de faible affinité. Des observations expérimentales ont permis

l'identification de cette seconde voie. Par exemple, lorsque les composantes du transport de haute affinité *FET3* et *FTR1* sont absentes, les levures sont capables de croître sur un milieu supplémenté en fer à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Askwith *et al*, 1994). Un autre exemple est qu'il a été observé que la vitesse de transport du fer chez les cellules sauvages varie selon sa concentration et consiste en une réponse biphasique, ce qui indique la présence de deux systèmes distincts, un premier de haute affinité ( $K_m = 0.15\mu\text{M}$ ) et un second de faible affinité ( $K_m = 30\mu\text{M}$ ) (Eide *et al*, 1992).

Le transporteur impliqué dans la voie d'acquisition du fer de faible affinité a été identifié suite à un criblage génétique. La surexpression de l'ADN complémentaire du gène *FET4* permet de rétablir la croissance de la souche nulle pour le gène *FET3* sur un milieu carencé en fer (Dix *et al*, 1994). La protéine Fet4 contient six DTMs. L'activité de transport du fer par Fet4 a été confirmée puisque sa surexpression chez une souche de levure augmente le contenu en radio-isotope  $^{59}\text{Fe}$  de deux à trois fois à comparé au contenu en  $^{59}\text{Fe}$  d'une cellule sauvage (Dix *et al*, 1994). La délétion du gène *FET4* abolie presque en totalité l'activité de transport du fer de faible affinité (Dix *et al*, 1994). En accord avec son rôle, les résultats de microscopie à fluorescence ont montré la présence de Fet4 à la membrane plasmique (Dix *et al*, 1997). La protéine Fet4 montre une préférence d'activité de transport pour le fer réduit ( $\text{Fe}^{2+}$ ) plutôt que la forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ). L'activité de transport de Fet4 n'est pas exclusive au fer puisque des essais ont montré que d'autres métaux de transition peuvent aussi servir de substrat à ce transporteur comme le  $\text{Zn}^{2+}$ , le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Cd}^{2+}$  et le  $\text{Co}^{2+}$  (Dix *et al*, 1994, Hassett *et al*, 2000).

L'expression du gène *FET4* est faiblement régulée selon la concentration en fer (Dix *et al.*, 1997). Son expression est également régulée par la présence ou l'absence de l'oxygène (Jensen & Culotta, 2002). En absence d'oxygène, *FET4* est fortement exprimé. Le complexe Fet3-Ftr1 est non-fonctionnel en absence d'oxygène puisque ce dernier est un cofacteur essentiel pour l'activité de la multicuivre oxydase. Dans cette condition, *FET3* est réprimé. Ces observations suggèrent que Fet4 pourrait être le principal transporteur de fer en condition d'hypoxie. Le contenu en fer total mesuré par spectroscopie d'absorption atomique ne varie pas chez une souche sauvage cultivée en condition aérobie versus anaérobie. Le contenu en fer diminue cependant de 80% chez une souche nulle pour *FET4* dans des conditions pauvres en oxygène (Jensen & Culotta, 2002). La régulation oxygène-dépendante du gène *FET4* implique le répresseur transcriptionnel Rox1. Deux séquences de liaison de Rox1 sont présentes dans le promoteur du gène *FET4* (Jensen & Culotta, 2002). Aft1 semble également participer à la régulation fer-dépendante de l'expression du gène *FET4*. L'induction de l'expression de *FET4* en carence de fer et en absence d'oxygène n'est pas seulement l'effet additif des deux conditions, mais serait plutôt le résultat d'activités synergiques (Jensen & Culotta, 2002).

### 2.5.2. Smf1/Smf2

En absence de composants clés impliqués dans les voies d'acquisition de haute et de faible affinité du fer (*fet3Δfet4Δ*), *S. cerevisiae* est encore viable, mais nécessite un milieu fortement supplémenté en fer (Dix *et al.*, 1994). Cette observation suppose que l'importation du fer à l'intérieur de la cellule peut s'effectuer via d'autres protéines. Des transporteurs responsables de cette activité résiduelle ont initialement été identifiés pour leur rôle dans

l'acquisition du manganèse (Supek *et al*, 1997). Les protéines Smf1 et Smf2 font partie de la famille de transporteurs d'ions divalents de type Nramp. Ils agissent en tant que symporteurs de protons et de métaux divalent ( $H^+/Me^{2+}$ ). Smf1 et Smf2 peuvent servir au transport de substrats variés tels le  $Mn^{2+}$  et le  $Fe^{2+}$ , mais aussi le  $Zn^{2+}$ , le  $Cu^{2+}$ , le  $Co^{2+}$ , le  $Cd^{2+}$  et le  $Ni^{2+}$  (Chen *et al*, 1999, Liu *et al*, 1997, Supek *et al*, 1997). Les protéines Smf1 et Smf2 partagent 54% d'identité entre elles et possèdent toutes deux onze DTMs. Quant à leur taille, Smf1 est constituée de 575 a.a., tandis que Smf2 possède 549 a.a.

L'affinité de Smf1 pour le  $Fe^{2+}$  a été démontrée dans un modèle d'oocytes (*Xenopus laevis*) exprimant ce transporteur. Smf1 possède un  $K_m$  de 2.2  $\mu M$  pour l'ion  $Fe^{2+}$  (Chen *et al*, 1999). Lorsque Smf1 est surexprimée dans une souche de *S. cerevisiae* où *FET3* et *FET4* sont inactivés, l'accumulation intracellulaire de fer radioactif est environ huit fois supérieur à la souche de type sauvage (Cohen *et al*, 2000). La localisation cellulaire de ces deux protéines a été déterminée par microscopie à fluorescence. Smf1 est visible à la membrane plasmique, tandis que Smf2 se retrouve au niveau de membranes formant des vésicules intracellulaires (Portnoy *et al*, 2000). Ce résultat suggère que le rôle de Smf1 dans l'importation des métaux à l'intérieur des cellules serait prépondérant sur celui de Smf2. Cela est également en accord avec l'observation qu'une souche nulle pour le gène *SMF1* est plus sensible à la présence de chélateurs d'ions métalliques qu'une souche nulle pour le gène *SMF2* (Cohen *et al*, 2000). La contribution de ces deux transporteurs dans l'homéostasie du fer serait toutefois minime étant donné que leur expression n'est pas régulée selon le statut en fer comme c'est le cas pour les autres composantes décrites précédemment (Liu *et al*, 1997, Liu & Culotta, 1999).

## 2.6. L'entreposage du fer à la vacuole

L'organite le plus volumineux à l'intérieur de *S. cerevisiae* est la vacuole. La vacuole est le lieu de dégradation des macromolécules. Elle joue un rôle important dans le recyclage des nutriments. Elle peut servir également de site d'entreposage pour les oligo-éléments tels les ions divalents essentiels (Ca, Cu, Fe et Zn) (Kucharczyk & Rytka, 2001). L'un des rôles de la vacuole est de détoxifier la cellule des ions potentiellement toxiques comme le plomb ou le cadmium et de prévenir l'excès d'ions essentielles comme le fer ou le cuivre (Raguzzi *et al*, 1988, Szczyпка *et al*, 1994, Van Ho *et al*, 2002).

L'un des compartiments cellulaires où l'on retrouve la plus forte concentration en fer est la vacuole (Raguzzi *et al*, 1988). Des mesures quantitatives du contenu en fer radioactif montrent qu'en augmentant de vingt fois la concentration extracellulaire en fer, son niveau reste stable dans le cytoplasme alors qu'il s'élève de six à neuf fois dans la vacuole (Raguzzi *et al*, 1988). L'intérieur de la vacuole étant un environnement oxydatif, le fer se retrouve sous forme  $Fe^{3+}$  et ne serait pas libre, mais lié à des complexes hydroxydes ou à des chaînes de polyphosphates (Raguzzi *et al*, 1988). La vacuole n'est pas simplement un site d'entreposage passif du fer en excès. Le fer contenu dans cette dernière peut être utilisé lorsque la cellule se retrouve en condition de carence pour cet élément. L'une des preuves démontrant que le fer vacuolaire est métaboliquement redistribué est que 70% du fer qui y est entreposé va être employé lors du passage d'un métabolisme de fermentation à un métabolisme de respiration chez la levure (Raguzzi *et al*, 1988). Les protéines impliquées dans l'homéostasie du fer au niveau de la vacuole seront décrites dans cette section.

### 2.6.1. Ccc1

Le transporteur responsable de l'importation du fer dans la vacuole est Ccc1. La protéine Ccc1 fait une taille de 322 a.a. et possède trois DTMs. La découverte du gène *CCCI* dans l'homéostasie du fer est le résultat d'un criblage génétique visant à restaurer la croissance sur un milieu non-fermentable d'une souche nulle pour le gène *YFH1* (Chen & Kaplan, 2000). L'utilisation d'un milieu non-fermentable oblige la levure à utiliser la voie métabolique de la respiration. Yfh1 est une protéine mitochondriale. En son absence, la mitochondrie accumule un surplus de fer. Ce fer génère des radicaux oxygénés qui causent des mutations dans l'ADN mitochondrial, causant ultimement la perte des fonctions de respiration de la cellule. La surexpression du gène *CCCI* dans la souche *YFH1* nulle limite l'accumulation de fer dans la mitochondrie, détournant les ions métalliques vers la vacuole, ce qui permet à la cellule de conserver la faculté de croître sur un milieu non-fermentable (Chen & Kaplan, 2000). On observe chez une souche surexprimant le gène *CCCI* une augmentation de l'expression des gènes du régulon du fer. Cela indique que le transporteur Ccc1 entraîne une diminution du fer cytosolique disponible, ce qui cause l'activation des régulateurs transcriptionnels Aft1 et Aft2 en réponse à la carence en fer dans le cytoplasme (Chen & Kaplan, 2000, Li *et al*, 2001). Une souche nulle pour le gène *CCCI* présente un phénotype d'hypersensibilité et ne peut pas croître sur un milieu très riche en fer, démontrant son implication dans la séquestration et la protection contre l'excès de fer pouvant être présent dans le cytoplasme des cellules. Ccc1 agit donc en transportant le fer à l'intérieur des vacuoles où il y est entreposé dans un état non toxique pour la cellule (Li *et al*, 2001). L'expression de la protéine de fusion Ccc1 contenant deux répétitions de l'épitope « FLAG » (Ccc1-FLAG<sub>2</sub>) a permis la détection de la protéine à la surface membranaire de la vacuole

(Li *et al*, 2001). Des mesures quantitatives du fer par spectroscopie d'absorption atomique sur des isolats de vacuoles montrent que la surabondance de *Ccc1* augmente le contenu des vacuoles en fer jusqu'à cinq fois (comparativement à la souche de type sauvage). Les vacuoles provenant d'une souche dans laquelle le gène *CCC1* est inactivé voient leur contenu en fer diminuer d'environ trois fois (Li *et al*, 2001, Singh *et al*, 2007). Ces résultats additionnés avec ceux de travaux antérieurs indiquent que *Ccc1* transporte le fer à l'intérieur de la vacuole en plus d'autres ions divalents tels le manganèse et le calcium (Chen & Kaplan, 2000, Lapinskas *et al*, 1996, Li *et al*, 2001).

Au moins deux régulateurs contrôlent l'expression du gène codant pour *Ccc1*. Le premier, *Yap5*, induit l'expression du gène *CCC1* en réponse au fer (Li *et al*, 2008). Le second, *Cth2* (ainsi que *Cth1*, quoique beaucoup plus faiblement), va se lier à la région 3'-UTR du transcrit de *CCC1* et induit sa dégradation en réponse à la carence en fer (Li *et al*, 2008, Puig *et al*, 2005, Puig *et al*, 2008). Le portrait global est que *Ccc1* est peu ou pas présent en carence de fer, mais très abondant en présence de fer afin de favoriser l'entreposage vacuolaire de fer.

### 2.6.2. *Fet5-Fth1*

L'une des voies empruntées par le fer pour sortir de la vacuole implique le complexe formé des protéines *Fet5* et *Fth1*. Ce complexe est homologue au complexe de transport du fer de haute affinité présent à la surface de la cellule comprenant les protéines *Fet3* et *Ftr1*. *Fet5* est une multicuivre oxydase similaire à *Fet3*. *Fth1* est une perméase transportant le fer qui possède sept DTMs. Donc, *Fth1* montre une topologie (prédite) similaire à la protéine

Ftr1 (Stearman *et al*, 1996). L'alignement des séquences de Fth1 et Ftr1 montre que Fth1 possède deux motifs REXXE qui se retrouvent également au niveau de Ftr1 (Urbanowski & Piper, 1999). Les motifs REXXE sont impliqués dans le transport du fer. Le complexe Fet5-Fth1 a été localisé à la membrane vacuolaire par microscopie à fluorescence (Urbanowski & Piper, 1999). De la même façon que pour Fet3 et Ftr1, Fet5 et Fth1 s'assemblent d'abord dans le réticulum endoplasmique (RE) avant d'atteindre la surface vacuolaire. Les études de microscopie ont démontré que si l'une des deux protéines n'est pas exprimée, l'autre est retenue au RE (Urbanowski & Piper, 1999).

Tout comme pour les gènes *FET3* et *FTR1*, l'expression des gènes *FET5* et *FTH1* est sous le contrôle des facteurs de transcription Aft1 et Aft2. Ils sont induits lorsque le fer est en concentration insuffisante pour les besoins cellulaires. L'analyse de phénotypes de croissance montre qu'une souche nulle pour *FET5* et *FTH1* est incapable de faire la transition entre la fermentation et la respiration. L'adaptation métabolique rapide nécessaire au passage de la fermentation à la respiration requiert un apport supplémentaire de fer provenant de la vacuole, qui lui, est normalement libéré par le complexe Fet5-Fth1 (Urbanowski & Piper, 1999). Les vacuoles isolées de cellules surexprimant Fet5, Fth1 et Ccc1 contiennent environ 40% moins de fer que celles provenant de cellules surexprimant uniquement Ccc1 (Singh *et al*, 2007). Ces résultats indiquent de manière plus directe que le complexe Fet5-Fth1 et Ccc1 travaillent en directions opposées, le premier complexe permettant la sortie du fer de la vacuole, alors que Ccc1 permet son entrée dans la vacuole.

### 2.6.3. Smf3

Une seconde voie d'exportation du fer vacuolaire existe chez *S. cerevisiae*. Cette voie implique Smf3, une protéine homologue à la famille de transporteur de type Nramp. Tout comme Smf1 et Smf2, Smf3 contient onze DTMs. La protéine de fusion Smf3-HA<sub>2</sub> est présente à la membrane vacuolaires (Portnoy *et al*, 2000). De façon similaire au gène *FET4*, le gène *SMF3* est induit par la carence en fer et des conditions de croissance hypoxiques (Jensen & Culotta, 2002, Portnoy *et al*, 2000, Portnoy *et al*, 2002). L'utilisation de la spectroscopie d'absorption atomique pour mesurer le contenu en fer des vacuoles provenant d'une souche nulle pour *SMF3* indique que ces dernières contiennent environ deux fois plus de fer que celles provenant d'une souche de type sauvage (Singh *et al*, 2007). Les concentrations de fer mesurées à partir de vacuoles purifiées provenant d'une souche surexprimant à la fois Smf3 et Ccc1 sont significativement inférieures comparativement au contenu en fer de vacuoles isolées d'une souche surexprimant seulement le gène *CCC1* (Singh *et al*, 2007). Ces résultats suggèrent que tout comme le complexe Fet5-Fth1, Smf3 exporte le fer présent à l'intérieur de la vacuole vers l'extérieur pour le redistribuer dans le cytoplasme de la cellule.

### 2.6.4. Fre6

Il a été démontré que les transporteurs de surface, Fet3-Ftr1 et Smf1/Smf2, nécessitent la présence d'une réductase afin d'obtenir le fer sous sa forme réduite afin de la transporter à l'intérieur de la cellule. Étant donné que l'intérieur de la vacuole est un environnement à pH très bas, le fer vacuolaire est prédit comme étant sous forme Fe<sup>3+</sup>. Pour

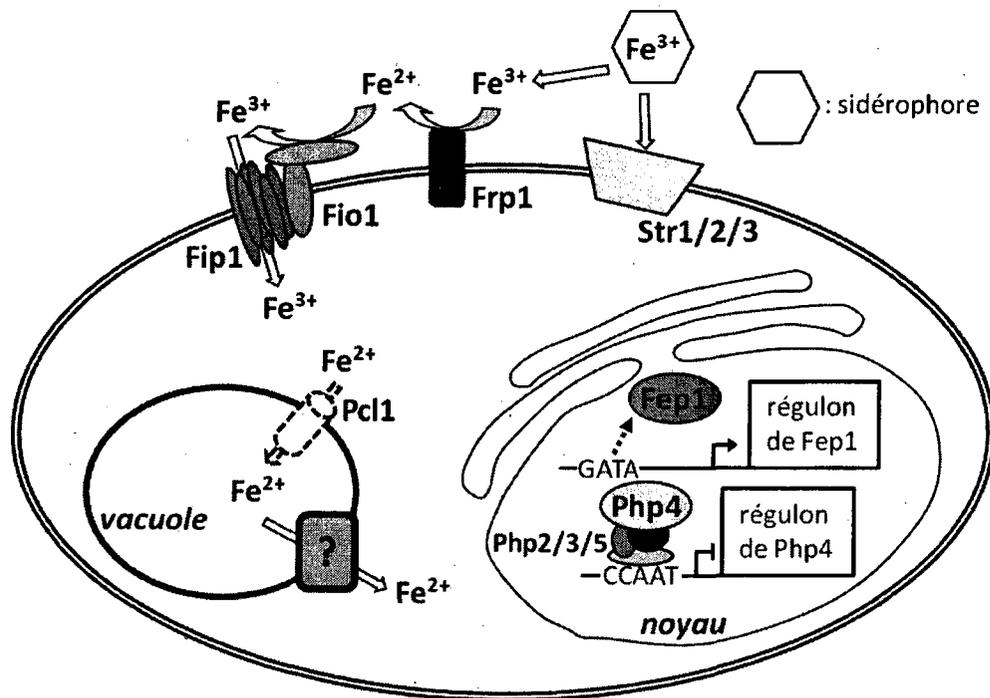
être libéré et ultérieurement transporté hors de la vacuole, le  $\text{Fe}^{3+}$  doit subir une étape de réduction par une réductase présente à la membrane vacuolaire. Parmi les sept réductases identifiées chez *S. cerevisiae*, Fre6 a été localisée à la surface de la vacuole (Singh *et al*, 2007). Le gène *FRE6* est l'un des six gènes de cette famille dont l'expression est régulée selon le statut en fer via Aft1 et Aft2 (Georgatsou & Alexandraki, 1994, Georgatsou & Alexandraki, 1999, Martins *et al*, 1998). La protéine Fre6 avec ses sept DTMs partage 35% d'identité avec la réductase Fre2. La séquence polypeptidique de Fre6 possède les domaines de liaison au FAD et au NADPH essentiels pour son activité ferri-réductase (Georgatsou & Alexandraki, 1999, Martins *et al*, 1998).

Différentes souches ont été utilisées pour l'isolement de vacuoles suivie de la quantification du fer vacuolaire par spectroscopie d'absorption atomique. Lorsque l'expression de *FRE6* est abolie, le fer présent dans les vacuoles est trois fois supérieur comparativement à la souche de type sauvage (Singh *et al*, 2007). La surexpression de Ccc1, afin de charger les vacuoles en fer, combinée avec la surexpression des composantes d'exportation du fer vacuolaire, Fet5-Fth1 ou Smf3, entraîne une accumulation du fer vacuolaire de plus du double lorsque le gène *FRE6* est muté comparativement à lorsqu'il est normalement exprimé (Singh *et al*, 2007). Ces résultats suggèrent fortement la nécessité de l'activité de la réductase Fre6 afin que Smf3 et le complexe Fet5-Fth1 puissent obtenir le fer à l'état réduit pour être transporté hors de la vacuole. Cela suggère également que le fer contenu à l'intérieur de la vacuole est sous forme  $\text{Fe}^{3+}$ .

### 3. L'organisme modèle *Schizosaccharomyces pombe*

Outre *S. cerevisiae*, d'autres levures sont employées pour comprendre les mécanismes homéostatiques des métaux. Parmi celles-ci, on retrouve la levure *Schizosaccharomyces pombe*. L'intérêt d'utiliser *S. pombe* comme modèle d'étude est justifié par le fait que le degré d'homologie de l'ensemble de ses gènes est plus près des eucaryotes supérieurs que ne l'est celui de *S. cerevisiae*. D'autres propriétés intrinsèques à *S. pombe* se rapprochent davantage à celles des eucaryotes supérieurs. Par exemple, la division cellulaire est binaire via la formation d'un septum. Plus de la moitié des gènes de *S. pombe* possèdent des introns. Tout comme les cellules animales et celles des plantes, le mécanisme d'ARN interférence est fonctionnel chez *S. pombe*, ce qui n'est pas le cas chez *S. cerevisiae*. Les modifications post-traductionnelles s'apparentent davantage à celles retrouvées chez les cellules animales à comparer à celles que *S. cerevisiae* utilisent pour modifier ses protéines (Chang & Nurse, 1996, Takegawa *et al*, 2009). Il a aussi été suggéré que la morphologie des organites de *S. pombe* se rapproche davantage de celle des eucaryotes supérieurs. À titre d'exemple, les vacuoles de *S. pombe*, qui seraient l'équivalent fonctionnel des lysosomes chez les eucaryotes supérieurs, sont présentes sous forme de petites vésicules membraneuses. Une cellule peut en contenir plusieurs dizaines. D'un point de vue morphologique, ceci se rapproche davantage des cellules des eucaryotes supérieurs que de la levure *S. cerevisiae* dans laquelle seulement une à trois vacuoles est observée, occupant jusqu'à 75% du contenu cellulaire (Takegawa *et al*, 2003). Tout comme *S. cerevisiae*, l'accélération des découvertes entourant *S. pombe* est en grande partie due à l'accessibilité à de nombreuses données issues du séquençage de son génome (Hertz-Fowler *et al*, 2004, Wood *et al*, 2002). Jusqu'à maintenant un certain nombre de composantes

moléculaires ont été identifiées et caractérisées chez cet organisme. Ces dernières sont illustrées à la figure 3 et seront décrites plus en détails dans les sections qui suivent.



**Figure 3. Bases moléculaires de la réponse à la carence en fer chez *S. pombe*.**

En carence de fer, le répresseur transcriptionnel Fep1 est inactif permettant l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Le système de transport du fer à la surface des cellules est formé de la réductase Frp1, du complexe de haute affinité Fio1-Fip1 et des récepteurs de sidérophores Str1, Str2 et Str3. Dans cette condition, le répresseur transcriptionnel Php4 est actif et inhibe l'expression des gènes impliqués dans la séquestration ou l'utilisation du fer. Le transporteur Pcl1 n'est plus exprimé, causant l'arrêt de l'import du fer dans la vacuole. La protéine responsable de l'export du fer de la vacuole vers le cytoplasme reste à être identifiée.

### 3.1. La régulation transcriptionnelle du transport du fer chez *S. pombe*

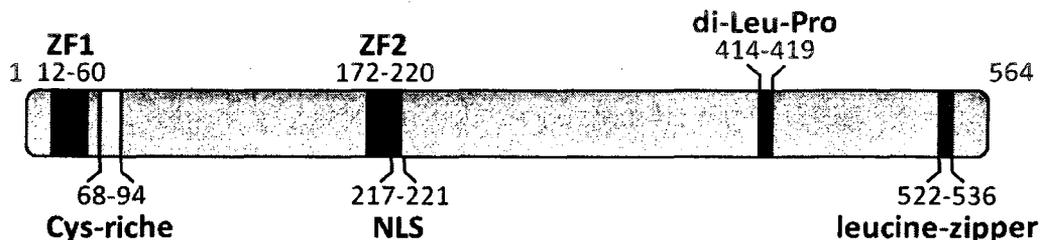
#### 3.1.1. Fep1

Tout comme chez *S. cerevisiae*, l'expression des gènes impliqués dans la réduction et le transport du fer chez *S. pombe* varie en fonction de la concentration intracellulaire en fer. Chez les deux organismes, ces gènes sont fortement transcrits lors d'une carence en fer, tandis que leur transcription est réprimée en présence de fer. L'analyse comparative du génome de *S. pombe* dans le but d'identifier une protéine homologue au facteur de transcription Aft1 de *S. cerevisiae* a été infructueuse, suggérant un mécanisme de régulation distinct (Pelletier *et al*, 2002). Un examen approfondi des régions promotrices des gènes responsables de l'entrée du fer dans la cellule à l'aide d'un programme bioinformatique a permis d'identifier une séquence commune retrouvée au niveau des promoteurs régulés de façon fer-dépendante. Cette séquence montre la composition suivante :  $^A/T$ GATAA (Pelletier *et al*, 2002). Ce type de séquence, aussi appelé élément GATA, est habituellement reconnu par la famille des facteurs de transcription de type GATA. Des analyses subséquentes ont permis d'identifier quatre gènes pouvant potentiellement coder pour des facteurs de transcription de type GATA. Parmi ces derniers, l'un codé par le cadre de lecture *SPAC23E2.01* a pu être identifié comme étant le bon facteur de transcription étant donné que son inactivation entraîne une expression soutenue, peu importe le statut en fer, des gènes d'acquisition du fer (Pelletier *et al*, 2002). Le gène codant pour ce facteur de transcription a été appelé *fep1*<sup>+</sup> pour « Fe protein 1 ». La souche mutante pour le gène *fep1*<sup>+</sup> présente une augmentation de l'activité réductase de surface et une sensibilité prononcée à la phléomycine, un antibiotique qui cause des cassures à l'ADN en présence d'un excès de fer

et en condition aérobie (Pelletier *et al*, 2002). Tous ces phénotypes disparaissent suite à l'insertion d'un allèle *fep1*<sup>+</sup> fonctionnel dans la souche *fep1*Δ mutante (Pelletier *et al*, 2002). Des essais *in vitro* de rétention sur gel (EMSA) ont démontré que la protéine de fusion MBP-Fep1 se lie spécifiquement aux éléments GATA en présence de fer (Pelletier *et al*, 2002). *In vivo*, Fep1 agit comme répresseur transcriptionnel. Il est activé en présence de fer.

Le gène *fep1*<sup>+</sup> est exprimé en présence d'un surplus de fer et en conditions basales (740 nM Fe) de culture. En présence du chélateur de fer, 2,2'-dipyridyl (Dip), le gène *fep1*<sup>+</sup> est réprimé (Jbel *et al*, 2009, Mercier *et al*, 2008). Des observations en microscopie à fluorescence ont montré que Fep1-GFP, exprimé sous le contrôle de son propre promoteur ou d'un promoteur inductible indépendant du fer, se localise de façon constitutive au noyau (Jbel *et al*, 2009, Pelletier *et al*, 2005). Ces informations indiquent que l'activité régulatrice de Fep1 n'est pas contrôlée par un changement de localisation cellulaire comme observé pour Aft1 (Ueta *et al*, 2003, Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002).

La protéine Fep1 est composée de deux doigts de zinc (ZFs) de type Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>. Celui le plus près de l'extrémité N-terminale (a.a. 12 à 60) est nommé ZF1. Le deuxième doigt de zinc (a.a. 172 à 220) est nommé ZF2. Entre les deux ZFs, plus précisément entre les a.a. 68 à 94, se retrouve une région contenant quatre cystéines hautement conservées. Un NLS putatif, KRRKR, se situe entre les a.a. 217 à 221. Du côté C-terminal de Fep1, on note la présence d'un motif di-leucine-proline (<sup>414</sup>Leu-Pro-Pro-Ile-Leu-Pro<sup>419</sup>) ainsi qu'une répétition de deux heptades formant un « leucine-zipper » (entre les a.a. 522 à 536). L'organisation de la protéine Fep1 est représentée à la figure 4.



**Figure 4. Représentation du répresseur transcriptionnel Fep1.**

La protéine Fep1 est constituée de deux doigts de zinc nommés ZF1 et ZF2. Entre ZF1 et ZF2 se trouve une région contenant quatre résidus cystéines hautement conservés (Cys-riche). ZF2 est bordé par un signal potentiel de localisation nucléaire (NLS) correspondant à la séquence KRRKR. Fep1 contient également un motif di-leucine-proline (di-Leu-Pro) composé des résidus LPPILP. Un domaine de type *leucine-zipper* est présent à l'extrémité C-terminale de Fep1 et serait impliqué dans son homo-dimérisation et sa capacité à réprimer la transcription.

La portion N-terminale de Fep1 (a.a. 1 à 241) est responsable de sa liaison à l'ADN, ainsi que de sa capacité à jauger le fer dans la cellule (Jbel *et al*, 2009, Pelletier *et al*, 2002, Pelletier *et al*, 2005). La fusion de cette portion protéique de Fep1 avec le domaine activateur VP16 permet de produire une protéine chimérique dotée d'un domaine d'activation transcriptionnel fer-dépendant dans un système simple-hybride (Jbel *et al*, 2009). Le motif ZF2 est principalement responsable de la liaison aux éléments GATA. Cela a été démontré *in vitro* par une perte totale de liaison à l'ADN lorsque ZF2 est muté (Pelletier *et al*, 2005). Le rôle de ZF1 est d'augmenter l'affinité de Fep1 pour l'ADN. La version tronquée de Fep1 (a.a. 60 à 564), sans ZF1, possède 5,2 fois moins d'affinité pour l'ADN et ne conserve que 32% de sa capacité à se lier à la chromatine *in vivo* (Jbel *et al*, 2009, Pelletier *et al*, 2005). Cette liaison résiduelle est toutefois insuffisante pour réprimer la transcription des gènes cibles (Jbel *et al*, 2009, Pelletier *et al*, 2005). Les quatre cystéines contenues entre les deux ZFs sont essentielles à la fonction de liaison à l'ADN du facteur de transcription. Leur

présence est hautement conservée chez d'autres répresseurs de type GATA ayant une activité similaire à celle de Fep1 (Haas *et al*, 1999, Haas, 2003, Pelletier *et al*, 2002). *In vivo*, la mutation de deux des quatre cystéines montre que Fep1 n'est plus capable de se lier à la chromatine en présence de fer (Jbel *et al*, 2009). La région contenant les a.a. 1 à 241 est aussi responsable de la localisation nucléaire étant donné que ce domaine se localise au noyau lorsqu'il est exprimé seul dans les cellules (Pelletier *et al*, 2005). L'expression de la partie C-terminale de la protéine (a.a. 262 à 564) fusionnée à la GFP n'est visible que dans le cytoplasme des cellules (Pelletier *et al*, 2005).

Du côté de la portion C-terminale de Fep1, le « leucine-zipper » situé entre les a.a. 522 et 536 est nécessaire et suffisant pour permettre l'homodimérisation du facteur de transcription. La mutation des résidus hydrophobes du motif empêche la formation *in vitro* de dimères de Fep1 (Pelletier *et al*, 2005). En l'absence de formation du dimère, la protéine Fep1 subit une perte importante de sa capacité à réprimer l'expression des gènes cibles comparativement à la protéine sauvage (Pelletier *et al*, 2005). Pour ce qui est du motif di-leucine-proline qui se situe entre les a.a. 414 à 419, il est impliqué dans l'établissement de l'interaction de Fep1 avec ses corépresseurs Tup11 et Tup12. Les corépresseurs Tup11 et Tup12 agissent de concert avec Fep1 pour réprimer les gènes responsables de l'entrée du fer dans la cellule. Une souche mutante pour les deux corépresseurs (*tup11Δtup12Δ*) exprime les gènes cibles de Fep1 de façon soutenue et ce, même en présence de fer et du facteur de transcription Fep1 (Pelletier *et al*, 2002). Les versions tronquées de Fep1, ne contenant que les a.a. 319 à 564, de même que le domaine minimal 405-541, interagissent avec Tup11 lors d'essais *in vivo* de type « double-hybride », de co-immunoprécipitation (Co-IP) ou d'essais *in vitro* de type « GST-pull down » (Znaidi *et al*, 2004). Sans la région C-terminale 360-564,

Fep1 se lie de manière fer-dépendante à l'ADN, mais ne joue plus son rôle de répresseur transcriptionnel (Jbel *et al*, 2009).

### 3.1.2. Php4

Il existe également chez *S. pombe* un mécanisme prévenant l'utilisation non-essentielle de fer lorsque ce dernier est en carence. La protéine au cœur de cette régulation est le répresseur transcriptionnel Php4. L'analyse transcriptionnelle de gènes codant pour des protéines impliquées dans la séquestration ou l'utilisation du fer montre que ceux-ci sont exprimés lorsque le fer est disponible, mais fortement réprimés lorsque la cellule se retrouve en condition de rareté pour cet élément. Une analyse plus poussée des régions 5'-UTR de ces gènes a permis d'identifier une séquence régulatrice de type CCAAT (Mercier *et al*, 2006). Cette séquence régulatrice est connue pour être liée par l'hétérocomplexe CCAAT formé des protéines Php2, Php3 et Php5 (McNabb *et al*, 1997). La protéine Php2 est responsable de la reconnaissance et de la liaison du complexe à la séquence CCAAT. La délétion du gène *php2*<sup>+</sup> entraîne la perte de la régulation des gènes cibles. L'expression de ces gènes en carence de fer est aussi plus élevée que chez la souche de type sauvage (Mercier *et al*, 2006). À l'époque, ces résultats suggéraient que le complexe pourrait fonctionner à l'aide d'un quatrième facteur pour réprimer la transcription en carence de fer. *S. cerevisiae* possède aussi un complexe CCAAT, cependant il n'est pas impliqué dans l'homéostasie du fer (McNabb & Pinto, 2005, Pinkham & Guarente, 1985). Par contre, il comporte quatre protéines et le domaine d'interaction entre cette quatrième protéine et le complexe est caractérisée (McNabb & Pinto, 2005). Une analyse bioinformatique de la base de données du génome de *S. pombe* a permis d'identifier une protéine contenant ce domaine d'interaction (Sybirna *et*

*al*, 2005). Cette protéine de 295 a.a. a été identifiée comme étant Php4. L'implication de Php4 dans la régulation dépendante du fer a d'abord été confirmée chez une souche mutante (*php4Δ*), chez laquelle on observe une perte de répression des gènes cibles en conditions de carence en fer. L'interaction de Php4 avec le complexe CCAAT a été démontré via l'utilisation d'un agent pontant, ce qui a permis de détecter le complexe formé des quatre protéines, soit Php2, Php3, Php4 et Php5 (Mercier *et al*, 2006).

Afin de comprendre le mécanisme de régulation fer-dépendant du complexe CCAAT, différentes approches ont été empruntées. L'analyse transcriptionnelle des gènes *php2<sup>+</sup>*, *php3<sup>+</sup>*, *php4<sup>+</sup>* et *php5<sup>+</sup>* montre que l'expression de *php4<sup>+</sup>* est régulée par le fer de façon *Fep1*-dépendante. Par contre, l'expression des gènes *php2<sup>+</sup>*, *php3<sup>+</sup>* et *php5<sup>+</sup>* est constitutive et invariable (Mercier *et al*, 2006). L'expression permanente de Php4 dans la souche *fep1Δ* ne génère pas, toutefois, une répression des gènes cibles en présence de fer, suggérant l'existence d'un mécanisme post-transcriptionnel afin d'inactiver la protéine Php4 en réponse à une concentration élevée de fer (Mercier *et al*, 2008). La capacité de Php4 à réprimer l'expression uniquement en carence en fer a été démontrée par une approche de type « simple-hybride ». La protéine de fusion GAL4-Php4 exprimée constitutivement se lie à l'ADN via la portion GAL4. Toutefois, c'est la portion Php4 qui est responsable de la répression de la transcription du gène rapporteur et ce, uniquement en carence de fer (Mercier *et al*, 2008).

La localisation de la protéine GFP-Php4 varie selon le statut en fer. En carence de fer, lorsque la protéine est active, elle se localise au noyau. En présence de fer, le « pool » nucléaire de Php4 est exporté en dehors du noyau vers le cytoplasme (Mercier & Labbé,

2009). Ce phénomène se produit uniquement avec les ions de fer. Cette observation a mené à l'identification du NES de Php4. Le NES est formé d'une région contenant quatre leucines, entre les a.a. 93 à 100 de Php4. L'exportine responsable de l'exportation de Php4 est Crm1. La mutation du NES entraîne la rétention de Php4 au noyau (Mercier & Labbé, 2009).

La capacité de la protéine Php4 à sentir la présence de fer au niveau post-transcriptionnel implique le glutathion (GSH). Une souche mutante pour la synthèse du GSH (*gcs1Δ*) empêche l'inactivation de Php4 par le fer (Mercier *et al*, 2008). Une protéine effectrice située en aval dans le sentier de la réponse au fer est la protéine monothiole glutarédoxine Grx4. Php4 et Grx4 interagissent l'une avec l'autre dans une approche de type « double-hybride » (Mercier & Labbé, 2009). En absence de Grx4, Php4 reste localisée au noyau et réprime la transcription des gènes de façon constitutive et ce, même en présence de fer (Mercier & Labbé, 2009). Le mécanisme exact par lequel Grx4 inhibe l'activité de Php4 en réponse au fer reste à définir.

Une étude par biopuces à ADN permettant de comparer l'expression génique d'une souche de type sauvage à celle possédant une délétion pour le gène *php4*<sup>+</sup> a été réalisée afin de déterminer tous les gènes régulés par Php4. Les résultats indiquent que Php4 est responsable de la répression transcriptionnelle de 86 gènes (Mercier *et al*, 2008). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans diverses voies métaboliques requérant du fer tel que le cycle du TCA, la respiration, la protection au stress oxydatif et la biosynthèse de l'hème. On retrouve aussi des gènes cibles directement reliés à la régulation de l'homéostasie du fer comme *fep1*<sup>+</sup> et *pcl1*<sup>+</sup>. Selon le modèle actuel, l'activité de Php4 est régulée à trois niveaux. Premièrement, lorsque le fer est présent, Fep1 réprime la

transcription de *php4*<sup>+</sup>. Deuxièmement, la monothiole glutarédoxine Grx4 inactive Php4. Troisièmement, le complexe Php4-Grx4 est exporté du noyau vers le cytoplasme permettant d'assurer l'élimination de la présence de Php4 dans le noyau des cellules.

## 3.2. Le système de transport du fer dépendant de la réductase Frp1

### 3.2.1. Frp1/Frp2

On observe à la surface des cellules de *S. pombe* une activité réductase catalysant la conversion du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>. Une souche présentant une perte de cette activité a été générée suite au traitement avec un agent mutagène (Roman *et al*, 1993). La protéine responsable de la réduction du Fe<sup>3+</sup> a été identifiée suite à un criblage génétique à l'aide de cette souche mutante dans laquelle des plasmides d'une banque génomique ont été surexprimés afin d'obtenir un phénotype de complémentation de l'activité réductase. Le gène isolé est celui de la protéine Frp1 (Roman *et al*, 1993). Frp1 possède une taille de 564 a.a. et contient six DTMs. Un alignement de séquences montre qu'elle partage 27% d'identité avec la réductase de surface Fre1 de *S. cerevisiae*. Les régions conservées se retrouvent principalement à l'extrémité C-terminale des deux protéines et correspondent aux motifs de liaison au FAD et aux NADPH. Ces deux cofacteurs sont essentiels pour l'activité réductase (Lesuisse *et al*, 1990).

Une souche nulle pour le gène *frp1*<sup>+</sup> a été générée afin de confirmer que le produit du gène est la réductase. Une souche mutante *frp1*Δ est sensible à la carence en fer, ce qui se traduit en une perte de croissance. Cette perte de croissance n'est pas rétablie par l'addition

de  $\text{Fe}^{3+}$  dans le milieu de culture. Par contre, l'addition de  $\text{Fe}^{3+}$  combinée à un agent réducteur tel l'ascorbate restaure la croissance cellulaire (Roman *et al*, 1993).

L'absence d'activité réductase résiduelle de surface chez la souche *frp1* $\Delta$  indique que Frp1 est seul à jouer ce rôle (Roman *et al*, 1993). L'analyse comparative du génome de *S. pombe* rapporte une protéine homologue partageant 46% d'identité avec Frp1. Celle-ci est nommée Frp2. Sa localisation cellulaire et son rôle n'ont pas été caractérisés. Les gènes codant pour les deux réductases identifiées dans le génome de *S. pombe*, *frp1*<sup>+</sup> et *frp2*<sup>+</sup>, sont régulées par le répresseur transcriptionnel Fep1 (Mercier *et al*, 2008, Pelletier *et al*, 2002, Roman *et al*, 1993). Ils sont induits en carence de fer et réprimés en présence de concentrations élevées de fer. Ceci supporte l'hypothèse que Frp2, tout comme Frp1, serait impliquée dans l'homéostasie du fer, mais au niveau d'un autre compartiment cellulaire.

### 3.2.2. Fio1-Fip1

L'existence de la réductase de surface Frp1, impliquée dans le transport du fer à la surface cellulaire, suppose que *S. pombe* possède un complexe oxydase-perméase pour transporter le fer. Des analyses comparatives du génome de *S. pombe* montrent que deux protéines partagent un fort pourcentage d'homologie avec les protéines Fet3 et Ftr1 de *S. cerevisiae* (Roman *et al*, 1993).

Ultérieurement, il a été montré que la protéine Fio1 est l'orthologue de la multicuivre oxydase Fet3 et partage 38% d'identité avec celle-ci. La taille de Fio1 est de 622 a.a. et sa séquence contient un seul DTM. Fio1 possède aussi deux motifs homologues aux multicuivres oxydases ainsi que tous les acides aminés conservés pouvant se lier au cuivre.

La portion N-terminale contient un signal peptide pour sa localisation à la membrane plasmique (Askwith & Kaplan, 1997).

La protéine Fip1 partage 46% d'identité avec la perméase Ftr1. La séquence de 397 a.a. de Fip1 forme sept DTMs. Celle-ci contient également deux motifs REXLE, dont l'implication dans le transport du fer a été démontrée pour Ftr1 (Askwith & Kaplan, 1997).

L'expression des gènes *fiol*<sup>+</sup> et *fip1*<sup>+</sup> est réprimée en présence de fer via l'activité de Fep1 (Askwith & Kaplan, 1997, Pelletier *et al*, 2002). L'organisation chromosomique de ces gènes est particulièrement intéressante. Les deux gènes sont côte à côte, mais orientés en direction opposée. La région intergénique ne contient que 1142 paires de bases et sert de région promotrice pour les deux gènes.

La capacité du complexe Fio1-Fip1 à transporter le fer a été démontrée dans une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour le transport du fer de haute affinité (*fet3*Δ). L'expression simultanée de l'oxydase (*fiol*<sup>+</sup>) et de la perméase (*fip1*<sup>+</sup>) est suffisante pour restaurer l'incorporation de fer radioactif (Askwith & Kaplan, 1997). Cependant, l'expression du gène *fiol*<sup>+</sup> seul ne permet pas de compléter la perte de *FET3* (Askwith & Kaplan, 1997). Ceci indique que les composantes des deux complexes ne forment pas les mêmes interactions entre elles. En plus de l'équivalence fonctionnelle, le complexe de *S. pombe* possède une affinité similaire pour le fer ( $K_m = 0.2 \mu\text{M}$ ) à celle de *S. cerevisiae* ( $K_m = 0.15 \mu\text{M}$ ) (Askwith & Kaplan, 1997).

### 3.3. Le transport du fer via les récepteurs de sidérophores

Bien que les premières études mentionnaient que *S. pombe* ne produit pas de sidérophores (Neilands, 1995), l'analyse de la base de donnée de son génome indique l'existence de gènes pouvant être impliqués dans la biosynthèse de ces derniers.

#### 3.3.1. Sib1/Sib2

Deux protéines possiblement impliquées dans la synthèse de sidérophore ont été identifiées (Schrettl *et al*, 2004). Il s'agit des protéines Sib1 et Sib2. Sib1 est une protéine de type peptide synthétase. Ce type de protéine est impliqué dans l'assemblage de petits composés organiques. La protéine Sib1 partage 16% d'identité avec la ferrichrome peptide synthétase Sid2 de la levure *Ustilago maydis* (Yuan *et al*, 2001). Sib1 contient plusieurs copies de domaines conservés responsables d'activités telles l'adénylation, la thiolation ou la condensation organique. Ces nombreux domaines multifonctionnels justifient sa taille imposante de 4924 a.a.

Le gène *sib2*<sup>+</sup> code pour une protéine de 431 a.a.. Sib2 partage 34% d'identité avec l'enzyme ornithine-*N*<sup>5</sup>-monooxygénase SidA de la levure filamenteuse *Aspergillus nidulans* (Eisendle *et al*, 2003). Cette enzyme est responsable de la catalyse de la première étape de synthèse des sidérophores de type hydroxamate à partir d'un précurseur : l'ornithine. Selon sa séquence, Sib2 contient trois domaines requis pour son activité, soit les domaines de liaison des cofacteurs FAD et NADPH, ainsi que le domaine de liaison à son substrat (DX<sub>3</sub><sup>L</sup>/FATGYX<sub>4</sub><sup>H/P</sup>) (Schrettl *et al*, 2004, Stehr *et al*, 1998).

L'arrangement chromosomique des gènes *sib1*<sup>+</sup> et *sib2*<sup>+</sup> est semblable à celle de *fiol*<sup>+</sup> et *fip1*<sup>+</sup>, c'est-à-dire, qu'ils partagent le même promoteur et qu'ils sont transcrits en direction opposée. La région intergénique est d'une longueur de 1498 paires de bases et contiendrait des éléments de régulation reconnus par Fep1. Une étude par biopuces à ADN révèle que l'expression de ces gènes est induite en carence de fer (Mercier *et al*, 2008).

L'existence de ces gènes corrobore avec la démonstration que la cellule de *S. pombe* contient un sidérophore de type hydroxamate : le ferrichrome (Schrettl *et al*, 2004). Une partie du ferrichrome synthétisée est sécrétée dans le milieu (Schrettl *et al*, 2004). La détection de ce sidérophore a été réalisée par spectrométrie de masse sur des échantillons de milieu de culture ou d'extrait cellulaire.

### 3.3.2. Str1/ Str2/ Str3

Le ferrichrome relâché dans le milieu, puis complexé au fer, est réacheminé à l'intérieur de la cellule par le récepteur Str1. La protéine Str1 a été identifiée sur la base de son homologie de séquence avec les protéines Arn1/2/3/4, responsables de l'acquisition des sidérophores chez *S. cerevisiae*, avec qui elle partage ~31% de similarité (Pelletier *et al*, 2003). Str1 a une taille et une topologie comparable aux protéines Arn1/2/3/4 et compte quatorze DTMs. Le génome de *S. pombe* contient deux homologues de Str1. En effet, les protéines Str2 et Str3 présentent, respectivement, 29% et 25% d'identité avec Str1. La taille de Str2 est de 597 a.a. et elle contient quatorze DTMs. Str3 possède une taille comparable (629 a.a.) et renferme un nombre inférieur de DTMs, soit douze.

La transcription des gènes de ces trois récepteurs (*str1*<sup>+</sup>, *str2*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup>) est induite lorsque le fer est absent et réprimée quand il est disponible (Mercier *et al*, 2008, Pelletier *et al*, 2003). L'élément GATA responsable de la répression de *str1*<sup>+</sup> par le régulateur transcriptionnel Fep1 a été identifié et caractérisé (Pelletier *et al*, 2003).

Une fonction a été identifiée pour deux des trois récepteurs. Les gènes *str1*<sup>+</sup>, *str2*<sup>+</sup> et *str3*<sup>+</sup> ont été exprimés de façon ectopique dans une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour l'importation de sidérophores ainsi que pour le transport du fer de haute affinité (*ARN1/2/3/4Δ + FET3Δ*). La présence de Str1 permet de restaurer la croissance de la souche mutante sur un milieu pauvre en fer supplémenté de ferrichrome (Pelletier *et al*, 2003). Un essai similaire indique que Str2 est apte à transporter la ferrioxamine-B en plus d'avoir une faible affinité pour le ferrichrome (Pelletier *et al*, 2003). Quant à Str3, la liste des substrats utilisés n'a pas permis d'identifier sa fonction. Ces résultats démontrent que *S. pombe* détient trois récepteurs impliqués dans l'acquisition de sidérophores qui possèdent des affinités ou spécificités différentes pour chacun de leurs substrats.

### 3.4. L'entreposage du fer à la vacuole

La morphologie des vacuoles de *S. pombe* diffère de celle de *S. cerevisiae*. Plutôt que de former un seul organite imposant, les vacuoles sont réparties en plusieurs petits organites dispersés dans toute la cellule (environ cinquante par cellule). Elles accompliraient les mêmes fonctions que chez *S. cerevisiae*, dont les rôles de détoxification et d'entreposage des métaux sont physiologiquement très importants pour la cellule (Mercier *et al*, 2006, Ortiz *et al*, 1992, Takegawa *et al*, 2003).

#### 3.4.1. Pcl1

La protéine Pcl1 a également été identifiée suite à une analyse comparative du génome de *S. pombe* (Mercier *et al*, 2006). Celle-ci comporte deux régions ayant une forte homologie avec le transporteur vacuolaire Ccc1 de *S. cerevisiae*. La première portion qui comprend les a.a. 25 à 69, possède 62% de similarité avec Ccc1 et la seconde portion comprenant les a.a. 149 à 231, possède un degré de similarité de 50%. La taille entière de Pcl1 est de 243 a.a. et l'analyse topologique de sa séquence prédit la présence de cinq DTMs.

Une étude par biopuces à ADN comparant l'expression des gènes de *S. pombe* en condition plus fer versus sans fer, rapporte que *pcl1*<sup>+</sup> est le gène pour qui le niveau de transcrits augment le plus en présence de fer (Mercier *et al*, 2008). La région 5'-UTR de *pcl1*<sup>+</sup> contient un élément CCAAT impliqué dans sa régulation négative en présence de fer via le répresseur Php4 (Mercier *et al*, 2006). Le gène *pcl1*<sup>+</sup> est fortement exprimé en présence de fer.

Le principal résultat démontrant que Pcl1 a une activité liée à l'homéostasie du fer est qu'une souche ne contenant pas d'allèle fonctionnelle de son gène (*pcl1*Δ) présente une sensibilité marquée à un surplus de fer (Mercier *et al*, 2006). Ce phénotype est également rapporté chez *S. cerevisiae* pour une souche mutante pour le gène *CCC1* (Li *et al*, 2001). Pcl1 aurait pour rôle de protéger la cellule contre la toxicité causé par un excès de fer.

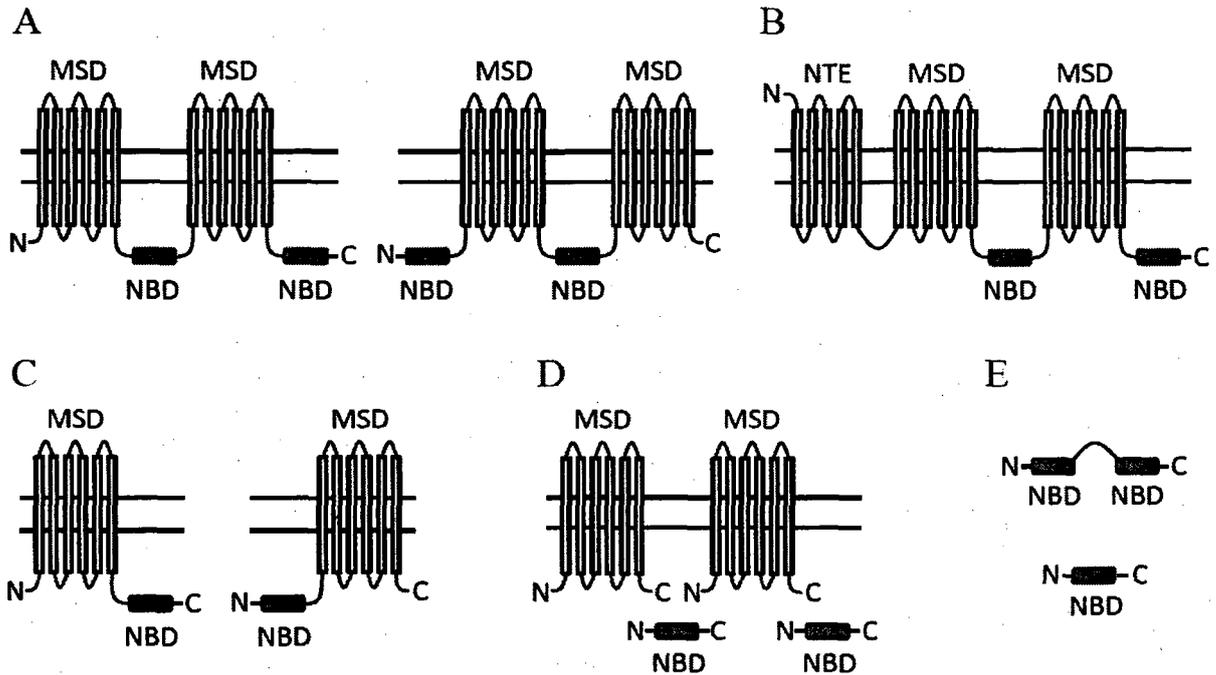
Contrairement à *S. cerevisiae*, *S. pombe* ne contient pas de second complexe oxydase-perméase ayant pour rôle de libérer le fer contenu dans la vacuole. Une analyse comparative entre les gènes du génome de *S. pombe* confirme que le complexe de surface, Fio1-Fip1, ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines. Cela suggère qu'en carence de fer, *S. pombe* utilise un mécanisme distinct de celui de *S. cerevisiae* afin d'exporter le fer vacuolaire.

#### 4. La famille des transporteurs à *ATP-binding cassette* (ABC)

##### 4.1. Structure des transporteurs ABC

La famille des transporteurs de type *ATP-binding cassette* (ABC) forme l'une des plus grandes familles de protéines (Higgins, 1992, Holland & Blight, 1999). Une analyse de génomes entiers chez treize organismes distincts provenant de différents règnes, incluant les archéobactéries, les eubactéries et les eucaryotes unicellulaires et multicellulaires, a permis d'identifier des séquences de gènes codant pour des domaines homologues au domaine d'attachement aux nucléotides (*nucleotide-binding domain* (NBD)) chez les transporteurs ABC (Isenbarger *et al.*, 2008). Ceci fait de ce type de domaine, l'un des motifs phylogéniques les plus conservés à travers les espèces. Plus de trois mille membres de cette famille de protéines ont été identifiés jusqu'à maintenant (Jones *et al.*, 2009).

L'architecture générale d'un transporteur de type ABC est formée de deux régions que l'on appelle « membrane spanning domain » (MSD), contenant plusieurs domaines transmembranaires, et de deux régions correspondant au NBD. Ces régions conservées peuvent se retrouver selon différentes configurations tel que décrit à la figure 5. Par exemple, un transporteur peut être constitué de deux MSDs et de deux NBDs (transporteur à domaines dupliqués). Il peut être constitué d'un MSD et d'un NBD (transporteur simple). Les transporteurs simples peuvent être assemblés en homo- ou hétéro-dimère. D'autres transporteurs de type ABC sont composés de quatre polypeptides, chacun correspondant au MSD ou au NBD, assemblés en tétramère (Jones *et al.*, 2009).



**Figure 5. Architecture générale des transporteurs ABC.**

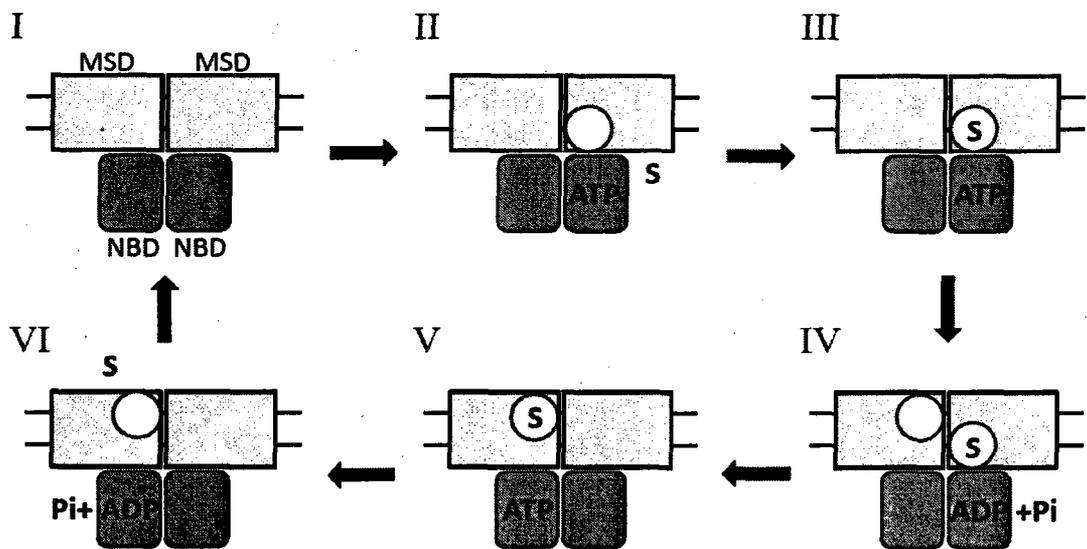
A. Les transporteurs à domaines dupliqués sont constitués de deux MSDs et de deux NBDs. L'orientation de ces domaines peut se retrouver dans les deux sens. B. Il existe chez les transporteurs à domaines dupliqués une sous-famille possédant un domaine MSD supplémentaire appelé NTE à leur extrémité N-terminale. C. Les transporteurs simples sont formés d'un MSD et d'un NBD pouvant se retrouver dans les deux orientations. Ce type de transporteur s'assemble en dimère pour être fonctionnel. D. Les transporteurs ABC peuvent contenir quatre sous-unités possédant chacune un MSD ou un NBD qui s'assemblent pour former un transporteur fonctionnel. E. Certaines sous-familles de transporteurs ABC ne contiennent pas de MSD. Ils comportent un ou deux NBDs similaires aux membres des autres sous-familles.

Chaque MSD peut être constitué de cinq ou six DTMs. Les MSDs d'un même transporteur s'assemblent de manière à former un canal dans la membrane. Le canal formé constitue un pore perméable qui reste fermé d'un côté de la membrane afin de prévenir la diffusion passive du substrat. Le pore contiendrait également des sites de liaison pour les substrats reconnus et transportés à travers la membrane (Jones *et al.*, 2009).

Les NBDs sont responsables de l'attachement et de l'hydrolyse de l'ATP. Le NBD comprend deux sous-domaines : une poche de fixation de l'ATP et un segment qui le relie avec les MSDs. La poche de fixation de l'ATP est formée, entre autre, de deux motifs communs à toutes les protéines liant l'ATP. Le motif A de Walker est constitué des acides aminés GxxGxGK<sup>S/T</sup> (où « x » correspond à n'importe lequel des a.a.). Le motif A de Walker est riche en résidus glycines (G) permettant la formation de la boucle de liaison aux phosphates de l'ATP (*P-loop*). Le résidu lysine (K) conservé forme des liaisons hydrogènes avec les groupements phosphates aux positions  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP (Walker *et al*, 1982). Le second motif est le motif B de Walker. Sa séquence,  $\phi\phi\phi\phi$ DE, est composée de plusieurs résidus aliphatiques ( $\phi$ ). Le résidu aspartate (D) lie un ion magnésium nécessaire pour l'activité catalytique du transporteur. Pour ce qui est du résidu glutamate (E), il jouerait aussi un rôle catalytique dans la réaction d'hydrolyse de l'ATP (Walker *et al*, 1982). Le sous-domaine polypeptidique du NBD qui interagit avec les MSDs est formé, en partie, de la séquence LSGGQ. Cette séquence correspond au motif « signature » des transporteurs ABC et différencie ces derniers des autres protéines liant l'ATP (Mourez *et al*, 1997). L'import ou l'export de substrats par les transporteurs ABC via les MSDs est obligatoirement couplé à l'hydrolyse de l'ATP par les NBDs. Ces activités s'effectuent de manière allostérique, mais le mécanisme précis de ce processus reste encore mal défini (Jones *et al*, 2009). L'un des modèles proposés pour le fonctionnement des transporteurs ABC est représenté à la figure 6.

Les transporteurs ABC peuvent être divisés en sept sous-familles (ABCA à ABCG) selon la disposition de leurs domaines (MSD et NBD) et le degré d'homologie entre leurs séquences en acides aminés (Dean, 2005). Ce système de classification découle des transporteurs ABC retrouvés chez les vertébrés. Les membres de la sous-famille ABCA

contiennent les domaines MSD et NBD en duplicata dans la même protéine (transporteurs à domaines dupliqués). Ceux de la sous-famille ABCC possèdent, en plus de ces domaines dupliqués, un domaine MSD supplémentaire à leur extrémité N-terminale. Les sous-familles ABCD et ABCG sont constituées de transporteurs simples, c'est-à-dire qu'ils possèdent un MSD et un NBD. La sous-famille ABCB contient à la fois des transporteurs à domaines dupliqués et des transporteurs simples. Pour ce qui est des sous-familles ABCE et ABCF, ils détiennent deux NBDs, mais ne renferment aucun DTM. Ces derniers n'exécutent pas de transport de molécules, cependant la nature de leurs NBDs, notamment la présence du motif « signature », montrent qu'ils ont une origine évolutive commune (Dean, 2005).



**Figure 6. Modèle de fonctionnement des transporteurs ABC.**

I. Un transporteur ABC fonctionnel est constitué de deux MSDs et de deux NBDs. II. La fixation de l'ATP à l'un des NBDs rendrait actif le site de liaison pour le substrat d'un des MSDs. III. La liaison du substrat au MSD actif entraînerait l'hydrolyse de l'ATP par le NBD. IV. L'hydrolyse de l'ATP rendrait actif le second site de liaison pour le substrat de l'autre MSD. V. La fixation de l'ATP sur le deuxième NBD rendrait inactif le premier site de liaison pour le substrat et entraînerait son déplacement sur le second site de liaison. VI. La liaison du substrat au second site induirait l'hydrolyse de l'ATP qui, à son tour, inactiverait le site de liaison, relâchant le substrat.

## 4.2. Caractérisation des transporteurs ABC de *S. pombe*

Puisque les transporteurs de types ABC constituent une famille très vaste de protéines et dans l'optique de rester succinct dans l'introduction, nous ne décrivons pas la multitude de fonctions qui a été proposée pour les transporteurs ABC chez les mammifères. Ainsi, nous nous concentrerons sur ceux présents chez *S. pombe*. À l'intérieur de ce même organisme, cette famille de transporteur occupe diverses localisations cellulaires et exécute des fonctions cellulaires variées.

Des analyses comparatives du génome de *S. pombe* ont permis d'identifier des gènes codant pour onze protéines homologues avec les transporteurs de type ABC (Iwaki *et al*, 2006). Avant cette analyse, six de ces transporteurs avait déjà été identifiés et, certains d'entre eux, bien caractérisés. La protéine Pmd1 est responsable du transport de la drogue leptomycin B. La leptomycin B est un antibiotique qui inhibe l'exportation de protéines nucléaires en bloquant l'activité de l'exportine Crm1 et par le fait même, la sortie de ses cargos du noyau (Nishi *et al*, 1992). L'absence de Bfr1 confère aux cellules une grande sensibilité à la drogue brefeldin A. La brefeldin A est un métabolite fongique reconnu pour inhiber le transport rétrograde de vésicules de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Iwaki *et al*, 2006, Nagao *et al*, 1995, Turi & Rose, 1995). Le transporteur Mam1 est impliqué dans le transport du facteur-M en lien avec l'activité des phéromones lors de la conjugaison (Christensen *et al*, 1997a). La séquence du gène *abc1*<sup>+</sup> avait été identifiée, mais aucun rôle n'a pu encore lui être déterminé (Christensen *et al*, 1997b). La protéine Atm1 est localisée au niveau de la mitochondrie et protège la cellule contre le stress oxydatif (Chen & Cowan, 2003, Iwaki *et al*, 2005). Hmt1 constitue le transporteur ABC de

*S. pombe* qui a été le plus caractérisé. Hmt1 transporte le cadmium lié soit aux phytochélatines ou au GSH. La direction du transport s'effectue du cytoplasme vers l'intérieur de la vacuole afin de protéger la cellule contre les effets toxiques de ce métal divalent (Ortiz *et al*, 1992, Ortiz *et al*, 1995, Preveral *et al*, 2009, Sooksa-Nguan *et al*, 2009).

Des analyses comparatives du génome a permis de mettre en évidence cinq nouveaux gènes codant pour des transporteurs ABC. Deux des protéines codées par ces gènes, Pdr1 et Mdl1, ont été nommées en raison de leur homologie de séquence et de leur localisation cellulaire similaire à deux protéines caractérisées de *S. cerevisiae* (Iwaki *et al*, 2006). Chez *S. cerevisiae*, Pdr1 facilite le transport des stérols entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique (RE) (Li & Prinz, 2004). Quant à Mdl1, elle est impliquée dans le transport de peptides au niveau de la mitochondrie (Dean *et al*, 1994, Young *et al*, 2001). Les trois autres gènes, *abc2<sup>+</sup>*, *abc3<sup>+</sup>* et *abc4<sup>+</sup>*, sont similaires au gène *abc1<sup>+</sup>* identifié précédemment. Par contre, les protéines Abc2, Abc3 et Abc4 sont localisées à la vacuole tout comme Hmt1, alors que Abc1 se retrouve à la membrane du RE (Iwaki *et al*, 2006). Les protéines Abc2 et Abc4 semblent jouer des rôles similaires. Ils seraient responsables du transport d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'adénine, de la détoxification de xénobiotiques et de la séquestration de conjugués glutathionylés à l'intérieur des vacuoles (Iwaki *et al*, 2006). Au moment où j'ai débuté mes travaux de recherche, le rôle du transporteur Abc3 n'était pas défini, mais des études par biopuces à ADN avait révélé que l'expression de son gène est induite lors de conditions de croissance en carence de fer (Mercier *et al*, 2008, Rustici *et al*, 2007).

## 5. Hypothèse de recherche

L'organisme modèle utilisé dans notre laboratoire est la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Chez cet organisme, la vacuole joue un rôle majeur dans le contrôle du maintien de l'homéostasie des ions métalliques, puisqu'elle est responsable d'entreposer ces derniers ou de les redistribuer dans le cytoplasme en cas de besoin (Mercier *et al*, 2006, Ortiz *et al*, 1992, Takegawa *et al*, 2003). En ce qui a trait au fer, son entrée à l'intérieur de la vacuole est vraisemblablement effectuée par la protéine Pcl1 (Mercier *et al*, 2006). La séquence polypeptidique de Pcl1 est partiellement homologue à celle de la protéine Ccc1 de *S. cerevisiae* pour laquelle l'activité d'importation du fer à l'intérieur de la vacuole a été bien caractérisée (Chen & Kaplan, 2000, Li *et al*, 2001, Singh *et al*, 2007). Lorsque j'ai entrepris mes travaux de recherche, la composante moléculaire permettant d'exporter le fer contenu dans la vacuole n'avait pas été identifiée. Il était clair que la ou les protéines impliquées dans ce mécanisme différaient du complexe oxydase-perméase présent à la surface cellulaire. Contrairement à *S. cerevisiae* qui détient deux complexes oxydase-perméase distincts, un à la surface et l'autre au niveau des vacuoles, un seul avait été répertorié chez *S. pombe* (Askwith & Kaplan, 1997, Stearman *et al*, 1996, Urbanowski & Piper, 1999).

Une étude par biopuces à ADN ayant pour objectif d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme du fer chez *S. pombe* suggérait l'existence d'un transporteur de la famille ABC dont l'expression était induite en conditions de carence de fer (Mercier *et al*, 2008). La famille des transporteurs ABC est impliquée dans le transport d'une grande variété de substrats, dont les ions métalliques (Iwaki *et al*, 2006, Jones *et al*, 2009, Jungwirth & Kuchler, 2006, Rea, 2007). Dans un contexte de surexpression, la protéine Abc3,

fusionnée à la GFP, avait été localisée au niveau de la membrane des vacuoles (Iwaki *et al*, 2006). Ces informations permettaient de supposer que le transporteur Abc3 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie du fer au sein de la vacuole.

## 6. Objectifs de recherche

L'objectif général de mon projet de recherche visait à identifier un transporteur responsable du relâchement du fer de la vacuole vers le compartiment cytosolique. Tel que mentionné ci-haut, nous avons ciblé Abc3 comme candidat potentiel pour jouer ce rôle. Dès lors, nous avons voulu déterminer si le transporteur Abc3 est impliqué dans le transport du fer au niveau de cet organite chez *S. pombe*.

Afin de répondre à cette question, nous nous sommes fixés quatre principaux objectifs. Le premier était d'identifier et de caractériser les éléments en « *cis* » responsables de la régulation fer-dépendante du gène *abc3*<sup>+</sup> et de déterminer si cette régulation impliquait le régulateur transcriptionnel Fep1. Ensuite, nous voulions localiser la protéine Abc3 lorsque cette dernière est exprimée sous le contrôle de son promoteur endogène. Nous voulions également déterminer si le statut protéique de Abc3 fluctue selon le statut en fer. Enfin, nous avons comme objectif de démontrer que le transporteur Abc3 possède une activité en lien avec l'homéostasie du fer.

## Résultats

Le gène *abc3<sup>+</sup>* code pour un transporteur de type ABC régulé par le fer  
chez *Schizosaccharomyces pombe*

### Article

Benoît Pouliot, Mehdi Jbel, Alexandre Mercier, et Simon Labbé, (2010), *abc3<sup>+</sup>* encode an  
iron-regulated vacuolar ABC-type transporter in *Schizosaccharomyces pombe*.  
*Eukaryot. Cell.* **9** : 59-73.

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

**Ma contribution aux travaux**

J'ai généré 90% des résultats contenus dans le manuscrit. J'ai supervisé les travaux qui ont été effectués par les co-auteurs du manuscrit en prenant soin d'établir avec eux les conditions de croissance à utiliser pour l'obtention des résultats. Ce fut le cas, notamment, de la figure faisant appel à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). J'ai également contribué activement à la rédaction et à la conception des figures du manuscrit.

## Résumé

Des études antérieures ont montré la contribution essentielle de la vacuole au niveau de l'entreposage et de la détoxification des ions métalliques divalents. Bien que les protéines transmembranaires responsables du transport du fer au niveau de la vacuole aient été identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae*, très peu d'information est disponible à propos de la mobilisation du fer vacuolaire chez *Schizosaccharomyces pombe*. Dans cette étude, nous rapportons l'identification d'un gène nommé *abc3*<sup>+</sup> qui code pour une protéine de type *ATP-binding cassette* de la sous-famille ABCC. La transcription du gène *abc3*<sup>+</sup> est induite lorsque les concentrations en fer sont faibles, mais réprimé par un niveau de fer élevé. La répression fer-dépendante du gène *abc3*<sup>+</sup> requiert le gène *fep1*<sup>+</sup>. Des essais d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que Fep1 s'associe au promoteur du gène *abc3*<sup>+</sup> *in vivo* et ce de manière fer-dépendante. Des analyses microscopiques révèlent que la protéine de fusion Abc3-GFP se localise à la membrane des vacuoles lorsque le niveau de fer est faible. En l'absence du système de transport de surface constitué de Fio1 et de Fip1, Abc3 est requis pour la croissance cellulaire en carence de fer. Les cellules mutantes *abc3*Δ présentent des niveaux accrus d'expression de *frp1*<sup>+</sup> codant pour une ferriréductase, suggérant une perte de répression par Fep1 et, conséquemment, l'activation des gènes régulés par Fep1. Lorsque *abc3*<sup>+</sup> est exprimé sous le contrôle du promoteur *nmt1*<sup>+</sup>, son induction mène à une activité transcriptionnelle réduite du gène *frp1*<sup>+</sup>. Puisque *S. pombe* ne possède pas d'orthologues des protéines Fth1, Fet5 et Smf3 à la membrane vacuolaire de la levure *S. cerevisiae*, nos résultats suggèrent que Abc3 pourrait être responsable de la mobilisation du fer entreposé dans la vacuole en réponse à une carence en fer.

## Abstract

Studies have shown the fundamental contribution of the yeast vacuole as a site for storage and detoxification of metals. Whereas the transmembrane proteins responsible for iron transport into and out of the vacuole have been identified in *Saccharomyces cerevisiae*, less information is available concerning the mobilization of vacuolar iron stores in *Schizosaccharomyces pombe*. In this study, we report the identification of a gene designated *abc3*<sup>+</sup> that encodes a protein which exhibits sequence homology with the ABCC subfamily of ATP-binding cassette transporters. The transcription of *abc3*<sup>+</sup> is induced by low concentrations of iron but repressed by high levels of iron. The iron-mediated repression of *abc3*<sup>+</sup> required a functional *fep1*<sup>+</sup> gene. Chromatin immunoprecipitation assays showed that Fep1 associates with the *abc3*<sup>+</sup> promoter *in vivo*, in an iron-dependent manner. Microscopic analyses revealed that a functional Abc3-green fluorescent protein localizes to the membrane vacuole when iron levels were low. Abc3 was required for growth in low iron medium in the absence of the transport system mediated by Fio1 and Fip1. *abc3*Δ cells exhibited increased levels of expression of the *frp1*<sup>+</sup>-encoded ferric reductase, suggesting a loss of Fep1 repression and, consequently, activation of Fep1-regulated genes. When *abc3*<sup>+</sup> was expressed using the *nmt1*<sup>+</sup> promoter system, its induction led to a reduced transcriptional activity of the *frp1*<sup>+</sup> gene. Because *S. pombe* does not possess vacuolar membrane-localized orthologs to *S. cerevisiae* Fth1, Fet5, and Smf3, our findings suggested that Abc3 may be responsible for mobilizing stored iron from the vacuole to the cytosol in response to iron deficiency.

## Introduction

All eukaryotes require iron for survival. The ability of this transition metal to exist in two different redox states makes it an essential component of the active centers of many enzymes and electron transporters (23). For instance, DNA synthesis, cell cycle progression, and energy-generating respiratory chain require iron. Paradoxically, the properties that make iron essential in these reactions could also make it toxic under certain conditions. Excess iron has the ability to unleash toxic oxygen radicals that can damage cellular components (18). Consequently, organisms must tightly regulate their internal iron load, and must be able to respond to changes in iron levels by appropriately controlling iron acquisition, utilization, and compartmentalization in order to maintain homeostasis.

Studies in *S. cerevisiae* have revealed that it possesses two genetically distinct systems for iron uptake (43). One of these systems requires that ferric iron [ $\text{Fe}^{3+}$ ]-chelates be reduced to ferrous iron [ $\text{Fe}^{2+}$ ]. This task is performed by the cell surface reductases Fre1 and Fre2 that reduce extracellular  $\text{Fe}^{3+}$  chelates (8, 14). The  $\text{Fe}^{2+}$  generated by this action is, in turn,

## Footnotes

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ABC, ATP-binding cassette; bp, base pair(s); BPS, bathophenanthrolinedisulfonic acid; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Dip, 2, 2'-dipyridyl; EMM, Edinburgh minimal medium; Fep1, Fe protein 1; GFP, green fluorescent protein; MSD, membrane spanning domain; NBD, nucleotide binding domain; NTE, amino-terminal extension; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements.

captured by an oxidase-permease complex formed by Fet3 and Ftr1 (4, 55, 57). Fet3 acts as a multicopper oxidase, converting  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ , which is transported across the plasma membrane by the permease Ftr1. A clear interdependence between Fet3 and Ftr1 has been established since the trafficking of either protein to the cell surface requires the concomitant trafficking of the other. A Fet3 oxidase homolog called Fet5 and a Ftr1 permease homolog termed Fth1 are known to be present in *S. cerevisiae* (56, 60). These two proteins physically interact and form an oxidase-permease complex in the vacuole membrane (60). The permease Fth1 is dependent on the presence of Fet5 for exiting the secretory pathway, suggesting that both proteins are required during biosynthesis for their correct targeting to the vacuole membrane (60). The Fet5-Fth1 complex most likely mobilizes stored iron from the vacuole to the cytosol when cells undergo a transition from iron excess to iron-limiting conditions (60). *S. cerevisiae* possesses a second system for iron uptake in which siderophore-iron chelates are taken up by the ARN1-ARN4 transporters (42).

In *S. pombe*, studies have shown that  $\text{Fe}^{3+}$  is reduced to  $\text{Fe}^{2+}$  by the cell surface reductase Frp1 (49). Once reduced,  $\text{Fe}^{2+}$  is taken up by an oxidase-permease complex consisting of Fio1 and Fip1, which are the orthologs of Fet3 and Ftr1, respectively (5). Despite the fact that Fio1 and Fip1 share significant similarities to Fet3 and Ftr1, only the simultaneous expression of both *S. pombe* genes (*fio1*<sup>+</sup> and *fip1*<sup>+</sup>) in *S. cerevisiae fet3Δ* cells is able to reconstitute high-affinity iron transport (5). The expression of *S. pombe fio1*<sup>+</sup> alone in a *S. cerevisiae fet3Δ* disrupted strain does not result in complementation of the *fet3Δ* iron-starvation defects (5). This observation suggests that, although Fio1 and Fet3 are homologous in function, Fio1 cannot assemble with endogenous *S. cerevisiae* Ftr1. This result further suggests that molecular differences may exist between the oxidase-permease

complexes in these two fungal species. Orthologs of Fet5 and Fth1 have not yet been identified in *S. pombe*. BLAST searches for both Fet5- and Fth1-like proteins in the *S. pombe* genome data base have revealed no *S. pombe* proteins with significant homologies. Although *S. pombe* vacuoles may serve as an important site for intracellular iron stores, transport of iron into and out of the vacuole has not been investigated in detail in fission yeast. The second pathway of iron uptake in *S. pombe* relies on the transport of iron-siderophore chelates, a process which primarily involves the hydroxamate-type siderophore ferrichrome (39, 52).

A critical issue for cells is the absolute requirement of being able to control iron concentrations in order to be capable of rapidly respond to changes in extracellular iron levels. Exposure of *S. pombe* to elevated concentrations of iron is sensed by the GATA-type transcriptional repressor Fep1 (26, 38). An important response to Fep1 activation is the down-regulation of the genes encoding the components of the high-affinity iron transport machinery, including *frp1*<sup>+</sup>, *fiol*<sup>+</sup>, and *fip1*<sup>+</sup> (38, 50). Based on genomic profiling studies, it has been proposed that Fep1 and its orthologs are also required for the iron-regulated expression of the genes encoding the proteins involved in iron-sulfur cluster formation, compartmentalization, and in the utilization of inorganic iron (22, 50). Once activated, Fep1 binds to the DNA sequences known as GATA elements (5'-(A/T)GATA(A/T)-3'), which are found in the promoters of its target genes. Conversely, when iron concentration is limited inside the cell, Fep1 dissociates from the chromatin, thereby allowing transcription of its target genes to take place (21, 40).

Analysis of iron-regulated gene expression in *S. pombe* using DNA microarrays has identified several uncharacterized genes that are transcriptionally activated in response to iron deprivation (34). Although the roles of these genes remain unclear, their iron starvation-dependent induction suggests that they possess iron-related functions. One example of these genes is *SPBC359.05*, which is also called *abc3<sup>+</sup>* (20). This gene encodes a putative transmembrane protein that exhibits sequence homology with the ABCC subfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters (9, 10, 15, 37). Members of the ABCC subfamily have a typical ABC “core” region, consisting of two homologous halves. Each half contains a membrane spanning domain (MSD) that includes six transmembrane spans and a nucleotide binding domain (NBD). The NBD harbors several conserved motifs designated Walker A, Walker B, and the signature motifs (15). The two halves of the core region are joined by a linker region (L1). A hallmark of the ABCC transporters is the presence of an additional N-terminal extension (NTE) that contains five putative transmembrane spans (MSD0) that are connected to the ABC core domain by a hydrophilic region (L0). A previous study has shown that *S. pombe* cells lacking a functional *abc3<sup>+</sup>* gene are sensitive to cerulenin, an antibiotic that inhibits the biosynthesis of fatty acids (20). Using direct fluorescence microscopy, the expression of a GFP-tagged form of Abc3 transformed in wild-type *S. pombe* cells suggests that Abc3 may localize to the vacuole membrane, although neither its cellular localization nor its role within the cell has been firmly characterized (20). *S. pombe* is one of the yeast species that does not have any homologs of *S. cerevisiae* proteins Fet5, Fth1, and Smf3 (16). However, as shown for the maintenance of the concentration of intracellular copper (6), the fission yeast vacuole may contribute to the overall iron metabolism of the cell.

In the present study, we determine that *abc3*<sup>+</sup> is regulated at the level of gene transcription, and its iron-dependent regulated expression requires a proximal GATA-type *cis*-acting element and a functional *fep1*<sup>+</sup> gene. Using a chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach, we show that Fep1 occupies the *abc3*<sup>+</sup> promoter in the presence of high levels of iron, whereas iron deficiency results in a loss of Fep1 occupancy at the *abc3*<sup>+</sup> promoter. Using an *abc3*<sup>+</sup>-GFP allele that retained wild-type function, we found that Abc3-GFP is localized to the vacuole membrane when iron levels are low, but become undetectable upon exposure to iron. Cell fractionation experiments revealed that Abc3 is an integral membrane protein. The loss of Abc3 resulted in an elevated transcriptional activity of the *fep1*<sup>+</sup> gene. In contrast, permanent expression of *abc3*<sup>+</sup> lowered the steady-state levels of the *fep1*<sup>+</sup> transcript. Taken together, these results strongly suggest that under iron-limiting conditions, Abc3 could serve to transport iron from the vacuole to the cytoplasm.

## Materials and Methods

**Strains and media.** The *S. pombe* strains used in this study were the wild-type FY435 (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210*) and eight isogenic mutant strains, *abc3Δ* (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 abc3Δ::KAN<sup>r</sup>*), *pcl1Δ* (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 pcl1Δ::KAN<sup>r</sup>*), *fep1Δ* (38), *ctr6Δ* (6), *fep1Δ php4Δ* (21), *abc3Δ ctr6Δ* (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 abc3Δ::KAN<sup>r</sup> ctr6Δ::ura4<sup>+</sup>*), *fio1Δ fip1Δ* (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 fio1-fip1Δ::KAN<sup>r</sup>*), and *abc3Δ fio1Δ fip1Δ* (*h*<sup>+</sup> *his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 abc3Δ::loxP fio1-fip1Δ::KAN<sup>r</sup>*). All *S. pombe* cells were cultured in either yeast extract plus supplements (YES), or in selective Edinburgh minimal medium

(EMM) lacking the specific amino acids required for integrative or non-integrative plasmid selection (1). Unsupplemented EMM contained 74 nM iron, unless otherwise stated. Liquid cultures were seeded to an  $A_{600}$  of 0.5, allowed to grow to exponential phase ( $A_{600}$  of  $\sim 1.0$ ), and then treated with 250  $\mu\text{M}$  2, 2'-dipyridyl (Dip), or 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  for 90 min, unless otherwise stated. Yeast transformations and manipulations were carried out using standard techniques (1).

*Plasmids.* A BamHI-EcoRI PCR-amplified fragment derived from the  $abc3^+$  promoter containing 584 bp of the 5'-noncoding region and the first 10 codons of the  $abc3^+$  gene was introduced into the BamHI-EcoRI-digested YEp357R vector (35). The  $abc3^+$  promoter region was isolated from YEp357R $abc3^+$ -584lacZ via digestion with BamHI and Bsu36I. It was then swapped for the equivalent DNA restriction fragment in pSP1*fiol*<sup>+</sup>-1155lacZ (38) in order to generate pSP1 $abc3^+$ -584lacZ. Two plasmids (pSP1 $abc3^+$ -239lacZ and pSP1 $abc3^+$ -114lacZ) harboring sequential deletions from the 5' end of the  $abc3^+$  promoter were created by PCR from plasmid pSP1 $abc3^+$ -584lacZ. Each PCR product obtained was purified, digested with BamHI and Bsu36I, and then used to replace the equivalent DNA restriction fragment in pSP1 $abc3^+$ -584lacZ. Plasmids pSP1 $abc3^+$ -584lacZ and pSP1 $abc3^+$ -239lacZ were used to introduce mutations to either or both of the GATA boxes (positions -115 to -120 and positions -197 to -202 with respect to the A of the ATG codon of  $abc3^+$ ) (CCTGTC instead of TGATA[A/T]) via the overlap-extension method (19). The DNA sequence of each mutant was confirmed by dideoxy sequencing. In order to create both the wild-type and mutant pCF83 $abc3^+$ -239/-56lacZ fusion plasmids, the  $abc3^+$  promoter region (positions -239 to -56) was PCR amplified from both the wild-type and the mutant pSP1 $abc3^+$ -584lacZ constructs. These PCR products were purified and inserted in their

natural orientations into the XmaI and XhoI sites of the *CYC1-lacZ* fusion plasmid pCF83 (33).

PCR amplification of the *abc3*<sup>+</sup> gene was carried out using primers designed to generate SpeI and XhoI restriction sites at the upstream and downstream termini of the ORF, respectively. The full-length gene was isolated from *S. pombe* strain FY435 genomic DNA. The PCR product was digested with SpeI and XhoI and cloned into the corresponding sites of the pBluescript SK vector (Stratagene, La Jolla, CA), creating plasmid pSK*abc3*<sup>+</sup>. Subsequently, the *S. pombe abc3*<sup>+</sup> promoter region from position -808 upstream of the start codon of the *abc3*<sup>+</sup> gene was isolated by PCR amplification and was then inserted into pSK*abc3*<sup>+</sup> at the SstI and SpeI sites. This pSK*abc3*<sup>+</sup> derivative was named pSKprom-*abc3*<sup>+</sup>. The SstI-XhoI DNA fragment was isolated from pSKprom-*abc3*<sup>+</sup> and then inserted into SstI-XhoI-digested pSP1 or pJK148 plasmid, creating plasmids pSP1*abc3*<sup>+</sup> and pJK148*abc3*<sup>+</sup>, respectively. The *GFP* coding sequence derived from pSF-GP1 (24) was isolated by PCR, using primers designed to generate XhoI and ApaI sites at the 5' and 3' termini, respectively, of the *GFP* gene. The resulting DNA fragment was used to clone the *GFP* gene into the pSP1*abc3*<sup>+</sup> plasmid to which XhoI and ApaI restriction sites had previously been introduced by PCR, and were placed immediately before the *abc3*<sup>+</sup> stop codon. For this particular construct, named pSP1*abc3*<sup>+</sup>-*GFP*, the XhoI-ApaI *GFP*-encoded fragment was placed in-frame with the C-terminal region of Abc3. The *nmt1*<sup>+</sup> 41X promoter (13) up to position -1178 from the initiator codon of the *nmt1*<sup>+</sup> gene was isolated by PCR and then swapped to replace the SstI-SpeI *abc3*<sup>+</sup> promoter fragment in either pSP1*abc3*<sup>+</sup> or pSP1*abc3*<sup>+</sup>-*GFP*. The resulting plasmids were named pSP-1178*nmt41X-abc3*<sup>+</sup> and pSP-1178*nmt41X-abc3*<sup>+</sup>-*GFP*, respectively.

*RNA analysis.* Total RNA was isolated using the hot phenol method (7). RNA samples were quantified spectrophotometrically, and 15 µg of RNA per sample were used for the RNase protection protocol (34). DNA templates for antisense riboprobes (Table 1) were cloned into the BamHI and EcoRI sites of pBluescript SK. The resultant constructs were linearized with BamHI for subsequent antisense RNA labelling with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP and the T7 RNA polymerase. [ $^{32}$ P]-labeled antisense *lacZ* RNA was generated from the HindIII-linearized plasmid pKSlacZ (38). The riboprobe derived from pSK*act1*<sup>+</sup> (41) was used to probe *act1*<sup>+</sup> mRNA as an internal control for the normalization purposes during quantification of the RNase protection products.

**Table 1.** Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts

| Gene ID      | Gene name                | Riboprobe length (bp) | Positions from the initiator codon | Reference or source |
|--------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|
| SPAC9E9.12c  | <i>abc1</i> <sup>+</sup> | 174                   | +205 to +379                       | This study          |
| SPAC3F10.11c | <i>abc2</i> <sup>+</sup> | 184                   | +301 to +485                       | This study          |
| SPBC359.05   | <i>abc3</i> <sup>+</sup> | 179                   | +351 to +530                       | This study          |
| SPAC30.04c   | <i>abc4</i> <sup>+</sup> | 189                   | +112 to +301                       | This study          |
| SPBC32H8.12c | <i>act1</i> <sup>+</sup> | 151                   | +334 to +485                       | (41)                |
| SPAC1F7.08   | <i>fiol</i> <sup>+</sup> | 183                   | +16 to +199                        | This study          |
| SPBC1683.09c | <i>frp1</i> <sup>+</sup> | 190                   | +117 to +307                       | This study          |
| SPCC737.09c  | <i>hmt1</i> <sup>+</sup> | 193                   | +584 to +777                       | This study          |
|              | <i>lacZ</i>              | 233                   | +1188 to +1421                     | (38)                |

*Chromatin immunoprecipitation (ChIP).* Cell growth conditions and the preparation of chromatin were carried out as described previously (21). Immunoprecipitation of TAP-tagged Fep1 with immunoglobulin G (IgG)-Sepharose beads, and the subsequent elution of the immunocomplexes, were performed as described (21). To reverse the formaldehyde crosslinks, both the eluted DNA and the DNA of the input control were first incubated at 65°C for 18 h, followed by 2 h at 37°C in the presence of 50 µg Proteinase K. Free DNA was then purified by phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) extraction in the presence of 0.4 M LiCl. After centrifugation and precipitation of the DNA by the addition of glycogen and ethanol, the precipitated DNA was resuspended in 100 µl of TE prior to PCR analysis.

PCR amplifications were performed essentially as described by Komarnitsky *et al.* (25), except that PCR program consisted of 2 min at 94°C, followed by 25 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C, and a final 4 min step at 72°C. Radiolabelled PCR products were purified using quick Spin columns (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and were resolved in 6% polyacrylamide-1X Tris-borate-EDTA gels. PCR signals were quantitated by PhosphorImager scanning, and were then normalized with respect to both the input DNA reaction and the internal intergenic control primer pair ( in order to correct for PCR efficiency and background signals). All experiments were conducted at least three times, and each experiment yielded similar results. Primers that span the *abc3*<sup>+</sup> promoter region that included a functional GATA box were used for PCR analysis. The primers were designated by the name of the gene promoter followed by the position of their 5' ends relative to the translation initiation codon:

*abc3-a.181*: 5'-CATAATGAGATTCAGCGCAAACGTTATTAGTC-3';

*abc3-b.16*: 5'-CCAAATACTTTATTA AAAAGCGATGCTTAAGTC-3';

Intergenic-cII3860000-a: 5'-CGGTGCGTTTTTCTACGCGCATCTTC-3';

Intergenic-cII3860000-b: 5'-GCCCAAGGCCCATCAACAATCTAACATG-3'.

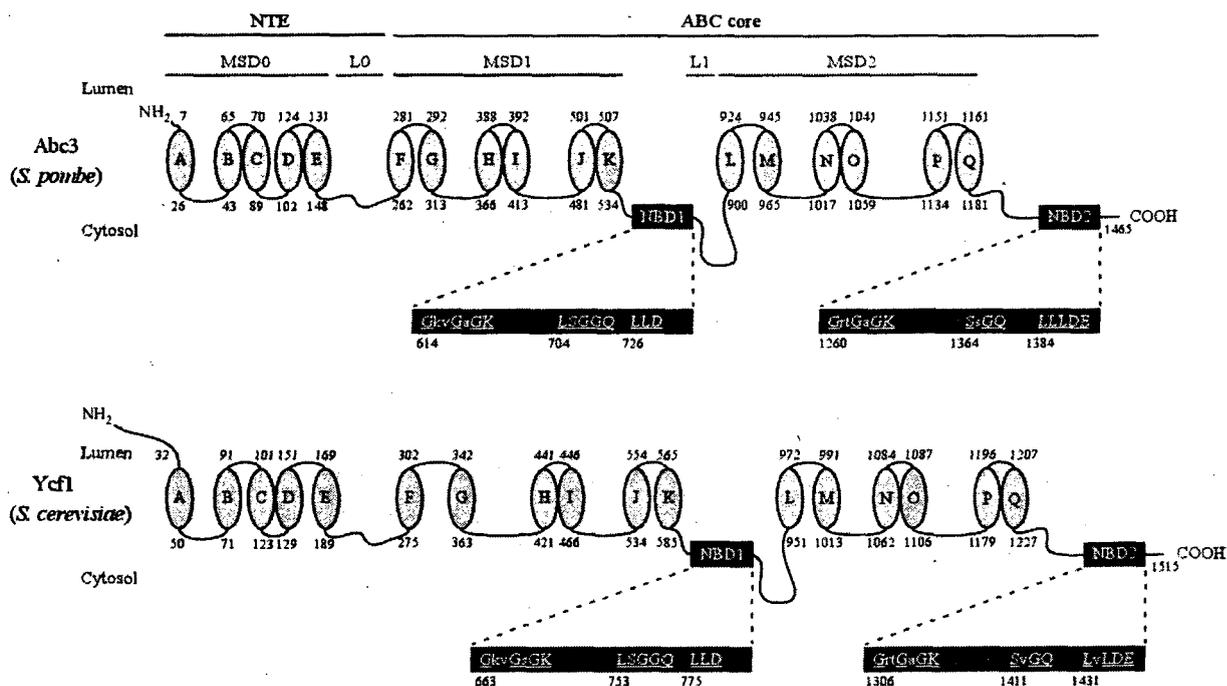
*Cerulenin sensitivity assay, organelle staining, and fluorescence microscopy.* Cells were grown to an  $A_{600}$  of 1.0 ( $\sim 2 \times 10^7$  cells) at 30°C. Each cell culture was diluted ( $\sim 2 \times 10^4$  cells) and incubated to a final volume of 4 ml in Edinburgh minimal medium containing cerulenin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma-Aldrich). At the designated time intervals, total growth was determined spectrophotometrically at  $A_{600}$ . Vacuole membrane staining using FM4-64 (Sigma-Aldrich) was performed as described previously (20), except that the cells were not resuspended in distilled water prior to microscopic analysis. Briefly, the cells were harvested and resuspended in Edinburgh minimal medium containing 16  $\mu\text{M}$  FM4-64 for 30 min at 30°C. The cells were pelleted, resuspended in fresh Edinburgh minimal medium, and incubated at 30°C for an additional 90 min. They were then placed on microscope slides and viewed on a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER cooled charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). The samples were analyzed using X 1,000 magnification with the following filters: 465 to 495 nm (GFP) and 510 to 560 nm (FM4-64). The cell fields shown in this study are representative of a minimum of five independent experiments.

*Preparation of S. pombe extracts, Western blot analysis, and spectrophotometric method using BPS/citric acid.* Protein extracts were prepared from logarithmic-phase cells that were grown in standard Edinburgh minimal medium or taken after their incubation in the presence of either 50  $\mu\text{M}$  Dip or 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . The harvested cells were washed in HEGN<sub>100</sub> buffer

(20 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 100 mM NaCl) and lysed with glass beads using the same buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and a complete protease inhibitor mixture (P8340; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The cells were broken using a FastPrep FP120 instrument (BIO 101; Thermo Electron Corporation, Milford, MA; twice for 45 s at 4°C, with cooling intervals of 1 min in an ice bath). The resulting lysates were centrifuged at 100,000 X g for 30 min at 4°C. The supernatant was kept at 4°C, whereas the pellet fraction was resuspended in 0.2 ml of buffer A (PBS, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, and the above-mentioned protease inhibitors) and incubated on ice for 30 min. Alternatively, the pellet fraction was resuspended and left untreated, or was adjusted to 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (to replace 1% Triton X-100). After incubation on ice, the pellet fraction was resuspended and centrifuged at 100,000 X g for 30 min at 4°C. Both supernatant and pellet fraction were resuspended in 2X SDS loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 mM EDTA, 15% SDS, 0.01% Bromophenol Blue, and 150 mM dithiothreitol) containing 8.0 M urea and 4% β-mercaptoethanol, unless otherwise indicated. After a 30-min incubation at 37°C, the samples were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by Coomassie Brilliant Blue staining, or were used for Western blot analysis. Monoclonal anti-GFP (clone B-2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and monoclonal anti-HA (clone F-7, Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used for protein expression analysis of the Abc3-GFP and Ctr6-HA<sub>4</sub> fusion proteins, respectively. A monoclonal anti-PCNA antibody (clone PC10, Sigma-Aldrich), was used to detect PCNA as an internal control for soluble proteins. For measuring intracellular iron, the BPS-based spectrophotometric assay was carried out as described previously (45).

## Results

*Molecular architecture of S. pombe Abc3.* There are eleven genes that encode putative proteins related to the ABC family of transporters in *S. pombe* (20). Analysis of iron-regulated gene expression using DNA microarrays has identified *abc3*<sup>+</sup> as one of the affected genes (34, 50). Because the transcript levels of *abc3*<sup>+</sup> (*SPBC359.05*) showed increases of expression in response to iron deficiency (34), we hypothesized that the gene product (Abc3) could be part of a mechanism that was activated under conditions of iron deficiency. The hypothesis was tested by isolating the gene for further analysis. *abc3*<sup>+</sup> encodes a polypeptide composed of 1465 amino acid residues with a predicted molecular mass of 166.5 kDa. Abc3 is 42 % sequence-identical and 56 % sequence-similar to *S. cerevisiae* Ycf1, a prototypical member of the ABCC subfamily of ABC transporters (58). Similarly to Ycf1 and the other members of the ABCC subfamily, Abc3 possesses an ABC core domain that consists of two homologous halves, each half containing a membrane spanning domain (MSD) with six putative transmembrane spans, and a nucleotide binding domain (NBD) (Fig. 1). The two halves of Abc3 are connected by a putative cytosolic loop (L1). The Abc3 N-terminal portion strongly resembles the unique N-terminal extension (NTE) that is a hallmark of proteins belonging to the subgroup ABCC (31). The Abc3 NTE is very hydrophobic, harboring five predicted transmembrane helices, in addition to a cytoplasmic linker region (L0). Three conserved motifs (<sup>614</sup>GkvGaGK<sup>620</sup> [Walker A], <sup>704</sup>LSGGQ<sup>708</sup> [signature], and <sup>726</sup>LLD<sup>728</sup> [Walker B] for NBD1; <sup>1260</sup>GrtGaGK<sup>1266</sup> [Walker A], <sup>1364</sup>SsGQ<sup>1367</sup> [signature], and <sup>1384</sup>LLLDE<sup>1388</sup> [Walker B] for NBD2) are present within the NBD domains. These motifs may participate in the binding and hydrolysis of nucleotides such as ATP to energize



**Fig. 1.** Structural features of *Abc3* and its close homologue from *S. cerevisiae* *Ycf1*. Topological models of the *S. pombe* *Abc3* (top) and *S. cerevisiae* *Ycf1* (bottom) proteins. The N-terminal extension (NTE) includes five membrane spans (denoted as MSD0; ovals A-E) and a cytosolic loop (L0). The ABC core domain consists of two homologous halves, each containing a transmembrane domain (denoted as MSD1 or MSD2) composed of six membrane spans (ovals F-K or L-Q), and a nucleotide binding domain (denoted as NBD1 or NBD2). The halves are joined by a linker region (L1). NBD1 and NBD2 (enlarged dark grey boxes) contain residues that are found in other ABC transporters. Highly conserved residues are both underlined and in capital letters. The amino acid sequence numbers refer to the position relative to the first amino acid of each protein.

the transport process. Sequence alignment analysis of the amino acid residues that compose the NBD1 and NBD2 of *Abc3* and *Ycf1* indicated that the spacing of the conserved motifs (Walker A, signature, and Walker B) in *Abc3* was highly similar to that of *Ycf1* (data not shown). Furthermore, *Abc3* residues 614-620 (Walker A), 704-708 (signature), and 726-728 (Walker B) for NBD1, as well as residues 1260-1266 (Walker A), 1364-1367 (signature), and 1384-1388 (Walker B) for NBD2, were 90 % identical to the Walker A, signature, and Walker B motifs found in *Ycf1*. Collectively, these observations strongly suggested that *abc3<sup>+</sup>* encodes an ABC protein of the ABCC subfamily similar to *Ycf1*.

*abc3<sup>+</sup>* transcript was induced under conditions of iron deficiency and negatively regulated by iron through *Fep1*. Our gene expression profiling data suggested that *abc3<sup>+</sup>* gene expression was down-regulated in the presence of iron (34). To independently verify the microarray data (34), *S. pombe* wild-type strain was left untreated or treated with Dip (250  $\mu$ M) or  $\text{FeCl}_3$  (100  $\mu$ M). In the presence of the iron chelator Dip, *abc3<sup>+</sup>* mRNA levels were increased ~17- to 20-fold as compared to the low basal levels observed in the untreated cells (Fig. 2). In contrast, under iron-replete conditions, the transcript levels of *abc3<sup>+</sup>* were repressed and remained approximately equal to those observed in the untreated cells (Fig. 2). The *abc3<sup>+</sup>* increases in transcript levels observed under conditions of iron deficiency paralleled those observed by DNA microarray analysis (16.9-fold) (34). The results of the dependency of *abc3<sup>+</sup>* gene expression on iron concentrations suggested that the iron-regulatory transcriptional repressor *Fep1* could play a role in *abc3<sup>+</sup>* gene regulation. This possibility was investigated by using an isogenic *fep1* $\Delta$  deletion strain of *S. pombe*. Results showed that the levels of *abc3<sup>+</sup>* mRNA were constitutive and unresponsive to cellular iron

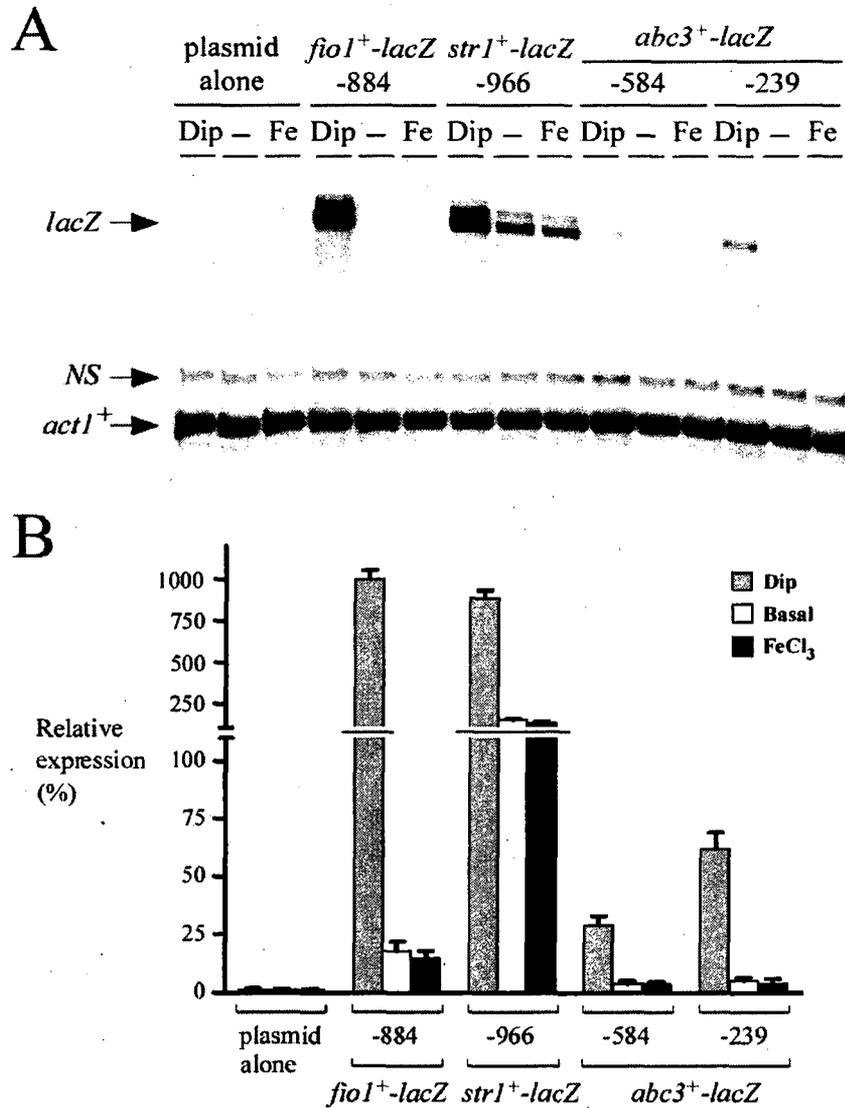


status in the yeast mutant (Fig. 2), suggesting that the iron-mediated repression of *abc3*<sup>+</sup> occurred through the activity of Fep1. Furthermore, these results revealed that wild-type *abc3*<sup>+</sup> gene was regulated by iron in a manner identical to that of iron uptake genes such as *frp1*<sup>+</sup>, *fio1*<sup>+</sup>, and *fip1*<sup>+</sup> (5, 27, 38).

According to the ABC transporter classification system (10), *S. pombe* Abc3 is a member of the ABCC subfamily. In fission yeast, three other genes, namely *abc1*<sup>+</sup>, *abc2*<sup>+</sup>, and *abc4*<sup>+</sup>, encode putative ABC transporters related to the ABCC subfamily (20). To examine whether they were differentially regulated as a function of iron availability, we investigated the profiles of expression of *abc1*<sup>+</sup>, *abc2*<sup>+</sup>, and *abc4*<sup>+</sup> by RNase protection assays (Fig. 2). The *hmt1*<sup>+</sup> gene (36) that encodes a member of the ABCB subfamily was also analyzed in RNase protection experiments. Results showed that the steady-state mRNA levels of *abc1*<sup>+</sup>, *abc2*<sup>+</sup>, *abc4*<sup>+</sup>, and *hmt1*<sup>+</sup> in the wild-type strain were not regulated by iron depletion (Dip, 250  $\mu$ M) or iron abundance (FeCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M) (Fig. 2). There were no significant changes in the levels of *abc1*<sup>+</sup>, *abc2*<sup>+</sup>, *abc4*<sup>+</sup>, and *hmt1*<sup>+</sup> transcription in treated cells compared to the basal levels in untreated cells. To further examine whether *abc1*<sup>+</sup>, *abc2*<sup>+</sup>, *abc4*<sup>+</sup>, and *hmt1*<sup>+</sup> transcription was controlled by Fep1, a *fep1* $\Delta$  null strain was grown in either the absence or the presence of either 250  $\mu$ M Dip or 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>. As shown in Fig. 2, the *fep1* $\Delta$  mutant had not significant effect on the expression of the above-mentioned genes. The bulk of these data led us to conclude that, among the five different ABC-encoded transporter genes tested, only *abc3*<sup>+</sup> was regulated by iron through the activity of the transcription factor Fep1.

*Analysis of abc3*<sup>+</sup> promoter sequences required to repress gene expression under basal and iron-replete conditions. The fact that Fep1 was necessary for the repression of *abc3*<sup>+</sup>

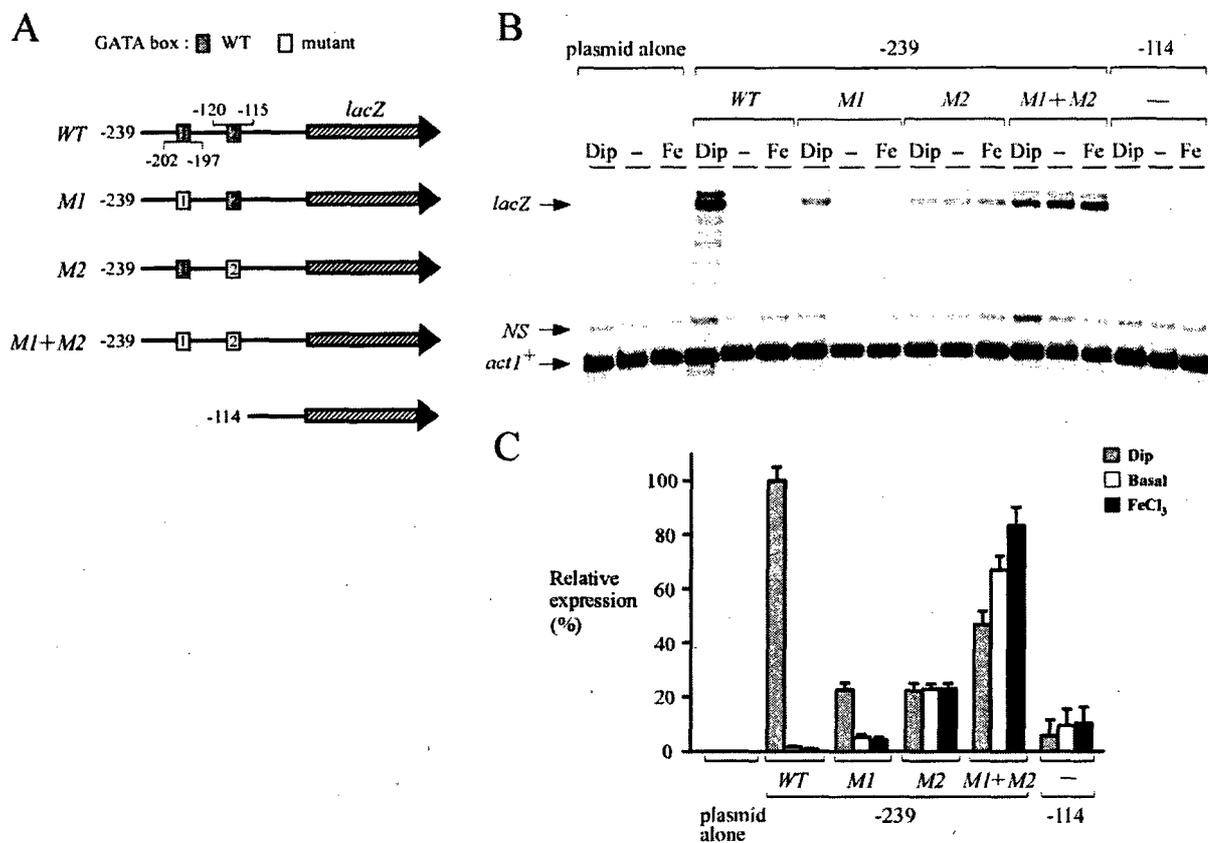
transcription under basal and iron-replete conditions led us to investigate whether the *abc3*<sup>+</sup> promoter region up to -584 from the start codon of the *abc3*<sup>+</sup> ORF harbored GATA elements. Six copies of the repeated sequence 5'-(A/T)GATA(A/T)-3' were identified at positions -115 to -120, -197 to -202, -391 to -396, -405 to -410, -418 to -423, and -511 to -516. To determine whether the GATA sequences played a role in the *abc3*<sup>+</sup> regulation by iron, we further examined two regions of the *abc3*<sup>+</sup> promoter that were fused upstream of and in-frame to the *lacZ* gene in pSP1-*lacZ*. The first region contained the promoter up to -584 from the initiator codon of the *abc3*<sup>+</sup> gene, whereas the second region harbored a shorter promoter segment up to -239. *lacZ* mRNA expression from these two plasmids was analyzed by RNase protection assays. Results showed that both fusion promoters were able to repress *lacZ* mRNA expression in the presence of iron (Fig. 3). Plasmids pSP1*abc3*<sup>+</sup>-584*lacZ* and pSP1*abc3*<sup>+</sup>-239*lacZ* were repressed ~7- and ~12-fold, respectively, as compared to their levels of expression in iron-starved cells. Unexpectedly, the overall magnitude of iron-regulated expression of the *lacZ* mRNA was slightly higher when the *abc3*<sup>+</sup> promoter was further deleted to position -239 (Fig. 3). As expected, *fiol*<sup>+</sup>-884*lacZ* (38) and *str1*<sup>+</sup>-966*lacZ* (39) (assayed as controls) were derepressed (~56- and ~6-fold, respectively) following treatment with Dip (250 μM) (Fig. 3). In contrast, their expression was down-regulated under basal or iron-replete conditions. Our data did not permit explanation of why the overall magnitude of the iron limitation-dependent activation of both *fiol*<sup>+</sup>-884*lacZ* and *str1*<sup>+</sup>-966*lacZ* gene expression was ~1.5 orders of magnitude greater than that for the *abc3*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion derivatives. However, the *abc3*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion plasmids were undoubtedly regulated in response to iron levels (Fig. 3).



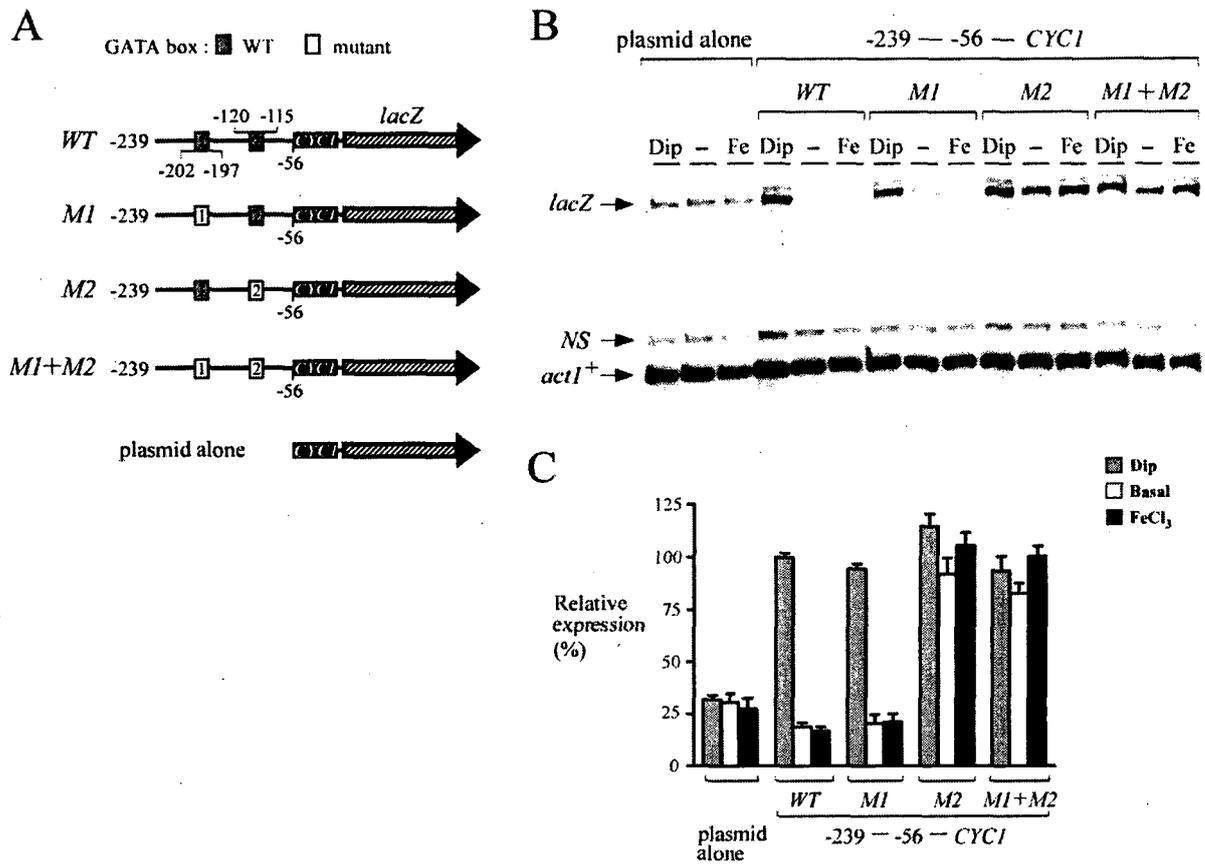
**Fig. 3. Iron responsiveness of the *abc3*<sup>+</sup> promoter.** *A*, *lacZ* fusion genes harboring wild-type DNA fragments derived from the *fiol*<sup>+</sup> (38), *str1*<sup>+</sup> (39), and *abc3*<sup>+</sup> promoters were analyzed by RNase protection assays. Total RNA was isolated from both control (untreated) cells (-) and cells treated with Dip (250  $\mu$ M) or FeCl<sub>3</sub> (100  $\mu$ M). Plasmids pSP1*fiol*<sup>+</sup>-884*lacZ* and pSP1*str1*<sup>+</sup>-966*lacZ* were used (38, 39) as controls for iron-regulated gene expression. The *lacZ* and *act1*<sup>+</sup> mRNA steady-state levels are indicated by arrows. NS, non-specific signal. *B*, Graphic representation of the quantification of the results of three

independent RNase protection assays, including the experiment shown in panel A. Reporter gene activity values shown are the average of triplicate determinations +/- standard deviations.

To gain further insight into the mechanism by which *abc3*<sup>+</sup> expression was regulated by iron, and because of the observation that the promoter region between positions -239 and -1 was sufficient to drive the iron-dependent repression of the *abc3*<sup>+</sup>-*lacZ* gene, we examined whether the two putative GATA sequences present in this region (positions -115 to -120, and -197 to -202) could mediate gene expression as a function of iron availability. Multiple point mutations that mimic the changes known to abolish the binding of Fep1 to GATA boxes (38) were inserted in each one or both elements. Mutation of the base pairs within the <sup>202</sup>TTATCA<sup>-197</sup> element (GACGGC instead of TTATCA; denoted M1) had no effect on the iron-regulatable expression of the *abc3*<sup>+</sup>-239*lacZ* fusion (Fig. 4). However, the overall magnitude of the response decreased by ~77 % as compared to cells containing the wild-type plasmid. When the second GATA element, <sup>-120</sup>TGATAT<sup>-115</sup>, was mutated (CCTGTC instead of TGATAT; denoted M2), a complete lack of iron responsiveness of the reporter gene was observed (Fig. 4). Surprisingly, when both (M1 + M2) GATA elements were mutated, the overall magnitude of the *lacZ* response was higher (Fig. 4). While the results indicated that the steady-state levels of *lacZ* mRNA under both basal and iron-replete conditions were slightly increased by 1.4- and 1.8-fold, respectively, above the levels observed in cells treated with Dip, the reason for such expression profile is unknown (Fig. 4). When the *abc3*<sup>+</sup> promoter was further deleted to position -114, *lacZ* transcript levels were very low, with no dramatic change as a function of iron availability (Fig. 4).



**Fig. 4.** Analysis of the proximal *abc3*<sup>+</sup> promoter sequences required to repress gene expression under both basal and iron-replete conditions. *A*, Diagram representation of a 239-bp *abc3*<sup>+</sup> promoter DNA fragment and its mutant derivatives assayed using the RNase protection protocol. The grey boxes indicate the wild-type GATA elements (5'-(T/A)GATA(T/A)-3'), while the white ones represent the mutant versions (5'-GCCGTC-3'). The hatched arrow represents the *lacZ* reporter gene. The nucleotide numbers refer to the positions of the GATA boxes relative to that of the *abc3*<sup>+</sup> initiator codon. *B*, Steady-state levels of *lacZ* mRNA from both the wild-type (*WT*) and mutant GATA fusions (*M1*, *M2*, and *M1 + M2*) were analyzed in the absence (-) or the presence of Dip (250  $\mu$ M) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100  $\mu$ M) for 90 min. The *lacZ* and *act1*<sup>+</sup> (as controls) mRNA levels are indicated with arrows. NS, nonspecific signal. *C*, Quantitation of the *lacZ* levels after the treatments shown in panel B. The values shown are the means of three replicates  $\pm$  standard deviations.



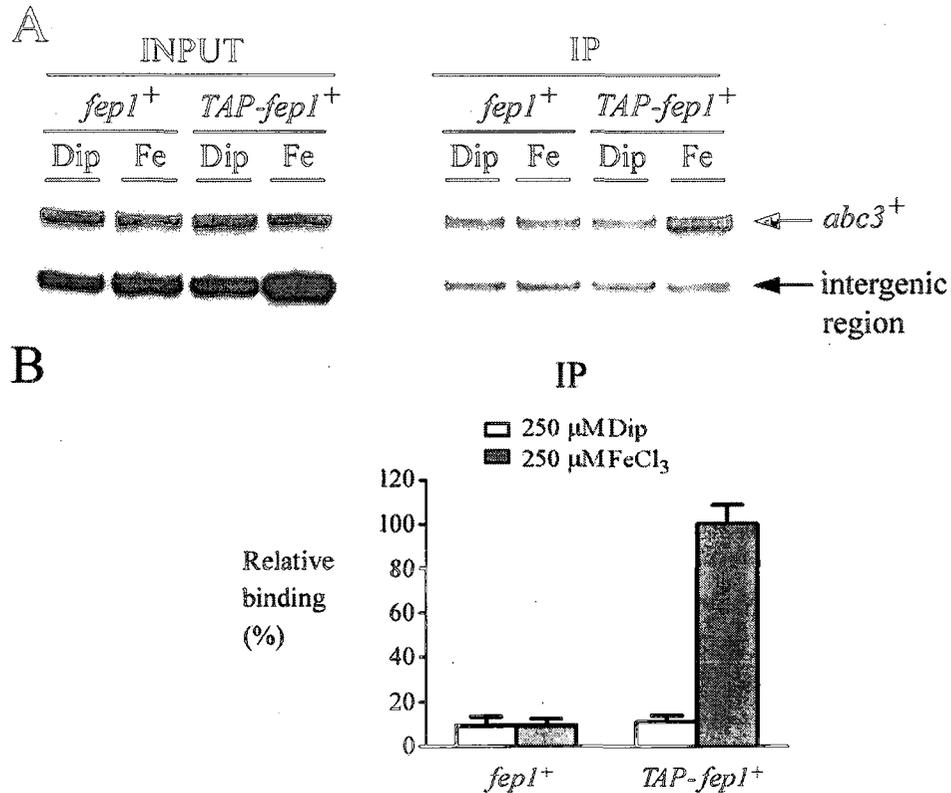
**Fig. 5.** A single GATA element in the *abc3*<sup>+</sup> promoter is sufficient to regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner. *A*, Schematic representation of a 183-bp *abc3*<sup>+</sup> promoter DNA fragment and its mutant derivatives that were inserted into the minimal promoter of the *CYC1* gene fused to *lacZ* (hatched arrow). The grey boxes shown in the *abc3*<sup>+</sup> promoter region indicate the wild-type elements, while the white boxes represent the mutant versions. The nucleotide numbers refer to the position relative to that of the A of the ATG initiation codon of the *abc3*<sup>+</sup> gene. *B*, Total RNA was isolated from cells harboring the indicated *abc3*<sup>+</sup>-*CYC1-lacZ* promoter derivatives and the steady-state mRNA levels of both *lacZ* and *act1*<sup>+</sup> (indicated with arrows) were analyzed by RNase protection experiments. Where indicated, the cells were left untreated (-) or were treated with Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 100 μM). NS, nonspecific signal. The data illustrated represent the results of three

independent experiments. C, Normalized expression levels of *abc3<sup>+</sup>-CYC1-lacZ* mRNA. The values shown represent the averages of three independent determinations +/- standard deviations.

Based on the findings that the integrity of the second GATA element located between positions -120 and -115 was essential in triggering the iron repression of the *abc3<sup>+</sup>-lacZ* fusion, we examined whether this sequence could regulate a heterologous reporter gene in an iron-dependent manner. A short DNA segment derived from the *abc3<sup>+</sup>* promoter (positions -239 to -56) was inserted in its natural orientation upstream of the minimal promoter of the *CYC1* gene fused to *lacZ* in pCF83. The fact that the upstream region of *lacZ* in pCF83 contains the *CYC1* minimal promoter may explain why low levels of *lacZ* transcript were detected from cells transformed with the plasmid alone. This promoter fusion was able to down-regulate *lacZ* mRNA expression under both standard (untreated) and iron-replete conditions. In contrast, under conditions of iron deprivation, *lacZ* mRNA expression was induced (~5- to 6-fold) compared to the transcript levels detected with either control (untreated) or iron-exposed cells (Fig. 5). When the first GATA element (positions -202 to -197) was mutated and the second one (positions -120 to -115) was left unchanged (wild-type), the steady-state levels of *lacZ* mRNA were decreased by ~4- to 5-fold under basal and iron-replete conditions compared to the levels observed in iron-starved cells (Fig. 5). When the first GATA element was unaltered and the second one was mutated, iron-dependent down-regulation of *lacZ* mRNA was compromised in a manner similar to that observed for the *abc3-239M2-lacZ* mutant (Figs. 4 and 5). When both GATA elements were mutated, a sustained and constitutive level of *lacZ* mRNA was observed regardless of the iron status

(Fig. 5). Taken together, these results were consistent with the interpretation that the proximal promoter region of *abc3*<sup>+</sup> contained a single functional GATA-type element, <sup>-120</sup>TGATAT<sup>-115</sup>, which was required for the transcriptional repression of *abc3*<sup>+</sup> in response to iron.

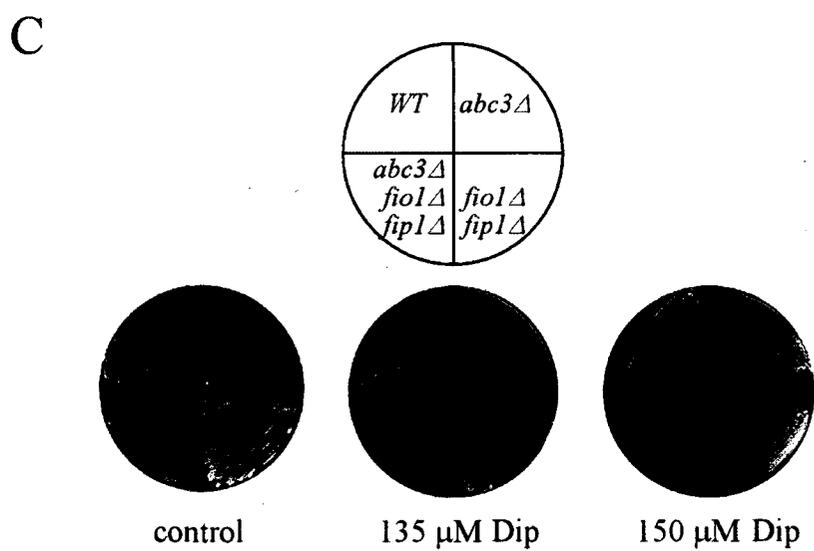
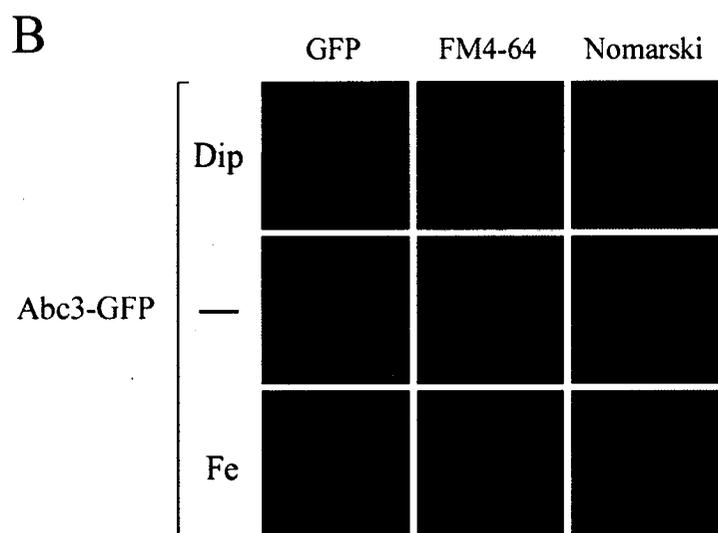
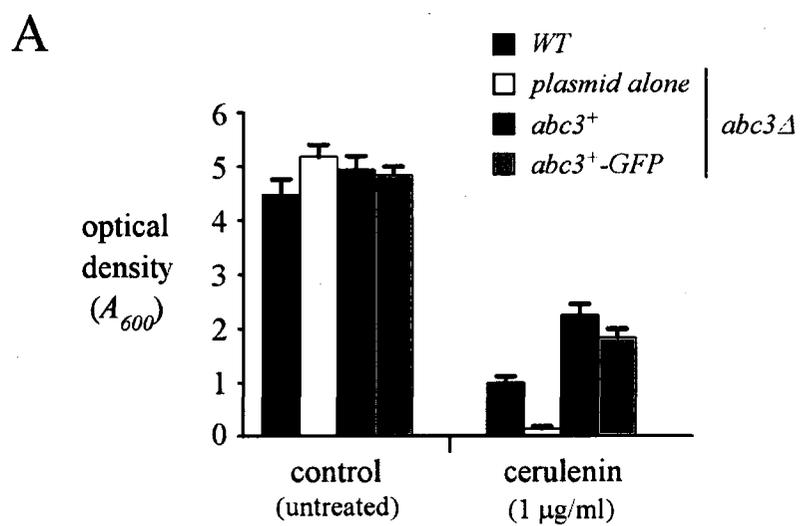
*Iron triggered the association of Fep1 with the abc3<sup>+</sup> promoter in vivo.* In previous studies, we reported that the fusion of TAP to the N terminus of Fep1 does not interfere with the latter's function (21). Furthermore, we created a *fep1Δ php4Δ* double mutant strain in which the expression of *TAP-fep1*<sup>+</sup> is disengaged from its transcriptional regulation by Php4, thereby ensuring its constitutive expression irrespective of the iron status (21). Taking advantage of this mutant, we used a CHIP method (21) to test whether the TAP-Fep1 fusion protein associates with the *abc3*<sup>+</sup> promoter *in vivo*. *fep1Δ php4Δ* mutant cells expressing either untagged or TAP-tagged *fep1*<sup>+</sup> alleles were precultivated in the presence of the iron chelator Dip (100 μM) to prevent any iron-dependent activation of Fep1 and, consequently, downregulation of target gene expression. Logarithmic phase cells were harvested, washed, and resuspended in the same medium containing Dip (250 μM) or FeCl<sub>3</sub> (250 μM) for 90 min. The cells were then fixed by formaldehyde treatment and chromatin was prepared to an average size of 500 bp. DNA fragments cross-linked to TAP-Fep1 were isolated by immunoprecipitation with an anti-mouse IgG that bound to the TAP tag. To determine the DNA sequences bound to TAP-Fep1, the cross-links were reversed, and DNA analyzed by quantitative PCR using primer sets specific for the *abc3*<sup>+</sup> promoter region encompassing the *cis*-acting element <sup>-120</sup>TGATAT<sup>-115</sup> that confers iron responsiveness. An intergenic region on chromosome II (contig location 3860292 – 3860402) devoid of ORFs and GATA-type *cis*-



**Fig. 6.** *Fep1* binds to the *abc3*<sup>+</sup> promoter in vivo in an iron-dependent manner. *A*, ChIP analysis of the *abc3*<sup>+</sup> promoter in *fep1* $\Delta$  *php4* $\Delta$  cells harboring an integrated untagged or TAP-tagged *fep1*<sup>+</sup> allele. The cells were precultured in the presence of 100  $\mu$ M Dip, allowed to grow to an  $A_{600}$  of  $\sim$ 1.0, washed and then incubated (90 min) in the presence of 250  $\mu$ M Dip or 250  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> (Fe). Chromatin was immunoprecipitated with anti-mouse IgG antibodies and a specific region of the *abc3*<sup>+</sup> promoter was analyzed by PCR to determine *Fep1* occupancy. The top band represents the *abc3*<sup>+</sup>-specific signal, whereas the lower band is an internal background control derived from a nontranscribed region (intergenic region). *B*, Quantitation of the PCR products obtained from anti-IgG immunoprecipitated (IP) chromatin. The results are representative of three independent experiments. The signals are expressed as relative binding (%), and were calculated as percentages of the largest amount of chromatin measured. Input, input chromatin; IP, immunoprecipitated chromatin.

acting sequences was used as a control for unregulated and nontranscribed DNA. Results from ChIP analysis showed that TAP-Fep1 occupied the *abc3*<sup>+</sup> promoter at high levels when cells had been incubated in the presence of iron (Fig. 6). The binding was iron-dependent, exhibiting ~9-fold higher levels of *abc3*<sup>+</sup> promoter DNA immunoprecipitated when the chromatin was prepared from cells grown in the presence of iron than from cells cultured in the presence of Dip (Fig. 6). As a control, untagged Fep1 immunoprecipitated the background levels of the *abc3*<sup>+</sup> promoter region. These data were consistent with results showing repression of the *abc3*<sup>+</sup> mRNA levels in response to iron. Furthermore, the data suggested that, under conditions of iron repletion, Fep1 was strongly associated with the *abc3*<sup>+</sup> promoter *in vivo* and dissociated from this promoter in response to iron deprivation.

*Vacuolar membrane protein Abc3 reduced cerulenin cytotoxicity and contributed to iron metabolism.* It has been shown that inactivation of Abc3 increased the sensitivity of *S. pombe* cells to cerulenin (20). Although the molecular basis of this growth inhibition remains unclear, we took advantage of this phenotype to determine whether insertion of GFP interfered with Abc3 function. As shown in Fig. 7A, the *abc3*Δ mutant strain exhibited an increased sensitivity to cerulenin as compared to the wild-type strain. Whereas the wild-type strain showed a 77% inhibition of growth in medium containing 1 μg/ml cerulenin, the *abc3*Δ mutant was ~7-fold more sensitive to cerulenin. When the *abc3*Δ disruptant was transformed with the wild-type or GFP epitope-tagged *abc3*<sup>+</sup> allele, cell resistance was restored to ~184-226% of the wild-type starting strain (Fig. 7A). The Abc3-GFP fusion protein possessed Abc3 activity that was comparable to that of the wild-type (untagged) Abc3 protein (Fig. 7A). We next sought to determine the subcellular location of active

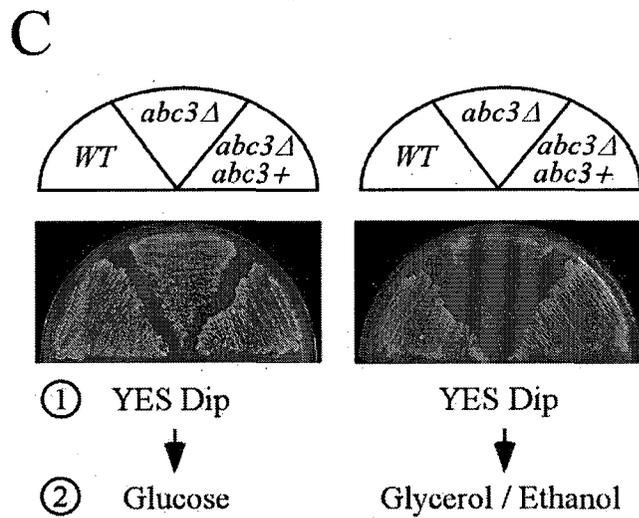
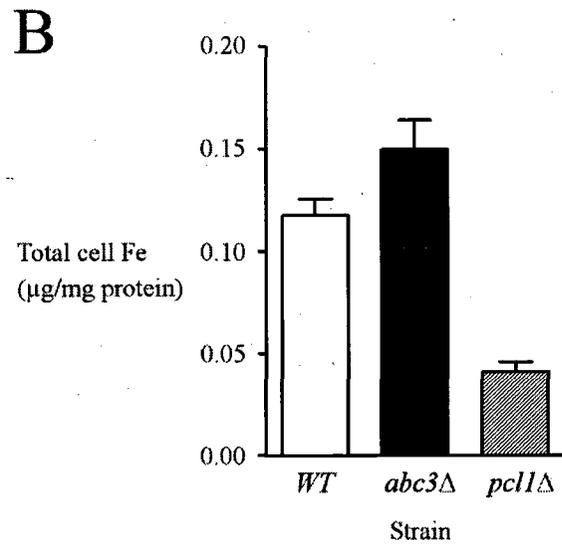
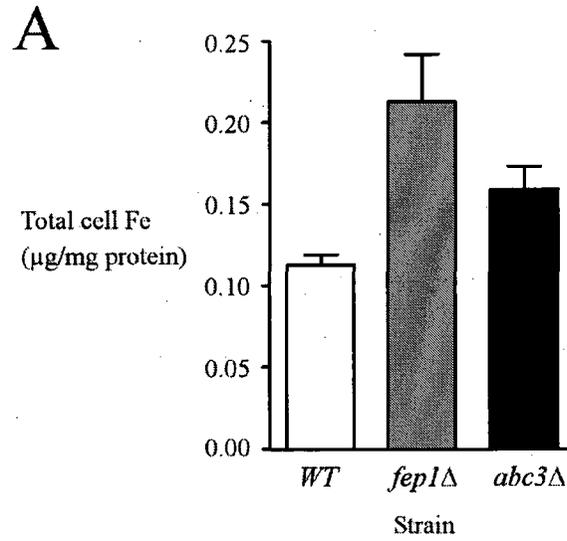


**Fig. 7.** *Vacuolar localization of a functional Abc3-GFP fusion protein and the contribution of Abc3 to cell growth under low iron conditions.* *A*, *abc3* $\Delta$  mutant cells were transformed with the indicated plasmids and their growth was measured in unmodified (control) Edinburgh minimal medium or that supplemented with cerulenin (1  $\mu$ g/ml). Total growth relative to that determined in the absence of cerulenin (% control growth) was evaluated by turbidimetry at  $A_{600}$ . Each point represents the average of triplicates  $\pm$  the standard deviation. *B*, Expression of *abc3*<sup>+</sup> in transformed *abc3* $\Delta$  cells. Exponentially growing cells ( $2 \times 10^6$  cells) were incubated in the absence (-) or the presence of Dip (50  $\mu$ M) or FeCl<sub>3</sub> (Fe, 50  $\mu$ M) for 16 h at 30°C. Cells were analyzed by direct fluorescence microscopy for GFP. FM4-64 staining visualized the vacuolar membranes, and Nomarski optics were used to examine cell morphology. *C*, The indicated *S. pombe* strains were streaked on EMM iron-poor media containing either 135 or 150  $\mu$ M Dip and then incubated for 9 days at 30°C in order to test for cell viability. The strains were also streaked on EMM medium lacking Dip (*control*) and were incubated at 30°C for 4 days. *WT*, isogenic wild-type strain.

Abc3-GFP in response to changing environmental iron concentrations. As shown in Fig. 7B, Abc3-GFP fluorescence was detected in the vacuole membranes of cells expressing the fusion allele under iron-limiting conditions. Abc3-GFP fluorescence colocalized with the vacuole-staining dye FM4-64, that was used as a marker to stain the vacuolar membrane. Consistent with the iron-dependent down-regulation of the *abc3*<sup>+</sup> gene expression, Abc3-GFP fluorescence levels were strongly reduced in cells grown under basal or elevated (100  $\mu$ M) iron concentrations. Whereas there was an absence of fluorescence in cells that had been transformed with an empty vector, the *abc3* $\Delta$  deletion strain expressing GFP alone displayed a pattern of fluorescence that was distributed throughout the cytoplasm and nuclei of the cells (data not shown). These results led us to conclude that Abc3 functions at the vacuole membrane under conditions of iron deficiency.

The observation that *abc3*<sup>+</sup> transcription responded to low iron concentrations suggested that the Abc3 protein was involved in iron metabolism, and that its expression was required under iron-limiting conditions. To begin to address this question, we created a set of isogenic strains that contained disruptions in genes known to play a role in iron transport. Gene deletions were introduced in the parental strain to disrupt the *fiol*<sup>+</sup> and *fip1*<sup>+</sup> genes that encode the cell surface oxidase-permease-based iron transport system in *S. pombe* (5). Subsequently, we inactivated the *abc3*<sup>+</sup> locus in the context of a *fiol* $\Delta$  *fip1* $\Delta$  double mutant background. We tested whether these mutations affected the ability of cells to grow on media containing the iron chelator Dip. Although the *abc3* $\Delta$  single mutant cells exhibited no obvious defects, the deletion of *abc3*<sup>+</sup> in the *fiol* $\Delta$  *fip1* $\Delta$  background resulted in a more severe growth defect than observed with the *fiol* $\Delta$  *fip1* $\Delta$  double mutant strain (Fig. 7C). Thus, a role for Abc3 in mobilizing iron became apparent only when the Fio1-Fip1 iron transport system was missing. As a control, the wild-type parental strain was able to grow on medium containing either 135 or 150  $\mu$ M Dip.

If Abc3 functions by exporting Fe, the rationale is that total cell Fe should increase in *abc3*-deleted cells. To determine total cell Fe concentrations in wild-type versus *abc3* $\Delta$  null cells, we used a BPS-based spectrophotometric assay for quantitative measurement of iron (45). The wild-type cells exhibited a total Fe concentration of 0.11  $\mu$ g/mg protein. Interestingly, the *abc3* $\Delta$  and *fep1* $\Delta$  mutant strains displayed a total cell Fe concentration of 0.16 and 0.21  $\mu$ g/mg protein, respectively, which was 1.5 and 1.9 times higher than the wild-type strain (Fig. 8A). The total cell Fe content results revealed that Abc3 plays a role in Fe-efflux. Deletion of *abc3*<sup>+</sup> blocked Fe-efflux, triggering Fe accumulation within the cells. For the



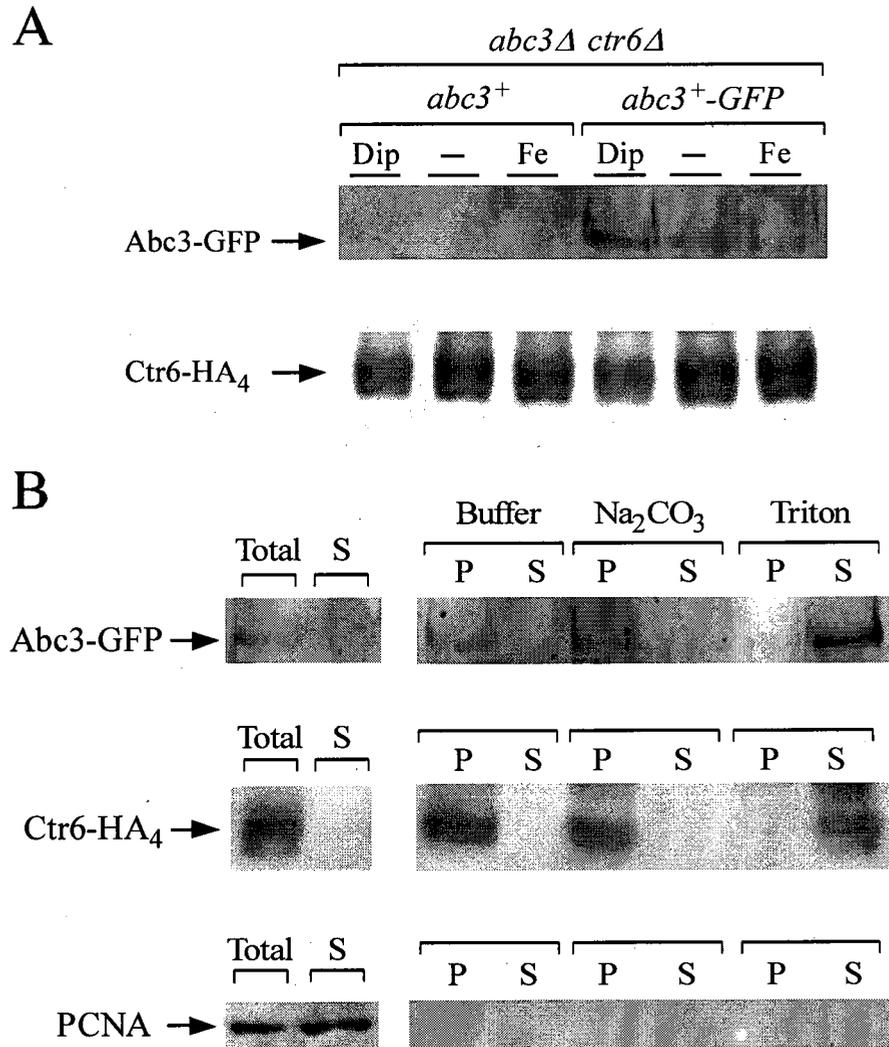
**Fig. 8. Iron accumulates in *abc3Δ* mutant cells.** *A*, The wild-type (*WT*), *fep1Δ*, and *abc3Δ* strains were grown in YES medium to exponential phase ( $A_{600}$  of  $\sim 1.0$ ). The cells were harvested and the iron content was determined by the BPS-based spectrophotometric method (45). The values indicated are the averages of triplicate measurements  $\pm$  standard deviations. *B*, Logarithmic-phase cultures of the isogenic wild-type (*WT*), *abc3Δ*, and *pcl1Δ* strains were grown in Edinburgh minimal medium containing 0.74  $\mu\text{g}$  iron. The cells lysates were prepared from each culture and analyzed using the BPS-based spectrophotometric assay for quantitative measurement of iron. The values of total iron concentration shown are the means of three replicates  $\pm$  standard deviations. *C*, An *S. pombe* strain bearing a disrupted *abc3Δ* allele was transformed with pJK148 (plasmid alone, *abc3Δ*) or pJK148*abc3*<sup>+</sup> (*abc3*<sup>+</sup>). *Step 1*, cultures were grown in YES medium containing glucose and Dip (150  $\mu\text{M}$ ). *Step 2*, cells were washed in water, and equivalent amount of each culture was streaked onto fermentable (glucose) and nonfermentable (ethanol/glycerol) agar media, and incubated at 30°C for 4 and 7 days, respectively. *WT*, wild-type strain.

*fep1Δ* mutant strain, the quantitative data revealed that *fep1Δ* cells accumulate Fe in excess of the physiological requirement (Fig. 8A). These results were fully consistent with the fact that in the absence of Fep1, there is lack of transcriptional repression of genes encoding components of the high-affinity Fe uptake machinery (38). We also measured total cell Fe content in an *S. pombe* *pcl1Δ* disruption strain (33). As observed for the vacuolar Fe-importer Ccc1 in *S. cerevisiae* (28), deletion of the *pcl1*<sup>+</sup> gene in *S. pombe* rendered cells sensitive to Fe compared with the wild-type strain (33, and data not shown). Consistently, we observed that *S. pombe* cells lacking the putative vacuolar Fe-importer Pcl1 contained 0.04  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, which is 3 times weaker than the wild-type strain (Fig. 8B).

Previous studies in *S. cerevisiae* have shown that, during the transition from growth on glucose to growth on a nonfermentable carbon source, the vacuolar iron stores are

redistributed within the cell and contribute to iron-requiring processes such as mitochondriogenesis (46). To test whether *abc3Δ* cells displayed a lower efficiency in making the switch from nonrespiratory to respiratory metabolism, cells were first grown on glucose under low iron conditions. After a four-day incubation on solid medium containing Dip (150 μM), the cells were transferred onto solid medium containing ethanol/glycerol, or onto medium containing glucose for control of viability. *abc3Δ* mutant cells were found to lag well behind their wild-type counterparts in converting to respiratory metabolism (Fig. 8C). In contrast, the parental wild-type cells were capable of quickly converting from nonrespiratory to respiratory growth when switched from a glucose- to an ethanol/glycerol-containing medium (Fig. 8C). Taken together with the microscopic data, the results were consistent with a role for Abc3 in mobilizing iron within the cell, supporting a possible function for this protein in the transmission of an intracellular pool of iron to extra-vacuolar metalloenzymes.

*Expression and membrane association of Abc3.* The iron-dependent regulated expression of *abc3<sup>+</sup>*, and its vacuolar detection under iron-limiting conditions, prompted us to examine the Abc3-GFP protein levels in both untreated cells and cells incubated under conditions of low and high levels of iron. *abc3<sup>+</sup>-GFP* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>* (6) fusion genes expressed under the control of their own promoters were co-transformed to an *abc3Δ ctr6Δ* double mutant disruption strain. The *abc3Δ ctr6Δ* mutant strain co-expressing the untagged *abc3<sup>+</sup>* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>* alleles were used in parallel experiments. Cells co-expressing either the *abc3<sup>+</sup>-GFP* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>*, or the *abc3<sup>+</sup>* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>* alleles were grown in the presence of the iron chelator Dip. Membrane fractions collected after ultracentrifugation were treated with



**Fig. 9.** *Abc3* is an integral membrane protein biosynthetically regulated by cellular iron levels. *A*, *S. pombe* cells harboring an *abc3Δ ctr6Δ* double deletion were co-transformed with *abc3<sup>+</sup>* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>*, or with *abc3<sup>+</sup>-GFP* and *ctr6<sup>+</sup>-HA<sub>4</sub>*. The co-transformed cells were grown to early-logarithmic phase and then treated with either Dip (50 μM) or FeCl<sub>3</sub> (50 μM), or were left untreated for 16 h. Triton X-100-solubilized extracts were prepared and analyzed by immunoblot using either anti-GFP or anti-HA antibody. The positions of the Abc3-GFP and Ctr6-HA<sub>4</sub> proteins are indicated by the arrows. *B*, *abc3Δ ctr6Δ* cells expressing Abc3-GFP and Ctr6-HA<sub>4</sub> proteins were grown in the presence of 50 μM Dip. Total-extract preparation (Total) was subjected to ultra-centrifugation at 100,000 X g. The membrane-containing pellet fraction was resuspended and either left untreated (buffer), or

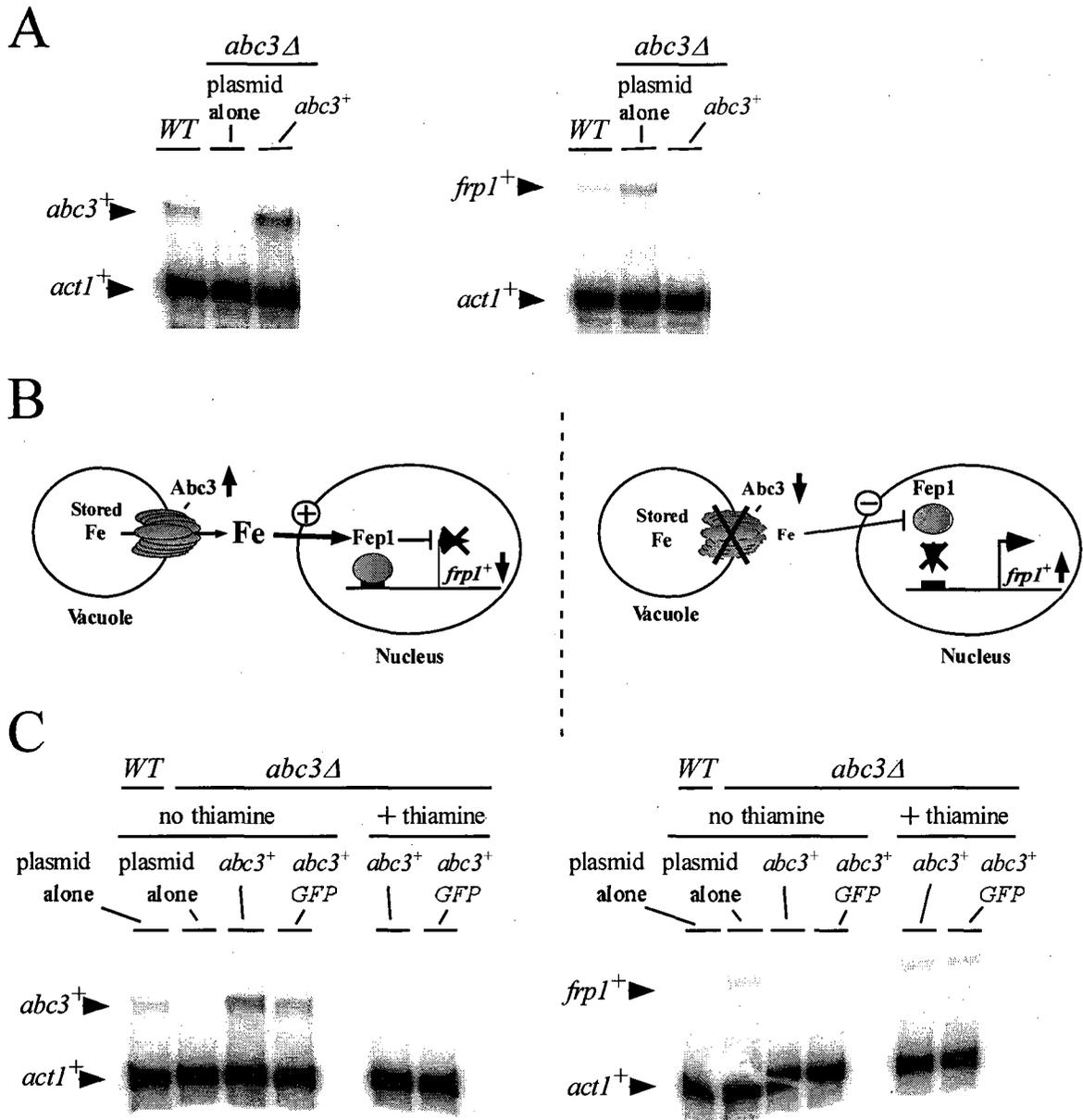
adjusted to either 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> or 1% Triton X-100, and then ultracentrifuged (100,000 X g). The supernatant (S) and pellet (P) fractions were separated on a SDS-polyacrylamide gel, and then analyzed by Western blotting using an anti-GFP, anti-HA<sub>4</sub>, or anti-PCNA antibody.

Triton X-100 and the supernatants were fractionated by electrophoresis. Results of immunoblotting using an antibody directed against GFP showed that Abc3-GFP was detected after 16 h of treatment (Fig. 9A, and data not shown). Consistent with the regulation of *abc3*<sup>+</sup> mRNA levels, the Abc3-GFP protein levels were markedly reduced in cells grown for 16 h under basal and high iron conditions. Immunoblot analyses of the Triton X-100-solubilized cell membranes were also carried out using an anti-HA antibody. In this case, results showed that Ctr6-HA<sub>4</sub> was detected after 16 h in cultures containing Dip or iron, as well as under untreated (basal) conditions (Fig. 9A).

The primary amino acid sequence of Abc3 suggests that it is integrated into cellular membranes. This possibility was investigated in the following manner. Cell membranes were obtained by ultracentrifugation of whole cell extracts of cells grown under iron-limiting conditions. Soluble and detached peripheral membrane proteins present in the supernatants were precipitated, resuspended, and left untreated before analysis by immunoblot assays. The pellet fraction was resuspended and left untreated or was adjusted to 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> or 1% Triton X-100, and then re-fractionated at 100,000 X g. Results showed that in the absence of any treatment, Abc3-GFP and Ctr6-HA<sub>4</sub> proteins were not detected in the supernatant fractions but only in the pellet fractions (Fig. 9B). An identical protein pattern was observed when the procedure had been carried out in the presence of 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, which is known to linearize membrane structures, releasing non-integral membrane proteins

into the soluble fraction. In the presence of Triton X-100, a non-ionic detergent that solubilises membranes, Abc3-GFP and Ctr6-HA<sub>4</sub> were released from the membrane and were detected in the supernatant fractions, indicating that Abc3-GFP was an integral membrane protein as previously reported in the case of Ctr6-HA<sub>4</sub> (6). On the other hand, the soluble PCNA protein was only found into the supernatant fraction.

*Effects of deletion and expression of abc3<sup>+</sup> on the transcriptional regulation of the frp1<sup>+</sup> ferrireductase gene.* The observation that *abc3<sup>+</sup>* was part of the transcriptional program that cells use to respond to low iron levels suggested that this protein was required during iron deficiency. Based on the fact of the vacuolar localization of Abc3, we reasoned that Abc3 could be important for providing iron to the cell from intracellular stores and that its activity could lead to the activation of Fep1. Under conditions of activation, Fep1 negatively regulates several genes, including those encoding components of the high-affinity iron transport machinery. To test how Abc3 expression influences cellular iron-dependent regulation, we investigated whether the levels of *frp1<sup>+</sup>* transcript were increased in cells harboring an inactivated *abc3<sup>+</sup>* gene. Cells were grown to early-logarithmic phase in Edinburgh minimal basal medium. Data showed that the expression of *frp1<sup>+</sup>* was increased ~2.8-fold as compared to the basal level of *frp1<sup>+</sup>* transcripts detected in wild-type cells (*abc3<sup>+</sup>*) (Fig. 10A). When the *abc3Δ* mutant was transformed with the wild-type *abc3<sup>+</sup>* allele, *frp1<sup>+</sup>* mRNA levels decreased ~1.8-fold under the basal levels observed in the wild-type starting strain (Fig. 10A). We concluded that deletion of the *abc3<sup>+</sup>* gene (*abc3Δ*) increased the steady-state levels of *frp1<sup>+</sup>* mRNA, suggesting a function for Abc3 in



**Fig. 10.** Disruption of the *abc3<sup>+</sup>* gene increases *frp1<sup>+</sup>* mRNA levels, whereas its transcriptional activation decreases *frp1<sup>+</sup>* expression. *A*, Cells were grown to early-logarithmic phase in Edinburgh minimal basal medium. *abc3<sup>+</sup>*, *frp1<sup>+</sup>*, and *act1<sup>+</sup>* mRNA steady-state levels (indicated by the arrows) were determined in a wild-type strain (*WT*) and an *abc3Δ* disruption strain in which either an empty plasmid or a wild-type copy of the *abc3<sup>+</sup>* gene was returned by transformation. The results are representative of three independent experiments. *B*, The left side shows a proposed model for the iron-dependent repression of

*frp1*<sup>+</sup> transcription when Abc3 is active, while the right side shows how the inactivation of Abc3 function leads to *frp1*<sup>+</sup> transcriptional induction. C, Cells harboring an *abc3*Δ deletion were transformed with either pSP-1178*nmt41X-abc3*<sup>+</sup> or pSP-1178*nmt41X-abc3*<sup>+</sup>-*GFP* and pre-cultured in the presence of both thiamine (15 μM) and FeCl<sub>3</sub> (10 μM). Early-logarithmic cultures were transferred to thiamine-free minimal medium containing 74 nM iron for 16 h. The cells (*A*<sub>600</sub> of ~1.0) were then kept in thiamine-depleted medium, or were transferred to thiamine-replete medium, and grown for a further 60 min. After incubation, total RNA was prepared and analyzed by RNase protection assays. Steady-state levels of the *abc3*<sup>+</sup>, *frp1*<sup>+</sup>, and *act1*<sup>+</sup> mRNAs (indicated with arrows) were probed. As controls, *abc3*<sup>+</sup> and *frp1*<sup>+</sup> mRNA steady-state levels were probed in a wild-type strain harboring an empty plasmid.

providing iron to the cell from intracellular stores. Its absence would lead to activation of the expression of the plasma membrane uptake machinery through the down-regulation of the iron-sensing transcription factor Fep1.

To further investigate the ability of the cell to down-regulate the transcription of *frp1*<sup>+</sup> as an indicator of Abc3 activity, we utilized the *nmt1*<sup>+</sup> inducible/repressible promoter system (32). The expression of *abc3*<sup>+</sup> or *abc3*<sup>+</sup>-*GFP* under the control of the *nmt1*<sup>+</sup> 41X promoter (13) permitted the repression of the synthesis of Abc3 in the presence of iron (10 μM), thereby ensuring intracellular accumulation of iron. Subsequently, the cells were harvested, washed, and resuspended in the same media in the absence of iron. After induction for 60 min, the ability of Abc3 or Abc3-GFP to generate an iron-mediated signal that fostered repression of *frp1*<sup>+</sup> transcription was analyzed. As shown in Fig. 10C, cells expressing *abc3*<sup>+</sup> or *abc3*<sup>+</sup>-*GFP* triggered down-regulation of the *frp1*<sup>+</sup> mRNA levels (~3- to 4-fold). In contrast, treatment of the cells with thiamine to repress Abc3 synthesis induced the up-regulation of

*frp1*<sup>+</sup> mRNA which exhibited steady-state levels similar to that observed in *abc3Δ* null cells. Taken together, the results strongly suggested that iron levels were compromised sufficiently in *abc3Δ* mutant cells to induce the activation of the *frp1*<sup>+</sup> gene. In contrast, when *abc3*<sup>+</sup> was induced under the control of the *nmt1*<sup>+</sup> promoter, a larger pool of labile iron may become available and activate Fep1, which in turn down-regulates the *frp1*<sup>+</sup> transcription levels.

## Discussion

Members of the ABC protein superfamily include transporters that are involved in the translocation of a wide variety of substrates across membranes (15). ABC transporters are classified into seven subfamilies (ABCA to ABCG) based on conserved sequences within their amino acid sequences (10). *S. pombe* has eleven putative ABC transporters, four of which (Abc1, Abc2, Abc3, and Abc4) are members of the ABCC subfamily (20). A previous report has localized a GFP-tagged form of Abc1 to the endoplasmic reticulum, and Abc2-GFP, Abc3-GFP, and Abc4-GFP fusion proteins to the vacuolar membrane (20).

The amino acid identities between Abc3 and Abc1, Abc2, and Abc4 are 23.6, 62.8, and 22.8 %, respectively, while the amino acid similarities are 39.7, 74.7, and 38.3 %, respectively. Although Abc2 and Abc3 exhibit the highest percentage of amino acid identity and similarity, it has been shown that these two proteins are functionally distinct with respect to vacuolar accumulation of glutathione-conjugated compounds, including both the adenine biosynthetic intermediate phosphoribosylaminoimidazole and monochlorobimane (20). In addition, although Abc2 and Abc4 possess much less homology (23.7 % identity; 40 %

similarity), the two proteins share similar functions *in vivo*, and differ considerably from Abc3 and Abc1 (20). Given the unrelated localizations of Abc3 and Abc1, and the lack of common phenotypes associated with their respective gene deletions (20), the probability that Abc3 and Abc1 share a common biological role is low.

As would be expected for genes regulated by Fep1, putative Fep1 consensus binding sites were found in the *abc3*<sup>+</sup> promoter. The removal of four GATA boxes from the 5' end of the *abc3*<sup>+</sup> promoter had no apparent effect on either the iron- or the Dip-regulated expression of the *abc3*<sup>+</sup>-*lacZ* fusion gene. The overall magnitude of the response was found to be even higher when the DNA between positions -584 and -239 was deleted. From there, we employed two independent reporter gene assays, one using the endogenous *abc3*<sup>+</sup> minimal promoter, and the second using a heterologous *CYC1* minimal promoter. Both approaches revealed that the integrity of the GATA sequence located between positions -120 to -115 was essential to the iron-dependent repression of *abc3*<sup>+</sup>. Thus, *abc3*<sup>+</sup> is the second Fep1-regulated gene to be subject of negative transcriptional regulation via the presence of a single GATA element, the first reported example being *str1*<sup>+</sup> (39). When iron is in excess in *Ustilago maydis*, siderophore transporter gene expression is negatively regulated at the transcriptional level by Urbs1 (2, 3). Similarly to Fep1, Urbs1 has two Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>-type zinc fingers located within its DNA-binding domain. Analogous to the situation for Fep1, *in vitro* DNA-binding assays have shown that Urbs1 can specifically interact with a single GATA element (2). However, as opposed to Fep1, Urbs1 requires the presence of two GATA boxes for its *in vivo* function (2). These observations may indicate differences in the use of amino acids that serve to interact with DNA between Fep1 and Urbs1. Alternatively, identification and characterization of additional target genes in *U. maydis* may reveal that some of them are

negatively regulated through binding of Ursb1 to a single GATA element. A sequence comparison between many functional GATA boxes found that a variation occurred within the consensus *cis*-acting 5'-(A/T)GATA(A/T)-3' element of target gene promoters that respond to Fep1. We have observed that when the GATA element contained the following sequence, 5'-ATC(A/T)GATA(A/T)-3', the iron-regulatory response was more consistent, and almost, invariably operative. Examples included the strongest upstream 5'-<sup>803</sup>ATCTGATAA<sup>-795</sup>-3' element of *fiol*<sup>+</sup>, the 5'-<sup>873</sup>ATCAGATAA<sup>-865</sup>-3' element of *str1*<sup>+</sup>, both the 5'-<sup>191</sup>ATCAGATAT<sup>-183</sup>-3' and the 5'-<sup>168</sup>ATCTGATAA<sup>-160</sup>-3' elements of *php4*<sup>+</sup>, and the 5'-<sup>123</sup>ATCTGATAT<sup>-115</sup>-3' element of *abc3*<sup>+</sup>. Furthermore, other groups have also observed that the extended 5'-ATC(A/T)GATA(A/T)-3' motif was significantly over-represented in target gene promoters that responded to *U. maydis* Ursb1 and *A. fumigatus* SreA, two fungal iron-responsive GATA factors (12, 51).

Yeast studies have shown that the vacuole is an important storage compartment for metals, either as a means of detoxifying the cell or as a reservoir of metal that enable the cell to grow under metal-deficient conditions (6, 47, 48, 53, 54). In the case of *S. cerevisiae*, when the cells dispose of ample iron, Ccc1 mediates the import of iron into the vacuole (28). In the case of *S. pombe*, *pcl1*<sup>+</sup> encodes a putative ortholog of *S. cerevisiae* Ccc1. As is observed for Ccc1, the deletion of the *pcl1*<sup>+</sup> gene renders the cells sensitive to iron as compared to the wild-type strain (33, and data not shown). Two distinct mechanisms are used for vacuolar iron mobilization when *S. cerevisiae* cells respond to a shift from sufficient to low iron concentrations. One mechanism involves the NRAMP homologue Smf3, which localizes to the vacuolar membrane and helps to mobilize vacuolar stores of iron (44). The other mechanism involves the vacuolar membrane-resident Fth1/Fet5 complex, which transports

stored iron out of the vacuole, resulting in a subsequent redistribution within the cell (60). In *S. pombe*, vacuolar iron mobilization in response to iron deficiency has not been established and may function differently because of a lack of homologs to the *S. cerevisiae* Smf3, Fth1, and Fet5. In fission yeast, Pdt1 is the only protein homologous to the NRAMP family of metal transporters (59). Analysis of protein localization has shown that Pdt1 is detected in periphery of the nucleus and the cell perimeter, suggesting a biological role in the endoplasmic reticulum and, perhaps, at the cell surface (59). Furthermore, genetic and functional studies have shown that Pdt1 and Pmr1 cooperatively regulate cell morphogenesis through an as yet uncharacterized manganese-dependent homeostatic mechanism (30).

In this study, our data do not allow us to establish a relationship between cerulenin and Fe homeostasis. However, it has been previously shown that cerulenin is an effective inhibitor of sterol synthesis in yeast (61). Interestingly, like *abc3*<sup>+</sup>, the mRNA levels of genes involved in sterol synthesis increase upon Fe depletion (34). One can envision that in the absence of Abc3, less Fe is available for Fe-requiring proteins involved in sterol synthesis, making cerulenin more effective to inhibit sterol biosynthesis, and then cell growth.

Given the fact that genetic studies have implicated the vacuole as a player in iron storage (28, 54), and assuming that vacuolar iron is present in a usable form, we suggest that *S. pombe* Abc3 is an intracellular transporter that mobilizes stores of iron from the organelle for redistribution throughout the cell. This model is supported by six experimental results. First, a functional Abc3-GFP fusion protein was localized to the membrane vacuole under iron-limiting conditions. Second, deletion of the *abc3*<sup>+</sup> gene led to elevated transcriptional activity of *frp1*<sup>+</sup> to presumably compensate for iron-poor conditions. Third, when *abc3*<sup>+</sup> was

induced from the *nmt1*<sup>+</sup> promoter, there was inhibition of *frp1*<sup>+</sup> gene expression. Four, *abc3Δ* cells contained more total cell iron than wild-type cells. Five, in *S. pombe* cells lacking the high-affinity plasma membrane transporting complex Fio1 and Fip1, Abc3 was required for growth in low iron medium. Six, the fact that *abc3*<sup>+</sup> was transcriptionally regulated by iron in the same direction as the genes encoding components of the high-affinity iron uptake machinery (e.g. *frp1*<sup>+</sup>, *fip1*<sup>+</sup>, and *fio1*<sup>+</sup>) suggests a function for Abc3 in iron utilization as opposed to iron detoxification.

Fungi such as *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, and *U. maydis* do not possess Fth1 orthologs (16). As in the case of *S. pombe* Abc3, *A. nidulans* AtrH, *A. fumigatus* Afu3g03430 and Afu3g03670, and *U. maydis* Fer6 are all ABC-like proteins that are regulated at the level of gene transcription (12, 16, 51). Their loci are induced in iron-depleted cells and repressed in iron-replete cells. Although protein localization of these putative ABC-type transporters has not yet been ascertained, the fission yeast *S. pombe* may represent an attractive model system for understanding the involvement of these proteins in *A. nidulans*, *A. fumigatus*, and *U. maydis* with respect to iron intracellular transport and homeostasis.

One feature of the members of the ABCC subfamily of transporters that distinguishes them from other ABC transporters is their ability to transport substrates in the form of glutathione conjugates or complexes (17, 29). In the presence of excess iron, the vacuole is postulated to function as a storage compartment, preventing detrimental levels of iron accumulation in the cytosol (28). Intravacuolar iron may be bound in a bio-unavailable form such as Fe<sup>3+</sup> to polyphosphates or other molecules. In response to iron deficiency, Abc3 may mobilize

stored iron either in an inorganic form or in the form of iron conjugates. This possibility remains speculative since a putative interaction between Abc3 and inorganic iron or organic iron-conjugates is unknown.

It is interesting to note that our data concerning Abc3 are reminiscent of those observed in the case of the IDI7 protein isolated from barley root cells, which is a member of the ABC superfamily of transporters (62). IDI7 localizes to the vacuolar surface in plant cells that is known as the tonoplast. As observed in the case of Abc3, IDI7 is expressed only in cells grown under conditions of iron deprivation. More recently, a third ABC transporter, named NtPDR3, has been found to be induced in iron-starved tobacco cells (11). Considering this information, one can envision the possibility that a new group of ABC transporters, including Abc3, IDI7, and NtPDR3, may be responsible for mobilizing intravacuolar stores of iron when cells face iron deprivation.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Professor Gilles Dupuis and William Home for critically reading the manuscript. We thank Jude Beaudoin for stimulating discussion and suggestions. B. P. and M. J. are the recipients of studentships from the Foundation of Stars for Children's Health Research and the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke, respectively. A. M. is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant MOP-238238-01 to S.L. S. L. is the recipient of a Senior Investigator Scholarship from FRSQ.

## References

1. **Alfa, C., P. Fantes, J. Hyams, M. McLeod, and E. Warbrick.** 1993. Experiments with fission yeast, a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
2. **An, Z., B. Mei, W. M. Yuan, and S. A. Leong.** 1997. The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. *EMBO J.* **16**:1742-1750.
3. **An, Z., Q. Zhao, J. McEvoy, W. M. Yuan, J. L. Markley, and S. A. Leong.** 1997. The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5882-5887.
4. **Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan.** 1994. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**:403-410.
5. **Askwith, C., and J. Kaplan.** 1997. An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**:401-405.
6. **Bellemare, D. R., L. Shaner, K. A. Morano, J. Beaudoin, R. Langlois, and S. Labbé.** 2002. Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**:46676-46686.

7. **Chen, D., W. M. Toone, J. Mata, R. Lyne, G. Burns, K. Kivinen, A. Brazma, N. Jones, and J. Bähler.** 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**:214-229.
8. **Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch, and R. D. Klausner.** 1992. Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3869-3873.
9. **Dean, M.** 2005. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol.* **400**:409-429.
10. **Decottignies, A., and A. Goffeau.** 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**:137-145.
11. **Ducos, E., S. Fraysse, and M. Boutry.** 2005. NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett.* **579**:6791-6795.
12. **Eichhorn, H., F. Lessing, B. Winterberg, J. Schirawski, J. Kamper, P. Muller, and R. Kahmann.** 2006. A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**:3332-3345.
13. **Forsburg, S. L.** 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* **21**:2955-2956.

14. **Georgatsou, E., and D. Alexandraki.** 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3065-3073.
15. **Gottesman, M. M., and S. V. Ambudkar.** 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**:453-458.
16. **Haas, H., M. Eisendle, and B. G. Turgeon.** 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**:149-187.
17. **Haimeur, A., G. Conseil, R. G. Deeley, and S. P. Cole.** 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* **5**:21-53.
18. **Halliwell, B., and J. M. Gutteridge.** 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.* **307**:108-112.
19. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
20. **Iwaki, T., Y. Giga-Hama, and K. Takegawa.** 2006. A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenine biosynthetic mutant. *Microbiology* **152**:2309-2321.

21. **Jbel, M., A. Mercier, B. Pelletier, J. Beaudoin, and S. Labbé.** 2009. Iron activates in vivo DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryot. Cell.* **8**:649-664.
22. **Jung, W. H., A. Sham, R. White, and J. W. Kronstad.** 2006. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* **4**:e410.
23. **Kaplan, C. D., and J. Kaplan.** 2009. Iron Acquisition and Transcriptional Regulation. *Chem. Rev.* 2009 Aug 25. [Epub ahead of print].
24. **Kim, J., and J. P. Hirsch.** 1998. A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* **149**:795-805.
25. **Komarnitsky, P., E. J. Cho, and S. Buratowski.** 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* **14**:2452-2460.
26. **Labbé, S., B. Pelletier, and A. Mercier.** 2007. Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biometals* **20**:523-537.
27. **Labbé, S., M. M. O. Peña, A. R. Fernandes, and D. J. Thiele.** 1999. A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **274**:36252-36260.

28. **Li, L., O. S. Chen, D. McVey Ward, and J. Kaplan.** 2001. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**:29515-29519.
29. **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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:42-47.
30. **Maeda, T., R. Sugiura, A. Kita, M. Saito, L. Deng, Y. He, L. Yabin, Y. Fujita, K. Takegawa, H. Shuntoh, and T. Kuno.** 2004. Pmr1, a P-type ATPase, and Pdt1, an Nramp homologue, cooperatively regulate cell morphogenesis in fission yeast: the importance of Mn<sup>2+</sup> homeostasis. *Genes Cells* **9**:71-82.
31. **Mason, D. L., and S. Michaelis.** 2002. Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol. Biol. Cell* **13**:4443-4455.
32. **Maundrell, K.** 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**:127-130.
33. **Mercier, A., B. Pelletier, and S. Labbé.** 2006. A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell.* **5**:1866-1881.
34. **Mercier, A., S. Watt, J. Bähler, and S. Labbé.** 2008. Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot. Cell.* **7**:493-508.

35. **Myers, A. M., A. Tzagoloff, D. M. Kinney, and C. J. Lusty.** 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**:299-310.
36. **Ortiz, D. F., L. Kreppel, D. M. Speiser, G. Scheel, G. McDonald, and D. W. Ow.** 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* **11**:3491-3499.
37. **Paumi, C. M., M. Chuk, I. Chevelev, I. Stagljar, and S. Michaelis.** 2008. Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension. *J. Biol. Chem.* **283**:27079-27088.
38. **Pelletier, B., J. Beaudoin, Y. Mukai, and S. Labbé.** 2002. Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**:22950-22958.
39. **Pelletier, B., J. Beaudoin, C. C. Philpott, and S. Labbé.** 2003. Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res.* **31**:4332-4344.
40. **Pelletier, B., A. Mercier, M. Durand, C. Peter, M. Jbel, J. Beaudoin, and S. Labbé.** 2007. Expression of *Candida albicans* Sfu1 in fission yeast complements the loss of the iron-regulatory transcription factor Fep1 and requires Tup co-repressors. *Yeast* **24**:883-900.

41. **Peter, C., J. Laliberté, J. Beaudoin, and S. Labbé.** 2008. Copper distributed by Atx1 is available to copper amine oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell.* **7**:1781-1794.
42. **Philpott, C. C.** 2006. Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**:636-645.
43. **Philpott, C. C., and O. Protchenko.** 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **7**:20-27.
44. **Portnoy, M. E., X. F. Liu, and V. C. Culotta.** 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7893-7902.
45. **Rad, A., M., B. Janic, A. S. M. Iskander, H. Soltanian-Zadeh, and A. S. Arbab.** 2007. Measurement of quantity of iron in magnetically labelled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *BioTechniques* **43**:627-636.
46. **Raguzzi, F., E. Lesuisse, and R. R. Crichton.** 1988. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **231**:253-258.
47. **Ramsay, L. M., and G. M. Gadd.** 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**:293-298.
48. **Rees, E. M., J. Lee, and D. J. Thiele.** 2004. Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* **279**:54221-54229.

49. **Roman, D. G., A. Dancis, G. J. Anderson, and R. D. Klausner.** 1993. The fission yeast ferric reductase gene *frp1*<sup>+</sup> is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4342-4350.
50. **Rustici, G., H. van Bakel, D. H. Lackner, F. C. Holstege, C. Wijmenga, J. Bähler, and A. Brazma.** 2007. Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol.* **8**:R73.
51. **Schrettl, M., H. S. Kim, M. Eisendle, C. Kragl, W. C. Nierman, T. Heinekamp, E. R. Werner, I. Jacobsen, P. Illmer, H. Yi, A. A. Brakhage, and H. Haas.** 2008. SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **70**:27-43.
52. **Schrettl, M., G. Winkelmann, and H. Haas.** 2004. Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe*, an iron transport and iron storage compound. *Biometals* **17**:647-654.
53. **Simm, C., B. Lahner, D. Salt, A. LeFurgey, P. Ingram, B. Yandell, and D. J. Eide.** 2007. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot. Cell.* **6**:1166-1177.
54. **Singh, A., N. Kaur, and D. J. Kosman.** 2007. The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **282**:28619-28626.
55. **Singh, A., S. Severance, N. Kaur, W. Wiltsie, and D. J. Kosman.** 2006. Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**:13355-13364.

56. **Spizzo, T., C. Byersdorfer, S. Duesterhoeft, and D. Eide.** 1997. The yeast *FET5* gene encodes a *FET3*-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* **256**:547-556.
57. **Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis.** 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**:1552-1557.
58. **Szczyпка, M. S., J. A. Wemmie, W. S. Moye-Rowley, and D. J. Thiele.** 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **269**:22853-22857.
59. **Tabuchi, M., T. Yoshida, K. Takegawa, and F. Kishi.** 1999. Functional analysis of the human NRAMP family expressed in fission yeast. *Biochem. J.* **344 Pt 1**:211-219.
60. **Urbanowski, J. L., and R. C. Piper.** 1999. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* **274**:38061-38070.
61. **Waring, A. J., and G. G. Laties.** 1977. Inhibition of the development of induced respiration and cyanide-insensitive respiration in potato tuber slices by cerulenin and dimethylaminoethanol. *Plant Physiol.* **60**:11-16.
62. **Yamaguchi, H., N. K. Nishizawa, H. Nakanishi, and S. Mori.** 2002. IDI7, a new iron-regulated ABC transporter from barley roots, localizes to the tonoplast. *J. Exp. Bot.* **53**:727-735.

## **Discussion**

L'ensemble des résultats obtenus a été décrit et discuté à l'intérieur du manuscrit. Pour cette raison, je ne m'attarderai pas davantage sur ceux-ci. J'orienterai plutôt la discussion sur la suite des travaux à réaliser. À l'intérieur des sections qui suivent, je proposerai des avenues à explorer et j'expliquerai sommairement les stratégies qui pourraient être utilisées pour la continuité des travaux.

Il s'agit ici de proposer des moyens afin de réaliser des objectifs pour la suite des travaux entourant le transporteur vacuolaire Abc3. Je suis conscient des lacunes que possèdent les moyens envisagés, mais cette discussion n'a pas été rédigée dans l'optique de fournir des protocoles complets et détaillés.

### **I. Caractérisation du transporteur Abc3**

#### **I.I. Quantification du contenu en fer des vacuoles**

Nous avons démontré à l'intérieur du manuscrit aux figures 8A et 8B que l'inactivation du gène *abc3*<sup>+</sup> entraîne une accumulation du contenu total des cellules en fer d'une fois et demie celui de la souche de type sauvage exprimant *abc3*<sup>+</sup> (Pouliot *et al*, 2010). Cet essai a été effectué sur des lysats totaux de cellules par une méthode spectrophotométrique où la variation de l'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de fer chélaté par l'acide bathophénanthrolinedisulfonique (BPS) (Rad *et al*, 2007).

Dans le but de valider l'hypothèse que la protéine Abc3 exporte le fer hors des vacuoles, il est indispensable de mesurer directement la quantité de fer contenu dans les

vacuoles. Cette approche a été employée dans quelques études avec la levure *S. cerevisiae*. La quantification du fer vacuolaire de *S. cerevisiae* a permis de déterminer que la vacuole est le site où l'on retrouve la plus forte concentration en fer à l'intérieur de la cellule (Raguzzi *et al*, 1988). La mesure du contenu en fer de la vacuole de *S. cerevisiae* est onze fois plus élevée que la mesure du fer cellulaire total lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu supplémenté en fer (Raguzzi *et al*, 1988). Ceci nous permet de croire que la comparaison de la quantité de fer à l'intérieur des vacuoles pour une souche de *S. pombe* mutante pour le gène *abc3<sup>+</sup>* (*abc3Δ*) résulterait en des concentrations plus élevées de fer vacuolaire que les résultats obtenus pour le fer cellulaire total.

Chez *S. cerevisiae*, la quantification précise du fer vacuolaire a permis de confirmer l'implication de protéines dans l'homéostasie du fer au niveau de l'import et de l'export de cet oligo-élément de la vacuole. Ainsi, le rôle de la protéine Ccc1 a été démontré dans l'import du fer à l'intérieur la vacuole et ce, afin de protéger la cellule lorsque le fer est en excès (section 2.6.1) (Li *et al*, 2001, Singh *et al*, 2007). La contribution de deux systèmes de transport, formés du complexe Fet5-Fth1 ou de la protéine Smf3, pour répondre aux besoins de la cellule lors d'une carence en fer a été renforcée par la démonstration de leur capacité à transporter le fer en dehors de cet organite (sections 2.6.2 et 2.6.3) (Singh *et al*, 2007). La quantification du contenu vacuolaire en ions métalliques chez *S. cerevisiae* a permis de démontrer que Ccc1 est responsable de l'import du manganèse, en plus du fer, dans la vacuole (Li *et al*, 2001) et que le transporteur Ctr2 exporte le cuivre en dehors des vacuoles (Rees *et al*, 2004).

Tous ces résultats sont issus d'une méthode d'isolement des vacuoles efficace et reproductible qui est bien établie chez *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al*, 1986). Cette méthode d'obtention d'isolat de vacuoles chez *S. cerevisiae* est divisée en trois étapes principales. La première est de digérer la paroi cellulaire avec un mélange d'enzymes afin de fragiliser la cellule, générant des sphéropastes. La seconde étape consiste à lyser les cellules, sous forme de sphéropastes, tout en préservant l'intégrité des organites. Chez *S. cerevisiae*, cette étape est effectuée par l'ajout d'une solution de diéthylaminoéthyl-Dextran (DEAE-Dextran). La troisième étape permet de séparer les vacuoles des autres organites suite à leur purification sur un gradient de Ficoll (Cabrera & Ungermann, 2008).

Cependant, l'isolement de vacuoles chez *S. pombe* n'est pas monnaie courante. La méthode utilisée pour *S. cerevisiae* est inefficace pour les cellules de *S. pombe*. Les trois étapes de purification des vacuoles doivent donc être adaptées. Des équipes de recherche optimisent cette méthode afin de la rendre applicable pour leurs travaux. Ces protocoles adaptés ont permis de démontrer que le transporteur de type ABC, Hmt1, se localise à la membrane vacuolaire et qu'il est impliqué dans la séquestration du cadmium à l'intérieur des vacuoles chez *S. pombe* (Ortiz *et al*, 1992, Ortiz *et al*, 1995, Sooksa-Nguan *et al*, 2009). Afin de poursuivre l'étude de l'activité de transport du fer de Abc3, l'emploi de la méthode la plus récente, soit celle publiée par Olena K. Vatamaniuk et ses collègues, semble être la plus prometteuse (Sooksa-Nguan *et al*, 2009). Pour réaliser la première étape, un cocktail d'enzymes très efficace est utilisé afin de fragiliser la paroi cellulaire de *S. pombe*, qui est plus résistante que celle de *S. cerevisiae*. La seconde étape, consiste à lyser les sphéropastes à l'aide d'un piston de verre de type Dounce plutôt que chimiquement avec le DEAE-

Dextran. Le fractionnement cellulaire en vue d'obtenir une préparation majoritairement composée de vacuoles emploie un gradient de Percoll (Sooksa-Nguan *et al*, 2009).

Suite à l'application de la procédure de purification des vacuoles, des fractions seront récoltées pour l'étude du transport du fer effectué par Abc3. Les fractions enrichies en vacuoles devront être analysées. L'un des moyens pour confirmer que les fractions contiennent des vacuoles est de procéder à des immunobuvardages afin de détecter la présence de protéines connues qui se localisent dans la membrane vacuolaire. Dans le cas qui nous intéresse, l'utilisation de la protéine de fusion Ctr6-HA<sub>4</sub> présentée dans le manuscrit pourrait servir de marqueur vacuolaire (Pouliot *et al*, 2010). Un second moyen pouvant être utilisé consiste à mesurer l'activité spécifique de marqueurs enzymatiques dont la localisation cellulaire est connue. Une fraction enrichie en vacuoles, comparativement au lysat total avant sa séparation sur gradient de Percoll, devrait montrer une augmentation de l'activité de l'enzyme  $\alpha$ -mannosidase (Roberts *et al*, 1991), qui est présente dans la membrane des vacuoles, alors que l'activité de la cytochrome *c* oxydase (Poyton *et al*, 1995) et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Roberts *et al*, 1991), qui sont des marqueurs de la membrane mitochondriale et du cytosol respectivement, devrait diminuer significativement.

L'isolement d'organites comme les vacuoles chez *S. pombe* est une approche complexe et il est difficilement envisageable d'obtenir du matériel pur à 100%. Le but du gradient de Percoll est d'obtenir un très bon enrichissement. Par la suite, on évalue le degré d'enrichissement atteint en comparant avec le contenu de la fraction initiale ainsi qu'avec des

composantes provenant d'autres organites pouvant être présents dans notre échantillon final et ce, à l'aide d'anticorps capables de détecter la présence de protéines connues.

L'intégrité des vacuoles pourrait être vérifiée, par exemple, par immunobuvardage afin de détecter des protéines résidantes de la lumière vacuolaire. Aussi, la coloration préalable de l'intérieur des vacuoles suite à la culture des cellules en présence de monochlorobimane (MCIB), tel que décrit à la section I.II de la discussion, permettrait de visualiser par microscopie à fluorescence le contenu de l'échantillon final. La rétention du composé fluorescent bimane-GS à l'intérieur de la vacuole confirmerait leur intégrité.

Après avoir confirmé les échantillons contenant les fractions enrichies en vacuoles, le contenu en fer des différents échantillons pourra être quantifié. Cette fois la méthode spectrophotométrique qui mesure la formation de complexe BPS-Fe sera mise de côté puisqu'elle nécessite beaucoup de matériel et que la technique d'isolement des vacuoles ne permet pas de recueillir les quantités suffisantes. Pour cette application nous aurons recouru à une technique plus sensible pour quantifier les ions d'intérêts. Cette technique est l'ICP-MS (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*) et elle permet la détection d'ions à des concentrations pouvant atteindre une partie par  $10^{12}$ .

Différentes combinaisons de souches et de traitements sont à envisager afin d'obtenir des résultats fiables et convaincants. Dans les figures 8A et 8B du manuscrit, nous avons comparé la souche *abc3Δ* avec celle de type sauvage (Pouliot *et al*, 2010). Dans la condition de culture employée (en présence de fer), l'expression endogène du gène *abc3<sup>+</sup>* est faible, mais semble suffisante pour remettre une partie du fer de la vacuole en circulation dans le cytoplasme. Cette combinaison semble être un bon point de départ pour les analyses du fer

vacuolaire. Afin d'augmenter l'écart entre le contenu vacuolaire des souches comparées, nous pourrions employer une souche dans laquelle l'expression du gène *abc3<sup>+</sup>* est constitutive. De cette façon, l'expression du gène *abc3<sup>+</sup>* ne varierait pas selon le statut en fer, ce qui permettrait sa présence à la vacuole en tout temps afin d'expulser le fer vacuolaire. Nous pourrions également employer un système de surexpression comme ce qui a été fait chez *S. cerevisiae* pour les composantes d'import et d'export du fer vacuolaire (Singh *et al.*, 2007). La surexpression de Pcl1 forcerait l'engorgement des vacuoles en fer et l'induction soudaine de Abc3 ferait chuter le contenu en fer. Ce système permettrait de faire une pierre deux coups en démontrant à la fois l'activité de Pcl1 et de Abc3 en regard avec leur activité de transport du fer au niveau de la vacuole.

### **I.II. Essai de transport employant le substrat fluorescent bimane-GS**

Dans le but d'étudier les domaines essentiels pour l'activité du transporteur Abc3, il serait utile de mettre au point un essai simple permettant de suivre son activité. Un essai employant le composé monochlorobimane (MCIB) permettrait de visualiser le déplacement d'un substrat transporté par Abc3 directement par microscopie à fluorescence. Le MCIB est un composé perméable aux membranes et non-fluorescent par lui-même. Lorsqu'il pénètre dans les cellules, il est conjugué au glutathion (GSH) par l'action de l'enzyme cytosolique glutathion-S-transférase. Le produit qui en résulte, le bimane-S-glutathion (bimane-GS), est imperméable aux membranes. De plus, ce produit devient très fluorescent (Ishikawa *et al.*, 1994, Shrieve *et al.*, 1988). Le bimane-GS est souvent employé comme substrat synthétique pour étudier des protéines capables de transporter des conjugués glutathionylés. Ainsi, le

bimane-GS est utilisé comme marqueur pour suivre son transport intracellulaire lorsqu'il est pris en charge par des protéines transmembranaires qui ont la capacité de le transporter.

Chez la levure, le bimane-GS est activement transporté à l'intérieur des vacuoles (Iwaki *et al*, 2006, Li *et al*, 1996). Chez *S. cerevisiae*, la protéine impliquée dans l'import du bimane-GS à l'intérieur de la vacuole est le transporteur de type ABC Ycf1 (Li *et al*, 1996). Les substrats naturels de Ycf1, conjugués au GSH, sont le pigment phosphoribosylaminoimidazole carboxylate, un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'adénine, et le cadmium (Li *et al*, 1996). Chez *S. pombe*, la principale protéine caractérisée pour son rôle dans la séquestration du cadmium à l'intérieur de la vacuole est le transporteur de type ABC Hmt1. Hmt1 possède la propriété de transporter le cadmium lié soit aux phytochélatines ou au GSH. Cependant, Hmt1 n'est pas responsable de l'import du pigment de la voie de biosynthèse de l'adénine conjugué au GSH (Chaudhuri *et al*, 1997, Ortiz *et al*, 1992, Ortiz *et al*, 1995, Preveral *et al*, 2009, Sooksa-Nguan *et al*, 2009). Une étude a récemment identifié que Abc2 et Abc4 sont les transporteurs de type ABC qui permettent l'import du pigment glutathionylé et du cadmium dans la vacuole (Iwaki *et al*, 2006). Abc2 et Abc4 sont également les principaux transporteurs du bimane-GS à l'intérieur des vacuoles (Iwaki *et al*, 2006).

Tout comme Ycf1, les transporteurs Abc2 et Abc4 font tous deux partie de la sous-famille ABCC, tandis que Hmt1 fait partie de la sous-famille ABCB (Iwaki *et al*, 2006). Étant donné l'appartenance de Abc3 à la même sous-famille que Ycf1, Abc2 et Abc4, ceci nous permet de croire que Abc3 aurait la propriété de transporter également des conjugués glutathionylés, dont le bimane-GS (Iwaki *et al*, 2006, Pouliot *et al*, 2010). Il est possible que

le rôle de Abc3 dans le transport de conjugués glutathionylés n'est pas été observé précédemment à cause des conditions de culture utilisées. En effet, nous avons démontré que, dans un milieu de culture où le fer est présent, Abc3 n'est que très faiblement exprimée (Pouliot *et al.*, 2010). La contribution de son activité est donc difficilement perceptible. De plus, les auteurs de l'étude qui ont attribué des fonctions aux transporteurs Abc2 et Abc4 se sont concentrés sur le transport vers l'intérieur de la vacuole, alors que, selon notre hypothèse, l'activité de transport de Abc3 est en direction opposée, soit de la vacuole vers le cytoplasme.

Afin de démontrer que Abc3 possède la propriété d'exporter des conjugués glutathionylés, plus précisément le bimane-GS, hors de la vacuole, une souche de *S. pombe* mutante pour les trois transporteurs vacuolaires de la sous-famille ABCC devra être générée. Cette souche triple mutante pour les gènes *abc2*<sup>+</sup>, *abc3*<sup>+</sup> et *abc4*<sup>+</sup> présentera une fluorescence nulle à l'intérieur des vacuoles en comparaison avec la souche de type sauvage lorsque le MCIB sera additionné au milieu de culture. En réintroduisant les allèles fonctionnels des gènes *abc2*<sup>+</sup> ou *abc4*<sup>+</sup> exprimés de façon constitutive dans la souche *abc2Δabc3Δabc4Δ*, l'importation du bimane-GS à l'intérieur de la vacuole sera rétablie causant la réapparition de la fluorescence. L'expression constitutive du gène *abc3*<sup>+</sup> dans la souche *abc2Δabc3Δabc4Δ* devrait montrer aucune fluorescence contenue dans les vacuoles en accord avec l'hypothèse qui stipule que Abc3 exporte les conjugués glutathionylés hors de la vacuole. La stratégie envisagée pour démontrer que Abc3 peut exporter le bimane-GS demandera l'utilisation d'un système d'expression inductible. Dans la souche *abc2Δabc3Δabc4Δ*, l'absence de thiamine dans le milieu de culture permettra d'induire l'expression du gène *abc2*<sup>+</sup> sous le contrôle du promoteur *nmt1*<sup>+</sup> et la présence de fer

réprimera l'expression du gène *abc3*<sup>+</sup>, qui lui, sera régulé par son propre promoteur. Cette combinaison aura pour effet de remplir les vacuoles avec le produit bimané-GS et d'observer une fluorescence concentrée à la vacuole. Puis, l'ajout de thiamine dans le milieu de culture bloquera l'expression du gène *abc2*<sup>+</sup> et l'ajout du chélateur de fer 2,2'-dipyridyl (Dip) entraînera l'expression du gène *abc3*<sup>+</sup>. Ces traitements empêcheront l'import constant de bimané-GS dans la vacuole, ce qui permettra de constituer un « pool » vacuolaire de bimané-GS. Le transporteur Abc3 nouvellement synthétisé exportera le bimané-GS de la vacuole en direction du cytoplasme. Cela entraînera une diminution de la fluorescence observée dans la vacuole et l'apparition de fluorescence dans le cytoplasme.

Une fois cet essai fonctionnel mis au point, il sera possible d'effectuer diverses mutations au niveau de la protéine Abc3 et d'observer si ces dernières ont un impacte sur la propriété de Abc3 à transporter des conjugués glutathionylés. Tel que décrit précédemment à la section 4.1, ainsi qu'à l'intérieur du manuscrit, les transporteurs ABC sont généralement formés de deux *membrane spanning domains* (MSDs) et de deux domaines d'attachement aux nucléotides (NBDs) (Pouliot *et al*, 2010). Une particularité des membres formant la sous-famille ABCC est qu'ils possèdent un troisième MSD (nommé MSD0) à leur extrémité N-terminale qui est relié au corps principal de la protéine par une région appelée L0 (pour *linker 0*). Parmi les mutations que l'on étudiera, nous abolirons l'activité d'hydrolyse de l'ATP par les NBDs en mutant les motifs A ou B de Walker et ce, afin de confirmer que le transport du bimané-GS par Abc3 est dépendant de l'ATP. Une étude a identifié que la région L0 est nécessaire pour la résistance au cadmium via l'activité du transporteur Ycf1 chez *S. cerevisiae* (Mason & Michaelis, 2002). Cette étude a proposé que l'implication de la région L0 est imputable à treize résidus qui, selon les prédictions informatiques, formeraient

une hélice- $\alpha$  amphipatique qui interagirait avec le substrat ou avec les autres domaines de la protéine (Bakos *et al*, 2000; Mason & Michaelis, 2002). Il serait pertinent de voir si la délétion de la région L0 du transporteur Abc3 affecte le transport du biman-GS. Puis, par analyses bioinformatiques, examiner si la région L0 de Abc3 comporte les treize résidus homologues à ceux de Ycf1. Si tel est le cas, vérifier si la substitution de ces résidus par d'autres résidus ayant des propriétés biochimiques différentes abolira l'exportation du biman-GS de manière équivalente à la délétion du L0 entier.

### **I.III. Identification du signal peptidique responsable de la localisation**

#### **cellulaire de Abc3**

Un autre volet à investiguer serait d'identifier le signal peptidique responsable de la localisation vacuolaire de Abc3. Le génome de *S. pombe* comporte onze gènes codant pour des transporteurs de type ABC (Iwaki *et al*, 2006). De ces onze transporteurs, quatre ont été localisés à la membrane vacuolaire. Les protéines localisées à la vacuole sont Abc2, Abc3, Abc4 et Hmt1 (Iwaki *et al*, 2006). Les protéines Abc2, Abc3 et Abc4 font parties de la sous-famille ABCC (Iwaki *et al*, 2006). Une particularité des membres de la sous-famille ABCC est qu'ils possèdent une extension N-terminale (NTE) composé du MSD0 et du L0. La protéine Hmt1 fait partie de la sous-famille ABCB (Iwaki *et al*, 2006). La structure de la protéine Hmt1 se distingue de celle des autres membres de la sous-famille ABCB. Hmt1 est unique par le fait qu'il est le seul transporteur simple de type ABC, dont le corps principal est formé d'un seul MSD, d'un seul NBD, à contenir un NTE (Ortiz *et al*, 1992, Sooksan-Nguan *et al*, 2009). L'analyse du génome de *S. cerevisiae* indique qu'il contient trente

transporteurs de type ABC (Jungwirth & Kuchler, 2006). De ces trente, environ la moitié a été caractérisée. Parmi ceux-ci, trois ont été localisés dans la membrane des vacuoles. Ces transporteurs sont Ycf1, Bpt1 et Ybt1. Ils font tous partis de la sous-famille ABCC (Jungwirth & Kuchler, 2006).

Ces informations suggèrent que la présence du NTE pourrait avoir une influence sur la localisation cellulaire des protéines vacuolaires. Une étude antérieure s'est penchée sur la fonction possible du NTE. Dans cette étude, il s'est avéré que la portion MSD0 contenue dans le NTE est nécessaire pour la localisation de la protéine à la membrane vacuolaire. En effet, la délétion du MSD0 de la protéine Ycf1 de *S. cerevisiae* empêche cette dernière de se localiser à la membrane vacuolaire (Mason & Michaelis, 2002).

La première étape à réaliser afin d'identifier le signal peptidique responsable de la localisation cellulaire de Abc3 consistera à vérifier si son domaine MSD0 joue un rôle au niveau de sa localisation. La délétion du MSD0 entier devrait faire en sorte que la protéine de fusion Abc3-GFP n'est plus visible à la membrane des vacuoles. Pour démontrer que le domaine MSD0 est suffisant pour permettre à la protéine Abc3 d'atteindre la vacuole, une protéine chimère pourrait être élaborée. La fusion de la région MSD0 de Abc3 avec la portion du corps principal de Abc1 (sans son propre MSD0) devrait entraîner un changement de localisation de la protéine Abc1-GFP. Celle-ci passerait d'une localisation au RE pour l'allèle naturel à une localisation vacuolaire pour l'allèle chimérique.

Une seconde étape dans le but d'élucider la nature du signal peptidique vacuolaire serait de procéder à des analyses bioinformatiques. L'alignement des acides aminés correspondant aux MSD0 de Abc3, Abc2 et Abc4 pourrait permettre d'identifier des résidus

conservés entre ces différents membres de la sous-famille ABCC qui se localisent à la vacuole. Le résultat de ce premier alignement pourrait être comparé avec le MSD0 de Abc1 afin de soustraire les résidus conservés qui ne participent pas au transport des protéines Abc3, Abc2 et Abc4 à la vacuole. Le MSD0 provenant de Hmt1 pourrait permettre de trouver des résidus additionnels importants pour la localisation vacuolaire. Si le signal peptidique recherché est conservé chez les levures, la contribution d'informations tirées de séquences de transporteurs ABC vacuolaires de *S. cerevisiae* pourrait être significative. Les motifs putatifs identifiés devraient par la suite être mutés dans le MSD0 de la protéine de fusion Abc3-GFP afin de voir si l'effet de mutations ponctuelles est équivalent à la délétion entière du domaine MSD0.

Si les analyses bioinformatiques ne permettent pas de cibler des motifs précis du MSD0, il pourrait être nécessaire d'effectuer des délétions progressives du domaine MSD0. La délétion de chacun des DTMs du MSD0, ainsi que des boucles hydrophiliques reliant chacun d'eux, permettrait de trouver une portion plus courte responsable de la localisation vacuolaire. Celle-ci faciliterait les recherches visant à identifier un signal peptidique vacuolaire.

#### **I.IV. Caractérisation de la topologie membranaire du transporteur Abc3**

Un aspect intéressant à étudier du transporteur Abc3 serait de déterminer sa topologie au niveau de la membrane vacuolaire. Plusieurs transporteurs de type ABC ont été caractérisés jusqu'à maintenant provenant d'organismes divers, tant procaryotes qu'eucaryotes. Chez les procaryotes, ces études ont permis d'identifier des transporteurs impliqués dans les systèmes d'imports de composés essentiels et d'autres impliqués dans les systèmes d'exports de produits potentiellement toxiques (Jones *et al*, 2009). Pour les deux groupes de transporteurs, leur orientation au niveau de la surface cellulaire est la même. Les NBDs qui induisent un changement conformationnel de la protéine permettant le passage du substrat suite à l'hydrolyse de l'ATP sont situés à l'intérieur de la cellule. Cependant, pour permettre l'importation de composés, ce groupe de transporteurs nécessite la présence d'une protéine soluble extra-cytoplasmique dont la fonction est de fixer le substrat avec une grande affinité et de le présenter au complexe ABC, souvent formé de plusieurs sous-unités.

Chez les eucaryotes, les transporteurs de type ABC sont reconnus pour exporter des substrats hors du cytoplasme (Jones *et al*, 2009). Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, ce transport peut être dirigé soit vers l'extérieur de la cellule par des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique ou au contraire, vers l'intérieur des organites (Iwaki *et al*, 2006, Jungwirth & Kuchler, 2006). Dans le cas des transporteurs de type ABC localisés à la surface des mitochondries, ils transportent leurs substrats de l'intérieur de la mitochondrie vers le cytoplasme de la cellule (Iwaki *et al*, 2006, Jungwirth & Kuchler, 2006). Selon un modèle généralement accepté, les substrats entrent dans le canal formé par les MSDs du côté où sont exposés les NBDs (Jones *et al*, 2009, Jungwirth & Kuchler, 2006).

Dans le but de confirmer que Abc3 est le premier transporteur de type ABC impliqué dans l'export de composés hors de la vacuole chez la levure, la caractérisation de sa topologie est un atout important. La stratégie proposée pour y parvenir repose en grande partie sur la mise au point du protocole d'isolement de vacuoles intactes chez *S. pombe* qui a été décrit dans l'une des sections précédentes (section I.I). Afin de définir la topologie membranaire de Abc3, la première étape consistera à insérer à l'intérieur du gène *abc3*<sup>+</sup>, la séquence codante pour un épitope facilement détectable par immunobuvardage (par exemple l'épitope de type HA). L'épitope HA devra être inséré à différents endroits stratégiques déterminés à partir des modèles topologiques prédits de façon informatique. Les protéines chimériques résultantes posséderont l'épitope HA soit à l'extrémité N- ou C-terminale, soit au niveau de boucles hydrophiliques qui relient les DTMs ou celles à proximité des NBDs. Ces protéines chimériques seront par la suite exprimées dans la souche mutante *abc3*Δ à partir de laquelle on procédera à la purification des vacuoles intactes. Pour chacune des constructions intégrées, les échantillons vacuolaires seront incubés en présence de protéases, par exemple la trypsine. En conditions natives, les portions protéiques qui seront protéolysées seront considérées comme étant à l'extérieur de la membrane vacuolaire. Les portions protéiques résistantes à la digestion enzymatique seront considérées comme étant disposées à l'intérieur de la membrane vacuolaire. Nous utiliserons également des conditions d'incubations en présence de détergents (par exemple le Triton X-100) capables de dissoudre la membrane vacuolaire. Sous ces dernières conditions, toutes les régions fusionnées à l'épitope HA devraient être sensible aux conditions de digestion partielle de la protéase utilisée. Tous les échantillons seront analysés par gels de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) suivi d'immunobuvardages. En plus de l'épitope

HA, l'immunobuvardage sera effectué sur une protéine contrôle localisée à l'intérieur de la vacuole afin de confirmer que la membrane de cet organite assure une protection contre la digestion protéolytique. Lorsque l'épitope HA se retrouve à l'intérieur de la vacuole, la taille du fragment observé est équivalente à la portion de la boucle hydrophilique et des DTMs qui la bordent. Tandis que lorsque l'épitope HA est du côté cytoplasmique, il est dégradé par les protéases et aucun fragment est révélé par immunobuvardage.

Ainsi, avec cette stratégie la topologie complète de Abc3 pourra être définie et la position des NBDs, par rapport à la membrane vacuolaire, résolue. S'il s'avère que les NBDs se situent à l'intérieur de la vacuole, la prédiction topologique présentée à la figure 1 du manuscrit devra être révisée (Pouliot *et al*, 2010). Cela constituerait également le premier exemple d'un transporteur ABC présentant ce type d'arrangement. Si les NBDs sont situés dans le cytoplasme, et que l'activité d'exportation hors de la vacuole est validée, ceci serait le premier exemple d'un transporteur ABC dont l'activité de transport s'effectue en requérant ce type de conformation topologique.

## Remerciements

Je remercie tout d'abord le docteur Simon Labbé pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il m'a permis de travailler sur un projet stimulant et rempli de défis. Je remercie également mes collègues et amis, Jude Beaudoin, Alexandre Mercier, Mehdi Jbel ainsi que Raphaël Ioannoni. Ils m'ont grandement aidé en répondant à mes nombreuses questions et en me donnant plusieurs conseils. J'ai apprécié les bons moments passés en leur compagnie.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur présence et pour m'avoir encouragé à poursuivre mes études. Un immense merci, particulièrement à ma copine Véronique qui m'a soutenu et motivé tout au long de ces années et qui a dû se passer de ma présence, parfois, durant de longues périodes.

Merci aussi aux Dr François Bachand et Dre Christine Lavoie pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

## Références

Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, & Kaplan J (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76: 403-410

Askwith C & Kaplan J (1997) An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272: 401-405

Askwith CC, de Silva D, & Kaplan J (1996) Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 20: 27-34

Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, & Sarkadi B (2000) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4451-4461

Bankaitis VA, Johnson LM, & Emr SD (1986) Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9075-9079

Blaiseau PL, Lesuisse E, & Camadro JM (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* 276: 34221-34226

Byers BR & Arceneaux JE (1998) Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. *Met Ions Biol Syst* 35: 37-66

Cabrera M & Ungermann C (2008) Purification and in vitro analysis of yeast vacuoles. *Methods Enzymol* 451: 177-196

Casas C, Aldea M, Espinet C, Gallego C, Gil R, & Herrero E (1997) The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 621-637

Chang F & Nurse P (1996) How fission yeast fission in the middle. *Cell* 84: 191-194

Chaudhuri B, Ingavale S, & Bachhawat AK (1997) *apd1*<sup>+</sup>, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* 145: 75-83

Chen CA & Cowan JA (2003) Characterization of the soluble domain of the ABC7 type transporter Atm1. *J Biol Chem* 278: 52681-52688

Chen OS & Kaplan J (2000) *CCCI* suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J Biol Chem* 275: 7626-7632

Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N, & Hediger MA (1999) Yeast *SMF1* mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J Biol Chem* 274: 35089-35094

Christensen PU, Davey J, & Nielsen O (1997a) The *Schizosaccharomyces pombe mam1* gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* 255: 226-236

Christensen PU, Davis K, Nielsen O, & Davey J (1997b) Abc1: a new ABC transporter from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* 147: 97-102

Cohen A, Nelson H, & Nelson N (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* 275: 33388-33394

Courel M, Lallet S, Camadro JM, & Blaiseau PL (2005) Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol Cell Biol* 25: 6760-6771

Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch AG, & Barriocanal JG (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 2294-2301

Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, Hinnebusch AG, & Klausner RD (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3869-3873

Dean M (2005) The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* 400: 409-429

Dean M, Allikmets R, Gerrard B, Stewart C, Kistler A, Shafer B, Michaelis S, & Strathern J (1994) Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10: 377-383

Dix D, Bridgham J, Broderius M, & Eide D (1997) Characterization of the *FET4* protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* 272: 11770-11777

Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, & Eide DJ (1994) The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 26092-26099

Eide D, Davis-Kaplan S, Jordan I, Sipe D, & Kaplan J (1992) Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. The ferrireductase and Fe(II) transporter are regulated independently. *J Biol Chem* 267: 20774-20781

Eisendle M, Oberegger H, Zadra I, & Haas H (2003 Jul) The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Mol Microbiol* 49: 359-375

Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, & Struhl K (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17: 6982-6993

Georgatsou E & Alexandraki D (1999) Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *Fre1p/Fre2p* Fe/Cu reductase related genes. *Yeast* 15: 573-584

Georgatsou E & Alexandraki D (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 3065-3073

Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, & Alexandraki D (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* 272: 13786-13792

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, & Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7

Haas H (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 316-330

Haas H, Zadra I, Stoffler G, & Angermayr K (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J Biol Chem* 274: 4613-4619

Halliwell B & Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307: 108-112

Hassett R, Dix DR, Eide DJ, & Kosman DJ (2000) The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 351 Pt 2: 477-484

Hediger MA, Rolfs A, & Goswami T (2002) Iron transport and hemochromatosis. *J Investig Med* 50: 239S-246S

Hertz-Fowler C, Peacock CS, Wood V, Aslett M, Kerhornou A, Mooney P, Tivey A, Berriman M, Hall N, Rutherford K, Parkhill J, Ivens AC, Rajandream MA, & Barrell B (2004) GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res* 32: D339-43

Heymann P, Ernst JF, & Winkelmann G (2000) A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 13: 65-72

Heymann P, Ernst JF, & Winkelmann G (1999) Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (*TAF1*) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. *Biometals* 12: 301-306

Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113

Holland IB & Blight MA (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293: 381-399

Isenbarger TA, Carr CE, Johnson SS, Finney M, Church GM, Gilbert W, Zuber MT, & Ruvkun G (2008) The most conserved genome segments for life detection on Earth and other planets. *Orig Life Evol Biosph* 38: 517-533

Ishikawa T, Wright CD, & Ishizuka H (1994) GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J Biol Chem* 269: 29085-29093

Iwaki T, Fujita Y, Tanaka N, Giga-Hama Y, & Takegawa K (2005) Mitochondrial ABC transporter Atm1p is required for protection against oxidative stress and vacuolar functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 2109-2116

Iwaki T, Giga-Hama Y, & Takegawa K (2006) A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenine biosynthetic mutant. *Microbiology* 152: 2309-2321

Jbel M, Mercier A, Pelletier B, Beaudoin J, & Labbé S (2009) Iron activates in vivo DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryot Cell* 8: 649-664

Jensen LT & Culotta VC (2002) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. *J Mol Biol* 318: 251-260

Jones PM, O'Mara ML, & George AM (2009) ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends Biochem Sci* 34: 520-531

Jungwirth H & Kuchler K (2006) Yeast ABC transporters - a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* 580: 1131-1138

- Kaplan J (2002) Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire. *Cell* 111: 603-606
- Kim Y, Lampert SM, & Philpott CC (2005) A receptor domain controls the intracellular sorting of the ferrichrome transporter, *ARN1*. *EMBO J* 24: 952-962
- Kim Y, Yun CW, & Philpott CC (2002) Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21: 3632-3642
- Kosman DJ (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* 47: 1185-1197
- Kucharczyk R & Rytka J (2001) *Saccharomyces cerevisiae* - a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochim Pol* 48: 1025-1042
- Kulkarni M, Ozgur S & Stoecklin G (2010) On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans* 38 Pt 1: 242-251
- Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM & Kaplan J (2008) Identification of *FRA1* and *FRA2* as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 283: 10276-10286
- Lapinskas PJ, Lin SJ, & Culotta VC (1996) The role of the *Saccharomyces cerevisiae* *CCCI* gene in the homeostasis of manganese ions. *Mol Microbiol* 21: 519-528

Lesuisse E, Casteras-Simon M, & Labbe P (1996) Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* ferrireductase system being a multicomponent electron transport chain. *J Biol Chem* 271: 13578-13583

Lesuisse E, Crichton RR, & Labbe P (1990) Iron-reductases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1038: 253-259

Lesuisse E, Raguzzi F, & Crichton RR (1987) Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a reduction step. *J Gen Microbiol* 133: 3229-3236

Lesuisse E, Simon-Casteras M, & Labbe P (1998) Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology* 144: 3455-3462

Li L, Bagley D, Ward DM, & Kaplan J (2008) Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol* 28: 1326-1337

Li L, Chen OS, McVey Ward D, & Kaplan J (2001) *CCCI* is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 276: 29515-29519

Li Y & Prinz WA (2004) ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate nonvesicular, raft-modulated sterol movement from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 45226-45234

Li ZS, Szczyпка M, Lu YP, Thiele DJ, & Rea PA (1996) The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271: 6509-6517

- Liu XF & Culotta VC (1999) Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the *BSD2* gene. *J Biol Chem* 274: 4863-4868
- Liu XF, Supek F, Nelson N, & Culotta VC (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. *J Biol Chem* 272: 11763-11769
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, & Winge DR (1998) Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 23716-23721
- Mason DL & Michaelis S (2002) Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Biol Cell* 13: 4443-4455
- McNabb DS & Pinto I (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4: 1829-1839
- McNabb DS, Tseng KA, & Guarente L (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol Cell Biol* 17: 7008-7018
- Mercier A & Labbé S (2009) Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1. *J Biol Chem* 284: 20249-20262

Mercier A, Pelletier B, & Labbé S (2006) A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 5: 1866-1881

Mercier A, Watt S, Bahler J, & Labbé S (2008) Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot Cell* 7: 493-508

Moore RE, Kim Y, & Philpott CC (2003) The mechanism of ferrichrome transport through Arn1p and its metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5664-5669

Mourez M, Hofnung M, & Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J* 16: 3066-3077

Nagao K, Taguchi Y, Arioka M, Kadokura H, Takatsuki A, Yoda K, & Yamasaki M (1995) *bfr1<sup>+</sup>*, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol* 177: 1536-1543

Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-26726

Nishi K, Yoshida M, Nishimura M, Nishikawa M, Nishiyama M, Horinouchi S, & Beppu T (1992) A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol* 6: 761-769

Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R & Winge DR (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 17661-17661

Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, & Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J* 11: 3491-3499

Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, & Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by *HMT1*, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* 270: 4721-4728

Pedro-Segura E, Vergara SV, Rodriguez-Navarro S, Parker R, Thiele DJ, & Puig S (2008) The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase *SDH4* mRNA in response to iron deficiency. *J Biol Chem* 283: 28527-28535

Pelletier B, Beaudoin J, Mukai Y, & Labbé S (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 22950-22958

Pelletier B, Beaudoin J, Philpott CC, & Labbé S (2003) Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res* 31: 4332-4344

Pelletier B, Trott A, Morano KA, & Labbé S (2005) Functional characterization of the iron-regulatory transcription factor Fep1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 280: 25146-25161

- Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim Biophys Acta* 1763: 636-645
- Pinkham JL & Guarente L (1985) Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5: 3410-3416
- Portnoy ME, Jensen LT, & Culotta VC (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem J* 362: 119-124
- Portnoy ME, Liu XF, & Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* 20: 7893-7902
- Pouliot B, Jbel M, Mercier A, & Labbé S (2010) *abc3<sup>+</sup>* Encodes an iron-regulated vacuolar ABC-type transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 9: 59-73
- Poyton RO, Goehring B, Droste M, Sevarino KA, Allen LA, & Zhao XJ (1995) Cytochrome-c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 260: 97-116
- Preveral S, Gayet L, Moldes C, Hoffmann J, Mounicou S, Gruet A, Reynaud F, Lobinski R, Verbavatz JM, Vavasseur A, & Forestier C (2009) A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J Biol Chem* 284: 4936-4943

Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, & Philpott CC (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 49244-49250

Puig S, Askeland E, & Thiele DJ (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120: 99-110

Puig S, Vergara SV, & Thiele DJ (2008) Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab* 7: 555-564

Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A & de la Torre-Ruiz MA (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119 Pt 21: 4554-4564

Rad AM, Janic B, Iskander AS, Soltanian-Zadeh H, & Arbab AS (2007) Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *BioTechniques* 43: 627-636

Raguzzi F, Lesuisse E, & Crichton RR (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 231: 253-258

Rea PA (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347-375

Rees EM, Lee J, & Thiele DJ (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* 279: 54221-54229

Roberts CJ, Raymond CK, Yamashiro CT, & Stevens TH (1991) Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol* 194: 644-661

Roman DG, Dancis A, Anderson GJ, & Klausner RD (1993) The fission yeast ferric reductase gene *frp1<sup>+</sup>* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol Cell Biol* 13: 4342-4350

Rustici G, van Bakel H, Lackner DH, Holstege FC, Wijmenga C, Bahler J, & Brazma A (2007) Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol* 8: R73

Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, & Winge DR (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14322-14327

Rutherford JC, Jaron S, & Winge DR (2003) Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem* 278: 27636-27643

Schrettl M, Winkelmann G, & Haas H (2004) Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe* - an iron transport and iron storage compound. *Biomaterials* 17: 647-654

Shatwell KP, Dancis A, Cross AR, Klausner RD, & Segal AW (1996) The *FRE1* ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271: 14240-14244

Shrieve DC, Bump EA, & Rice GC (1988) Heterogeneity of cellular glutathione among cells derived from a murine fibrosarcoma or a human renal cell carcinoma detected by flow cytometric analysis. *J Biol Chem* 263: 14107-14114

Singh A, Kaur N, & Kosman DJ (2007) The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem* 282: 28619-28626

Singh A, Severance S, Kaur N, Wiltsie W, & Kosman DJ (2006) Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p-Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 13355-13364

Sooksa-Nguan T, Yakubov B, Kozlovskyy VI, Barkume CM, Howe KJ, Thannhauser TW, Rutzke MA, Hart JJ, Kochian LV, Rea PA, & Vatamaniuk OK (2009) Drosophila ABC transporter, DmHMT-1, confers tolerance to cadmium. DmHMT-1 and its yeast homolog, SpHMT-1, are not essential for vacuolar phytochelatin sequestration. *J Biol Chem* 284: 354-362

Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, & Dancis A (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271: 1552-1557

Stehr M, Diekmann H, Smau L, Seth O, Ghisla S, Singh M, & Macheroux P (1998) A hydrophobic sequence motif common to N-hydroxylating enzymes. *Trends Biochem Sci* 23: 56-57

Supek F, Supekova L, Nelson H, & Nelson N (1997) Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J Exp Biol* 200: 321-330

Sybirna K, Guiard B, Li YF, Bao WG, Bolotin-Fukuhara M, & Delahodde A (2005) A new *Hansenula polymorpha* *HAP4* homologue which contains only the N-terminal conserved domain of the protein is fully functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47: 172-181

Szczyпка MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, & Thiele DJ (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 269: 22853-22857

Takegawa K, Iwaki T, Fujita Y, Morita T, Hosomi A, & Tanaka N (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct Funct* 28: 399-417

Takegawa K, Tohda H, Sasaki M, Idiris A, Ohashi T, Mukaiyama H, Giga-Hama Y, & Kumagai H (2009) Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. *Biotechnol Appl Biochem* 53: 227-235

Turi TG & Rose JK (1995) Characterization of a novel *Schizosaccharomyces pombe* multidrug resistance transporter conferring brefeldin A resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 410-418

Ueta R, Fukunaka A, & Yamaguchi-Iwai Y (2003) Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 50120-50127

Ueta R, Fujiwara N, Iwai K & Yamaguchi-Iwai Y (2007) Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18: 2980-2990

Urbanowski JL & Piper RC (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem* 274: 38061-38070

Van Ho A, Ward DM, & Kaplan J (2002) Transition metal transport in yeast. *Annu Rev Microbiol* 56: 237-261

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A *et al* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-880

Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, & Klausner RD (1995) *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 1231-1239

Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, & Klausner RD (1996) Iron-regulated DNA binding by the *AFT1* protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J* 15: 3377-3384

Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, & Sasaki R (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 18914-18918

Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, & Langer T (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291: 2135-2138

Yuan WM, Gentil GD, Budde AD, & Leong SA (2001) Characterization of the *Ustilago maydis sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J Bacteriol* 183: 4040-4051

Yun CW, Bauler M, Moore RE, Klebba PE, & Philpott CC (2001) The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 10218-10223

Yun CW, Ferea T, Rashford J, Ardon O, Brown PO, Botstein D, Kaplan J, & Philpott CC (2000a) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* 275: 10709-10715

Yun CW, Tiedeman JS, Moore RE, & Philpott CC (2000b) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J Biol Chem* 275: 16354-16359

Znaidi S, Pelletier B, Mukai Y, & Labbé S (2004) The *Schizosaccharomyces pombe* corepressor Tup11 interacts with the iron-responsive transcription factor Fep1. *J Biol Chem* 279: 9462-9474