

Université de Montréal

**La calnexine : un élément clé dans l'apoptose chez la
levure *Schizosaccharomyces pombe***

par

Renée Guérin

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor (Ph. D.)*
en biochimie

Décembre 2008

© Renée Guérin, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
La calnexine : un élément clé dans l'apoptose
chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

présentée par :
Renée Guérin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Boileau, président-rapporteur
Dr. Luis A. Rokeach, directeur de recherche
Dr. Pierre Belhumeur, membre du jury
Dr. Jeffrey Brodsky, examinateur externe
Dr. Muriel Aubry, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La mort cellulaire programmée (PCD pour Programmed Cell Death) est un processus essentiel aux cellules. Le PCD a d'abord été caractérisé dans le développement cellulaire et peut être divisé en plusieurs groupes selon les caractéristiques observées. L'apoptose, un sous-groupe du PCD, est caractérisé par plusieurs distinctions morphologiques et signalétiques attribué tout d'abord aux organismes complexes pour son rôle dans le développement et dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Depuis la dernière décennie, de nombreuses études font état de l'existence d'un programme apoptotique dans des organismes unicellulaires comme les levures. Ce programme apoptotique a surtout été étudié chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* et partage certaines caractéristiques avec l'apoptose des mammifères. Par contre, l'apoptose associé aux levures est distinct à certains égards entre autre par l'absence de certains homologues présents chez les mammifères. L'intérêt au niveau de l'étude du phénomène apoptotique chez les levures est sans cesse grandissant par la facilité avec laquelle les levures peuvent être utilisées comme système modèle.

L'apoptose peut être induit dans les cellules de différentes façons en réponse à des stimuli internes ou externes. L'accumulation de protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) causant un stress est un inducteur bien caractérisé de la voie apoptotique. La signalisation de l'apoptose dans un cas de stress au RE fait appel aux transducteurs des signaux de la voie du UPR (Unfolded Protein Response). Récemment, il a été montré que la calnexine, une chaperone transmembranaire du RE connue et

caractérisée surtout pour ses fonctions d'aide au repliement des protéines et au contrôle de qualité, joue un rôle dans la transduction du signal apoptotique en réponse au stress du RE chez mammifères. Le rôle de la calnexine dans ce cas consiste principalement en l'échafaudage pour le clivage par la caspase 8 de la protéine apoptotique Bap31.

Nous avons tout d'abord démontré que le stress du RE et que la déficience en inositol, un précurseur essentiel de nombreuses molécules signalétiques, sont deux inducteurs de l'apoptose chez la levure *S. pombe*. Ces deux voies semblent induire l'apoptose par deux voies distinctes puisque seule la voie de la déficience en inositol induit l'apoptose de façon dépendante à la métacaspase Pca1p. La calnexine, essentielle à la viabilité chez la levure *S. pombe*, est impliquée dans ces deux phénomènes apoptotiques. L'apoptose induit par le stress du RE nécessite une version de la calnexine ancrée à la membrane du RE pour être optimal. De façon opposée, l'apoptose induit par une déficience en inositol nécessite la présence de la queue cytosolique ancrée à la membrane de la calnexine pour être retardé. Ces deux actions différentes imputables à une même protéine laisse croire à une double fonction pro et anti-apoptotique de celle-ci. Suite à la découverte de l'existence d'un clivage endogène de la calnexine en situation normale de croissance, un modèle a été élaboré expliquant les rôles distincts de la calnexine dans ces deux voies apoptotiques. Ce modèle fait état d'un rôle associé au clivage de la calnexine dans l'apoptose.

Mots clés: Mort cellulaire programmée, Programmed Cell Death (PCD), Réticulum Endoplasmique (RE), Apoptose, Stress du RE, Calnexine, Levure, Inositol, Clivage.

ABSTRACT

Programmed Cell Death (PCD) is an essential process to the cells. PCD was first characterized in cell development and can be separated in sub-groups depending of cell death characteristics observed. Apoptosis is one of the PCD sub-groups that was first associated to complex organisms for its roles in cell development and in maintenance of tissues integrity. The apoptotic pathway is characterized by specific morphological and signalization characteristics. In the last ten years, numerous studies demonstrated the existence of apoptosis in unicellular organisms such as yeast. This apoptotic program was extensively studied in the two yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* and share characteristics with the mammalian one. However, yeast apoptosis is distinctive at many points as yeast do not encodes all the mammalian homologues of the apoptotic pathway. Although yeast and mammalian apoptosis seems to differs, the interest about yeast apoptosis is growing given that yeast is an excellent and easily tractable model system.

External and internal stimuli can induce apoptosis by different ways. Accumulation of unfolded or incompletely folded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) causing ER stress is a well-known inducer of the apoptotic pathway. Signalization of ER-stress induced apoptosis involves the same transducers than the UPR (Unfolded Protein Response) pathway. It was recently shown that calnexin, a transmembrane chaperone of

the ER, is implicated in ER-stress apoptosis in mammalian cells. In this particular case, it was demonstrated that calnexin acts as a scaffold in the cleavage of the apoptotic protein Bap31 by caspase 8.

We demonstrated that ER stress and inositol deficiency, a precursor of many important signalization molecules, are two situations leading to apoptosis in the yeast *S. pombe*. These two pathways leading to apoptosis seems to differ as only inositol deficiency is dependant of the yeast metacaspase Pca1p. We also demonstrated that *S. pombe* calnexin, essential for cell viability of this yeast, takes part in these two apoptotic process. ER stress induced apoptosis needs a calnexin anchors to the ER membrane to be efficient. However, apoptosis induced by inositol starvation needs the calnexin C-terminal tail with the transmembrane domain to be delayed. These two opposite actions from the same protein lead to the hypothesis that calnexin encodes both pro and anti-apoptotic functions. By the discovery that calnexin is cleaved under normal culture conditions, a model was elaborated explaining the distinctive roles of calnexin in these two apoptotic pathways. This model proposed a role of calnexin cleavage to apoptosis.

Key words: Programmed Cell Death (PCD), Endoplasmic reticulum (ER), Apoptosis, ER stress, Calnexin, Yeast, Inositol, Cleavage.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr. Luis A. Rokeach. Il a été le premier à croire en mes qualités scientifiques et sans sa confiance, cette présente thèse n'existerait pas.

Des remerciements vont également aux membres de mon comité de thèse, Dr. Guy Boileau, Dr. Gerardo Ferbeyre et Dr. Luis A. Rokeach, qui m'ont suivi et m'ont aidé.

Merci ensuite à tous les membres de mon laboratoire qui font partis maintenant du passé ou du présent : Philippe Collin, Pierre-Luc Tanguay, Alexandre Maréchal, Fadi Hajjar, Alexandre Leroux, Antoine Roux, Patrick Sénéchal, Frédéric Montpetit. Un merci tout particulier à Cynthia Turcotte et Geneviève Arseneault pour leur amitié. Un merci spécial à ma collègue Pascale B. Beauregard, une personne avec un grand talent scientifique et une personnalité merveilleuse parfois bien cachée. Les discussions avec toi me manqueront.

Merci aux membres des laboratoires des Dr. Pascal Chartrand, Dr. James G. Omichinski, Dr. Normand Brisson et Dr. Brakier-Gingras pour leur aide autant technique que idéologique. Plus particulièrement, un merci à Nicolas Paquin, Frank Gallardo, Karine Gendron, Geneviève Arseneault et Alexandre Maréchal.

Des remerciements vont également aux membres de mon présent jury de thèse pour l'évaluation qu'ils vont en faire.

Finalement, merci infiniment à ma famille et à mes amis. Mes parents, qui n'ont pas toujours compris la finalité de tout ça mais qui m'ont donné tout ce qu'ils pouvaient afin de me rendre la vie plus facile. Mon frère, qui m'a confronté souvent afin que je sois certaine de mes choix. Un gros merci à mes beaux-parents et en particulier à Marie-France Desbiens qui a été un guide. Et en tout dernier lieu, des remerciements à mon amour, Frédéric Bhérer, qui a été depuis le tout début mon ami, mon chum et enfin mon mari. Cette thèse est son œuvre dans la mesure où il a forgé ce que je suis en ne me quittant pas, en croyant en moi et en continuant à m'aimer malgré tout.

*À tous ceux qui m'ont assez aimé pour que
j'y arrive...*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
REMERCIEMENTS	vii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xviii
LISTE DES FIGURES.....	xix
INTRODUCTION	1
1.1 Le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique.....	2
1.1.1 Le réticulum endoplasmique	2
1.1.2 Ciblage et translocation des protéines nouvellement synthétisées.....	4
1.1.3 Protéines impliquées dans le repliement des protéines	7
1.1.4 La voie du ERAD (ER-Associated Degradation)	15
1.2 La voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique, le UPR.....	22
1.2.1 IRE1	24
1.2.2 PERK	27
1.2.3 ATF6	30
1.2.4 Globalisation des effets du UPR	34
1.2.5 Le UPR sans le stress	38
1.2.6 Les maladies et la voie du UPR	40
1.3 La mort cellulaire programmée	42
1.4 L'autophagie	43
1.4.1 Les étapes menant à l'autophagie	45
1.4.2 Les rôles associés à l'autophagie	49
1.4.3 L'autophagie et la mort cellulaire	52
1.5 L'apoptose.....	54

1.5.1 Les caspases	55
1.5.2 La voie extrinsèque	60
1.5.3 La voie intrinsèque.....	61
1.5.4 La voie apoptotique du RE.....	63
1.6 L'apoptose chez les levures	68
1.6.1 La levure comme outil d'expression hétérologue pour l'étude de l'apoptose ...	71
1.6.2 Conditions menant à l'apoptose chez les levures.....	72
1.6.3 Conditions naturelles menant à l'apoptose chez les levures.....	74
1.6.4 Protéines impliquées dans l'apoptose chez les levures.....	76
1.6.5 La mitochondrie dans l'apoptose chez les levures.....	82
1.7 L'apoptose chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	83
1.7.1 <i>S. pombe</i> comme organisme modèle dans l'étude de l'apoptose.....	83
1.7.2 Homologues de protéines apoptotiques encodés par la levure <i>S. pombe</i>	84
1.7.3 Conditions physiologiques menant à l'induction de l'apoptose chez <i>S. pombe</i>	86
1.8 L'implication de la calnexine dans l'apoptose.....	90
1.9 Données du laboratoire et hypothèses de l'auteure.....	92
CHAPITRE 2: Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast	99
2.1 ABSTRACT.....	102
2.2 INTRODUCTION	103
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	109
2.3.1 Yeast strains, media, and vectors	109
2.3.2 Construction of <i>cnx1</i> mutants and plasmids	110
2.3.3 Plasmid shuffling and viability of calnexin mutants.....	112
2.3.4 Membrane extraction	112
2.3.5 Immunoprecipitations	113
2.3.6 Immunoblotting.....	113
2.3.7 Genetic screen for suppressors of the lethality of overexpression of calnexin	114

2.3.8 Apoptosis induction assays	114
2.3.9 Viability Assays	115
2.3.10 Detection of Apoptotic Markers	116
2.3.11 Flow Cytometry analyses.....	119
2.3.12 Statistical analyses	119
2.4 RESULTS	120
2.4.1 Overexpression of wild-type calnexin causes cell death in <i>S. pombe</i>	120
2.4.2 Cells dying from overexpression of calnexin display typical apoptotic features	122
2.4.3 The transmembrane domain (TM) of calnexin is required for the induction of apoptotic death by overexpression.....	123
2.4.4 Calnexin is involved in ER-stress induced apoptosis	126
2.4.5 The <i>S. pombe</i> metacaspase Pca1p and the homologue of Bap31 are not required for the induction of apoptosis by calnexin overexpression.....	128
2.4.6 The <i>S. pombe</i> homologue of human HMGB1 prevents apoptosis due to calnexin overexpression	130
2.4.7 Overexpression of human calnexin induces apoptosis in <i>S. pombe</i>	131
2.5 DISCUSSION	133
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	142
2.7 FIGURE LEGENDS	143
2.8 REFERENCES.....	154
CHAPITRE 3: Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Inositol Starvation in Fission Yeast.....	179
3.1 ABSTRACT.....	182
3.2 INTRODUCTION	183
3.3 RESULTS	189
3.3.1 Inositol starvation induces apoptotic cell death in <i>S. pombe</i>	189

3.3.2 The metacaspase Pca1p is required to mediate apoptosis induced by inositol starvation.....	190
3.3.3 The UPR transducer Ire1p affects the apoptosis induced by inositol starvation	191
3.3.4 A luminal version of calnexin is more sensitive to apoptosis induced by inositol starvation.....	192
3.3.5 Co-expression of the cytosolic tail and TM with luminal_Cnx1p reduces the sensitivity to inositol starvation	193
3.3.6 Calnexin is cleaved within the luminal domain under normal culture conditions	194
3.4 DISCUSSION	197
3.5 MATERIALS AND METHODS.....	205
3.5.1 Yeast strains, media, and vectors	205
3.5.2 Inositol Starvation.....	205
3.5.3 Immunoblotting.....	206
3.5.4 Gel-filtration chromatography	206
3.5.5 Mass spectrometry analysis.....	207
3.5.6 Viability Assays	207
3.5.7 Calcofluor staining.....	208
3.5.8 Detection of Apoptotic Markers.....	208
3.5.9 Flow Cytometry Analyses.....	209
3.5.10 Statistical Analysis.....	210
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	211
3.7 REFERENCES.....	212
3.8 FIGURE LEGENDS	224
DISCUSSION	237
4.1 L'apoptose induit par le stress du RE chez la levure <i>S. pombe</i>	238
4.1.1 La calnexine dans l'apoptose induit par le stress du RE.....	239

4.2 La voie de l'inositol et l'apoptose chez la levure <i>S. pombe</i>	250
4.2.1 Le rôle de la calnexine dans l'apoptose induite par une déficience en inositol	255
4.3 Le rôle du clivage de la calnexine dans l'apoptose chez <i>S. pombe</i>	259
4.3.1 Modèle de l'implication de la calnexine dans l'apoptose	260
4.3.2 Voie cellulaire responsable du clivage de la calnexine	267
CONCLUSIONS	270
BIBLIOGRAPHIE	272
ANNEXES	I
ANNEXE 1: A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin	II
SUMMARY	IV
INTRODUCTION	V
RESULTS	X
DISCUSSION	XXII
EXPERIMENTAL PROCEDURES	XXVII
ACKNOWLEDGEMENTS	XXXIV
FIGURE LEGENDS	XXXV
ANNEXE II : Accord des coauteurs (Article 1, Chapitre2) Error!	Bookmark not defined.
ANNEXE III : Accord des coauteurs (Article 2, Chapitre 3) Error!	Bookmark not defined.
ANNEXE IV : Accord des coauteurs (Article 3, Annexe I) Error!	Bookmark not defined.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C :	degré Celsius
µg :	microgramme
µl :	microlitre
µM :	micromolaire
aa :	amino acid
ADN (DNA en anglais) :	acide déoxyribonucléique
ARN (RNA en anglais) :	acide ribonucléique
ARNm (mRNA en anglais) :	acide ribonucléique messenger
BiP :	immunoglobulin binding protein
C-terminal :	carboxy-terminal
<i>cnx1</i> ⁺ :	<i>S. pombe</i> gene encoding calnexin

Cnx1p:	<i>S. pombe</i> calnexin
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHR123:	dihydrorhodamine123
DO (OD en anglais):	densité optique
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ERAD :	ER-associated degradation
FITC-VAD-FMK :	valyl-alanyl-aspartyl-[<i>O</i> -methyl]-fluoromethylketone
h:	heure
hcd:	highly conserved central domain
hsp:	heat shock protein
kDa:	kilodalton
L:	litre
mg:	milligramme
min:	minute
ml:	millilitre
nM :	nanomolaire
N-terminal :	amino-terminal
PBS:	phosphate buffered saline

PCR:	polymerase chain reaction
PDI:	protein-disulfide isomerase
RE (ER en anglais):	réticulum endoplasmique
ROS:	reactive oxygen species
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i> :	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SR :	SRP receptor
SRP :	Signal recognition particle
TM:	transmembrane domain
ts:	thermosensible
TUNEL :	Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling
UPR:	unfolded protein response
WT:	wild type

LISTE DES TABLEAUX

Table I. Résumé des maladies de la voie du repliement des protéines dans le RE.....	41
Table II. Strains used in this study.....	167
Table III. Strains used in this study.....	230
Table IV. Strains used in this study.....	XLVII
Table V. Overexpression of <i>cif1</i> ⁺ induces the Cin _{cif1} state.....	XLIX
Table VI. Cin _{cif1} is partially dominant in diploid cells.....	XLIX
Table VII. <i>cif1</i> ⁺ is not required for the induction of the Cin _{Δhcd_cnx1} state.....	L
Table VIII. <i>cif1</i> ⁺ is not required for the maintenance of either Cin state.....	L

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de la calnexine/calréticuline dans le repliement des glycoprotéines.....	13
Figure 2 : La voie du UPR chez les mammifères.	33
Figure 3 : Liaison entre autophagie et mort cellulaire.	53
Figure 4 : Représentation d'une cellule de levure en apoptose.....	70
Figure 5 : Représentation schématique des multiples voies de morts cellulaires liées à la lipotoxicité chez <i>S. pombe</i>	89
Figure 6 : Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine luminal de la calnexine de mammifères.....	94
Figure 7 : Résumé de la structure protéique linéaire des différents mutants de la calnexine construits au laboratoire au cours de différentes études.....	96
Figure 8: Overexpression of <i>cnx1</i> ⁺ induces cell death.....	168
Figure 9: The overexpression of calnexin induces typical apoptotic phenotypes.....	169
Figure 9 (suite): The overexpression of calnexin induces typical apoptotic phenotypes ..	170
Figure 10: The transmembrane domain (TM) is required to induce cell death by overexpression of calnexin.....	171
Figure 11: The TM of calnexin is required for induction of apoptotic cell death due to overexpression.	172
Figure 12: Involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis in <i>S. pombe</i>	173
Figure 12 (suite): Involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis in <i>S. pombe</i>	174
Figure 13: The <i>S. pombe</i> metacaspase Pca1p and the homologue of Bap31 are not required for apoptosis induced by calnexin overexpression.....	175
Figure 14: The <i>S. pombe</i> homologue of the human antiapoptotic HMGB1 inhibits apoptotic death induced due to calnexin overexpression.....	176
Figure 15: Overexpression of human calnexin induces apoptotic death in <i>S. pombe</i>	177
Supplementary Figure 1: Calnexin overexpression do not disrupts ER membranes.....	178

Figure 16: Inositol starvation induced apoptotic cell death	231
Figure 17: The metacaspase Pca1p is required for apoptosis induced by inositol starvation	232
Figure 18: The UPR transducer Ire1p affects the apoptosis induced by inositol starvation	233
Figure 19: Increased apoptosis induced by inositol starvation in cells expressing a calnexin mutant lacking its TMD and cytosolic tail.....	234
Figure 20: The expression of the C-term TM _Cnx1p_cmyc mutant reverses the increase in apoptosis induced by inositol starvation of the <i>lumenal_cnx1</i> strain.....	235
Figure 21: Calnexin is cleaved in the luminal domain under normal conditions.....	236
Figure 22: Clivage de la calnexine en conditions apoptotiques.....	262
Figure 23: Modèle du mécanisme d'action de la calnexine dans différentes situations cellulaires.....	266
Figure 24: Courbe de croissance et cinétique de clivage de la calnexine dans les cellules <i>isp6</i> ⁺ et Δ <i>isp6</i>	269
Figure 25: Primary structure of Cif1p.....	LI
Figure 26: <i>Cin</i> _{<i>cif1</i>} cells display phenotypic differences with <i>Cin</i> _{Δ<i>hcd_cnx1</i>} cells.....	LII
Figure 26 (suite): <i>Cin</i> _{<i>cif1</i>} cells display phenotypic differences with <i>Cin</i> _{Δ<i>hcd_cnx1</i>} cells	LIII
Figure 27: <i>cif1</i> ⁺ is unessential for vegetative growth.	LIV
Figure 28: Nucleolar localization of Cif1p is abolished by the KRKR ₂₇₋₃₀ /AAAA mutation.	LV
Supplementary Figure 2: Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay.....	LVI
Supplementary Figure 3: The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the <i>Cin</i> _{Δ<i>hcd_cnx1</i>} or <i>Cin</i> _{<i>cif1</i>} states.	LVII
Supplementary Figure 4: Cif1p forms fibers in vitro.....	LVIII
Supplementary Figure 5: Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR _{27- 30} /AAAA-Venus.....	LIX

Supplementary Figure 6: Cif1p and Cnx1p do not co-immunoprecipitate. LX

INTRODUCTION

J'ai découvert au fil du temps qu'ont duré mes études graduées que l'ouverture d'esprit était un pré-requis à la découverte scientifique. Mes recherches m'ont amenée bien plus loin d'où elles avaient commencées, ce qui m'a permis de voyager à travers nombre de processus cellulaires différents. L'introduction à ma thèse se veut un résumé des diverses voies cellulaires rencontrées au cours de ce voyage.

1.1 Le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique

1.1.1 Le réticulum endoplasmique

La compartimentalisation cellulaire est une des nombreuses caractéristiques permettant une distinction claire entre les cellules du règne procaryote versus les cellules eucaryotes. En effet, l'évolution vers les cellules eucaryotes a établi un environnement intracellulaire des plus diversifié permettant l'avènement de nombreux processus cellulaires distincts les uns des autres à l'intérieur d'une même cellule. Par contre, la structure même des organelles d'une cellule permet une étroite collaboration entre ceux-ci laissant libre cours à l'interrelation entre les processus cellulaires. Le Réticulum Endoplasmique (RE), un réseau membranaire élaboré en continuité avec la membrane nucléaire et en lien avec l'appareil de Golgi et les vésicules, constitue le siège de processus vitaux à la cellule tels la

biosynthèse des lipides et des stérols, la régulation du calcium et le repliement des protéines dirigées à la membrane ou destinées à la sécrétion (Matlack *et al.*, 1998; Meldolesi and Pozzan, 1998; Ma and Hendershot, 2001; McMaster, 2001). Ce réseau membranaire est divisé en deux structures qui sont le réticulum endoplasmique lisse et le rugueux (Baumann and Walz, 2001; Voeltz *et al.*, 2002; Estrada de Martin *et al.*, 2005). Le réticulum endoplasmique lisse est associé le plus souvent à la synthèse des lipides et des stérols et au contrôle des niveaux calciques alors que le réticulum endoplasmique rugueux, dénommé rugueux à cause de la présence de ribosomes à la surface membranaire qui donnent cet aspect, est associé au repliement des protéines (Sitia and Meldolesi, 1992; Baumann and Walz, 2001; Voeltz *et al.*, 2002; Estrada de Martin *et al.*, 2005). La lumière du réticulum endoplasmique est une espace hautement oxydatif et possède un taux élevé de calcium (Hwang *et al.*, 1992; Sitia and Meldolesi, 1992; Baumann and Walz, 2001; Voeltz *et al.*, 2002; Hebert and Molinari, 2007). Ces conditions qui semblent agressives au premier abord constituent en fait des conditions optimales au repliement des protéines membranaires et sécrétées puisqu'elles sont similaires aux conditions retrouvées dans le milieu extracellulaire. Bien qu'il ait été montré par essais *in vitro* que chaque protéine possède la capacité intrinsèque d'acquérir sa forme tridimensionnelle nécessaire à son bon fonctionnement, le repliement des protéines *in vivo* est un processus élaboré faisant intervenir de nombreux joueurs permettant l'optimisation de la qualité, de l'efficacité et de la vitesse du repliement (Anfinsen *et al.*, 1961; Anfinsen, 1973; Hebert and Molinari, 2007).

1.1.2 Ciblage et translocation des protéines nouvellement synthétisées

La synthèse des protéines membranaires et sécrétées se déroule à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux conférant ainsi la proximité nécessaire à la translocation des polypeptides naissants dans la lumière du RE. La translocation des protéines naissantes se déroule pour la plupart des organismes de façon co-traductionnelle. Par contre, une translocation post-traductionnelle conjointe à la translocation co-traductionnelle est observée chez les procaryotes et certains eucaryotes comme c'est le cas pour les levures.

Les protéines entrant dans la voie de sécrétion contiennent un signal de ciblage au RE habituellement situé du côté N-terminal de la protéine (Keenan *et al.*, 2001; Pool, 2005). Ce signal particulier est composé habituellement de 6-20 acides aminés hydrophobiques précédés de résidus basiques du côté N-terminal et est habituellement clivé lors de la translocation. En ce qui concerne les protéines ciblées à la membrane transitant dans le RE, celles-ci sont insérées dans la double couche lipidique par reconnaissance d'un signal d'arrêt de transfert ou une séquence signal d'ancrage à la membrane. Les polypeptides naissants nécessitant un transit à travers le RE possèdent un peptide signal en N-terminal permettant la reconnaissance de ceux-ci et leur ciblage au RE. La majorité des protéines sécrétées et des protéines membranaires chez les mammifères sont transloquées de façon co-traductionnelle à la membrane par un processus impliquant un complexe

ribonucléoprotéique cytosolique (SRP pour Signal Recognition Particle)) et son récepteur à la membrane (SR pour SRP receptor). La liaison du complexe SRP au peptide signal du polypeptide naissant inhibe la traduction par le ribosome jusqu'à ce que le complexe SRP lie le récepteur SR ciblant ainsi la protéine naissante au RE (Keenan *et al.*, 2001; Pool, 2005). Ce système de ciblage est conservé à travers les espèces. Ce processus est par contre moins nécessaire à certaines espèces qu'il l'est pour les mammifères comme c'est le cas pour les levures par exemple (Hann and Walter, 1991; Ng *et al.*, 1996). En effet, il a été montré chez la levure *S. cerevisiae* qu'une délétion du SRP n'est pas létale contrairement à une délétion des éléments de ciblage de la machinerie de translocation post-traductionnel (Hann and Walter, 1991; Mutka and Walter, 2001). Une adaptation à l'absence de SRP se produit dans les cellules déficientes en complexe SRP permettant même la translocation dans le RE de polypeptides SRP-dépendants (Hann and Walter, 1991; Mutka and Walter, 2001). La translocation post-traductionnelle est un processus surtout retrouvé dans les levures et qui a été beaucoup étudié dans l'organisme modèle *S. cerevisiae* (Roitsch and Lehle, 1988; Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995). Ce processus implique les protéines transmembranaires Sec62p, Sec63p et Sec71p, la protéine membranaire périphérique Sec72p et les protéines luminales Kar2p (homologue de BiP chez *S. cerevisiae*) et Lhs1p. Le mécanisme d'action de ce processus n'est pas encore complètement établi mais les études mènent vers un modèle consensus (Rapoport *et al.*, 1999; Rapoport, 2007). En premier lieu, ce modèle consiste en la reconnaissance de façon ATP-indépendante du peptide signal du précurseur par le complexe protéique du RE formé

de Sec62p, Sec71p, Sec72p et possiblement Sec63p. Suite à la liaison du peptide signal, le transfert vers le pore de translocation du polypeptide naissant se produit grâce à Kar2p et Sec63p de manière ATP-dépendante, l'hydrolyse de l'ATP servant de moteur au mécanisme. Ces deux systèmes de reconnaissance des signaux de localisation au RE des protéines naissantes se fait conjointement avec le pore de translocation situé à l'intérieur de la membrane du RE. Le pore de translocation (aussi appelé translocon) des mammifères et des levures est formé par le complexe hétérotrimérique Sec61 (Simon and Blobel, 1991; Rapoport, 2007). Ce pore comprend plusieurs sous-unités dont la protéine Sec61 α (Sec61p chez *S. cerevisiae*), la protéine Sec61 β (Sbh1p chez *S. cerevisiae*) et la protéine Sec61 γ (Sss1p chez *S. cerevisiae*). La sous-unité Sec61 α est la sous-unité la plus grande du translocon, possède 10 domaines transmembranaires et le canal à travers le RE en est principalement constitué (Kalies *et al.*, 1994; Mothes *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000). Cette protéine est essentielle à la viabilité. La protéine Sec61 β , petite protéine à 1 domaine transmembranaire largement cytosolique, est quant à elle non essentielle (Finke *et al.*, 1996; Toikkanen *et al.*, 1996; Kalies *et al.*, 1998). Elle est responsable de l'association du pore de translocation à « *la signal peptidase* ». La délétion de son gène codant est associée à des défauts de translocation et à une sensibilité accrue aux élévations de température chez *S. cerevisiae* (Toikkanen *et al.*, 1996). Finalement, la sous-unité Sec61 γ est essentielle et associée plus particulièrement à un rôle de stabilisation du complexe de translocation (Esnault *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.*, 2004). Le translocon décrit ci-haut est le pore de translocation majoritairement retrouvé à la membrane du RE quoiqu'un pore similaire

contenant un homologue non-essentiel de Sec61p se retrouve aussi chez la levure *S. cerevisiae* (Holmstrom *et al.*, 1994; Finke *et al.*, 1996). Ce pore pourrait avoir un rôle spécialisé dans la translocation co-translationnel, toutefois on ne trouve pas d'équivalent chez les cellules de mammifères. Il a aussi été démontré que BiP joue un rôle dans le maintien de la perméabilité membranaire du RE par sa fonction de sceller le pore de translocation du côté luminale du RE avant et au début de la translocation (Crowley *et al.*, 1994; Hammann and Kutzner, 1998; Alder *et al.*, 2005).

1.1.3 Protéines impliquées dans le repliement des protéines

Le repliement des protéines assisté par les chaperones du RE commence immédiatement du début de la translocation, que celle-ci soit co-translationnelle ou post-translationnelle. Le RE, comme tous les compartiments cellulaires dans lesquels la synthèse protéique ou la translocation ont lieu, contient un grand nombre de chaperones et de foldases aidant au repliement et permettant ainsi l'accroissement de la qualité, la vitesse et l'efficacité du repliement protéique (Hebert and Molinari, 2007). Les enzymes de repliement et les chaperones constituant la machinerie du repliement du RE se divisent principalement en trois groupes : Les chaperones classiques membres de la famille des HSPs (Heat Shock Protein), les chaperones de type lectine (calnexine et calréticuline) et les thiol-oxidoreductases de la famille des PDIs (Protein Disulfide Isomerase) (Hebert and Molinari, 2007). Les rôles des membres de chacun de ces trois groupes sont aussi diversifiés que l'aide au repliement, le contrôle de qualité, l'oligomérisation, la maturation

et l'acquisition de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et la formation de ponts disulfures. Les chaperones et les enzymes du repliement libèrent définitivement leur substrat lorsque celui-ci a atteint sa structure native, une fois qu'il est correctement replié, et assemblé si besoin est. Une fois les substrats libérés, ceux-ci sont dirigés hors du RE, vers l'appareil de Golgi.

Chaperones classiques

Chez les mammifères, la lumière du RE contient en ce qui concerne les chaperones un membre de la famille des Hsp70 (GRP78/BiP), des membres de la famille des HSP40 qui sont des co-facteurs de HSP70 (ERdj1-5), des membres de la famille des GRPE-like (BAP/Sil1 et GRP170), un membre de la famille des HSP90 (GRP94) et un membre de la famille des HSP100 (Torsin A) (Haas and Wabl, 1983; Breakefield *et al.*, 2001; Lee, 2001; Chung *et al.*, 2002; Shen and Hendershot, 2005; Weitzmann *et al.*, 2006). Chez les levures, on retrouve deux homologues solubles de la famille des HSP70s (Kar2p chez *S. cerevisiae* et Bip1p chez *S. pombe* et Lhs1p) et une protéine attachée à la membrane Pbn1p (Rose *et al.*, 1989; Pidoux and Armstrong, 1992; Saris *et al.*, 1997).

La chaperone classique la plus caractérisée est la protéine BiP (Gething, 1999). La protéine BiP (Binding Immunoglobulin Protein) également nommé GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78 kDa) a été identifiée à l'origine indépendamment par deux groupes

(Pouyssegur *et al.*, 1977; Haas and Wabl, 1983). Cette chaperone est membre de la famille des HSP70 et est résidente du lumen du RE. La fonction principale de cette protéine est sa capacité à lier les domaines largement hydrophobiques des protéines mal repliées ou non-assemblées en complexes dont leur transport hors du RE a conséquemment été bloqué (Blond-Elguindi *et al.*, 1993a; Gething, 1999). La liaison de BiP à ces protéines mal repliées ou non complexées stabilise les structures protéiques les maintenant dans un état compatible à un autre cycle de repliement ou d'oligomérisation. La chaperone BiP est une ATPase possédant deux domaines principaux : un domaine catalytique de type ATPase en N-terminal et un domaine de liaison aux substrats en C-terminal (McKay, 1993). L'affinité pour les substrats du domaine en C-terminal dépend du type de nucléotide lié au domaine N-terminal. La liaison d'une molécule d'ATP au domaine ATPasique permet une liaison rapide des substrats mais avec une faible affinité alors que l'hydrolyse de l'ATP en ADP permet d'augmenter l'affinité du domaine en C-terminal mais de rendre l'échange de substrats lent (Blond-Elguindi *et al.*, 1993a; Blond-Elguindi *et al.*, 1993b; Fourie *et al.*, 1994). De ce fait, un même substrat peut lier plusieurs fois une même molécule de BiP, dépendant de la disponibilité des échanges de nucléotides et de la capacité d'hydrolyse de l'ATP. Bien que la fonction majoritaire de BiP soit son aide au repliement des protéines, cette chaperone a nombre de fonctions qui lui sont associées dont certaines d'entre elles seront discutées plus loin (Gething, 1999; Hendershot, 2004; Hebert and Molinari, 2007). Entre autres, on note une implication de BiP dans le maintien de la perméabilité membranaire du RE, l'aide à la translocation des chaînes de polypeptides naissants, la

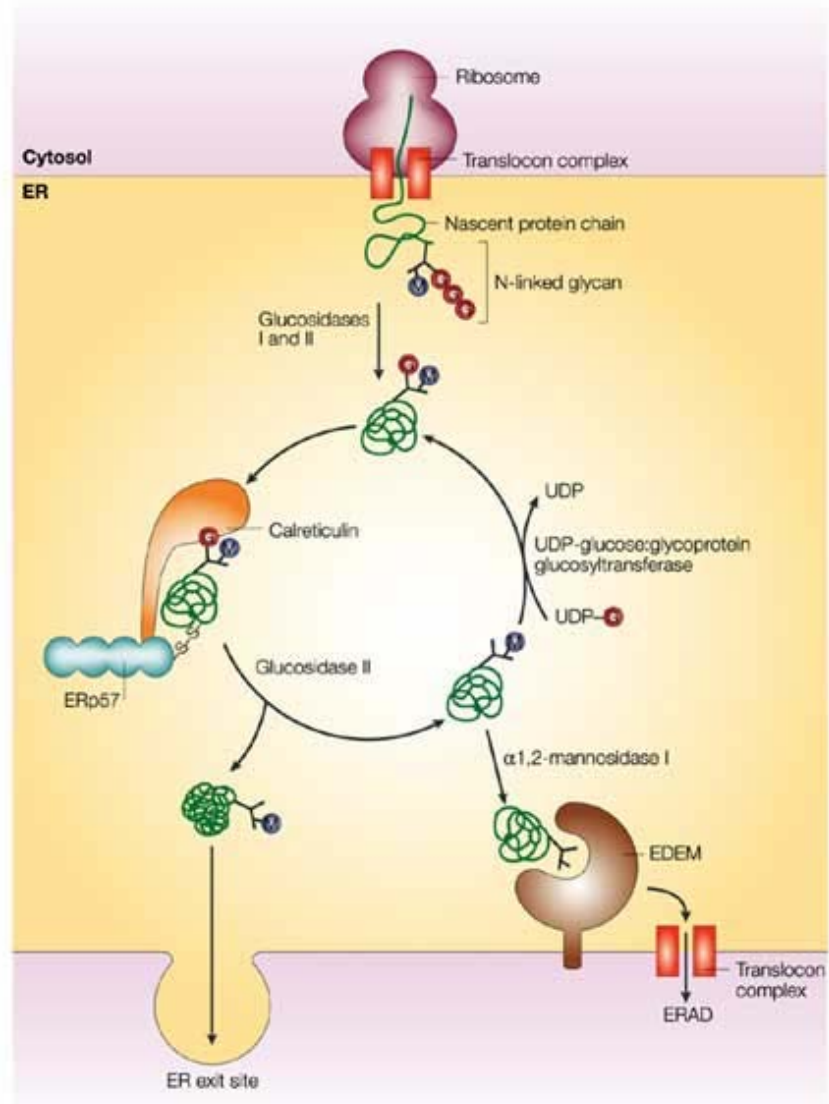
régulation de l'agrégation, l'homéostasie du calcium du RE et, la régulation de la voie de réponse aux stress du RE (voie du UPR pour Unfolded Protein Response) (Haas and Wabl, 1983; Puig and Gilbert, 1994; Lievremont *et al.*, 1997; Matlack *et al.*, 1999; Hendershot, 2004; Alder *et al.*, 2005; Schroder and Kaufman, 2005b; Marciniak and Ron, 2006). L'importance cellulaire de BiP est bien représentée par la diversité de ses fonctions, et son essentialité chez de nombreux organismes (levures, souris, cellules de mammifères en culture) en est une preuve éloquent (Gething, 1999; Hendershot, 2004).

Les chaperones de type lectine

La prise en charge des polypeptides nouvellement synthétisés lors de leur entrée dans le RE n'est pas aléatoire et est dépendant de leur nature propre. Certaines chaperones ont la capacité de lier une grande diversité de substrats alors que d'autres possèdent une spécificité pour leur substrat comme c'est le cas pour les chaperones de type lectine dont font partie la calnexine et la calréticuline (Williams, 2006). La calnexine et la calréticuline sont deux protéines qui ont été identifiées en premier lieu pour leur capacité à lier le calcium (Fliegel *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 1991). Ces deux protéines sont très similaires du point de vue structural bien que la calnexine soit ancrée à la membrane du RE alors que la calréticuline est son homologue soluble. Plusieurs protéines transitant dans la voie de sécrétion subissent une modification que l'on appelle la N-glycosylation consistant en un transfert d'un N-glycan provenant d'un donneur lipidique pyrophosphate (dolichol-PP) sur

la chaîne polypeptidique naissante par une enzyme appelée oligosaccharyl transférase (OST) (Parodi *et al.*, 1972; Chavan *et al.*, 2006). Le N-glycan est une chaîne d'oligosaccharides comprenant trois molécules de glucose, neuf molécules de mannoses et deux de N-acetyl glucosamine. Le processus de N-glycosylation est très conservé des levures aux mammifères, a lieu sur un site défini comprenant la séquence en acides aminés suivante : N-X-S/T. Par ailleurs, une même protéine peut avoir plusieurs sites de N-glycosylation. De façon co-traductionnelle, le polypeptide recevant le N-glycan est rapidement pris en charge par deux enzymes appelés GST1 et GST2 (glucosidases 1 et 2) (Hammond *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 2003). Les glucosidases 1 et 2 sont responsables du clivage des deux glucoses terminant l'oligosaccharide rendant ainsi le polypeptide en formation mono-glucosylé. Cette monoglucosylation permet l'interaction de cette protéine en formation avec la calnexine ou la calréticuline (Figure 1) (Hammond *et al.*, 1994; Ware *et al.*, 1995). Une fois l'interaction substrat-chaperone terminée et le processus de repliement complété, le polypeptide monoglucosylé est relâché lui permettant ainsi d'interagir une seconde fois avec la GST2 afin de retirer la dernière molécule de glucose de l'oligosaccharide lui permettant ainsi sont export vers la voie de sécrétion. Advenant un repliement inadéquat du polypeptide naissant glycosylé, celui-ci peut être re-glucosylé par l'enzyme UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) lui permettant ainsi un second cycle d'interaction avec la calnexine ou la calréticuline (Caramelo *et al.*, 2003; Caramelo *et al.*, 2004). Les glycoprotéines mal repliées peuvent effectuer de nombreux cycles avant d'être définitivement relâchées vers la voie de sécrétion ou vers la voie de

dégradation advenant un repliement inadéquat persistant. Bien que la calnexine et la calréticuline soient très semblables au niveau structural, ces deux chaperones de type lectine semblent avoir une affinité distincte pour leur substrat (Hebert *et al.*, 1997). Ce processus de repliement appelé cycle de la calnexine/calréticuline est présent non seulement chez les mammifères mais également chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Par contre la levure modèle *S. cerevisiae* ne semble pas avoir un tel mécanisme (Parodi, 1999). De plus, aucun homologue de la calréticuline n'est présent chez les espèces de levure mentionnées ci-haut.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1: Cycle de la calnexine/calréticuline dans le repliement des glycoprotéines. Tiré et adapté de Ellgaard L. *et al.* Molecular Cell Biology 2003

Les foldases

Pour que la majorité des polypeptides nouvellement synthétisés transitant dans le RE puissent atteindre leur structure tridimensionnelle optimale, ceux-ci doivent former adéquatement les ponts disulfures entre les cystéines de leur séquence peptidique (Jessop *et al.*, 2004). Pour ce faire, les oxidoréductases de la famille des PDIs constituent des enzymes à motifs CXXC capables de catalyser les réactions d'oxido-reduction impliquées dans la formation des ponts disulfures (Ellgaard and Ruddock, 2005). Cette famille comporte plusieurs membres dont certains sont conservés entre les espèces et dont d'autres sont multifonctionnelles faisant office de chaperone en plus d'effectuer leur fonction oxido-réductrice. Les protéines appelées PDI et ERp57 sont deux membres de la famille des PDI qui ont été caractérisés de façon approfondie (Maattanen *et al.*, 2006). PDI est une protéine multifonctionnelle capable d'agir à la fois comme oxido-réductase permettant d'accélérer le repliement et, comme chaperone augmentant ainsi la fidélité du repliement (Cai *et al.*, 1994; Maattanen *et al.*, 2006; Hatahet and Ruddock, 2007). ERp57 bien que très similaire à PDI au niveau de l'organisation des domaines se différencie totalement de PDI en ce qui a trait aux types de polypeptides qui lui sont associés (Maattanen *et al.*, 2006; Jessop *et al.*, 2007). ERp57 lie préférentiellement les glycoprotéines de par son association à la calnexine et à la calréticuline (Maattanen *et al.*, 2006; Jessop *et al.*, 2008). Bien que des homologues de PDI soient trouvés chez les mammifères et les levures, ERp57 ne trouve pas son homologue du côté des levures laissant le complexe calnexine-foldase non résolu.

Certaines protéines en repliement nécessitent une isomérisation cis/trans des liens peptidyl-prolyl (Xaa-Pro) ce qui représente une autre étape limitante dans le processus de repliement des protéines (Lu *et al.*, 2007). Les membres de la famille des PPIs (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) sont des enzymes catalysant l'isomérisation de ces liens peptidyl-prolyl favorisant ainsi une accélération du processus de repliement (Fischer *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 2007). Cette classe de foldases a été étudiée chez les mammifères. La présence de membres de la famille des PPIs chez les levures n'a pas encore été démontrée bien que leur génome encode des homologues de cette famille.

1.1.4 La voie du ERAD (ER-Associated Degradation)

Lors du processus de repliement des protéines, une quantité incroyable de protéines à différents stades et dans divers états se retrouve dans un même moment dans le RE. En effet, on estime à 100 mg/ml la quantité de protéine présente dans la lumière du RE et chacune de ces protéines se trouve à un stade précis de leur maturation donnant un mélange de polypeptides naissants, de polypeptides en repliement, de protéines mal repliées et de protéines correctement repliées (Kleizen and Braakman, 2004). Afin d'éviter tout débordement du processus complexe qu'est le repliement des protéines, une gestion serrée des intermédiaires peptidiques présent dans le RE doit être effectuée. La machinerie du contrôle de qualité dans le RE doit effectuer la distinction entre les polypeptides correctement repliés nécessitant un export vers leur destination finale, les polypeptides en

formation entrant dans la voie de sécrétion et devant être correctement maturés et les protéines mal repliées devant être dirigées vers la voie de dégradation (Ellgaard and Helenius, 2003). Les acteurs principaux participant au contrôle de qualité à l'intérieur du RE sont majoritairement les mêmes protéines impliquées dans le processus du repliement (Nishikawa *et al.*, 2005). Les chaperones tels que BiP et ses partenaires de la famille des Hsp40, les chaperones de type lectine (calnexine, calréticuline) et les facteurs associés (protéine de type EDEM; ER-degradation enhancing alpha-mannosidase like protein) et les enzymes de type oxidoréductases plus particulièrement certains membres de la famille des PDI (Gillece *et al.*, 1999; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2002; Schelhaas *et al.*, 2007; Avezov *et al.*, 2008) sont tous des partenaires agissant de concert pour distinguer les protéines mal repliées afin de les diriger vers la voie de dégradation appelée ERAD (ER-associated degradation). La calnexine étant une chaperone de type lectine, son contrôle de qualité s'exerce surtout du côté des glycoprotéines mal repliées de concert avec les facteurs EDEM (Molinari *et al.*, 2003). Il a été suggéré que les glycoprotéines transitant trop longtemps dans le RE et n'arrivant pas à atteindre leur structure tridimensionnelle optimale à leur fonction deviennent substrat de la ER α 1,2-mannosidase I. La ER α 1,2-mannosidase clive un mannose de la chaîne de carbohydrates laissant une chaîne de carbohydrates à 8 mannoses. Ce résidu Man8 (Man8GlcNAc2) favoriserait le passage du substrat mal replié de la calnexine vers le facteur de type lectine EDEM (Mln1p/Htm1p chez les levures) (Hosokawa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001). Le passage du substrat vers le facteur EDEM permettrait la direction de ce même substrat vers le

processus de dégradation (ERAD). La façon dont le facteur EDEM dirige le substrat au translocon avant que celui-ci soit rétrotransloqué dans le cytosol n'est à ce jour pas encore caractérisée. Des travaux de 2005 publiés dans *MBC* chez la levure *S. pombe* émettent par contre un bémol sur ce mécanisme de ciblage vers la voie de dégradation (Movsichoff *et al.*, 2005). En effet, bien que ces études établissent toujours l'importance de l' α 1,2-mannosidase dans le ciblage des glycoprotéines mal repliées vers la voie de dégradation, elles démontrent ce ciblage comme étant indépendant de sa fonction enzymatique remettant en question l'importance du clivage du mannose 9. Des travaux *in vitro* effectués chez les levures entre autre à l'aide d'une forme mutée du précurseur de la phéromone de conjugaison du facteur α (Δ Gp α F) a permis d'établir plus précisément le rôle de BiP dans le processus de ciblage vers la dégradation des protéines mal repliées (McCracken and Brodsky, 1996; Nakatsukasa *et al.*, 2001). Les protéines en cours de repliement et les protéines mal repliées exposent sur leur structure des domaines largement hydrophobes permettant leur liaison avec BiP. L'affinité des substrats pour la chaperone BiP constituerait une étape essentielle du ciblage des protéines vers l'ERAD, le rôle de BiP dans ce cas-là étant de maintenir à l'état soluble les substrats à être dégradés, ce qui se fait en association avec les Hsp40 qui lui sont associées (Nishikawa *et al.*, 2001). Bien que BiP joue un rôle très important dans le ciblage des protéines à être dégradées, le passage de ces protéines de la lumière du RE au translocon pour la rétrotranslocation serait plutôt imputable à PDI (Gillece *et al.*, 1999). Finalement chez la levure, BiP n'est pas requis pour

le ciblage vers la dégradation des protéines membranaires (Hill and Cooper, 2000; Nishikawa *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Huyer *et al.*, 2004).

Une fois les protéines mal repliées et destinées à être dégradées identifiées, celles-ci doivent être rétrotransloquées hors du RE vers le cytosol, ubiquitinées et dégradées. Ce processus impliquant la dégradation des protéines sécrétées et membranaires transitant dans le RE est appelé ERAD pour ER-Associated Degradation (Meusser *et al.*, 2005; Nakatsukasa and Brodsky, 2008). La majeure partie des études sur ce processus de dégradation associé au RE a été effectuée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* bien que certaines études ont été entreprises plus récemment dans les cellules de mammifères. Les études chez la levure avec une variété de substrats modèles ont démontré l'existence de 3 voies distinctes de dégradation selon la région de la protéine qui est mal repliée : région luminale (ERAD-L) région transmembranaire (ERAD-M) ou région cytosolique (ERAD-C) (Meusser *et al.*, 2005; Nakatsukasa and Brodsky, 2008). Chacune de ces voies comportent des mécanismes distincts permettant la dégradation de leur substrat respectif mais possèdent également des mécanismes communs aux trois voies.

La voie ERAD-L empruntée par les protéines solubles ou membranaires ayant un défaut du repliement dans un domaine contenu dans le lumen du RE est la voie de dégradation la plus complexe associée au RE. Cette voie a été largement résolue à l'aide d'un mutant de la carboxypeptidase Y vacuolaire ayant une substitution près de son site

actif (CPY*) (Finger *et al.*, 1993; Pety de Thozee and Ghislain, 2006). Le complexe protéique responsable de l'ubiquitination et de l'exportation des substrats vers le protéasome fait intervenir l'ubiquitine ligase Hrd1p et ses co-facteurs Hrd3p, Der1p et Usa1p (Carvalho *et al.*, 2006). Ce large complexe protéique aurait comme fonction non seulement d'ubiquitiner le substrat mais également de former un pore à travers la membrane du RE permettant le passage du substrat à travers la membrane. Le complexe Sec61p associé habituellement à la translocation à travers la membrane du RE n'a pas été montré comme s'associant aux protéines composant la voie du ERAD. D'après les dernières recherches, la séquence des événements définis dans la voie du ERAD-L commence par le ciblage au complexe protéique Hrd1p/Hrd3p/Der1p/Usa1p des protéines solubles ou transmembranaires à être dégradées par les protéines solubles Htm1p (EDEM), PDI ou Yos9p (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006). La nature du substrat mal replié déterminera la protéine qui ciblera vers le complexe associé au ERAD-L. Bien que Htm1p et Yos9p aient une affinité particulière pour les glycoprotéines, il n'est pas à ce jour établi si des substrats non glycosylés peuvent être ciblés par Yos9p. (Carvalho *et al.*, 2006; Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007) La protéine Usa1p faisant partie intégrante du pore est requise pour tous les substrats empruntant la voie du ERAD-L. (Carvalho *et al.*, 2006) Cette protéine a été suggérée comme faisant le pont entre Hrd1p et Der1p. Une fois les substrats du ERAD-L ciblés au complexe protéique formant le pore, ceux-ci sont transloqués et ubiquitinés dès leur arrivée dans le cytosol. L'ubiquitine ligase Hrd1p travaille de concert avec l'enzyme de conjugaison des ubiquitines Ubc7p et son partenaire

d'ancrage à la membrane Cue1p (Bordallo *et al.*, 1998; Bays *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2006). A ce stade du processus, la chaîne d'ubiquitines sert à la fois d'outil mécanistique pour éviter un retour du substrat au lumen et de signal pour les protéines de liaison aux ubiquitines plus loin dans le processus. Finalement suite à la polyubiquitination, les substrats à être dégradés sont amenés plus loin dans le cytosol par l'action d'une ATPase Cdc48p en partenariat avec ses co-facteurs Ufd1p/Npl4p (Neuber *et al.*, 2005; Schubert and Buchberger, 2005; Carvalho *et al.*, 2006). Le lien entre l'ATPase et la membrane du côté cytosolique viendrait de la liaison avec la protéine transmembranaire à domaine Uba : Ubx2p. La manière dont Ubx2p est recrutée au complexe Hrd1p est à ce jour inconnue bien que ce processus de recrutement semble impliquer la liaison de Ubx2p au substrat polyubiquitiné via son domaine Uba (Neuber *et al.*, 2005; Gauss *et al.*, 2006). Des études chez les mammifères ont par contre démontré que le complexe ATPase pouvait former des liens directement avec les substrats polyubiquitinés et que Cdc48p pouvait lier directement les extrémités C-terminal de Der1p et Hrd1p ainsi que les motifs mal repliés des substrats à être dégradés (Ye *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005). La façon dont le complexe ATPase amène les substrats à être dégradés au protéasome se veut certainement un mélange de toutes ces interactions.

La voie ERAD-M possède plusieurs caractéristiques communes à la voie de l'ERAD-L bien que certaines différences notables aient été observées. Les protéines Hrd1p et Hrd3p sont requises pour la dégradation de substrats possédant une structure mal repliée

dans une région transmembranaire alors que les autres composants du complexe Hrd1p ne le sont pas (Plempner *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2006). Puisque le complexe Hrd1p semble être un seul complexe en soit, il est possible que le complexe en entier intervienne dans la voie de l'ERAD-M mais que seulement Hrd1p et Hrd3p soient indispensables. Le ciblage du substrat à être dégradé vers l'ubiquitine ligase Hrd1p se fait par Yos9p selon ce que les expériences avec le substrat glycosylé mal replié Pdr5* ont démontré (Plempner *et al.*, 1998). Par contre, il est possible que le ciblage se fasse via d'autres protéines faiblement associées ce qui ne permettrait pas leur identification. Le passage du substrat vers l'ubiquitine ligase peut se faire également de façon directe comme l'ont suggéré les expériences avec Hmg2p (Gardner *et al.*, 2001). Contrairement à ce qui est observé pour les substrats empruntant la voie ERAD-L, les substrats de la voie du ERAD-M ne requièrent pas les protéines Usa1p et Der1p (Carvalho *et al.*, 2006). De ce fait, il a été proposé que ceux-ci doivent emprunter un plus petit pore pouvant être formé seulement de Hrd1p ou encore qu'ils sont directement extraits de la membrane sans emprunter de pore comme il a été proposé pour la protéine bactérienne FtsH (Akiyama and Ito, 2003; Carvalho *et al.*, 2006).

Le dernier processus de dégradation associé au ER est appelé le ERAD-C et fait office de voie de dégradation pour les substrats ayant un mauvais repliement du côté cytosolique. Ce procédé est très similaire au procédé du ERAD-M mis à part en ce qui

concerne l'ubiquitine ligase impliquée. Dans ce cas précis la protéine Doa10p fait office d'ubiquitine ligase (Carvalho *et al.*, 2006).

Les protéines transitant dans le RE contiennent souvent plusieurs domaines distincts (domaine lumenal, transmembranaire ou encore cytosolique). Le choix de la voie de dégradation associée au RE qui sera empruntée advenant de multiples défauts dans les différents domaines d'un substrat dépend des domaines impliqués. La voie du ERAD-C est la préférée (Vashist and Ng, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). Advenant des défauts de repliement à la fois dans les domaines luminaux et transmembranaires d'un même substrat, la voie du ERAD-M serait la voie privilégiée (Taxis *et al.*, 2003; Meusser and Sommer, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). L'hypothèse la plus suggérée étant que la voie empruntée est celle du domaine le plus à proximité du cytosol puisque les substrats à être dégradés doivent être transloqués au cytosol.

1.2 La voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique, le UPR.

Le RE est responsable de trois fonctions majeures dans la physiologie cellulaire : il est le siège du repliement des protéines membranaires et sécrétées, le site majeur de stockage du calcium intracellulaire, et la membrane du RE est le lieu de biosynthèse des lipides et des stérols de la cellule. Le contrôle serré de ces fonctions est nécessaire à la

conservation d'une homéostasie physiologique du RE, homéostasie qui si perturbée cause un stress au RE (Selye, 1985; Schroder and Kaufman, 2005b; Malhotra and Kaufman, 2007). Les sources de stress pouvant déséquilibrer l'homéostasie fragile de cette organelle sont nombreuses. Par exemple des désordres au niveau osmotique peuvent générer un débalancement du calcium. Le débalancement d'une ou l'autre des fonctions du RE cause systématiquement une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière de cette organelle. En fait, très peu est connu au niveau de la façon dont une perturbation dans le métabolisme des lipides cause un stress au RE et de la façon dont la cellule répond face à ce stress (Zhang and Kaufman, 2003; Ron and Oyadomari, 2004). Puisque le RE est une organelle centrale remplissant des fonctions essentielles à la viabilité cellulaire, la cellule doit obligatoirement avoir une voie de réponse au stress du RE lui permettant de palier à ce genre de perturbations. Deux actions principales sont entreprises en tout premier lieu lorsque le RE présente des signes de surcharge, c'est-à-dire lorsque l'afflux de polypeptides nouvellement synthétisés ou mal repliés excède la capacité du RE à replier et/ou à disposer de ces polypeptides. Les deux actions vont de concert l'une avec l'autre et consistent en la diminution de la demande de repliement et en l'augmentation de la capacité de repliement (Schroder and Kaufman, 2005b; Malhotra and Kaufman, 2007). La demande en repliement dans la cellule est diminuée par : 1) l'arrêt de la transcription et de la traduction de nouvelles protéines; 2) par l'augmentation de la capacité cellulaire à dégrader les protéines mal repliées ou repliées de façon incomplète, ce qui se traduit par l'augmentation de la voie de l'ERAD (Harding *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 2000). La capacité cellulaire à replier les

protéines est quant à elle accrue par l'augmentation de la synthèse des chaperones et foldases du RE et, par l'augmentation de la taille du RE afin de diluer la concentration des protéines mal repliées présentes dans le RE (Kozutsumi *et al.*, 1988; Dorner *et al.*, 1989). Ces deux actions sont le résultat de l'activation de la voie de réponse au stress du RE appelée UPR pour Unfolded Protein Response (Schroder and Kaufman, 2005b; Malhotra and Kaufman, 2007). La voie de l'UPR a d'abord été découverte et étudiée dans les levures bien que cette voie de réponse au stress soit mieux caractérisée maintenant chez les mammifères (Mori *et al.*, 1993; Cox and Walter, 1996). Cette voie chez les mammifères fait intervenir trois récepteurs majeurs qui sont les protéines IRE1 (Inositol requiring kinase I), ATF6 (activating transcription factor 6) et PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) (pancreatic eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinase) (Figure 2) (Schroder and Kaufman, 2005b; Ron and Walter, 2007). À ce jour, seulement Ire1p a été découvert chez les levures et impliqué dans la transduction du signal de réponse au stress du RE chez cet organisme.

1.2.1 IRE1

IRE1 et son implication dans le processus de réponse au stress du RE a été découvert chez les levures en 1996 (Cox and Walter, 1996). Le nom IRE1 pour inositol-requiring kinase I a été donné à cause de sa découverte chez *S. cerevisiae* par un criblage génétique effectué pour trouver des gènes menant à l'auxotrophie pour l'inositol chez cette

levure. IRE1 est une protéine transmembranaire du RE de type I atypique, possédant des fonctions kinase et endoribonucléase (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993). Le domaine luminaire d'IRE1 possède certains points d'homologie avec le domaine luminaire de la protéine PERK (Liu *et al.*, 2000). Cette homologie de séquence en est une de fonction également puisque les deux domaines de ces deux protéines sont interchangeable. Le domaine luminaire est principalement un domaine d'homodimérisation puisque celui-ci peut être remplacé par un domaine hétérologue à domaine bZIP possédant la capacité de former des dimères (Liu *et al.*, 2000). Ce domaine possède également la capacité de lier la protéine de repliement BiP (Bertolotti *et al.*, 2000; Liu and Kaufman, 2003). Les régions du domaine luminaire responsable de la liaison à BiP et de l'homodimérisation se chevauchent chez IRE1 (Liu and Kaufman, 2003). Il a été proposé que la liaison de BiP à IRE1 inhiberait l'homodimérisation de cette dernière. L'accumulation de protéines mal repliées causée par un stress du RE permettrait la dissociation par compétition de BiP à IRE1 permettant ainsi son homodimérisation et l'activation du même coup des activités enzymatiques de son domaine cytosolique (Bertolotti *et al.*, 2000). Par contre, un article publié par Kohno et al dans *Journal of Cell Science* montre que la dissociation de BiP et l'homodimérisation d'Ire1p de *S. cerevisiae* ne sont pas des actions suffisantes à son activation (Oikawa *et al.*, 2007). Le large domaine cytosolique de IRE1 contient les activités endoribonucléase et kinase de la protéine (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993). Jusqu'à maintenant le seul substrat connu d'IRE1 du côté de son activité kinase est la protéine IRE1 elle-même. En effet, IRE1 a la capacité de s'auto-phosphoryler ce qui a pour

conséquence d'activer son domaine RNase (Sidrauski and Walter, 1997). Le domaine RNase de IRE1 a une très forte homologie avec la RNase L et des expériences biochimiques et fonctionnelles ont permis de conclure à la nécessité de la dimérisation des domaines RNase pour favoriser cette action (Sidrauski and Walter, 1997; Tirasophon *et al.*, 2000). La séquence d'évènements consistant en la dimérisation de IRE1 et son auto-phosphorylation permet l'activation de son action endoribonucléique. Le seul substrat connu à ce jour est l'ARN messager codant pour le facteur de transcription bZIP Hac1p chez les levures et XBP-1 son homologue chez les mammifères (Cox and Walter, 1996; Yoshida *et al.*, 2001a; Calfon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Une étude par le laboratoire de Peter Walter de 2005 combinant des approches génétiques et biochimiques chez la levure *S. cerevisiae* s'est avérée infructueuse pour découvrir de nouveaux substrats d'épissage d'ARNm par IRE1 (Niwa *et al.*, 2005). L'épissage de l'ARNm XBP-1 est identique à l'épissage des pre-ARNt ce qui laisse nébuleux la façon dont la ligase impliquée (la ligase ARNt: RLG\TRL1 ou autre) distingue entre exons et introns (Sidrauski *et al.*, 1996; Abelson *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 1999). De plus, le compartiment dans lequel se déroule l'épissage de HAC1 et de XBP-1 est encore inconnu puisque certaines évidences laissent croire à un épissage cytoplasmique alors que d'autres tendent vers un épissage nucléaire (Winicov and Button, 1982; Kuhn *et al.*, 2001; Ruegsegger *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Une fois HAC1/XBP-1 épissé, celui-ci peut être traduit correctement en facteur de transcription bZIP (Mori *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 2001a; Spode *et al.*, 2002). Le promoteur de HAC-1/XBP-1 contient des éléments de régulation reconnus par HAC-

1/XBP-1 lui-même permettant un cycle positif d'autorégulation une fois HAC-1/XBP-1 activé (Lee *et al.*, 2002; Ogawa and Mori, 2004).

1.2.2 PERK

La protéine PERK partage plusieurs caractéristiques communes à la protéine IRE1 bien que celle-ci, contrairement à IRE1, n'ait à ce jour qu'été identifiée chez les mammifères (Harding *et al.*, 1999). Un orthologue de la protéine PERK est présent chez les levures en la protéine Gcn2p, une kinase impliquée dans la régulation de la traduction via la phosphorylation de eIF2 α , mais son implication réel dans la voie de la réponse au stress du RE reste fragmentaire (Wilson and Roach, 2002; Patil *et al.*, 2004). En tout premier lieu, PERK tout comme IRE1 est une protéine transmembranaire de type I du réticulum endoplasmique. Comme mentionné plus haut, les domaines luminaux de PERK et de IRE1 démontrent un certain degré d'homologie entre elles qui est conféré entre autre par la présence de domaines d'homodimérisation et de liaison à BiP dans cette partie des protéines (Bertolotti *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). Ce degré d'homologie de séquence rend ces domaines luminaux interchangeable entre les deux protéines (Liu *et al.*, 2000). De la même façon qu'il a été proposé pour IRE1, le modèle d'activation de PERK passerait par la dissociation de BiP de son domaine luminaire suite à une accumulation de protéines mal repliées causée par un stress du RE. Cette dissociation favoriserait ainsi l'homodimérisation de PERK et l'activation de l'activité kinase de son domaine

cytosolique (Bertolotti *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2002a). Contrairement à IRE1, les domaines d'homodimérisation et de liaison à BiP ne se chevauchent pas du côté lumenale de la protéine PERK (Ma *et al.*, 2002a). Dans ce cas précis, il est suggéré que la liaison de BiP à PERK induirait une conformation se voulant inhibitrice de l'oligomérisation. L'activation de la fonction kinase contenue dans le domaine cytosolique de PERK a deux conséquences majeures : la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique 2 (eIF2 α) et la phosphorylation du facteur de transcription bZIP Cap 'n' Collar Nrf2 (Harding *et al.*, 1999; Cullinan *et al.*, 2003).

La phosphorylation d'eIF2 α inhibe l'échange GDP pour GTP du complexe eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} faisant partie du complexe 43S de pré-initiation de la traduction. La diminution de la disponibilité du complexe eIF2 lié au GTP a pour première conséquence de diminuer la traduction globale des ARNm(s) de la cellule (Harding *et al.*, 1999). En effet, des cellules de mammifères déficientes en PERK (*perk*^{-/-}) montrent une sensibilité accrue aux stress du RE et voient leur sensibilité partiellement restaurée par l'ajout d'inhibiteurs de la traduction comme la cycloheximide (Harding *et al.*, 2000b). Le niveau de phosphorylation du facteur eIF2 α influence également la traduction de certains gènes via l'activation de la traduction de petits cadres de lecture en amont de certains ORFs codant (uORFs) (Kozak, 2002). Un bas niveau de phosphorylation du facteur eIF2 α permet la traduction de la majorité des ARNm(s) de la même façon qu'il permet la traduction de ces petits uORFs. La traduction des uORFs a pour effet d'inhiber la traduction des ORFs

codants en aval de ces uORFs. Au contraire, un haut niveau de phosphorylation inhibe la traduction de la majorité des ARNm(s) et des uORFs dû au faible taux disponible de complexe eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} permettant ainsi la traduction des ORFs codants en aval des uORFs (Kozak, 2002). Ce mécanisme de contrôle a été observé chez les levures et chez les mammifères bien qu'aucun homologue de PERK n'ait été identifié à ce jour chez les levures. Les ARNm(s) régulés de cette manière identifiés jusqu'à maintenant sont GCN4 chez la levure *S. cerevisiae* et ATF4 et Cat-1 chez les mammifères (Harding *et al.*, 2000a; Scheuner *et al.*, 2001; Yaman *et al.*, 2003; Hinnebusch, 2005). GCN4 chez les levures est un facteur de transcription clé impliqué entre autre dans la régulation de la réponse cellulaire associée au métabolisme des acides aminés (Hinnebusch, 2005). L'homologue de GCN4 chez les mammifères, ATF4, est de plus impliqué dans la régulation de la réponse antioxydante et l'apoptose (Harding *et al.*, 2000a; Scheuner *et al.*, 2001). En ce qui concerne l'ARNm de Cat-1, celui-ci code pour un transporteur des acides aminés arginine et lysine, transporteur activé également en situation de stress nutritionnel (Yaman *et al.*, 2003).

L'activation de PERK médie également son action via le facteur de transcription Nrf2.(Cullinan *et al.*, 2003). Lorsque survient un stress du RE résultant en l'activation de PERK, celui-ci phosphoryle Nrf2 provoquant ainsi sa dissociation de Keap1 dans le cytoplasme, Keap1 étant un partenaire maintenant Nrf2 inactif (Cullinan *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003). La dissociation de ce complexe permet la translocation du facteur

Nrf2 au noyau et l'activation de gènes contenant l'élément de réponse ARE (antioxydant response element) (Nguyen *et al.*, 2003). Ce mécanisme explique le phénotype observé chez les cellules déficientes en PERK (*perk*^{-/-}) qui accumulent des ROS (Reactive Oxygen Species) sous stress du RE et chez les cellules *nrf2*^{-/-} qui ont une sensibilité accrue au stress du RE par leur incapacité à palier à un stress oxydatif (Cullinan *et al.*, 2003; Harding *et al.*, 2003).

L'activation de PERK en cas de stress au RE est réversible et très rapide. En effet, dans les minutes suivant un retour à la normale de l'homéostasie présente dans le RE, PERK est déphosphorylé rapidement. Le mécanisme de déphosphorylation de PERK est à ce jour inconnu ainsi que les phosphatases impliquées (Schroder and Kaufman, 2005b; Malhotra and Kaufman, 2007).

1.2.3 ATF6

ATF6 a été déterminé comme activateur de l'UPR lors d'une étude cherchant à identifier des nouvelles protéines pouvant lier des séquences promotrices activées pendant l'UPR (Yoshida *et al.*, 1998). ATF6 est une protéine transmembranaire de type II du RE (Haze *et al.*, 1999). ATF6 est membre d'une grande famille de facteurs de transcription bZIP impliquée dans la transduction des signaux de stress du RE. Aucun homologue de cette protéine n'a été trouvée jusqu'à maintenant chez les levures, ce qui restreint les études

effectuées sur cette protéine aux cellules de mammifères comme c'est le cas pour PERK. Les cellules de mammifères contiennent deux homologues de ATF6 : ATF6 α et ATF6 β /cAMP-response-element-binding protein (CREB)-related protein (CREB-RP)/G13 (Haze *et al.*, 1999). Le mécanisme d'activation de ATF6 est bien caractérisé. Lorsqu'un stress du RE survient dans les cellules, ATF6 est transloquée à l'appareil de Golgi où il sera pris en charge immédiatement par la protéase à sérine S1P (Site-1 protease) qui clivera ATF6 dans son domaine luminale (Haze *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). La métalloprotéase S2P (Site-2 protease) prend également en charge ATF6 suite à l'action de S1P afin de cliver la partie N-terminale ancrée à la membrane. Ces deux actions concertées des protéases permettent le relâchement complet du domaine cytosolique d'ATF6 possédant l'activité bZIP, qui est ensuite transloqué dans le noyau (Wang *et al.*, 2000; Kokame *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001b). La translocation de ATF6 au noyau permet sa liaison, seul ou en partenariat, aux éléments de réponse de type CRE (ATF/cAMP response element) et ERSE I et II (ER stress response element), qui se trouvent dans le promoteur de certains gènes activant ainsi leur transcription. Dans son domaine luminale, ATF6 possède deux éléments de localisation à l'appareil de Golgi (GLS1 et GLS2) et contient également des domaines de glycosylation (Shen *et al.*, 2002). La rétention d'ATF6 dans le RE en conditions normales (absence de stress au niveau du RE) est en outre due à la liaison de BiP à l'élément de localisation GLS1 et à l'interaction entre ATF6 et la calréticuline via les résidus glycosylés (Shen *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004). En conditions de stress du RE, BiP par son association aux protéines mal repliées

perd sa liaison à l'élément GLS1 de ATF6 rendant ainsi possible la translocation d'ATF6 à l'appareil de Golgi (Shen *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004). De plus, les molécules d'ATF6 nouvellement synthétisées en conditions de stress du RE se voient être beaucoup moins glycosylées inhibant ainsi l'interaction d'ATF6 avec la calréticuline (Hong *et al.*, 2004).

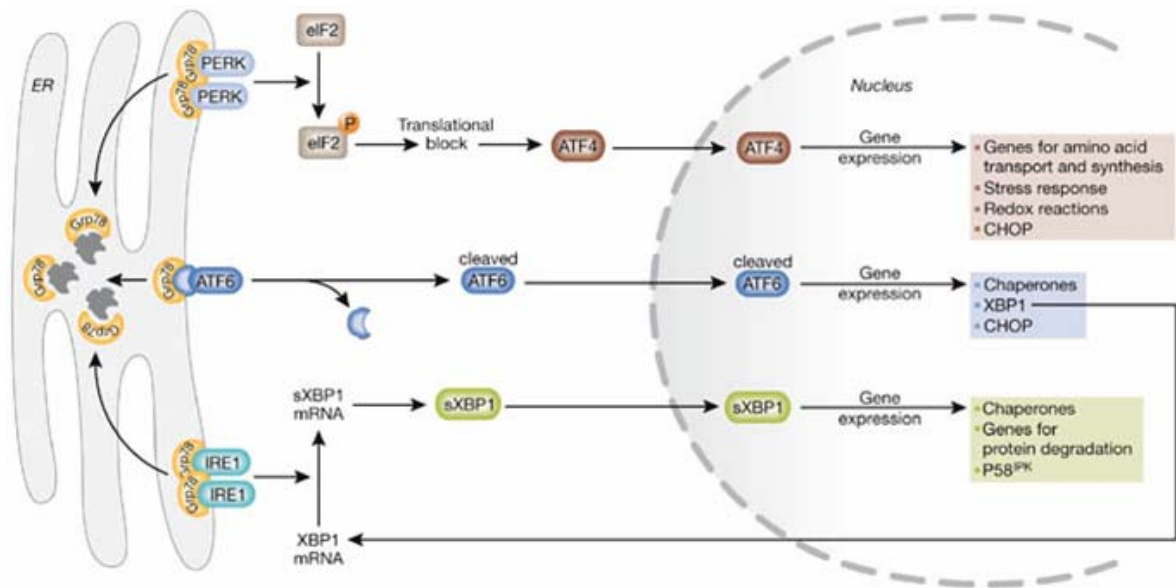


Figure 2 : La voie du UPR chez les mammifères. Principaux transducteurs de la voie du UPR chez les mammifères et les effets de leur activation sur les voies cellulaires au niveau de la transcription des gènes. Tiré et adapté de Szegezdi E., *et al.* 2006.

1.2.4 Globalisation des effets du UPR

En somme, l'activation de la voie de réponse au stress du RE, l'UPR, permet l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription de type bZIP formant des dimères homogènes ou hétérogènes selon le cas (Newman and Keating, 2003). Ces facteurs de transcription permettent de réguler la transcription de nombreux gènes qui auront des effets sur certains processus cellulaires clés. Ces effets de l'UPR tels que la synthèse de chaperones moléculaires, l'activation de la voie ERAD, la synthèse accrue de phospholipides et l'activation de la voie apoptotique sont induits différemment en fonction du niveau de stress imputé au RE et du temps selon un processus encore mal compris (Schroder and Kaufman, 2005b; Malhotra and Kaufman, 2007). Chaque joueur impliqué dans l'activation de la voie UPR a une contribution différente pour chaque effet produit. Par contre, les voies empruntées par chaque activateur se chevauchent dans certaines situations et s'influencent mutuellement.

L'effet de PERK qui passe par la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α permettant la réduction globale de la traduction est un des premiers événements à avoir lieu dans un cas de stress du RE (Harding *et al.*, 2000b). La phosphorylation de eIF2 α diminue

la traduction globale par sa perte d'activité mais permet également la dissociation des ribosomes de l'ARNm laissant ainsi libre la machinerie d'initier la traduction sur les ARNm relatifs aux gènes traduits pour répondre au stress du RE. Il semble également y avoir un contrôle au niveau des ARNm codant pour des protéines sécrétées les rendant plus sensible à la dégradation (Hollien and Weissman, 2006). L'induction des chaperones moléculaires qui consiste en la deuxième étape de la réponse au stress du RE requière l'intervention des 3 branches de l'UPR (IRE1, ATF6, PERK) et implique le processus de répression de la traduction des ARNm. En effet, le facteur de traduction eIF2 α est partiellement déphosphorylé lors du processus permettant la traduction efficace des ARNm cibles de l'UPR (Novoa *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 2003). La grande demande en chaperones moléculaires provoquée par le stress du RE inhibe également le processus de translocation (Kang *et al.*, 2006). L'hypothèse que seuls les polypeptides contenant un peptide signal fort peuvent être transloqués dans le RE en situation de stress a été émise (Ron and Walter, 2007). L'activation de l'UPR complémente également l'induction de chaperones moléculaire avec l'activation de la voie de dégradation associée au RE (ERAD). En effet, plusieurs protéines impliquées dans l'ERAD constituent des cibles directes de la voie UPR permettant ainsi une dégradation des protéines mal repliées qui ne passent pas le processus de repliement des chaperones (Travers *et al.*, 2000). La voie ERAD implique une rétro-translocation des protéines mal repliées du RE vers le cytosol ce qui s'avère ardu dans certaines situations. Certaines protéines mal repliées et agrégats de protéines ne parviennent pas à passer la barrière membranaire, ce qui implique

l'intervention d'un processus d'autophagie spécifique au RE permettant leur dégradation à plus grande échelle (Bernales *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006). L'autophagie est un processus par lequel un organelle ou une partie de cette organelle est dégradé par son fusionnement aux vacuoles contenant de nombreuses enzymes de dégradation (Kundu and Thompson, 2008). Plusieurs protéines impliquées dans ce processus ont été identifiées en tant que cible de l'activation de la voie de l'UPR. Dans le processus d'autophagie spécifique au RE (appelé quelquefois ER-phagy), les membranes du RE sont séquestrées et emmagasinées en structures appelées autophagosomes (Bernales *et al.*, 2006). Bien que la voie habituelle de l'autophagie mène à la fusion des autophagosomes aux vacuoles jusqu'à ce que le stress soit aboli, ce mécanisme n'est pas automatique dans le cas du ER-phagy, laissant croire à un rôle des autophagosomes plus important que leur dégradation finale.

L'activation de la voie UPR cause également un autre phénomène cellulaire qui consiste en l'expansion du RE laissant croire en un lien certain entre la voie UPR et la voie de la biosynthèse des lipides (Ron and Walter, 2007). Chez la levure *S. cerevisiae*, de nombreuses cibles de la voie UPR sont des gènes codant pour des enzymes clés de la voie de biosynthèse des lipides. Il a été montré chez la levure et chez les mammifères qu'une diminution des phospholipides induit la voie UPR (Cox *et al.*, 1997; Travers *et al.*, 2000; van der Sanden *et al.*, 2003). Chez les levures les médiateurs de l'UPR, IRE1 et son substrat d'épissage HAC1, sont les principaux responsables du contrôle de la voie de biosynthèse des lipides en situation de stress du RE et, leur action dans ce processus est

conservée chez les mammifères (Shaffer *et al.*, 2004; Sriburi *et al.*, 2004; Bernales *et al.*, 2006). Une déficience en *IRE1* chez la levure *S. cerevisiae* rend les cellules auxotrophes à l'inositol puisque le gène *INO1* se trouve sous le contrôle de *HAC1* via son activation par Ire1p (Cox *et al.*, 1997). Ino1p (pour inositol-1-phosphate synthase), est une enzyme clé de la biosynthèse des phospholipides. Bien qu'au départ il ait été postulé que les cibles de l'UPR impliquées dans la biosynthèse des lipides soient responsables de l'expansion membranaire observée en présence de stress au RE, il semble que dans certains cas l'expansion membranaire soit indépendante de l'UPR et que le métabolisme lipidique joue un rôle plus grand dans ce processus (Stroobants *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2002). De plus, le contrôle d'*INO1* par *IRE1* et *HAC1* chez les levures semble être plus indirect qu'il ait été postulé au départ (Chang *et al.*, 2002). Il est à noter que toutes ces études concernant le gène *INO1* ont été effectuées chez la levure *S. cerevisiae* et que la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe* ne peut être l'objet d'études de cette nature puisque cette levure est naturellement auxotrophe à l'inositol (Yarbrough and Clark, 1957). Le lien entre les lipides et la voie UPR a également été étudié chez les mammifères pour ce qui est de la famille des facteurs de transcription bHLH SREBPs (SRE-binding proteins). Les SREBPs sont impliquées de la régulation des acides gras et du cholestérol chez les mammifères (Horton *et al.*, 2002). Il a été démontré que ATF6 agissait en lien avec SREBP2 afin de favoriser la répression de la synthèse du cholestérol, alors que SREBP2 seul est habituellement un stimulateur de la synthèse de cette molécule (Horton *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2004). Bien qu'un partage des cibles entre les voies de l'UPR et de la régulation des

lipides ait été établi, les détails concernant leur action restent toujours préliminaires et semblent être quelquefois en opposition l'une avec l'autre.

1.2.5 Le UPR sans le stress

Chaque partenaire majeur de la voie de l'UPR est présent dans des cellules non stressées et qu'environ 3 à 30% des ARNm de HAC1 sont épissés chez la levure *S. cerevisiae* en phase exponentielle. Donc, la question de l'utilité de la voie de réponse au stress du RE en absence de ce stress est devenue légitime à étudier (Schroder *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2001). Au premier abord, il a été suggéré qu'une légère activation de la voie de l'UPR dans des cellules saines permettait de palier aux variations de la demande en repliement des cellules en croissance, afin de maintenir une homéostasie (Schroder and Kaufman, 2005b). Par contre, des études chez la levure et chez les mammifères ont permis d'établir le contrôle qu'exerce la voie de signalisation de l'UPR sur le contrôle nutritionnel et sur les programmes de différenciation cellulaire. En ce qui concerne la levure *S. cerevisiae*, les effets de la voie UPR en situation cellulaire normale est bien caractérisée. L'UPR agit sur les voies cellulaires se rapportant au métabolisme du glucose, au métabolisme de l'azote et, au contrôle de la méiose majoritairement via son effet sur le potentiel de répression du complexe *RPD3-SIN3* HDAC (Schroder *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002; Schroder *et al.*, 2004). Les cibles connues jusqu'à maintenant du complexe répressif *RPD3-SIN3* HDAC sont ACS1 (acetyl coenzyme A synthetase), CAR1 (arginase)

et INO1 (inositol-1-phosphate synthase) (Schroder *et al.*, 2000; Schroder *et al.*, 2004). Chez la levure *S. cerevisiae*, le niveau d'activité de la voie UPR sans stress est lié de près à l'état métabolique des cellules. Une activité basse est observée en présence de sources fermentables de carbone alors que l'activation de la voie UPR se voit plus élevée en présence de sources de carbone non-fermentables (Kuhn *et al.*, 2001). En plus des sources de carbone, le niveau d'épissage de l'ARNm de HAC1 est régulé en fonction du niveau d'azote présent dans le milieu des cellules (Strich *et al.*, 1994; Schroder *et al.*, 2000). Finalement, des liens directs entre l'entrée en méiose et la croissance pseudohyphale des levures et la voie UPR ont été démontrés établissant le rôle de cette voie dans le contrôle de la différenciation cellulaire chez les levures (Schroder *et al.*, 2000; Schroder *et al.*, 2004).

Bien que les données concernant le rôle de l'UPR dans le contrôle nutritionnel et la différenciation cellulaire soient claires chez les levures, les données chez les mammifères se veulent un peu plus disparates. Dans un premier temps, il a été montré que la majorité des chaperones du RE (comme BiP et GRP94) sont induites suite à une privation en glucose et à l'anaérobiose montrant une première corrélation entre état métabolique et UPR chez les cellules de mammifères (Pouyssegur *et al.*, 1977). De nombreuses études effectuées dans des cellules pancréatiques β ont également permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la voie UPR chez ce type cellulaire contribuerait à la signalisation par le glucose agissant ainsi sur la sécrétion de l'insuline (Harding *et al.*, 1999; Bertolotti *et al.*, 2000; Scheuner *et al.*, 2001). Par contre, d'autres études entre autres avec un modèle de souris *perk*^{-/-} émettent un

doute sur les conclusions précédentes, laissant croire plutôt à des effets d'une dysfonction des cellules pancréatiques β due à l'apoptose induite par le stress du RE, plutôt qu'à une interaction directe entre signalisation du glucose et l'UPR (Harding *et al.*, 2000a; Oyadomari *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Le rôle de l'UPR dans la voie de différenciation cellulaire chez les mammifères a quant à lui été proposé suite à la démonstration de l'implication de cette voie dans le passage des cellules B en cellules sécrétrices d'anticorps (Wiest *et al.*, 1990). Dans ce modèle cellulaire, il y a corrélation entre induction et niveau d'épissage de XBP-1 et différenciation cellulaire vers les cellules plasmiques ainsi que corrélation entre changements transcriptionnels requis pour la différenciation et implication de l'UPR dans ces changements transcriptionnels (Lin *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Reimold *et al.*, 2001). Tous ces résultats semblent établir un rôle clair de la voie de réponse au stress du RE dans des processus cellulaires clés ayant préséance en absence de stress du RE.

1.2.6 Les maladies et la voie du UPR

Plusieurs maladies chez l'humain sont le résultat d'un dérèglement des mécanismes de contrôle présents dans le RE dont fait partie intégrante la voie UPR (Schroder and Kaufman, 2005b). Ces maladies peuvent être classées en 4 différents groupes, déterminés par le dérèglement spécifique d'une voie associée au RE dans chacun de ces groupes. Par

le fait même, chacun de ces groupes peut contenir des variantes qui sont séparées en sous-groupes. Un résumé de pathologies associées est présenté dans le tableau suivant.

Table I. Résumé des maladies de la voie du repliement des protéines dans le RE

Class	Definiton	Examples
I	Mutations in secretory client proteins that alter the folding properties of the affected protein. 3 subgroups: A, B, C	Hemophilias A,B, Presenille dementia,...
II	Loss of function of specific proteins at their destination. Mutatlons In the trafficking machinery of the secretory pathway that retains WT cargo molecules in the ER.	Abetalipoproteinemia, Combined coagulation factor V and VIII deficiency,...
III	Defective UPR-signaling machinery.	Bipolar disorder, Wollcott-Rallison syndrome,...
IV	Protective responses regulated by the UPR are disrupted	Polyglutamine diseases (Huntington's disease, spinocerebellar ataxia,...)

En somme, la voie de réponse au stress du RE appelée la voie UPR est une voie centrale des cellules permettant de palier aux stress subits par le RE et permettant ainsi la

survie des cellules soumises à de tels stress. En plus de son action cruciale dans la survie cellulaire, l'UPR semble posséder un rôle non moins important dans des processus clé des cellules en situation normale. L'UPR est une voie extrêmement sensible aux stimuli extérieurs, ce qui permet une régulation très fine des nombreuses voies impliquées dans la réponse au stress du RE. Par contre, il arrive certaines situations où la voie du UPR malgré son activation se voit incapable de palier au stress subit par le réticulum endoplasmique. Dans de tels cas, la voie UPR emprunte un chemin alternatif induisant la voie apoptotique provoquant ainsi la mort cellulaire. La révision de cette alternative empruntée par la voie UPR est complexe et nécessite une révision des mécanismes même de l'apoptose et sera discutée plus loin.

1.3 La mort cellulaire programmée

On répertorie des phénomènes décrivant la mort cellulaire chez les organismes multicellulaires depuis au moins 150 ans. Par contre, il faut attendre les années 70 pour que trois scientifiques (Kerr, Wyllie et Curie) définissent la mort cellulaire observée selon deux catégories basées sur la morphologie des cellules en processus de mort. De ce fait, les termes nécrose et apoptose ont alors fait leur apparition. En premier lieu, il a été établi que la nécrose consistait en un événement violent répondant à des perturbations de l'environnement et causant un arrêt majeur de toutes les fonctions cellulaires et un effondrement de l'homéostasie interne cellulaire. En parallèle, l'apoptose a été définie

comme un évènement complémentaire, mais opposé fonctionnellement à la mitose, et consistant en un processus actif et programmé répondant à des stimuli environnementaux physiologiques ou pathologiques. Ces premières études visant à définir la mort cellulaire a ouvert la porte à d'innombrables études subséquentes visant à comprendre les mécanismes de la mort cellulaire programmée. De ces études il a été établi que la mort cellulaire programmée (PCD pour Programmed Cell Death) était beaucoup plus complexe qu'il n'y paraissait au début, et qu'elle ne se résumait pas seulement au processus apoptotique.

Selon la morphologie des cellules entrant en mort programmée et selon la séquence des évènements, la mort cellulaire programmée peut se diviser en sous-catégories dont font partie l'autophagie et l'apoptose (Bursch *et al.*, 2000; Jin and El-Deiry, 2005). De plus, il semble y avoir également des types de PCD faisant appel aux deux sous-catégories définies précédemment rendant la classification encore plus complexe. Par souci de clarté, seulement les processus d'autophagie et d'apoptose seront définis dans la suite du texte, mais des exemples des processus de mort programmée alternatifs à ces deux phénomènes seront inclus au fil des explications.

1.4 L'autophagie

L'autophagie consiste de façon générale en la dégradation lysosomale/vacuolaire des composantes cellulaires. Le terme autophagie fait référence habituellement à trois

types de processus autophagiques : microautophagie, macroautophagie et autophagie associée aux chaperones (Klionsky, 2005; Massey *et al.*, 2006). Brièvement, la microautophagie prend ses références majoritairement chez les levures et réfère à la séquestration de composantes cytosoliques directement par les lysosomes/vacuoles (Mizushima *et al.*, 2008). Ce processus peut être sélectif ou non et consiste chez les levures en la dégradation sélective d'organelles (RE, mitochondrie,...). La macroautophagie se caractérise par la formation d'autophagosomes qui sont des structures vésiculaires à double membrane se fusionnant aux endosomes ou aux lysosomes/vacuoles permettant la dégradation de larges structures cytosoliques. Comme pour la microautophagie, ces processus peuvent être sélectifs ou non (Mizushima, 2007; Mizushima *et al.*, 2008). La macroautophagie est le processus relatif à l'autophagie le plus étudié et, le terme même autophagie fait souvent référence rien qu'au processus de macroautophagie. Finalement, le processus autophagique médié par les chaperones se réfère seulement à la dégradation sélective de protéines solubles par les lysosomes/vacuoles (Mizushima *et al.*, 2008). Les données qui suivront feront référence à la macroautophagie (qui sera nommée pour la suite seulement autophagie) puisque la majeure partie des données connues sur l'autophagie concerne la macroautophagie.

1.4.1 Les étapes menant à l'autophagie

Le processus menant à l'autophagie comporte plusieurs étapes bien définies. Ces étapes peuvent être au nombre de 3 ou de 7 dépendamment de la façon dont le processus est décortiqué (Mizushima, 2007; Kundu and Thompson, 2008). De façon générale, l'autophagie débute par l'étape de séquestration des composantes cytosoliques qui est suivie par la dégradation de ces dites composantes et finalement suit l'étape de réutilisation des composés dégradés. Chaque étape a une fonction, fonction pouvant différer selon l'organisme étudié et le contexte.

L'autophagie est un procédé induit en réponse à des stimuli extérieurs. La privation en nutriment est certainement la voie d'induction de l'autophagie la plus étudiée. Chez la levure, bien que la privation en azote soit le stimulus le plus fort, l'autophagie peut également être enclenchée en réponse à la privation en carbone, en acides aminés, en acides nucléiques et en sulfate (Takeshige *et al.*, 1992). Chez les mammifères, le processus d'induction est un peu plus complexe bien que la privation en nutriments soit également un stimulus à l'autophagie dans ce système (Mortimore and Poso, 1987; Talloczy *et al.*, 2002; Byfield *et al.*, 2005; Nobukuni *et al.*, 2005). De nombreuses études chez les mammifères placent également le système endocrinien via l'insuline dans la liste des stimuli signalant

vers l'autophagie; donnée également confirmée par des études génétiques chez la drosophile (Mortimore and Poso, 1987; Rusten *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004). Chez les mammifères et la levure, les voies de privation en nutriments et de signalisation par l'insuline passent majoritairement par la kinase TOR, bien que certaines exceptions aient été démontrées (Noda and Ohsumi, 1998; Mordier *et al.*, 2000; Kanazawa *et al.*, 2004; Ravikumar *et al.*, 2004). En plus des nutriments et de la voie endocrinienne, de nombreux régulateurs de l'autophagie ont été identifiés: Bcl-2, les ROS (reactive oxygen species), le calcium, l'AMPK (AMP-activated protein kinase), BNIP3, p19ARF, DRAM, la calpaïne, TRAIL, FADD et l'IP3 (myo-inositol-1,4,5-triphosphate) (Mizushima, 2007).

Une fois le processus enclenché, il doit y avoir formation de l'autophagosome à proximité des structures à dégrader. Les premières étapes de la formation de l'autophagosome consiste en la séquestration des constituants cytoplasmiques incluant les organelles par une membrane unique appelée le phagophore (ou membrane d'isolation) qui possède une structure équivalente à une citerne de l'appareil de Golgi. La séquestration complète des constituants par le phagophore mène à l'autophagosome, organelle à double membrane (Mizushima, 2007). La formation de l'autophagosome est dépendante des produits des gènes Atg (autophagy-related) qui ont été identifiés au nombre de 31 chez *S. cerevisiae*. De ce nombre, 18 gènes sont nécessaires à la formation de l'autophagosome et sont appelés AP-Atg proteins (Reggiori, 2006; Mizushima, 2007; Suzuki and Ohsumi, 2007). Ces protéines AP-Atg sont dépendantes l'une de l'autre pour leur recrutement au

niveau de la structure PAS (pre-autophagosomal structure) lors du début de la formation de l'autophagosome (Suzuki *et al.*, 2001a). En plus des protéines Atg, des facteurs spécifiques aux cellules de mammifères ont été identifiés pour leur interaction dans le processus de formation de l'autophagosome. Le plus connu et le plus caractérisé de ces facteurs est certainement la protéine Beclin-1 qui constitue l'orthologue de Atg6/Vps30 (Vacuolar Protein Sorting 30) et une sous-unité du complexe PI3-kinase de classe III (Liang *et al.*, 1998). L'action pro-autophagique de Beclin-1 est médiée majoritairement par ces partenaires d'interaction que sont Bcl-2, UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) et Ambra1, partenaires qui ne semblent pas être présents chez la levure (Patingre *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Fimia *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007). La séquestration par les autophagosomes est majoritairement non spécifique puisque le contenu des autophagosomes ne se trouve pas à proximité des membranes de celui-ci. Certaines exceptions sont par contre observées comme pour le cas de la voie Cvt (Cytosol to Vacuole Targeting), voie où les enzymes vacuolaires Ape1 et Ams1 sont spécifiquement requises et recrutées grâce à Atg19 (Klionsky, 2005). Également, la présence de la protéine LC3 (ubiquitine ligase homologue mammifère d'Atg8 chez la levure) dans la membrane interne des autophagosomes ciblant spécifiquement la protéine p62/SQSTM1, protéine présente en grandes quantités dans les cellules autophagiques (Bjorkoy *et al.*, 2005). Des cas de spécificité ont également été observés pour Ald6 chez la levure, les peroxysomes, la catalase, les mitochondries et les bactéries envahissantes (Onodera and Ohsumi, 2004).

La dégradation du matériel contenu dans les autophagosomes résulte de la fusion de ces structures avec les lysosomes (vacuoles pour les levures) formant ainsi une nouvelle structure appelée autolysosome ou autophagolysosome (Mizushima, 2007; Mizushima *et al.*, 2008). Le contenu de ces nouvelles structures est alors dégradé par les hydrolases lysosomiales (vacuolaires). Une enzyme identifiée comme nécessaire dans ce processus chez les levures est la lipase putative Atg15/Aut5/Cvt17 (Epple *et al.*, 2001). Puisque les lysosomes sont constamment requis pour la dégradation du matériel provenant de la voie d'endocytose, il est probable que les autolysosomes soient constitués également de matériel étranger. Il a été proposé que les autophagosomes doivent fusionner avec les endosomes avant leur fusion aux lysosomes afin de leur fournir la machinerie nécessaire à la fusion lysosomiale (Tooze *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1998). Le résultat d'une fusion entre les autophagosomes et les endosomes a été nommé amphisomes. Qu'il s'agisse des autophagosomes, des amphisomes ou encore des autolysosomes, ces dénominations sont basées sur leur fonction et non sur leur morphologie puisque par microscopie ces structures ne sont pas distinguables les unes de autres. De ce fait, les structures observées dans les cellules autophagiques sont nommées vacuoles autophagiques (AV) (Mizushima, 2007).

Le but final de tout le processus autophagique consiste en la production de molécules monomériques tels les acides aminés par la dégradation des macromolécules séquestrées dans les autophagosomes (Mizushima, 2007; Mizushima *et al.*, 2008). Ces molécules sont ensuite redistribuées dans la cellule afin qu'elles soient utilisées par celle-ci.

Jusqu'à ce jour, certains partenaires de la redistribution des molécules ont été trouvés chez la levure et chez les mammifères, mais le mécanisme d'action d'un tel processus est encore inconnu (Yang *et al.*, 2006). De plus, aucune donnée n'est disponible sur la contribution de l'autophagie à la redistribution d'autres molécules tels les carbohydrates et les lipides.

1.4.2 Les rôles associés à l'autophagie

Les rôles physiologiques de l'autophagie sont nombreux et sont associés à chaque étape du processus. Une des premières étapes de l'autophagie concerne la séquestration des composantes du cytosol ou d'organelles en soi. Certaines études sur le phénomène de séquestration ont démontré que cette étape, sans la dégradation qui la suit, était nécessaire dans certaines conditions. En effet, des études ont montré que l'autophagie induite par un stress du RE avait un effet protecteur sur les cellules de levure et de mammifères (Bernales *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006; Kouroku *et al.*, 2007). Une hypothèse est que les autophagosomes contenant le RE empêcheraient de signaler à travers le cytosol la toxicité attribuable au stress du RE. Par contre, un stress prolongé ou trop violent du RE semble mener à la mort cellulaire malgré l'effet protecteur que procure l'autophagie (Bernales *et al.*, 2006). La séquestration imputable au processus autophagique possède également des fonctions qui seraient plutôt désavantageuses pour la cellule concernée. En effet, il semble que des pathogènes, tels que les bactéries et les virus, détournent en certaines occasions le processus autophagique à leur avantage leur assurant

ainsi une protection à l'intérieur des autophagosomes, protection nécessaire à leur réplication (Kirkegaard *et al.*, 2004).

L'étape de l'autophagie menant les autophagosomes vers les lysosomes/vacuoles, bien qu'ayant comme but premier l'acheminement des macromolécules à la dégradation, est quelquefois nécessaire au ciblage de certaines protéines ou d'autres molécules. Cette nécessité devient évidente dans la voie Cvt chez les levures, voie permettant aux enzymes vacuolaires Ape1 et Ams1 d'être ciblées à la vacuole sans qu'elles possèdent de séquence signal via l'autophagie (Klionsky, 2005). Ce rôle est également présent chez les cellules de mammifères en ce qui a trait au système immunitaire. En effet, l'autophagie semble jouer un rôle dans la présentation de molécules MHC de classe II à la surface cellulaire, contrairement aux molécules MHC de classe I qui passe préférentiellement par le protéasome et le RE avant d'être envoyées à leur destination finale (Schmid and Munz, 2007). La même fonction semble être jouée par l'autophagie en ce qui concerne le récepteur TLR (Toll-like Receptor), récepteur clé de la réponse immunitaire chez les cellules dendritiques (Lee *et al.*, 2007).

La dégradation par le processus de l'autophagie n'est quant à lui pas en reste en ce qui a trait aux fonctions détenues par ce processus. En effet, il semble que l'autophagie participe au contrôle intracellulaire des protéines/organelles à être dégradées assurant ainsi conjointement avec d'autres processus le contrôle de qualité de la cellule (Iwata *et al.*,

2006; Kim *et al.*, 2007). L'élimination de contenu cytoplasmique par l'autophagie semble être cruciale puisque une inhibition de ce processus a été impliquée dans des dysfonctionnements cellulaires majeurs tels la neurodégénération et la tumorigénèse. (Ravikumar *et al.*, 2002; Hippert *et al.*, 2006). Finalement, même si certains organismes pathogènes utilisent l'autophagie comme protection pour se répliquer, la majorité de corps étrangers sont détruits suivant leur entrée dans la cellule et ce, en partie grâce à l'activation du processus autophagique (Nakagawa *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2005).

Finalement, la dégradation des macromolécules par les autolysosomes en molécules plus simples permet à la cellule de survivre entre autre en période de privation (Kuma *et al.*, 2004; Onodera and Ohsumi, 2005). Des études ont démontré que l'autophagie pourrait faire partie intégrante de l'activation de la gluconéogenèse en période de privation en glucose, qu'elle serait impliquée via la production d'acides aminés dans la production d'énergie via le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et, qu'elle serait impliquée également dans la production de nouvelles protéines nécessaires aux mécanismes de réponse à la privation (Lum *et al.*, 2005; Onodera and Ohsumi, 2005; Mizushima, 2007). Également, des études chez la souris tendent à démontrer l'implication de l'autophagie dans la réponse à l'hypoxie (Adhami *et al.*, 2006; Bohensky *et al.*, 2007).

1.4.3 L'autophagie et la mort cellulaire

Bien que le processus par lequel l'autophagie opère d'abord et avant tout soit une fonction protectrice pour la cellule, l'autophagie peut également être responsable de la mort cellulaire en combinaison ou non avec le processus apoptotique (Figure 3) (Scarlatti *et al.*, 2008). La mort par autophagie peut être induite par deux mécanismes indépendants appelés mort cellulaire par autophagie canonique et non-canonique (Zhu *et al.*, 2007; Mizushima *et al.*, 2008; Scarlatti *et al.*, 2008). On entend par mort cellulaire par autophagie canonique un processus passant par Beclin-1 et Vps34, les deux médiateurs les plus importants de l'autophagie (Mizushima *et al.*, 2008). La mort cellulaire par autophagie non-canonique est un processus indépendant de ces deux derniers médiateurs (Zhu *et al.*, 2007). L'autophagie et l'apoptose partagent de nombreux médiateurs rendant la séparation entre ces deux mécanismes difficiles dans le cas de mort cellulaire (Heath-Engel *et al.*, 2008; Levine *et al.*, 2008). Par exemple, plusieurs membres de la famille des Bcl-2 possèdent des fonctions à la fois dans le processus autophagique et le processus apoptotique. De ce fait, la prudence est de mise lors de l'évaluation du type de mort cellulaire subit par les cellules.

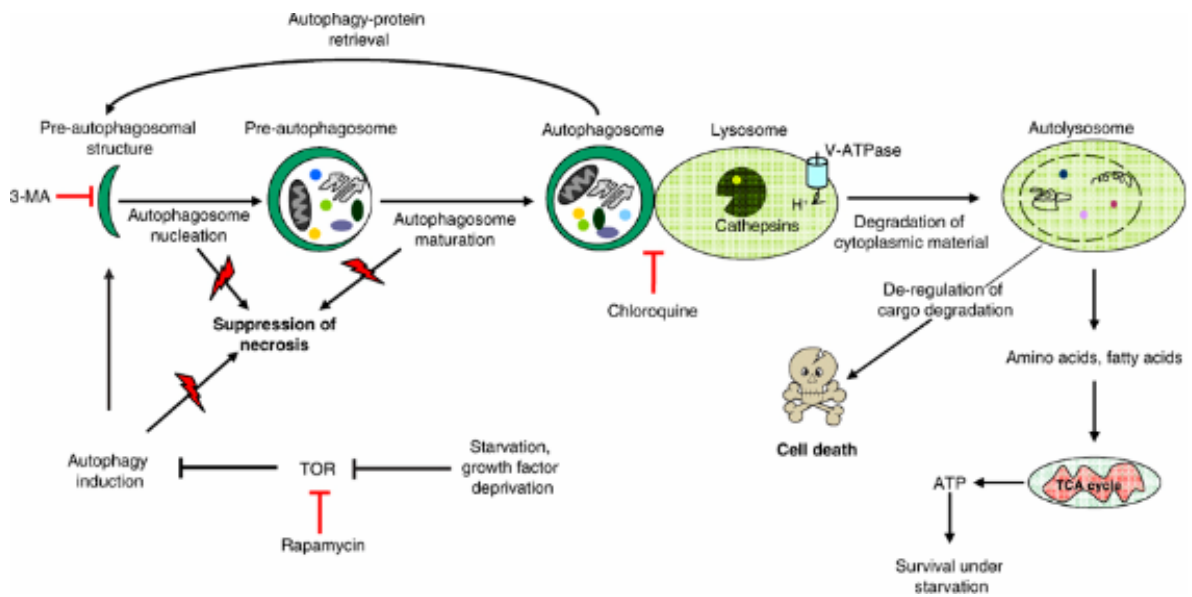


Figure 3 : Liaison entre autophagie et mort cellulaire. Tiré et adapté de Kourtis *et al.* 2009.

1.5 L'apoptose

L'apoptose est certainement un des sujets provoquant le plus d'intérêt auprès de la communauté scientifique pour son importance cruciale dans le maintien des organismes, son implication dans de nombreuses maladies et sa présence dans la majorité des règnes du vivant. L'apoptose a été identifiée en premier lieu comme une voie cruciale des organismes multicellulaires pour son rôle majeur dans le développement et la conservation de l'homéostasie des tissus (Kerr *et al.*, 1972; Prindull, 1995; Meier *et al.*, 2000). Par contre, des études chez nombre d'organismes modèles, dont la levure, ont montré que les processus apoptotiques sont conservés à travers nombres d'espèces élargissant ainsi son importance à l'intégrité même de la vie. La mort cellulaire par apoptose a été classifiée en premier lieu par des distinctions morphologiques évidentes observées chez les cellules présentant une activation de ce processus telles que la modification de l'intégrité membranaire, le rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN et du noyau cellulaire (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980). Toutes ces caractéristiques étant distinctives d'une mort propre ne provoquant pas de relâche incontrôlée du contenu cellulaire qui risquerait de provoquer une toxicité aux cellules environnantes ou une réponse inflammatoire comme c'est le cas pour des cellules subissant la nécrose (Leist and Jaattela, 2001). Les recherches pour comprendre les mécanismes d'initiation, d'exécution et de régulation des phénomènes apoptotiques ont pris naissance dans l'organisme modèle *C. elegans* (Ellis and Horvitz, 1986). Des études

génétiqes ont permis d'établir les gènes impliqués dans la mort par apoptose des 131 cellules somatiques pendant le développement de cet organisme sur les 1090 cellules générées (Ellis and Horvitz, 1986). Les gènes identifiés ont permis d'établir que cet organisme encodait tous les composants de base du processus apoptotique : CED-3 (homologue des caspases), CED-4 (homologue de Apaf-1), CED-9 (homologue de la protéine anti-apoptotique Bcl-2) et EGL-1 (homologue de la famille des protéines à domaine BH-3 seulement) (Ellis and Horvitz, 1986). En bref, en présence d'un signal promouvant l'apoptose, la protéine EGL-1 est activée ce qui permet sa liaison avec la protéine CED-9. Le lien EGL-1 et CED-9 défait la liaison entre CED-9 et CED-4 libérant ainsi CED-4 lui permettant de lier et d'activer CED-3 provoquant ainsi la mort des cellules par apoptose (Hengartner, 1999; Liu and Hengartner, 1999). Le processus observé chez *C. elegans* constitue une bonne base à la compréhension de la voie apoptotique bien que celle-ci se veut autrement plus complexe chez les mammifères, car celle-ci fait intervenir nombre d'autres intervenants dans ce processus.

1.5.1 Les caspases

Certainement, les protéines clé des processus apoptotiques chez les mammifères sont les caspases. L'identification de la grande famille des caspases chez les mammifères, contenant 14 membres, découle d'une identification par homologie de la protéine ICE (interleukin-1 β processing enzyme) (Yuan *et al.*, 1993). ICE a été étudiée en tant

qu'homologue de la protéine CED-3, celle-ci identifiée chez *C. elegans*. Des recherches visant à trouver d'autres protéines de ce type ont fait suite à l'observation que la surexpression d'ICE chez les cellules de mammifères était suffisante à l'induction de l'apoptose (Miura *et al.*, 1993). Les caspases correspondent à une famille de protéases produites sous forme de pro-protéines devant être clivées pour être activées (Stennicke and Salvesen, 2000). Ces protéases sont clivées au motif Asp-Xxx et possèdent également la capacité de cliver des substrats contenant ce même motif ce qui rend leur auto-activation possible. Les caspases sont les seules protéases possédant une spécificité pour ce motif mis à part en ce qui a trait à la protéase à sérine Granzyme B (Stennicke and Salvesen, 2000). Les caspases se classent en trois groupes distincts selon leur fonction : les caspases inflammatoires, les caspases d'initiation et les caspases d'exécution (Degterev *et al.*, 2003). Les caspases inflammatoires ne seront pas revues ici puisque ce groupe de caspases est impliqué dans la réponse inflammatoire plutôt que dans l'apoptose. Les caspases d'initiation sont responsables de l'interaction avec les molécules de signalisation en amont qui induisent l'apoptose via leur domaine DED (death effector domain, contenu dans les caspases 8 et 10) ou CARD (caspase activation and recruitment domain, caspases 2 et 9) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Ces caspases dites d'initiation forment des homodimères permettant leur activation par le clivage mutuel de chaque membre de l'homodimère. L'homodimérisation est le résultat d'une proximité accrue de ces caspases grâce aux complexes protéiques répondant à l'induction de l'apoptose en amont de ces caspases (complexe DISC (death-inducing signaling complex) et apoptosome) (Boatright *et*

al., 2003; Donepudi *et al.*, 2003). Une fois ces caspases initiatrices activées, celles-ci pourront activer les caspases effectrices permettant ainsi une cascade d'évènements protéolytiques favorisant une activation en masse des caspases d'exécution et assurant une transduction rapide du signal (Thornberry *et al.*, 1997; Slee *et al.*, 1999). Des études génétiques chez la souris ont démontré que la caspase 3 était la caspase centrale dans l'exécution du signal apoptotique et que les autres membres faisant partie du groupe des caspases d'exécution avaient des fonctions redondantes avec la caspase 3 (Kuida *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2000).

Les substrats des caspases sont variés et leur nombre dépasse maintenant les 100 protéines chez les mammifères. Les cibles des caspases peuvent être classées en quatre catégories selon leur fonction : protéines régulatrices de l'apoptose, les protéines structurales, les protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN et finalement les protéines reliées à la régulation du cycle cellulaire (Degterev *et al.*, 2003; Jin and El-Deiry, 2005). En plus des caspases en soi, les caspases ont comme substrat d'autres types de protéines impliquées dans la médiation du processus apoptotique. Parmi la gamme de substrats spécifiques aux caspases on retrouve : i) des protéines à domaine BH3, Bid par exemple qui est un substrat spécifique de la caspase 8; ii) des protéines impliquées dans les changements morphologiques attribuables aux cellules apoptotiques telles que DFF45/ICAD, facteur responsable en partie de la dégradation de l'ADN et NDUFS1, sous-unité de complexe respiratoire I de la mitochondrie impliqué dans la perte du potentiel

membranaire de la mitochondrie, la production de ROS et l'interruption du transport de la chaîne d'électrons lorsque ciblée; iii) des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-Xl, IAP,...; iv) ainsi que des protéines kinases à fonctions pro- et anti-apoptotiques telles que AKT, FAK et RIP pour les kinases anti-apoptotiques et ROCK1, PAK2 et MEKK1 pour les protéines pro-apoptotiques (Enari *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998; Degterev *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2004; Jin and El-Deiry, 2005).

Les protéines de type caspases ciblent également des protéines n'ayant pas de fonctions à proprement parler dans le phénomène apoptotique mais contribuant à la propagation de ce processus une fois clivées par leur gain ou perte de fonction (Jin and El-Deiry, 2005). En effet, certains changements morphologiques propre aux cellules apoptotiques sont le résultat du ciblage des protéines structurales par les caspases comme par exemple la fodrine ou les lamines nucléaires (Rao *et al.*, 1996; Kothakota *et al.*, 1997; Jin and El-Deiry, 2005). Également il a été avancé que le ciblage de protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN rendant ce processus inactif permet à la cellule une économie d'énergie permettant l'utilisation de celle-ci préférentiellement pour l'apoptose puisque le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN est coûteux du point de vue énergétique. Les caspases ciblent également le cycle cellulaire en activant des facteurs associés au cycle cellulaire et en inactivant des inhibiteurs ayant pour effet global l'enclenchement du cycle cellulaire (Janicke *et al.*, 1996; Levkau *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). L'activation du cycle cellulaire a également un effet régulateur sur la voie

apoptotique comme en fait foi la phosphorylation de Bad par Cdc2 qui a pour résultat d'inhiber sa liaison avec AKT et de promouvoir son activité pro-apoptotique (Konishi *et al.*, 2002). Cette communication entre apoptose et cycle cellulaire est cruciale en tant que processus suppresseur de tumeurs assurant l'activation de la mort cellulaire lors advenant un défaut de signalisation au cycle cellulaire par des oncogènes (Jin and El-Deiry, 2005).

Bien que la régulation principale des membres de la famille des caspases réside dans leur activation par clivage, ces protéines se voient également régulées par d'autres procédés. La régulation de l'expression génique, les modifications protéiques telles la nitrosylation, l'oxydation, l'ubiquitination et la phosphorylation et la présence d'inhibiteurs spécifiques des caspases ont tous été décrits comme des procédés intervenant dans la régulation de l'activité des caspases (Degterev *et al.*, 2003; Jin and El-Deiry, 2005). La famille des IAPs est la famille d'inhibiteurs de caspases la plus connue et la plus caractérisée (Srinivasula and Ashwell, 2008). Cette famille de protéines contient 8 membres chez l'humain dont la protéine XIAP est la plus caractérisée (Deveraux *et al.*, 1997; Srinivasula and Ashwell, 2008). Les IAPs régulent négativement les caspases par leur liaison directe à celles-ci inhibant ainsi leur activité catalytique (Srinivasula and Ashwell, 2008). Par contre, certaines IAPs prennent la forme d'E3 ubiquitine ligase ciblant les caspases et promouvant leur dégradation par le fait même (Huang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001b). En situation de mort par apoptose, les IAPs se voient régulées négativement par les caspases directement ou encore par les facteurs mitochondriaux Smac et Omi/Htra2,

facteurs relâchés suivant l'induction de l'apoptose (Deveraux *et al.*, 1999; Reed, 2000; Creagh *et al.*, 2004).

1.5.2 La voie extrinsèque

L'induction de l'apoptose dans les cellules est le résultat de la réponse à deux types de signaux de mort cellulaire déterminant ainsi deux voies apoptotiques différentes dans la cellule : voie extrinsèque et voie intrinsèque (Jin and El-Deiry, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006). La voie extrinsèque est médiée par des récepteurs de mort cellulaire présent surtout à la surface des cellules alors que la voie intrinsèque fait appel à une induction de l'apoptose provoquée par des signaux intracellulaires médiant leur action majoritairement via la mitochondrie.

La voie extrinsèque résulte de la liaison de ligands à des récepteurs de mort cellulaire tels TNF-TNFR1, FasL-Fas et TRAIL-DR4 ou TRAIL-DR-5 (Wallach *et al.*, 2008). Chacun de ces récepteurs a été caractérisé dans des types cellulaires précis chez les mammifères et répondent à des stimuli spécifiques. Le détail des voies formées suite à l'activation de ces récepteurs par un signal pro-apoptotique ne sera pas exploré ici mais est exploré dans plusieurs articles de revue sur le sujet (Jin and El-Deiry, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006; Wallach *et al.*, 2008). Par contre, ces trois récepteurs caractérisant la voie extrinsèque emprunte un chemin commun débutant par la liaison du ligand spécifique à son

récepteur pré-assemblé. Le pré-assemblage est en fait une association des récepteurs via leur domaine PLAD (preligand assembly domain). La liaison du ligand au récepteur permet son activation et son association aux molécules adaptatrices via leur domaine DED formant ainsi le complexe DISC. Le complexe DISC assure de cette façon la proximité entre les caspases initiatrices favorisant ainsi leur activation (voir la section sur les caspases) (Jin and El-Deiry, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006; Wallach *et al.*, 2008).

1.5.3 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est quant à elle une voie très bien caractérisée semblant être présente dans tous les types cellulaires entrant en apoptose. Cette voie a pour élément clé la mitochondrie et débute avec la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP pour mitochondrial outer membrane permeabilization) (Green and Kroemer, 2004). La régulation de ce processus de perméabilisation est dépendant d'une famille de protéines centrale de la voie apoptotique : la famille Bcl-2. Les membres de la famille Bcl-2 sont du nombre de 20 chez les mammifères, ont la caractéristique commune de contenir de un à quatre domaines BH (Bcl-2 Homology) et se classent en trois groupes distincts : les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques à plusieurs domaines BH et finalement les membres pro-apoptotiques à simple domaine BH3 (Cory and Adams, 2002). Le ratio serré entre le nombre de molécules pro- et anti-apoptotiques détermine le niveau de sensibilité des cellules à l'apoptose passant par la voie intrinsèque

(Danial and Korsmeyer, 2004). La voie intrinsèque répond à des stimuli apoptotiques variés comme le dommage à l'ADN, les changements au niveau du calcium, la privation en nutriments, etc. (Danial and Korsmeyer, 2004; Green and Kroemer, 2004; Jin and El-Deiry, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006). La première réponse se passe via les protéines à domaine BH3 simple (Bim, Bmf, Puma, Noxa et Bid), qui une fois activées peuvent induire l'oligomérisation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à domaines BH multiples, comme le sont entre autre Bax et Bak (Schuler and Green, 2001; Harada and Grant, 2003; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Elles peuvent également agir au niveau des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 favorisant ainsi leur détachement des protéines à multiples domaines BH pro-apoptotiques. L'activation de Bax et Bak provoque la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie via des mécanismes PT-dépendant ou PT-indépendant (PT pour permeability transition) (Green and Kroemer, 2004; Oberst *et al.*, 2008). La voie de MOMP PT-dépendant fait appel à un pore présent dans la mitochondrie formé par des protéines de la membrane interne et externe de la mitochondrie, alors que la voie MOMP PT-indépendant fait appel à la formation d'un pore dans la membrane externe de la mitochondrie contenant les protéines à domaines BH multiples. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie mène à la mort cellulaire par apoptose selon deux mécanismes : la relâche de molécules pro-apoptotiques et la perte de fonctions essentielles de la mitochondrie (Green and Kroemer, 2004; Oberst *et al.*, 2008). Comme c'est le cas pour le complexe DISC dans la voie apoptotique extrinsèque, la voie intrinsèque forme un complexe similaire appelé

apoptosome formé par le cytochrome C relâché par la mitochondrie suite au MOMP et Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) (Riedl and Salvesen, 2007). Ce complexe peut alors activer la caspase effectrice 9, activation qui mènera à la cascade apoptotique des caspases effectrices. En plus de la relâche du cytochrome C, MOMP relâche également les protéines inhibitrices de caspases membres de la famille des IAPs et ses régulateurs Smac/DIABLO, Htr2A/Omi et GSPT-erF3 (Suzuki *et al.*, 2001b; Hegde *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Riedl and Salvesen, 2007). La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie permet également la relâche de plusieurs autres facteurs pro-apoptotiques qui auront des effets sur l'apoptose de manière caspase-indépendante (Oberst *et al.*, 2008). Parmi ces facteurs on y trouve les protéines AIF (apoptosis-inducing factor) et Endo G (endonuclease G), deux protéines subissant une translocation nucléaire une fois relâchées et impliquées dans la fragmentation de l'ADN observée chez les cellules apoptotiques (Joza *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

1.5.4 La voie apoptotique du RE

Comme il a été discuté largement, le RE est un lieu phare où prennent place des processus cellulaires cruciaux dont le repliement des protéines sécrétées et membranaires. Un déséquilibre de l'équilibre entre protéines mal repliées et repliées correctement provoque un stress au RE puisque l'accumulation de protéines mal repliées mène à leur agrégation, ce qui est toxique pour les cellules. Afin de contrer les stress du RE, la cellule a

développé un mécanisme de réponse pouvant restaurer le déséquilibre subi par le RE, mécanisme appelé UPR pour Unfolded Protein Response révisé de façon détaillée précédemment dans la section consacrée à cet effet (Malhotra and Kaufman, 2007; Ron and Walter, 2007; Schroder, 2008). Par contre, si le mécanisme de l'UPR n'arrive pas à palier au stress imputé au RE et que l'agrégation de protéines en repliement persiste alors les médiateurs de l'UPR enclenchent une voie alternative qui est la voie apoptotique.

Les trois médiateurs principaux de la voie de l'UPR (PERK, ATF6 et IRE1) sont encore cette fois-ci les trois médiateurs principaux de la voie apoptotique enclenchée suivant un stress du RE prolongé. L'action de ces médiateurs dans ce type de mécanisme semble concertée principalement vis-à-vis leur capacité à induire le facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein). L'induction de CHOP est principalement le résultat de l'activation de PERK, et a lieu via le facteur de transcription ATF4 produit spécifiquement quand la synthèse générale est inhibée (Ma *et al.*, 2002b). L'action de IRE1 sur l'activation de CHOP est un peu plus subtile que celle de PERK mais est néanmoins importante. IRE1 agirait plutôt sur l'activation de CHOP via sa phosphorylation post-traductionnelle par la MAPK p38, MAP kinase activée par la kinase ASK1, qui est une kinase clé du processus apoptotique qui sera discutée plus loin (Wang and Ron, 1996; Maytin *et al.*, 2001). Bien qu'il ait été montré qu'ATF6 avait la capacité d'induire l'ARNm de CHOP, aucune étude n'a, à ce jour, relié ATF6 au mécanisme apoptotique induit suite à un stress du RE (Yoshida *et al.*, 2000).

L'implication de CHOP dans l'apoptose induite par le stress du RE a entre autre été élucidée grâce aux études effectuées avec des souris CHOP^{-/-} (Zinszner *et al.*, 1998). CHOP médie son action pro-apoptotique via la transcription de cibles spécifiques dont GADD34, TRB3 et BCL-2 (Szegezdi *et al.*, 2006). GADD34 est une protéine interagissant avec la protéines phosphatase 1 (PP1) permettant son activation amenant ainsi la déphosphorylation de eIF2 α et ainsi la levée du blocage de la traduction (Brush *et al.*, 2003). L'effet pro-apoptotique de GADD34 est clair puisque son expression est liée à plusieurs signaux apoptotiques et puisque sa surexpression induit le mécanisme apoptotique (Adler *et al.*, 1999; Hollander *et al.*, 2001; Hollander *et al.*, 2003). Par contre, la façon dont GADD34 exerce sa fonction pro-apoptotique en est encore au stade des spéculations. TRB3 (Tribbles-related protein 3), une deuxième cible de CHOP, a obtenu le crédit d'une implication dans l'apoptose induite par le stress du RE suite à une étude montrant que l'absence provoquée de TRB3 dans les cellules HEK293T et HeLa par la technique de l'ARN interférence (RNAi) rendait ces cellules résistantes à la tunicamycine, un puissant agent stresser du RE (Ohoka *et al.*, 2005). Un mécanisme d'action de TRB3 dans l'apoptose induite par le stress du RE a été défini lui imputant l'inhibition d'AKT par sa liaison, AKT étant une sérine/thréonine kinase impliquée dans la survie des cellules (Du *et al.*, 2003). TRB3 aurait des actions contradictoires dépendant de la durée du stress du RE bloquant CHOP au début du stress et favorisant l'inhibition d'AKT dans un cas de stress prolongé (Hu *et al.*, 2004; Ohoka *et al.*, 2005).

L'implication de BCL-2 dans l'apoptose induite par le stress du RE a été la première preuve d'une intervention de la mitochondrie dans le processus apoptotique s'initiant au RE (Szegezdi *et al.*, 2006). Une surexpression de BCL-2 ou une déficience en Bax et Bak conférant une protection aux cellules soumises à des stress du RE ont été les premières évidences de l'implication de la famille des BCL dans ce processus (Distelhorst and McCormick, 1996; Wei *et al.*, 2001). La famille de BCL-2 semble être sous la régulation de CHOP et JNK dans le cas d'un processus apoptotique initié par le RE. En ce qui concerne CHOP, il a été montré que CHOP inhibait l'expression de la protéine BCL-2, laissant ainsi une plus grande place aux protéines pro-apoptotiques de la famille des BCL-2 dont font parti Bax et Bak, ce qui leur permet d'exercer leur action pro-apoptotique (Matsumoto *et al.*, 1996; McCullough *et al.*, 2001).

CHOP n'est pas le seul intervenant majeur dans le processus apoptotique initié au RE induit par les médiateurs de l'UPR. IRE1 a également des actions marquées du côté de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase), une voie connue pour son influence sur la mort cellulaire programmée en réponse à plusieurs stress d'origines variées (Dhanasekaran and Reddy, 2008). L'activation de la voie JNK en réponse au stress du RE a été observée et montrée dépendante du complexe IRE1-TRAF2. Ce complexe a la capacité de recruter ASK1 (apoptosis-signal-regulating kinase) et de l'activer rendant la médiation des signaux à la voie JNK possible puisque ASK1 est une MAPKKK (mitogen-activated protein kinase

kinase kinase) de la voie des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) JNK et p38 (Urano *et al.*, 2000; Yoneda *et al.*, 2001). Par un criblage double hybride chez la levure, il a également été démontré qu'IRE1 avait la capacité de lier JIK (c-Jun N-terminal inhibitory kinase) et JAB1 (Jun activation domain-binding protein), deux intervenants de plus dans la voie JNK (Yoneda *et al.*, 2001; Oono *et al.*, 2004). Les effets de la voie JNK sur l'apoptose découle de son action vis-à-vis BCL-2 et les protéines à domaine BH3 seulement plus particulièrement Bim tous deux de la famille des BCL. La phosphorylation de BCL-2 par le voie JNK inhibe son action anti-apoptotique alors que la phosphorylation de Bim stimule son activité pro-apoptotique laissant ainsi le champ libre aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pour exercer leur effet (Lei and Davis, 2003; Bassik *et al.*, 2004). Par contre, une étude récente a montré qu'une souris déficiente en Bax et Bak soumise à un stress du RE n'induisait pas la forme épissée de XBP-1 pas plus que l'activation de la voie JNK (Hetz *et al.*, 2006). De cette même étude, il a également été montré que IRE1 avait la capacité de lier directement Bax et Bak en situation de stress du RE (Hetz *et al.*, 2006). Ces résultats montrent de façon surprenante un lien direct entre l'UPR et l'apoptose.

Suite à l'activation et la mise en place de tous ces intervenants, la voie apoptotique se trouve activée. L'activation des caspases 3, 6, 7, 8, 9 et 12 a été observée en stress du RE à travers diverses études (Degterev *et al.*, 2003). Par contre, la caspase clé dans le processus apoptotique induit par un stress du RE n'a pas encore été définie et ce, même si la caspase 12 a souvent été proposée (Szegezdi *et al.*, 2003). Le problème avec la caspase

12 réside dans le fait que cette caspase ne se trouve que chez les rongeurs et n'a donc pas d'homologues chez les autres espèces de mammifères.

1.6 L'apoptose chez les levures

Le mécanisme de mort cellulaire programmée par apoptose a été considéré pendant longtemps comme un processus exclusif aux organismes multicellulaires de par l'importance de ce mécanisme dans le développement et dans la différenciation cellulaire. Par contre, cette exclusivité a été ébranlée une toute première fois en 1997 lorsqu'une équipe a démontré pour la première fois qu'un mutant du gène CDC48 présentant des défauts de cycle cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* démontrait des caractéristiques distinctes propres à l'apoptose (Madeo *et al.*, 1997). En effet, les premières observations d'externalisation des phosphatidylsérines, de fragmentation de l'ADN et de fragmentation nucléaire étaient publiées pour un organisme unicellulaire. À partir de ce moment, les études visant à démontrer le mécanisme apoptotique chez les levures se sont succédées, permettant d'établir hors de tout doute l'existence de l'apoptose chez cet organisme modèle (voir Figure 4). Des études chez non seulement *Saccharomyces cerevisiae* mais également chez *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Podospora anserina*, *Aspergillus fumigatus* et *Zygosaccharomyces bailii* par exemple, ont permis de poser des bases sur un tel mécanisme chez les levures (Hamann *et al.*, 2008). Puisque les mécanismes apoptotiques ont été élucidés en premier lieu chez *C. elegans* et

ensuite chez les cellules de mammifères, les études effectuées chez les levures ont d'abord cherché à identifier des similarités dans ces processus entre les organismes. Le résumé d'une décennie d'études chez les levures a établi une panoplie de conditions menant à l'activation de l'apoptose, a défini un nombre d'homologues présents dans la voie apoptotique chez les mammifères et leur action et a révélé une implication cruciale de la mitochondrie dans plusieurs conditions induisant l'apoptose (Liang *et al.*, 2008a; Mazzoni and Falcone, 2008a; Owsianowski *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008).

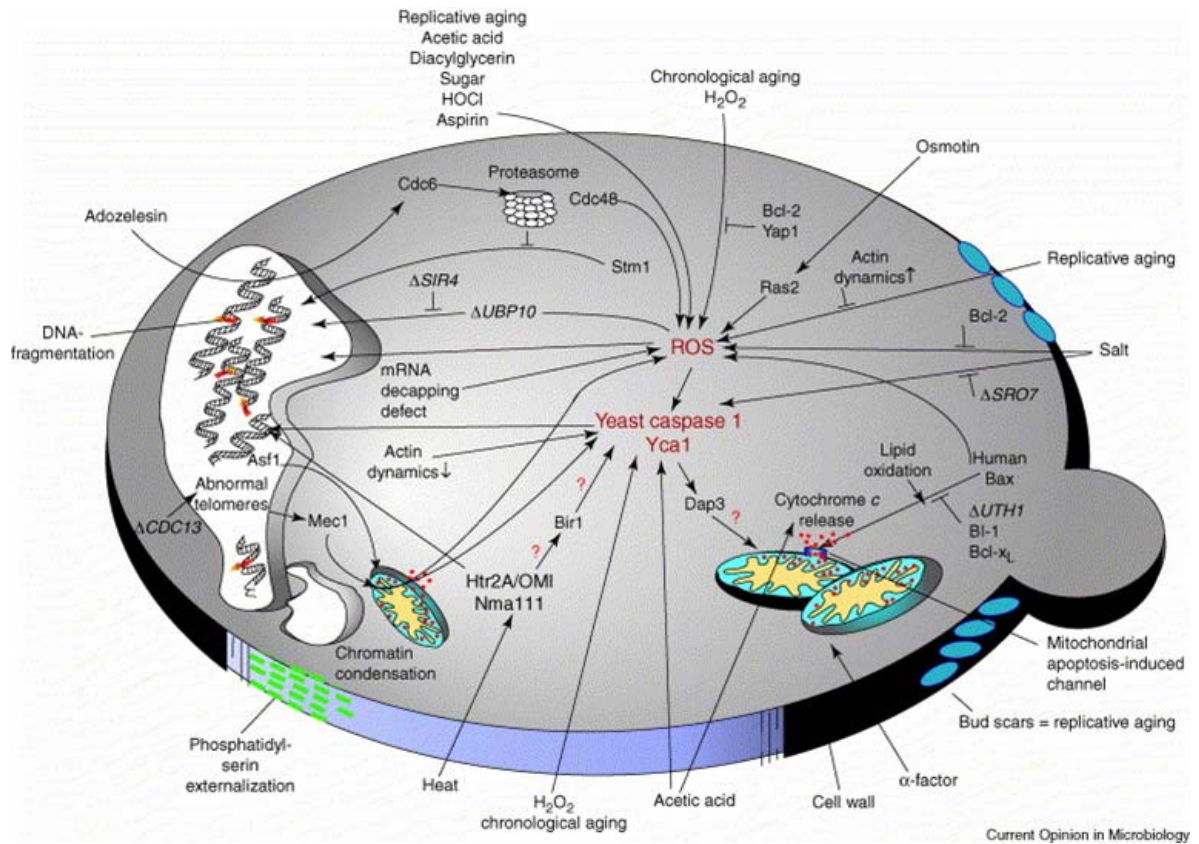


Figure 4 : Représentation d'une cellule de levure en apoptose. Principaux médiateurs de l'apoptose chez les levures et leurs liens entre eux sont représentés dans ce schéma. Les flèches en rouge indiquent des voies apoptotiques connues chez les mammifères mais pas chez les levures. Tiré et adapté de Madeo F. *et al.* *Current Opinion in Microbiology*. 2004

1.6.1 La levure comme outil d'expression hétérologue pour l'étude de l'apoptose

Avant la publication de la découverte chez les levures d'une voie comportant toutes les caractéristiques diagnostiques de l'apoptose, cet organisme modèle a d'abord été utilisé comme outil d'expression de protéines de mammifères hétérologues pro- et anti-apoptotiques dans le but de tester leur interaction. En effet, les levures étaient considérées comme un modèle « propre », puisqu'on les considérait comme dépourvues de voie apoptotique (Matsuyama *et al.*, 1998; Xu and Reed, 1998; Sawada *et al.*, 2003).

La levure a été utilisée comme plateforme d'expression hétérologue afin d'étudier des protéines impliquées dans l'apoptose. Les protéines hétérologues les plus étudiées chez la levure sont sans aucun doute les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 bien que d'autres protéines aient été exprimées. L'expression hétérologue de Bax et Bak chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* respectivement ont permis de montrer que ces protéines induisaient non seulement la mort cellulaire mais la mort cellulaire ayant les caractéristiques typiques de la mort programmée par apoptose (Ink *et al.*, 1997; Ligr *et al.*, 1998; Xu and Reed, 1998; Priault *et al.*, 2003; Kissova *et al.*, 2006). L'hypothèse favorisée concernant le mécanisme d'action de Bak et Bax stipule que ces protéines formeraient des pores à la membrane mitochondriale permettant la relâche du cytochrome c et provoquant ainsi le signalement de l'apoptose, semble être valable également chez les levures.

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 a également largement été étudiée chez les levures. Bcl-2 démontre dans tous les cas une activité anti-apoptotique claire chez les levures comme c'est le cas pour les mammifères (Sato *et al.*, 1994; Ink *et al.*, 1997; Poliakova *et al.*, 2002). En plus de bloquer chez la levure l'activité pro-apoptotique de protéines hétérologues exprimées comme Bax et Bak, Bcl-2 inhibe également l'apoptose produite par des mécanismes endogènes des levures (Longo *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003b; Trancikova *et al.*, 2004). Des différences claires entre les effets produits par les protéines hétérologues chez les levures, comparativement aux effets observés chez les mammifères, démontrent clairement la spécificité de chacun des organismes dans la médiation de sa voie apoptotique, bien qu'une similarité certaine existe bel et bien.

1.6.2 Conditions menant à l'apoptose chez les levures

Les conditions menant à l'apoptose chez les levures sans expression de protéines hétérologues sont nombreuses. Plusieurs conditions de stress et plusieurs drogues ont été montrées comme pro-apoptotiques entre autre chez *S. cerevisiae* mais également chez d'autres levures. La déficience en sucre, la déficience en acides aminés, la déficience en oxygène, la déficience en triacylglycérols, le stress osmotique, le stress thermique, le stress oxydatif, le stress d'ions métalliques, les drogues telles la tunicamycine, l'aspirine, l'amiodarone, l'amphotericin B, l'adozelesin, l'acide valproïque et la caféine, sont des exemples de conditions menant à l'activation de processus apoptotique chez les levures

(Madeo *et al.*, 1999; Ludovico *et al.*, 2001; Huh *et al.*, 2002; Granot *et al.*, 2003; Balzan *et al.*, 2004; King *et al.*, 2004; Mitsui *et al.*, 2005; Pozniakovsky *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005). Ces conditions particulières et ces drogues sont des indicateurs des voies cellulaires impliquées dans la signalisation à l'apoptose que ce soit la voie du dommage à l'ADN, le stress associé au réticulum endoplasmique, la biosynthèse des lipides,... L'implication de toutes ces voies dans l'induction de l'apoptose démontre bien la nécessité d'un tel mécanisme chez ces organismes unicellulaires afin de palier aux dérèglements cellulaires (Frohlich *et al.*, 2007).

Toutes les conditions et les drogues mentionnées ci-haut induisent l'apoptose suite à un stress et à une modification drastique de l'environnement. Par contre, la levure a également la capacité d'induire le phénomène de mort programmée par apoptose en réponse à des conditions physiologiques. Parmi ces conditions physiologiques on retrouve la réponse aux phéromones lors de la conjugaison sexuelle, la mort cellulaire retrouvée dans des colonies de levures, le vieillissement et la réponse aux toxines virales (Knorre *et al.*, 2005; Buttner *et al.*, 2006; Frohlich *et al.*, 2007; Severin *et al.*, 2008). Ces phénomènes naturels sont importants puisqu'ils viennent démontrer la nécessité du processus apoptotique chez les organismes unicellulaires.

1.6.3 Conditions naturelles menant à l'apoptose chez les levures

L'apoptose induite lors de la conjugaison sexuelle résulterait de la présence d'une concentration trop élevée de phéromones lorsqu'aucun partenaire de type sexuel opposé n'est disponible. La concentration élevée de phéromones résulterait en une activation accrue de la voie MAP kinase, dont la protéine Ste20p est la kinase clé, le dérèglement de la concentration cytosolique de calcium, l'hyperpolarisation de la mitochondrie et une production accrue de ROS menant finalement à la mort cellulaire (Severin and Hyman, 2002; Pozniakovsky *et al.*, 2005). Par contre, l'implication de l'apoptose dans ce processus est à ce jour encore en débat depuis qu'un groupe a publié en 2006 l'hypothèse selon laquelle la mort provoquée par les phéromones serait une mort nécrotique résultant d'un échec dans le processus de conjugaison sexuelle (Zhang *et al.*, 2006).

La population de levures constituant une colonie démontre une capacité de survie à long terme et, les caractéristiques des cellules constituant le centre et la périphérie des colonies ne sont pas les mêmes (Palkova and Vachova, 2003, 2006). En effet, les cellules constituant le centre de la colonie démontrent un phénotype apoptotique clair (externalisation des phosphatidylsérines, fragmentation de l'ADN et du noyau, production de ROS,...). Ces caractéristiques semblent être induites par la réponse au signal du relâchement de l'ammoniac dans la colonie, signal responsable de la différenciation des cellules à l'intérieur de la colonie, adaptant les cellules à l'environnement. Le signal par

l'ammoniac provoquant la mort cellulaire des cellules internes à la colonie aurait le rôle de fournir des nutriments aux cellules en périphérie, permettant ainsi une croissance optimale de la colonie et une meilleure survie à long terme (Palkova and Vachova, 2003; Vachova and Palkova, 2005). Cette hypothèse a été établie suite aux études montrant que la délétion de *SOK2* abolissant le signal de l'ammoniac provoque l'induction de l'apoptose dans la colonie entière et, que le fait de retirer le centre de la colonie inhibait la croissance des cellules en périphérie de celle-ci (Vachova *et al.*, 2004).

La majeure partie des données obtenues sur le vieillissement des cellules de mammifères provient au départ d'études effectuées préalablement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Piper, 2006). Les levures sont soumises à deux types de vieillissement : le vieillissement chronologique et le vieillissement répliatif (Maskell *et al.*, 2003; Qin and Lu, 2006). Un phénotype clair d'apoptose semblant dépendre beaucoup de la présence de ROS a été observé chez les levures vieillissantes et ce pour les deux types de vieillissement (Laun *et al.*, 2001; Fabrizio *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Laun *et al.*, 2005; Rockenfeller and Madeo, 2008). Bien que la mutation de certains gènes impliqués dans les processus apoptotiques permet la survie des cellules, il semble que ces cellules soient moins adaptées à entrer dans un second cycle de croissance laissant croire à une sélection négative de ces cellules pouvant outrepasser la mort cellulaire par vieillissement (Herker *et al.*, 2004).

Il existe des levures appelées levures tueuses (killer yeast) ayant la capacité de produire et sécréter dans le milieu environnant des toxines tueuses (killer toxins), qui sont encodées par des virus à ARN dans la majorité des cas (Buttner *et al.*, 2006; Schmitt and Breinig, 2006). Cette capacité de sécréter des toxines favorisant la mort des souches de levures sensibles à ces toxines, joue un rôle majeur dans le phénomène de compétition pour les nutriments existant dans le milieu naturel des cellules (par exemple dans la compétition existant entre les diverses communautés de levures présentes dans les fruits). Il a été montré que la mort cellulaire provoquée suite à la signalisation par les toxines tueuses fait appel à un mécanisme apoptotique lorsque ces toxines sont présentes en faible quantité dans l'environnement. Parallèlement, un niveau très élevé de toxines dans le milieu induit une mort nécrotique (Reiter *et al.*, 2005).

1.6.4 Protéines impliquées dans l'apoptose chez les levures

Bien que les caractéristiques observées chez les levures soumises à l'expression hétérologue de protéines pro-apoptotiques, à différents stress cellulaires, à des drogues ou encore soumises à des processus cellulaires physiologiques tels le vieillissement ou la conjugaison sexuelle présentent toutes des caractéristiques auparavant définies comme des caractéristiques typiques de l'activation du mécanisme apoptotique (externalisation des phosphatidylsérines, fragmentation de l'ADN, fragmentation du noyau, production de ROS, ...). Les détails des mécanismes de l'apoptose chez les levures restent inconnus à ce jour.

Par contre, l'étude chez les levures de plusieurs mutants induisant l'apoptose et la découverte de plusieurs homologues des protéines impliquées dans l'apoptose chez les mammifères a permis de définir certains aspects du processus apoptotique ayant lieu chez les levures. Il semble que les mécanismes menant à la mort cellulaire programmée par apoptose diffèrent dépendant de l'élément inducteur de ce processus apoptotique.

L'observation de caractéristiques apoptotiques chez des mutants de certains gènes encodant des protéines ayant des fonctions variées dans la cellule a permis de fournir des indices sur les voies intervenant dans l'induction de l'apoptose chez les levures. Le lien entre la voie de la réparation des dommages à l'ADN, la réplication de l'ADN et la longueur des télomères et l'apoptose présent dans de nombreux cas de cancers chez les mammifères a été mis de l'avant chez les levures grâce aux études avec différentes drogues, mais également grâce au mutant de la protéine de liaison aux télomères CDC13 et au mutant thermosensible de la protéine ORC2, une sous-unité du complexe de reconnaissance de l'origine de réplication (Qi *et al.*, 2003; Wysocki and Kron, 2004; Weinberger *et al.*, 2005). L'étude du mutant LSM4 chez *S. cerevisiae*, une protéine impliquée dans l'enlèvement de la coiffe des ARNm(s), a permis d'établir l'importance de la stabilité des ARN messagers dans l'induction de l'apoptose (Mazzoni *et al.*, 2003; Mazzoni *et al.*, 2005). Finalement, l'importance du processus de dégradation des protéines dans le mécanisme apoptotique a été établie grâce aux études des mutants des protéines CDC48, STM1 et UBP10 entre autre (Ligr *et al.*, 2001; Jarosch *et al.*, 2002; Bettiga *et al.*, 2004).

Les génomes de levures encodent plusieurs homologues de protéines jouant un rôle dans le processus apoptotique chez d'autres organismes. Les caspases sont au centre du mécanisme apoptotique des cellules de mammifères et le génome de ces cellules encode plusieurs caspases intervenant à différents moments dans le processus apoptotique. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* encodent chacune une protéine homologue aux caspases retrouvées chez les mammifères, métacaspases appelée Yca1p (*S. cerevisiae*) et Pca1p (*S. pombe*). Cette métacaspase n'est pas essentielle à la viabilité de ces levures (Madeo *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007). De ce fait, la majorité des processus induisant l'apoptose chez les levures ont été évalués sur leur dépendance à cette métacaspase grâce à la délétion du gène codant pour celle-ci. Bien que l'apoptose induite par des défauts à plusieurs processus fondamentaux de la cellule semblent être dépendante d'Yca1p, ou Pca1p (chez *S. pombe*), comme par exemple la réplication de l'ADN, la stabilité des ARNm(s) ou encore la fonction mitochondriale, il semble que certains processus soient indépendants de cette métacaspase. Ces observations laissent croire à la présence d'autres protéines encore non identifiées remplissant la même fonction ou encore à une voie totalement indépendante de toute forme d'action de la part des métacaspases (Liang *et al.*, 2008a; Mazzoni and Falcone, 2008a). Par contre, comme beaucoup de processus dans la cellule les voies ne sont pas totalement distinctes, ce qui laisse possible qu'il y est des croisements entre les voies apoptotiques dépendantes et indépendantes de la métacaspase Yca1p ou Pca1p. Jusqu'à ce jour, aucun substrat de cette métacaspase n'a été

identifié, ne permettant pas ainsi de relier cette métacaspase à une branche précise du mécanisme apoptotique (Liang *et al.*, 2008a; Mazzoni and Falcone, 2008a). Des expériences *in vitro* avec extraits bactériens contenant Yca1p recombinante ont montré que cette métacaspase contenait une activité endopeptidase à cystéine spécifique pour les arginines/lysines. Dans cette étude, l'activité endopeptidase n'a pu être inhibée par l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk, laissant supposer une différence notable avec les caspases de mammifères bien que la nature recombinante de cette protéine puisse altérer les résultats. La clé dans la compréhension du mécanisme impliquant la métacaspase chez les levures réside dans l'identification de substrats physiologiques de cette endopeptidase. Bien qu'aucun substrat ne soit à ce jour identifié, des criblages double-hybride chez la levure *S. cerevisiae* ont permis d'identifier des protéines ayant la capacité d'interagir avec Yca1p (Uetz *et al.*, 2000; Drees *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2002). Finalement, comme c'est le cas pour la majorité des protéines impliquées dans le phénomène apoptotique chez les mammifères, il semble que la métacaspase Yca1p ait une fonction cellulaire qui ne soit pas reliée à la mort cellulaire programmée. Un article récent paru en août 2008 fait état d'un rôle pour Yca1p dans la régulation du cycle cellulaire (Lee *et al.*, 2008).

La métacaspase Yca1 n'est pas le seul homologue encodé par le génome de la levure impliqué dans l'apoptose. Des homologues aux protéines Htra2/Omi (Nma111p), Survivin (Bir1p), cytochrome c, AIF (Aif1p), EndoG (Nuc1p), histone H2B et AMID

(Ndi1p) ont été identifiées et étudiées pour leur implication dans le mécanisme apoptotique (Frohlich *et al.*, 2007). De ces études, il est devenu évident l'existence d'un processus apoptotique ancestral établi chez les levures bien que les similarités de fonction entre ces homologues ne soient pas parfaites. Nma111p (Nuclear Mediator of Apoptosis) est une protéase à sérine qui s'accumule dans le noyau en conditions de stress. Il est proposé que cette accumulation est responsable de la dégradation de Bir1p (homologue à IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein) permettant ainsi l'induction du phénomène apoptotique. Dans le cas de Nma111p, celle-ci est localisée exclusivement dans le noyau, contrairement à son homologue chez les mammifères localisé à la fois dans la mitochondrie et le noyau (Fahrenkrog *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2006). Dans le cas de Bir1p, aucun lien direct avec la métacaspase Yca1p n'a été observé parallèlement au lien entre la caspase 3 et Survivin (IAP) tel qu'observé chez les mammifères (Riedl *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2006). Le mode d'action d'Aif1p chez les levures est quant à lui très semblable à celui des mammifères et consiste en la translocation d'Aif1p de la mitochondrie au noyau en conditions apoptotiques, permettant ainsi la promotion des mécanismes apoptotiques (Wissing *et al.*, 2004; Modjtahedi *et al.*, 2006). Un mécanisme similaire est observé pour Endo G ou encore Nuc1p chez *S. cerevisiae*, endonucléase mitochondriale subissant une translocation de la mitochondrie au noyau lors d'un processus apoptotique afin de procéder à la dégradation de l'ADN nucléaire (Buttner *et al.*, 2007). Comme il a été démontré chez les mammifères, la phosphorylation de la queue de l'histone H2B est un pré-requis à l'exécution du programme apoptotique chez les levures lors de l'induction par le peroxyde

d'hydrogène montrant la conservation du contrôle épigénétique dans le processus apoptotique entre les espèces (Ahn *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006). Ndi1p, homologue d'AMID (AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of cell death) est une NADH déshydrogénase interne contribuant au phénomène apoptotique puisque son knockout permet une meilleure survie en présence de plusieurs inducteurs d'apoptose (Wu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Son effet semble être dû à sa participation dans la production active de ROS lors du phénomène d'induction de l'apoptose. Un deuxième homologue d'AMID est présent chez *S. cerevisiae* : NDE1 codant pour une NADH déshydrogénase externe. Ce second homologue semble également impliqué dans le processus apoptotique mais à un degré moins élevé que Ndi1p (Li *et al.*, 2006). Des protéines comme Tat-D et Mmi1p ont également été étudiées chez la levure pour leur implication dans l'apoptose, comme il avait été démontré pour ces protéines chez *C. elegans* et les mammifères (Nakatsukasa *et al.*, 2001; Parrish and Xue, 2003; Qiu *et al.*, 2005; Rinnerthaler *et al.*, 2006). Tat-D correspond à une endo-/exo/ (3'-5')-nucléase possiblement impliquée dans la fragmentation de l'ADN (Qiu *et al.*, 2005). Mmi1p est quant à elle une protéine homologue à TCTP chez les mammifères capable d'interagir avec les microtubules et la mitochondrie et subissant une relocalisation à la mitochondrie en conditions apoptotiques (Rinnerthaler *et al.*, 2006).

1.6.5 La mitochondrie dans l'apoptose chez les levures

Une des similarités des plus frappantes entre le mécanisme apoptotique observé chez les mammifères et celui découvert chez les levures réside dans l'implication de la mitochondrie dans ce processus. La présence accrue de ROS lors de l'induction de l'apoptose dans de nombreuses conditions, la relâche du cytochrome c, le rôle de l'homologue de AIF et de Endo G dans la médiation de l'apoptose, l'observation des phénotypes de fragmentation et d'hyperpolarisation mitochondriale, la perte de potentiel membranaire mitochondrial, l'implication de protéine de fission mitochondriale comme Dnm1p, Mdv1p et Fis1p dans le processus apoptotique, l'effet de l'expression de protéines telles Bax et Bak sur la formation de pores mitochondriaux sont autant de preuves de la voie mitochondriale dans le processus apoptotique chez les levures (Frohlich *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Bien que tous les inducteurs d'apoptose chez la levure ne semblent pas passer obligatoirement par la mitochondrie, celle-ci est sans aucun doute un médiateur des plus importants comme c'est le cas pour les mammifères et cela surtout du point de vue du vieillissement. Plusieurs détails sur le mécanisme impliquant la mitochondrie chez les levures dans le processus apoptotiques ne sont pas encore élucidés comme par exemple l'implication des homologues de VDAC, ANT et cyclophilin D dans la formation du PTP.

1.7 L'apoptose chez *Schizosaccharomyces pombe*

L'étude de l'apoptose chez la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe* est à un stade beaucoup plus embryonnaire que chez son homologue *S. cerevisiae* (Low *et al.*, 2005; Low and Yang, 2008b). L'éloignement phylogénétique de ces deux levures rend leur étude conjointe nécessaire puisque des divergences majeures dans les voies cellulaires centrales sont souvent observées (Sipiczki, 2000).

1.7.1 *S. pombe* comme organisme modèle dans l'étude de l'apoptose

Comme ce fut le cas pour *S. cerevisiae*, *S. pombe* a tout d'abord été utilisé comme organisme modèle dans l'expression de protéines hétérologues impliquées dans l'apoptose. Ces premières études ont tout d'abord établi la capacité des protéines de la famille des Bcl à induire et à inhiber l'apoptose chez *S. pombe*. En effet, la surexpression de Bax et Bak induit la mort cellulaire de *S. pombe* ayant tous les phénotypes caractéristiques de l'apoptose et la co-expression de Bcl-Xl et Bcl-2 renverse ce phénotype (Ink *et al.*, 1997; Jurgensmeier *et al.*, 1997; Torgler *et al.*, 1997). L'apoptose induite par Bak et Bax démontre une vacuolisation accrue des cellules laissant croire à un croisement des deux voies de mort cellulaire que sont l'apoptose et l'autophagie dans ce cas (Kissova *et al.*, 2006). Également, la mort cellulaire provoquée par Bak chez *S. pombe* se fait de manière

caspase-indépendante. De plus, l'expression de la protéine Ced-4 de *C. elegans* induit la mort cellulaire, qui est inhibée lorsque Ced-9 est co-exprimée; démontrant ainsi la conservation de ce mécanisme du ver à la levure (James *et al.*, 1997). Dans le même ordre d'idées, *S. pombe* a également été utilisé dans des nombreux criblages génétiques visant à identifier des protéines intervenant dans le mécanisme apoptotique et des mutations affectant la fonction apoptotique des protéines ciblées. De ces études on a identifié la protéine HMGB1 (High-mobility group box-1) comme protéine anti-apoptotique inhibant la mort cellulaire provoquée par Bak chez *S. pombe* (Brezniceanu *et al.*, 2003). Il est certainement intéressant que HMGB1 soit exprimée de façon accrue dans les carcinomes du cancer du sein. Le domaine essentiel permettant l'interaction physique entre la caspase 3 et la protéine anti-apoptotique XIAP a été élucidée entre autre grâce à un criblage effectué chez *S. pombe* (Silke *et al.*, 2001).

1.7.2 Homologues de protéines apoptotiques encodés par la levure *S. pombe*

Comme mentionné ci-haut pour *S. cerevisiae*, la levure *S. pombe* encode un nombre de protéines homologues à des protéines impliquées dans l'apoptose chez les mammifères. *S. pombe* encode Pca1p l'homologue de la métacaspase YCA1, SpRad9 un homologue de la famille des Bcl-2 et Bir1p un homologue de la famille des IAP (Low and Yang, 2008b). Des recherches bioinformatiques démontrent également la présence d'homologues pour les

protéines Htra2/Omi, EndoG et BI-1 (Bax inhibitor 1) (nos résultats). La métacaspase Pca1p de la levure *S. pombe* est une protéase à cystéine à activité auto-catalytique (Zhang *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007). Comme il a été montré pour Yca1p, la surexpression de Pca1p n'induit pas la mort des cellules (Low and Yang, 2008b). Par contre, la surexpression de Pca1p semble restaurer la toxicité induite par le cadmium mais ne restaure pas la mort provoquée par le stress oxydatif ou le vieillissement chronologique, laissant donc le rôle de Pca1p dans ces conditions ambigu (Lim *et al.*, 2007). Contrairement à ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, la délétion de Pca1p ne protège pas de la mort par apoptose induite par le stress oxydatif, l'acide acétique et le vieillissement chronologique, laissant croire à un mécanisme alternatif indépendant de cette caspase chez *S. pombe* (Low and Yang, 2008b). Finalement une régulation à la hausse de la transcription de *pcal*⁺ est observée en différentes conditions de stress comme le stress oxydatif, le stress osmotique, la chaleur, les dommages à l'ADN et la toxicité due aux métaux lourds (Chen *et al.*, 2003a; Lim *et al.*, 2007). Cette régulation positive laisse présager une dualité protectrice et mortelle.

Le génome de *S. pombe* encode également la protéine SpRad9, un partenaire du complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1), complexe ayant de nombreuses fonctions telles la reconnaissance des dommages à l'ADN, initiation du point de contrôle du cycle cellulaire, réparation des dommages à l'ADN, la liaison aux télomères, la stabilisation des chromosomes et la transactivation des gènes. Rad9 joue un rôle clé dans la résistance à la génotoxicité, autant chez *S. pombe* que chez l'humain et la souris (Komatsu *et al.*, 2000a;

Lieberman, 2006). Le rôle de Rad9 dans l'apoptose a été établi en ce qui concerne l'homologue de Rad9 chez l'humain via son domaine BH3 (Komatsu *et al.*, 2000b). Il a été montré que la caspase 3 médie le clivage de Rad9 en conditions apoptotiques menant à sa dissociation du complexe 9-1-1 et à sa translocation dans le cytosol (Lee *et al.*, 2003). Une fois dans le cytosol, Rad9 lie Bcl-2 via son domaine BH3, inhibant ainsi l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et promouvant ainsi l'apoptose. Des études conjointes avec Rad9 de *S. pombe* chez l'humain et Rad9 de l'humain chez *S. pombe* ont permis d'établir que ces deux protéines sont également des homologues fonctionnels (Komatsu *et al.*, 2000a). Par contre la régulation positive de Rad9 par le facteur de transcription Pap1p est nécessaire à une viabilité accrue en situation de privation d'azote laissant croire encore une fois à un rôle double de cette protéine (Kang *et al.*, 2007). Finalement bien qu'un homologue de la famille des IAP, Bir1p, soit également présent chez *S. pombe* et que le rôle de Bir1p chez *S. cerevisiae* a en partie été élucidé, le rôle de Bir1p dans le processus de mort cellulaire chez *S. pombe* est encore inconnu (Fahrenkrog *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2006; Low and Yang, 2008b).

1.7.3 Conditions physiologiques menant à l'induction de l'apoptose chez *S. pombe*

Finalement, plusieurs études chez *S. pombe* ont permis d'établir certaines conditions physiologiques chez cette levure pouvant mener à la mort cellulaire via un mécanisme

apoptotique. Des défauts dans la biosynthèse des lipides, dans le processus de réplication de l'ADN et dans la mitose, dans l'épissage de l'ARNm et le vieillissement réplcatif et chronologique sont toutes des situations pouvant mener à l'apoptose chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Low *et al.*, 2005; Frohlich *et al.*, 2007; Low and Yang, 2008b). Une souche de levure déficiente dans les gènes *plh1*⁺ et *dgal1*⁺, deux enzymes impliquées dans la dernière étape de la biosynthèse des triacylglycérols (TAG) qui consiste en l'estérification des diacylglycérols (DAG), entre en apoptose au début de la phase stationnaire (Zhang *et al.*, 2003). Cette voie apoptotique induit un arrêt post-mitotique du cycle cellulaire et implique la mitochondrie (Low and Yang, 2008b). Ce phénotype apoptotique est par contre observé exclusivement en milieu riche puisque cette double délétion létale en milieu minimal bien que capable d'induire la mort cellulaire semble passer par une voie non-apoptotique. L'apoptose induite par cette double délétion en milieu riche semble être le résultat d'une accumulation de DAG à l'intérieur de la cellule (Zhang *et al.*, 2003; Low and Yang, 2008b). Trois candidats encodés par le génome de *S. pombe* contiennent de domaines conservés (C1) de liaison à DAG, les homologues de PKC (Pkc1p et Pkc2p) et un homologue non-caractérisé impliqué dans la régulation de l'actine et l'endocytose chez *S. cerevisiae*, *bzz1*⁺. Il semble que la mort cellulaire non-apoptotique observée en milieu minimal dépendant de nombreux facteurs tels *pck1*⁺, *bzz1*⁺, *pca1*⁺ et *sprad9*⁺, alors que la mort apoptotique observée en milieu riche ne soit pas dépendante de ces facteurs. Toutes les données par rapport à cette étude ne sont pas à ce jour publiées mais font partie d'une revue sur le sujet par le groupe y travaillant (Low and Yang, 2008b).

Le modèle établi suite à leurs résultats fait appel à une dualité des mécanismes de mort cellulaire induits selon le milieu dans lequel les cellules sont appelées à croître et est résumé à la figure 5. Un stress de réplication de même que des déficiences dans le mécanisme d'entrée en mitose sont deux évènements pouvant également produire la mort cellulaire chez *S. pombe* (Marchetti *et al.*, 2006). Cette mort cellulaire est accompagnée d'une production élevée de ROS laissant croire à une mort de type apoptotique dans ce cas. La production de ROS impliquée dans ces processus de mort cellulaire peut être dépendante ou non de la présence de protéines essentielles à la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire (Marchetti *et al.*, 2006).

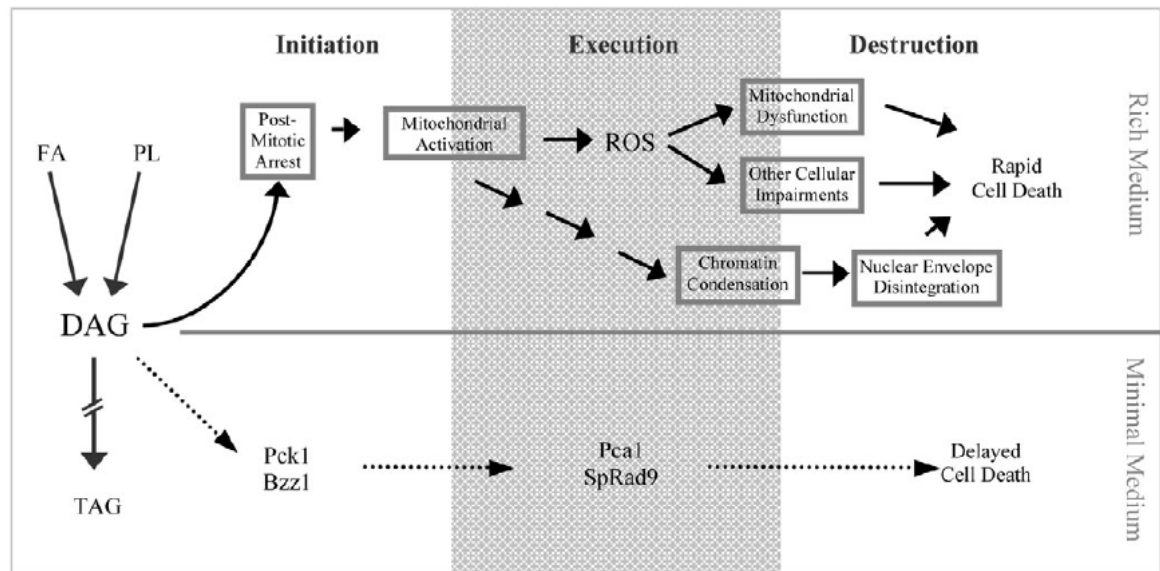


Figure 5 : Représentation schématique des multiples voies de morts cellulaires liées à la lipotoxicité chez *S. pombe*. Tiré et adapté de Low and Yang 2008.

La levure *S. pombe* fait également l'objet d'études par notre laboratoire sur le vieillissement chronologique (Roux *et al.*, 2006). Le vieillissement répliatif est très peu étudié chez cette levure en comparaison à la levure *S. cerevisiae*, vu que le mode de division cellulaire de *S. pombe* est par fission, rendant très difficile la distinction entre la cellule-mère et la cellule fille (Fabrizio and Longo, 2008b). Le vieillissement chronologique chez *S. pombe* est accompagné de signes distincts liés à l'apoptose comme la production accrue de ROS et l'activation des métacaspases, laissant croire que les cellules vieillissantes meurent via un mécanisme apoptotique (Roux *et al.*, 2006). L'induction de ce phénomène passerait par deux voies de signalisation parallèles conservées à travers les espèces eucaryotes. Ces voies de signalisation faisant intervenir des protéines kinase passant par l'AMPc (PKA et SCK1/SCK2) seraient responsables entre autre de l'inhibition de la réponse antioxydante nécessaire à la survie des cellules vieillissantes soumises à une quantité accrue de ROS puisque la délétion de *pka1*⁺ et de *sck2*⁺ prolonge la survie des cellules et rend les cellules moins sensibles à des stress oxydatifs tel que la ménadione (Roux *et al.*, 2006; Mutoh and Kitajima, 2007).

1.8 L'implication de la calnexine dans l'apoptose

Bien que de plus en plus de données soient disponibles sur les mécanismes régissant l'apoptose chez les mammifères et chez les levures, beaucoup de zones grises restent encore inexplorées. L'implication de la chaperone du RE calnexine dans le processus

apoptotique en est une. La littérature concernant ce phénomène est peu étoffée mais certaines évidences claires commencent à émerger. Curieusement, la première démonstration de l'implication de la calnexine dans un phénomène apoptotique a été effectuée chez l'organisme modèle *Schizosaccharomyces pombe*. En effet, les auteurs d'une étude publiée en 1997 dans la revue *Cell Death and Differentiation* ont démontré que la présence de la calnexine était essentielle à la médiation de la létalité par Bak chez *S. pombe* (Torgler *et al.*, 1997). De plus, cette étude a montré que la surexpression de Bak en présence d'une version de la calnexine dépourvue de la queue cytosolique ne provoque pas la mort des cellules, impliquant ainsi la calnexine dans la transduction du signal de mort cellulaire via des partenaires. Par la suite, des études sur l'apoptose induite par le stress du RE dans des lignées cellulaires humaines et de souris dépourvues de calnexine ont été effectuées. (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2006). Ces études ont démontré que les cellules dépourvues de calnexine ont une résistance accrue à l'apoptose induite par les stress du RE. Un mécanisme impliquant la protéine transmembranaire du RE Bap31 et la caspase 12 dans le cas de la lignée cellulaire de souris spécifiquement a été proposé (Groenendyk *et al.*, 2006). Une étude plus récente sur l'effet d'une délétion de la calnexine dans les cellules de mammifères sur la voie du UPR montre que les cellules $cnx^{-/-}$ ont un UPR plus actif que les cellules sauvages (Coe *et al.*, 2008). Toutes ces études effectuées par la même équipe peuvent mener à l'hypothèse d'une prédisposition des cellules $cnx^{-/-}$ dans ces lignées cellulaires à résister aux inducteurs apoptotiques par l'activation accrue de la voie du UPR.

Des études du groupe d'Eric Chevet effectuées dans une lignée de cellules du sein cancéreuses ont établi le modèle selon lequel la calnexine agirait comme protéine d'échafaudage pour le clivage par la caspase 8 de la protéine transmembranaire du RE Bap31 en conditions de stress du RE (Delom *et al.*, 2007a). Ce processus serait impliqué dans la résistance qu'ont certaines cellules cancéreuses à l'apoptose via le niveau d'expression de la calnexine et sa localisation dans certaines structures particulières du RE (Delom *et al.*, 2007a; Delom *et al.*, 2007c). Finalement, une étude publiée dans *J. Biochem* en 2004 fait état d'un clivage de la calnexine dans la partie C-terminal provoqué par plusieurs inducteurs apoptotiques chez les lignées cellulaires de mammifères NIH3T3 et COS-1 (Takizawa *et al.*, 2004a). De plus, l'expression de la partie clivée de la calnexine semblerait inhibée l'apoptose induite par plusieurs inducteurs apoptotiques faisant foi d'un mécanisme impliquant ce clivage lors de processus apoptotiques.

1.9 Données du laboratoire et hypothèses de l'auteure

Le laboratoire du Dr. Rokeach travaille depuis de nombreuses années avec la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe*. La levure est un organisme de choix dans l'étude des processus cellulaires fondamentaux conservés à travers les espèces, entre autre grâce aux nombreux outils génétiques disponibles dans cet organisme modèle et par la facilité avec laquelle cet organisme est maintenu en culture. La calnexine de la levure *Schizosaccharomyces pombe* est à l'étude dans le laboratoire depuis presque deux

décennies. Cette chaperone du RE possède un degré d'homologie très élevé avec la calnexine des mammifères contrairement à la calnexine retrouvée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De ce fait, on peut penser que la structure tridimensionnelle de la calnexine de mammifères est similaire à la structure de la calnexine de *S. pombe* (Figure 6). Elle possède un grand domaine luminal contenant une région hautement conservée, un domaine transmembranaire et une courte queue en C-terminal faisant face au cytosol. La queue cytosolique est un peu plus courte que celle de l'homologue de la calnexine chez les mammifères et contient des séquences cibles de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC I et PKC II) et par la caséine kinase II (CK II). La fonctionnalité de ces séquences cibles n'a pas été validée chez *S. pombe* mais il a été montré chez les mammifères que la calnexine est bel et bien phosphorylée par la protéine kinase C et la caséine kinase ainsi que par la kinase ERK (Wong *et al.*, 1998; Chevet *et al.*, 1999b). Il a également été démontré pour la calnexine de mammifères que la phosphorylation de la queue cytosolique est responsable de l'association de la calnexine avec les ribosomes, avec la pompe à calcium transmembranaire du RE, SERCA et avec certains substrats du repliement (Chevet *et al.*, 1999b; Roderick *et al.*, 2000). La caractérisation de la calnexine de *S. pombe* par notre laboratoire a permis de caractériser sa fonction chaperone via son activité lectine mais également via des interactions protéine-protéine et son implication dans le contrôle de qualité (Arunachalam and Cresswell, 1995; Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Parodi, 2000; Marechal *et al.*, 2004; Hebert *et al.*, 2005; Thammavongsa *et al.*, 2005; Williams, 2006).

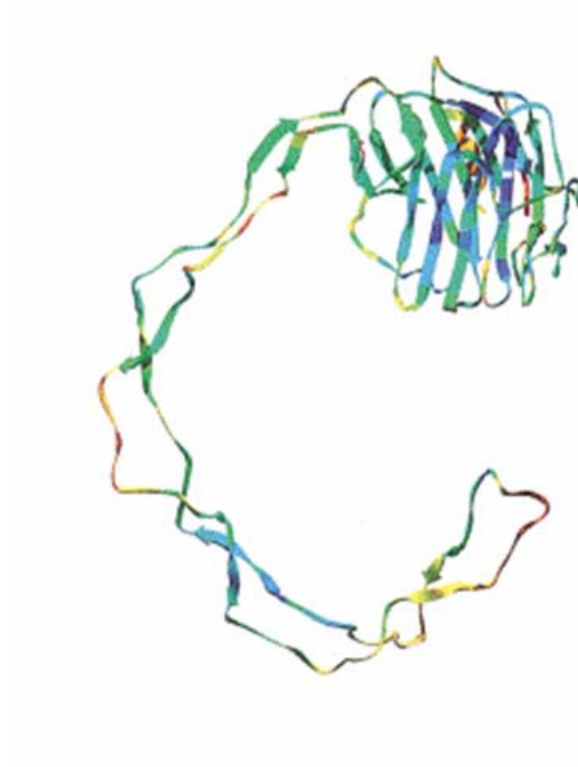


Figure 6 : Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine luminal de la calnexine de mammifères. Tiré et adapté de Schrag JD. *et al.* Molecular Cell. 2001

La calnexine de *S. pombe* est essentielle à la viabilité des cellules (Jannatipour and Rokeach, 1995; Parlati *et al.*, 1995a) alors qu'elle ne l'est pas chez *S. cerevisiae* et dans les cellules de mammifères en culture (Howell *et al.*, 1985; Parlati *et al.*, 1995b). Par contre, une délétion de la calnexine chez la souris cause de graves désordres neurologiques et moteurs et cause la mort prématurée à la naissance (Denzel *et al.*, 2002). Dans le but de déterminer la fonction essentielle de la calnexine chez *S. pombe*, de nombreux mutants de délétion ont été construits et évalués dans leur capacité à assurer la viabilité des cellules et à effectuer leur fonction chaperone (voir Figure 7) (Elagoz *et al.*, 1999). De ces études, il a été établi que les 52 derniers acides aminés de domaine luminaire étaient suffisants pour maintenir la viabilité conjointement avec le domaine transmembranaire et la queue cytosolique. Ce mutant nommé *mini_cnx1* ne possède par contre pas de fonction chaperone, établissant donc du même coup que la fonction chaperone de la calnexine n'est pas la fonction essentielle de cette protéine. Une autre étude a également démontré que les 160 acides aminés du côté N-terminal de la séquence protéique de la calnexine confère la viabilité aux cellules (Hajjar *et al.*, 2007).

Lors d'une étude d'un mutant particulier de la calnexine dépourvu de la région hautement conservée, mutant appelé Δhcd_cnx1 , notre laboratoire a isolé des cellules totalement dépourvues de la calnexine (Collin *et al.*, 2004). Après plusieurs vérifications, ces cellules ont été établies comme viables sans calnexine et ont été nommées Cin (Calnexin independant cells) (Collin *et al.*, 2004). Le phénomène d'indépendance de la calnexine est stable dans ces cellules et est transmis à travers les générations. Une caractérisation poussée de ces cellules a démontrée que les cellules Cin montrent certains phénotypes typiques tels que des défauts de paroi, une sensibilité accrue à certains stress et une activation des métacaspases plus élevée en phase stationnaire (Turcotte *et al.*, 2007). Deux criblages génétiques distincts effectués dans le but de découvrir des inducteurs du phénomène Cin ont permis d'identifier la protéine Cif1p comme inducteur de ce phénomène (Beauregard PB. *et al.* accepté avec révisions mineures dans J. of Cell Science, 2008). Cif1p est une protéine nucléolaire non caractérisée contenant aucun domaine d'homologie avec d'autres protéines connues. Une caractérisation poussée des caractéristiques des cellules Cin provenant de la surexpression de l'inducteur Cif1p (Cin_{cif1}) a permis d'établir des différences phnotypiques avec les cellules Cin originales provenant de l'expression du mutant de la calnexine Δhcd_cnx1 (Cin _{Δhcd_cnx1}). Ces différences suggèrent différents mécanismes d'induction et de maintien de l'état Cin. (Beauregard PB. *et al.* accepté avec révisions mineures dans J. of Cell Science, 2008).

De ces études, le mystère de la fonction essentielle de la calnexine est resté entier et est devenu des plus intéressant puisque son activité chaperone caractérisée depuis de nombreuses années ne semblait pas impliquée dans son rôle cellulaire essentiel. Les protéines essentielles à la vie cellulaire possèdent habituellement un rôle clé dans les processus cellulaires et puisque ce processus ne concerne pas le repliement des protéines dans le cas de la calnexine il devenait très intéressant de découvrir une nouvelle implication de cette protéine dans les processus cellulaires centraux de la cellule. La calnexine serait-elle impliquée dans le processus apoptotique comme il commence à être démontré chez les mammifères? La calnexine serait-elle impliquée dans une voie de signalisation hors du RE via sa queue cytosolique puisque celle-ci semble être impliquée dans le mort cellulaire induite par Bak chez *S. pombe*? Le phénomène Cin serait-il une voie de remplacement de la fonction essentielle de la calnexine faisant appel à un changement de plusieurs voies fondamentales de cette cellule rendant ainsi la calnexine accessoire dans ces conditions? Les phénotypes observés chez les cellules Cin sont-ils représentatifs d'une cellule ne nécessitant pas la fonction essentielle de la calnexine, ou encore d'une cellule ayant établi des adaptations alternatives à l'absence de fonction essentielle de la calnexine?

**CHAPITRE 2: Calnexin Is Involved in Apoptosis
Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission
Yeast**

NOTE

Contribution des auteurs:

Renée Guérin : Construction des souches des mutants de la calnexine, tests de viabilité des mutants, immunobuvardages, immunoprécipitations, marquage des cellules à la Phloxine B, marquage au FITC-VAD-FMK pour les métacaspases, essai TUNEL, marquage par Annexin V, tests en gouttes, microscopie à fluorescence suite au marquage au DAPI et au DHR123, traitements à la tunicamycine, extraction membranaire, planification du travail, écriture de l'article, corrections.

Geneviève Arseneault : Construction des souches des mutants de la calnexine, tests de viabilité des mutants, immunobuvardages, marquage des cellules à la Phloxine B, marquage au FITC-VAD-FMK pour les métacaspases, essai TUNEL, marquage par Annexin V, tests en gouttes, traitements à la tunicamycine

Stéphane Dumont : Criblage génétique pour l'isolation de suppresseurs de la létalité provoquée par la surexpression de la calnexine

Luis A. Rokeach : Planification et supervision générale, corrections de l'article

Article publié dans le journal scientifique *Molecular Biology of the Cell* (2008) 19 : 4404-

Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum stress in the Fission Yeast

Renée Guérin, Geneviève Arseneault, Stéphane Dumont,
and Luis A. Rokeach^{1*}

1. Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada, Tel.: 1 (514) 343-6324; Fax: 1(514) 343-2210

Running Head: Calnexin involvement in ER apoptosis in *S. pombe*

Abbreviations: aa, amino acid; BiP, immunoglobulin binding protein; cnx1+, *S. pombe* gene encoding calnexin; Cnx1p, *S. pombe* calnexin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DHR123, dihydrorhodamine123; ER, endoplasmic reticulum; ERAD: ER-associated degradation; FITC-VAD-FMK, valyl-alanyl-aspartyl-[*O*-methyl]-fluoromethylketone; hcd, highly conserved central domain; PDI, protein-disulfide isomerase; ROS, reactive oxygen species; TM, trans-membrane domain; TUNEL assay, Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling assay; UPR, Unfolded Protein Response

2.1 ABSTRACT

Stress conditions affecting the functions of the endoplasmic reticulum (ER) lead to the accumulation of unfolded proteins. ER stress is normally counteracted by the unfolded-protein response (UPR). However, under prolonged stress the UPR initiates a pro-apoptotic response. Mounting evidence indicate that the ER chaperone calnexin is involved in apoptosis caused by ER stress. Here, we report that overexpression of calnexin in *Schizosaccharomyces pombe* induces cell death with typical apoptosis markers. Apoptotic death caused by calnexin overexpression required its trans-membrane domain (TM), and involved sequences on either side of the ER membrane. Apoptotic death caused by the *N*-glycosylation inhibitor tunicamycin was dramatically reduced in a strain expressing endogenous levels of calnexin lacking its TM and cytosolic tail. This indicates the involvement of calnexin in apoptosis triggered by ER stress. Interestingly, a genetic screen identified the *S. pombe* homologue of the human anti-apoptotic protein HMGB1 as a suppressor of apoptotic death due to calnexin overexpression. Remarkably, overexpression of human calnexin in *S. pombe* also provoked apoptotic death. Our results argue for the conservation of the role of calnexin in apoptosis triggered by ER stress, and validate *S. pombe* as a model to elucidate the mechanisms of calnexin-mediated cell death.

2.2 INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) is a specialised organelle playing essential and central roles in the biology of the cell. The ER is the site of synthesis and folding of secreted, membrane-bound and some organelle-targeted proteins (Bukau *et al.*, 2000) (Fewell *et al.*, 2001). Protein folding in the ER is assisted by a battery of molecular chaperones and foldases (Bukau *et al.*, 2000; Fewell *et al.*, 2001; Trombetta and Parodi, 2003; Helenius and Aebi, 2004). In addition, the ER contains several factors required for optimum protein folding, including, ATP, Ca^{2+} and an oxidizing environment to allow disulphide-bond formation. Proper ER function is critical for numerous aspects of cell physiology, including vesicle trafficking, lipid and membrane biogenesis, as well as protein targeting and secretion (Lai *et al.*, 2007).

The ER is highly sensitive to stresses perturbing the cellular energy levels, ER lipid or glycolipid imbalances, or changes in the redox state or Ca^{2+} concentration (Breckenridge *et al.*, 2003; Boyce and Yuan, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006). Such stresses reduce the protein folding capacity of the ER, which results in the accumulation and aggregation of unfolded proteins, a condition referred to as ER stress. When the capacity of the ER to fold proteins properly is compromised or overwhelmed, a highly conserved unfolded protein response (UPR) signal-transduction pathway is activated. The ER response to stress is basically conserved from yeast to mammalian cells (Patil and Walter, 2001; Ron and Walter, 2007). To counter ER stress, the UPR halts general protein synthesis and upregulates the transcription of genes encoding ER resident chaperones and other

regulatory components of the secretory pathway, giving the cell a chance to correct the environment within the ER (Breckenridge *et al.*, 2003; Schroder and Kaufman, 2005b; Xu *et al.*, 2005; Boyce and Yuan, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006; Wu and Kaufman, 2006). Moreover, in coordination with the UPR, the cell increases the capacity of the proteasome-dependent ER-associated degradation (ERAD) to remove misfolded proteins from the ER (Ahner and Brodsky, 2004; Meusser *et al.*, 2005; Marciniak and Ron, 2006).

In *S. cerevisiae*, ER stress is monitored by Ire1p, an ER transmembrane protein. According to current models (Patil and Walter, 2001; McCracken and Brodsky, 2005; Boyce and Yuan, 2006; Ron and Walter, 2007), the ER luminal domain of a single Ire1p molecule interacts with BiP/Kar2p, an ER luminal chaperone that assists the folding of nascent polypeptides entering the lumen. Under ER stress conditions, BiP is titrated away from Ire1p due to its binding to unfolded or misfolded proteins. The removal of BiP permits the activation of Ire1p by oligomerization leading to the efficient induction of UPR, which upregulates genes coding for ER chaperones and factors involved in all stages of the secretory pathway. The mammalian UPR retains several key features of the yeast program like the role of BiP, but is significantly more complex, and is mediated through three ER transmembrane receptors: PERK, ATF6 and IRE1. In normal conditions, the suite of responses activated by the UPR pathway succeeds in restoring ER homeostasis. However, if protein aggregation is persistent and the stress cannot be resolved, the UPR signalling switches from pro-survival to pro-apoptotic. Upon prolonged ER stress the PERK, ATF6 and IRE1 pro-apoptotic signals ultimately execute cell death through the activation of

kinases, proteases, transcription factors, thereby affecting the expression and activities of the Bcl-2 family of proteins and their modulators (Breckenridge *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Szegezdi *et al.*, 2006).

Apoptosis is a form of programmed–cell death that is characterized by several specific morphological and biochemical changes including cell rounding and shrinkage, chromatin breakage, nuclear fragmentation and activation of caspases (Kerr *et al.*, 1972; Kerr, 2002). Apoptosis was first described and extensively studied in multicellular organisms, where it plays critical roles in development and the control of many diseases in adult organisms. Evidence accumulated in the last ten years has demonstrated that apoptosis-like processes do also occur in *S. cerevisiae* and in *S. pombe* yeasts. Yeasts undergo apoptosis-like death under a variety of conditions and cell processes including DNA damage, mitotic catastrophe, replication defects, deficiency in triacylglycerols, ER stress, aging and mating (Jannatipour and Rokeach, 1995; Burhans *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Fahrenkrog *et al.*, 2004; Wissing *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Hauptmann *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2006; Frohlich *et al.*, 2007). Both *S. cerevisiae* and *S. pombe* encode several homologues of proteins characterized for their implication in apoptosis including AIF, HtrA2/Omi and IAP. Yeasts also encode a metacaspase called Yca1/Mca1 in *S. cerevisiae* and Pca1 in *S. pombe* (Uren *et al.*, 2000; Madeo *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007). However, programmed-cell death pathways in yeast can be metacaspase-dependent or independent (Madeo *et al.*, 2002; Bettiga *et al.*, 2004; Fannjiang *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Wadskog *et al.*, 2004; Ivanovska and Hardwick,

2005; Reiter *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008b; Mazzoni and Falcone, 2008b). It has been proposed that apoptotic processes are useful in unicellular organisms for their survival under conditions of environmental stresses, and are relevant in populations of cells such as colonies and biofilms (Skulachev, 2002; Buttner *et al.*, 2006). Because of their powerful genetics, *S. cerevisiae* and *S. pombe* have become interesting models to study the core mechanisms of apoptosis (Ink *et al.*, 1997; Ligr *et al.*, 1998; Madeo *et al.*, 2002; Priault *et al.*, 2003; Hardwick and Cheng, 2004; Madeo *et al.*, 2004; Rodriguez-Menocal and D'Urso, 2004; Burhans and Weinberger, 2007; Frohlich *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Fabrizio and Longo, 2008a; Low and Yang, 2008a).

The molecular chaperone calnexin plays key roles in the translocation of nascent polypeptides, and in the folding and quality control of newly synthesized proteins (Bukau *et al.*, 2000; Fewell *et al.*, 2001; Williams, 2006). Structurally, calnexin is a type I ER transmembrane protein, with a large luminal domain, a transmembrane domain (TM), and a short cytosolic tail (Figure 8A). The luminal domain of calnexin contains the highly conserved central domain (hcd), which is the portion of the protein that is the most conserved across species. This region of calnexin interacts with client proteins in a glycan-lectin fashion or via protein-protein interactions (Arunachalam and Cresswell, 1995; Fernandez *et al.*, 1996; Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Parodi, 2000; Marechal *et al.*, 2004; Hebert *et al.*, 2005; Thammavongsa *et al.*, 2005; Williams, 2006).

Pointing to its critical biological roles, the knockout of calnexin causes early-postnatal death in mouse, and is lethal in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Jannatipour and Rokeach, 1995; Parlati *et al.*, 1995a; Denzel *et al.*, 2002). Intriguingly, some *S. pombe* calnexin mutants devoid of chaperone activity are viable, demonstrating therefore that the essential cellular role of calnexin is not its chaperone function (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004; Hajjar *et al.*, 2007).

Cumulating evidence point to the implication of calnexin in apoptosis induced by ER stress. First indication resulted from studies in *S. pombe* that led to the identification of calnexin as a lethal partner of the pro-apoptotic mammalian proteins Bak and Bax (Torgler *et al.*, 1997). The authors showed that the expression of Bak is lethal in *S. pombe* cells expressing full-length calnexin but not in cells expressing a calnexin mutant devoid of the C-terminal tail, suggesting a role as signal transducer for calnexin by recruiting lethal partners (Torgler *et al.*, 1997). In the case of mammalian cells, it has been shown that cells devoid of calnexin are relatively resistant to ER stress-induced apoptosis (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2006). It was also proposed that mammalian calnexin acts as a scaffold for the cleavage by caspase-8 of the ER transmembrane protein Bap31 under ER-stress conditions, such as in the presence of tunicamycin (Delom *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007b). Moreover, mammalian calnexin was shown to be cleaved by caspases under stress conditions, and it was suggested that this cleavage may have a role in the mediation of the apoptotic signal (Takizawa *et al.*, 2004b). Nevertheless, much remains to be elucidated about the mechanistic details of the role of calnexin in ER-stress induced apoptosis.

Certainly, the study of the involvement of calnexin in apoptosis caused by ER stress could greatly benefit from the use of a model organism.

Here, we demonstrate that calnexin is involved in the induction of apoptosis triggered by ER stress in *S. pombe*. We further show that the apoptotic effect of calnexin is counteracted by overexpression of Hmg1/2p, the *S. pombe* homologue of the mammalian anti-apoptotic protein HMGB1. Interestingly, the overexpression of mammalian calnexin also induced apoptosis in *S. pombe*, suggesting the functional conservation of the role of calnexin in apoptosis.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Yeast strains, media, and vectors

Experiments were carried out using the *S. pombe* strains described in Table II. All strains were cultured in Edinburgh minimal medium (here denoted as MM) supplemented with required supplements (Moreno et al., 1991) at 30°C. DNA transformations into *S. pombe* were performed by the PEG-lithium acetate procedure, as previously described (Elbe, 1992). *S. pombe* homozygous, haploid strains deleted for the homologue of *IRE1* (geneID SPAC167.01), the homologue of *YCA1* (geneID SPCC1840.04, *pca1::kanMX4*; strain SP8167R) and for the gene encoding the homologue of Bap31 (geneID SPAC9E9.04, *dma1::kanMX4*; strain SP8083R) were purchased from Bioneer Corporation (Daejeon, Korea)

pREP is a family of multicopy expression vectors for *S. pombe*. All vectors contain the *S. pombe arsI* origin of replication and a version of thiamine-repressible *nmt* promoter (Maundrell, 1993). The *nmt1* promoter in pREP1, pREP2 and pREP3X is full strength, and these vectors were used to overexpress wild-type calnexin (strains SP8007R, SP8231R, SP8136R and SP8081R), mutants of calnexin (strains SP7965R, SP16053, SP8056R and SP8125R) and controls (strains SP16058, SP15302, SP8227R, SP8145R and SP8178R) (Forsburg, 1993). The pREP3X vector was derived from the pREP family, has the promoter strength like pREP1 and pREP2, but has an *XhoI* site replacing the ATG at the 5' end of its polylinker (Forsburg, 1993). This empty vector was used as control (strain SP7975R). The *nmt* promoter in the vectors pREP41 and pREP42 is medium strength and

expressed calnexin at levels comparable to the endogenous genomic copy of the gene (Jannatipour *et al.*, 1998). pREP41 differs from pREP42 in that it contains the *S. pombe* *LEU2* marker instead of *ura4*⁺, and likewise for the pREP1 and pREP2 vectors, respectively. To test the ability to confer viability the calnexin mutants *lumenal*TM*_cnx1* and *C-term*TM*_cnx1_cmyc* were cloned in the pREP41 and pREP42 vectors and were shuffled against wild-type calnexin (strains SP8075R and SP8160R, respectively). The wild-type calnexin and the viable mutants on pREP41 vector were used to study ER stress induced by tunicamycin (strains SP7951R, SP8490R, SP8488R and SP8085R).

2.3.2 Construction of *cnx1* mutants and plasmids

The construction of mutants *mini_cnx1* and *lumenal_cnx1* was previously described (Elagöz, 1999). The mutant *lumenal*TM*_cnx1* was obtained by PCR amplification with the following primers: A2: 5'-AAACATATGAAGTACGGAAAGGTATCT-3' and L: 5'-AAAGGATCCTTAAGCAAAGAAATAAAAGTAACA-3'. These two primers contained restriction sites for *Nde*I and *Bam*HI to allow the cloning of the PCR product into the pREP1 and pREP41. For the mutant *C-term*TM*_cnx1_cmyc*, two independent fragments were first amplified by PCR. One fragment corresponded to the signal peptide of the wild-type calnexin and was amplified with the primers A2 and F2: 5'-AGGATCAGCAAGTGATCCCCG-3'. The second fragment corresponding to the transmembrane domain with the cytosolic tail in fusion with a c-myc tag was obtained with primers M2: CTTGCTGATCCTATTGGGATTGCAATTGTTGCCGTT-3' and c-

mycSTOPcnx1:

5'-

GGATCCTTACATGGCATTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCCATGTC
 TTCATTCTTCGCAGT-3'. These two PCR products were mixed together to perform an
 overlap PCR amplification with the oligonucleotides primers A2 and c-mycSTOPcnx1.
 These two oligonucleotide primers contain restriction sites (*NdeI* for A2 and *BamHI* for c-
 mycSTOPcnx1) allowing their cloning into the pREP vectors family. The final product
 was digested with the restriction enzymes *NdeI* and *BamHI*, as it was done for the
lumenalTM_cnx1 mutant and cloned into the pREP1 and pREP41 vector. The homologue
 of HMGB1 in *S. pombe* is Hmg1/2 that is encoded by the open reading frame (ORF)
SPBC28F2.11, which was amplified from genomic DNA by PCR with the following
 primers: HMG1/2 *NdeI* forward: 5'-AAACATATGGCTCAAACTCAACCC-3' and
 HMG1/2 *SalI* reverse: 5'-AAAGTCGACTCAATTAGCAACTTTGGC-3', and cloned into
 the cloning vector pDRIVE (QIAGEN[®] PCR Cloning Kit) following the manufacturers
 recommendations. The gene *hmg1/2* was then cut out from pDRIVE- HMG1/2 with the
 restriction enzymes *NdeI* and *SalI*, and cloned into pREP42 and pREP2 vectors. The
 cDNA encoding human calnexin was kindly provided by Dr. Michael Brenner (Brigham
 Women's Hospital, Boston, MA) (Rajagopalan *et al.*, 1994) The gene was amplified with
 the following oligonucleotide primers: cnxh1-NdeI-F: 5'-
 AAACATATGGAAGGGAAGTGGTTGCTG-3' and cnxh1-BamHI-R: 5'-
 AAAGGATCCTCACTCTCTTCGTGGCTT-3' and cloned into the cloning pDRIVE
 vector (QIAGEN[®] PCR Cloning Kit) following the manufacturer's recommendations. The

cDNA encoding human calnexin was then digested with restriction enzymes *NdeI* and *BamHI* and cloned into the pREP41 and pREP1.

2.3.3 Plasmid shuffling and viability of calnexin mutants

To test the viability of new calnexin mutants, *S. pombe* (*cnx1Δ* + *pcnx1⁺*) cells containing a deletion of genomic calnexin (*cnx1Δ*) and a plasmid bearing a wild-type copy of the calnexin gene (*cnx1⁺*), were transformed with plasmids bearing the calnexin mutants to be tested (strains SP8075R and SP8160R). *S. pombe* strains bearing the two plasmids were grown for 7 days at 30°C in 5 mL liquid non-selective media (MM supplemented with adenine and appropriate supplements, i.e. uracil and/or leucine). Cells were plated on the same solid non-selective media, and auxotrophy for uracil and/or leucine was analysed after 5-7 days by toothpicking on selective plates. The viability of the calnexin mutants was determined by examining the cell's capacity to conserve only the plasmid encoding mutant calnexin without the *pcnx1⁺* plasmid.

2.3.4 Membrane extraction

Microsomal membranes were prepared as previously described (Elagoz et al., 1999). *S. pombe* microsomal membranes were treated for 15 minutes at 4°C by mixing 1 vol. of either 1M NaCl or 0.2% SDS. Membrane lysates were spun at 80,000 X g for 1 hour at 4°C in a L8-70M Sorvall ultracentrifuge, then the pellet from this spin was resuspended in 0,1 ml of 3X Laemmli's sample buffer (P fraction). Proteins in the

supernatant fraction were treated for 30 minutes at 4°C in the presence of 6% ice-cold trichloroacetic acid (TCA) and spun at 2,000 X g for 45 minutes at 4°C. The pellet was washed twice in ice-cold 80% acetone and dissolved in 0, 1 ml 3X Laemmli's sample buffer (S fraction). Before SDS-PAGE, samples were boiled for 5 minutes.

2.3.5 Immunoprecipitations

Immunoprecipitations from cells (the equivalent of OD₅₉₅ 0.8-1.0) treated or not with 10 µg/ml tunicamycin for 24 hours, were carried out as previously described (Jannatipour *et al.*, 1998).

2.3.6 Immunoblotting

Protein extractions were carried out as previously described (Elagöz *et al.*, 1999) Protein extracts were migrated on a 10% or 12% (w/v) SDS-PAGE gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane according to the manufacturer's instruction. Immunoblotting to detect Cnx1p and mutants of calnexin was carried out with the anti-Cnx1p rabbit polyclonal antibody (LAR223) dilution 1:30,000 or with the anti-cmyc mouse monoclonal antibody 9E10 dilution 1:500. Immunoblotting to detect BiP was performed with the anti-BiP rabbit polyclonal antibody (LAR311) dilution 1:30,000 (Collin *et al.*, 2004). When necessary, the intensity of the immunoblotting bands was quantified with Bio-RAD Quantity One 4.6.5 Basic program.

2.3.7 Genetic screen for suppressors of the lethality of overexpression of calnexin

Briefly, cells overexpressing calnexin were transformed with the *S. pombe* pURSP1 genomic bank (Barbet *et al.*, 1992) containing insertions between 2.5 Kb and 10 Kb (the generous gift of Dr Anthony Carr). About 150,000 clones were screened and 50 potential suppressors were selected. All 50 potential candidate strains were subjected to a secondary screening by Western blotting, to verify that the incoming genomic plasmid did not affect the levels of overexpression of calnexin. After verification, only one candidate was a real suppressor of cell death by overexpression, without it affecting the levels of calnexin. The ORF identified *SPBC28F2.11* encodes Hmg1/2p the homologue of the mammalian nuclear protein HMGB1, was cloned into the pREP2 overexpression vector.

2.3.8 Apoptosis induction assays

Overexpression of wild-type and calnexin mutants

Cells overexpressing wild-type or mutants of calnexin and control strains (see Table II), were cultured for 43 hours until saturation in minimal media (MM) containing the required supplements in the presence of 5 µg/ml of thiamine to repress the *nmt1* promoter of the pREP1 or the pREP2 vector. At saturation, the cells were diluted to $OD_{595} = 0.3$ in the same media and cultured for 19 hours. Then, to induce the *nmt1* promoter, an aliquot containing 5×10^7 cells was taken, and the cells were washed twice with 1 ml of media without thiamine. Following which, the cells were resuspended in an appropriate volume

and 1×10^7 cells were inoculated in 3 ml of media without thiamine. Maximal levels of wild-type or mutants of calnexin were reached after 18 hours of culture in MM without thiamine. In all experiments, the timepoint zero was defined as the time where the thiamine is removed from the media.

Tunicamycin treatment

Cells only expressing full-length calnexin or viable calnexin mutants at basal levels (see Table II) were cultured for 43 hours until saturation in MM with the required supplements. To obtain exponentially growing cells, the cells were diluted and cultured overnight until they reached OD_{595} 0.3-0.8. A volume of 10 ml of culture was adjusted to OD_{595} 0.3, and cells were treated with 10 μ g/ml of tunicamycin for 40 hours at 30°C. Tests for metacaspase activation and nuclear fragmentation (DAPI staining) were performed at this time.

2.3.9 Viability Assays

The survival of cells was measured by two different techniques: by serial 10-fold dilutions (drop tests on plates) and by cytometry with the vital fluorescent dye Phloxin B. For serial-dilution spotting experiments, an equivalent of OD_{595nm} of 0.8 was taken from exponentially growing cells in media containing thiamine. These cells were washed twice in media free of thiamine and adjusted to an equivalent of OD_{595nm} of 0.5. The cells were serially diluted ($10^{-1} - 10^{-4}$), spotted on solid media with or without thiamine, and incubated

for 7 days at 30°C. Viability assays with the Phloxin B fluorescent vital dye were carried out as previously described (Roux *et al.*, 2006).

2.3.10 Detection of Apoptotic Markers

Metacaspase Activation

Culture samples were taken at time points 32, 40, 48, 56 and 72 hours after gene induction in the media depleted of thiamine, or after 40 hours of tunicamycin treatment. Aliquots containing 1×10^7 cells were washed once in 1 ml of 1X PBS pH 7.4 (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO₄, 18 mM KH₂PO₄) and resuspended in 150 µl of 1X PBS pH 7.4 containing 10 µM FITC-VAD-FMK (CasPACE, Promega, Madison, WI, USA). After incubation for 20 min at 30°C, cells were washed once in 1X PBS pH 7.4 and resuspended in 100 µl 1X PBS pH 7.4 to be analysed by flow cytometry (FACS).

TUNEL assay

TUNEL (Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay was performed with the APO-BRDU TUNEL Kit (PHOENIX flow systems, San Diego, CA), essentially following the manufacturer's recommendations. Following 96 hours of gene induction by culturing cells in media without thiamine, 1.4×10^7 cells were taken and fixed with 1 ml of 3.7% formaldehyde. After fixation, the cell wall was digested by resuspending the cell pellet in 200 µl of sorbitol buffer (1.2 M sorbitol, 0.5 mM MgCl₂, potassium phosphate, pH 6.8) containing 5 mg/ml of lysing enzymes (SIGMA), and

incubating for 90 min at room temperature, followed by 30 minutes incubation at 37°C. The cell pellet was resuspended in 500 µl of permeabilization solution (0.1% Triton in 0.1% sodium citrate) and let on ice for 2 minutes, washed twice with 400 µl of WASH solution and incubated in 50 µl of TUNEL solution for 30 min at 30°C. After incubation, the cells were washed twice in WASH solution and incubated 30 min at room temperature in the dark with 100 µl antibodies solution (anti-BrdU antibodies). Staining of the cells was analyzed by flow cytometry (FACS).

Annexin V staining

Annexin V staining was performed with the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA) essentially following the manufacturer's recommendations. Following 48 hours of gene induction by culturing cells in media without thiamine, 1.4×10^7 cells were centrifuged, resuspended and incubated for 2 hours at room temperature in 200 µl of sorbitol buffer (1.2 M sorbitol, 0.5 mM MgCl₂, potassium phosphate, pH 6.8) containing 10 mg/ml of Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation) in order to digest the cell wall. The cell pellet was washed with 400 µl of Binding Buffer (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 M sorbitol) and resuspended in 35 µl of Binding Buffer containing 5 µl of Annexin V-FITC and let incubated at room temperature in dark for 20 min. After incubation, the cells were washed once in 400 µl of Binding Buffer and resuspended in 500 µl of 1X Binding Buffer (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, BioVision Research Products, Mountain View, CA). Staining of the cells was analyzed by flow cytometry (FACS).

DAPI Staining

For DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining, samples containing 1.4×10^7 cells were taken after 96 hours of induction or after 40 hours of tunicamycin treatment. Cells were fixed for 10 min. in a solution of 3.7% formaldehyde, washed once in 1x PBS pH 7.4 containing 1% Nonidet P-40, and twice in 1x PBS pH 7.4. The cells were resuspended in 100 μ l 1x PBS pH 7.4 to a final concentration of $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cells/ml. Suitable quantities of cells were applied to a poly-lysine coated coverslips, washed and let dry. The slides were mounted with a DAPI-containing mounting media (1 μ g/mL DAPI, 1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Microscopic analysis was performed using a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit and treated with the UIC Metamorph[®] software.

In vivo detection of ROS accumulation

The accumulation of ROS (reactive oxygen species) was determined essentially as previously described (Roux et al, 2006). Culture samples were taken after 24 hours of induction. Samples containing $1-2 \times 10^7$ cells were incubated with 30 μ M dihydrorhodamine123 (Sigma), for 30 min at 30°C. A suitable quantity of cells are applied to poly-lysine coated coverslip, washed with 1x PBS pH 7.4 and let dry. Fluorescence was observed with a fluorescence microscope Nikon E800. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit and treated with UIC Metamorph[®] software.

2.3.11 Flow Cytometry analyses

Cells were stained with Phloxin B, FITC-VAD-FMK or with the TUNEL assay as described above. Flow cytometry analyses were performed using a FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) device, on 10,000 cells. Emission from the argon LASER was at 488 nm; emission settings were 515-545 nm (filter FL-1) for FITC-VAD-FMK and fluorescein staining or 560-600 nm (filter FL-2) for Phloxin B staining. The percentage of positive stained cells was determined as the population of fluorescent cells with a higher fluorescent intensity than a stained negative control. Parameters of the stained negative control were adjusted with an unstained negative control. Each experiment was repeated three times.

2.3.12 Statistical analyses

The significance of the variations of results among strains was determined by a global ANOVA as described in <http://www.physics.cbsju.edu/stats/anova.html>. In certain figures, the significance to variation with respect to controls or Cnx1p was evaluated by a Student's *t*-test.

2.4 RESULTS

2.4.1 Overexpression of wild-type calnexin causes cell death in *S. pombe*

We have previously demonstrated that while calnexin is an essential chaperone playing key roles in protein folding and quality control in the ER, its vital function in *S. pombe* is not its chaperone activity (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004). Because the overexpression of a gene generally leads to a gain of function (Ramer *et al.*, 1992), to obtain clues as to the essential cellular role of calnexin we overexpressed *cnx1*⁺ in the fission yeast. Interestingly, we observed that the overexpression of calnexin resulted in a severe decline in the viability of the culture. To characterize this phenotype, we assayed the viability of cells overexpressing calnexin by measuring their capacity to grow on inducing media, i.e. without thiamine (Figure 8B). When cells containing the pREP1*cnx1*⁺ plasmid were spotted on media free of thiamine, we observed a dramatic reduction in the ability to form colonies as compared to the control strain containing the pREP3X vector. By contrast, no difference with the control was observed when cells were spotted on thiamine-containing media, which represses the overexpression of calnexin (Figure 8B). The same phenotype was observed when cells were stained with Phloxin B, a fluorescent vital dye that accumulates within dead cells (Roux *et al.*, 2006). At 48 hours post-induction, about 50% of cells overexpressing calnexin were stained with Phloxin B compared to nearly 0% for cells harbouring the empty vector control (Figure 8C). To assess whether this death phenotype was specific to calnexin and not due to an overloading of the ER lumen, we overexpressed Pdi1p, a soluble luminal ER foldase involved in the

formation of disulfide-bonds of newly synthesized polypeptides (Maattanen *et al.*, 2006). No cell death was observed by spotting on media free of thiamine or by Phloxin B staining when cells overexpressed Pdi1p (Figure 8B-C). However, the strain overexpressing Pdi1p appeared to grow more slowly than the control cells containing the empty vector (Figure 8B). Because, calnexin is an ER integral-membrane protein, it remained possible that the cell-death phenotype could be the result of saturating the ER membrane and not due to a specific effect of a calnexin function. To investigate this possibility, we overexpressed the Sec61 β subunit of the translocon (Sbh1p see Table II), which is an ER-membrane protein (Romisch, 1999). As depicted in Figures 8B and C, the overexpression of Sec61 β did not cause cell death. Finally, to ascertain that overexpression of calnexin does not disrupt the ER membrane, the ER membranes were extracted and treated with Tris buffer alone (mock) as control, high concentration of NaCl to disrupt ionic interactions, and with SDS to break all interactions. This experiment showed that overexpression of calnexin does not alter the integrity of the membrane since no proteins were detected in the supernatant of the mock treatment (see Supplemental Figure 1). Together, these observations demonstrate that the death phenotype of cells overexpressing calnexin is specifically inherent to this ER chaperone and not due to an artefact caused by the overloading of the capacity of the ER membrane and/or lumen.

2.4.2 Cells dying from overexpression of calnexin display typical apoptotic features

Next we investigated whether the death of *S. pombe* cells overexpressing calnexin is due to an apoptotic process or whether these cells undergo unspecific necrotic death. Cells undergoing apoptosis display typical morphological and biochemical markers, which necrotic cells do not exhibit (Kerr *et al.*, 1972; Jin and Reed, 2002; Madeo *et al.*, 2004). Typical markers of apoptosis include phosphatidyl serine externalization, caspase activation, chromatin breakage and nuclear fragmentation. Cells entering in the apoptotic cascade usually show phosphatidyl serine externalization as a first phenotype associated with this kind of death. About 45% of cells overexpressing Cnx1p were stained with Annexin V-FITC as compared to 0% for the control cells (overexpressing Pdi1p or Sec61 β , or harbouring the empty vector) (Figure 9A). This demonstrates that phosphatidyl serine is specifically externalized due to calnexin overexpression. Fluorescence microscopy with 4,6-diamidino-phenylindol (DAPI) revealed nuclear fragmentation in cells overexpressing calnexin whereas the nuclei of control cells (overexpressing Pdi1p or Sec61 β , or harbouring the empty vector) remained intact for the same time point (Figure 9B). To assess if nuclear fragmentation was due to chromatin breakage, the TUNEL assay (TdT-mediated dUTP-X nick-end labelling) was performed and quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells overexpressing calnexin exhibited a significant TUNEL-positive phenotype as compared to the controls (cells overexpressing Pdi1p or Sec61 β , or harbouring the empty vector), which is consistent with the DAPI phenotype (Figure 9C). We and others (Hauptmann *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2006), have

previously shown that caspase-like (metacaspase) (Uren *et al.*, 2000) activation can be assessed in *S. cerevisiae* and in *S. pombe* by the permeable fluorescent marker FITC-VAD-FMK (valyl-alanyl-aspartyl-[*O*-methyl]-fluoromethylketone). FACS analysis revealed that about 40 % of cells overexpressing calnexin were metacaspase positive at 72 hours post-induction (Figure 9D). In contrast, no FITC-VAD-FMK fluorescent cells were observed in the control cultures of the strains overexpressing Pdi1p or Sec61 β , or harbouring the empty vector. High levels of ROS are associated with apoptosis due to ER stress in mammalian and yeast cells (Carmody and Cotter, 2001). We measured this apoptotic marker by staining cells with dihydrorhodamine 123 (DHR123), which is oxidized to fluorescent rhodamine by ROS. As shown by fluorescent microscopy analysis, only cells overexpressing calnexin produced ROS, thus indicating that overexpression of Cnx1p may cause ER stress (Figure 9E). Collectively, these observations show that overexpression of calnexin in *S. pombe* leads to cell death with the typical markers associated with apoptosis.

2.4.3 The transmembrane domain (TM) of calnexin is required for the induction of apoptotic death by overexpression

To identify molecular determinants of calnexin involved in the triggering apoptotic death, we overexpressed *cnx1* truncation mutants. We began our analysis with luminal_Cnx1p and mini_Cnx1p, two viable mutants previously characterized (Elagoz *et al.*, 1999). The *luminal_cnx1* mutant encodes the entire luminal domain of calnexin (Figure 10A), which was shown to have the same level of chaperone activity as wild-type

calnexin (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004). The *mini_cnx1* mutant encodes a truncated calnexin protein spanning the last 52 amino acid (aa) of the luminal domain, the transmembrane domain (TM), and the cytosolic tail (Figure 10A). This mutant exhibits no detectable chaperone activity (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004).

Remarkably, overexpression of *lumenal_Cnx1p* did not provoke cell death, as measured by spotting on inducing media or by Phloxin B (Figure 10C and D). In agreement with these results, cells overexpressing *lumenal_Cnx1p* did not exhibit apoptotic markers (nuclear fragmentation, DNA breakage and metacaspase activation; Figure 11A-C). In contrast, the overexpression of *mini_Cnx1p* resulted in significant cell death (Figure 10C and D). Overexpression of *mini_Cnx1p* also provoked apoptotic phenotypes as those caused by overexpression of wild-type calnexin (Figure 11A-C). Therefore, removing the transmembrane domain (TM) and the cytosolic tail completely abolished the apoptotic effect triggered by overexpression of calnexin.

To further map the determinants involved in the induction of apoptosis by overexpression of calnexin, we constructed two additional mutants (Figure 10A). One of them is called *lumenalTM_cnx1*, and encodes the luminal domain of calnexin and includes the TM anchor. The other mutant is *C-termTM_cnx1_cmyc*, and encodes the TM and the cytosolic tail of calnexin with a c-myc tag to facilitate immunodetection (Figure 10B). The mutant *lumenalTM_Cnx1p* conferred viability, whereas *C-termTM_Cnx1p_cmyc* could not sustain viability in a $\Delta cnx1$ strain (Figure 10A). That the encoded mutant proteins were indeed correctly integrated into the ER membrane was verified using cell fractionation and

detergent solubilisation, as we have previously described for wild-type calnexin and mini_Cnx1p (Elagoz *et al.*, 1999); see Supplemental Figure 1).

Like for wild-type calnexin, the overexpression of lumenalTM_Cnx1p and C-termTM_Cnx1p_cmyc mutants resulted in apoptotic cell death (Figure 10C and D), as judged by the typical markers nuclear fragmentation, DNA breakage, and metacaspase activation (Figure 11A-C). However, in the case of the mutant lumenalTM_Cnx1p, the apoptotic death phenotype was stronger than with wild-type calnexin, whereas in the case of the C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant the apoptotic death phenotype was weaker. For instance, cells overexpressing lumenalTM_Cnx1p were not able to form colonies on media without thiamine, whereas cells overexpressing C-termTM_Cnx1p_cmyc formed colonies, albeit not as efficiently as the control strains (Figure 10C). Moreover, about 70% of the cells overexpressing the lumenalTM_Cnx1p mutant were dead as judged by Phloxin B staining, whereas only 21% of dead cells were observed for the strain overexpressing C-termTM_Cnx1p_cmyc (Figure 10D). Cells overexpressing these two mutants showed distinctive nuclear fragmentation, DNA breakage, and metacaspase activation (Figure 11A-C). The strongest difference in apoptotic markers was observed for metacaspase activation measurements as 70% of cells overexpressing lumenalTM_Cnx1p were positive after 72 hours of induction, compared to about 27% for C-termTM_Cnx1p_cmyc (Figure 11C). Together these experiments indicate that the TM is required for the induction of apoptotic cell death by calnexin overexpression, and suggest that some calnexin sequences on either or both sides of the ER membrane might be necessary for this lethal phenotype.

Importantly, as the mini_Cnx1p and C-termTM_Cnx1p_cmyc mutants do not exhibit chaperone activity, it clearly appears that the role of calnexin in apoptosis is distinct from its chaperone function in the ER lumen.

2.4.4 Calnexin is involved in ER-stress induced apoptosis

Because its overexpression induces apoptotic death, we wished to investigate whether calnexin is involved in apoptosis provoked by ER stress. Tunicamycin is an inhibitor of *N*-glycosylation that strongly induces apoptosis in mammalian cells and in the budding yeast (Perez-Sala and Mollinedo, 1995; Hacki *et al.*, 2000; Hauptmann *et al.*, 2006; Hauptmann and Lehle, 2008). We have previously reported that tunicamycin efficiently inhibits protein *N*-glycosylation and induces ER stress in *S. pombe* (Jannatipour and Rokeach, 1995; Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999). As depicted in Figure 12A, *S. pombe* cells treated with tunicamycin displayed typical apoptotic markers, such as nuclear fragmentation and metacaspase activation. To investigate if calnexin is involved in apoptosis induced by the ER stressor tunicamycin, we constructed *S. pombe* strains solely expressing the mutant version of calnexin at the basal level, in a $\Delta cnx1$ genetic background. The genes coding for the calnexin mutants to be tested were cloned into the pREP41 vector, which expresses calnexin at the basal endogenous level (Jannatipour *et al.*, 1998). It is important to note that because calnexin is essential for viability in *S. pombe*, only viable calnexin mutants can be tested in the $\Delta cnx1$ background. The mutants tested were *mini_cnx1*, *lumenal_cnx1* and *lumenalTM_cnx1*. Following treatment with tunicamycin,

about 35% of wild-type calnexin cells were positive for metacaspase activation as measured by staining with the fluorescent marker FITC-VAD-FMK (Figure 12B). The same level of metacaspase activation was observed with the strains *mini_cnx1* and *lumenalTM_cnx1* mutants (Figure 12B). Interestingly, only 17% of the *lumenal_cnx1* mutant cells treated with tunicamycin stained positive for metacaspase activation (Figure 12B). This diminution in metacaspase activity corresponds to a reduction of 50% of the total metacaspase-positive wild-type calnexin cells.

BiP anchoring to the ER membrane was reported in mammalian cells subjected to ER stress (Rao et al., 2002; Reddy et al., 2003). In previous reports, we have shown that calnexin and BiP associate in a complex, (Jannatipour *et al.*, 1998; Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004). To investigate whether the BiP-Cnx1p association is affected in the presence of tunicamycin, we immunoprecipitated Cnx1p or lumenal_Cnx1p and verified the presence of BiP in the precipitate. The treatment with tunicamycin increased the interaction between the two partners for both, wild-type calnexin and the lumenal_Cnx1p mutant, with a higher ratio of BiP for the latter (Figure 12C).

Ire1p is a mediator of ER stress that is conserved from yeast to mammals (Patil and Walter, 2001; Breckenridge *et al.*, 2003). Therefore, we wished to investigate if apoptosis induced by calnexin overexpression involves Ire1p. We overexpressed calnexin in the *Aire1* background and measured cell death and metacaspase activation. Indicating the involvement of Ire1p, we observed about 50% diminution in the levels of cell death and

metacaspase activation induced by calnexin overexpression in the the *Aire1* background (Figure 12D).

To sum up, apoptosis induced by the ER-stressor tunicamycin is strongly reduced in the background of luminal_Cnx1p, the only mutant tested that does not provoke apoptosis by overexpression. This observation demonstrates the involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis and support the notion that the TM and/or the anchoring of calnexin to the ER membrane are important for the pro-apoptotic function of calnexin in *S. pombe*. That apoptosis induced by calnexin overexpression is significantly reduced in the absence of Ire1p, suggests that this mediator plays a role in the apoptosis pathway involving calnexin.

2.4.5 The *S. pombe* metacaspase Pca1p and the homologue of Bap31 are not required for the induction of apoptosis by calnexin overexpression.

S. pombe encodes several homologues of known actors of the apoptotic pathway (Uren *et al.*, 2000; Madeo *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007). So far, only one caspase-like protein was identified in yeast and the dependence of apoptosis on this metacaspase is variable depending of the apoptotic inducer (Madeo *et al.*, 2002; Bettiga *et al.*, 2004; Fannjiang *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Wadskog *et al.*, 2004; Ivanovska and Hardwick, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008b; Mazzoni and Falcone, 2008b). To test whether the apoptosis induced by calnexin overexpression is dependent of the metacaspase

Pca1p, death was assayed by spotting cells on inducing media and by staining cells with Phloxin B in the $\Delta pcal$ strain containing an empty vector (Vector) or overexpressing calnexin. No reduction in the death levels was observed in the $\Delta pcal$ background (Figure 13A, B). Metacaspase activation was analyzed with the fluorescent probe FITC-VAD-FMK. We observed a slower kinetics of caspase-like activation in $\Delta pcal$ cells; however the level of final activation was similar to the $pca1^+$ strain (Figure 13C). Therefore, apoptosis induced by calnexin overexpression is not absolutely dependent of the Pca1p. Interestingly, these results demonstrate the presence of other, yet uncharacterized, caspase-like activities in *S. pombe*.

In mammalian cells, calnexin was demonstrated to associate with the transmembrane ER protein Bap31. Bap31 mediates apoptosis following its cleavage by caspase 8 and calnexin was proposed to act as a scaffold in this process (Delom *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007b). To assess if the homologue of Bap31 in *S. pombe* is required for apoptosis induction by calnexin overexpression, we measure death rate and metacaspase activation in cells deleted for the homologue of Bap31 ($\Delta dam1/bap31$). Overexpression of calnexin in $\Delta dam1/bap31$ strain caused similar death levels as the wild-type strain (Figure 13A, B). Here again, a delay in metacaspase induction was observed in the $\Delta dam1/bap31$ strain, reaching the similar final levels as the wild-type strain (Figure 13C). Therefore, Bap31 is not crucial in *S. pombe* to mediate apoptosis induced by calnexin overexpression.

2.4.6 The *S. pombe* homologue of human HMGB1 prevents apoptosis due to calnexin overexpression

To identify cellular factors involved in cell death mediated by calnexin, we carried out a genetic screen to isolate suppressors of the lethality caused by the overproduction of calnexin. Briefly, cells overexpressing calnexin were transformed with the pURSP1 *S. pombe* genomic bank, and 150,000 transformants were screened for survival, *i.e* the ability to form colonies. Of 50 potential candidates isolated in the primary screen, one was an authentic suppressor (Figure 14A). This suppressor clone encoded Hmg1/2p, the homologue of the mammalian nuclear protein HMGB1. This protein is part of a HMG family that interacts with DNA for replication, transcription and DNA repair. Importantly, human HMGB1 was reported as an anti-apoptotic protein in mammalian and in fission yeast cells (Brezniceanu *et al.*, 2003).

To investigate the suppressor effect of Hmg1/2p on death by calnexin overexpression, we synthesized its encoding gene (*SPBC28F2.11*) by PCR amplification and cloned it into an overexpression vector. Simultaneous co-overexpression of Hmg1/2p with calnexin significantly reduced the levels of cell death, as judged by spotting on inducing media and by Phloxin B staining (Figure 14A and B). About 50% of cells stained positively with Phloxin B when calnexin was overproduced alone, as compared to 20% of cells when was Hmg1/2p overproduced in concert (Figure 14B). Examination of the metacaspase activation revealed that overexpression of Hmg1/2p reduced the levels of induction of apoptosis (Figure 14C). About 45% of the cells overexpressing solely wild-

type calnexin were positive for metacaspase activation, whereas only 10% of the cells co-overexpressing Hmg1/2p stained positively with the fluorescent marker FITC-VAD-FMK (Figure 14C). Western blotting showed that the suppression of cell death caused by the simultaneous overexpression of Hmg1/2p was not due to a reduction in the calnexin levels (data not shown). These observations indicate that Hmg1/2p has anti-apoptotic function in *S. pombe* and that this protein may have a regulatory role in apoptosis involving calnexin.

2.4.7 Overexpression of human calnexin induces apoptosis in *S. pombe*

S. pombe calnexin is a close sequence homologue of its human counterpart, especially when compared to the *S. cerevisiae* molecule (Jannatipour and Rokeach, 1995). Recent studies in mammalian cells have demonstrated the involvement of calnexin in the apoptosis induced by ER stress in mammals (Zuppini *et al.*, 2002; Takizawa *et al.*, 2004b; Tomassini *et al.*, 2004; Delom *et al.*, 2006; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007b). Because several studies reported interchangeability between mammalian and fission yeast proteins in apoptotic processes (Komatsu *et al.*, 2000a), we asked whether human calnexin could also induce apoptosis when overexpressed in *S. pombe*.

Indeed, the overproduction of human calnexin in *S. pombe* provoked cell death in about 30% of cells, as measured by Phloxin B staining (Figure 15A). Moreover, about 30% of cells overexpressing human calnexin exhibited metacaspase activation as measured with the fluorescent probe FITC-VAD-FMK. Although these levels of death and caspase activity are lower than those observed with wild-type *S. pombe* calnexin, these results argue

for the conservation of the mechanisms of calnexin-mediated apoptotic cell death, at least in part, between human and *S. pombe* cells.

2.5 DISCUSSION

Cell survival under ER stress conditions is largely dependent on the UPR pathway (Patil and Walter, 2001; Schroder and Kaufman, 2005b; Marciniak and Ron, 2006; Zhao and Ackerman, 2006; Lai *et al.*, 2007; Ron and Walter, 2007). However, if the overload caused by ER stressors cannot be counteracted, the UPR response switches from its pro-survival function to the signalling of apoptotic death. A major current question regarding the cell's response to ER stress is how the switch from pro-survival to pro-death is mechanistically decided. According to current models, the mammalian UPR senses intraluminal stress through the three upstream ER transducers IRE1, PERK and ATF6; signalling via these stress receptors is regulated by the ER molecular chaperone BiP (Lee *et al.*, 1999; Li and Lee, 2006; Ni and Lee, 2007). Nevertheless, it is unclear whether other upstream regulators of the mechanism ER-stress apoptosis do exist, and much remains to be elucidated about the downstream factors and interactions involved in the transduction of the cell-death signal.

Recent work showed that mammalian calnexin is required for the cleavage of Bap31 and thus for the generation of the pro-apoptotic p20 fragment under tunicamycin stress; these authors proposed that calnexin acts as a scaffold for Bap31 processing by caspase 8 (Zuppini *et al.*, 2002; Delom *et al.*, 2006; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007b). These observations raise the possibility that calnexin could be involved in the early steps relaying the signal towards apoptotic death initiated by overwhelming ER stress.

Here, we demonstrate that the overexpression of calnexin in *S. pombe* induces cell death with typical apoptotic features including early death, phosphatidyl serine exposure, metacaspase activation, ROS production, nuclear fragmentation and DNA breakage. This effect is specific to calnexin and is not due to overloading of the ER capacity, as overproduction of the ER proteins PDI or Sec61 β did not induce the apoptotic-death phenotypes, and is not due to the loss of ER membrane integrity as confirmed by microsome analysis.

It has been previously reported that the expression of mammalian Bak in the fission yeast is lethal, and that Bak requires interactions with *S. pombe* calnexin to mediate this cell-death phenotype (Torgler *et al.*, 1997). The authors proposed that the interaction between Bak and calnexin results in a dominant lethal effect due to the propagation of a death signal or the recruitment of additional interactors to the Bak-calnexin complex (Torgler *et al.*, 1997). Our results show that when overexpressed, calnexin induces apoptosis without exogenous factors or ER-stress conditions. In general, overexpression causes a bypass in the regulation of the pathway studied (Ramer *et al.*, 1992). This suggests that calnexin overexpression may disturb the control of an apoptotic pathway in which calnexin takes part. A possibility is that the overexpression of calnexin mimics conditions of ER stress in otherwise resting cells.

Truncation of the TM and cytosolic tail of calnexin abolished the apoptotic death caused by overexpression. Using various deletion mutants we demonstrated that the anchoring of calnexin to the ER membrane is required to induce apoptosis by

overexpression. Although the overexpression of the cytosolic tail anchored to the membrane induced cell death, the strongest apoptotic effect was observed by overproducing a calnexin mutant spanning the luminal domain with the TM. These results may imply that residues on both the intraluminal portion and the cytosolic tail of calnexin could play roles in the induction of apoptosis, and that the sequences on either side of the TM may participate in different pro-death interactions. Supporting the importance of the cytosolic tail and the TM, Torgler *et al.* (1997) reported that expression of human Bak was lethal in an *S. pombe* strain expressing wild-type calnexin but not in a strain expressing a mutant calnexin lacking both the TM and the cytosolic tail. Importantly, our results demonstrate that sequences within the luminal domain of calnexin are also involved in pro-apoptotic interactions. The requirement of the TM to elicit apoptotic death by overexpression suggests that the anchoring of calnexin to the ER membrane may be required for its interaction with some key partner(s) for the assembly of a lethal complex.

Our observations provide first direct evidence that altering the levels of calnexin causes death with apoptotic features. That its overexpression induces programmed cell death is indicative that calnexin could play a role in apoptotic processes induced by “natural” ER stresses. An increase in the calnexin levels due to ER stress may constitute a part of a branch in the mechanism of induction of apoptotic death. Tunicamycin is a potent inhibitor of *N*-glycosylation that is currently used as an elicitor of ER stress in the study of the apoptosis mechanisms in mammalian cells and in the budding yeast (Perez-Sala and Mollinedo, 1995; Hacki *et al.*, 2000; Hauptmann *et al.*, 2006; Hauptmann and Lehle, 2008).

We have previously reported that tunicamycin induces ER stress in *S. pombe* and increases the expression of *cnx1*⁺, the gene encoding calnexin (Jannatipour and Rokeach, 1995). In this work, we show that also in the case of *S. pombe*, tunicamycin provokes cell death with typical apoptosis markers.

Using *S. pombe* strains expressing calnexin mutants at basal levels, we demonstrated that apoptotic cell death induced by tunicamycin is significantly less efficient in cells expressing calnexin without its TM. Cells expressing only the luminal portion of calnexin exhibited a 50% reduction in apoptotic cell death due to exposure to tunicamycin. Our observations implicate calnexin in apoptosis caused by ER stress. In agreement with our results, calnexin-deficient rodent cells are relatively resistant to apoptosis induced by ER stress (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2006). However, it has been reported that siRNA inhibition of calnexin expression increases the sensitivity to tunicamycin of apoptosis-resistant human-breast carcinoma MCF-7 cells (Delom *et al.*, 2006). This disparity in the results could be due to differences in the cell lines used in these studies. Nevertheless, transfection of a ΔE calnexin mutant lacking most of the luminal domain into MCF-7 cells restored the sensitivity to tunicamycin-induced apoptosis (Delom *et al.*, 2006). Together, these observations clearly implicate calnexin ER-stress induced apoptosis, in mammalian and in *S. pombe*.

S. pombe encodes several homologues of proteins characterized for their implication in apoptosis including thus far only metacaspase identified Pca1p (geneID: SPCC1840.04) and a Bap31 homologue (geneID: SPAC9E9.04). Our results demonstrate that the knock-

out of these genes does not affect the final level of apoptosis provoked by calnexin overexpression, however we observed a slower kinetics of induction. Likewise induction of apoptosis by tunicamycin was not blocked in the $\Delta pcal$ and $\Delta dma1/bap31$ strains (data not shown). Importantly, our results clearly demonstrate that another, yet uncharacterized, caspase-like activity is involved in this apoptotic process. Similarly, the homologue of Pca1p in *S.cerevisiae*, Yca1p, is not required for apoptotic death induced by numerous conditions (Madeo *et al.*, 2002; Bettiga *et al.*, 2004; Fannjiang *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Wadskog *et al.*, 2004; Ivanovska and Hardwick, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008b; Mazzoni and Falcone, 2008b). More recently, it was reported that Yca1p is not required for apoptosis induced by tunicamycin in *S. cerevisiae* (Hauptmann and Lehle, 2008). These observations suggest the existence of uncharacterized caspase-like activities in both, *S. pombe* and *S. cerevisiae*. That cell death occurs by calnexin overexpression in the $\Delta dma1/bap31$ background does not exclude the possibility that Bap31 could be part of a complex involving calnexin, but it is indicative that the role of Bap31 is not essential for apoptosis. In this vein, it was shown in mammalian cells that an uncleavable mutant of Bap31 does not abrogate the capacity to the cells to enter FAS-mediated apoptosis but it delays some cytoplasmic apoptotic events (Nguyen *et al.*, 2000).

The significant reduction in the levels of tunicamycin-induced apoptosis observed with the *lumenal_cnx1* mutant could be due to a diminution or a loss of effective interactions with lethal partners as observed for mammalian cells (Zuppini *et al.*, 2002;

Delom *et al.*, 2006; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007b). Ire1p could be taking part of this interaction since its presence is required to attain maximum apoptosis induction by calnexin overexpression. Further experiments are required to dissect the molecular interaction of calnexin with Ire1p and other lethal partners. Such interactions probably require the anchoring of calnexin to the ER membrane to be optimal in transducing the death signal. Interestingly, the *luminalTM_cnx1* strain exhibited the highest levels of apoptosis induced by tunicamycin. These, and our results obtained by overexpression experiments implicate luminal sequences of calnexin in apoptosis. However, it appears that the chaperone function of calnexin is distinct from its role in apoptosis since the mutant *luminal_Cnx1p* is a very effective chaperone (Marechal *et al.*, 2004) but a poor effector of tunicamycin-induced apoptosis. Further supporting this point, *mini_Cnx1p* does not exhibit chaperone activity (Marechal *et al.*, 2004) but is highly efficient in inducing apoptosis by overexpression, and *mini_cnx1* cells display levels of tunicamycin-induced apoptosis as the wild-type strain.

BiP anchoring to the ER membrane was reported in mammalian cells subjected to ER stress (Rao *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003). We have previously reported that the last 52 residues of the luminal portion of calnexin are required for viability and do interact with ER chaperone BiP (Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004). As BiP regulates the ER stress receptors IRE1, PERK, and ATF6, it is therefore tempting to speculate that BiP could also play a regulatory role in the pro-apoptotic function of calnexin (Patil and Walter, 2001; Szegezdi *et al.*, 2006; Ni and Lee,

2007; Ron and Walter, 2007). Our co-immunoprecipitation experiments showed that tunicamycin treatment enhances Cnx1p-BiP interaction in both the wild-type calnexin and the mutant luminal_Cnx1p. However, apoptosis is significantly reduced in the case of the luminal_Cnx1p mutant. These observations raise the possibility that stronger interaction between Cnx1p and BiP is required for ER stress-induced apoptosis, and that this complex needs to be anchored to the ER membrane to efficiently transduce the apoptotic signal. In such scenario, the diminution of tunicamycin-induced apoptosis in luminal_Cnx1p cells could be due to a mislocalization of the Cnx1p-BiP complex, as this complex is not localized to the ER membrane in the case of this mutant.

In a genetic screen designed to isolate suppressors of lethality caused by calnexin overexpression we identified Hmg1/2p, the *S. pombe* homologue of the human high-mobility group box-1 protein (HMGB1). The HMGB1 protein is part of the HMG family that interacts with DNA for replication, transcription and DNA repair and is a protein overexpressed in human breast carcinoma (Brezniceanu *et al.*, 2003; Ulloa and Messmer, 2006). Importantly, HMGB1 is an anti-apoptotic protein that was identified as an inhibitor of Bak-mediated cell death in mammalian cells and in *S. pombe* (Brezniceanu *et al.*, 2003). In this work we showed that like its mammalian counterpart, Hmg1/2p inhibits the ER-derived apoptotic pathway involving calnexin. Because Bak-induced apoptotic death in *S. pombe* is dependent on calnexin (Torgler *et al.*, 1997) and is inhibited by HMGB1, and because Hmg1/2 represses death by overexpression of calnexin in *S. pombe*, we hypothesize that the apoptotic pathway involving calnexin are similar in *S. pombe* and in

mammalian cells. While no sequence homologue of Bak was described in the fission yeast, it is likely that some *S. pombe* protein plays an analogous function to that of mammalian Bak. The discovery of this lethal partner will be important for the elucidation of the apoptotic processes caused by ER stress in *S. pombe*, and are likely to contribute to our understanding of the mechanism of apoptosis in mammals.

Human calnexin and *S. pombe* calnexin are very similar in their structure (Jannatipour and Rokeach, 1995). Here we report that like *S. pombe* calnexin, the overexpression of its human orthologue in the fission yeast induces cell death with typical apoptotic features. These results indicate that human calnexin interacts with *S. pombe* apoptotic machinery and overrides the mechanisms that regulate apoptosis involving endogenous calnexin. Collectively, these observations argue for the conservation between the mammalian and the *S. pombe* mechanisms of apoptosis involving calnexin, and validate *S. pombe* as a model organism.

Most of our current knowledge on the apoptotic response due to ER stress derives from studies with mammalian cells (Breckenridge *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006). Evidence accumulated in the last 10 years has proven that yeasts are interesting models to investigate the mechanism of apoptosis (Ink *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 1997; Ligr *et al.*, 1998; Madeo *et al.*, 1999; Madeo *et al.*, 2002; Priault *et al.*, 2003; Hardwick and Cheng, 2004; Madeo *et al.*, 2004; Rodriguez-Menocal and D'Urso, 2004; Burhans and Weinberger, 2007; Frohlich *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008). Whereas human and *S. pombe* calnexin share significant sequence similarity (Jannatipour

and Rokeach, 1995), the *S. cerevisiae* molecule (Cne1p) (Parlati *et al.*, 1995b) is the most distant known homologue. Thus, the study of the role of calnexin in the mechanisms of ER-stress apoptosis in *S. pombe* should bring crucial information regarding this cellular process in mammals.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Michael Brenner for the gift of the plasmid bearing the human calnexin cDNA, and Dr Anthony car for supplying the pURSP1 *S. pombe* genomic library. We also thank Dr Gerardo Ferbeyre and the members of the Rokeach Lab for critical reading of the manuscript. This work was supported by research grants from CIHR (Grant MOP-62703) and NSERC (Grant 171325) to LAR. RG was recipient of FES-Département de biochimie studentships.

2.7 FIGURE LEGENDS

Figure 8. Overexpression of *cnx1*⁺ induces cell death. **(A)** Schematic representation of *S. pombe* calnexin, Cnx1p. SP corresponds to the signal peptide (22 amino acids; aa), followed by the *N*-terminal part (98 aa; symbolized by the forward-hatched box). The highly conserved central domain (hcd) is represented by a white box (317 aa). The *C*-terminal part of luminal domain of calnexin is 52-aa long and is represented by the backward-hatched box. The transmembrane domain (TM, black box) and the cytosolic tail (punctuated box) span 23 aa and 48 aa, respectively. **(B)** Survival of cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302) was assayed by serial dilution on inducing plates (without thiamine) or repressing plates (with thiamine). Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-4}) of cells at 0.5 OD₅₉₅ were spotted on selective MM and incubated at 30°C for 7 days (see Material and Methods). **(C)** Percentage of dead cells measured by staining with fluorescent vital dye Phloxin B. Cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). In panel C, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 9. The overexpression of calnexin induces typical apoptotic phenotypes. (A) Phosphatidyl serine externalization. The Annexin V assay was carried out after 48 hours of induction of overexpression for the Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302). The percentage of stained cells was measured by FACS. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). **(B)** Nuclear fragmentation. Cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302) were stained with DAPI, after 96 hours of induction of overexpression. Cells were visualized under fluorescence microscopy; Nomarski fields are shown. White arrows indicate fragmented nuclei. **(C)** DNA fragmentation. The TUNEL assay was carried out after 96 hours of induction of overexpression for the Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302). The percentage of stained cells was measured by FACS. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). **(D)** Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS, at different time points following the overexpression of Cnx1p (strain SP8007R) and control strains (empty vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302), as described in the Materials and Methods. The experiment was repeated 3 times, and this graph is a representation of a typical experiment. **(E)** Accumulation of reactive oxygen species (ROS). ROS accumulation in the Cnx1p overexpressing strain (SP8007R) and control strains (empty

vector, SP7975R; Pdi1p, SP16058; and Sec61 β , SP15302) was determined by using the ROS probe DHR123 and fluorescence microscopy. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 10. The transmembrane domain (TM) is required to induce cell death by overexpression of calnexin. (A) Structures of calnexin mutants used in this study. Four different mutants were used. The mutant lumenal_Cnx1p encodes the luminal domain of calnexin (415 aa) and is truncated of the TM and the cytosolic tail. The mutant mini_Cnx1p encodes 123 residues corresponding to last 52 aa at the C-terminal end of the luminal domain, the TM (23 aa), and the cytosolic tail (48 aa). The lumenalTM_Cnx1p mutant spans the luminal domain and the TM of calnexin (437 aa). The C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant encodes the TM and the cytosolic of calnexin (71 aa), and encodes also the c-myc tag for immunodetection. For the sake of simplicity, the signal peptide (SP) of calnexin is not represented in this figure. The capacity of the mutants to sustain the viability of the cells in a $\Delta cnx1$ background is indicated at the right of the figure by + or – signs and was determined by a plasmid shuffling experiment (see Materials and Methods and (Elagoz *et al.*, 1999). (B) Immunoblot detection of Cnx1p and mutants of calnexin. Samples corresponding to 10 μ g of protein extracts from cells overexpressing mini_Cnx1p (strain SP7965R) and C-termTM_Cnx1p_cmyc (strain SP8125R) and 2 μ g from cells overexpressing lumenal_Cnx1p (strain SP16053) and lumenalTM_Cnx1p (strain SP8056) were loaded on a 12% (w/v) SDS-PAGE gel. Calnexin proteins were detected by

immunoblotting with the anti-Cnx1p rabbit polyclonal serum (1:30,000) for Cnx1p, mini_Cnx1p, luminal_Cnx1p and luminalTM_Cnx1p mutants, and with the 9E10 anti-cmyc mouse monoclonal antibody (1:500) for C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant. The positions of the molecular mass markers (in KDa) are indicated on the left. The bands corresponding to the overexpressed are identified with a star (*). The band marked with a black circle (●) corresponds to the endogenous calnexin present in all the strains but that is visible only in the mini_Cnx1p well due to the amount of proteins loaded. **(C)** Survival of cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R), the mutants of calnexin (mini_Cnx1p, SP7965R; luminal_Cnx1p, SP16053; luminalTM_Cnx1p, SP8056R; C-termTM_Cnx1p_cmyc, SP8125R) and the control strain (empty vector, SP7975R) was assayed by serial dilution on inducing plates (without thiamine) and repressing plates (with thiamine). Samples of 10 µl of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-4}) of cells at 0.5 OD₅₉₅ were spotted on selective MM and incubated at 30°C for 7 days (see Material and Methods). **(D)** Percentage of dead cells measured by staining with fluorescent vital dye Phloxin B. Cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R), the mutants of calnexin (mini_Cnx1p, SP7965R; luminal_Cnx1p, SP16053; luminalTM_Cnx1p, SP8056R; C-termTM_Cnx1p_cmyc, SP8125R) and the control strain (empty vector, SP7975R) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression, and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise

calculated with respect to the control for Cnx1p and C-termTM_Cnx1p_cmyc and to Cnx1p for the calnexin mutants. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. In panel D, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 11. The TM of calnexin is required for induction of apoptotic cell death due to overexpression. (A) Nuclear fragmentation. Cells overexpressing the mutants of calnexin (mini_Cnx1p, SP7965R; lumenal_Cnx1p, SP16053; lumenalTM_Cnx1p, SP8056R; C-termTM_Cnx1p_cmyc, SP8125R) and the control strain (empty vector, SP7975R) were stained with DAPI, after 96 hours of induction of overexpression. Cells were visualized under fluorescence microscopy; Nomarski fields are shown. White arrows indicate fragmented nuclei. (B) DNA fragmentation. The TUNEL assay was carried out after 96 hours of induction of overexpression for the Cnx1p (strain SP8007R), the mutants of calnexin (mini_Cnx1p, SP7965R; lumenal_Cnx1p, SP16053; lumenalTM_Cnx1p, SP8056R; C-termTM_Cnx1p_cmyc, SP8125R) and the control strain (empty vector, SP7975R). The percentage of stained cells was measured by FACS. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with respect to the control for Cnx1p and C-termTM_Cnx1p_cmyc and to Cnx1p for the calnexin mutants. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS, at different time points following the overexpression of Cnx1p (strain

SP8007R), the mutants of calnexin (*mini_Cnx1p*, SP7965R; *lumenal_Cnx1p*, SP16053; *lumenalTM_Cnx1p*, SP8056R; *C-termTM_Cnx1p_cmyc*, SP8125R) and the control strain (empty vector, SP7975R) as described in the Materials and Methods. The experiment was repeated 3 times, and this graph is a representation of a typical experiment. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 12. Involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis in *S. pombe*. (A) Tunicamycin induces apoptotic cell death in *S. pombe*. *S. pombe* cells carrying a wild-type genomic copy of calnexin (strain SP556) were treated with 5 µg/ml of tunicamycin or with the solvent (no treatment) and subsequently stained with DAPI to detect nuclear fragmentation and with FITC-VAD-FMK to determine the % of metacaspase activation. For DAPI staining, cells were examined by fluorescence microscopy. White arrows indicate fragmented nuclei. The % of metacaspase-positive cells was measured by FACS as described in Materials and Methods. (B) Truncation of the TM and the cytosolic tail of calnexin dramatically reduces the levels of metacaspase activation. Cells expressing *cnx1*⁺ (strain SP7951R) or mutants of calnexin (*mini_cnx1*, SP8490R; *lumenal_cnx1*, SP8488R; and *lumenalTM_cnx1*, SP8085R) at basal levels were treated with 10 µg/ml of tunicamycin, and subsequently the % of metacaspase-positive cells was determined with FITC-VAD-FMK by FACS, as described in Materials and Methods. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with

respect to the control for Cnx1p and to Cnx1p for the calnexin mutants. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. **(C)** Association with BiP. Cells at OD 0.8-1.0 expressing Cnx1p (strain SP7951R) or luminal_Cnx1p (SP8488R) were treated or not with 10 $\mu\text{g/ml}$ of tunicamycin. Immunoprecipitations were performed with anti-Cnx1p antibodies and the membrane was blotted with anti-Cnx1p antibodies or anti-BiP antibodies. Bands corresponding to Cnx1p, luminal_Cnx1p or BiP were quantified with the Bio-RAD Quantity One 4.6.5 Basic program and reported as a ratio to Cnx1p untreated on a graph. The graph is representative of three different experiments. **(D)** Implication of Ire1p in apoptosis induced by calnexin overexpression. Cells overexpressing Cnx1p in a wild-type background (SP8007R) or in a *Dire1* strain (SP8231R) and the control strain (empty vector, SP7975R and SP8227R) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression to measure cell death. Stained cells were considered as dead. At different time points following the overexpression of Cnx1p cells were stained with the fluorescent probe FITC-VAD-FMK to measure metacaspase activation. Fluorescent cells were quantified by FACS. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with respect to the control for Cnx1p. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. For metacaspase activation, the experiment was repeated 3 times, and this graph is a representation of a typical experiment. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 13. The *S. pombe* metacaspase Pca1p and the homologue of Bap31 are not required for apoptosis induced by calnexin overexpression. (A) Survival of cells overexpressing Cnx1p in a *Δpca1* or in a *Δdma1/Bap31* strain (SP8081R and SP8136R) and the control strains (empty vector, SP7975R, SP8167R and SP8145R), was assayed by serial dilution on inducing plates (without thiamine) and repressing plates (with thiamine). Samples of 10 μl of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-4}) of cells at 0.5 OD₅₉₅ were spotted on selective MM and incubated at 30°C for 7 days (see Material and Methods). (B) Percentage of dead cells measured by staining with fluorescent vital dye Phloxin B. Cells overexpressing Cnx1p in a wild-type background (SP8007R), in a *Δpca1* strain (SP8081R) or in a *ΔBap31* strain (SP8136R) and the control strain (empty vector, SP7975R) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with respect to the control for Cnx1p. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS, at different time points following the overexpression of Cnx1p in a wild-type background strain (SP8007R), in a *Δpca1* strain (SP8081R) or in a *ΔBap31* strain (SP8136R) and the control strain (empty vector, SP7975R) as described in the Materials and Methods. The experiment was repeated 3 times, and this graph is a

representation of a typical experiment. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 14. The *S. pombe* homologue of the human anti-apoptotic HMGB1 inhibits apoptotic death induced due to calnexin overexpression. (A) Survival of cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R) alone and co-overexpressing Hmg1/2p, the *S. pombe* homologue of the human anti-apoptotic HMGB1 protein, (strain SP16081) and the control strain (empty vector, SP7975R) was assayed by serial dilution on inducing plates (without thiamine) and repressing plates (with thiamine). Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-4}) of cells at 0.5 OD₅₉₅ were spotted on selective MM and incubated at 30°C for 7 days (see Material and Methods). (B) Percentage of dead cells measured by staining with fluorescent vital dye Phloxin B. Cells overexpressing Cnx1p (strain SP8007R) alone and co-overexpressing Hmg1/2p, the *S. pombe* homologue of the human anti-apoptotic HMGB1 protein, (strain SP16081) and the control strain (empty vector, SP7975R) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. A global ANOVA showed that the values obtained among the strains were significantly different ($P=0.000$). The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with respect to the control for Cnx1p and to Cnx1p for the Cnx1p + Hmg1/2p strain. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase

activation by FACS, at different time points following the overexpression of Cnx1p (strain SP8007R) alone and co-overexpressing Hmg1/2p, the *S. pombe* homologue of the human anti-apoptotic HMGB1 protein, (strain SP16081) and the control strain (empty vector, SP7975R) as described in the Materials and Methods. The experiment was repeated 3 times, and this graph is a representation of a typical experiment. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Figure 15. Overexpression of human calnexin induces apoptotic death in *S. pombe*.

(A) Overexpression of human calnexin provokes cell death in *S. pombe*. Samples of 10 μ l of four serial ten-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-4}) of 0.5 OD₅₉₅ cells overexpressing human calnexin (strain SP16084), or control cells harboring the empty vector (strain SP7975R) were plated on selective minimal media and incubated at 30°C for 7 days. **(B)** Percentage of dead cells as measured with the vital fluorescent dye Phloxin B. Cells overexpressing human calnexin (strain SP16084) or control cells harboring the empty vector (strain SP7975R) were stained with Phloxin B after 48 hours of induction of overexpression and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. The significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with respect to the control for human calnexin. If $P < 0.01 = **$ and if $P < 0.05 = *$. **(C)** Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS, at different time points following the overexpression of human calnexin (SP16084), or control cells harboring the empty vector

(strain SP7975R), as described in the Materials and Methods. The experiment was carried out 3 times and this graph represents a typical experiment. In this figure, vertical black arrows symbolize overexpression of the indicated protein.

Supplementary Figure 1: Calnexin overexpression does not disrupt the integrity of ER membrane. Microsomal membranes from cells overexpressing Cnx1p were prepared as described in Material and Methods and extracted with Tris-buffer pH 7.5 alone (Mock) or supplemented with either 0.5M NaCl or 0.1% SDS. The extract was ultracentrifuged resulting in pellet (P) and supernatant (S) fractions. Fractions were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred on a nitrocellulose membrane that was stained with Ponceau Red to reveal to total amount of proteins in each fraction. The nitrocellulose membrane was also immunoblotted with anti-BiP and anti-Cnx1p antibodies.

2.8 REFERENCES

Ahner, A., and Brodsky, J.L. (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends in cell biology* *14*, 474-478.

Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F., and Ludovico, P. (2008). Drug-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et biophysica acta*.

Arunachalam, B., and Cresswell, P. (1995). Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *The Journal of biological chemistry* *270*, 2784-2790.

Beaulieu, H., Elagoz, A., Crine, P., and Rokeach, L.A. (1999). Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical journal* *340 (Pt 3)*, 813-819.

Bettiga, M., Calzari, L., Orlandi, I., Alberghina, L., and Vai, M. (2004). Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res* *5*, 141-147.

Boyce, M., and Yuan, J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* *13*, 363-373.

Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* *22*, 8608-8618.

Brezniceanu, M.L., Volp, K., Bossler, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., and Zornig, M. (2003). HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *Faseb J* *17*, 1295-1297.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E.A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122.

Burhans, W.C., and Weinberger, M. (2007). Yeast endonuclease G: complex matters of death, and of life. *Mol Cell* 25, 323-325.

Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M.A., Ramachandran, L., D'Urso, G., and Huberman, J.A. (2003). Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res* 532, 227-243.

Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., and Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *The Journal of cell biology* 175, 521-525.

Carmody, R.J., and Cotter, T.G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 6, 77-90.

Cho, N.C., Kang, H.J., Lim, H.W., Kim, B.C., Park, E.H., and Lim, C.J. (2006). Stress-dependent regulation of Pbh1, a BIR domain-containing protein, in the fission yeast. *Can J Microbiol* 52, 1261-1265.

Collin, P., Beauregard, P.B., Elagoz, A., and Rokeach, L.A. (2004). A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* 117, 907-918.

Delom, F., Emadali, A., Cocolakis, E., Lebrun, J.J., Nantel, A., and Chevet, E. (2006). Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ*.

Delom, F., Fessart, D., and Chevet, E. (2007). Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis*.

Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J.E., Velmurgan, S., Brown, S., Stamp, G., and Owen, M.J. (2002). Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Molecular and cellular biology* 22, 7398-7404.

Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. (1999). Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *Journal of cell science* 112 (Pt 23), 4449-4460.

Fabrizio, P., and Longo, V.D. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta*.

Fahrenkrog, B., Sauder, U., and Aebi, U. (2004). The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J Cell Sci* 117, 115-126.

Fannjiang, Y., Cheng, W.C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., Hill, R.B., Basanez, G., and Hardwick, J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* 18, 2785-2797.

Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L.A., and Parodi, A.J. (1996). A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP--Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *The EMBO journal* *15*, 705-713.

Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual review of genetics* *35*, 149-191.

Forsburg, S.L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic acids research* *21*, 2955-2956.

Frohlich, K.U., Fussi, H., and Ruckenstuhl, C. (2007). Yeast apoptosis--from genes to pathways. *Seminars in cancer biology* *17*, 112-121.

Groenendyk, J., Zuppini, A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (2006). Caspase 12 in calnexin-deficient cells. *Biochemistry* *45*, 13219-13226.

Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I., and Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* *19*, 2286-2295.

Hajjar, F., Beauregard, P.B., and Rokeach, L.A. (2007). The 160 N-terminal residues of calnexin define a novel region supporting viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* *24*, 89-103.

Hardwick, J.M., and Cheng, W.C. (2004). Mitochondrial programmed cell death pathways in yeast. *Dev Cell* *7*, 630-632.

Hauptmann, P., and Lehle, L. (2008). Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid and during chronological aging. *J Biol Chem*.

Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Frohlich, K.U., Madeo, F., and Lehle, L. (2006). Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol Microbiol* *59*, 765-778.

Hebert, D.N., Garman, S.C., and Molinari, M. (2005). The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends in cell biology* *15*, 364-370.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* *73*, 1019-1049.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* *164*, 501-507.

Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T., and Evan, G. (1997). Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *17*, 2468-2474.

Ivanovska, I., and Hardwick, J.M. (2005). Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *The Journal of cell biology* *170*, 391-399.

Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A.J., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. (1998). Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* *37*, 17253-17261.

Jannatipour, M., and Rokeach, L.A. (1995). The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *The Journal of biological chemistry* 270, 4845-4853.

Jin, C., and Reed, J.C. (2002). Yeast and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 453-459.

Kerr, J.F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology 181-182*, 471-474.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11, 5-13.

Komatsu, K., Hopkins, K.M., Lieberman, H.B., and Wang, H. (2000). Schizosaccharomyces pombe Rad9 contains a BH3-like region and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2. *FEBS Lett* 481, 122-126.

Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda, Md)* 22, 193-201.

Lee, Y.K., Brewer, J.W., Hellman, R., and Hendershot, L.M. (1999). BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Molecular biology of the cell* 10, 2209-2219.

Li, J., and Lee, A.S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Current molecular medicine* 6, 45-54.

Liang, Q., Li, W., and Zhou, B. (2008). Caspase-independent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta*.

Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K.U., and Wolf, D.H. (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett* 438, 61-65.

Lim, H.W., Kim, S.J., Park, E.H., and Lim, C.J. (2007). Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* 53, 1016-1023.

Low, C.P., Liew, L.P., Pervaiz, S., and Yang, H. (2005). Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 5, 1199-1206.

Low, C.P., and Yang, H. (2008). Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*.

Maattanen, P., Kozlov, G., Gehring, K., and Thomas, D.Y. (2006). ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84, 881-889.

Madeo, F., Frohlich, E., and Frohlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *The Journal of cell biology* 139, 729-734.

Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Frohlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* 145, 757-767.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.

Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., and Frohlich, K.U. (2004). Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7, 655-660.

Marciniak, S.J., and Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews* 86, 1133-1149.

Marechal, A., Tanguay, P.L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G., and Rokeach, L.A. (2004). Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *The Biochemical journal* 380, 441-448.

Mazzoni, C., and Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta*.

McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (2005). Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Current topics in microbiology and immunology* 300, 17-40.

Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* 7, 766-772.

Nguyen, M., Breckenridge, D.G., Ducret, A., and Shore, G.C. (2000). Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and cellular biology* 20, 6731-6740.

Ni, M., and Lee, A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters* 581, 3641-3651.

Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995a). The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *The EMBO journal* 14, 3064-3072.

Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995b). *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *The Journal of biological chemistry* 270, 244-253.

Parodi, A.J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annual review of biochemistry* 69, 69-93.

Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13, 349-355.

Perez-Sala, D., and Mollinedo, F. (1995). Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *Journal of cellular physiology* 163, 523-531.

Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K.W., Vallette, F.M., and Manon, S. (2003). Yeast as a tool to study Bax/mitochondrial interactions in cell death. *FEMS Yeast Res* 4, 15-27.

Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M.B. (1994). Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science (New York, N.Y)* 263, 387-390.

Ramer, S.W., Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1992). Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11589-11593.

Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 514, 122-128.

Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R.C., Kaufman, R.J., and Lee, A.S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 278, 20915-20924.

Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., and Schmitt, M.J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* 168, 353-358.

Rodriguez-Menocal, L., and D'Urso, G. (2004). Programmed cell death in fission yeast. *FEMS Yeast Res* 5, 111-117.

Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *Journal of cell science* 112 (Pt 23), 4185-4191.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews* 8, 519-529.

Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L.A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging cell* 5, 345-357.

Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M.R., Cohen-Doyle, M.F., and Williams, D.B. (1999). Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *The EMBO journal* 18, 6718-6729.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* 74, 739-789.

Skulachev, V.P. (2002). Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett* 528, 23-26.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7, 880-885.

Takizawa, T., Tatematsu, C., Watanabe, K., Kato, K., and Nakanishi, Y. (2004). Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli: implication for the regulation of apoptosis. *Journal of biochemistry* 136, 399-405.

Thammavongsa, V., Mancino, L., and Raghavan, M. (2005). Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein. *The Journal of biological chemistry* 280, 33497-33505.

Tomassini, B., Malisan, F., Franchi, L., Nicolo, C., Calvo, G.B., Saito, T., and Testi, R. (2004). Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *Faseb J* *18*, 1553-1555.

Torgler, C.N., de Tiani, M., Raven, T., Aubry, J.P., Brown, R., and Meldrum, E. (1997). Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1. *Cell Death Differ* *4*, 263-271.

Trombetta, E.S., and Parodi, A.J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annual review of cell and developmental biology* *19*, 649-676.

Ulloa, L., and Messmer, D. (2006). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* *17*, 189-201.

Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* *6*, 961-967.

Wadskog, I., Maldener, C., Proksch, A., Madeo, F., and Adler, L. (2004). Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. *Mol Biol Cell* *15*, 1436-1444.

Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., and Fahrenkrog, B. (2006). The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J Cell Sci* *119*, 1843-1851.

Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* *119*, 615-623.

Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G., and Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* *166*, 969-974.

Wu, J., and Kaufman, R.J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation* *13*, 374-384.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* *115*, 2656-2664.

Zhang, Q., Chieu, H.K., Low, C.P., Zhang, S., Heng, C.K., and Yang, H. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *The Journal of biological chemistry* *278*, 47145-47155.

Zhao, L., and Ackerman, S.L. (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current opinion in cell biology* *18*, 444-452.

Zuppini, A., Groenendyk, J., Cormack, L.A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (2002). Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry* *41*, 2850-2858.

Table II. Yeast strains used for this study

Strain	Genotype	Source
SP556	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu 1-32</i>	Paul Nurse lab
SP7975R	SP556 + pREP3X	This lab
SP16058	SP556 + pREP2 <i>pdi1⁺</i>	This lab
SP15302	SP556 + pREP2 <i>sbh1⁺</i>	This lab
SP8007R	SP556 + pREP1 <i>cnx1⁺</i>	This lab
SP7965R	SP556 + pREP1 <i>mini_cnx1</i>	This lab
SP16053	SP556 + pREP1 <i>lumenal_cnx1</i>	This lab
SP8056R	SP556 + <i>lumenalTM_cnx1</i>	This lab
SP8125R	SP556 + pREP1 <i>C-termTM_cnx1_cmyc</i>	This lab
SP248	<i>h⁻ his3-D1 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Burke et al. (1994)
SP8075R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>lumenalTM_cnx1</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP8160R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>C-termTM_cnx1_cmyc</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP7951R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>cnx1⁺</i> + pREP42	Elagöz et al. (1999)
SP8490R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>mini_cnx1</i> + pREP42	Elagöz et al. (1999)
SP8488R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>lumenal_cnx1</i> + pREP42	Elagöz et al. (1999)
SP8085R	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>lumenalTM_cnx1</i> + pREP42	This study
SP16081	SP556 + pREP1 <i>cnx1⁺</i> + pREP2 <i>hmg1/2⁺</i>	This study
SP16084	SP556 + pREP1 <i>human calnexin</i>	This study
SP8083R	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu 1-32 KanMX4::dma1 (Δ<i>dma1/bap31</i>)</i>	BIONEER
SP8167R	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu 1-32 KanMX4::pca1 (Δ<i>pca1</i>)</i>	BIONEER
SP8212R	<i>h⁺ ade6-M210 (or M216) ura4-D18 leu 1-32 KanMX4::SPAC167.01 (Δ<i>ire1</i>)</i>	BIONEER
SP8145R	SP8083R + pREP1	This study
SP8136R	SP8083R + pREP1 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP8178R	SP8167R + pREP3X	This study
SP8081R	SP8167R + pREP1 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP8227R	pREP3X	This study
SP8231R	pREP1 <i>cnx1⁺</i>	This study

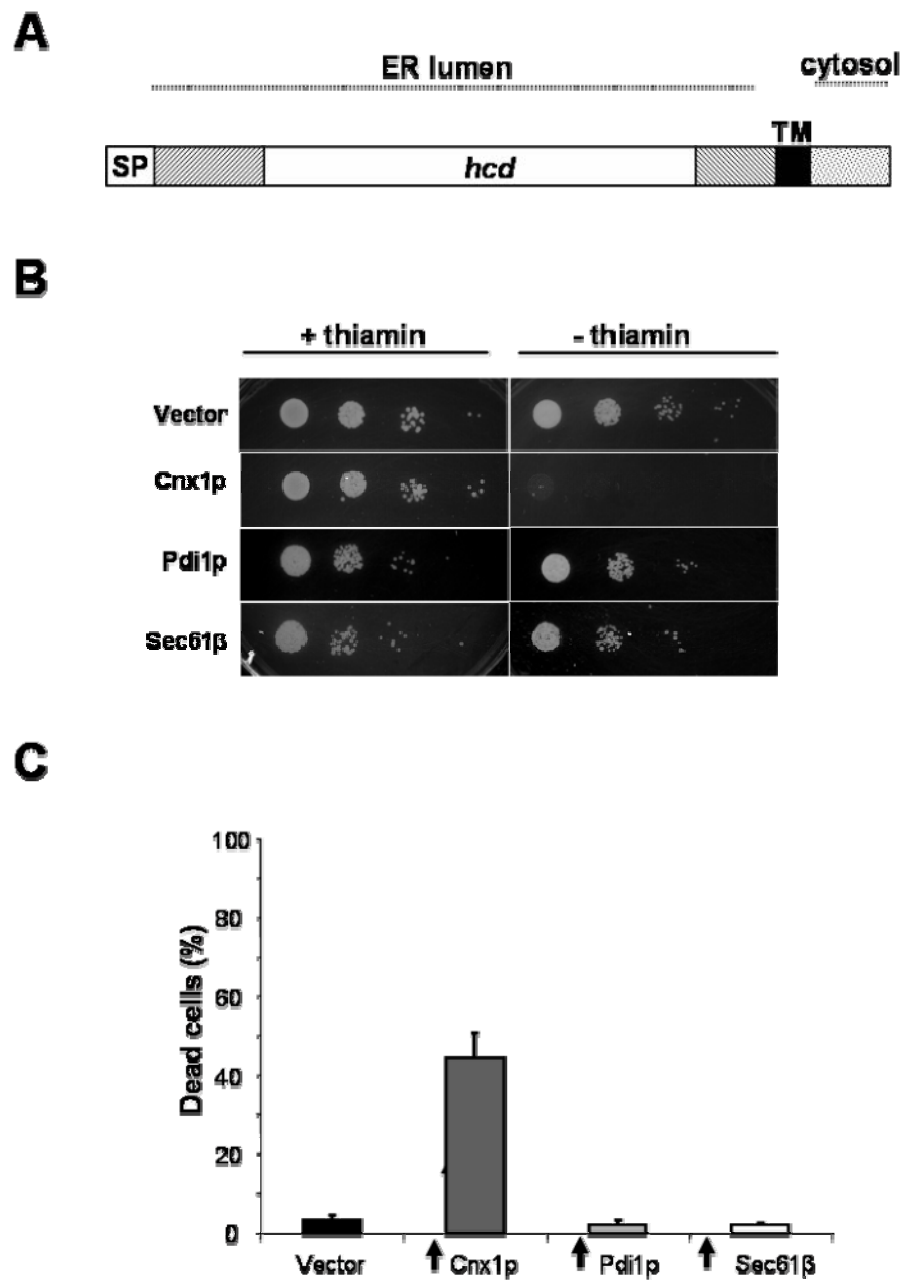


Figure 8: Overexpression of *cnx1*⁺ induces cell death.

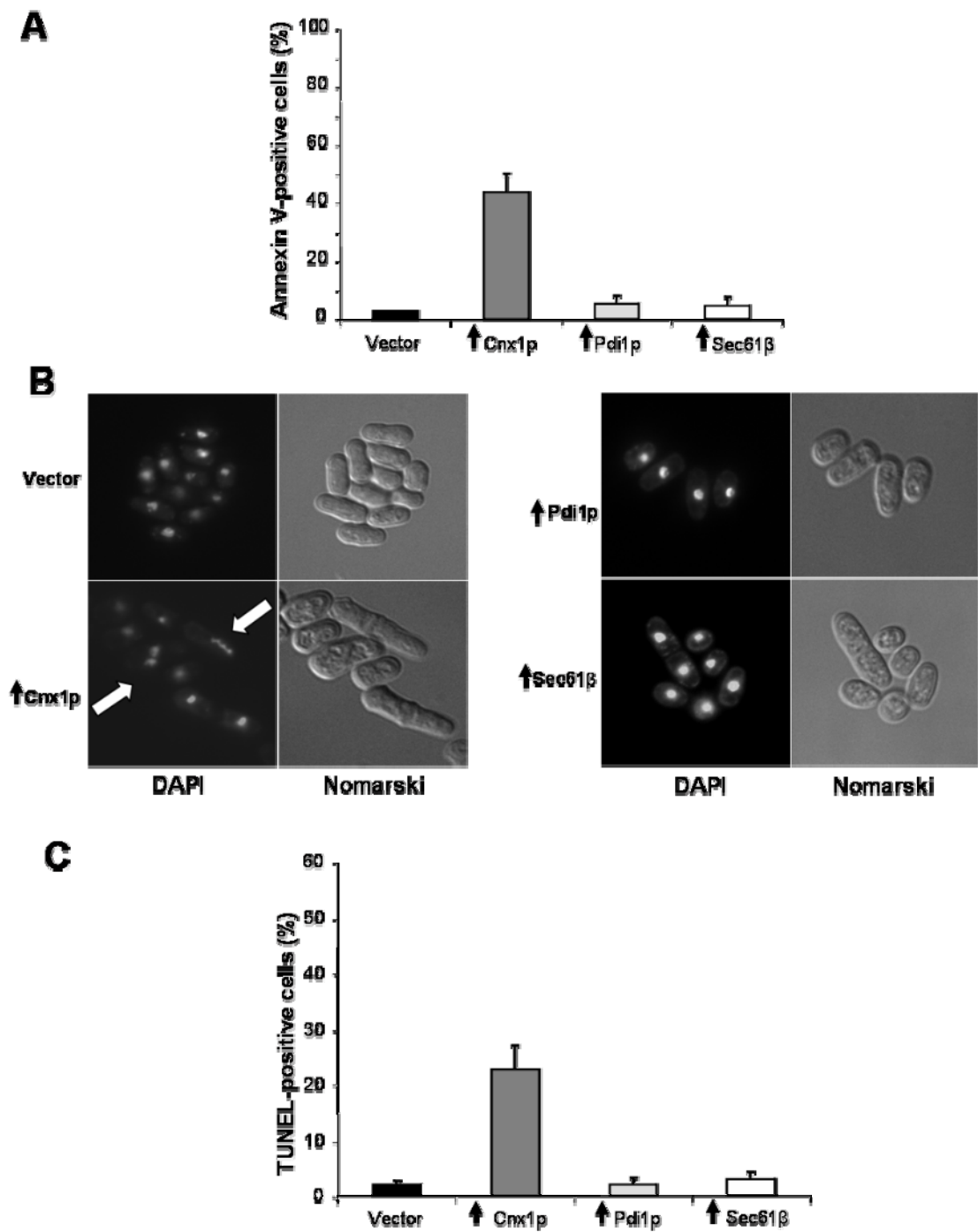


Figure 9: The overexpression of calnexin induces typical apoptotic phenotypes

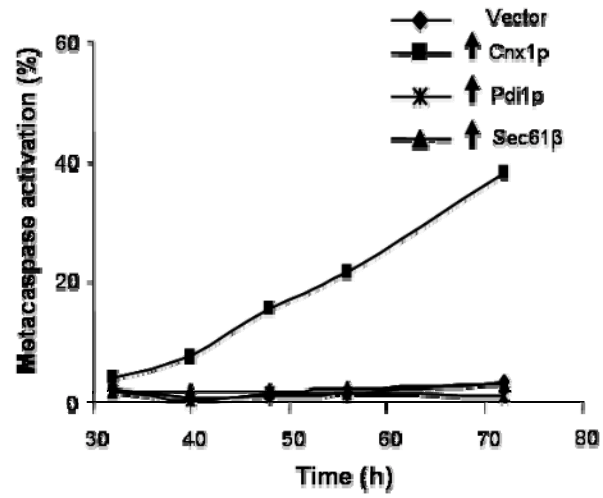
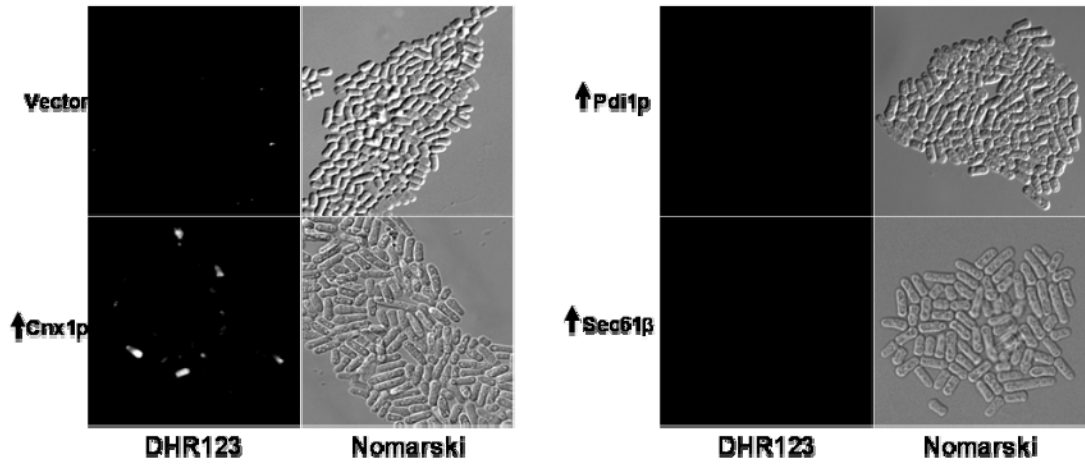
D**E**

Figure 9 (suite): The overexpression of calnexin induces typical apoptotic phenotypes

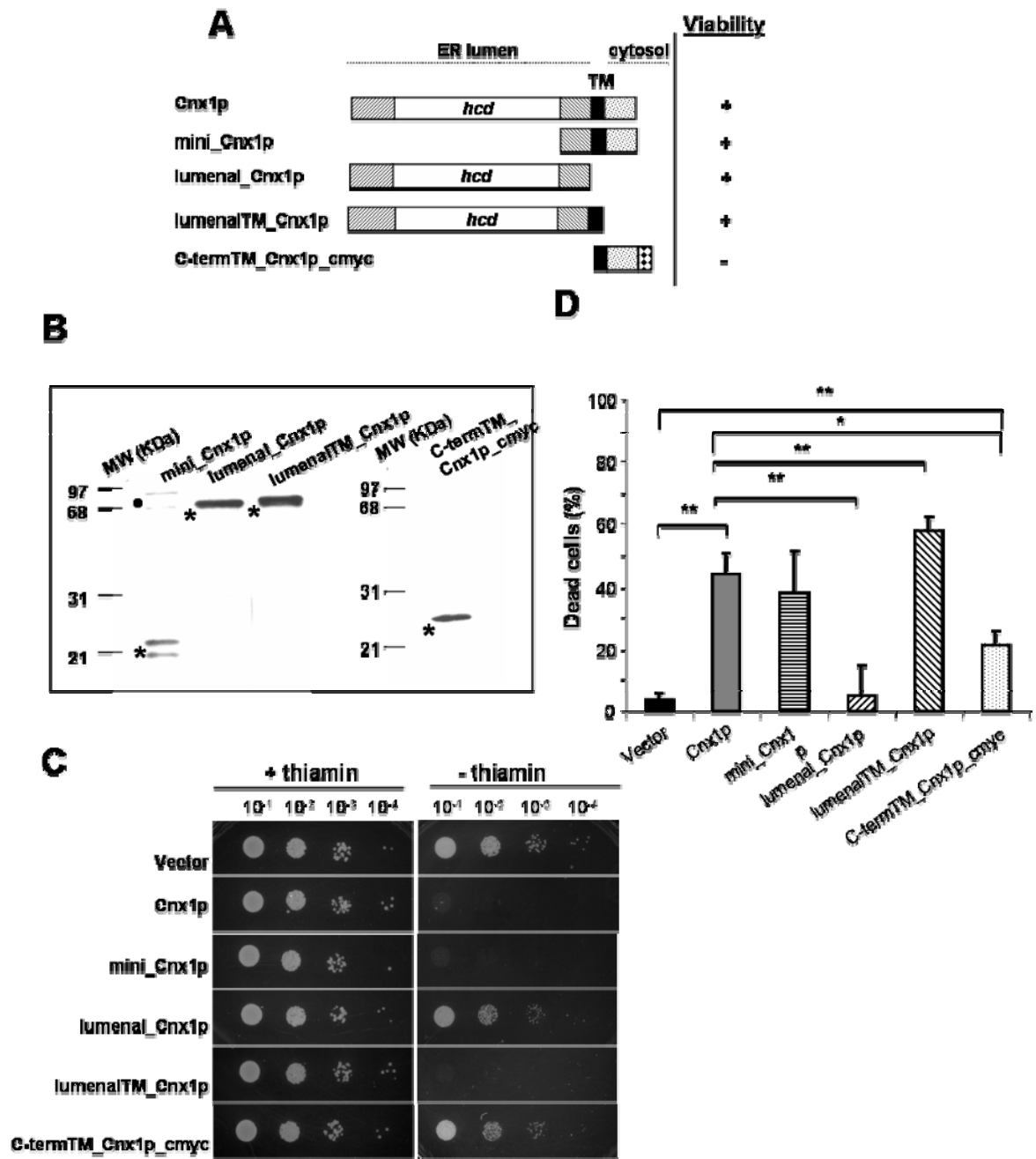


Figure 10: The transmembrane domain (TM) is required to induce cell death by overexpression of calnexin.

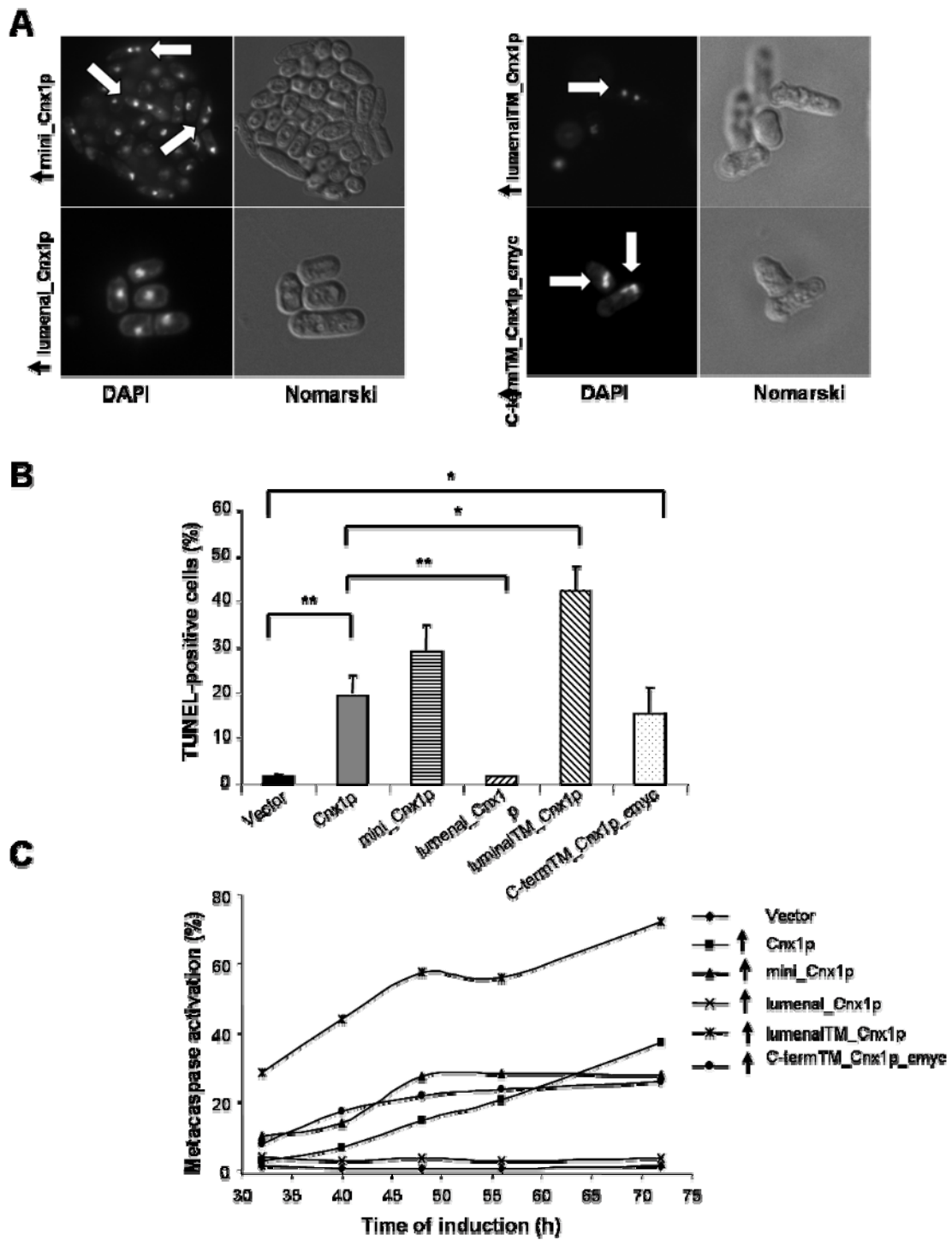


Figure 11: The TM of calnexin is required for induction of apoptotic cell death due to overexpression.

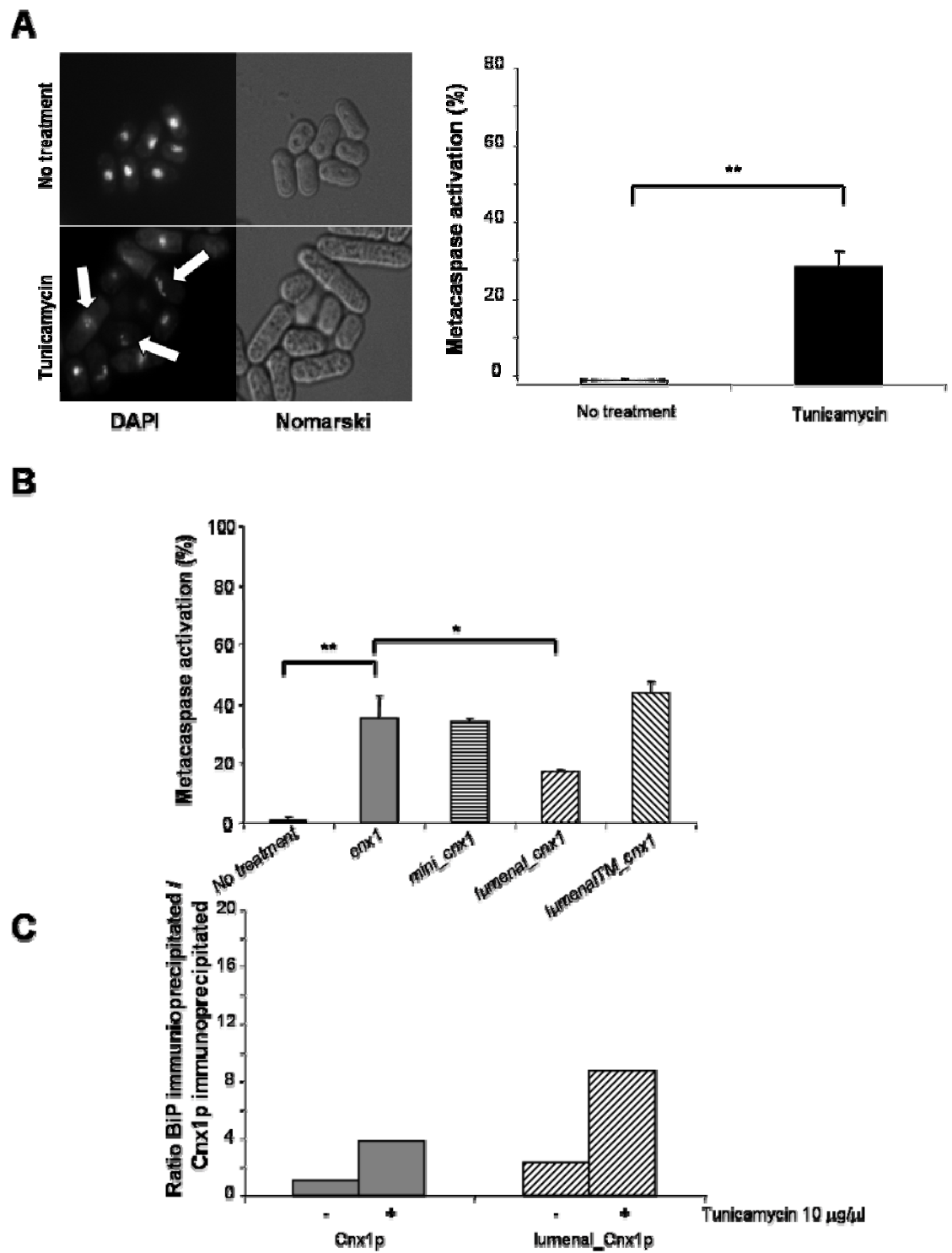


Figure 12: Involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis in *S. pombe*.

D

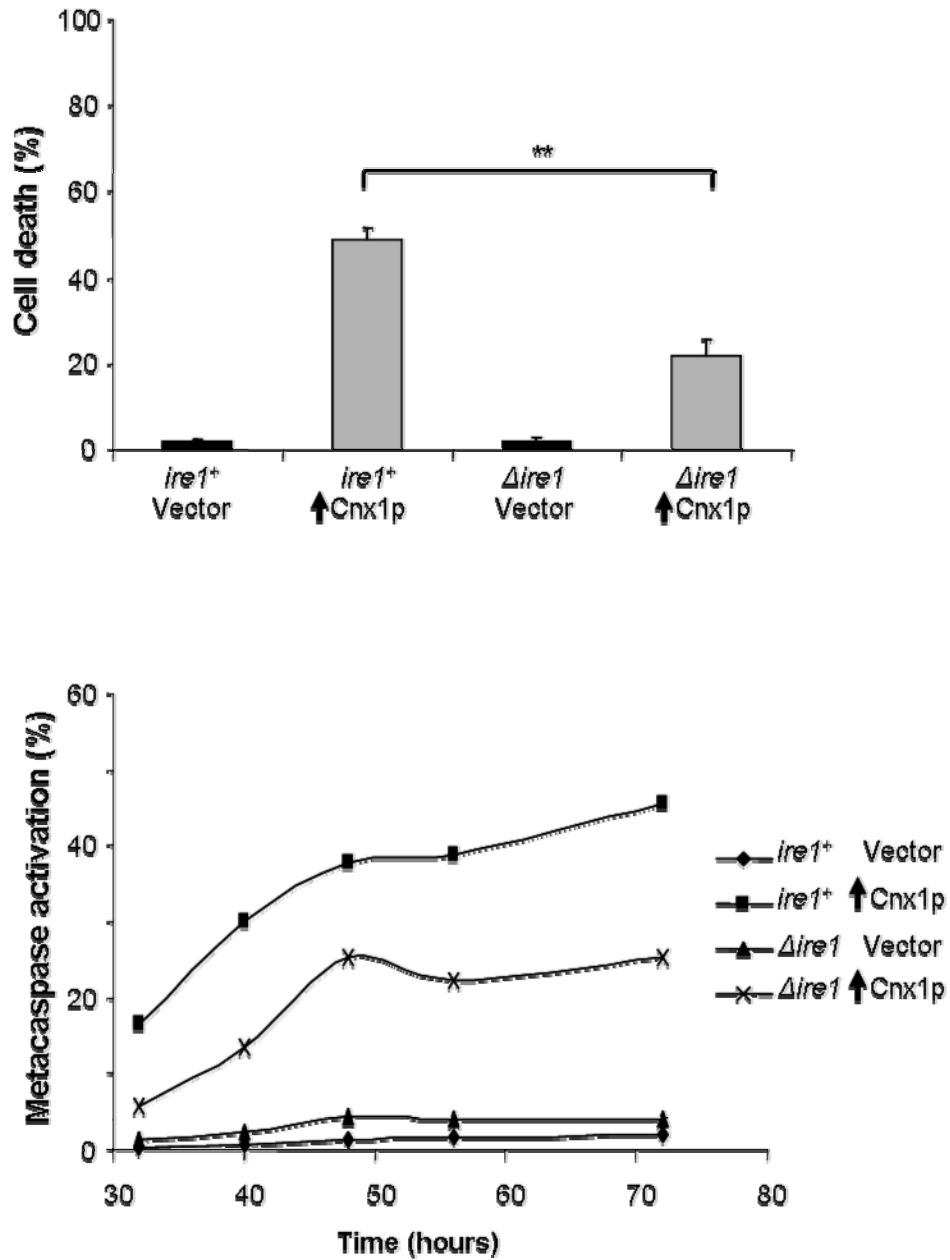


Figure 12 (suite): Involvement of calnexin in ER-mediated apoptosis in *S. pombe*.

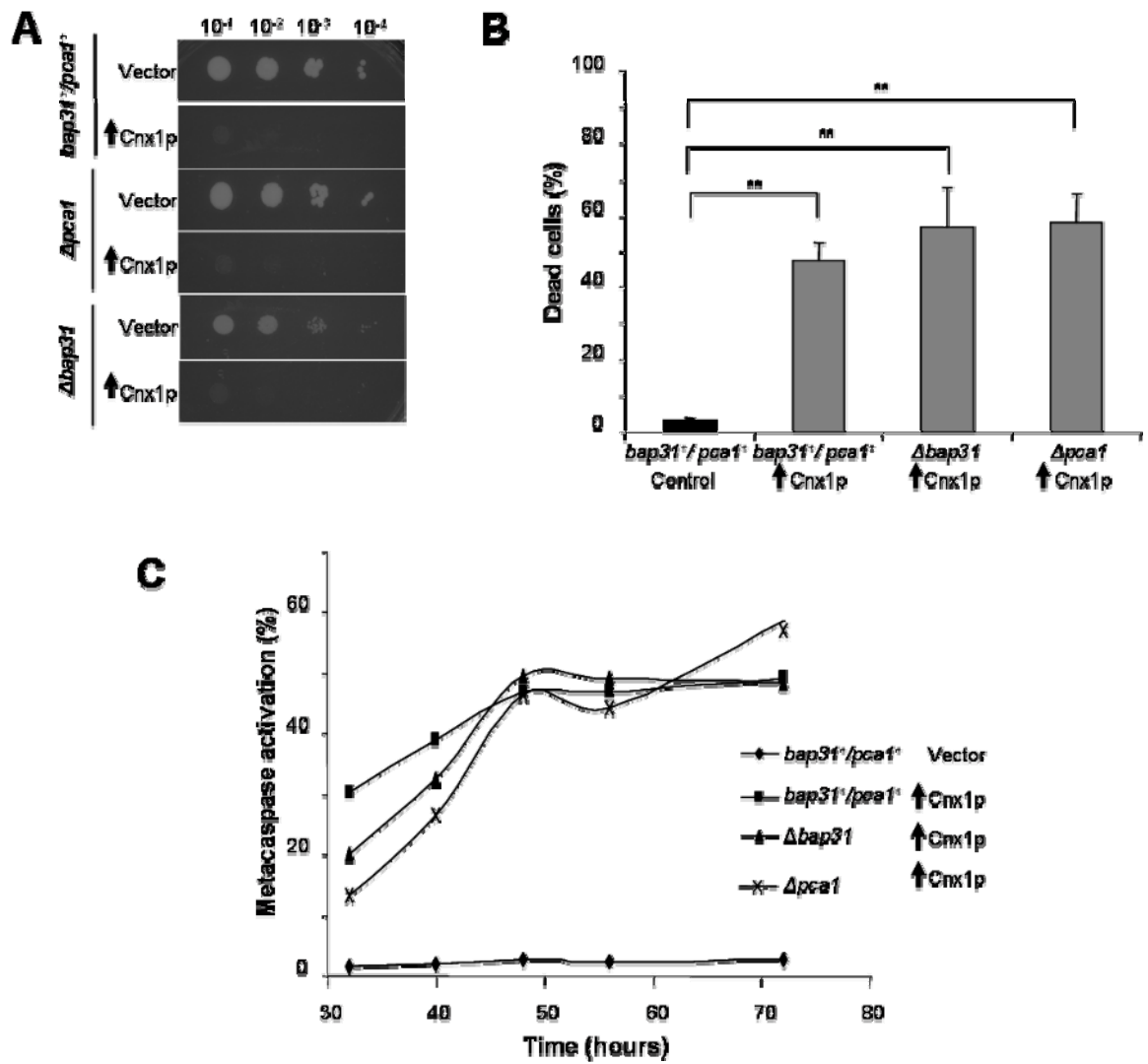


Figure 13: The *S. pombe* metacaspase Pca1p and the homologue of Bap31 are not required for apoptosis induced by calnexin overexpression.

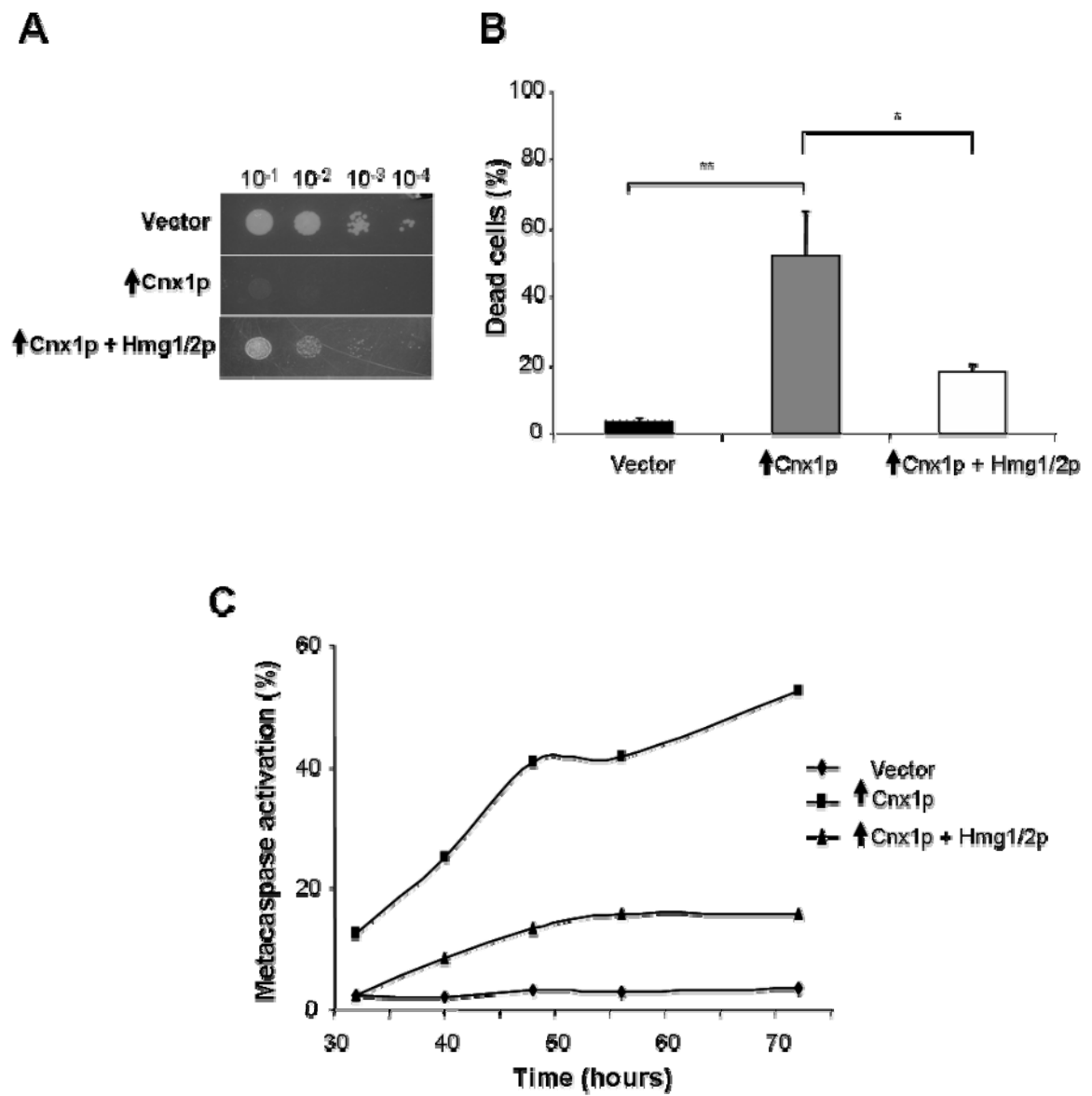


Figure 14: The *S. pombe* homologue of the human antiapoptotic HMGB1 inhibits apoptotic death induced due to calnexin overexpression.

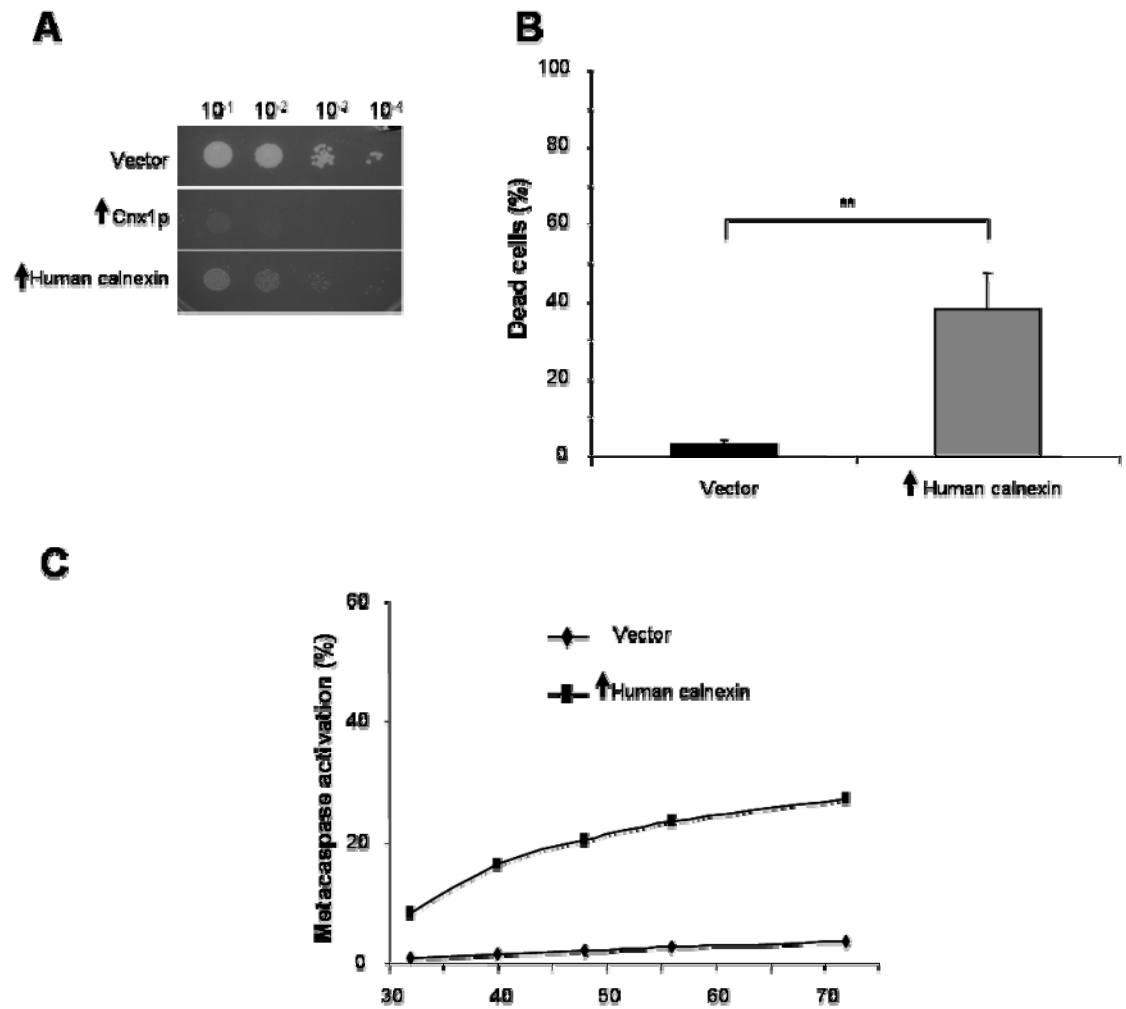
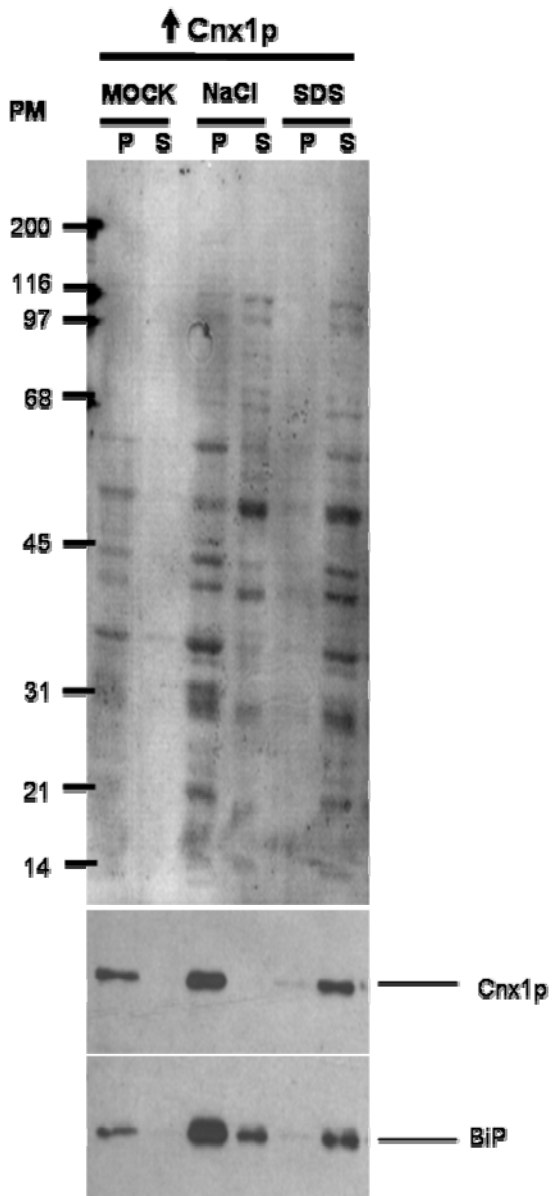


Figure 15: Overexpression of human calnexin induces apoptotic death in *S. pombe*.



Supplementary Figure 1: Calnexin overexpression do not disrupts ER membranes.

**CHAPITRE 3: Calnexin Is Involved in Apoptosis
Induced by Inositol Starvation in Fission Yeast**

NOTE

Contribution des auteurs:

Renée Guérin: Construction de souches, expériences de déficience en inositol, courbes de croissance, marquage à la Phloxine B, marquage au FITC-VAD-FMK pour les métacaspases, tests en gouttes, microscopie à fluorescence pour marquage au DAPI et au Calcofluor, immunobuvardages, immunoprécipitations, analyse des résultats de spectrométrie de masse, planification du travail, écriture de l'article et corrections.

Pascale B. Beauregard: Colonne de gel filtration et immunobuvardages correspondants

Luis A. Rokeach: Planification et supervision générale, corrections de l'article

Cet article a été soumis au journal scientifique PLoS ONE en mars 2009

Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Starvation in Inositol in Fission Yeast

Renée Guérin, Pascale B. Beauguard and Luis A. Rokeach^{1*}

1. Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville,
Montréal, Québec H3C 3J7, Canada, Tel.: 1 (514) 343-6324; Fax: 1(514) 343-2210

Running Head: Calnexin in inositol apoptosis

Abbreviations: aa, amino acid; BiP, immunoglobulin binding protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ER, endoplasmic reticulum; ERAD: ER-associated degradation; FITC-VAD-FMK, valyl-alanyl-aspartyl-[*O*-methyl]-fluoromethylketone; hcd, highly conserved central domain; TM, trans-membrane domain; UPR, Unfolded Protein Response

3.1 ABSTRACT

Inositol is a precursor of numerous phospholipids and signalling molecules essential for the cell. *Schizosaccharomyces pombe* is naturally auxotroph for inositol as its genome does not have a homologue of the *INO1* gene encoding inositol-1-phosphate synthase, the enzyme responsible for inositol biosynthesis. In this work, we demonstrate that inositol starvation in *S. pombe* causes cell death with apoptotic features. This apoptotic death is dependant on the metacaspase Pca1p and affected by the UPR transducer Ire1p. Previously, we demonstrated that calnexin is involved in apoptosis induced by ER stress. Here, we show that cells expressing a luminal version of calnexin exhibit a 2-fold increase in the levels of apoptosis provoked by inositol starvation. This increase is reversed by co-expression of a calnexin mutant spanning the transmembrane domain and C-terminal cytosolic tail. Coherently, calnexin is naturally cleaved at the end of its luminal domain, under normal growth conditions when cells approach stationary phase. This processing produces a calnexin fragment spanning most of luminal domain and another one comprising its transmembrane domain and the cytosolic tail. Collectively, our observations indicate that calnexin takes part in at least two apoptotic pathways in *S. pombe*, and suggest that its cleavage has regulatory roles in different apoptotic processes involving calnexin.

3.2 INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) is a central organelle playing crucial roles in several cellular processes. The ER is at the center of the synthesis and the folding of secreted, membrane-bound and some organelle-targeted proteins [1,2]. To assist in the protein folding process, the ER contains molecular chaperones, several co-factors such as ATP and Ca^{2+} , and an optimal oxidizing environment to facilitate disulphide-bond formation [1-3]. In addition to its protein folding roles in the secretory pathway, the ER is crucial for other fundamental cellular processes including lipid biosynthesis, membrane biogenesis, and Ca^{2+} storage [4].

Perturbations in the ER homeostasis by stresses such as lipid and glycolipid imbalances, alterations in the levels of Ca^{2+} , or modification in redox state, negatively affect the protein folding capacity of this organelle [5-7]. These adverse conditions, referred to as ER stress, result in the accumulation and aggregation of unfolded or incompletely folded proteins. The functions of the ER are tightly regulated. To counteract ER stress and restore its full protein-folding capacity, the ER responds by inducing a stress-response pathway called UPR, for Unfolded Protein Response [8,9]. The UPR mechanism is well conserved from yeast to mammals. The UPR stops general protein synthesis and stimulates the transcription of genes coding for ER-folding factors such as molecular chaperones and foldases [5-7,10,11]. Concomitantly, the cell improves the ERAD (ER-Associated Degradation) pathway in order to degrade the unfolded proteins present in the

ER [12-14]. These actions allow the ER to stabilize its environment and ensure cell survival. A major regulator of the UPR is the ER transmembrane protein Ire1p (Inositol requiring kinase I) which is conserved from fungi to mammals [8,9]. Ire1p is an endoribonuclease that is activated by homodimerization and autophosphorylation, and whose downstream effect is to stimulate the transcription of genes encoding ER chaperones and other factors involved in all stages of the secretory pathway. So far, Ire1p is the only factor identified in yeast to transduce the UPR, but mammalian cells contain additional transducers called PERK and ATF6 [9,15]. If this initial suite of actions is not able to restore ER homeostasis, the UPR switches its downstream effects from pro-survival to pro-death. Prolonged ER stress induces via IRE1, PERK and ATF6 an apoptotic pathway involving the Bcl-2 family of proteins, which act at the level of the mitochondria and the ER [6,7,16]. Moreover, apoptosis induced by ER stress could also originate from the interaction between IRE1 and TRAF2 that activates c-jun amino-terminal kinases (JNKs) [Urano *et al.*, 200].

Apoptosis is a central molecular process first identified in multicellular organisms for its crucial roles in development and in regulation of many diseases. Apoptosis is a tightly regulated form of programmed cell death that is characterized by specific biochemical and morphological features such as cell rounding and shrinkage, chromatin breakage, nuclear fragmentation and activation of caspases [17,18]. Mounting evidence accumulated in the last ten years established that unicellular organisms such as yeasts

undergo apoptotic cell death [19-21]. Apoptosis in yeast is induced by numerous conditions including DNA damage, aging, replication defects, deficiency in triacylglycerols, ER stress, and mating [19,22]. The yeast genomes encode several homologues of proteins characterized for their involvement in apoptosis including AIF, EndoG, HtrA2/Omi and IAP [23-27]. As is for mammalian cells, the involvement of these factors and their interaction in different apoptotic pathways are under current investigation.

Inositol is a precursor for numerous molecules including inositol-containing phospholipids, inositol esters and phosphorylated versions of inositol playing central roles in membrane integrity, cell signalling and vesicular traffic [28-30]. The pathway involving inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) has been extensively characterized. IP₃ derives from the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) by phospholipase C (PLC), thereby producing IP₃ and DAG (diacylglycerol). IP₃ acts a second messenger via its binding to the IP₃R receptor on the ER membrane [31]. The binding of IP₃ to its receptor provokes the release of the ER-stored calcium into the cytoplasm, which in turn elicits a range of cellular responses [32]. Calcium release from vacuoles following IP₃-signalling was also observed in *Saccharomyces cerevisiae* [33]. Inositol can be synthesized by intracellular processes involving conversion of glucose-6-phosphate (G6P) into inositol monophosphate (IP₁) through a set of complex reactions of oxidation/reduction which are mediated by a unique enzyme, the inositol-1-phosphate synthase (*INO1*) [34,35]. The *INO1* gene was identified in various species of yeasts, protozoa, plants and mammals [36-

38]. Deletion of *INO1* and mutation in other genes such as *IRE1* cause inositol auxotrophy in *S. cerevisiae* [39,40]. In this yeast, expression of *INO1* is under the control of *IRE1* via *HAC1*, two key players of the UPR pathway [41,42].

Schizosaccharomyces pombe is considered a good model to study the involvement of inositol in cell pathways because this yeast is naturally auxotroph for inositol due to the absence of a gene coding for an inositol-1-phosphate synthase [43,44]. Studies in *S. pombe* have shown that absence of inositol in the culture medium is lethal for this yeast, and that partial depletion provokes sexual sterility with no effects on growth [45-50]. Although *S. pombe* cells die in the absence of inositol, they are able to survive longer than *S. cerevisiae* cells auxotroph for inositol as result of genetic manipulation ($\Delta ino1$ cells) [48].

Calnexin is an ER transmembrane chaperone playing key roles in translocation, in protein folding, and in the quality control of newly synthesized polypeptides [1,2,51]. Structurally, calnexin is a type I transmembrane protein of the ER containing a large luminal domain, a transmembrane domain (TM), and a short cytosolic tail. The luminal domain folds into a globular structure formed by the C- and N-terminal extremities, and a hairpin structure formed by the highly conserved central domain (hcd), which is the most conserved calnexin domain across species. Calnexin interacts with client proteins via glycan-lectin or protein-protein interactions [51-60].

The knockout of calnexin in mice causes early postnatal death and severe motor disorders and is lethal in *S. pombe*, thus pointing to the critical cellular roles of this protein [61-63]. We showed that certain calnexin chaperone-deficient mutants are viable. Interestingly, this demonstrates that the essentiality of calnexin is not its chaperone activity but another yet to be defined cellular role [57,64,65].

Several studies published in the recent years indicate that calnexin is involved in apoptotic processes induced by ER stresses. First indications came from a report showing that the cytosolic tail of *S. pombe* calnexin is required for cell death mediated by the heterologous expression of mammalian Bak, suggesting that calnexin can form a complex with lethal partners in apoptotic situations [66]. In mammalian cells, it was shown that calnexin-deficient cells are more resistant to apoptosis [67,68]. It was suggested that calnexin could act as a scaffold for the cleavage of the ER transmembrane apoptotic protein Bap31 by caspase 8 in ER-stress conditions [69]. In addition, calnexin in mammalian cells was shown to be sensitive to caspase cleavage under stress conditions [70]. It was proposed that this cleavage could have a role in the transduction of an apoptotic signal. More recently, we showed that overexpression of calnexin in *S. pombe* causes apoptosis and that this induction requires the anchoring of calnexin to the ER membrane [71]. We also demonstrated that apoptosis induced by tunicamycin is less efficient in cells containing only a luminal version of calnexin, thus pointing to the importance of both the membrane anchoring of calnexin and of its cytosolic tail.

Here, we demonstrate that inositol starvation induces cell death in *S. pombe* via an apoptotic pathway dependent on the metacaspase Pca1p and that is modulated by the UPR transducer Ire1p. We show that calnexin is cleaved under normal conditions when cells approach stationary phase. While a luminal version of calnexin exacerbates the apoptosis provoked by inositol starvation, co-expression of a mutant spanning the TM and C-terminal tail significantly reduces the levels of apoptosis. Our work suggests that the TM and C-terminal tail of calnexin is involved in apoptotic signalling when inositol is depleted.

3.3 RESULTS

3.3.1 Inositol starvation induces apoptotic cell death in *S. pombe*

Inositol starvation induces cell death in fission yeast [43,44]. This effect is due to the inability of *S. pombe* to synthesize inositol because of the lack of a homologue the *INO1* gene in its genome. Inositol starvation in *S. cerevisiae* also provokes cell death when *INO1* is defective, indicating a crucial role of inositol in the physiology of the cell. To characterize the death resulting from inositol depletion in *S. pombe*, we first measured the capacity of cells to grow on media containing inositol after 48 hours of culture in media without inositol. As expected, cells cultured in media deprived of inositol show a dramatic reduction in the ability to form colonies compared to cells cultured in media containing inositol (Figure 1A). The death phenotype was confirmed by staining with the fluorescent vital dye Phloxin B, followed by quantification by fluorescence-activated cell sorting (FACS). As shown in Figure 1B, about 25% of cells are stained after 12 hours of inositol starvation and more than 50% after 24 hours, as compared to near 0% for the unstarved cells. Next, to determine the type of cell death we measured apoptotic markers in cells starved for inositol. As we have previously demonstrated, *S. pombe* cells undergoing apoptotic death show specific phenotypes including metacaspase activation and nuclear fragmentation [71]. Using the fluorescent probe FITC-VAD-fmk in FACS analyses, cells submitted to inositol starvation for 12 and 24 hours show respectively 15 and 50% of fluorescence, compared to near 0% for cells that were not starved (Figure 1C). Fluorescence microscopy with DAPI revealed nuclear fragmentation for cells cultured for

48 h without inositol (Figure 1D). By contrast, cells cultured in inositol-containing medium exhibited round and intact nuclei. Taken together, these results confirm that depletion of inositol is lethal for *S. pombe* and indicate that this death is mediated via an apoptotic mechanism.

3.3.2 The metacaspase Pca1p is required to mediate apoptosis induced by inositol starvation

The *S. pombe* genome encodes several characterized homologues of factors associated with apoptotic pathways in mammalian cells [23-27]. In *S. pombe*, Pca1p is the only caspase-like protein identified so far, and the most studied factor for dependence in apoptosis [72,73]. As this is the first time that death by inositol starvation is described as apoptotic in fission yeast, we investigated whether this process requires the metacaspase Pca1p. To this end, $\Delta pcal$ cells were cultured in inositol-less medium for 48 h and spotted on inositol-containing plates. A dramatic diminution in the death level induced by inositol starvation was observed in a $\Delta pcal$ strain compared to the wild-type control (Figure 2A). The reduction in the levels of cell death in the absence of $pca1^+$ was confirmed by Phloxin B staining. Following 24 h of inositol starvation, the $\Delta pcal$ strain exhibited practically no Phloxin B staining compared to more than 50% for the wild-type control (Figure 2B). Metacaspase activation was measured with the fluorescent probe FITC-VAD-FMK. Congruently, a significant reduction in the level of metacaspase activation was observed in a $\Delta pcal$ background compared to the wild-type control (Figure 2C). These results

demonstrate the importance of the metacaspase Pca1p in the apoptotic pathway induced by the absence of inositol.

3.3.3 The UPR transducer Ire1p affects the apoptosis induced by inositol starvation

Inositol is essential for the survival of *S. pombe* because its genome does not have an *INO1* homologue encoding for the inositol-1-phosphate synthase enzyme responsible for the biosynthesis of inositol from glucose-6-phosphate [34,35,43,44]. In *S. cerevisiae*, *INO1* is under the control of the UPR via *IRE1* and *HAC1*, and the knockout of *IRE1* leads to inositol auxotrophy [41,42]. Also, the role of UPR mediators in apoptosis induced by ER stress was extensively studied in yeast and mammals [6,7,16,71]. To investigate if *ire1*⁺ is involved in apoptosis induced by inositol starvation in *S. pombe*, $\Delta ire1$ cells were cultured in the absence of inositol for 48 h and the death levels were measured by spotting on inositol containing plates. A significant improvement in the levels of survival was observed for the $\Delta ire1$ strain in comparison to the wild-type control (Figure 3A). The induction of metacaspase was measured by FITC-VAD-FMK staining and FACS analysis. Here again, a dramatic reduction in the levels of metacaspase activation was observed for the $\Delta ire1$ strain compared to wild-type cells. The levels of metacaspase activation dropped to about 15% in the absence of Ire1p compared to near 50% in its presence (Figure 3B). These results demonstrate that Ire1p significantly influences the apoptotic cell death induced by inositol starvation in *S. pombe*, albeit not totally as a certain level of death is measured in the $\Delta ire1$ cells.

3.3.4 A luminal version of calnexin is more sensitive to apoptosis induced by inositol starvation

We have previously demonstrated that calnexin is involved in apoptosis caused by ER stress in *S. pombe* [71]. To examine if calnexin is part of the death pathway induced by the absence of inositol, we compared WT cells to a strain expressing the luminal_Cnx1p mutant which lacks the transmembrane domain (TM) and the cytosolic tail of this ER protein. As shown in Figure 4B, in inositol starvation the cells expressing the luminal_Cnx1p mutant as the only version of calnexin exhibited a dramatic increase in the death levels, as measured by the ability to form colonies (Figure 4A). Moreover, the *luminal_cnx1* cells showed a close to 2-fold increase in cell death measured by Phloxin B staining after 12 h of starvation (Figure 4B). Calcofluor-white is a fluorescent dye that stains a cell-wall polysaccharide, probably chitin, accumulating in the septa of *S. pombe* [64,74]. Interestingly, inositol-starved *luminal_cnx1* cells accumulate large, round vesicles containing material that is highly stained with Calcofluor (Figure 4D). These vesicles were also observed when *luminal_cnx1* cells were cultured in inositol-containing media but at a much lower frequency, as compared to deprivation conditions (Figure 4D). This phenotype exacerbated by inositol starvation is also observed when calnexin mutants are submitted to heat stress in inositol-containing medium, conditions in which they exhibit cell-wall defects [64]. Thus, this Calcofluor-staining phenotype suggests a link between inositol and cell-wall biosynthesis exacerbated by expression of calnexin mutants. The connection between

pathways of inositol and cell-wall biosynthesis as recently been observed in *S. cerevisiae* cells [Nunez *et al.*, 2008].

In agreement with the levels of cell death observed by Phloxin B, cells expressing only the luminal version of calnexin exhibited a close to 2-fold increase in metacaspase activation following 12 h of growth in media without inositol as compared to the *cnx1*⁺ strain (Figure 4C). These results implicate calnexin in the death cascade triggered by inositol starvation, and point to a role of its TM and cytosolic tail in this apoptotic pathway.

3.3.5 Co-expression of the cytosolic tail and TM with luminal_Cnx1p reduces the sensitivity to inositol starvation

Since luminal_Cnx1p is a calnexin mutant with full chaperone activity [57], we hypothesized that the increased effect on apoptosis induced by inositol starvation could be due to the absence of the cytosolic tail and the TM. To test this hypothesis, we co-expressed luminal_Cnx1p with the mutant C-termTM_Cnx1p_cmyc, which spans the TM and cytosolic tail of calnexin (Figure 5A). Expression of the C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant in conjunction with the luminal_Cnx1p reduced the cell death to wild-type levels, as measured by Phloxin B staining (Figure 5B). The same reduction was observed for the levels of metacaspase activation when luminal_Cnx1p was co-expressed with the C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant (Figure 5C). Interestingly, the Calcofluor-staining phenotype observed for the *luminal_cnx1* cells submitted to inositol starvation was not

completely reverted in the presence of the C-termTM_Cnx1p_cmyc mutant (Figure 5D). The levels of large round structures stained with Calcofluor in media with or without inositol is the same whether the mutant C-termTM_Cnx1p_cmyc is co-expressed or not. These observations indicate that the anchoring of the C-terminal tail of calnexin to the ER membrane is important in the response to the apoptotic signal induced by inositol starvation. However, the cell-wall defects observed by Calcofluor staining appear to be more attributable to the requirement for an intact, i.e. wild-type calnexin. The importance of calnexin in cell-wall integrity was already shown in *S. cerevisiae* [75], and in *S. pombe* as we observed previously the same defect in calnexin mutants at 37°C [64,65,76].

3.3.6 Calnexin is cleaved within the luminal domain under normal culture conditions

The TM and the cytosolic tail of calnexin are important domains in at least two situations leading to apoptosis, ER stress and inositol starvation. Interestingly, in time-course experiments to measure the levels of calnexin expression by Western blotting with WT cells, we observed that calnexin undergoes cleavage in a time-dependent manner under normal culture conditions (Figure 6A). The size downshift of calnexin begins at 12 h of culture corresponding to $OD_{595} \sim 1$, thus in early exponential phase (Figure 6A). Complete cleavage of calnexin is observed after 48 h of culture when cells reach an OD_{595} of 7. It is important to note that this downshift in size is observed in medium containing inositol, and that the same pattern is observed whether the calnexin gene is in the genome or calnexin is expressed by a plasmid in a $\Delta cnx1$ background. The same downshift in the

size of calnexin was observed in media without inositol (not shown). To determine whether the cleavage occurs closer to the N- or C-terminal end, we used a version of calnexin *cmyc*-tagged at its C-terminus. At time-point 0 corresponding to OD₅₉₅ 0.3, we detected the full-length calnexin by Western blotting against *cmyc*. However, after 48 h of culture, corresponding to OD₅₉₅ 7, we detected by anti-*cmyc* immunoblotting a small calnexin fragment migrating at *Mr* of 31 kDa, which apparently is not cleaved further. This indicates that the cleavage takes place at a site approximately within C-terminal third of the protein (Figure 6B). The band observed near 31 kDa migrated more slowly than the C-termTM_Cnx1p_*cmyc* construct [71], indicating that calnexin is probably cleaved within its luminal domain. An approximation of the cleavage site was obtained by analysis of a collection of different calnexin mutants created in the laboratory (not shown), and by MS/MS analysis of the *cmyc*-tagged small fragment of calnexin isolated by immunoprecipitation from cell extracts after 48 h of growth. This confirmed that calnexin is cleaved in its luminal domain near the TM domain within a sequence of residues that is framed in red in Figure 6C. To further investigate the properties of the calnexin fragments produced by cleavage, protein extracts from cells cultured for 24 h were fractionated by gel-filtration. Full-length calnexin and the cleaved-version of calnexin did not elute in the same fractions, indicating that they do not associate in the same protein complexes (Figure 6D). Supporting this point, the BiP chaperone eluted in the same fractions with cleaved calnexin, but did not co-elute with full-length calnexin. Collectively, these results demonstrate that under normal growth conditions calnexin is cleaved at the end of its

luminal domain giving rise to two stable moieties, probably each having a different cellular role.

3.4 DISCUSSION

The evidence accumulated in the past ten years demonstrate the existence of apoptotic pathways in yeasts [19,21,77-87]. Although numerous homologues of mammalian apoptosis factors are found in yeast, the key players of specific apoptotic processes are for the most part unknown [21]. And like in mammalian [88-90], in yeasts the interactions between cell factors within the apoptotic mechanisms are not completely described. The use of yeast models should assist in charting the core interactions of apoptotic pathways conserved in higher eukaryotes.

Recent reports point to a role of calnexin in apoptosis triggered by ER stress in mammalian cells. Calnexin was reported to act as a scaffold for the cleavage by caspase 8 of the apoptotic protein Bap31 under conditions of tunicamycin stress [69]. These authors suggested that the action of calnexin is dependent on its localisation in a specific ER sub-compartment and on its expression level [91]. These studies raise the possibility that calnexin plays a role in the early steps in the transduction of an apoptotic signal initiated by ER stress. In fission yeast, our recent results demonstrate that calnexin is involved in ER-stress induced apoptosis elicited by tunicamycin [71]. We showed that the anchoring of calnexin into the ER membrane is crucial for its apoptotic action under ER stress. The levels of calnexin increase during ER stress triggered by tunicamycin. Consistently, overexpression of calnexin also induces apoptotic death; an experimental intervention probably mimicking conditions of ER stress.

Here, we demonstrate that starvation in inositol induces apoptotic cell death in *S. pombe* as observed by an important reduction in the ability to form colonies, Phloxin B staining, metacaspase activation, and nuclear fragmentation. This apoptotic death is dependent on Pca1p, the only metacaspase so far identified in *S. pombe*, and is influenced by the extensively-characterized UPR transducer Ire1p.

Inositol is a precursor for numerous molecules playing central roles in membrane integrity, cell signalling and vesicular trafficking. Many organisms have the capacity to synthesize inositol from glucose-6-phosphate by the enzyme inositol-1-phosphate synthase, encoded by the *INO1* gene in *S. cerevisiae* [34,35]. The *S. pombe* genome does not encode an Ino1p homologue, thus sensitizing this yeast to inositol deficiency because inositol is an essential precursor [43,44]. Moreover, *S. cerevisiae* strains deleted for *INO1* die when inositol is absent in the culture media [45-50]. Numerous screens performed in *S. cerevisiae* demonstrated that deficiencies in several pathways can lead to inositol auxotrophy, indicating that inositol biosynthesis is linked to diverse cellular processes [39,40,92-95]. *S. cerevisiae* cells cultured in media depleted of inositol show also an activation of the UPR pathway, which shuts off when inositol is replenished in the media [41,42,96].

The apoptotic phenotypes observed following inositol depletion could be due to an imbalance of ER calcium, as in mammals it was shown that the IP₃ receptor (IP3R) is a

regulator of ER calcium, and calcium is pro-apoptotic in certain situations [97]. IP3R favours Ca^{2+} release from the ER after binding of its IP_3 ligand. Although no homologue of IP3R was found in yeast to date, it was shown that IP_3 could trigger the calcium release from vacuoles [33]. The lack of inositol in the culture medium of fission yeast could lower the IP_3 concentration in the cytosol leading to inhibition of calcium release from ER or vacuoles. It is known that an increase in the calcium concentration in the cytosol is a condition triggering apoptosis [98]. On the other hand, some studies suggest that a high calcium concentration in the ER protects against apoptosis in particular situations [99,100]. In this sense, an inhibition of regulated calcium release by low levels of IP_3 could imbalance the Ca^{2+} concentration in the ER and/or the vacuoles eventually triggering apoptosis. Moreover, numerous studies also demonstrate that lowering the inositol concentration or inhibiting IP3R induce autophagy [101-104]. Autophagy could be a precursor of apoptosis when the condition inducing autophagy is maintained [105]. Thus, apoptosis induced by the lack of inositol could be the endpoint of autophagy.

Low levels of both inositol and IP_3 , and defects in IP3R signalling have been associated with autophagy in mammals [102,106,107]. Moreover, alterations in phospholipid levels in *S. cerevisiae* correspond to the appearance of autophagy markers [108]. Inasmuch as the induction of autophagy can lead to apoptosis, a possibility is that inositol starvation triggers apoptotic cell death via an autophagic program [109,110]. Inositol is an essential precursor for a large number of phospholipids, and inositol deficiency deregulates the levels of

phospholipids in *S. pombe* [48]. Studies in fission yeast demonstrated that deregulation in the balance of lipids induces apoptotic death [111-113]. The same group showed that deregulation of lipid homeostasis could lead to cell death via several pathways dependent or not on different players such as Pca1p, Rad9p or Pkc1p. Moreover, it was shown that valproate, a short-chain fatty acid causing inositol depletion in budding yeast, induces a metacaspase-dependent apoptotic pathway with accumulation of neutral lipids in this yeast [87,114-116]. Hence, these observations raise the possibility that inositol deficiency triggers apoptotic death in fission yeast via the loss of lipid homeostasis.

It was shown that *INO1* is under the control of Ire1p in *S. cerevisiae* and that UPR in this yeast is tightly linked to inositol biosynthesis. Therefore, we expected that *ire1*⁺ could have a role in the apoptotic pathway induced by inositol starvation in *S. pombe*, although this fission yeast does not contain a homologue of *INO1* [41,42,96]. We observed that deletion of *ire1*⁺ decreases significantly but not totally the levels of apoptotic death provoked by the absence of inositol. This observation demonstrates that in fission yeast, the consequences of inositol deficiency are partially dependent on the major UPR transducer. The fact that deletion of *IRE1* leads to inositol auxotrophy in *S. cerevisiae* and that deletion of *ire1*⁺ in *S. pombe* reduces the apoptotic effect provoked by inositol starvation suggest that Ire1p could be involved not only in inositol biosynthesis but also in inositol signalling. It is possible that Ire1p acts as an inositol sensor in both yeasts,

signalling for inositol biosynthesis in *S. cerevisiae* and for cell death in *S. pombe* when cells are depleted of inositol.

Absence of the TM and cytosolic tail of calnexin increases the apoptotic phenotype due the lack of inositol in the media. By co-expression of luminal_Cnx1p with C-termTM_Cnx1p_cmyc, we observed that the cytosolic tail anchored to the ER membrane reduced to WT levels the apoptotic effect provoked by inositol deprivation. This observation demonstrates the involvement of calnexin in this apoptotic pathway and points to the importance of the cytosolic tail and TM of this ER protein. Remarkably, these results are in contrast with our previous observations regarding the involvement of calnexin in ER-stress mediated apoptotic cell death [71]. In our previous study, we demonstrated that apoptosis triggered by tunicamycin treatment is less efficient in cells expressing only luminal_Cnx1p, a calnexin mutant not anchored to the ER membrane [71]. In the present work, apoptosis induced by inositol starvation is more efficient when only the luminal version of calnexin is present in the cell, suggesting that calnexin is involved in at least two different apoptotic pathways: one induced by ER stress and the other by inositol starvation. Although inositol starvation and tunicamycin treatment are two inducers of apoptosis, their mechanisms of action leading to cell death are different. Tunicamycin treatment blocks N-glycosylation, which causes folding defects resulting in severe ER stress [117,118]. In the case of inositol starvation, while the actual mechanism leading to apoptosis remains undefined, it is known that lack of inositol affects lipid homeostasis and signalling [45-

50,102,107]. These significant differences may underlie the two diverging effects observed with the mutant luminal_Cnx1p in these two apoptotic situations. Another distinction between these two apoptotic situations resides in the dependence or independence on the Pca1p metacaspase. Here we demonstrated apoptosis induced by inositol starvation is dependant on the metacaspase Pca1p, whereas in the case of ER-stress apoptotic cell death is independent of Pca1p [71]. From our studies, it is clear that calnexin is implicated in apoptotic processes, and that the TM and cytosolic tail of calnexin play important roles in these death pathways. These observations suggest that the TM and cytosolic tail of calnexin form crucial interactions playing pro- or anti-death roles depending on the apoptosis pathway.

In the course of our experiments, we came to the unexpected observation that calnexin undergoes cleavage within its luminal domain under normal growth conditions. At late exponential phase ($OD_{595} \approx 4$), calnexin is cleaved into two moieties: a large one spanning most of the luminal domain and a small one containing a few residues of the C-terminal part of the luminal domain attached to the TM and the cytosolic tail. This cleavage is consistently 100% efficient under normal culture conditions at the same growth stage, suggesting that this is a physiological processing of calnexin that is important for its cellular roles. In gel-filtration, full-length and processed calnexin elute in different fractions; hinting that they associate with different factors and that each calnexin fragment is involved in different cellular roles. We demonstrated that experimental removal of the

cytosolic tail and TM increases by 2-fold the apoptotic death triggered by inositol starvation. Inasmuch as inositol starvation does not prevent the cleavage of calnexin, these observations indicate that the small C-terminal moiety resulting from calnexin cleavage has a role in the mediation of the apoptotic signal under inositol deprivation. It appears then possible that the small C-terminal moiety of calnexin interacts with other proteins in a complex that negatively regulates apoptosis induced by inositol starvation. Because the absence of cytosolic tail and TM reduced by 50% the apoptotic death induced by tunicamycin [71], in contrast to what we observed for inositol starvation, we propose that the cytosolic tail of calnexin and its TM have different regulatory roles in different apoptotic pathways, depending of the origin of the apoptotic signal. The apoptotic signal induced by tunicamycin treatment probably originates from the ER lumen, as this drug provokes folding defects within this organelle space. Whereas in the case of inositol starvation the apoptotic signal could originate from the cytosol or the ER membrane, as inositol is an essential precursor of molecules involved in signalisation taking place in the cytosol and in the synthesis of membrane phospholipids. The difference observed for the dependency to the metacaspase in apoptosis induced by an N-glycosylation defect or an inositol depletion in *S. cerevisiae* and *S. pombe* is another indication of the differences in the two apoptotic pathways induced by these two particular conditions [71,87,117]. Taken together, these observations clearly indicate that calnexin is a partner in at least two apoptotic cell-death pathways, triggered by two different inducers. Further studies are needed to understand more precisely the mechanistic details of the involvement of calnexin

in these apoptotic processes and to unveil whether calnexin takes part in other apoptotic pathways.

Calnexin was first identified as an ER phosphoprotein that binds calcium [119]. Soon after it was defined as glycoprotein-specific molecular chaperone binding its client proteins through lectin-glycan interactions [120-122], and later calnexin was shown to interact with non-glycosylated folding polypeptides via peptide-peptide contacts [57,123-125]. Also from early reports, the role of calnexin in the quality control of protein folding was demonstrated [126]. Phosphorylation of the cytosolic tail of calnexin was shown to regulate its association with ribosomes and in this manner to affect translocation into the ER [127,128]. More recently, calnexin was implicated in apoptosis induced by ER stress [69,71,91], and here we demonstrated its involvement in another apoptotic pathway triggered by inositol deprivation. Clearly, calnexin is a multifunctional protein involved in several cellular processes. The use of the *S. pombe* model will continue to be instrumental in the elucidation of novel and unsuspected cellular roles of calnexin.

3.5 MATERIALS AND METHODS

3.5.1 Yeast strains, media, and vectors

Experiments were carried out using the *S. pombe* strains described in Table I. All strains were cultured at 30°C in Edinburgh minimal medium (here denoted as MM) supplemented with required supplements (Moreno et al., 1991). The *nmt* promoter in the vectors pREP41 and pREP42 is medium strength and expressed calnexin at levels comparable to the endogenous genomic copy of the gene [124]. pREP41 differs from pREP42 in that it contains the *S. pombe LEU2* marker instead of *ura4*⁺. The wild-type calnexin and the viable mutant *lumenal_cnx1* on pREP41 vector were used to study the effects of inositol starvation (strains SP3234-8 and SP3235-9). The unviable mutant *C-termTM_cnx1_cmyc* on pREP42 was also used to study the effects of inositol starvation, but in co-expression with the mutant *lumenal_cnx1* on pREP41 (strain SP8244).

3.5.2 Inositol Starvation

Cells were cultured for 43h until saturation in MM containing the required supplements. To obtain exponentially growing cells, the cells were diluted and cultured overnight until they reached $OD_{595} = 1.0$. A volume of 10 ml of culture was centrifuged and the cells washed once with MM without inositol and resuspended in MM without inositol. The tests were performed after 18h and 48h of starvation.

3.5.3 Immunoblotting

Protein extracts were prepared as previously described [64]. Protein extracts were separated on 10 or 15% (w/v) SDS-PAGE gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane according to the manufacturer's instructions. Immunoblotting to detect Cnx1p was carried out with an anti-Cnx1p rabbit polyclonal antibody (LAR223), at a dilution of 1:30,000 or with the anti-cmyc mouse mAb 9E10, at a 1:500 dilution.

3.5.4 Gel-filtration chromatography

Protein extractions were performed as previously described [64]. A Sepharyl S-300 (Pharmacia Biotech Inc.) column (0.8 by 60 cm) was equilibrated in gel-filtration buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol) at room temperature and calibrated with molecular weight standards (thyroglobulin, 669 kDa; α -amylase, 200 kDa; bovine serum albumin, 68 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa). The void volume was calculated as 12.5-13 ml. The sample was loaded on the column and eluted with the gel-filtration buffer. After 12.5-13 ml, 30 fractions of 1 ml were collected and an equal volume of each fraction was loaded on an 8.5% SDS-PAGE gel. Cnx1p and BiP were detected in each fraction by immunoblotting with the corresponding antibodies.

3.5.5 Mass spectrometry analysis

Immunoprecipitation was performed as previously described using cells expressing a C-terminal *cmyc*-tagged version of Cnx1p cultured for 48 hours [124]. Anti-*cmyc* mouse mAb 9E10 (1:100 dilution) was used to perform immunoprecipitations. Immunoprecipitates were loaded and fractionated on a 15% SDS-PAGE gel, and the gel was stained with Coomassie blue. The band corresponding to the *cmyc*-tagged Cnx1p fragment was cut-out of the gel and analyzed by MS/MS by the Proteomics Core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), at Université de Montréal. The fragment was subjected to tryptic digestion and analyzed by nanoliquid chromatography/tandem mass spectrometry.

3.5.6 Viability Assays

The survival of cells was measured by two different techniques: 1) the ability to form colonies by serial 10-fold dilutions spotted on appropriate plates; and 2) by cytometry with the vital fluorescent dye Phloxin B. For serial dilutions spotting experiments, an equivalent of $OD_{595} = 1.0$ was taken from cells starved in inositol for 48 h. The cells were serially diluted ($10^{-1} - 10^{-4}$), spotted on solid media and incubated for 7 days at 30°C. Viability assays with the Phloxin B fluorescent vital dye was carried out as previously described after 18 h of starvation [22].

3.5.7 Calcofluor staining

Samples containing 1.4×10^7 cells were taken after 48 hours of inositol starvation. Cells were washed once in 1X PBS pH 7.4, fixed for 10 min in a solution of 3.7% formaldehyde and washed once in 1x PBS pH 7.4. The cells were resuspended in 100 μ l 1x PBS pH 7.4 containing 20 μ g/ml Fluorescent Brightener 28 (Sigma Inc.) for 5 min. and washed one time in 1X PBS pH 7.4. Finally the cells were resuspended in 1X PBS pH 7.4 to a final concentration of $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cells/ml. Suitable quantities of cells were applied to a poly-lysine coated coverslips, washed and let dry. The slides were mounted with a mounting media (1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Microscopic analysis was performed using a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit and treated with the UIC Metamorph[®] software.

3.5.8 Detection of Apoptotic Markers

Metacaspase Activation

Culture samples were taken after 18 hours of inositol starvation. Aliquots containing 1×10^7 cells were washed once in 1 ml of 1X PBS pH 7.4 (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO₄, 18 mM KH₂PO₄) and resuspended in 150 μ l of 1X PBS pH 7.4 containing 10 μ M FITC-VAD-fmk (CasPACE, Promega, Madison, WI, USA). After incubation for 20 min at 30°C, cells were washed once in 1X PBS pH 7.4 and resuspended in 100 μ l 1X PBS pH 7.4 to be analysed by flow cytometry.

DAPI Staining

For DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining, samples containing 1.4×10^7 cells were taken after 48 hours of inositol starvation. Cells were fixed for 10 min in a solution of 3.7% formaldehyde, washed once in 1x PBS pH 7.4 containing 1% Nonidet P-40, and twice in 1x PBS pH 7.4. The cells were resuspended in 100 μ l 1x PBS pH 7.4 to a final concentration of $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cells/ml. Suitable quantities of cells were applied to a poly-lysine coated coverslips, washed and let dry. The slides were mounted with a DAPI-containing mounting media (1 μ g/mL DAPI, 1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Microscopic analysis was performed using a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit and treated with the UIC Metamorph[®] software.

3.5.9 Flow Cytometry Analyses

Cells were stained with Phloxin B or with FITC-VAD-fmk as described above. Flow cytometry analyses were performed using a FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) device, on 10,000 cells. Emission from the argon LASER was at 488 nm; emission settings were 515-545 nm (filter FL-1) for FITC-VAD-fmk or 560-600 nm (filter FL-2) for Phloxin B staining. The percentage of positive stained cells was determined as the population of fluorescent cells with a higher fluorescent intensity than a stained negative control.

Parameters of the stained negative control were adjusted with an unstained negative control. Each experiment was repeated three times.

3.5.10 Statistical Analysis

The significance of the variations of results among strains was determined by a Student's *t* test.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the Rokeach Lab for critical reading of the manuscript.

3.7 REFERENCES

1. Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101: 119-122.
2. Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35: 149-191.
3. Trombetta ES, Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-676.
4. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193-201.
5. Boyce M, Yuan J (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13: 363-373.
6. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608-8618.
7. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7: 880-885.
8. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
9. Patil C, Walter P (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13: 349-355.
10. Schroder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63.
11. Wu J, Kaufman RJ (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 13: 374-384.
12. Ahner A, Brodsky JL (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* 14: 474-478.
13. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7: 766-772.

14. Marciniak SJ, Ron D (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86: 1133-1149.
15. Schroder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.
16. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-2664.
17. Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-474.
18. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
19. Severin FF, Meer MV, Smirnova EA, Knorre DA, Skulachev VP (2008) Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1350-1353.
20. Hamann A, Brust D, Osiewacz HD (2008) Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends Microbiol* 16: 276-283.
21. Frohlich KU, Fussi H, Ruckenstuhl C (2007) Yeast apoptosis--from genes to pathways. *Semin Cancer Biol* 17: 112-121.
22. Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5: 345-357.
23. Wissing S, Ludovico P, Herker E, Buttner S, Engelhardt SM, et al. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 166: 969-974.
24. Walter D, Wissing S, Madeo F, Fahrenkrog B (2006) The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J Cell Sci* 119: 1843-1851.
25. Jin C, Reed JC (2002) Yeast and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 453-459.
26. Fahrenkrog B, Sauder U, Aebi U (2004) The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J Cell Sci* 117: 115-126.

27. Burhans WC, Weinberger M (2007) Yeast endonuclease G: complex matters of death, and of life. *Mol Cell* 25: 323-325.
28. De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271: 1533-1539.
29. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, et al. (1986) The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* 234: 1519-1526.
30. Steiner S, Lester RL (1972) Studies on the diversity of inositol-containing yeast phospholipids: incorporation of 2-deoxyglucose into lipid. *J Bacteriol* 109: 81-88.
31. Berridge MJ (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56: 159-193.
32. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529.
33. Belde PJ, Vossen JH, Borst-Pauwels GW, Theuvenet AP (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 323: 113-118.
34. Donahue TF, Henry SA (1981) myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J Biol Chem* 256: 7077-7085.
35. Eisenberg F, Bolden AH, Loewus FA (1964) Inositol formation by cyclization of glucose chain in rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 14: 419-424.
36. Klig LS, Antonsson B, Schmid E, Friedli L (1991) Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* genes share common regulation. *Yeast* 7: 325-336.
37. Klig LS, Henry SA (1984) Isolation of the yeast *INO1* gene: located on an autonomously replicating plasmid, the gene is fully regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3816-3820.

38. Majumder AL, Johnson MD, Henry SA (1997) 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta* 1348: 245-256.
39. Dean-Johnson M, Henry SA (1989) Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene, the INO1 locus. *J Biol Chem* 264: 1274-1283.
40. Greenberg ML, Lopes JM (1996) Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60: 1-20.
41. Chang HJ, Jones EW, Henry SA (2002) Role of the unfolded protein response pathway in regulation of INO1 and in the sec14 bypass mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162: 29-43.
42. Cox JS, Chapman RE, Walter P (1997) The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 8: 1805-1814.
43. MacNeill SA (2002) Genome sequencing: and then there were six. *Curr Biol* 12: R294-296.
44. Yarbrough HF, Jr., Clark FM (1957) Utilization of inositol, an essential metabolite for *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 73: 318-323.
45. Niederberger C, Graub R, Schweingruber AM, Fankhauser H, Rusu M, et al. (1998) Exogenous inositol and genes responsible for inositol transport are required for mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 33: 255-261.
46. Poitelea M, Rusu M (1997) [Inositol is necessary to sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 101: 87-91.
47. Voicu PM, Poitelea M, Schweingruber E, Rusu M (2002) Inositol is specifically involved in the sexual program of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* 177: 251-258.
48. Fernandez S, Homann MJ, Henry SA, Carman GM (1986) Metabolism of the phospholipid precursor inositol and its relationship to growth and viability in the natural auxotroph *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 166: 779-786.

49. Minskoff SA, Gaynor PM, Greenberg ML (1992) Mutant enrichment of *Schizosaccharomyces pombe* by inositol-less death. *J Bacteriol* 174: 4078-4085.
50. Ingavale SS, Bachhawat AK (1999) Restoration of inositol prototrophy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 145 (Pt 8): 1903-1910.
51. Williams DB (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119: 615-623.
52. Arunachalam B, Cresswell P (1995) Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J Biol Chem* 270: 2784-2790.
53. Beaulieu H, Elagoz A, Crine P, Rokeach LA (1999) Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem J* 340 (Pt 3): 813-819.
54. Fernandez F, Jannatipour M, Hellman U, Rokeach LA, Parodi AJ (1996) A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP--Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *Embo J* 15: 705-713.
55. Hebert DN, Garman SC, Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol* 15: 364-370.
56. Jannatipour M, Rokeach LA (1998) A *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a novel polypeptide with a predicted alpha-helical rod structure found in the myosin and intermediate-filament families of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1399: 67-72.
57. Marechal A, Tanguay PL, Callejo M, Guerin R, Boileau G, et al. (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* 380: 441-448.
58. Parodi AJ (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 69: 69-93.

59. Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, Williams DB (1999) Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *Embo J* 18: 6718-6729.
60. Thammavongsa V, Mancino L, Raghavan M (2005) Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein. *J Biol Chem* 280: 33497-33505.
61. Denzel A, Molinari M, Trigueros C, Martin JE, Velmurgan S, et al. (2002) Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol Cell Biol* 22: 7398-7404.
62. Jannatipour M, Rokeach LA (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* 270: 4845-4853.
63. Parlati F, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY (1995) The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J* 14: 3064-3072.
64. Elagoz A, Callejo M, Armstrong J, Rokeach LA (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4449-4460.
65. Hajjar F, Beauregard PB, Rokeach LA (2007) The 160 N-terminal residues of calnexin define a novel region supporting viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 24: 89-103.
66. Torgler CN, de Tiani M, Raven T, Aubry JP, Brown R, et al. (1997) Expression of *bak* in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue *Cnx1*. *Cell Death Differ* 4: 263-271.
67. Groenendyk J, Zuppini A, Shore G, Opas M, Bleackley RC, et al. (2006) Caspase 12 in calnexin-deficient cells. *Biochemistry* 45: 13219-13226.
68. Zuppini A, Groenendyk J, Cormack LA, Shore G, Opas M, et al. (2002) Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry* 41: 2850-2858.

69. Delom F, Emadali A, Cocolakis E, Lebrun JJ, Nantel A, et al. (2006) Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ*.
70. Takizawa T, Tatematsu C, Watanabe K, Kato K, Nakanishi Y (2004) Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli: implication for the regulation of apoptosis. *J Biochem (Tokyo)* 136: 399-405.
71. Guerin R, Arseneault G, Dumont S, Rokeach LA (2008) Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Mol Biol Cell* 19: 4404-4420.
72. Lim HW, Kim SJ, Park EH, Lim CJ (2007) Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* 53: 1016-1023.
73. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, et al. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6: 961-967.
74. Elorza MV, Rico H, Sentandreu R (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* 129: 1577-1582.
75. Shahinian S, Dijkgraaf GJ, Sdicu AM, Thomas DY, Jakob CA, et al. (1998) Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149: 843-856.
76. Turcotte C, Roux A, Beauregard PB, Guerin R, Senechal P, et al. (2007) The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 7: 196-208.

77. Buttner S, Eisenberg T, Herker E, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, et al. (2006) Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* 175: 521-525.
78. Knorre DA, Smirnova EA, Severin FF (2005) Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* 70: 264-266.
79. Balzan R, Sapienza K, Galea DR, Vassallo N, Frey H, et al. (2004) Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* 150: 109-115.
80. King DA, Hannum DM, Qi JS, Hurst JK (2004) HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 423: 170-181.
81. Silva RD, Sotoca R, Johansson B, Ludovico P, Sansonetty F, et al. (2005) Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58: 824-834.
82. Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, et al. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145: 757-767.
83. Pozniakovsky AI, Knorre DA, Markova OV, Hyman AA, Skulachev VP, et al. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168: 257-269.
84. Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C, Corte-Real M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147: 2409-2415.
85. Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, et al. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* 29: 649-659.
86. Granot D, Levine A, Dor-Hefetz E (2003) Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Res* 4: 7-13.

87. Mitsui K, Nakagawa D, Nakamura M, Okamoto T, Tsurugi K (2005) Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett* 579: 723-727.
88. Harada H, Grant S (2003) Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7: 117-138.
89. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2006) Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11: 506-525.
90. Carmody RJ, Cotter TG (2001) Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 6: 77-90.
91. Delom F, Fessart D, Chevet E (2007) Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis*.
92. Chang Q, Petrash JM (2008) Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1783: 237-245.
93. Hirsch JP, Henry SA (1986) Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (INO1) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis. *Mol Cell Biol* 6: 3320-3328.
94. Jesch SA, Zhao X, Wells MT, Henry SA (2005) Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J Biol Chem* 280: 9106-9118.
95. Nunez LR, Jesch SA, Gaspar ML, Almaguer C, Villa-Garcia M, et al. (2008) Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J Biol Chem* 283: 34204-34217.
96. Nikawa J, Yamashita S (1992) IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 6: 1441-1446.
97. Joseph SK, Hajnoczky G (2007) IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. *Apoptosis* 12: 951-968.

98. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27: 6407-6418.
99. Rong Y, Distelhorst CW (2008) Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 70: 73-91.
100. White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, et al. (2005) The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol* 7: 1021-1028.
101. Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, Maiuri MC, Lavandro S, et al. (2007) The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3: 350-353.
102. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, et al. (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 170: 1101-1111.
103. Sarkar S, Rubinsztein DC (2008) Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol Biosyst* 4: 895-901.
104. Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig AA, et al. (2007) Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ* 14: 1029-1039.
105. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* 16: 12-20.
106. Lam D, Golstein P (2008) A specific pathway inducing autophagic cell death is marked by an IP3R mutation. *Autophagy* 4: 349-350.
107. Sarkar S, Rubinsztein DC (2006) Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy* 2: 132-134.
108. Iwanyshyn WM, Han GS, Carman GM (2004) Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. *J Biol Chem* 279: 21976-21983.
109. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, et al. (2008) No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 15: 1113-1123.

110. Sinha S, Colbert CL, Becker N, Wei Y, Levine B (2008) Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* 4: 989-997.
111. Zhang Q, Chieu HK, Low CP, Zhang S, Heng CK, et al. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J Biol Chem* 278: 47145-47155.
112. Low CP, Liew LP, Pervaiz S, Yang H (2005) Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 5: 1199-1206.
113. Low CP, Shui G, Liew LP, Buttner S, Madeo F, et al. (2008) Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *J Cell Sci* 121: 2671-2684.
114. Shaltiel G, Shamir A, Shapiro J, Ding D, Dalton E, et al. (2004) Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biol Psychiatry* 56: 868-874.
115. Sun Q, Bi L, Su X, Tsurugi K, Mitsui K (2007) Valproate induces apoptosis by inducing accumulation of neutral lipids which was prevented by disruption of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 581: 3991-3995.
116. Vaden DL, Ding D, Peterson B, Greenberg ML (2001) Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis. *J Biol Chem* 276: 15466-15471.
117. Hauptmann P, Riel C, Kunz-Schughart LA, Frohlich KU, Madeo F, et al. (2006) Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol Microbiol* 59: 765-778.
118. Perez-Sala D, Mollinedo F (1995) Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 163: 523-531.
119. Wada I, Rindress D, Cameron PH, Ou WJ, Doherty JJ, 2nd, et al. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 266: 19599-19610.

120. Hammond C, Braakman I, Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 913-917.
121. Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81: 425-433.
122. Kapoor M, Srinivas H, Kandiah E, Gemma E, Ellgaard L, et al. (2003) Interactions of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone. *J Biol Chem* 278: 6194-6200.
123. Brockmeier A, Williams DB (2006) Potent lectin-independent chaperone function of calnexin under conditions prevalent within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 45: 12906-12916.
124. Jannatipour M, Callejo M, Parodi AJ, Armstrong J, Rokeach LA (1998) Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* 37: 17253-17261.
125. Leach MR, Williams DB (2004) Lectin-deficient calnexin is capable of binding class I histocompatibility molecules in vivo and preventing their degradation. *J Biol Chem* 279: 9072-9079.
126. Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-191.
127. Chevet E, Wong HN, Gerber D, Cochet C, Fazel A, et al. (1999) Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *EMBO J* 18: 3655-3666.
128. Delom F, Chevet E (2006) In vitro mapping of calnexin interaction with ribosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 39-44.

3.8 FIGURE LEGENDS

Figure 16. Inositol starvation induces apoptotic cell death. (A) Survival of cells cultured for 48 h in MM with or without inositol was assayed by serial dilution on media containing inositol. Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} – 10^{-4}) of cells at OD₅₉₅ 1 were spotted on selective MM with inositol, and incubated at 30°C for 7 days (see *Material and Methods*). (B) Percentage of dead cells measured by staining with the fluorescent vital dye Phloxin B. Cells cultured for 24 h in MM containing inositol or for 12 h and 24 h in MM without inositol, were stained with Phloxin B and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS after 12 and 24 h of growth in MM without inositol, or after 24 h of growth in MM containing inositol, as described in *Material and Methods*. (D) Nuclear fragmentation. Cells cultured for 48 h in MM with or without inositol were stained with DAPI and visualized under fluorescence microscopy; Nomarski fields are shown. White arrows indicate fragmented nuclei. The significance of differences in the results was evaluated by a Student's t test pairwise calculated between the different conditions assayed. **p < 0.01 and *p < 0.05.

Figure 17. The metacaspase Pca1p is required for apoptosis induced by inositol starvation. (A) Survival of *pca1*⁺ and Δ *pca1* cells cultured for 48 h in MM without

inositol was assayed by serial dilution on solid media containing inositol. Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions ($10^{-1} - 10^{-4}$) of cells at OD₅₉₅ 1 were spotted on selective MM plates with inositol, and incubated at 30°C for 7 days (see *Material and Methods*). **(B)** Percent of dead cells measured by staining with the fluorescent vital dye Phloxin B. *Pca1*⁺ and Δ *pca1* cells grown for 24 h in MM without inositol were stained with Phloxin B, and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. **(C)** Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS of *pca1*⁺ and Δ *pca1* cells after 24 h of culture in MM without inositol, as described in *Material and Methods*. The significance of differences in the results was evaluated by a Student's t test pairwise calculated between the different conditions assayed. **p< 0.01 and *p< 0.05.

Figure 18. The UPR transducer Ire1p affects the apoptosis induced by inositol starvation. **(A)** Survival of *ire1*⁺ and Δ *ire1* cells cultured for 48 h in MM without inositol was assayed by serial dilution on solid media containing inositol. Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions ($10^{-1} - 10^{-4}$) of cells at OD₅₉₅ 1 were spotted on selective MM plates with inositol, and incubated at 30°C for 7 days (see *Material and Methods*). **(B)** Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS of *ire1*⁺ and Δ *ire1* cells after 24 h of culture in MM without inositol, as described in *Material and Methods*. The significance of differences in

the results was evaluated by a Student's t test pairwise calculated between the different conditions assayed. **p< 0.01 and *p< 0.05.

Figure 19. Increased apoptosis induced by inositol starvation in cells expressing a luminal calnexin version. (A) Survival of Cnx1p and luminal_Cnx1p strains cells cultured for 48 h in MM depleted of inositol was assayed by serial dilution on media containing inositol. Samples of 10 μ l of four 10-fold serial dilutions (10^{-1} – 10^{-4}) of cells at OD₅₉₅ 1 were spotted on selective MM plates containing inositol, and incubated at 30°C for 7 days (see *Material and Methods*). (B) Percent of dead cells measured by staining with the fluorescent vital dye Phloxin B. *cnx1*⁺ and *luminal_cnx1* strains cultured for 12 h in MM depleted in inositol were stained with Phloxin B and the fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS of *cnx1*⁺ and *luminal_cnx1* strains after 12 h of growth in MM without inositol, as described in *Material and Methods*. (D) Cell morphology. Cells expressing only Cnx1p or luminal_Cnx1p were cultured for 48 h in MM without inositol and stained with Calcofluor-White, and visualized under fluorescence microscopy; Nomarski fields are shown. White arrows indicate the vesicles containing Calcofluor-stainable accumulating in the *luminal_cnx1* strain. The significance of differences in the results was evaluated by a Student's t test pairwise calculated between the different conditions assayed. **p< 0.01 and *p< 0.05.

Figure 20. C-terminalTM_Cnx1pcmyc reverses the augmentation of apoptosis induced of the *lumenal_cnx1* strain caused by inositol starvation. (A) Schematic representation of WT calnexin and of calnexin mutants used in this study. The mutant *lumenal_Cnx1p* encodes the luminal domain of calnexin (415 aa) and is truncated of the transmembrane domain (TM) and the cytosolic tail. The mutant *C-termTM_Cnx1p_cmyc* encodes the TM domain (23 aa) and the cytosolic tail (48 aa) fused to the *cmyc* tag. (B) Percent of dead cells measured by staining with the fluorescent vital dye Phloxin B. *cnx1*⁺, *lumenal_cnx1* and *lumenal_cnx1 + C-termTM_cnx1_cmyc* strains cultured for 12 h in MM without inositol were stained with Phloxin B, and fluorescent cells were quantified by FACS. Stained cells were considered as dead. (C) Metacaspase activation. The fluorescent probe FITC-VAD-FMK was used to measure metacaspase activation by FACS of *cnx1*⁺, *lumenal_cnx1* and *lumenal_cnx1 + C-termTM_cnx1_cmyc* strains after 12 h of cultured in MM depleted of inositol, as described in *Material and Methods*. (D) Cell morphology. Cells expressing only Cnx1p, *lumenal_Cnx1p* or *lumenal_Cnx1p + C-termTM_Cnx1p_cmyc* were cultured for 48 h in MM without inositol and stained with Calcofluor-White, and visualized under fluorescence microscopy; Nomarski fields are shown. White arrows indicate the accumulation of Calcofluor-stained material in the *lumenal_cnx1* strain. The significance of differences in the results was evaluated by a Student's t test pairwise calculated between the different conditions assayed. **p< 0.01 and *p< 0.05.

Figure 21. Calnexin is cleaved in the luminal domain under normal conditions. **(A)** Time-course cleavage of calnexin. Samples corresponding to 10 μg of protein extracts from cells expressing endogenous calnexin at different time points of growth were loaded on a 10% (wt/vol) SDS-PAGE gel. Calnexin was detected by immunoblotting with an anti-Cnx1p rabbit polyclonal serum (at a 1:30,000 dilution). The positions of the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left. The two forms of calnexin detected are identified with an asterisk (*). Concomitantly, the OD_{595} of cells expressing endogenous calnexin was measured at each time point and graphed in correlation with the cleavage of calnexin as assessed by Western blotting with anti-Cnx1p rabbit polyclonal serum. **(B)** Anti-*cmyc* immunoblot detection of *c-myc*-tagged calnexin before and after cleavage. Samples corresponding to 10 μg of protein extracts from cells expressing a *cmyc*-tagged version of calnexin (Cnx1p-*cmyc*) at $\text{OD}_{595} = 0.3$ or $\text{OD}_{595} = 7$ were loaded on a 15% (wt/vol) SDS-PAGE gel. Calnexin was detected by immunoblotting with the 9E10 anti-*cmyc* mouse mAb (at a 1:500 dilution). The positions of the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left. **(C)** Region of calnexin spanning the site of cleavage. The region of cleavage of calnexin was determined by a series of truncation mutants and tandem mass spectrometry analysis of the small *cmyc*-tagged fragment of calnexin detected in Figure 21B. In this sequence, the amino acids in bold correspond to the highly conserved central domain (hcd) and the underlined residues correspond to the transmembrane domain (TM). The region delimited in red contains the cleavage site of calnexin. **(D)** Gel-filtration

fractionation of uncleaved (full length) and cleaved calnexin. Samples from cells expressing endogenous calnexin cultured for 24 h were subjected to gel-filtration analysis. Equal volumes of fractions 2 to 10 were loaded on an 8.5% (wt/vol) SDS-PAGE gel and immunoblotted with anti-Cnx1p rabbit polyclonal serum (at a 1:30,000 dilution) or anti-BiP rabbit polyclonal serum (at a 1:30,000 dilution). Arrows denote the migration of molecular mass standards (thyroglobulin, 669 kDa; α -amylase, 200 kDa; bovine serum albumin, 68 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa). The two forms of calnexin detected are identified with black arrows.

Table III: Yeast strains used for this study

Strain	Genotype	Source
SP556	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu 1-32</i>	Paul Nurse lab
SP3234-8	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz et al. (1999)
SP3235-9	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>lumenal_cnx1</i>	Elagöz et al. (1999)
SP8244	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>lumenal_cnx1</i> + pREP42 <i>C-termTM_cnx1_cmyc</i>	This study
SP8167R	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu 1-32 KanMX4::pca1 (Δ<i>pca1</i>)</i>	BIONEER
SP8212R	<i>h⁺ ade6-M210 (or M216) ura4-D18 leu 1-32 KanMX4::SPAC167.01 (Δ<i>ire1</i>)</i>	BIONEER

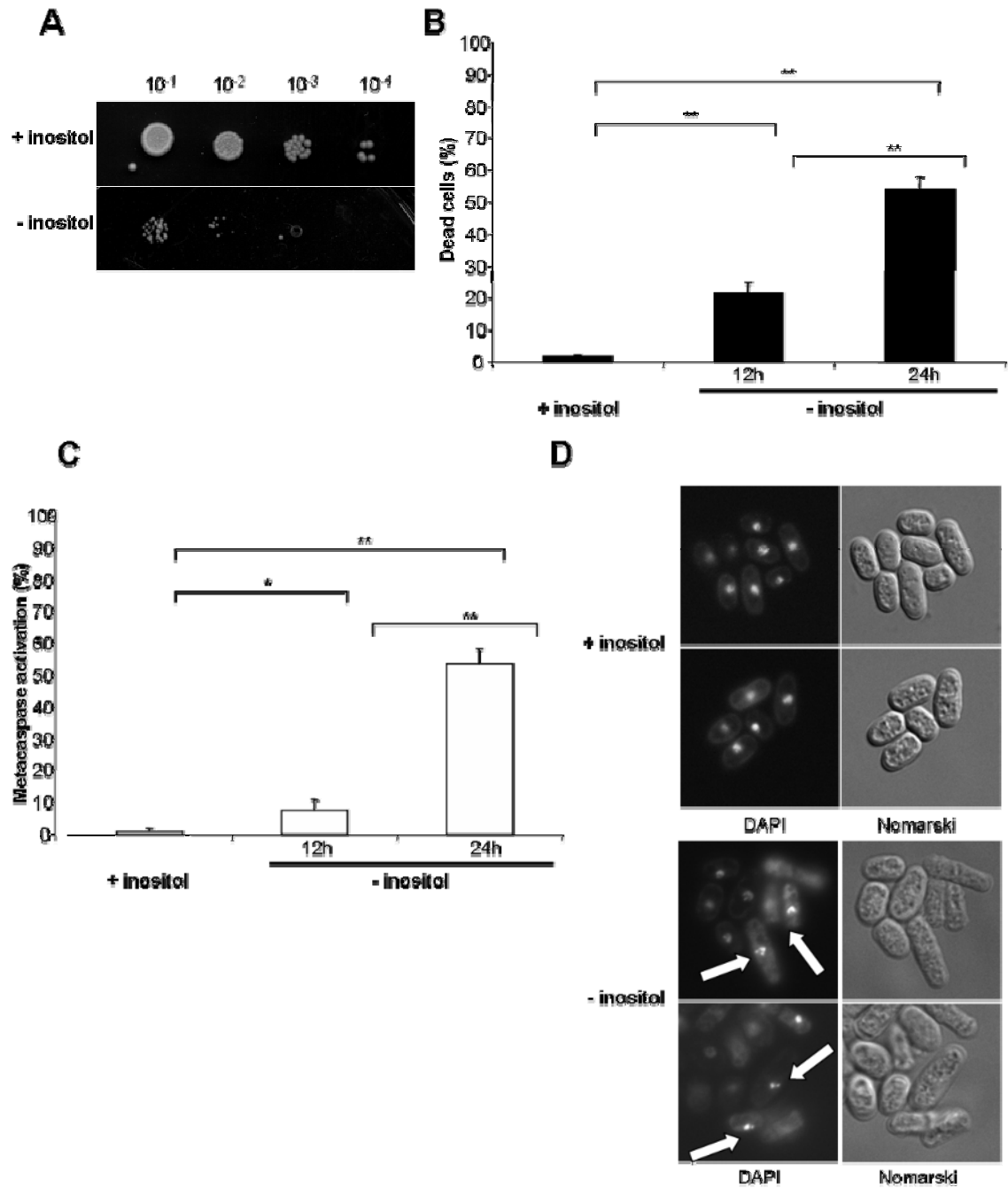


Figure 16: Inositol starvation induced apoptotic cell death

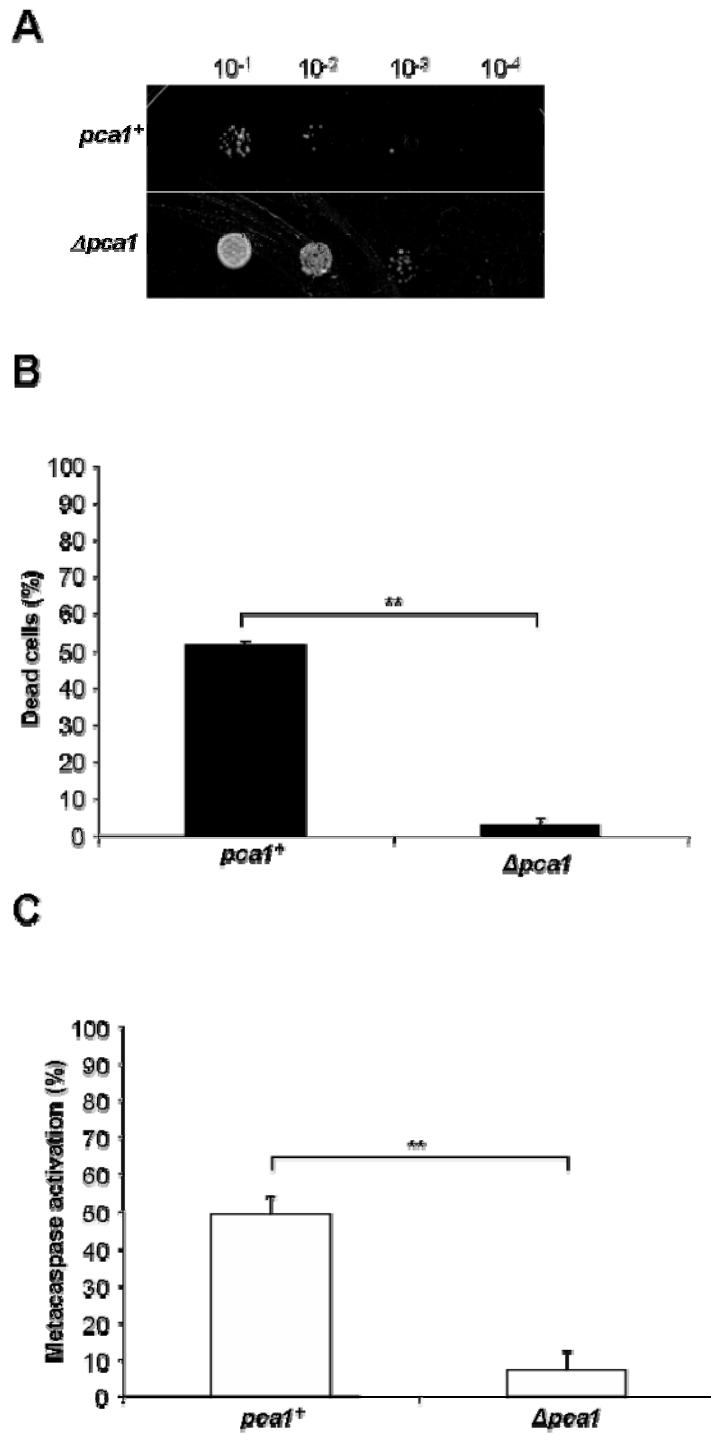
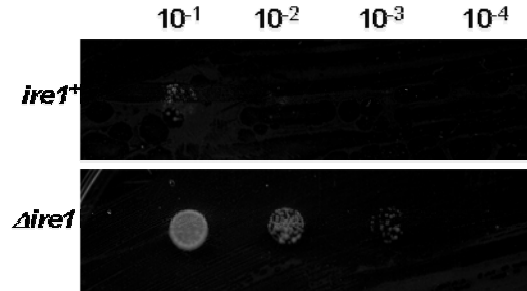


Figure 17: The metacaspase Pca1p is required for apoptosis induced by inositol starvation

A



B

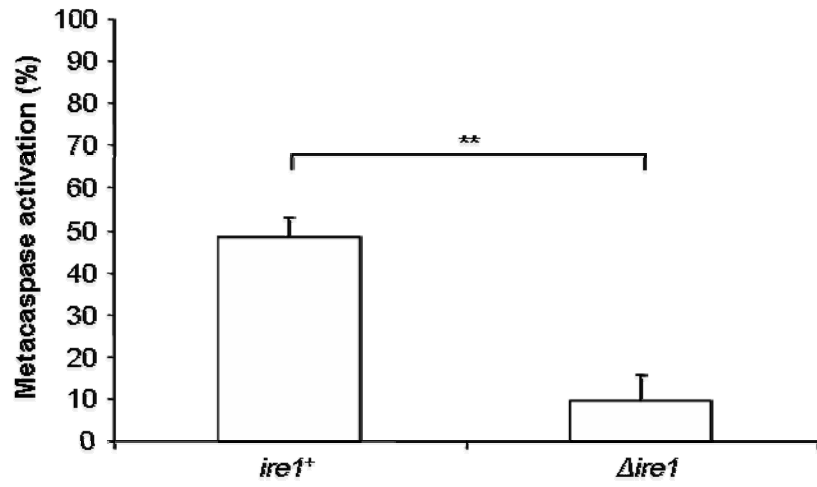


Figure 18: The UPR transducer Ire1p affects the apoptosis induced by inositol starvation

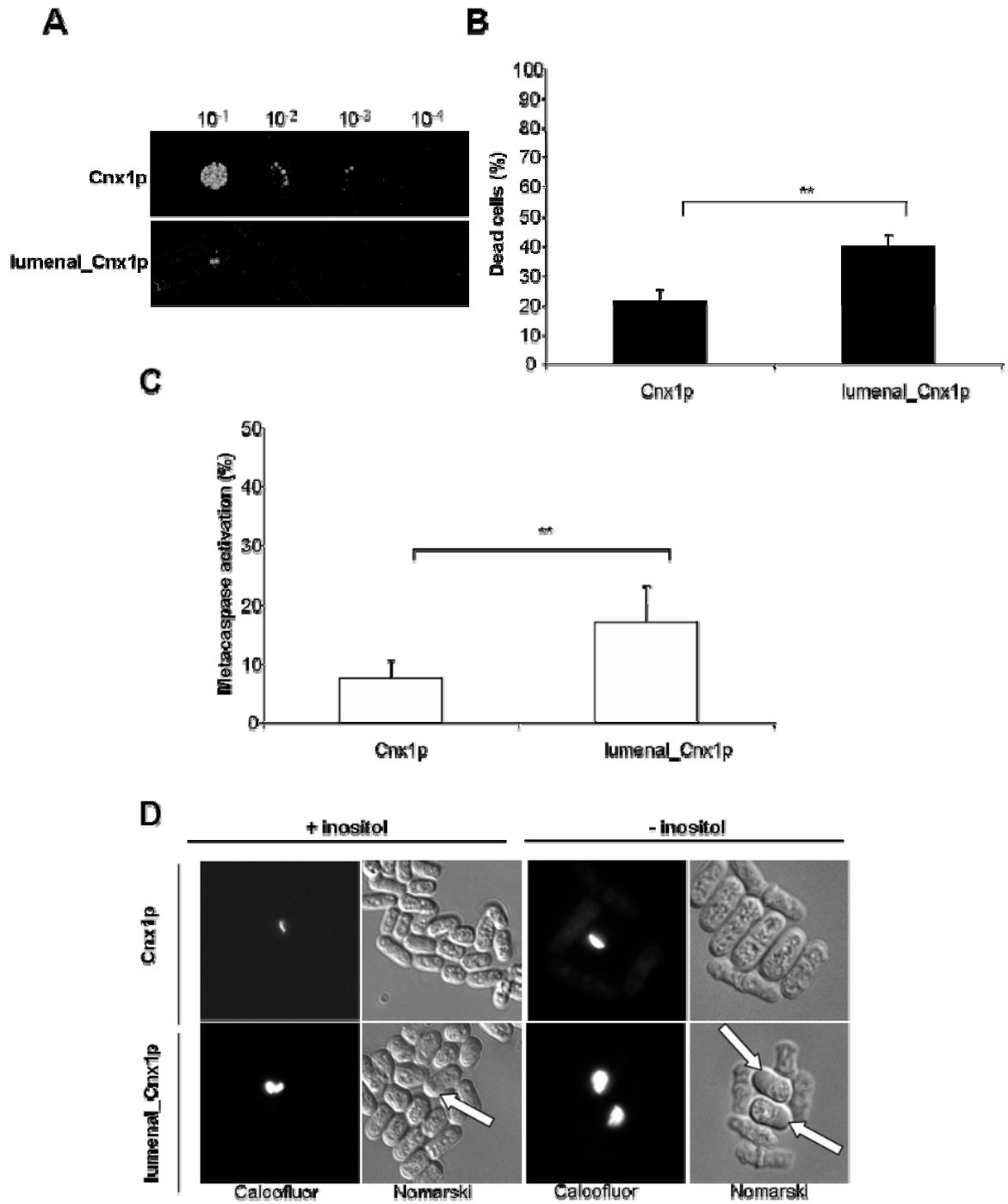


Figure 19: Increased apoptosis induced by inositol starvation in cells expressing a calnexin mutant lacking its TMD and cytosolic tail

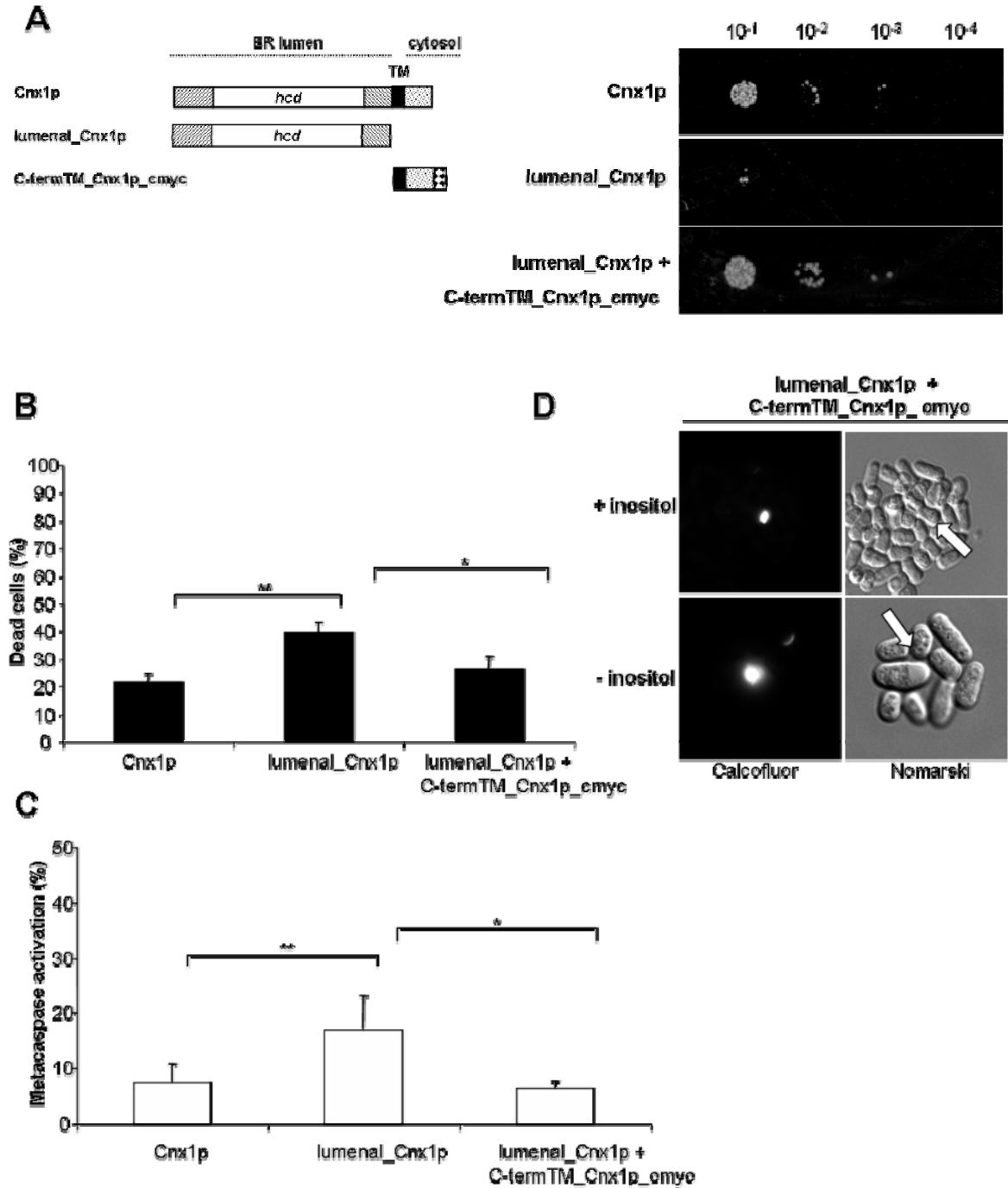


Figure 20: The expression of the C-termTM_Cnx1p_myc mutant reverses the increase in apoptosis induced by inositol starvation of the *lumenal_cnx1* strain

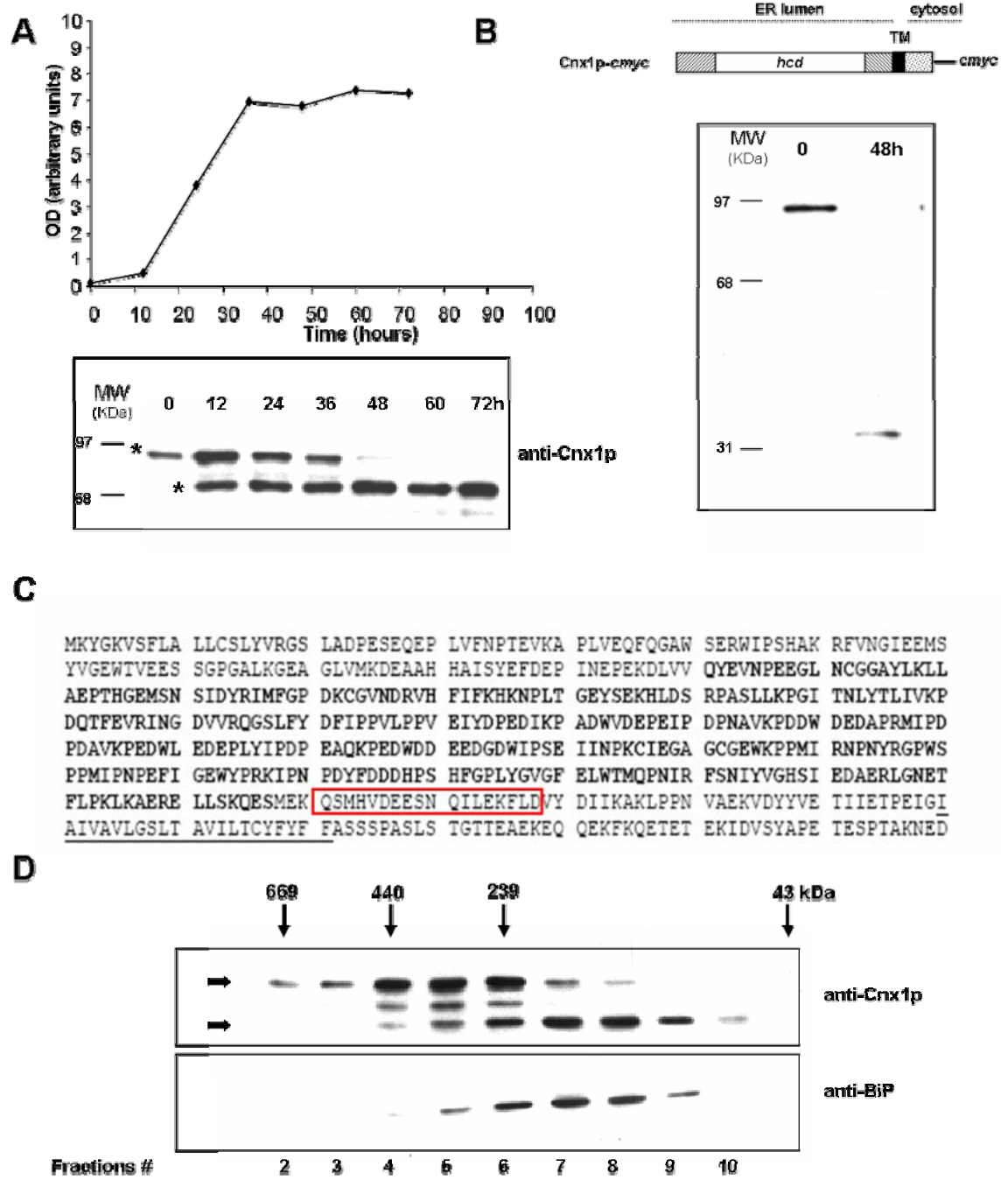


Figure 21: Calnexin is cleaved in the luminal domain under normal conditions

DISCUSSION

4.1 L'apoptose induit par le stress du RE chez la levure *S. pombe*

L'apoptose induite suite à un stress prolongé du RE est un phénomène caractérisé depuis quelques années (Xu *et al.*, 2005; Boyce and Yuan, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006). Les facteurs intervenants dans ce processus ont été identifiés majoritairement chez les mammifères. À ce jour, il est établi que les transducteurs de la voie de réponse aux stress du RE qu'est la voie du UPR, sont également les transducteurs de la voie apoptotique induite suite à un stress prolongé du RE. Les facteurs IRE1, ATF6 et PERK agissent tous trois de concert afin d'activer les voies transcriptionnelles clé de l'apoptose, entre autre, via le facteur de transcription CHOP (Ma *et al.*, 2002b; Szegezdi *et al.*, 2006). Ces voies transcriptionnelles influencent surtout la famille des Bcl-2, inhibant tantôt l'action de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ou activant encore les protéines pro-apoptotiques de cette famille telles Bax et Bak (Cory and Adams, 2002; Ferrari *et al.*, 2002; Danial and Korsmeyer, 2004; Hetz *et al.*, 2006). Les évènements apoptotiques enclenchés suite à un stress appliqué au RE sont la relâche du calcium du RE vers la mitochondrie, la relâche du cytochrome c, l'activation des caspases, etc (Boyce and Yuan, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006; Wallach *et al.*, 2008). Par contre, de nombreux détails du processus d'apoptose induit par le RE restent encore à ce jour nébuleux. Chez les levures, la situation se veut différente puisque l'endoribonucléase transmembranaire IRE1 est le seul intervenant dans la voie du

UPR caractérisé à ce jour (Patil and Walter, 2001). La levure a, par contre, été beaucoup utilisée dans le but d'identifier de nouveaux intervenants dans les voies apoptotiques grâce aux nombreuses approches de génétique développées chez cet organisme (Fleury *et al.*, 2002).

4.1.1 La calnexine dans l'apoptose induit par le stress du RE

Les premières évidences concernant l'implication de la calnexine dans l'apoptose sont venues par les études du Dr. Eric Chevet faisant état de l'implication de la calnexine dans l'apoptose induit par la tunicamycine chez les cellules MCF-7, cellules cancéreuses particulièrement résistantes à l'apoptose induite par la tunicamycine (Delom *et al.*, 2007a). L'équipe du Dr. Chevet a établi que la résistance accrue à la tunicamycine de cette lignée cellulaire était imputable à une plus forte expression de la calnexine dans ces cellules et au rôle probable de la calnexine dans l'échafaudage de la protéine Bap31 nécessaire à son clivage par la caspase 8.

Dans notre article publié dans la revue *Mol Biol. Cell*, nous avons démontré que la surexpression de la calnexine induisait l'apoptose chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Guerin *et al.*, 2008). Les contrôles de surexpression de la sous-unité du translocon Sec61 β et de PDI permettent d'établir que la mort cellulaire par apoptose est imputable au

débalancement d'une action de la calnexine en soi et non à un débalancement de l'homéostasie du RE ou à une perte de l'intégrité membranaire. Il a été montré qu'une modification des niveaux des sous-unités du translocon modifie l'intégrité membranaire ce qui ne semble pas être un évènement inducteur d'apoptose puisque la surexpression de Sec61 β dans notre modèle ne provoque pas la mort cellulaire (Wagner *et al.*, 2007). La voie apoptotique semble également ne pas être induite par un changement dans l'homéostasie des protéines intervenant dans le processus de repliement des protéines puisque la surexpression de PDI n'a aucun effet pro-apoptotique. Par contre, bien que la calnexine et PDI interviennent toutes deux dans la voie du repliement, ces deux protéines possèdent des caractéristiques fonctionnelles totalement différentes pouvant expliquer la spécificité de la calnexine vis-à-vis ce processus de mort programmée.

Le fait que le mutant luminal_Cnx1p, une version soluble de la calnexine, n'induit pas l'apoptose lorsque surexprimé apporte des éléments clés dans la compréhension de ce processus. Nous avons démontré auparavant que le mutant luminal_Cnx1p est une chaperone fonctionnelle (Marechal *et al.*, 2004) du RE ce qui établit qu'une modification des niveaux de l'activité chaperone de la calnexine n'est pas responsable de l'induction de l'apoptose par surexpression. Ceci nous laisse plutôt croire à un débalancement d'une interaction spécifique de la calnexine lors de sa surexpression. Les levures, contrairement aux cellules de mammifères, n'encodent pas la calréticuline, une chaperone du RE équivalant à une version soluble de la calnexine (Meldolesi *et al.*, 1996). La calnexine et la

calréticuline sont des protéines capables de lier le calcium et leurs rôles respectifs dans l'apoptose induite par le stress du RE ont été quelque peu explorés chez les mammifères (Nakamura *et al.*, 2000; Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2004; Takizawa *et al.*, 2004a; Tomassini *et al.*, 2004; Groenendyk and Michalak, 2005; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007a; Delom *et al.*, 2007c; Mohan and Lee, 2008; Tufi *et al.*, 2008). Puisque ces deux protéines influencent le stockage du calcium et sont présentes simultanément dans les cellules, le fait de départager leurs rôles dans l'apoptose est difficile puisque l'absence d'un paralogue peut être palliée par la présence de l'autre. Ceci dit, il apparaît néanmoins clair que ces deux protéines interviennent dans l'apoptose induit par le stress du RE. La calréticuline semble être nécessaire aux premières étapes de l'induction de l'apoptose (relâche du calcium) alors que la calnexine semble requise pour les étapes subséquentes (échafaudage de Bap31) (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2004; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007a; Delom *et al.*, 2007c; Tufi *et al.*, 2008). Il est possible que la calnexine chez la levure *S. pombe* soit essentielle à la viabilité parce qu'elle englobe à la fois les actions de la calréticuline et de la calnexine prenant place chez les mammifères. De plus, bien que la calnexine et la calréticuline soient toutes deux des chaperones du RE, nous avons clairement démontré que l'action essentielle effectuée par la calnexine de *S. pombe* ne soit en rien liée à son activité chaperone puisque des mutants de la calnexine dépourvus d'activité chaperone confèrent la viabilité cellulaire (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004; Hajjar *et al.*, 2007).

L'ajout du domaine transmembranaire au mutant lumenal_Cnx1p (mutant lumenalTM_Cnx1p) rend possible l'induction de l'apoptose par surexpression laissant croire à une modification d'une interaction spécifique de la calnexine nécessitant l'ancrage de celle-ci à la membrane (Guerin *et al.*, 2008). L'utilisation d'un mutant de la calnexine dépourvu du domaine central hautement conservé (ΔE) par l'équipe du Dr. Éric Chevet montre que l'expression de ce mutant rétablit la sensibilité de leurs cellules résistantes à la tunicamycine. Ce résultat laisse croire que le domaine hautement conservé (domaine E) est essentiel à l'établissement d'une interaction nécessaire à la résistance à la tunicamycine imputable à ces cellules (Delom *et al.*, 2007a). Il est possible également que ce mutant soit responsable de la titration d'un facteur nécessitant une interaction avec la calnexine pleine longueur puisque l'expression de ce mutant est faite dans des cellules exprimant toujours la calnexine sauvage. Il aurait été intéressant de voir l'expression conjointe d'un mutant de la calnexine dépourvu de domaine transmembranaire dans le rétablissement de la sensibilité à la tunicamycine des cellules MCF-7 résistantes. Le cas des cellules MCF-7 est particulier puisqu'il s'agit d'un type cellulaire résistant à l'apoptose induit par un stress du RE, alors que la majorité des types cellulaires sont fortement sensibles à ce type d'apoptose. De ce fait, il est possible que les actions entreprises par la calnexine dans les cellules MCF-7 résistantes à la tunicamycine soient différentes des actions entreprises par la calnexine dans des types cellulaires sensibles au stress du RE.

La surexpression du mutant C-termTM_Cnx1p myc constitué simplement de la queue cytosolique et du domaine transmembranaire induit l'apoptose mais à un taux plus faible que celui provoqué par la calnexine sauvage ou par une version luminale de la calnexine ancrée à la membrane (mutant lumTM_Cnx1p) (Guerin *et al.*, 2008). Ces résultats laissent croire que ce mutant est capable d'établir ou de déplacer une interaction nécessaire à l'induction de l'apoptose en surexpression mais d'une façon qui ne se veut pas optimale à cette voie. De plus, le fait que ce mutant de la calnexine ne soit pas viable indique que la fonction essentielle de la calnexine ne se retrouve pas exclusivement dans ces deux domaines de la calnexine.

Puisque le rôle établi jusqu'à maintenant chez les cellules de mammifères pour la calnexine dans l'apoptose concerne surtout l'échafaudage de Bap31 (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007a; Delom *et al.*, 2007c), la surexpression de la calnexine dans des cellules dépourvues de l'homologue de Bap31 de *S. pombe* a été effectuée afin de savoir si la modification de l'interaction soupçonnée par la surexpression concernait Bap31. La délétion de Bap31 n'a absolument aucun effet sur l'efficacité ou la cinétique d'induction de l'apoptose provoquée par la surexpression de la calnexine montrant que Bap31 n'intervient pas dans cette voie apoptotique particulière induite par la calnexine (Guerin *et al.*, 2008). Le rôle de Bap31 n'a pas encore été caractérisé chez les levures ce qui laisse nébuleux son intervention dans l'apoptose chez ces organismes. Par contre, cette indépendance de la calnexine vis-à-vis de Bap31 dans ce contexte peut s'allier

à l'hypothèse voulant qu'il y ait une globalisation des effets de la calnexine dans le phénomène apoptotique chez *S. pombe* en comparaison avec son rôle chez les mammifères. De ce fait, la calnexine agirait dans ce cas précis plus au niveau des premières étapes du processus qu'aux étapes subséquentes. Il serait intéressant de vérifier les débalancements du calcium dans des cellules surexprimant la calnexine afin de voir si son action est médiée principalement par cette voie. De la même façon, une surexpression de la calnexine couplée à une inhibition des mécanismes de relâche du calcium serait un test important à effectuer afin d'explorer si l'action de la calnexine dans l'apoptose prend toute son importance dans ce processus.

De la même façon que pour Bap31, la dépendance à la seule métacaspase à ce jour caractérisée chez les levures dans l'apoptose induite par la surexpression de la calnexine a été vérifiée. Les mêmes résultats que ceux obtenus dans des cellules sauvages ont été observés dans des cellules dépourvues de la métacaspase Pca1p indiquant clairement que Pca1p n'est pas requise à l'exécution de l'apoptose induite par la surexpression de la calnexine (Guerin *et al.*, 2008). Ce résultat rappelle celui publié en 2006 par l'équipe du Dr. Lehle faisant état d'un processus apoptotique indépendant de la métacaspase Yca1 chez *S. cerevisiae* causé par l'inhibition de la N-glycosylation (Hauptmann *et al.*, 2006). La N-glycosylation est une modification essentielle prenant lieu dans le RE qui, une fois inhibée par des mutations dans des gènes spécifiques ou par des drogues comme la tunicamycine, provoque un stress majeur du RE suite à l'accumulation d'un grand nombre de protéines

mal repliées (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Jannatipour and Rokeach, 1995; Perez-Sala and Mollinedo, 1995; Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Knauer and Lehle, 1999; Helenius and Aebi, 2001; Hauptmann *et al.*, 2006). Partant de l'hypothèse selon laquelle la surexpression de la calnexine induit une voie apoptotique similaire à celle induite lors d'un stress appliqué au RE, il n'est pas surprenant que la métacaspase Pcalp dans notre cas n'intervienne pas dans ce processus de la même façon que la métacaspase Ycalp n'intervient pas chez la levure *S. cerevisiae* dans un cas de stress au RE. Par contre, dans les deux cas qui nous intéressent, une activité détectant l'activation des métacaspases grâce à la sonde fluorescente FITC-VAD-FMK est décelée même en absence des métacaspases caractérisées, laissant croire à une activité des métacaspases non caractérisées à ce jour dans la cascade apoptotique découlant d'un stress au RE (Hauptmann *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2008).

Des résultats de notre laboratoire non publiés font état d'une synthèse accrue de la calnexine suite à un traitement des cellules à la tunicamycine. Est-il possible que l'apoptose induite par la tunicamycine soit le résultat d'une expression accrue de la calnexine seulement? Le Dr. Chevet a observé une expression plus importante de la calnexine dans les cellules MCF-7 résistantes à l'apoptose induite par la tunicamycine comparativement aux cellules qui y sont sensibles, permettant de croire qu'un niveau accru de la calnexine protégerait contre les stress appliqués au RE (Delom *et al.*, 2007a). Par contre, le cas de ces cellules reste encore une fois particulier puisque ce sont des cellules

naturellement résistantes à ce type d'apoptose permettant de croire que les mécanismes de résistance implantés ne reflètent peut-être pas la réalité des mécanismes se déroulant dans des cellules sensibles à la tunicamycine soumises à l'apoptose du RE. L'équipe du Dr. Chevet étudie deux types de cellules MCF-7 dont un type a été sélectionné spécifiquement pour leur résistance accrue à la tunicamycine, les cellules MCF-7R. Une expression accrue de la calnexine est détectée dans les cellules MCF-7 suite à un traitement de 24h à la tunicamycine de même que l'apparition de cellules apoptotiques dans une proportion de 5 %. Par contre, les cellules MCF-7R montrent une expression de la calnexine équivalente que celles-ci soient traitées ou non avec la tunicamycine pour 24h de même qu'une apparition nulle de cellules apoptotiques. Ces résultats permettent de penser que les cellules MCF-7R ont effectivement en place des mécanismes de résistance à l'apoptose induits suite à un stress du RE leur évitant de répondre au stress appliqué. En plus, il a été démontré par un autre groupe que les cellules de mammifères dépourvues de calnexine sont résistantes aux drogues provoquant le stress du RE (Zuppini *et al.*, 2002; Groenendyk *et al.*, 2006). Afin d'avoir une meilleure idée de la nécessité de la calnexine dans la réponse apoptotique suivant un stress du RE, il serait intéressant de mesurer l'apoptose induit par la tunicamycine dans des cellules de *S. cerevisiae* dépourvues de la calnexine puisque la calnexine n'est pas essentielle chez cette levure (Parlati *et al.*, 1995b). Par contre, puisque la calnexine n'est pas essentielle chez cette levure on peut s'attendre à ce que les mécanismes impliquant cette protéine soient différents expliquant la différence d'essentialité. L'inhibition par RNAi de la synthèse de la calnexine chez des cellules de *S.*

pombe soumises à la tunicamycine représente également une expérience intéressante pouvant apporter des éclaircissements cruciaux dans la compréhension de ce processus. Des expériences de siRNA ont été effectuées par l'équipe du Dr. Chevet dans des cellules MCF-7 et MCF-7R (Delom *et al.*, 2007a). Ces expériences ont démontré que l'inhibition de la synthèse de la calnexine dans les deux cas provoquait une augmentation du nombre de cellules apoptotiques lorsque traitées à la tunicamycine pendant 24 h. Par contre, bien que le siRNA affecte la synthèse de la calnexine dans les cellules MCF-7 et que l'effet de la tunicamycine sur les niveaux d'expression est toujours présent malgré la présence du siRNA, il n'est pas possible d'établir le même constat pour les cellules MCF-7R puisque le contrôle de l'expression de la calnexine dans les cellules MCF-7R non traitées à la tunicamycine et soumises au siRNA n'est pas présenté.

Dans nos études publiées dans *MBC*, un effet notable sur la transduction du signal apoptotique induite par la tunicamycine est observé quand seul le mutant luminal_Cnx1p est présent dans les cellules (Guerin *et al.*, 2008). Cet effet montre que l'apoptose induite par la tunicamycine requière l'attachement à la membrane de la calnexine pour être pleinement efficace puisqu'une version soluble de la calnexine réduit de 50% le nombre de cellules apoptotiques lors d'un traitement à la tunicamycine. La nécessité d'un attachement membranaire de la calnexine dans l'apoptose médiée par la tunicamycine est en lien avec la nécessité de l'attachement membranaire dans l'apoptose induite par la surexpression de la calnexine. Ces résultats laissent croire à une interaction cruciale de la calnexine avec des

partenaires, interaction prenant lieu à la membrane du RE et permettant la transduction efficace du signal apoptotique. Il est possible que ce partenaire du RE soit également transmembranaire plutôt que cytosolique puisque la queue cytosolique n'est pas essentielle à la transduction du signal dans ces deux cas. Également, l'attachement à la membrane de la calnexine peut être requis afin d'amener un partenaire luminal de celle-ci à la membrane du RE ce que peut faire en théorie le mutant lumenalTM_Cnx1p mais pas le mutant lumenal_Cnx1p.

Dans un criblage génétique visant à identifier des protéines qui, en surexpression, contrecarreraient la mort cellulaire induite par la surexpression de la calnexine, l'homologue de HMGB1 de mammifères, Hmg1/2p, a été identifié. HMGB1 fait partie de la famille des protéines à boîte HMG (High Mobility Box) impliquée dans le remodelage de la chromatine (Stros *et al.*, 2007). Des propriétés anti-apoptotiques ont déjà été attribuées à cette protéine chez les mammifères et chez la levure *S. pombe* suite à l'activation de la voie apoptotique par différents inducteurs entre autre l'expression de Bak dans le cas de *S. pombe* (Brezniceanu *et al.*, 2003). Il est possible que l'expression de HMGB1 ou de son homologue chez *S. pombe* permettent la transcription de gènes anti-apoptotiques permettant la survie des cellules dans le cas d'une mort apoptotique induite par l'expression de Bak ou la surexpression de la calnexine puisque des études ont démontré un potentiel transcriptionnel attribuable à cette protéine nucléaire (Bianchi and Beltrame, 2000). On peut penser que l'expression de Bak chez *S. pombe* induit une voie apoptotique similaire à

celle empruntée lors de la surexpression de la calnexine puisqu'il a été montré que la liaison de Bak à la calnexine chez cette levure était nécessaire à la transduction des signaux de mort cellulaire induits par Bak (Torgler *et al.*, 1997). Par contre, la conservation de l'effet anti-apoptotique par une version de HMGB1 dépourvue de son domaine acide en C-terminal, domaine impliqué dans l'interaction à l'ADN, laisse croire à un rôle anti-apoptotique indépendant de sa capacité de liaison à l'ADN (Cato *et al.*, 2008, Brezniceanu, 2003 #422). Des études chez la levure *S. cerevisiae* démontrent un lien génétique et un lien physique entre l'homologue de HMGB1 chez cette levure et la peptidyl-prolyl isomérase cible de la rapamycine, FKBP12 (Dolinski and Heitman, 1999). Plusieurs interactions sont associées à la protéine FKBP12 autant chez les mammifères que chez les levures comme des interactions avec la calcineurine et TOR chez les levures et les mammifères et le récepteur à l'IP₃ chez les mammifères seulement (Koltin *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Sabatini *et al.*, 1994; Dargan *et al.*, 2002). Il est possible que l'expression de HMGB1 ou son homologue chez *S.pombe* en situations apoptotiques régule différemment la protéine FKBP12 ayant ainsi un effet sur les voies du calcium via la calcineurine ou un partenaire similaire au récepteur à l'IP₃ ou encore sur la voie de TOR, voie impliquée dans l'autophagie et l'apoptose chez les levures (Almeida *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009).

De nombreuses autres expériences sont requises afin de mieux comprendre le rôle de la calnexine dans l'apoptose induite par le stress du RE, entre autres dans des modèles génétiques tels la levure mais également dans plusieurs types cellulaires de mammifères.

Cependant, d'après les nombreuses études, l'importance de la chaperone calnexine dans l'apoptose initiée dans le RE reste un fait indéniable.

4.2 La voie de l'inositol et l'apoptose chez la levure *S. pombe*

Depuis les débuts de la caractérisation des phénomènes apoptotiques chez les levures, de nombreux inducteurs ont été caractérisés qui sont très différents les uns des autres et qui impliquent des voies cellulaires différentes. De tous les inducteurs répertoriés, il y a ceux pouvant affecter les voies de réponses associées à certains stress tels l'acide acétique, la tunicamycine ou encore le peroxyde par exemple, les mutations associées à des gènes clés de voies cellulaires tels les mutants *cdc48^{S565G}* ou *ubp10Δ*, l'expression de protéines pro-apoptotiques hétérologues tels Bak et Bax et finalement les conditions naturelles induisant l'apoptose comme le vieillissement (Buttner *et al.*, 2006; Frohlich *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2008a; Low *et al.*, 2008; Low and Yang, 2008b; Severin *et al.*, 2008). Ces voies très différentes les unes des autres ne sont souvent caractérisées que par les marqueurs apoptotiques qu'elles présentent et que par leur dépendance à la seule métacaspase à ce jour caractérisée chez les levures (Liang *et al.*, 2008a; Mazzoni and Falcone, 2008a). De ce fait, il n'est pas clair si l'apoptose induite par ces différents inducteurs chez les levures emprunte des voies similaires aux voies intrinsèques et extrinsèques caractérisées chez les mammifères. Les voies intrinsèques et extrinsèques des cellules de mammifères sont de façon générale séparées selon ce que l'inducteur

apoptotique est un stimulus cellulaire externe (une molécule de signalisation par exemple) ou un stimulus provenant de l'intérieur de la cellule (un stress du RE par exemple) (Harada and Grant, 2003; Jin and El-Deiry, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006; Dhanasekaran and Reddy, 2008; Wallach *et al.*, 2008).

Dans notre article soumis à la revue *Journal of Cell Science*, nous avons établi que la déficience en inositol chez la levure *S. pombe* induit l'apoptose. L'inositol est un précurseur essentiel de nombreux phospholipides et de nombreuses molécules de signalisation comme IP₃ par exemple, molécule impliquée dans la relâche du calcium du RE vers le cytosol en réponses à de nombreux stimuli externes (Steiner and Lester, 1972; Majerus *et al.*, 1986; Berridge, 1987; Belde *et al.*, 1993; De Camilli *et al.*, 1996; Berridge *et al.*, 2003). Bien que l'inositol soit crucial au bon fonctionnement cellulaire, la plupart des cellules encode les protéines essentielles à la biosynthèse de cette molécule advenant une déficience de celle-ci (Klig and Henry, 1984; Klig *et al.*, 1991; Majumder *et al.*, 1997). Il est connu depuis de nombreuses années que la déficience en inositol est létale pour la levure *S. pombe* du fait que cette levure n'encode pas l'enzyme essentielle à la biosynthèse de l'inositol : l'inositol-1-phosphate synthase (*INO1*) (Yarbrough and Clark, 1957; MacNeill, 2002). De ce fait, *S. pombe* devient un excellent modèle pour l'étude des voies impliquant l'inositol puisque cette levure est naturellement déficiente dans la biosynthèse de l'inositol.

Il est clair d'après les résultats de nos études que la déficience en inositol chez *S. pombe* induit la mort cellulaire par apoptose. Ce résultat rappelle les résultats obtenus chez *S. cerevisiae* démontrant qu'un traitement au valproate, une courte chaîne d'acides gras inhibant la biosynthèse de l'inositol, induit une voie apoptotique caspase dépendante chez cette levure (Shaltiel *et al.*, 2004; Mitsui *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007). L'apoptose induite par une déficience en inositol peut être le résultat d'une baisse de n'importe quelle molécule synthétisée à partir de l'inositol (PI, IP₄, IP₃,...) puisque chacune de ces molécules est impliquée dans des processus cruciaux de la cellule comme la régulation des télomères par IP₄ par exemple, le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire, le maintien de l'intégrité des membranes, ou encore la régulation des niveaux calciques au niveau du noyau (Hughes *et al.*, 1990; York *et al.*, 2005; Malviya and Klein, 2006; Nielsen, 2008). Par contre, les résultats les plus clairs liant l'apoptose et la signalisation par l'inositol concernent les effets d'IP₃ sur le récepteur IP3R chez les mammifères (Choe and Ehrlich, 2006; Rong *et al.*, 2008). Le récepteur IP3R est un récepteur transmembranaire du RE impliqué dans la relâche du calcium du RE vers le cytosol en réponse à l'IP₃ (Rizzuto *et al.*, 1998). Il n'y a, à ce jour, aucun homologue du récepteur à l'IP₃ identifié chez les levures. Par contre, un canal calcique localisé à la vacuole permettant la relâche du calcium dans le cytosol en situation de stress osmotique homologue au canal TRP (Transient Receptor Potential) appelé Yvc1p a été identifié chez la levure *S. cerevisiae* (Palmer *et al.*, 2001; Denis and Cyert, 2002). Il a également été observé qu'il y avait relâche du calcium de la vacuole en réponse à l'IP₃ et qu'une perte de l'intégrité des vacuoles inhibait la mort

cellulaire induit par Bax (Belde *et al.*, 1993; Belhocine *et al.*, 2004). De façon générale, la relâche du calcium du RE permet la capture de celui-ci par la mitochondrie ce qui a pour effet de permettre la relâche du cytochrome c et l'enclenchement des étapes subséquentes propres à l'exécution de l'apoptose (Rizzuto *et al.*, 1998; Bernardi, 1999). On peut penser qu'une déficience en inositol provoque la synthèse d'IP₃ à partir de l'inositol produit par cette levure grâce au recyclage de certains phospholipides afin de signaler la mort cellulaire suite à une déficience prolongée. En effet, il a été montré que la levure *S. pombe* a la capacité de produire une petite quantité d'inositol probablement par recyclage des phospholipides en absence d'inositol ce que *S. cerevisiae* ne peut pas puisque cette levure n'a pas évolué dans un contexte où l'inositol est primordial à sa survie (Fernandez *et al.*, 1986). De ce fait, l'inositol en situation d'abondance servirait principalement à la synthèse des phospholipides et au signalement de la prolifération afin d'assurer la survie alors qu'une déficience prolongée entraînerait l'utilisation de l'inositol recyclée pour la production d'IP₃ nécessaire à l'activation du canal calcique et à la relâche du calcium requise à la signalisation pro-apoptotique.

Par contre, dans le cas du récepteur IP₃R, les données ne sont pas claires sur l'effet sur l'apoptose des niveaux calciques du RE. Le récepteur IP₃R est lié à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et certaines études démontrent que les protéines anti-apoptotiques telles Bcl-Xl maintiendrait le récepteur IP₃R dans un état sensible à l'IP₃ ayant pour effet de diminuer le calcium intra-RE ce qui aurait un effet anti-apoptotique (White *et al.*, 2005;

Rong *et al.*, 2008). On peut penser alors dans le sens de ces résultats qu'une baisse de l'inositol provoquerait une baisse des niveaux d'IP₃ ce qui aurait pour effet de remonter le niveau calcique du RE menant à une activité pro-apoptotique des cellules.

Finalement, de nombreuses études chez les mammifères montrent qu'une baisse des niveaux d'inositol et d'IP₃ dans les cellules ainsi qu'une inhibition du récepteur IP₃R induit l'autophagie (Sarkar *et al.*, 2005; Sarkar and Rubinsztein, 2006; Criollo *et al.*, 2007a; Criollo *et al.*, 2007b; Sarkar and Rubinsztein, 2008). On peut alors penser que les cellules de *S. pombe* déficientes en inositol rentrent en premier lieu dans un procédé autophagique qui mènera subséquemment à l'apoptose si la déficience se poursuit. Il serait alors possible dans un tel contexte que l'autophagie serve à recycler les membranes dans le but de produire de l'inositol afin de permettre une survie transitoire des cellules comme c'est le cas pour la déficience en acides aminés ou en azote chez *S. pombe* (Codogno and Meijer, 2005; Onodera and Ohsumi, 2005; Kohda *et al.*, 2007). La survie prolongée des cellules de *S. pombe* soumises à une déficience en inositol en comparaison avec les cellules de *S. cerevisiae* pourrait peut-être s'expliquer par un tel mécanisme de recyclage de l'inositol (Fernandez *et al.*, 1986). L'observation de grosses structures ressemblant à des vacuoles dans les cellules de *S. pombe* soumises à une déficience en inositol abonde dans ce sens (résultats non publiés) et correspondent aux observations de vacuoles chez les cellules apoptotiques de *S. cerevisiae* traitées au valproate (Mitsui *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007).

4.2.1 Le rôle de la calnexine dans l'apoptose induite par une déficience en inositol

Dans cette étude concernant la déficience en inositol et l'apoptose chez *S. pombe*, nous avons également établi qu'une version luminale de la calnexine provoquait une induction accrue de l'apoptose et que cet accroissement de l'induction était renversé par la co-expression de la queue cytosolique de la calnexine attachée à la membrane avec la version luminale de la calnexine. Ces résultats impliquent une fois de plus la calnexine dans la médiation d'une voie apoptotique mais, cette fois-ci, de façon différente que celle démontrée dans l'apoptose induite suite à un stress du RE (Guerin *et al.*, 2008). Dans le cas précis de l'inositol, nous assistons à une augmentation des niveaux de cellules apoptotiques en présence d'une version luminale de la calnexine alors que nous assistions à une diminution de ce niveau suite à un traitement à la tunicamycine. Cette différence peut s'expliquer par une différence des voies apoptotiques induites dans les deux cas. Cette hypothèse selon laquelle ces deux voies seraient distinctes est appuyée par la dépendance à la métacaspase Pca1p de la voie apoptotique induite par la déficience à l'inositol et par l'indépendance à cette métacaspase de la voie apoptotique induite suite au traitement à la tunicamycine. Cette différence rappelle les résultats obtenus chez *S. cerevisiae* faisant état d'une voie apoptotique caspase indépendante lors d'une inhibition du processus de N-glycosylation et d'une voie apoptotiques caspase dépendante lors d'un traitement au valproate (Mitsui *et al.*, 2005; Hauptmann *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007). On peut penser

que la tunicamycine, en provoquant une augmentation dans la quantité des protéines mal repliées à l'intérieur du RE, induit un signal apoptotique prenant sa source à l'intérieur du RE vers l'extérieur alors qu'une déficience en inositol, par la baisse des molécules nécessitant l'inositol pour leur biosynthèse, induit un signal prenant naissance au niveau de la membrane cellulaire, signal semblant de type extrinsèque. Si la différence entre les deux voies est réelle, il est possible que dans le cas de la tunicamycine, la calnexine doit être attachée à la membrane du RE afin de médier le signal pro-apoptotique de l'intérieur du RE vers l'extérieur via son domaine contenu dans le lumen. Dans le cas de l'inositol, la calnexine doit être attachée à la membrane du RE mais doit contenir la queue cytosolique afin de médier son action anti-apoptotique suite au signalement provenant de l'extérieur du RE.

L'autophagie, déclenchée par une baisse des niveaux d'inositol dans la cellule comme hypothèse, peut passer par la nécessité d'avoir une calnexine ancrée à la membrane du RE et contenant sa queue cytosolique pour qu'elle s'établisse. Plusieurs études démontrent que l'autophagie et l'apoptose sont régulés chez les cellules de mammifères par les protéines de la famille des Bcl-2 (Heath-Engel *et al.*, 2008). Aucun homologue des membres de la famille des protéines à domaines Bcl-2 n'a été trouvé à ce jour dans les levures mais des expériences d'expression hétérologue de ces membres chez la levure a permis d'établir que ces protéines ont la capacité de médier leur action pro- et anti-apoptotiques de façon similaire (Ink *et al.*, 1997; Jurgensmeier *et al.*, 1997; Longo *et al.*,

1997; Ligr *et al.*, 1998; Fleury *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003b; Priault *et al.*, 2003). Une expérience chez *S. pombe* a démontré que l'expression de Bak induit l'apoptose et que ce processus, pour être efficace, nécessite l'interaction de Bak avec la queue cytosolique de la calnexine (Torgler *et al.*, 1997). Ce résultat nous laisse croire que même si aucun homologue de ces protéines à domaines Bcl-2 n'a été caractérisé chez la levure *S. pombe*, il existerait des protéines ayant des fonctions similaires médiant les processus de mort cellulaire. Dans le même sens, notre démonstration de la réduction notoire de l'apoptose induite par la surexpression de la calnexine par la surproduction conjointe de l'homologue chez *S. pombe* de la protéine nucléaire anti-apoptotique humaine HMGB1 n'est pas sans rappeler un article publié en 2003 dans *FASEB Journal* rapportant l'inhibition par HMGB1 de la mort cellulaire induite par Bak chez *S. pombe*. De ce fait, il est probable que la queue cytosolique de la calnexine ait la capacité de lier un tel partenaire et que cette liaison nécessite l'ancrage à la membrane de celle-ci pour avoir lieu.

Des évidences démontrées chez des organismes plus complexes que les levures permettent également d'émettre des hypothèses sur les interactions que pourraient avoir la calnexine en situations particulières. Les résultats publiés en 2000 dans la revue *Journal of Cellular Biology* sont certainement ceux amenant le plus de questions (Roderick *et al.*, 2000). Il a été montré que dans les oocytes de *Xenopus*, les oscillations de calcium du RE qui sont régulées par l'alternance des pompes à calcium IP3R et SERCA-type ATPase (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) impliquent la liaison de SERCA à la

calnexine. En effet, la phosphorylation de la queue cytosolique par la kinase PKC médie l'interaction de la calnexine avec la pompe SERCA. Une stimulation du récepteur à l'IP₃ a pour effet, d'après ces études, de déphosphoryler la calnexine et d'inhiber son interaction avec SERCA arrêtant ainsi les oscillations de calcium. Cet article fait état également d'un arrêt des oscillations de calcium dans les oocytes imputable à une surexpression de la calnexine. Dans la même voie, des études chez *S. cerevisiae* ont montré que la voie cellulaire impliquant la kinase PKC est activée en réponse à une déficience en inositol et que cette voie est essentielle à la viabilité et au maintien de l'homéostasie des lipides (Nunez *et al.*, 2008). Est-il possible, dans notre modèle, que la queue cytosolique de la calnexine soit requise lors d'une déficience en inositol afin de permettre l'interaction avec Cta3p (l'homologue de SERCA chez *S. pombe*) via sa phosphorylation par PKC et ainsi éviter un débalancement trop rapide des niveaux calciques dans le RE? Le haut niveau d'apoptose mesuré dans des cellules déficientes en inositol en présence d'une version exclusivement luminale de la calnexine est-il le résultat d'un débalancement trop rapide des niveaux calciques? Un mutant de la calnexine aux sites de phosphorylation mutés est-il aussi sensible à la déficience en inositol qu'un mutant luminal? La surexpression de la calnexine chez *S. pombe* provoque-t-il un débalancement du calcium?

4.3 Le rôle du clivage de la calnexine dans l'apoptose chez *S. pombe*

Toutes ces hypothèses essayant de relier la calnexine dans les phénomènes apoptotiques que provoquent la déficience en inositol et le stress du RE prennent un tout nouveau sens lorsque l'on prend en considération le dernier résultat démontré dans le deuxième article faisant état d'un clivage de la calnexine en situation de croissance normale des cellules. Cette nouvelle information apporte une vision totalement différente des processus impliquant la calnexine puisque maintenant nous devons considérer la calnexine comme une protéine entière au début de la phase exponentielle devenant deux protéines indépendantes en milieu de la phase de croissance. La caractérisation approximative du site de clivage indique que les deux fragments de la calnexine pourraient être considérées comme deux protéines distinctes dont une serait une chaperone luminaire (fragment contenant la majeure partie des régions contenant l'activité chaperone mais dépourvu de queue cytosolique et de domaine transmembranaire) et dont l'autre serait une petite protéine transmembranaire du RE ayant la capacité de lier le calcium et d'être régulée par phosphorylation contenant un petit domaine luminal et la queue cytosolique. Puisque le clivage a lieu en situation de croissance normale, il est logique de croire celui-ci doit avoir un rôle nécessaire pour la cellule. Le clivage de la calnexine n'a été démontré chez aucune autre espèce jusqu'à maintenant et les seules données existantes sur le clivage de la calnexine proviennent d'un article publié en 2004 dans la revue *J. Biochem* (Takizawa et

al., 2004a). Cet article fait état d'un clivage de la calnexine dans la région carboxy-terminale en réponse à divers stimuli pro-apoptotiques. De la même façon, une inhibition de l'apoptose induite par ces mêmes stimuli pro-apoptotiques est observé lorsqu'il y a expression du fragment clivé en C-terminal. Bien que le clivage de la calnexine suite à l'application de stimuli pro-apoptotiques soit évident dans cet article, il arrive qu'un certain clivage basal soit observé sans que les cellules ne soient soumises à des stimuli induisant l'apoptose. Le fait que le clivage complet de la calnexine ait lieu à une certaine phase de croissance des cellules pourrait expliquer la faible détection du clivage endogène dans les résultats rapportés dans ce papier. Le fait que la calnexine chez la levure *S. pombe* soit clivée naturellement sans qu'aucun stimulus externe ne soit appliqué nous indique que le clivage n'est pas pro-apoptotique puisque les cellules une fois la calnexine complètement clivée ne rentrent pas en apoptose. Il serait crucial d'investiguer plus en profondeur le clivage de la calnexine chez les mammifères afin de démystifier les deux résultats.

4.3.1 Modèle de l'implication de la calnexine dans l'apoptose

Dans les deux cas pro-apoptotiques qui nous concernent, une déficience en inositol n'a, tout d'abord, aucun effet sur le clivage puisque la calnexine est clivée de la même façon qu'en présence d'inositol. Par contre, nous avons observé qu'un traitement à la tunicamycine des cellules ou encore qu'une surexpression de la calnexine inhibe totalement ou partiellement le clivage de la calnexine (voir Figure 22, résultats non-publiés). Ces

différents effets sur le clivage de la calnexine de la part des différents inducteurs apoptotiques caractérisés par nos études chez *S. pombe* laissent croire une fois de plus en une différence de voies cellulaires menant à la mort cellulaire par apoptose dans ces deux cas.

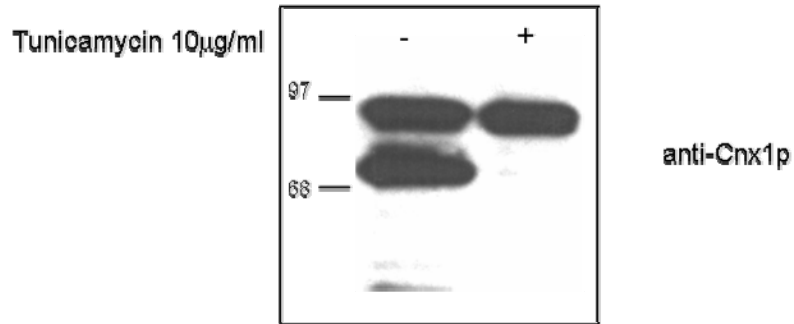
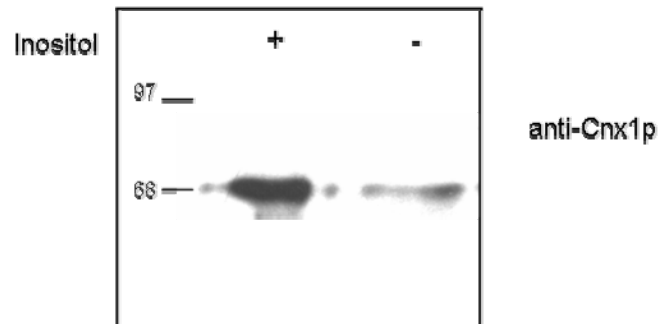
A**B**

Figure 22: Clivage de la calnexine en conditions apoptotiques. (A) Immunobuvardage de type western à l'aide d'anticorps anti-Cnx1p afin de détecter la calnexine avant et après traitement de 24h à 10 µg/ml tunicamycine. (B) Immunobuvardage de type western à l'aide d'anticorps anti-Cnx1p afin de mesurer le clivage de la calnexine après 48h de culture en présence ou en absence d'inositol.

Ces résultats nous conduisent à établir un modèle préliminaire permettant d'expliquer l'implication de la calnexine dans ces deux voies apoptotiques différentes (Figure 23). Dans ce modèle, la tunicamycine et la surexpression de la calnexine sont considérés comme des inducteurs de la voie apoptotique reliée au stress du RE. Dans ces deux cas précis, on peut penser que le stress appliqué au RE inhibe le clivage de la calnexine menant à la transduction d'un signal pro-apoptotique de l'intérieur du RE vers l'extérieur. Cette transduction du signal apoptotique peut être initiée : 1) d'une interaction de la calnexine avec un nouveau partenaire au niveau de la membrane du RE, 2) de l'inhibition de l'interaction avec un partenaire habituel du petit fragment de la calnexine formé majoritairement de la queue cytosolique et du domaine transmembranaire, 3) ou encore de la localisation à la membrane du RE d'un partenaire habituel de la calnexine mais étant localisé habituellement dans la lumière du RE grâce au clivage de la calnexine. La présence d'une version seulement luminale de la calnexine dans ce cas interférerait grandement avec la transduction de ce signal ce qui provoquerait la baisse des niveaux de cellules apoptotiques observées dans nos premières études.

Dans le cas de l'apoptose causée par la déficience en inositol, on peut penser que le clivage naturel de la calnexine aide à l'induction d'un processus anti-apoptotique que peut être l'autophagie par exemple, processus qui est nécessaire à la survie quelque peu prolongée de *S. pombe* dans cette situation de privation d'inositol. La survie cellulaire serait

imputable dans ce cas au petit fragment clivé de la calnexine constitué de la queue cytosolique, du domaine transmembranaire et d'une courte région luminale. Ce petit fragment clivé peut également être le partenaire crucial d'une protéine transmembranaire ou cytosolique essentielle au bon fonctionnement cellulaire comme Cta3p, l'homologue de SERCA; si nous faisons référence à l'article démontrant une interaction entre ces deux partenaires dans les oocytes de *Xenopus* (Roderick *et al.*, 2000). La présence seulement d'une version luminale de la calnexine dans ce cas annulerait l'interaction et/ou l'induction de la voie anti-apoptotique et par le fait même la courte période de survie des cellules. Tous ces évènements résultant en l'apparition d'un niveau plus élevé de cellules apoptotiques en présence du mutant lumenal_Cnx1p comme il est démontré dans notre deuxième article. Cette hypothèse expliquerait également pourquoi les niveaux d'apoptose reviennent au niveau observé avec une calnexine sauvage lorsqu'un mutant de la calnexine formé de la queue cytosolique et du domaine transmembranaire est co-exprimé en présence du mutant lumenal_Cnx1p.

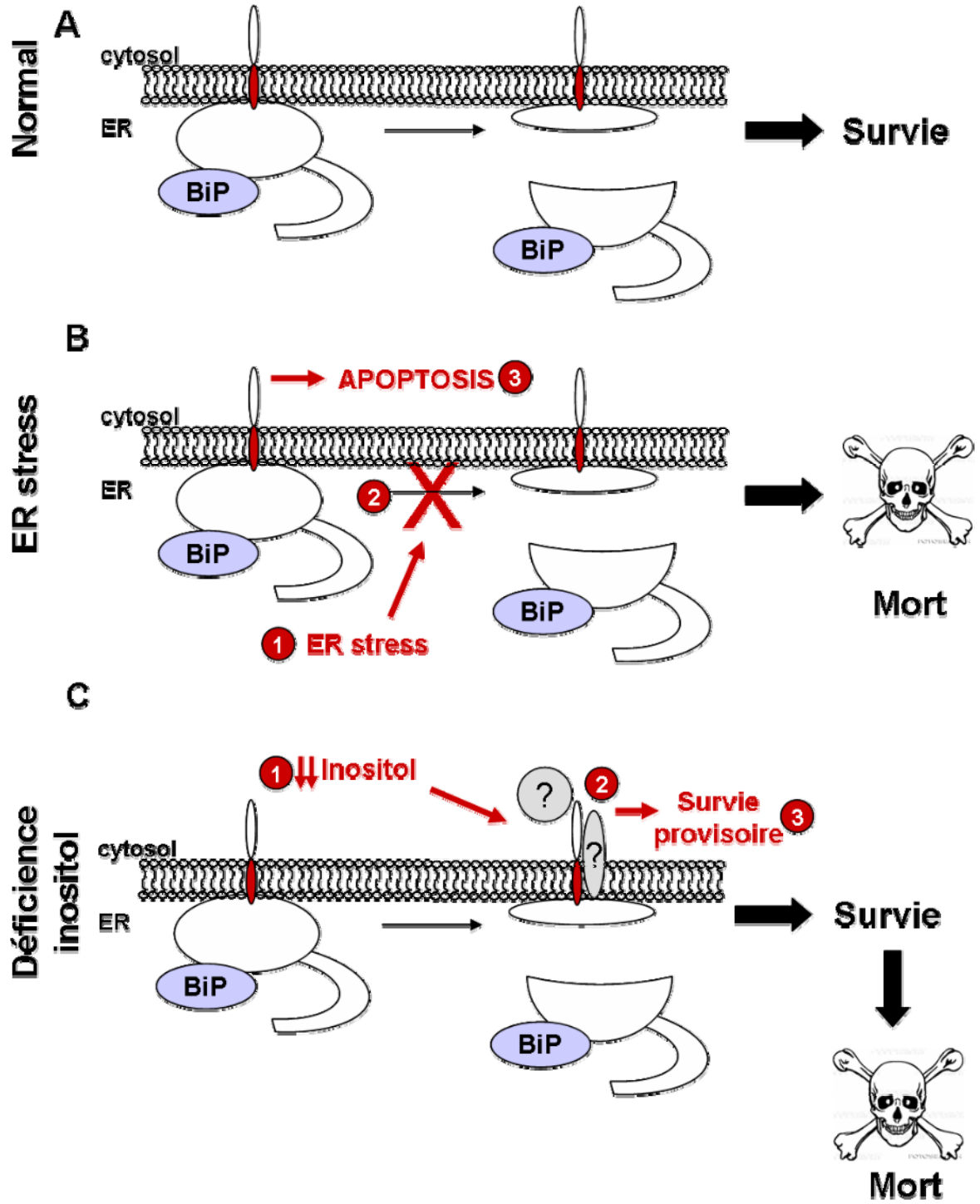


Figure 23: Modèle du mécanisme d'action de la calnexine dans différentes situations cellulaires. (A) La calnexine est clivée au niveau de son domaine luminal en conditions normales de croissance. Ce clivage laisse place à deux portions de la calnexine localisées à la fois à la membrane du RE et dans le lumen devant remplir des fonctions qui leurs sont propres. (B) En cas de stress au RE comme c'est le cas lors d'un traitement à la tunicamycine, le clivage de la calnexine est inhibé. Cette inhibition signale la mort cellulaire par apoptose par 1) la formation d'une nouvelle interaction à la membrane 2) l'inhibition d'une interaction nécessaire à la survie ou encore par 3) la localisation à la membrane d'un partenaire luminal de la calnexine. (C) En cas de déficience en inositol, la calnexine est toujours clivée comme en conditions de croissance normales. La présence à la membrane de la queue cytosolique et d'une petite partie luminale de la calnexine permet de retarder le signal apoptotique provoqué par la déficience en inositol.

4.3.2 Voie cellulaire responsable du clivage de la calnexine

L'identification de la protéase responsable du clivage de la calnexine permettrait certainement une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant ce clivage et des voies cellulaires nécessitant le clivage de la calnexine. Dans des études encore au stade préliminaires ayant pour but de trouver la protéase ou la voie contenant la protéase responsable du clivage de la calnexine, une banque de délétion de protéines diverses précédemment identifiées chez la levure *S. pombe* présente dans le laboratoire a été utilisée afin d'effectuer des études de cinétique de clivage de la calnexine dans ces différents backgrounds génétiques. Les knockouts disponibles au laboratoire que nous avons étudié étaient *pka1*, *isp6*, *pht1* (sous-famille des yapsins, protéase aspartique), *ire1* et *dmal* (Bap31). De ce nombre, seulement la délétion d'*isp6* a démontré un effet inhibiteur sur le clivage de la calnexine (Figure 24 B). Isp6 est une protéase à sérine vacuolaire, qui est induite en fin de la phase stationnaire et jouant un rôle dans les processus de différenciation sexuelle ainsi que dans l'induction de l'autophagie chez *S. pombe* (Nakashima *et al.*, 2002a; Nakashima *et al.*, 2002b; Nakashima *et al.*, 2006). Isp6p est l'homologue de la protéase PrB chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Naik *et al.*, 1997; Subramanian *et al.*, 2006). PrB a été montré chez *S. cerevisiae* comme dépendante pour sa maturation de la présence de Pbn1p, une glycoprotéine membranaire du RE dont la délétion n'est pas létale (Subramanian *et al.*, 2006). Par contre, ce même papier a démontré que la délétion de la calnexine chez *S. cerevisiae* couplée à la délétion de Pbn1p, deux délétions non létales,

provoquait la mort des cellules démontrant un lien entre les voies cellulaires impliquant ces deux protéines. Les cellules ayant la délétion d'*isp6* chez *S. pombe*, en plus d'être déficientes dans les processus de différenciation sexuelle et d'autophagie, montrent ce qui semble être un arrêt de croissance dans la fin de la phase exponentielle (Figure 24 A). En effet, des cellules haploïdes Δ *isp6* n'atteignent par une densité optique plus élevée que 4 en milieu minimum contrairement à une densité optique de 8 pouvant être atteinte par des cellules sauvages. De la même façon, le clivage de la calnexine est totalement absent dans les cellules Δ *isp6* alors que le clivage se produit en tout premier lieu environ à une DO près de 1 dans les cellules sauvages pour être complet à une densité optique équivalente à environ 7. L'implication d'une protéase nécessaire au bon déroulement du processus autophagique chez la levure *S. pombe* dans le clivage de la calnexine en conditions normales apporte de nombreuses questions par rapport aux voies cellulaires nécessitant ce clivage. Bien que l'on ne sache pas encore si Isp6p est la protéase responsable du clivage de la calnexine ou si sa délétion a des conséquences sur les processus cellulaires permettant l'inhibition du clivage, il est clair que cette protéase a des effets notoires sur la cellule et qu'elle est liée de près ou de loin à l'action de la calnexine. La calnexine est-elle nécessaire à l'autophagie des cellules? Le clivage de la calnexine répond-t-il à un signal pré-autophagique? Les cellules contenant une version luminale de la calnexine sont-elles capables d'induire l'autophagie? Le vieillissement des cellules en phase stationnaire nécessite-t-il un processus autophagique? Une version luminale de la calnexine est-elle aussi viable en phase stationnaire qu'une version sauvage?

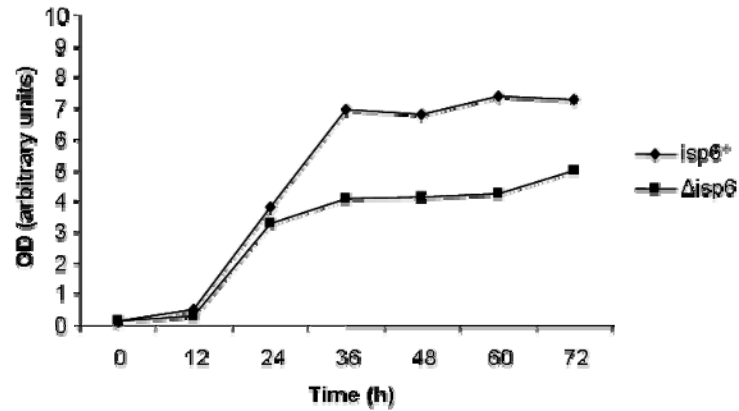
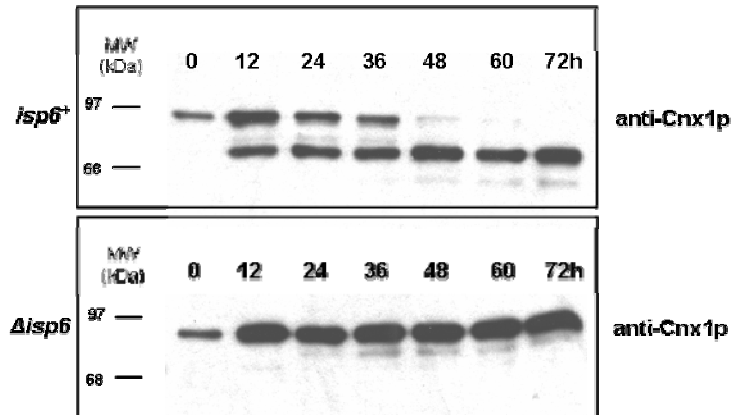
A**B**

Figure 24: Courbe de croissance et cinétique de clivage de la calnexine dans les cellules *isp6*⁺ et Δ *isp6*. (A) La densité optique des cellules (DO_{595}) *isp6*⁺ et Δ *isp6* a été mesurée à chaque période de temps indiquée. (B) Des échantillons de 10 μ g d'extraits protéiques de cellules *isp6*⁺ et Δ *isp6* à différents temps ont été chargés sur gel SDS-PAGE 10% (wt/vol). La calnexine a été détectée par immunobuvardage de type western à l'aide d'anticorps anti-Cnx1p

CONCLUSIONS

Suite à ces études, de nombreuses questions ont été révélées au grand jour et plus de questions ont été posées que répondues. Par contre, une toute nouvelle voie impliquant une protéine perçue pendant de nombreuses années comme un chaperone exclusivement impliquée dans le processus de repliement des protéines s'ouvre faisant état de rôles importants dans des voies cellulaires aussi fondamentales que les voies de vie et de mort des cellules. Les voies régissant la survie et la mort des cellules sont intimement liées par leur caractère interdépendant puisqu'il faut empêcher la mort si l'on veut survivre et vice versa. La voie d'indépendance à la calnexine qui n'est pas le sujet de la présente thèse est par contre intimement liée à ces recherches sur la fonction essentielle de la calnexine. L'état épigénétique appelé Cin est un état de survie totalement indépendant de la présence de la calnexine et par le fait même de sa fonction essentielle. Une meilleure caractérisation de l'état Cin permettra certainement une meilleure compréhension de l'essentialité de la calnexine. Beaucoup de questions par rapport au phénomène Cin et au rôle que joue la calnexine dans le phénomène apoptotique restent sans réponses : le mutant de la calnexine dépourvu du domaine central conservé appelé Δhcd_Cnx1p induit-il un phénomène épigénétique modifiant intrinsèquement les cellules dans leurs voies de survie par sa liaison avec un partenaire particulier de la calnexine? Le mutant Δhcd_Cnx1p subit-il un clivage alternatif de par sa structure particulière? Le mutant Δhcd_Cnx1p interagit-il avec un de ces partenaires d'une façon à modifier son effet sur celui-ci? La surexpression de la

protéine Cif1p, une protéine nucléolaire impliquée dans la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire, modifie-t-elle l'état cellulaire de la cellule au point de rendre la calnexine accessoire? Des données non publiées font état d'une régulation positive des ARNm des gènes codant pour Isp6p et Cta3p (l'homologue de SERCA chez la levure *S. pombe*) lorsque Cif1p est surexprimé. Se pourrait-il que ce dérèglement soit suffisant pour palier l'action naturelle de la calnexine? La régulation à la hausse de Cta3p dérègle-t-il l'homéostasie du calcium du RE rendant les niveaux calciques de celui-ci plus élevé, et abolissant ainsi peut-être un effet particulier de la calnexine? La régulation positive de Isp6 enclenche-t-elle plus tôt que prévu l'autophagie rendant l'action de la calnexine accessoire? Beaucoup de ces questions devront être répondues afin de connaître plus exactement les actions entreprises, les régulations effectuées, les interactions provoqués et les signaux envoyés par la calnexine mais tout ceci n'est en fait que le commencement de belles découvertes à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Abelson, J., Trotta, C.R., and Li, H. (1998). tRNA splicing. *J Biol Chem* 273, 12685-12688.
- Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y.M., Schloemer, A., Schmithorst, V.J., Lorenz, J.N., Dunn, R.S., Vorhees, C.V., Wills-Karp, M., Degen, J.L., Davis, R.J., Mizushima, N., Rakic, P., Dardzinski, B.J., Holland, S.K., Sharp, F.R., and Kuan, C.Y. (2006). Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *The American journal of pathology* 169, 566-583.
- Adler, H.T., Chinery, R., Wu, D.Y., Kussick, S.J., Payne, J.M., Fornace, A.J., Jr., and Tkachuk, D.C. (1999). Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* 19, 7050-7060.
- Ahn, S.H., Cheung, W.L., Hsu, J.Y., Diaz, R.L., Smith, M.M., and Allis, C.D. (2005). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 120, 25-36.
- Ahn, S.H., Diaz, R.L., Grunstein, M., and Allis, C.D. (2006). Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol Cell* 24, 211-220.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2003). Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. *J Biol Chem* 278, 18146-18153.
- Alder, N.N., Shen, Y., Brodsky, J.L., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (2005). The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168, 389-399.
- Almeida, B., Ohlmeier, S., Almeida, A.J., Madeo, F., Leao, C., Rodrigues, F., and Ludovico, P. (2009). Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* 9, 720-732.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H., Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 1309-1314.
- Arunachalam, B., and Cresswell, P. (1995). Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J Biol Chem* 270, 2784-2790.

- Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., and Lederkremer, G.Z. (2008). Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation. *Mol Biol Cell* *19*, 216-225.
- Balzan, R., Sapienza, K., Galea, D.R., Vassallo, N., Frey, H., and Bannister, W.H. (2004). Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* *150*, 109-115.
- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* *23*, 1207-1216.
- Baumann, O., and Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* *205*, 149-214.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A., and Hampton, R.Y. (2001). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* *3*, 24-29.
- Beaulieu, H., Elagoz, A., Crine, P., and Rokeach, L.A. (1999). Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem J* *340 (Pt 3)*, 813-819.
- Belde, P.J., Vossen, J.H., Borst-Pauwels, G.W., and Theuvsenet, A.P. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *323*, 113-118.
- Belhocine, S., Mbithe, C., Dimitrova, I., Kampranis, S.C., and Makris, A.M. (2004). Yeast mutants resistant to Bax lethality reveal distinct vacuolar and mitochondrial alterations. *Cell Death Differ* *11*, 946-948.
- Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Berg, T., and Seglen, P.O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* *273*, 21883-21892.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* *4*, e423.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* *79*, 1127-1155.

- Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56, 159-193.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.
- Bettiga, M., Calzari, L., Orlandi, I., Alberghina, L., and Vai, M. (2004). Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res* 5, 141-147.
- Bianchi, M.E., and Beltrame, M. (2000). Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 1, 109-114.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171, 603-614.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1993a). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75, 717-728.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A.M., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1993b). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem* 268, 12730-12735.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
- Bohensky, J., Shapiro, I.M., Leshinsky, S., Terkhorn, S.P., Adams, C.S., and Srinivas, V. (2007). HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy* 3, 207-214.
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A., and Wolf, D.H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209-222.

- Boyce, M., and Yuan, J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13, 363-373.
- Breakefield, X.O., Kamm, C., and Hanson, P.I. (2001). TorsinA: movement at many levels. *Neuron* 31, 9-12.
- Brezniceanu, M.L., Volp, K., Bossler, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., and Zornig, M. (2003). HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J* 17, 1295-1297.
- Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23, 1292-1303.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. (2000). Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926, 1-12.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Frohlich, K.U., Sigrist, S., and Madeo, F. (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell* 25, 233-246.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., and Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* 175, 521-525.
- Byfield, M.P., Murray, J.T., and Backer, J.M. (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 280, 33076-33082.
- Cai, H., Wang, C.C., and Tsou, C.L. (1994). Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem* 269, 24550-24552.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- Caramelo, J.J., Castro, O.A., Alonso, L.G., De Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 86-91.

Caramelo, J.J., Castro, O.A., de Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J Biol Chem* 279, 46280-46285.

Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126, 361-373.

Cato, L., Stott, K., Watson, M., and Thomas, J.O. (2008). The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails. *J Mol Biol* 384, 1262-1272.

Chang, H.J., Jones, E.W., and Henry, S.A. (2002). Role of the unfolded protein response pathway in regulation of INO1 and in the sec14 bypass mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162, 29-43.

Chang, Y.Y., Juhasz, G., Goraksha-Hicks, P., Arsham, A.M., Mallin, D.R., Muller, L.K., and Neufeld, T.P. (2009). Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem Soc Trans* 37, 232-236.

Chavan, M., Chen, Z., Li, G., Schindelin, H., Lennarz, W.J., and Li, H. (2006). Dimeric organization of the yeast oligosaccharyl transferase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8947-8952.

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003a). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14, 214-229.

Chen, S.R., Dunigan, D.D., and Dickman, M.B. (2003b). Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 34, 1315-1325.

Chen, X., Shen, J., and Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277, 13045-13052.

Chevet, E., Wong, H.N., Gerber, D., Cochet, C., Fazel, A., Cameron, P.H., Gushue, J.N., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1999). Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *EMBO J* 18, 3655-3666.

Choe, C.U., and Ehrlich, B.E. (2006). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE* 2006, re15.

Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2006). Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11, 506-525.

Chung, K.T., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277, 47557-47563.

Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 *Suppl* 2, 1509-1518.

Coe, H., Bedard, K., Groenendyk, J., Jung, J., and Michalak, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress in the absence of calnexin. *Cell Stress Chaperones* 13, 497-507.

Collin, P., Beauregard, P.B., Elagoz, A., and Rokeach, L.A. (2004). A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* 117, 907-918.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Cox, J.S., Chapman, R.E., and Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 8, 1805-1814.

Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197-1206.

Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87, 391-404.

Creagh, E.M., Murphy, B.M., Duriez, P.J., Duckett, C.S., and Martin, S.J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 279, 26906-26914.

Criollo, A., Maiuri, M.C., Tasmir, E., Vitale, I., Fiebig, A.A., Andrews, D., Molgo, J., Diaz, J., Lavandro, S., Harper, F., Pierron, G., di Stefano, D., Rizzuto, R., Szabadkai, G., and Kroemer, G. (2007a). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ* 14, 1029-1039.

Criollo, A., Vicencio, J.M., Tasmir, E., Maiuri, M.C., Lavandro, S., and Kroemer, G. (2007b). The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3, 350-353.

- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., and Johnson, A.E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461-471.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23, 7198-7209.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Dargan, S.L., Lea, E.J., and Dawson, A.P. (2002). Modulation of type-1 Ins(1,4,5)P₃ receptor channels by the FK506-binding protein, FKBP12. *Biochem J* 361, 401-407.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S., and Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271, 1533-1539.
- Degtarev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Delom, F., Emadali, A., Cocolakis, E., Lebrun, J.J., Nantel, A., and Chevet, E. (2007a). Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* 14, 586-596.
- Delom, F., Fessart, D., and Chevet, E. (2007b). Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis* 12, 293-305.
- Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. (2006). A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126, 349-359.
- Denis, V., and Cyert, M.S. (2002). Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 156, 29-34.
- Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J.E., Velmurgan, S., Brown, S., Stamp, G., and Owen, M.J. (2002). Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol Cell Biol* 22, 7398-7404.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808.

- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* *18*, 5242-5251.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* *388*, 300-304.
- Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* *27*, 6245-6251.
- Distelhorst, C.W., and McCormick, T.S. (1996). Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca²⁺ fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. *Cell Calcium* *19*, 473-483.
- Dolinski, K.J., and Heitman, J. (1999). Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase. *Genetics* *151*, 935-944.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., and Grutter, M.G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* *11*, 543-549.
- Dorner, A.J., Wasley, L.C., and Kaufman, R.J. (1989). Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* *264*, 20602-20607.
- Drees, B.L., Sundin, B., Brazeau, E., Caviston, J.P., Chen, G.C., Guo, W., Kozminski, K.G., Lau, M.W., Moskow, J.J., Tong, A., Schenkman, L.R., McKenzie, A., 3rd, Brennwald, P., Longtine, M., Bi, E., Chan, C., Novick, P., Boone, C., Pringle, J.R., Davis, T.N., Fields, S., and Drubin, D.G. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol* *154*, 549-571.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* *300*, 1574-1577.
- Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. (1999). Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* *112* (*Pt 23*), 4449-4460.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 181-191.
- Ellgaard, L., and Ruddock, L.W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* *6*, 28-32.

- Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* *44*, 817-829.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43-50.
- Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L., and Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol* *183*, 5942-5955.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R., and Kepes, F. (1994). SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem* *269*, 27478-27485.
- Estrada de Martin, P., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2005). The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem Cell Biol* *83*, 752-761.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.L., Diaspro, A., Dossen, J.W., Gralla, E.B., and Longo, V.D. (2004). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *166*, 1055-1067.
- Fabrizio, P., and Longo, V.D. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 1280-1285.
- Fahrenkrog, B., Sauder, U., and Aebi, U. (2004). The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J Cell Sci* *117*, 115-126.
- Fernandez, S., Homann, M.J., Henry, S.A., and Carman, G.M. (1986). Metabolism of the phospholipid precursor inositol and its relationship to growth and viability in the natural auxotroph *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* *166*, 779-786.
- Ferrari, D., Pinton, P., Szabadkai, G., Chami, M., Campanella, M., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2002). Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. *Cell Calcium* *32*, 413-420.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., and Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* *447*, 1121-1125.

- Finger, A., Knop, M., and Wolf, D.H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur J Biochem* 218, 565-574.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., and Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 15, 1482-1494.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984). [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* 43, 1101-1111.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478.
- Fleury, C., Pampin, M., Tarze, A., and Mignotte, B. (2002). Yeast as a model to study apoptosis? *Biosci Rep* 22, 59-79.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D.H., Reithmeier, R.A., and Michalak, M. (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264, 21522-21528.
- Fourie, A.M., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem* 269, 30470-30478.
- Frohlich, K.U., Fussi, H., and Ruckstuhl, C. (2007). Yeast apoptosis--from genes to pathways. *Semin Cancer Biol* 17, 112-121.
- Gardner, R.G., Shearer, A.G., and Hampton, R.Y. (2001). In vivo action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol Cell Biol* 21, 4276-4291.
- Gauss, R., Sommer, T., and Jarosch, E. (2006). The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *EMBO J* 25, 1827-1835.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-472.
- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de La Cruz, F.J., and Romisch, K. (1999). Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* 147, 1443-1456.

- Gonzalez, T.N., Sidrauski, C., Dorfler, S., and Walter, P. (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* *18*, 3119-3132.
- Granot, D., Levine, A., and Dor-Hefetz, E. (2003). Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Res* *4*, 7-13.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* *305*, 626-629.
- Groenendyk, J., Lynch, J., and Michalak, M. (2004). Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells* *17*, 383-389.
- Groenendyk, J., and Michalak, M. (2005). Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* *52*, 381-395.
- Groenendyk, J., Zuppini, A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (2006). Caspase 12 in calnexin-deficient cells. *Biochemistry* *45*, 13219-13226.
- Guerin, R., Arseneault, G., Dumont, S., and Rokeach, L.A. (2008). Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Mol Biol Cell* *19*, 4404-4420.
- Haas, I.G., and Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* *306*, 387-389.
- Hajjar, F., Beaugard, P.B., and Rokeach, L.A. (2007). The 160 N-terminal residues of calnexin define a novel region supporting viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *24*, 89-103.
- Hamann, A., Brust, D., and Osiewacz, H.D. (2008). Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends Microbiol* *16*, 276-283.
- Hammann, R., and Kutzner, H.J. (1998). Key enzymes for the degradation of benzoate, m- and p-hydroxybenzoate by some members of the order Actinomycetales. *J Basic Microbiol* *38*, 207-220.
- Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 913-917.

- Hann, B.C., and Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* 67, 131-144.
- Harada, H., and Grant, S. (2003). Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7, 117-138.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000b). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5, 897-904.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., and Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
- Hatahet, F., and Ruddock, L.W. (2007). Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J* 274, 5223-5234.
- Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Frohlich, K.U., Madeo, F., and Lehle, L. (2006). Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol Microbiol* 59, 765-778.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787-3799.
- Heath-Engel, H.M., Chang, N.C., and Shore, G.C. (2008). The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27, 6419-6433.
- Hebert, D.N., Garman, S.C., and Molinari, M. (2005). The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol* 15, 364-370.
- Hebert, D.N., and Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87, 1377-1408.

Hebert, D.N., Zhang, J.X., Chen, W., Foellmer, B., and Helenius, A. (1997). The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J Cell Biol* 139, 613-623.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., and Alnemri, E.S. (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 278, 38699-38706.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.

Hendershot, L.M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 71, 289-297.

Hengartner, M.O. (1999). Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 54, 213-222; discussion 222-214.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164, 501-507.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., and Korsmeyer, S.J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572-576.

Hill, K., and Cooper, A.A. (2000). Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *EMBO J* 19, 550-561.

Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-450.

Hippert, M.M., O'Toole, P.S., and Thorburn, A. (2006). Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 66, 9349-9351.

Hollander, M.C., Poola-Kella, S., and Fornace, A.J., Jr. (2003). Gadd34 functional domains involved in growth suppression and apoptosis. *Oncogene* 22, 3827-3832.

Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Yu, K., Zhan, Q., Iglesias, M., Woodworth, C., and Fornace, A.J., Jr. (2001). Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors. *Int J Cancer* 96, 22-31.

- Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313, 104-107.
- Holmstrom, K., Brandt, T., and Kallesoe, T. (1994). The sequence of a 32,420 bp segment located on the right arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10 Suppl A, S47-62.
- Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.M., Gogia, R.K., Li, M., and Lee, A.S. (2004). Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 279, 11354-11363.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 491-498.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-422.
- Howell, D.N., Andreotti, P.E., Dawson, J.R., and Cresswell, P. (1985). Natural killing target antigens as inducers of interferon: studies with an immunoselected, natural killing-resistant human T lymphoblastoid cell line. *J Immunol* 134, 971-976.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., and Exton, J.H. (2004). Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 279, 49420-49429.
- Huang, Q., Deveraux, Q.L., Maeda, S., Salvesen, G.S., Stennicke, H.R., Hammock, B.D., and Reed, J.C. (2000). Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1427-1432.
- Hughes, A.R., Horstman, D.A., Takemura, H., and Putney, J.W., Jr. (1990). Inositol phosphate metabolism and signal transduction. *Am Rev Respir Dis* 141, S115-118.
- Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2002). Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* 29, 649-659.
- Huyer, G., Piluek, W.F., Fansler, Z., Kreft, S.G., Hochstrasser, M., Brodsky, J.L., and Michaelis, S. (2004). Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279, 38369-38378.

- Hwang, C., Sinskey, A.J., and Lodish, H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* *257*, 1496-1502.
- Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T., and Evan, G. (1997). Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *17*, 2468-2474.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4569-4574.
- Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, E. (2006). Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem* *281*, 4035-4041.
- Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y., and Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* *2*, 423-430.
- James, C., Gschmeissner, S., Fraser, A., and Evan, G.I. (1997). CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* *7*, 246-252.
- Janicke, R.U., Walker, P.A., Lin, X.Y., and Porter, A.G. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* *15*, 6969-6978.
- Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A.J., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. (1998). Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* *37*, 17253-17261.
- Jannatipour, M., and Rokeach, L.A. (1995). The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* *270*, 4845-4853.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* *4*, 134-139.
- Jessop, C.E., Chakravarthi, S., Garbi, N., Hammerling, G.J., Lovell, S., and Bulleid, N.J. (2007). ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J* *26*, 28-40.

Jessop, C.E., Chakravarthi, S., Watkins, R.H., and Bulleid, N.J. (2004). Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans* 32, 655-658.

Jessop, C.E., Tavender, T.J., Watkins, R.H., Chambers, J.E., and Bulleid, N.J. (2008). Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin. *J Biol Chem*.

Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4, 139-163.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., and Penninger, J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Jurgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M., Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Reed, J.C., and Otilie, S. (1997). Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 8, 325-339.

Kalies, K.U., Gorlich, D., and Rapoport, T.A. (1994). Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* 126, 925-934.

Kalies, K.U., Rapoport, T.A., and Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* 141, 887-894.

Kanazawa, T., Taneike, I., Akaishi, R., Yoshizawa, F., Furuya, N., Fujimura, S., and Kadowaki, M. (2004). Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 279, 8452-8459.

Kang, M.H., Park, E.H., and Lim, C.J. (2007). Protective role and regulation of Rad9 from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* 275, 270-277.

Kang, S.W., Rane, N.S., Kim, S.J., Garrison, J.L., Taunton, J., and Hegde, R.S. (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127, 999-1013.

Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70, 755-775.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* *26*, 239-257.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* *462*, 245-253.
- King, D.A., Hannum, D.M., Qi, J.S., and Hurst, J.K. (2004). HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* *423*, 170-181.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P., and Jackson, W.T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* *2*, 301-314.
- Kissova, I., Plamondon, L.T., Brisson, L., Priault, M., Renouf, V., Schaeffer, J., Camougrand, N., and Manon, S. (2006). Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast. *J Biol Chem* *281*, 36187-36197.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 343-349.
- Klig, L.S., Antonsson, B., Schmid, E., and Friedli, L. (1991). Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* genes share common regulation. *Yeast* *7*, 325-336.
- Klig, L.S., and Henry, S.A. (1984). Isolation of the yeast *INO1* gene: located on an autonomously replicating plasmid, the gene is fully regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3816-3820.
- Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* *118*, 7-18.
- Knauer, R., and Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the *OST6* gene, its synthetic interaction with *OST3*, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* *274*, 17249-17256.
- Knorre, D.A., Smirnova, E.A., and Severin, F.F. (2005). Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* *70*, 264-266.

- Kohda, T.A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M., and Yamamoto, M. (2007). Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes Cells* *12*, 155-170.
- Kokame, K., Kato, H., and Miyata, T. (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* *276*, 9199-9205.
- Koltin, Y., Faucette, L., Bergsma, D.J., Levy, M.A., Cafferkey, R., Koser, P.L., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1991). Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol Cell Biol* *11*, 1718-1723.
- Komatsu, K., Hopkins, K.M., Lieberman, H.B., and Wang, H. (2000a). *Schizosaccharomyces pombe* Rad9 contains a BH3-like region and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2. *FEBS Lett* *481*, 122-126.
- Komatsu, K., Miyashita, T., Hang, H., Hopkins, K.M., Zheng, W., Cuddeback, S., Yamada, M., Lieberman, H.B., and Wang, H.G. (2000b). Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis. *Nat Cell Biol* *2*, 1-6.
- Konishi, Y., Lehtinen, M., Donovan, N., and Bonni, A. (2002). Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell* *9*, 1005-1016.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* *54*, 631-664.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., and Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* *278*, 294-298.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* *14*, 230-239.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* *299*, 1-34.

- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.
- Kuhn, K.M., DeRisi, J.L., Brown, P.O., and Sarnow, P. (2001). Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol Cell Biol* 21, 916-927.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
- Kundu, M., and Thompson, C.B. (2008). Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 3, 427-455.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U., and Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 39, 1166-1173.
- Laun, P., Ramachandran, L., Jarolim, S., Herker, E., Liang, P., Wang, J., Weinberger, M., Burhans, D.T., Suter, B., Madeo, F., Burhans, W.C., and Breitenbach, M. (2005). A comparison of the aging and apoptotic transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5, 1261-1272.
- Lee, A.S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26, 504-510.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398-1401.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16, 452-466.
- Lee, M.W., Hirai, I., and Wang, H.G. (2003). Caspase-3-mediated cleavage of Rad9 during apoptosis. *Oncogene* 22, 6340-6346.

- Lee, R.E., Puente, L.G., Kaern, M., and Megeney, L.A. (2008). A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *PLoS ONE* 3, e2956.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Levine, B., Sinha, S., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4, 600-606.
- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E.W., Clurman, B.E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J.M., and Ross, R. (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1, 553-563.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., and Zhou, B. (2006). Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Mol Biol Cell* 17, 1802-1811.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8, 688-699.
- Liang, Q., Li, W., and Zhou, B. (2008). Caspase-independent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1311-1319.
- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 72, 8586-8596.
- Lieberman, H.B. (2006). Rad9, an evolutionarily conserved gene with multiple functions for preserving genomic integrity. *J Cell Biochem* 97, 690-697.

- Lievremont, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997). BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 272, 30873-30879.
- Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K.U., and Wolf, D.H. (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett* 438, 61-65.
- Ligr, M., Velten, I., Frohlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Frohlich, K.U., Wolf, D.H., and Hilt, W. (2001). The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 2422-2432.
- Lim, H.W., Kim, S.J., Park, E.H., and Lim, C.J. (2007). Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* 53, 1016-1023.
- Lin, K.I., Lin, Y., and Calame, K. (2000). Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol Cell Biol* 20, 8684-8695.
- Liu, C.Y., and Kaufman, R.J. (2003). The unfolded protein response. *J Cell Sci* 116, 1861-1862.
- Liu, C.Y., Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2000). Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 24881-24885.
- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Liu, Q.A., and Hengartner, M.O. (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 887, 92-104.
- Longo, V.D., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Valentine, J.S., and Gralla, E.B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol* 137, 1581-1588.
- Low, C.P., Liew, L.P., Pervaiz, S., and Yang, H. (2005). Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 5, 1199-1206.
- Low, C.P., Shui, G., Liew, L.P., Buttner, S., Madeo, F., Dawes, I.W., Wenk, M.R., and Yang, H. (2008). Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *J Cell Sci* 121, 2671-2684.

- Low, C.P., and Yang, H. (2008). Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1335-1349.
- Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H., and Nicholson, L.K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3, 619-629.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leao, C., and Corte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147, 2409-2415.
- Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., and Thompson, C.B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 439-448.
- Ma, K., Vattam, K.M., and Wek, R.C. (2002a). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 277, 18728-18735.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002b). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318, 1351-1365.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107, 827-830.
- Maattanen, P., Kozlov, G., Gehring, K., and Thomas, D.Y. (2006). ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem Cell Biol* 84, 881-889.
- MacNeill, S.A. (2002). Genome sequencing: and then there were six. *Curr Biol* 12, R294-296.
- Madeo, F., Frohlich, E., and Frohlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Frohlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.

- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* *26*, 2527-2539.
- Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S., and Wilson, D.B. (1986). The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* *234*, 1519-1526.
- Majumder, A.L., Johnson, M.D., and Henry, S.A. (1997). 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta* *1348*, 245-256.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 716-731.
- Malviya, A.N., and Klein, C. (2006). Mechanism regulating nuclear calcium signaling. *Can J Physiol Pharmacol* *84*, 403-422.
- Marchetti, M.A., Weinberger, M., Murakami, Y., Burhans, W.C., and Huberman, J.A. (2006). Production of reactive oxygen species in response to replication stress and inappropriate mitosis in fission yeast. *J Cell Sci* *119*, 124-131.
- Marciniak, S.J., and Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* *86*, 1133-1149.
- Marechal, A., Tanguay, P.L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G., and Rokeach, L.A. (2004). Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* *380*, 441-448.
- Maskell, D.L., Kennedy, A.I., Hodgson, J.A., and Smart, K.A. (2003). Chronological and replicative lifespan of polyploid *Saccharomyces cerevisiae* (syn. *S. pastorianus*). *FEMS Yeast Res* *3*, 201-209.
- Massey, A.C., Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* *73*, 205-235.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* *97*, 553-564.
- Matlack, K.E., Mothes, W., and Rapoport, T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* *92*, 381-390.

- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y., and Akira, S. (1996). Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett* 395, 143-147.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., and Reed, J.C. (1998). The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1, 327-336.
- Maytin, E.V., Ubeda, M., Lin, J.C., and Habener, J.F. (2001). Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res* 267, 193-204.
- Mazzoni, C., and Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1320-1327.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Madeo, F., and Falcone, C. (2005). Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep* 6, 1076-1081.
- Mazzoni, C., Mancini, P., Verdone, L., Madeo, F., Serafini, A., Herker, E., and Falcone, C. (2003). A truncated form of KILsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 721-729.
- McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132, 291-298.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-1259.
- McKay, D.B. (1993). Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv Protein Chem* 44, 67-98.
- McMaster, C.R. (2001). Lipid metabolism and vesicle trafficking: more than just greasing the transport machinery. *Biochem Cell Biol* 79, 681-692.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Meldolesi, J., Krause, K.H., and Michalak, M. (1996). Calreticulin: how many functions in how many cellular compartments? Como, April 1996. *Cell Calcium* 20, 83-86.

- Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1998). The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J Cell Biol* 142, 1395-1398.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7, 766-772.
- Meusser, B., and Sommer, T. (2004). Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation. *Mol Cell* 14, 247-258.
- Mitsui, K., Nakagawa, D., Nakamura, M., Okamoto, T., and Tsurugi, K. (2005). Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett* 579, 723-727.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-272.
- Mohan, C., and Lee, G.M. (2008). Calnexin overexpression sensitizes recombinant CHO cells to apoptosis induced by sodium butyrate treatment. *Cell Stress Chaperones*.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., and Paganetti, P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397-1400.
- Mordier, S., Deval, C., Bechet, D., Tassa, A., and Ferrara, M. (2000). Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 29900-29906.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1993). A transmembrane protein with a *cdc2+*/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743-756.

- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J.F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J* *11*, 2583-2593.
- Mortimore, G.E., and Poso, A.R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* *7*, 539-564.
- Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* *13*, 3973-3982.
- Movsichoff, F., Castro, O.A., and Parodi, A.J. (2005). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* ER alpha-mannosidase: a reevaluation of the role of the enzyme on ER-associated degradation. *Mol Biol Cell* *16*, 4714-4724.
- Mutka, S.C., and Walter, P. (2001). Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell* *12*, 577-588.
- Mutoh, N., and Kitajima, S. (2007). Accelerated chronological aging of a mutant fission yeast deficient in both glutathione and superoxide dismutase having cu and zn as cofactors and its enhancement by sir2 deficiency. *Biosci Biotechnol Biochem* *71*, 2841-2844.
- Naik, R.R., Nebes, V., and Jones, E.W. (1997). Regulation of the proteinase B structural gene PRB1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *179*, 1469-1474.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., and Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* *306*, 1037-1040.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzell, E., Burns, K., Fadel, M.P., Lozyk, M., Goping, I.S., Opas, M., Bleackley, R.C., Green, D.R., and Michalak, M. (2000). Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* *150*, 731-740.
- Nakashima, A., Hasegawa, T., Mori, S., Ueno, M., Tanaka, S., Ushimaru, T., Sato, S., and Uritani, M. (2006). A starvation-specific serine protease gene, *isp6+*, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* *49*, 403-413.
- Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., and Uritani, M. (2002a). Involvement of a CCAAT-binding complex in the expression of a nitrogen-starvation-specific gene, *isp6+*, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* *66*, 2224-2227.

- Nakashima, A., Yoshida, M., Nakayama, K., Kato-Furuno, A., Ueno, M., Ushimaru, T., and Uritani, M. (2002b). Genes for a nuclease and a protease are involved in the drastic decrease in cellular RNA amount in fission yeast cells during nitrogen starvation. *J Biochem* *131*, 391-398.
- Nakatsukasa, K., and Brodsky, J.L. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* *9*, 861-870.
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K., and Endo, T. (2001). Mnl1p, an alpha -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem* *276*, 8635-8638.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., and Sommer, T. (2005). Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* *7*, 993-998.
- Newman, J.R., and Keating, A.E. (2003). Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* *300*, 2097-2101.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* *112*, 481-490.
- Ng, D.T., Brown, J.D., and Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* *134*, 269-278.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., and Pickett, C.B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *43*, 233-260.
- Nielsen, E. (2008). Investigating lipid signalling: it's all about finding the right PI. *Biochem J* *413*, e5-6.
- Nishikawa, S., Brodsky, J.L., and Nakatsukasa, K. (2005). Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem* *137*, 551-555.
- Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., and Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* *153*, 1061-1070.

- Niwa, M., Patil, C.K., DeRisi, J., and Walter, P. (2005). Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biol* 6, R3.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J., and Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14238-14243.
- Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273, 3963-3966.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., and Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* 22, 1180-1187.
- Nunez, L.R., Jesch, S.A., Gaspar, M.L., Almaguer, C., Villa-Garcia, M., Ruiz-Noriega, M., Patton-Vogt, J., and Henry, S.A. (2008). Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J Biol Chem* 283, 34204-34217.
- Oberst, A., Bender, C., and Green, D.R. (2008). Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ* 15, 1139-1146.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., and Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26, 9220-9231.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727-731.
- Ogawa, N., and Mori, K. (2004). Autoregulation of the HAC1 gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes Cells* 9, 95-104.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 24, 1243-1255.

- Oikawa, D., Kimata, Y., and Kohno, K. (2007). Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *J Cell Sci* *120*, 1681-1688.
- Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell* *28*, 544-554.
- Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2004). Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *279*, 16071-16076.
- Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* *280*, 31582-31586.
- Oono, K., Yoneda, T., Manabe, T., Yamagishi, S., Matsuda, S., Hitomi, J., Miyata, S., Mizuno, T., Imaizumi, K., Katayama, T., and Tohyama, M. (2004). JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1. *Neurochem Int* *45*, 765-772.
- Owsianowski, E., Walter, D., and Fahrenkrog, B. (2008). Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 1303-1310.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of clinical investigation* *109*, 525-532.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2003). Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol* *225*, 229-272.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* *30*, 806-824.
- Palmer, C.P., Zhou, X.L., Lin, J., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y. (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7801-7805.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* *81*, 561-570.
- Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995a). The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J* *14*, 3064-3072.

- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995b). *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* *270*, 244-253.
- Parodi, A.J. (1999). Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta* *1426*, 287-295.
- Parodi, A.J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* *69*, 69-93.
- Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F., and Carminatti, H. (1972). The role of polyprenol-bound saccharides as intermediates in glycoprotein synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 3268-3272.
- Parrish, J.Z., and Xue, D. (2003). Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol Cell* *11*, 987-996.
- Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 349-355.
- Patil, C.K., Li, H., and Walter, P. (2004). Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biol* *2*, E246.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927-939.
- Pereira, C., Silva, R.D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M.J., and Corte-Real, M. (2008). Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 1286-1302.
- Perez-Sala, D., and Mollinedo, F. (1995). Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *Journal of cellular physiology* *163*, 523-531.
- Pety de Thozee, C., and Ghislain, M. (2006). ER-associated degradation of membrane proteins in yeast. *ScientificWorldJournal* *6*, 967-983.
- Pidoux, A.L., and Armstrong, J. (1992). Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* *11*, 1583-1591.
- Piper, P.W. (2006). Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast* *23*, 215-226.

- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K., and Wolf, D.H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* 273, 32848-32856.
- Poliakova, D., Sokolikova, B., Kolarov, J., and Sabova, L. (2002). The antiapoptotic protein Bcl-x(L) prevents the cytotoxic effect of Bax, but not Bax-induced formation of reactive oxygen species, in *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 148, 2789-2795.
- Pool, M.R. (2005). Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol* 22, 3-15.
- Pouyssegur, J., Shiu, R.P., and Pastan, I. (1977). Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* 11, 941-947.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., and Severin, F.F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168, 257-269.
- Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K.W., Vallette, F.M., and Manon, S. (2003). Yeast as a tool to study Bax/mitochondrial interactions in cell death. *FEMS Yeast Res* 4, 15-27.
- Prindull, G. (1995). Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31A, 116-123.
- Prinz, A., Hartmann, E., and Kalies, K.U. (2000). Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 381, 1025-1029.
- Puig, A., and Gilbert, H.F. (1994). Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme. *J Biol Chem* 269, 25889-25896.
- Qi, H., Li, T.K., Kuo, D., Nur, E.K.A., and Liu, L.F. (2003). Inactivation of Cdc13p triggers MEC1-dependent apoptotic signals in yeast. *J Biol Chem* 278, 15136-15141.
- Qin, H., and Lu, M. (2006). Natural variation in replicative and chronological life spans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Gerontol* 41, 448-456.
- Qiu, J., Yoon, J.H., and Shen, B. (2005). Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J Biol Chem* 280, 15370-15379.

- Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* *135*, 1441-1455.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* *450*, 663-669.
- Rapoport, T.A., Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B., and Staeck, O. (1999). Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* *380*, 1143-1150.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* *11*, 1107-1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* *36*, 585-595.
- Reed, J.C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology* *157*, 1415-1430.
- Reggiori, F. (2006). 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol* *74*, 1-30.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* *412*, 300-307.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., and Schmitt, M.J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol* *168*, 353-358.
- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* *117*, 773-786.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* *104*, 791-800.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 405-413.

- Rinnerthaler, M., Jarolim, S., Heeren, G., Palle, E., Perju, S., Klinger, H., Bogengruber, E., Madeo, F., Braun, R.J., Breitenbach-Koller, L., Breitenbach, M., and Laun, P. (2006). MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757, 631-638.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763-1766.
- Rockenfeller, P., and Madeo, F. (2008). Apoptotic death of ageing yeast. *Exp Gerontol* 43, 876-881.
- Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. (2000). Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 149, 1235-1248.
- Roitsch, T., and Lehle, L. (1988). Post-translational translocation of polypeptides across the mammalian endoplasmic reticulum membrane is size and ribosome dependent. *Eur J Biochem* 174, 699-705.
- Ron, D., and Oyadomari, S. (2004). Lipid phase perturbations and the unfolded protein response. *Dev Cell* 7, 287-288.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Rong, Y.P., Barr, P., Yee, V.C., and Distelhorst, C.W. (2008). Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochim Biophys Acta*.
- Rose, M.D., Misra, L.M., and Vogel, J.P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57, 1211-1221.
- Roth, J., Ziak, M., and Zuber, C. (2003). The role of glucosidase II and endomannosidase in glucose trimming of asparagine-linked oligosaccharides. *Biochimie* 85, 287-294.
- Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L.A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5, 345-357.

- Ruegsegger, U., Leber, J.H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 103-114.
- Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A., and Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* *7*, 179-192.
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* *78*, 35-43.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* *391*, 96-99.
- Saris, N., Holkeri, H., Craven, R.A., Stirling, C.J., and Makarow, M. (1997). The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denatured protein aggregates. *J Cell Biol* *137*, 813-824.
- Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., and Rubinsztein, D.C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* *170*, 1101-1111.
- Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2006). Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy* *2*, 132-134.
- Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2008). Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol Biosyst* *4*, 895-901.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G., and et al. (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9238-9242.
- Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D.A., and Matsuyama, S. (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* *5*, 320-329.
- Scarlati, F., Granata, R., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2008). Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ*.

- Schelhaas, M., Malmstrom, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grunewald, K., and Helenius, A. (2007). Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* *131*, 516-529.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R.J. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* *7*, 1165-1176.
- Schmid, D., and Munz, C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* *27*, 11-21.
- Schmitt, M.J., and Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol* *4*, 212-221.
- Schroder, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* *65*, 862-894.
- Schroder, M., Chang, J.S., and Kaufman, R.J. (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev* *14*, 2962-2975.
- Schroder, M., Clark, R., Liu, C.Y., and Kaufman, R.J. (2004). The unfolded protein response represses differentiation through the RPD3-SIN3 histone deacetylase. *EMBO J* *23*, 2281-2292.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* *74*, 739-789.
- Schuberth, C., and Buchberger, A. (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* *7*, 999-1006.
- Schuler, M., and Green, D.R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* *29*, 684-688.
- Scott, F.L., Denault, J.B., Riedl, S.J., Shin, H., Renatus, M., and Salvesen, G.S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* *24*, 645-655.
- Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* *7*, 167-178.

Selye, H. (1985). The nature of stress. *Basal Facts* 7, 3-11.

Severin, F.F., and Hyman, A.A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, R233-235.

Severin, F.F., Meer, M.V., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., and Skulachev, V.P. (2008). Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1350-1353.

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., and Staudt, L.M. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81-93.

Shaltiel, G., Shamir, A., Shapiro, J., Ding, D., Dalton, E., Bialer, M., Harwood, A.J., Belmaker, R.H., Greenberg, M.L., and Agam, G. (2004). Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biol Psychiatry* 56, 868-874.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3, 99-111.

Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2005). ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell* 16, 40-50.

Sidrauski, C., Cox, J.S., and Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 87, 405-413.

Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031-1039.

Silke, J., Ekert, P.G., Day, C.L., Hawkins, C.J., Baca, M., Chew, J., Pakusch, M., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2001). Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *EMBO J* 20, 3114-3123.

Silva, R.D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M.T., Peinado, J.M., and Corte-Real, M. (2005). Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58, 824-834.

- Simon, S.M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* *65*, 371-380.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* *1*, REVIEWS1011.
- Sitia, R., and Meldolesi, J. (1992). Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell* *3*, 1067-1072.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., and Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* *144*, 281-292.
- Spode, I., Maiwald, D., Hollenberg, C.P., and Suckow, M. (2002). ATF/CREB sites present in sub-telomeric regions of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes are part of promoters and act as UAS/URS of highly conserved COS genes. *J Mol Biol* *319*, 407-420.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *167*, 35-41.
- Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name? *Mol Cell* *30*, 123-135.
- Steiner, S., and Lester, R.L. (1972). Studies on the diversity of inositol-containing yeast phospholipids: incorporation of 2-deoxyglucose into lipid. *J Bacteriol* *109*, 81-88.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* *1477*, 299-306.
- Strich, R., Surosky, R.T., Steber, C., Dubois, E., Messenguy, F., and Esposito, R.E. (1994). UME6 is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development. *Genes Dev* *8*, 796-810.
- Stroobants, A.K., Hetteema, E.H., van den Berg, M., and Tabak, H.F. (1999). Enlargement of the endoplasmic reticulum membrane in *Saccharomyces cerevisiae* is not necessarily linked to the unfolded protein response via Ire1p. *FEBS Lett* *453*, 210-214.
- Stros, M., Launholt, D., and Grasser, K.D. (2007). The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* *64*, 2590-2606.

Subramanian, S., Woolford, C.A., Drill, E., Lu, M., and Jones, E.W. (2006). Pbn1p: an essential endoplasmic reticulum membrane protein required for protein processing in the endoplasmic reticulum of budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 939-944.

Sun, Q., Bi, L., Su, X., Tsurugi, K., and Mitsui, K. (2007). Valproate induces apoptosis by inducing accumulation of neutral lipids which was prevented by disruption of the SIR2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *581*, 3991-3995.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001a). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* *20*, 5971-5981.

Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *581*, 2156-2161.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001b). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* *8*, 613-621.

Szegezdi, E., Fitzgerald, U., and Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* *1010*, 186-194.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* *7*, 880-885.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* *119*, 301-311.

Takizawa, T., Tatematsu, C., Watanabe, K., Kato, K., and Nakanishi, Y. (2004). Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli: implication for the regulation of apoptosis. *J Biochem* *136*, 399-405.

Taloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H.W.t., Leib, D.A., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Eskelinen, E.L., and Levine, B. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 190-195.

Taxis, C., Hitt, R., Park, S.H., Deak, P.M., Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* *278*, 35903-35913.

Thammavongsa, V., Mancino, L., and Raghavan, M. (2005). Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein. *J Biol Chem* *280*, 33497-33505.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* *281*, 1312-1316.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., and Nicholson, D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 17907-17911.

Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R.J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev* *14*, 2725-2736.

Toikkanen, J., Gatti, E., Takei, K., Saloheimo, M., Olkkonen, V.M., Soderlund, H., De Camilli, P., and Keranen, S. (1996). Yeast protein translocation complex: isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 beta subunit. *Yeast* *12*, 425-438.

Tomassini, B., Malisan, F., Franchi, L., Nicolo, C., Calvo, G.B., Saito, T., and Testi, R. (2004). Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *FASEB J* *18*, 1553-1555.

Tong, A.H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., Quondam, M., Zucconi, A., Hogue, C.W., Fields, S., Boone, C., and Cesareni, G. (2002). A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* *295*, 321-324.

Tooze, J., Hollinshead, M., Ludwig, T., Howell, K., Hoflack, B., and Kern, H. (1990). In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol* *111*, 329-345.

Torgler, C.N., de Tiani, M., Raven, T., Aubry, J.P., Brown, R., and Meldrum, E. (1997). Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1. *Cell Death Differ* *4*, 263-271.

Trancikova, A., Weisova, P., Kissova, I., Zeman, I., and Kolarov, J. (2004). Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-xL. *FEMS Yeast Res* *5*, 149-156.

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

Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 246-255.

Tufi, R., Panaretakis, T., Bianchi, K., Criollo, A., Fazi, B., Di Sano, F., Tesniere, A., Kepp, O., Paterlini-Brechot, P., Zitvogel, L., Piacentini, M., Szabadkai, G., and Kroemer, G. (2008). Reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ* *15*, 274-282.

Turcotte, C., Roux, A., Beauregard, P.B., Guerin, R., Senechal, P., Hajjar, F., and Rokeach, L.A. (2007). The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* *7*, 196-208.

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *403*, 623-627.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664-666.

Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Rivicova, M., Jacq, C., and Palkova, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem* *279*, 37973-37981.

Vachova, L., and Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* *169*, 711-717.

Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* *427*, 36-44.

van der Sanden, M.H., Houweling, M., van Golde, L.M., and Vaandrager, A.B. (2003). Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* *369*, 643-650.

- Vashist, S., and Ng, D.T. (2004). Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* *165*, 41-52.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., and Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* *3*, 944-950.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J., 2nd, Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* *266*, 19599-19610.
- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A.J., Klussmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., Nygren, P.A., van Wijk, K.J., and de Gier, J.W. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* *6*, 1527-1550.
- Wallach, D., Kang, T.B., and Kovalenko, A. (2008). The extrinsic cell death pathway and the elan mortel. *Cell Death Differ* *15*, 1533-1541.
- Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., and Fahrenkrog, B. (2006). The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J Cell Sci* *119*, 1843-1851.
- Wang, X.Z., and Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* *272*, 1347-1349.
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* *275*, 27013-27020.
- Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A., and Williams, D.B. (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* *270*, 4697-4704.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.
- Weinberger, M., Ramachandran, L., Feng, L., Sharma, K., Sun, X., Marchetti, M., Huberman, J.A., and Burhans, W.C. (2005). Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication. *J Cell Sci* *118*, 3543-3553.

- Weitzmann, A., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2006). The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sll1 function in man and mouse. *FEBS Lett* 580, 5237-5240.
- White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foskett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol* 7, 1021-1028.
- Wiest, D.L., Burkhardt, J.K., Hester, S., Hortsch, M., Meyer, D.I., and Argon, Y. (1990). Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J Cell Biol* 110, 1501-1511.
- Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119, 615-623.
- Williams, R.M., Primig, M., Washburn, B.K., Winzeler, E.A., Bellis, M., Sarrauste de Menthiere, C., Davis, R.W., and Esposito, R.E. (2002). The Ume6 regulon coordinates metabolic and meiotic gene expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13431-13436.
- Wilson, W.A., and Roach, P.J. (2002). Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast. *Cell* 111, 155-158.
- Winicov, I., and Button, J.D. (1982). Nuclear ligation of RNA 5'-OH kinase products in tRNA. *Mol Cell Biol* 2, 241-249.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G., and Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 166, 969-974.
- Wong, H.N., Ward, M.A., Bell, A.W., Chevet, E., Bains, S., Blackstock, W.P., Solari, R., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1998). Conserved in vivo phosphorylation of calnexin at casein kinase II sites as well as a protein kinase C/proline-directed kinase site. *J Biol Chem* 273, 17227-17235.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., and Mak, T.W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-819.

- Wu, M., Xu, L.G., Li, X., Zhai, Z., and Shu, H.B. (2002). AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J Biol Chem* *277*, 25617-25623.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* *68*, 251-306.
- Wysocki, R., and Kron, S.J. (2004). Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species. *J Cell Biol* *166*, 311-316.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* *115*, 2656-2664.
- Xu, Q., and Reed, J.C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* *1*, 337-346.
- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J., and Hatzoglou, M. (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* *113*, 519-531.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* *17*, 1487-1496.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* *17*, 5094-5104.
- Yarbrough, H.F., Jr., and Clark, F.M. (1957). Utilization of inositol, an essential metabolite for *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* *73*, 318-323.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* *6*, 1355-1364.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* *162*, 71-84.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., and Rapoport, T.A. (2005). Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of

retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14132-14138.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* *276*, 13935-13940.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* *281*, 30299-30304.

York, S.J., Armbruster, B.N., Greenwell, P., Petes, T.D., and York, J.D. (2005). Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J Biol Chem* *280*, 4264-4269.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* *273*, 33741-33749.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001a). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881-891.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* *20*, 6755-6767.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001b). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* *21*, 1239-1248.

Yu, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J., and Calame, K. (2000). Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* *20*, 2592-2603.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* *75*, 641-652.

Zeng, L., Lu, M., Mori, K., Luo, S., Lee, A.S., Zhu, Y., and Shyy, J.Y. (2004). ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *EMBO J* *23*, 950-958.

Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2003). Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nat Cell Biol* 5, 769-770.

Zhang, N.N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K.W. (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* 17, 3409-3422.

Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., and Cavener, D.R. (2002). The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol* 22, 3864-3874.

Zhang, Q., Chieu, H.K., Low, C.P., Zhang, S., Heng, C.K., and Yang, H. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J Biol Chem* 278, 47145-47155.

Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M.L., McCracken, A.A., Watkins, S.C., Michaelis, S., and Brodsky, J.L. (2001). Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1303-1314.

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y., and Flavell, R.A. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 6, 1241-1247.

Zhou, B.B., Li, H., Yuan, J., and Kirschner, M.W. (1998). Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6785-6790.

Zhu, J.H., Horbinski, C., Guo, F., Watkins, S., Uchiyama, Y., and Chu, C.T. (2007). Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *The American journal of pathology* 170, 75-86.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12, 982-995.

Zuppini, A., Groenendyk, J., Cormack, L.A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (2002). Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry* 41, 2850-2858.

ANNEXES

ANNEXE 1: A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin

Article accepté avec revisions mineures dans le journal scientifique Journal of Cell Science, 2008

A nucleolar protein allows viability in the absence of
the essential ER chaperone calnexin

**Pascale B. Beauregard¹, Renée Guérin¹, Cynthia Turcotte¹,
Susan Lindquist², and Luis A. Rokeach^{1*}**

1. Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville,
Montréal, Québec H3C 3J7, Canada, Tel.: 1-514-343-6324; Fax: 1-514-343-2210

2. Whitehead Institute for Biomedical Research and Howard Hughes Medical Institute, 9
Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, USA.

Running title: *cif1*⁺ induces calnexin independence

Abbreviations: A, adenine; Cif1p, calnexin independence factor; Cin_{cif1}, calnexin-independent state from *cif1*⁺ overexpression; Cin_{Δhcd_cnx1}, calnexin-independent state from *Δhcd_cnx1* calnexin mutant expression; Cnx1p, calnexin from *S. pombe*; H, histidine; L, leucine; *pcnx1*, plasmid bearing a WT copy of calnexin; T, thiamine; U, uracil;

SUMMARY

In fission yeast, the ER chaperone calnexin is normally essential for viability. However, a specific mutant of calnexin (Δ hcd_Cnx1p) devoid of chaperone function induces an epigenetic state that allows growth of *S. pombe* without calnexin. This calnexin-independent state (Cin) was previously shown to be mediated via a non-chromosomal element exhibiting some prion-like features. Here, we report the identification of a gene whose overexpression induces the appearance of stable Cin cells. This gene, here named *cif1*⁺ for calnexin independence factor, encodes an uncharacterized nucleolar protein. The Cin cells arising from *cif1*⁺ overexpression (Cin_{cif1}) are genetically and phenotypically distinct from the previously characterized Cin _{Δ hcd_cnx1} cells, spontaneously appearing in the presence of the Δ hcd_Cnx1p mutant. Moreover, *cif1*⁺ is not required for induction or maintenance of Cin _{Δ hcd_cnx1}. These observations argue for different pathways of induction and/or maintenance of the state of calnexin independence. Nucleolar localization of Cif1p is required to induce the Cin_{cif1} state, thus suggesting an unexpected interaction between the vital cellular role of calnexin and a function of the nucleolus.

INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) has several vital functions including biosynthesis of organelles, lipid donation to other organelles, Ca²⁺ homeostasis, as well as folding and quality control of membrane-bound and secreted proteins (Kleizen and Braakman, 2004). The ER lumen is a highly crowded environment with a concentration of resident and nascent proteins of about 100 mg/ml (Kleizen and Braakman, 2004). Despite the elevated levels of unstructured polypeptides within the ER lumen, most of the proteins attain their native conformation and continue on the secretory pathway. The prevention of aggregation and the correct folding of nascent proteins in the ER lumen are mediated by the concerted action of foldases and molecular chaperones (reviewed in (Fewell *et al.*, 2001; Ellgaard and Helenius, 2003; Kleizen and Braakman, 2004; Hebert and Molinari, 2007).

Calnexin is a molecular chaperone in the ER that plays key roles in protein folding and quality control (Williams, 2006; Hebert and Molinari, 2007; Caramelo and Parodi, 2008). Calnexin has been implicated in several genetic diseases caused by inherited protein folding defects (Kuznetsov and Nigam, 1998; Chevet *et al.*, 1999a; Amaral, 2004; Ni and Lee, 2007). Mechanistically, calnexin interacts with nascent polypeptides as a lectin binding *N*-linked glycan, and/or via protein-protein contacts (Helenius and Aebi, 2004; Marechal *et al.*, 2004; Bedard *et al.*, 2005; Thammavongsa *et al.*, 2005; Moremen and Molinari, 2006; Williams, 2006; Caramelo and Parodi, 2008).

Structurally, calnexin is a type I transmembrane protein. X-ray crystallography studies revealed that the luminal portion of calnexin consists of a globular domain and an extended hairpin-like arm (Schrag et al., 2001). The globular domain contains a calcium-binding site and the lectin activity (Schrag et al., 2001, (Leach *et al.*, 2002). The hairpin protrusion, also called the P-domain, contains a highly conserved central domain, hcd (Jannatipour and Rokeach, 1995; Elagoz *et al.*, 1999). The hairpin structure is involved in protein-protein interactions with unfolded proteins and with other ER chaperones (Leach et al., 2002; Marechal et al., 2004; Pollock et al., 2004; Williams, 2006).

While calnexin was first identified as a molecular chaperone, mounting evidence indicates the involvement of calnexin in other cellular process. For instance, it was shown that one of the main roles of calnexin is the retention of irretrievably misfolded protein in the ER and their targeting for degradation (Bedard et al., 2005). As it is involved in the folding of proteins destined to be secreted, mammalian calnexin was also linked to cell adhesion (Lenter and Vestweber, 1994). Most recently, several reports demonstrated that calnexin is involved in apoptosis induced by ER stress (Torgler *et al.*, 1997; Zuppini *et al.*, 2002; Takizawa *et al.*, 2004b; Tomassini *et al.*, 2004; Delom *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2007c; Guerin *et al.*, 2008). Intriguingly, the knockout of the gene encoding calnexin in different organisms results in diverse phenotypes (Muller-Taubenberger *et al.*, 2001; Denzel *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). These phenotypes, however, have not unveiled comprehensive aspects of the novel cellular roles of calnexin because the organisms studied

encode also calreticulin, a paralogue that is a luminal ER protein and whose functions overlap with calnexin (Anelli and Sitia, 2008).

To address the cellular roles of calnexin, we have investigated the consequence of its deletion in the genetically tractable *S. pombe* (Jannatipour and Rokeach, 1995; Elagoz *et al.*, 1999). The calnexin homologue of *S. pombe*, Cnx1p, displays a high degree of sequence identity and similarity with its mammalian counterparts. Importantly, *S. pombe* does not encode a calreticulin orthologue, thus allowing direct analysis of the cellular roles of calnexin. We and another group have demonstrated that under normal conditions, calnexin/Cnx1p is essential for viability (Jannatipour and Rokeach, 1995; Parlati *et al.*, 1995a). Interestingly, certain calnexin mutants devoid of chaperone function such as mini_Cnx1p, with only 52 amino acid in the lumen, do complement the calnexin knockout (Elagoz *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2004). These observations demonstrate that the essential function of calnexin in *S. pombe* is not its chaperone activity but another undefined cellular role.

Previous structure-function studies of *S. pombe* calnexin led us to an unexpected observation. A particular mutant of calnexin lacking its highly conserved central domain (*Ahcd_cnx1*) induces a state where *cnx1*⁺ is no longer required for viability (Collin *et al.*, 2004). The sole expression of this mutant at an endogenous level, in presence or not of a WT copy of calnexin, is sufficient to induce the stable state of viability without calnexin in the vast majority of cells. We named this epigenetic state of viability without calnexin **Cin**,

for calnexin **in**dependent. Accordingly, calnexin-less cells were named Cin. On the other hand, the state of naïve cells requiring *cnx1*⁺ for viability was renamed **Cdn**, for calnexin **d**ependent. Extensive characterization of these calnexin-less cells revealed that the Cin state is mediated by a non-chromosomal element exhibiting prion-like features (Collin et al., 2004). Namely, we showed that the Cin state is stable, dominant in diploids and in merodiploids harboring a *cnx1*⁺ plasmid, and transmitted in a non-Mendelian fashion. Surprisingly, Cin cells are not sensitive to folding stresses, but have cell-wall defects that are corrected by reintroduction of calnexin (Turcotte et al., 2007). These observations indicate that while the Cin state confers viability, it does not compensate for all calnexin functions in *S. pombe*. As the essential function(s) of *S. pombe* calnexin remain(s) unknown, the elucidation of the mechanism underlying the Cin state should be instrumental in unraveling novel cellular roles of this ER protein.

So far, the Δhcd_Cnx1p mutant was the only known inducer of the Cin state. In order to identify cellular components involved in the triggering and maintenance of the Cin state, we carried out two genetic screens. These screens led to the identification of an uncharacterized gene, that we here named *cif1*⁺ for calnexin independence factor 1. Interestingly, *cif1*⁺ codes for a previously uncharacterized nucleolar protein. In this paper, we report that the transient overexpression of *cif1*⁺ induces the appearance of a stably inheritable state of calnexin independence. Hence, it provokes the appearance of Cin cells. The Cin cells obtained by *cif1*⁺ overexpression exhibited phenotypic differences compared to Cin cells induced by the Δhcd_cnx1 calnexin mutant. Moreover, the knockout of *cif1*⁺

does not impair the induction or the maintenance of the Cin state induced by the Δhcd_cnx1 mutant. These observations suggest the existence of diverse mechanisms of induction and/or maintenance of the Cin state in these two types of Cin cells. Accordingly, we called them $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} to reflect these distinctions. Finally, we showed that nucleolar localization of Cif1p is required for the induction of the Cin state by $cif1^+$ overexpression.

RESULTS

Identification of *cif1*⁺

To identify genes involved in the mechanisms underlying the Cin state, we carried out two unbiased genetic screens scoring for the appearance of Cin cells (see Materials and Methods). One screen consisted in the overexpression of a *S. pombe* cDNA library. As the overexpression of a gene creates, in general, a downstream bypass in a given pathway (Ramer *et al.*, 1992; de la Cruz J., 1998), with this screen we expected to identify candidates having a positive role in the induction/maintenance of the Cin state. The second genetic screen consisted in the random mutagenesis by insertion of a *ura4*⁺ cassette in the genome. In this case, calnexin-independent cells would appear following the knockout of a gene blocking the induction of the Cin state. Each screen was carried out with cells deleted for calnexin but carrying a plasmid bearing a WT copy of *cnx1*⁺ (*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺). Following culture in non-selective media, candidates Cin cells were isolated by scoring for cells that could still grow after the loss of the WT calnexin plasmid (supplementary Figure 2, and screens in Material and Methods). That the candidate clones were authentic Cin cells was confirmed by Western blotting with anti-Cnx1p antibodies (data not shown). The two genetics screens led to the identification of several candidate genes (see Materials and Methods). The open reading frame (ORF) SPCC364.01 was isolated in multiple Cin clones isolated from both screens, and therefore we chose to investigate it further. In the *ura4*⁺-insertion screen, the cassettes were all integrated at different sites within the promoter

region of the gene. The insertion of the *ura4⁺* cassettes did not disrupt the gene but affected its regulation.

According to the Sanger center database (www.genedb.org), this ORF is an uncharacterized gene (for sequence, see Fig. 25A). The predicted protein is rich in basic residues with a pI of 9.6 (<http://ca.expasy.org/>). Similarity searches revealed a sequence homologue in the closely related fungus *Schizosaccharomyces japonicus*. No significant sequence alignments with proteins in other organisms were detected. Stretches of the protein sequence exhibit limited similarities with nucleic-acid binding proteins, however these occurred within low-complexity regions that are rich in basic residues (E-value \geq 1.2). Therefore, this provides little information concerning the function of this protein. As it induces the Cin state, SPCC364.01 was renamed *cif1⁺* for calnexin independence factor 1.

The overexpression of *cif1⁺* induces a Cin state with distinct propagation properties

To confirm its involvement in the induction of the calnexin-independent state, *cif1⁺* was cloned under the control of the strong *nmt1* promoter in the pREP3X overexpressing vector. This construction was transformed into a $\Delta cnx1 + pcnx1⁺$ strain and a plasmid segregation assay was performed to assess if overexpression of Cif1p induces the appearance of Cin cells. Briefly, cells were cultured in non-selective media for 6 days. Without selective pressure the cells adopting the Cin epigenetic state lose the calnexin-encoding plasmid as calnexin is not essential for their viability. To discriminate between

Cin and Cdn cells, the cultures are plated on non selective media and the colonies are scored on selective plates for the presence or absence of the calnexin-encoding plasmid (for more details, see Materials and Methods and supplementary Figure 2). As shown in Table V, line 4, overexpression of *cif1*⁺ consistently induced the state of viability without calnexin, demonstrated by the presence of calnexin-free cells. Otherwise, an empty plasmid or the overexpression of a non-specific protein like EGFP had no effect on the requirement of calnexin for cell survival, as all cells still contained the calnexin-encoding plasmid (Table V, lines 2 and 3). The absence or presence of calnexin in these Cin cells was verified by Northern and Western blotting (Fig. 26B, C). The frequency of appearance of calnexin-free cells was in the range of 50%, indicating that the Cin state does not arise from spontaneous mutations or as a result of clonal selection. Interestingly, expression of *cif1*⁺ under the control of the more moderate *nmt41* promoter did not induce the Cin state (Table V, lane 5). Thus most likely these Cin cells arise from the elevated levels of Cif1p, which probably causes a bypass in the pathway inducing the Cin state.

Importantly, the continuous overexpression of Cif1p was not required for the maintenance of the Cin state, as cells without calnexin could also lose the plasmid overexpressing Cif1p (data not shown). This observation suggests that *cif1*⁺ is found upstream of the inheritance machinery of the Cin state. Finally, the Cin state obtained by overexpression of Cif1p is dominant over calnexin in haploid cells. After re-introduction of *pcnx1*⁺, the plasmid was readily lost when not selected for in the plasmid segregation assay (Table V, line 6).

We previously observed that the Cin state induced by the calnexin mutant Δhcd_Cnx1p ($Cin_{\Delta hcd_cnx1}$) was dominant in diploid cells (Collin et al., 2004), indicating that the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ state stably supersedes the essentiality of calnexin. To further examine the Cin state induced by *cif1*⁺ overexpression (Cin_{cif1}), Cin_{cif1} cells were mated to cells depending on calnexin for survival, the Cdn strain ($\Delta cnx1 + pcnx1^+$). Following which, the ability of diploids to lose the calnexin plasmid was assessed by the plasmid segregation assay. Intriguingly, five of nine diploids tested could stably live without calnexin (Table VI, line 2). This result contrasts with those obtained from diploids formed with $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ cells, in which all diploids analyzed retained this ability (Table VI, line 1 and (Collin et al., 2004). The partial dominance of Cin_{cif1} in diploid cells suggests that this epigenetic state is not stable enough to be maintained in all the diploids. Because Cin_{cif1} haploids remain stably in the calnexin-independent state after re-introduction of the $pcnx1^+$ plasmid but is unstable in diploids, a possibility is that the Cin_{cif1} state is lost in certain cases during mating. Alternatively, the Cin_{cif1} state could be less stable in the 2n background perhaps due to a dosage effect of certain gene(s). At this point, we cannot discriminate between these two possibilities.

In the previous characterization of the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ state, we showed that it was transmitted in a non-Mendelian fashion to the meiotic progeny (Collin et al., 2004). To further our characterization, random spore analysis was performed on different diploids constructed by mating of $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} ($\Delta cnx1$ Cin) with the calnexin-dependant

Cdn cells containing a genomic disruption of *cnx1*⁺ and a calnexin-encoding plasmid ($\Delta cnx1$ *pcnx1*⁺). As previously observed (Collin et al., 2004), 85% of the meiotic progeny of a *Cin* _{Δhcd_cnx1} X Cdn diploid were in the state of calnexin independence. In contrast, no *Cin* cells were obtained in the analysis of more than 250 spores from a *Cin*_{*cif1*} X Cdn diploid (not shown). These results suggest that *Cin*_{*cif1*} spores do not form colonies due to a defect in germination, or that the *Cin*_{*cif1*} state cannot be propagated to the meiotic progeny. Currently, we cannot distinguish between these two possibilities. In any case, these observations indicate that the *Cin*_{*cif1*} and the *Cin* _{Δhcd_cnx1} states exhibit distinct propagation characteristics, and are therefore different.

***Cin*_{*cif1*} cells display phenotypic differences with *Cin* _{Δhcd_cnx1} cells**

We have previously observed that while *Cin* _{Δhcd_cnx1} state allows viability, it does not complement all the functions mediated by calnexin, as *Cin* _{Δhcd_cnx1} cells display cell-wall defects and in stationary phase they exhibit increased caspase activation (Turcotte et al., 2007). As thus far the *Cin* _{Δhcd_cnx1} and *Cin*_{*cif1*} states showed different properties in their propagation, it was of interest to investigate if they exhibit additional phenotypic distinctions. Calcofluor is a fluorescent dye that binds polysaccharides concentrating in the septum of dividing cells, and it inhibits the growth of mutants that are defective in cell-wall morphogenesis (Rose and Fink, 1987; Hampsey, 1997; Elagoz *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2004; Turcotte *et al.*, 2007). Interestingly, in microscopy analysis with Calcofluor, *Cin* _{Δhcd_cnx1} cells grown at 30°C showed fluorescence staining of the septa, whereas some *Cin*_{*cif1*} cells exhibited Calcofluor-labeling on the tip instead of the septum (Fig. 26A).

When cultured at 37°C, both types of Cin cells were smaller, irregularly shaped and accumulated cell-wall material highly stained with Calcofluor white in the form of large vesicles (Fig. 26A). These observations demonstrate that like $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$, Cin_{cif1} cells exhibit defects in the synthesis/and or assembly of cell-wall components that are temperature dependent. Re-introduction of a plasmid encoding calnexin ($pcnxI^+$) rescued the defects observed at 30°C for the two types Cin of cells, but a clear difference was still observable at 37°C (Fig. 26A, panels $Cin_{\Delta hcd_cnx1} + pcnxI^+$ and $Cin_{cif1} + pcnxI^+$). In fact, while $Cin_{\Delta hcd_cnx1} + pcnxI^+$ displayed WT morphology, $Cin_{cif1} + pcnxI^+$ cells were larger and sometimes had multiple septa. Thus, the adaptative changes in Cin_{cif1} cells allowing them to live in the absence of calnexin cause phenotypic characteristics that cannot be reverted when calnexin is restored.

To further characterize the Cin_{cif1} cells, the sensitivity to hygromycin B was examined by spotting the different strains on media containing this antibiotic. Hygromycin B lowers the viability of *S. pombe* cells with defects in the early stages of glycoprotein biosynthesis (Turcotte et al., 2007). As previously described, $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ cells showed sensitivity to hygromycin B, and this phenotype was rescued by reintroduction of $cnxI^+$ on a plasmid (Fig. 26B and (Turcotte et al., 2007)). Cin_{cif1} cells were more sensitive to hygromycin B than $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ cells. Interestingly, reintroduction of a calnexin-encoding plasmid into Cin_{cif1} cells rescued this cell-wall phenotype only partially. SDS is a detergent that disturbs the membrane and exacerbates cell-wall defects (Turcotte et al., 2007). At 30°C, the Cin_{cif1} cells were more sensitive to SDS than the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ strain (Fig. 26C).

Intriguingly, the differences between the two types of Cin cells were less pronounced at 37°C, possibly because the sum of both SDS and temperature stresses is too severe for both types of Cin cells to cope with. Here again, reintroduction of *cnxI*⁺ rescued the sensitivity to SDS of the Cin_{Δhcd_cnx1} strain, but the phenotype of the Cin_{cif1} cells was not completely reversed. Thus, these observations indicate that Cin_{cif1} are more affected in cell-wall formation than the Cin_{Δhcd_cnx1} and WT cells.

Caspase activation is a typical marker of induction of programmed cell death (PCD) (Madeo *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2008). In yeast, metacaspase activation can be readily assessed by fluorescence-activated sorting (FACS) of cells stained with the fluorescent probe FITC-VAD-fmk (Madeo *et al.*, 2002; Herker *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2006). As previously reported, Cin_{Δhcd_cnx1} cells display higher levels metacaspase activation in stationary phase whether they contain a *cnxI*⁺ plasmid or not (Turcotte *et al.*, 2007). As shown in Figure 26

D, the Cin_{cif1} strain exhibited elevated levels of metacaspase activation than Cin_{Δhcd_cnx1} cells in both the exponential and the stationary phase. In contrast with Cin_{Δhcd_cnx1} cells, reintroduction of calnexin into Cin_{cif1} cells reduced the FITC staining to levels comparable to those of Cin_{Δhcd_cnx1} + *pcnxI* cells, thus suggesting that in part this metacaspase phenotype is related to the absence of calnexin in Cin_{cif1} cells. As the Cin_{cif1} state is less stable than the Cin_{Δhcd_cnx1}, a possibility is that a certain percent of the population could revert to Cdn cells without calnexin, giving rise to non-viable cells rescued by

reintroduction of calnexin. Taken together, the distinct cell-wall and metacaspase phenotypes further indicate that the Cin_{cif1} and $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ states are different.

cif1*⁺ is not essential for vegetative growth of *S. pombe

To determine if Cif1p is an essential protein, several clones from a *cif1*⁺/*cif1::kanMX4* diploid strain were sporulated and the meiotic progeny was analyzed. The diploids were constructed with two different *ade6* alleles (*ade6M210* and *ade6M216*); streaking on low adenine media showed that the spores segregate in a 2:2 ratio. The *kanMX4* cassette confers resistance to the G418 antibiotic, which allows the scoring of *cif1::kanMX4*. Restreaking of the germinated spores on YE + G418 (150 μg/mL) showed a 2:2 segregation of $\Delta cif1$ and *cif1*⁺ (Fig. 27A). All the spores from the 5 asci dissected grew at the same rate, showing that deletion of *cif1*⁺ does not cause gross growth defects (Fig. 27A). That the G418-resistant haploids were deleted for *cif1*⁺ was confirmed by Northern blotting (Fig. 27B). Thus, these results show that *cif1*⁺ is not required for vegetative growth of *S. pombe*, as cells *cif1::kanMX4* exhibited normal morphology and growth rates (Fig. 27A and not shown).

In order to examine if the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ or the Cin_{cif1} states affect the levels of Cif1p, cell extracts from these strains were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with polyclonal antibodies elicited against recombinant Cif1p. As shown in Figure 27C, Western blotting with anti-Cif1p showed a major band around 37 kDa in all the strains tested, except for the $\Delta cif1$ cells. The levels of Cif1p in WT and both Cin strains were

similar, showing that the continuous overexpression of *cifl*⁺ is not necessary for the maintenance of neither of the Cin states.

Cif1p is not required for induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state or for the maintenance of either Cin state

Because overexpression of *cifl*⁺ stably induces the Cin_{cifl} state, we asked if this gene was required for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state. To this end, we constructed a test strain $\Delta cifl \Delta cnx1$ in which the calnexin knockout is complemented with a plasmid coding for *cnx1*⁺. This strain was submitted to a plasmid segregation assay, and the deletion of *cifl*⁺ did not provoke the spontaneous appearance of Cin cells (Table VII, line 1). Thus, it is unlikely that Cif1p acts as a negative regulator of the Cin state as in such case its deletion would have caused the spontaneous appearance of cells viable without calnexin.

To assess for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state in a *cifl* disruption background, the $\Delta cifl \Delta cnx1 + pcnx1$ ⁺ strain was transformed with plasmids expressing Δhcd_Cnx1p at normal levels. If *cifl*⁺ was required for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state, the $\Delta cifl \Delta cnx1$ double knockout strain should not give rise to calnexin-less cells. As shown in Table VII line 2, expression of Δhcd_Cnx1p in the $\Delta cifl$ background led to the appearance of calnexin-less cells, showing that *cifl*⁺ is neither required for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state nor for the maintenance of this state in the mitotic progeny. Next, to

assess whether Cif1p is required for the maintenance of the Cin_{cif1} state, we transformed a plasmid overexpressing *cif1*⁺ into the test strain $\Delta cif1 \Delta cnx1 + pcnx1^+$. Interestingly, the Cin_{cif1} state was induced in the $\Delta cif1$ background and it was stably maintained in the mitotic progeny even in the absence of the *cif1*⁺-overexpression plasmid (not shown). Thus once it is triggered by *cif1*⁺ overexpression, the Cin_{cif1} state can be maintained without the continuous presence of Cif1p in the cell. These observations demonstrate that the mechanism of maintenance of the Cin_{cif1} state is downstream and independent of *cif1*⁺.

Next, we asked if *cif1*⁺ plays a role in the transmission of the Cin _{Δhcd_cnx1} state to the meiotic progeny. Accordingly, we constructed a diploid by mating the $\Delta cnx1 \Delta cif1 + pcnx1^+$ strain with Cin _{Δhcd_cnx1} cells. This diploid was sporulated and the germinated spores were analyzed by restreaking on selective and non-selective medium, to check respectively for the *cif1::KanMX4* marker (G418) and for the presence or absence *cnx1*⁺-encoding plasmid (uracil marker). A total of 1387 spores from different diploids were examined, and 50.2% of the Cin cells were $\Delta cif1$ (Table VIII). These results demonstrate that *cif1*⁺ is not required for the propagation of the Cin _{Δhcd_cnx1} state to the mitotic or the meiotic progeny. Furthermore, these observations suggest that *cif1*⁺ is upstream of, or in a parallel pathway to Δhcd_Cnx1p in the mechanism of induction and maintenance of the Cin _{Δhcd_cnx1} state. As it is not possible to isolate Cin_{cif1} spores (see above), we were not able to assess the importance of *cif1*⁺ in the propagation of the Cin_{cif1} state to the meiotic progeny.

Nucleolar localization of Cif1p is required for the induction of the Cin_{cif1} state

A nuclear localization signal (NLS) was predicted in the *N*-terminal part of the sequence (Fig. 25A, B) (see <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>, (Cokol et al., 2000). To examine its subcellular localization, a Cif1p-Venus fusion was constructed using a variant of the yellow fluorescent protein (Venus; see Materials and Methods) and this construction was transformed into WT, $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} cells. Fluorescence microscopy imaging of fixed cells revealed the presence of foci in the nuclei of the three types of cells. The foci co-localized with a fibrillarin-RFP fusion, a nucleolar marker (Henriquez et al., 1990) (Fig. 28A), but not entirely with the fluorescent marker DAPI, which stains chromatin. The overlay clearly indicates that Cif1p is present in the nucleolus of the three different cell types. These observations demonstrate that the localization of Cif1p is not altered in either the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ or the Cin_{cif1} state. Moreover, microscopy examination of DAPI and Fib1-RFP fluorescence revealed that $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} states do not affect the shape of the nucleus or the nucleolus. This was confirmed by using one additional marker for each compartment, Htt2p for the nucleus and Gar2p for the nucleolus (see supplementary Figure 3).

Next we asked if the nucleolar localization of Cif1p is important for the induction of the Cin_{cif1} state. Accordingly, we constructed a Cif1p variant in which the KRKR₂₇₋₃₀ residues at the beginning of the predicted NLS were substituted with four alanines (Fig. 25B). A Venus fusion of this Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutant displayed fluorescence in the cytosol (Fig. 28B). This result demonstrates the importance of the KRKR₂₇₋₃₀ residues

for proper localization of Cif1p. The background nuclear staining could be due to interactions with other nuclear proteins or to some residual functionality of the NLS. Remarkably, cells overexpressing the Cif1p KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutant did not give rise to calnexin-independent cells (Table V, line 7). Thus, the correct nuclear/nucleolar targeting of Cif1p is necessary for the induction of the Cin_{cif1} state. In addition, it is possible that these residues could be also important for interaction with partners necessary for Cin_{cif1} induction. Importantly, this result rules out the possibility that Cin_{cif1} state is induced by a non-specific effect of overloading the cell with this protein, as the presence of Cif1p in the cytosol does not induce the calnexin independence state. Moreover, these observations suggest that at least part of the pathway compensating for the loss of calnexin function in Cin_{cif1} cells involves nuclear/nucleolar components.

DISCUSSION

We identify a protein that can induce a stably inheritable state of calnexin independence in *S. pombe*. The protein was named Cif1p for calnexin independence factor, and its encoding gene SPCC364.01 was accordingly renamed *cif1*⁺. The fact that we found this gene in several clones in two different genetic screens is indicative of its importance in the triggering of the calnexin-independence mechanism.

The Cin cells obtained by overexpression of *cif1*⁺ (Cin_{cif1}) exhibit different phenotypic features as compared to the Cin_{Δhcd_cnx1} cells, which were characterized previously. While both types of Cin cells are unaffected by the ER-stress agent DTT (not shown), the Cin_{cif1} cells are more affected in the synthesis/assembly of the cell-wall and exhibit higher levels of metacaspase activity than the Cin_{Δhcd_cnx1} cells. Like Cin_{Δhcd_cnx1}, the Cin_{cif1} state is dominant over plasmid-encoded calnexin in haploids. However, unlike the Cin_{Δhcd_cnx1} state, the Cin_{cif1} state is partially dominant in diploid cells (5 of 9 diploids studied). Also, unlike Cin_{Δhcd_cnx1}, Cin_{cif1}/Cdn diploids do not give rise to Cin_{cif1} sporulants. This suggests that in Cin_{cif1} spores, the Cin_{cif} state would not completely replace the function of calnexin, leading to a defect in the germination process. Alternatively, the Cin_{cif1} state might not be stably propagated to the meiotic progeny. Presently, we cannot distinguish between these two possibilities. Importantly, these observations indicate that at least two different epigenetic states of calnexin independence can arise in *S. pombe*, Cin_{Δhcd_cnx1} and Cin_{cif1}.

In our first characterization we observed that the propagation of the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ epigenetic state is mediated via a non-chromosomal element exhibiting some prion-like features (Collin et al., 2004). Thus, it could be postulated that the distinctions between the two Cin states may be due to different prion strains. Strains were described for the $[PSI^+]$ prion of *S. cerevisiae* that differ in their phenotypic strength and stability (Safar et al., 1998; Uptain et al., 2001; King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004; Collinge and Clarke, 2007). As $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} appear to exhibit different phenotypes and transmission properties, they could be a reflection of prion variants. The fungal prions best characterized present typical hallmark features. In vitro, purified prion proteins like Sup35, Rnq1 and Het-s aggregate into amyloid fibers able to transmit their corresponding $[PSI^+]$, $[PIN^+]$, $[Het-s]$ prion phenotypes by transformation into naïve cells (Maddelein et al., 2002; King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004; Patel and Liebman, 2007). In vivo, overexpression of the prion protein induces the prion conformer and the corresponding phenotype, which are dependent on the continued biosynthesis of the prion protein (reviewed in (Uptain and Lindquist, 2002; Benkemoun and Saupe, 2006; Tuite and Cox, 2006; Wickner et al., 2007). As overexpression of Cif1p leads to the Cin_{cif1} state, we examined whether this protein exhibits prion properties. In preliminary in vitro studies, we observed that Cif1p produces aggregates in the shape of fibers, as judged by atomic force microscopy (supplementary Fig. 4). $cif1^+$ is not required for the maintenance of either the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ or the Cin_{cif1} state. Therefore it is unlikely that the maintenance of either Cin epigenetic state would depend on a mechanism based on the inheritance of Cif1p in a prion conformer. However, this does not exclude the possibility that Cif1p could be a prion

protein, nor does it rule out the existence of a prion-based propagation mechanism downstream of Cif1p.

As the Cin_{cif1} state can be maintained in the $\Delta cif1$ context, Cif1p is likely to be a component of a pathway of induction rather than being part of the propagation machinery of calnexin independence per se. That the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ epigenetic state can be triggered in the $\Delta cif1$ background suggests that Cif1p acts either upstream of Δhcd_Cnx1p or in a parallel induction pathway. Clarification of this point requires further identification of genes involved in the induction and maintenance of these Cin states, as well as the charting of the interactions between these cellular components. However, the fact that the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and Cin_{cif1} states exhibit distinct phenotypic and genetic characteristics is at this point more supportive of the notion that Cif1p and Δhcd_Cnx1p act in parallel pathways.

We discovered the Cin state because it replaces the essential function of calnexin in the $\Delta cnx1$ background and this is monitored as the loss of the $cnx1^+$ plasmid in non-selective media. Certainly, the calnexin gene is not readily lost in a natural setting. In nature, the Cin epigenetic states are likely to be adaptative mechanisms providing the cell with additional fitness to withstand stresses normally handled by pathways involving calnexin. In fact, it appears that both Cin states have a functional ER despite the absence of calnexin. Namely, Cin cells do not display sensitivity to the ER stressor DTT, and they do not show increased levels of the typical marker of unfolded protein response BiP (Fig. 27C). To obtain clues as the essential function of calnexin and the cellular roles of the Cin

states, we are currently screening metabolic and environmental conditions that could lead to the induction of calnexin independence.

The elucidation of the biological activity of Cif1p may provide indication as to the cellular role of the Cin state, but the function(s) of Cif1p is unknown as yet. Similarity searches revealed an orthologue in the recently annotated genome of *S. japonicus*, but no other significant sequence homologies were found in other organisms. Its basic character (predicted pI 9.6) and its nucleolar localization suggest that Cif1p could be a nucleic-acid binding protein with a potential role in ribosome biogenesis. The lack of straight sequence homologies in the databases does not rule out the possibility of functional homologues in other organisms such as in mammals. Several nucleic-acid-binding proteins exhibit 3D-structural and functional conservation without obvious sequence similarities (Nichols *et al.*, 1999; Fribourg and Conti, 2003; Meka *et al.*, 2003; Schroder and Kaufman, 2005b). For instance, *S. cerevisiae* Mtr2p and human p15 do not share sequence similarities; however, these proteins have similar 3D structures and are biologically functional homologues (Fribourg and Conti, 2003). The identification of Cif1p functional homologues should lead to the discovery of Cin-like mechanisms in other organisms.

Interestingly, replacement of the KRKR₂₇₋₃₀ residues at the beginning of the predicted NLS with four alanines disrupted the nucleolar localization of Cif1p by affecting its entry in the nucleus (Fig. 28B and supplementary Fig. 5). Importantly, this mutation obliterates the ability of Cif1p to induce the Cin_{cif1} state by overexpression. This result

indicates that the nuclear/nucleolar localization of Cif1p is required for induction of the Cin_{cif1} state. However, we cannot exclude the possibility that mutation of the KRKR₂₇₋₃₀ residues could in addition directly affect the interaction of Cif1p with some partner in the pathway of induction of the Cin_{cif1} state.

We have previously demonstrated that the essential function of calnexin is contained in its C-terminal domain, a stable portion of calnexin devoid of chaperone activity (Elagoz et al., 1999; Marechal et al., 2004). Recently, we reported that the cytosolic tail of calnexin is involved in mediating an ER-stress-induced apoptotic signal (Guerin et al., 2008). Further characterization of this apoptotic pathway and investigation of the cellular function of Cif1p will reveal if an apoptotic mechanism and the Cin epigenetic state are functionally linked. As the membrane of the ER abuts that of the nucleus, it is possible that Cif1p and the cytosolic tail of calnexin biochemically interact. This possibility was addressed by immunoprecipitation; however no interaction between Cif1p and calnexin was observed under the conditions tested (supplementary Figure 7).

The overexpression of the nucleolar protein Cif1p induces viability in the absence of calnexin. Thus, part of the Cin_{cif1} state induction pathway takes place in the nucleolus. Further characterization of the function(s) of Cif1p and the identification of its interacting factors will allow us to elucidate the pathway in which this nucleolar protein acts, and will also shed light on how Cin state replaces the essential function of calnexin. Interestingly, the experiments presented here show a connection between a yet uncharacterized nucleolar

activity and the replacement of an essential ER chaperone. This supports the notion that the cellular functions of calnexin are not completely understood. Exploring the functions of calnexin may shed light on the interaction of the ER with other organelles such as the nucleolus.

Ribosome biogenesis is tightly coordinated with cell growth, and so are the functions of the ER, which include membrane synthesis (both lipids and proteins) and protein secretion (Warner, 1999; Lowe and Barr, 2007). Our work suggests a communication between the ER and the nucleolus, hinting that these compartments work together for the proper maintenance of the cell. The investigation of the functions of Cif1p should provide clues as to the molecular details of a cross-talk between the ER and the nucleolus in their adjusting of cell growth.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

***S. pombe* genetic, strains and media**

S. pombe strains used in this study are listed in Table IV. Yeast cells were cultured in MM (Edinburgh Minimal Medium, here referred to as MM) supplemented with required nutrients as previously described (Moreno et al., 1991) with 2% glucose, at 30°C (unless indicated otherwise). *S. pombe* transformations were performed using the PEG [poly (ethylene glycol)]/lithium acetate procedure (Elbe, 1992). A heterozygous diploid strain knockout for SPCC364.01/*cif1*⁺ (*cif1::kanMX4*) was purchased from Bioneer (Daejeon, Korea). Tetrads were dissected on MM medium supplemented with adenine, uracil, leucine,

and histidine (MM+AULH) with a Nikon Eclipse E400 micromanipulator. *S.*

pombe matings were carried out on MMAULH media, the diploids were selected on solid MM supplemented with the appropriate nutriment, and sporulation was induced in liquid MM with low amount of sodium glutamate. Random spore analysis was performed as described in (Moreno et al., 1991).

Genetic screens

Insertion mutagenesis of *S. pombe* was performed as described in (Chua et al., 2000).

Briefly, a *ura4*⁺ cassette was amplified by PCR with a pair of degenerated oligonucleotide

ura4 for: 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGCTTAGCTACAAATCCCACTGGC-3'

and **ura4 rev** :

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTGATATTGACGAACTTTTTGACAT-3'.

Transformation of 3.5 µg of the cassette in 7.5 mL of the *S. pombe* SP6089 cells (see Table IV) in exponential phase was performed by PEG/Li acetate procedure. Subsequently, cells were cultured on selective medium (MM + A) to select for transformants, following which the cells were cultured in non-selective medium (MM + AU) to eliminate unstable insertions. Finally, the transformed cells were cultured in plasmid loss medium (MM + AL) to allow for the loss of the *pcnX1*⁺ plasmid (see supplementary Fig. 2). Approximately 4 x 10⁴ cells were screened for the induction of the Cin state by plating on plasmid loss solid medium (MM + AL) and replica-plating colonies on selective media. Colonies growing on the first media but not the second, thus without the plasmid encoding calnexin,

were conserved for further analysis. The absence of Cnx1p was confirmed by Western blotting. The locus of insertion of the *ura4*⁺ cassette was determined by inverse PCR (Chua et al., 2000). For the overexpression screen, a cDNA *S. pombe* bank on the pREP3X overexpression vector (a kind gift from Dr Norbury) was transformed. The screening protocol to isolate Cin cells was as the insertion strain. Plasmids were extracted from *S. pombe* Cin candidate clones and transformed into *E. coli*, as previously described (Alfa, 1993). Following which, the cDNA of the candidate clones were identified by automated DNA sequencing. In addition to *cif1*⁺, we isolated several candidate genes involved in different cellular pathways. These included the ER translocon subunit Sec61 β and the glycolytic enzymes pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase. These candidate genes are currently under investigation.

DNA Constructs

The coding sequence of *cif1*⁺ was obtained by PCR amplification from genomic DNA of WT *S. pombe* Sp556. The primers used contained *Xho*I restriction sites (underlined), and are: forward pc364forA (5'-GATCTCGAATGAGTGAAGAAATTATAACA-3') and reverse pc364revA (5'-GATCTCGAGTCAAATATCATCTTTTTTGGC-3'). The ORF of *cif1*⁺ was cloned into the *Xho*I site of pREP3X or pREP41X vectors. The correct orientation and sequence was verified by digestion with *Xmn*I/*Bam*HI, PCR amplification and sequencing. A plasmid expressing a fusion of Cif1p with the yellow fluorescent protein (YFP) was constructed with the Venus YFP variant (kindly provided by Dr Atsushi Miyawaki, RIKEN, Japan; see Nagai *et al.*, 2002). Venus was fused to the C-terminal of

Cif1p in pREP42 plasmid, in a sequential cloning. First, *cif1*⁺ was cloned *NdeI/SmaI* (restriction sites are underline) using primers: forward *NdeI*-364-for (5'-AAACATATGAGTGAAGAAATTATA-3') and reverse pc364rec, containing a site for *SmaI* (underline) and a *KpnI* (bold) (5'-GACCCCGGGCTCGAGTTACATGGCATTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCGGTACCAATATCATCTTT-3'). Venus was amplified with the pair of primers GFPCTermlongfor containing a *KpnI* site (bold) (5'-AAAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3') and *BamHI*venus_stop containing a *BamHI* site (underline) (5'-AAAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTC-3'). The amplified fragment was digested with *KpnI* and *BamHI*, and inserted into the pREP42 plasmid containing *cif1*⁺ also digested with these two enzymes. For Cif1p the KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutant, the codons for amino acids 27-30 (KRKR) were changed with 4 alanine residues using overlap PCR. First, two fragments of *cif1*⁺ containing the quadruple mutation were constructed using for the 5' part, *NdeI*-364-for and 364-KRKR/AAAA-rev (5'-CTTTTCAGCTCGCACCTCTGAAGCAGCAGCAGCCGGCTGCTTTTCTCCCACTGATGTTTC-3'), and for the 3' part, 364-KRKR/AAAA-for (5'-GGGAGAAAAGCAGCCGGCTGCTGC TGCTTCAGAGGTGCGAG-3') and stop-364-*BamHI*, containing a *BamHI* site (underlined) (5'-AAAGGATCCTCAAATATCTTTTTT-3'). To obtain the complete mutant, overlap PCR amplification was performed using the two fragments and the *NdeI*-364-for and stop-364-*BamHI* primers. To create a fusion of Cif1p-KRKR/AAAA with Venus, the 3' primer used contained a *KpnI* site instead of

*Bam*HI, and mutants were cloned in frame with Venus in the pREP42 plasmid.

Fibrillarin fused with the monomeric red fluorescent protein (mRFP, Dr Tsien) was constructed in 2 steps. First, mRFP was amplified using a pair of oligonucleotides: mRFP1-forw2 containing a *Xho*I restriction site (underlined) and a *Pme*I restriction site (bold) (5'-CCG CTCGAGGTTTAAACGCCTCCTCCGA-3'), and mRFP1-reverse, containing a *Bam*HI site (underlined) (5'-CGGGATCCTTAGGCGCCGGTGGAGTG-3'). Subsequently, the PCR product was digested with *Xho*I and *Bam*HI and cloned in pREP41X. Fibrillarin was amplified from genomic DNA with Fib1-*Xho*I-forward (*Xho*I site underlined) (5'-AGACTCGAGATGGCATATACACCAGGTTCA-3') and Fib1-*Pme*I-no-stop-reverse (*Pme*I site in bold characters) (5'-AGAGTTTAAACCCTGATGTCTCAAGTATTTTCCTAC-3'). Following which, the PCR product was digested with *Xho*I and *Pme*I, and inserted into pREP41X-mRFP previously digested with the same enzymes.

Plasmid segregation experiments

S. pombe strains bearing one or two plasmids were cultured for 7 days at 30°C in 5 mL liquid MM with adenine and appropriate supplements to make a non-selective medium (uracil and/or leucine) (see supplementary Fig. 2). Cells were plated on the same solid media and auxotrophy for uracil and/or leucine was analyzed after 5-7 days of incubation at 30°C, by toothpicking on selective plates. For each experiment 400 colonies were streaked, and experiments were performed at least 3 times.

Phenotypic assays

Stress-resistance assay, sodium dodecyl sulfate (SDS)-sensitivity assays, and *in vivo* staining for metacaspase activity were performed as described in (Turcotte et al., 2007).

Northern blotting

RNA was prepared with a Trizol-like and phase-lock tube protocol as describe in (Lyne et al., 2003) (www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/docs/rnaextraction_website.pdf). Northern blotting was carried out as described previously (Jannatipour and Rokeach, 1995). Both the *cif1* and the *cnx1* probes encompass the full-length gene. The *cif1* probe was isolated by *XhoI* digestion of the pREP3X/*cif1* plasmid, and the *cnx1* probe was isolated by a *BamHI/NdeI* digestion of the pREP42/*cnx1*⁺ plasmid.

Immunoblotting

Cell extracts were prepared from exponentially growing cells by bead-beating in lysis buffer (50 mM tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100). After fractionation on 10% SDS-acrylamide gels, the proteins were transferred on nitrocellulose membrane and blotting was performed with appropriate antibodies. Rabbit polyclonal antibody against Cif1p was used at a 1:5,000 dilution. Anti-Cnx1p rabbit serum (Jannatipour and Rokeach, 1995) was used at a 1:35,000 dilution. Anti-BiP rabbit serum (Marechal et al., 2004) was used at a 1:20,000 dilution. For loading controls, mouse monoclonal antibody against α -tubulin (Sigma T-5168) was used a 1:5,000 dilution. To raise polyclonal antibodies against Cif1p, the protein was expressed in

bacteria with a hexahistidine-tag and purified in denaturant conditions. This recombinant protein was used to immunize rabbits for producing polyclonal antibodies, and the serum was further purified with acetone powder of $\Delta cif1$ cells (Harlow and Lane, 1988).

Microscopy imaging

For Calcofluor-white staining was done as previously describe in (Elagoz et al., 1999). For Cif1p-Venus fusion imaging, exponentially growing cells were fixed and prepared as describe in (Guerin et al., 2008). Microscopy analysis was performed with a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit, and treated with UIC Metamorph[®] software.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Chris Norbury (University of Oxford) for the gift of the *S. pombe* cDNA library in the pREP3X overexpression vector, and Dr Atsushi Miyawaki (RIKEN, Japan) for providing the clone encoding the Venus YFP variant. We thank all members of the Rokeach lab for fruitful discussions and critical reading of this manuscript. This work was supported by grants of the Canadian Institutes of Health Research (Grant MOP_62703) and National Science and Engineering Research Council (Grant 171325) to LAR. P.B.B. received an NSERC PhD studentship. P.B.B., RG, and C.T. received scholarships from the Faculté des Études supérieures-Département of Biochemistry, Université de Montréal.

FIGURE LEGENDS

Figure 25. Primary structure of Cif1p. (A) Predicted amino acid sequence of the *S. pombe* protein encoded by the open reading frame SPCC364.01, as retrieved from Genbank. The predicted nuclear localization signal (NLS) is underlined, and basic residues are in bold. (B) Schematic representation of Cif1p. The NLS is in gray, and the quadruple replacement of KRKR₂₇₋₃₀ by alanine residues is indicated.

Figure 26. Cin_{cif1} cells display phenotypic differences with Cin_{Δhcd_cnx1} cells. (A) Calcofluor staining of Cin cells. Log phase cells (OD₅₉₅ 0.8) were cultured at 30°C or 37°C, and incubated with 20 μg/mL Calcofluor white for 5 minutes. Nomarski-interference images of the same fields of cells stained with Calcofluor are shown. (B) Sensitivity to cell-wall stress. Exponentially growing cells were adjusted at OD₅₉₅ 0.8, serially diluted (10⁻¹ – 10⁻⁴), and spotted on MM plates with or without the indicated chemicals. Plates were incubated at 30°C for 7 days. Results are representative of three independent assays. (C) SDS sensitivity of Cin cells. A volume of 450 μL of a culture at exponential phase (OD₅₉₅ 0.5) was added to 13 mL MM + 0.7% agar, and poured on plates containing MM + 2% agar. A circle of 3M paper of 5 mm diameter was placed in the center of each plate and 10 μL 10% SDS was added on the circle. Petri dishes were incubated for 7 days at 30°C or at 37°C. The ratio of halos was calculated with respect to WT at 30°C. Results are the average of three independent assays. (D) Metacaspase activity of Cin cells. Metacaspase activity was evaluated by the CaspACETM FITC-VAD-fmk fluorescence assay on exponential-phase and 4-days stationary-phase cultures. Stained cells were counted by

flow cytometry analysis. Samples of 10,000 cells were analyzed from at least three independent cultures for each strain. Results are the mean of these assays. In (C) and (D), the statistical significance of differences in the results was evaluated by a Student's *t*-test, pairwise calculated with the lanes indicated. If $P < 0.01 = **$, and if $P < 0.05 = *$.

Figure 27. *cif1*⁺ is unessential for vegetative growth. (A) Tetrad analysis of a *cif1*⁺/*cif1*::*KanMX4* (Δ *cif1*) diploid. Dissection was performed on MM + AULH, and colonies from germinated spores were streaked on YE + 150 μ g/mL G418 to verify the presence of the *cif1*::*KanMX4* marker, and on MM + low adenine + ULH to verify the segregation of the *ade6* marker. All the tetrads showed 2:2 segregation of both *cif1* and *ade6* alleles. (B) Northern blot analysis of Cin and Δ *cif1* cells. Samples of 5 μ g of total RNA prepared from exponential phase cells were loaded on a 1.2% agarose-formaldehyde gel. RNA was probed with a ³²P-labelled DNA probe encompassing the entire *cif1*⁺ or *cnx1*⁺ coding sequence. EtBr, photograph of the ethidium-bromide staining show the 18S and 25S rRNAs as loading control. Cells harboring calnexin on a plasmid have higher levels of *cnx1*⁺ RNA, however these cells contain the same amount of Cnx1p; thus confirming that the levels plasmid-encoded Cnx1p are equivalent to genomic expression. (C) Western blotting of Cin and Δ *cif1* cells. Cell extracts were made as described in Material and Methods, and 10 μ g of material was loaded for fractionation on a 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane; Western blotting was carried out using rabbit polyclonal anti-Cif1p serum at a 1:5,000 dilution, and with anti-Cnx1p polyclonal antibodies at a 1:35,000 dilution. As a loading control, the same

membrane was immunoblotted with anti-tubulin monoclonal antibodies at a 1:5,000 dilution.

Figure 28. Nucleolar localization of Cif1p is abolished by the KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutation. (A) Cif1p localizes to the nucleolus of WT and both types of Cin cells. Exponentially growing cells expressing a Cif1p-Venus and a Fib1p-mRFP fusion were fixed as described in Material and Methods. Slides were mounted with a DAPI-containing media (1 µg/mL DAPI, 1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Cells were examined by fluorescence microscopy. Venus, mRFP, DAPI, merge and Nomarski show the same fields of cells for each strain. (B) Replacement of KRKR₂₇₋₃₀ with alanines abolishes the nucleolar localization of Cif1p. Exponentially growing cells expressing a Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA-Venus fusion and a Fib1p-mRFP fusion were fixed as analyzed by fluorescence microscopy as in panel A.

Supplementary Figure 2. Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay. Cells auxotrophic for leucine and uracil (*ura4D18*, *leu1-32*), with a genomic deletion for *cnx1*⁺ (Δ *cnx1*) and harboring a plasmid encoding calnexin (*pcnx1*⁺) are used to test for the induction of the Cin state. 1) Cin-inducing genes such as *Ahcd_cnx1* or *cif1*⁺ on expression plasmids are introduced by transformation into this strain. After introduction of the Cin inducers, cells are cultured in non-selective minimal medium for 7 days. Under these conditions, Cin cells lose *pcnx1*⁺ as calnexin is no longer essential for viability in the Cin epigenetic state. To identify the Cin cells, the cultures are plated on non-selective medium, and colonies are restreaked on selective and non-selective medium to check for

the presence or absence of the *pcnxI*⁺ plasmid. 2) In the overexpression screen, the candidate Cin-inducing genes are screened for by transformation of *S. pombe* cDNA overexpression libraries. 3) In the random insertion screen, to identify candidate Cin-inducing genes, a *ura4*⁺ linear DNA fragment was transformed and the cassette inserted randomly into the *S. pombe* genome.

Supplementary Figure 3. The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the Cin_{Δhed_cnx1} or Cin_{cif1} states. (A) Examination of the nuclear shape of WT and both types of Cin cells. Exponentially growing cells containing a plasmid encoding the nuclear protein Hht2p fused with YFP (Riken, Japan) were fixed as described in Material and Methods. Slides were mounted with a DAPI-containing media (1 μg/mL DAPI, 1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Cells were examined by fluorescence microscopy. Venus, DAPI and Nomarski show the same fields of cells for each strain. (B) Examination of the nucleolar shape of WT and both types of Cin cells. Exponentially growing cells expressing a plasmid encoding the nucleolar protein Gar2p fused with YFP (Riken, Japan) were fixed, mounted and examined as in panel A.

Supplementary Figure 4. Cif1p forms fibers in vitro. Cif1p-his₆ was purified from *E. coli* under denaturing conditions, and incubated at 30°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 150 mM NaCl for 14 days. The protein solution was centrifuged at 16,000 X g for 15 minutes and the supernatant was transferred on MICA for observation by solid-state atomic force microscopy. The diameter (height) of oligomers and fibrils is shown; the full range of the

brown scale corresponds to a height of 15 nm. Soluble proteins are not visible, amorphous aggregates form particles of various sizes; organized aggregates form regularly-shaped particles or fibers. Arrows indicate fibrillar structures.

Supplementary Figure 5. Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA-Venus. Exponentially growing $\Delta cif1$ cells expressing a Cif1p-Venus and a Fib1p-mRFP fusion were treated with 1.6% methanol (vehicle, control) or 100 ng/mL leptomycin B for 6 hours. Following which cells were fixed, mounted and examined as describe previously. Venus, mRFP, DAPI, merge and Nomarski show the same fields of cells for each strain. Leptomycin B provokes both a deceleration of cell growth and aberrant nuclear shape.

Supplementary Figure 6. Cif1p and Cnx1p do not co-immunoprecipitate. Immunoprecipitations were performed using extracts of exponentially growing cells with anti-Cif1p antibodies. Calnexin was detected by immunoblotting using the appropriate antibodies as described in the Materials and Methods.

Table IV. Strains used in this study.

Table V. Overexpression of *cif1*⁺ induces the Cin_{cif1} state. Plasmid segregation assays were carried out by culturing $\Delta cnx1 + pcnx1^+$ cells in non-selective liquid medium and

scoring auxotrophies/prototrophies on selective media, as described in Materials and Methods and supplementary Figure 2. – indicates no appearance of calnexin-free cells, and + indicates stable maintenance of the Cin state. The results are representative of 3 independent experiments.

Table VI. Cin_{cif1} is partially dominant in diploid cells. $\Delta cnx1 + pcn1^+$ cells were mated with $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ or Cin_{cif1} cells, and submitted to a plasmid segregation assay. For each of these independent diploids, over 200 colonies were streaked to examine the absence of calnexin (Cin state).

Table VII. $cif1^+$ is not required for the induction of the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ state. Plasmid segregation assays were carried out by growing $\Delta cnx1 \Delta cif1 + pcn1^+$ cells in non-selective medium and scoring auxotrophies/prototrophies on selective media, as described in Material and Methods. The results are representative of 3 independent experiments.

Table VIII. $cif1^+$ is not required for the maintenance of either Cin state. A diploid was obtained by crossing a $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ strain ($cif1^+ \Delta cnx1$) and a calnexin-dependant (Cdn) strain deleted for $cif1^+$ ($\Delta cif1 \Delta cnx1 + pcn1^+$), and sporulated in low nitrogen media. Asci were digested overnight with lysing enzymes, and plated on low adenine media to distinguish between haploid (red or pink) and diploid (white) cells. Haploids were then restreaked on YE + G418 150 μ g/mL to examine the presence of the $cif1::KanMX4$ marker, and on selective MM to examine the presence of the $pcn1^+$ plasmid.

RÉFÉRENCES

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., Warbrick, E. .** (1993). Experiments with Fission Yeast. 186.
- Amaral, M. D.** (2004). CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* **23**, 41-8.
- Anelli, T. and Sitia, R.** (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *Embo J* **27**, 315-27.
- Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M. and Opas, M.** (2005). Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* **245**, 91-121.
- Benkemoun, L. and Saupe, S. J.** (2006). Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol* **43**, 789-803.
- Caramelo, J. J. and Parodi, A. J.** (2008). Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem* **283**, 10221-5.
- Chevet, E., Jakob, C. A., Thomas, D. Y. and Bergeron, J. J.** (1999). Calnexin family members as modulators of genetic diseases. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 473-80.
- Chua, G., Taricani, L., Stangle, W. and Young, P. G.** (2000). Insertional mutagenesis based on illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **28**, E53.
- Cokol, M., Nair, R. and Rost, B.** (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**, 411-5.
- Collin, P., Beauregard, P. B., Elagoz, A. and Rokeach, L. A.** (2004). A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* **117**, 907-18.
- Collinge, J. and Clarke, A. R.** (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**, 930-6.
- de la Cruz J., D. M.-C., Linder P.** (1998). Smart Genetic Screens. *Methods in Microbiology* **26**, 27.

Delom, F., Emadali, A., Cocolakis, E., Lebrun, J. J., Nantel, A. and Chevet, E. (2006). Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ.*

Delom, F., Fessart, D. and Chevet, E. (2007). Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis* **12**, 293-305.

Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J. E., Velmurgan, S., Brown, S., Stamp, G. and Owen, M. J. (2002). Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol Cell Biol* **22**, 7398-404.

Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J. and Rokeach, L. A. (1999). Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* **112 (Pt 23)**, 4449-60.

Elbe, R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-19.

Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.

Fewell, S. W., Travers, K. J., Weissman, J. S. and Brodsky, J. L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* **35**, 149-91.

Fribourg, S. and Conti, E. (2003). Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO Rep* **4**, 699-703.

Guerin, R., Arseneault, G., Dumont, S. and Rokeach, L. A. (2008). Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 4404-20.

Hampsey, M. (1997). A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1099-133.

Hebert, D. N. and Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* **87**, 1377-408.

Helenius, A. and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019-49.

Henriquez, R., Blobel, G. and Aris, J. P. (1990). Isolation and sequencing of NOP1. A yeast gene encoding a nucleolar protein homologous to a human autoimmune antigen. *J Biol Chem* **265**, 2209-15.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K. U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S. and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**, 501-7.

Jannatipour, M. and Rokeach, L. A. (1995). The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* **270**, 4845-53.

Kaufmann, S. H., Lee, S. H., Meng, X. W., Loegering, D. A., Kottke, T. J., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Samejima, K. and Earnshaw, W. C. (2008). Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* **44**, 262-72.

King, C. Y. and Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* **428**, 319-23.

Kleizen, B. and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 343-9.

Kuznetsov, G. and Nigam, S. K. (1998). Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* **339**, 1688-95.

Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y. and Williams, D. B. (2002). Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* **277**, 29686-97.

Lee, W., Lee, T. H., Park, B. J., Chang, J. W., Yu, J. R., Koo, H. S., Park, H., Yoo, Y. J. and Ahnn, J. (2005). Caenorhabditis elegans calnexin is N-glycosylated and required for stress response. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1018-30.

Lenter, M. and Vestweber, D. (1994). The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. *J Biol Chem* **269**, 12263-8.

Lowe, M. and Barr, F. A. (2007). Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 429-39.

Ma, Y., Dostie, J., Dreyfuss, G. and Van Duyne, G. D. (2005). The Gemin6-Gemin7 heterodimer from the survival of motor neurons complex has an Sm protein-like structure. *Structure* **13**, 883-92.

Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Couлары-Salin, B. and Saupe, S. J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7402-7.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S. et al. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**, 911-7.

Marechal, A., Tanguay, P. L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G. and Rokeach, L. A. (2004). Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* **380**, 441-8.

Meka, H., Daoust, G., Arnvig, K. B., Werner, F., Brick, P. and Onesti, S. (2003). Structural and functional homology between the RNAP(I) subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Res* **31**, 4391-400.

Moremen, K. W. and Molinari, M. (2006). N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 592-9.

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.

Muller-Taubenberger, A., Lupas, A. N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E. and Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *Embo J* **20**, 6772-82.

Ni, M. and Lee, A. S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* **581**, 3641-51.

Nichols, M. D., DeAngelis, K., Keck, J. L. and Berger, J. M. (1999). Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *Embo J* **18**, 6177-88.

Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J. J. and Thomas, D. Y. (1995). The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *Embo J* **14**, 3064-72.

Patel, B. K. and Liebman, S. W. (2007). "Prion-proof" for [PIN+]: infection with in vitro-made amyloid aggregates of Rnq1p-(132-405) induces [PIN+]. *J Mol Biol* **365**, 773-82.

Pollock, S., Kozlov, G., Pelletier, M. F., Trempe, J. F., Jansen, G., Sitnikov, D., Bergeron, J. J., Gehring, K., Ekiel, I. and Thomas, D. Y. (2004). Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *Embo J* **23**, 1020-9.

Ramer, S. W., Elledge, S. J. and Davis, R. W. (1992). Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11589-93.

Rose, M. D. and Fink, G. R. (1987). KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* **48**, 1047-60.

Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Rokeach, L. A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* **5**, 345-57.

Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**, 1157-65.

Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y. and Cygler, M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell* **8**, 633-44.

Takizawa, T., Tatematsu, C., Watanabe, K., Kato, K. and Nakanishi, Y. (2004). Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli: implication for the regulation of apoptosis. *J Biochem (Tokyo)* **136**, 399-405.

Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R. and Weissman, J. S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**, 323-8.

Thammavongsa, V., Mancino, L. and Raghavan, M. (2005). Polypeptide substrate recognition by calnexin requires specific conformations of the calnexin protein. *J Biol Chem* **280**, 33497-505.

Tomassini, B., Malisan, F., Franchi, L., Nicolo, C., Calvo, G. B., Saito, T. and Testi, R. (2004). Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *Faseb J* **18**, 1553-5.

Torgler, C. N., de Tiani, M., Raven, T., Aubry, J. P., Brown, R. and Meldrum, E. (1997). Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1. *Cell Death Differ* **4**, 263-71.

Tuite, M. F. and Cox, B. S. (2006). The [PSI⁺] prion of yeast: a problem of inheritance. *Methods* **39**, 9-22.

Turcotte, C., Roux, A., Beauregard, P. B., Guerin, R., Senechal, P., Hajjar, F. and Rokeach, L. A. (2007). The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* **7**, 196-208.

Uptain, S. M. and Lindquist, S. (2002). Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* **56**, 703-41.

Uptain, S. M., Sawicki, G. J., Caughey, B. and Lindquist, S. (2001). Strains of [PSI⁺] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. *Embo J* **20**, 6236-45.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-40.

Wickner, R. B., Edskes, H. K., Shewmaker, F. and Nakayashiki, T. (2007). Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol* **5**, 611-8.

Williams, D. B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **119**, 615-23.

Zuppini, A., Groenendyk, J., Cormack, L. A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R. C. and Michalak, M. (2002). Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry* **41**, 2850-8.

Table IV. Strains used in this study

Strain	Genotype	Source
SP247	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 his3D1</i>	(Burke and Gould, 1994)
SP248	<i>h⁻ ade6-M216 ura4-D18 leu-32 his3D1</i>	(Burke and Gould, 1994)
SP556	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	P. Nurse Lab
SP3220 (Cdn)	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>cnx1</i> ⁺	(Elagoz, Callejo <i>et al.</i> , 1999)
SP6089	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP42 <i>cnx1</i> ⁺	(Elagoz, Callejo <i>et al.</i> , 1999)
SP8433	<i>h⁺ ade6M210 ura4D18 leu1-32 $\Delta cnx1::his3$ + pREP42cnx1⁺</i>	This study
SP7188 (Cin Δ hed _{cnx1})	SP248 $\Delta cnx1::his3$ [<i>cif</i>] (derivative of SP3222)	(Collin, Beaugard <i>et al.</i> , 2004)
SP8599	SP6089 + pREP3X	This study
SP8603	SP6089 + pREP3X <i>egfp</i>	This study
SP8520	SP6089 + pREP3X <i>cif1</i> ⁺	This study
SP8537	SP6089 + pREP41X <i>cif1</i> ⁺	This study
SP8680 (Cin _{cif1})	SP248 $\Delta cnx1::his3$ [<i>cif</i>] (derivative of SP8520)	This study
SP8711	SP8680 + pREP41X <i>cif1</i>	This study
SP17814	SP6089 + pREP1 <i>cif1KRKR</i> ₂₇₋₃₀ /AAAA	This study
SP7202 (Cin Δ hed _{cnx1} + p <i>cnx1</i>)	SP7188 + pREP41 <i>cnx1</i>	(Collin, Beaugard <i>et al.</i> , 2004)
SP8699 (Cin _{cif1} +	SP8680 + pREP41 <i>cnx1</i>	This study

<i>pcnx1</i>)		
SP8887	<i>h⁺/h⁺ ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 cif1::kanMX4/cif1⁺</i>	Bioneer
SP8912	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 his3D1 cif1::kanMX4</i>	This study
SP8952	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 his3D1 cnx1::his3 cif1::kanMX4 pREP42/cnx1⁺</i>	This study
SP8991	SP8952 + pREP41/ Δ <i>hcd_cnx1</i>	This study
SP8997	SP8952 + pREP3X/ <i>cif1⁺</i>	This study
SP10370	SP556 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1venus</i>	This study
SP10372	SP7188 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1venus</i>	This study
SP10376	SP8680 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1venus</i>	This study
SP10373	SP556 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1KRRK₂₇₋₃₀/AAA</i> <i>Avenus</i>	This study
SP10374	SP7188 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1KRRK₂₇₋₃₀/AAA</i> <i>Avenus</i>	This study
SP10375	SP8680 + pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP + pREP42 <i>cif1KRRK₂₇₋₃₀/AAA</i> <i>Avenus</i>	This study

Table V. Overexpression of *cif1*⁺ induces the Cin_{*cif1*} state.

Constructs	Appearance of calnexin-free cells
(1) $\Delta cnx1 + pcnx1^+$	-
(2) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP3x$	-
(3) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP3xegfp$	-
(4) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP3xcif1^+$	+
(5) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP41xcif1^+$	-
(6) Cin _{<i>cif1</i>} + pREP42 <i>cnx1</i> ⁺	+
(7) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP1cif1KRKR_{27-30}/AAAA$	-

Table VI. Cin_{*cif1*} is partially dominant in diploid cells.

Diploid	Total cells	Cin cells	% of Cin
X $\Delta cif1 \Delta cnx1 pREP42cnx1^+$ <i>cif1</i> ⁺ $\Delta cnx1$ (Cin _{Δhed_{cnx1}})	7	7	100
X $\Delta cif1 \Delta cnx1 pREP42cnx1^+$ <i>cif1</i> ⁺ $\Delta cnx1$ (Cin _{<i>cif1</i>})	9	5	56

Table VII. *cif1*⁺ is not required for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state.

Constructs	Appearance of calnexin-free cells
(1) <i>Δcif1 Δcnx1</i> pREP42 <i>cnx1</i> ⁺	-
(2) <i>Δcif1 Δcnx1 pcnx1</i> pREP41 <i>Δhcd_cnx1</i>	+
(3) <i>Δcif1 Δcnx1 pcnx1</i> pREP3 <i>xcif1</i> ⁺	+

Table VIII. *cif1*⁺ is not required for the maintenance of either Cin state.

Diploid	No. of spores studied			% of Cin
	Total Cin spores	Cin <i>l</i>cif1⁺	Cin <i>l</i>Δ<i>cif1</i>	<i>l</i>Δ<i>cif1</i>
X <i>Δcif1 Δcnx1</i> pREP42 <i>cnx1</i> ⁺ <i>cif1</i> ⁺ <i>Δcnx1</i> (Cin _{Δhcd_cnx1})	1387	660	696	50.2

A

MSEEITESIVKNFGSAETSVGEKQPKRKRRSEVRAEKLKARK
 LOKAAEIVOKOKENRKILKDVSLKRLSKSLDRSLPSENTIDQI
 SFNHAMSEEDASGYQIGDKHKNLLYKLSSSSSGSVFTENLYS
 TIQEFLSAQKVDIADSKNTYVFGSTFDKKSHALVKTSDSVRS
 LKYGSFVKACAPLFRFASGDKAHAPHFHQALLKLELAPSAIR
 FGVFPNFSLOQSVSNGYMSMESNFSSIKYGFVVIIWGEINDVE
 LKIPAISHSLKLDGSLVLRSSLLHQWYSLPKQSILYEIRLFA
 MSSLWHYEKNKSIKIAKKDDI

B

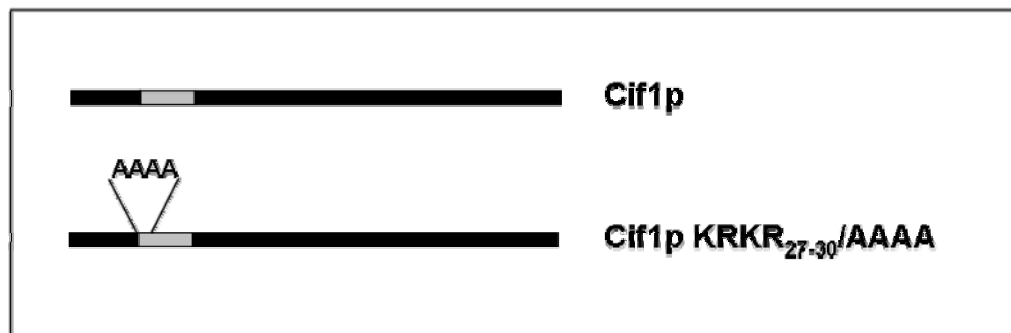


Figure 25: Primary structure of Cif1p

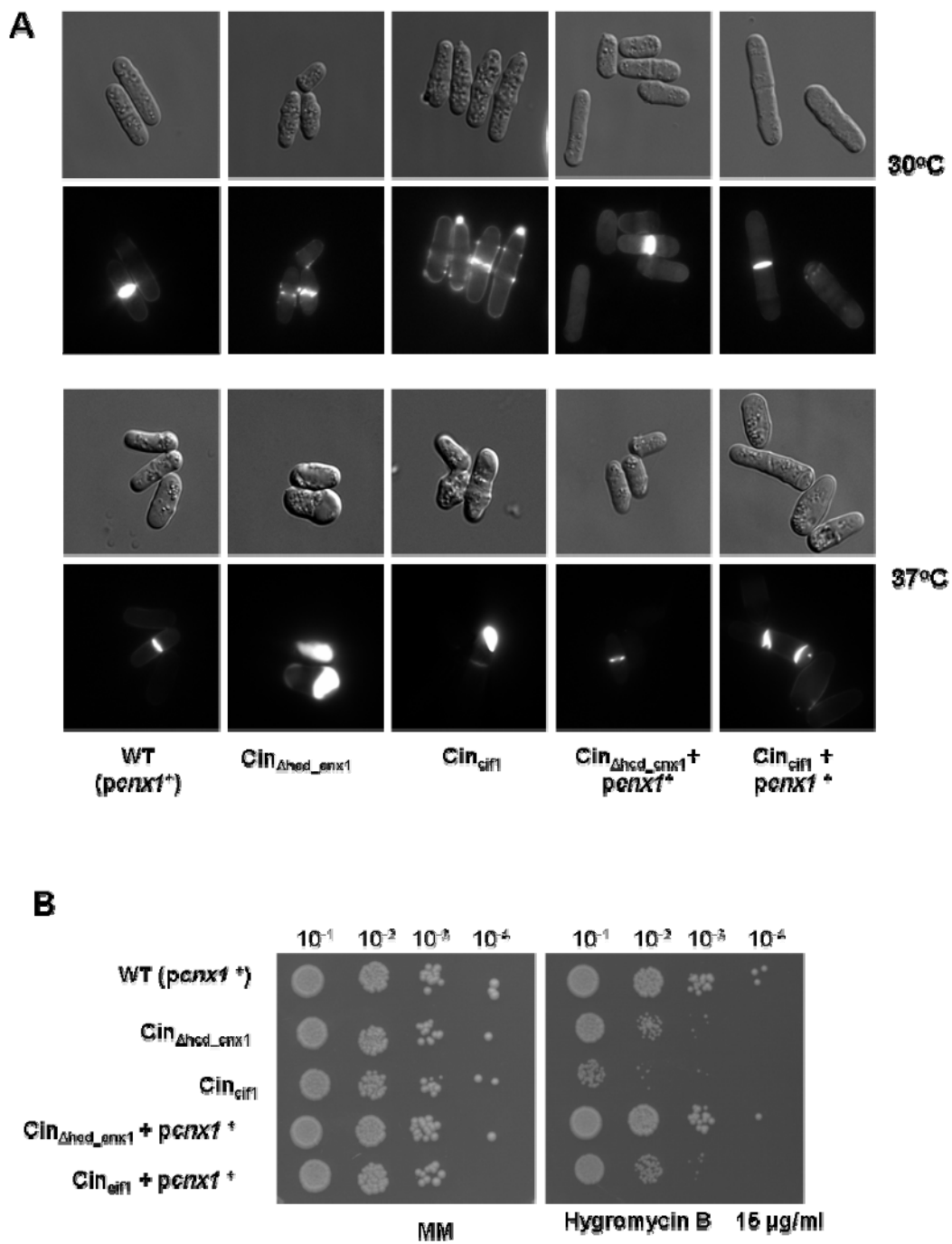


Figure 26: *Cin*_{cifI} cells display phenotypic differences with *Cin*_{Δhed_enx1} cells.

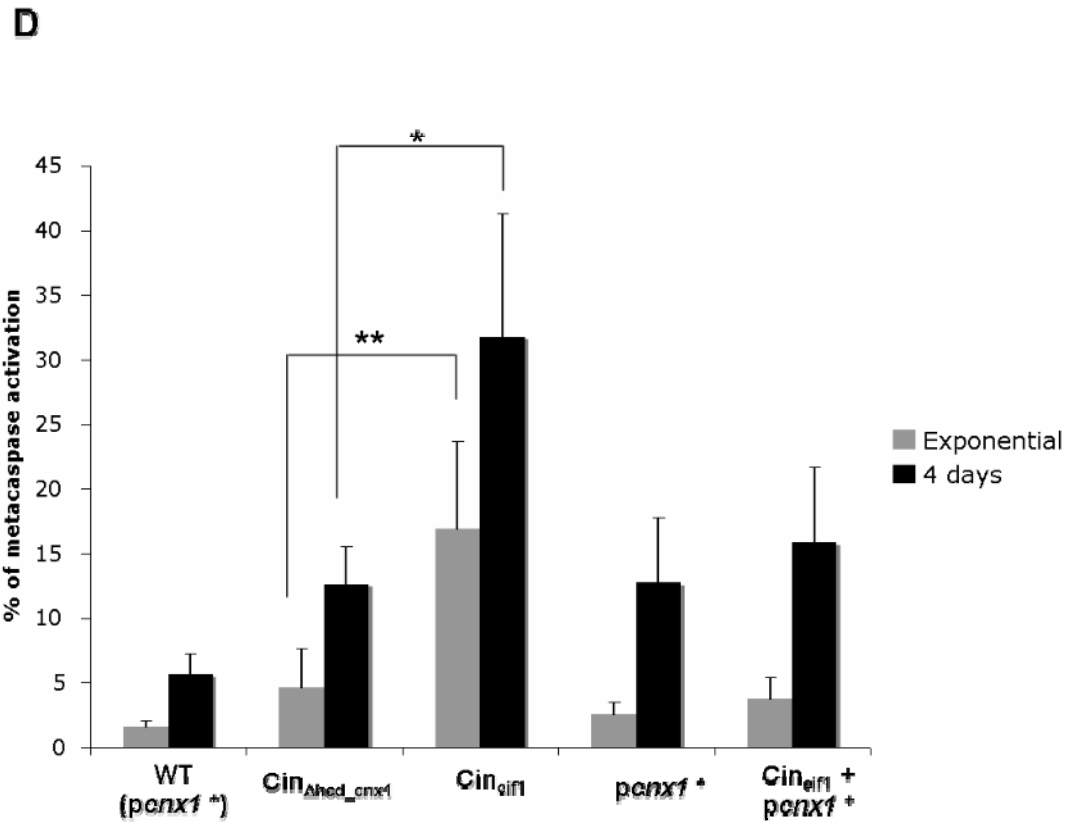
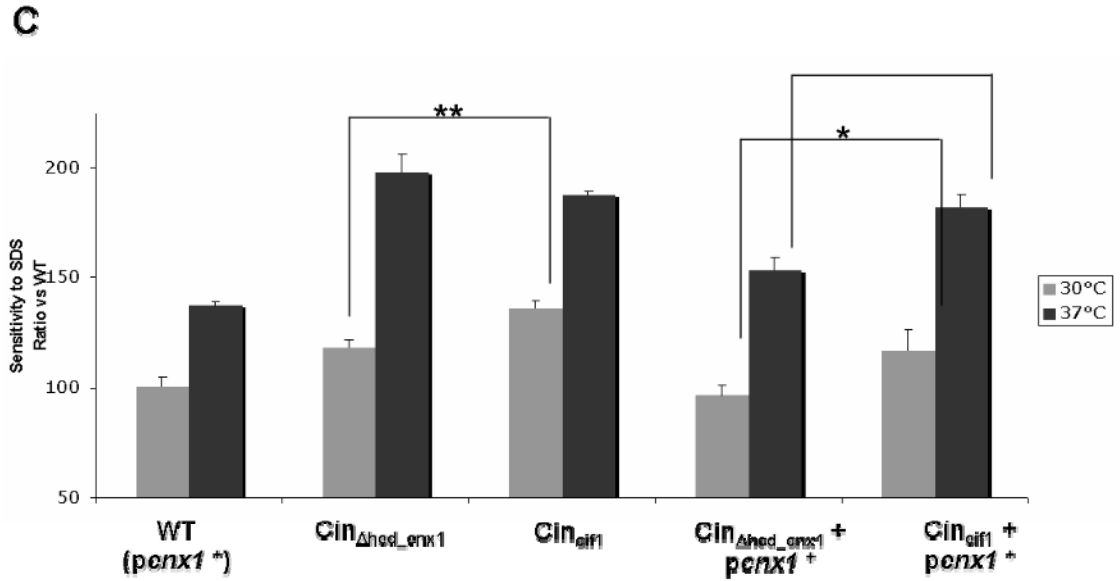


Figure 26 (suite): *Cin*_{qif1} cells display phenotypic differences with *Cin*_{Δhcd_cnx1} cells

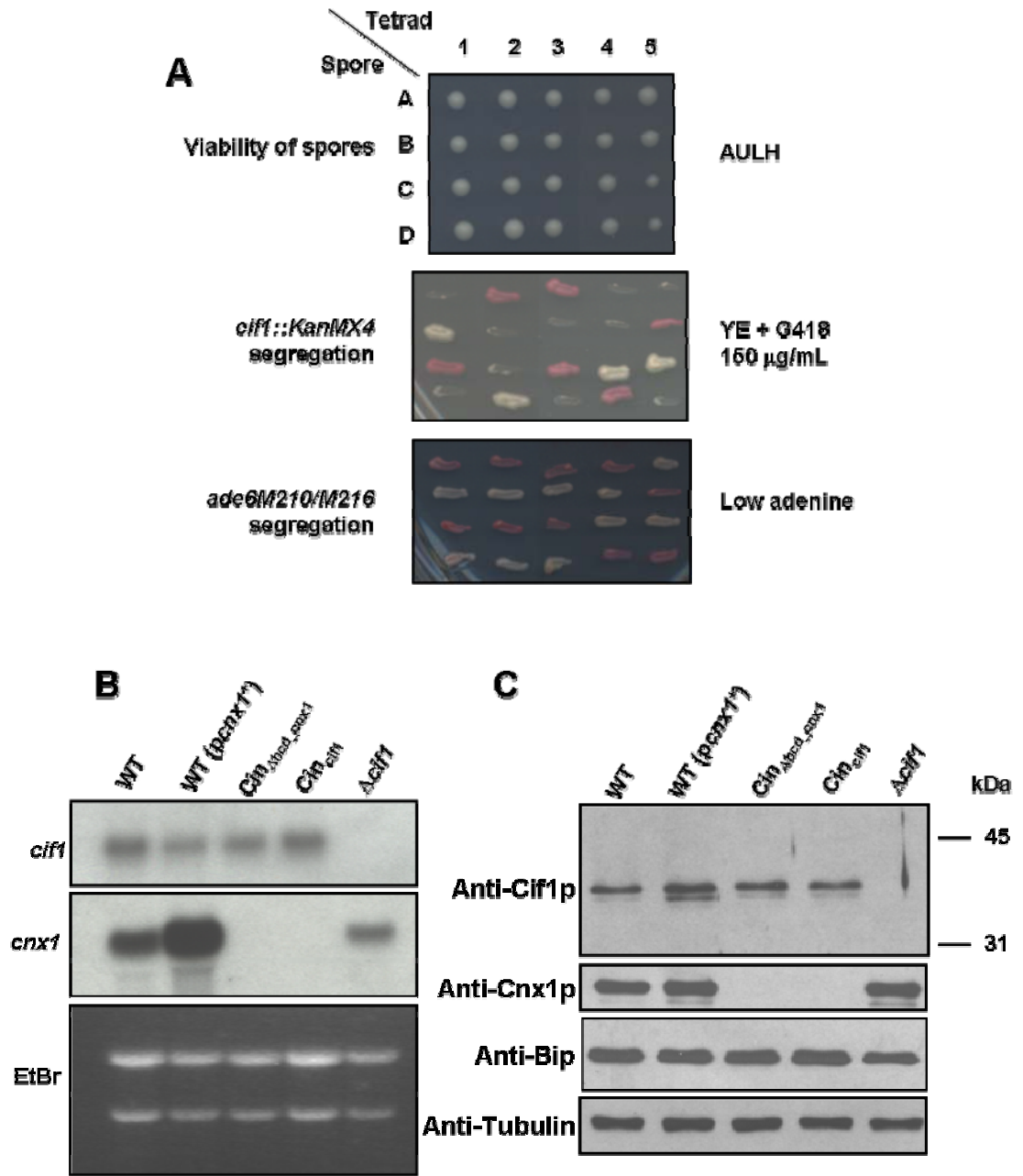


Figure 27: *cif1⁺* is unessential for vegetative growth.

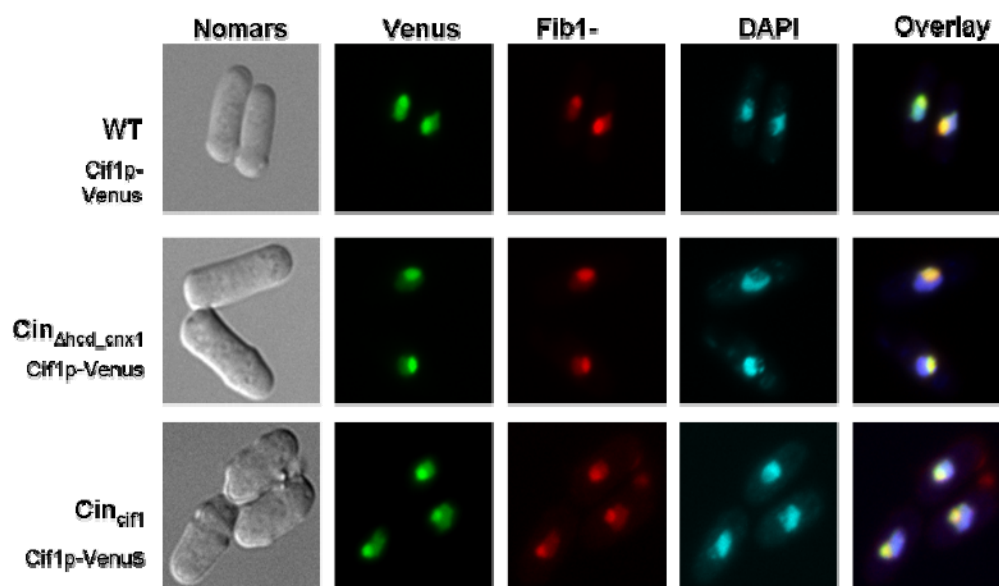
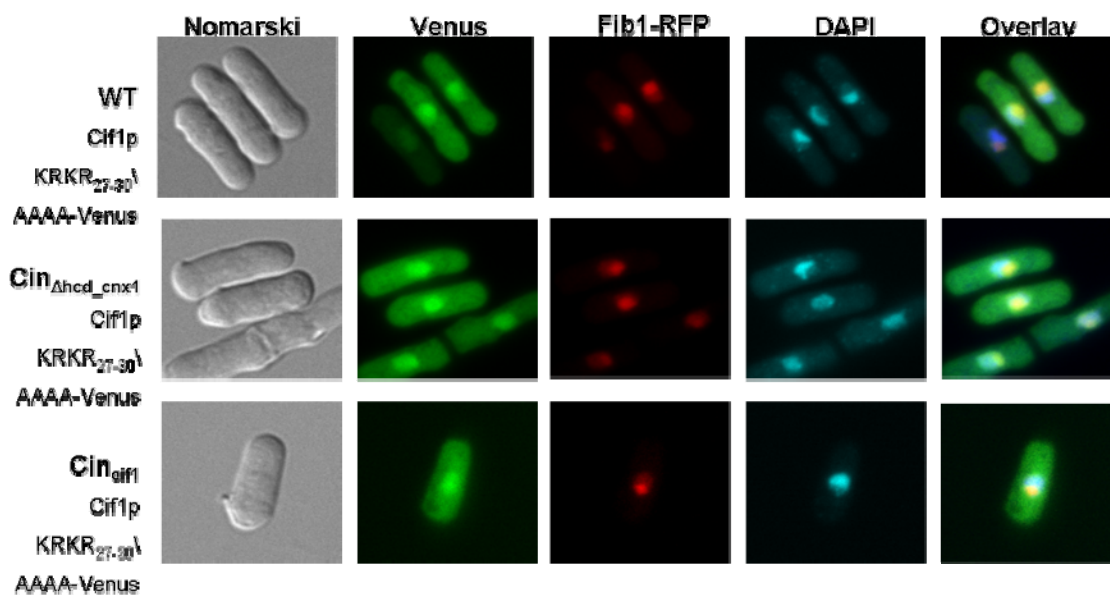
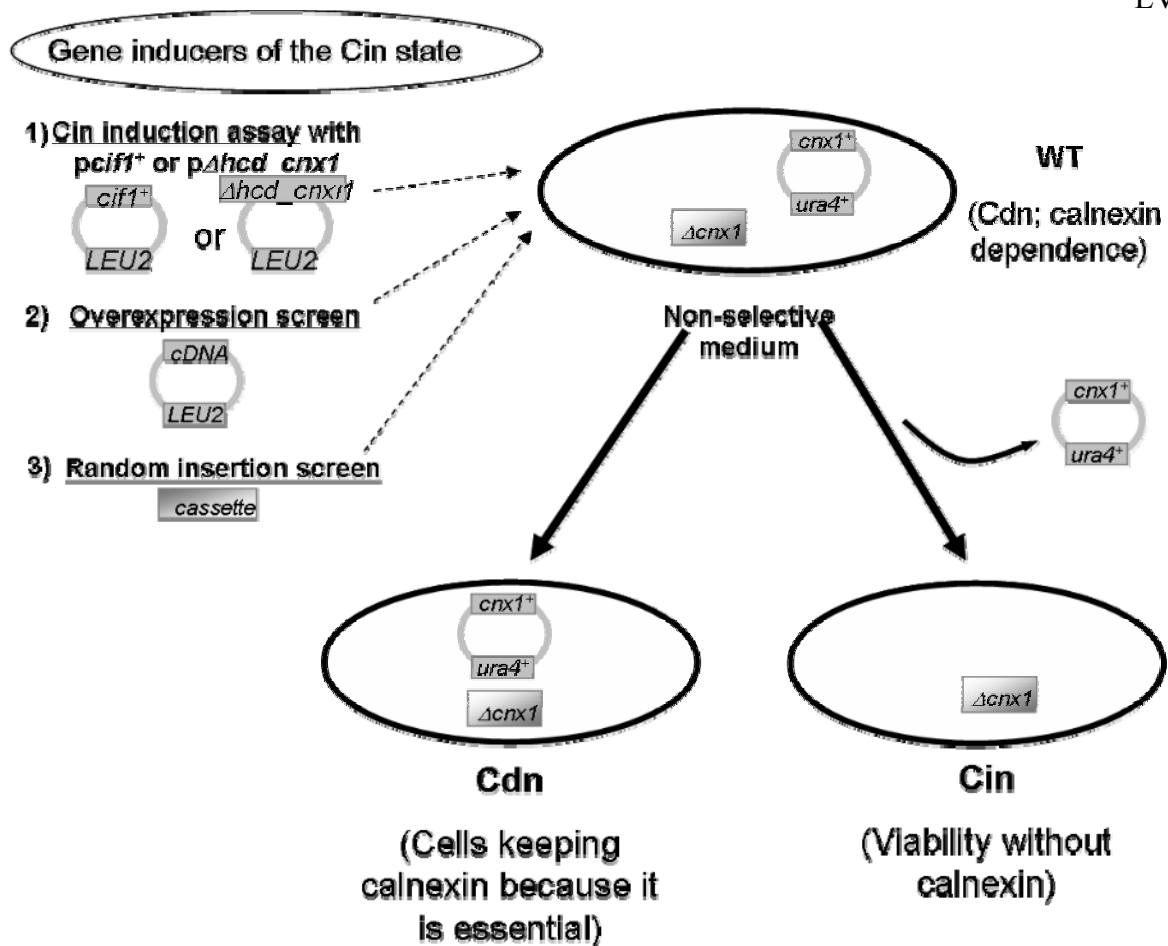
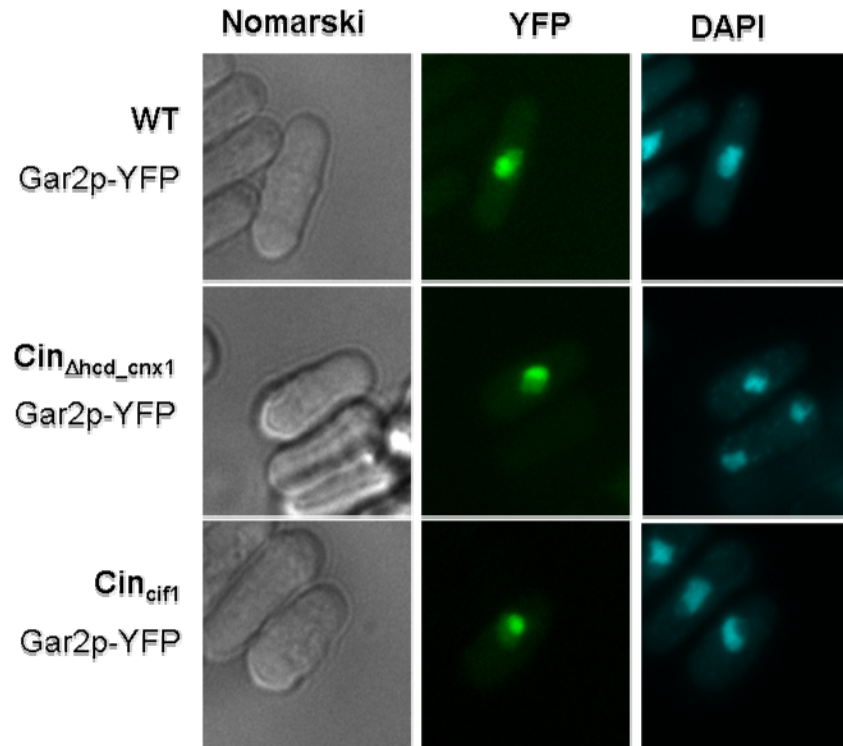
A**B**

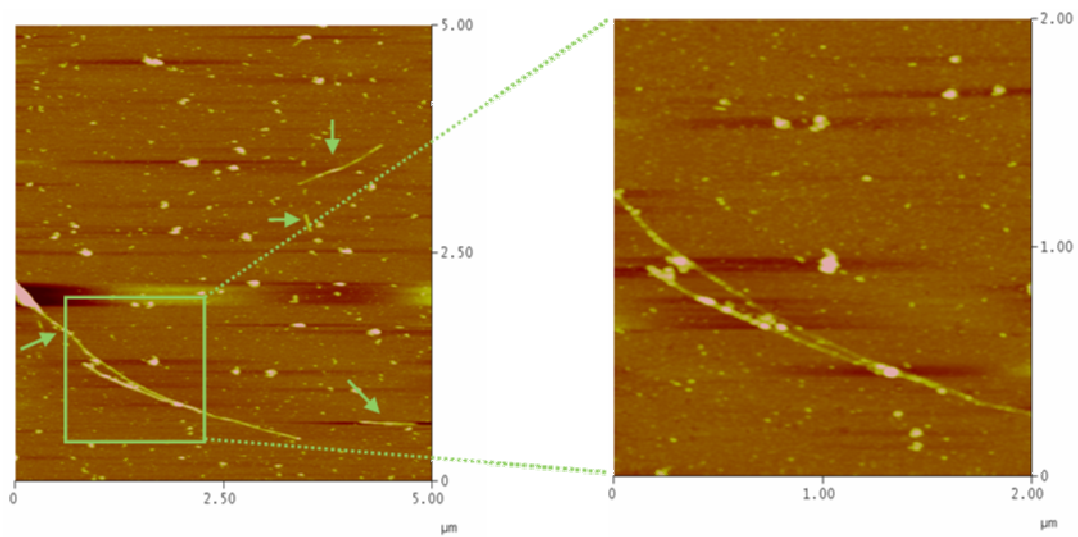
Figure 28: Nucleolar localization of Cif1p is abolished by the KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutation.



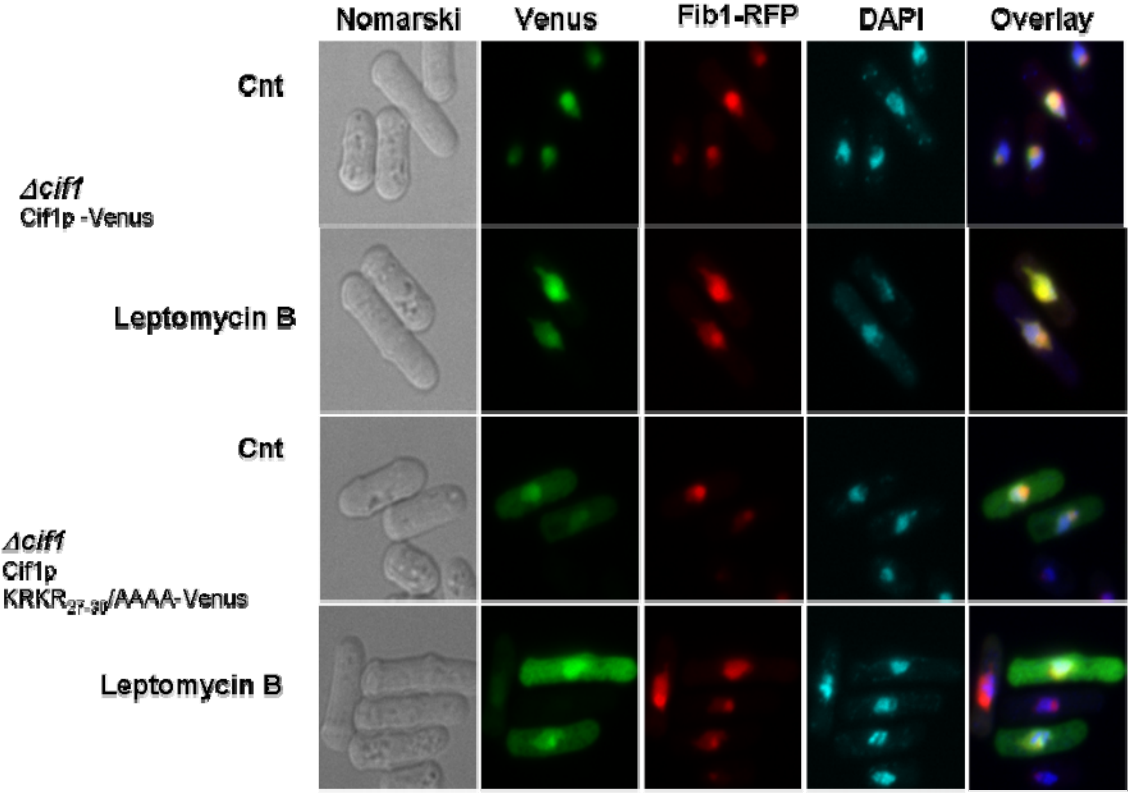
Supplementary Figure 2: Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay.



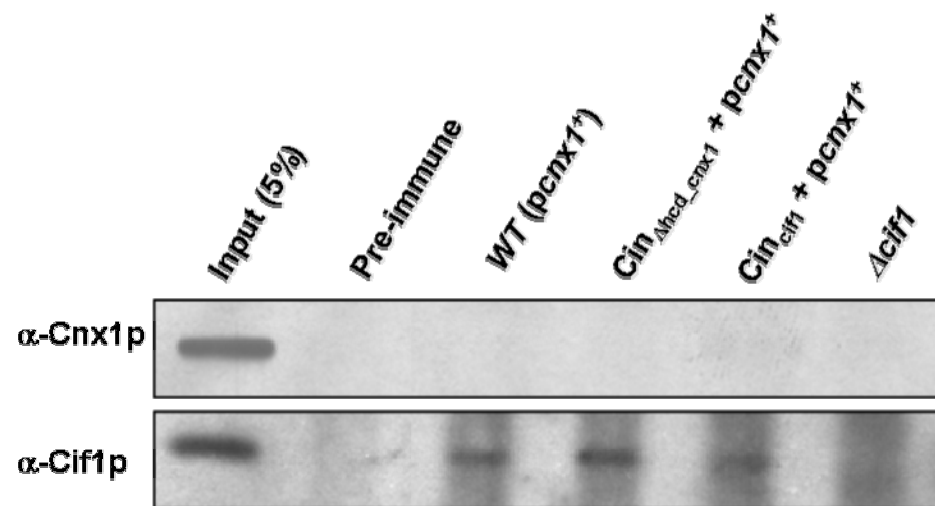
Supplementary Figure 3: The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the **Cin**_{Δhcd_cnx1} or **Cin**_{cif1} states.



Supplementary Figure 4: Cif1p forms fibers in vitro.



Supplementary Figure 5: Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA-Venus.



Supplementary Figure 6: Cif1p and Cnx1p do not co-immunoprecipitate.