

Université de Sherbrooke

**ÉLUCIDATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME D'INACTIVATION DE Php4 EN
RÉPONSE AU FER.**

Par

M. Philippe Vachon

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

Sherbrooke, Québec, Canada

septembre 2014

Membres du jury d'évaluation :

Dr Simon Labbé, Département de Biochimie

Dr Éric Massé, Département de Biochimie

Dr Nicolas Gévry, Département de Biologie

© Philippe Vachon, 2014

RÉSUMÉ

Élucidation d'un nouveau mécanisme d'inactivation de Php4 en réponse au fer.

Par
Philippe Vachon
Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du diplôme de Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie, Faculté de
Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec,
Canada, J1H 5N4

Le fer est un cofacteur essentiel à la croissance des organismes. Cependant, un surplus de fer conduit à la production de dérivés toxiques de l'oxygène qui sont dangereux pour les cellules. La concentration intracellulaire de fer doit donc être régulée. Lorsque la biodisponibilité du fer s'amenuise, la plupart des cellules augmentent leur acquisition du fer environnemental tout en réduisant sa consommation en réprimant plusieurs voies métaboliques fer-dépendantes non-essentiels. Alors que les mécanismes qui régissent l'augmentation de l'acquisition du fer sont assez bien caractérisés, les composantes qui contrôlent la promotion de l'économie du fer sont largement méconnues. Mes travaux ont porté sur l'étude des mécanismes de contrôle de l'économie du fer chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*. Php4, une sous-unité du complexe liant les boîtes CCAAT, est responsable de la répression des gènes codants pour des protéines qui utilisent du fer lorsque ce dernier est en faible concentration. Il est déjà connu qu'en présence de fer, l'expression du gène php4+ est réprimée via le facteur de transcription Fep1. De plus, la protéine Php4 est inactivée et exportée hors du noyau lorsque les cellules croissent en présence de fer. Ce processus est dépendant à la fois de la présence de l'exportine Crm1 et de la monothiol glutarédoxine Grx4. L'objectif de recherche est de découvrir le mécanisme par lequel Grx4 inhibe Php4 en réponse à la présence de fer. L'approche du double-hybride a été utilisée pour quantifier la force de l'interaction entre Php4 et Grx4 et identifier les domaines de ces protéines qui y participent. Ce système nous a permis de déterminer que Php4 interagit de façon constitutive avec le domaine thiorédoxine (TRX) de Grx4, alors que l'interaction entre Php4 et le domaine glutarédoxine (GRX) est dépendante de la présence de fer. Nous avons déterminé que la cystéine 35 du domaine TRX et la cystéine 172 du domaine GRX sont essentiels pour l'interaction de chacun de ces domaines avec Php4. Des régions minimales de Php4 nécessaires pour son interaction avec chacun des domaines GRX et TRX ont aussi été identifiées. Par la suite, nous avons démontré que l'expression du domaine GRX seul de Grx4 est suffisante pour l'inactivation de Php4 en présence de fer. Puis, par des essais de fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC), nous avons démontré que le domaine GRX de Grx4 interagit de façon fer-dépendante avec Php4 et qu'il est suffisant pour l'exportation de Php4 hors du noyau en présence de fer. Ces résultats révèlent que le mécanisme par lequel Php4 est inhibé en présence de fer dépend de son interaction avec le domaine GRX de Grx4. À la suite des résultats obtenus, un modèle illustrant l'interaction fer-dépendante entre Grx4 et Php4 suggère la présence potentielle d'un centre fer-soufre qui pourrait expliquer la nature de l'interaction fer-dépendante entre les deux protéines.

Mots clefs : homéostasie du fer, monothiol glutarédoxine, complexe liant les boîtes CCAAT, régulation transcriptionnelle, *Schizosaccharomyces pombe*.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
1. Le fer chez l'organisme vivant.....	1
1.1 Importance pour l'organisme vivant.....	1
1.2 Danger d'un excès de fer.....	2
1.3 Homéostasie du fer.....	2
2. Organismes modèles.....	3
2.1 Les levures comme modèle d'étude.....	3
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	4
2.3 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.....	4
3. Homéostasie du fer chez <i>S. cerevisiae</i>.....	5
3.1 Acquisition du fer.....	5
3.1.1 Système de haute affinité réductase-dépendant.....	5
3.1.2 Système de haute affinité réductase-indépendant.....	6
3.1.3 Système de faible affinité.....	7
3.1.4 Entreposage du fer par la vacuole.....	7
3.2 Régulation de l'homéostasie du fer.....	8
3.2.1 Régulation de l'acquisition du fer.....	8
3.2.2 Régulation de l'utilisation du fer.....	11
3.2.3 Régulation de l'entreposage du fer.....	12
4. Homéostasie du fer chez <i>S. pombe</i>.....	13
4.1 Acquisition du fer.....	13

4.1.1	<i>Système de haute affinité réductase-dépendant</i>	13
4.1.2	<i>Système de haute affinité réductase-indépendant</i>	14
4.1.3	<i>Entreposage du fer par la vacuole</i>	15
4.2	Régulation de l'homéostasie du fer	16
4.2.1	<i>Régulation de l'acquisition du fer</i>	16
4.2.2	<i>Régulation de l'utilisation du fer</i>	19
5.	Les monothiols glutarédoxines	23
5.1	<i>La famille des glutarédoxines</i>	23
5.2	<i>La classe des monothiols glutarédoxines</i>	24
5.3	<i>La monothiol glutarédoxine Grx4</i>	29
6.	Hypothèse de recherche	30
7.	Objectif de recherche	31
RÉSULTATS		32
	Article : The Monothiol Glutaredoxin Grx4 Exerts an Iron-Dependent Inhibitory Effect on Php4 Function	32
DISCUSSION		79
1.	Caractérisation du mécanisme d'inactivation de Php4	79
1.1.	<i>Résumés des résultats publiés</i>	79
1.2.	<i>Rôle d'un centre fer-soufre</i>	79
REMERCIEMENTS		91
LISTE DES RÉFÉRENCES		92

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Représentation de la réaction de Fenton.....	2
Figure 2 : Acquisition du fer chez <i>S. cerevisiae</i> : système de haute affinité réductase-dépendant.....	6
Figure 3 : Régulation de l'acquisition du fer chez <i>S. cerevisiae</i> par Aft1/2.....	10
Figure 4 : Acquisition du fer chez <i>S. pombe</i> : systèmes de haute affinité réductase-dépendant et réductase-indépendant.....	14
Figure 5 : Représentation des domaines fonctionnels de Fep1.....	17
Figure 6 : Schéma résumant la régulation du fer chez <i>S. pombe</i> via Php4 et Fep1.....	19
Figure 7 : Représentation des domaines fonctionnels de Php4.....	23
Figure 8 : Arrangement des domaines fonctionnels de différentes monothiol glutarédoxines.....	26
Figure 9 : Coordination d'un centre fer-soufre par Grx3 et Grx4 de <i>S. cerevisiae</i>	28

Résultats

Fig. 1. The N- and C-terminal regions of Grx4 interact with Php4.....	46
Fig. 2. Two domains of Grx4 are involved in the association with Php4, but only the GRX domain interacts in an iron-dependent manner.....	49
Fig. 3. The Cys35 of Grx4 is necessary for the Php4-TRX domain interaction, whereas the Grx4 Cys172 is required for the iron-dependent Php4-GRX domain association.....	53
Fig. 4. The GRX domain of Grx4 interacts with the C-terminal region 188-254 of Php4.....	56
Fig. 5. The TRX domain of Grx4 interacts with two distinct regions of Php4.....	58
Fig. 6. The GRX domain inhibits Php4 activity in response to iron.....	60
Fig. 7. Php4 and the GRX domain interact in an iron-dependent manner in living <i>S. pombe</i> cells.....	63
Fig. 8. Proposed model for the interaction between the monothiol glutaredoxin Grx4 and Php4.....	69

Discussion

Figure 10 : Prédiction de coordination d'un centre fer-soufre par Grx4 et Php4 chez <i>S. pombe</i>	81
Figure 11 : Représentation du plasmide pRSFDuet1-(His6-Php4)-(MBP-Grx4)	83
Figure 12 : Php4 et Grx4 co-éluent lors d'une chromatographie d'affinité	84
Figure 13 : Rôle de la cystéine 172 de Grx4 sur la coordination d'un centre fer-soufre	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	alanine
a.a.	acide aminé
ABC	<i>ATP binding cassette</i> (cassette liant l'ATP)
ADN	acide déoxyribonucléique
ARE	AU-rich element (élément de type AU-riche)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BiFC	fluorescence par complémentation bimoléculaire
BPS	acide bathophénanthrolinedisulfonique
C	cystéine
Co-IP	co-immunoprécipitation
diGrx	dithiol glutarédoxine
Dip	2,2'-dipyridyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Phénylalanine
Fe	fer
Fe-S	centre fer-soufre
Grx	glutarédoxine
GRX	domaine de Grx4 semblable aux glutarédoxines
GSH	glutathion
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
mGrx	monothiol glutarédoxine
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NES	signal d'exportation nucléaire
NLS	signal de localisation nucléaire

P	Proline
ROS	dérivé réactif de l'oxygène
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyce cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TRX	domaine de Grx4 semblable au thiorédoxine
Y	Tyrosine
μM	micromolaire

INTRODUCTION

1. Le fer chez l'organisme vivant

1.1 Importance pour l'organisme vivant

Le fer est un micro-nutriment essentiel à presque tous les organismes vivants. Utilisé comme cofacteur enzymatique, on le retrouve au site actif de plusieurs enzymes participant à des processus cellulaires essentiels, dont la biosynthèse de l'ADN, des lipides et des acides aminés, la production d'ATP et la réponse au stress oxydatif. L'importance du fer chez les organismes s'explique par sa propriété de se retrouver sous deux états d'oxydation différents : la forme réduite Fe^{2+} (ion ferreux) et la forme oxydée Fe^{3+} (ion ferrique). Il a donc la capacité de donner ou de recevoir un électron, d'où sa prévalence dans des réactions chimiques d'oxydoréduction (KOSMAN, 2003). Le fer peut être présent dans les protéines sous forme de centres fer-soufre, d'hème ou encore lié sous forme inorganique aux chaînes latérales (BLEACKLEY et MACGILLIVRAY, 2011; KAPLAN *et al.*, 2006).

Bien que le fer soit un élément très abondant sur la surface de la terre, il se présente sous forme insoluble non biodisponible. En fait, le Fe^{2+} qui est soluble et biologiquement assimilable s'oxyde en présence d'oxygène et à pH physiologique en Fe^{3+} . Le Fe^{3+} est non soluble, car il se polymérise en hydroxydes ferriques (KOSMAN, 2003; SPIRO *et al.*, 1966). Les organismes sont donc naturellement dans un milieu pauvre en fer et en compétition entre eux pour se l'accaparer. Ils doivent donc posséder des mécanismes d'acquisition du fer pour assurer leur croissance. Ces mécanismes seront décrits dans les sections 3.1 et 4.1. Entre autre, le fer extracellulaire peut être réduit via des ferriréductases de surface ou être séquestré par des sidérophores. Ces derniers sont de petites molécules synthétisées, sécrétées dans le milieu extracellulaire par certains organismes et ont la capacité de se lier au Fe^{3+} avec une très forte affinité. Dans une étape subséquente, les cellules peuvent internaliser les complexes sidérophore- Fe^{3+} via des transporteurs spécifiques. Une fois à l'intérieur des cellules, le Fe^{3+} peut être réduit et libéré du sidérophore pour être relâché à l'intérieur de la cellule. La sécrétion de sidérophores permet à un organisme de réquisitionner le fer extracellulaire pour son propre usage. Dans un contexte de constante compétition pour l'acquisition du fer dans l'environnement, certains micro-organismes ont

la capacité de transporter des sidérophores produits par d'autres micro-organismes s'ils possèdent le transporteur approprié (NEILANDS, 1995).

1.2 Danger d'un excès de fer

Bien que le fer soit essentiel à la croissance cellulaire, il est cependant toxique en trop grande quantité. En fait, le fer catalyse la formation de dérivés de l'oxygène par la réaction de Fenton illustrée à la figure 1 (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1992). Le fer réduit (Fe^{2+}) peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former du fer oxydé (Fe^{3+}), un ion hydroxyle (OH^-) et un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$). Ce radical hydroxyle est un dérivé réactif de l'oxygène (ROS) possédant un grand pouvoir d'oxydation. Il cause des dommages aux constituants cellulaires, dont les acides nucléiques, les protéines et les membranes lipidiques (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1992).



Figure 1 : Représentation de la réaction de Fenton.

L'ion de fer(II) (Fe^{2+}) et le peroxyde d'hydrogène réagissent pour former un ion de fer(III) (Fe^{3+}), un ion hydroxyle (OH^-) et un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$).

1.3 Homéostasie du fer

Les organismes doivent être capables d'acquérir suffisamment de fer de leur milieu, qui d'autre part est difficilement assimilable. Paradoxalement, les organismes doivent éviter la toxicité engendrée par un surplus de fer. Des mécanismes homéostatiques permettent aux organismes de maintenir une concentration idéale en fer. Chez les organismes, les systèmes d'acquisition du fer sont activés en carence de fer et inhibés en excès de fer. Aucun mécanisme d'excrétion du fer n'a été décrit à ce jour, autant chez les organismes uni- que pluricellulaires (KAPLAN, 2002). Donc, limiter l'acquisition du fer est la principale voie pour éviter d'atteindre un niveau toxique de ce dernier. Les voies

métaboliques qui requièrent du fer et la production de protéines qui en nécessite comme cofacteur doivent également être contrôlés pour économiser ce métal lorsqu'il est en quantité insuffisante. Un mécanisme de contrôle de l'entreposage du fer contribue également au bon maintien du statut intracellulaire de fer. Les ions de fer libres sont séquestrés et entreposés lorsque le fer est en surplus. Ces derniers sont alors emmagasinés à l'intérieur des vacuoles au niveau de chaînes de polyphosphates. En condition de carence, les ions de fer peuvent être exportés de la vacuole afin de combler les besoins soudains pour le cofacteur (LI *et al.*, 2001).

2. Organismes modèles

2.1 Les levures comme modèle d'étude

Les levures sont largement utilisées comme organisme modèle en recherche. Leur étude est instructive, car pour plusieurs sentiers biologiques fondamentaux, les levures partagent beaucoup de similarité avec les cellules mammifères. Les levures sont des organismes unicellulaires relativement simples à étudier. Leur mise en culture est rapide et peu coûteuse en comparaison avec les cellules de mammifères. Aussi, elles peuvent croître sur milieu défini, permettant un contrôle précis des conditions de croissance expérimentales. Elles sont faciles à manipuler génétiquement. La transformation avec des plasmides, l'expression de protéines et la délétion des gènes sont des opérations de routine chez les levures (FORSBURG, 2005). Une caractéristique intéressante de plusieurs levures par rapport aux autres eucaryotes est leur capacité à croître en condition anaérobie. Puisque la perturbation de l'homéostasie du fer peut causer l'inactivation d'enzymes fer-dépendantes jouant un rôle au niveau de la respiration cellulaire, la croissance en condition anaérobie est une alternative intéressante pour certaines conditions d'études particulières (KAPLAN *et al.*, 2006). L'étude de l'homéostasie du fer chez les levures a permis la découverte de nouvelles protéines orthologues chez les mammifères jusqu'avant non identifiées et a permis l'avancement des connaissances sur des maladies humaines comme l'ataxie de Friedreich (ASKWITH et KAPLAN, 1998; BLEACKLEY et MACGILLIVRAY, 2011; LODI *et al.*, 2006; ROUAULT et TONG, 2008).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est une levure très utilisée dans l'industrie agroalimentaire. Par exemple, elle sert pour la production du pain et de la bière. *S. cerevisiae* est aussi appelée levure à bourgeon, à cause de son mode de division cellulaire asymétrique qui est caractérisé par la formation d'une cellule à l'extrémité de la cellule mère. En recherche, cette levure est un des organismes modèles eucaryotes les plus utilisés. Il existe beaucoup d'outils et de techniques de biologie moléculaire qui sont disponibles pour étudier *S. cerevisiae*. Elle est non pathogène et peut être mise en culture de façon simple (FORSBURG, 2005). Son génome a été séquencé et les gènes annotés (GOFFEAU *et al.*, 1996). Il est aisé de produire une souche mutante pour un gène donné et ainsi étudier sa fonctionnalité. Puisque beaucoup d'études sur des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer ont été réalisées chez *S. cerevisiae*, des résultats obtenus chez d'autres levures sont généralement comparés à *S. cerevisiae* dans un but de validation.

2.3 *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe est un organisme modèle fongique qui est également très utilisé en recherche. Son utilisation est plus récente que *S. cerevisiae*. Tout comme *S. cerevisiae*, le génome de *S. pombe* a été séquencé et annoté (WOOD *et al.*, 2002). Son mode de division cellulaire est de type binaire; c'est-à-dire que la cellule mère s'allonge puis forme un septum en son centre pour permettre la génération de deux cellules de taille équivalente à partir d'un axe central. *S. pombe* porte aussi le nom de levure à fission à cause de son mode de division. Ce type de division est également utilisé par les cellules eucaryotes d'organismes multicellulaires (FORSBURG, 2005). D'autres caractéristiques différencient *S. pombe* de *S. cerevisiae* comme l'existence chez *S. pombe* du mécanisme d'interférence à l'ARN, la présence d'un grand nombre d'introns et l'absence de duplication de son génome au cours de l'évolution (HALL *et al.*, 2002; KELLIS *et al.*, 2004; WOLFE et SHIELDS, 1997; WOOD *et al.*, 2002). Au sujet de l'homéostasie du fer, *S. pombe* possède la capacité de synthétiser des sidérophores, ce qui n'est pas le cas de *S. cerevisiae*. Cette propriété de *S. pombe* est retrouvée chez plusieurs microorganismes tels les bactéries

et plusieurs levures filamenteuses (HAAS *et al.*, 2008). Un avantage d'utiliser *S. pombe* sur *S. cerevisiae* lors de l'étude de l'homéostasie du fer est que *S. pombe* a deux régulateurs clés dont on retrouve des protéines orthologues chez des levures filamenteuses pathogènes. Il est donc possible d'en apprendre sur ces dernières en travaillant avec *S. pombe*, qui est non pathogène. Ces deux régulateurs, Fep1 et Php4, et les protéines orthologues seront décrits à la section 4.2.

3. Homéostasie du fer chez *S. cerevisiae*

3.1 Acquisition du fer

3.1.1 Système de haute affinité réductase-dépendant

S. cerevisiae maintient son homéostasie du fer en contrôlant la quantité de fer qui entre dans la cellule par trois systèmes d'acquisition différents. Un premier est le système d'acquisition du fer réductase-dépendant, qui implique les ferriréductases de surface Fre1 et Fre2. Ces protéines localisées à la membrane plasmique peuvent réduire le fer environnemental Fe^{3+} non-biodisponible (qui se présente sous forme d'hydroxyde ferrique insoluble) ou le fer complexé dans des sidérophores extracellulaires (LESUISSE *et al.*, 1990; YUN *et al.*, 2000a; YUN *et al.*, 2000b). *S. cerevisiae* possède aussi d'autres ferriréductases de surface qui peuvent réduire le fer contenu dans des sidérophores spécifiques. Fre3 et Fre4 participent à la réduction d'ions Fe^{3+} contenus dans des sidérophores de type hydroxamates et de dérivés de l'acide rhodotorulique respectivement (YUN *et al.*, 2001). En plus, *S. cerevisiae* possède les mannoprotéines Fit1/2/3 situées au niveau de la paroi cellulaire qui retiennent les sidérophores à proximité des ferriréductases membranaires (PHILPOTT *et al.*, 2002). Suite à la réduction du Fe^{3+} , le Fe^{2+} soluble est oxydé par la multi-cuivre oxydase Fet3 en Fe^{3+} et puis transféré au transporteur Ftr1 qui le fait entrer dans la cellule (ASKWITH *et al.*, 1994; DE SILVA *et al.*, 1995; HASSETT *et al.*, 1998; STEARMAN *et al.*, 1996). Ce transporteur a une forte affinité pour les ions Fe^{3+} libres avec un K_m de 0,15 μM (EIDE *et al.*, 1992). Fet3 et Ftr1 se localisent à la membrane plasmique et sont associées l'une à l'autre. Le couplage de leur activité est important, car Ftr1 n'accepte que le Fe^{3+} qui lui est transféré directement par Fet3 (figure 2) (KWOK *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2003).

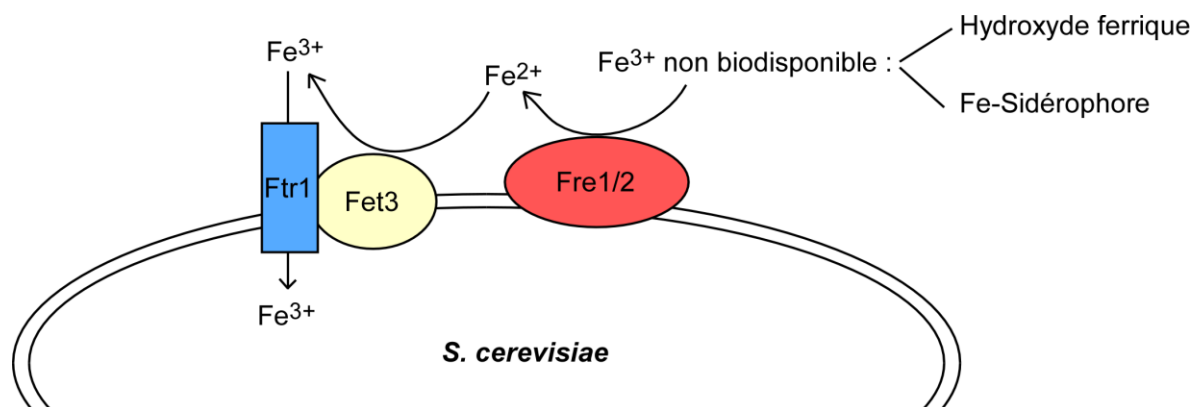


Figure 2 : Acquisition du fer chez *S. cerevisiae* : système de haute affinité réductase-dépendant.

Le fer Fe^{3+} non-biodisponible est présent sous forme d'hydroxyde ferrique insoluble ou séquestré par un sidérophore. Il est premièrement réduit par l'une des ferriréductases de surface Fre1 et Fre2. Le Fe^{2+} soluble obtenu est ensuite oxydé par la multi-cuivre oxydase Fet3 en Fe^{3+} biodisponible, puis est transporté par la perméase Ftr1 à l'intérieur de la cellule.

3.1.2 Système de haute affinité réductase-indépendant

Saccharomyces cerevisiae possède un autre mécanisme d'acquisition du fer qui ne nécessite pas l'activité des ferriréductases de surface, mais implique les sidérophores. Ces derniers sont de petites molécules excrétées qui captent le fer avec une forte affinité, puis sont récupérés par la cellule (NEILANDS, 1995). *S. cerevisiae* ne produit pas de sidérophore, mais peut acquérir ceux produits et excrétés par d'autres organismes via les transporteurs Arn1/2/3/4 (HAAS *et al.*, 2008; YUN *et al.*, 2000a). Arn2/3/4 sont aussi nommés Taf1, Sit1 et Enb1, respectivement (PHILPOTT, 2006). Arn1/2/3/4 sont chacun spécifiques pour certains types de sidérophores. Ils transportent les sidérophores ferrirubin, ferrirhodin et ferrichrome (Arn1), triacétylfusarinine C (Arn2), ferrioxamine B (Arn3) et entérobactine (Arn4) (HEYMANN *et al.*, 1999; HEYMANN *et al.*, 2000a; HEYMANN *et al.*, 2000b; LESUISSE *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel le fer est libéré du sidérophore une fois dans le cytoplasme de la cellule est encore mal défini au niveau moléculaire.

3.1.3 Système de faible affinité

Un troisième mécanisme d'acquisition du fer chez *S. cerevisiae* implique des transporteurs à faible affinité. Ce transport est actif lorsque les concentrations en fer atteignent plus de 5 μM (EIDE *et al.*, 1992). Il permet à la cellule de maintenir un faible apport en fer lorsque cet ion est en concentration suffisante, alors que le transport à haute affinité est inactivé dans cette condition pour protéger la cellule contre une acquisition excessive de fer (DIX *et al.*, 1997) (voir section 3.2.1 Régulation de l'acquisition du fer). En absence d'oxygène, ce type de transport devient plus important, parce que l'activité de la multi-cuivre oxydase Fet3 nécessaire au transport via Ftr1 est inhibée. Le système de transport du fer de faible affinité implique les transporteurs de surface Fet4 et Smf1, qui possèdent la propriété de transporter plusieurs métaux divalents différents (DIX *et al.*, 1997; DIX *et al.*, 1994). Fet4 peut transporter les ions Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+} (DIX *et al.*, 1994; HASSETT *et al.*, 2000). Smf1 a une spécificité pour plusieurs métaux divalents dont Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Cu^{2+} . C'est un transport actif qui est alimenté via un gradient de proton et qui nécessite l'activité préalable des réductases de surface parce que ces transporteurs ne peuvent qu'accepter le fer sous sa forme réduite Fe^{2+} (CHEN *et al.*, 1999).

3.1.4 Entreposage du fer par la vacuole

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la vacuole sert de lieu d'entreposage. Elle peut y séquestrer le surplus de fer cytoplasmique, puis l'utiliser en condition de carence. De cette façon, la levure peut survivre pour plusieurs générations seulement avec les réserves de fer vacuolaires (PHILPOTT et PROTCHENKO, 2008). Le transporteur Ccc1 localisé à la membrane de la vacuole est responsable de l'import vacuolaire en fer. La séquestration vacuolaire du surplus de fer via Ccc1 est importante, car il a été montré qu'un délétant pour *CCC1* est plus sensible à une condition d'excès en fer (LI *et al.*, 2001). Le système d'export du fer de la vacuole vers le cytoplasme est une réplique du système d'acquisition du fer extracellulaire. Le fer vacuolaire est réduit par la réductase Fre6, pour ensuite être oxydé par la multi-cuivre oxydase Fet5, puis transporté au cytoplasme via le transporteur Fth1 (SINGH *et al.*, 2007; URBANOWSKI et PIPER, 1999). Le transporteur à faible affinité Smf3, qui possède une

spécificité large pour plusieurs métaux divalents, participe également au transport du Fe^{2+} en dehors de la vacuole. Toutefois, son action ne requiert pas la présence de Fet5 (SINGH *et al.*, 2007).

3.2 Régulation de l'homéostasie du fer

Jusqu'à maintenant, aucune voie excrétrice de fer permettant son élimination n'a été identifiée chez les eucaryotes unicellulaires. Ceci suggère que son homéostasie est principalement régulée au niveau de son absorption et son utilisation (KAPLAN, 2002).

3.2.1 Régulation de l'acquisition du fer

En carence de fer, *Saccharomyce cerevisiae* réagit en augmentant son absorption en fer. Pour ce faire, elle possède les facteurs de transcription Aft1 et Aft2 qui activent la transcription de plus de 200 gènes, qui forment le régulon du fer (BLAISEAU *et al.*, 2001; RUTHERFORD *et al.*, 2001; SHAKOURY-ELIZEH *et al.*, 2004; YAMAGUCHI-IWAI *et al.*, 1995; YAMAGUCHI-IWAI *et al.*, 1996). Parmi ces gènes, plusieurs sont impliqués dans l'acquisition du fer à la membrane cellulaire, l'exportation vacuolaire du fer ou encore, son économie. Parmi les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans l'acquisition du fer, il y a ceux impliqués dans le système à haute affinité réductase-dépendant (*FRE1/2/3/4*, *FIT1/2/3*, *FET3* et *FTR1*), le système à haute affinité réductase-indépendant (*ARN1/2/3/4*) et le système de récupération du fer vacuolaire (*FRE6*, *FET5*, *FTH1* et *SMF3*) (PHILPOTT et PROTCHENKO, 2008). Aft1 et Aft2 sont des paralogues, mais c'est Aft1 qui est responsable en grande partie de la régulation des gènes du régulon du fer, sauf dans les cas de *SMF3* et du gène codant pour le transporteur de l'importation mitochondriale de fer Mrs4, qui sont régulés par Aft2 (COUREL *et al.*, 2005). Ces deux facteurs de transcription peuvent lier l'ADN au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Les séquences reconnues sont : TGCACCC pour Aft1 et (C/G)GCACCC pour Aft2 (COUREL *et al.*, 2005; RUTHERFORD *et al.*, 2003; YAMAGUCHI-IWAI *et al.*, 1996).

Malgré une expression constitutive, Aft1 et Aft2 n'activent la transcription de leurs gènes cibles qu'en carence en fer. Leur localisation cellulaire est différente selon le statut en fer. Aft1 et Aft2 sont localisés au noyau en conditions de carence en fer. À l'inverse, ils sont retrouvés au cytoplasme en présence d'un excès en fer (COUREL *et al.*, 2005; YAMAGUCHI-IWAI *et al.*, 2002). L'exportine Msn5 est responsable de leur exportation en dehors du noyau. C'est suite à l'homodimérisation d'Aft1/2, qui s'effectue en présence de fer, qu'il y a association avec Msn5 puis exportation du noyau vers le cytoplasme (UETA *et al.*, 2007). Hors du noyau, Aft1/2 n'ont plus de contact avec leur gènes cibles et cessent d'activer leur transcription. Les monothiols glutarédoxines Grx3/4, qui sont cytosoliques et nucléaires, interagissent directement avec Aft1 et sont nécessaires à son homodimérisation et à son exportation hors du noyau (les glutarédoxines seront décrites en détail à la section 5). Grx3 et Grx4 sont des protéines à séquence similaire et à fonction redondante. Une souche mutante déficiente en Grx3 ou Grx4 ne présente pas de phénotype, alors qu'une souche déficiente pour les deux protéines présente une activation constitutive d'Aft1 et une suraccumulation de fer (OJEDA *et al.*, 2006; PUJOL-CARRION *et al.*, 2006).

Des études ont permis de décrire un mécanisme qui met en relation la présence du fer et l'inactivation d'Aft1 via Grx3/4. Le fer reconnu serait sous forme d'un cofacteur mal défini contenant un centre fer-soufre de type [2Fe-2S] originant d'une synthèse mitochondriale (CHEN *et al.*, 2004; MUHLENHOFF *et al.*, 2010; RUTHERFORD *et al.*, 2005). En fait, la présence des protéines mitochondriales Atm1, la frataxine (Yfh1) et Grx5 est essentielle à l'inactivation d'Aft1 en présence de fer. Grx5 et Yfh1 participent à la synthèse et au transfert de centres fer-soufre, alors qu'Atm1 est un transporteur qui est connu pour transporter des précurseurs de centres fer-soufre formés dans la mitochondrie vers le cytoplasme (ALVES *et al.*, 2004; GERBER *et al.*, 2003; KISPAL *et al.*, 1999). Ensuite, il a été déterminé que les protéines Fra1 et Fra2 (*Fe repressor of activation-2*), qui forment un complexe, pourraient lier le cofacteur inconnu et que Fra2 interagirait avec Grx3/4 (KUMANOVICS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011). Un modèle incomplet décrit le mécanisme comme suit. Le cofacteur non identifié contenant un centre fer-soufre n'est synthétisé que si la concentration en fer est suffisante, il est ensuite transféré au complexe Fra2-Grx3/4. Grx3/4 deviendraient actifs afin de médier l'exportation d'Aft1/2 hors du noyau via Msn5. Ceci conduirait donc à la libération des promoteurs des gènes

d'acquisition du fer et leur expression ne seraient plus activée (figure 3) (LI et OUTTEN, 2012).

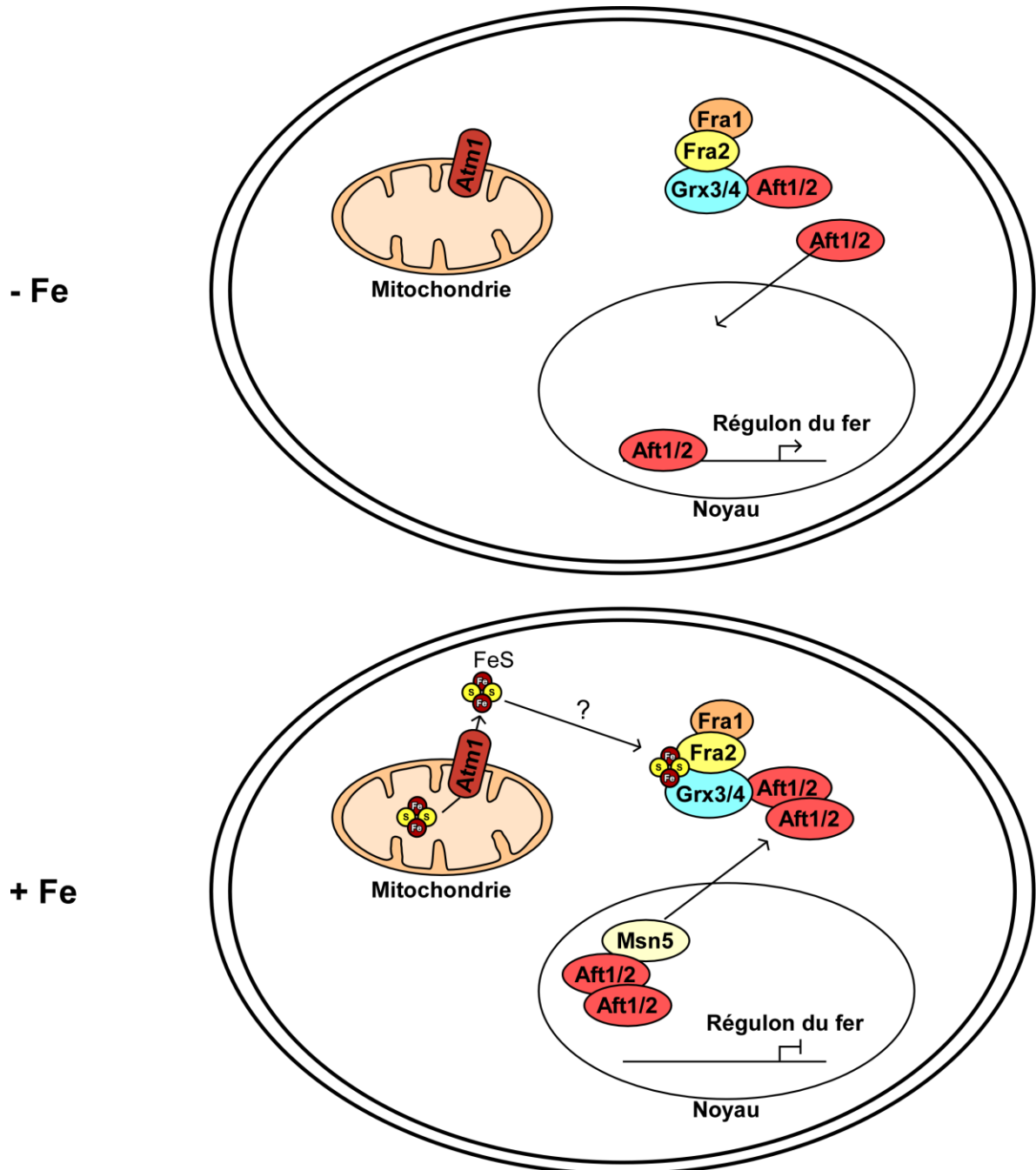


Figure 3 : Régulation de l'acquisition du fer chez *S. cerevisiae* par Aft1/2.

Aft1 et Aft2 sont deux facteurs de transcription actifs en carence en fer chez *S. cerevisiae*. Ils activent la transcription des gènes (Régulon du fer) de l'acquisition du fer. En présence de fer (+ Fe), un centre fer-soufre (FeS) synthétisé dans la mitochondrie est exporté vers le cytoplasme par le transporteur Atm1. Ce centre fer-soufre est chargé dans un cofacteur inconnu et transporté sur un complexe protéique formé de Grx3/4, Fra1, Fra2 et Aft1/2. Des interactions protéiques indépendantes du statut en fer sont présentes entre Grx3/4 et Fra2, Fra1 et Fra2, et Grx3/4 et Aft1 (et potentiellement avec Aft2). Le centre fer-soufre est coordonné par Grx3/4 et Fra2 et sa présence induit l'inactivation d'Aft1/2, son homodimérisation et son exportation hors du noyau via l'exportine Msn5. Dans cette condition d'abondance en fer, Aft1/2 n'est plus présent sur la chromatine et l'expression des gènes du régulon du fer est inhibée. En carence de fer (- Fe), le cofacteur contenant le centre fer-soufre n'est plus présent, Aft1/2 n'est plus séquestré et est libre d'activer l'expression de ses gènes cibles.

3.2.2 Régulation de l'utilisation du fer

Lorsque *S. cerevisiae* est en condition de carence en fer, elle doit pouvoir l'économiser et favoriser son utilisation dans les processus cellulaires les plus essentiels. Ceci lui permet de survivre le plus longtemps possible en attendant des conditions plus favorables. L'utilisation des ressources intracellulaires en fer est contrôlée par deux mécanismes. Un de ces mécanismes est post-transcriptionnel et implique les protéines Cth1 et Cth2 (PUIG *et al.*, 2008). Ces dernières sont deux protéines paralogues qui contiennent des doigts de zinc en tandem de type CCCH. Elles ont la capacité de lier des ARNm au niveau d'éléments AU-riches (ARE) situés dans les régions 3' non-codantes (PROUTEAU *et al.*, 2008). Les ARNm qui sont ciblés par Cth1/2 codent pour des protéines participant à des processus cellulaires qui nécessitent du fer. La liaison de Cth1/2 sur un ARNm amène sa dégradation via un mécanisme encore mal défini impliquant l'hélicase Dhh1 (PEDRO-SEGURA *et al.*, 2008; PROUTEAU *et al.*, 2008). Des exemples de cibles sont les ARNm des gènes *SDH4* (succinate dehydrogénase) et *HEM15* (biosynthèse de l'hème). *CTH1/2* sont régulés via les facteurs de transcription Aft1/2 qui sont responsables de l'activation de leur expression en condition de carence en fer (voir section précédente) (PUIG *et al.*, 2005).

Il existe un deuxième mécanisme encore peu étudié du contrôle de l'utilisation intracellulaire du fer. Ce mécanisme d'adaptation transcriptionnelle dépend d'un changement de concentrations de certains métabolites selon le statut en fer. Par exemple, l'expression de gène *CYCI* (cytochrome c, oxydase qui contient du fer) est réduite en

carence de fer. Il a été découvert que le facteur de transcription Hap1 responsable de son activation est inactif à cause d'un manque de son cofacteur, qui est l'hème (IHRIG *et al.*, 2010). La diminution de la concentration de ce métabolite en carence de fer est due au système de dégradation des ARNm via Cth1/2. En effet, Cth1/2 se lie aux transcrits du gène *HEM15* qui code pour une protéine qui participe à la biosynthèse de l'hème (PUIG *et al.*, 2005). En absence de Hem15, les concentrations d'hème chutent et inactivent Hap1. Les deux mécanismes de contrôle de l'utilisation du fer sont donc interreliés.

3.2.3 Régulation de l'entreposage du fer

Un excès de fer est toxique pour la levure à bourgeon, car il cause la production de dérivés oxygénés (ROS). La cellule se protège en séquestrant les ions de fer dans les vacuoles. Comme mentionné dans la section 3.1.4, le transporteur vacuolaire Ccc1 permet l'entreposage vacuolaire du fer (LI *et al.*, 2001). Ccc1 n'est présent qu'en condition d'abondance en fer (LI *et al.*, 2008). Son expression est régulée par deux mécanismes distincts, l'un transcriptionnel et l'autre post-transcriptionnel. Premièrement, l'ARNm *CCC1* est la cible de Cth1/2, ce qui conduit à sa dégradation en condition de carence en fer (PUIG *et al.*, 2005). Deuxièmement, en surplus de fer, l'expression de *CCC1* est augmentée via l'activité de l'activateur de la transcription Yap5. Yap5 est un membre de la famille des facteurs de la transcription possédant le domaine fermeture éclair de leucines de type basique (bZip) (LI *et al.*, 2008). Constitutivement exprimé, Yap5 n'est actif qu'en surplus de fer via un mécanisme encore mal défini impliquant la formation de ponts disulfures intramoléculaires (LI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011). Aft1/2 n'étant pas actifs en condition de surplus de fer, l'expression des gènes codant pour les protéines d'export vacuolaire (Fre6, Fet5, Fth1 et Smf3) est inhibée. L'absence de ces protéines permet au fer de s'accumuler dans les vacuoles et d'y rester en s'associant à des chaînes de polyphosphates (PHILPOTT et PROTCHENKO, 2008).

4. Homéostasie du fer chez *S. pombe*

4.1 Acquisition du fer

4.1.1 Système de haute affinité réductase-dépendant

S. pombe peut acquérir le fer qui se trouve dans le milieu par au moins deux mécanismes différents. Un premier système d'importation du fer à haute affinité utilise une réductase de surface nommé Frp1. Celle-ci réduit le Fe^{3+} environnant en Fe^{2+} (ROMAN *et al.*, 1993). Sous forme réduite (Fe^{2+}), le fer est un substrat utilisable par le complexe membranaire Fip1/Fio1. La multicuivre oxydase Fio1 oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} qui est ensuite transporté via la perméase Fip1 (figure 4). Un fait intéressant est que les gènes *fip1⁺* et *fio1⁺* sont situés l'un à côté de l'autre sur le chromosome de la levure. En fait, les deux gènes sont transcrits de façon divergente l'un par rapport à l'autre en utilisant un promoteur commun (ASKWITH et KAPLAN, 1997). Cet arrangement chromosomique particulier pourrait contribuer à favoriser une expression simultanée de ces deux gènes. Ce système d'acquisition du fer est aussi retrouvé chez *S. cerevisiae*, qui possède des homologues de Frp1, Fio1 et Fip1, qui sont respectivement Fre1/2, Fet3 et Ftr1 (voir section 3.1.1).

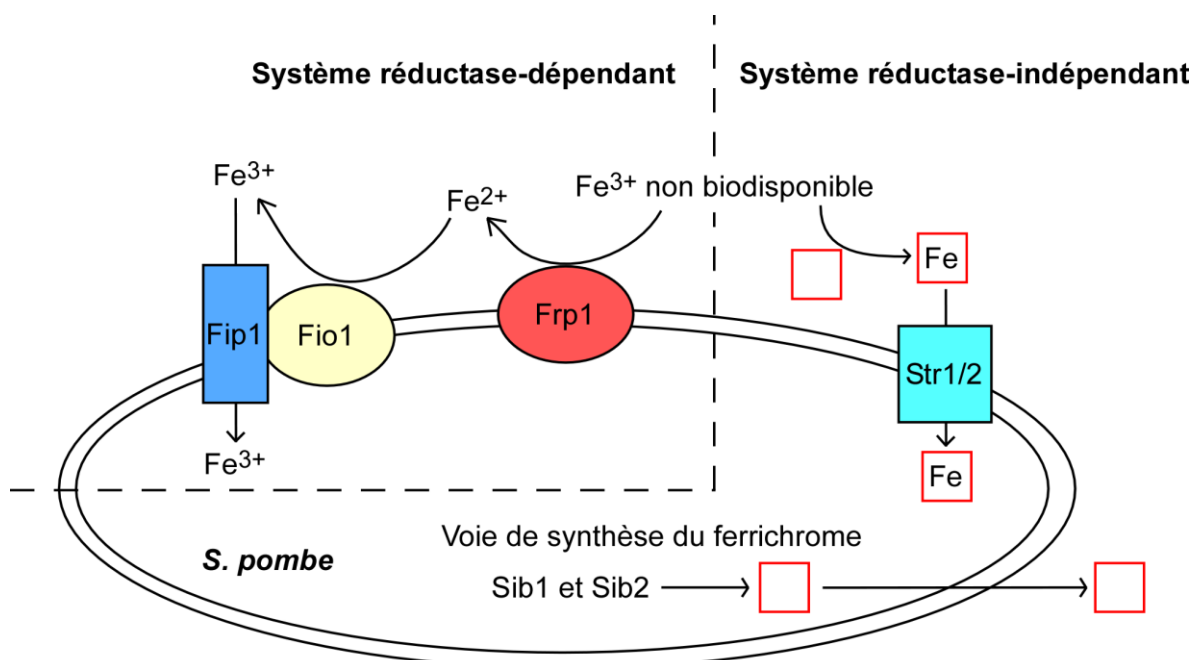


Figure 4 : Acquisition du fer chez *S. pombe* : systèmes de haute affinité réductase-dépendant et réductase-indépendant.

Le fer Fe^{3+} non-biodisponible peut être acquis par deux systèmes distincts : réductase-dépendant (gauche) et réductase-indépendant (droite). Pour le système réductase-dépendant, le fer est premièrement réduit par la ferriréductase de surface Frp1. Le Fe^{2+} soluble obtenu est ensuite oxydé par la multi-cuivre oxydase Fio1 en Fe^{3+} biodisponible, qui est ensuite transporté par la perméase Fip1 à l'intérieur de la cellule. Le système d'acquisition du fer réductase-indépendant implique l'utilisation du sidérophore ferrichrome. Le ferrichrome (carré rouge) est synthétisé par *S. pombe* avec implication de Sib1 et Sib2, puis exporté hors de la cellule. Ce sidérophore séquestre le fer extracellulaire et est ensuite internalisé dans la cellule via les transporteurs membranaires Str1 et Str2.

4.1.2 Système de haute affinité réductase-indépendant

Un deuxième mécanisme d'acquisition du fer est le système réductase-indépendant. Il implique le transport du fer couplé à des sidérophores. *S. pombe* produit le ferrichrome, un sidérophore de type hydroxamate (SCHRETTL *et al.*, 2004). La biosynthèse du ferrichrome se fait à partir d'un précurseur ornithine via les activités successives de trois protéines : l'ornithine monooxygénase Sib2, une acetyltransférase non caractérisée (prédite pour être codée par le gène *SPBC17G9.06c*) et la ferrichrome synthétase Sib1 (MERCIER et LABBE, 2010; PLATTNER et DIEKMANN, 1994). Tout comme fip^+ et $fio1^+$, les gènes $sib1^+$ et $sib2^+$ sont

adjacents sur le chromosome et sont transcrits en direction opposée, partageant également le même promoteur (WOOD *et al.*, 2002). Lorsque le ferrichrome est excrété dans le milieu extracellulaire, il peut chélater le Fe^{3+} . Le ferrichrome complexé au Fe^{3+} , est ensuite assimilé par *S. pombe* via les transporteurs transmembranaires Str1 et Str2 (figure 4). Str2 peut aussi transporter des sidérophores excrétés par d'autres organismes comme la ferrioxamine B produit par des microorganismes appartenant au genre streptomyces (PELLETIER *et al.*, 2003). Un troisième transporteur, Str3, a été identifié par homologie de séquence avec Str1 et Str2, mais aucun substrat ne lui a été attribué. Str1, Str2 et Str3 sont des homologues des transporteur de sidérophores de *S. cerevisiae* Arn1/2/3/4 (PELLETIER *et al.*, 2003). Le ferrichrome, pourrait aussi contribuer à chélater le surplus de fer intracellulaire, et ainsi protéger la cellule contre le stress oxydatif causé par des réactions de type Fenton. Le ferrichrome intracellulaire pourrait également servir de molécule d'entreposage du fer (SCHRETTL *et al.*, 2004).

4.1.3 Entreposage du fer par la vacuole

Basée sur des homologies de séquences et des essais phénotypiques, la protéine Pcl1 est prédite pour être un transporteur permettant l'importation du fer dans la vacuole . En fait, elle est homologue au transporteur Ccc1 chez *S. cerevisiae* qui assure cette fonction (LI *et al.*, 2001). En absence de Pcl1, *S. pombe* contient moins de fer et est plus sensible à un excès de fer exogène qu'une souche sauvage (POULIOT *et al.*, 2010). Ceci suggère fortement que Pcl1 permet l'entreposage du surplus de fer cytoplasmique dans la vacuole afin de protéger la cellule contre sa toxicité. Lorsque la concentration de fer cytoplasmique baisse, le fer vacuolaire peut être réacheminé au cytoplasme par transport actif ATP-dépendant via Abc3. Cette protéine appartient à la superfamille de transporteur ABC (*ATP binding cassette transporter*) (POULIOT *et al.*, 2010).

4.2 Régulation de l'homéostasie du fer

4.2.1 Régulation de l'acquisition du fer

Le contrôle du niveau intracellulaire en fer chez *S. pombe* se fait via une régulation transcriptionnelle des gènes responsables de l'acquisition du fer et de son entreposage. C'est le facteur de transcription Fep1 qui en est responsable. Fep1 réprime la transcription des gènes codant pour les transporteurs de fer lorsque les cellules sont incubées en présence d'un excès de fer (LABBE *et al.*, 2007;POULIOT *et al.*, 2010). Parmi les gènes régulés par Fep1, on note les gènes codant pour le système d'acquisition du fer réductase-dépendant (Frp1, Fio1 et Fip1), pour la biosynthèse et le transport des sidérophores (Sib1/2 et Str1/3) et pour Abc3 (PELLETIER *et al.*, 2002;PELLETIER *et al.*, 2003;POULIOT *et al.*, 2010).

Fep1 peut lier l'ADN via un domaine de liaison à l'ADN qui se trouve dans la portion N-terminal de la protéine. Ce domaine comprend deux doigts de zinc (ZF1 et ZF2) bordant une région riche en cystéines (figure 5) (PELLETIER *et al.*, 2005). Fep1 possède une localisation exclusivement nucléaire. Le domaine de liaison à l'ADN de Fep1 comprend une séquence de localisation nucléaire potentielle (NLS) qui est constituée des résidus basiques ²¹⁷KRRKR²²¹ (PELLETIER *et al.*, 2005). Fep1 lie l'ADN en réponse à un excès de fer. La séquence d'ADN reconnu par Fep1 est 5'-(A/T)GATAA-3', communément appelé boîte GATA. Cette séquence se retrouve en une ou plusieurs copies au niveau des promoteurs des gènes cibles de Fep1 (JBEL *et al.*, 2009;PELLETIER *et al.*, 2002;PELLETIER *et al.*, 2003). Fait intéressant, une protéine de fusion comprenant le domaine de liaison à l'ADN de Fep1 et un domaine d'activation de la transcription permet une transactivation fer-dépendante d'un gène rapporteur (JBEL *et al.*, 2009). Des protéines homologues de Fep1 sont retrouvées chez des levures filamenteuses telles *Candida albicans* (Sfu1), *Cryptococcus neoformans* (Cir1) et *Aspergillus nidulans* (SREA) (HAAS *et al.*, 1999;JUNG *et al.*, 2006;LAN *et al.*, 2004). Aucune protéine homologue de Fep1 n'existe chez *S. cerevisiae*.

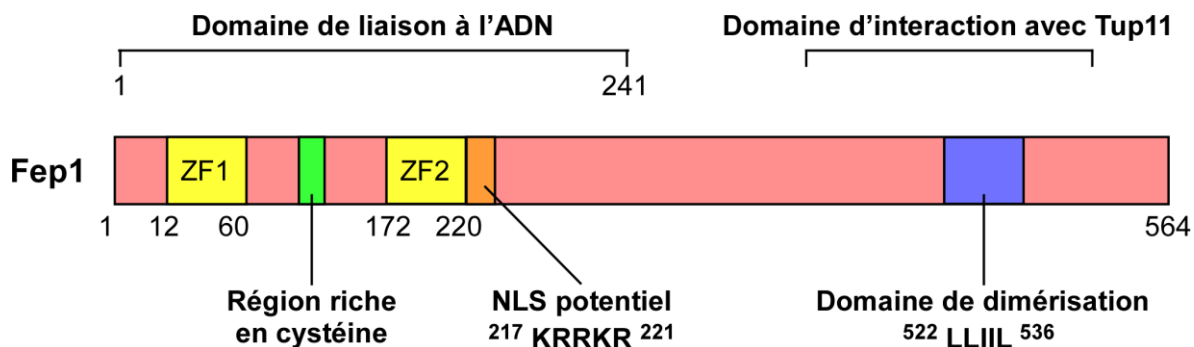


Figure 5 : Représentation des domaines fonctionnels de Fep1.

Le répresseur transcriptionnel Fep1 possède 564 acides aminés et comprend plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine de liaison à l'ADN de Fep1 est situé en N-terminal et est délimité par les acides aminés 1-241. Ce domaine comprend les doigts de zinc ZF1 et ZF2 qui bordent une région riche en cystéines. Ces cystéines sont localisées aux positions des acides aminés 70, 76, 85 et 88. Une séquence de localisation nucléaire potentielle (NLS) est aussi présente dans le domaine de liaison à l'ADN. Fep1 possède en C-terminal un domaine de liaison avec ses corépresseurs Tup11 et Tup12 et un domaine de dimérisation formé d'une fermeture éclair de leucine.

L'activité de répression de la transcription de Fep1 est en partie contrôlée par sa capacité à s'homodimériser et à se lier aux corépresseurs Tup11 et Tup12 (PELLETIER *et al.*, 2002; ZNAIDI *et al.*, 2004). En fait, l'activité de Fep1 est fortement réduite lorsque le motif de dimérisation (sous forme d'une fermeture éclair de leucine ⁵²²LLIIL⁵³⁶) est muté (PELLETIER *et al.*, 2005). Aussi, l'absence des corépresseurs de la transcription Tup11 et Tup12 abolit l'activité répressive de Fep1 (PELLETIER *et al.*, 2002).

Fep1 a la capacité de moduler son activité en fonction de la concentration en fer. Ceci pourrait dépendre de sa capacité à se lier directement au fer. Sa portion N-terminale contient une région riche en cystéines qui est importante pour sa liaison à l'ADN (JBEL *et al.*, 2009; PELLETIER *et al.*, 2005). Ces cystéines pourraient être impliquées dans la liaison d'ions de fer. En fait, il a été rapporté que d'autres membres de la famille des facteurs de type GATA ont la capacité de lier le fer *in vitro* (CHAO *et al.*, 2008). Par contre, la mécanistique de cette liaison n'a toujours pas été élucidée.

Un mécanisme hypothétique de la répression de la transcription via Fep1 impliquerait le recrutement de Ssn6, qui peut former un hétérocomplexe avec Tup11/12

(FAGERSTROM-BILLAI et WRIGHT, 2005;FAGERSTROM-BILLAI *et al.*, 2007). Ssn6 est responsable du recrutement d'histones déacétylases qui causerait la compaction de la chromatine menant à la répression de la transcription (WATSON *et al.*, 2000;WU *et al.*, 2001).

Il est critique pour la levure de pouvoir éliminer l'action de Fep1 lorsque le fer vient à manquer, ce qui permet un retour de l'expression des gènes responsables de l'acquisition du fer. Ceci est réalisé via deux mécanismes distincts (figure 6 section du haut). Premièrement, le gène *fep1*⁺ est réprimé au niveau transcriptionnel via le facteur de transcription Php4 (voir section 4.2.2). Deuxièmement, la protéine Fep1 est physiquement inactivée via la monothiol glutarédoxine Grx4 lorsque la concentration en fer est basse. En absence de Grx4, Fep1 continue à lier l'ADN en condition de carence en fer (voir la section 5 pour une description détaillée des glutarédoxines et de Grx4) (JBEL *et al.*, 2011).

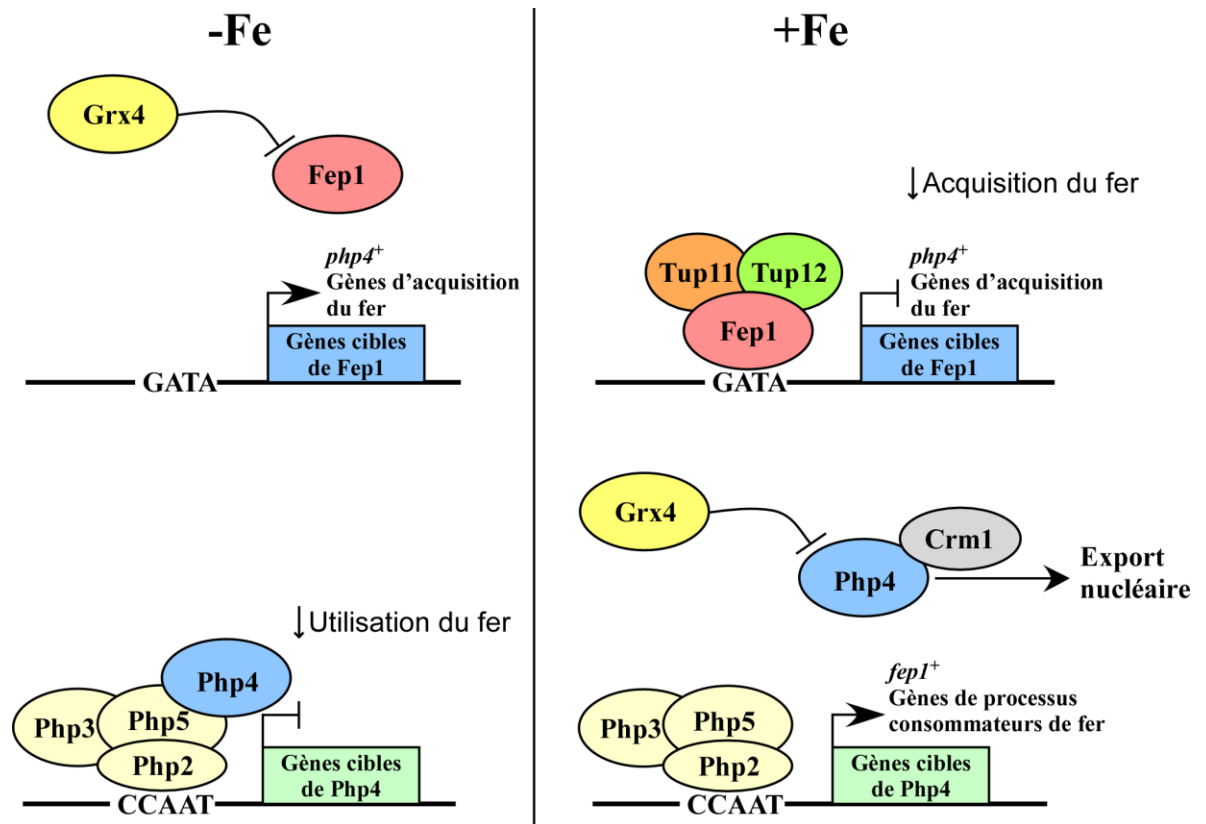


Figure 6 : Schéma résumant la régulation du fer chez *S. pombe* via Php4 et Fep1.

Chez *S. pombe*, l'acquisition et l'utilisation du fer sont régulées respectivement par les facteurs de transcription Fep1 et Php4. En condition de carence en fer (-Fe), le gène *php4⁺* est exprimé. Le répresseur transcriptionnel Fep1, qui a *php4⁺* comme gène cible, est inactivé via l'action de la monothiol glutarédoxine Grx4. Php4 vient s'associer au complexe CCAAT, qui est formé par les protéines Php2, Php3 et Php5. Les gènes réprimés par Php4 comprennent *fep1⁺* et des gènes participant à des processus cellulaires utilisateurs de fer. Il en résulte une économie du fer. En condition d'abondance en fer (+Fe), le gène *fep1⁺* est exprimé. Fep1 s'associe avec ses co-répresseurs Tup11 et Tup12 et lie l'ADN des promoteurs de ses gènes cibles au niveau de boîtes GATA. Les gènes réprimés par Fep1 comprennent *php4⁺* et les gènes d'acquisition du fer. Il y a donc une baisse de l'acquisition du fer par la cellule et une protection contre la toxicité du fer. Aussi, en présence de fer, Php4 est inactivé par Grx4 et l'exportine Crm1, puis est exporté hors du noyau.

4.2.2 Régulation de l'utilisation du fer

Chez la levure à fission, il existe un second niveau de régulation de l'homéostasie du fer qui est la gestion de son utilisation en fonction de son abondance. Comme expliqué à la section 1.1, de nombreuses protéines essentielles à la prolifération cellulaire nécessitent

du fer comme cofacteur. Les gènes qui codent pour ces protéines sont donc exprimés lorsque le fer est présent. Par contre, lorsque la concentration en fer est déficiente, l'expression de ces gènes est diminuée fortement. Ceci permet à la levure d'économiser en ne synthétisant pas des protéines qui seraient non fonctionnelles en carence de fer (cofacteur non disponible) et ainsi, préserver le peu de fer restant pour les processus cellulaires essentiels à la survie. Ce niveau de contrôle de l'expression génique chez *S. pombe* est possible grâce à la présence du facteur de transcription Php4 qui réprime ses gènes cibles en carence de fer (MERCIER *et al.*, 2006). La majorité de ces gènes codent pour des protéines utilisant le fer ou participent à des processus cellulaires qui en utilise. Selon des résultats de micropuces à ADN, 86 gènes sont exprimés à la baisse en carence en fer et ce, de façon Php4-dépendante (MERCIER *et al.*, 2008). Ces gènes constituent le régulon de Php4. Ces gènes participent à des processus cellulaires très variés et codent surtout pour des protéines qui contiennent du fer sous forme de centre fer-soufre comme la succinate déshydrogénase Sdh4 (cycle de Krebs) et la β -isopropylmalate déshydrogénase (Leu2; synthèse de la leucine). D'autres protéines contiennent un groupement hème comme la catalase Ctt1 (protection contre le stress oxydatif) et la cytochrome c (Cyc1; chaîne de transport des électrons). D'autres cibles de Php4 sont Isa1 (assemblage de centre fer-soufre), Hem3 (synthèse de l'hème) et Pcl1 (transporteur vacuolaire de fer permettant son entreposage en conditions de surplus en fer) (MERCIER *et al.*, 2006;MERCIER *et al.*, 2008).

Les gènes cibles de Php4 contiennent tous dans leur promoteur des éléments CCAAT, soit en un ou plusieurs exemplaires (MERCIER *et al.*, 2006). Cette séquence est reconnue par l'hétérocomplexe formé des protéines Php2/3/5 (MCNABB *et al.*, 1997). L'hétérocomplexe se nomme le facteur CCAAT et Php4 en est la sous-unité régulatrice fer-dépendante (MCNABB *et al.*, 1997;MERCIER *et al.*, 2006). Les facteurs de transcription CCAAT sont une famille de protéines conservées entre les différentes espèces. Par exemple, Php2/3/5 sont homologues à Hap2/3/5 chez *S. cerevisiae*, qui reconnaissent aussi la même séquence d'ADN (SYBIRNA *et al.*, 2005). Il est intéressant de mentionner que la protéine Hap4 de *S. cerevisiae*, qui est la sous unité régulatrice du facteur CCAAT chez cette espèce, montre que très peu d'homologie avec Php4 (~8.5%) et ne possède pas de fonction comparable. Toutefois, une séquence de 16 acides aminés est conservée entre les deux protéines. Cette séquence correspond au domaine d'interaction avec la protéine Hap5 ou

Php5 qui fait partie du complexe liant la boîte CCAAT (MCNABB et PINTO, 2005 ;MERCIER *et al.*, 2006). Hap4 est un activateur transcriptionnel chez la levure à bourgeon. Les gènes cibles codent pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative lorsque les cellules poussent en présence d'une source de carbone non fermentable (FORSBURG et GUARENTE, 1989). Php4 possède des orthologues chez d'autres espèces fongiques comme HapX chez *Aspergillus fumigatus* et Hap43 chez *Candida albicans* (HORTSCHANSKY *et al.*, 2007;LAN *et al.*, 2004). Il n'y a pas d'orthologue fonctionnel à Php4 chez *S. cerevisiae* étant donné que Hap4 exerce une fonction biologique différente de celle de Php4 et ce, même si elle s'associe avec des protéines similaires à celles avec qui Php4 s'associe. Comme décrit à la section 3.2.2, *S. cerevisiae* possède pour sa part le système de dégradation de l'ARN impliquant les protéines Cth1/2 pour réguler l'utilisation du fer.

Les protéines du complexe Php2/3/5 possède une expression constitutive et se retrouvent en permanence en interaction protéique les unes avec les autres, mais la présence de Php4 dans le complexe est variable selon le statut en fer (figure 6) (MCNABB *et al.*, 1997;MERCIER *et al.*, 2006). En conditions de carence en fer, Php4 s'associe au complexe Php2/3/5, alors que la présence de fer force sa dissociation du complexe. Le complexe Php2/3/5 peut se lier l'ADN et est toujours présent aux promoteurs du régulon de Php4, spécifiquement au niveau des éléments CCAAT et ce, indépendamment du statut en fer. En présence de fer, Php4 est absent du complexe et ses gènes cibles ne sont pas réprimés. Php2/3/5 possède un rôle au niveau de l'activation de la transcription des gènes. Il a été démontré que la présence de Php2 est nécessaire pour l'expression de *pcl1*⁺, *isa1*⁺ et *sdh4*⁺ en condition basale (MERCIER *et al.*, 2006). Lorsque la levure est carencée en fer, Php4 s'associe au complexe Php2/3/5 et réprime l'expression des gènes cibles, limitant ainsi l'utilisation du fer. Php4 ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN, mais régule l'expression génique via son interaction protéique avec Php2/3/5 (MERCIER *et al.*, 2006).

L'expression de Php4 est réprimée en présence de fer via l'activité du répresseur Fep1 (voir section 4.2.1). Parallèlement, Fep1 fait partie des gènes cibles de Php4 et voit son expression réprimée en carence en fer (figure 6) (MERCIER *et al.*, 2008). Ce contrôle transcriptionnel mutuel entre Php4 et Fep1 permettrait un ajustement fin entre l'acquisition

du fer et de son utilisation pour attendre un équilibre et éviter ainsi une condition de carence ou d'excès de ce nutriment essentiel.

Toutefois, des résultats publiés peu de temps avant le début de mes travaux de recherche ont montrés que la fonction de Php4 continue d'être inactivée en présence de fer et ce, même dans une souche *fep1* nulle (MERCIER et LABBE, 2009). Bien que les niveaux d'ARNm de *php4*⁺ soient alors constants, que ce soit en condition de carence ou de suffisance en fer, il a été observé que Php4 quitte le noyau en réponse à un arrivage de fer exogène. L'existence d'un autre mécanisme de régulation de Php4 en présence de fer devait donc exister et impliquerait une dimension post-transcriptionnelle. Une partie d'explication est venue de la découverte qu'en présence de fer, Php4 est exportée hors du cytoplasme via l'exportine Crm1 avec la participation de la monothiol glutarédoxine Grx4 (figure 6). Grx4 et les monothiol glutarédoxines seront décrites à la section 5. Php4 contient une séquence d'exportation nucléaire (NES) qui est reconnue par l'exportine Crm1. Grx4 et Php4 interagissent de façon constitutive lorsque les deux protéines sont de pleine longueur. Il a aussi été découvert que Grx4 interagit plus fortement avec la région de Php4 délimitée par les acides aminés 152 à 254 (figure 7). Il a été découvert que la présence de Grx4 est requise pour inactiver Php4 en présence de fer. De plus, Php4 acquiert un gain de fonction s'il est exprimé de façon constitutive dans une souche nulle pour Grx4 (*grx4Δ*). Dans cette dernière condition, Php4 réprime l'expression de ses gènes cibles, peut importe le statut en fer (MERCIER et LABBE, 2009). Grx4 est donc une molécule essentielle pour la régulation de l'activité de Php4. Le mécanisme moléculaire par lequel ceci est possible était inconnu avant le début de mes travaux.

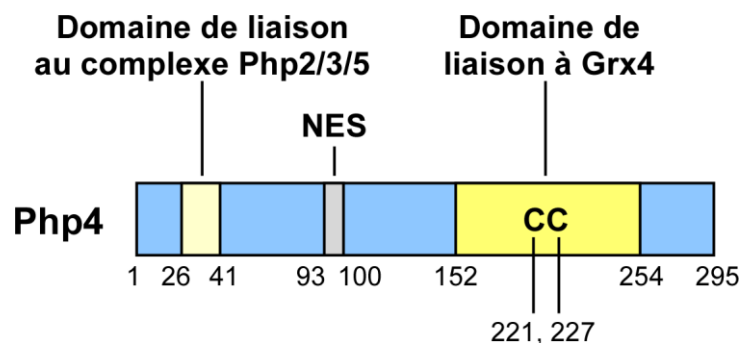


Figure 7 : Représentation des domaines fonctionnels de Php4.

Php4 est une protéine qui compte 295 acides aminés dont certains domaines fonctionnels ont été identifiés. Les chiffres représentés sur la figure correspondent aux positions en acides aminés. En N-terminal, Php4 possède un domaine de liaison à la sous-unité Php5 du complexe formé de Php2, Php3 et Php5. On retrouve une séquence d'exportation nucléaire (NES) qui correspond à la région reconnue par l'exportine Crm1. Puis, en C-terminal, une région de forte interaction avec Grx4 est retrouvée. Deux cystéines sont contenues dans ce domaine aux positions 221 et 227.

5. Les monothiols glutarédoxines

5.1 La famille des glutarédoxines

Les glutarédoxines (Grxs) sont des protéines de faible masse moléculaire très conservées entre les organismes et qui participent à des réactions d'oxydoréduction sur les groupements thiols des cystéines avec implication du glutathion comme cofacteur (LILLIG *et al.*, 2008; MEYER *et al.*, 2009). Le glutathion est un tripeptide non ribosomal qui joue un rôle d'anti-oxydant et de tampon de groupements thiols (MEISTER, 1994). Les glutarédoxines possèdent un repliement de type thiorédoxine, qui est caractérisé par une alternance d'hélices alpha et de feuillets beta (MARTIN, 1995). Les thiorédoxines sont une autre famille de protéines présentant aussi cette structure et possédant une fonction similaire d'oxydoréduction sur les groupements thiols des cystéines (MARTIN, 1995; MEYER *et al.*, 2009). Il existe deux types de glutarédoxines : les monothiols glutarédoxines (mGrxs) et les dithiols glutarédoxines (diGrxs), selon si elles possèdent une ou deux cystéines dans leur site actif. La présence des cystéines est significative puisqu'elles possèdent un groupement thiol sur leur chaîne latérale qui est essentiel à la fonction des Grxs. Les séquences en acide aminés de ces sites actifs sont très conservées, les séquences consensus étant CP(Y/F)C

pour les diGrxs et CGFS pour les mGrxs (FERNANDES et HOLMGREN, 2004; LILLIG *et al.*, 2008; PICCIOCCHI *et al.*, 2007).

Les mGrxs sont une classe de glutarédoxines moins bien comprises quand à leur fonction comparativement aux diGrxs dites «glutarédoxines classiques». La fonction des diGrxs est de réduire les ponts disulfures sur les résidus cystéine en utilisant le glutathion comme cofacteur. Le mécanisme de cette réaction implique les deux cystéines du site actif. Le glutathion se retrouve oxydé lors de son utilisation et est par la suite régénéré par la glutathion réductase avec consommation de NADPH (LILLIG *et al.*, 2008).

Une autre fonction des diGrxs est la déglutathionylation. Cette réaction implique le retrait d'un groupement glutathion sur un résidu cystéine. Le mécanisme de cette réaction n'implique que la cystéine en N-terminal du site actif (FERNANDES et HOLMGREN, 2004). L'origine de la présence de ce groupement est la glutathionylation, une modification post-traductionnelle des protéines. Elle consiste en l'ajout de glutathion sur les résidus cystéine via le groupement thiol et permet de protéger ce groupement très réactif de réactions chimiques indésirables comme l'oxydation (BERNDT *et al.*, 2008; HERRERO et DE LA TORRE-RUIZ, 2007). La déglutathionylation via les diGrxs permet donc de contrôler la réactivité des cystéines qui sont des résidus importants des protéines, souvent présents au site actif.

5.2 La classe des monothiols glutarédoxines

La fonction des monothiols glutarédoxines est méconnue. Les mGrxs peuvent lier le glutathion, mais ne possèdent aucune ou très peu d'activité réductrice sur les ponts disulfures qui est attribuée aux diGrxs et ne permettent pas la déglutathionylation (HERRERO et DE LA TORRE-RUIZ, 2007). En fait, aucune activité enzymatique intrinsèque n'est attribuée aux mGrxs. Des études chez *S. cerevisiae* et *E. coli* ont apporté une percée dans la compréhension du rôle des mGrxs. Le rôle qui leur est reconnu est de coordonner des centres fer-soufre de type [2Fe-2S] avec l'aide du glutathion et d'être des chaperonnes de centres fer-soufre (IWEMA *et al.*, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009; ROUHIER *et al.*, 2010).

Les mGrxs ont comme caractéristique de ne posséder qu'un résidu cystéine au site actif au lieu de deux comme dans le cas des diGrxs. Les mGrxs sont constituées d'un ou plusieurs domaines protéiques conservés et présentent des régions non-conservées *linker* entre les domaines. Les mGrxs présentent au minimum un domaine glutarédoxine (GRX), situé en C-terminal, qui contient le site actif CGFS. Ce domaine est nommé ainsi pour sa ressemblance avec les dithiol glutarédoxines. La mGrx Grx4 de *E. coli* n'est formée que de ce seul domaine. La présence chez les mGrxs d'un deuxième domaine GRX est aussi possible comme dans le cas de PICOT (Glr3) qui est la mGrx chez l'humain (figure 8) (HERRERO et DE LA TORRE-RUIZ, 2007).

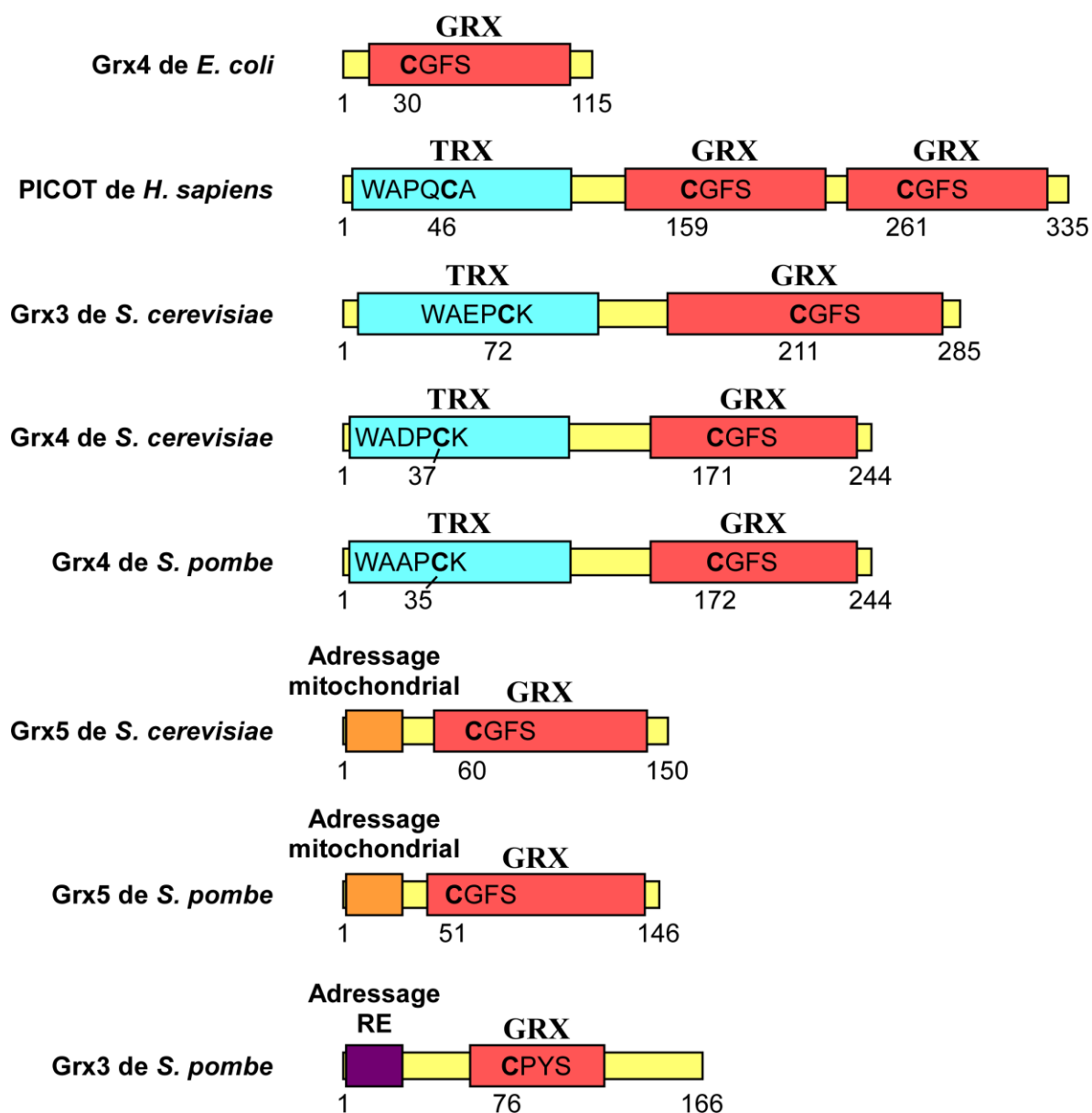


Figure 8 : Arrangement des domaines fonctionnels de différentes monothiol glutarédoxines.

Il est présenté dans cette figure les différentes monothiol glutarédoxines traitées dans le texte et l'arrangement de leurs domaines fonctionnels. Les motifs conservés de chaque domaine sont indiqués. Les chiffres indiquent la position en acides aminés de début et de fin des protéines ainsi que des cystéines centrales des domaines thiorédoxine (TRX, en bleu) et glutarédoxine (GRX, en rouge). Les domaines d'adressage à la mitochondrie sont présentés en orange. Grx3 de *S. pombe* possède un domaine transmembranaire permettant l'adressage au réticulum endoplasmique (RE) qui est présenté en violet.

Un autre domaine présent chez les mGrxs est le domaine semblable au thiorédoxine (*thioredoxin-like*, TRX). Le domaine est apparenté aux molécules de la famille des thiorédoxines et possède une séquence conservée WAXPCK qui est semblable au site actif des thiorédoxines WCGPCK (HERRERO et DE LA TORRE-RUIZ, 2007;VILELLA *et al.*, 2004). Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae* et Grx4 de *S. pombe* sont des mGrxs homologues qui possèdent un domaine TRX en N-terminal et un domaine GRX en C-terminal (figure 8). Ces mGrxs multidomaines ont la propriété de présenter une localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire (CHUNG *et al.*, 2005;HERRERO et DE LA TORRE-RUIZ, 2007;MERCIER et LABBE, 2009). Leur rôle n'est pas clair, mais il est suggéré qu'elles servent de chaperonnes de fer et dans la capacité à communiquer la présence de fer à divers facteurs de transcription (MUHLENHOFF *et al.*, 2010;ROUHIER *et al.*, 2010). En fait, il a été démontré que Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae* ont la fonction de co-régulateurs des facteurs de transcription Aft1 et Aft2 (voir section 3.2.1). Il a aussi été démontré que les mGrxs Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae* peuvent former des homodimères et coordonner un centre fer-soufre [2Fe-2S]. Ce dernier est coordonné via 4 liens thiols dont un est fourni par la cystéine du site actif CGFS de chacune des deux mGrxs et les deux liens restant proviennent de deux molécules de glutathion (figure 9) (LI *et al.*, 2009).

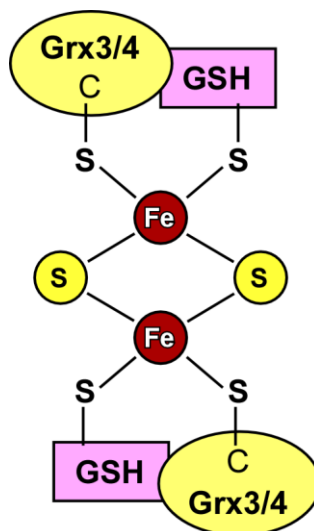


Figure 9 : Coordination d'un centre fer-soufre par Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae*.

Les monothiol glutarédoxines Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae* ont la propriété de s'homodimériser et de coordonner un centre fer-soufre de type [2Fe-2S]. Le centre fer-soufre est coordonné via 4 liens thiols. La cystéine (C) au site actif du domaine GRX de chacune des glutarédoxines du dimère fournit deux des liens thiols. Ces cystéines sont aux positions en acides aminés 211 pour Grx3 et 171 pour Grx4 et font partis du motif conservé CGFS. Les deux liens restant sont fournis par deux molécules du cofacteur glutathion (GSH). Grx3 et Grx4 ont la propriété de lier le glutathion.

Un troisième domaine qui est retrouvé dans les mGrxs est une séquence d'adressage aux mitochondries. Par exemple, *S. cerevisiae* et *S. pombe* possèdent tous les deux une protéine nommée Grx5 qui est similaire chez ces deux organismes et contient cette séquence d'adressage en N-terminal. Grx5 est localisé à la mitochondrie et participe à l'assemblage de centres fer-soufre en jouant un rôle de chaperonne de centre fer-soufre assurant le transfert du cofacteur vers les apo-protéines (ALVES *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010).

Grx3 est une autre mGrx présente chez *S. pombe*. Elle est localisée au contour du noyau et au réticulum endoplasmique. Elle possède un domaine GRX standard dont le site actif est CPYS et un domaine transmembranaire putatif en N-terminal. Son rôle dans le système sécrétoire est inconnu (CHUNG *et al.*, 2005). Elle est homologue à Grx6/7 chez *S. cerevisiae* (figure 8) (IZQUIERDO *et al.*, 2008).

5.3 La monothiol glutarédoxine Grx4

Grx4 est une monothiol glutarédoxine chez *S. pombe*. Elle possède une localisation autant cytoplasmique que nucléaire. Elle est homologue à Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae*, qui jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer chez cet organisme (voir section 3.2.1) (CHUNG *et al.*, 2005;MERCIER et LABBE, 2009). Grx4 possède deux domaines fonctionnels distincts : le domaine de type thiorédoxine (TRX, acides aminés 1 à 105) en N-terminal et le domaine glutarédoxine en C-terminal (GRX, acides aminés 161 à 229) (CHUNG *et al.*, 2005). Chaque domaine contient une cystéine. La cystéine 172 (¹⁷²CGFS¹⁷⁵) pour le domaine GRX est située dans la séquence qui est généralement identifiée comme le site actif des dithiol glutarédoxines. La cystéine 35 du domaine TRX est située dans la région ³¹WAAPCK³⁶ qui est homologue au site actif des thiorédoxines (WCGPCK) (figure 8) (CHUNG *et al.*, 2005). La structure de Grx4 n'est pas disponible à ce jour. Bien qu'il existe des données cristallographiques de la mGrx homologue Grx4 chez *E. coli*, elle ne possède pas de domaine TRX, donc la localisation de ce domaine dans la structure de Grx4 de *S. pombe* est inconnue (FLADVAD *et al.*, 2005).

Des expériences double-hybride ont permis de constater une interaction protéique de Grx4 avec autant Php4 que Fep1 et ce, indépendamment du niveau cellulaire en fer. La co-localisation entre Grx4 et Php4 et entre Grx4 et Fep1 a aussi été déterminée *in vivo* par microscopie à fluorescence. De plus, Grx4 inhibe la fonction de Php4 en condition de surplus de fer et celle de Fep1 en carence en fer. Sans la présence de Grx4, Php4 et Fep1 deviennent constitutivement actifs *in vivo* (voir section 4.21 et 4.2.2) (JBEL *et al.*, 2011;MERCIER et LABBE, 2009). Ces informations permettent de poser l'hypothèse que Grx4 pourrait jouer un rôle dans la détection du statut cellulaire en fer et la transduction d'un signal qui conduirait à l'inactivation de Php4 et Fep1. Fait intéressant, un délétant de *S. pombe* pour *grx4*⁺ n'est viable qu'en condition micro-aérophile, possiblement dû à une sensibilité au stress oxydatif résultante d'une répression constitutive de gènes cible de Php4 comme la catalase *ctt1*⁺ (MERCIER *et al.*, 2008;MERCIER et LABBE, 2009).

Des résultats récents de notre laboratoire ont permis d'approfondir le rôle de chacun des domaines de Grx4 dans l'inactivation de Fep1. Il a été découvert que le domaine TRX de Grx4 interagit fortement avec la région C-terminal de Fep1 indépendamment du statut

en fer, alors que le domaine GRX interagit avec la région N-terminal de Fep1 de façon fer-dépendante. La région N-terminal de Fep1 comprend justement son domaine de liaison à l'ADN (voir section 4.2.1) (JBEL *et al.*, 2011). Alors, l'association du domaine GRX de Grx4 sur Fep1 pourrait être responsable d'un encombrement de son domaine de liaison à l'ADN ou d'un repliement protéique, inactivant la capacité de Fep1 à se lier à la chromatine et donc de réprimer ces gènes cibles. Le rôle du domaine TRX dans l'interaction avec Fep1 serait d'assurer une liaison constitutive forte entre Grx4 et Fep1, permettant une inactivation rapide de Fep1 par le domaine GRX advenant une carence en fer. C'est pourquoi il est appelé domaine d'arrimage. L'interaction entre Php4 et les domaines de Grx4 a été le sujet principal de mes travaux de recherche et n'était pas caractérisée avant le début de ceux-ci.

6. Hypothèse de recherche

Chez *S. pombe*, Php4 est une sous-unité du complexe liant les boîtes CCAAT qui est responsable de la répression des gènes codants des protéines qui utilisent du fer lorsque ce dernier est en faible concentration. Avant le début de mes travaux de recherche, l'étude de Php4 dans notre laboratoire avait conduit à l'obtention de résultats sur la régulation de son activité (MERCIER *et al.*, 2006;MERCIER *et al.*, 2008;MERCIER et LABBE, 2009). Il existe un mécanisme post-traductionnel d'inactivation de Php4 en présence de fer, qui est indépendant de son inhibition de transcriptionnelle par Fep1. Ce mécanisme implique la glutarédoxine Grx4 qui est nécessaire à l'inactivation de Php4. De plus, par des expériences de double-hybride, une interaction directe entre Php4 et Grx4 à été découverte et cette dernière est indépendante du statut cellulaire en fer. Le mécanisme moléculaire d'inactivation de Php4 via Grx4 doit donc contenir un élément permettant à Grx4 de détecter un surplus de fer et de moduler son influence sur l'activité de Php4 et ce, dans le but de causer l'inactivation de Php4.

7. Objectif de recherche

L'objectif général de mes travaux de recherche porte sur l'étude des mécanismes de contrôle de l'économie du fer chez la levure à fission *S. pombe*. Plus précisément, l'objectif est de comprendre par quel mécanisme Grx4 inhibe Php4 en réponse à la présence de fer.

RÉSULTATS

Article : The Monothiol Glutaredoxin Grx4 Exerts an Iron-Dependent Inhibitory Effect on Php4 Function

Par : Philippe Vachon, Alexandre Mercier, Mehdi Jbel, et Simon Labbé

publié dans *Eukaryotic Cell*, juin 2012, Volume 11, numéro 6, pages 806–819

Contributions :

J'ai effectué 90% des expériences qui ont conduit à la production des résultats présentés dans cet article. J'ai été entièrement responsable de la conception des figures et j'ai contribué à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

Lorsque la concentration en fer est faible, la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* réprime la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines utilisatrices de fer. Php4 dirige ce contrôle transcriptionnel en interagissant spécifiquement avec le complexe de liaison aux éléments CCAAT, qui est constitué de Php2, Php3 et Php5. En contrepartie, lorsque le fer est en quantité suffisante, Php4 est inactivé, ce qui permet la transcription de plusieurs gènes qui codent pour des protéines fer-dépendantes. Des analyses de fluorescence par complémentation bimoléculaire et de double-hybride montrent que Php4 et la monothiol glutaredoxin Grx4 interagissent physiquement l'un avec l'autre. Une analyse de carte de délétions révèle que le domaine GRX de Grx4 s'associe avec Php4 de façon fer-dépendante. Par mutagenèse dirigée, la cystéine 172 de Grx4 a été identifiée comme étant requise pour cette association fer-dépendante. Des analyses subséquentes ont montré que, même si le domaine TRX de Grx4 interagit fortement avec Php4, cette

interaction est insensible selon la présence ou non de fer. Des analyses de cartographie révèlent que la cystéine 35 de Grx4 est nécessaire pour l'association entre le domaine TRX et Php4. Ensemble, ces résultats révèlent que, tandis que le domaine TRX interagit constitutivement avec Php4, l'association entre le domaine GRX et Php4 est modulée par le fer, et est requise pour l'inactivation de l'activité de Php4 en réponse à la présence de fer.

Monothiol glutaredoxin Grx4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Php4 function.

Philippe Vachon, Alexandre Mercier, Mehdi Jbel, and Simon Labbé*.

Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de

Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada.

* Corresponding author:

Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de

Sherbrooke,

3001, 12e Ave Nord, Sherbrooke (QC) J1H 5N4 Canada

Running title: Iron inhibition of Php4 function.

Keywords: Iron homeostasis, fission yeast, CCAAT-binding transcription factor, monothiol glutaredoxin.

Abstract

When iron is scarce, *Schizosaccharomyces pombe* cells repress transcription of several genes encoding iron-using proteins. Php4 mediates this transcriptional control by interacting specifically with the CCAAT-binding core complex, which is constituted of Php2, Php3 and Php5. In contrast, when iron is sufficient, Php4 is inactivated, thus allowing the transcription of many genes that encode iron-requiring proteins. Analysis by bimolecular fluorescence complementation and two-hybrid assays showed that Php4 and the monothiol glutaredoxin Grx4 physically interact with each other. Deletion mapping analysis revealed that the GRX domain of Grx4 associates with Php4 in an iron-dependent manner. Site-directed mutagenesis identified the Cys172 of Grx4 as being required for this iron-dependent association. Subsequent analysis showed that, although the TRX domain of Grx4 interacts strongly with Php4, this interaction is insensitive to iron. Fine mapping analysis revealed that the Cys35 of Grx4 is necessary for the association between the TRX domain and Php4. Taken together, the results revealed that, whereas the TRX domain interacts constitutively with Php4, the GRX domain-Php4 association is both modulated by iron and required for the inhibition of Php4 activity in response to iron depletion.

Introduction

Iron poses a particular dilemma to cells because of its dual properties as essential metal for cell viability but being also cytotoxic. As a redox-active metal, iron is an important cofactor for a variety of enzymes that are intimately linked to essential cellular functions such as DNA synthesis, oxidative phosphorylation and biosynthesis of metabolites (10, 36). Ironically, this same redox property allows iron to undergo Fenton-type chemical reactions that result in the production of hydroxyl radicals that can lead to cell death (8). Therefore, cells have developed homeostatic mechanisms to acquire adequate, but not excessive, iron concentrations.

In the model organism *Schizosaccharomyces pombe*, the GATA-type transcription factor Fep1 binds to chromatin and represses expression of a number of genes involved in iron acquisition when the intracellular iron levels are elevated. In contrast, when iron levels are low, Fep1 is unable to bind chromatin and that results in transcriptional activation of iron transport genes (17). Regulators with similar function and sequences to Fep1 have been identified in several fungi, but not in the *sensus stricto* group of *Saccharomyces cerevisiae* (7, 21, 24, 36). Except for the transcription factor Cir1 from *Cryptococcus neoformans* (20) in which a single Cys₂/Cys₂-type zinc finger motif is present, the Fep1-like regulators possess two of those zinc finger motifs (6). Furthermore, there is a conserved 27-residue segment that contains four invariant Cys residues located between the two zinc finger motifs (6). In the case of Fep1, its N-terminal 241-amino-acid region contains the two zinc finger motifs that are denoted ZF1 and ZF2 (34). ZF1 and ZF2 are not equivalent. Whereas ZF1 plays a role in increasing the affinity of the Fep1-DNA complex, ZF2 is essential for Fep1 DNA binding activity (35). When two or more of the invariant Cys residues of the conserved 27-residue segment of Fep1 (denoted Cys-rich domain) are mutated to alanine residues, the mutant recombinant peptide exhibits a much lower affinity to bind DNA, with failure to repress target gene expression (35). Further analysis using the ChIP methodology has consistently revealed that the

region encompassing the Cys-rich domain and ZF2 constitutes the minimal module required for the *in vivo* binding of Fep1 to chromatin (18).

Studies in *Histoplasma capsulatum* have revealed that the Sre1 protein (which is a Fep1 ortholog) directly associates with ferric iron *in vitro* (2, 15). Furthermore, it has been observed that during purification of recombinantly expressed SRE, Sre1 and Fep1 (DNA binding domains) by affinity chromatography, the recombinant peptides that contain the ZF1, Cys-rich and ZF2 motifs were reddish-brown in color, presumably due to the presence of protein-bound iron (2, 9, 24). Thus, based on these observations, a current working model for repression by Fep1-like transcriptional repressors posits that, when bound by iron, the Fep-like repressors associate with chromatin to down-regulate transcription. In *S. pombe*, recent studies have shown that the monothiol glutaredoxin Grx4 is a binding partner of Fep1 and that it plays a critical role in inhibiting Fep1 function when cells undergo a transition from iron-sufficient to iron-limiting conditions (17, 23). Although the mechanism by which Grx4 communicates the low levels of iron to Fep1 remains unclear, deletion mapping analysis revealed that the TRX domain of Grx4 interacts strongly and constitutively with the C-terminal region of Fep1 (17). Further analysis has shown that, under conditions of iron starvation, the GRX domain of Grx4 associates with Fep1 through its N terminus. A potential mechanism for Grx4-mediated inhibition of Fep1 function would be that the Fep1-GRX domain association induces an inhibitory conformational change that inactivates the Fep1 DNA binding domain, blocking its interaction with chromatin and therefore its repressive action on target gene expression.

Under conditions of iron deprivation, *S. pombe* cells produce the CCAAT-binding subunit Php4 (28). Php4 then assembles with a heteromeric DNA-binding complex that contains three other subunits, designated Php2, Php3 and Php5 (26). Together the Php2/Php3/Php4/Php5 heteromeric complex binds CCAAT *cis*-acting elements and represses expression of genes encoding several iron-dependent proteins, including the iron-responsive transcriptional repressor Fep1 (29). On the

other hand, when iron is abundant, Php4 fails to act as a repressor. *fep1*⁺ transcription is therefore derepressed. Fep1 is responsible for the transcriptional repression of the *php4*⁺ gene, creating a reciprocal regulatory mechanism by which Fep1 and Php4 mutually control each other's expression as a function of iron availability.

Additional studies have revealed the involvement of an additional regulatory mechanism by which Php4 is inactivated by iron (27). This mechanism does not operate at the transcriptional level, but instead, occurs at the post-translational level. In cells undergoing transition from low to high iron, it has been determined that Php4 is exported from the nucleus to the cytoplasm (27). The nuclear-to-cytosolic export of Php4 requires the exportin Crm1 and the monothiol glutaredoxin 4 (Grx4) (27). Consistently, *grx4*Δ mutant cells show markedly decreased transcription of genes encoding iron-dependent proteins as a result of constitutively active Php4 (27). The constant repression of Php4 target gene expression measured in the *grx4*Δ mutant cells has been intrinsically associated with a constitutive Php4 nuclear retention (27). Subsequently, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and two-hybrid assays have revealed that Grx4 is a binding partner of Php4 (27). BiFC experiments have shown that VN-Php4-Grx4-VC complexes display fluorescence signals in the nuclei of iron-deficient cells, whereas BiFC signals accumulate in the cytoplasm when cells were exposed to high levels of iron (27).

S. pombe Grx4 is a multi-domain monothiol glutaredoxin (4). The primary amino acid sequence of Grx4 contains two major regions that are denoted thioredoxin (TRX)-like and glutaredoxin (GRX)-like domains, respectively. The N-terminal TRX-like domain of Grx4 contains a WAAPC³⁵K sequence that is reminiscent of the thioredoxin active site motif WCGPCK (4, 11). Mutational analysis of the Cys35 residue located within the TRX domain of Grx4 revealed that is required for establishing a strong and iron-independent association with Fep1 (17). Consistently, a recent study in *S. cerevisiae* has suggested that the TRX domain may serve as a docking site for interacting partners of the multi-domain monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4 (12). In baker's yeast, other

functions for the TRX domain have been proposed, including a role for the targeting of the monothiol glutaredoxin Grx3 to the nucleus (31), as well as a regulatory role in actin cytoskeleton remodeling and in cellular defenses against oxidative stress (40). However, whether the TRX domain participation to the repolarization of the actin cytoskeleton involves protein-protein interactions has not yet been ascertained.

Based on biochemical studies with other multi-domain glutaredoxins orthologous to *S. pombe* Grx4, it has been shown that the C-terminal GRX-like domain contains a CGFS-active site motif (11, 41). In the case of *S. pombe* Grx4, this motif is found within residues 172 to 175 (¹⁷²CGFS¹⁷⁵). The CGFS-type monothiol glutaredoxins can form [2Fe-2S]-bridged homodimers (1, 16, 38). Indeed, the combination of two glutaredoxin molecules (containing one CGFS motif each) provides two Cys ligands to hold a 2Fe-2S cluster (1, 16, 38). Within the complex, the addition of two glutathione molecules provide the other two cluster ligands, resulting in a glutathione-ligated [2Fe-2S] center that is held within the monothiol glutaredoxin dimer (16, 42). Several studies have pointed out important roles for multi-domain monothiol glutaredoxins. These proteins participate in mitochondrial and cytosolic Fe-S protein biogenesis (41); they specifically deliver and transfer Fe-S clusters into proteins and subcellular compartments (32); and, they relay cellular iron status to several iron-responsive transcription factors (17, 21, 23, 27, 33, 39, 43).

Based on our previous findings that Grx4 is a binding partner of Php4 required for its inactivation under high levels of iron, we sought to determine the mechanism by which Grx4 and Php4 interact with each other as a function of iron availability. Deletion mapping analysis revealed that the TRX domain interacts constitutively with Php4, whereas the GRX domain associates in an iron-dependent manner with a domain corresponding to amino acids 188 to 254 of Php4. Further analyses by BiFC assays revealed that the GRX domain is required for iron-mediated inhibition of Php4 activity as well as its nuclear export behavior. Taken together, the results reported here reveal

that the presence of the GRX domain of Grx4 is critical to communicate the presence of excess iron to the Grx4-Php4 complex.

Materials and methods

Yeast strains and growth media. The *S. pombe* strains used in this study were all isogenic derivatives of FY435 (*h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210*) (27) and included *grx4Δ* (*h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 grx4Δ::KAN^r*) and *php4Δ grx4Δ* (*h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 php4Δ::loxP grx4Δ::KAN^r*). *S. pombe* cells were cultured in yeast extract plus supplements (YES) medium that contained 3% glucose and 225 mg/l of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Strains used for plasmid integration were grown in synthetic Edinburgh minimal medium (EMM) in which specific amino acids were lacking for plasmid selection and maintenance. *S. pombe* liquid cultures were seeded to an A_{600} of 0.5 and then grown to exponential phase. At log phase (A_{600} of ~0.9), cells were treated with either 2,2'-dipyridyl (Dip, 250 μM), FeCl₃ (100 μM) or were left untreated for 90 min, unless otherwise indicated. *grx4Δ* and *php4Δ grx4Δ* mutant strains and control strains were grown in culture jars under microaerobic conditions using the BD GazPack EZ system (BD Diagnostic System, Sparks, MD). In the case of two-hybrid experiments, *S. cerevisiae* strain L40 [*MAT α his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2:::(lexAop)₄-HIS3 URA3:::(lexAop)₈-lacZ*] (47) was grown in a synthetic minimal medium (pH 6.1) containing 83 mg/l of histidine, adenine, uracil, and lysine, 2% dextrose, 50mM MES [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.67% yeast nitrogen base lacking copper and iron (MP Biomedicals, Solon, OH).

Plasmids. Twelve previously described plasmids, VP16-¹Php4²⁹⁵, VP16-¹Php4²⁵⁴, VP16-¹Php4²¹⁸, VP16-⁵⁴Php4²⁵⁴, VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴, VP16-¹⁸⁸Php4²⁵⁴, VP16-²¹⁹Php4²⁵⁴, LexA-²Grx4²⁴⁴, LexA-²Grx4¹⁴² (domain TRX), LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ (domain GRX), LexA-Grx4(C35A) and LexA-Grx4(C172A) (17, 27), were used in this study. The prey plasmids pVP16-⁵⁴Php4²⁹⁵, pVP16-¹¹²Php4²⁹⁵, pVP16-¹⁵²Php4²⁹⁵, pVP16-¹⁸⁸Php4²⁹⁵, pVP16-²¹⁹Php4²⁹⁵ and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ (C221A; C227A) were

created by cloning different truncated versions of the *php4*⁺ gene that were generated by PCR using primers, which contained BamHI and NotI restriction sites. Subsequently, the purified DNA fragments were digested with these enzymes and cloned into the corresponding sites of pVP16 (47) as described previously (27).

The *S. pombe grx4*⁺ gene was obtained by PCR amplification using primers that contained Sall and Asp718 restriction sites using genomic DNA from strain FY435. The purified DNA fragment was digested and cloned into the pJK-194**promphp4*⁺-TAP plasmid at compatible Sall and Asp718 sites, creating pJK-194**promphp4*⁺-TAP-*grx4*⁺. The pJK-194**promphp4*⁺-*GFP-php4*⁺ plasmid has been described previously (27). The gene encoding *GFP* was PCR-amplified from the pSF-GP1 plasmid (22) and inserted into the BamHI and Sall restriction sites of pGEM-7Zf (Promega, Madison, WI). A Sall-Asp718 *grx4*⁺ gene fragment was generated by PCR and cloned into pGEM-7Zf in which the *GFP* gene had been previously introduced. The resulting pGEM-7Zf+*GFP-grx4*⁺ plasmid was subsequently digested with BamHI and XhoI and cloned into the corresponding sites of the pSP1-194**promphp4*⁺ plasmid previously described (27). The resulting construct was denoted as pSP1-194**promphp4*⁺-*GFP-grx4*⁺. To create the pSP1-194**promphp4*⁺-*GFP*-¹⁰⁵Grx²⁴⁴ plasmid, pSP1-194**promphp4*⁺-*GFP-grx4*⁺ was co-digested with Sall and ApaI. A copy of the C-terminal region of Grx4 (coding sequence corresponding to amino acid residues 105-244) was generated by PCR using primers that contained Sall and ApaI sites and then was exchanged with the Sall-ApaI DNA fragment in plasmid pSP1-194**promphp4*⁺-*GFP-grx4*⁺.

A DNA fragment encoding Grx4-VC was isolated from pGEM-*grx4*⁺-VC (27) using the BamHI and Asp718 restriction enzymes. The purified DNA fragment was inserted into the integrative vector pJK-1200*grx4*⁺ (17) in which the BamHI-Asp718 *grx4*⁺ gene fragment had been previously removed, leaving only the SacII-BamHI *grx4*⁺ promoter segment at the 5' terminal end of the polylinker region (pJK-1200*promgrx4*⁺). The resulting plasmid was denoted pJK-1200*promgrx4*⁺Grx4-VC. To generate pJK-1200*promgrx4*⁺VC-¹⁰⁵Grx²⁴⁴, a first BamHI-Sall DNA

restriction fragment containing the coding region of VC was produced by PCR amplification with pFA6a-VC-kanMX6 (45). A second Sall-Asp718 DNA restriction fragment containing the C-terminal region of Grx4 (amino acid residues 105-244) was obtained by PCR from the pSP1-194**promphp4⁺-GFP-¹⁰⁵Grx²⁴⁴* plasmid. The pJK-1200*promgrx4⁺VC-¹⁰⁵Grx²⁴⁴* was constructed by three-piece ligation by simultaneously introducing the BamHI-Sall PCR-amplified fragment containing VC and the Sall-Asp718 PCR-amplified fragment harboring ¹⁰⁵Grx²⁴⁴ into the BamHI-Asp718-digested pJK-1200*promgrx4⁺* vector.

RNA isolation and analysis. Total RNA was extracted using a hot phenol method as described previously (3) and was quantified spectrophotometrically. In the case of the RNase protection assays, 15 µg of RNA per reaction were used as described previously (28). The riboprobes derived from the plasmids pSK*isal⁺*, pSK*php4⁺* (28) and pSK*grx4⁺* (27) were used to detect *isal⁺*, *php4⁺* and *grx4⁺* transcripts, respectively. The *act1⁺* riboprobe made from the linearized plasmid pSK*act1⁺* (28) was used to detect *act1⁺* mRNA as an internal control for normalization during quantification of the RNase protection products. The riboprobes derived from the plasmids pKSlacZ, pKSACT1 (25) and pSKVP16 (27) were used to determine the *lacZ*, ACT1 and VP16 mRNA levels, respectively.

Two-hybrid analysis. Pre-cultures of each L40 co-transformed strain harboring the indicated bait and prey plasmids were grown to an A_{600} of 0.5 and were then either left untreated, or cultured in the presence of Dip (250 µM) or FeCl₃ (100 µM) for 4 h. Aliquots were withdrawn, and β-galactosidase activity was assayed using *o*-nitrophenyl-β-*D*-galactopyranoside as a substrate. β-galactosidase activity levels were measured within the linear response range, and were expressed in standard Miller units (30). The values reported here are the averages of triplicates of three

independent co-transformants. In addition to β -galactosidase assays, a riboprobe derived from the plasmid pKSlacZ was used to monitor steady-state levels of *lacZ* mRNAs from the integrated (*lexAop*)₈-*lacZ* reporter construct in a L40 strain. Furthermore, a riboprobe to detect actin (*ACT1*) mRNA levels from *S. cerevisiae* was used as an internal control. For Western blotting experiments, total cell lysates were prepared as described previously (49). After electrophoresis on 9 % sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels, protein samples were analyzed by immunoblotting. Antibodies used for protein detection were monoclonal antibodies anti-LexA 2-12, which is directed against the LexA DNA binding domain, and anti-VP16 1-21, which is directed against the VP16 activation domain (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A monoclonal anti-3-phosphoglycerate kinase (PGK) antibody (Molecular Probes, Eugene, OR) was used to detect PGK that served as internal control.

Bimolecular fluorescence complementation assay. Analysis by BiFC assays was performed as described previously (27). Fluorescence and differential interference contrast images of the cells were obtained using an Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with an ORCA ER digital cooled camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). BiFC signals were visualized using a magnification of X1000 with a transmission window of 465 to 495 nm, whereas the chromosomal material (as marked by Hoechst 33342-staining) was detected with a window of 340 to 380 nm. The cell fields shown in this study represent a minimum of five independent experiments. The merged images were obtained using the Simple PCI software, version 5.3.0.1102 (Compix, Sewickly, PA).

Results

Php4 interacts with both the N- and C-terminal regions of *Grx4*. We have previously shown that the full-length *Php4* and *Grx4* interact with each other (27). Although we identified a minimal region of *Php4* (residues 152-254) that is necessary for interaction with *Grx4* (27), the amino acid regions of *Grx4* that are required for its association with *Php4* remain unknown. To gain insight into regions of *Grx4* that interact with *Php4*, we first tested a N-terminal (residues 2-142) and a C-terminal (residues 105-244) segment of *Grx4*. Notably, the N-terminal 142-residue region of *Grx4* includes a thioredoxin (TRX)-like domain, whereas its C-terminal region (amino acids 105 to 244) contains a glutaredoxin (GRX)-like domain. β -galactosidase assays of LexA-²*Grx4*¹⁴² and LexA-¹⁰⁵*Grx4*²⁴⁴ coexpressed with VP16-*Php4* revealed high activity levels (1072 +/- 70 and 686 +/- 118 Miller units, respectively). Although these levels of β -galactosidase activity were lower by 32 % and 57 % compared with the full-length LexA-²*Grx4*²⁴⁴ protein (1578 +/- 119 Miller units), a clear and elevated transactivation of the reporter gene expression was observed, revealing that both N- and C-terminal regions of *Grx4* interact with *Php4* (Fig. 1A). As negative controls, the VP16 transactivation domain was used without the *Php4* protein or the LexA DNA-binding domain was assayed without the *Grx4* protein. In both cases, the β -galactosidase activity was absent, resulting in background values that are typical of pairs of noninteracting proteins (Fig. 1A). Immunoblot analyses of protein extracts using anti-LexA and anti-VP16 antibodies clearly indicated that the fusion proteins were expressed in the co-transformed cells (Fig. 1B). Although we consistently detected LexA polypeptide alone, full-length VP16-*Php4* protein, LexA-*Grx4* protein and its truncated derivatives, we were unable to detect the VP16 polypeptide alone. This result may be due to its low predicted molecular weight (~8 kDa). Based on these data, we concluded that the TRX- and GRX-containing regions of *Grx4* interact both with *Php4*.

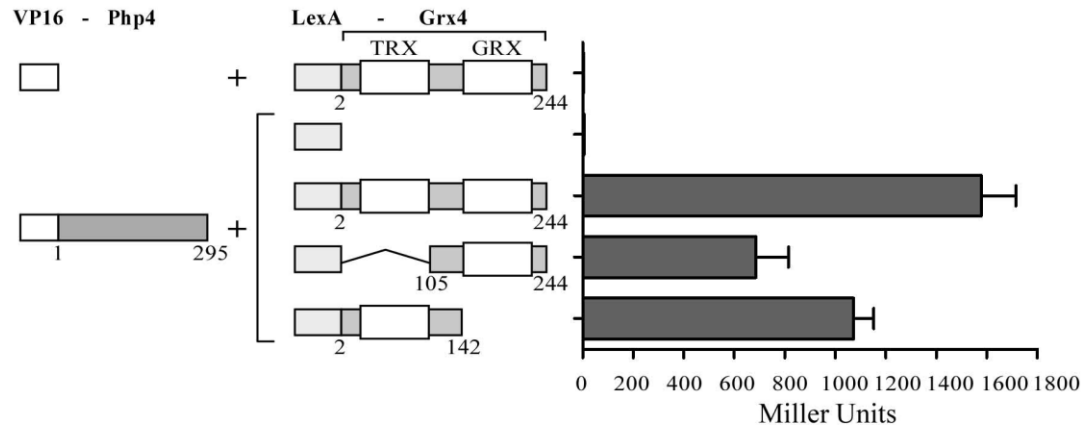
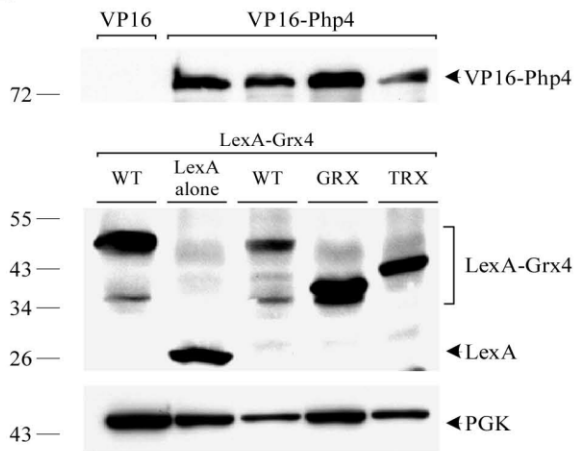
A**B**

Fig. 1. The N- and C-terminal regions of Grx4 interact with Php4. *A*, The VP16-Php4 fusion protein was co-expressed with the full-length LexA-Grx4 protein or its truncated derivatives. The amino acid sequences of the Php4 and Grx4 proteins are numbered relative to their first initiator codons, respectively. Each set of constructs was co-expressed in the *S. cerevisiae* strain L40 under basal conditions. As a measure of protein-protein interactions, liquid β -galactosidase assays were carried out, and results are shown as the mean of triplicate determinations \pm standard deviations. *B*, Cell lysates from aliquots of the cultures described in panel *A* were analyzed by immunoblotting using anti-VP16, anti-LexA, or anti-phosphoglycerate kinase (PGK) (as an internal control) antibodies. The positions of protein standards are indicated to the left of the panel.

Whereas the association between the TRX domain and *Php4* is constitutive, the GRX domain interacts in an iron-dependent manner with *Php4*. As we have previously shown using a two-hybrid approach, the interaction between the full-length LexA-Grx4 and VP16-*Php4* fusion proteins is not modulated by the cellular iron status (27). Indeed, in the present study, the full-length LexA-Grx4 and VP16-*Php4* chimeric proteins interacted with each other, producing a constitutive steady-state level of *lacZ* mRNA as assayed by RNase protection experiments under low or high concentrations of iron (Fig. 2, A and B). Similarly, when the GRX domain of Grx4 was deleted (LexA-²Grx4¹⁴²), leaving only the TRX-containing region, and then tested for interaction with the full-length VP16-¹Php4²⁹⁵ protein, the levels of *lacZ* mRNA were constitutive and unresponsive to cellular iron status (Fig. 2, A and B). Surprisingly, when the TRX domain was removed (LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴, leaving only the GRX-containing region) and then tested for association with VP16-¹Php4²⁹⁵, the levels of *lacZ* mRNA were exclusively detected in the presence of iron, and not found under iron-limiting conditions (Fig. 2, A and B).

Based on these data and the fact that we had previously determined that a *Php4* domain corresponding to amino acids 152-254 constituted a minimal module that was sufficient for interaction with Grx4 (27), we further investigated the region on Grx4 that was required for interaction with the 152-254-amino acid region of *Php4*. We first tested the possibility of interaction between VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ with the N-terminal residues 2 to 142 of Grx4 (including the TRX domain). This first combination showed an absence of *lacZ* transcript, irrespective of iron status (Fig. 2, A and B). We then tested whether the C-terminal region of residues 105-244 of Grx4 (including the GRX domain) was involved in the interaction with amino acids 152 to 254 of *Php4*. In these experiments, LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ clearly activated *lacZ* mRNA expression under iron-replete conditions, but not under iron-limiting conditions. These results revealed an interaction between the GRX domain of Grx4 and the amino acid region consisting of residues 152 to 254 of *Php4* that

was dependent of iron. We consistently found that the interaction between the full-length LexA-Grx4 and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ occurred only in response to excess iron but not under conditions of iron deficiency (Fig. 2, A and B). These results suggested that the iron-dependent interaction between these two proteins took place through the GRX domain of Grx4. With the exception of the VP16 polypeptide alone and the short VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ protein, all the fusion proteins tested for two-hybrid interactions were expressed as confirmed by immunoblot analyses (Fig. 2C). Given this situation, we assayed the levels of mRNA expression of *VP16* alone, *VP16-¹Php4²⁹⁵* and *VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴* alleles by RNase protection experiments. The results showed that *VP16* used without or with the full-length and truncated *php4* constructs were clearly expressed, with transcripts detected in the case of each prey construct (Fig. 2D). We therefore conclude, on the basis of these data, that iron fosters the interaction between the Grx domain of Grx4 and the C-terminal 152 to 254 amino acid residues of Php4, whereas the TRX domain establishes a constitutive and iron-independent association with Php4.

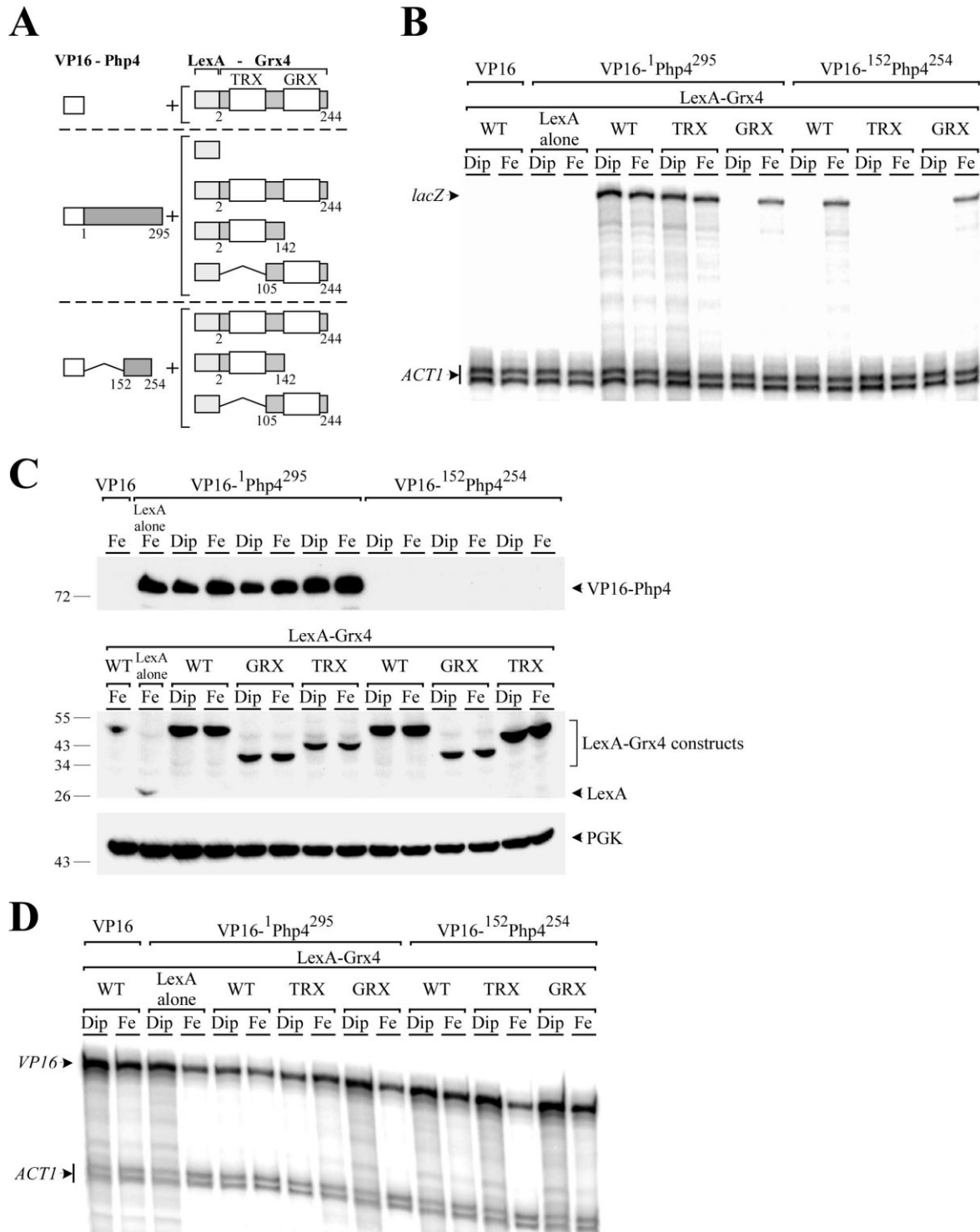


Fig. 2. Two domains of Grx4 are involved in the association with Php4, but only the Grx domain interacts in an iron-dependent manner. *A*, Schematic illustration of chimeric VP16-Php4 and

LexA-Grx4 molecules that were used as prey and bait, respectively. The N-terminal 142 amino acid residues of Grx4 encompass its TRX domain, whereas residues 105 to 244 of Grx4 contain the GRX domain. The amino acid sequence numbers refer to the positions relative to the first amino acid of each protein. *B*, Each set of constructs was co-expressed in the *S. cerevisiae* strain L40 to an A_{600} of 0.4 and then treated with Dip (250 μ M) or FeCl₃ (100 μ M) for 3 h. After total RNA extraction, the *lacZ* and *ACT1* steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. Results shown are representative of three independent experiments. *C*, Cell lysates from aliquots of the cultures described in panel *B* were analyzed by immunoblotting using anti-VP16, anti-LexA, or anti-PGK (as an internal control) antibodies. The positions of the molecular weight standards are indicated to the left. *D*, Aliquots of the cultures described in panel *B* were also examined by RNase protection assays for steady-state levels of *VP16* transcripts. Actin (*ACT1*) mRNA levels were probed as an internal control.

The Cys35 of Grx4 is required for interaction between Php4 and the TRX domain, whereas Grx4 Cys172 is necessary for the iron-dependent association between the GRX domain and the C-terminal region of Php4. To further investigate the interaction between the TRX or GRX domain of Grx4 with Php4, we performed two-hybrid experiments using *LexA-grx4* fusion alleles that contained punctual mutations in two highly conserved cysteine residues. The N-terminal Trx domain of Grx4 contains a WAAPC³⁵K sequence that is reminiscent of the thioredoxin active site motif WCGPCK (11). The C-terminal Grx-like domain of Grx4 contains the highly conserved residues C¹⁷²GFS that are required for monothiol glutaredoxin cellular functions (41). We first co-expressed the LexA-Grx4(C35A) mutant construct with either VP16-¹Php4²⁹⁵ or VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴. Under low-iron conditions, results showed that no significant levels of *lacZ* mRNA were detected, suggesting that the interaction between LexA-Grx4(C35A) and VP16-¹Php4²⁹⁵ or LexA-Grx4(C35A)

and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ was not significant or absent (Fig. 3, A and B). In contrast, when these two co-transformants were incubated in the presence of iron, *lacZ* mRNA expression was readily detected, revealing iron-dependent interactions between LexA-Grx4(C35A) and VP16-¹Php4²⁹⁵ or LexA-Grx4(C35A) and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ (Fig. 3, A and B). When the GRX domain was mutated [LexA-Grx4(C172A)] and then tested for interaction with the full-length VP16-¹Php4²⁹⁵ fusion protein, high levels of *lacZ* mRNA were detected under iron-limiting and iron-replete conditions (Fig. 3, A and B). In contrast, two-hybrid assays of LexA-Grx4(C172A) co-expressed with VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ showed no steady-state level of *lacZ* mRNA under neither iron-limiting nor iron-replete conditions (Fig. 3, A and B). Based on these data, we concluded that the Cys172 of Grx4 was required for Grx4 interaction with the C-terminal residues 152 to 254 of Php4. Furthermore, results showed that this interaction was modulated by iron in the absence of the Cys35 of Grx4. To further investigate the requirement of the Cys172, we designed a truncated segment of the N-terminal end of Grx4, leaving only the GRX domain containing residues 105 to 244. When the Cys172 → Ala mutation [LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴(C172A)] was tested for interaction with VP16-¹Php4²⁹⁵ or VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ by two-hybrid analysis, *lacZ* mRNA levels were undetectable by RNase protection assays (Fig. 3, A and B). Given these results and those obtained above (Fig. 2), we concluded that the Cys172 residue within the GRX domain of Grx4 is absolutely required because its exchange abrogates the interaction between the LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ and VP16-¹Php4²⁹⁵ or LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ in response to iron. Western blot analyses of protein extracts using anti-LexA and anti-VP16 antibodies showed that the fusion proteins were expressed in the co-transformed cells, independently of the iron levels (Fig. 3C). Since we were unable to detect the VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ fusion protein (presumably due to its low molecular weight), we ascertained the levels of mRNA expression of VP16-*php4*⁺ fusion alleles by RNase protection assays (Fig. 3D). Results showed that

VP16⁻¹php4²⁹⁵ and *VP16⁻¹⁵²php4²⁵⁴* fusion alleles were clearly expressed, with transcripts detected in the case of each prey construct (Fig. 3D).

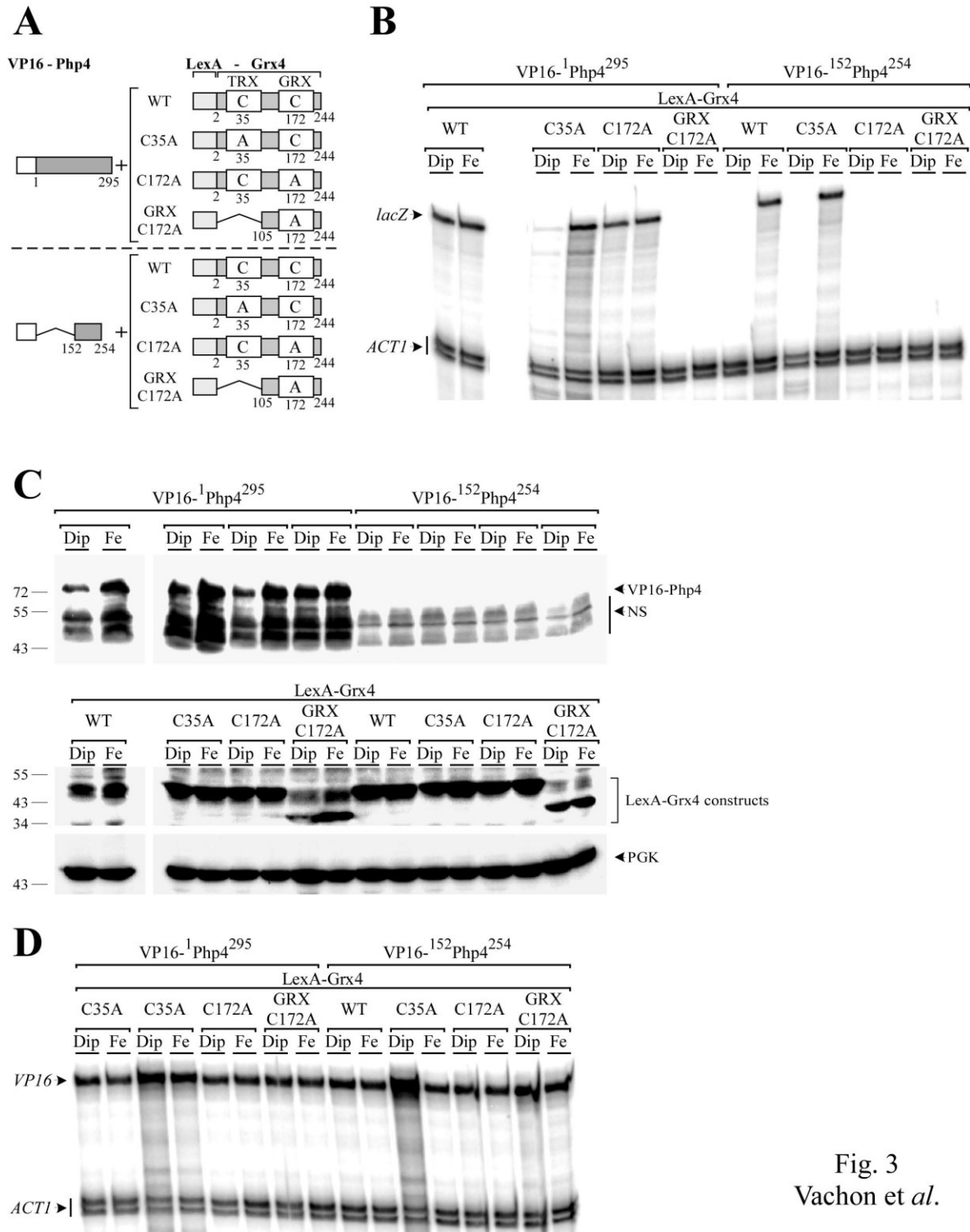


Fig. 3
Vachon et al.

Fig. 3. The Cys35 of Grx4 is necessary for the Php4-TRX domain interaction, whereas the Grx4 Cys172 is required for the iron-dependent Php4-GRX domain association. A, Schematic illustration

of the VP16-Php4 and LexA-Grx4 fusion protein and their mutant derivatives. The point mutations of Grx4 Cys35 and Cys172 are indicated with an A (instead of the wild-type C residues). The amino acid sequence numbers refer to the positions relative to the first amino acid of each protein. *B*, Co-transformed cells were grown to mid-logarithmic phase and then incubated in the presence of Dip (250 μ M) or FeCl₃ (Fe, 100 μ M) for 3 h. Total RNA was isolated and analyzed by RNase protection assays for steady-state levels of *lacZ* transcript. Actin (*ACT1*) mRNA levels were probed as an internal control. Results shown are representative of three independent experiments. *C*, Whole-cell extracts were prepared from aliquots of the cultures described in panel B and analyzed by immunoblotting using either anti-VP16, anti-LexA, or anti-PGK (as an internal control) antibodies. *D*, Total RNA isolated from aliquots of the cultures described in panel B were also examined by RNase protection assays for steady-state levels of *VP16* transcripts. Actin (*ACT1*) mRNA levels were probed as an internal control.

Minimal C-terminal region of Php4 required for interaction with the GRX domain of Grx4. We have previously shown that the full-length Grx4 protein interacts with the C-terminal region 152-254 of Php4 (27). To gain additional insight into the GRX domain that is responsible for interaction with Php4, seven chimeric proteins were generated using different segments of the Php4 protein. These segments comprised residues residues 1 and 295 (VP16-¹Php4²⁹⁵), 1 to 254 (VP16-¹Php4²⁵⁴), 1 to 218 (VP16-¹Php4²¹⁸), 152 to 254 (VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴), 188 to 254 (VP16-¹⁸⁸Php4²⁵⁴), 219 to 254 (VP16-²¹⁹Php4²⁵⁴) and 152 to 254 (VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴(C221A; C227A)), in which Cys221 and Cys227 were mutated to alanine residues. β -galactosidase assays of VP16-¹Php4²⁹⁵, VP16-¹Php4²⁵⁴, VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ or VP16-¹⁸⁸Php4²⁵⁴ co-expressed with LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ showed high levels of activity (637 +/- 56, 1772 +/- 42, 1366 +/- 15 and 973 +/- 12 Miller units, respectively) (Fig. 4A). Co-expression of VP16-¹Php4²¹⁸, VP16-²¹⁹Php4²⁵⁴ or VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴(C221A; C227A) with LexA-

¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ resulted in dramatic reduced levels of β -galactosidase activity (19 +/- 1, 7 +/- 1 and 21 +/- 4 Miller units, respectively) that were similar to the values of pairs of noninteracting proteins (Fig. 4A). All fusion proteins tested for two-hybrid interactions were detected by immunoblot analyses, except the chimeric VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴, VP16-¹⁸⁸Php4²⁵⁴, VP16-²¹⁹Php4²⁵⁴ and VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴(C221A; C227A) proteins (Fig. 4B). As previously performed in the case of the very short versions of VP16-Php4 fusions, we monitored the levels of *VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴*, *VP16-¹⁸⁸Php4²⁵⁴*, *VP16-²¹⁹Php4²⁵⁴* and *VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴(C221A; C227A)* mRNA expression to confirm that they were produced in the two-hybrid experiments (Fig. 4C). Based on the results of analysis of reporter gene expression, we concluded that the C-terminal region of Php4 from residues 188 to 254 is sufficient for interaction between Php4 and the GRX domain of Grx4. Furthermore, the results showed that Cys221 and Cys227 in Php4 are required for Php4-GRX domain association.

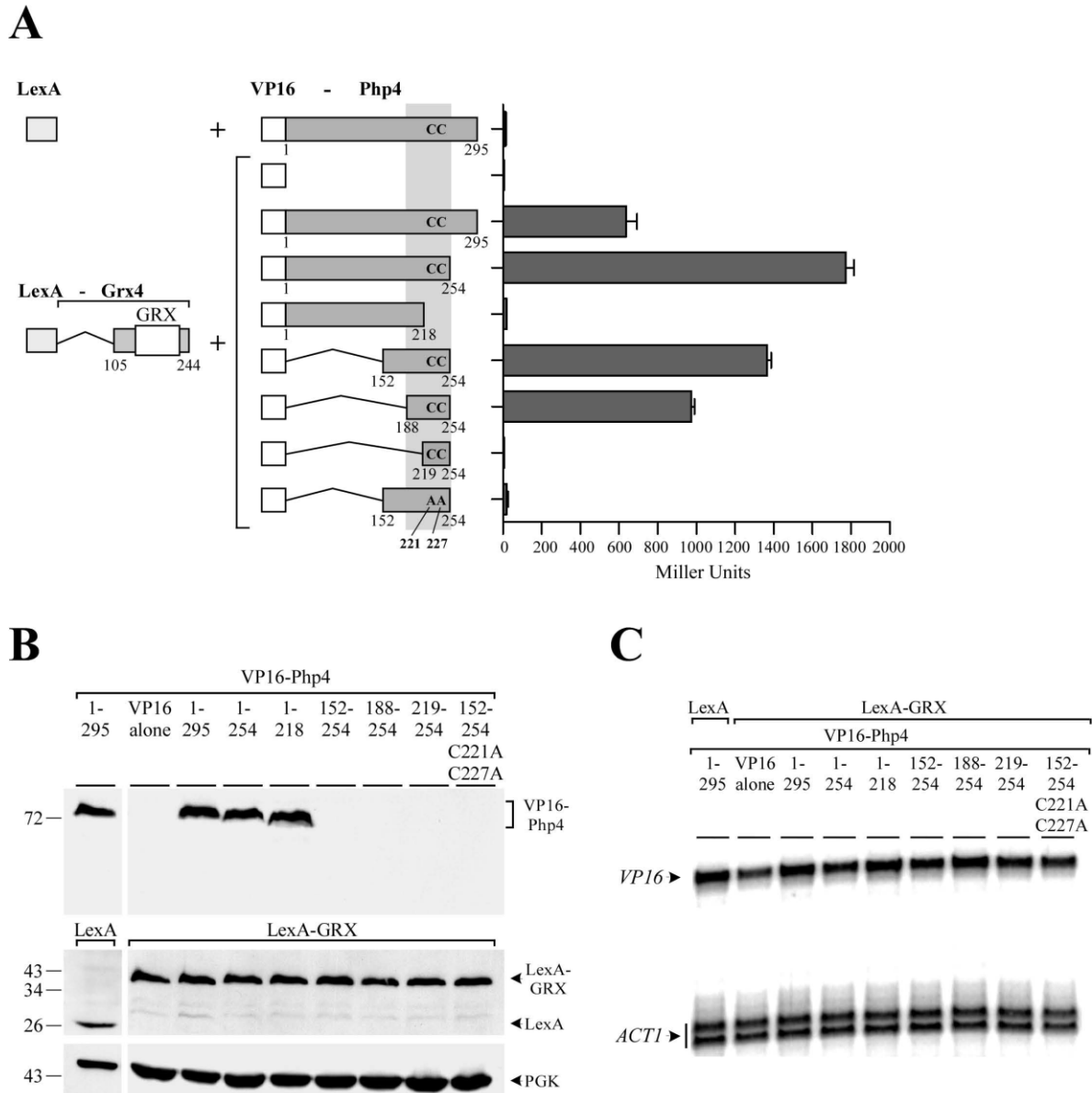


Fig. 4. The GRX domain of Grx4 interacts with the C-terminal region 188-254 of Php4. *A*, The LexA⁻¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ fusion protein was co-expressed with the full-length VP16-Php4 or its truncated derivatives. The amino acid sequences of the Grx4 and Php4 proteins are numbered relative to their first initiator codons. Each set of constructs was co-expressed in a strain (L40) in the presence of iron (10 μ M FeCl₃). Protein-protein interactions were detected by β -galactosidase assays and are indicated in Miller units. The error bars indicate the mean \pm standard deviations of

triplicate independent experiments. *B*, Whole cell extracts were prepared from aliquots of the cultures described in panel *A*, and analyzed by immunoblotting using either an anti-VP16 or anti-LexA antibody. As an internal control, total extract preparations were probed with an anti-phosphoglycerate kinase (PGK) antibody. *C*, Total RNA from aliquots of cultures described in panel *A* was isolated. Shown is a representative example of a RNase protection experiment to detect *lacZ* and *ACT1* mRNA steady-state levels.

Regions of Php4 that interact with the TRX domain of Grx4. In additional two-hybrid assays, we used the LexA-²Grx4¹⁴² fusion protein that contained only the TRX domain as a bait. Results showed that the first construct in which the last 41 amino acids of Php4 were deleted had no β -galactosidase activity when co-expressed with LexA-²Grx4¹⁴² (Fig. 5A). On the N-terminal side, deletions VP16-⁵⁴Php4²⁹⁵, VP16-¹¹²Php4²⁹⁵, VP16-¹⁵²Php4²⁹⁵ and VP16-¹⁸⁸Php4²⁹⁵ showed successive decreases in β -galactosidase activity (15%, 56%, 62% and 74%, respectively) compared to VP16-¹Php4²⁹⁵. A further deletion to amino acid 219 drastically abolished β -galactosidase activity by 97% as compared to full-length VP16-¹Php4²⁹⁵ protein (Fig. 5A). The LexA alone and LexA-²Grx4¹⁴² fusion protein were detected by immunoblotting using an anti-LexA antibody (Fig. 5B). Although the long VP16-Php4 fusions (VP16-¹Php4²⁹⁵, VP16-¹Php4²⁵⁴ and VP16-⁵⁴Php4²⁹⁵) were consistently detected by immunoblotting (Fig. 5B), we were unable to detect the short fusion products (VP16-¹¹²Php4²⁹⁵, VP16-¹⁵²Php4²⁹⁵, VP16-¹⁸⁸Php4²⁹⁵ and VP16-²¹⁹Php4²⁹⁵) using this approach (Fig. 5B). To ensure that these fusion proteins were expressed in the co-transformed cells, RNase protection analyses were performed to verify the levels of expression of these VP16-Php4 constructs. Results showed that the transcripts were detected in each case (Fig. 5C). Taken together, the two-hybrid interaction assays revealed that the last 41 amino acid residues found in the C terminus of Php4 and the first N-terminal 188 amino acids of Php4 constitute two important regions that are required for optimal interaction between Php4 and the TRX domain of Grx4.

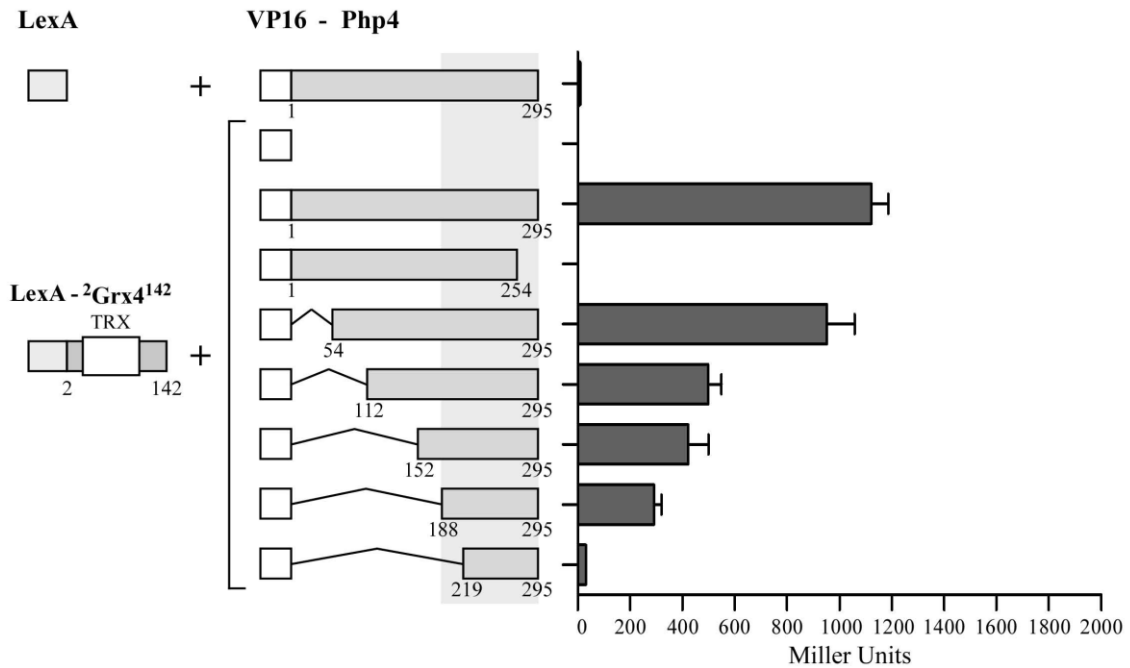
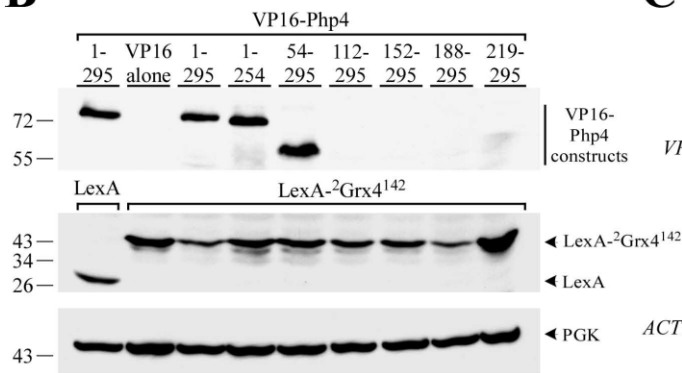
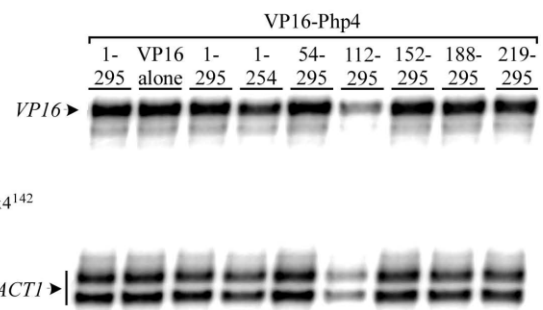
A**B****C**

Fig. 5. The TRX domain of Grx4 interacts with two distinct regions of Php4. *A*, The TRX domain of Grx4 was co-expressed with a series of VP16-Php4 truncations in the *S. cerevisiae* L40 strain. Protein-protein interactions were detected by β -galactosidase assays and results are indicated in Miller units. Error bars indicate the mean \pm standard deviations of triplicates. Amino acids are numbered relative to the first amino acid of either the Grx4 or Php4 protein. *B*, Total cell extract

preparations from aliquots of cultures used in the assays described in panel A were analyzed by immunoblotting with anti-VP16, anti-LexA or anti-PGK antibodies. C, Aliquots of the cultures described in panel A were also examined by RNase protection assays for *VP16* and *ACT1* steady-state mRNA levels.

The GRX domain is sufficient for iron-mediated inhibition of Php4 function. Given the fact that two-hybrid assays showed that the GRX domain strongly associates with Php4 in an iron-dependent manner, we further investigated the effect of this domain on Php4 function. These experiments were in keeping with the fact of the importance of the Php4-dependent regulation of *isaI*⁺, a gene known to encode a component implicated in iron-sulfur cluster assembly paths (48). Integrative plasmids harboring *grx4*⁺, *TAP-grx4*⁺ and *GFP-grx4*⁺ alleles were expressed under the control of the *grx4*⁺ promoter. Similarly, the *GFP-GRX* allele, which expressed only the Grx domain, was integrated in a *grx4Δ* mutant strain and was expressed under the same *grx4*⁺ promoter system. To assess the effect of the expression of different Grx4 fusion proteins on Php4 function, we carried out RNase protection experiments to examine the relative transcriptional profile of the Php4-regulated target gene *isaI*⁺ (Fig. 6). When *grx4Δ* cells expressing the *GFP-GRX* (GRX domain alone) allele were grown under conditions of iron deficiency, *isaI*⁺ gene expression was repressed (~4-fold) as compared to the levels of transcript detected from either control (untreated) or iron-treated cells. As shown in Fig. 6, *grx4Δ* cells in which wild-type *grx4*⁺ or functional *TAP-grx4*⁺ and *GFP-grx4*⁺ alleles were re-integrated regained their capacity to down-regulate *isaI*⁺ gene expression in response to iron starvation. In the case of these transformed *grx4Δ* cells, *isaI*⁺ transcript levels were readily detected under both standard (untreated) and iron-replete conditions. In fact, *isaI*⁺ transcript levels were more abundant (~6 to 12-fold) than those of mRNAs observed under iron-limiting conditions. Under iron-replete conditions, *grx4Δ* cells expressing *GFP-GRX* exhibited a less pronounced derepression of *isaI*⁺ transcript levels as compared to those observed in

grx4Δ cells expressing *grx4⁺*, *TAP-grx4⁺* and *GFP-grx4⁺* alleles. This result may be due to the fact that the GRX domain alone (without the TRX domain) is less competent to inhibit Php4 in response to iron. Nevertheless, taken together the results revealed that the GRX domain of Grx4 appears to be sufficient to inactivate a large proportion of the Php4 proteins in response to iron.

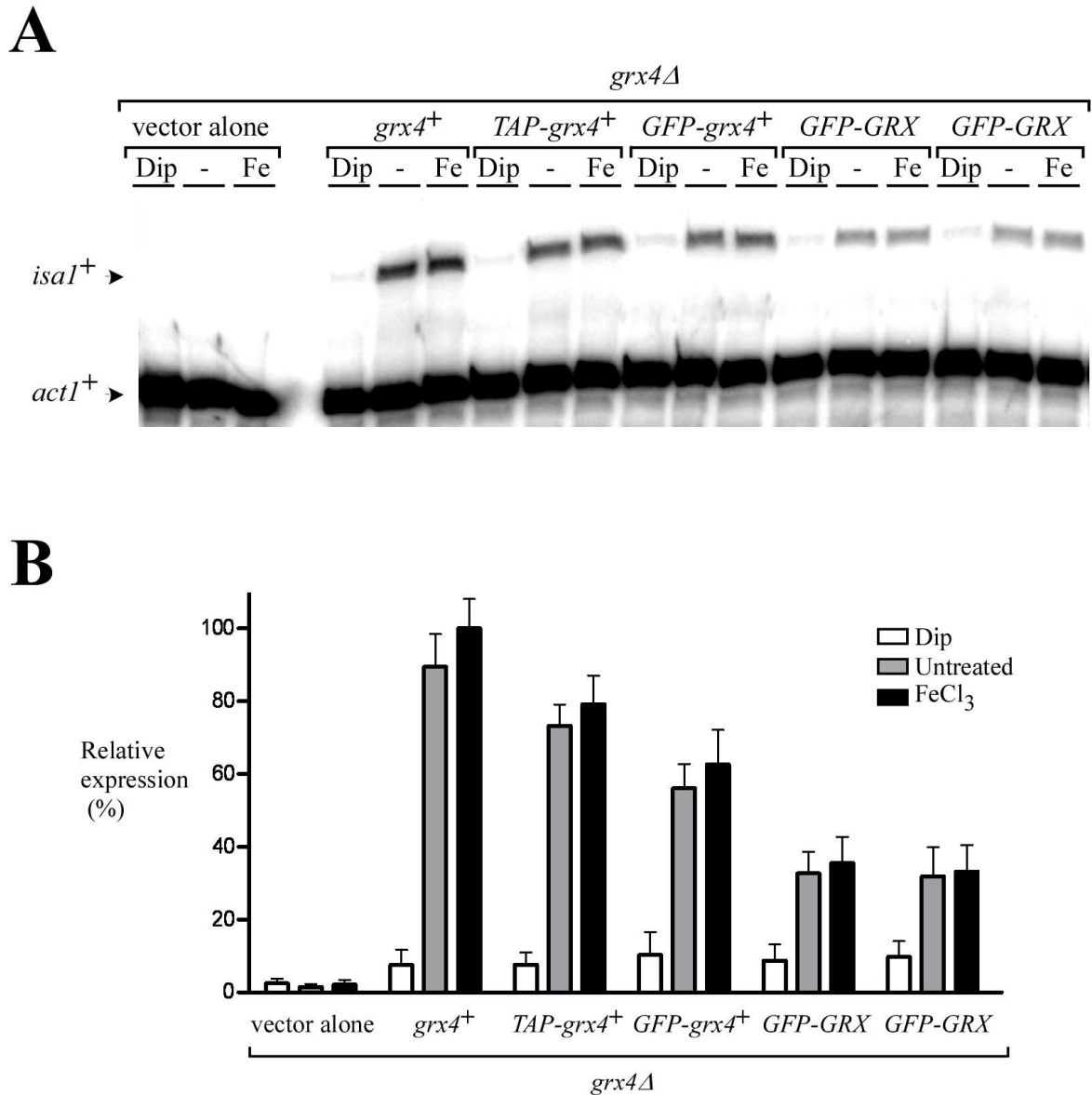


Fig. 6. The GRX domain inhibits Php4 activity in response to iron. A, Cells harboring a *grx4Δ* deletion were transformed with an empty integrative vector or the *grx4⁺*, *TAP-grx4⁺*, *GFP-grx4⁺*

and *GFP-GRX* alleles. For the *GFP-GRX* allele, two independent transformants are shown. Mid-logarithmic phase cultures were left untreated (-) or were treated with Dip (250 μ M), or FeCl₃ (Fe, 100 μ M) for 90 min. Total RNA was prepared from each sample and then analyzed by RNase protection assays. Steady-state levels of *isa1*⁺ and *act1*⁺ mRNAs are indicated with arrows. *B*, Graphic representation of the quantification of the results of three independent RNase protection assays, including the experiment shown in panel A. The histogram values represent the averages of triplicate determinations +/- standard deviations.

The GRX domain and Php4 associate with each other in the presence of iron. The ability of the GRX domain to interact with Php4 in a *S. cerevisiae* two-hybrid system led us to investigate whether such interaction could be detected in *S. pombe*. To address this point, we used a BiFC approach in fission yeast in which case VN and VC were fused to the N-terminal portions of Php4 and the GRX domain, respectively. Integrative plasmids expressing the tagged (*VN-php4*⁺ and *VC-GRX*) coding sequences were co-transformed into *grx4* Δ *php4* Δ mutant cells which were grown to mid-logarithmic phase. At this stage of growth, cells were incubated for 2 h in the presence of the iron chelator Dip (250 μ M) or exogenous iron (100 μ M). Microscopic analysis of iron-starved cells did not exhibit a BiFC signal. Under iron-limiting conditions, VN-Php4 and VC-GRX did not reconstitute a functional fluorophore, revealing that they were not interacting with each other (Fig. 7A). In contrast, when cells were incubated in the presence of exogenous iron, VN-Php4 and VC-GRX produced a BiFC signal that appeared in the cytoplasm and was to a great extent excluded from the nucleus (Fig. 7A). Consistent with the results obtained by two-hybrid analysis, the interaction between the GRX domain and Php4 occurred in an iron-dependent manner when assayed by BiFC in *S. pombe*. As we have previously reported (27), the VN-tagged Php4 and VC-tagged Grx4 proteins used in this study (as positive controls) produced a BiFC signal in the nucleus

under low-iron conditions, whereas the BiFC signal was mainly detected in the cytoplasm of the cells under iron-replete conditions (Fig. 7A). To ensure that the VN- or VC-tagged versions of the Php4 or Grx4 protein derivatives were expressed, total RNA was prepared from cultures analyzed by BiFC under both iron-starvation and iron-replete conditions and analyzed by RNase protection assays (Fig. 7, B and C). Although the transcripts for each construct were not found at the same steady-state levels, *php4*⁺ and *grx4*⁺ mRNAs were clearly detected under both iron starvation and excess. Together, these results indicated that the GRX domain is required together with iron for re-localization of the Grx4-Php4 complex from the nucleus to the cytoplasm.

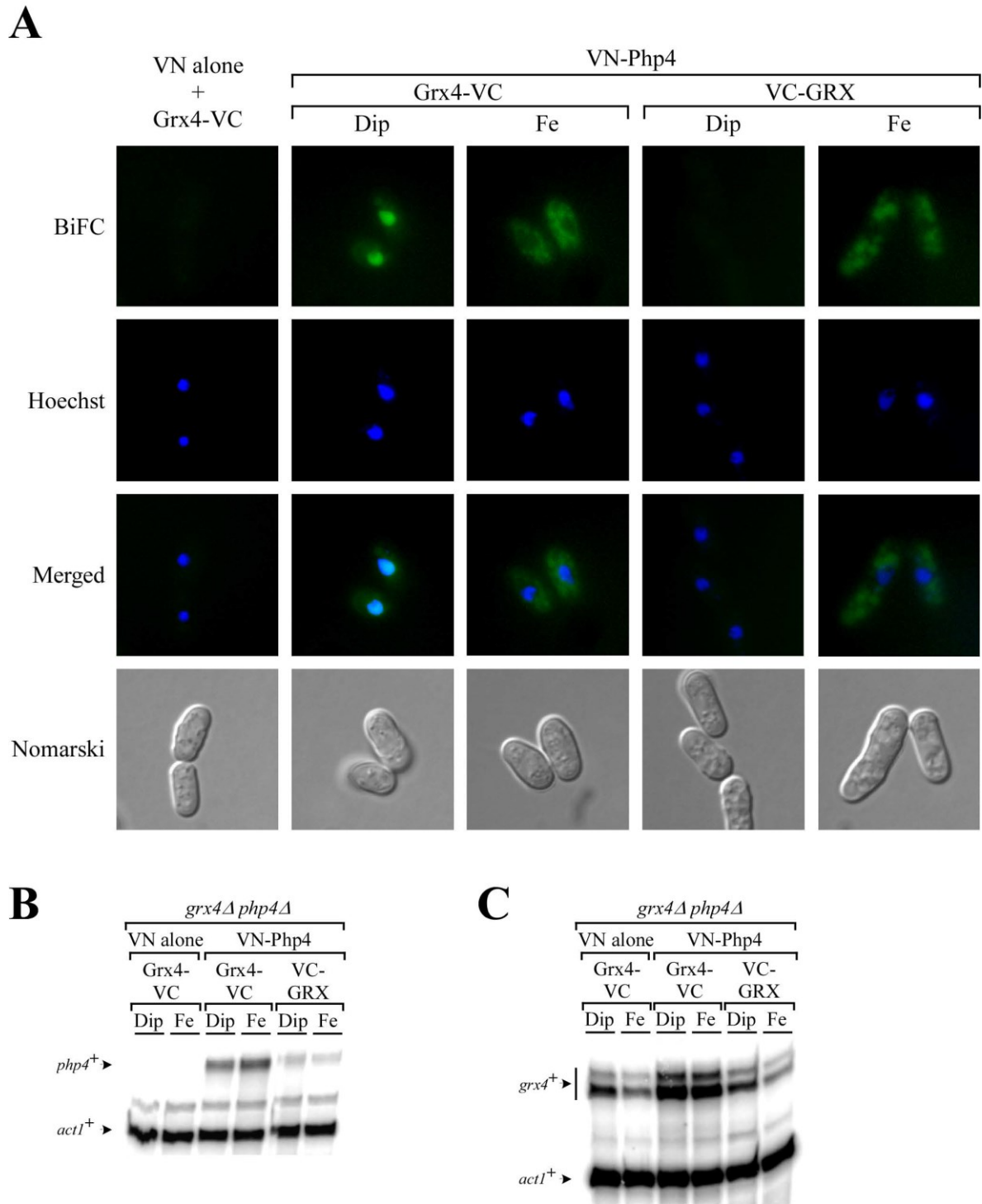


Fig. 7. *Php4* and the GRX domain interact in an iron-dependent manner in living *S. pombe* cells. *A*, A mutant strain disrupted for *grx4*⁺ and *php4*⁺ genes (*grx4Δ php4Δ*) was transformed with a vector

alone (VN alone) or with *grx4⁺-VC*, *VN-php4⁺* and *grx4⁺-VC*, or *VN-php4⁺* and *VC-GRX*. Cells expressing the indicated alleles were grown to mid-logarithmic phase and then treated with 250 μ M Dip or 100 μ M FeCl₃ (Fe) for 2 h. After treatment, the cells were visualized by fluorescence microscopy using BiFC and Hoechst. Merged images are shown in the center bottom panels. Nomarski optics (far bottom) was used to monitor cell morphology. For simplicity, cells co-transformed with VN alone and *grx4⁺-VC* were taken from iron-replete cells because the fluorescent images from iron-deficient cells were identical. Aliquots of the cultures described in panel A were analyzed by RNase protection assays. Steady-state mRNA levels of *php4⁺* and *act1⁺* were probed in panel B, whereas transcript levels of *grx4⁺* and *act1⁺* were analyzed in panel C. Each RNase protection experiment in B and C was independently repeated three times.

Discussion

In *S. pombe*, the *php4*⁺ gene encodes a subunit of the CCAAT-binding protein complex, which includes three other subunits, denoted Php2, Php3 and Php5 (26). Genes encoding Php2, Php3, and Php5 are constitutively expressed, whereas transcripts of *php4*⁺ are induced under conditions of iron starvation and repressed under iron-replete conditions (28). Under low-iron conditions, Php4 acts as a negative regulatory subunit of the CCAAT-binding factor and fosters repression of several genes encoding iron-using proteins. We have previously observed that deletion of the *grx4*⁺ gene makes Php4 constitutively active, suggesting that Grx4 plays a critical role in inhibiting Php4 function (27). Further analysis by BiFC assays showed that Grx4 is a binding partner of Php4 (27). Based on these findings, we sought to determine the mechanism by which Grx4 and Php4 interact with each other as a function of iron availability. In the present study, we found that both the TRX and the GRX domains of Grx4 interacted with Php4. Although the TRX domain interacted strongly and constitutively with Php4, the GRX domain associated in an iron-dependent manner with Php4. These results were different than those reported in the case of the *S. cerevisiae* monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4 with respect to their associations with Aft1 (39). In this case, two-hybrid experiments showed that each of the GRX and TRX domains of Grx3 and Grx4 interacted with Aft1, exhibiting similar levels of β -galactosidase activity, with no specification with respect to the interactions (between these polypeptides) as a function of iron availability. Although the nature of the difference between these respective observations is unclear, it is possible that the composition and length of the GRX and TRX domains may be contributing factors that would explain the differences between the results reported here and those published by others (39). Alternatively, the differences between the results of the two-hybrid studies may be due to the fact that Php4 (*S. pombe*) and Aft1 (*S. cerevisiae*) do not share significant amino acid sequence identity (only 4.3%). It is possible that these two proteins use distinct mechanisms or partners in their interactions with monothiol glutaredoxins. Recently, it has been determined that the last 16 amino

acid residues of *S. cerevisiae* Grx4 serve as a specific binding region for the transcription factor Aft1 (12). When this region was substituted with the last 14 amino acid residues of *S. pombe* Grx4 (which represents the C-terminal end of the protein), the interaction between the chimeric Grx4 and Aft1 was lost (12). This absence of interaction was consistent with the fact that only a limited percentage of identity (~31%) exists between the two C-terminal ends of Grx4 proteins from *S. pombe* and *S. cerevisiae*, respectively.

In *S. cerevisiae*, monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4 can transport Fe/S clusters to diverse locations and subsequently sort them to different enzymes (32). It has been demonstrated that both the TRX and GRX domains of Grx3 and Grx4 are required for this function (12). Although a similar function for *S. pombe* Grx4 has not yet been ascertained, this protein may also participate in intracellular Fe/S cluster delivery. A second role for *S. cerevisiae* Grx3 and Grx4 consist to communicate the presence of iron to Aft1. This condition leads to Aft1 inactivation and its subsequent export from the nucleus to the cytoplasm (5, 21, 37, 46). Deletion mapping analysis have revealed that neither the TRX domain alone nor the GRX domain alone can mediate iron-dependent inhibition of Aft1 (12). *S. cerevisiae* Grx4 must contain the two domains, TRX and GRX, to inactivate Aft1 function. Our results are different from those reported in the case of the *S. cerevisiae* Grx4. In the case of *S. pombe* Grx4, the expression of the GRX domain alone was sufficient to mediate a significant iron inhibition of Php4 function. This observation was supported by two experimental results. First, *grx4*Δ cells in which a full-length *grx4*⁺ allele or the GRX domain coding sequence was reintegrated, regained the capacity to up-regulate *isal*⁺ gene expression in response to iron (Fig. 6). In contrast, deletion of the *grx4*⁺ gene resulted in constitutively active Php4, thereby maintaining the target gene *isal*⁺ in a constant state of repression (Fig. 6) (27). Second, in cells harboring a *php4*Δ *grx4*Δ double deletion, co-expression of VN-Php4 and VC-GRX domain produced BiFC signals in the cytoplasm of iron-replete cells, indicating that the GRX domain can associate with Php4 and contribute to its inactivation via its re-

localization from the nucleus to the cytoplasm. Therefore, based on results reported here, it would appear that *S. pombe* Grx4 functions as an iron sensor for Php4. Furthermore, the presence of the GRX domain is sufficient for iron inhibition of Php4 function. Interestingly, the results also showed that the GRX domain was sufficient to allow recognition of the Php4-Grx4 complex by the exportin Crm1 (27) since an export of the Php4-GRX complex was observed in response to iron.

Yeast two-hybrid analysis showed that the TRX domain of Grx4 binds Php4 in a constitutive manner. Two Php4 regions were involved in the Php4-TRX domain association. The first region was relatively short and encompassed the last 40 C-terminal residues of Php4 (residues 255 to 295), whereas the second region was larger and required the presence of amino acid residues 55 to 218 of Php4. These data strongly suggested that the TRX domain functions as a docking-domain for the association between Grx4 and Php4. Although the precise amino acid residues responsible for the interaction between the TRX domain and Php4 must await finer mapping analysis, the Cys³⁵ residue located within the TRX domain was required for this interaction.

We have previously shown that Grx4 is required for inhibition of Php4 function in response to iron. The question thus arises concerning the mechanism of this inhibition. As opposed to the TRX domain, the GRX domain of Grx4 interacted in an iron-dependent manner with Php4. Under high iron conditions, we determined that the GRX domain associated with Php4 through a minimal domain encompassing amino acid residues 188 to 254 of Php4. This minimal C-terminal region of Php4 contains two Cys residues at positions 221 and 227. Interestingly, these two Cys residues are highly conserved in other Php4-like proteins, including HapX from *Aspergillus nidulans*, Hap43 from *Candida albicans*, HapX from *Aspergillus fumigatus* and HapX from *Cryptococcus neoformans* (13, 14, 19, 44). Substitution of these two Cys residues (Cys²²¹ and Cys²²⁷) by alanine residues abolished the association between the LexA-¹⁰⁵Grx4²⁴⁴ and the VP16-¹⁵²Php4²⁵⁴ fusion proteins (Fig. 4). Similarly, substitution of Cys¹⁷² with alanine in the GRX domain of Grx4 disrupted the interaction between this domain and Php4. One model that could explain these

observations would be that the GRX domain forms a [2Fe-2S] cluster with Php4. This putative [2Fe-2S] cluster would be coordinated by Cys¹⁷² located in the CGFS motif of Grx4, Cys²²¹ and Cys²²⁷ of Php4 and the cysteine residue of one molecule of glutathione (GSH). At this time, however, the model remains speculative and the mechanism by which Grx4 communicates the presence of iron to Php4 needs further investigations. Experiments are currently underway to investigate this mechanism. It is important to mention that, in support of the model, a number of studies have revealed that CGFS-type monothiol glutaredoxins can act as scaffold for the delivery of [2Fe-2S] clusters to acceptor proteins (1, 16, 38). Under conditions of excess of iron, Grx4 would acquire an [2Fe-2S] cluster that would trigger the interaction between the GRX domain and the C-terminal region (residues 188 to 254) of Php4. This interaction between the GRX domain and Php4 would induce an inhibitory conformational change that would disrupt the Php4/Php2/Php3/Php5 heteromeric complex, leading to Php4 release and inactivation (Fig. 8). Grx4-mediated inactivation of Php4 would lead to its recruitment by the exportin Crm1, and its subsequent export from the nucleus to the cytoplasm (27). Conversely, under conditions of iron starvation, the GRX domain would dissociate from the C-terminal portion (residues 188 to 254) of Php4, resulting in the ability of Php4 to bind the Php2/Php3/Php5 heterotrimeric complex and thereby repressing transcription of target genes (Fig. 8). Because the TRX domain of Grx4 is constitutively associated with Php4, other cellular components may be required to communicate cellular iron levels to the GRX domain of Grx4. These components may participate in signalling and/or delivery of a putative [2Fe-2S] cluster that would be inserted into the GRX domain of Grx4 to inactivate Php4. Further studies are needed to decipher the detailed mechanism by which Php4 is inactivated by the monothiol glutaredoxin Grx4.

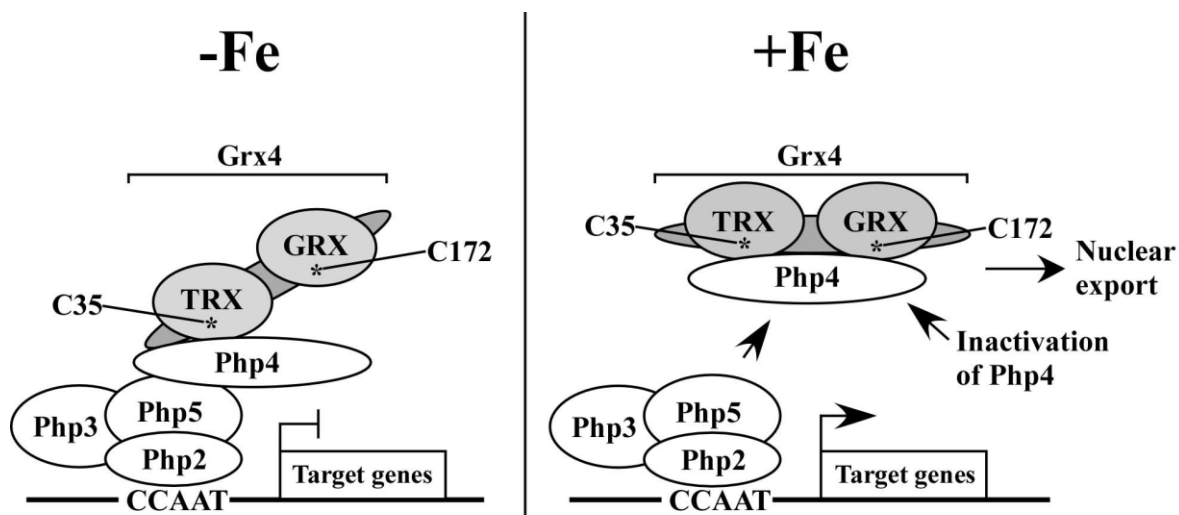


Fig. 8. Proposed model for the interaction between the monothiol glutaredoxin Grx4 and Php4. In the absence of iron, Php4 forms a complex with Php2, Php3, Php5 and Grx4. Because only the TRX domain interacts with Php4, this leaves the repression domain of Php4 available to repress target gene expression. When cells undergo transition from iron-limiting to iron-sufficient conditions, the GRX domain interacts with Php4, causing an inhibitory effect on Php4 function. The inactivation of Php4 leads to its release from the Php2/Php3/Php5 complex, and its subsequent export from the nucleus to the cytoplasm (27). Lack of Php4 allows the CCAAT-binding Php2/Php3/Php5 heterotrimer complex to activate gene expression. Php4-TRX and Php4-GRX domain associations require the presence of Cys35 and Cys172 of Grx4, respectively.

Acknowledgments

We are grateful to Gilles Dupuis and William Home for critical reading of the manuscript and for their valuable comments. We are indebted to Won-Ki Huh (Institute of Microbiology, Seoul National University) for the gift of pFA6a-VN173-KANMX6 and pFA6a-VC155-KANMX6 plasmids. P.V. and M.J. were recipients of studentships from the Faculté de médecine et des sciences de la santé of the Université de Sherbrooke and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), respectively. This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grants MOP-238238-2010-15 and MOP-396029-2010-DAS to S.L.

References

1. **Bandyopadhyay, S., F. Gama, M. M. Molina-Navarro, J. M. Gualberto, R. Claxton, S. G. Naik, B. H. Huynh, E. Herrero, J. P. Jacquot, M. K. Johnson, and N. Rouhier.** 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**:1122-1133.
2. **Chao, L. Y., M. A. Marletta, and J. Rine.** 2008. Sre1, an iron-modulated GATA DNA-binding protein of iron-uptake genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry.* **47**:7274-7283.
3. **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.
4. **Chung, W. H., K. D. Kim, and J. H. Roe.** 2005. Localization and function of three monothiol glutaredoxins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**:604-610.
5. **Ehrensberger, K. M., and A. J. Bird.** 2011. Hammering out details: regulating metal levels in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **36**:524-531.
6. **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.
7. **Haas, H., M. Eisendle, and B. G. Turgeon.** 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**:149-187.
8. **Halliwell, B., and J. M. Gutteridge.** 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**:108-112.

9. **Harrison, K. A., and G. A. Marzluf.** 2002. Characterization of DNA binding and the cysteine rich region of SRE, a GATA factor in *Neurospora crassa* involved in siderophore synthesis. *Biochemistry*. **41**:15288-15295.
10. **Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella.** 2010. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*. **142**:24-38.
11. **Herrero, E., and M. A. de la Torre-Ruiz.** 2007. Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol. Life Sci*. **64**:1518-1530.
12. **Hoffmann, B., M. A. Uzarska, C. Berndt, J. R. Godoy, P. Haunhorst, C. H. Lillig, R. Lill, and U. Muhlenhoff.** 2011. The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid. Redox Signal*. **15**:19-30.
13. **Hortschansky, P., M. Eisendle, Q. Al-Abdallah, A. D. Schmidt, S. Bergmann, M. Thon, O. Kniemeyer, B. Abt, B. Seeber, E. R. Werner, M. Kato, A. A. Brakhage, and H. Haas.** 2007. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex-a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J*. **26**:3157-3168.
14. **Hsu, P. C., C. Y. Yang, and C. Y. Lan.** 2011. *Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. *Eukaryot. Cell*. **10**:207-225.
15. **Hwang, L. H., E. Seth, S. A. Gilmore, and A. Sil.** 2012. SRE1 regulates iron-dependent and -independent pathways in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot. Cell*. **11**:16-25.
16. **Iwema, T., A. Picciocchi, D. A. Traore, J. L. Ferrer, F. Chauvat, and L. Jacquamet.** 2009. Structural basis for delivery of the intact [Fe₂S₂] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry*. **48**:6041-6043.

17. **Jbel, M., A. Mercier, and S. Labbé.** 2011. Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. *Eukaryot. Cell.* **10**:629-645.
18. **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.
19. **Jung, W. H., S. Saikia, G. Hu, J. Wang, C. K. Fung, C. D'Souza, R. White, and J. W. Kronstad.** 2010. HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* **6**:e1001209.
20. **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.
21. **Kaplan, C. D., and J. Kaplan.** 2009. Iron Acquisition and Transcriptional Regulation. *Chem. Rev.* **109**:4536-4552.
22. **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.
23. **Kim, K. D., H. J. Kim, K. C. Lee, and J. H. Roe.** 2011. Multi-domain CGFS-type glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis via direct interaction with a repressor Fep1 in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**:609-614.
24. **Labbé, S., B. Pelletier, and A. Mercier.** 2007. Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biometals.* **20**:523-537.

25. **Labbé, S., Z. Zhu, and D. J. Thiele.** 1997. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* **272**:15951-15958.
26. **McNabb, D. S., K. A. Tseng, and L. Guarente.** 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.
27. **Mercier, A., and S. Labbé.** 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.
28. **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.
29. **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.
30. **Miller, J. H.** 1972. *Experimental in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
31. **Molina, M. M., G. Belli, M. A. de la Torre, M. T. Rodriguez-Manzaneque, and E. Herrero.** 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **279**:51923-51930.
32. **Muhlenhoff, U., S. Molik, J. R. Godoy, M. A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, J. Stubbe, F. Pierrel, E. Herrero, C. H. Lillig, and R. Lill.** 2010. Cytosolic monothiol

- glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell. Metab.* **12**:373-385.
33. **Ojeda, L., G. Keller, U. Muhlenhoff, J. C. Rutherford, R. Lill, and D. R. Winge.** 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**:17661-17669.
34. **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.
35. **Pelletier, B., A. Trott, K. A. Morano, and S. Labbé.** 2005. Functional characterization of the iron-regulatory transcription factor Fep1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **280**:25146-25161.
36. **Philpott, C. C., S. Leidgens, and A. G. Frey.** 2012. Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochim. Biophys. Acta.* Jan 27. [Epub ahead of print].
37. **Philpott, C. C., and O. Protchenko.** 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **7**:20-27.
38. **Picciocchi, A., C. Saguez, A. Boussac, C. Cassier-Chauvat, and F. Chauvat.** 2007. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the *Cyanobacterium synechocystis PCC6803* and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry.* **46**:15018-15026.
39. **Pujol-Carrion, N., G. Belli, E. Herrero, A. Nogues, and M. A. de la Torre-Ruiz.** 2006. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **119**:4554-4564.

40. **Pujol-Carrion, N., and M. A. de la Torre-Ruiz.** 2010. Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7826-7835.
41. **Rouhier, N., J. Couturier, M. K. Johnson, and J. P. Jacquot.** 2010. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **35**:43-52.
42. **Rouhier, N., H. Unno, S. Bandyopadhyay, L. Masip, S. K. Kim, M. Hirasawa, J. M. Gualberto, V. Lattard, M. Kusunoki, D. B. Knaff, G. Georgiou, T. Hase, M. K. Johnson, and J. P. Jacquot.** 2007. Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:7379-7384.
43. **Rutherford, J. C., L. Ojeda, J. Balk, U. Muhlenhoff, R. Lill, and D. R. Winge.** 2005. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**:10135-10140.
44. **Schrettl, M., N. Beckmann, J. Varga, T. Heinekamp, I. D. Jacobsen, C. Jochl, T. A. Moussa, S. Wang, F. Gsaller, M. Blatzer, E. R. Werner, W. C. Niermann, A. A. Brakhage, and H. Haas.** 2010. HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **6**:e1001124.
45. **Sung, M. K., and W. K. Huh.** 2007. Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **24**:767-775.
46. **Ueta, R., N. Fujiwara, K. Iwai, and Y. Yamaguchi-Iwai.** 2007. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **18**:2980-2990.

47. **Vojtek, A. B., J. A. Cooper, and S. M. Hollenberg.** 1997. Searching for interacting proteins with the two-hybrid system II, p. 29-42. *In* P. Bartel and S. Fields (ed.), *The yeast two-hybrid system: a practical approach*. Oxford University Press, New-York, NY.
48. **Wu, G., S. S. Mansy, C. Hemann, R. Hille, K. K. Surerus, and J. A. Cowan.** 2002. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Isa1. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**:526-532.
49. **Znaidi, S., B. Pelletier, Y. Mukai, and S. Labbé.** 2004. The *Schizosaccharomyces pombe* corepressor Tup11 interacts with the iron-responsive transcription factor Fep1. *J. Biol. Chem.* **279**:9462-9474.

Footnotes

¹ The abbreviations used are: BiFC, bimolecular fluorescence complementation; bp, base pair(s); DBD, DNA-binding domain; Dip, 2,2'-dipyridyl; EMM, Edinburgh minimal medium; GFP, green fluorescent protein; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; VC, Venus carboxyl-terminal fragment; VN, Venus amino-terminal fragment; WT, wild-type; YES, yeast extract plus supplements; ZF, zinc finger.

DISCUSSION

Dans cette prochaine section je vais m'attarder à discuter du mécanisme d'inactivation de Php4 en présence de fer. Je vais présenter ce que je connais, un bref résumé des résultats publiés et un aperçu de résultats préliminaires non publiés. Puis, je vais décrire les prochaines expériences à effectuer pour poursuivre l'étude du projet.

1. Caractérisation du mécanisme d'inactivation de Php4

1.1. Résumés des résultats publiés

Les résultats que j'ai obtenu lors de mes recherches, ainsi que ceux obtenu précédemment dans notre laboratoire, nous ont permis de démontrer une interaction entre Grx4 et Php4. Dépendamment du statut en fer, le niveau d'interaction entre Php4 et Grx4 change. Aussi, en condition d'excès de fer, Grx4 cause l'inactivation de Php4 (MERCIER et LABBE, 2009). En fait, alors que le domaine TRX de Grx4 interagit avec Php4 indépendamment du statut en fer, le domaine GRX de Grx4 interagit avec Php4 qu'en présence de fer. Le domaine GRX possède une cystéine en position 172 qui est essentiel à son interaction avec Php4 et l'inactivation de ce dernier. Le mécanisme d'inactivation de Php4 en présence de fer devrait dépendre du domaine GRX de Grx4. La fonction du domaine TRX de Grx4 serait de garder la protéine en contact permanent avec Php4, permettant une inactivation rapide de Php4 lorsque les concentrations de fer augmentent au dessus des concentrations normales requises pour la croissance cellulaire (voir section Résultats).

1.2. Rôle d'un centre fer-soufre

Des travaux sur les homologues de Grx4 chez *Saccharomyces cerevisiae*, nommés Grx3 et Grx4, ont identifié la capacité de ceux-ci à former des centres fer-soufre coordonnés au niveau de la cystéine de leur domaine GRX (LI et OUTTEN, 2012). Ces centres fer-soufre, de type [2Fe-2S], peuvent être formés entre des homodimères de Grx3 et Grx4

et entre des hétérodimères de Fra2 et Grx3 ou Grx4 (Li *et al.*, 2009). Ces informations mettent en évidence la possibilité de la formation d'un centre fer-soufre sur Grx4 de *S. pombe* et son implication dans le mécanisme d'inactivation de Php4. Ce centre fer-soufre serait de type [2Fe-2S], s'il y a conservation des monothiols glutarédoxines entre *S. pombe* et *S. cerevisiae*. Il serait coordonné par la cystéine 172 de Grx4, une molécule de glutathion (comme dans le cas de Fra2 et Grx4 de *S. cerevisiae*) et par les deux cystéines de Php4, les résidus 221 et 227 (voir figure 10 A). Comme présenté à ma section résultats, ces deux cystéines de Php4 sont en fait essentielles à son interaction avec le domaine GRX de Grx4, qui contient la cystéine 172 de Grx4. Une autre possibilité de coordination du centre fer-soufre serait dans un homodimère de Grx4. Le centre fer-soufre serait coordonné dans ce cas par deux cystéines 172 et deux molécules de glutathion (voir figure 10 B). Cette prévision est basée sur la coordination du centre fer-soufre pour Grx4 d'*E. coli* dont la structure cristalline a été publiée (IWEMA *et al.*, 2009).

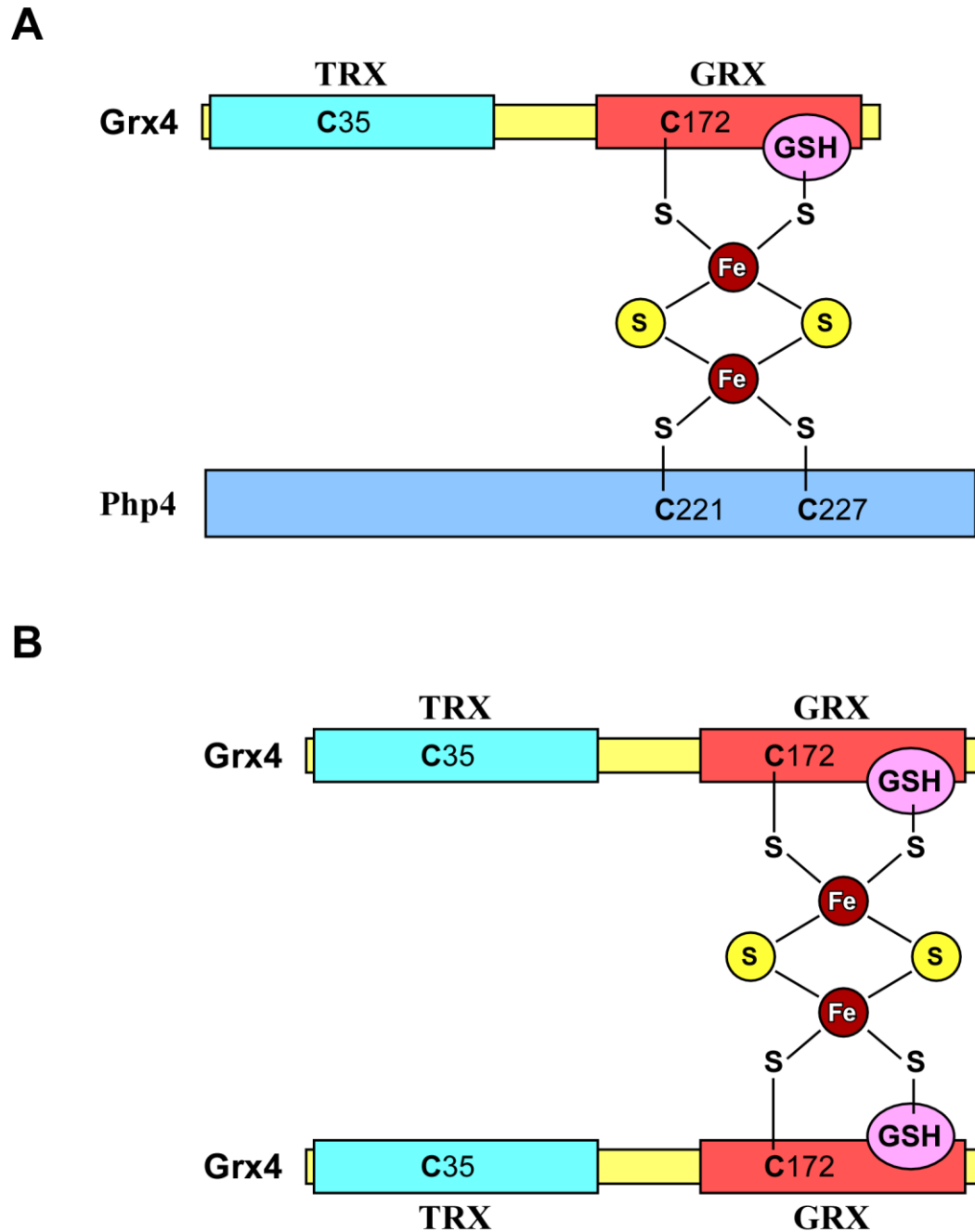


Figure 10 : Prédiction de coordination d'un centre fer-soufre par Grx4 et Php4 chez *S. pombe*.

En se basant sur ce qui est connu chez *S. cerevisiae*, il est possible de prédire la coordination d'un centre fer-soufre de type [2Fe-2S] sur Grx4 de *S. pombe*. **A**, Entre Grx4 et Php4, un centre fer-soufre serait coordonné via quatre liens thiols fournis par la cystéine 172 de Grx4 (situé dans le domaine GRX), une molécule du cofacteur glutathion (GSH) et par les cystéines 221 et 227 de Php4. **B**, Entre un homodimère de Grx4, le centre fer-soufre serait coordonné par la cystéine 172 de chaque protéine Grx4 du dimère et par deux molécules de glutathion.

Dans le cadre de mes travaux de maîtrise, j'ai testé expérimentalement si un centre fer-soufre est présent dans le complexe formé par Php4 et Grx4 chez *S. pombe*. J'ai obtenu des résultats préliminaires qui ne sont pas encore publiés. J'ai utilisé des versions purifiées de Php4 et Grx4 extraites d'*E. coli*. Ces bactéries ont été transformées avec le plasmide pRSFDuet-1 (Novagen[®]), qui a la particularité de permettre une co-expression dans *E. coli* de deux protéines distinctes. Ce plasmide possède deux sites de clonage indépendants, chacun sous le contrôle d'un promoteur bactérien et un opérateur *lac*. Ceci permet l'induction de l'expression de deux protéines différentes et ce, de façon simultanée. L'utilisation du système pRSFDuet-1 a plusieurs avantages en comparaison d'une co-transformation avec deux plasmides différents codant chacun pour une protéine. Premièrement, un seul antibiotique est nécessaire pour maintenir le plasmide. Aussi, il est attendu que les deux protéines soient exprimées à des niveaux équimolaires, étant sous les mêmes promoteurs et opérateurs. Dans un système à deux plasmides, il est difficile de contrôler la quantité relative de chacune des protéines produites. Le plasmide pRSFDuet-1 que j'ai développé code pour les protéines Php4 et Grx4 étiquetées en N-terminal avec six-histidines et MBP (*maltose binding protein*), respectivement (figure 11). Dans ce système, les deux protéines sont en présence l'une de l'autre à l'intérieur de la bactérie, qui possède un système de synthèse de centre fer-soufre. Dans une culture d'*E. coli* supplémentée en fer, il est donc envisageable que Php4 et Grx4 synthétisés aient la possibilité de se complexer via un centre fer-soufre qui peut demeurer stable et ce, même durant la purification.

pRSFDuet1-(His6-Php4)-(MBP-Grx4)

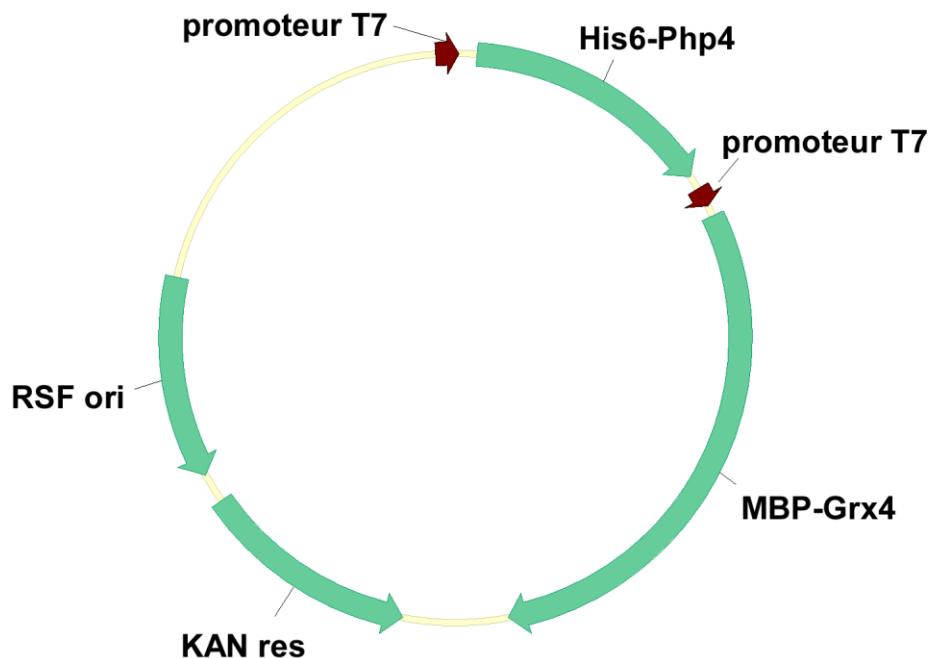


Figure 11 : Représentation du plasmide pRSFDuet1-(His6-Php4)-(MBP-Grx4).

Le plasmide pRSFDuet1-(His6-Php4)-(MBP-Grx4) a été créé en laboratoire à partir du plasmide commercial pRSFDuet1. Deux cadre de lecture différents ont été clonés dans ce plasmide, chacun à la suite d'un promoteur T7 : Php4 étiqueté en N-terminal par 6 histidines et Grx4 étiqueté par la *maltose binding protein* (MBP) en N-terminal. Le plasmide comprend aussi une origine de réplication RSF et un gène de résistance à la kanamycine (KAN res) pour la sélection. La figure a été générée à partir du programme Vector NTI 9 d'Invitrogen.

J'ai entrepris de purifier des complexes protéiques contenant Php4 et Grx4 par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne d'amylose qui retient MBP-Grx4. Puis, j'ai détecté la présence de Php4 dans les fractions d'élution à forte concentration en Grx4 (figure 12 A). Ce résultat a aussi été reproduit lorsqu'une colonne d'affinité Ni-NTA a été utilisée, permettant l'accrochement de la protéine His6-Php4 (figure 12 B). Lors de cette dernière chromatographie, His6-Php4 et MBP-Grx4 co-élus, alors que MBP-Grx4 n'est pas retenu par la colonne en absence de Php4. Ce résultat supporte l'existence d'une interaction protéique entre Php4 et Grx4 et confirme les résultats publiés de double-hybride et de BiFC (voir section Résultats). Ce nouveau résultat est intéressant, car il permet de constater que

la présence d'aucune protéine tierce de *S. pombe* n'est requise à l'interaction entre Php4 et Grx4 *in vitro*.

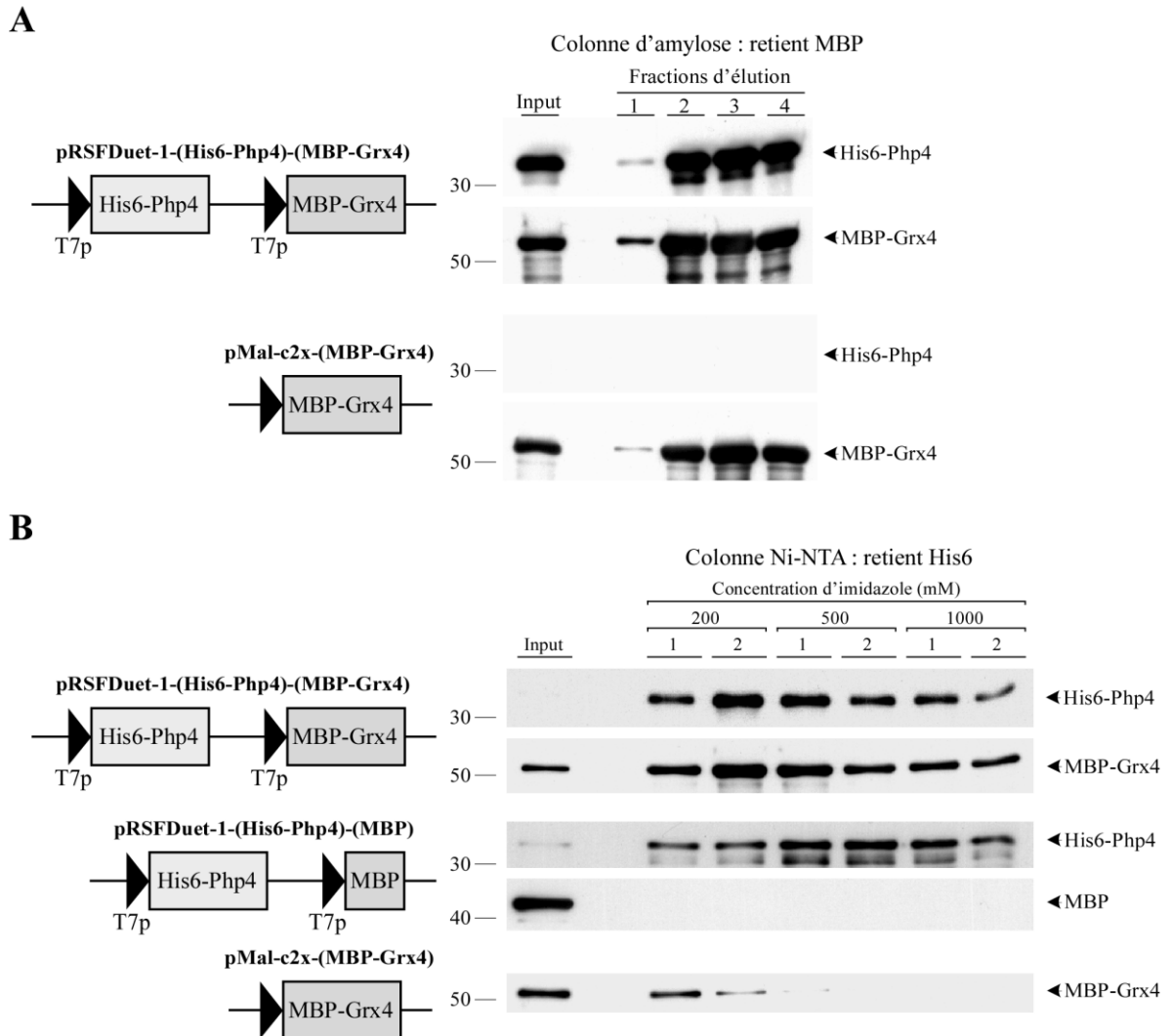


Figure 12 : Php4 et Grx4 co-éluent lors d'une chromatographie d'affinité.

Deux protéines qui interagissent l'une avec l'autre vont co-éluer lors d'une chromatographie d'affinité dont la résine de la colonne ne peut retenir que l'une des deux. L'expression de His6-Php4 et MBP-Grx4 est induite dans une souche d'*E. coli* BL21 transformée avec différents plasmides indiqués à gauche. Des extraits cellulaires sont soumis à une chromatographie d'affinité et les fractions d'éluion sont testées par immunobuvardages de type Western pour détecter la présence de Php4 et Grx4. Une colonne d'amylose qui retient MBP-Grx4 est utilisée en **A** et une colonne Ni-NTA qui retient His6-Php4 est utilisée en **B**. Les chiffres à gauche des gels réfèrent à un marqueur de masse moléculaire (en kDa). Les différentes fractions déposées sur gels sont l'extrait brute

(input) et les différentes fractions d'éluion. Les anti-corps utilisés pour révéler le gel (indiqués à droite) sont un anti-His6 et un anti-MBP. His6-Php4 et MBP-Grx4 co-éluent dans les deux systèmes. Le plasmide codant pour His6-Php4 et MBP seul sert à vérifier qu'il n'y a pas d'interaction non-spécifique entre His6-Php4 et MBP. Le plasmide codant pour MBP-Grx4 seul permet de vérifier que cette protéine ne lie pas la colonne Ni-NTA.

Lors de l'extraction protéique des cellules d'*E. coli* exprimant Grx4 et Php4, les fractions protéiques provenant d'une culture additionnée en fer possédaient une forte coloration rouge-brune qui s'estompait rapidement dans le temps. Suite à la purification par chromatographie d'affinité, les fractions dont la couleur était la plus intense sont aussi celles dont Php4 et Grx4 sont les plus fortement détectées par immunobuvardage de type Western. La présence de centres fer-soufre dans un extrait protéique est caractérisée par cette coloration. Aussi, les centres fer-soufre sont très sensibles à l'oxydation en présence d'oxygène (BERNDT *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2009; PICCIOCCI *et al.*, 2007). Cette caractéristique s'accorde avec mon observation de réduction de la coloration de mes extraits dans le temps. De plus, les fractions dont la couleur est la plus intense présentaient un profil spectrophotométrique UV caractéristique de la présence d'un centre fer-soufre : un pic d'absorption correspondant à ~400 nm (DAILEY *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2009; PICCIOCCI *et al.*, 2007).

J'ai effectué la même expérience de chromatographie avec des versions mutantes de Grx4. Des mutants de Grx4 avec une délétion du domaine TRX ou dont la cystéine 35 (situé dans le domaine TRX) est substituée, n'empêchent pas Grx4 de se lier au fer. En fait, les extraits protéiques de ces mutants présentent la même couleur rouge-brune et le même profil spectrophotométrique qu'avec Grx4 de type sauvage. Par contre, un mutant de Grx4 pour la cystéine 172 (situé au domaine GRX) ne possède pas la couleur ni le spectre, indiquant l'absence de fer (figures 13). Ceci renforce l'hypothèse qu'un centre fer-soufre se formerait au domaine GRX et serait coordonné par la cystéine 172. Le mutant pour la cystéine 172 co-élué avec Php4 peut importer le statut en fer. Puisque la colonne amylose retient MBP-Grx4 ou MBP-Grx4 ayant la cystéine 172 mutées mais pas His6-Php4, la présence de Php4 dans l'éluion indique son interaction avec Grx4. Ces observations

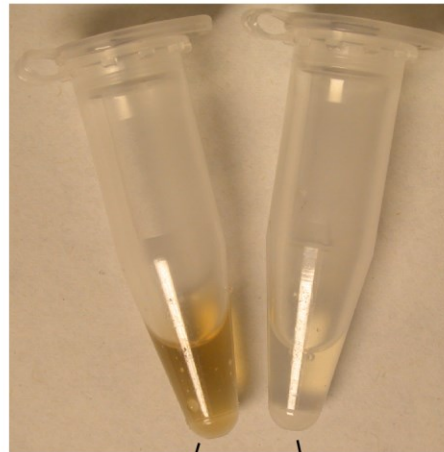
supportent mes résultats de double-hybride et de fluorescence par complémentation biomoléculaire présentés en section résultats.

L'hypothèse de la présence d'un centre fer-soufre de type [2Fe-2S] dans le complexe Php4-Grx4 chez *S. pombe* est basée sur des résultats publiés qui indiquent qu'un centre fer-soufre de ce type est retrouvé dans le complexe Fra2-Grx3/4 chez *S. cerevisiae* (LI *et al.*, 2009). Mais, la possibilité de la présence d'une espèce de fer différente pourrait aussi être responsable de la couleur et du spectre spectrophotométrique de mes extraits d'*E. coli* obtenus exprimant Php4 et Grx4. Des expériences plus poussées devront être entreprises pour confirmer la présence de centre fer-soufre de type [2Fe-2S]. La spectrométrie Mössbauer peut être utilisée pour déterminer le degré d'oxydation d'un atome de fer (RAVI *et al.*, 1994). Aussi, le fer et le soufre labile de l'échantillon peuvent être dosés et comparés l'un à l'autre dans le but de déterminer si leur ratio est de 1 (BEINERT, 1983).

La nature du complexe comprenant Php4 et Grx4 coordonnant un centre fer-soufre n'est jusqu'à maintenant pas complètement élucidée. Des résultats préliminaires de co-immunoprécipitation de Grx4 sous deux étiquètes différentes indique que Grx4 peut former un homodimère. Aussi, des extraits de cultures d'*E. coli* exprimant Grx4 sans Php4 présentent des caractéristiques de couleur et de spectrophotométrie UV semblables à celles observées pour un extrait contenant Php4 et Grx4. Grx4 peut donc former un homodimère coordonnant un centre fer-soufre. Grx3 et Grx4 de *S. cerevisiae* ont aussi cette propriété (LI *et al.*, 2009;PICCIOCCI *et al.*, 2007). Mes résultats sont donc difficiles à analyser, car il existe différent type de coordination du centre fer-soufre. Le centre fer-soufre peut être coordonné par Grx4 et Php4 dans un hétérodimère. Mais, il peut aussi être contenu par un homodimère de Grx4 interagissant avec Php4 (figure 10). À ce stade, je suis donc dans l'impossibilité d'affirmer si Php4 lie directement le centre fer-soufre. La comparaison des profils de spectrophotométrie UV d'extraits protéiques contenant Php4 et Grx4 ou Grx4 seul révèle une différence notable entre les deux profils. Pour Php4 et Grx4, le spectre possède un pic net à 408 nm, alors que dans le cas de Grx4 sans Php4 un pic est plutôt retrouvé à 416 nm (figure 13). Un changement dans le profil d'un spectre d'absorbance UV peut indiquer une différence au niveau de la coordination du centre fer-soufre (LI *et al.*, 2009). Puisque le

spectre correspondant à l'extrait contenant Php4 et Grx4 ne possède pas de pic à 416 nm, il est intéressant de considérer que le pic à 408 nm indique une coordination du centre fer-soufre entre Php4 et Grx4. L'absence de pic à 416 nm lorsque Php4 est absent permet de suggérer que Grx4 est plus stable en hétérodimère avec Php4 plutôt qu'en homodimère. En fait des résultats double-hybride permettent de constater que l'interaction VP16-Php4 avec LexA-Grx4 (1578 unités Miller) est plus forte que VP16-Grx4 avec LexA-Grx4 (379 unités Miller) (données non publiées).

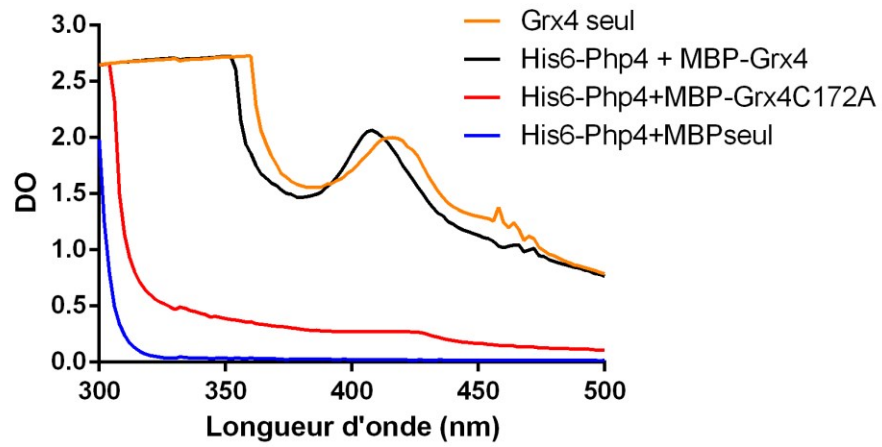
A



His6-Php4 + MBP-Grx4

His6-Php4 + Grx4C172A

B



C

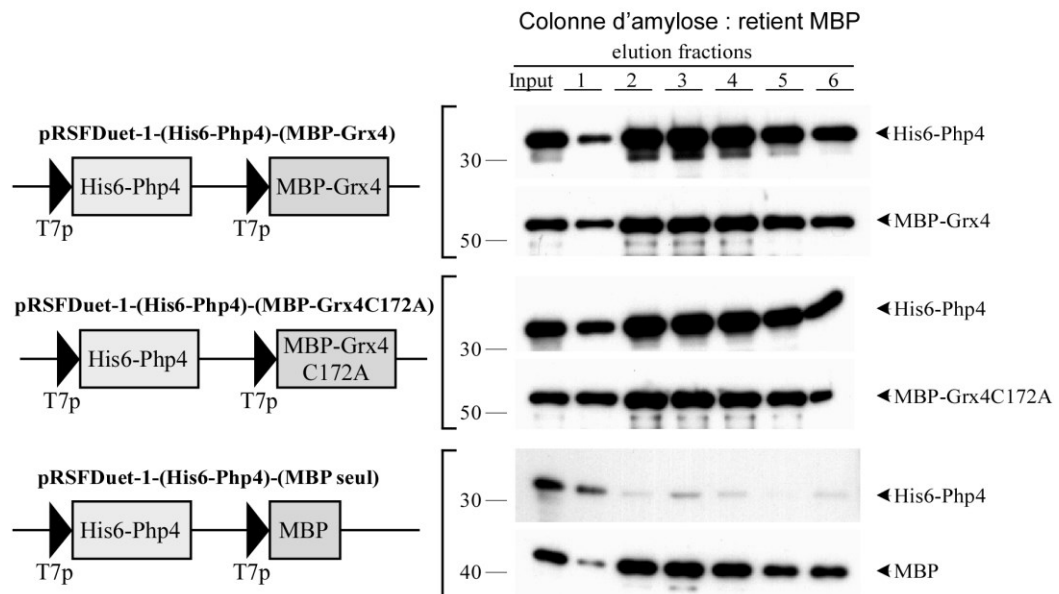


Figure 13 : Rôle de la cystéine 172 de Grx4 sur la coordination d'un centre fer-soufre.

Des souches d'*E. coli* BL21 sont transformées avec des plasmides permettant une co-induction de la production de His6-Php4 avec MBP-Grx4, MBP-Grx4 dont la cystéine 172 est mutée en alanine (Grx4C172A) ou MBP seul. Des extraits cellulaires sont soumis à une chromatographie d'affinité avec une colonne amylose qui retient le MBP et des fractions d'élution sont recueillies. En **A**, la fraction d'élution no3 obtenue à partir de la culture exprimant His6-Php4 et MBP-Grx4 est très colorée. Par opposition, la fraction provenant de la culture exprimant l'allèle muté de Grx4 pour la cystéine 172 (Grx4C172A) ne possède aucune coloration. **B**, Ces deux fractions ainsi que d'autres provenant de cultures transformées avec un plasmide contenant MBP-Grx4 seulement ou His6-Php4 et MBP seul sont analysées par un balayage d'absorbance de 300 à 500 nm. Des pics d'absorbance sont détectés à 408 nm pour His6-Php4 + MBP-Grx4 et 416 nm pour MBP-Grx4 seul. **C**, Les fractions d'élution et les extraits bruts (input) sont analysées par immunobuvardages de type Western pour détecter la présence de His6-Php4 et MBP-Grx4 ou variantes. Les chiffres à gauche des gels réfèrent à un marqueur de masse moléculaire (en kDa) et les anticorps utilisés pour révéler le gel sont indiqués à droite. His6-Php4 + MBP-Grx4 et His6-Php4 + MBP-Grx4C172A co-éluent dans des proportions équivalentes. Le plasmide codant pour His6-Php4 et MBP seul sert à vérifier qu'il n'y a pas d'interaction non-spécifique entre His6-Php4 et MBP.

Par contre, la différence entre 408 et 416 nm est assez mince et des expériences supplémentaires devront être effectuées pour déterminer avec précision la nature du complexe composé de Php4 et Grx4. Une expérience permettant d'étudier la composition du complexe protéique contenant le centre fer-soufre est la filtration sur gel de type FPLC. Cette technique permettra de déterminer la masse atomique totale du complexe en évaluant le volume d'élution. Ceci permettra donc de différencier si le complexe est un hétérodimère de Php4 et Grx4, un homodimère de Grx4 ou toutes autres possibilités, qui ont des masses différentes. Ultérieurement, le complexe contenant le centre fer-soufre devra être analysé par spectrométrie de masse pour conclure avec certitude de sa composition.

La connaissance de la composition du complexe protéique de Php4 et Grx4 est importante pour définir le mécanisme d'inactivation de Php4 et si le centre fer-soufre y participe directement. Puisque la présence de centres fer-soufre est une indication d'un statut cellulaire en fer, son arrivé au cœur de l'hétérodimère Php4 et Grx4 pourrait conduire directement à l'inhibition de Php4, en causant un changement de conformation, l'inactivant et le forçant à quitter le complexe Php2/3/5. Cette hypothèse, si elle est vérifiable, constituerait donc le lien entre l'augmentation de la concentration cellulaire en fer et

l'inactivation de Php4, ce qui permettrait l'expression des gènes consommateurs de fer. Un élément manquant à mon mécanisme d'inactivation de Php4 est l'identification d'une ou plusieurs autres protéines chaperonnes responsables du transfert d'un centre fer-soufre au complexe Php4-Grx4. L'inactivation de Php4 via Grx4 précède son exportation hors du noyau via Crm1 (MERCIER et LABBE, 2009). Donc le centre fer-soufre doit être acheminé jusqu'à l'intérieur du noyau. De plus, il a été proposé que le centre fer-soufre provienne d'une synthèse mitochondriale, car l'inactivation de cette voie de synthèse inhibe l'activité de Grx4 (MUHLENHOFF *et al.*, 2010). Il est connu que les glutarédoxines possèdent un rôle de chaperonne de centre fer-soufre; Grx4 pourrait potentiellement posséder ce rôle (ROUHIER *et al.*, 2010). Par contre, cette protéine pourrait difficilement effectuer le transport de centres fer-soufre, car elle est constitutivement en interaction forte avec Php4 qui est localisée au noyau. Si Grx4 est en quantité supérieure dans la cellule, elle pourrait toutefois transporter des centres fer-soufre en plus d'être présent dans le complexe avec Php4.

En conclusion, j'ai commencé mes travaux de recherche avec l'objectif de préciser le mécanisme d'inactivation de Php4 via Grx4 et de comprendre comment celui-ci répond au changement de niveau cellulaire en fer. J'ai répondu à mon objectif en identifiant une interaction différente entre Php4 et Grx4 selon le statut en fer. Grx4 possède les domaines TRX et GRX qui n'ont pas les mêmes propriétés d'interaction avec Php4 en carence ou en présence de fer. J'ai aussi avancé l'hypothèse de la formation d'un centre fer-soufre sur Php4 qui pourrait servir de signal de suffisance en fer. J'ai présenté des résultats préliminaires pour supporter cette idée et des expériences supplémentaires en perspectives pour la prouver et poursuivre le projet.

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche Simon Labbé pour m'avoir accepté en stage puis à la maîtrise dans son laboratoire. Il a été d'une grande aide en encadrant mes travaux et je le remercie aussi pour son support et pour m'avoir encouragé tout au long de ma maîtrise. Je tiens à souligner sa grande disponibilité pour les étudiants, son enthousiasme et qu'il est très dédié à notre réussite. Je tiens particulièrement à remercier Alexandre Mercier, ancien étudiant au doctorat de qui j'ai pris la relève du projet Php4. Il a été mon superviseur de stage et a continué à me superviser au début de ma maîtrise. Il m'a été d'une aide inestimable pour diriger mes travaux de recherche et me montrer les différentes techniques. Je remercie aussi Mehdi Jbel, autre ancien étudiant au doctorat, qui a travaillé sur un projet connexe au mien. Il m'a donné plusieurs conseils pour l'avancement de mes travaux. Je tiens à remercier l'assistant de recherche du laboratoire Jude Beaudoin pour son temps et aide technique précieuse. Je remercie également les autres membres du laboratoire actuels ou passés avec qui j'ai cohabité. Ils ont fourni conseils et amitié : Benoit Poulliot, Raphael Ioannoni, Jean-François Jacques, Samuel Plante et Md Gulam Musawwir Khan. J'aimerais remercier les membres de ma famille pour leur support moral et leurs encouragements : mon père Mario, ma mère Françoise et mes deux frères Pierre-Luc et Paul. Je remercie aussi les organismes subventionnaires le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la Fondation des Étoiles pour leur support financier. Finalement, j'aimerais remercier les membres du jury Dr Éric Massé et Dr Nicolas Gévry pour leur temps et d'avoir accepté de m'évaluer.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Alves, R., Herrero, E. and Sorribas, A.** (2004). Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism. II. role of glutaredoxin Grx5. *Proteins* **57**, 481-492.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D. M. and Kaplan, J.** (1994). The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**, 403-410.
- Askwith, C. and 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, C. and Kaplan, J.** (1998). Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 135-138.
- Beinert, H.** (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem.* **131**, 373-378.
- Berndt, C., Lillig, C. H. and Holmgren, A.** (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 641-650.
- Berndt C., Lillig C.H., Wollenberg M., Bill E., Mansilla M.C., de Mendoza D., Seidler A., Schwenn J.D.** (2004). Characterization and reconstitution of a 4Fe-4S adenylyl sulfate/phosphoadenylyl sulfate reductase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* **279**, 7850-7855.
- Blaiseau, P. L., Lesuisse, E. and Camadro, J. M.** (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 34221-34226.
- Bleackley, M. R. and Macgillivray, R. T.** (2011). Transition metal homeostasis: From yeast to human disease. *Biomaterials* **24**, 785-809.

Chao, L. Y., Marletta, M. A. and Rine, J. (2008). Sre1, an iron-modulated GATA DNA-binding protein of iron-uptake genes in the fungal pathogen *histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* **47**, 7274-7283.

Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R. and Kaplan, J. (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 29513-29518.

Chen, X. Z., Peng, J. B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N. and Hediger, M. A. (1999). Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* **274**, 35089-35094.

Chung, W. H., Kim, K. D. and Roe, J. H. (2005). Localization and function of three monothiol glutaredoxins in *schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 604-610.

Courel, M., Lallet, S., Camadro, J. M. and Blaiseau, P. L. (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.

Dailey, H. A., Finnegan, M. G. and Johnson, M. K. (1994). Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. *Biochemistry* **33**, 403-407.

De Silva, D. M., Askwith, C. C., Eide, D. and Kaplan, J. (1995). The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 1098-1101.

Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M. and 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, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. and Eide, D. J. (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. and 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.

Fagerstrom-Billai, F., Durand-Dubief, M., Ekwall, K. and Wright, A. P. (2007). Individual subunits of the Ssn6-Tup11/12 corepressor are selectively required for repression of different target genes. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1069-1082.

Fagerstrom-Billai, F. and Wright, A. P. (2005). Functional comparison of the Tup11 and Tup12 transcriptional corepressors in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 716-727.

Fladvad, M., Bellanda, M., Fernandes, A. P., Mammi, S., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A. and Sunnerhagen, M. (2005). Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Grx4, a monothiol glutaredoxin from *escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 24553-24561.

Fernandes A. P. and Holmgren A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal.* **6**, 63-74.

Forsburg, S. L. (2005). The yeasts *saccharomyces cerevisiae* and *schizosaccharomyces pombe*: Models for cell biology research. *Gravit Space Biol. Bull.* **18**, 3-9.

Forsburg, S. L. and Guarente, L. (1989). Identification and characterization of HAP4: A third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **3**, 1166-1178.

Gerber, J., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906-911.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M. et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-7.

- Haas, H., Eisendle, M. and Turgeon, B. G.** (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 149-187.
- Haas, H., Zadra, I., Stoffler, G. and 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.
- Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S. I.** (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**, 2232-2237.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.** (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. an update. *FEBS Lett.* **307**, 108-112.
- Hassett, R., Dix, D. R., Eide, D. J. and Kosman, D. J.** (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.
- Hassett, R. F., Yuan, D. S. and Kosman, D. J.** (1998). Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from saccharomyces cerevisiae, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 23274-23282.
- Herrero, E. and de la Torre-Ruiz, M. A.** (2007). Monothiol glutaredoxins: A common domain for multiple functions. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 1518-1530.
- Heymann, P., Ernst, J. F. and 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.
- Heymann, P., Ernst, J. F. and Winkelmann, G.** (2000a). A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in saccharomyces cerevisiae. *Biometals* **13**, 65-72.

Heymann, P., Ernst, J. F. and Winkelmann, G. (2000b). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 221-227.

Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thon, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner, E. R. et al. (2007). Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* **26**, 3157-3168.

Ihrig, J., Hausmann, A., Hain, A., Richter, N., Hamza, I., Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2010). Iron regulation through the back door: Iron-dependent metabolite levels contribute to transcriptional adaptation to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **9**, 460-471.

Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D. A., Ferrer, J. L., Chauvat, F. and Jacquamet, L. (2009). Structural basis for delivery of the intact [Fe₂S₂] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* **48**, 6041-6043.

Izquierdo, A., Casas, C., Muhlenhoff, U., Lillig, C. H. and Herrero, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot. Cell.* **7**, 1415-1426.

Jbel, M., Mercier, A. and Labbe, S. (2011). Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. *Eukaryot. Cell.* **10**, 629-645.

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

Johansson, C., Kavanagh, K. L., Gileadi, O. and Oppermann, U. (2007). Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 3077-3082.

- Jung, W. H., Sham, A., White, R. and Kronstad, J. W.** (2006). Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* **4**, e410.
- Kaplan, J.** (2002). Mechanisms of cellular iron acquisition: Another iron in the fire. *Cell* **111**, 603-606.
- Kaplan, J., McVey Ward, D., Crisp, R. J. and Philpott, C. C.** (2006). Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 646-651.
- Kellis, M., Birren, B. W. and Lander, E. S.** (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624.
- Kim, K. D., Chung, W. H., Kim, H. J., Lee, K. C. and Roe, J. H.** (2010). Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 467-472.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R.** (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981-3989.
- Kosman, D. J.** (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. [review] [74 refs]. *Mol. Microbiol.* **47**, 1185-1197.
- Kumanovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D. et al.** (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 10276-10286.
- Kwok, E. Y., Severance, S. and Kosman, D. J.** (2006). Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane. *Biochemistry* **45**, 6317-6327.

- Labbe, S., Pelletier, B. and Mercier, A.** (2007). Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biometals* **20**, 523-537.
- Lan, C. Y., Rodarte, G., Murillo, L. A., Jones, T., Davis, R. W., Dungan, J., Newport, G. and Agabian, N.** (2004). Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **53**, 1451-1469.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P. L., Dancis, A. and Camadro, J. M.** (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**, 289-298.
- Lesuisse, E., Crichton, R. R. and Labbe, P.** (1990). Iron-reductases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 253-259.
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P. J., Winge, D. R., Johnson, M. K. and Outten, C. E.** (2011). Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 867-876.
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffman, B. M., Riggs-Gelasco, P. J., Huynh, B. H., Johnson, M. K. and Outten, C. E.** (2009). The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**, 9569-9581.
- Li, H. and Outten, C. E.** (2012). Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* **51**, 4377-4389.
- Li, L., Bagley, D., Ward, D. M. and 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, O. S., McVey Ward, D. and Kaplan, J.** (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 29515-29519.

Li, L., Jia, X., Ward, D. M. and Kaplan, J. (2011). Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *J. Biol. Chem.* **286**, 38488-38497.

Lillig, C. H., Berndt, C. and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1304-1317.

Lodi, R., Tonon, C., Calabrese, V. and Schapira, A. H. (2006). Friedreich's ataxia: from disease mechanisms to therapeutic interventions. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 438-443.

Martin, J. L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245-250.

McNabb, D. S. and Pinto, I. (2005). Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 1829-1839.

McNabb, D. S., Tseng, K. A. and 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.

Meister, A. (1994). Glutathione-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals. *J. Biol. Chem.* **269**, 9397-9400.

Mercier, A. and Labbe, 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. and Labbe, S. (2010). Iron-dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3806-3817.

Mercier, A., Pelletier, B. and Labbe, 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. and Labbe, 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.

Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F. and Reichheld, J. P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: Unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 335-367.

Muhlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E. et al. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell. Metab.* **12**, 373-385.

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

Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R. and Winge, D. R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 17661-17669.

Pedro-Segura, E., Vergara, S. V., Rodriguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D. J. and 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. and Labbe, 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, C. C. and Labbe, 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, K. A. and Labbe, S.** (2005). Functional characterization of the iron-regulatory transcription factor Fep1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **280**, 25146-25161.
- Philpott, C. C.** (2006). Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 636-645.
- Philpott, C. C. and Protchenko, O.** (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **7**, 20-27.
- Philpott, C. C., Protchenko, O., Kim, Y. W., Boretsky, Y. and Shakoury-Elizeh, M.** (2002). The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 698-702.
- Picciochi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F.** (2007). CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* **46**, 15018-15026.
- Plattner, H. J. and Diekmann, H.** (1994). Enzymology of siderophore biosynthesis in fungi. In *Metal Ions in Fungi* (ed. G. Winkelmann and D. R. Winge), pp. 99-117. New York: Decker.
- Pouliot, B., Jbel, M., Mercier, A. and Labbe, S.** (2010). *abc3+* encodes an iron-regulated vacuolar ABC-type transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell.* **9**, 59-73.
- Prouteau, M., Daugeron, M. C. and Seraphin, B.** (2008). Regulation of ARE transcript 3' end processing by the yeast Cth2 mRNA decay factor. *EMBO J.* **27**, 2966-2976.
- Puig, S., Askeland, E. and Thiele, D. J.** (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**, 99-110.
- Puig, S., Vergara, S. V. and Thiele, D. J.** (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. and de la Torre-Ruiz, M. A.** (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **119**, 4554-4564.
- Ravi, N., Bollinger, J. M., Huynh, B. H., Stubbe, J. and Edmondson, D. E.** (1994). Mechanism of Assembly of the Tyrosyl Radical-Diiron(III) Cofactor of E. Coli Ribonucleotide Reductase: 1. Moessbauer Characterization of the Diferric Radical Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8007–8014.
- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J. and Klausner, R. D.** (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* 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.
- Rouault, T. A., and Tong, W. H.** (2008) Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet.* **24**, 398-407.
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M. K. and Jacquot, J. P.** (2010). Glutaredoxins: Roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 43-52.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O. and Winge, D. R.** (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14322-14327.
- Rutherford, J. C., Jaron, S. and Winge, D. R.** (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 27636-27643.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R. and Winge, D. R.** (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 10135-10140.

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

Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P. O., Botstein, D. and Philpott, C. C. (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1233-1243.

Singh, A., Kaur, N. and Kosman, D. J. (2007). The metalloreductase Fre6p in fe-efflux from the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **282**, 28619-28626.

Spiro, T. G., Allerton, S. F., Renner, J., Terzis, A., Bils, R. and Saltman, P. (1966). The hydrolytic polymerization of iron (III). *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2721-2725.

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

Sybirna, K., Guiard, B., Li, Y. F., Bao, W. G., Bolotin-Fukuhara, M. and 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.

Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K. and 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, J. L. and Piper, R. C. (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.

Vilella, F., Alves, R., Rodriguez-Manzaneque, M. T., Belli, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P. and Herrero, E. (2004). Evolution and cellular function of monothiol

glutaredoxins: Involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp. Funct. Genomics* **5**, 328-341.

Wang, T. P., Quintanar, L., Severance, S., Solomon, E. I. and Kosman, D. J. (2003). Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 611-620.

Watson, A. D., Edmondson, D. G., Bone, J. R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D. J. and Roth, S. Y. (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev.* **14**, 2737-2744.

Wolfe, K. H. and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S. et al. (2002). The genome sequence of *schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.

Wu, J., Suka, N., Carlson, M. and Grunstein, M. (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell* **7**, 117-126.

Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A. and Klausner, R. D. (1995). AFT1: A mediator of iron regulated transcriptional control in *saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 1231-1239.

Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A. and Klausner, R. D. (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. and Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 18914-18918.

Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E. and Philpott, C. C. (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, C. W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J. and Philpott, C. C. (2000a). Desferrioxamine-mediated iron uptake in *saccharomyces cerevisiae*. evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **275**, 10709-10715.

Yun, C. W., Tiedeman, J. S., Moore, R. E. and Philpott, C. C. (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. and Labbe, S. (2004). The *schizosaccharomyces pombe* corepressor Tup11 interacts with the iron-responsive transcription factor Fep1. *J. Biol. Chem.* **279**, 9462-9474.

