

Université de Montréal

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET FONCTIONNELLE DE CIF1P, UNE PROTÉINE ORPHELINE
IMPLIQUÉE DANS LE PHÉNOMÈNE ÉPIGÉNÉTIQUE DE VIABILITÉ DE LA LEVURE *S. POMBE* EN
ABSENCE DE LA CHAPERONE CALNEXINE.**

par

Pascale B. Beauregard

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Janvier 2009

© Pascale B. Beauregard, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET FONCTIONNELLE DE CIF1P, UNE PROTÉINE ORPHELIN
IMPLIQUÉE DANS LE PHÉNOMÈNE ÉPIGÉNÉTIQUE DE VIABILITÉ DE LA LEVURE *S. POMBE* EN ABSENCE
DE LA CHAPERONE CALNEXINE.

présentée par :

Pascale B. Beauregard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Normand Brisson, président-rapporteur

Luis A. Rokeach, directeur de recherche

Muriel Aubry, membre du jury

Malcolm Whiteway, examinateur externe

Gerardo Ferbeyre, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le repliement des protéines est un processus cellulaire crucial impliquant plusieurs protéines dont la calnexine, une chaperone du réticulum endoplasmique. Notre laboratoire et un autre groupe avons démontré que la calnexine est essentielle à la viabilité de la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Dans le cadre d'études structure-fonction portant sur cette protéine, nous avons découvert un phénomène permettant la viabilité des cellules en absence de la calnexine. Cet état, nommé Cin pour *calnexine independence*, est induit par un mutant de la calnexine dépourvu du domaine central hautement conservé (Δ hcd_Cnx1p). La caractérisation de l'état Cin a révélé plusieurs caractéristiques particulières telle la dominance, sa transmission de façon non-Mendélienne à la progéniture méiotique et sa transmission par des extraits protéiques dépourvus d'acides nucléiques. Toutes ces propriétés suggèrent donc que l'état Cin est médié via un élément de type prion.

Le gène *cif1⁺*, pour *calnexin independence factor*, a été isolé lors de criblages visant à identifier des gènes impliqués dans l'état Cin. Il encode pour une protéine orpheline dont la surexpression induit de façon stable un état de viabilité en l'absence de la calnexine. Cet état diffère génétiquement et phénotypiquement de l'état Cin induit par le mutant Δ hcd_Cnx1p préalablement caractérisé, ce qui suggère deux voies parallèles de signalisation du phénomène Cin. Une caractérisation exhaustive de Cif1p a permis de démontrer qu'il ne s'agissait pas du prion responsable de l'état Cin, malgré que cette protéine possède certaines propriétés typiques des prions *in vitro*. Finalement, Cif1p est une protéine nucléolaire dont la bonne localisation est essentielle à sa capacité à induire l'état Cin. Ceci suggère une interaction entre la fonction essentielle de la calnexine et une fonction exécutée dans le nucléole.

Lors d'études visant à élucider la fonction cellulaire de Cif1p, il a été établi qu'elle interagissait avec certaines protéines de la grosse sous-unité du ribosome telle la protéine L3. Cependant, Cif1p ne co-sédimente pas avec des sous-unités ribosomales assemblées, des ribosomes ou des polysomes. De plus, des cellules contenant une délétion génomique de *cif1* voient leur contenu en ribosomes perturbé lors de la phase stationnaire. Il semble donc que Cif1p joue un rôle dans la biosynthèse des ribosomes lors de la phase stationnaire. Ce rôle spécifique à cette phase de croissance coïncide avec un clivage de la portion *N*-terminale de Cif1p, clivage qui a lieu lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire. De plus, des études effectuées récemment dans notre laboratoire proposent que la calnexine joue un rôle important dans la signalisation de l'apoptose, et ce particulièrement en phase stationnaire. Ainsi, une voie impliquant Cif1p, sa fonction nucléolaire dans la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire, la calnexine et la médiation de l'apoptose semble se dessiner. D'autres travaux, notamment sur la fonction exacte de Cif1p, le rôle de son clivage et les autres composantes impliquées dans le phénomène Cin nous permettront de dessiner un portrait plus complet de cette voie cellulaire inédite.

Mots-clés : Chaperone, Calnexine, *Schizosaccharomyces pombe*, Prion, Nucléole, Ribosome, Phase stationnaire

Abstract

Protein folding is a vital process that involves many proteins of the cell. One of them is calnexin, a chaperone of the endoplasmic reticulum. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, calnexin is essential for survival of the cells. During structure-function studies on calnexin, our laboratory discovered a phenomenon allowing the viability of cells without this chaperone. This state, designated Cin for Calnexin INdependence, is induced by a calnexin mutant devoid of the highly conserved central domain (Δ hcd_Cnx1p). Characterization of the Cin cells showed several exceptional properties such as dominance, non-Mendelian transmission and transmission via cell extracts devoid of nucleic acids of the Cin state. All these observations suggested that the Cin phenomenon is mediated via a prionic element.

To identify genes implicated in the Cin state, genetic screens were performed. They led to the identification of the *cif1*⁺ gene, for *calnexin independence factor*. This gene encodes an orphan protein, the overexpression of which stably induces a state of viability in the absence of calnexin. Notably, this state is genetically and phenotypically distinct from the previously isolated Cin state arising from Δ hcd_Cnx1p expression. This suggests the presence of two parallel pathways both able to signal the induction of the Cin phenomenon. The exhaustive characterization of Cif1p showed that it is not the prion solely responsible for the Cin state, although it displays prion-like properties *in vitro*. Finally, 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.

While investigating Cif1p function in the cell, we observed that it interacts with ribosomal proteins of the large subunit, notably L3, but it does not sediment with assembled ribosomal subunits or whole ribosomes. However, cells containing a genomic

deletion of *cif1* also have a disrupted ribosome content during stationary phase. Altogether, these results suggest that Cif1p has a role in ribosomal biogenesis during stationary phase. This growth-phase specific role correlates with the occurrence during stationary phase of a cleavage in the *N*-terminal part of Cif1p. Recent studies from our laboratory proposed that calnexin plays an important role in apoptosis signaling, especially in stationary phase. Thus, a pathway implicating Cif1p, its nucleolar function in ribosome biosynthesis in stationary phase, calnexin and apoptosis signaling is starting to emerge. However more studies, notably on the exact function of Cif1p, the role of its cleavage and the other proteins implicated in the Cin state will be necessary to draw the complete scheme of this unprecedented cellular pathway.

Keywords : Chaperone, Calnexin, *Schizosaccharomyces pombe*, Prion, Nucleolus, Ribosome, Stationary phase

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XII
REMERCIEMENTS	XIV
AVANT-PROPOS	XVI
INTRODUCTION	1
1.1 Repliement des protéines : réticulum endoplasmique	2
1.1.1 Repliement des protéines	2
1.1.2 Translocation dans le réticulum	4
1.1.3 Le repliement des protéines dans le RE : foldases	6
1.1.4 Le repliement des protéines dans le RE : Chaperones et BiP	7
1.1.5 Le repliement des protéines dans le RE : le cycle des glucans	9
1.1.6 ERAD	12
1.1.7 UPR	15
1.1.8 L'apoptose et le RE	18
1.2 Calnexine	23
1.2.1 Structure	23
1.2.2 Fonction chaperone de la calnexine : lectine et liaison des polypeptides	27
1.2.3 Partenaires	29
1.2.4 Apoptose et calnexine	32
1.2.5 Caractérisation de la calnexine dans divers organismes	34
1.3 Prions	37
1.3.1 Prion : une définition	37
1.3.2 PrP ou le premier prion	39
1.3.3 Les prions de <i>S. cerevisiae</i> : le très populaire [PSI ⁺]	41
1.3.4 Les prions de <i>S. cerevisiae</i> : [URE3] le second de classe	45
1.3.5 Les prions <i>S. cerevisiae</i> : [RNQ] l'inducteur	46
1.3.6 Le prion du champignon filamenteux <i>P. anserina</i> : [HET-s] le tueur	47
1.3.7 Induction et propriétés génétiques des prions de levure	49
1.3.8 Le changement de conformation des prions de levures	51
1.3.9 Mécanismes de propagation des prions de levure	54
1.3.10 Les prions dans la nature : avantage ou inconvénient?	58
1.3.11 Les « nouveaux » prions : élargir la définition des prions	60
1.4 Travaux préliminaires	61
1.5 Hypothèses et objectifs	64
CHAPITRE 2. A NON-CHROMOSOMAL FACTOR ALLOWS VIABILITY OF <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i> LACKING THE ESSENTIAL CHAPERONE CALNEXIN	66

2.1	Mise en contexte	67
2.2	Summary	69
2.3	Introduction	70
2.4	Materials and Methods	72
2.4.1	Strains and media	72
2.4.2	Plasmids and nucleic acid manipulation	72
2.4.3	Polymerase chain reaction	72
2.4.4	Southern and Northern blot analysis	73
2.4.5	Plasmid segregation experiments	73
2.4.6	Cell-extract preparation and transformation	74
2.4.7	Calcofluor staining of the cell wall and confocal microscopy	75
2.5	Results	77
2.5.1	<i>S. pombe</i> cells can become independent of the essential chaperone calnexin/Cnx1p	77
2.5.2	The Cin state is maintained in the presence of the <i>cnx1</i> ⁺ allele on a plasmid.....	80
2.5.3	Cin cells display reduced tolerance to temperature and altered morphology	80
2.5.4	The Cin state is dominant and transmitted to the meiotic progeny	81
2.5.5	The Cin state can be transmitted by transformation and requires a proteinaceous factor	82
2.5.6	The Cin state maintained in a <i>cnx1</i> ⁺ genomic background and transmitted in a non-Mendelian manner	85
2.5.7	The appearance of Cin cells mediated by the <i>Δhcd_cnx1</i> mutant requires the cytosolic tail of <i>Δhcd_Cnx1p</i>	86
2.6	Discussion	87
2.6.1	Two models for the appearance and survival of Cin cells	88
2.7	Acknowledgments	91
2.8	References	92
2.9	Legends	96
CHAPITRE 3. A NUCLEOLAR PROTEIN ALLOWS VIABILITY IN THE ABSENCE OF THE ESSENTIAL ER CHAPERONE CALNEXIN		111
3.1	Mise en contexte	112
3.2	Summary	114
3.3	Introduction	115
3.4	Materials and Methods	119
3.4.1	<i>S. pombe</i> genetic, strains and media	119
3.4.2	Genetic screens	119
3.4.3	DNA Constructs	120
3.4.4	Plasmid segregation experiments	122
3.4.5	Phenotypic assays	122
3.4.6	Northern blotting	122
3.4.7	Immunoblotting	122
3.4.8	Microscopy imaging	123

3.5 Results	124
3.5.1 Identification of <i>cif1</i> ⁺	124
3.5.2 The overexpression of <i>cif1</i> ⁺ induces a Cin state with distinct propagation properties	125
3.5.3 Cin _{<i>cif1</i>} cells display phenotypic differences with Cin _{Δ<i>hcd_cnx1</i>} cells	127
3.5.4 <i>cif1</i> ⁺ is not essential for vegetative growth of <i>S. pombe</i>	129
3.5.5 Cif1p is not required for induction of the Cin _{Δ<i>hcd_cnx1</i>} state or for the maintenance of either Cin state	130
3.5.6 Nucleolar localization of Cif1p is required for the induction of the Cin _{<i>cif1</i>} state	132
3.6 Discussion	134
3.7 Acknowledgements	139
3.8 References	140
3.9 Legends	147
CHAPITRE 4. A ROLE OF THE NUCLEOLAR PROTEIN CIF1P IN RIBOSOME BIOGENESIS DURING STATIONARY PHASE IN <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	168
4.1 Mise en contexte	169
4.2 Summary	171
4.3 Introduction	172
4.4 Materials and Methods	176
4.4.1 <i>S. pombe</i> growth and media	176
4.4.2 DNA Constructs	176
4.4.3 FLAG purification and immunoprecipitation	177
4.4.4 Immunoblotting	178
4.4.5 Ribosomal profiling	178
4.4.6 Northern blotting	179
4.4.7 Microscopy	179
4.5 Results	180
4.5.1 Screen to identify interacting partners of Cif1p	180
4.5.2 Cif1p interacts with the ribosomal protein L3 but does not sediment with ribosomal subunits or polysomes	180
4.5.3 Δ <i>cif1</i> cells exhibit defects in ribosomal biosynthesis in stationary phase	181
4.5.4 Cif1p is cleaved in stationary phase but remains in the nucleolus	183
4.6 Discussion	185
4.7 Acknowledgments	188
4.8 References	189
4.9 Legends	192
5.1 L'état de viabilité en l'absence de la calnexine	201
5.1.1 Signalisation et maintenance de l'état Cin	201
5.1.2 Fonction(s) de l'état Cin	202
5.2 Cif1p et l'état Cin	206
5.2.1 Identification de <i>cif1</i> ⁺ en tant qu'inducteur de Cin _{<i>cif</i>}	206

5.2.2 Cif1p, séquence et homologie	208
5.2.3 Cif1p est-il le prion?.....	209
5.2.4 Mutants de délétion de Cif1p	214
5.2.5 Études générales sur Cif1p.....	216
5.3 Cif1p en phase stationnaire	218
5.3.1 Le clivage de Cif1p	218
5.3.2 Cif1p interagit avec les protéines ribosomales L3, L7 et L8 (L7a)	219
5.3.3 Fonction(s) de Cif1p dans la maturation du ribosome	220
5.3.4 Clivage de Cif1p et effet sur la maturation du ribosome?	223
5.4 La calnexine et Cif1p : une hypothèse d'action	223
BIBLIOGRAPHIE	227
ANNEXE I : THE CALNEXIN-INDEPENDENT STATE DOES NOT COMPENSATE FOR ALL CALNEXIN FUNCTIONS IN <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	I
Summary	III
Introduction	IV
Materials and Methods	VIII
Strains and Media.....	VIII
Stress resistance	VIII
SDS-sensitivity assays	VIII
Secretion assays	IX
<i>In vivo</i> staining and microscopic analysis for caspase activity.....	IX
Flow cytometry analysis	X
Statistical Analysis	X
Results	XI
Cin cells are sensitive to cell-wall stresses	XI
Cin cells are sensitive to calcium	XIII
Cin cells are sensitive to heat shock but not to protein folding stresses	XIII
The secretion efficiency of the glycoprotein cellulase is considerably increased in Cin cells	XIV
Increased levels of caspase activity in Cin cells	XVI
Discussion	XVIII
Acknowledgements	XXII
Reference.....	XXIII
Legends	XXXI

Liste des tableaux

Table I. Récapitulation de l'influence des chaperones sur la maintenance et la propagation de prions de <i>S. cerevisiae</i> .	57
Table II. Strains used in this study	102
Table III. Mutants tested in plasmid segregation assays	103
Table IV. The Cin state is dominant.	104
Table V. The Cin state is transmitted to the meiotic progeny.	104
Table VI. Yeast strains used for this study.	158
Table VII. Overexpression of <i>cif1</i> ⁺ induces the Cin <i>cif1</i> state.	159
Table VIII. Cin _{<i>cif1</i>} is partially dominant in diploid cells.	160
Table IX. <i>cif1</i> ⁺ is not required for the induction of the Cin _{Δ<i>hed</i>_{cnx1}} state.	161
Table X. <i>cif1</i> ⁺ is not required for the maintenance of either Cin state.	162
Table XI. Yeast strains used in this study.	199
Table XII. Gènes modulés dans l'état Cin.	205
Table XIII. Gènes modulés par la surexpression de <i>cif1</i> ⁺	217

Liste des figures

Figure 1. Modèle proposé pour le contrôle de qualité du repliement des polypeptides glycosylés..	11
Figure 2. Schéma simplifié de certaines voies menant à l'apoptose suite à un stress du RE.	20
Figure 3. Structure de la calnexine.	24
Figure 4. Représentation schématique de la propagation des prions.	38
Figure 5. Représentation schématique des prions de <i>S. cerevisiae</i> [PSI ⁺] et [URE3].	44
Figure 6. Représentation schématique du prion [Het-s] de <i>P. anserina</i> .	48
Figure 7. Essai de ségrégation plasmidique pour la calnexine.	63
Figure 8. Leu ⁻ /Ura ⁻ clones are viable calnexin-independent (Cin) cells.	105
Figure 9. Cin and Cin + <i>pcn1</i> ⁺ cells display temperature-sensitive growth.	106
Figure 10. Cin cells display thermosensitive altered morphology.	107
Figure 11. The Cin state can be transmitted by transformation and requires a proteinaceous factor.	108
Figure 12. The Cin state is plasmid-independent, maintained in the <i>cnx1</i> ⁺ genomic background transmitted in a non-Mendelian fashion.	109
Figure 13. A two-component model for the survival mechanism of Cin cells.	110
Figure 14. Primary structure of Cif1p.	152
Figure 15. Cin _{cif1} cells display phenotypic differences with Cin _{Δhcd_cnx1} cells.	154
Figure 16. <i>cif1</i> ⁺ is unessential for vegetative growth.	155
Figure 17. Nucleolar localization of Cif1p is abolished by the KRKR ₂₇₋₃₀ /AAAA mutation.	156
Figure 18. Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay.	163
Figure 19. The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the Cin _{Δhcd_cnx1} or Cin _{cif1} states.	164
Figure 20. Cif1p forms fibers <i>in vitro</i> .	165
Figure 21. Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR ₂₇₋₃₀ /AAAA-Venus.	166
Figure 22. Cif1p and Cnx1p do not co-immunoprecipitate.	167
Figure 23. Interaction partners of Cif1p.	195
Figure 24. Cif1p interacts with ribosomal protein L3 but does not sediment with ribosomal subunits or mature ribosomes.	196
Figure 25. Cif1p is necessary for the correct biosynthesis of ribosomal subunits in stationary phase.	197
Figure 26. Cif1p is cleaved in stationary phase but remains in the nucleolus.	198
Figure 27. Agrégation de Cif1p en présence de thioflavine-T.	211
Figure 28. Immunobuvardages contre Cif1p avec différents anticorps.	213
Figure 29. Mutants de Cif1p.	215
Figure 30. Modèle récapitulatif.	226

À ceux qui cherchent

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux dans son laboratoire. Luis, merci de m'avoir pointé un chemin ni trop clair ni trop flou, et de m'avoir soutenu et conseillé tout au long de ce parcours.

Mon doctorat s'est déroulé dans un environnement où l'entraide était très présente. Tout le personnel du département de biochimie a contribué à un moment ou à un autre au succès de mes études, et pour cela je les en remercie. Je voudrais remercier, pour avoir donné leurs précieux avis sur mon projet, Dr Pascal Chartrand, Dr Pierre Belhumeur, Dr Gerardo Ferbeyre, Dr Jim Omichinski et Dr Franz Lang. Aussi, je voudrais remercier des étudiants pour leur aide technique et leurs bons conseils; merci notamment à Karine Boulay, Frank Gallardo et Shen Yaoqing. Merci à Nicolas Paquin, pour le temps et l'expertise qu'il m'a généreusement partagé. J'ai bénéficié, lors de mes études, d'importantes collaborations qui m'ont permis de faire avancer mon projet. Pour cela, je remercie Dr Linda Johnston et sa chercheuse post-doctorale Amira Choucair, ainsi que Dr Jürg Bähler et Stephen Watt.

Je voudrais dire un merci tout spécial au Dr Susan Lindquist, qui a été excessivement généreuse en temps et en conseils, et qui m'a invitée à effectuer un stage de perfectionnement dans son laboratoire. Merci aussi au personnel, étudiants et chercheurs post-doctoraux de son laboratoire qui m'ont accueilli à bras ouverts, notamment Randal Halfmann, Rajaraman Krishnan et Peter Tessier.

Merci à tous les membres passés et présents du laboratoire. Particulièrement Pierre-Luc, Philippe, Fadi, Alex L., Patrick, Cynthia et Antoine pour m'avoir écoutée et supportée,

conseillée et soutenue pendant mon doctorat qui ne fut pas toujours facile pour moi, et pour vous parfois en contrecoups. Un merci gros comme le monde à Renée, ma complice de tous les jours dans cette épopée que furent nos doctorats. Même si un simple merci ne m'apparaît pas suffisant, merci quand même pour ton aide inestimable, tes conseils, ton support, tes critiques, les cafés du matin, les jasettes et ton amitié.

Enfin un grand merci à ma famille, qui a toujours prêté une oreille attentive à mes histoires parfois compliquées, et qui m'ont donné des avis sincères et un soutien moral inconditionnel. Le dernier et non le moindre merci, à Alex pour cet amour et ce support que tu m'as donné et sans lesquels je ne serais pas arrivée au bout du chemin. Ze t'aime plus que tout. Et sans oublier, merci à Laurence pour être là, simplement.

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat est l'aboutissement de plusieurs années d'études acharnées sur un sujet passionnant et complexe. Cependant, les résultats et conclusions qui y sont ne représentent pas à mon avis ce qu'a réellement été mon doctorat. Le déroulement de mes recherches a été plus tortueux, parsemé à la fois de succès, mais aussi d'échecs, de doutes, de collaborations, et surtout d'apprentissage. Pendant ces six années j'ai lu et analysé la littérature de différents domaines gravitant autour de mon sujet de thèse, tout comme j'ai appris de très nombreuses techniques me permettant de réaliser les expériences nécessaires à l'avancement de mon projet. Mais encore plus, j'ai appris les équilibres nécessaires au scientifique; la balance entre des hypothèses trop innovatrices et trop conservatrices, entre persévérer sur un sujet prometteur et s'arrêter s'il n'aboutit pas, entre douter de ses résultats et les croire lorsqu'ils s'accordent entre eux, et finalement la balance entre la science, qui peut vous engloutir, et la vie autour qu'il ne faut pas négliger.

Plus concrètement, mon projet de doctorat a commencé avec le criblage par insertion décrit dans le chapitre 3, criblage commencé lors de ma troisième année de baccalauréat et qui s'est poursuivi dans l'année qui suivit. Pendant cette année-là, j'ai aussi fait les expériences nécessaires à la complétion de l'article présenté au chapitre 2. Lors des trois années et demie qui suivirent, j'ai effectué le clonage de ma protéine, Cif1p, et commencé l'analyse de ses propriétés prioniques *in vivo* et *in vitro*. Cette portion de mon doctorat s'avéra la plus fastidieuse car elle consistait majoritairement en la fabrication d'outils et l'optimisation d'expériences jamais réalisées auparavant dans notre laboratoire. De plus, j'ai frappé quelques nœuds; Cif1p était excessivement difficile à purifier, les anticorps élicités produisaient un artéfact et certaines techniques que je mettais aux points s'avéraient non-concluantes au bout de plusieurs répétitions. Heureusement, j'ai eu droit à de précieux renforts. Je suis allée passer quelques jours dans le laboratoire du Dr Linda

Johnston (NRC-CNRC, Ottawa) où j'ai fait de la microscopie à force atomique avec le Dr Amira Choucair. Aussi, ma collègue Renée Guérin fut d'une grande aide, d'abord par son acharnement à produire la souche contenant la délétion de *cif1* et surtout pour la production et l'analyse de plusieurs mutants de Cif1p.

Un point tournant dans mon doctorat est sans contredit le stage que j'ai effectué dans le laboratoire du Dr Susan Lindquist à la fin de l'année 2006. Ce stage m'a permis de me familiariser avec différentes techniques d'analyse des prions *in vitro*, techniques pointues dont l'expertise est restreinte à quelques laboratoires à travers le monde. J'ai aussi bénéficié de discussions et des regards critiques des étudiants au doctorat, chercheurs post-doctoraux et du Dr Lindquist, ce qui m'a permis de considérer différemment mon projet. De retour de ce stage, il s'avéra que j'avais aussi réuni les outils nécessaires à la poursuite de mon projet telle la souche contenant la délétion génétique de *cif1*. J'ai donc poursuivi l'exploration de Cif1p avec un angle différent, ce qui m'a permis de finalement produire l'article présenté dans le 3^e chapitre.

L'article présenté dans le 4^e chapitre, soit la caractérisation fonctionnelle de Cif1p, a été efficacement produit lors de ma dernière année de doctorat. Ceci s'explique par le fait que j'avais à ma disposition toutes les constructions de Cif1p ainsi qu'une solide connaissance d'une vaste gamme de techniques expérimentales.

Même si mon doctorat est fini, le projet sur Cif1p et l'état Cin ne fait que commencer. Cette protéine et cet état cellulaire complexe représentent merveilleusement les relations entre les composantes d'une cellule, et la complexité de celle-ci. Cependant, Cif1p a réussi avec succès sa première mission : être un défi assez corsé pour faire ressortir le meilleur de moi-même et me faire évoluer en tant que scientifique.

Introduction

1.1 Repliement des protéines : réticulum endoplasmique

1.1.1 Repliement des protéines

Les protéines sont les composantes majeures de tous les processus du vivant. Un nombre impressionnant de protéines différentes existent pour effectuer toutes ces fonctions. Pourtant, toutes ces protéines aux formes et fonctions diverses sont composées des mêmes 20 acides aminés assemblés en chaîne, dont l'ordre et le nombre sont précieusement encodés par l'ADN. Le repliement en sa structure native est un processus crucial pour une chaîne polypeptidique. En effet, sans cette structure la protéine n'a au mieux aucune fonction et sera détruite par la cellule ou pourra lui être nuisible.

Les processus employés par une chaîne d'acides aminés pour atteindre sa structure finale sont étudiés depuis de très nombreuses années. Dans les années 60, le prix Nobel de chimie Christian B. Anfinsen et son équipe ont émis « l'hypothèse thermodynamique », qui stipule que la structure tridimensionnelle d'une protéine dans un milieu physiologique est celle où l'énergie libre de Gibbs du système entier est la plus basse [1]. Ainsi, la structure est déterminée par l'ensemble des interactions des acides aminés de la chaîne polypeptidique entre eux et avec le milieu. La nature nous montre donc comment elle est bien faite, puisque l'enchaînement des acides aminés sur la chaîne contient les informations nécessaires à la formation de la structure finale de la protéine. Le polypeptide, suffisamment dilué dans une solution physiologique, finira donc par adopter seul sa conformation finale [1].

Jusqu'au milieu des années 1990, la vision de Levinthal, aussi formulée dans les années 60, prédominait lorsqu'il était question du mécanisme de repliement d'une protéine

[2, 3]. Pris littéralement, le paradoxe Levinthal stipule que toutes les conformations d'une protéine sont également possibles, et donc que l'obtention de la conformation native doit se faire en essayant une à une toutes les conformations aléatoirement. Cependant, si l'on considère une chaîne de 100 acides aminés, avec ses 10^{70} conformations possibles, elle n'arriverait à sa structure finale qu'au bout de 10^{52} années d'essais de repliement. Ainsi, puisqu'une protéine ne prend généralement que quelques millisecondes à quelques secondes pour atteindre sa conformation finale, Levinthal a proposé qu'il existe une voie bien définie que chaque protéine emprunte pour atteindre sa conformation finale [2, 3].

L'établissement d'une nouvelle vue concernant la cinétique de repliement des protéines est dû à l'avancée des techniques expérimentales permettant une plus grande résolution et/ou une résolution beaucoup plus rapide de la structure [2, 3]. Notamment, il a été observé qu'il n'y avait pas d'accumulation d'états intermédiaires pour des petites protéines au repliement rapide [4, 5]. Cette nouvelle vue implique l'existence, pour chaque protéine, d'un « paysage énergétique » (*energy landscape*) décrivant l'énergie libre d'une chaîne de polypeptide en fonction de sa conformation. Pour chaque protéine, ce paysage énergétique prend la forme d'un entonnoir. Plus un polypeptide s'approche de sa conformation native, plus il adoptera des structures d'énergies basses, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la structure finale située théoriquement au fond de l'entonnoir, puisqu'elle a l'énergie libre la plus basse. Ainsi, l'entonnoir répond au paradoxe de Lévinthal en ce sens qu'il ne propose pas un seul chemin possible pour se rendre à la conformation finale, mais bien une multitude de chemins d'efficacité semblable [3, 6, 7].

En théorie, comme nous venons de le voir, en solution une protéine ne devrait pas avoir trop de mal à atteindre sa conformation native. Hors, dans un environnement cellulaire il en est tout autrement. De façon générale, avant l'atteinte de la structure finale la chaîne de polypeptide exposera au solvant des régions hydrophobiques qui sont

normalement camouflées à l'intérieur de la structure native. Ceci peut donner lieu à des contacts inappropriés entre les protéines, qui mènent parfois à leur agrégation et donc à l'acquisition d'une structure stable mais improductive [6].

Heureusement pour nous, la cellule a mis en place plusieurs systèmes afin de maximiser l'efficacité du repliement des polypeptides. Un des compartiments cellulaires où le repliement des protéines est le plus étroitement surveillé est le réticulum endoplasmique. En effet, en tant que première étape de la voie de sécrétion, le réticulum endoplasmique est responsable du repliement de plus de 30% des protéines produites par la cellule [8].

1.1.2 Translocation dans le réticulum

La première étape du cheminement du polypeptide nouvellement synthétisé dans la voie de sécrétion est sa translocation dans le réticulum endoplasmique. Chez les eukaryotes, les polypeptides destinés à la sécrétion possèdent dans leur extrémité *N*-terminale une séquence signal de localisation au réticulum endoplasmique (RE) d'environ 20 acides aminés hydrophobiques [9]. Sitôt émergée du ribosome, cette séquence est reconnue par le *Signal Recognition Particle* (SRP). Composé de 6 protéines et d'une molécule d'ARN 7S, ce complexe est responsable de l'arrêt de la traduction et du ciblage au RE du polypeptide en cours de traduction, via le récepteur à SRP [10-12]. L'interaction entre le récepteur et le SRP stimule le détachement de ce dernier, puis la reprise de la traduction [12]. Le ribosome va être ensuite ancré à la membrane, et la chaîne du polypeptide sera engagée dans le complexe de translocation Sec61 [10]. La force nécessaire à l'entrée dans le RE est fournie par le ribosome qui « pousse » la chaîne polypeptidique [10, 13]. Ce mécanisme de translocation de type co-traductionnel est le seul retrouvé chez les mammifères, et est aussi présent chez la levure.

De façon intéressante, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la délétion des gènes codant pour différents composants de SRP ne conduit pas à la mort cellulaire [13]. En effet, des cellules contenant une délétion pour une importante protéine du SRP croissent quand même, quoique à un rythme environ 4 à 6 fois plus lent, et la translocation de certains précurseurs protéiques n'est à peu près pas affectée [10, 13, 14]. Ces observations indiquent donc la présence d'un deuxième mécanisme de translocation qui serait quant à lui post-traductionnel. Les polypeptides destinés à ce type de translocation sont liés par les chaperones cytosoliques Hsp70s et Ydj1, qui empêchent leur repliement et/ou leur agrégation [13]. En effet, des protéines entièrement repliées ne pourraient traverser le pore Sec61. Ces précurseurs sont ensuite dirigés vers le complexe Sec63 (composé des protéines Sec62p, Sec63p, Sec71p et Sec72p), qui a été impliqué dans la reconnaissance de séquences signal [9, 13]. Ce complexe reconnaît des séquences signal moins hydrophobes que celles reconnues par le *SRP* [15]. Le complexe Sec63 livre ensuite le polypeptide au complexe Sec61 afin d'amorcer la translocation. Vu que le ribosome n'est pas impliqué dans ce processus d'exportation post-traductionnel, des composants luminaux, telle que la chaperone luminale Kar2p (BiP chez les mammifères et *S. pombe*) fournissent la force nécessaire à la translocation [9, 13].

Brièvement, le complexe Sec61 est composé de 3 protéines. La première identifiée fût Sec61p, une protéine à 10 domaines transmembranaires qui forme le pore de translocation *per se* [9, 13]. Cette protéine identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède des homologues chez les mammifères (Sec61 α) et chez les bactéries (SecY) [9, 13]. Accompagnant Sec61p se trouvent 2 petites protéines à simple domaine transmembranaire de type II, Sss1p (Sec61 γ chez les mammifères) et Sbh1 (Sec61 β) ([13]. Les trimères Sec61 $\alpha\beta\gamma$ s'associent en oligomères de 2-4 complexes, formant un anneau dont le pore intérieur aurait un diamètre de 20-35 Å tel qu'observé par microscopie électronique. Cependant, d'autres expériences ont montré que le pore du complexe Sec61 des mammifères pouvait être aussi large que 80Å, accommodant le passage de chaîne

polypeptidique dans une conformation d'hélice alpha ou d'autres structures secondaires, mais pas celui de toutes les protéines complètement repliées [10, 13].

1.1.3 Le repliement des protéines dans le RE : foldases

Une fois entrés dans le lumen du réticulum endoplasmique, les polypeptides nouvellement synthétisés se retrouvent dans un environnement où la concentration de calcium et le niveau d'oxydants sont beaucoup plus élevés que dans le cytosol. Cependant, la concentration en protéine est à plus de 100 mg/ml [10, 16]. Afin de permettre le bon repliement des polypeptides dans un tel environnement, le RE contient une panoplie de protéines qui participe à différentes étapes du repliement. Il est possible de séparer ces protéines en deux catégories, soit les foldases et les chaperones. Les premières catalysent des réactions qui promeuvent ou stabilisent le repliement protéique. Quant à elles, les chaperones lient et stabilisent les protéines en cours de repliement en prévenant les interactions incorrectes entre les divers domaines ou protéines ou en promouvant les bonnes interactions [12].

Dû à son environnement oxydant, le lumen du réticulum endoplasmique est propice à la formation de ponts disulfure, dont l'établissement correct représente par ailleurs une étape critique dans la maturation des protéines du RE [8, 11]. L'isomérisation des ponts disulfures et leur réduction occasionnelle se fait grâce aux thiols oxidoréductases. La plus étudiée de ces protéines est la protéine disulfide isomerase ou PDI des mammifères [8, 11, 17]. Elle fait partie d'une famille qui compte jusqu'à 17 membres chez les mammifères, dont 9 ont été montrés comme participant à la formation de ponts disulfure via des réactions d'oxydo-réduction [8]. Cette famille se caractérise par la présence du CXXC dans leur domaine thiorédoxine, dont l'emplacement et le nombre de copies diffèrent selon les membres [8, 11]. Des études cristallographiques ont déterminé que PDI possède une

structure en forme de U, plaçant les sites catalytiques au sommet du U [8]. L'intérieur du U contient des résidus hydrophobiques, qui seraient vraisemblablement responsables de la liaison à des polypeptides mal repliés, conférant à PDI une fonction chaperone très importante [8, 11, 17]. L'homologue de PDI de *Saccharomyces cerevisiae* est essentiel à la viabilité de la cellule. L'activité cruciale de cette protéine n'est pas la catalyse de la formation des ponts disulfures, mais plutôt la catalyse de l'échange de ceux-ci. Il existe aussi quatre autres protéines de la famille de PDI, mais qui sont non-essentiels [18]. La levure *Schizosaccharomyces pombe* possède deux homologues potentiels de PDI, dont un a été caractérisé. Ce dernier, possédant deux motifs CXXC, montre beaucoup de similarité avec la PDI encodée par la plante *Arabidopsis thaliana*, et beaucoup moins avec celle de *Saccharomyces cerevisiae* [18].

La majorité des liens peptidiques dans les protéines natives possèdent une conformation *trans*, à l'exception des liens impliquant une proline, qui peuvent adopter soit une conformation *cis* ou *trans*. Des études de repliement ont démontré que l'isomérisation *cis/trans* de ces liens peptidyl-prolyl est une étape limitante du repliement des polypeptides. Cette isomérisation est cependant facilitée par les peptidyl-prolyl isomérases (PPIases), présentes dans le RE [11, 19]. Ces protéines se divisent en trois familles non reliées structurellement : les cyclophilines, les FK506-binding proteins (FKBPs) et les parvulines. Ces trois familles se retrouvent autant chez les mammifères que chez *S. cerevisiae* [19].

1.1.4 Le repliement des protéines dans le RE : Chaperones et BiP

Le lumen du RE contient une vaste gamme de protéines chaperones. Presque toutes les familles des protéines de choc thermique (*heat shock protein*; Hsp) ont un représentant dans le RE, sauf les Hsp60. Ainsi, on y retrouve notamment quelques membres de la famille des Hsp40 (ERdj1-5) et de la famille des GrpE-like (BAP/Sil1 et GRP170), un

membre des Hsp90 (GRP94), un des Hsp100 (TorsinA) et un membre de la famille des Hsp70 dont il sera question ici (BiP/GRP78) [11].

BiP, aussi nommé GRP78 chez les mammifères ou Kar2p chez *Saccharomyces cerevisiae*, est la première chaperone eucaryote à avoir été identifiée [20]. Cette chaperone, comme tous les membres de la famille Hsp70, est composée d'un domaine ATPase et d'un domaine lisant les peptides. Ces domaines coordonnés effectuent des cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP et d'échange de l'ADP pour l'ATP, stimulant respectivement la liaison et le relâchement des polypeptides [16, 17]. L'activité hydrolyse et échange de l'ATP de BiP est modulée par différentes protéines qui agissent en tant que co-chaperones. Les co-chaperones à domaine J ERdj 1-5, semblables aux Hsp40, stimulent la faible activité ATPasique de BiP et lui permettent d'acquérir sa forme de haute affinité pour les polypeptides, ce qui en fait des régulateurs clef de son activité [11, 17]. Des protéines échangeurs de nucléotides (NEFs) vont quant à elles favoriser l'échange ADP-ATP, permettant la relâche du polypeptide emprisonné par la chaperone. Le domaine liaison aux peptides de BiP présente une préférence pour l'alternance d'acides aminés aromatiques et hydrophobiques. Ces domaines normalement enfouis dans la protéine native sont à l'origine d'agrégations non productives lorsqu'ils se retrouvent exposés à la surface. Ainsi, la liaison et capture du polypeptide immature par BiP va assurer sa protection temporaire contre l'agrégation et lui fournir un environnement propice pour poursuivre son repliement vers sa conformation native [11].

En plus de son rôle dans le repliement et l'assemblage des polypeptides nouvellement synthétisés, BiP participe à de nombreux processus du RE [11, 20]. Il agit en tant que moteur moléculaire permettant la translocation des polypeptides post-traductionnellement transloqués, et va sceller les pores de translocation inactifs du côté luminal. Il joue un rôle important dans la rétrotranslocation vers le cytosol des polypeptides

mal-repliés destinés à la dégradation, ainsi que dans l'homéostasie du calcium. Finalement, BiP jouerait un rôle important dans la régulation et la réponse cellulaire aux stress subis par le RE, dans quels cas son expression se trouve fortement augmentée [11].

Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que Kar2p est requis pour la translocation et la maturation des protéines dans le RE ainsi que dans la transduction du signal de réponse aux stress de protéines mal repliées (UPR; voir plus loin) [21]. La délétion du gène encodant Kar2p est donc létale, tout comme chez *S. pombe* [22, 23].

1.1.5 Le repliement des protéines dans le RE : le cycle des glucans

La majorité des protéines traversant la voie de sécrétion sont modifiées par l'ajout d'un ou plusieurs *N-linked* oligosaccharides. Ces glycans changent non seulement les propriétés générales des protéines, les rendant notamment plus solubles, mais ils fournissent aussi des sites de liaisons pour les chaperones de type lectine. En effet, dans le réticulum endoplasmique se trouve tout un système de régulation du repliement basé sur les modifications et la liaison de ces oligosaccharides (voir Figure 1) [11].

Les oligosaccharides transférés sur les glycoprotéines dans le RE sont composés de 2 résidus *N*-acétyl glucosamine, neuf mannoses et trois glucoses assemblés en arbre sur un dolichol-PP avant le transfert sur le polypeptide. L'oligosaccharyl transférase (OST), associée au translocon, ajoute l'oligosaccharide sur la chaîne latérale d'une asparagine (Asn-X-Ser\Thr) lors de la translocation du polypeptide dans le RE [11, 24]. Puis, les glucosidases I et II clivent rapidement le premier et le deuxième glucose de l'arbre, laissant un oligosaccharide-1-glucose qui peut être reconnu par les chaperones lectines calnexine et calréticuline [11, 25]. Ces chaperones, détaillées plus loin, vont favoriser le bon repliement du polypeptide monoglucosylées en le protégeant de l'aggrégation. Malgré leur affinité

semblable pour le $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, la calnexine et la calréticuline ne lient pas tout à fait les mêmes substrats [25]. La différence s'explique en partie par la topologie différente des deux chaperones, membranaire pour la calnexine et soluble pour la calréticuline [11, 25]. Le relâchement du glycopolypeptide par la chaperone lectine est stimulé par la glucosidase II, qui clive le troisième et dernier glucose de l'oligosaccharide [24].

Suite à leur relâchement, les polypeptides non-glucosylés vont emprunter différentes voies selon leur conformation. Les protéines natives poursuivent simplement leur chemin dans la voie de sécrétion, tandis que les protéines mal repliées sont reconnues par l'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (GT) qui va remettre un glucose sur l'oligosaccharide et ainsi permettre une nouvelle liaison avec les chaperones lectine [24, 25]. La GT joue donc un rôle central dans le cycle de liaison relâchement des substrats à leur chaperone, ainsi que dans la régulation du bon repliement des glycoprotéines. Cette enzyme va ignorer les polypeptides à conformation native, tout comme les protéines définitivement mal-repliées qui sont engagées dans un processus de dégradation. Le mécanisme de distinction des polypeptides natifs et mal-repliés de la GT n'a pas été clairement élucidé, mais il est suggéré que des petites régions avec un défaut de repliement et l'exposition de séquences hydrophobiques soient les déterminants structuraux reconnus [11, 24, 26]. Les polypeptides n'ayant pas atteint leur conformation native après une série de cycles glucosylation/déglucosylation ne restent pas indéfiniment dans le RE, mais vont plutôt être destinés à la dégradation via la voie ERAD (voir plus loin) [24, 27].

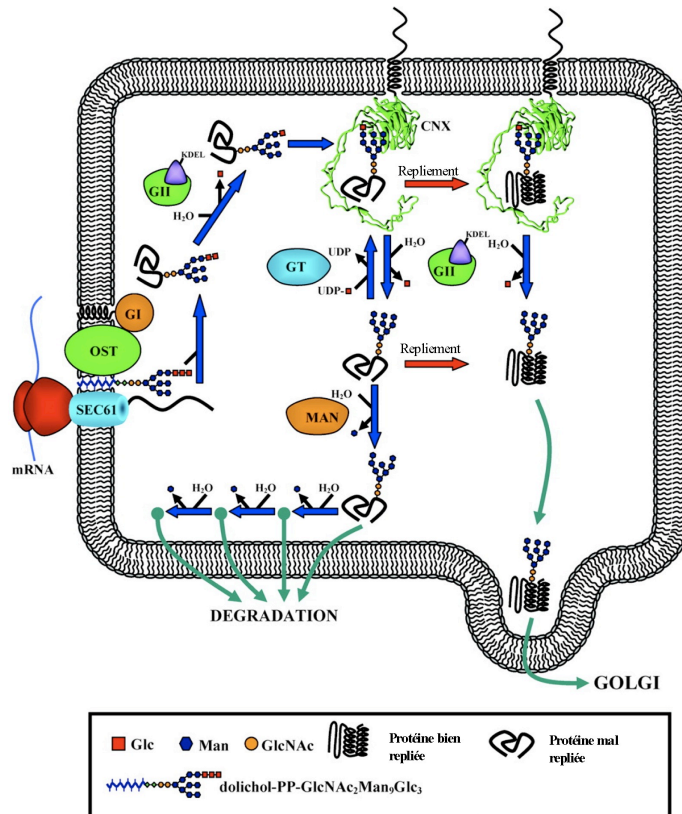


Figure 1. Modèle proposé pour le contrôle de qualité du repliement des polypeptides glycosylés. Les polypeptides nouvellement synthétisés sont *N*-glycosylés par l'oligosaccharyltransférase (OST) lors de leur translocation à l'intérieur du RE. Puis, deux glucoses de l'oligosaccharide sont clivés suite aux actions séquentielles des glucosidases I et II (GI et GII). La forme monoglucosylée ainsi générée est reconnue par la calnexine, qui favorise le bon repliement de la glycoprotéine. La glucosidase II stimule le relâchement par la calnexine du polypeptide en clivant le dernier glucose de l'oligosaccharide. Si le repliement n'est pas complet, la glycoprotéine va être re-glucosylée par la glucosyltransférase (GT) et liera à nouveau la calnexine. Les polypeptides bien repliés vont poursuivre leur chemin vers le Golgi. Les glycoprotéines irrémédiablement mal repliées vont être démannosylées et rétrotransloquées vers le cytosol pour être dégradées par le protéasome. Adapté de Caramelo, J. J. et al. *J. Biol. Chem.* 2008;283:10221-10225 [25]

Chez *S. pombe*, presque toutes les composantes de ce cycle des chaperones lectines sont conservées. Contrairement à *S. cerevisiae*, où elle est absente, la GT est présente mais n'est pas essentielle à la survie de *S. pombe* [25, 26, 28]. Elle s'avère essentielle seulement dans le cas d'un stress sévère du RE, suggérant que certaines glycoprotéines ont absolument besoin de la GT pour atteindre leur structure native efficacement [25]. Par ailleurs, ni l'une ni l'autre de ces deux levures ne possèdent un homologue de la calréticuline, mais la calnexine y est présente [26]. Plusieurs observations, dont le degré de conservation des protéines et l'augmentation du transcrit de BiP en l'absence de la GII, tendent donc à démontrer que *S. pombe* posséderait le même mécanisme de contrôle de qualité des glycoprotéines que les mammifères [26].

1.1.6 ERAD

Au milieu des années 90, l'identification et la caractérisation du protéasome 26S a mené à la surprenante constatation que la dégradation des protéines mal repliées et défectueuses du RE s'effectuait dans le cytosol [11, 27, 29]. Le concept de « *ER-associated degradation* » (ERAD) a ainsi émergé. Les mécanismes de reconnaissance des polypeptides mal repliés diffèrent selon le site de lésion, soit luminal (ERAD-L), cytosolique (ERAD-C) ou membranaire (ERAD-M) [11, 29, 30].

Le transport actif des polypeptides vers le protéasome doit pouvoir faire la différence entre des polypeptides en cours de repliement et ceux, définitivement mal repliés, qui nuisent par leur présence à l'homéostasie du RE [11]. Pour les glycopolypeptides mal-repliés du lumen, il a été observé que l'inhibition du clivage des résidus mannoses des oligosaccharides protégeait de la dégradation. Ceci a mené à l'hypothèse de « l'horloge mannose », qui stipule que le très lent clivage des mannoses des oligosaccharides met fin à la phase de maturation de la glycoprotéine et mène à sa

dégradation par l'ERAD [11, 30]. Chez *S. cerevisiae*, le clivage du mannose extérieur de la chaîne B de l'oligosaccharide par Mns1p, l'homologue de l' α 1,2-mannosidase I du RE, semble suffisant pour diriger la glycoprotéine vers la dégradation via l'ERAD [11, 27]. Cependant, chez les eukaryotes supérieurs des clivages successifs de l'oligosaccharide par les mannosidases jusqu'à une conformation de 5-6 mannoses sont nécessaires pour complètement retirer les glycoprotéines du cycle de re-glycosylation aux chaperones lectines et les diriger vers la dégradation [11, 27].

Les protéines EDEMs, homologues à l' α -mannosidase I, jouent un rôle important bien que mal compris dans la dégradation des polypeptides solubles du RE. Au nombre de 3 chez la souris et de 1 chez la levure, il a d'abord été proposé qu'elles agissent en tant que lectines spécifiques aux résidus mannoses [25]. Ce faisant, elles séquestrent les polypeptides partiellement dé-mannosylés hors du cycle de la calnexine, et les emmènent vers leur lieu de rétrotranslocation. Cependant certaines études proposent qu'EDEM 1 et 3 possèderaient une activité enzymatique mannosidase, mais l'absence de tests *in vitro* avec des enzymes purifiés empêche de confirmer ou non cette observation [11, 27]. La seule étude effectuée chez *S. pombe* a montré que l' α -mannosidase I (Spmns1p) avait une faible activité mannosidase et que l'homologue de EDEM (Spmln1p) était dépourvu de cette activité. Malgré cela, la délétion génomique de *mns1* ou *mln1* diminue grandement la dégradation du polypeptide modèle mal replié CPY*, indiquant le rôle fondamental de ces protéines dans l'ERAD [31]. Les auteurs de cet article proposent que ces deux lectines agiraient comme chaîne de transport, dirigeant les protéines mal repliées vers le protéasome.

L'identification de plusieurs autres intermédiaires entre la sélection des polypeptides et leur rétrotranslocation a été effectuée chez *S. cerevisiae*. Dans le ERAD-L, la lectine Yos9, en complexe avec la chaperone Kar2p/BiP et Hrd3p, un partenaire de la

ligase d'ubiquitine E3 Hrd1, joue un rôle important dans la sélection des glycopolypeptides destinés à la dégradation [32, 33]. En fait, chacune de ces trois protéines agissent probablement comme autant d'étapes d'un mécanisme de reconnaissance de substrat de l'ERAD [30]. Les polypeptides mal repliés liés par ce complexe sont ensuite transférés au complexe membranaire Hrd1p. Ce dernier accepterait aussi des cargos de protéines luminales mal repliées provenant d'autres transporteurs tels que EDEM/Htm1p [33]. Ce complexe membranaire est composé, en plus de l'ubiquitine ligase E3 Hrd1p et de son co-facteur Hrd3p, des protéines Der1p et Usa1p. Ces deux protéines, avec les 6 segments transmembranaires de Hrd1p, constitueraient le canal nécessaire à la rétrotranslocation des protéines [33].

Peu de données existent quant à la reconnaissance des lésions de polypeptides dans les régions transmembranaires (ERAD-M). Elle s'effectuerait soit via Yos9, soit directement par Hrd1p et Hrd3p ou encore impliquerait d'autres facteurs encore non identifiés [30]. Par ailleurs, seules les protéines Hrd1p et H3drp du complexe Hrd1p sont nécessaires à la rétrotranslocation/dégradation des substrats du ERAD-M [32]. Dans le cas du ERAD-C, la reconnaissance est effectuée par les chaperones cytosoliques Hsp70/Hsp49 (Ssa1, Ydj1 et Hlj1) ainsi que par l'ubiquitine ligase Doa10. Le complexe membranaire qui médie la rétrotranslocation et les protéines associées dans le cytosol sont les mêmes que pour l'ERAD-L, à l'exception de Doa10 qui remplace le complexe Hrd1p [32].

Les complexes ubiquitines ligases Hrd1p et Doa10 sont associés du côté cytosolique avec le complexe ATPase Cdc48/p97, qui fournit la force pour l'extraction des polypeptides mal repliés hors du RE [30]. Une fois un segment sorti dans le cytosol, le substrat du ERAD est polyubiquitiné par la ligase Hrd1p ou Doa10 en coopération avec l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine Ubc7 et la protéine membranaire Cue1p [29, 32]. Il est probable que d'autres composantes de la voie de dégradation du protéasome, qui

interagissent avec Cdc48/p97, interviennent aussi pour favoriser la dégradation des protéines mal repliées [30]. Les polypeptides sont ensuite dirigés vers le protéasome et dégradés.

1.1.7 UPR

Une importante accumulation de polypeptides mal repliés dans le lumen du réticulum endoplasmique déclenche une cascade de signalisation qui permet à la cellule de s'ajuster et de rétablir l'homéostasie du RE. Cette voie intracellulaire de réponse, nommée UPR pour *unfolded protein response*, implique des transducteurs de signaux enchâssés dans la membrane du RE ainsi que différents effecteurs cytoplasmiques et cellulaires [34]. Trois classes de transducteurs ont été identifiées et bien caractérisées jusqu'à ce jour, séparant l'UPR en 3 branches distinctes. Il s'agit de IRE1 (*inositol-requiring protein-1*), conservé de la levure aux mammifères, PERK (PKR-like ER Kinase) et ATF6 (Activating Transcription Factor-6), présents seulement chez les métazoaires [33-36].

IRE1 a été caractérisé chez *S. cerevisiae* suite à un criblage génétique cherchant à identifier des mutations bloquant l'activation de gènes induits par l'UPR [37, 38]. Cette protéine transmembranaire contient dans sa portion cytosolique un domaine sérine/thréonine kinase ainsi qu'une fonction endoribonucléase (RNase) qui sont toutes deux inactives lorsque la IRE1 est monomérique. Lors d'un stress du RE cette protéine homodimérise, ce qui provoque son autophosphorylation et l'activation de son domaine RNase [33, 35]. Ce dernier va catalyser l'épissage de l'ARNm HAC1, dont l'intron réprime normalement la traduction [34]. L'ARNm épissé de HAC1 peut alors être traduit en un facteur de transcription qui transloque au noyau, va lier l'élément promoteur UPR et active une variété de gènes requis pour le repliement des protéines, le transport ER-Golgi et l'ERAD [35].

La voie IRE1 est conservée chez les mammifères, à l'exception qu'on y trouve deux homologues de IRE1, soit IRE1 α et IRE1 β . Par ailleurs, l'épissage de l'homologue d'HAC1, XBP-1, n'a pas tout à fait les mêmes conséquences puisque les formes non-épissée et épissée sont toutes deux traduites [34]. La forme non-épissée encode une protéine instable qui réprime les gènes cibles de l'UPR, alors que la forme épissée de XBP-1 est stable et agit comme un inducteur fort des gènes possédant l'élément de réponse au UPR ERSE-1 [33, 35].

Tout comme IRE1, PERK est une protéine kinase transmembranaire qui homodimérise lors d'un stress du réticulum endoplasmique. Sa dimérisation provoque alors sa *trans*-autophosphorylation et son activation. La forme active de PERK phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2. Ceci a pour effet de diminuer le nombre de eIF2 actifs, menant à une diminution globale de l'initiation de la traduction et un ralentissement dans la production de nouveaux polypeptides. Ainsi, l'activation de PERK par un stress du RE permet de diminuer la charge en polypeptides à replier de ce dernier [33]. Par ailleurs la phosphorylation et l'inactivation de eIF2 α est requise pour la traduction de certains ARNm spécifiques, comme pour le facteur de transcription ATF4. ATF4 contrôle la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et les réactions d'oxido-réduction, mais aussi dans la réponse au stress et la sécrétion des protéines [36]. En plus de son effet sur la traduction, l'activation de PERK stimule donc aussi la transcription de gènes nécessaires au rétablissement de l'homéostasie du RE [33, 35]. Chez *S. cerevisiae*, il a été observé qu'un stress du RE fait augmenter les niveaux cellulaires de GCN4, l'homologue chez la levure d'ATF4. GCN4 va alors accentuer la stimulation de la transcription des gènes de l'UPR par Hac1p. Ainsi, malgré l'absence d'homologue de PERK chez la levure, une partie de cette voie de réponse est conservée [40]. Finalement, certaines études suggèrent que PERK phosphoryle et active le facteur de

transcription à zipper leucine NRF2, liant l'élément de réponse antioxidant ARE. PERK jouerait ainsi un rôle supplémentaire, soit la protection des cellules contre le stress oxydatif [35, 41].

De façon intéressante, les domaines luminaux d'IRE1 et PERK sont interchangeable, impliquant un mécanisme similaire de reconnaissance du stress du RE et d'homodimérisation. Précédemment, il a été établi que la chaperone BiP, qui lit constitutivement ces protéines dans leur domaine luminal, les bloque dans la forme monomérique. Lors d'un stress du RE, BiP serait séquestré par des polypeptides mal repliés et/ou serait activement relâché d'IRE1 et PERK, permettant la dimérisation de ces derniers. Cependant, la récente cristallisation du domaine luminal d'IRE1 de *S. cerevisiae* apporte la possibilité d'un deuxième mécanisme. En effet, ce domaine contient une longue fente étroite semblable à celle du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), capable d'accepter les polypeptides en extension. La liaison d'un même polypeptide mal replié, pouvant se faire sur deux fentes à la fois, pourrait donc directement provoquer la dimérisation [33, 34, 42]. La réalité est peut-être en fait dans un hybride de ces deux mécanismes, impliquant à la fois BiP et la présence d'une protéine en extension [34].

ATF6 a été identifié comme un facteur de transcription liant l'élément de réponse au UPR ERSE1, tout comme XBP-1. Chez les mammifères, les deux isoformes d'ATF6 (ATF6 α et β) sont localisées à la membrane du RE et liées à BiP en conditions normales [37]. Lors de stress du RE, BiP se dissocie d'ATF6 qui expose alors deux séquences de localisation dans le Golgi. En même temps, ATF6 se trouve à être sous-glycosylé, ce qui abolit son interaction avec la calnexine et/ou la calréticuline [38]. Sa dissociation des chaperones et l'exposition des séquences de signalisation permet la translocation d'ATF6 dans le Golgi, où elle est alors successivement clivée par les protéases S1P et S2P. Ceci permet le relâchement de la portion cytosolique d'ATF6 qui, transloquée au noyau, va lier

l'élément de réponse à l'AMP_c CRE et l'élément ERSE-1, activant notamment la transcription de gènes cibles de l'UPR [33, 35].

IRE1, ATF6 et PERK ne sont pas les seuls médiateurs du stress du RE. En effet d'autres senseurs du stress du RE ont récemment été identifiés dans certains types cellulaires, à cause de leur ressemblance avec ATF6. Ces protéines, dont font partie CREB4, CREB-H, Luman et OASIS, sont toutes clivées lors d'un stress du RE. Cependant, leur court domaine luminal suggère un mécanisme de reconnaissance du stress différent de celui impliquant une liaison avec BiP [35].

Il est intéressant de noter que les activations transcriptionnelles et traductionnelles issues de l'UPR n'augmentent pas uniquement la synthèse des protéines dont la fonction rétablit la bonne marche du RE. En effet, l'UPR contribue aussi à augmenter la traduction d'enzymes limitantes impliquées dans la synthèse des lipides, provoquant une expansion des membranes cellulaires et donc de la voie de sécrétion [34]. Les voies du UPR ne servent pas uniquement à répondre lors d'un stress du RE, mais sont aussi probablement utilisées pour l'adaptation de la cellule à une panoplie de situations.

1.1.8 L'apoptose et le RE

Dans les cas de stress du RE très importants ou prolongés, l'activation de l'UPR n'est pas suffisante pour restaurer le bon fonctionnement de la voie de sécrétion. L'UPR va alors contribuer à induire la mort par apoptose de la cellule. Les composantes impliquées dans ce mécanisme ont été partiellement identifiées, mais l'apport exact de chacune et leurs interactions restent encore à élucider. La Figure 2 schématise globalement les signaux menant du stress du RE à l'apoptose.

Un des plus important médiateur de l'apoptose causée par un stress du RE est sans doute le facteur de transcription CHOP, dont la transcription découle directement de l'activation de PERK et de la traduction subséquence d'AFT4. ATF6 et IRE1 induisent aussi la transcription de CHOP, mais leur implication est beaucoup moins significative [34, 35, 39]. CHOP module la transcription de nombreux gènes associés à l'apoptose, provoquant une réponse globale d'augmentation de celle-ci. Notamment, il active la transcription des gènes GADD34, ERO1 α , DR5 (death receptor 5) et TRB3, mais il diminue celle de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [37]. L'expression de GADD34, une protéine interagissant avec la protéine phosphatase PP1, corrèle avec l'apoptose provoquée par différents signaux mais son mécanisme d'action n'est pas connu [36]. De plus, GADD34 va augmenter le niveau de stress du RE en induisant la déphosphorylation de eIF2 α et renversant le blocage de la traduction instauré par l'activation de PERK. ERO1 α , une oxydase du RE, augmente quant à elle la quantité d'espèces réactives d'oxygène dans le RE. La fonction de ce mécanisme d'augmentation du stress du RE dans l'induction de l'apoptose n'est pas encore très claire; il pourrait s'agir d'un signal de non-retour poussant définitivement la cellule vers la mort [33, 35, 39]. DR5 encode un récepteur de mort cellulaire situé à la surface des cellules qui active la cascade des caspases [37]. Finalement, TRB3 agirait en séquestrant et diminuant l'activité de la sérine/thréonine kinase pro-survie Akt, poussant les cellules vers l'apoptose [36].

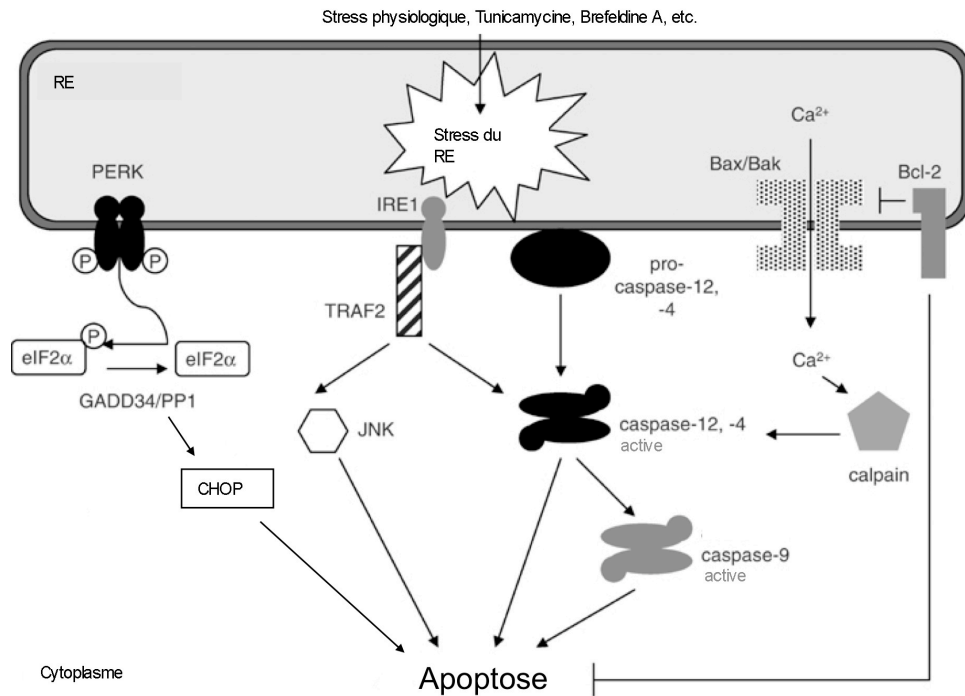


Figure 2. Schéma simplifié de certaines voies menant à l'apoptose suite à un stress du RE. Les stress du RE mènent à l'activation de PERK et du complexe GADD34/PP1 phosphatase, qui déphosphoryle alors eIF2alpha, ce qui mène à la promotion de l'apoptose notamment via la transcription accrue de CHOP. La Caspase-12 (souris) ou -4 (humain) est associée à la face cytosolique de la membrane du RE et peut être activée par les stress du RE via notamment IRE1 et TRAF2, ou par un clivage de la calpaïne, elle-même activée par un relâchement de calcium du RE. Les membres de la famille Bcl-2 sont aussi associés à la membrane du RE et influencent l'apoptose à la fois en modulant le relâchement de calcium et l'amplification des signaux apoptotiques via la mitochondrie. Adapté de Boyce, M. et Yuan, J. *Cell Death and Diff.* 2006; 13: 363-373 [39]

PERK n'est pas le seul transducteur du UPR à être directement impliqué dans l'activation de l'apoptose. En effet, la surexpression d'IRE1 dans des cellules en culture résulte en la mort par apoptose [39]. Cette activation de l'apoptose serait provoquée, du moins en partie, par le recrutement de TRAF2 par IRE1 activé. Le complexe IRE1-TRAF2 recrute alors ASK1, une mitogen-activated kinase kinase kinase associée à l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, qui active alors les kinases JNK et p38. L'activation de JNK est une réponse fréquente à plusieurs formes de stress cellulaires, et est connue comme régulant la machinerie de mort cellulaire via la régulation des protéines de la famille BCL-2 [36, 37, 40].

Un paradoxe réside dans le fait que les effecteurs de l'UPR induisent à la fois un mécanisme d'adaptation au stress du RE et une voie menant à l'apoptose. Il semblerait qu'en fait, le choix entre l'adaptation ou l'apoptose résulte de la composition en protéines des cellules répondant à un stress du RE. Ainsi, un stress modéré ou court changera les niveaux de chaperones du RE, mais vu sa nature faible ou transitoire il ne sera pas suffisant pour l'induction persistante d'ATF4, CHOP et GADD34 dont les ARNm et protéines sont instables. Cette situation mènera les cellules à l'adaptation à ce stress. Un stress fort et prolongé, quant à lui, provoquera une augmentation stable des niveaux d'ATF4, CHOP et GADD34, poussant les cellules sur la voie de l'apoptose [41].

Les membres de la famille de protéines BCL-2 sont d'importants régulateurs de la mort cellulaire par apoptose. Certains sont anti-apoptotiques, comme BCL-2 et BCL-xL, et d'autres, comme BAX et BAK, sont pro-apoptotiques. Identifiées d'abord pour leur importance dans l'apoptose médiée par la mitochondrie, ces protéines sont aussi localisées dans la membrane du RE et agissent dans l'apoptose induite par le stress de celui-ci [36, 37, 40]. Bien que leurs effets restent en grande partie incompris, différentes voies d'action sont connues. D'abord, l'inhibition de BCL-2 par JNK via l'activation de IRE1 permettrait

l'activation de BAX et BAK, menant à l'exécution de l'apoptose [36]. BAX et BAK sont des protéines cruciales pour la maintenance du niveau luminal de calcium; lors d'un stress du RE, leur oligomérisation permet un efflux de Ca^{2+} dans la mitochondrie et le cytoplasme. Cet apport de calcium au niveau de la mitochondrie dépolarise la membrane intérieure, provoquant la libération du cytochrome C et l'activation du *apoptosis protease-activating factor 1* (APAF-1). Quant à lui, l'augmentation cytosolique du calcium activerait des cascades de caspases dépendantes et indépendantes de la mitochondrie, et ce notamment via l'activation de la protéase dépendante du calcium *m-calpain* [37, 42]. D'autres protéines de la famille BCL-2 ont aussi été impliquées dans l'apoptose médiée par le RE, telles PUMA et NOXA, mais leurs rôles précis ne sont pas connus [37, 42].

La caspase 12, présente à la surface cytosolique du RE, a été proposée comme médiateur clef de l'apoptose provoquée par un stress du RE [36]. En effet, elle est activée uniquement par des stimuli provenant du RE. Elle peut être clivée et activée par la *m-calpain*, ou encore suite à une interaction avec TRAF2 et IRE1, cette dernière voie restant à l'état d'hypothèse [35, 40]. L'activation de la caspase 12 provoquerait l'activation subséquente des caspases 9 et 3, menant à la mort cellulaire par apoptose [35, 37, 40]. L'importance de la caspase 12 est cependant mise en doute par certains facteurs. D'abord, le gène encodant la caspase 12 humaine contient des mutations inactivatrices. Il a été proposé que la caspase 4 remplace sa fonction, mais cela est encore matière à débat. Finalement, les études sur l'effet protecteur de la délétion de la caspase 12 sont contradictoires [36, 40].

Bap31 est une protéine transmembranaire du RE qui existe en complexe avec la procaspase 8 et BCL-2 ou BCL-xL. L'activation de la caspase 8 induit le clivage de Bap31, créant le fragment p20 qui induit alors le relâchement de Ca^{2+} du lumen et son absorption

par la mitochondrie. Ceci est suivi d'une dépolarisation de la mitochondrie et d'une augmentation de son taux de division, le tout menant à l'apoptose [42].

En conclusion, les processus régissant l'homéostasie du RE et la réponse aux stress de celui-ci, soit l'adaptation ou la mort par apoptose, sont excessivement complexes. Ils impliquent un grand nombre de protéines qui interagissent entre elles et sur plusieurs voies cellulaires différentes. L'élucidation de ces mécanismes n'en est donc qu'à ses débuts, et plusieurs autres études seront nécessaires pour avoir un portrait complet de la situation.

1.2 Calnexine

1.2.1 Structure

La calnexine est une protéine membranaire de type I du réticulum endoplasmique qui a d'abord été identifiée pour son habileté à lier le calcium [43]. Conservée chez les animaux, les plantes et les champignons, la calnexine a été par la suite surtout étudiée pour sa fonction chaperone [44, 45]. La plus grande partie de cette protéine de 90 kDa réside dans le lumen du réticulum endoplasmique. Elle est ancrée dans la membrane par un unique domaine transmembranaire suivi d'une queue cytosolique dont la longueur varie selon l'organisme (Figure 3A) [45, 46].

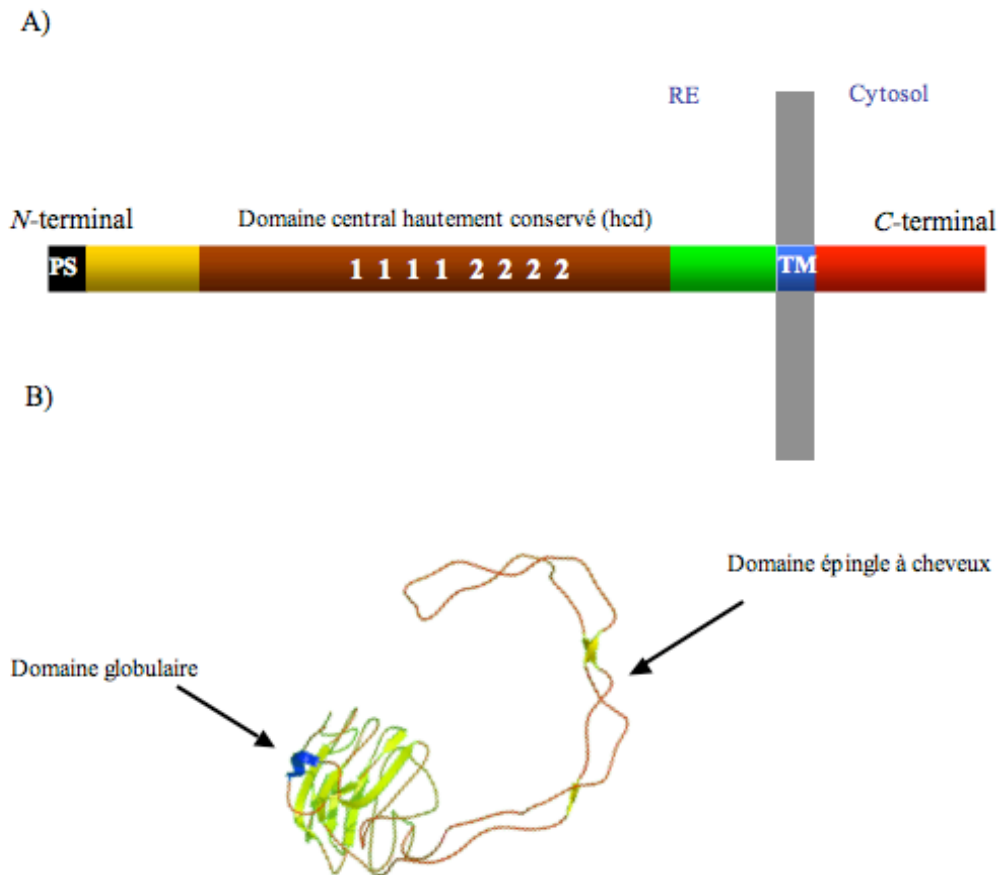


Figure 3. Structure de la calnexine. A) Schéma représentant la structure primaire de la calnexine. Le peptide signal est représenté en noir (PS), et le domaine transmembranaire en bleu (TM). Le domaine central, hautement conservé entre les calnexines des différentes espèces, est représenté en brun; les chiffres 1 et 2 représentent les motifs riches en prolines (motif 1 : I-DPD/EA-KPEDWDD/E, motif 2 : G-W—P-I-NP-Y). La portion verte représente les 52 acides aminés luminaux suffisants pour conférer la survie de *S. pombe*, et la queue cytosolique de la calnexine est en rouge. B) Représentation de la structure tridimensionnelle de la partie luminale de la calnexine de chien, telle qu'obtenue suite à des études de cristallographie © Schrag et al., 2001

La structure de presque toute la portion luminale (résidus 61-458) de la calnexine de chien a été déterminée par des techniques cristallographiques. Nous pouvons y distinguer deux régions très différentes, tel que représenté dans la Figure 3B. D'abord, il y a un domaine compact globulaire formé par la superposition de deux feuillets β antiparallèles, composé des résidus des extrémités *N*- et *C*-terminales (résidus 61 à 262 et 415-458). Les 145 résidus du centre forment quant à eux un long bras qui s'étend sur 140Å [44]. Les résidus en *N*-terminal (résidues 1-61) et en *C*-terminal (résidus 458-482) sont manquants à la structure car la protéine recombinante a été clivée à ces endroits par les bactéries lors de son expression hétérologue [44, 47].

Le domaine globulaire de la calnexine comporte un site lectine liant le glucose et reconnaissant aussi les 3 mannoses le suivant sur l'oligosaccharide $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ [44, 48, 49]. La structure cristallographique de ce domaine a d'ailleurs révélé qu'il était très semblable à celui des lectines des légumineuses [44]. De plus, la même étude a identifié un site de liaison au Ca^{2+} dans le domaine globulaire. Ceci contredit cependant une étude précédente qui place le principal site de liaison au calcium de la calnexine dans les résidus formant le bras [50].

Le bras de la calnexine est formé par deux brins bêta repliés un sur l'autre dans une configuration dite épingle à cheveux. Chacun de ces brins est composé d'une séquence riche en proline répétée 4 fois, donnant le nom domaine-P à la structure qu'ils forment [44, 45]. Ces motifs sont disposés dans la séquence primaire selon l'arrangement 1111 2222 (motif 1 : I-DPD/EA-KPEDWDD/E, motif 2 : G-W—P-I-NP-Y), les motifs 1 s'éloignant du domaine globulaire dans le premier brin, et les motifs 2 du deuxième brin se repliant sur les motifs 1 en direction opposée. En plus de contenir un fort site de liaison au calcium [50], ce bras est responsable de la liaison avec la protéine disulfide-isomérase ERP57 chez les cellules de mammifères [49, 51]. Selon des études de mutant de délétions, le domaine-P

contiendrait aussi un site de liaison aux oligosaccharides, mais de moindre importance que celui du domaine globulaire [48, 49]. De façon un peu surprenante, malgré que sa séquence soit très conservée à travers les organismes, le(s) rôle(s) du domaine-P ne sont pas très bien définis à travers la littérature. On lui prête le plus souvent un rôle dans des interactions protéines-protéines [44, 52]

La structure de la calnexine est influencée par différentes molécules et conditions du RE, qui peuvent ainsi jouer un rôle dans la modulation de sa fonction. Selon certaines études, la calnexine fluctuerait entre une conformation monomérique favorisant la liaison des oligosaccharides sur son domaine lectine, et une conformation dimérique/multimérique plus sensible aux protéases et favorisant plutôt les liaisons polypeptides-polypeptides propres aux protéines chaperones [48, 53-55]. D'abord, la liaison du calcium à la calnexine a été montrée comme cruciale au bon fonctionnement de son site lectine, et au repliement général du domaine luminal [53]. En contrepartie, la déplétion du calcium par l'EGTA inhibe la liaison aux oligosaccharides *in vitro* et rend la protéine plus sensible aux protéases, suggérant donc un changement de conformation [48, 53]. De plus, le calcium favorise la forme monomérique de la calnexine, alors que la déplétion de calcium induit la formation de dimère/multimères [53, 56]. Malgré que cela soit moins clairement établi, il apparaît aussi que l'ATP influence la conformation et les propriétés de liaison de la calnexine. D'abord, certaines études ont montré que la calnexine pouvait lier l'ATP, mais le site exact impliqué dans cette liaison reste inconnu [53, 54]. Cette liaison de l'ATP favoriserait la conformation dimérique/multimérique. Elle provoquerait également un dépliement partiel qui favoriserait la liaison aux polypeptides via des régions hydrophobes, et ce au détriment de la fonction lectine [53, 54]. Finalement, notons que la tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation, et la chaleur induisent aussi toutes deux la conformation dimérique/multimérique de la calnexine [56].

La calnexine possède deux paralogues. La calnéguine est une protéine du RE aussi de type I qui est exprimée principalement dans les spermatides des testicules, et qui est impliquée dans la fertilité [57]. La calréticuline, beaucoup plus étudiée, est une protéine soluble qui possède environ 39% d'identité de séquence avec la calnexine. Cette forte similarité, une liaison de type lectine identique et la détermination par RMN de la structure du domaine-P de la calréticuline suggèrent que la calnexine et la calréticuline possèdent une structure très semblable [45, 58]. Cependant, la calréticuline ne comporte que trois copies de chaque motif riche en proline au lieu de quatre, comme chez la calnexine, ce qui lui donne un bras plus court. De plus, sa région C-terminale très acide lui confère un site supplémentaire de forte liaison au calcium. La calréticuline joue donc aussi un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie du calcium dans le RE [45, 59].

1.2.2 Fonction chaperone de la calnexine : lectine et liaison des polypeptides

Dans les premières années suivant son identification, il a été montré que la calnexine lie de façon transitoire plus d'une centaine de protéines, suggérant ainsi un rôle de protéine chaperone [60]. Dans le même sens, l'augmentation de son expression augmente *in vivo* le repliement et l'assemblage des molécules d'histocompatibilités de classe I et du récepteur nicotinique acétylcholine [61, 62]. La calnexine participe aussi au contrôle de qualité du RE en retardant l'exportation vers le Golgi des protéines dont l'assemblage n'est pas complété [63, 64]. Compte tenu qu'elle possède à la fois une très forte homologie avec la calnexine et les mêmes spécificités de liaison aux oligosaccharides, la calréticuline aurait des fonctions redondantes à celles de la calnexine [48, 65, 66]. Des études montrent cependant que ces deux chaperones diffèrent dans leurs substrats, et que dans certains cas cette sélectivité dépend de la topologie de la chaperone, i.e. liée à la membrane ou soluble [65, 67, 68].

Les premières études sur les interactions entre la calnexine ou la calréticuline et les glycoprotéines ont démontré qu'elles étaient abrogées par l'addition de drogues agissant sur l'intégrité de l'oligosaccharide [69]. Par la suite, la caractérisation de ces chaperones a été centrée sur leur fonction lectine. Le laboratoire d'Ari Helenius a démontré que la calnexine liait préférentiellement les oligosaccharides mono-glucosylés ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), proposant du même coup le cycle glucosylation/déglucosylation de contrôle de qualité du repliement (voir section 1.1.5) [69, 70]. Plusieurs observations sont venues appuyer ce modèle. Notons entre autre que le traitement de cellules en culture avec l'inhibiteur de la *N*-glycosylation tunicamycine ou avec l'inhibiteur de glucosidase castanospermine diminue grandement la quantité de glycoprotéines associées avec la calnexine et la calréticuline [66, 69, 71, 72].

Cependant, des articles de plus en plus nombreux provenant de notre laboratoire et d'autres groupes indiquent que la calnexine et la calréticuline, en plus d'établir des liens de type lectine, interagissent via des contacts polypeptides-polypeptides avec leurs substrats [45]. D'abord, la déglucosylation enzymatique de complexes formés par la calnexine et ses substrats n'affecte pas la liaison de la chaperone aux glycoprotéines [73, 74]. Aussi, notre laboratoire et d'autres groupes avons démontré que la calnexine peut s'associer avec des substrats dépourvus d'oligosaccharides, soit de par leur séquence ou suite au traitement avec la tunicamycine [64, 75-81]. *In vitro*, la calnexine a été montrée comme liant et prévenant l'agrégation de substrats non-glycosylés [54, 56, 82]. Finalement, un mutant du site lectine de la calnexine, incapable de lier des oligosaccharides, peut tout de même lier *in vivo* les molécules d'histocompatibilité de classe I K^b et D^b et prévenir l'agrégation *in vitro* de la citrate synthase. Dans les cas où son substrat est non-glycosylé, la calnexine exercerait une fonction de promotion du repliement similaire à celle des autres protéines chaperones, soit via la liaison de segments hydrophobiques des glycoprotéines mal-repliées et la prévention de leur agrégation [45].

Le modèle *dual-binding* vient concilier l'existence des deux spécificités de liaison aux protéines mal-repliées de la calnexine. Celui-ci suggère que la calnexine et la calréticuline peuvent engager à la fois l'oligosaccharide et la chaîne polypeptidique d'un même substrat, augmentant l'affinité de liaison globale entre la chaperone et son substrat [45]. Ce modèle est supporté entre autre par le fait que la calnexine ou la calréticuline empêchent l'agrégation de l' α -mannosidase, de l'agglutinine ou du IgY en l'absence de glycosylation, mais cet effet est substantiellement augmenté par la présence des oligosaccharides [54, 55, 83]. Cependant certains points, tels la localisation exacte du site de liaison aux polypeptides de la calnexine, devront être éclaircis lors de futures recherches.

1.2.3 Partenaires

La calnexine n'agit pas en solitaire à l'intérieur du réticulum endoplasmique. En effet, elle fait plutôt partie d'un large complexe de protéines lâchement associées qui favoriserait le repliement des protéines par les chaperones et foldases du RE [84]. Chez les mammifères, le plus connu des partenaires d'interaction de la calnexine est sans doute ERP57, une protéine de la famille des protéines disulfide isomérase (voir section 1.1.3). Il a été montré que *in vitro*, l'activité disulfide isomérase de ERP57 sur la RNase B est grandement augmentée par l'addition de calnexine ou de calréticuline, ce qui n'est pas le cas pour PDI [85]. Par ailleurs, l'association entre la calnexine et ERP57 a été démontrée à la fois *in vitro* [49, 51, 85] et *in vivo*, en l'absence de glycoprotéines mal repliées [86]. Des études de mutagenèse dirigée, de RMN et de double-hybride ont localisé le site d'interaction de la calnexine avec ERP57 sur l'extrémité du domaine-P [49, 51]. Quant à lui, ERP57 interagirait avec la calnexine via ses derniers acides aminés en C-terminal, fortement chargés négativement [51]. Fonctionnellement, cette association entre la calnexine et ERP57 permettrait la création d'un complexe de repliement plus efficace,

rapprochant du substrat plusieurs chaperones et foldases aux fonctions complémentaires [86].

Certaines études suggèrent que la calnexine et la chaperone de type Hsp70 BiP font partie de deux complexes de repliement distincts n'interagissant pas ensemble [87, 88]. Cependant, l'isolation de complexes chimiquement réticulés dans des cellules intactes a montré une association faible entre la calnexine ou la calréticuline et BiP [84]. Il a aussi été établi, chez le tabac, que la calréticuline et BiP forment un complexe stable en présence et en l'absence de stress [89]. Enfin, notre laboratoire a maintes fois démontré que chez *S. pombe*, la calnexine et BiP forment un complexe stable, indépendant de la traduction et important pour le bon fonctionnement du RE [75, 76, 90, 91]. L'association entre BiP et la calnexine augmenterait significativement l'efficacité du repliement de certaines protéines, combinant à la fois la fonction lectine de la calnexine et l'activité chaperone liée à l'ATP de BiP [55, 76, 91]. Une étude *in vitro* montrant une coopération entre BiP et la calnexine pour le repliement de certains substrats vient d'ailleurs appuyer cette hypothèse [57]. Notre laboratoire a construit des mutants de délétion qui ont permis d'établir le site d'interaction de BiP sur la calnexine au niveau du domaine globulaire, soit dans les 52 derniers acides aminés luminaux du côté C-terminal, ou des 160 derniers acides aminés du côté N-terminal [90, 91]. Finalement, la région luminale de la calnexine médie une interaction avec la sous-unité β du translocon (Sec61 β) chez *Yarrowia lipolytica*. Cette interaction permettrait vraisemblablement de rapprocher la calnexine des pores de translocation, stimulant le repliement des chaînes polypeptidiques naissantes aussitôt leur émergence dans le lumen du RE [92].

La queue cytosolique de la calnexine est aussi impliquée dans des interactions avec des partenaires cellulaires, notamment via certains résidus phosphorylés. En effet, chez les mammifères quatre sites de phosphorylation ont été identifiés sur la queue cytosolique de la

calnexine : un site consensus pour la protéine kinase C (PKC; Ser⁴⁸⁴), localisé près du domaine transmembranaire, deux sites consensus pour la caséine kinase 2 (CK2; Ser⁵³⁴ et Ser⁵⁴⁴) et un site reconnu par la extracellular-signal regulated kinase-1 (ERK-1; Ser⁵⁶³) [93, 94]. La phosphorylation des trois derniers sites a d'ailleurs été confirmée *in vivo* [93]. Chez *S. pombe*, une étude à large spectre suggère que l'extrémité C-terminale de la queue cytosolique de la calnexine est phosphorylée, et ce possiblement au résidu Ser⁵⁵³ [93]. Chez les mammifères, une augmentation de la phosphorylation par ERK-1 va augmenter le recrutement de la calnexine au ribosome [96]. Une étude subséquente est venue confirmer que ce recrutement aux ribosomes est direct et se fait via une interaction entre le domaine cytosolique de la calnexine et la protéine L4 de la grosse sous-unité [95].

Les protéines *sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) pompent les ions calcium du cytosol dans le lumen du RE, contrôlant ainsi l'homéostasie du Ca²⁺. La version 2b de ce gène (SERCA2b) se retrouve au RE et est une protéine ubiquitaire chez les mammifères [96]. De façon intéressante, la surexpression de la calnexine et de la calréticuline inhibe les oscillations de Ca²⁺ imputable à SERCA2b chez *Xenopus laevis* [96]. En fait, lorsqu'elle est phosphorylée en position Ser⁵⁶³ la calnexine interagit avec SERCA2b et inhibe son activité. Cependant, une augmentation de la concentration cytosolique de calcium favorise la déphosphorylation de Ser⁵⁶³ et provoque ainsi la dissociation du complexe SERCA2b – calnexine. SERCA2b, libéré, peut alors pomper le calcium excédentaire dans le RE [97]. Ces observations suggèrent donc que la calnexine agit comme un modulateur sensible du calcium dans le RE.

La *phosphofurin acidic cluster sorting protein-2* (PACS-2) contrôle la localisation de différentes protéines transmembranaires dans le RE. Typiquement, elle interagit avec d'autres protéines au niveau de sites de phosphorylation CK2 situés dans des régions acides, semblables à ceux présents sur la queue cytosolique de la calnexine. Comme de fait,

une étude récente a montré que la calnexine déphosphorylée sur son motif CK2 s'associe avec PACS-2. Cette association stimule la rétention de la chaperone dans le RE et promeut sa localisation dans les membranes associées aux mitochondries [98]. La présence de la calnexine au niveau des membranes associées aux mitochondries peut paraître surprenante, mais certaines études suggèrent que cette protéine a un rôle au niveau de la médiation de l'apoptose.

1.2.4 Apoptose et calnexine

De plus en plus d'articles publiés par quelques groupes, dont le nôtre, pointent vers une implication de la calnexine dans la médiation de l'apoptose. D'abord, des expériences effectuées par le groupe de Michalak sur une lignée de cellules humaines ou de souris contenant une délétion du gène de la calnexine ont montré une résistance modérée à l'apoptose provoquée par la thapsigargine, une drogue inhibant le pompage du calcium dans le RE [99, 100]. Inversement, Delom *et al.* a mis en évidence que l'augmentation de l'expression de la calnexine dans les cellules cancéreuses MCF-7 constituait un mécanisme de protection contre l'apoptose provoqué par le stress du RE [101]. Ces études s'entendent cependant pour dire que la calnexine forme un complexe avec la protéine impliquée dans l'apoptose Bap31 [99-102]. Dans cette interaction, la calnexine servirait de protéine d'échafaudage, stimulant le clivage de Bap31 par la caspase 8. Le fragment ainsi créé, p20, agirait ensuite sur le relâchement du calcium par le RE et son pompage par la mitochondrie, provoquant l'apoptose [100-103]. Dans le cas de cellules dépourvues calnexine, le clivage de Bap31 est diminué, menant donc à une réduction de l'apoptose [99]. Dans les MCF-7, l'augmentation de la quantité de calnexine suite à un traitement à la tunicamycine provoquerait la relocalisation du complexe calnexine/Bap31, le protégeant ainsi du clivage [102].

Chez *S. pombe*, Torgler *et al.* a démontré que la surexpression de la protéine pro-apoptotique Bak causait la mort par apoptose dans des cellules exprimant la version sauvage de la calnexine, mais pas dans des cellules exprimant un mutant de la calnexine dépourvue de domaine transmembranaire et de queue cytosolique [104]. En effet, une étude de double-hybride indique que ces deux protéines s'associent via le domaine cytosolique ou transmembranaire de la calnexine [104]. Une récente étude publiée par notre laboratoire vient confirmer l'importance de la calnexine dans la médiation de l'apoptose causée par un stress du RE. En effet, Renée Guérin et collaborateurs ont montré que la surexpression de la calnexine sauvage chez *S. pombe* provoquait la mort par apoptose [105]. Ce n'est cependant pas le cas pour la surexpression d'un mutant dépourvu de domaine transmembranaire et cytosolique. Par ailleurs, l'induction de l'apoptose par la tunicamycine chez *S. pombe* est diminuée d'environ 50% dans des cellules n'exprimant que la forme luminale de la calnexine [105]. Ces observations viennent renforcer l'importance des domaines transmembranaire et cytosolique de calnexine dans le phénomène de l'apoptose, tel que suggéré par Torgler *et al* [103]. Finalement, la délétion de Bap31 n'affecte pas l'apoptose provoquée par la surexpression de la calnexine. Ceci n'exclut pas que cette protéine soit en complexe avec la calnexine chez *S. pombe*, mais indique plutôt que son rôle n'est pas essentiel à l'établissement de l'apoptose [105]. De façon intéressante, il a été observé que la surexpression de la calnexine dans des cellules CHO augmentait leur sensibilité à l'apoptose induite par le butyrate de sodium (NaBu). Dans ce cas, il apparaît que l'augmentation de calnexine corrèle avec une augmentation du calcium cytosolique en réponse au NaBu, ce qui modulerait la réponse apoptotique [106].

En dernier lieu, une étude a montré que, dans des cellules de mammifères, la calnexine est clivée lors de l'entrée en apoptose provoquée par différents stress du RE. Ce clivage, médié directement ou indirectement par la caspase-3 ou 7, atténuerait l'apoptose due au stress du RE [107]. Toutefois, il a été montré dans des cellules MCF-7 que la tunicamycine ne provoque pas le clivage de la calnexine [101]. Des observations non-

publiées de notre laboratoire indiquent aussi que la calnexine de *S. pombe* subit un clivage. Cependant, celui-ci survient plutôt lors de l'entrée en phase stationnaire des cellules, et est inhibé par la tunicamycine. En bref, il apparaît que la calnexine joue un rôle critique dans la signalisation de l'apoptose due au stress du RE. Cependant, les différentes études n'en sont qu'au stade préliminaire et beaucoup de chemin reste à parcourir pour comprendre son rôle en entier.

1.2.5 Caractérisation de la calnexine dans divers organismes

L'examen des effets sur la cellule de la délétion d'un gène dans différents organismes constitue une excellente façon de déterminer l'implication de la protéine qu'il encode dans diverses voies cellulaires. Dans le cas de la calnexine, cette approche est compliquée dans certains organismes par la présence du paralogue calréticuline qui possède certaines fonctions redondantes à celles de la calnexine. De plus, la délétion du gène encodant la calnexine entraîne des phénotypes très diversifiés selon les organismes.

Les souris homozygotes pour la délétion du gène de la calnexine présentent plusieurs défauts. D'abord, environ la moitié d'entre elles meurent dans les premiers 48h suivant la naissance, et les causes de cette mort restent à élucider. Les souris survivantes sont remarquablement plus petites que leur congénères, montrent rapidement des signes d'ataxie et arrêtent progressivement de bouger. Ce problème moteur est associé à une perte dramatique des grandes fibres nerveuses myélinées, mais le lien exact avec la calnexine reste non résolu [108]. Des cellules de souris déficientes pour la calnexine montrent, tel que décrits précédemment, une légère augmentation de la résistance à l'apoptose induite par la thapsigargine [100]. Par ailleurs, une récente étude suggère que les fibroblastes de souris déficientes pour la calnexine ont une activation constitutive de l'UPR plus élevée que des cellules sauvages [109]. De même, dans des cellules lymphoïdes humaines (CEM),

l'absence de la calnexine provoque une hausse de l'expression des chaperones calréticuline et BiP [99]. Ces mêmes cellules montrent aussi une légère résistance à l'apoptose induite par la thapsigargine, mais ne semblent pas avoir de défauts au niveau de la structure du RE et de sa capacité à stocker le calcium [99].

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les défauts imputables à la délétion de la calnexine apparaissent sous un stress de haute température. En effet, sous cette condition, ainsi que sous plusieurs autres stress du RE, les vers homozygotes pour la délétion ont une fertilité réduite et l'embryogénèse ainsi que le développement de la larve sont compromis. Puisqu'une nette augmentation du transcrit de la calnexine est observée lors de stress du RE, les auteurs de cette étude suggèrent que chez *C. elegans*, la calnexine joue un rôle important dans les fonctions chaperones induites par le stress [110]. Il est intéressant de noter que l'absence de la calnexine ne résulte pas en une hausse de l'expression de la calréticuline [111]. Cependant, tout comme pour les cellules de mammifère, une double délétion calnexine-calréticuline semble être compensée par une augmentation de la quantité de certaines protéines chaperones, notamment BiP et PDI. Ceci suggère que l'absence de la calnexine chez *C. elegans* induirait un signal de l'UPR [111].

La délétion de la calnexine dans la drosophile cause des défauts majeurs seulement dans l'œil. En effet, elle semble jouer un rôle de premier plan dans la biosynthèse de la rhodopsine, ainsi que dans la modulation du calcium cytosolique des cellules photorécepteur. Toutefois, mentionnons qu'il existe chez la drosophile deux autres homologues de la calnexine et une copie de la calréticuline; ces derniers compensent possiblement pour la perte de fonction de la calnexine partout ailleurs dans l'organisme [112].

Jusqu'à ce jour, le microorganisme eucaryote *Dictyostelium discoideum* est le seul unicellulaire à posséder à la fois une copie de la calnexine et de la calréticuline. La délétion de ces gènes est viable, et provoque une faible baisse additive du taux de croissance cellulaire, suggérant une certaine redondance de fonction. Cette absence de calnexine et de calréticuline cause cependant un défaut majeur dans la capacité des cellules à phagocyter. Les auteurs de cette étude suggèrent que cela est imputable à un problème dans la maintenance de l'homéostasie du calcium dans le RE et le cytosol [113].

L'homologue de la calnexine chez la levure *S. cerevisiae* (Cne1p) diffère grandement de ceux retrouvés chez les mammifères et chez *S. pombe*. D'abord, elle ne possède du motif 1 répéré présent dans le domaine-P et deux copies du motif 2. De plus, elle est ancrée à la membrane mais dépourvue de queue cytosolique, et elle ne lie pas le calcium [114]. La délétion génomique de *CNE1* n'est pas létale, et n'entraîne aucun phénotype évident chez *S. cerevisiae* [114]. Seulement sous stress thermique, il semble que la transcription de BiP et PDI soit augmentée dans les levures dépourvues de calnexine [115, 116].

La calnexine de *S. pombe* possède toutes les caractéristiques propres à la calnexine des mammifères, notamment les deux motifs répétés quatre fois en tandem et la queue cytosolique [46, 117]. Son expression est augmentée suite à un stress thermique, à un traitement à l'ionophore de calcium A23187 ou au déoxyglucose, mais pas en présence de tunicamycine [46, 117]. De façon importante, notre laboratoire et le groupe de Dave Thomas ont montré que la calnexine est essentielle à la viabilité chez *S. pombe* [46, 117]. Il s'agit donc du seul organisme caractérisé à ce jour dans lequel cette protéine est nécessaire à la survie des cellules. Surprenamment, la calnexine d'*Aspergillus niger* peut compléter cette délétion, mais pas la calnexine de chien [117, 118]. Aussi, la délétion de la calnexine peut être complétée par un mutant comprenant seulement sa portion

luminale [46, 117]. Finalement, notre laboratoire a créé plusieurs mutants de délétion de la calnexine, et nous avons établi que le plus petit mutant permettant la viabilité comprend les 52 derniers acides aminés luminaux en *C*-terminal, le domaine transmembranaire et la queue cytosolique [90]. La suite des études sur la délétion de la calnexine est décrite dans le chapitre 4.

1.3 Prions

1.3.1 Prion : une définition

Selon la définition classique, les protéines prions possèdent la capacité d'adopter au moins deux états conformationnels distincts, dont l'un est auto-réplicatif. En effet, dans sa forme auto-répliquative (prionique), le prion peut stimuler la conversion conformationnelle de ses protéines sœurs non-prion en prion, ce qui lui confère un caractère infectieux (Figure 4) [119, 120].

Le changement conformationnel de la protéine prion s'accompagne aussi d'un phénotype cellulaire imputable à la modification de la protéine. Ce phénotype peut correspondre à une nouvelle toxicité due à la protéine prion, à une perte de fonction de celle-ci ou encore à un gain de fonction. Puisque le phénotype découle directement de la conformation prion de la protéine, il est donc propagé en même temps que le prion [121, 122]. Ainsi, un prion est une protéine infectieuse qui provoque une modification dans la cellule.

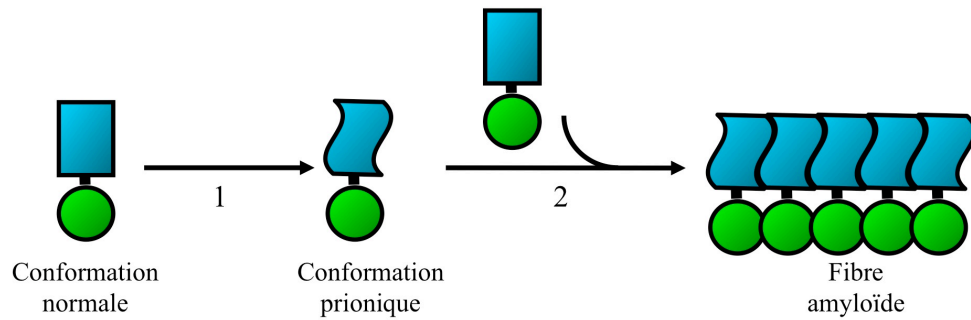


Figure 4. Représentation schématique de la propagation des prions. La protéine prion possède au moins deux domaines plus ou moins distincts; le domaine prion (bleu), qui médie le changement de conformation de la protéine, et le domaine fonctionnel (vert), qui exerce la fonction endogène de la protéine. La première transition de la conformation normale de la protéine en sa conformation prionique (1) survient spontanément dans la cellule. Puis, le prion force la conversion de ses protéines-soeurs en conformation prionique (2) par contact direct. Les protéines prion ainsi générées vont s'agréger en fibres amyloïdes.

1.3.2 PrP ou le premier prion

La découverte des prions est directement issue de l'étude des encéphalopathies transmissibles spongiformes (TSEs), un groupe de maladies neurodégénératives infectieuses affectant les mammifères. Dans ce groupe se retrouvent notamment le scrapie du mouton, l'encéphalopathie bovine spongiforme ou « maladie de la vache folle », ainsi que le Kuru et la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'humain (revue dans [123-125]). Les premières observations effectuées sur ces maladies suggéraient un élément infectieux de type « virus lent », conséquemment à la longue période d'incubation précédant l'éclosion de la maladie [125]. Cependant, en 1967 Alper *et al.* rapportaient que la particule infectieuse responsable du scrapie était anormalement résistante aux traitements détruisant les acides nucléiques [126]. Suivant cette observation, J.S. Griffith proposa dans la même année que la particule infectieuse soit une protéine capable de se répliquer dans l'organisme [127].

Il faudra attendre les travaux de Stanley Prusiner dans les années 80 pour obtenir plus d'information concernant la véritable nature de l'élément infectieux des TSEs. Dans une étude clef publiée en 1982, il démontrait que l'agent responsable du scrapie n'est pas inactivé par des procédures modifiant les acides nucléiques, mais est partiellement affecté par des procédures hydrolysant ou modifiant des protéines. Ceci distinguait donc l'agent du scrapie des autres virus ou plasmides. Prusiner proposa le terme « prion », dérivé de **proteinaceous and infectious**, pour définir cette petite particule infectieuse exclusivement composée de protéines [128]. La même année, son groupe réussit à isoler par purification la protéine infectieuse de cerveaux de hamsters malades du scrapie [129]. La détermination de la séquence et le clonage moléculaire de PrP (Prion Protein) suivirent peu après [130-132].

PrP est une protéine extracellulaire reliée à la cellule via une ancre GPI. Bien que présente dans plusieurs tissus, elle est particulièrement exprimée dans les neurones et les cellules gliales [123, 124]. En 1993, le groupe de Weissmann réalisa l'importante démonstration que des souris dépourvues du gène encodant PrP sont résistantes à l'infection par le scrapie. Sans prouver l'hypothèse du prion, cette expérience attestait de l'implication cruciale de PrP dans les TSEs [133, 134]. PrP peut exister sous deux conformations distinctes, soit sa forme cellulaire normale (PrP^C) et son isoforme pathologique ou prionique (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} a la capacité de catalyser le changement de conformation de PrP^C en PrP^{Sc}, qui s'accumule alors dans les tissus. En effet, contrairement à PrP^C qui est présent surtout de façon monomérique ou dimérique, PrP^{Sc} a tendance à être insoluble et à former des agrégats structurés de type amyloïde. Par ailleurs, PrP^C est complètement digéré par la protéinase K, tandis que le même traitement sur PrP^{Sc} laisse invariablement un fragment de 27-30 kDa intact (revue dans [133, 135]). Cette accumulation de matériel amyloïde insoluble n'est pas sans rappeler d'autres maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer. Cependant, la pathologie des maladies à prions ne s'explique pas uniquement par l'accumulation de dépôts extracellulaires de PrP^{Sc}. D'autres voies moléculaires impliquant PrP^{Sc} provoquent directement la mort des neurones, mais celles-ci restent encore incomprises [124, 133].

Malgré la publication de très nombreuses études et la remise en 1997 du prix Nobel de médecine à Stanley Prusiner pour ses travaux sur le prion des mammifères, certains chercheurs soulèvent encore des doutes quant à la nature exclusivement protéique de la particule infectieuse responsable des TSEs. Une critique majeure vient de l'existence de différentes souches de TSEs, dont les périodes d'incubations, les symptômes cliniques et la neuropathologie varient. En effet, ce phénomène de souches de maladies, normalement attribuable à des mutations ou polymorphismes génétiques d'agents infectieux, est plus difficilement réconciliable avec l'idée d'un agent infectieux composé d'une unique

protéine. Cette apparente contradiction a grandement été éclaircie avec l'étude des prions de levures, telles que décrit plus loin [123, 136].

Il ressort à travers la littérature que la preuve ultime de l'existence d'une protéine infectieuse ou prion est la propagation *in vivo* du phénotype qu'elle provoque suite à une infection effectuée avec des prions produits *in vitro* à partir de protéines recombinantes [120, 123, 137]. Très tôt, il a été démontré que la conversion *in vitro* de protéines PrP^C recombinantes en PrP^{Sc} à partir de PrP^{Sc} purifié de cerveaux atteints de TSEs était possible [138]. Cependant, la faible efficacité de ce processus ne permettait pas de tester si les particules obtenues pouvaient causer le scrapie [123, 139]. Une version améliorée de cet essai, nommée PMCA pour *protein-misfolding cyclic amplification assay*, permis d'augmenter l'efficacité de la technique grâce à plusieurs cycles de conversion [139]. Utilisant cette méthode, le groupe de Supattapone a récemment démontré que les composantes minimales nécessaires à l'inoculation de la maladie à prion sont PrP^C recombinant, des lipides co-purifiés et une molécule polyanionique à un brin [140]. Ces composantes recombinantes peuvent donc à elles seules former la particule infectieuse, ce qui peut être considéré par certains comme la preuve finale de la véracité de l'hypothèse prion pour PrP [124].

1.3.3 Les prions de *S. cerevisiae* : le très populaire [*PSI*⁺]

Il y a plus de quarante ans, Cox décrivait chez la levure *S. cerevisiae* un phénotype qui pouvait se transmettre de façon cytoplasmique, ce qui le rendait particulièrement intrigant [141]. En effet, il a observé que certaines cellules avaient la capacité d'augmenter significativement l'efficacité de suppression de mutations non-sens, provoquées par l'introduction d'un codon stop ocre, via l'insertion de l'ARNt *SUQ5*. La description de ce phénotype de suppression, nommé [*PSI*⁺], suggérait qu'il était transmis

par un élément cytosolique et de façon non-mendélienne (revue dans [142, 143]). En 1993, Chernoff *et al.* décrivait l'apparition *de novo* de $[PSI^+]$ suite à la surexpression du gène *SUP35* [144]. C'est cependant Reed B. Wickner qui suggèrera le premier que le phénotype de suppression $[PSI^+]$ est le résultat de la forme prionique de la protéine Sup35p [145]. Dans les années qui suivirent la proposition de Wickner, plusieurs articles apportèrent des preuves biochimiques et génétiques appuyant l'hypothèse que Sup35p se comporte comme un prion [119, 146-149].

Chez *S. cerevisiae*, Sup35p est l'homologue du facteur de terminaison de la traduction eRF3. En collaboration avec Sup45p, Sup35p permet la reconnaissance des codons stop et termine la traduction. Dans les cellules $[PSI^+]$, Sup35p est ségrégué des fibres de prion auto-répliquatives et ne peut donc plus participer à la terminaison de la traduction. Conséquemment, ce processus est relâché et certains codons stops ne sont plus efficacement reconnus. Cette suppression de la lecture non-sens peut être aisément détectée dans la souche *ade1-14*, qui contient un codon stop prématuré supprimé dans les cellules $[PSI^+]$. Ainsi, en l'absence de $[PSI^+]$ les cellules *ade1-14* ne peuvent pas synthétiser l'adénine et accumulent un précurseur rouge sur des milieux contenant de faibles quantités d'adénine. En présence du prion $[PSI^+]$, *ade1-14* est complètement traduit grâce au *read-through* et les cellules peuvent croître en l'absence d'adénine, formant des colonies blanches (schéma Figure 5A et revue dans [119, 120, 136, 143, 150]). Il est intéressant de noter que *SUP35* est un gène essentiel à la survie de *S. cerevisiae*, ce qui signifie que même dans les cellules $[PSI^+]$, une petite fraction de Sup35p reste fonctionnelle.

$[PSI^+]$ est sans aucun doute le prion de levure le plus étudié, à la fois dû à son phénotype facilement discernable et à l'accumulation de l'expertise à son sujet. Ainsi, plusieurs expériences clefs de la recherche sur les prions ont été d'abord faites sur ce

système, et une vaste partie des connaissances sur les prions découle donc de son étude [136].

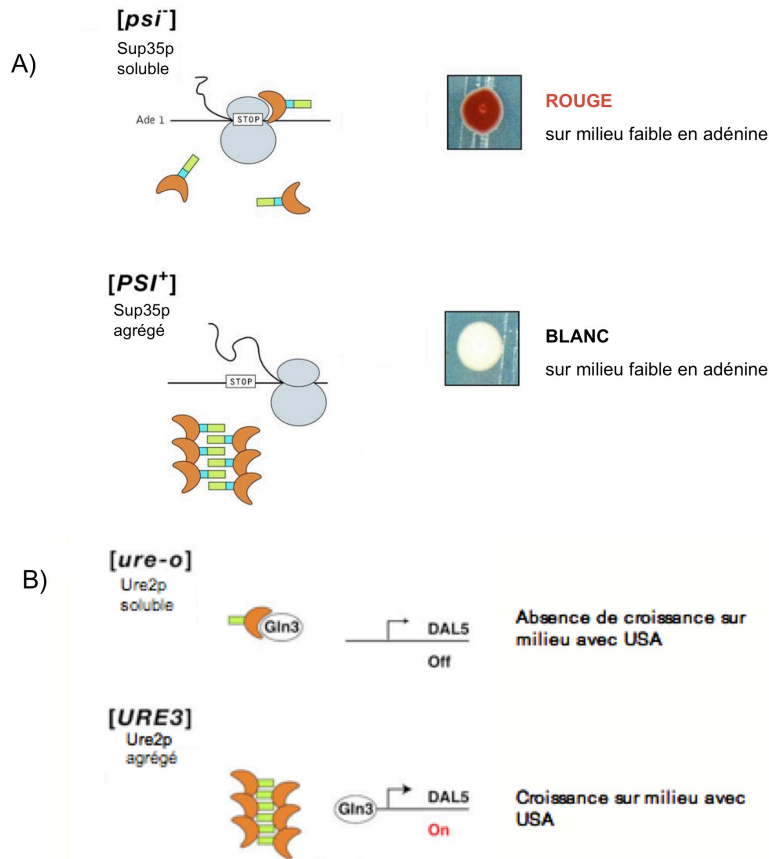


Figure 5. Représentation schématique des prions de *S. cerevisiae* [PSI⁺] et [URE3]. A) Sup35p est soluble dans les levures [psi⁻] et permet la terminaison de la traduction. Dans les cellules [PSI⁺] Sup35p est agrégé, résultant en une suppression de codons non-sens. La terminaison de traduction peut être évaluée en utilisant l'allèle *ade1-14* portant un codon stop prématuré; l'absence d'Ade1p dans les cellules [psi⁻] provoque l'accumulation d'un pigment rouge sur milieu faible en adénine, alors que les colonies de cellules [PSI⁺] restent blanches. B) Dans sa conformation normale, Ure2p lie le facteur de transcription Gln3p, empêchant son activité. Lorsqu'en conformation prion, Ure2p agrégé ne peut plus séquestrer Gln3p qui active alors différents gènes, dont celui encodant pour Dal5p. Dal5p permet l'importation du *n*-carbamyl aspartate (USA) dans la cellule et donc la survie sur milieu pauvre en azote et contenant de l'USA. Adapté de Chien, P., Weissman, J.S. et DePace, A.H., *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73:617-656 [170]

1.3.4 Les prions de *S. cerevisiae* : [URE3] le discret

Tout comme [PSI⁺], le phénotype [URE3] a été décrit longtemps avant son identification en tant que prion. En 1971, Lacroûte isola des souches de *S. cerevisiae* mutées pour *URA2* mais capable de croître sur un milieu contenant de l'uréidosuccinate (USA), le métabolite normalement produit par l'enzyme encodée par le gène *URA2*. La caractérisation d'une famille de ces mutants révéla que le phénotype de survie sur USA était très efficacement transmis lors de la mitose, mais qu'il est aussi transmis de façon non-Mendélienne et non-mitochondriale [151]. Ce phénotype fut baptisé [URE3]. Une étude subséquente rapporte que la propagation du phénotype [URE3] requiert la présence du gène *URE2* [152]. Ces observations seront confirmées par Wickner en 1994, et il observera de plus que la surproduction de la protéine Ure2p induit l'apparition de [URE3]. Il en conclut que le phénotype [URE3] est issu de la propagation de la forme prionique d'Ure2p [145].

Brièvement, Ure2p agit comme répresseur du transport de l'USA. En présence de riches sources d'azote, Ure2p bloque l'assimilation de sources pauvres d'azote en empêchant l'entrée dans le noyau du facteur de transcription Gln3p. Un des gènes cibles de ce facteur de transcription est la perméase d'allantoate *DAL5*. Compte tenu de la similarité de structure entre l'allantoate et l'USA, Dal5p peut aussi servir de transporteur à ce dernier. En présence de l'état [URE3] Ure2p se trouve à être inactivé à cause de son incorporation dans des fibres prioniques. Gln3p peut donc aller en tout temps activer la transcription de *DAL5*, ce qui permet l'assimilation d'USA. L'USA permet alors la survie en l'absence d'uracile des cellules *ura2* (voir Figure 5B) [136, 153].

Malgré qu'il ait été le premier prion de levure clairement établi, [URE3] est moins étudié et compris que [PSI⁺]. Ceci s'explique à la fois par le fait que le phénotype encodé,

soit la croissance sur USA, est moins stringent que celui de $[PSI^+]$. De plus, $[URE3]$ est instable dans plusieurs souches de laboratoire, et ceci est possiblement dû à une interaction négative avec $[PSI^+]$ [136, 154].

1.3.5 Les prions *S. cerevisiae* : $[RNQ]$ l'inducteur

Le prion $[RNQ]$ (pour *Rich* in *Asn* and *Glu*) a été découvert suite à une analyse bioinformatique visant à identifier d'autres protéines possédant des similarités de séquence avec les domaines prion de $[PSI^+]$ et $[URE3]$. Ainsi, c'est grâce à ses caractéristiques biochimiques que Rnq1p a d'abord été établi en tant que prion [155]. L'identification d'un rôle potentiel de $[RNQ]$ dû attendre un an après son identification, lorsqu'il fut associé au phénomène $[PIN^+]$ [156].

L'état $[PIN^+]$ désigne d'abord un facteur essentiel à l'apparition du prion $[PSI^+]$ *de novo*. La caractérisation de $[PIN^+]$ révéla qu'il se comportait aussi comme un prion, ce qui soulève l'idée que la présence d'un premier prion dans une cellule favorise l'apparition subséquente de prions [157-159]. Puis, un criblage visant à trouver le(s) protéine(s) à la base du phénomène $[PIN^+]$ permit l'identification des protéines Ure2p et Rnq1p. La découverte que deux prions différents pouvaient causer le phénotype $[PIN^+]$ suggérait donc que sa fonction, soit l'induction de $[PSI^+]$, n'était pas la conséquence d'un prion en particulier mais pouvait être attribuable à différents prions [156]. Cette observation fut répétée et confirmée par la suite avec $[URE3]$ et $[Het-s]$, qui suscitent aussi le phénotype $[PIN^+]$ [160, 161]. Cependant, compte tenu de la grande efficacité avec laquelle $[RNQ]$ peut induire $[PSI^+]$ et de l'absence d'autres fonctions attribuées à Rnq1p ou $[RNQ]$, $[RNQ]$ est désormais connu comme étant le prion $[PIN^+]$ [119, 136, 162]. La véritable fonction de Rnq1p et/ou $[RNQ]$, s'il en possède une différente de celle visant à favoriser l'apparition d'autres prions, reste cependant inconnue jusqu'à ce jour.

1.3.6 Le prion du champignon filamenteux *P. anserina*: [HET-s] le tueur

La protéine [Het-s] de *Podospora anserina* est impliquée dans un phénomène de reconnaissance du soi/non-soi nommé incompatibilité de l'hétérocaryon. Brièvement, le locus de het-s possède deux allèles encodant pour des protéines qui diffèrent par seulement 13 acides aminés, *het-s* et *het-S*. Cependant, seul le premier type de protéine permet l'existence de la conformation prionique [Het-s]; la conformation normale de cette même protéine est dénotée [Het-s*]. La fusion d'une cellule [Het-s] avec une cellule HET-S conduit à la mort de l'hétérocaryon formé. En contrepartie, la fusion d'une cellule HET-S avec une cellule possédant [Het-s*] permet la viabilité. Ceci signifie donc que l'interaction entre HET-S et Het-s dans sa conformation prionique est toxique pour les cellules (Figure 6) [136, 163].

Des observations datant de 1962 rapportent que la transformation [Het-s*]⇒[Het-s] s'étend très rapidement à travers le mycélium, tel un processus infectieux. De plus, ces deux caractères sont transmis de façon non-Mendélienne suite à la méiose [164]. Il n'en fallut pas plus pour que l'étude de ce phénomène reprenne avec les nouvelles données sur les prions, et qu'en 1997 Coustou *et al.* proposent qu'[Het-s] agit comme un prion [165].

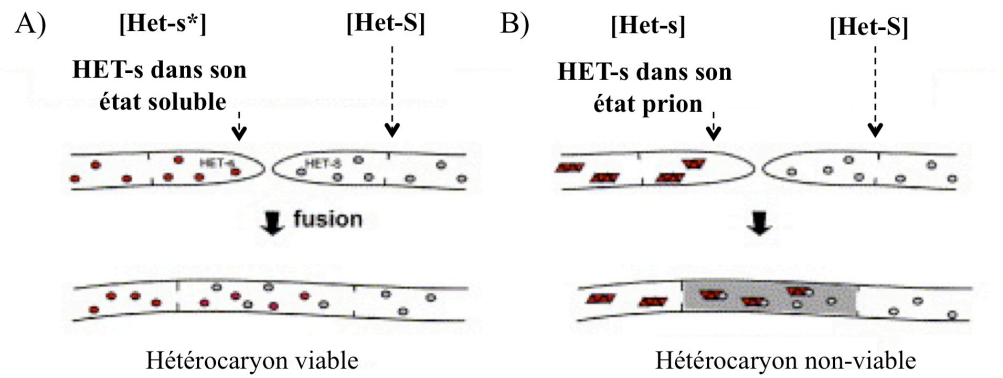


Figure 6. Représentation schématique du prion [Het-s] de *P. anserina*. A) La fusion de cellules [Het-s*], soit la forme non-prion de l'allèle *Het-s*, et de cellules *Het-S* permet la viabilité des hétérocaryons ainsi formés. B) La fusion de cellules contenant la forme prionique de *Het-s*, soit [Het-s], avec des cellules *Het-S* va provoquer la mort des cellules fusionnées. Les mécanismes entraînant cette mort sont encore mal compris. Adapté de Benkemoun, L., Saupe, S.J., *Fungal Genet. Biol.*, 2006 43(12): 789-803 [135]

1.3.7 Induction et propriétés génétiques des prions de levure

Chez la levure, les premières caractéristiques permettant de démontrer qu'un phénotype est encodé par un prion ont été décrites par Wickner lors de la publication de [URE3] en 1994 [145]. Ces propriétés ont par la suite été reconnues comme typiques à tout prion [122, 154, 166]. Parmi celles-ci nous retrouvons les propriétés génétiques des prions, l'induction par la surexpression du gène encodant le prion, la métastabilité et la stricte dépendance du prion au gène qui l'encode.

Génétiquement, les phénotypes encodés par des prions sont dominants et montrent une transmission non-Mendélienne. En effet, lors de croisements entre haploïdes [*PRIONS*⁺] et [*prion*⁻], les cellules diploïdes obtenues seront [*PRIONS*⁺]. De plus, les 4 spores issues de ces diploïdes sont généralement aussi [*PRIONS*⁺], bien que certains prions ou souches de prions montrent d'autres ratios aberrants qui diffèrent de l'habituel 2:2 [119, 122]. La dominance et la transmission non-Mendélienne sont des caractéristiques cruciales des prions, et elles ont été démontrées entre autres pour [*PSI*⁺], [*URE3*] et [*RNQ*] [122, 141, 145, 151, 159].

L'hérédité non-Mendélienne des phénotypes prioniques s'explique par la transmission d'un élément extra-chromosomal. Comme de fait, tous les prions les mieux caractérisés, soit [*PSI*⁺], [*URE3*], [*RNQ*] et [Het-s], peuvent être transmis de façon cytoplasmique [152, 155, 164, 165, 167]. Chez *S. cerevisiae*, les expériences qui montrent la transmission du prion via le cytoplasme sont effectuées avec des souches contenant la mutation *kar1*. Ce mutant favorise la présence d'événements de cytoduction lors d'un croisement, i.e. le mélange du cytoplasme de deux cellules sans fusion nucléaire (formation d'un hétérocaryon) [122]. Le mutant *kar1* permet donc d'évaluer directement la

transmission d'éléments cytoplasmiques. Jusqu'à maintenant cependant aucun mutant de la sorte n'a été créé chez *S. pombe*.

Les prions et leur phénotype peuvent apparaître spontanément dans les cellules. Ceci s'effectue à de très basses fréquences, soit entre 1 fois pour 10^5 à 10^7 cellules ou moins, dans le cas de [Het-s] (revue dans [119]). La surexpression du gène encodant le prion permet d'augmenter le niveau d'apparition des prions de plusieurs ordres de grandeur [144, 145, 155, 165]. En effet, une hausse de la concentration de protéines prioniques augmente les chances qu'un changement de conformation se produise [119, 121, 154]. Il est important de noter que [*PSI*⁺] et [*URE3*] sont maintenus même si la surexpression de *SUP35* et *URE2* n'est que temporaire [144, 145].

Une fois induits, la majorité des prions sont stablement transmis à travers les divisions méiotiques et mitotiques. Cependant, il existe des différences dans la stabilité de certains prions qui sont généralement attribuables au background génétique et épigénétique des cellules (revue dans [119]). Tout comme une cellule peut être guérie d'un virus, *S. cerevisiae* peut être artificiellement guéri de ses prions. Ceci s'effectue notamment par un traitement avec une faible quantité (1-5 mM) de chlorure de guanidium [145, 158, 168]. Suite à sa disparition de la cellule, le prion peut cependant réapparaître spontanément sans nécessité d'infection extérieure, contrairement au virus. Cette stabilité à travers les divisions cellulaires et la guérison réversible confère donc aux prions la caractéristique d'être métastable [119, 121, 154].

Même s'il constitue un élément épigénétique en soi, la maintenance du prion dépend de l'intégrité du gène encodant la protéine prion. Ainsi, une perte de l'expression du gène encodant la protéine prionique va mener à une déplétion cellulaire de cette protéine et éventuellement à la perte du prion [145, 156, 169]. La délétion du gène encodant le prion

n'entraîne cependant pas automatiquement la perte du phénotype prionique. En effet, le phénotype encodé par le prion correspond parfois à une perte de fonction de la protéine. C'est le cas de $[PSI^+]$ et $[URE3]$, où les phénotypes d'augmentation du *read-through* de codons stop et d'expression de *DAL5* découlent de l'inactivation de Sup35p et Ure2p. Pour d'autres prions tel $[RNQ]$ et $[Het-s]$, la forme prionique confère une nouvelle fonction à la protéine. Dans ces cas, la délétion du gène encodant le prion signifie la perte simultanée du prion et du phénotype qu'il encode (revue dans [119, 154]).

1.3.8 Le changement de conformation des prions de levures

Tous les prions décrits ci-haut partagent le même type de conformation lorsqu'ils sont dans leur forme prionique. En effet, PrP^{Sc}, $[PSI^+]$, $[URE3]$, $[RNQ]$ et $[Het-s]$ correspondent aux formes amyloïdes de PrP^C, Sup35p, Ure2p, Rnq1p et HET-s (revue dans [170, 171]). Les amyloïdes sont des fibres très structurées de protéines qui possèdent une structure secondaire formée de brins β empilés perpendiculairement à l'axe de la fibre (*cross- β structure*). En plus de leur structure caractéristique, les amyloïdes sont excessivement stables et résistantes aux protéases [136, 170, 172]. Si tous les prions les mieux caractérisés forment des amyloïdes, les amyloïdes ne sont pas tous des prions. En effet, plus de 20 différents peptides ou protéines faisant des amyloïdes ont été décrits chez l'humain, et seul PrP est un prion [136, 171].

La présence de fibres amyloïdes *in vivo* peut être examinée à l'aide de techniques basées sur l'insolubilité dans le SDS des fibres amyloïdes à température pièce. Par exemple, la centrifugation d'un lysat cellulaire préparé avec un faible pourcentage de SDS permettra de séparer en fractions solubles et insolubles. Typiquement, une protéine sous sa forme prionique va se retrouver dans les fractions insolubles alors que dans sa conformation normale elle sera soluble [122, 172]. Il est aussi possible de visualiser les

complexes de haut poids moléculaire, donc de type amyloïde, directement sur gel d'agarose [172]. D'autres techniques, comme la digestion d'extraits cellulaires avec la protéinase K, sont aussi fréquemment utilisées [122]. Finalement, la conséquence de la formation de fibres amyloïdes peut être visualisée directement à l'aide de fusions entre une protéine prion et une protéine fluorescente. Dans des cellules sans prions, la protéine est soluble et la fluorescence, diffuse, alors que dans les cellules contenant un prion, la fluorescence se retrouve concentrée en un ou plusieurs foci, reflétant l'agrégation de la protéine [122, 136, 171].

In vitro, les protéines prioniques agrègent en formant des fibres amyloïdes. C'est d'ailleurs sous cette forme que les prions peuvent être transformés et entraînent l'apparition de leur phénotype *in vivo*. Compte tenu de leur structure unique, il est assez aisé d'examiner la formation de fibres amyloïdes à partir de protéines recombinantes *in vitro*. Certains colorants comme le Congo Red ou la thioflavine T voient leurs propriétés spectroscopiques modifiées lors de la liaison à des fibres amyloïdes, ce qui permet de suivre en temps réel la formation de fibres dans une réaction d'agrégation *in vitro*. Il est aussi possible de suivre la formation de fibres grâce à la digestion par la protéinase K, en examinant l'accumulation de matériel résistant, ou avec n'importe quelle méthode biochimique décrite plus haut. Finalement, il est possible d'observer directement les fibres à l'aide de techniques de microscopie à très haute résolution, soit la microscopie à force atomique (AFM) ou la microscopie électronique (EM) [122, 136, 171, 173].

Les amyloïdes des prions de levure produits *in vitro* sont infectieux. En effet lorsqu'ils sont introduits dans des cellules naïves, ils induisent l'émergence de la forme prion de la protéine et du phénotype qu'elle provoque. Tout comme pour le prion des mammifères, cette expérience visant à induire *in vivo* le prion à partir de protéines recombinantes et agrégées est considérée comme la preuve ultime que la protéine examinée

est infectieuse, donc un prion [120, 123, 137]. Cette expérience a été réalisée avec succès sur tous les prions de cellules eucaryotes énumérés jusqu'ici, soit [*PSI*⁺], [*URE3*], [*RNQ*] et [*Het-s*] [174-179].

Chez les prions de levure et de *P. anserina*, l'agrégation est dirigée par un domaine spécifique de la protéine nommé le domaine prion. Ces domaines sont à la fois nécessaires et suffisants à l'activité du prion [136, 166]. Ils apparaissent aussi être modulaires; la fusion d'un domaine prion avec une autre protéine résulte en une chimère agissant comme un prion [160, 169]. Les domaines prions de Sup35p, Ure2p et Rnq1p se ressemblent à cause de leurs séquences riches en acides aminés asparagine et glutamine [121, 136, 155]. Cependant, cette séquence n'est pas typique de tous les prions puisque le domaine prion de HET-s ne montre pas de biais dans sa composition en acides aminés [180, 181]. Étonnamment, le mélange aléatoire de l'ordre des acides aminés des domaines prions de Sup35p et Ure2p ne modifie pas leur habilité à former un prion [182, 183]. Il apparaît donc que c'est la composition et non la séquence en acides aminés qui détermine les propriétés d'agrégation. Ceci va de pair avec l'observation que tous les domaines prions sont flexibles et très peu structurés dans leur forme soluble [180, 181, 184, 185]. Grossièrement, un prion de levure peut être considéré comme un domaine globulaire fonctionnel fusionné à une queue susceptible d'agréger sous forme amyloïde [136].

Tout comme pour PrP, les prions de *S. cerevisiae* présentent un phénomène de souche. Les souches de prion sont caractérisées par la force du phénotype associé et la stabilité mitotique du prion; on distingue généralement des souches dites fortes et faibles [171]. Ce phénomène a d'abord été observé chez [*PSI*⁺], où les différentes souches sont mises en évidence par la couleur de la colonie. Les souches fortes montrent un haut taux de *read-through* et sont donc blanches, alors que les souches faibles font moins de suppression de la terminaison et sont roses [186-188]. Étonnamment, les différentes souches de [*PSI*⁺]

peuvent être créés et/ou propagés *in vitro*, ce qui indique que la différence entre les souches est encodée directement dans la structure amyloïde du prion. En effet, il apparaît que Sup35p peut adopter différentes formes amyloïdes et que celles-ci diffèrent dans leur stabilité et leur capacité à se propager [174, 176, 189]. Bien qu'il y soit moins étudié, il est intéressant de mentionner que le phénomène de souche est aussi présent chez [URE3] et [RNQ] [177, 190].

1.3.9 Mécanismes de propagation des prions de levure

Pour pouvoir être infectieuses, les fibres amyloïdes des prions doivent se maintenir dans la population cellulaire en répliquant et disséminant leur structure. Chez *S. cerevisiae*, le mécanisme de propagation doit donc être assez rapide pour suivre le processus de mitose. Deux étapes sont nécessaires à ce processus. D'abord, la fibre prionique doit croître via le recrutement et le changement de conformation de nouvelles protéines. Puis cette fibre doit se fragmenter afin de libérer des particules infectieuses qui peuvent se disséminer dans le cytoplasme et les cellules-filles [120, 166, 171]. Dans le cas de [PSI⁺], il est évalué que les cellules contiennent entre 30 et 1000 propagons. La nature exacte de la structure *in vivo* de ces particules infectieuses (aussi nommées *seeds* ou propagons) reste toutefois nébuleuse [191, 192].

La propagation des prions de levure peut être modulée par différents facteurs cellulaires. Le plus important est sans contredit la protéine chaperone Hsp104p, une protéine chaperone ATPasique agissant comme désagrégase (revue dans [136, 191, 193]). En effet, sa présence dans la cellule est cruciale à l'apparition et à la propagation des prions de *S. cerevisiae in vivo*, et elle est aussi importante à la propagation de [Het-s]. Par ailleurs, la surexpression de Hsp104p élimine [PSI⁺] des cellules mais n'a pas cet effet sur les autres prions [159, 194-196]. Cette dépendance de la propagation des prions à Hsp104p explique

l'effet curatif de faibles quantités de chlorure de guanidium, qui agit comme inhibiteur de la chaperone [136].

Deux modèles complémentaires ont été proposés pour expliquer l'effet d'Hsp104p sur $[PSI^+]$. Le premier suggère qu'Hsp104p est requis pour la stabilisation ou la génération d'un intermédiaire structural requis pour la formation du prion. Dans ce cas, un niveau endogène d'Hsp104p prendrait une part active dans le processus de réplication du prion, et son absence empêcherait Sup35p d'acquérir un état de transition propre à sa conformation prion. Le deuxième modèle stipule plutôt que l'activité d'Hsp104p est requise pour la génération de propagons de $[PSI^+]$. Son absence éliminerait donc $[PSI^+]$ des cellules en empêchant simplement sa propagation. Les deux modèles s'accordent cependant pour expliquer que la surexpression d'Hsp104p dissipe $[PSI^+]$ via la dissolution des agrégats de prions et la resolubilisation de Sup35p (revue dans [136, 193]). Les dernières études portant sur les effets de Hsp104p sur $[PSI^+]$ *in vitro* et *in vivo* indiquent un rôle similaire à celui proposé dans le deuxième modèle, soit la formation de propagons [197-199].

En plus d'Hsp104p, d'autres protéines chaperones ont été impliquées dans la propagation des prions. En effet, des Hsp70 de la famille des Ssa et Ssb ainsi que leur co-chaperones Hsp40 Ydj1p et Sis1p peuvent moduler la propagation des différents prions de *S. cerevisiae*. Cependant, leurs effets sur la propagation varient selon la chaperone elle-même et selon le type de prion tel que montré dans le tableau I. De plus, certaines de ces chaperones affectent l'activité d'Hsp104p, et d'autres non (revue dans [191, 193, 200]). Puisque l'expression des différentes Hsp est modulée par les conditions environnementales, il a été proposé que les mécanismes sophistiqués de régulation des prions via les chaperones permettent à la cellule de répondre au stress par une promotion ou une élimination du prion et de son phénotype [198]. L'élucidation de la nature même des

propagons et de l'effet des chaperones sur ceux-ci permettra sans doute d'éclaircir la question.

Chaperonne	Effet sur [<i>PSI</i> ⁺]	Effet sur [<i>URE3</i>]	Effet sur [<i>RNQ</i>]
Surexpression de Hsp104p	Élimination	Aucune effet	Aucun effet
Diminution de Hsp104p	Élimination	Élimination	Élimination
Surexpression de Hsp70 (<i>Ssa1-2</i>)	Élimine certaines souches de [<i>PSI</i> ⁺]; diminue l'effet de la surexpression de Hsp104p	Élimination (<i>Ssa1p</i>) ou aucun effet (<i>Ssa2p</i>)	Pas de donnée
Mutation/délétion de Hsp70	Élimination suite à la mutation de <i>ssa1</i>	Élimination suite à la mutation de <i>ssa2</i>	
Hsp40	Pas de donnée	Élimination suite à la surexpression de Ydj1p	Modulé par Sis1p

Table I. Récapitulation de l'influence des chaperones sur la maintenance et la propagation de prions de *S. cerevisiae*. Adapté de True, H.L. *TRENDS Genet.*, 2006 22(2)110-117 et de Perrett, S. et Jones, G.W., *Curr. Op. in Struct. Biol.*, 2008 18:52-59 [192, 199].

1.3.10 Les prions dans la nature : avantage ou inconvénient?

Chez les mammifères, il ne fait aucun doute que le prion PrP est un pathogène, et donc un inconvénient pour l'organisme. En ce qui concerne les prions de levure, particulièrement le très étudié $[PSI^+]$, la réponse est moins claire.

Il a d'abord été montré que la présence de $[PSI^+]$ révèle des traits génétiques cryptiques chez *S. cerevisiae*. Ceci mène à la génération de phénotypes divers qui varient selon le background génétique de la levure et qui sont souvent avantageux pour la survie dans différentes conditions de culture [201-204]. Aussi, la séquence du domaine prion de Sup35p est très conservée chez *S. cerevisiae* et chez les autres levures [205, 206]. De plus, tous les homologues testés de Sup35p issus de différentes espèces de levures peuvent adopter la conformation prion [207-212]. Selon certains, cette conservation de structure et de fonction implique que la capacité de Sup35p à adopter une forme prionique est avantageuse pour la cellule. Cependant, cette conservation pourrait être associée à la fonction endogène de Sup35p, terminaison de traduction ou autre, et n'avoir qu'un lien fortuit avec la capacité à adopter une structure prion. Rien ne permet pour le moment de discriminer entre ces deux possibilités [136]. Les tenants de l'opinion contraire, soit que $[PSI^+]$ constitue un désavantage pour les cellules, s'appuient notamment sur le fait que ce prion n'a pas été retrouvé dans différentes souches naturelles de levure. De cette observation, ils concluent que $[PSI^+]$ est une « maladie » puisque seul le fait de conférer un net désavantage aux levures permettrait d'expliquer son absence dans la nature [213]. Une compréhension plus complète des effets de $[PSI^+]$ sur la cellule permettra peut-être de résoudre ce conflit.

Dans le cas d' $[URE3]$, la balance penche moins vers un bénéfice net pour les cellules. En effet, les cellules $[URE3]$ montrent un léger désavantage par rapport aux

cellules sans prion [151]. De plus, le domaine prion d'Ure2p est moins conservé chez les différentes levures, et certains homologues ne peuvent pas adopter la conformation prion [205, 214, 215]. Finalement, il n'a pas été observé dans des souches naturelles de levures [213].

En fait, [RNQ] est le seul des trois prions examinés à avoir été trouvé dans des souches naturelles [213]. Ironiquement, c'est aussi celui dont la fonction de la protéine, sous forme prion ou non-prion, reste inconnue. Une hypothèse stipule que [RNQ] facilite l'apparition d'autres prions dans des conditions le nécessitant, ce qui le rendrait avantageux [120]. Compte tenu du peu d'information que nous possédons sur le rôle endogène de Rnq1p et [RNQ], la question de l'avantage conféré reste entière.

Quant à lui, [Het-s] est très fréquemment retrouvé dans des souches sauvages de *P. anserina* [216]. De plus, sa fonction dans la réaction d'incompatibilité de l'hétérocaryon est très bien caractérisée. Plusieurs études suggèrent que cette réaction de reconnaissance du soi et du non-soi emmène un bénéfice aux champignons filamenteux via une protection contre certains parasites cellulaires. Il apparaît donc que [Het-s] est un prion conférant un avantage aux cellules (revue dans [136, 150]).

Deux autres protéines bien caractérisées et possédant des régions riches en glutamine et asparagine ont récemment été suggérées comme ayant un comportement de type prion. La première est CPEB, une protéine liant de petits motifs d'ARN situés en 3' nommés éléments de polyadénylation cytoplasmique. Ce faisant, elle régule l'activation de ces ARNm via la modulation de la polyadénylation, et de plus affecte leur localisation (revue dans [217]). Il a été montré que dans la levure, la forme neuronale de CPEB d'*Aplysia californica* agit comme un prion. De façon importante, la forme prionique de CPEB correspond à sa forme active, ce qui implique que le prion CPEB est bénéfique aux

cellules [218]. La deuxième de ces protéines est Swi1p, une des 11 protéines faisant partie du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF de *S. cerevisiae*. Une récente étude a démontré que Swi1p possède la capacité d'adopter une conformation prion [219]. L'inactivation de cette protéine via son changement de conformation et/ou sa séquestration à l'intérieur d'agrégats aurait de grandes répercussions sur la transcription globale de la cellule, et pourrait ainsi fournir un avantage d'adaptation aux cellules [120].

La recherche sur les prions en est encore à ses débuts, et plusieurs protéines infectieuses, avantageuses ou non pour l'organisme, restent à découvrir. Selon certains auteurs, les prions agiraient comme une mémoire pour l'organisme, conférant un moyen à la fois flexible, durable et transmissible d'accumuler des informations [120, 136].

1.3.11 Les « nouveaux » prions : élargir la définition des prions

En 2003, le groupe de Wickner publiait la caractérisation du prion $[\beta]$ [220]. Selon lui, cet élément mérite la désignation de prion puisqu'il peut se transmettre via le cytosol, donc est infectieux, possède deux états distincts, est réversible et la surexpression du gène l'encodant provoque l'apparition de la conformation prionique. Cependant, le mode de propagation de $[\beta]$ diffère grandement de celui des prions étudiés auparavant. En effet, $[\beta]$ correspond à la forme active de la protéase vacuolaire PrB de *S. cerevisiae*, capable de s'auto-activer grâce à un clivage en *trans*. Il ne se transmet donc pas via un changement de conformation menant à la formation de fibres amyloïdes, mais plutôt via modification covalente [136, 220, 221].

La description de $[\beta]$ a ouvert la voie à la description de phénomènes semblables. L'élément *Crippled Growth* ou $[C]$ de *P. anserina* est un phénomène de dégénération cellulaire émergeant lors de la phase stationnaire et qui est transmis de façon cytoplasmique

et infectieuse aux hyphes. La caractérisation de [C] démontre cependant qu'il ne correspond pas à un prion classique, mais est plutôt le résultat de la forme active d'une cascade de MAP kinases dirigée par PaASK1. Les auteurs de cette étude proposent que cette voie possède une loupe de régulation positive suffisamment forte pour être propagée d'une cellule à l'autre [222].

Ces nouveaux joueurs dans le monde des prions viennent donc ouvrir un débat sur la définition même de ces protéines infectieuses : doit-on restreindre le nom « prions » aux protéines adoptant un changement de conformation menant à des amyloïdes, ou plutôt l'élargir à toutes les protéines capables de transmettre efficacement leurs modifications conformationnelles et/ou covalentes.

1.4 Travaux préliminaires

Notre laboratoire a choisi d'utiliser la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme modèle de recherche pour l'étude de la protéine chaperone calnexine. De façon générale, la levure possède le grand avantage de permettre des manipulations génétiques aisées tout en étant un organisme eucaryote. La publication du génome de *S. pombe* en 2002 a permis le développement de plusieurs outils et a rendu son utilisation d'autant plus efficace [223]. *S. pombe* ressemble plus aux cellules de mammifères que sa très populaire consœur *S. cerevisiae* sur de nombreux aspects, et particulièrement en ce qui concerne la calnexine. En effet, l'homologue de la calnexine de *S. pombe* possède beaucoup plus de similarité avec la calnexine des eucaryotes supérieurs qu'avec celle de *S. cerevisiae* [46]. De plus la glucosyl transférase (ou GT), composante cruciale du cycle de la calnexine, est absente chez *S. cerevisiae* [25, 26]. Puisque plusieurs travaux sur la calnexine de mammifères étaient déjà en cours, le choix de *S. pombe* par notre laboratoire permettait à la fois d'utiliser différentes

approches pour cerner la fonction de la calnexine, tel des criblages génétiques, et d'extrapoler les découvertes aux eucaryotes supérieurs.

Le clonage et la caractérisation de la calnexine de *S. pombe* par notre laboratoire révélèrent qu'il s'agissait d'une protéine essentielle à la viabilité de cette levure [45]. Cette observation cruciale fut confirmée de façon indépendante par un laboratoire de l'université McGill quelques mois après [116]. Puis, des études structure-fonction ont permis de délimiter la région essentielle de la calnexine aux extrémités *N*- et *C*- terminales de son domaine luminal [90, 91]. Ces régions essentielles sont toutefois dépourvues de fonction chaperone, ce qui nous indique que la fonction essentielle de la calnexine ne réside pas dans son rôle direct sur le repliement des protéines [76]. Finalement, notre laboratoire a démontré que la calnexine interagit de façon stable avec la chaperone BiP. Puisque les régions de la calnexine permettant la viabilité conservent cette propriété, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction avec BiP pouvait être impliquée dans sa fonction essentielle [90, 91].

L'essai utilisé dans le cadre d'études structure-fonction de la calnexine est nommé essai de ségrégation plasmidique (Figure 7). Il consiste à utiliser une souche de *S. pombe* contenant une délétion génomique de la calnexine et portant une copie sauvage de la calnexine sur un plasmide avec un marqueur uracile ($\Delta cnx1 + pcnx1^+$). Dans cette souche, un mutant de la calnexine encodé sur un plasmide portant un marqueur leucine est transformé. Puis, la cellule est mise à croître dans un milieu non-sélectif pendant 7 jours, permettant la perte de l'un ou l'autre des plasmides. Si le mutant ne confère pas la viabilité, les cellules garderont toujours le plasmide uracile portant le gène sauvage de la calnexine ($pcnx1^+$), mais pourront perdre le plasmide encodant le mutant. Au contraire si le mutant supporte la viabilité, le plasmide $pcnx1^+$ pourra être perdu. La perte de l'un ou l'autre des plasmides est examinée en faisant croître les cellules sur des milieux ne contenant pas d'uracile ou de leucine.

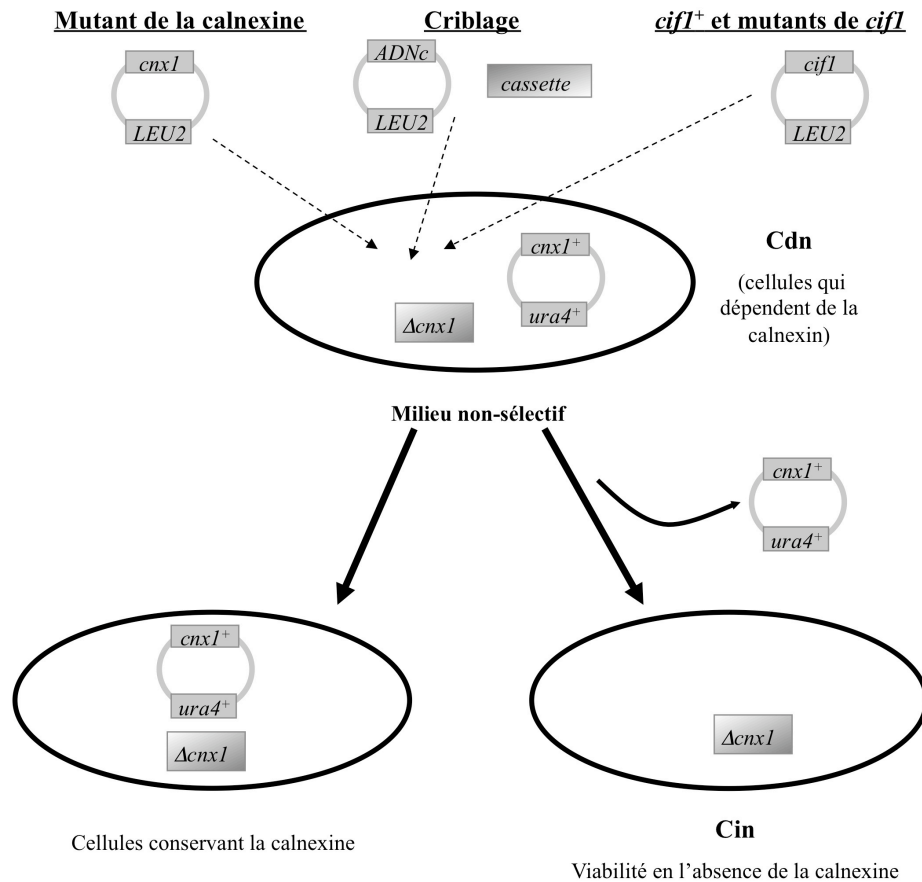


Figure 7. Essai de ségrégation plasmidique pour la calnexine. La souche utilisée contient une délétion génomique de la calnexine; le gène sauvage de la calnexine est encodé sur un plasmide portant le marqueur *ura4*⁺. Dans cette souche est introduit la séquence dont on veut tester l'habileté à remplacer la calnexine ou à induire la viabilité en l'absence de la calnexine (état Cin). Ces séquences à tester sont encodées sur un plasmide portant le marqueur *LEU2*; elles peuvent être un mutant de la calnexine, une banque d'ADNc, une cassette de délétion, *cif1*⁺ ou des mutants de *cif1*. Les cellules sont ensuite mises à croître en milieu non-sélectif pendant 7 jours, ce qui permet la perte de l'un ou l'autre des plasmides. Finalement, la présence de l'un ou l'autre des plasmides est analysée par repiquage sur milieu sélectif (absence d'uracile ou de leucine).

L'essai de ségrégation plasmidique a permis de mettre en évidence le surprenant phénomène de viabilité en l'absence de la calnexine. Cet état est spécifique à un seul mutant de délétion de la calnexine, nommé *Δhcd_cnx1* en raison de la délétion domaine central hautement conservé (hcd) de la calnexine. Lorsque *Δhcd_cnx1* est transformé dans une souche *Δcnx1 pcnx1⁺*, il provoque la perte simultanée des deux plasmides et donc l'émergence de cellules dépourvues de calnexine. Il apparaît donc que le mutant *Δhcd_cnx1* induit un état stable permettant aux cellules de survivre en l'absence de la calnexine. C'est à partir de cette observation que débute l'histoire de mon doctorat...

1.5 Hypothèses et objectifs

La recherche que j'ai effectuée pendant mon doctorat fait directement suite aux travaux effectués par Dr Aram Elagöz et Philippe Collin dans le laboratoire du Dr Rokeach. D'abord, Dr Elagöz a découvert chez *S. pombe* l'état de viabilité en l'absence de la chaperone calnexine (état Cin) suite à des essais de ségrégation plasmidique, tel que décrit dans l'introduction. Puis, les expériences effectuées par Dr Collin lors de la caractérisation de cet état ont permis d'émettre l'hypothèse que l'état Cin était médié via un élément de type prion. La première partie de mes travaux visait à compléter cette étude en faisant certaines expériences qui permettraient de confirmer ou non cette hypothèse.

L'état Cin de viabilité en l'absence de la calnexine est le premier phénomène médié par un prion identifié chez *S. pombe*. Il constitue un cas unique où une cellule met en place un mécanisme métastable permettant la survie en l'absence d'une protéine essentielle. L'étude du phénomène Cin permettra à la fois d'identifier la nature du prion, comprendre les méthodes de régulation employées par la cellule pour moduler son apparition et éclaircir la fonction essentielle de la calnexine chez *S. pombe*.

Le premier objectif de mon projet de doctorat était donc d'identifier, via un criblage génétique, des protéines impliquées dans ce phénomène. Puis, j'ai voulu caractériser *in vivo* et *in vitro* les propriétés prioniques de Cif1p, une protéine orpheline aux propriétés particulièrement intéressantes identifiées lors du criblage génétique. Le dernier objectif de ce projet était d'identifier le(s) rôle(s) cellulaire de Cif1p. Ces trois axes de recherche, qui se suivent et se complètent, visent à élucider du moins en partie les mécanismes cellulaires sous-tendant l'état métastable de viabilité en l'absence de la calnexine.

**Chapitre 2. A non-chromosomal factor allows viability of
Schizosaccharomyces pombe lacking the essential
chaperone calnexin**

Article publié dans *Journal of Cell Science* en février 2004

2.1 Mise en contexte

Cet article contient la description du premier phénomène médié par un prion découvert chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, soit l'état métastable de viabilité en l'absence de la calnexine (état Cin). Une première soumission de cet article avait été effectuée avant que je commence à travailler à cette étude. J'ai donc aidé le premier auteur de l'article, Philippe Collin, à effectuer des expériences complémentaires et des contrôles visant à solidifier l'affirmation que l'état Cin est médié via un élément de type « prion de levure ». J'ai effectué notamment des expériences de génétique pour déterminer la dominance de l'état Cin dans des cellules diploïdes (Tableau IV) et pour examiner la transmission méiotique du phénomène (Tableau V et Figure 12), ainsi que des contrôles cruciaux pour l'expérience de transmission du phénomène Cin via des extraits de levure dépourvus d'acides nucléiques (Figure 11).

A non-chromosomal factor allows viability of
S. pombe lacking the essential chaperone calnexin

**Philippe Collin, Pascale B. Beauregard, Aram Elagöz,
and Luis A. Rokeach¹**

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 Title: Fission yeast lives without an essential chaperone

2.2 Summary

Calnexin is a molecular chaperone playing key roles in protein folding and its quality control in the endoplasmic reticulum. We, and others, have previously demonstrated that *cnx1*⁺, the gene encoding the calnexin homologue in *Schizosaccharomyces pombe*, is essential for viability. Here we show that a particular *cnx1* mutant induces a novel mechanism allowing the survival of *S. pombe* cells in the absence of calnexin/Cnx1p. Calnexin-independence is dominant in diploid cells and is inherited in a non-Mendelian manner. Remarkably, this survival pathway bypassing calnexin essentiality can be transmitted by transformation of cell extracts into a wild type naive strain, thus implicating a non-chromosomal factor. Nuclease and UV treatments of cells extracts did not obliterate transmission of calnexin independence by transformation. On the other hand, protease digestion of extracts did reduce the appearance of calnexin-independent cells, hence indicating that a protein element is required for calnexin-less viability. We discuss a model in which this calnexin-less survival mechanism would be activated and perpetuated by a protein component acting as a genetic element.

2.3 Introduction

Proper folding of proteins and its quality control are basic and essential cellular processes. While a number of proteins can acquire their final structures *in vitro*, a battery of molecular chaperones and foldases assist the *in vivo* folding of proteins, bringing both the efficiency and the yield of this cellular process to levels compatible with life (reviewed in (Fink and Goto, 1998; Leitzgen and Haas, 1998; Ellis and Hartl, 1999; Bukau et al., 2000; Fewell et al., 2001; Frydman, 2001). Inherited alterations in protein folding and/or assembly in the endoplasmic reticulum (ER) constitute the molecular basis for several genetic diseases such as cystic fibrosis, juvenile emphysema, familial hypercholesterolemia, and certain coagulation disorders (Kuznetsov and Nigam, 1998). On the other hand, incorrect folding can be infectious, as is the case of prion-mediated diseases such as sheep scrapie, bovine spongiform encephalopathy (BSE; mad cow disease), and Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) in humans (reviewed in (Prusiner, 1998). Indeed, in these diseases prion propagation is the result of the structural conversion of a native cellular protein that is mainly α -helical into its prionic conformer, which is rich in β structure (reviewed in (Prusiner, 1998). This structural conversion is mediated by the infecting or already existing prionic conformer; therefore prions impose their structure on their native conformers. In fungi, the mechanism of propagation of prions by structural replication constitutes the basis of protein-only inheritance genetics, without involving changes in the nucleic-acid encoded information (Serio and Lindquist, 1999; Wickner et al., 1999a; Wickner et al., 1999b; Serio and Lindquist, 2000; Uptain and Lindquist, 2002; Ter-Avanesyan and Kushnirov, 1999; Chernoff et al., 2002).

Calnexin is a molecular chaperone of the endoplasmic reticulum (ER) playing key roles in the folding and quality control of numerous secreted and membrane-bound proteins (Williams, 1995; Parodi, 2000; Helenius A. and Aebi, 2001; Fewell et al., 2001; Yen et al., 2003). To explore the functions exerted by calnexin *in vivo*, we have established a genetic system in the fission yeast *S. pombe*. We, and others, have demonstrated that the gene

encoding calnexin (*cnx1*⁺) in *S. pombe* is essential for cell viability (Jannatipour and Rokeach, 1995; Parlati et al., 1995). Calnexin molecules contain a highly conserved central domain (hcd) that has been described as being involved in Ca²⁺ binding, and as being required for interaction of calnexin with folding substrates and potentially with other chaperones (Vassilakos et al., 1998; Schrag et al., 2001). In a previous study we determined that, in spite of its conservation and encoded functions, the central domain of calnexin/Cnx1p is dispensable for viability, and that the minimal sequences required for viability could be reduced to the last 123 a.a. at the C-terminus (Elagöz et al., 1999).

In this paper, we show that a particular *cnx1* mutant, deleted of the calnexin's highly conserved domain (*Δhcd_cnx1*), triggers an unprecedented phenomenon by which cells adapt to live without the essential chaperone calnexin (Cnx1p). We demonstrate that this phenomenon can be transmitted to naive *cnx1*⁺ cells by transformation, and we present evidence indicating that this survival mechanism involves a non-chromosomal genetic component, exhibiting some protein-like features.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Strains and media

The *S. pombe* strains are described in Tables II and III. Mutant Δhcd_cnx1 was previously designated deleted_cnx1 (Elagöz et al., 1999), its name was changed in order to prevent confusions with $\Delta cnx1$. DNA transformations into *S. pombe* cells were performed by the PEG-lithium acetate procedure as previously described (Elbe, 1992). Unless otherwise indicated, *S. pombe* strains were grown at 30°C in minimal medium (EMM, here designated MM) supplemented with nutrient requirements (Moreno et al., 1991).

2.4.2 Plasmids and nucleic acid manipulation

pREP41 is an *S. pombe* expression multicopy vector bearing the *S. cerevisiae* LEU2 marker and the *ars1* origin of replication (Maundrell, 1993). pREP42 differs from pREP41 in that it contains the *S. pombe ura4⁺* marker instead of *LEU2*. Expression of cloned sequences in these plasmids is under control of thiamine repressible *nmt41* promoter (Maundrell, 1993). PCR products were cloned using the pCR XL TOPO™ vector according to manufacturer's conditions (Invitrogen). Nucleic acid manipulation and analysis were done as previously described (Sambrook et al., 1989).

2.4.3 Polymerase chain reaction

PCR amplifications were carried out using Taq polymerase using manufacturer's conditions (Pharmacia Biotech), and 100 ng of *S. pombe* total DNA of the strains used in this study. Primers used for the amplification of the *his3⁺* gene integrated in the genome at the *cnx1* locus were; (1) 5'-CAACTTACCAGATAGGTCTTTC-3' and (2) 5'-GGCTTTTAACAGAGTCGCTAC-3'; for the amplification of the *nmt1* promoter and the

cloning cassette of the expression vectors pREP41 and pREP42; (3) 5'-CGGCAATGTGCAGCGAAAC-3' and (4) 5'-TATCTCATCTAAACCAC-3' and finally for the amplification of *cnx1* or the Δhcd_cnx1 mutant construct; (5) 5'-CCACCCAACACGTGCATATGAAGTACGGAAAG-3' and (6) 5'-CGGGATCCGGCTTTTAAACAGAGTCGCTAC-3'. Amplifications with the pair of primers 1/2 and 5/6 were carried out as follows: 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 2 min 30 sec. Amplifications with the primers 3/4 and 3/2 were carried out as follows: 94°C for 30 sec, 48°C for 30 sec, 72°C for 1 min 50 sec.

2.4.4 Southern and Northern blot analysis

Genomic DNA extractions and DNA-DNA hybridisation were carried out as previously described (Moreno et al., 1991; Sambrook et al., 1989). Two probes were used in for Southern blotting. The first was specific to the 400 bp 3' region of *cnx1* comprised between the *Cla*I and *Bam*HI, and it was obtained by digestion of pSPCA3261 (Elagöz et al., 1999). The second one was the linearised pREP41 vector. RNA preparation and Northern blotting was carried out as described previously (Jannatipour and Rokeach, 1995), using a ³²P-labelled DNA probe encompassing the entire *cnx1*⁺-coding region.

2.4.5 Plasmid segregation experiments

S. pombe strains bearing one or two plasmids were grown for 6 days at 30°C in 5 ml liquid MM supplemented with adenine (Ade), uracil (Ura) and leucine (Leu) to chase the containing pREP42-based (*ura4*⁺ marker) and/or pREP41-based (LEU2 marker) plasmid(s). Cells were plated onto MM+Ade+Ura+Leu, MM+Ade+Ura, MM+Ade and MM+Ade+Leu. Phenotypes of the cells for uracil and/or leucine auxotrophy were then analysed after 2-3 days of growth at 30°C, and statistical values for plasmid loss were calculated.

2.4.6 Cell-extract preparation and transformation

Protein extracts for immunoblotting were prepared as previously described (Jannatipour et al., 1998). Lysates for transformation were made using spheroplasts prepared as described previously (Elagöz et al., 1999). Briefly, lysates were prepared by resuspending the cells in 2 ml lysis buffer (0.1 M sorbitol, 20 mM HEPES, 50 mM potassium acetate, pH 7.4) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF, 10 mM iodoacetamide, 300 µg/ml pepstatin A, 300 µg/ml leupeptin, 300mg/ml phenantroline) and homogenising in a Potter-Elvehjem homogeniser 25 times. Clumps of unbroken cells were discarded by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C. The cleared lysate was then centrifuged at 15000 rpm, and the supernatant was designated as the soluble fraction. The pellet was resuspended in lysis buffer and was designated as the insoluble fraction. In order to destroy nucleic acid present in the extracts, both the pellets and supernatants were digested with DNaseI (10 µg/ml) and RNaseA (10 µg/ml), at 37°C for 3 hours. Following this, the samples were UV-irradiated at 360 mJ/cm², which was three times the radiation dosage necessary to inactivate 500 ng of plasmid DNA or 10⁸ pfu of bacteriophages λ or M13. To ensure that this treatment did efficiently destroy the nucleic acid present in the extracts, controls were done by including 500 ng of plasmid DNA in control samples, subjected to the same treatment, and transforming into *E. coli* strain DH5α, which yielded no transformants. Likewise, 10⁸ pfu of λ or M13 were included in control samples that were subjected to the same treatments before infection of *E. coli* strain XL-1 Blue (Stratagene), producing no plaques. Moreover, to ascertain that no *S. pombe* cells survived the preparation of lysates, treated and untreated cell extracts were plated on appropriate media.

S. pombe transformation with protein extracts was carried out using two methods: a variation of the PEG/LiAc protocol (Elbe, 1992) and a liposomal method (DOTAP, N-[1-2(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate); according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals #1811177). Soluble and

insoluble protein fractions were individually transformed into SP3220 ($\Delta cnx1::his3 + pREP42cnx1^+$) cells. Briefly, for LiAc-PEG technique, 1ml of mid-log SP3220 cells were pelleted, 5 or 15 μg of proteins were added and mixed by gentle vortexing. A 500 μl volume of sterile PLATE medium (40.5% PEG 3350, 100 mM lithium acetate, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) was added and cells were incubated at room temperature for 24-48 hours. Cells were then washed in MM+Ade+Ura+Leu three times and diluted in the same medium containing 2% glucose for plasmid segregation assay. For transformation with the DOTAP liposomal reagent, SP3220 cells (1×10^6 cells) were spheroplasted, as described above, resuspended in fresh MM+Ade+Ura+Leu, transformed with 100 μl of mixture containing DOTAP reagent and 5 or 15 μg of proteins, followed by incubation for 16 hours. The DOTAP-proteins mixture was obtained by incubating at room temperature for 20 minutes the proteins with 30 μg DOTAP reagent in a 100 μl final volume of HBS buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Finally cells were washed and resuspended in fresh MM+Ade+Ura+Leu and plasmid segregation assay was then carried out. For proteinase K digestions, the protein extracts were prepared as described above but using buffer A (25 mM tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5% glycerol) as described in ref. (Paushkin et al., 1997). Digestions with proteinase K were carried out for 2 hours at 37°C at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final enzyme concentration. Both the soluble and the pellet fractions produced Cin cells, with either transformation protocol. Since both the soluble and pellet fractions of Cin cell extracts transmitted the Cin state, transformations were carried out with unfractionated lysates.

2.4.7 Calcofluor staining of the cell wall and confocal microscopy

Calcofluor-white staining was carried out as described previously (Elagöz et al., 1999). Indirect confocal immunofluorescence was carried out using standard formaldehyde fixation essentially as described in: <http://www.bio.uva.nl/pombe/handbook/section4/section4-2.html>. Primary antibody was

used at a dilution of 1:50 for anti-BiP, or 1:100 for anti-Cnx1p. Secondary antibody FITC-conjugated anti-rabbit IgG at a 1:50 dilution was incubated overnight.

2.5 Results

2.5.1 *S. pombe* cells can become independent of the essential chaperone calnexin/Cnx1p

To explore the functions encoded by calnexin, *cnx1* deletion mutants (see Table IIIA) were assessed using a plasmid segregation assay. Briefly, the experiment consisted in evaluating the functionality of mutants by determining the frequency at which an *S. pombe* strain, disrupted for genomic *cnx1*⁺ ($\Delta cnx1::his3 = cnx1\Delta$), retained the episomal copies of mutant *cnx1* (pREP41 vector, *LEU2* marker) as compared to *cnx1*⁺ on an *ura4*⁺ vector (pREP42). After six days of liquid culture without selective pressure, cells were scored on selective plates for the presence of either the WT or mutant *cnx1* plasmids (for the sake of simplicity, these constructs are denoted here as *pcnx1*).

As shown on Table III, while strains *cnx1\Delta* + *pcnx1*⁺, *cnx1\Delta* + *pmini_cnx1* and *cnx1\Delta* + *plumenal_cnx1* never gave rise to plasmid-free cells, the mutant *cnx1\Delta* + *p\Deltahcd_cnx1* by itself or in the presence of either *cnx1*⁺ (wild type) or other *cnx1* mutant constructs consistently gave rise to a population of Leu⁻/Ura⁻ cells. We deduced that the simplest explanations for the appearance of viable Leu⁻/Ura⁻ cells were: *i*) integration of the *p\Deltahcd_cnx1* sequences into the genome; or *ii*) mutations in the vector's *LEU2* selection marker and maintenance of the episomal constructs because of the essentiality of *cnx1*⁺. In this regard, however, the frequency of appearance of Leu⁻/Ura⁻ cells (87 %) was several orders of magnitude higher than the expected rates for illegitimate genomic integration or for spontaneous mutations, which in both cases is estimated to be of about 10⁻⁶ (Chua et al., 2000; Zeyl and DeVisser, 2001). While it could be argued that the high frequency of Leu⁻/Ura⁻ clones could be due to some selective growth advantage, this seems however unlikely since these cells grow more slowly than *cnx1\Delta* + *pcnx1* strains under the same culture conditions (see Fig. 9).

Because calnexin/Cnx1p is essential for *S. pombe* viability, it seemed highly unlikely at that time that these Leu⁻/Ura⁻ cells had lost the *cnx1* genes along with the markers/plasmids. Nevertheless, we considered it of importance to ascertain that *cnx1* sequences were present in these marker-less cells. To this effect, we performed PCR, Southern, Northern, and Western analyses as summarised in Figure 8. In the PCR experiments we used different combinations of primers in order to differentiate the amplification of genomic from plasmid DNA. The primer pair 3/4 was specific for the *nmt1* promoter and terminator sequences that are respectively found upstream and downstream of the multicloning sites of both the pREP41 and pREP42 vectors (Fig. 8B). Therefore, PCR reactions using this pair of primers allowed the amplification of any sequence cloned within the multicloning site of these vectors, in our case the *cnx1*⁺ or any of the *cnx1* mutants, as well as the *nmt1* genomic sequences. As shown in Figure 8A (lane 1) for one representative of the Leu⁻/Ura⁻ clones analysed, PCR using the pair of primers 3/4 did not produce any amplification band, except for the one corresponding to the intrinsic *nmt1* genomic sequences (approximately 1.2 kb). In contrast, the strains *cnx1*Δ + pΔ*hcd_cnx1* (SP3222; Fig. 8A, lane 3), SP556 harbouring the pREP41 empty vector (Fig. 8A, lane 2), or the purified pREP41*cnx1*⁺ plasmid DNA produced the expected PCR amplifications (Fig. 8A, lane 4). Thus, according to these PCR results, the Leu⁻/Ura⁻ clones did not contain *cnx1* or other DNA sequences under the control of the *nmt1* promoter, either as plasmid-borne or integrated in the *S. pombe* genome. Furthermore, the absence of *cnx1* under the control of the *nmt1* promoter was assessed by PCR-amplification using the primers 3/2 that hybridise respectively to the *nmt1* promoter and the 3' untranslated region of *cnx1*, which are present in all the pREP41*cnx1* constructs used in this study (see Fig. 8 A and B).

In addition, the Leu⁻/Ura⁻ clones were scrutinised for the presence of *cnx1* coding sequences by using PCR and Southern blot analyses. To this aim, PCR analyses were carried out with the pair of primers 5/6 that was designed to amplify the Cnx1p coding

region (see Fig. 8B). As shown in Figure 8C, this pair amplified the corresponding bands in DNA extracted from the control strains (lanes 6-8 and 10), but no amplification band could be detected with the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ strain (lane 9). As a positive control for this experiment, PCR was carried out with the pair of primers 1/2 that amplifies the $his3^+$ marker disrupting the *cnx1* gene in the strains $cnx1\Delta + pcnx1^+$ (SP3220), $cnx1\Delta + p\Delta hcd_cnx1$ (SP3222), and the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clone (Fig. 8C, lanes 2, 3 and 4, respectively), or *cnx1* coding sequences in the strain SP556 (Fig. 8C, lane 1). Finally, Southern blot analysis revealed that, as opposed to the control strains (Fig. 8D, lanes 1 and 3), no band corresponding to *cnx1* sequences was detectable in the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones (Fig. 8D, lanes 2).

Next it was of interest to investigate whether the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones were viable because of the possible random integration of *cnx1* sequences into the genome and their expression under the control of a spurious promoter. No *cnx1* transcript could be detected by Northern blot analysis of the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones (see Fig. 8F, lane 4). Likewise, while BiP was readily observed with anti-BiP antibodies, no Cnx1p was detectable in protein extracts from $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones by immunoblot analysis using anti-Cnx1p polyclonal antibodies (see Fig. 8G, lane 4), whereas the mutant protein Δhcd_Cnx1p in extracts of the corresponding strain was distinctly detected (Fig. 8G, lane 3). Here it is important to stress that the anti-Cnx1p serum used recognises epitopes throughout the entire molecule (Elagöz et al., 1999), thus it would have been possible to detect fragments of calnexin/Cnx1p even smaller to the size of Δhcd_Cnx1p .

Therefore, in conclusion, the *S. pombe* $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones described above do not contain *cnx1* sequences in the genome and have lost the *pcnx1* episome(s), nevertheless they are viable. Thus these have become calnexin-independent through a mechanism triggered by mutant Δhcd_cnx1 . One of these clones is hereafter designated as the Cin strain, for calnexin independent (SP7188; see Table II).

2.5.2 The Cin state is maintained in the presence of the *cnxI*⁺ allele on a plasmid

As described in Table III (rows 3, 7, and 11), the appearance of *S. pombe* Cin cells was only observed with the mutant *cnxI* Δ + p Δ *hcd_cnxI* (SP3222). Interestingly, this phenomenon took place even in the presence of *cnxI*⁺, as it was possible to lose the WT construct, but only when construct p Δ *hcd_cnxI* was present in the cell (Table III, row 3). In order to verify whether the phenomenon of calnexin independence (Cin) once initiated could be reversed by the re-introduction of the *cnxI*⁺ allele, the Cin strain was transformed with pREP41*cnxI*⁺ to generate strain SP7202, and the plasmid segregation assay was repeated. Results from these experiments clearly showed that the *cnxI*⁺ plasmid was lost, giving rise again to a population of Cin cells at a frequency of about 70% (Table III, row 13). Thus the Cin state is not reversible under these conditions.

2.5.3 Cin cells display reduced tolerance to temperature and altered morphology

Since calnexin/Cnx1p was shown to be essential for *S. pombe* viability, it was of interest to examine whether the lack of the calnexin/Cnx1p chaperone affected the ability of Cin cells to cope with environmental stress conditions. As depicted in Figure 9, when compared to the wild-type strain SP3220 (*cnxI* Δ + p*cnxI*⁺), the growth rates of Cin cells was slightly reduced at 30°C (Fig. 9A and C) and considerably slower at 37°C (Fig. 9B and C), thus reflecting a reduction in the cell's capacity to withstand thermal stress. Interestingly, the Cin strain containing the p*cnxI*⁺ plasmid (SP7202) presented an intermediate phenotype (Fig. 9B and C), suggesting that the reduced thermal resistance of Cin cells is not exclusively due to the lack of calnexin/Cnx1p.

Morphological observations using Nomarski-interference microscopy revealed that like certain previously characterised *cnx1* mutants (Elagöz et al., 1999), the Cin cells exhibited at 30°C a rounder shape than *cnx1*⁺ (Fig. 10A), and this altered morphology was more evident when these cells were grown at 37°C (Fig. 10B). Due to the lack of calnexin/Cnx1p it could be expected that Cin cells would exhibit altered ER morphology. However, confocal-microscopy analysis with anti-BiP antibodies to stain the ER revealed no distinguishable changes in Cin cells as compared to the calnexin-dependent *cnx1*⁺ cells (Fig. 10C).

2.5.4 The Cin state is dominant and transmitted to the meiotic progeny

The results described above showed that the Cin state in haploid cells is maintained even upon re-introduction of the *cnx1*⁺ allele on a plasmid. Next we wondered whether the calnexin-independence state could be reversed in a diploid where any possible mutation in the original Cin strain should be complemented, if recessive, by the genome of the partner “naive” strain. Accordingly, the original Cin strain was mated with an isogenic strain to create a diploid Cin/*cnx1*Δ + *pcnx1*⁺ (strain SP7571). As controls, we constructed a diploid *cnx1*⁺/*cnx1*Δ + *pcnx1*⁺ (strain SP9450) that should lose the *cnx1*⁺ episome at high frequency because of the presence of genomic *cnx1*⁺, and a diploid *cnx1*Δ + *pcnx1*⁺/*cnx1*Δ + *pcnx1*⁺ (strain SP8394), which should not produce calnexin-less mitotic progeny because calnexin is essential, under normal conditions. As shown in Table IV, positive and negative controls produced the expected results, while plasmid segregation experiments with the Cin/*cnx1*Δ + *pcnx1*⁺ strain (SP7571) revealed that calnexin independence is maintained in diploid cells. Therefore, the Cin state is dominant.

To assess whether the Cin trait is transmitted to the meiotic progeny random spore analysis (RSA) was performed. The diploid strain SP7571 described above was constructed by selecting for adenine prototrophy using the complementing chromosomal alleles *ade6-210* and *ade6-216*. Since in haploid cells *ade6-210* and *ade6-216* produce

dark pink and light pink colonies, respectively, we used these colour phenotypes as indication of segregation for a chromosomal marker. As expected, these alleles were found at a frequency of approximately 50% each among the germinated spores (not shown). Then, to assess the inheritance ratio of Cin with respect to a chromosomal marker we scored approximately 250 of each, dark pink and light pink colonies, for the presence of the *pcnx1*⁺ episome (Leu⁺). As shown in Table V, 88.7% of the germinated spores tested were Cin, revealing that calnexin independence segregated to the meiotic progeny at ratios different from the expected 2:2 for a chromosomal marker (such as the *ade6* alleles). Furthermore, we assessed the inheritance of the Cin trait among the germinated spores that kept the *pcnx1*⁺ episome by culturing 18 of these haploid strains in non-selective liquid medium. In this case, 50% of these strains were in fact Cin (see Table V). Thus these experiments established that the Cin state is dominant in diploid cells and transmitted to the meiotic progeny in an aberrant manner, compared to a chromosomal genetic trait. The non-Mendelian inheritance of the Cin state is further analysed below (see also Fig 12).

2.5.5 The Cin state can be transmitted by transformation and requires a proteinaceous factor

The appearance of Cin cells raised the question of what mechanism could render the essential chaperone calnexin dispensable for viability in *S. pombe*. From the various features described thus far for the Cin strain it is possible to highlight the following key points: *i*) due to the high frequency at which occurs the Cin phenomenon it is unlikely to be the result of mutations, rearrangements in the *S. pombe* genome, or the selection of a particular population; *ii*) the phenomenon leading to the loss of episomal copies of *cnx1*⁺ is maintained after reintroduction of the *cnx1*⁺ allele; *iii*) calnexin independence is dominant in a diploid strain; and *iv*) the Cin state is transmitted to the meiotic progeny in an aberrant ratio. Taken together, these features suggest that the Cin state behaves as a dominant non-chromosomal genetic trait. Hence, we hypothesised that the Cin state could be encoded by

a non-chromosomal genetic determinant such as a cryptic plasmid, or a virus, or a prion-like element (see (Wickner, 1996; Wickner et al., 1999a; Sparrer et al., 2000; Maddelein et al., 2002)). As such, we assumed that such determinant of calnexin independence could be transformable.

To test these hypotheses, we performed an experiment that consisted in preparing cell extracts depleted or not of nucleic acids from the Cin strain (SP7188) not containing the *pcnxI*⁺ plasmid, transforming them into the WT strain *cnx1Δ* + *pcnxI*⁺ (SP3220), and subsequently assessing whether it was possible to obtain Cin cells in this manner. To deplete nucleic acids, the cell extracts were extensively treated with DNaseI, RNaseA and UV-irradiated to degrade DNA and RNA in the lysates. In order to verify that these conditions effectively destroy nucleic acids, exogenous pREP42*cnxI*⁺ plasmid DNA was added to the lysates and the samples subjected the treatments, followed by transformation into *S. pombe* strain SP3220. While untreated control samples yielded approximately 1,500 c.f.u./μg, the DNaseI, RNaseA and UV-irradiated samples produced no colonies. To further ascertain that the conditions used did proficiently degrade plasmid or viral nucleic acid, control experiments were performed with exogenously added plasmid DNA, as well as with the λ or m13 bacteriophages (see Materials and Methods). In these controls, the extracts treated with DNaseI, RNaseA and UV-irradiated containing the added control plasmid did not yield ampicillin-resistant colonies by transformation into *E. coli*. The latter organism was used in these tests because it is several orders of magnitude more efficient in transformation than *S. pombe* (~10⁸ vs. ~10³ c.f.u./μg, respectively). Likewise, the added bacteriophages did not produce plaques by infection of a sensitive *E. coli* strain. Furthermore, the absence of *S. pombe* genomic DNA in the treated extracts was confirmed by PCR analysis using primers designed to amplify the genes encoding BiP, Pdi1 and Ppi1 (data not shown). To transform the extracts, we used the Li⁺/PEG procedure and a spheroplast transformation technique mediated by liposomes (see Materials and Methods). Considering the possibility that a protein could encode the Cin state, purified GFP in fluorescence microscopy was used to confirm that protein transformation into *S. pombe*

cells is indeed feasible using either technique. Fluorescence-microscopy analysis revealed that GFP was efficiently transformed with both methods (data not shown). Transformation of untreated extracts from the Cin strain into strain *cnx1Δ* + *pcnx1*⁺ (SP3220) resulted in the appearance of Cin cells at about 1.3% of the colonies tested (about 2,000) with either transformation method (not shown). Likewise, the DNaseI, RNaseA and UV-irradiated extracts from the Cin strain consistently provoked the loss of episomal *cnx1*⁺ after transformation and resulted in the highly efficient appearance of cells lacking the *cnx1*⁺ plasmid, with either transformation method (Fig. 11). In contrast, extracts prepared from the WT strain (*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺; SP3220) did not induce in any case the loss of episomal *cnx1*⁺ in the transformed strain. Furthermore, the plating on of treated and untreated lysates ascertained that the clones lacking the *pcnx1*⁺ were actual transformants and not survivor cells that were not lysed during preparation of the extracts.

Two independent clones devoid of the *cnx1*⁺ episome, obtained with each transformation method, were further characterised to confirm their Cin state. Retransformation of the *pcnx1*⁺ plasmid followed by the plasmid segregation assay in non-selective, liquid medium, showed comparable frequencies of episomal-*cnx1*⁺ loss (~70%) to the Cin + *pcnx1*⁺ (SP7202) strain described earlier. Furthermore, PCR and Western blot analyses ascertained, at the molecular level, that the clones obtained by transformation of nuclease- and UV-treated cell-extracts did not contain calnexin (data not shown).

That calnexin independence was transmissible by transformation indicated that an extrachromosomal genetic element is implicated in the inheritance of the Cin state. In addition, because the DNase, RNase and UV treatments used did not reduce the transmission of the Cin state as compared to untreated lysates, it would be unlikely that Cin state could be encoded by nucleic acid, be it naked or encapsidated as certain yeast viruses. Rather, these observations suggested that a protein could be involved in the transmission of the Cin state by transformation. To further investigate this point, the cell extracts were further treated with proteinase K. This experiment showed that transmission of the Cin state was significantly reduced by proteinase K digestion, however not abolished (see Fig.

11), thus indicating the implication of a protein, partially resistant to protease digestion, in the transmission of the Cin state. Interestingly, calnexin independence was efficiently transmitted by both soluble and insoluble fractions of extracts from Cin cells, suggesting that the extrachromosomal factor allowing viability in the absence of calnexin/Cnx1p may exist in at least two molecular states, one being of higher-order complexity than the other.

2.5.6 The Cin state is maintained in a *cnxI*⁺ genomic background and transmitted in a non-Mendelian manner

To assess whether the trait allowing calnexin-independence was stably maintained in a background with an intact *cnxI*⁺ genomic copy, the *cnxI*⁺/Cin diploid SP7501 (SP247/SP7188; see Table II) was sporulated and the meiotic progeny analysed. It should be noted that this diploid does not contain a *cnxI*⁺ plasmid, and that deletion of the *cnxI* genomic copy in the SP7188 haploid is marked with *his3*⁺. Analysis of four tetrads revealed that the *his3*⁺ marker (i.e. *cnxI*::*his3* = *cnxI*Δ) was inherited in 2:2 ratio, as expected for a chromosomal marker (see Fig. 12A). Western blotting with anti-Cnx1p antibodies confirmed that the *his3*⁺ germinated spores were viable in the absence of calnexin (Fig. 12B). To determine whether the trait encoding calnexin independence was present in the *cnxI*⁺ progeny, extracts from the *his*⁻ germinated spores were transformed into the *cnxI*Δ + *pcnxI*⁺ strain (SP3220; Table II), and their capacity to generate Cin cells was examined by the plasmid-segregation assay and absence of calnexin/Cnx1p was verified by Western blotting. All *cnxI*⁺/*his*⁻ extracts produced Cin cells, showing that calnexin independence is encoded by a non-Mendelian, dominant genetic element that is stably maintained in the *cnxI*⁺-genomic background. Hereafter, this putative non-chromosomal genetic determinant is designated as [*cif*], for calnexin-independence factor. Moreover, these observations show that [*cif*] is maintained in the *cnxI*⁺ background, and does not require the initial presence of the *pcnxI*⁺ plasmid.

2.5.7 The appearance of Cin cells mediated by the Δhcd_cnx1 mutant requires the cytosolic tail of Δhcd_Cnx1p

As described above and in Table III, the appearance of Cin cells takes place only in the presence of the $p\Delta hcd_cnx1$ construct, which is deleted of the segment encoding the calnexin's highly conserved central region (hcd). In contrast, mutant $mini_cnx1$, which in addition lacks the region encoding the *N*-terminal domain of calnexin/Cnx1p, does not elicit the loss of episomal $cnx1^+$. Therefore, it was of interest to test whether it was possible to complement the inability of $mini_Cnx1p$ to induce the appearance of Cin cells by providing in trans *N*-terminal_Cnx1p. As it is possible to see on Table III (row 15), the simultaneous presence of mutants $mini_Cnx1p$ and *N*-terminal_Cnx1p in the same cell did not result in $pcnx1^+$ loss. Therefore, induction of the mechanism leading to calnexin independence requires that the *N*-terminal and *C*-terminal parts of calnexin/Cnx1p be associated covalently. To test whether the cytosolic tail of Δhcd_Cnx1p was required for the appearance of calnexin-less cells by Δhcd_cnx1 , a mutant designated $s\Delta hcd_cnx1$ was constructed, in which the regions coding for the Cnx1p's transmembrane domain and cytosolic tail were deleted from Δhcd_cnx1 . The mutant $s\Delta hcd_cnx1$ failed to produce Cin cells in the plasmid segregation assay (Table III, row 14). Therefore, these observations suggest that the transmembrane domain and the cytosolic tail of calnexin/Cnx1p could be involved in the appearance of Cin cells mediated by the Δhcd_cnx1 mutant.

2.6 Discussion

In this paper we report the unprecedented phenomenon by which a gene essential for *S. pombe* viability becomes dispensable. Here, we show that *S. pombe* cells are able to live in the absence of the essential molecular chaperone calnexin/Cnx1p. Remarkably, this survival mechanism is triggered by the Δhcd_cnx1 mutant, which lacks the region encoding the calnexin's highly conserved domain (hcd), whether when alone in the cell or in the presence of wild type or other *cnx1* mutants. Indeed, calnexin independence is dominant both in haploid and diploid cells, and is inherited in a non-Mendelian manner. Furthermore, calnexin independence can be transmitted by transformation with cell extracts from Cin cells into naive wild type cells, which are calnexin-dependent. This indicates that a non-chromosomal genetic element is implicated in the transmission of Cin state, and thus also explains its non-Mendelian inheritance. We designated [*cif*] this putative non-chromosomal element, for calnexin-independence factor. That calnexin independence was efficiently transmitted by both soluble and insoluble fractions of cell extracts suggests that this factor may exist in at least two molecular states, one being of higher-order complexity than the other.

Since treatments with nuclease and UV that efficiently destroy nucleic acids did not obliterate the transmissibility of the Cin state by transformation, it appears improbable that a plasmid or a virus could be the genetic factor encoding calnexin independence. On the other hand, the reduction of transmissibility of calnexin-independence by protease treatment of the Cin cell extracts suggests the involvement of a protein in the inheritance of the Cin state. Therefore, we propose that a protein is at least an important component of [*cif*], the putative non-chromosomal element carrying the genetic information to transmit the Cin state. As mentioned above, in fungi prions are proteins that act as genetic elements, capable of propagating themselves perpetuating the phenotypes they encode, and able to infect by transformation (Serio and Lindquist, 1999; Wickner et al., 1999a; Wickner et al.,

1999b; Serio and Lindquist, 2000; Sparrer et al., 2000; Uptain and Lindquist, 2002; Ter-Avanesyan and Kushnirov, 1999; Maddelein et al., 2002; Chernoff et al., 2002).

Remarkably, the factor encoding the Cin state does exhibit some of the features of yeast prions such as dominance in diploid cells, non-Mendelian inheritance, partial sensitivity/resistance to proteases, and infectivity by transformation. Whether the factor encoding calnexin independence is actually a prion or not awaits its identification and characterization. We here propose two models based on the proteinaceous, non-Mendelian, and metastable features of [*cif*].

2.6.1 Two models for the appearance and survival of Cin cells

Both models are based on the notion that the conversion of *S. pombe* cells, which are normally calnexin dependent, into calnexin-independent cells (Cin) implies the existence of an inducible pathway replacing the essential function of calnexin/Cnx1p. The second premise is that once suppression of calnexin's essentiality is induced in Cin cells, this state is dominant and maintained through generations, therefore implying an inheritance mechanism.

The first and simpler model comprises a single gene designated *cif1*, for calnexin-independence factor encoding the protein Cif1p of unknown function, which can convert under special conditions (see below) into the [*cif*] conformer. The structural conversion into the [*cif*] conformer would entail the gain by this molecule of a function replacing calnexin's vital role, thereby allowing calnexin/Cnx1p to become dispensable for viability and give rise to Cin cells. Importantly, the [*cif*] conformer would be able to propagate by "structural replication" to other Cif1p molecules present in the cell, and thus being inherited through generations, acting then as a proteinaceous extrachromosomal factor able to transmit the Cin state.

Alternatively, one could envisage a second model comprising two key elements (see Fig. 13): 1) a suppressor gene for calnexin/Cnx1p essentiality (*scx1*, for suppressor of cnx1); and 2) a regulatory, proteinaceous, non-chromosomal genetic factor [*cif*], encoded by the *cif1* gene as described above. In calnexin-dependent cells, the protein encoded by *cif1* would normally exist in a conformational state, designated Cif1p, that would negatively act on the function of *scx1*. However, under particular conditions to be discussed below, this protein could convert into the alternative conformer [*cif*], which would be unable to negatively act on *scx1*. According to this model, in calnexin-dependent cells WT calnexin/Cnx1p exerts its essential function by acting on its essential target “?”, while *scx1* action on “?” is blocked by Cif1p. However, the presence of Δ hcd_Cnx1p in the cell would induce directly or indirectly the structural change of Cif1p into the [*cif*] conformer. As above, the [*cif*] conformer would then propagate by “structural replication” to other Cif1p molecules present in the cell, entailing the functional depletion of the Cif1p activity. As a result this would constitutively activate *scx1*, thereby allowing calnexin/Cnx1p to become dispensable for viability and give rise to Cin cells.

In any case, the [*cif*]-*scx1* pathway may be normally a functional back-up to Cnx1p/calnexin that could be reversibly turned-on under certain conditions, such as during protein-folding stress. Under these folding-stress conditions *scx1* activity would be likely to occur in a reversible and modulated fashion in the *cnx1*⁺ background. However in the case of mutant Δ hcd_Cnx1p, the activation of *scx1* would be prolonged. This might be because the 3D structure of the Δ hcd_Cnx1p mutant could mimic a long-lasting calnexin/Cnx1p-substrate interaction, as perhaps during folding stress, facilitating the conversion of Cif1p into [*cif*]. In this regard, it is interesting that the *mini_cnx1* and *N-terminal_cnx1* mutants alone or in concert do not trigger calnexin independence. So both portions of calnexin/Cnx1p have to be covalently attached for calnexin independence to occur. While the mechanism of induction remains to be elucidated, it is remarkable that the Δ hcd_Cnx1p mutant elicits the emergence of Cin cells at a very high frequency ($\sim 7 \times 10^{-1}$). For instance, while the spontaneous appearance of the yeast prions [*URE3*] and [*PSI*⁺] is of

about 10^{-6} – 10^{-5} , overexpression of these yeasts prion proteins or the presence of an unrelated prion in the cell can increase the emergence frequency up to ~6,000-fold (Chernoff et al., 1995; Wickner, 1994; Masison and Wickner, 1995; Derkatch et al., 1997; Crist et al., 2003; Osherovich and Weissman, 2001; Derkatch et al., 2001), which is about the level of Cin appearance. Titration of a common cellular inhibitor, like a chaperone, has been proposed as a possible mechanism for the induction of prion appearance mediated by an unrelated prion (Osherovich and Weissman, 2001; Derkatch et al., 2001). While Δhcd_Cnx1p is unlikely to be a prion, it is tempting to speculate that this non-functional chaperone (data not shown) could titrate a cellular factor and thereby mediate the emergence of the Cin state. We will use a combination of genetic and biochemical approaches in order to delineate the components of the *[cif]-scx1* pathway, and map their circuitry.

2.7 Acknowledgments

We wish to express our gratitude to Anne-Marie Sdicu and Dr. Howard Bussey (Dept. of Biology, McGill University, Montreal) for help with the dissection of tetrads. We thank Drs. John Armstrong, Pascal Chartrand, Jonathan Dinman, Gerardo Ferbeyre, Arthur Horwich, Reed B. Wickner, Sandra Wolin, and the members of the Rokeach's lab for the critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from The Medical Research Council of Canada (L.A.R.), and by bridging funds from the Department of Biochemistry, the Faculty of Medicine and the Université de Montréal.

2.8 References

- Bukau,B., Deuerling,E., Pfund,C., and Craig,E.A.** (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-122.
- Chernoff,Y.O., Derkatch,I.L., and Inge-Vechtonov,S.G.** (1995). Multicopy *SUP35* gene induces de-novo appearance of *psi*-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **24**, 268-270.
- Chernoff,Y.O., Uptain,S.M., and Lindquist,S.L.** (2002). Analysis of prion factors in yeast. *Meth. Enzymol.* **351**, 499-538.
- Chua,G., Taricani,L., Stangle,W., and Young,P.G.** (2000). Insertion mutagenesis based on illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E53.
- Crist,C.G., Nakayashiki,T., Kurahashi,H., and Nakamura,Y.** (2003). [*PHI*⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104. *Genes to Cells* **8**, 603-618.
- Derkatch,I.L., Bradley,M.E., Hong,J.Y., and Liebman,S.W.** (2001). Prions affect the appearance of other prions: The story of [*PIN*⁺]. *Cell* **106**, 182.
- Derkatch,I.L., Bradley,M.E., Zhou,P., Chernoff,Y.O., and Liebman,S.W.** (1997). Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the [*PSI*⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 507-519.
- Elagöz,A., Callejo,M., Armstrong,J., and Rokeach,L.A.** (1999). Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460.
- Elbe,R.** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-19.
- Ellis,R.J. and Hartl,F.U.** (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Cur. Opin. Struc. Biol.* **9**, 102-110.

- 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**, 149-191.
- Fink,A.L. and Goto,Y.** (1998). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function and Mode of Action.*, A.L.Fink and Y.Goto, eds. (New York: Marcel Dekker, Inc.).
- Frydman,J.** (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: The role of Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 603-647.
- Helenius A. and Aebi,M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- 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 *S. 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.
- Kuznetsov,G. and Nigam,S.K.** (1998). Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng. J. Med.* **339**, 1668-1695.
- Leitzgen,K. and Haas,I.G.** (1998). Protein maturation in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Mol. Biol.* **11**, 423-445.
- 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. USA* **99**, 7402-7407.
- Masison,D.C. and Wickner,R.B.** (1995). Prion-inducing domain of yeast Ure2 and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science* **270**, 93-95.
- Maudrell,K.** (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.
- Moreno,S., Klar,A., and Nurse,P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* **194**, 795-823.

- Osherovich,L.Z. and Weissman,J.S.** (2001). Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast $[PSI^+]$ prion. *Cell* **106**, 183-194.
- Parlati,F., Dignard,D., Bergeron,J.J.M., and Thomas,D.Y.** (1995). The calnexin homologue *cnxI⁺* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **14**, 3064-3072.
- Parodi,A.J.** (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69-93.
- Paushkin,S.V., Kushnirov,V.V., Smimov,V.N., and Ter-Avanesyan,M.D.** (1997). In vitro propagation of the prion-like state of yeast sup35 protein. *Science* **277**, 381-383.
- Prusiner,S.B.** (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schrag,J.D., Bergeron,J.J.M., 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**, 633-644.
- Serio,T.R. and Lindquist,S.L.** (1999). $[PSI^+]$: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 661-703.
- Serio,T.R. and Lindquist,S.L.** (2000). Protein-only inheritance in yeast: something to get $[PSI^+]$ -ched about. *Trends Cell Biol.* **10**, 98-105.
- Sparrer,H.E., Santoso,A., Szoka Jr.,F.C., and Weissman,J.S.** (2000). Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast $[PSI^+]$ factor by in vitro converted Sup35 protein. *Science* **289**, 595-599.
- Ter-Avanesyan,M.D. and Kushnirov,V.V.** (1999). Prions: Infectious proteins with genetic properties. *Biochemistry (Moscow)* **64**, 1382-1390.
- Uptain,S.M. and Lindquist,S.** (2002). Prions as protein-based genetic elements. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 703-741.

- Vassilakos,A., Michalak,M., Lehrman,M.A., and Williams,D.B.** (1998). Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480-3490.
- Wickner,R.B.** (1994). [URE3] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**, 566-569.
- Wickner,R.B.** (1996). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Genet.* **30**, 109-139.
- Wickner,R.B., Edskes,H.K., Maddelein,M.L., Taylor,K.L., and Moriyama,H.** (1999a). Prions of yeast and fungi. *J. Biol. Chem.* **274**, 555-558.
- Wickner,R.B., Taylor,K.L., Edskes,H.K., Maddelein,M.L., Moriyama,H., and Roberts,T.** (1999b). Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: Protein-based inheritance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 844-861.
- Williams,D.B.** (1995). The Merck Frosst award lecture 1994: Calnexin, a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 123-132.
- Yen,H.-S.C., Gordon,C., and ChangE.C.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras Homologs Regulate Cell Division and Mitotic Fidelity via the Proteasome. *Cell* **112**, 207-217.
- Zeyl,C. and DeVisser,J.A.G.M.** (2001). Estimates of the rate and distributions of fitness effects of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 53-61.

2.9 Legends

Table II. Strains used in this study. For the sake of simplicity, the presence of pREP41 or pREP42 constructs bearing *cnx1*⁺ or *cnx1* mutants are designated in the text as + *pcnx1*⁺ and + *pcnx1*, respectively. Mutant *Δhcd_cnx1* was previously designated *deleted_cnx1* (Elagöz et al., 1999); its name was changed in order to prevent confusions with *cnx1Δ*.

Table III. Mutants tested in plasmid segregation assays. A) Schematic representation of *cnx1* constructs tested. SP, denotes the signal peptide of Cnx1p; the shaded box, the highly conserved central domain; TM, the transmembrane domain; black boxes, potential sites of glycosylation by protein kinase C (PKC); ADEL, the ER-retention signal in *S. pombe*. B) Plasmid segregation assays were carried out by culturing the *cnx1Δ* + *pcnx1* + *pcnx1* cells in liquid non-selective medium and scoring auxotrophies/prototrophies on solid media as described in Materials and Methods. For each line, the first construct mentioned is on the pREP41 (*LEU2* marker) vector and the second construct is on pREP42 vector (*ura4*⁺ marker). When only one plasmid is denoted, the *cnx1* construct is based on the pREP41 vector. ^a Average of at least two independent experiments. ^b Average of at least three experiments.

Table IV. The Cin state is dominant. Dominance of the Cin state was tested by assessing *cnx1*⁺ essentiality with plasmid segregation assays using the following diploids: strain SP9450 (*cnx1*⁺/*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺) as a positive control of plasmid loss; strain SP8394 (*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺/*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺) as a negative control of plasmid loss, and SP7501 (Cin/*cnx1Δ* + *pcnx1*⁺) as the strain to test the essentiality of *cnx1*⁺.

Table V. The Cin state is transmitted to the meiotic progeny. Meiotic inheritance of the Cin trait was studied by random spore analysis, as previously described (Jannatipour

and Rokeach, 1995). Meiotic segregation of chromosomal alleles *ade6-216* (light pink) and the *ade6-210* (dark pink) was analysed on low adenine minimal medium (MMaUL), revealing that were present at a frequency of approximately 50% each among the germinated spores, as expected. A total of 268 light pink and 252 dark pink germinated spores were scored on minimal medium containing adenine and lacking leucine (MMAU) to assess the presence of the pREP41*cnx1*⁺ episome. Cells containing the pREP41*cnx1*⁺ episome were further subjected to plasmid segregation analysis (see Materials and Methods). The % of Cin spores and the plasmid segregation results on the spores bearing the pREP41*cnx1*⁺ episome are presented.

Figure 8. Leu⁻/Ura⁻ clones are viable calnexin-independent (Cin) cells.

PCR, Southern blot, Northern blot and Western blot analyses demonstrate the existence of Cin cells. **A)** Total DNA from a representative Leu⁻/Ura⁻ clone (lanes 1 and 5), SP556 + pREP41 (lanes 2 and 6), SP3222: *cnx1*Δ + pΔ*hcd_cnx1* (lanes 3 and 7), purified pREP41*cnx1*⁺ plasmid DNA (lanes 4 and 8) were subjected to PCR analysis with two sets of primers. The primer set 3/4 amplifies the *nmt1* coding sequences in the genome and sequences inserted in the multicloning sites of the pREP41 or pREP42. The primer pair 3/2 specifically detects episomal constructs with *cnx1*⁺ or *cnx1* mutants. Positions of certain DNA size markers in kb (lane 9) are indicated on the right. **B)** Schematic representation of the *cnx1*Δ + *pcnx1* haploid strains with the annealing sites for the primers used. **C)** PCR analyses of *cnx1* and *his3* sequences. Total DNA from a representative Leu⁻/Ura⁻ clone (lanes 4 and 9), SP556 + pREP41 (lanes 1 and 6), SP3220: *cnx1*Δ + *pcnx1*⁺ (lanes 2 and 7), SP3222: *cnx1*Δ + pΔ*hcd_cnx1* (lanes 3 and 8), or purified empty pREP41 vector DNA (lanes 5 and 10), were subjected to PCR analysis with two sets of primers. The primer set 1/2 amplifies the *cnx1* coding sequences in the genome of WT cells, or the *his3*⁺ marker in the *cnx1*Δ (*cnx1::his3*⁺) strains. The primer pair 5/6 specifically detects genomic or

episomal *cnx1* sequences. Positions of DNA size markers are indicated on the left. **D)** Southern blot analysis showing the absence of genomic integration of *cnx1* coding sequences. DNA from *cnx1Δ* + p*Δhcd_cnx1* (SP3222; lanes 1), a representative Leu⁻/Ura⁻ clone (Cin; lanes 2), or the control for genomic *cnx1*⁺ strain SP556 + pREP41 (lanes 3) was digested with either *Bgl*III or *Cla*I. After transfer, the membranes were hybridised with either the *mini_cnx1* or the pREP41 probes. Positions of DNA size markers are indicated on the right. **E)** Schematic representation of the *cnx1*⁺ locus relevant to the Southern blot analyses. The *cnx1*⁺ open reading frame is indicated by a box dashed diagonally to the right. The 5' and 3' untranslated regions are denoted by boxes dashed diagonally to the left. Only relevant restriction sites and distances in kilobases (kb) are shown. **F)** Northern blot analysis probing *cnx1*. Total RNA from strains SP556 (genomic *cnx1*⁺; lane 1), SP3220: *cnx1Δ* + p*cnx1*⁺ (lane 2), SP3222: *cnx1Δ* + p*Δhcd_cnx1* (lane 3), SP7188: Cin (lane 4) and SP7202: Cin + p*cnx1*⁺ (lane 5), were hybridised as described in (Jannatipour and Rokeach, 1995) with a ³²P-labelled DNA probe encompassing the entire *cnx1*⁺ coding sequence. **G)** Western blot analyses using rabbit anti-Cnx1p or anti-BiP polyclonal antibodies, as indicated. The anti-Cnx1p antibodies detect epitopes throughout the entire calnexin/Cnx1p molecule. Log phase cultures of SP556 (genomic *cnx1*⁺; lane 1), SP3220: *cnx1Δ* + p*cnx1*⁺ (lane 2), SP3222 SP *cnx1Δ* + p*Δhcd_cnx1* (lane 3), 7188: Cin (lane 4), and SP7202: Cin + p*cnx1*⁺ (lane 5) cells were used to prepare total protein extracts as described in Materials and Methods, and 20 μg of material was loaded fractionated by SDS-PAGE, and incubated with antibodies as described in (Elagöz et al., 1999). Perpendicular, thick black arrows in panels A, C, D, F, and G indicate the lanes corresponding to analyses of the Leu⁻/Ura⁻ (Cin) strain.

Figure 9. Cin and Cin + *pcnx1*⁺ cells display temperature-sensitive growth.

Cells were cultured to saturation and then diluted into 10 ml of fresh MM+Ade+Ura medium to OD₅₉₅ of 0.02. A) Growth curves of SP556 (genomic *cnx1*⁺), SP3220: *cnx1D* + *pcnx1*⁺, SP7188: Cin and SP7202: Cin + *pcnx1*⁺ cells at 30°C for 45 hours. B) Growth curves of the same cells grown at 37°C for 72 hours. C) Histograms of calculated growth rates for each strain, at 30°C and 37°C, as indicated.

Figure 10. Cin cells display thermosensitive altered morphology.

Panels (A-C) *S. pombe* cells exponentially grown at 30°C were incubated for 20 hours in MM+Ade+Ura (2% glucose) at 30°C (A), at 37°C (B). Cells were then stained with the fluorescent dye Calcofluor White (upper part of panels A and B). Nomarski interference images show the same fields as those stained with Calcofluor White (lower part of panels A and B). Arrows indicate intracellular accumulation of the fluorescent dye. C) Confocal indirect immunofluorescence analysis on *cnx1*⁺ (SP3220: *cnx1Δ* + *pcnx1*⁺), Cin (SP7188), and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7202) cells was carried out with anti-Cnx1p rabbit antibodies (as described in Materials and Methods). For the Cin strain, anti-BiP antibodies were used for the ER immunostaining.

Figure 11. The Cin state can be transmitted by transformation and requires a proteinaceous factor.

Extracts from Cin (SP7188) and *cnx1Δ + pcnx1⁺* (SP3220) cells were prepared and treated with RNaseA, DNaseI, and UV, as described in Materials and Methods. Cell extracts were treated or not with proteinase K as indicated. Five and 15 μg of these extracts were transformed into strain SP3220 (*cnx1Δ + pcnx1⁺*) using the PEG/LiAc method. After plasmid segregation assay the appearance of Cin cells was scored. A table with details about the numbers colonies tested are at the right of the histogram. The frequencies of plasmid loss are the mean of two to three independent experiments. In initial experiments, the cell extracts were fractionated by centrifugation into pellet and soluble fractions. Since both the soluble and pellet fractions of Cin (SP7188) cell extracts transmitted the Cin state, transformations were carried out with unfractionated lysates.

Figure 12. The Cin state is plasmid-independent, maintained in the *cnx1⁺* genomic background transmitted in a non-Mendelian fashion.

A) Phenotypic analysis of tetrads resulting from sporulation of the *cnx1⁺/Cin* diploid SP7501 (SP247/SP7188; see Table II), in which deletion of the *cnx1* genomic copy in the SP7188 haploid is marked with *his3⁺*. Cin spores bear the *his3⁺* marker (i.e. *cnx1::his3 = Δcnx1*), thus they can grow on medium lacking histidine (MMaUL), while *cnx1⁺* spores grow only on medium containing histidine (MMaULH). The *his3⁺* marker was inherited in 2:2 ratio. Spores bearing the *ade6-210* allele produce dark pink colonies on low adenine medium (MMaULH), while the *ade6-210* allele produces light pink colonies. The *ade6* markers were inherited in 2:2 ratio. To assess whether the factor encoding calnexin independence was present in the *cnx1⁺* progeny, extracts from the *his3⁻* germinated spores were transformed into the *cnx1Δ + pcnx1⁺* strain (SP3220; Table II), and their capacity to generate Cin cells was examined by plasmid segregation. All *cnx1⁺/his3⁻* extracts produced Cin cells, as symbolised by [*cif*] within a circle. The putative [*cif*] factor was then inherited

in a 4:0 ratio. Tetrads are labelled 1-4, and spores A-D. **B)** Western blotting with anti-Cnx1p antibodies confirmed that the *his3*⁺ germinated spores were viable in the absence of calnexin. As positive control, the same extracts were immunoblotted with anti-BiP antibodies. Tetrads are labelled 1-4, and spores A-D.

Figure 13. A two-component model for the survival mechanism of Cin cells.

The model presented comprises two key elements: 1) a suppressor gene for calnexin/Cnx1p essentiality (*scx1*⁺, for suppressor of cnx1); and 2) a regulator of *scx1* activity that is designated Cif1p, for calnexin-independence factor). In the calnexin-dependent state, the protein encoded by *cif1* is present in the cell in its native conformer Cif1p, negatively regulating *scx1* activity on *cnx1*⁺ essential function on its putative target (symbolised as “?”). However, under particular conditions, such as the presence of Δ hcd_Cnx1p, the Cif1p protein could convert into an alternative conformer [*cif*] unable to inhibit *scx1* activity. Under these latter conditions, *scx1* could complement the essential function of calnexin/Cnx1p on its target “?”. This would allow the loss of episomal *cnx1*⁺ in a *cnx1* Δ + *pcnx1*⁺ strain when grown under non-selective conditions since *cnx1*⁺ activity on target “?” would be no longer vital, and thereby giving rise to calnexin-independent cells (Cin). The [*cif*] conformer would provoke further conversion of Cif1p molecules into the [*cif*] form by an “autocatalytic” process, such as structural replication, which can be inherited during mitosis and meiosis, and that can be transmitted by transformation. These features of [*cif*] would constitute the basis for the dominance and the inheritance of the Cin state. Details of this model are found in the Discussion section.

Strains	Genotype	Source
SP556	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	P. Nurse Lab
SP247	<i>h⁺ his3-D1 ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>	Burke <i>et al.</i> (1994)
SP248	<i>h⁻ his3-D1 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Burke <i>et al.</i> (1994)
SP6089	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP7052	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>cnx1⁺</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8485	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>lum_cnx1</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8486	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 Δhcd_cnx1 + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8487	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>mini_cnx1</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP7951	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>cnx1⁺</i> + pREP42	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8488	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>lum_cnx1</i> + pREP42	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8489	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 Δhcd_cnx1 + pREP42	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP8490	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>mini_cnx1</i> + pREP42	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP3220	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP3221	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>lum_cnx1</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP3222	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 Δhcd_cnx1	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP7109	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>mini_cnx1</i>	Elagöz <i>et al.</i> (1999)
SP7188 (Cin)	SP248 $\Delta cnx1::his3$ [<i>cif</i>] (derivative of SP3222)	This study
SP7202 (Cin + <i>pcnx1⁺</i>)	SP7188 + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP7391	SP248 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>sΔhcd_cnx1</i>	This study
SP8450	SP247/SP3220	This lab
SP7501	SP247/SP7188	This study
SP7588	SP247 $\Delta cnx1::his3$ + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	This lab
SP7571	SP7188/SP7588	This study
SP8394	SP3220/SP7588	This study

Table II. Strains used in this study

A

B

Constructs	Plasmid-free cells
(1) <i>pcnx1</i> ⁺ + <i>pcnx1</i> ⁺	0
(2) <i>plumenal_cnx1</i> + <i>pcnx1</i> ⁺	0
(3) <i>pΔhcd_cnx1</i> + <i>pcnx1</i> ⁺	87 ^a
(4) <i>pmini_cnx1</i> + <i>pcnx1</i> ⁺	0
(5) <i>pcnx1</i> ⁺ + pREP42	0 ^b
(6) <i>plumenal_cnx1</i> + pREP42	0
(7) <i>pΔhcd_cnx1</i> + pREP42	73
(8) <i>pmini_cnx1</i> + pREP42	0
(9) <i>pcnx1</i> ⁺	0 ^b
(10) <i>plumenal_cnx1</i>	0 ^a
(11) <i>pΔhcd_cnx1</i>	46 ^a
(12) <i>pmini_cnx1</i>	0 ^a
(13) Cin + <i>pcnx1</i> ⁺	72 ^b
(14) <i>psΔhcd_cnx1</i>	0 ^b
(15) <i>pN-terminal</i> + <i>pmini_cnx1</i>	0 ^b

Table III. Mutants tested in plasmid segregation assays.

Strains	No. of cells studied		Frequency of
	Total cells	Plasmid-free cells	Plasmid-free cells %
<i>cnx1⁺/cnx1Δ+pcnx1⁺</i>	451	405	90 ± 0
<i>Cin/cnx1Δ+pcnx1⁺</i>	602	457	76 ± 9.8
<i>cnx1Δ+pcnx1⁺/cnx1Δ+pcnx1⁺</i>	133	0	0 ± 0

Table IV. The Cin state is dominant.

Total spores	Cin spores	Cin spores	% loss <i>pcnx1</i> on	Ratio of <i>ade6</i>
Test		%	<i>cnx1⁺</i> spores	alleles
520	461	88.7	50	268 pink 250 red

Table V. The Cin state is transmitted to the meiotic progeny.

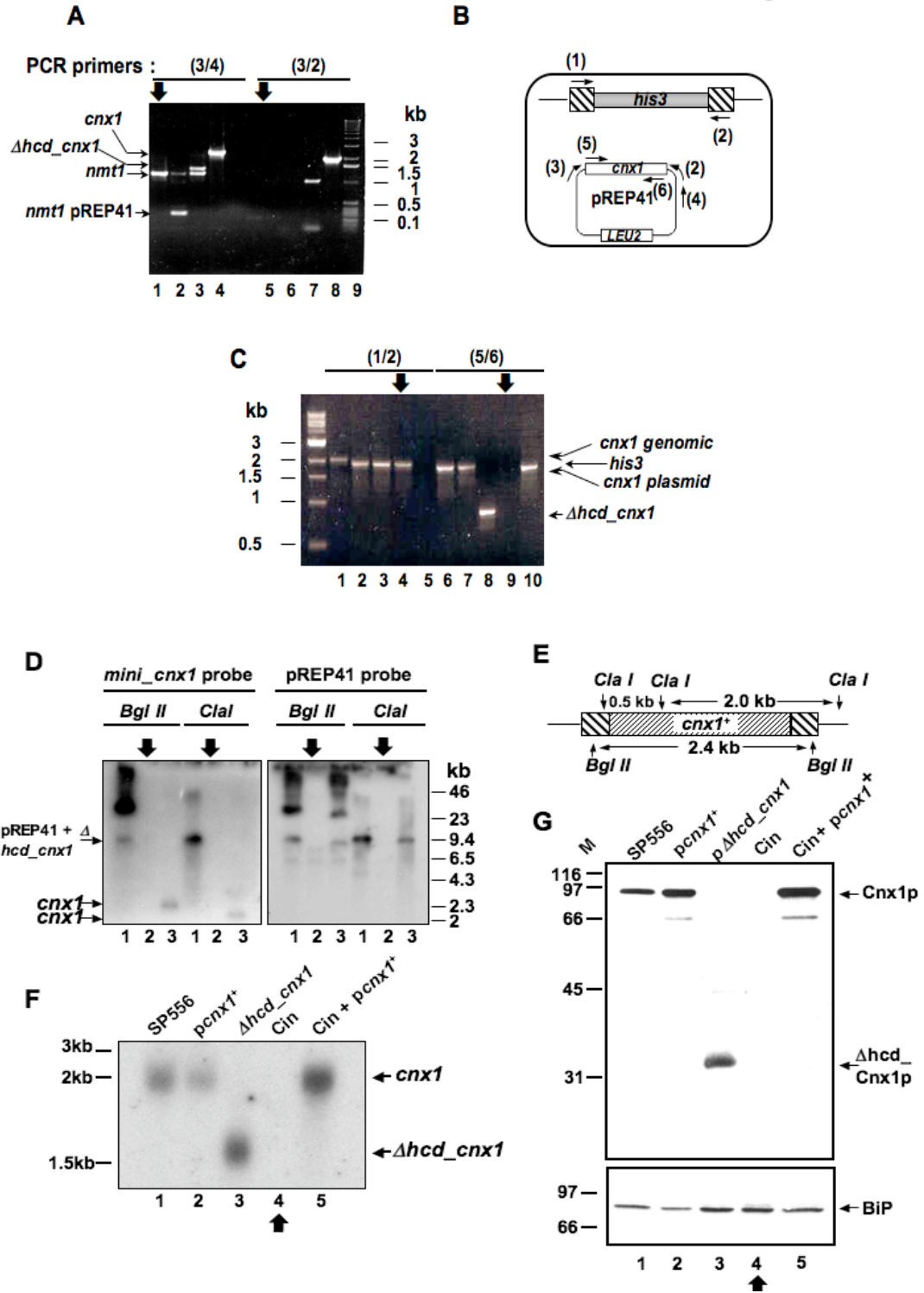


Figure 8. *Leu*⁻/*Ura*⁻ clones are viable calnexin-independent (Cin) cells.

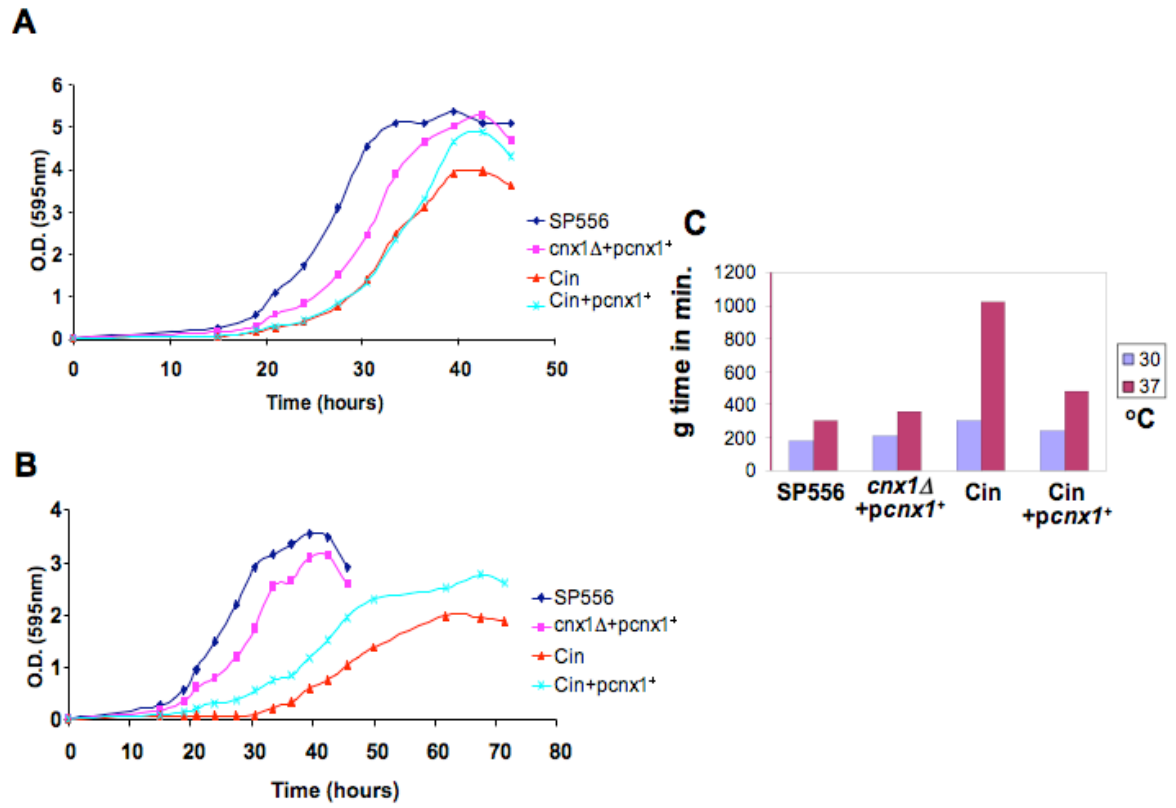


Figure 9. Cin and Cin + *pcnx1*⁺ cells display temperature-sensitive growth.

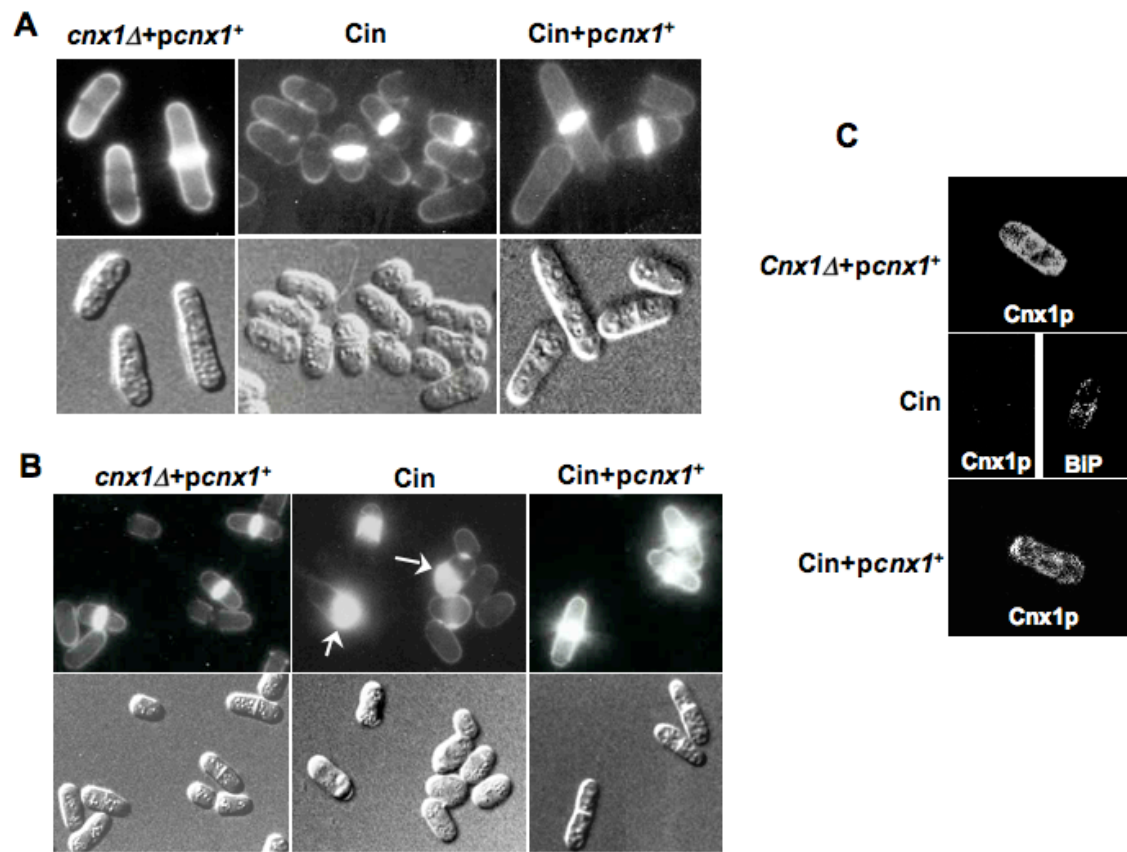


Figure 10. Cin cells display thermosensitive altered morphology.

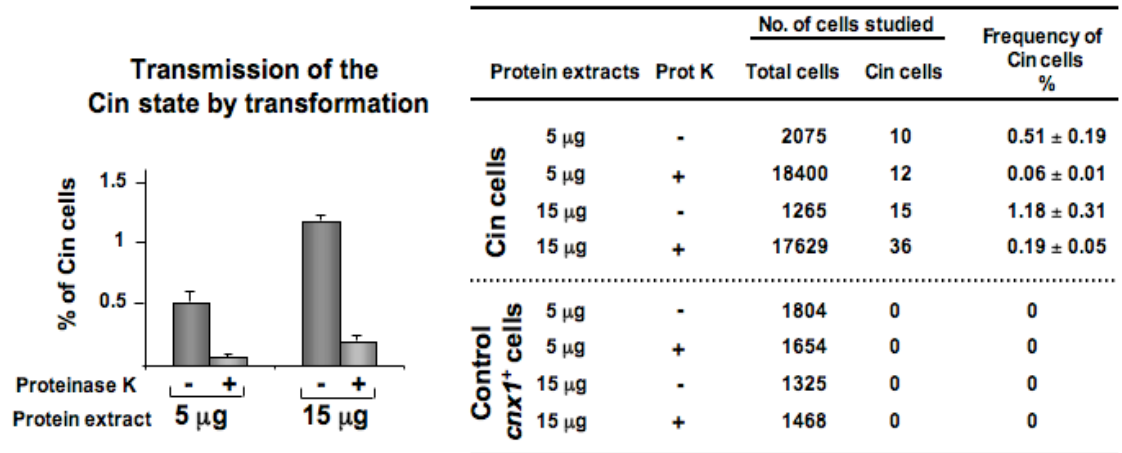


Figure 11. The Cin state can be transmitted by transformation and requires a proteinaceous factor.

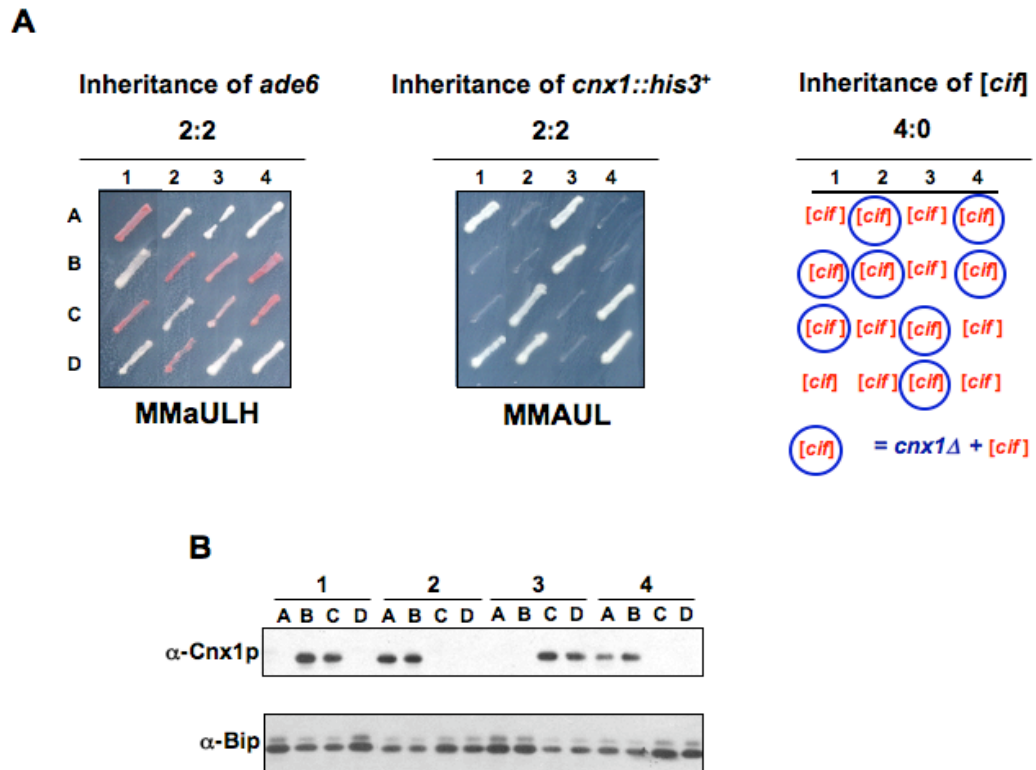


Figure 12. The Cin state is plasmid-independent, maintained in the *cnx1*⁺ genomic background transmitted in a non-Mendelian fashion.

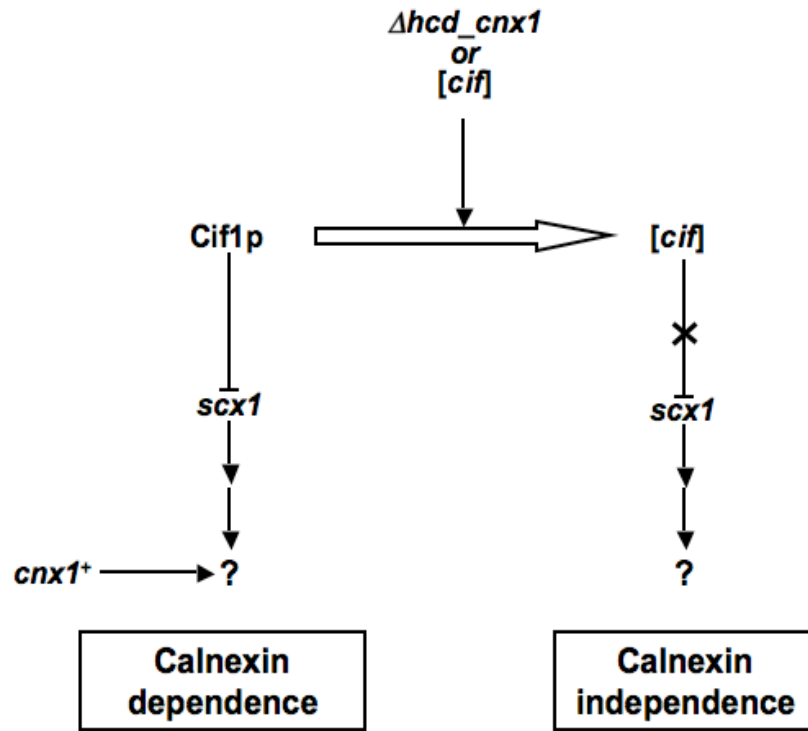


Figure 13. A two-component model for the survival mechanism of Cin cells.

Chapitre 3. A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin

Article publié dans *Journal of Cell Science* en mai 2009

3.1 Mise en contexte

Cet article est la suite directe de l'article *Collin et al.* présenté précédemment. En effet, il débute avec la description de criblages génétiques visant à identifier des protéines impliquées dans l'état épigénétique de survie de *S. pombe* en absence de la chaperone essentielle calnexine (état Cin). Plus particulièrement, cet article contient la description de Cif1p, une protéine orpheline localisée dans le nucléole qui agit comme inducteur fort du phénomène Cin. J'ai effectué la totalité des figures présentées dans cet article, à l'exception du deuxième criblage génétique (criblage de surexpression avec banque d'ADNc), de la construction et des essais de ségrégation plasmidique du mutant Cif1p KRKR₂₇₋₃₀/AAAA.

Cet article est le résultat d'une longue étude sur la protéine Cif1p. Puisque Cif1p n'avait jamais été étudié auparavant j'ai dû, avec l'aide de ma collègue Renée Guérin, fabriquer tous les outils nécessaires à son étude (clonage, fusion avec protéine fluorescente, purification et fabrication d'anticorps, délétion génétique, mutants). Suite à quoi j'ai entrepris une étude exhaustive des propriétés prioniques de la protéine *in vivo* et *in vitro*. Ces différentes expériences, pour la plupart peu fréquentes car restreintes au domaine des prions de levure, prirent un certain temps à être exécutées. Tel que mentionné dans la discussion de l'article, certaines de ces expériences s'avérèrent non-concluantes quant aux propriétés de Cif1p. Suivant cette constatation, des expériences complémentaires, notamment sur l'effet de la localisation de Cif1p, furent effectuées afin de compléter la première histoire de Cif1p. Cette démarche explique donc pourquoi cet article pris 5 ans à être produit.

A nucleolar protein allows viability in the absence of
the essential ER-residing 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.

*To whom the correspondence should be sent

Running title: *cif1*⁺ induces calnexin independence

3.2 Summary

In fission yeast, the ER chaperone calnexin is normally essential for viability. However, a specific mutant of calnexin ($\Delta\text{hcd_Cnx1p}$) 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 _{$\Delta\text{hcd_cnx1}$} cells, spontaneously appearing in the presence of the $\Delta\text{hcd_Cnx1p}$ mutant. Moreover, *cif1*⁺ is not required for induction or maintenance of Cin _{$\Delta\text{hcd_cnx1}$} . 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.

3.3 Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) has several vital functions including biosynthesis of organelles, lipid donation to other organelles, Ca^{2+} 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 (Ellgaard and Helenius, 2003; Fewell et al., 2001; Hebert and Molinari, 2007; Kleizen and Braakman, 2004).

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

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

(Elagoz et al., 1999; Jannatipour and Rokeach, 1995). 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 processes. 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). Most recently, several reports demonstrated that calnexin is involved in apoptosis induced by ER stress (Delom et al., 2006; Delom et al., 2007; Guerin et al., 2008; Takizawa et al., 2004; Tomassini et al., 2004; Torgler et al., 1997; Zuppini et al., 2002). Intriguingly, the knockout of the gene encoding calnexin in different organisms results in diverse phenotypes (Denzel et al., 2002; Lee et al., 2005; Muller-Taubenberger et al., 2001). 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* (Elagoz et al., 1999; Jannatipour and Rokeach, 1995). 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., 1995). 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; Maréchal 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 (*Δhcd_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 independent**. 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 dependent**. 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 _{Δhcd_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.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 *S. pombe* genetic, strains and media

S. pombe strains used in this study are listed in Table VI. 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 and random spore analyses were carried out as previously described (Moreno et al., 1991).

3.4.2 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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGCTTAGCTACAAATCCCACTGGC-3' and **ura4 rev** : NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTGATATTGACGAAACTTTTTGACAT-3'.

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 *pcn1*⁺ plasmid (see supplementary Fig. 18). 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.

3.4.3 DNA Constructs

The coding sequence of *cif1⁺* was obtained by PCR amplification from genomic DNA of WT *S. pombe* Sp556. The primers used contained *XhoI* restriction sites (underlined), and are: forward pc364forA (5'-GATCTCGAATGAGTGAAGAAATTATAACA-3') and reverse pc364revA (5'-GATCTCGAGTCAAATATCATCTTTTTTGGC-3'). The ORF of *cif1⁺* was cloned into the *XhoI* site of pREP3X or pREP41X vectors. The correct orientation and sequence was verified by digestion with *XmnI/BamHI*, 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 Nde1-364-for (5'-AAACCATATGAGTGAAGAAATTATA-3') and reverse pc364rec, containing a site for *SmaI* (underline) and a *KpnI* (bold) (5'-GACCCCCGGGGCTCGAGTTACATGGCATTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTGCTCGGTACCAATATCATCTTT-3'). Venus was amplified with the pair of primers GFPCTermLongfor containing a *KpnI* site (bold) (5'-

AAAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3') and BamHIvenus_stop containing a *Bam*HI site (underline) (5'-AAAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTC -3'). The amplified fragment was digested with *Kpn*I and *Bam*HI, 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'-CTTTTCAGCTCGCACCTCTGAAGCAGCAGCAGCCGGCTGCTTTTCTCCCCTGA TGTTTC-3'), and for the 3' part, 364-KRKR/AAAA-for (5'-GGGAGAAAAGCAGCCGGCTGCTGC TGCTTCAGAGGTGCGAG-3') and stop-364-BamHI, containing a *Bam*HI 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 *Kpn*I 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.

3.4.4 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. 18).

3.4.5 Phenotypic assays

Stress-resistance assay, sodium dodecyl sulfate (SDS)-sensitivity assays, and *in vivo* staining for metacaspase activity were performed as described in [238].

3.4.6 Northern blotting

Northern blotting was carried out as described previously [46]. 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.

3.4.7 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). Rabbit polyclonal antibody against Cif1p was used at a 1:5,000 dilution. Anti-Cnx1p rabbit serum [46] was used at a 1:35,000 dilution. Anti-BiP rabbit serum [76] 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 Δ *cif1* cells (Harlow and Lane, 1988).

3.4.8 Microscopy imaging

For Calcofluor-white staining was done as previously described in [90]. For Cif1p-Venus fusion imaging was performed as described [105]. 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.

3.5 Results

3.5.1 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 (de la Cruz J., 1998; Ramer et al., 1992) 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*⁺ (*cnx1*Δ + *pcnx1*⁺). Following culture in non-selective media, candidate Cin cells were isolated by scoring for cells that could still grow after the loss of the WT calnexin plasmid (supplementary Figure 18, 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. 14A). 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. As it induces the Cin state, SPCC364.01 was renamed *cif1*⁺ for calnexin independence factor 1.

3.5.2 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 18). As shown in Table VII, 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 VII, lines 2 and 3). The absence or presence of calnexin in these Cin cells was verified by Northern and Western blotting (Fig. 16B, 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 VII, 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 *pcn1*⁺, the plasmid was readily lost when not selected for in the plasmid segregation assay (Table VII, line 6).

We previously observed that the Cin state induced by the calnexin mutant Δ hcd_Cnx1p (Cin _{Δ hcd_cnx1}) was dominant in diploid cells [233], indicating that the Cin _{Δ 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 (Δ *cnx1* + *pcn1*⁺). Following which, the ability of diploids to lose de calnexin plasmid was assessed by the plasmid segregation assay. Intriguingly, five of nine diploids tested could stably live without calnexin (Table VIII, line 2). This result contrasts with those obtained from diploids formed with Cin _{Δ hcd_cnx1} cells, in which all diploids analyzed retained this ability (Table VIII, 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 *pcn1*⁺ 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).

In the previous characterization of the Cin _{Δ 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 $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ 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 $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ states exhibit distinct propagation characteristics, and are therefore different.

3.5.3 Cin_{cif1} cells display phenotypic differences with $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ cells

We have previously observed that while $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ state allows viability, it does not complement all the functions mediated by calnexin, as $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ cells display cell-wall defects and in stationary phase they exhibit increased caspase activation (Turcotte et al., 2007). As thus far the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ 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 (Collin et al., 2004; Elagoz et al., 1999; Hampsey, 1997; Rose and Fink, 1987; Turcotte et al., 2007). Interestingly, in microscopy analysis with Calcofluor, $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ 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. 15A). 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. 15A). 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. 15A, 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. 15B 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. 15C). 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 $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ 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 $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ and WT cells.

Caspase activation is a typical marker of induction of programmed cell death (PCD) (Kaufmann et al., 2008; Madeo et al., 2002). In yeast, metacaspase activation can be readily assessed by fluorescence-activated sorting (FACS) of cells stained with the fluorescent probe FITC-VAD-fmk (Herker et al., 2004; Madeo et al., 2002; 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 15D, 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*_{Δhcd_cnx1} states are different.

3.5.4 *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 Δ*cif1* and *cif1*⁺ (Fig. 16A). 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. 16A). That the G418-resistant haploids were deleted for *cif1*⁺ was confirmed by Northern

blotting (Fig. 16B). 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. 16A and not shown).

In order to examine if the Cin_{Δhcd_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 16C, Western blotting with anti-Cif1p showed a major band around 37 kDa in all the strains tested, except for the Δ*cif1* cells. The levels of Cif1p in WT and both Cin strains were similar, showing that the continuous overexpression of *cif1*⁺ is not necessary for the maintenance of neither of the Cin states.

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

Because overexpression of *cif1*⁺ stably induces the Cin_{cif1} 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 Δ*cif1* Δ*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 *cif1*⁺ did not provoke the spontaneous appearance of Cin cells (Table IX, 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 *cif1* disruption background, the Δ*cif1* Δ*cnx1* + *pcnx1*⁺ strain was transformed with plasmids expressing Δ*hcd_Cnx1p* at

normal levels. If *cif1*⁺ was required for the induction of the Cin_{Δhcd_cnx1} state, the Δ*cif1* Δ*cnx1* double knockout strain should not give rise to calnexin-less cells. As shown in Table IX line 2, expression of Δhcd_Cnx1p in the Δ*cif1* background led to the appearance of calnexin-less cells, showing that *cif1*⁺ 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 Δ*cif1* Δ*cnx1* + *pcnx1*⁺. Interestingly, the Cin_{cif1} state was induced in the Δ*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 Δ*cnx1* Δ*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 Δ*cif1* (Table X). 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.

3.5.6 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 Cif1p sequence (Fig. 14A, 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. 17A), 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 19).

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. 14B). A Venus fusion of this Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutant displayed fluorescence in the cytosol (Fig. 17B). 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 VII, 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.

3.6 Discussion

We identified 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_{Δhcd_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 (Collinge and Clarke, 2007; King and Diaz-Avalos, 2004; Safar et al., 1998; Tanaka et al., 2004; Uptain et al., 2001). 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 (King and Diaz-Avalos, 2004; Maddelein et al., 2002; Patel and Liebman, 2007; Tanaka et al., 2004). 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 (Benkemoun and Saupe, 2006; Tuite and Cox, 2006; Uptain and Lindquist, 2002; 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. 20). *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. 16C). 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 (Fribourg and Conti, 2003; Ma et al., 2005; Meka et al., 2003; Nichols et al., 1999). 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. 17B and supplementary Fig. 21). 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; Maréchal et al., 2004). Recently, we reported that the cytosolic tail of calnexin is involved in mediating an ER-stress-induced apoptotic signal (Guérin 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 22).

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 (Lowe and Barr, 2007; Warner, 1999). 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.

3.7 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.

3.8 References

- 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.

Guérin, 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.

Lowe, M. and Barr, F. A. (2007). Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 429-39.

Lyne, R., Burns, G., Mata, J., Penkett, C. J., Rustici, G., Chen, D., Langford, C., Vetrie, D. and Bahler, J. (2003). Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics* **4**, 27.

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.

Maddelain, 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.

Maréchal, A., Tanguay, P. L., Callejo, M., Guérin, 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., Guérin, 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.

3.9 Legends

Figure 14. 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 15. Cin_{cif1} cells display phenotypic differences with Cin_{Δhed_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 16. *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 17. 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 μ g/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-KRKR_{27-30/AAAA}-Venus fusion and a Fib1p-mRFP fusion were fixed as analyzed by fluorescence microscopy as in panel A.

Table VI. Strains used in this study.

Table VII. 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 18. – indicates no appearance of calnexin-free cells, and + indicates stable maintenance of the Cin state. The results are representative of 3 independent experiments.

Table VIII. Cin_{cif1} is partially dominant in diploid cells. $\Delta cnx1 + pcnx1^+$ cells were mated with Cin _{Δhcd_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 IX. *cif1*⁺ is not required for the induction of the Cin _{Δhcd_cnx1} state. Plasmid segregation assays were carried out by growing $\Delta cnx1 \Delta cif1 + pcnx1^+$ 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 X. *cif1*⁺ is not required for the maintenance of either Cin state. A diploid was obtained by crossing a Cin _{Δhcd_cnx1} strain (*cif1*⁺ $\Delta cnx1$) and a calnexin-dependant (Cdn) strain deleted for *cif1*⁺ ($\Delta cif1 \Delta cnx1 + pcnx1^+$), 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to examine the presence of the *cif1::KanMX4* marker, and on selective MM to examine the presence of the *pcnxI*⁺ plasmid.

Supplementary Figure 18. Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay. Cells auxotrophic for leucine and uracil (*ura4D18*, *leu1-32*), with a genomic deletion for *cnxI*⁺ ($\Delta\textit{cnxI}$) and harboring a plasmid encoding calnexin (*pcnxI*⁺) are used to test for the induction of the Cin state. 1) Cin-inducing genes such as *Ahcd_cnxI* or *cifI*⁺ 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 5-7 days. Under these conditions, Cin cells lose *pcnxI*⁺ as calnexin is not 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. For each experiment 400 colonies were streaked, and experiments were performed at least 3 times. 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.

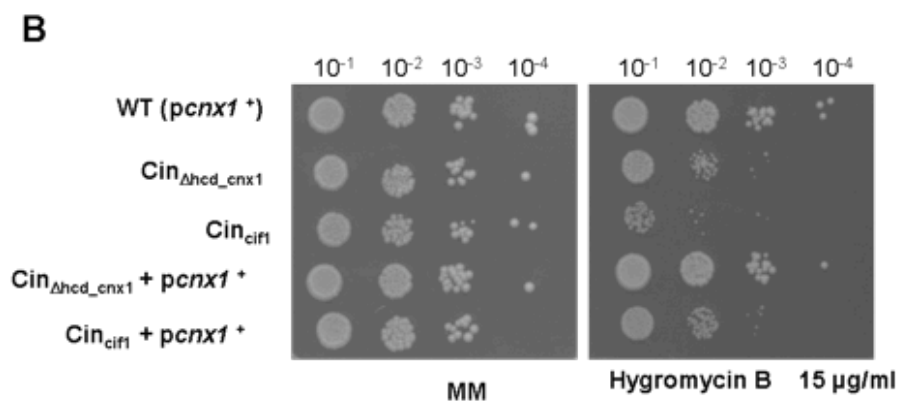
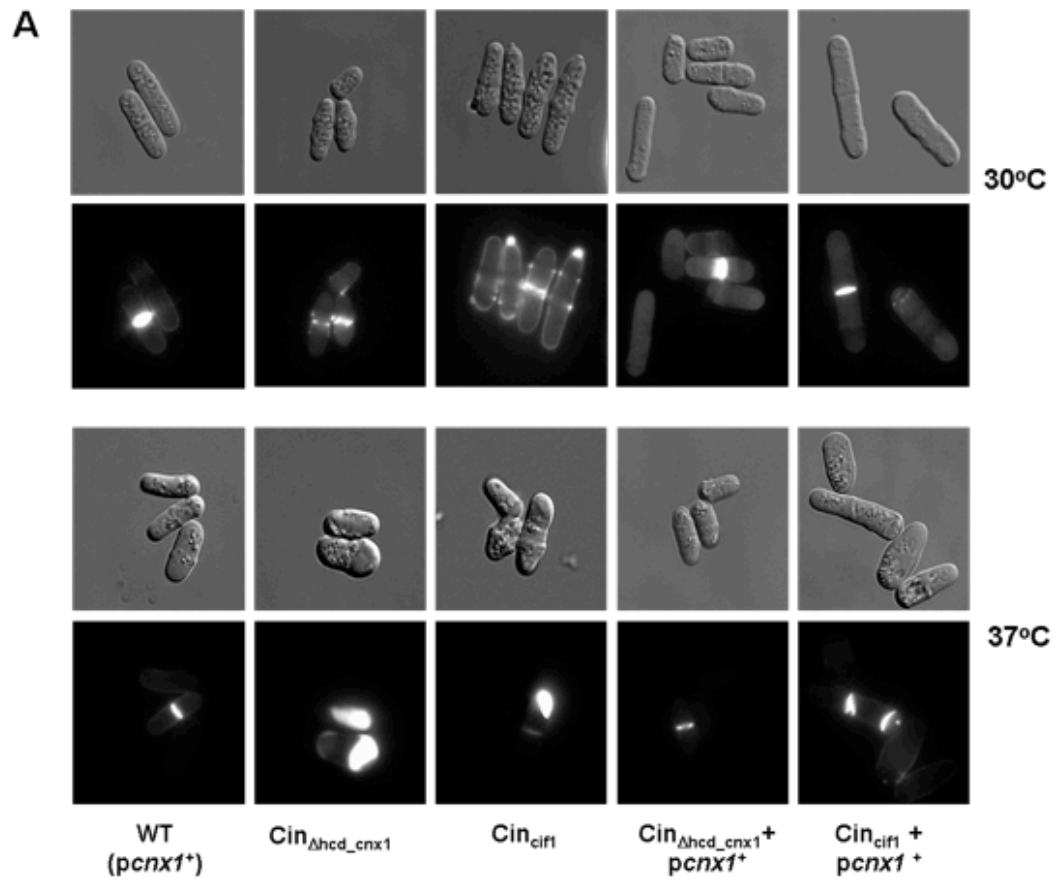
Supplementary Figure 19. The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the Cin_{Ahcd_cnx1} or Cin_{cif1} states. (A) Examination of the nuclear shape of WT and both types of Cin cells. Exponentially growing cells containing a plasmid encoding the nuclear protein Hht2p fused with YFP (Riken, Japan) were fixed as described in Material and Methods. Slides were mounted with a DAPI-containing media (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.

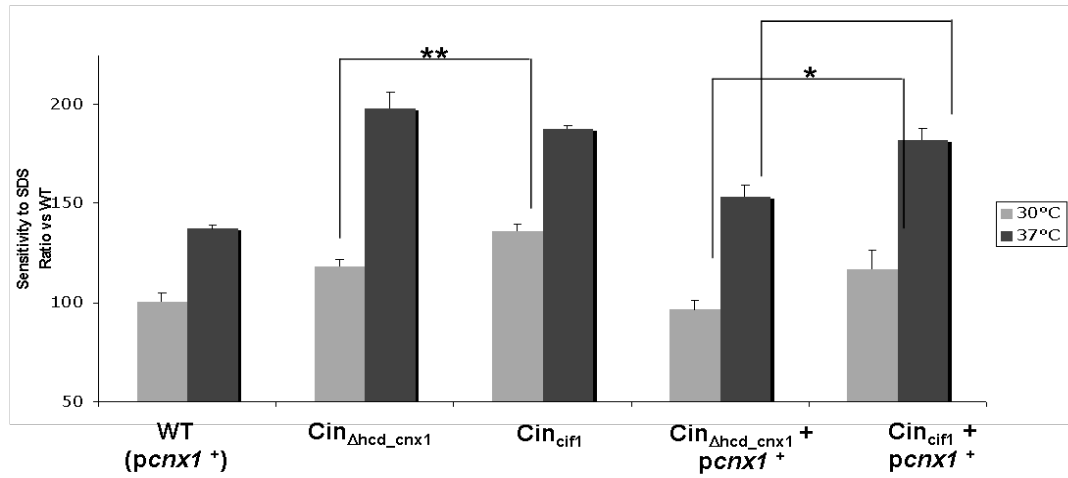
Supplementary Figure 20. Cif1p forms fibers in vitro. Cif1p-his₆ was purified from *E. coli* under denaturing conditions, and incubated at 30°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 150 mM NaCl for 14 days. The protein solution was centrifuged at 16,000 X g for 15 minutes and the supernatant was transferred on 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 21. Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA-Venus. Exponentially growing *Δcif1* 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 22. 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.



C



D

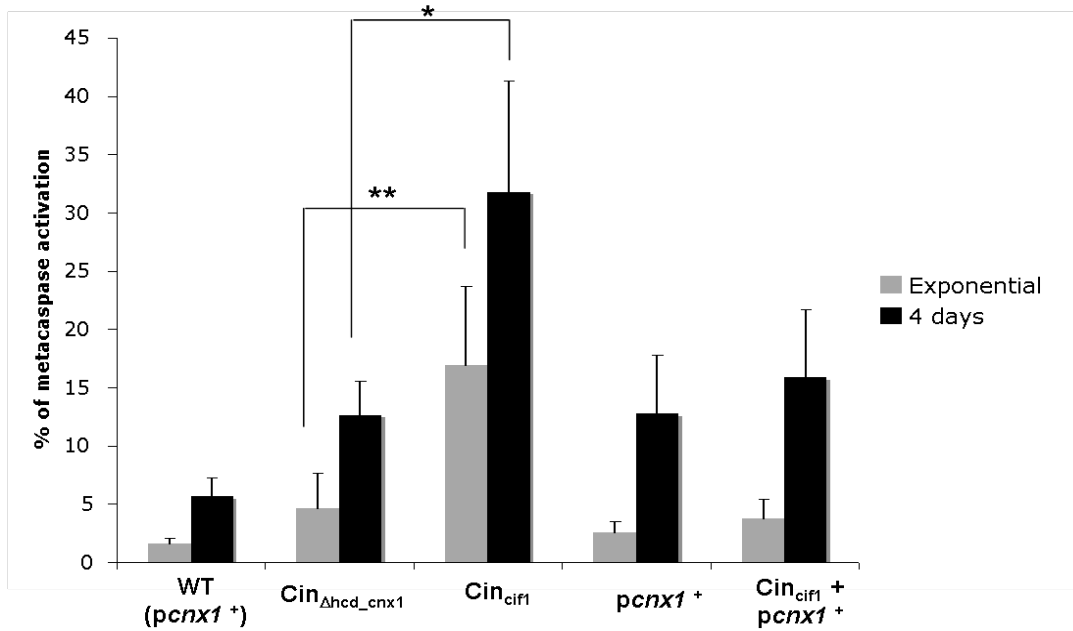


Figure 15. *Cin*_{cif1} cells display phenotypic differences with *Cin*_{Δhcd_cnx1} cells.

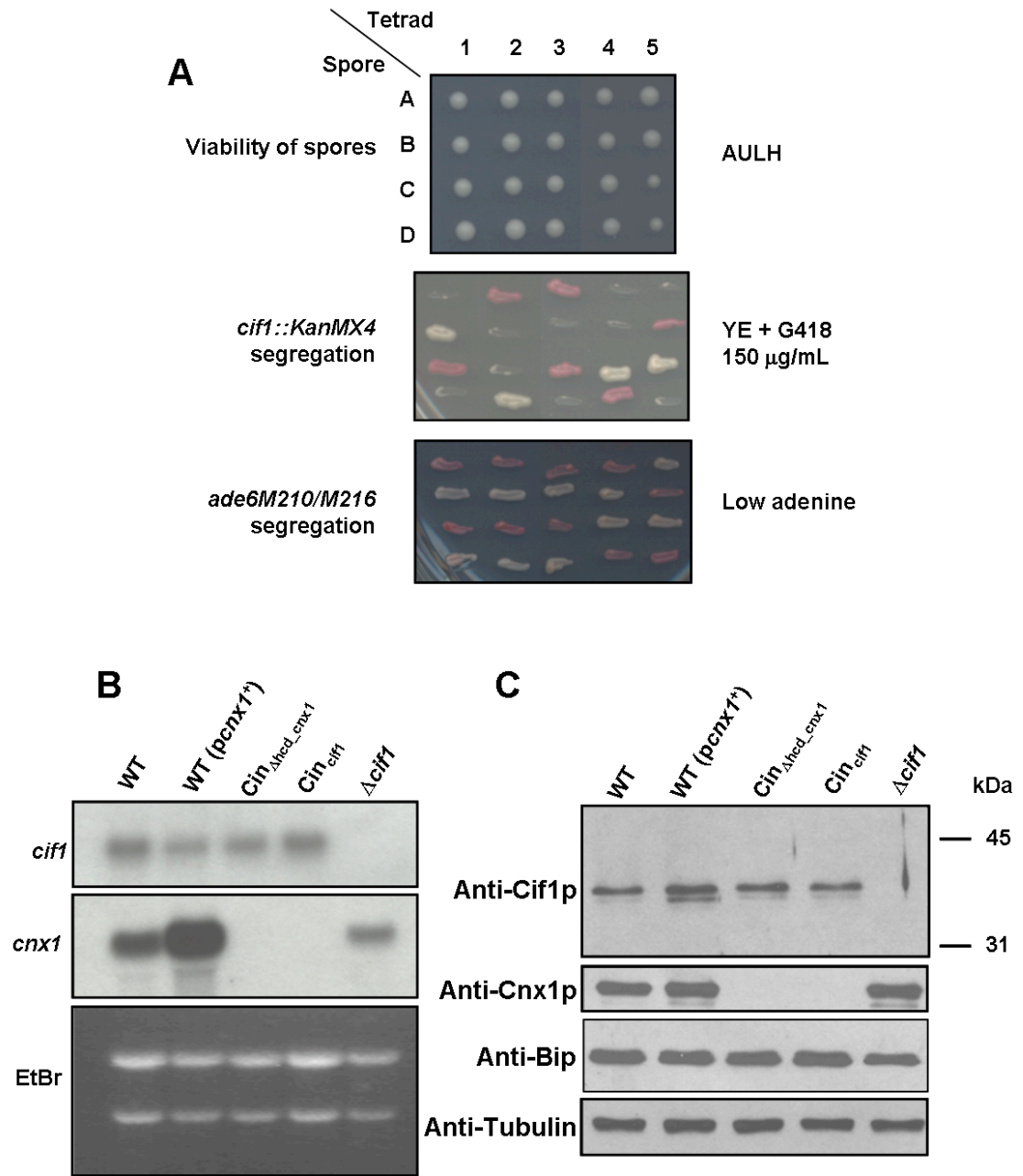


Figure 16. *cif1⁺* is unessential for vegetative growth.

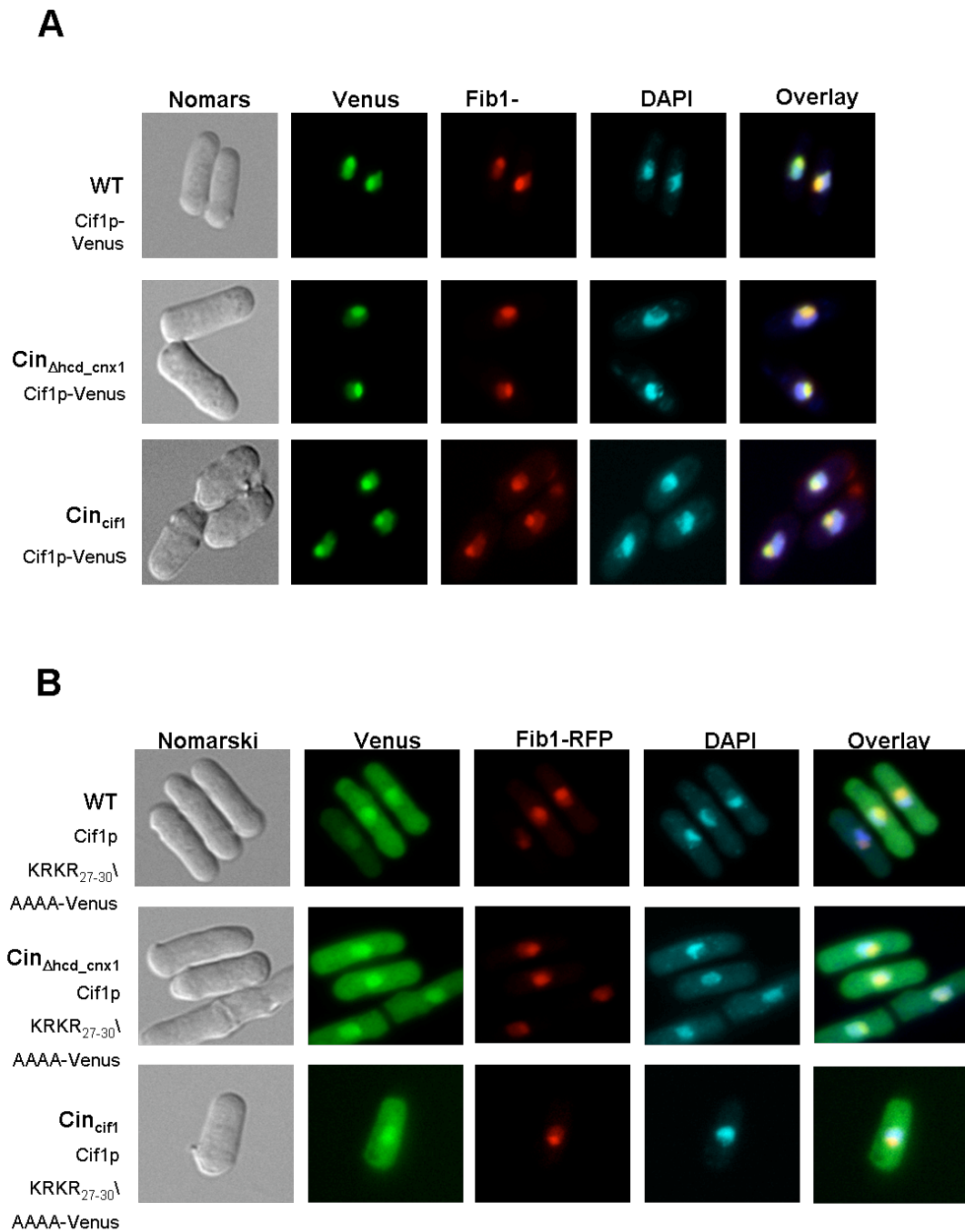


Figure 17. Nucleolar localization of Cif1p is abolished by the KRKR₂₇₋₃₀/AAAA mutation.

Strain	Genotype	Source
SP247	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 his3D1</i>	[257]
SP248	<i>h⁻ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 his3D1</i>	[257]
SP556	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	P. Nurse Lab
SP3220 WT (<i>pcnx1⁺</i>) (Cdn)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	[90]
SP6089 (Cdn)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	[90]
SP8433	<i>h⁺ ade6M210 ura4D18 leu1-32 Δcnx1::his3</i> + pREP42 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP7188 (Cin original)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> [<i>cif</i>] (derivative of SP3222)	[233]
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
SP8570	SP8348 + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	This study
SP8680 (Cin from <i>cif1</i>)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> [<i>cif</i>] (derivative of SP8520)	This study
SP8711	SP8680 + pREP41X <i>cif1</i>	This study
SP17814	SP6089 + pREP1 <i>cif1KRKR/AAAA</i>	This study
SP7202 (Cin original + <i>pcnx1</i>)	SP7188 + pREP41 <i>cnx1</i>	[233]
SP8699 (Cin from <i>cif1</i> + <i>pcnx1</i>)	SP8680 + pREP41 <i>cnx1</i>	This study
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 + pREP42 <i>cif1venus</i>	pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP	+	This study
SP10376	SP8680 + pREP42 <i>cif1venus</i>	pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP	+	This study
SP10373	SP556 + pREP42 <i>cif1KRKR/AAAvenus</i>	pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP	+	This study
SP10374	SP7188 + pREP42 <i>cif1KRKR/AAAvenus</i>	pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP	+	This study
SP10375	SP8680 + pREP42 <i>cif1KRKR/AAAvenus</i>	pREP41X/ <i>fib1</i> -mRFP	+	This study

Table VI. Yeast strains used for this study.

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) $Cin_{cif1} + pREP42cnx1^+$	+
(7) $\Delta cnx1 + pcnx1^+ + pREP1cif1KRKR_{27-30}/AAAA$	-

Table VII. Overexpression of $cif1^+$ induces the Cin $cif1$ state.

Diploid	Total cells	Cin cells	% of Cin
X $\Delta cif1 \Delta cnx1$ pREP42 $cnx1^+$ $cif1^+ \Delta cnx1$ (Cin $_{\Delta hcd_cnx1}$)	7	7	100
X $\Delta cif1 \Delta cnx1$ pREP42 $cnx1^+$ $cif1^+ \Delta cnx1$ (Cin $_{cif1}$)	9	5	56

Table VIII. Cin $_{cif1}$ is partially dominant in diploid cells.

Constructs	Appearance of calnexin-free cells
(1) $\Delta cif1 \Delta cnx1$ pREP42 $cnx1^+$	-
(2) $\Delta cif1 \Delta cnx1 pcnx1$ pREP41 Δhcd_cnx1	+
(3) $\Delta cif1 \Delta cnx1 pcnx1$ pREP3 $xcif1^+$	+

Table IX. $cif1^+$ is not required for the induction of the $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ state.

Diploid	No. of spores studied			% of Cin
	Total Cin spores	Cin <i>I</i> <i>cif1</i> ⁺	Cin <i>I</i> Δ <i>cif1</i>	<i>I</i> Δ <i>cif1</i>
X ^{<i>Δcif1 Δcnx1 pREP42cnx1⁺</i>} _{<i>cif1⁺ Δcnx1 (Cin_{Δhod_cnx})</i>}	1387	660	696	50.2

Table X. *cif1*⁺ is not required for the maintenance of either Cin state.

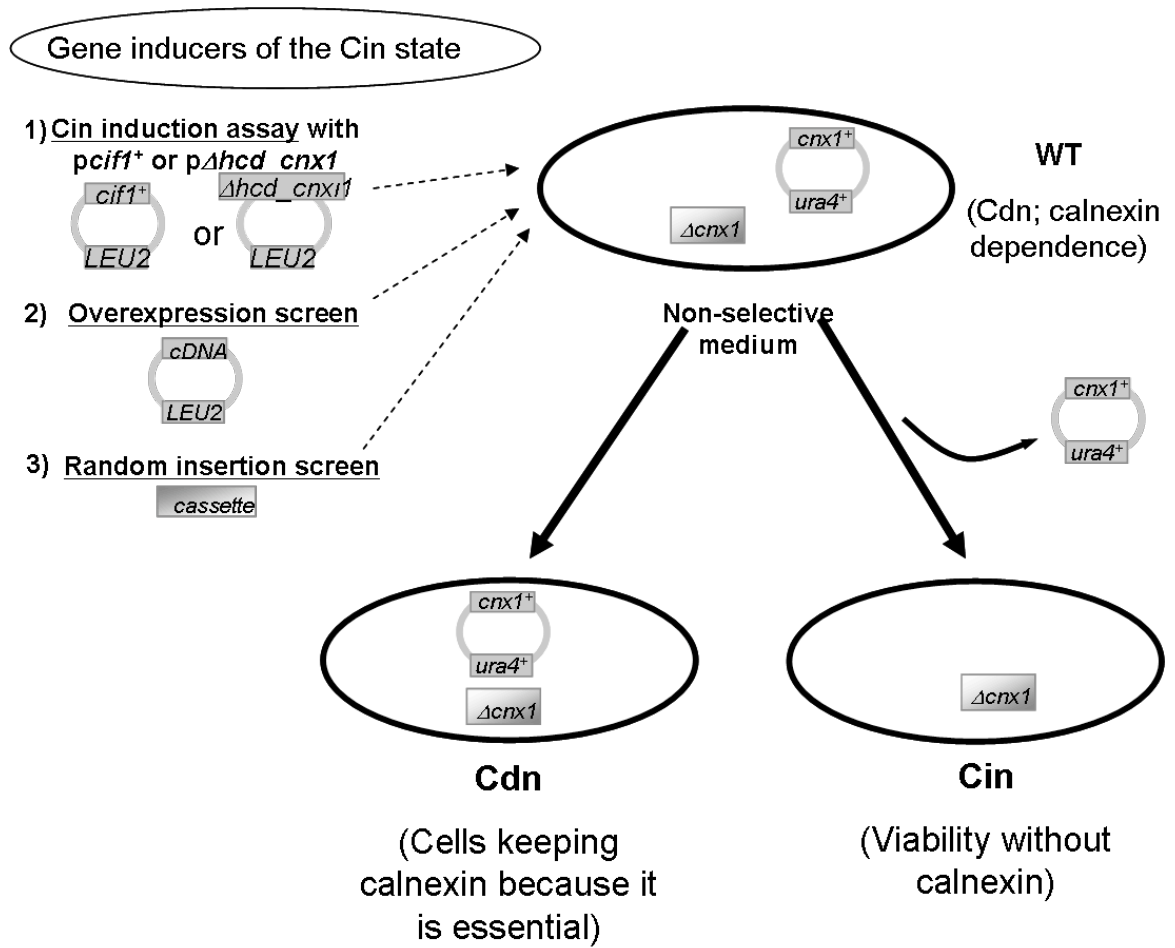


Figure 18. Induction of calnexin-independent cells: Plasmid segregation assay.

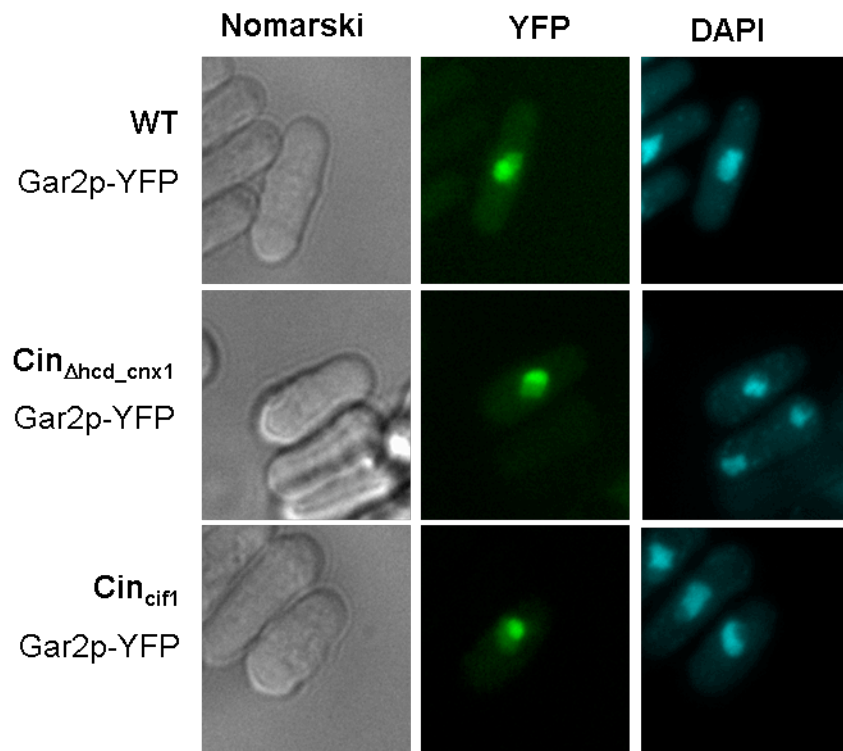


Figure 19. The shapes of the nucleus and the nucleolus are not affected in the **Cin_{Δhcd_cnx1} or **Cin**_{cif1} states.**

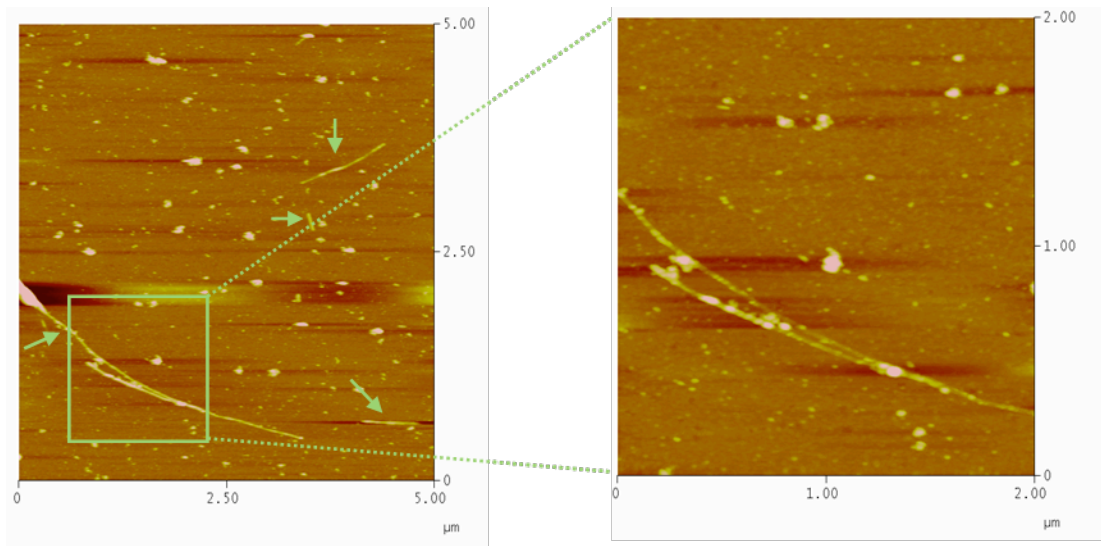


Figure 20. Cif1p forms fibers *in vitro*.

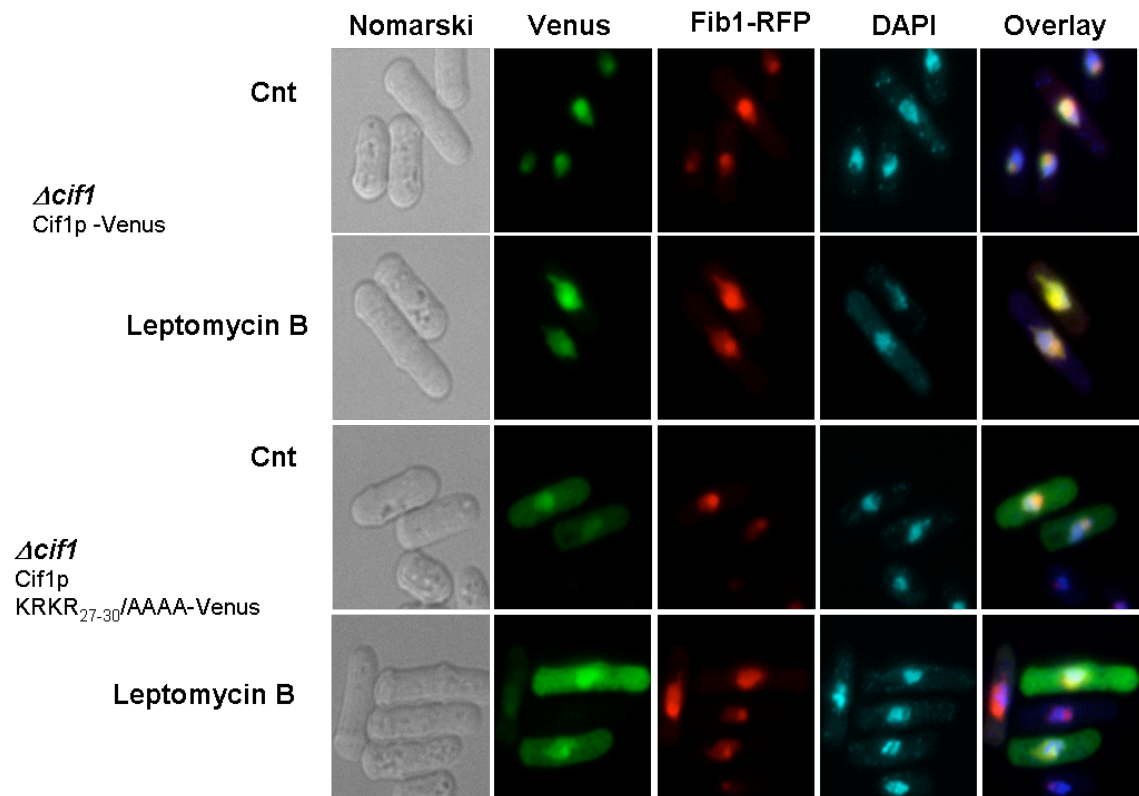


Figure 21. Leptomycin B does not affect the distribution of Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA-Venus.

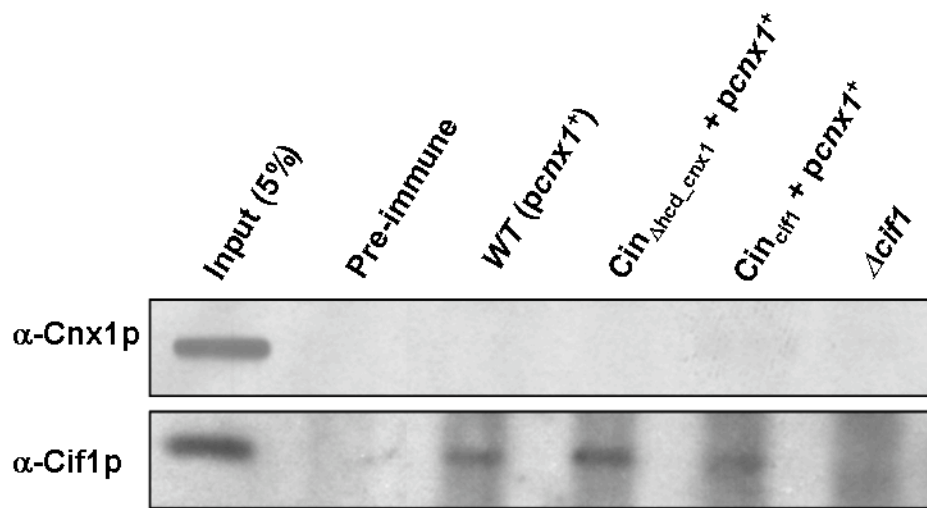


Figure 22. Cif1p and Cnx1p do not co-immunoprecipitate.

**Chapitre 4. A role of the nucleolar protein Cif1p in
ribosome biogenesis during stationary phase in
*Schizosaccharomyces pombe***

Article soumis à *Yeast* en mars 2009

4.1 Mise en contexte

Faisant suite à l'article précédent, cet article se veut une première caractérisation du rôle cellulaire de la protéine Cif1p. Localisée dans le nucléole et clivée en phase stationnaire, il apparaît que cette protéine agit sur la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire. J'ai effectué la totalité des expériences présentées dans cet article, à l'exception de la construction des mutants utilisés dans la Figure 26B.

A Role of the Nucleolar Protein Cif1p in Ribosome
Biogenesis During Stationary Phase in
Schizosaccharomyces pombe

**Pascale B. Beauregard, Renée Guérin, Alexandre Leroux,
and Luis A. Rokeach***

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.

*To whom correspondence should be sent

Running title: Cif1p in ribosome biogenesis

4.2 Summary

Ribosome biosynthesis is a highly regulated process. In stationary phase, the ribosomal content of yeast cells drops to less than 25% of the level in exponential phase. Numerous proteins were identified as playing a part in ribosome assembly, but so far the actual function of only a few ones is known. Cif1p is a nucleolar protein that was identified as a strong inducer of the epigenetic state of viability without the essential ER chaperone calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. Here, we addressed the functional characterization of Cif1p. Cif1p interacts with ribosomal proteins of the large subunit (L3, L7 and L8), but does not sediment with assembled ribosomal subunits or whole ribosomes. We show that cells deleted for *cif1*⁺ have a defect in the biosynthesis of ribosomal subunits and in the maturation of rRNA in stationary phase. Cif1p is cleaved at its *N*-terminal domain during diauxic shift and stationary phase, suggesting a role during this growth stage. Together, these results indicate that Cif1p is involved in ribosomal biogenesis during the stationary phase.

4.3 Introduction

Ribosome biogenesis is a complex process involving hundreds of different proteins. In yeast as in other eukaryotes, this process takes place in the nucleolus. It starts with the synthesis of the rRNAs, transcribed as a single long unit by RNA polymerase I. The first detectable intermediate (35S in yeast) is then successively processed by cleavage of its 5' and 3' external transcribed spacers (ETS), and of the internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2. This highly conserved processing produces the mature 18S, 5.8S and 25S rRNAs. The 18S rRNA assembles with ribosomal proteins into the 40S subunit. The 60S subunit rRNA components are the 5.8S, 25S and 5S. The latter is transcribed by RNA polymerase III [1-3].

In *Saccharomyces cerevisiae*, ribosome assembly begins with a 90S precursor that is rapidly converted into pre-60S (66S) and pre-40S (43S) particles. The 43S pre-ribosomes are then exported to the cytoplasm, while the 66S stays in the nucleolus where it continues its maturation [1,4,5]. Whereas mature yeast ribosomes are composed of only 4 rRNA and 78 proteins, over 200 different proteins were found to be part of pre-ribosomal complexes and are thought to play a role in ribosome biogenesis [6]. These *trans*-activating proteins display very diverse functions. Some of them have a role in rRNA modification, cleavage, ribosome assembly and transport, while the function of many others remains unknown [2,4,7,8]. Additionally, the precise order of assembly of the ribosomal proteins and the function of the *trans*-activating factors are poorly characterized [8]. Notably, most of these proteins are essential in *S. cerevisiae* and are conserved in mammals, suggesting a general low tolerance of eukaryotic cells for ribosome biosynthesis defects [7]. Deletion of many non-essential nucleolar proteins results in a similar molecular phenotype, characterized by a decrease in precursor accumulation and/or mature rRNA species [9].

Energy-wise, ribosome biosynthesis is an extremely expensive process. In rapidly dividing *S. cerevisiae*, cells must produce 2000 ribosomes per minute for a total of 200,000 ribosomes per cell [10]. Thus, ribosome biogenesis has to be tightly regulated, both at a macroscopic level in conjunction with other aspects of cell growth, and at a microscopic level to maintain ribosomal components at equimolar amounts in the cell. *S. cerevisiae* utilizes the transcription of ribosomal proteins as a primary mean to regulate ribosome generation, while in vertebrates this control is done at the translational level [10]. For example, high temperature and defects in the secretory pathway lead to a rapid decrease in the transcription of ribosomal protein genes [11,12]. Ribosome biosynthesis is also closely linked to cell size and division, and thus to the nutrients present in the environment [12,13]. For instance, inhibition of the nitrogen-sensing TOR pathway by rapamycin leads to repression of transcription of both rRNA and ribosomal proteins [10]. Moreover, the correct expression of the rRNA and ribosomal proteins requires an active *ras*-cAMP-protein kinase A (PKA) pathway. As the PKA pathway is involved in glucose signaling, this cascade appears to couple ribosome biosynthesis with the source and availability of carbon sources [10].

During their growth in rich media, yeast cells begin to dramatically decrease their ribosome synthesis when at least one-quarter of the original glucose is still present. This is remarkably early, as cells are at <30% of the maximum density at this stage [14]. Hence, it seems that cells can sense an unfavorable change in the nutritional supply and anticipate growth arrest. There is a slight, temporary rebound in ribosomal protein transcription when cells enter respiration [14], but when cells approach their final density they start to degrade their ribosomes. Thus, a cell in stationary phase has <25% of the ribosomes present in exponentially-growing cells. However, although in this phase the level of protein synthesis

is very low, translation is required for the maintenance of viability of cells in stationary-phase [15].

The entry of yeast cells in stationary phase is an elaborate process that activates a program for long-term survival in carbon starvation and absence of cell division [33]. Prior to attaining this stage, yeast cells in culture pass through different steps. First, exponential phase is characterized by high-rate growth and fermentation. When glucose becomes exhausted from the medium, cells adapt to a respiratory mechanism, which is called the diauxic shift. Then growth resumes at a much lower rate by utilizing energy provided by respiration. In this postdiauxic state, cells have acquired many, but not all, of the characteristics of the stationary phase. When division completely stops, cells enter the quiescent state in which they can survive for extended periods of time. The vast majority of the studies on stationary phase were carried out in *S. cerevisiae*. Indeed, the quiescent state of this yeast proved to be a good model for the $G_{(0)}$ state of non-proliferating terminally differentiated mammalian cells. In stationary-phase, budding yeast cells also acquire other specific characteristics including induction of autophagy, thermotolerance, osmotolerance, thicker cell-wall, and an overall diminished transcription and translation [32]. The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* displays much the same adaptation process to stationary phase; however, exit of the cell cycle occurs mainly in G2 [16].

Cif1p is an orphan nucleolar protein that was identified in *S. pombe* as a strong inducer of the epigenetic state of viability without the ER chaperone calnexin (Cin state) [17]. Overexpression of this protein induces a stable calnexin-independent state with specific characteristics. Notably, the nuclear localization of Cif1p is absolutely required for its effect as inducer of the Cin state. In a previous study we reported that $\Delta cif1$ cells are viable and do not display any detectable phenotype [17].

To better understand its role in the Cin induction pathway, we investigated the cellular function of Cif1p. Consistent with its nucleolar localization, we show that Cif1p interacts with ribosomal proteins of the large subunit. As Cif1p does not sediment with mature ribosomal subunits or polysomes, this suggests a role in ribosome biogenesis. Congruently, genetic depletion of Cif1p affects the biosynthesis of ribosomal subunits and the maturation of rRNA in stationary phase. When cells exit the exponential phase, the *N*-terminal end of Cif1p is cleaved during the diauxic shift, but this processing does not affect the nucleolar localization of the protein. We propose that Cif1p stimulates ribosome biosynthesis during stationary phase.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 *S. pombe* growth and media

Yeast cells were cultured in MM (Edinburgh Minimal Medium) supplemented with required nutrients as previously described [30] with 2% glucose, at 30°C. *S. pombe* transformations were performed using the PEG (polyethylene glycol)/lithium acetate procedure [31]. For stationary phase experiments, cells were diluted at OD₅₉₅ 0.05 and grown for 60 hours. Yeast strains used in this study are listed in Table XI.

4.4.2 DNA Constructs

The cloning of *cif1*⁺ and Cif1p KRKR₂₇₋₃₀/AAAA was described previously [17]. The Cif1p 27-320 mutant was constructed by PCR amplification and cloned into the *NdeI/BamHI* sites of the pREP82 vector using the primers: 364dN-term-for (5'-AAA CAT ATG AAA CGA AAA CGT TCA GAG G-3') and stop-364-BamHI (5'-AAA GGA TCC TCA AAT ATC ATC TTT TTT-3') (restriction sites are underlined). Fusion of Cif1p with the FLAG epitope and a tri-glycine linker in C-terminal was constructed by PCR amplification using the primers: forward Nde1-364-for and reverse cif1-flag-rev (5'-AGA GGA TCC TCA TTT ATC GTC ATC GTC TTT ATA GTC ACC ACC ACC AAT ATC ATC TTT TTT GGC AAT TTT TAT G -3') (epitope in bold), and cloned within the *NdeI/BamHI* sites in the pREP82 vector. The sequence coding for the ribosomal protein RpL3 fused to a V5 epitope at its C-terminus was constructed by PCR amplification on total cDNA using the primers: forward RpL3-for (5'-AAA GCA TAT GAG TCA TTG TAA ATT TGA GC-3') and reverse RpL3-V5-rev (5'-AAA GGT CGA CTT AAC CAG AAT CAA GAC CAA GAA GAG GGT TAG GGA TAG GCT TAC CGG TAG CGA CAT CCT TCT TGA G-3'). The PCR product was then cloned within *NdeI/Sall* sites in the pREP82 vector. All constructions were sequenced to verify their integrity.

4.4.3 FLAG purification and immunoprecipitation

100 mL of exponentially growing cells (SP10512 and SP10508) were used for the FLAG purification, and 15 mL of exponentially growing cells or 5 mL of early stationary phase cells (60 hours after dilution to OD₅₉₅ 0.05) were used for immunoprecipitation. Cell extracts were prepared by lysing the cells in 150 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM iodoacetamide, 1mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin A and 1 mg/mL phenantroline) with 0.25 mL of glass beads for 4 pulses of 30 seconds in a bead-beater apparatus. 400 µL of lysis buffer was added to the solution, the broken cells were spun down for 5 minutes at 10,000Xg, and the supernatant was collected. This step was done twice, and the protein extracts were centrifuged 15 minutes at 13,000Xg in a microcentrifuge.

For FLAG purification, pre-clearing was done on 800 µL of extract by a 3 hours incubation with 20 µL of EZview™ Red Protein A Affinity Gel (Sigma P-6486) at 4°C with gentle rocking. Binding was performed overnight with 20 µL anti-flag® M2 Affinity Gel (Sigma A-2220; prepared according to the manufacturer's instructions) at 4°C, with gentle rocking. Beads were collected by a 1 minute centrifugation in the cold, and washed 3 times with 700 µL of ice-cold lysis buffer. Then, beads were resuspended in 30 µL of 2.5X sample buffer and boiled for 5 minutes. The equivalent of the whole FLAG-purification was loaded on a 12% SDS-PAGE gel and stained by Coomassie blue to reveal proteins. Candidate protein bands were cut out and identified by LC-MS/MS (Proteomics Platform at IRIC, Université de Montréal).

For the anti-V5 immunoprecipitation, pre-clearing was done by incubating the extracts with 50 μ L of 10% Protein A-sepharose (GE; prepared in lysis buffer) for 1 hour at 4°C with slight agitation. Extracts were then incubated overnight with anti-V5 antibodies (at a 1:300 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA), and 50 μ L of 10% Protein A-Sepharose was added and incubation continued for 1 additional hour. Beads were collected by centrifugation for 1 minute in the cold, washed 4 times with 750 μ L of ice-cold lysis buffer, and resuspended in 50 μ L of 2.5X sample buffer. The equivalent of the half immunoprecipitation reaction was loaded and resolved on a 12% SDS-PAGE gel. Input corresponds to 0.5% of the total amount of proteins used for immunoprecipitation.

4.4.4 Immunoblotting

After SDS-PAGE gel, proteins were transferred on a nitrocellulose membrane, and blotting was performed with appropriate antibodies. Rabbit polyclonal antibody against Cif1p [17] and anti-V5 antibody were used at a 1:5,000 dilution.

4.4.5 Ribosomal profiling

50 mL of exponentially growing cells (SP8890 and SP8912) or 10 mL of early stationary phase cells (60 hours after dilution to OD₅₉₅ 0.05) were used for polysome profiling. Cycloheximide was added to a final concentration of 100 μ g/mL and cells were incubated on ice for 15 minutes. Cells were then washed with ice-cold polysome lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL cycloheximide, 0.2 mg/mL heparin, 10 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL pepstatin A and 1 mg/mL phenantroline, prepared in DEPC water) and resuspended in 750 μ L of the same buffer. Cells were lysed by bead-beating (4 times, 30 seconds), and extracts were centrifuged at 7,000Xg for 10 minutes in cold to remove beads.

Supernatant was cleared with a 13,000Xg spin for 10 minutes at 4°C and loaded on top of a 10-35% or 15-45% sucrose gradient (prepared in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM NH₄Cl and 4 mM Mg(OAc)₂). Ultracentrifugation was performed at 38,000 rpm with a Sorvall TH641 rotor. Twelve fractions of 800 µl were recovered and the ribosomal profile was monitored at OD₂₅₄ with a gradient fractionator (ISCO, Lincoln, USA). For immunoblotting, 20 µL of each fraction were loaded on a 10% SDS-PAGE gel.

4.4.6 Northern blotting

RNA and membrane were prepared as described previously [272] from WT (SP8890) and $\Delta cifI$ (SP8912) cell extracts. 5' ETS probe was done using the specific oligonucleotide 5'-CGT TTC TCT GAA GAC AAG GAA ATT GCC AGC-3'. Labeling of the probe was performed using 10 U of T4 polynucleotide kinase (Fermentas, Hanover, MD) used according to the manufacturer's instructions. After pre-incubation in hybridization solution (0.25 mM sodium phosphate pH 7.0, 7% SDS) at 65°C for 1 hour, the membrane was incubated with 5 X 10⁶ cpm of probe in 25 mL of hybridization solution O/N at 42°C. Membranes were washed once with 2X SSC for 10 minutes at 42°C.

4.4.7 Microscopy

Exponentially growing (OD₅₉₅ 0.5) or stationary phase (60 hours after dilution to OD₅₉₅ 0.05) cells (SP10370) were fixed and examined as previously described [272]. Microscopy analyses were 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.

4.5 Results

4.5.1 Screen to identify interacting partners of Cif1p

As Cif1p has no characterized homologues and does not display sequence similarity with known proteins, we used a global approach to address its cellular function by identifying proteins interacting with Cif1p. To this end, we tagged Cif1p in C-terminal with the FLAG epitope and expressed this construct at near endogenous levels in *Δcif1* cells. Protein complexes containing Cif1p-FLAG were then purified from cell extracts by immunoprecipitation with anti-FLAG antibodies coupled to agarose beads, and resolved on an SDS-PAGE gel (Figure 23). To discriminate true interactants from possible contaminants, a Venus-FLAG co-purification was run in parallel. Protein bands appearing in both purifications were considered as background and ignored. Using this approach, five specifically immunoprecipitated bands were recovered in the Cif1p-FLAG lane and analyzed by mass spectrometry. Three of these bands were identified as proteins of the large ribosomal subunit: L3, L7 and L8. One other band corresponded to L20 but was contaminated with a glycolytic enzyme. The fifth band corresponded to Cif1p. Considering the highly basic nature of Cif1p (pI of 10.4) and its nucleolar localization, these results suggest that Cif1p interacts with either ribosomal protein complexes or mature ribosomes.

4.5.2 Cif1p interacts with the ribosomal protein L3 but does not sediment with ribosomal subunits or polysomes

Ribosomal protein L3 (RpL3) gave the strongest signal in the Cif1p-FLAG immunoprecipitation. Since no antibodies were available to detect this protein in *S. pombe*, a V5-epitope tagged version of RpL3 was constructed to confirm the specificity of the interaction with Cif1p. Anti-V5 immunoprecipitation followed by immunoblotting confirmed that Cif1p interacts with RpL3 in exponential phase (Figure 24A, lane 7). To

determine if the interaction was growth-phase specific, the experiment was repeated using stationary phase cultures (60 hours after inoculation of the culture at OD₅₉₅ 0.05). As shown in Figure 24A (lane 8), the Cif1p/RpL3 ratio was 4.5 times higher in stationary phase than in exponential phase, suggesting that the interaction is increased in this growth stage. In contrast to exponential phase, multiple immunoprecipitated bands of Cif1p were visible in stationary phase, suggesting that RpL3 forms protein complexes with different post-translationally modified variants of Cif1p.

Because Cif1p interacts with the ribosomal protein L3 and is located in the nucleolus, it was of interest to investigate whether Cif1p sediments with whole ribosomal subunits and/or polysomes. Accordingly, extracts of exponential or stationary phase WT cells were layered onto 10-35% sucrose gradients and separated by ultracentrifugation. Ribosome profiles were examined by monitoring of OD₂₆₀ and fractions were collected. The presence of Cif1p in these fractions was investigated by Western blotting. As shown in Figure 24B, Cif1p remains in the upper part of the gradient and does not sediment with either the 40S or the 60S subunit, nor with whole ribosomes. This suggests that Cif1p interacts with ribosomal proteins (L3, L7 and L8) prior to their integration into ribosomal subunits. This is supported by the fact that Cif1p-FLAG purification did not retrieve a wide range of ribosomal proteins, which would have been the case if Cif1p associated with whole ribosomal subunits. Together, these observations suggest a role of Cif1p in the early steps of ribosome biogenesis.

4.5.3 *Δcif1* cells exhibit defects in ribosomal biosynthesis in stationary phase

To investigate if Cif1p has a role in ribosome biosynthesis, we studied a *Δcif1* strain. This *Δcif1* strain did not display gross defects, and grew at the same rate as WT cells (not shown). The levels of ribosomal subunits and ribosomes in both exponential and

stationary phase were examined for WT and $\Delta cifl$ cells by sedimentation in sucrose gradients and monitoring of OD₂₆₀. As shown in Figure 25A, $cifl^+$ deletion modified the ribosome pattern in exponential and stationary phase as compared to WT cells. Analysis of each peak indicated that $\Delta cifl$ cells display a 20% reduction of the total amount of ribosomal subunits in both conditions, mainly attributed to a diminution/displacement of the 40S peak (up to 50% as compared to WT). The effect of $cifl^+$ deletion was particularly severe during stationary phase, which already diminished the total amount of ribosomal subunits. It thus appears that absence of Cif1p affects the biosynthesis of ribosomal subunits, especially in stationary phase.

To further investigate this phenomenon, we examined the effect of the knockout of $cifl^+$ on the maturation of rRNA precursors in exponential and stationary phase cells. Northern blotting with probes specific to rRNA precursors 5' ETS revealed that knocking out $cifl^+$ has a minor impact on the maturation of rRNA in exponential phase. By contrast, in stationary phase, $\Delta cifl$ cells displayed a 1.5 fold increase in the accumulation of the 35S rRNA precursor in comparison with WT cells (Figure 25B). These results indicate that $cifl^+$ affects the levels of rRNA maturation in stationary phase, and correlates with the observation that $\Delta cifl$ cells exhibit a modest reduction in ribosomal biosynthesis in stationary phase.

As ribosomal biosynthesis is essential for the viability of cells in stationary phase [15], it was of interest to evaluate the long-term survival of $\Delta cifl$ cells. Accordingly, WT and $\Delta cifl$ cells were cultured in minimal media for 14 days, and their viability was analyzed by spotting serial dilutions. The absence of Cif1p had no impact on the viability and/or re-growth of cells, indicating that its effect on ribosome biogenesis in stationary phase is not crucial for cells during the length of time and conditions tested (not shown).

4.5.4 Cif1p is cleaved in stationary phase but remains in the nucleolus

In Western blots with specific antibodies, Cif1p appears as two or three bands when protein extracts are prepared from stationary phase cells (Figure 24A). To investigate whether Cif1p is subjected to a specific post-translational modification, WT cells were cultured in minimal media and samples were taken at different time points, while growth was monitored by measuring OD₅₉₅. Western blotting revealed that most of Cif1p undergoes a size downshift at 36 hours, which corresponds to entry into diauxic shift (Figure 26A). The lower Cif1p band corresponds to a reduction of molecular mass of approximately 1-2 kDa with respect to the band detected during exponential phase. Following the diauxic shift, this second Cif1p species is observed through the remaining growth of the cells in stationary phase. Thus, it seems that Cif1p is subjected to a post-translational modification when cells exit exponential phase. The simplest explanation for the appearance of a second faster-moving band is that Cif1p is subject to a cleavage restricted to this stage of growth.

To further examine this post-translational processing of Cif1p, we used two different mutants of this protein (Figure 26B, upper panel). The first one, Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA, contains a quadruple point mutation replacing the first four basic residues of the nucleolar localization signal of Cif1p for alanine residues. This mutation was shown to disrupt the nuclear/nucleolar accumulation of Cif1p [272]. The second mutant, Cif1p 27-320, is deleted for the first 26 residues of Cif1p. Both mutants were cloned under the control of the weak *nmt*^{***} promoter, which provides a level of *cif1*⁺ expression comparable to the endogenous gene. As shown in Figure 26B (lower panel), Western blotting with anti-Cif1p antibodies did not reveal a faster moving band in cell extracts of *cif1*₂₇₋₃₂₀ cells in stationary phase. This result strongly suggests that in stationary phase, Cif1p is modified within the first 26 residues of the protein. That the post-translational

modification is *N*-terminal was confirmed using a c-Myc tagged version of Cif1p (not shown). The size of the post-translational downshift (corresponding to 10-20 amino acids) and the fact that the *N*-terminal region of Cif1p does not contain any phosphorylation or other predicted modification site indicate that Cif1p is subjected to a proteolytic cleavage during stationary phase. Importantly, the nuclear localization mutant Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA still displays a lower cleaved band during stationary phase. As the Cif1p-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA does not accumulate in the nucleus/nucleolus, this observation suggests that the stationary-phase specific cleavage occurs at least in part in the cytoplasm.

Since the cleavage site of Cif1p is located near its NLS, this post-translational modification could affect the transport of the protein from the cytoplasm to the nucleolus in stationary phase. To test this possibility, a Cif1p-Venus fusion was expressed in WT cells, and its localization was examined both in exponential phase and after 60 hours of growth. As shown in Figure 26C, Cif1p-Venus co-localized with the nucleolar marker fibrillarin (Fib1p-mRFP) both in exponential and stationary phase. These results indicate that Cif1p cleavage does not affect the nucleolar localization of the protein during stationary phase.

4.6 Discussion

We addressed the biological role of the orphan protein Cif1p, previously identified as a strong inducer of the epigenetic state of viability without calnexin. Purification of Cif1p-FLAG complexes and further immunoprecipitation revealed that Cif1p interacts with the ribosomal protein L3. Cif1p does not interact with mature ribosomal subunits or whole ribosomes, but rather interacts with a subset of ribosomal proteins. Experiments with *Δcif1* cells indicate that Cif1p modulates ribosome biogenesis in stationary phase. Cif1p is cleaved at its *N*-terminus during diauxic shift, suggesting a specific role of the protein during this stage of cell growth.

FLAG-purification and immunoprecipitation revealed that Cif1p interacts with a subset of ribosomal proteins of the large subunit including L3. However, as demonstrated by polysome profiling, Cif1p does not interact with ribosomal subunits or with whole ribosomes. Also, Cif1p does not sediment with the 90S pre-ribosome complex, in which the 35S rRNA is matured into its individual components [1,2]. This is consistent with the fact that the 90S pre-ribosomal complex does not contain synthesis factors or ribosomal proteins of the large subunit [18]. We propose that Cif1p interacts with the ribosomal proteins L3, L7 and L8 individually or in a complex that precedes their integration in the late 90S or pre-60S ribosomal subunit. Supporting this hypothesis, we show that Cif1p modulates ribosome biosynthesis, especially in stationary phase.

Whilst it occurs at a lower level, translation is an essential process in stationary phase [15]. As Cif1p is not essential for the viability and its knockout does not affect survival in stationary phase, its effect on ribosome biosynthesis is not crucial under these conditions. This observation suggests that the function of Cif1p on ribosome biogenesis in stationary phase is redundant. Nevertheless, its role in ribosome biosynthesis could be

fundamental in other growth conditions such as those in natural settings. Indeed, studies in *S. cerevisiae* showed that there is a wide heterogeneity among ribosomes, both at the level of protein composition and post-translational modification [19,20]. For example, in stationary phase, *S. cerevisiae* ribosomes have 40% less acidic proteins than exponential phase ribosomes [21]. Thus, one could hypothesize that Cif1p has a role required for the biosynthesis of a subset of ribosomes present at higher levels in stationary phase than in exponential phase. As the knockout of *cif1*⁺ has an impact both on the maturation of rRNA and on the assembly of subunits, these observations suggest a role for Cif1p in the first steps of ribosome biosynthesis. Similarly to Cif1p, a yeast homolog of chromatin assembly factor 1 (Rrb1p) was shown to be involved in early ribosome assembly by facilitating the deposition of RpL3 on the 90S precursor [22,23]. Although Rrb1p and Cif1p do not share primary sequence homology, a similar role for Cif1p is plausible.

While studying Cif1p, we found that the protein is specifically cleaved upon entry in stationary phase, thus providing a potential explanation for its growth-phase related activity. During diauxic shift and entry in stationary phase, cells undergo numerous changes. Except for a subset of genes, the overall gene expression and translation are downregulated. Moreover, the cell's metabolism switches from fermentation to respiration and β -oxidation. Thus, many proteins undergo post-transcriptional modifications (reviewed in [24]), but little is known about protease activation during this stage of growth. In *S. pombe*, several proteases are related to autophagy and starvation, processes that are associated with stationary phase [25-27]. However, the whole protease system remains largely unknown [25], and it makes it difficult to delimitate protease(s) that could be responsible of Cif1p cleavage. The cleavage appears to take place within the first 26 amino acids of Cif1p, and is predicted to leave the NLS of Cif1p intact. That the cleavage does not affect the NLS sequence correlates with the observation that truncated Cif1p has the same localization than full-length Cif1p. Interestingly, analysis of this sequence did not reveal a consensus cleavage sequence for a known protease. However, deletion of a broad-

specificity protease, PrB/Isp6p, reduced the cleavage of Cif1p (not shown). Since this protease is located in the vacuole, the effect on Cif1p, a nucleolar protein, is clearly indirect. Nevertheless, our study reinforces the link between autophagy, nucleolar proteins processing and ribosome biogenesis.

Initially, Cif1p was discovered as a strong inducer of an epigenetic state of viability without calnexin, a multifunctional essential ER protein involved in translocation, protein folding, quality control, and ER-stress induced apoptosis [28]. Here we demonstrate a role of Cif1p in ribosome biosynthesis in stationary phase, thus possibly uncovering its involvement in a functional crosstalk between the nucleolus and the ER. Indeed, both ribosome biogenesis and ER functions (such as membrane and protein biosynthesis) are tightly coordinated with cell growth [10, 29]. Further exploration of the cellular role(s) of Cif1p should shed light on the functional interactions between these two cell compartments.

4.7 Acknowledgments

We thank Dr Atsushi Miyawaki (RIKEN, Japan) for providing the clone encoding the Venus YFP variant, Laurent Cappadocia for help with the Northern blotting, Nicolas Paquin and Dr Marc Drolet for help with the ribosomal profiling. We thank all members of the Rokeach lab and Alexandre Maréchal for fruitful discussions and critical reading of this manuscript.

4.8 References

1. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313: 17-42.
2. Nazar RN (2004) Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life* 56: 457-465.
3. Good L, Intine RV, Nazar RN (1997) The ribosomal-RNA-processing pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* 247: 314-321.
4. Henras AK, Soudet J, Gerus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, et al. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 65: 2334-2359.
5. Fatica A, Tollervey D (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14: 313-318.
6. Krogan NJ, Peng WT, Cagney G, Robinson MD, Haw R, et al. (2004) High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* 13: 225-239.
7. Dlakic M (2005) The ribosomal subunit assembly line. *Genome Biol* 6: 234.
8. Kressler D, Linder P, de La Cruz J (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 7897-7912.
9. Venema J, Tollervey D (1995) Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 1629-1650.
10. Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24: 437-440.
11. Mizuta K, Warner JR (1994) Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol Cell Biol* 14: 2493-2502.
12. Rudra D, Warner JR (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev* 18: 2431-2436.
13. Waldron C, Lacroute F (1975) Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol* 122: 855-865.

14. Ju Q, Warner JR (1994) Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 151-157.
15. Granot D, Snyder M (1993) Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast* 9: 465-479.
16. 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.
17. Beauregard PB, Guérin R, Turcotte C, Lindquist S, Rokeach LA (2009) A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin. *Journal of Cell Science* [Accepted : 5 january 2009].
18. Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, et al. (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10: 105-115.
19. Komili S, Farny NG, Roth FP, Silver PA (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131: 557-571.
20. Mauro VP, Edelman GM (2007) The ribosome filter redux. *Cell Cycle* 6: 2246-2251.
21. Saenz-Robles MT, Remacha M, Vilella MD, Zinker S, Ballesta JP (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta* 1050: 51-55.
22. Schaper S, Fromont-Racine M, Linder P, de la Cruz J, Namane A, et al. (2001) A yeast homolog of chromatin assembly factor 1 is involved in early ribosome assembly. *Curr Biol* 11: 1885-1890.
23. Iouk TL, Aitchison JD, Maguire S, Wozniak RW (2001) Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis. *Mol Cell Biol* 21: 1260-1271.
24. Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, et al. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 187-206.

25. Idiris A, Tohda H, Bi KW, Isoai A, Kumagai H, et al. (2006) Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 404-420.
26. Idiris A, Bi K, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y (2006) Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast* 23: 83-99.
27. Nakashima A, Hasegawa T, Mori S, Ueno M, Tanaka S, et al. (2006) A starvation-specific serine protease gene, *isp6+*, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 49: 403-413.
28. Guérin 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.
29. Lowe M, Barr FA (2007) Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 429-439.
30. Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194: 795-823.
31. Elbe R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13: 18-19.
32. Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A. and Werner-Washburne, M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**:187-206
33. Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM. (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 19(6):1159-66

4.9 Legends

Figure 23. Interaction partners of Cif1p. Cif1p-FLAG purification identified the ribosomal proteins L3, L7 and L8. A Cif1p-FLAG construction was expressed at near endogenous levels in $\Delta cif1$ cells (SP8912) in exponential phase. Purification was done with agarose beads conjugated with anti-FLAG antibodies in native conditions. Interacting proteins were resolved by SDS-PAGE and revealed by Coomassie blue staining. Mass-spectrometry analysis was carried out for bands present in the Cif1p-FLAG lane but absent in the negative control (Venus-FLAG).

Figure 24. Cif1p interacts with ribosomal protein L3 but does not sediment with ribosomal subunits or mature ribosomes. (A) Ribosomal protein L3 interacts with Cif1p. Immunoprecipitations were performed on exponentially growing (OD_{595} 0.5) or stationary phase (60 hours after dilution to OD_{595} 0.05) WT cells (SP556) expressing or not the ribosomal protein L3 tagged with a V5 epitope (RpL3-V5) using anti-V5 antibodies. Bound Cif1p was detected by immunoblotting using the appropriate antibodies as described in Materials and Methods. Stars indicate post-translationally modified variants of Cif1p. Results are representative of two independent repeats. (B) Extracts from WT cells (SP8890) in exponential or stationary phase were fractionated on 10-35% sucrose gradients. Ribosomal profiling was performed by monitoring OD_{260} . The presence of Cif1p in the different fractions was examined by Western blotting. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 25. Cif1p is necessary for the correct biosynthesis of ribosomal subunits in stationary phase. (A) Extracts from WT (SP8890) and $\Delta cif1$ (SP8912) cells in exponential (OD_{595} 0.5) or stationary (60 hours growth after dilution to OD_{595} 0.05) phase were fractionated on a 10-35% sucrose gradient. Ribosomal profiling was performed by monitoring OD_{260} . (B) Northern blot of rRNA precursor. Samples of 5 μ g of total RNA from WT and $\Delta cif1$ cells in exponential or stationary phase were loaded on a 1.2% agarose-formaldehyde gel. Upper panel: RNA was probed with a 32 P-labelled DNA oligonucleotide specific for the 5' external transcribed spacers (ETS). Band quantification was done using the Quantity One software (Biorad). Lower panel: total RNA stained by ethidium-bromide is shown as a loading control. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 26. Cif1p is cleaved in stationary phase but remains in the nucleolus. (A) Examination of Cif1p by Western blotting during cell growth. WT cells (SP8890) were diluted at OD_{595} 0.05 in MM, and growth was followed by spectrometry at $\lambda = 595$ nm. Samples of cultures were collected every 12 hours and used to prepare cell extracts as described in Materials and Methods. 10 μ g of material was loaded for fractionation on a 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Western blotting was carried out using rabbit polyclonal anti-Cif1p serum at a 1:2,500 dilution. (B) Western blotting of Cif1p mutants (SP10419, SP10421, SP10423) in exponential (OD_{595} 0.8-1) and stationary (60 hours after dilution to O.D.₅₉₅ 0.05) phase. 10 μ g of cell extracts were loaded for fractionation on a 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Upper panel: mutants used in the study. NLS = Nuclear Localization Signal, arrow indicate the potential cleavage site. Lower panel: Western blotting was carried out using rabbit polyclonal anti-Cif1p serum at a 1:2,500 dilution. Results are representative of at least three independent experiments. (C) Nucleolar localization of Cif1p. Exponentially growing or stationary phase WT cells (SP556) expressing a Cif1p-Venus fusion and a

Fib1p-mRFP fusion (nucleolar marker) were fixed as described in Materials and Methods. Slides were mounted with a DAPI-containing media as a nucleus marker (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI, 1 mg/mL *p*-phenylenediamine, 90% glycerol). Cells were examined by fluorescence microscopy. Nomarski, Venus, Fib1-mRFP, DAPI and merge show the same fields for each strain.

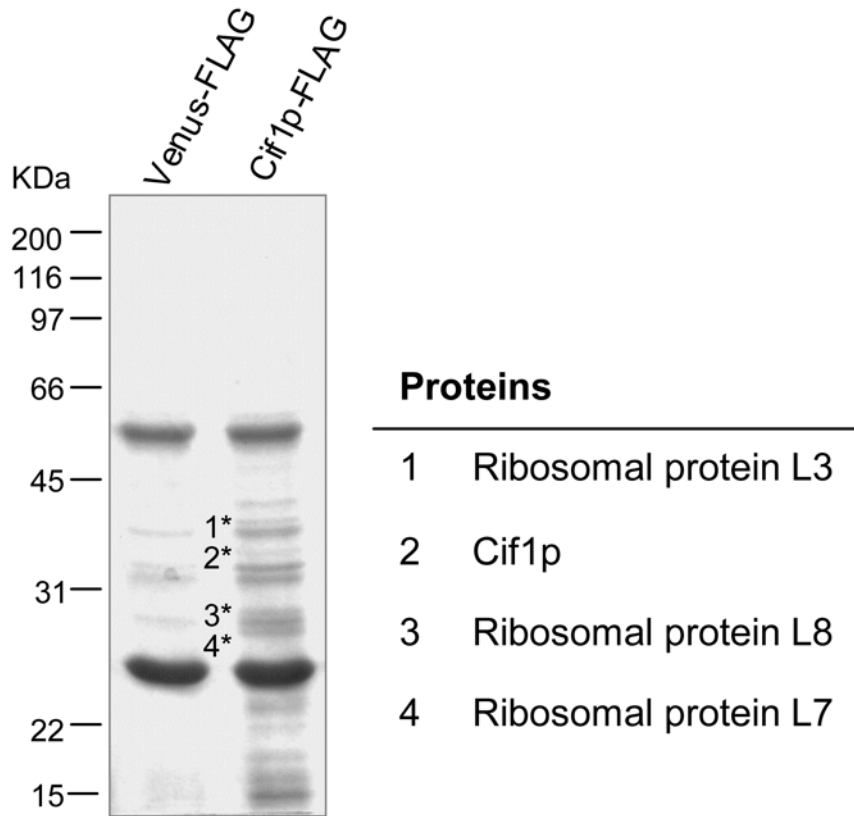


Figure 23. Interaction partners of Cif1p.

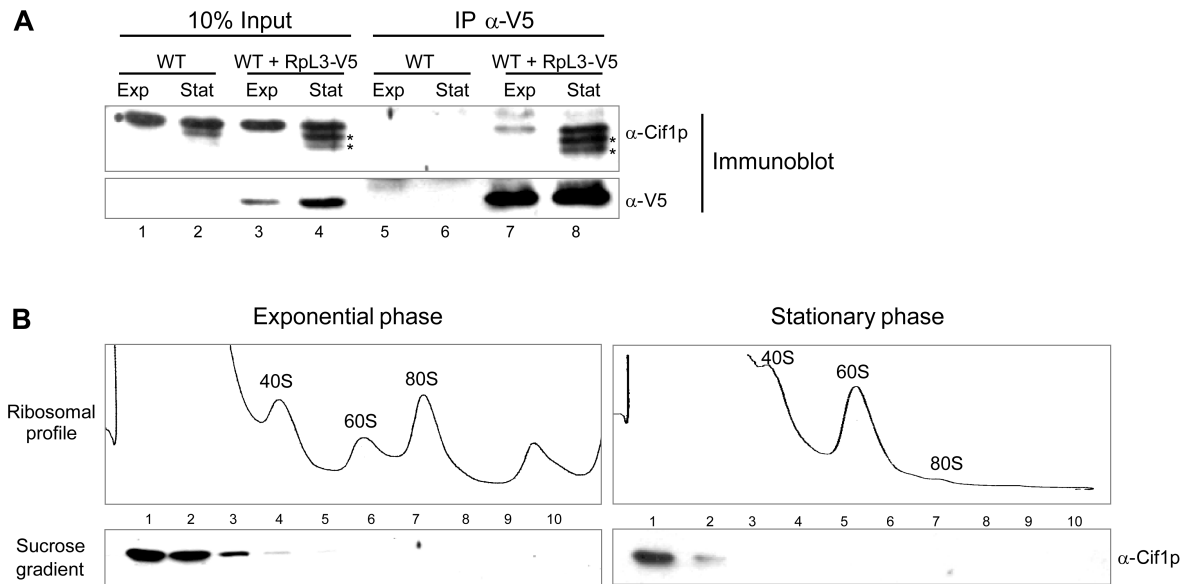


Figure 24. Cif1p interacts with ribosomal protein L3 but does not sediment with ribosomal subunits or mature ribosomes.

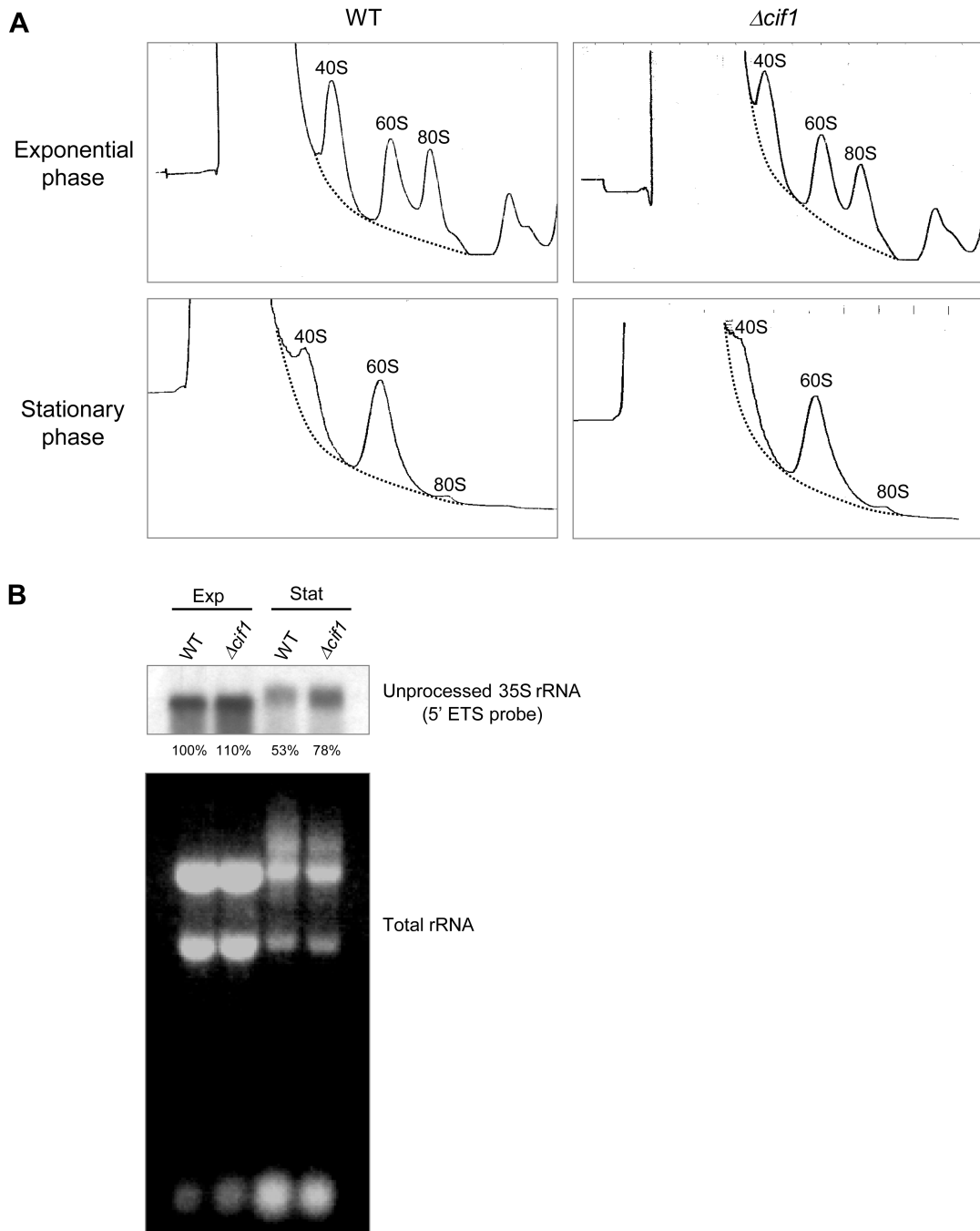


Figure 25. Cif1p is necessary for the correct biosynthesis of ribosomal subunits in stationary phase.

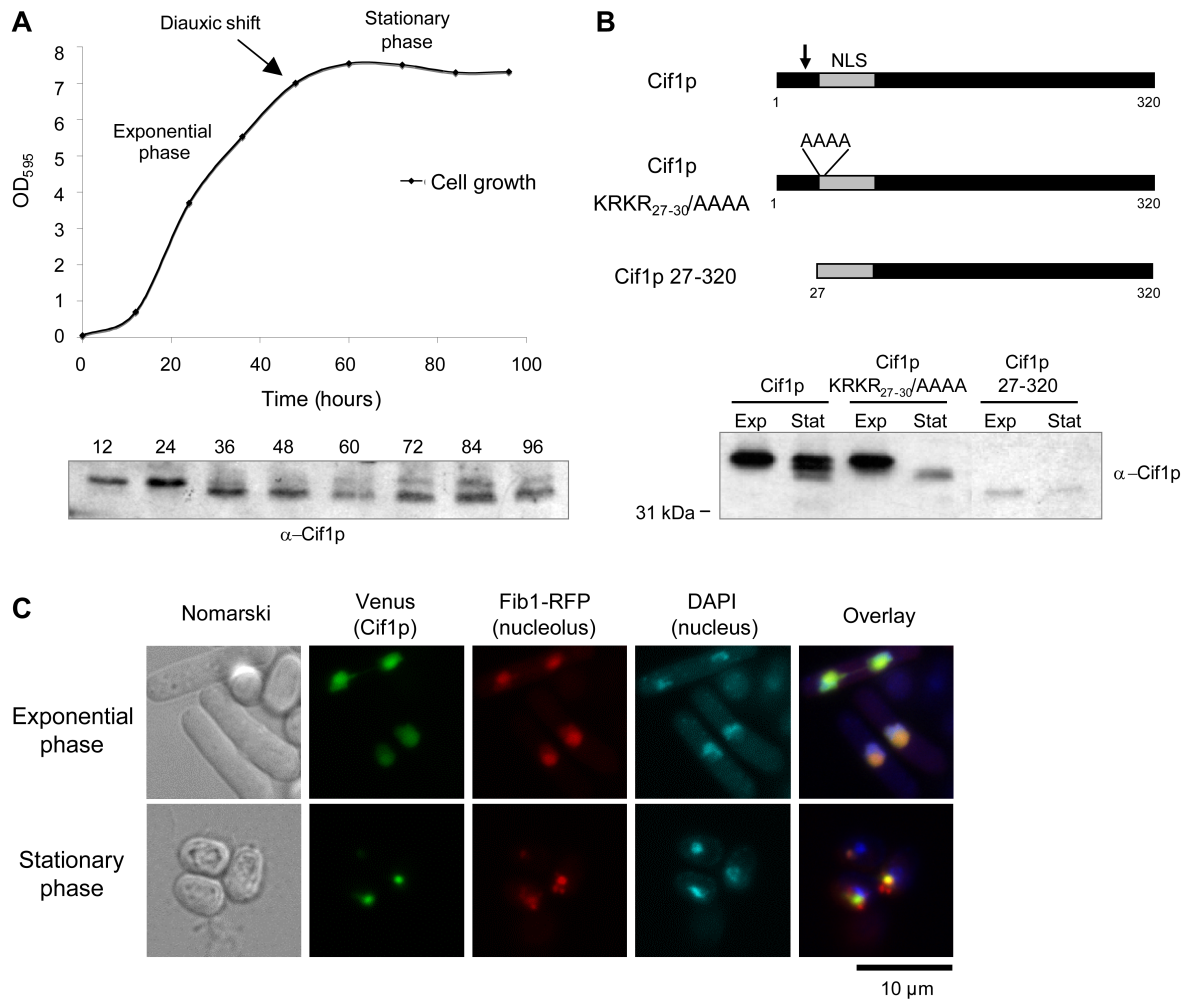


Figure 26. Cif1p is cleaved in stationary phase but remains in the nucleolus.

Strain	Genotype	Source
SP556 (WT)	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Paul Nurse Lab
SP8890 (WT)	<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 his3D1</i>	Derived from Bioneer
SP8912 ($\Delta cif1$)	<i>h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 his3D1 cif1::kanMX4</i>	(Beauregard <i>et al.</i> , 2009)
SP10512	SP8912 + pREP82- <i>Venus-FLAG</i>	This study
SP10508	SP8912 + pREP82- <i>cif1-FLAG</i>	This study
SP10545	SP556 + pREP82- <i>rpl3-V5</i>	This study
SP10419	SP8912 + pREP82- <i>cif1</i> ⁺	This study
SP10423	SP8912 + pREP82- <i>cif1-KRKR₂₇₋₃₀/AAAA</i>	This study
SP10421	SP8912 + pREP82- <i>cif1-27-320</i>	This study
SP10370	SP556 + pREP41X- <i>fib1</i> -mRFP + pREP42- <i>cif1-Venus</i>	(Beauregard <i>et al.</i> , 2009)

Table XI. Yeast strains used in this study.

Discussion

5.1 L'état de viabilité en l'absence de la calnexine

5.1.1 Signalisation et maintenance de l'état Cin

L'état de viabilité en l'absence de la calnexine, ou état Cin, a été découvert suite à l'expression d'un mutant spécifique de la calnexine. Ce mutant, dépourvu de domaine central hautement conservé (Δhcd_Cnx1p), induit l'état Cin de façon stochastique dans environ 70% des cellules. Tel que rapporté dans [233], nous avons observé que l'état Cin est médié via un élément de type prion. En effet, l'état Cin montre plusieurs caractéristiques propres aux prions telle la dominance dans des cellules diploïdes et la transmission non-Mendélienne. Surtout, cet état peut être transféré d'une cellule à une autre par des extraits protéiques dépourvus d'acides nucléiques. Deux modèles expliquant comment un prion peut moduler la viabilité d'une cellule en l'absence d'une protéine essentielle sont présentés à la Figure 13.

L'état Cin est un nouvel état cellulaire dans lequel la calnexine n'est plus nécessaire à la survie. Puisque naturellement les cellules de *S. pombe* ne perdent pas spontanément la séquence encodant la calnexine, l'émergence de l'état Cin, qui pallie pour la fonction essentiel de la calnexine, permettait à la cellule de composer avec un environnement très exigeant dans lequel la calnexine n'est plus suffisante. Dans ce cas, l'induction de Cin par un mutant de la calnexine apparaît logique; Δhcd_Cnx1p doit posséder une caractéristique structurale particulière qui se retrouve aussi chez une calnexine non-fonctionnelle ou soumise à un stress trop élevé. L'induction de l'état Cin par Δhcd_cnx1 en présence de la calnexine sauvage élimine la possibilité que cet état découle d'une perte de fonction de la calnexine. Il est plus probable que Δhcd_Cnx1p établisse de nouvelles interactions, soit directement avec le prion ou en déclenchant une voie de signalisation, dont l'aboutissement est le changement de conformation du prion. Il est intéressant de signaler qu'un mutant Δhcd_Cnx1p dépourvu de queue cytosolique n'induit pas l'état Cin. Ceci renforce

l'hypothèse que Δhcd_Cnx1p établisse une nouvelle interaction, qui de plus serait localisée au niveau du cytosol ou du noyau. La localisation cytosolique et nucléaire des différents inducteurs de Cin trouvés dans les deux criblages génétiques subséquents viennent appuyer que l'état Cin n'est pas confiné au RE mais agit dans l'ensemble de la cellule [283].

Pourquoi la cellule utilise-t-elle un mécanisme modulé par un prion pour pallier un défaut de fonction d'une de ses protéines? Tout comme une mutation génétique, un prion peut encoder un nouveau phénotype stable et transmissible à la progéniture mitotique et méiotique. Contrairement à une mutation, les prions peuvent cependant survenir plus fréquemment, et leur apparition peut être stimulée par certaines conditions cellulaires. De plus, ils sont plus facilement éliminés de la cellule et ne laissent pas de traces permanentes.

La fonction essentielle de la calnexine reste nébuleuse, mais est fort probablement reliée à des stress créés par le mauvais repliement des protéines dans le RE et/ou une voie de signalisation menant à l'apoptose. En situation naturelle, ces deux conditions peuvent apparaître brusquement. Ainsi, la présence d'un prion constitue un mécanisme à la fois stable, transmissible et flexible pour pallier à des changements soudains des conditions de vie de la cellule.

5.1.2 Fonction(s) de l'état Cin

Les prions sont associés à une maladie seulement dans les cellules de mammifères. Dans le cas des levures, champignons ou même dans le cas d'une protéine de l'aplysie, les prions peuvent conférer des avantages non négligeables à la cellule [120, 124, 136]. Dans le cas de Cin, le prion ou la voie modulée par celui-ci apporte de nombreux avantages à la cellule car il compense pour plusieurs, mais pas toutes, les fonctions de la calnexine.

Tout en permettant la viabilité de *S. pombe* en l'absence de la calnexine, l'état Cin ne comble pas certaines fonctions que celle-ci exerce dans le RE. En effet, les cellules Cin ont un défaut dans la formation de la paroi cellulaire et dans le repliement de certaines protéines sécrétées [238]. Cependant, la voie du UPR n'est pas activée dans les cellules Cin, signifiant que l'absence de calnexine dans ces cellules n'est pas une cause de stress. De plus, nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau de certaines chaperones clés dans les cellules Cin [233]. Il semble donc que la machinerie du RE déjà en place est suffisante pour pallier à plusieurs des fonctions de la calnexine reliées au repliement des protéines. Cette observation corrèle avec le fait que la fonction essentielle de la calnexine n'est pas sa fonction chaperone, tel que proposé par notre laboratoire [76, 90].

De façon intéressante, nous avons remarqué qu'il y avait plus d'activation des métacaspases dans les cellules Cin que dans les cellules sauvages. De plus, cette activation n'est pas complètement renversée par la ré-introduction de la copie sauvage de la calnexine. Cette observation suggère un lien entre l'état Cin et l'apoptose, ce qui concorde avec des études récentes de notre laboratoire démontrant que la calnexine est impliquée dans la médiation de l'apoptose chez *S. pombe* [105]. L'état Cin pourrait donc agir comme mécanisme palliant l'absence de cette modulation de l'apoptose qui se traduirait par une augmentation de la signalisation par les métacaspases.

Afin d'élucider le(s) rôle(s) de l'état Cin, une étude pilote du transcriptôme complet de cellules Cin et Cin + *pcnxI*⁺ (contenant une copie sauvage de la calnexine) a été effectuée. Si l'état Cin effectue ses rôles via l'augmentation de la transcription de certaines protéines, nous devrions voir une augmentation de ces transcrits dans les deux souches de cellules, puisque l'état Cin est maintenu en présence d'une copie de *cnxI*⁺. Cependant, tel que montré dans le tableau XII, très peu de gènes sont modulés à la fois dans les cellules

Cin et Cin + *pcnx1*⁺. Ce résultat indique donc que l'état Cin pallie pour la fonction essentielle de la calnexine via un mécanisme n'impliquant que peu ou pas la transcription.

Gène	Ratio Cin/Cdn	Ratio Cin + <i>pcnX1</i> ⁺ / Cdn	Description
c1271.09	0,64	0,58	Transporteur glycérophosphodiester
c16e9.16c	0,68	0,24	Séquence orpheline
hsp16	0,38	0,21	Désagrégase
mei2	0,42	0,66	Protéine liant l'ARN impliquée dans la méiose
mdp2	2,29	2,03	Protéine impliquée dans l'épissage et le transport de l'ARNm
rrna_2.2.16	3,12	2,12	ARNr

Table XII. Gènes modulés dans l'état Cin. L'analyse du transcriptôme a été effectuée sur des cellules Cin (issues de l'expression du mutant Δhcd_cnx1) et Cin + *pcnX1*⁺. La souche de référence (Cdn) dépend de la calnexine qu'elle porte sur un plasmide pour sa survie. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec le laboratoire du Dr Jürg Bähler.

5.2 Cif1p et l'état Cin

5.2.1 Identification de *cif1*⁺ en tant qu'inducteur de Cin_{cif}

Le cadre de lecture Spcc364.01 a été identifié dans deux criblages génétiques visant à identifier des protéines impliquées dans l'état de viabilité en l'absence de la calnexine [283]. Son identification à travers deux criblages complètement indépendants et la constance avec laquelle sa surexpression pouvait induire l'état Cin nous a poussé à investiguer plus loin ce gène, rebaptisé *cif1*⁺ pour *calnexin independence factor 1*, ainsi que l'état Cin qu'il provoque.

La caractérisation des cellules Cin issus de la surexpression de *cif1*⁺ (Cin_{cif}) a révélé que ces cellules ne sont pas en tous points identiques aux cellules Cin « originales », issues de l'expression du mutant Δhcd_cnx1 (Cin _{Δhcd_cnx1}). En effet, l'état Cin_{cif} n'est pas toujours dominant dans des cellules diploïdes et n'est pas transmis aux spores, contrairement à Cin _{Δhcd_cnx1} qui est toujours dominant et qui est transmis à plus de 85% des spores. Deuxièmement, les cellules Cin_{cif1} sont plus sensibles aux stress de la paroi cellulaire et montrent un niveau environ deux fois plus élevé d'activation des métacaspases en phase stationnaire que les cellules Cin _{Δhcd_cnx1} [283].

Les différences entre Cin _{Δhcd_cnx1} et Cin_{cif1} peuvent s'expliquer de deux façons qui ne sont pas mutuellement exclusives. Premièrement, Cin_{cif} pourrait être moins efficace que Cin _{Δhcd_cnx1} à induire le remplacement de la fonction essentielle de la calnexine. Puisque la calnexine est vitale à *S. pombe*, un remplacement incomplet provoquerait logiquement une hausse de l'activation des métacaspases. Il semble que la calnexine joue un rôle important dans la fabrication de la paroi cellulaire, et ce particulièrement lors de la sporulation.

Conséquemment, un remplacement insuffisant de cette fonction par Cin_{cif} générerait plus de défauts de la paroi et ne permettrait pas la germination des spores. La deuxième explication veut que l'état Cin_{cif} soit moins stablement transmis que l'état $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$. Dans ce cas, il serait plus souvent spontanément perdu, ce qui expliquerait le fort taux d'activation des métacaspases qui mèdirait l'apoptose dans des cellules dépourvues à la fois de calnexine et d'état Cin_{cif} . Cet état serait aussi moins efficacement transmis lors de croisements entre cellules haploïdes, suite à un phénomène de dilution ou de dosage de gènes, et ne serait pas ou mal transmis lors de la méiose.

Puisque le phénomène Cin a été montré comme transmis via un prion, la présence de deux états Cin distincts génétiquement et phénotypiquement rappelle grandement l'idée des souches de prions. Notamment, les souches de $[PSI^+]$ se distinguent selon la force du phénotype conféré et la stabilité du prion lui-même [174, 176, 188, 250]. Dans le cas de $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ et Cin_{cif1} , leurs caractéristiques indiquent à la fois une variation dans la force du phénotype conféré par le prion, soit la capacité à remplacer la fonction essentielle de la calnexine, et une variation dans la force de transmission, montrée par les différences génétiques. Ainsi, puisque l'idée d'une souche de prion réconcilie les deux explications proposées pour les différences entre $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ et Cin_{cif1} , cela apparaît comme l'explication la plus plausible. Cependant, il est impossible de vérifier cette hypothèse avec l'état actuel des connaissances concernant le phénomène Cin . Pour ce faire, nous aurions besoin d'identifier la protéine prion à la base des phénomènes Cin , et caractériser ses propriétés dans les différents types de cellules Cin (voir [188]).

L'hypothèse voulant que les deux états Cin soient le reflet de deux souches de prion implique qu'ils sont tous deux médiés de la même façon. Qu'en est-il vraiment? Lors de la caractérisation de l'implication de $cif1^+$ dans le phénomène Cin , nous avons observé que la présence de ce gène n'était pas nécessaire à l'induction et à la maintenance de Cin via le

mutant Δhcd_Cnx1p . Ceci implique donc que $cif1^+$ est situé en amont de l'effet de Δhcd_Cnx1p sur Cin , ou qu'il agit comme inducteur en parallèle. La deuxième option semble plus vraisemblable, car $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ montre des caractéristiques différentes de Cin_{cif} , ce qui s'explique plus facilement s'il s'agit d'une voie parallèle. De plus, comme Δhcd_Cnx1p est un mutant de la calnexine et provoque un phénomène permettant son remplacement, il est plus vraisemblable qu'il mime le tout premier signal menant à l'établissement de Cin plutôt qu'il ne soit une composante secondaire agissant plus bas dans la voie. Ainsi, nous nous retrouvons avec deux voies d'induction parallèles menant à un phénomène globalement identique, mais dont certaines caractéristiques génétiques et phénotypiques sont distinctes. Il est donc plus vraisemblable que Δhcd_cnx1 et $cif1^+$ agissent de façon différente sur un même prion, mais seulement l'identification formelle de celui-ci permettra de vérifier cette hypothèse.

5.2.2 Cif1p, séquence et homologie

Cif1p est une protéine orpheline de 320 acides aminés qui possède un pI de 9,6 (Figure 14). Elle ne possède qu'un homologue avec lequel elle possède 37% d'identité et qui est présent chez la levure *Schizosaccharomyces japonicus*. Malgré l'utilisation de divers outils bioinformatiques, aucun alignement significatif avec d'autres protéines n'a pu être trouvé. Seules quelques similarités de séquence avec des maturases K et des nucléases semblent présentes au niveau du domaine C-terminal de Cif1p, mais elles sont très limitées et peu significatives. Cependant, ces homologies limitées sont conséquentes avec la localisation nucléolaire de Cif1p et les premiers indices quant à son implication dans la maturation des ribosomes. Finalement, la recherche de motifs dans Cif1p a mis en évidence un domaine de localisation nucléaire formé par les acides aminés 27 à 54, domaine qui est par ailleurs fonctionnel (Figures 14 et 17).

La prédiction de la structure secondaire de Cif1p montre une protéine majoritairement non-structurée avec quelques hélices alpha. De plus, la purification de Cif1p flanquée d'un épitope hexa-histidine en *N*-terminal et exprimée chez *E. coli* a révélé qu'il s'agit d'une protéine hautement insoluble dans des tampons physiologiques. En effet, pour être soluble His₆-Cif1p pure doit être conservée dans un tampon contenant 8M urée et 2M NaCl. Évidemment, cette particularité de Cif1p rend donc impossibles la plupart des expériences effectuées *in vitro* pour évaluer la fonction d'une protéine, tels des essais de liaison à des acides nucléiques.

5.2.3 Cif1p est-il le prion?

Lorsque *cif1*⁺ a été identifié lors des criblages génétiques, deux observations nous ont poussés à examiner les propriétés prioniques de cette protéine. D'abord, la surexpression de *cif1*⁺ induit de façon stable le phénomène Cin, comme la surexpression d'une protéine prion induit l'apparition du phénotype prionique. Deuxièmement, tel que mentionné ci-haut, les prédictions de la structure secondaire de Cif1p révèlent des domaines non-structurés et sa purification montre une très forte propension à agréger, caractéristiques typique des domaines prions. Conséquemment, plusieurs expériences ont été effectuées afin de déterminer si Cif1p est un prion, et si c'était le prion responsable de l'état Cin.

D'abord, des expériences ont été faites sur les propriétés d'agrégation de Cif1p recombinant *in vitro*. L'examen par microscopie à force atomique des agrégats formés *in vitro* avec Cif1p recombinant a montré la présence de structures fibrillaires [283]. L'utilisation de la thioflavine-T, qui permet la détection de structures *cross-β*, n'a toutefois pas mis en évidence que Cif1p formait des amyloïdes (voir Figure 27). Il faut toutefois mentionner que la production de Cif1p recombinant est très peu efficace, probablement à

cause d'une toxicité partielle de la protéine et de sa propension à agréger. La concentration et la quantité de protéine étaient donc largement insuffisantes pour utiliser cette technique à son plein potentiel. Par ailleurs, les techniques d'analyse de l'agrégation *in vitro* demandent souvent plusieurs années d'optimisation, car les paramètres varient avec chaque prion. Ainsi, l'absence de résultats positifs avec la thioflavine-T ne peut donc pas nous mener à la conclusion que Cif1p ne forme pas des structures amyloïdes *in vitro*.

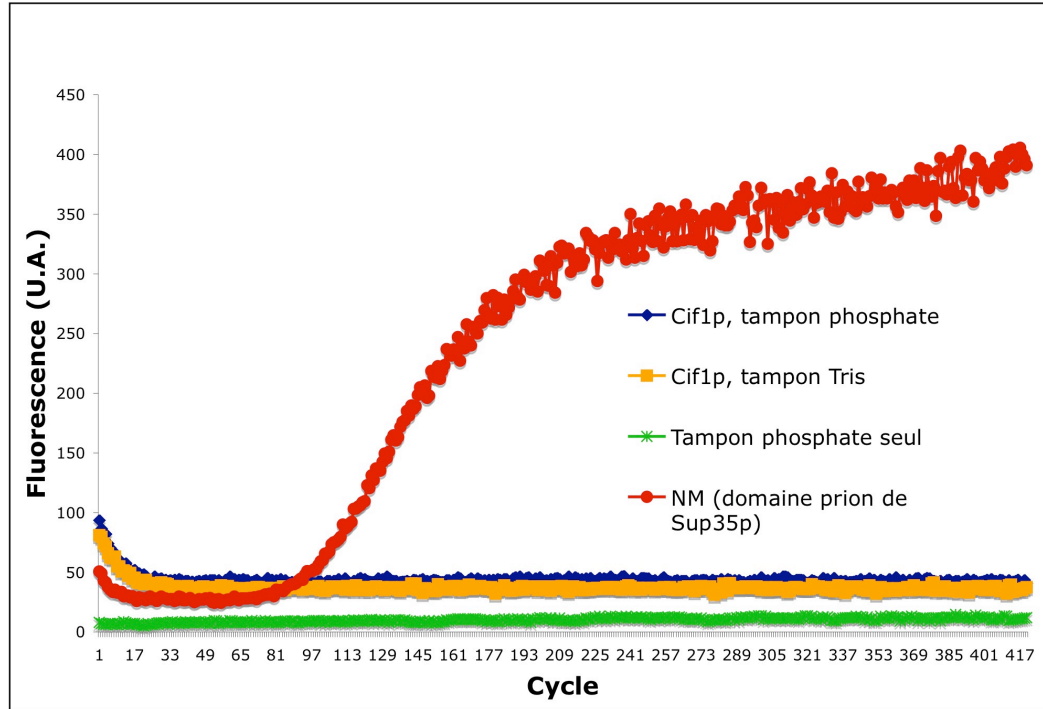


Figure 27. Agrégation de Cif1p en présence de thioflavine-T. Cif1p recombinant et purifié est dilué à une concentration de 1 μM dans un tampon Tris (pH 7.0) ou dans un tampon phosphate (pH 7.4) en présence de 20 μM Thioflavine-T. Chaque cycle représente une agitation de 60 secondes suivie de la lecture de la fluorescence. Le contrôle positif utilisé ici est NM (domaine prion de Sup35p) recombinant et purifié dans un tampon phosphate.

Afin d'examiner si Cif1p forme des agrégats *in vivo*, plusieurs techniques différentes tels des gels natif SDS-Agarose, des colonnes gel-filtration et des ultracentrifugations sur gradient de sucrose ont été utilisées. Dans tous les cas, les résultats indiquent que Cif1p ne forme pas d'agrégats *in vivo*. De plus, la délétion génomique du gène *cif1* n'empêche ni l'induction de l'état $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ ni la maintenance des états $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ et Cin_{cif1} . Finalement, par microscopie à fluorescence nous voyons que la localisation d'une fusion Cif1p-Venus n'est pas modifiée selon la présence ou non de l'état $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ ou Cin_{cif1} (Figure 17). Toutes ces données indiquent donc que Cif1p n'est pas le prion responsable de l'état de viabilité en l'absence de la calnexine, qu'il soit induit par le mutant Δhcd_cnx1 ou par la surexpression de *cif1*⁺.

Cependant, certains faits doivent être mentionnés. *In vivo*, une surexpression même modérée provoque l'agrégation de fusions Cif1p-myc (voir Figure 28). De plus, nous nous devons de mentionner que les anticorps anti-Cif1p utilisés lors des expériences de caractérisation détectent non seulement la bande monomérique de Cif1p, mais aussi des agrégats non-spécifiques sur immunobuvardage (Figure 28). Une purification de ces anticorps avec à des extraits de cellules $\Delta cif1$ a permis d'éliminer cette réactivité non-spécifique. Il est toutefois possible que ce faisant, nous avons éliminé des anticorps spécifiques à une structure propre à certains d'agrégats, structure qui pourrait se retrouver dans des agrégats de Cif1p. Finalement, les expériences effectuées *in vitro* ne permettent pas de conclure si Cif1p possède un comportement de type prion ou non. Tous ces doutes ne nous permettent donc pas d'exclure que Cif1p ait des propriétés prioniques.

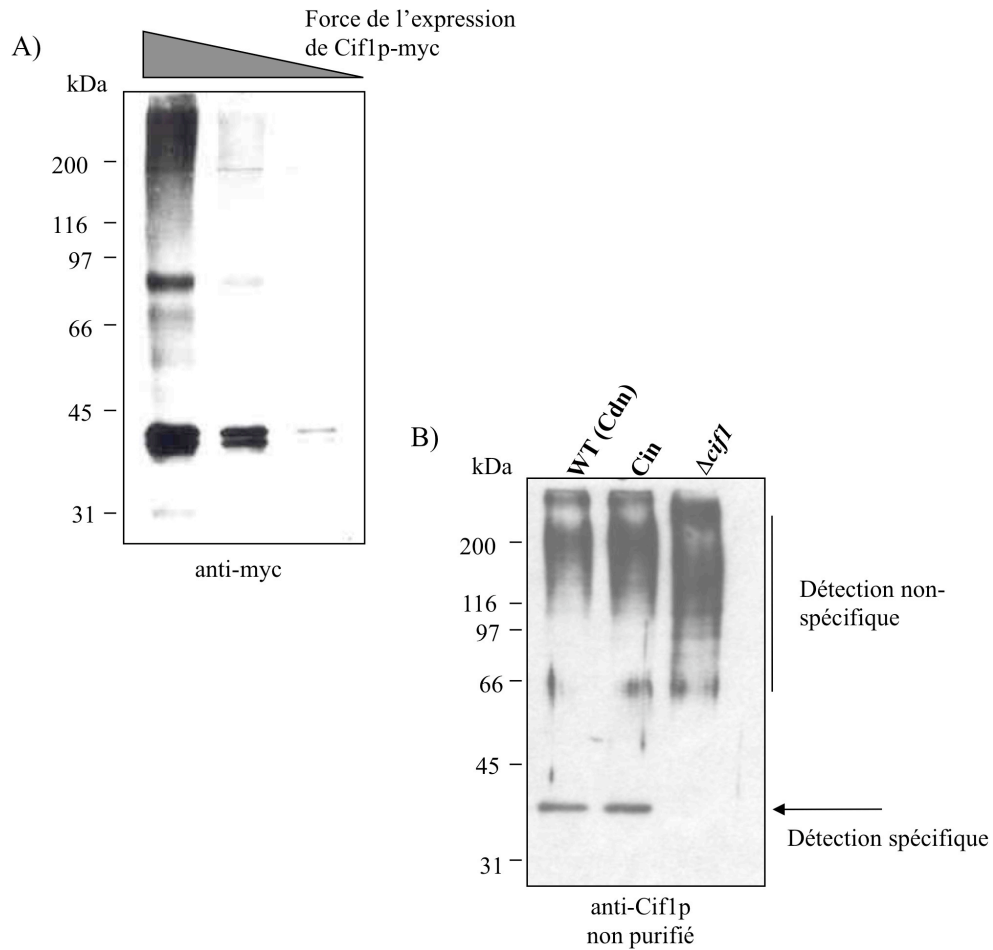
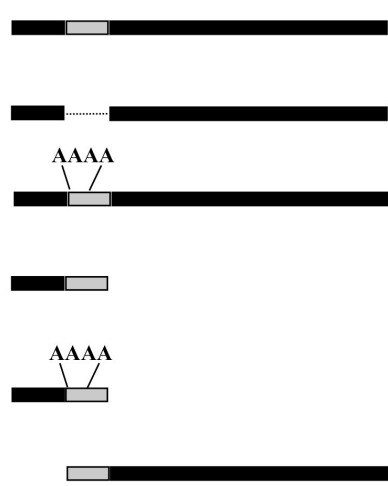


Figure 28. Immunobuvardages contre Cif1p avec différents anticorps. A) La présence de la protéine de fusion Cif1p-myc dans des extraits de cellules exprimant avec différentes forces cette construction est détectée à l'aide d'anticorps monoclonaux contre myc. Plus Cif1p-myc est exprimé fortement dans la cellule, plus il y a présence de Cif1p-myc dans des complexes de haut poids moléculaires. B) La présence de Cif1p dans des extraits de cellules WT (Cdn; dépendantes de la calnexine), $Cin_{\Delta hcd_cnx1}$ et $\Delta cif1$ est détectée à l'aide des anticorps polyclonaux bruts élicités contre Cif1p recombinant. La large bande de haut poids moléculaire correspond à une détection non-spécifique, telle qu'illustrée par la piste $\Delta cif1$, tandis que la bande détectée autour de 40 kDa est spécifique à Cif1p.

5.2.4 Mutants de délétion de Cif1p

Afin de déterminer quels domaines de Cif1p sont importants pour l'induction du phénomène Cin, la capacité de différents mutants de délétion à induire l'état Cin_{cif1} a été évalué (Figure 29). D'abord, nous avons examiné un mutant du signal de localisation nucléaire comportant un remplacement des lysines et arginines aux positions 27 à 30 en alanines. Ce mutant, qui ne localise plus que très partiellement dans le noyau, est incapable d'induire l'état Cin_{cif1} par surexpression [283]. Ainsi, il apparaît que la localisation nucléaire de Cif1p est essentielle à l'induction du phénomène Cin_{cif1}. Nous ne pouvons toutefois pas exclure que cette quadruple mutation affecte aussi l'interaction de Cif1p avec certains partenaires dans la voie d'induction de l'état Cin_{cif1}.

L'utilisation d'autres mutants de délétion a mis en évidence l'importance du domaine N-terminal de Cif1p dans l'induction du phénomène Cin. Effectivement, un mutant comportant la délétion des 27 premiers acides aminés ne permet plus l'induction de Cin_{cif1}, alors qu'un mutant comprenant seulement les 54 premiers acides aminés le permet. Il est difficile pour le moment d'expliquer l'importance de ce domaine car il ne possède pas d'homologie avec des protéines connues et il n'agrège pas *in vitro*. Peut-être son importance dans l'induction de l'état de viabilité en l'absence de la calnexine est-elle due à la présence du site de clivage de Cif1p en phase stationnaire (voir section 4.3.1)? Plus d'études sur le clivage de Cif1p et le mécanisme d'induction de Cin_{cif1} sont nécessaires pour élucider ce point.



	Induction de Cin <i>en trans</i>	Localisation nucléaire
<i>cif1</i> ⁺	Oui	Oui
<i>cif1</i> Δ27-54	Non	Non
<i>cif1</i> KRKR/AAAA	Non	Non
<i>cif1</i> -54	Oui	Oui
<i>cif1</i> -54KRKR/AAAA	Non	Non
<i>cif</i> 27-320	Non	Oui

Figure 29. Mutants de Cif1p. La capacité à induire l'état Cin de certains mutants de délétion et/ou ponctuel de Cif1p a été analysée par essai de ségrégation plasmidique. Leur présence dans le noyau a été visualisée à l'aide d'une fusion avec la protéine fluorescente Vénus.

5.2.5 Études générales sur Cif1p

Puisque Cif1p ne possède pas d'homologie significative avec des protéines connues, des expériences à large spectre ont été effectuées afin de cibler sa fonction. D'abord, la viabilité d'une souche contenant une délétion génomique de *cif1* a été évaluée dans différentes conditions. Notamment, des stress menant à l'apoptose et des stress affectant le ribosome ont été utilisés, mais aucune de ces conditions n'a mis en évidence une différence entre la viabilité des cellules WT et des cellules $\Delta cif1$ (résultats non-montrés).

En collaboration avec le Dr Jürg Bähler du Wellcome Trust Sanger Institute, une analyse complète du transcriptôme de cellules WT, $\Delta cif1$ ou surexprimant *cif1*⁺ a été effectuée. Dans le cas des cellules $\Delta cif1$, aucun changement significatif dans la transcription des gènes n'a pu être observé, et ce autant en phase stationnaire qu'en phase exponentielle. Dans le cas de la surexpression de *cif1*⁺, quelques 22 gènes voient leur expression modifiée par deux fois ou plus. Nous y retrouvons entre autres plusieurs protéines orphelines, quelques transporteurs et protéines impliqués dans des processus métaboliques divers, la protéase vacuolaire Isp6p et le transporteur de calcium du RE Cta3p (voir tableau XIII). Malgré que des pistes intéressantes sont fournies par ces deux dernières protéines, ces résultats ne nous permettent toutefois pas d'inférer une fonction à Cif1p.

Gène	Ratio $\uparrow\uparrow$ <i>cif1</i> /WT	Description
bfr1:hba2	0,49	Famille de transporteur ABC
C106.17c	0,44	Homosérine O-acétyltransférase (prédit)
C1271.09	0,44	Transporteur glycérophosphodiester
C14f5.01	0,21	Séquence orpheline
C1739.06c	0,36	Uroporphyrine méthyltransférase (prédit)
C29b12.10c	0,46	Famille de transporteur oligopeptide OPT
C428.11	0,37	Homocystéine synthase
Pb2b2.08	0,091	Séquence orpheline
Pgk1	0,43	Phosphoglycérate kinase
Sam1	0,48	S-adénosylméthionine synthase
c19c7.04c	5,6	Protéine conservée chez les levures
C27d7.09c	2,06	Famille spécifique à <i>S. pombe</i>
C27d7.11c	2,08	Famille spécifique à <i>S. pombe</i>
C1348.06c	6,9	Protéine conservée chez les champignons
C977.05c	6,88	Protéine conservée chez les champignons
C11d3.01c	2,61	Protéine conservée chez les champignons
cta3	11,87	Transporteur de calcium ATPase
hsp9	2,47	Protéine de choc thermique
isp4	2,03	Famille de transporteur oligopeptide OPT
isp6	2,06	Protéase à sérine vacuolaire
pb18e9.04c	2,93	glycoprotéine (prédit)
pb1a10.14	2,58	Protéine à boîte F

Table XIII. Gènes modulés par la surexpression de *cif1*⁺. L'analyse du transcriptôme a été effectuée sur des cellules surexprimant *cif1*⁺ vs des cellules sauvages, en collaboration avec le laboratoire du Dr Jürg Bähler.

5.3 Cif1p en phase stationnaire

5.3.1 Le clivage de Cif1p

Cif1p est clivé lorsque les cellules adoptent la respiration plutôt que la fermentation comme moyen principal de produire de l'énergie (i.e. shift diauxique) et pendant toute la phase stationnaire (Figure 26). Des études avec différents mutants de délétion de Cif1p ont démontré que le clivage a lieu dans les premiers 27 acides aminés de la protéine, donc dans un site précédant le signal de localisation nucléaire. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse de Cif1p-Flag purifié de cellules en phase exponentielle et stationnaire suggère que le clivage a lieu dans les 12 premiers acides aminés de la protéine. Puisque Cif1p en phase stationnaire montre une différence d'environ 1 à 2 kDa par rapport à la protéine pleine longueur (voir Figure 26), ceci suggère que le clivage a lieu entre les acides aminés 8 à 12, qui encodent une séquence Ser-Ile-Val-Lys. Les résidus sérine et lysine constituant des cibles fréquemment reconnues par les protéases, ce site apparaît très vraisemblable. L'examen d'un quadruple mutant ponctuel remplaçant ces quatre acides aminés par des alanines permettrait de vérifier cette hypothèse. De plus, il est à noter que puisque les mutants de séquence de localisation nucléaire de Cif1p sont aussi clivés en phase stationnaire, le clivage semble avoir lieu dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau.

Chez *S. cerevisiae*, le shift diauxique et l'entrée en quiescence se fait via la signalisation de différentes voies. La voie Tor, qui signale entre autres pour l'apport en azote, et la voie de la protéine kinase A (PKA), qui médie la signalisation du glucose, doivent être inactives pour que la cellule entame son processus d'adaptation à la phase stationnaire. Aussi, la voie de la protéine kinase C joue un rôle important dans ce processus, et ce particulièrement au niveau du remodelage de la paroi cellulaire (revue dans [279]). Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que la délétion de PKA augmentait la viabilité des cellules en phase stationnaire, ce qui confirme son rôle dans ce

processus [246]. Afin d'examiner si ces voies de signalisation étaient aussi responsables du clivage de Cif1p lors du shift diauxique, l'état de clivage de Cif1p dans des cellules saturées contenant une délétion de *pkal* et *pkc* ou une activation constitutive de *gpa2* (et donc de la voie PKA) a été examiné. Aucun de ces mutants n'influence le clivage de Cif1p, ce qui signifie que ce clivage répond à l'activation/inactivation d'une voie différente.

L'analyse de l'effet de la délétion de différents gènes sur Cif1p en phase stationnaire a révélé que l'absence de la protéase Isp6p dans la cellule inhibait complètement le clivage de Cif1p. Compte tenu de leur localisation différente, il semble très peu probable qu'Isp6p clive directement Cif1p. Isp6p est une protéase vacuolaire impliquée dans l'autophagie des cellules, et sa transcription est activée par une carence en azote, par exemple lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire [282]. Il apparaît donc que l'établissement de l'autophagie, ou d'une voie en découlant, active le clivage de Cif1p.

5.3.2 Cif1p interagit avec les protéines ribosomales L3, L7 et L8 (L7a)

Tel que mentionné dans le chapitre 3, la purification Flag de Cif1p a révélé des interactions avec des protéines ribosomales de la grande sous-unité, soit L3, L7 L8 (L7a). Cependant, Cif1p ne sédimente pas avec les sous-unités ribosomales ou les ribosomes ou avec le complexe pré-ribosomal 90S dans lequel s'effectue la maturation du rRNA 35S en ses composantes individuelles [258, 261]. Ces résultats suggèrent donc que Cif1p interagit avec ces protéines ribosomales, en complexe ou individuellement, dans une étape qui précède l'intégration de ces protéines dans le complexe 90S tardif ou le complexe ribosomal pré-60S. La localisation nucléolaire exclusive de Cif1p est aussi en accord avec cette hypothèse, puisque lors de sa maturation la sous-unité 60S finit par être exportée au cytosol [261, 284]. Ainsi, les protéines nucléolaires impliquées dans la maturation du 60S sont reconnues comme agissant au niveau des toutes premières étapes d'assemblage.

La protéine L3 a été identifiée comme étant parmi les premières à s'assembler sur la sous-unité 60S du ribosome [285]. Ainsi, son interaction avec Cif1p en l'absence d'autre protéine ribosomale et dans le nucléole apparaît logique. Il est surprenant de retrouver les protéines ribosomales L7 et L8 (L7a) dans les mêmes conditions, puisqu'elles s'associent plus tardivement avec la sous-unité 60S. Nous pouvons donc penser que Cif1p interagit avec L3, L7 et L8 (L7a) séparément ou encore que la protéine L7 identifiée par la purification Flag n'est pas celle qui est présente dans la structure finale du ribosome. En effet, il existe chez *S. cerevisiae* deux homologues de L7, dont un est restreint au nucléole et agit dans la maturation du 60S [286]. Puisque chez *S. pombe* se trouve aussi plus d'une protéine L7 et qu'aucune n'a été caractérisée, il est possible que l'homologue identifiée par purification Flag ne soit pas la protéine active dans le ribosome, mais plutôt celle agissant sur la biosynthèse précoce du 60S.

5.3.3 Fonction(s) de Cif1p dans la maturation du ribosome

Des expériences de purification TAP-tag ont permis d'identifier plus de 200 protéines interagissant avec les ribosomes lors de leur biosynthèse [287-289]. Celles-ci peuvent être séparées en au moins 7 groupes distincts, soient les ATP/GTPases, les nucléases, les enzymes de modification, les hélicases, les chaperones, les protéines d'assemblages et les facteurs de transport [259, 265]. Compte tenu de l'absence d'homologie de Cif1p avec des domaines ou protéines connues, il est impossible de la classer à priori dans l'un de ces sous-groupes. Cependant, malgré l'absence de domaine consensus de liaison à l'ARN, le caractère basique de la protéine associé à une forte concentration de résidus lysine et arginine en *N*-terminal suggèrent que Cif1p lierait les acides nucléiques. Puisque Cif1p est insoluble *in vitro*, cette hypothèse n'a toutefois pas pu être directement examinée jusqu'à présent.

Nous pouvons définir trois types d'interactions protéine-protéine entre les protéines pré-ribosomales. Il y a les interactions définissant les sous-complexes ribosomaux, les interactions régulatrices avec des partenaires spécifiques et des interactions physiques directes guidant l'assemblage au pré-ribosome [258]. Compte tenu de l'effet de la délétion de *cif1* observé uniquement en phase stationnaire et de la sélectivité d'interaction de Cif1p avec les protéines ribosomales, il apparaît vraisemblable que cette protéine établisse des interactions du deuxième type, dites régulatrices.

Chez *S. cerevisiae*, la transcription des rRNA et des protéines ribosomales est utilisée comme premier moyen de régulation de la biosynthèse des ribosomes. Toutefois, chez les eubactéries, vertébrés et chez *S. pombe*, la traduction semble être le moyen privilégié [255, 290]. Puisque la délétion de *cif1* a un effet sur la biosynthèse des ribosomes, il est possible qu'elle ait aussi un effet sur la transcription ou la traduction de protéines ribosomales et/ou de l'ARN ribosomal. Cependant, des analyses globales des transcrits d'ARN en phase stationnaire et exponentielle dans des cellules sauvages et délétées pour *cif1* n'ont pas montré de différence au niveau de la transcription des gènes ribosomaux et des protéines ribosomales. Pour ce qui est d'étudier le taux de traduction de ces protéines ribosomales, l'approche est complexifiée par l'absence d'anticorps spécifiques à ces protéines chez *S. pombe*. Il faudrait alors utiliser des techniques plus globales tel que des gels 2D et examiner si certaines bandes de protéines voient leur niveau augmenté en l'absence de Cif1p.

Des études ont démontré que chez *S. cerevisiae*, les ribosomes présentent une grande hétérogénéité autant au niveau de leur composition protéique que de leur modifications post-traductionnelles [274, 275]. Par exemple, en phase stationnaire chez *S. cerevisiae* les ribosomes possèdent 40% moins de protéines acides que les ribosomes

présents en phase exponentielle [276]. Ainsi, nous pouvons émettre la possibilité que Cif1p ait un rôle spécifique à la biosynthèse d'un type de ribosome plus présent en phase stationnaire qu'en phase exponentielle.

La traduction, même si elle est moins présente en phase stationnaire, est essentielle à la survie des cellules [271]. Puisque Cif1p n'est pas essentiel à la survie de *S. pombe* et que sa délétion n'affecte pas la survie en phase stationnaire, son effet sur la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire n'est pas crucial. Ces observations suggèrent que l'effet de Cif1p sur la biogenèse des ribosomes est compensé par d'autres protéines du nucléole. Alternativement, la fonction de Cif1p pourrait être fondamentale à la survie des cellules, mais dans une condition particulière de croissance qui reste à déterminer.

Suite à ces réflexions, nous pouvons définir comme suit la fonction de Cif1p sur les ribosomes. Compte tenu de sa liaison directe à des protéines ribosomales et possiblement à l'ARN, Cif1p agirait directement sur le processus d'assemblage plutôt que sur la modulation de la traduction de certaines protéines/facteurs essentiels. De plus, il favoriserait la biogenèse correcte des ribosomes spécifiques à la phase stationnaire et aussi possiblement à d'autres conditions de croissance/stress restant à déterminer. Les protéines agissant sur la biosynthèse des ribosomes sont excessivement nombreuses, et la majeure partie n'est pas caractérisée. Une fonction comme celle suggérée pour Cif1p met en lien direct les conditions de croissance cellulaire et la modulation de l'assemblage des ribosomes. Ceci permettrait à la fois une réponse plus rapide que la modulation de la traduction de protéines ribosomiales normalement utilisées par les cellules pour contrôler la biosynthèse des ribosomes, et la synthèse de ribosomes spécialisés à cette phase de croissance des cellules.

5.3.4 Clivage de Cif1p et effet sur la maturation du ribosome?

Un point majeur reste à examiner, c'est-à-dire l'effet du clivage de Cif1p en phase stationnaire sur sa fonction au niveau des ribosomes. En effet, pour le moment seules des corrélations nous suggèrent que le clivage est nécessaire à la fonction de Cif1p sur le ribosome en phase stationnaire. En effet, celui-ci a lieu au même moment que la délétion de *cif1* a un effet sur la biosynthèse des ribosomes. L'analyse de l'effet sur la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire d'un mutant non-clivable permettra sans aucun doute d'éclaircir si le clivage affecte la fonction de Cif1p.

L'hypothèse la plus plausible est que Cif1p pleine longueur est inactif, compte tenu de l'absence d'effet de la délétion de *cif1* en phase exponentielle. Son clivage, même s'il n'enlève qu'une dizaine d'acides aminés en *N*-terminal, permettrait d'activer la protéine en découvrant une région normalement masquée ou en modulant l'interaction avec d'autres partenaires protéiques. Cif1p ainsi activé en phase stationnaire pourrait alors exécuter sa fonction, qui est de favoriser une biogenèse correcte des ribosomes dans des conditions cellulaires normalement défavorables à ce processus.

5.4 La calnexine et Cif1p : une hypothèse d'action

Cif1p et la calnexine semblent fonctionnellement plutôt éloignés dans la cellule. Ils font cependant tous deux partie d'une même voie cellulaire, soit l'état de viabilité sans la calnexine ou Cin. Plusieurs des plus récentes observations concernant ces deux protéines peuvent être réconciliées dans le modèle suivant (Figure 30), qui tente d'expliquer comment la surexpression de *cif1*⁺ peut induire l'état Cin.

D'abord, la surexpression de Cif1p dans la cellule provoque l'apparition de l'espèce clivée et ce, même en phase exponentielle (Figure 30). Si nous supposons que le clivage de Cif1p active une fonction spécifique à la phase stationnaire, ce clivage constitutif permettrait l'activation constitutive de Cif1p. Puisque Cif1p module la biosynthèse des ribosomes en phase stationnaire, son activation durant la phase exponentielle provoquerait une apparition « artificielle » de ribosomes spécifiques à la phase stationnaire. Ce faisant, cela induirait la traduction de protéines normalement réprimées en phase exponentielle. Cet état artificiel, soit la présence simultanée de conditions de vie en phase exponentielle et stationnaire, pourrait alors induire le prion. Si nous supposons que le prion suit le modèle « classique », l'augmentation de quantité d'une protéine présente normalement en phase stationnaire dans des conditions qui lui sont inhabituelles pourrait provoquer son changement de conformation, notamment via une augmentation ou une diminution d'interaction avec les diverses protéines chaperones présentes dans la cellule. Alternativement, si le prion suivait le modèle $[\beta]$ proposé par Wickner, l'installation de conditions typiques à la phase stationnaire dans la cellule via la présence de certaines protéines spécifiques pourrait s'auto-stimuler. Ceci serait possible par exemple via une forte boucle rétroactive positive provoquant une modification auto-catalytique d'une ou plusieurs protéines-clefs de la signalisation en phase stationnaire. L'installation durable de cet état artificiel de phase stationnaire pourrait venir remplacer la fonction essentielle de la calnexine. En effet, afin de survivre longtemps en phase stationnaire, les cellules mettent en place des mécanismes de protection contre l'apoptose [245]. Ces mécanismes pourraient donc venir remplacer les fonctions de modulation de l'apoptose attribuées à la calnexine, fonctions qui semblent de plus en plus être cruciales pour la viabilité de *S. pombe*, notamment en phase stationnaire et sous différentes conditions de culture.

Compte tenu du caractère très hypothétique de ce modèle, plusieurs questions restent en suspens. Quels sont les effets exacts de la surexpression de Cif1p sur les cellules ? Pourquoi le seul fait de cultiver les cellules en phase stationnaire n'induit pas

l'état Cin ? Quel est le prion, et quel modèle suit-il ? La fonction essentielle de la calnexine est-elle réellement en lien avec l'apoptose et la phase stationnaire ? En résumé, l'exploration de la fonction cellulaire de Cif1p, l'état de viabilité en l'absence de la calnexine et le rôle de la calnexine dans l'apoptose en sont encore à leurs balbutiements. Il faudra une compréhension plus complète de ces trois axes de recherche pour valider et/ou compléter le modèle proposé ci-haut et répondre aux questions qu'il suscite.

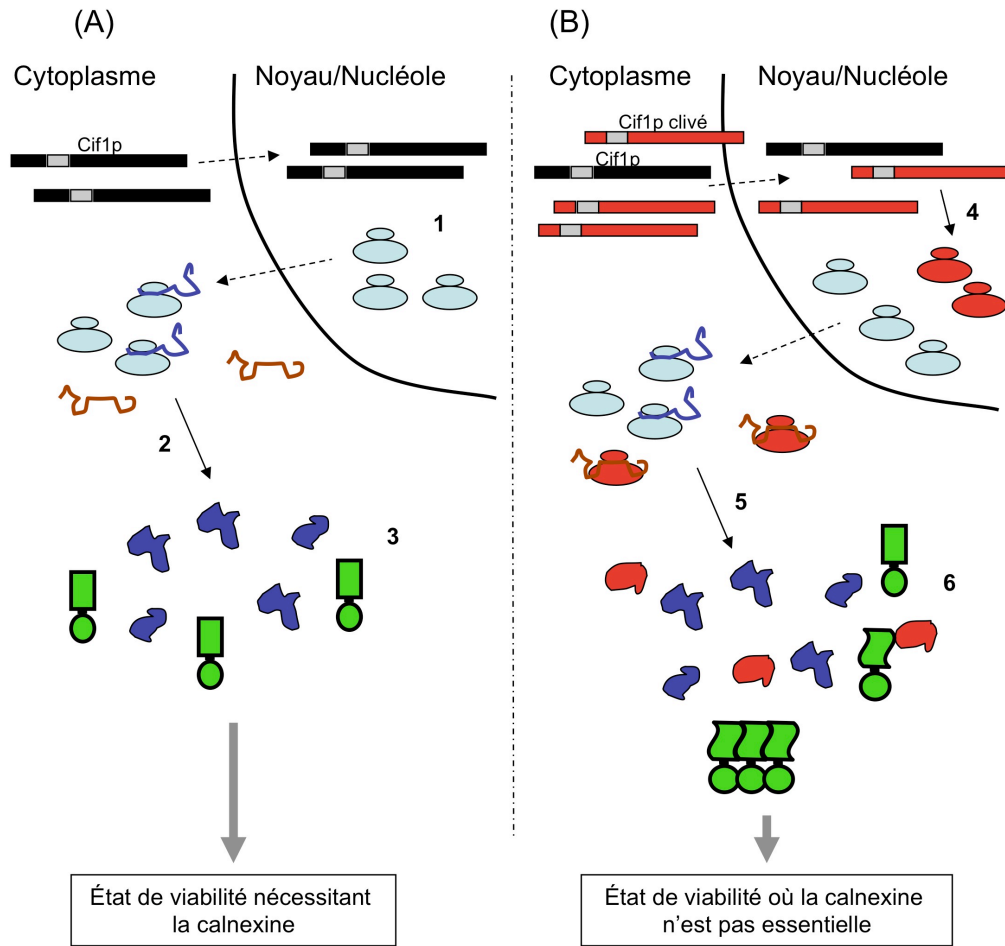


Figure 30. Modèle récapitulatif. A) En phase exponentielle, Cif1p n'a aucun effet sur la synthèse des ribosomes (1). Ainsi, seuls les ARNm spécifiques à ce stade de croissance, représenté en bleu, sont traduits (2). La protéine prion, en vert, reste donc dans sa conformation endogène (3). B) Lors de la surexpression de Cif1p, une partie de cette dernière est clivée. Le clivage induit une fonction de Cif1p qui favorise alors la synthèse de ribosomes spécifiques à la phase stationnaire (en rouge; 1). Ces ribosomes vont traduire des ARNm de protéines aussi spécifiques à la phase stationnaire (5). Cette condition cellulaire particulière, soit la présence de protéines propres à la phase stationnaire dans des cellules en phase exponentielle, va induire l'apparition du prion (en vert) et donc l'état de viabilité ne nécessitant plus la calnexine.

Bibliographie

- 1 Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* (New York, N.Y. **181**, 223-230
- 2 Karplus, M. (1997) The Levinthal paradox: yesterday and today. *Folding & design*. **2**, S69-75
- 3 Dill, K. A. and Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology*. **4**, 10-19
- 4 Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. and Schmid, F. X. (1995) Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nature structural biology*. **2**, 663-673
- 5 Sosnick, T. R., Mayne, L., Hiller, R. and Englander, S. W. (1994) The barriers in protein folding. *Nature structural biology*. **1**, 149-156
- 6 Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology*. **15**, 3-16
- 7 Yon, J. M. (2001) Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ...* [et al. **34**, 419-435
- 8 Buck, T. M., Wright, C. M. and Brodsky, J. L. (2007) The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Seminars in cell & developmental biology*. **18**, 751-761
- 9 Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. (1997) *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (volume 3) Cell cycle and Cell Biology.
- 10 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
- 11 Hebert, D. N. and Molinari, M. (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews*. **87**, 1377-1408
- 12 Fink, A. L., Goto, Y. and Dekker, M. (1998) *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*.
- 13 Stirling, C. J. (1999) Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. 1997 Fleming Lecture. *Microbiology* (Reading, England). **145 (Pt 5)**, 991-998
- 14 Ogg, S. C., Poritz, M. A. and Walter, P. (1992) Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. **3**, 895-911
- 15 Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N. and van den Hondel, C. A. (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol*. **33**, 155-171
- 16 Kleizen, B. and Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology*. **16**, 343-349
- 17 Anelli, T. and Sitia, R. (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *The EMBO journal*. **27**, 315-327

- 18 Kim, S. J., Choi, Y. S., Kim, H. G., Park, E. H. and Lim, C. J. (2006) Cloning, characterization and regulation of a protein disulfide isomerase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology reports*. **33**, 187-196
- 19 Arevalo-Rodriguez, M., Wu, X., Hanes, S. D. and Heitman, J. (2004) Prolyl isomerases in yeast. *Front Biosci*. **9**, 2420-2446
- 20 Hendershot, L. M. (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. **71**, 289-297
- 21 Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y. and Kohno, K. (2004) A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *The Journal of cell biology*. **167**, 445-456
- 22 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
- 23 Pidoux, A. L. and Armstrong, J. (1992) Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal*. **11**, 1583-1591
- 24 Helenius, A. and Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*. **73**, 1019-1049
- 25 Caramelo, J. J. and Parodi, A. J. (2008) Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *The Journal of biological chemistry*. **283**, 10221-10225
- 26 Parodi, A. J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochimica et biophysica acta*. **1426**, 287-295
- 27 Olivari, S. and Molinari, M. (2007) Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS letters*. **581**, 3658-3664
- 28 Fanchiotti, S., Fernandez, F., D'Alessio, C. and Parodi, A. J. (1998) The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *The Journal of cell biology*. **143**, 625-635
- 29 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
- 30 Nakatsukasa, K. and Brodsky, J. L. (2008) The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. **9**, 861-870
- 31 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. *Molecular biology of the cell*. **16**, 4714-4724
- 32 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
- 33 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

- 34 Ron, D. and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews*. **8**, 519-529
- 35 Lai, E., Teodoro, T. and Volchuk, A. (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda, Md)*. **22**, 193-201
- 36 Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M. and Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. **7**, 880-885
- 37 Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology*. **18**, 716-731
- 38 Schroder, M. (2006) The unfolded protein response. *Molecular biotechnology*. **34**, 279-290
- 39 Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. and Ron, D. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO journal*. **17**, 5708-5717
- 40 Boyce, M. and Yuan, J. (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell death and differentiation*. **13**, 363-373
- 41 Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Sadighi Akha, A. A., Raden, D. and Kaufman, R. J. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS biology*. **4**, e374
- 42 Rao, R. V., Ellerby, H. M. and Bredesen, D. E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell death and differentiation*. **11**, 372-380
- 43 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. *The Journal of biological chemistry*. **266**, 19599-19610
- 44 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. *Molecular cell*. **8**, 633-644
- 45 Williams, D. B. (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*. **119**, 615-623
- 46 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
- 47 Hahn, M., Borisova, S., Schrag, J. D., Tessier, D. C., Zapun, A., Tom, R., Kamen, A. A., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y. and Cygler, M. (1998) Identification and crystallization of a protease-resistant core of calnexin that retains biological activity. *Journal of structural biology*. **123**, 260-264
- 48 Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M. A. and Williams, D. B. (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*. **37**, 3480-3490

- 49 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. *The Journal of biological chemistry*. **277**, 29686-29697
- 50 Tjoelker, L. W., Seyfried, C. E., Eddy, R. L., Jr., Byers, M. G., Shows, T. B., Calderon, J., Schreiber, R. B. and Gray, P. W. (1994) Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry*. **33**, 3229-3236
- 51 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. *The EMBO journal*. **23**, 1020-1029
- 52 Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M. and Opas, M. (2005) Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *International review of cytology*. **245**, 91-121
- 53 Ou, W. J., Bergeron, J. J., Li, Y., Kang, C. Y. and Thomas, D. Y. (1995) Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca²⁺. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 18051-18059
- 54 Ihara, Y., Cohen-Doyle, M. F., Saito, Y. and Williams, D. B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Molecular cell*. **4**, 331-341
- 55 Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y. and Williams, D. B. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 39779-39787
- 56 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
- 57 Ikawa, M., Nakanishi, T., Yamada, S., Wada, I., Kominami, K., Tanaka, H., Nozaki, M., Nishimune, Y. and Okabe, M. (2001) Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Developmental biology*. **240**, 254-261
- 58 Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Guntert, P., Braun, D., Helenius, A. and Wuthrich, K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 3133-3138
- 59 Michalak, M., Robert Parker, J. M. and Opas, M. (2002) Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell calcium*. **32**, 269-278
- 60 David, V., Hochstenbach, F., Rajagopalan, S. and Brenner, M. B. (1993) Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *The Journal of biological chemistry*. **268**, 9585-9592
- 61 Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A., Jackson, M. R. and Williams, D. B. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *The EMBO journal*. **15**, 1495-1506

- 62 Chang, W., Gelman, M. S. and Prives, J. M. (1997) Calnexin-dependent enhancement of nicotinic acetylcholine receptor assembly and surface expression. *The Journal of biological chemistry*. **272**, 28925-28932
- 63 Jackson, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A. and Williams, D. B. (1994) Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science (New York, N.Y.)* **263**, 384-387
- 64 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
- 65 Danilczyk, U. G., Cohen-Doyle, M. F. and Williams, D. B. (2000) Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *The Journal of biological chemistry*. **275**, 13089-13097
- 66 Peterson, J. R., Ora, A., Van, P. N. and Helenius, A. (1995) Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Molecular biology of the cell*. **6**, 1173-1184
- 67 Van Leeuwen, J. E. and Kears, K. P. (1996) The related molecular chaperones calnexin and calreticulin differentially associate with nascent T cell antigen receptor proteins within the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. **271**, 25345-25349
- 68 Molinari, M., Eriksson, K. K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M. and Helenius, A. (2004) Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Molecular cell*. **13**, 125-135
- 69 Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**, 913-917
- 70 Hebert, D. N., Simons, J. F., Peterson, J. R. and Helenius, A. (1995) Calnexin, calreticulin, and Bip/Kar2p in protein folding. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. **60**, 405-415
- 71 Toyofuku, K., Wada, I., Hirosaki, K., Park, J. S., Hori, Y. and Jimbow, K. (1999) Promotion of tyrosinase folding in COS 7 cells by calnexin. *Journal of biochemistry*. **125**, 82-89
- 72 Balow, J. P., Weissman, J. D. and Kears, K. P. (1995) Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 29025-29029
- 73 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
- 74 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. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 4697-4704

- 75 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
- 76 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
- 77 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
- 78 Kim, P. S. and Arvan, P. (1995) Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. **128**, 29-38
- 79 Carreno, B. M., Schreiber, K. L., McKean, D. J., Stroynowski, I. and Hansen, T. H. (1995) Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecules are associated with calnexin. Evidence implicating the class I-connecting peptide segment in calnexin association. *J Immunol*. **154**, 5173-5180
- 80 Danilczyk, U. G. and Williams, D. B. (2001) The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 25532-25540
- 81 Swanton, E., High, S. and Woodman, P. (2003) Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *The EMBO journal*. **22**, 2948-2958
- 82 Brockmeier, A. and Williams, D. B. (2006) Potent lectin-independent chaperone function of calnexin under conditions prevalent within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*. **45**, 12906-12916
- 83 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
- 84 Tatu, U. and Helenius, A. (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. **136**, 555-565
- 85 Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J. and Thomas, D. Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *The Journal of biological chemistry*. **273**, 6009-6012
- 86 Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H. and High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Molecular biology of the cell*. **10**, 2573-2582
- 87 Molinari, M. and Helenius, A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*. **288**, 331-333
- 88 Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T. and Hendershot, L. M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Molecular biology of the cell*. **13**, 4456-4469

- 89 Crofts, A. J., Leborgne-Castel, N., Pesca, M., Vitale, A. and Denecke, J. (1998) BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell*. **10**, 813-824
- 90 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
- 91 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
- 92 Boisrame, A., Chasles, M., Babour, A., Beckerich, J. M. and Gaillardin, C. (2002) Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of cell science*. **115**, 4947-4956
- 93 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. *The Journal of biological chemistry*. **273**, 17227-17235
- 94 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. *The EMBO journal*. **18**, 3655-3666
- 95 Delom, F. and Chevet, E. (2006) In vitro mapping of calnexin interaction with ribosomes. *Biochemical and biophysical research communications*. **341**, 39-44
- 96 Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Dode, L. and Wuytack, F. (2005) Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell calcium*. **38**, 291-302
- 97 Roderick, H. L., Lechleiter, J. D. and Camacho, P. (2000) Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *The Journal of cell biology*. **149**, 1235-1248
- 98 Myhill, N., Lynes, E. M., Nanji, J. A., Blagoveshchenskaya, A. D., Fei, H., Carmine Simmen, K., Cooper, T. J., Thomas, G. and Simmen, T. (2008) The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. *Molecular biology of the cell*. **19**, 2777-2788
- 99 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
- 100 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
- 101 Delom, F., Emadali, A., Cocolakis, E., Lebrun, J. J., Nantel, A. and Chevet, E. (2007) Calnexin-dependent regulation of tunicamycin-induced apoptosis in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell death and differentiation*. **14**, 586-596
- 102 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

- 103 Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and Shore, G. C. (2003) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *The Journal of cell biology*. **160**, 1115-1127
- 104 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 and differentiation*. **4**, 263-271
- 105 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. *Molecular biology of the cell*. **19**, 4404-4420
- 106 Mohan, C. and Lee, G. M. (2008) Calnexin overexpression sensitizes recombinant CHO cells to apoptosis induced by sodium butyrate treatment. *Cell stress & chaperones*
- 107 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
- 108 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
- 109 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
- 110 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**, 1018-1030
- 111 Lee, W., Kim, K. R., Singaravelu, G., Park, B. J., Kim, D. H., Ahnn, J. and Yoo, Y. J. (2006) Alternative chaperone machinery may compensate for calreticulin/calnexin deficiency in *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*. **6**, 1329-1339
- 112 Rosenbaum, E. E., Hardie, R. C. and Colley, N. J. (2006) Calnexin is essential for rhodopsin maturation, Ca²⁺ regulation, and photoreceptor cell survival. *Neuron*. **49**, 229-241
- 113 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. *The EMBO journal*. **20**, 6772-6782
- 114 Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J. and Thomas, D. Y. (1995) *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
- 115 Zhang, H., He, J., Ji, Y., Kato, A. and Song, Y. (2008) The effect of calnexin deletion on the expression level of PDI in *Saccharomyces cerevisiae* under heat stress conditions. *Cellular & molecular biology letters*. **13**, 38-48
- 116 Zhang, H., Hu, B., Ji, Y., Kato, A. and Song, Y. (2008) The effect of calnexin deletion on the expression level of binding protein (BiP) under heat stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & molecular biology letters*. **13**, 621-631

- 117 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. *The EMBO journal*. **14**, 3064-3072
- 118 Wang, H., Entwistle, J., Morlon, E., Archer, D. B., Peberdy, J. F., Ward, M. and Jeenes, D. J. (2003) Isolation and characterisation of a calnexin homologue, *clxA*, from *Aspergillus niger*. *Mol Genet Genomics*. **268**, 684-691
- 119 Uptain, S. M. and Lindquist, S. (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annual review of microbiology*. **56**, 703-741
- 120 Shorter, J. and Lindquist, S. (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet*. **6**, 435-450
- 121 Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Baxa, U., Brachmann, A. and Shewmaker, F. (2004) Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Annual review of genetics*. **38**, 681-707
- 122 Chernoff, Y. O., Uptain, S. M. and Lindquist, S. L. (2002) Analysis of prion factors in yeast. *Methods in enzymology*. **351**, 499-538
- 123 Soto, C. and Castilla, J. (2004) The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nature medicine*. **10 Suppl**, S63-67
- 124 Aguzzi, A., Baumann, F. and Bremer, J. (2008) The prion's elusive reason for being. *Annual review of neuroscience*. **31**, 439-477
- 125 Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 13363-13383
- 126 Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. and Clarke, M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*. **214**, 764-766
- 127 Griffith, J. S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*. **215**, 1043-1044
- 128 Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*. **216**, 136-144
- 129 Bolton, D. C., McKinley, M. P. and Prusiner, S. B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science (New York, N.Y.)*. **218**, 1309-1311
- 130 Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. and Hood, L. E. (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*. **38**, 127-134
- 131 Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M. and et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. **315**, 331-333
- 132 Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. and et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. **40**, 735-746
- 133 Aguzzi, A. and Polymenidou, M. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*. **116**, 313-327
- 134 Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. **73**, 1339-1347
- 135 Caughey, B. (2001) Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends in biochemical sciences*. **26**, 235-242

- 136 Benkemoun, L. and Saupe, S. J. (2006) Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol.* **43**, 789-803
- 137 Baskakov, I. V. and Breydo, L. (2007) Converting the prion protein: what makes the protein infectious. *Biochimica et biophysica acta.* **1772**, 692-703
- 138 Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. and Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* **370**, 471-474
- 139 Soto, C., Saborio, G. P. and Anderes, L. (2002) Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends in neurosciences.* **25**, 390-394
- 140 Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R. and Supattapone, S. (2007) Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **104**, 9741-9746
- 141 Cox, B. S. (1965) A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity.* **20**, 505-521
- 142 Cox, B. S., Tuite, M. F. and McLaughlin, C. S. (1988) The psi factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast (Chichester, England).* **4**, 159-178
- 143 Tuite, M. F. and Cox, B. S. (2006) The [PSI+] prion of yeast: a problem of inheritance. *Methods (San Diego, Calif.* **39**, 9-22
- 144 Chernoff, Y. O., Derkach, I. L. and Inge-Vechtomov, S. G. (1993) Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics.* **24**, 268-270
- 145 Wickner, R. B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)* **264**, 566-569
- 146 Paushkin, S. V., Kushnirov, V. V., Smirnov, V. N. and Ter-Avanesyan, M. D. (1997) In vitro propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 381-383
- 147 Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M., Liu, J. J. and Lindquist, S. (1997) Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI+], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell.* **89**, 811-819
- 148 Patino, M. M., Liu, J. J., Glover, J. R. and Lindquist, S. (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 622-626
- 149 Wickner, R. B., Masison, D. C. and Edskes, H. K. (1995) [PSI] and [URE3] as yeast prions. *Yeast (Chichester, England).* **11**, 1671-1685
- 150 Wickner, R. B., Edskes, H. K., Shewmaker, F. and Nakayashiki, T. (2007) Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nature reviews.* **5**, 611-618
- 151 Lacroute, F. (1971) Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *Journal of bacteriology.* **106**, 519-522
- 152 Aigle, M. and Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet.* **136**, 327-335

- 153 Brachmann, A., Toombs, J. A. and Ross, E. D. (2006) Reporter assay systems for [URE3] detection and analysis. *Methods (San Diego, Calif.* **39**, 35-42
- 154 Wickner, R. B., Edskes, H. K. and Shewmaker, F. (2006) How to find a prion: [URE3], [PSI+] and [beta]. *Methods (San Diego, Calif.* **39**, 3-8
- 155 Sondheimer, N. and Lindquist, S. (2000) Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Molecular cell.* **5**, 163-172
- 156 Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y. and Liebman, S. W. (2001) Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)]. *Cell.* **106**, 171-182
- 157 Tuite, M., Stojanovski, K., Ness, F., Merritt, G. and Koloteva-Levine, N. (2008) Cellular factors important for the de novo formation of yeast prions. *Biochemical Society transactions.* **36**, 1083-1087
- 158 Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Masse, S. V., Zadorsky, S. P., Polozkov, G. V., Inge-Vechtomov, S. G. and Liebman, S. W. (2000) Dependence and independence of [PSI(+)] and [PIN(+)] : a two-prion system in yeast? *The EMBO journal.* **19**, 1942-1952
- 159 Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Zhou, P., Chernoff, Y. O. and Liebman, S. W. (1997) Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI+] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **147**, 507-519
- 160 Taneja, V., Maddelein, M. L., Talarek, N., Saupe, S. J. and Liebman, S. W. (2007) A non-Q/N-rich prion domain of a foreign prion, [Het-s], can propagate as a prion in yeast. *Molecular cell.* **27**, 67-77
- 161 Schwimmer, C. and Masison, D. C. (2002) Antagonistic interactions between yeast [PSI(+)] and [URE3] prions and curing of [URE3] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p. *Molecular and cellular biology.* **22**, 3590-3598
- 162 Liebman, S. W., Bagriantsev, S. N. and Derkatch, I. L. (2006) Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN+] prions in yeast. *Methods (San Diego, Calif.* **39**, 23-34
- 163 Benkemoun, L., Sabate, R., Malato, L., Dos Reis, S., Dalstra, H., Saupe, S. J. and Maddelein, M. L. (2006) Methods for the in vivo and in vitro analysis of [Het-s] prion infectivity. *Methods (San Diego, Calif.* **39**, 61-67
- 164 Beisson-Schecroun, J. (1962) [Cellular incompatibility and nucleo-cytoplasmic interactions in the "barrage" phenomena in *Podospora anserina*.]. *Annales de genetique.* **4**, 4-50
- 165 Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. and Begueret, J. (1997) The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **94**, 9773-9778
- 166 Tuite, M. F. and Cox, B. S. (2003) Propagation of yeast prions. *Nature reviews.* **4**, 878-890
- 167 Cox, B. S., Tuite, M. F. and Mundy, C. J. (1980) Reversion from suppression to nonsuppression in SUQ5 [psi+] strains of yeast: the classification of mutations. *Genetics.* **95**, 589-609

- 168 Tuite, M. F., Mundy, C. R. and Cox, B. S. (1981) Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **98**, 691-711
- 169 Li, L. and Lindquist, S. (2000) Creating a protein-based element of inheritance. *Science (New York, N.Y.)* **287**, 661-664
- 170 Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Shewmaker, F., Baxa, U. and Brachmann, A. (2004) Prions of yeast are genes made of protein: amyloids and enzymes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. **69**, 489-496
- 171 Chien, P., Weissman, J. S. and DePace, A. H. (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annual review of biochemistry*. **73**, 617-656
- 172 Kushnirov, V. V., Alexandrov, I. M., Mitkevich, O. V., Shkundina, I. S. and Ter-Avanesyan, M. D. (2006) Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. *Methods (San Diego, Calif.)* **39**, 50-55
- 173 DePace, A. H. and Weissman, J. S. (2002) Origins and kinetic consequences of diversity in Sup35 yeast prion fibers. *Nature structural biology*. **9**, 389-396
- 174 King, C. Y. and Diaz-Avalos, R. (2004) Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. **428**, 319-323
- 175 Sparrer, H. E., Santoso, A., Szoka, F. C., Jr. and Weissman, J. S. (2000) Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI+] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science (New York, N.Y.)* **289**, 595-599
- 176 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**, 323-328
- 177 Brachmann, A., Baxa, U. and Wickner, R. B. (2005) Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *The EMBO journal*. **24**, 3082-3092
- 178 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+]. *Journal of molecular biology*. **365**, 773-782
- 179 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 7402-7407
- 180 Nazabal, A., Dos Reis, S., Bonneu, M., Saupe, S. J. and Schmitter, J. M. (2003) Conformational transition occurring upon amyloid aggregation of the HET-s prion protein of *Podospora anserina* analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *Biochemistry*. **42**, 8852-8861
- 181 Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C., Chaignepain, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, J. M., Riek, R. and Saupe, S. J. (2003) Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *The EMBO journal*. **22**, 2071-2081
- 182 Ross, E. D., Baxa, U. and Wickner, R. B. (2004) Scrambled prion domains form prions and amyloid. *Molecular and cellular biology*. **24**, 7206-7213

- 183 Ross, E. D., Edskes, H. K., Terry, M. J. and Wickner, R. B. (2005) Primary sequence independence for prion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 12825-12830
- 184 Baxa, U., Ross, P. D., Wickner, R. B. and Steven, A. C. (2004) The N-terminal prion domain of Ure2p converts from an unfolded to a thermally resistant conformation upon filament formation. *Journal of molecular biology*. **339**, 259-264
- 185 Pierce, M. M., Baxa, U., Steven, A. C., Bax, A. and Wickner, R. B. (2005) Is the prion domain of soluble Ure2p unstructured? *Biochemistry*. **44**, 321-328
- 186 Kochneva-Pervukhova, N. V., Chechenova, M. B., Valouev, I. A., Kushnirov, V. V., Smirnov, V. N. and Ter-Avanesyan, M. D. (2001) [Psi(+)] prion generation in yeast: characterization of the 'strain' difference. *Yeast (Chichester, England)*. **18**, 489-497
- 187 Derkatch, I. L., Chernoff, Y. O., Kushnirov, V. V., Inge-Vechtomov, S. G. and Liebman, S. W. (1996) Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **144**, 1375-1386
- 188 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. *The EMBO journal*. **20**, 6236-6245
- 189 Toyama, B. H., Kelly, M. J., Gross, J. D. and Weissman, J. S. (2007) The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature*. **449**, 233-237
- 190 Bradley, M. E., Edskes, H. K., Hong, J. Y., Wickner, R. B. and Liebman, S. W. (2002) Interactions among prions and prion "strains" in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99 Suppl 4**, 16392-16399
- 191 Jones, G. W. and Tuite, M. F. (2005) Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays*. **27**, 823-832
- 192 Eaglestone, S. S., Ruddock, L. W., Cox, B. S. and Tuite, M. F. (2000) Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 240-244
- 193 True, H. L. (2006) The battle of the fold: chaperones take on prions. *Trends Genet.* **22**, 110-117
- 194 Moriyama, H., Edskes, H. K. and Wickner, R. B. (2000) [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Molecular and cellular biology*. **20**, 8916-8922
- 195 Malato, L., Dos Reis, S., Benkemoun, L., Sabate, R. and Saupe, S. J. (2007) Role of Hsp104 in the propagation and inheritance of the [Het-s] prion. *Molecular biology of the cell*. **18**, 4803-4812
- 196 Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G. and Liebman, S. W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. *Science (New York, N.Y.)*. **268**, 880-884
- 197 Satpute-Krishnan, P., Langseth, S. X. and Serio, T. R. (2007) Hsp104-dependent remodeling of prion complexes mediates protein-only inheritance. *PLoS biology*. **5**, e24

- 198 Shorter, J. and Lindquist, S. (2008) Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *The EMBO journal*. **27**, 2712-2724
- 199 Byrne, L. J., Cox, B. S., Cole, D. J., Ridout, M. S., Morgan, B. J. and Tuite, M. F. (2007) Cell division is essential for elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 11688-11693
- 200 Perrett, S. and Jones, G. W. (2008) Insights into the mechanism of prion propagation. *Current opinion in structural biology*. **18**, 52-59
- 201 True, H. L. and Lindquist, S. L. (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature*. **407**, 477-483
- 202 True, H. L., Berlin, I. and Lindquist, S. L. (2004) Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature*. **431**, 184-187
- 203 Eaglestone, S. S., Cox, B. S. and Tuite, M. F. (1999) Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *The EMBO journal*. **18**, 1974-1981
- 204 Wilson, M. A., Meaux, S., Parker, R. and van Hoof, A. (2005) Genetic interactions between [PSI⁺] and nonstop mRNA decay affect phenotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 10244-10249
- 205 Harrison, L. B., Yu, Z., Stajich, J. E., Dietrich, F. S. and Harrison, P. M. (2007) Evolution of budding yeast prion-determinant sequences across diverse fungi. *Journal of molecular biology*. **368**, 273-282
- 206 Jensen, M. A., True, H. L., Chernoff, Y. O. and Lindquist, S. (2001) Molecular population genetics and evolution of a prion-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **159**, 527-535
- 207 Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K. and Weissman, J. S. (2005) Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins. *Cell*. **121**, 49-62
- 208 Chernoff, Y. O., Galkin, A. P., Lewitin, E., Chernova, T. A., Newnam, G. P. and Belenkiy, S. M. (2000) Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. *Molecular microbiology*. **35**, 865-876
- 209 Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L. Z. and Weissman, J. S. (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell*. **100**, 277-288
- 210 Kushnirov, V. V., Kochneva-Pervukhova, N. V., Chechenova, M. B., Frolova, N. S. and Ter-Avanesyan, M. D. (2000) Prion properties of the Sup35 protein of yeast *Pichia methanolica*. *The EMBO journal*. **19**, 324-331
- 211 Nakayashiki, T., Ebihara, K., Bannai, H. and Nakamura, Y. (2001) Yeast [PSI⁺] "prions" that are cross-transmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state. *Molecular cell*. **7**, 1121-1130
- 212 Resende, C., Parham, S. N., Tinsley, C., Ferreira, P., Duarte, J. A. and Tuite, M. F. (2002) The *Candida albicans* Sup35p protein (CaSup35p): function, prion-like behaviour and an associated polyglutamine length polymorphism. *Microbiology (Reading, England)*. **148**, 1049-1060

- 213 Nakayashiki, T., Kurtzman, C. P., Edskes, H. K. and Wickner, R. B. (2005) Yeast prions [URE3] and [PSI⁺] are diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 10575-10580
- 214 Talarek, N., Maillet, L., Cullin, C. and Aigle, M. (2005) The [URE3] prion is not conserved among *Saccharomyces* species. *Genetics*. **171**, 23-34
- 215 Baudin-Baillieu, A., Fernandez-Bellot, E., Reine, F., Coissac, E. and Cullin, C. (2003) Conservation of the prion properties of Ure2p through evolution. *Molecular biology of the cell*. **14**, 3449-3458
- 216 Dalstra, H. J., Swart, K., Debets, A. J., Saupe, S. J. and Hoekstra, R. F. (2003) Sexual transmission of the [Het-S] prion leads to meiotic drive in *Podospora anserina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 6616-6621
- 217 Mendez, R. and Richter, J. D. (2001) Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature reviews*. **2**, 521-529
- 218 Si, K., Lindquist, S. and Kandel, E. R. (2003) A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell*. **115**, 879-891
- 219 Du, Z., Park, K. W., Yu, H., Fan, Q. and Li, L. (2008) Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature genetics*. **40**, 460-465
- 220 Roberts, B. T. and Wickner, R. B. (2003) Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes & development*. **17**, 2083-2087
- 221 Roberts, B. T. and Wickner, R. B. (2004) A new kind of prion: a modified protein necessary for its own modification. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. **3**, 100-103
- 222 Kicka, S., Bonnet, C., Sobering, A. K., Ganesan, L. P. and Silar, P. (2006) A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 13445-13450
- 223 Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon,

- A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G. and Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. **415**, 871-880
- 224 Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 181-191
- 225 Kuznetsov, G. and Nigam, S. K. (1998) Folding of secretory and membrane proteins. *The New England journal of medicine*. **339**, 1688-1695
- 226 Chevet, E., Jakob, C. A., Thomas, D. Y. and Bergeron, J. J. (1999) Calnexin family members as modulators of genetic diseases. *Seminars in cell & developmental biology*. **10**, 473-480
- 227 Ni, M. and Lee, A. S. (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters*. **581**, 3641-3651
- 228 Amaral, M. D. (2004) CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci*. **23**, 41-48
- 229 Moremen, K. W. and Molinari, M. (2006) N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Current opinion in structural biology*. **16**, 592-599
- 230 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
- 231 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
- 232 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*
- 233 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. *Journal of cell science*. **117**, 907-918
- 234 Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology*. **194**, 795-823
- 235 Elbe, R. (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques*. **13**, 18-19
- 236 Chua, G., Taricani, L., Stangle, W. and Young, P. G. (2000) Insertional mutagenesis based on illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research*. **28**, E53
- 237 Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., Warbrick, E. . (1993) Experiments with Fission Yeast. 186
- 238 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 research*. **7**, 196-208

- 239 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
- 240 de la Cruz J., D. M.-C., Linder P. (1998) Smart Genetic Screens. *Methods in Microbiology*. **26**, 27
- 241 Rose, M. D. and Fink, G. R. (1987) KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell*. **48**, 1047-1060
- 242 Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*. **13**, 1099-1133
- 243 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. *Molecular cell*. **9**, 911-917
- 244 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 (San Diego, Calif)*. **44**, 262-272
- 245 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
- 246 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
- 247 Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO reports*. **1**, 411-415
- 248 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. *The Journal of biological chemistry*. **265**, 2209-2215
- 249 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. *Nature medicine*. **4**, 1157-1165
- 250 Collinge, J. and Clarke, A. R. (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science (New York, N.Y)*. **318**, 930-936
- 251 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. *The EMBO journal*. **18**, 6177-6188
- 252 Fribourg, S. and Conti, E. (2003) Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO reports*. **4**, 699-703
- 253 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 research*. **31**, 4391-4400
- 254 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**, 883-892

- 255 Warner, J. R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* **24**, 437-440
- 256 Lowe, M. and Barr, F. A. (2007) Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 429-439
- 257 Burke, J. D. and Gould, K. L. (1994) Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe his3* gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet.* **242**, 169-176
- 258 Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene.* **313**, 17-42
- 259 Nazar, R. N. (2004) Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life.* **56**, 457-465
- 260 Good, L., Intine, R. V. and Nazar, R. N. (1997) The ribosomal-RNA-processing pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem.* **247**, 314-321
- 261 Henras, A. K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A. and Henry, Y. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci.* **65**, 2334-2359
- 262 Fatica, A. and Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 313-318
- 263 Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala, A. P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A. P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J. E., Hughes, T. R., Emili, A. and Greenblatt, J. F. (2004) High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell.* **13**, 225-239
- 264 Dlakic, M. (2005) The ribosomal subunit assembly line. *Genome Biol.* **6**, 234
- 265 Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**, 7897-7912
- 266 Venema, J. and Tollervey, D. (1995) Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **11**, 1629-1650
- 267 Mizuta, K. and Warner, J. R. (1994) Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol Cell Biol.* **14**, 2493-2502
- 268 Rudra, D. and Warner, J. R. (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev.* **18**, 2431-2436
- 269 Waldron, C. and Lacroute, F. (1975) Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol.* **122**, 855-865
- 270 Ju, Q. and Warner, J. R. (1994) Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **10**, 151-157
- 271 Granot, D. and Snyder, M. (1993) Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast.* **9**, 465-479
- 272 Beauregard, P. B., Guérin, R., Turcotte, C., Lindquist, S. and Rokeach, L. A. (2009) A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin. *Journal of Cell Science.* **122**(Pt 9):1342-51

- 273 Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A. C. and Hurt, E. (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*. **10**, 105-115
- 274 Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P. and Silver, P. A. (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*. **131**, 557-571
- 275 Mauro, V. P. and Edelman, G. M. (2007) The ribosome filter redux. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. **6**, 2246-2251
- 276 Saenz-Robles, M. T., Remacha, M., Vilella, M. D., Zinker, S. and Ballesta, J. P. (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta*. **1050**, 51-55
- 277 Schaper, S., Fromont-Racine, M., Linder, P., de la Cruz, J., Namane, A. and Yaniv, M. (2001) A yeast homolog of chromatin assembly factor 1 is involved in early ribosome assembly. *Curr Biol*. **11**, 1885-1890
- 278 Iouk, T. L., Aitchison, J. D., Maguire, S. and Wozniak, R. W. (2001) Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis. *Mol Cell Biol*. **21**, 1260-1271
- 279 Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A. and Werner-Washburne, M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **68**, 187-206
- 280 Idiris, A., Tohda, H., Bi, K. W., Isoai, A., Kumagai, H. and Giga-Hama, Y. (2006) Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **73**, 404-420
- 281 Idiris, A., Bi, K., Tohda, H., Kumagai, H. and Giga-Hama, Y. (2006) Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast*. **23**, 83-99
- 282 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*. *Current genetics*. **49**, 403-413
- 283 Beauregard, P. B., Guerin, R., Turcotte, C., Lindquist, S. and Rokeach, L. A. (2009) A nucleolar protein allows viability in the absence of the essential ER chaperone calnexin *Journal of Cell Science*
- 284 Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*. **13**, 255-263
- 285 Kruiswijk, T., Planta, R. J. and Krop, J. M. (1978) The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochimica et biophysica acta*. **517**, 378-389
- 286 Gadad, O., Strauss, D., Petfalski, E., Gleizes, P. E., Gas, N., Tollervey, D. and Hurt, E. (2002) Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *The Journal of cell biology*. **157**, 941-951

- 287 Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. **415**, 141-147
- 288 Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Woolford, J. L., Jr. (2001) Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Molecular cell*. **8**, 505-515
- 289 Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*. **17**, 1030-1032
- 290 Bachand, F., Lackner, D. H., Bahler, J. and Silver, P. A. (2006) Autoregulation of ribosome biosynthesis by a translational response in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. **26**, 1731-1742

**Annexe I : The calnexin-independent state does not
compensate for all calnexin functions in
*Schizosaccharomyces pombe***

Article publié dans FEMS Yeast Research en mars 2007

The calnexin-independent state does not compensate
for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces*
pombe

Cynthia Turcotte, Antoine Roux, Pascale B. Beauregard, Renée

Guérin, Patrick Sénéchal, Fadi Hajjar

and Luis A. Rokeach*

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.

*To whom correspondence should be sent

Running title: Partial rescue of calnexin knock-out by the Cin state

Summary

In the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the molecular chaperone calnexin (Cnx1p) was shown to be essential for viability. However, we recently reported that under certain circumstances, *S. pombe* cells are able to survive in absence of calnexin/Cnx1p, indicating that an inducible pathway can complement the calnexin/Cnx1p essential function(s). This calnexin independent state (Cin) is transmitted by a non-chromosomal proteinaceous element exhibiting several prion-like properties. To assess to which extent the Cin state compensates for the absence of calnexin/Cnx1p, the Cin strain was further characterized. Cin cells exhibited cell-wall defects, sensitive to heat shock, as well as higher secretion levels of a model glycoprotein. Together these results indicate that the Cin state does not compensate for all calnexin/Cnx1p functions. Reintroduction of plasmid-borne *cnx1*⁺ partially rescued most but not all of the phenotypes displayed by Cin cells. Interestingly, Cin cells in stationary phase exhibited increased levels of caspase activation, and this phenotype was not suppressed by reintroduction of *cnx1*⁺, suggesting that cells in the Cin state are subjected to a stress other than the absence of calnexin/Cnx1p.

Introduction

Protein folding is a key process in the cell, as proteins must adopt their correct conformation in order to acquire and exert their functions. Inherited alterations in protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) are the cause of several genetic diseases such as cystic fibrosis, juvenile emphysema, familial hypercholesterolemia and certain coagulation disorders (reviewed in (Kuznetsov & Nigam 1998; Dobson, 2003; Selkoe, 2003; Barral *et al.*, 2004). Altered protein conformations can also be infectious as in the case of prion-mediated ailments such as human Creutzfeldt-Jakob's disease, sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy (Kretzschmar, 1999; Glatzel *et al.*, 2005). In these cases, infectivity is caused by the transmissible change of conformation from the native cellular form of the PrP protein that is mainly α -helical, into its prionic form that is mainly rich in β -sheet (Prusiner, 1998). The prionic conformer facilitates this structural conversion, and thereby it propagates to the other PrP sister molecules in the native state (Prusiner, 1998). Prion-like elements have also been described in fungi, in which they can act as non-chromosomal genetic elements conferring epigenetic traits. Indeed, because of their two basic features, i.e. the change of conformation which entails a loss and/or change of function of the protein and the ability of the prion conformer to structurally replicate, prion-like elements are able to propagate new traits and thus constitute a protein-based mode of inheritance. Among these fungal prion-like elements the best characterized are [*PSI*⁺], [*URE3*], [*RNQ*⁺] and [*Het-S*] (reviewed in (Liebman & Derkatch, 1999; Uptain & Lindquist, 2002; Wickner *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004).

The folding of secreted and membrane-bound proteins takes place in the ER, where a battery of molecular chaperones and foldases accelerates and increases the yield of this process (reviewed in (Fewell *et al.*, 2001; Ellgaard & Helenius, 2003; Trombetta & Parodi, 2003; Kleizen & Braakman, 2004; van Anken & Braakman, 2005). In addition, molecular chaperones do monitor that newly synthesised polypeptides acquire their correct three-dimensional structure in a process designated quality control (Fewell *et al.*, 2001). When

nascent proteins fail to fold correctly, they are retained by the quality control machinery and are subsequently targeted for degradation in the cytoplasm by the ER-associated degradation machinery (ERAD; (Ma & Hendershot, 2004; Ahner & Brodsky, 2004; Meusser *et al.*, 2005; Lederkremer & Glickman, 2005).

Calnexin is a molecular chaperone that plays key roles in protein folding and quality control in the ER, and that is well conserved throughout species (Ellgaard & Frickel, 2003; Schrag *et al.*, 2003; Trombetta & Parodi, 2003; Helenius & Aebi, 2004; Hebert *et al.*, 2005; Lederkremer & Glickman, 2005; van Anken & Braakman, 2005). While calnexin displays selectivity for glycoproteins, it was also shown to assist the folding of non-glycosylated proteins both *in vitro* and *in vivo* (Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Ihara *et al.*, 1999; Stronge *et al.*, 2001; Maréchal *et al.*, 2004). Structurally, calnexin is a type I membrane-bound protein containing a large luminal domain and a short cytosolic tail. Crystallography studies demonstrated that the luminal portion of calnexin is composed of two main structural domains: a long hairpin domain and a globular structure (Ross & Wickner, 2004). The long hairpin domain is formed by a highly conserved central domain (hcd), while the globular structure is composed of residues flanking the hcd. Functionally, the hairpin structure was implicated in interactions with other chaperones such as ERp57, while the globular domain was shown to harbour the calnexin's lectin activity and it is probably also involved in peptide-peptide interactions (Schrag *et al.*, 2003; Ellgaard & Frickel, 2003).

The calnexin homologue in *Schizosaccharomyces pombe* (*cnx1*⁺) was shown to be essential for its viability (Jannatipour & Rokeach, 1995; Parlati *et al.*, 1995). In order to determine the region encoding the essential function(s) of calnexin/Cnx1p, studies with a series of *cnx1* deletion mutants were carried out in our laboratory. Experiments with a mutant devoid of the hcd region (Δ *hcd_cnx1*) established that deletion of this domain does not impair the viability of the fission yeast. Moreover, it was shown that a small version of

calnexin/Cnx1p, encoded by the *mini_cnx1* mutant, supports cell viability with only 123 residues of the C-terminus of the protein, 52 amino acids (aa) of which are localized in the ER lumen (Elagöz *et al.*, 1999). Interestingly, while both the Δhcd_cnx1 and the *mini_cnx1* mutants support cell viability and secrete active proteins, they do not exhibit chaperone activity *in vitro* (Maréchal *et al.*, 2004). Therefore, these observations suggest that the calnexin/Cnx1p essentiality resides in another function than the chaperone one.

Further studies led to the discovery that the Δhcd_cnx1 mutant induces a mechanism that allows *S. pombe* viability in the absence of the essential chaperone calnexin/Cnx1p (Collin *et al.* 2004). This state of viability was designated Cin for calnexin independence. The Cin state was shown to be dominant in both haploid and diploid cells, inherited in a non-Mendelian fashion by the meiotic progeny, and transmitted to calnexin-dependent cells (Cdn) by transformation of Cin-cell extracts depleted of nucleic acids. These yeast prion-like characteristics suggested that the Cin state is transmitted by a proteinaceous genetic element designated [*cif*], for calnexin-independence factor (Collin *et al.*, 2004). The [*cif*] element would modulate the function of a gene or a pathway compensating for the essential function of calnexin/Cnx1p, thereby allowing the switch from the Cdn to the Cin state.

In order to determine whether the Cin state compensates for all functions exerted by calnexin/Cnx1p, we undertook the extended characterization of cells in the Cin state. A variety of phenotypes displayed by Cin cells were compared with those of a WT strain (*cnx1*⁺) and of two *cnx1* mutants devoid of chaperone function, *mini_cnx1* and Δhcd_cnx1 . A Cin strain containing an episomal copy of *cnx1*⁺ was used to discriminate between phenotypes arising from the absence of calnexin/Cnx1p and those due to the Cin state itself. Cin cells were particularly sensitive to elevated temperature but were nevertheless resistant to protein folding stresses. Moreover, Cin cells exhibited cell-wall defects and reduced heat-shock resistance. In addition, the Cin strain secreted higher levels of cellulase; this was however at the expense of a reduced efficiency in the quality control for this glycoprotein. Together these observations indicate that the Cin state does not compensate

for all calnexin/Cnx1p functions. Intriguingly, reintroduction of episomal *cnxI*^{VII+} reverted most but not all of the phenotypes displayed by Cin cells. Most notably, Cin cells showed elevated caspase activity. Remarkably however, caspase activation in the Cin strain was not suppressed by reintroduction of *cnxI*⁺, suggesting that cells in the Cin state are subjected to a stress other than the lack of calnexin/Cnx1p.

Materials and Methods

Strains and Media

S. pombe strains used in this study are described in Table I. *cnx1*⁺ and the *cnx1* mutants were expressed under the control of the thiamine repressible *nmt41* promoter (induction ratio 25X) and *nmt* terminator on the pREP41 plasmid. pREP41 is an *S. pombe* expression multicopy vector containing the *LEU2* marker and the *arsI* origin of replication (Elagöz *et al.*, 1999). For secretion assays, cells expressing human serum albumin (HSA) were obtained by transformation of the pSLF172-HSA plasmid (Maréchal *et al.*, 2004) into the described strains. *S. pombe* cells expressing cellulase I (Cell1p) from *Aspergillus aculeatus* were constructed as described in (Maréchal *et al.*, 2004). Cultures were grown in MM (Edinburgh minimal medium) supplemented with required nutrients as previously described (Moreno *et al.*, 1991), at 30°C unless otherwise specified. *S. pombe* transformations were performed using the PEG-lithium acetate procedure (Elbe, 1992).

Stress resistance

For stress-resistance assays, chemicals were filter-sterilized and added to media at the indicated concentrations. Exponentially growing cells were adjusted to an OD₅₉₅ of 0.8, serially diluted (10⁻¹-10⁻⁴), spotted on solid media and grown for 7 days at the indicated temperature. Heat shock was performed on exponentially growing cells adjusted at an OD₅₉₅ of 0.8. Cells were either or not pre-treated at 37°C for 30 min, then incubated at 50°C for different times and cooled on ice. Cells were subsequently serially diluted, spotted on solid MM and incubated for 7 days at 30°C.

SDS-sensitivity assays

Exponentially growing cells were spread on solid MM in top agar (0.7%). Disc diffusion assays were performed by placing a sterile 3M paper disc in the center of the plate where 10 µl of 10% SDS was spotted. After incubation for 5 days at either 30°C or 37°C, the diameter of the zone of growth inhibition (halo) was measured. Sensitivity was

calculated by dividing the diameter of the halo of mutant strains by that of the wild type strain.

Secretion assays

A 15 ml sample of exponentially growing cells was pelleted, and a volume of 12 ml of supernatant was concentrated 50X with Amicon Ultra 10 000 MWCO columns (Millipore, Bedford, USA). The equivalent of 1 OD₅₉₅ (2×10^7 cells) of pelleted cells and the corresponding volume of concentrated spent medium were boiled for 15 min and for 5 min, respectively. Subsequently, the samples were loaded on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membrane and immunoblotted with the 12CA5 anti-HA mouse monoclonal antibody at a dilution of 1:500 for the detection of HA-tagged HSA and Cellp. Quantification of bands was performed by densitometry using the Quantity One program (BioRad).

Enzymatic assays of cellulase were essentially performed as described (Maréchal *et al.*, 2004). Briefly, the spent medium of an equivalent of 1 OD₅₉₅ of concentrated cultured cells was completed to 100 μ l with water and mixed with 100 μ l citrate buffer (0.1 M, pH 3.0) and 100 μ l 0.8% AZCL-HE-cellulose (Azurine crossed-linked hydroxyethylcellulose) as substrate (MegaZyme, North Rocks, N.S.W., Australia). The reactions were incubated for 18 h at 40°C. A volume of 1 ml of water was added to stop the reaction, and the OD₆₂₀ of the blue color produced after cleavage by cellulase was measured. The relative secretion efficiency of the mutants was reported as a ratio to the secretion of WT values.

***In vivo* staining and microscopic analysis for caspase activity**

Cultures were harvested in exponential phase or after 4 days in stationary phase. A sample of 1×10^7 cells was washed once in 1 ml phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.4 (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO₄, 18 mM KH₂PO₄ in water) and resuspended in 150 μ l of PBS containing 10 μ M FITC-VAD-fmk (CaspACE™, Promega).

After incubation for 20 min at 30°C with agitation, cells were washed in 1 ml PBS, resuspended in 100 µl PBS and analysed under the fluorescence microscope. Microscopic analyses were performed by using a fluorescence inverted-microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFx M® 12bit and treated with UIC Metamorph® software.

Flow cytometry analysis

Cells were stained with FITC-VAD-fmk as described above. Flow cytometry analysis was performed using FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) on 10,000 cells. Emission from the argon LASER was at 488 nm; emission settings were 515-545 nm (filter FL1) for FITC-VAD-fmk. The percentage of positive stained cells was determined as the population of fluorescent cells with a higher fluorescent intensity than an unstained negative control. Three independent cultures were analysed.

Statistical Analysis

Significance of the variations of results among strains was determined by a global analysis of variance (ANOVA) as described in <http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>. In Figure 35, the significance of variation with respect to WT was also pair-wise evaluated by the test of Student.

Results

Cin cells are sensitive to cell-wall stresses

In order to compare the Cin strain with other *cnx1* mutants such as *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* displaying similar morphology (Elagöz *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2004), cells grown in exponential phase were analyzed by Nomarski microscopy. As shown in Figure 31A, Cin cells were shorter and rounder than *mini_cnx1* or *Δhcd_cnx1*, and sometimes presented an irregular pear-like shape. To investigate if the defects causing the altered morphology also affect the viability of the cells, the growth of these strains was examined at 30°C and 37°C. At 30°C, the various strains grew at rates comparable to WT, whereas at 37°C the growth of Cin was slightly affected. In contrast, the growth of *mini_cnx1* cells was dramatically impaired at 37°C (Fig. 31B). Thus, the pathway completing the essential function of calnexin/Cnx1p allows the Cin strain to withstand the 37°C stress. Both *Δhcd_Cnx1p* and *mini_Cnx1p* are devoid of chaperone activity *in vitro* (Maréchal *et al.*, 2004). Since the Cin state is strongly induced by the *Δhcd_cnx1* mutant but not by *mini_cnx1* (Elagöz *et al.*, 1999), the differences in thermosensitivities between these two strains could be due to the activity of the pathway replacing the essential function of calnexin/Cnx1p in the *Δhcd_cnx1* cells.

We have previously observed that culturing cells in medium supplemented with the osmostabilizer sorbitol rescues the growth defect of *cnx1* mutants at 37°C (Elagöz *et al.*, 1999), and hence we wished to test if this could also be the case for Cin cells. As shown in Figure 31B, the addition of 1.2 M sorbitol to the media rescued the sensitivity of Cin cells 37°C. The rescue by sorbitol of aberrant morphology and reduced growth phenotypes is indicative of cell-wall defects (Rose & Fink, 1987; Elagöz *et al.*, 1999). Accordingly, the Cin strain was further examined by exposure to cell-wall stresses. Calcofluor white is a fluorescent dye that binds to cell-wall and septum polysaccharides of dividing cells, and it inhibits the growth of mutants that are defective in cell-wall morphogenesis (Rose & Fink,

1987; Hampsey, 1997). In previous reports (Elagöz *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2004), microscopy analyses with Calcofluor-white showed that *mini_cnx1*, *Δhcd_cnx1* and Cin cells exhibit aberrant septum staining. As shown in Figure 32A, the growth of Cin cells is inhibited by Calcofluor white, while it does not affect the growth of the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants. The antibiotic hygromycin B lowers viability of cells affected in early stages of glycoprotein biosyntheses (Dean, 1995). Figure 32A shows that Cin cells were also affected by hygromycin B, but not the two *cnx1* mutants. It was reported that caffeine, which inhibits mammalian phosphodiesterase (Parsons *et al.*, 1988), can also inhibit the growth of cell-wall yeast mutants (Martin *et al.*, 2000). As depicted in Figure 32A, Cin cells were very sensitive to 5 mM caffeine. The sensitivity of Cin cells to Calcofluor white, hygromycin B and caffeine was rescued by reintroduction of *cnx1*⁺ on a plasmid. These observations indicate that the absence of a functional calnexin/Cnx1p in the Cin strain results in important cell-wall defects.

To further investigate the integrity of the cell-wall in Cin cells, a disc diffusion assay was performed to quantify the mutants' sensitivity to SDS, a detergent which disturbs the membrane and exacerbates cell-wall defects (Sirisattha *et al.*, 2004). As it is possible to see in Figure 32B, Cin cells were more sensitive to SDS than WT and the two *cnx1* mutants at 30°C. Reintroduction of *cnx1*⁺ on an episome into Cin cells (Cin + *pcnx1*⁺) palliated the SDS sensitivity to a level comparable to the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants. Furthermore, increasing the temperature to 37°C dramatically impaired the growth of Cin cells and the two *cnx1* mutants, suggesting that full-length calnexin/Cnx1p is necessary to cope with the combination of both high temperature and detergent stresses. Because the Cin state is induced at ~70% in the *Δhcd_cnx1* strain (Collin *et al.* 2004), the elevated SDS sensitivity displayed by the *Δhcd_cnx1* mutant at 37°C could be due the added rather than complementing effects in the same cells of defective calnexin function and the Cin state.

Cin cells are sensitive to calcium

Like its mammalian counterpart, *S. pombe* calnexin (Cnx1p) is a Ca^{2+} -binding protein (Parlati *et al.*, 1995). It was therefore interesting to evaluate the degree of sensitivity of Cin cells to Ca^{2+} as compared with the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants. The addition of 50 mM CaCl_2 significantly reduced the growth of Cin cells at 30°C as compared with the other strains tested (Fig. 33B). Moreover, the sensitivity to Ca^{2+} was enhanced at 37°C, and reintroduction of *cnx1*⁺ into the Cin strain reduced this sensitivity. That Cin cells displayed higher sensitivity to CaCl_2 than *cnx1* mutants suggests that the absence of calnexin/Cnx1p affected the balance of calcium in the cells. Thus, it seems that the portion of calnexin/Cnx1p encoded by the two *cnx1* deletion mutants tested is sufficient to cope with the 50 mM Ca^{2+} concentration at 30°C. However, at 37°C *mini_cnx1* low tolerance to Ca^{2+} , suggesting that the functionality of the mutant calnexin/Cnx1p is compromised as previously observed (Elagöz *et al.*, 1999).

Cin cells are sensitive to heat shock but not to protein folding stresses

Next we wished to examine if Cin cells display other defects associated with the ER. Because the growth of Cin cells was affected at 37°C, and since calnexin/Cnx1p is a heat-shock protein whose mRNA levels increase 3-fold following heat treatment (Jannatipour & Rokeach 1995; Chen *et al.*, 2003), the effect of heat shock on Cin cells was studied. Cells were treated at 50°C with or without a pre-treatment at 37°C, and spotted on MM. Cin cells were more sensitive to heat shock than the other strains (Fig. 33A), and the reintroduction of plasmid-borne *cnx1*⁺ salvaged this sensitivity for a treatment of 5 minutes. Moreover, a pre-incubation at the intermediate temperature of 37°C attenuated the sensitivity of all strains to heat shock, in agreement with previous reports showing that such a treatment induces thermotolerance in yeasts (Parsell & Lindquist, 1993; Saris & Makarow, 1998).

Since calnexin is a molecular chaperone involved in protein folding and quality control in the ER, we were interested to test resistance of Cin cells to protein-folding

stresses. To this end, the growth of strains was examined in media supplement with either 5% EtOH or 1 mM DTT, conditions which affect protein folding (Jimenez & Oballe, 1994; Elagöz *et al.*, 1999). At 30°C, Cin cells were as resistant to these stresses as the WT strain, but the combination of heat and folding stresses exacerbated the sensitivity of all the strains tested in the case of EtOH and that of *mini_cnx1* and Cin in the case of DTT (Fig. 33B).

Upon accumulation of unfolded or misfolded proteins within the ER, a stress signalling cascade (the unfolded protein response, UPR) is activated to induce synthesis of chaperones and folding enzymes in order to cope with the stress and prevent cell death (Ma and Hendershot 2004; Schroder & Kaufman, 2005). A diagnostic marker of UPR is an increase in the levels of the BiP chaperone (Pidoux & Armstrong, 1992). Accordingly, to evaluate the ER stress in the Cin strain, the levels of the BiP protein were quantified by immunoblotting. As shown in Figure 33C, there were no significant differences in the BiP levels in the various strains compared with the WT as evaluated by the ANOVA test, suggesting that neither the lack of calnexin/Cnx1p nor the Cin state provoke the accumulation of misfolded protein or UPR induction.

The secretion efficiency of the glycoprotein cellulase is considerably increased in Cin cells

Previously, we have reported that the chaperone function of calnexin/Cnx1p is not essential for protein secretion in *S. pombe* as the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants are able to secrete active proteins (Maréchal *et al.*, 2004). In order to gain further insight into the role of calnexin/Cnx1p in this process, the secretion efficiency of Cin cells was investigated. To this end, human serum albumin (HSA) and cellulase (Cel1p) from *Aspergillus aculeatus* were used in this work as the model proteins, since they were previously shown to interact with calnexin/Cnx1p (Maréchal *et al.*, 2004).

As demonstrated for other mutants, the absence of calnexin/Cnx1p chaperone function in Cin cells did not affect the secretion of the non-glycosylated model protein HSA (Fig. 34A). It has been proposed that interaction with a functional calnexin/Cnx1p may be required for optimal secretion efficiency but the rate-limiting step for HSA secretion is protein folding (Maréchal *et al.*, 2004). The results presented here suggest that while calnexin/Cnx1p binds HSA, this interaction does not appear to be absolutely required for efficient secretion of this non-glycosylated model protein.

The interaction of cellulase (Cellp) with calnexin/Cnx1p and its ER partners has been proposed to be the rate-limiting step for its secretion (Maréchal *et al.*, 2004). In the Cin strain the secretion efficiency of cellulase was 8-fold higher as compared with WT (Fig. 34A), and 2-fold higher relative to the levels reported for *mini_cnx1* and *Ahcd_cnx1* (Maréchal *et al.*, 2004). It should be noted that the increased secretion by Cin cells was not due to cell lysis, as verified by immunoblotting of the concentrated supernatant against the ER protein BiP (data not shown). Reintroduction of plasmid-borne *cnx1*⁺ into the Cin strain diminished the secretion efficiency of cellulase to approximately half of the WT level. These results support the hypothesis that the interaction of cellulase with calnexin/Cnx1p is rate limiting for the secretion of this glycoprotein, as the absence of calnexin/Cnx1p resulted in the highest level of secretion of this model protein among the *cnx1* mutants.

Because of the remarkable increase in the secretion efficiency of cellulase by Cin cells, we considered that it was interesting to assess if the secreted cellulase is correctly folded. Accordingly, the quality-control efficiency for this protein was estimated as the ratio activity/quantity of secreted cellulase. This ratio for Cin cells was 5-fold lower than that of WT (Fig. 34B), indicating that increased cellulase secretion by Cin cells corresponds to a reduced efficiency of folding quality control of this glycoprotein. In other words, it appears as though a considerable number of partially folded or misfolded cellulase

molecules escape the ER of Cin cells in the absence of calnexin/Cnx1p. Remarkably, reintroduction of plasmid-borne *cnxI*⁺ into the Cin strain resulted in a 4-fold increase in the apparent quality-control as compared with the WT strain (Fig. 34B). This increase in quality control is not caused by a calnexin/Cnx1p overexpression as its levels were not significantly different among the strains (Fig. 34C). Note that calnexin/Cnx1p from the strain Cin + *pcnxI*⁺ expressing cellulase migrates slightly more slowly as compared to the other strains. One possibility is that the strain Cin + *pcnxI*⁺ overexpressing cellulase is under a stress which may lead to additional post-translational modification of calnexin/Cnx1p (Jannatipour & Rokeach, 1995). This possibility is currently under investigation in our laboratory.

Increased levels of caspase activity in Cin cells

Unicellular organisms such as *S. cerevisiae* were shown to undergo programmed cell death (PCD) in response to stresses like low concentrations of acetic acid, hydrogen peroxide, high concentration of mating pheromone, and DNA-damage conditions (Madeo *et al.*, 2002; Burhans *et al.*, 2003). Likewise, *S. pombe* was also shown to carry out an apoptosis-like process (Low *et al.* 2005). Similar to apoptosis in mammalian cells, this apoptotic-like cell-death program in yeast involves caspase-like proteases (metacaspases), DNA fragmentation, and accumulation of reactive oxygen species (ROS; ref. Low *et al.*, 2005).

To explore the possibility of PCD activation in the Cin strain, the fluorogenic caspase substrate FITC-labelled VAD-fmk was used. This compound was reported to be recognized by *S. cerevisiae* active caspases or proteases (Madeo *et al.*, 2002), and this present study demonstrates that this caspase probe is also operative in *S. pombe* (see Fig. 34A). Flow cytometry with this probe was used to evaluate the levels of caspase activity in the different strains in log phase and stationary phase. In stationary phase all strains exhibited higher caspase activity than in exponential phase (Fig. 34B). This observation is consistent with previous studies with *S. cerevisiae* showing that the apoptosis-like program

is induced in stationary phase (Herker *et al.*, 2004; Knorre *et al.*, 2005). After 4 days in stationary phase, the *mini_cnx1* and Δhcd_cnx1 mutants showed a similar caspase activity to the WT levels, and this remained unchanged after introduction of *cnx1*⁺ on a plasmid (Fig. 34B). In contrast, Cin cells exhibited a significant increase in caspase activity. The Cin + *pcnx1*⁺ strain exhibited an equally high level of caspase activation as the Cin cells. Thus, reintroduction of *cnx1*⁺ did not rescue the caspase activation in the Cin strain, suggesting that both the absence of a functional calnexin/Cnx1p and the Cin state itself could induce caspase activity in *S. pombe*. The variations in the caspase levels were not due to differences in calnexin/Cnx1p expression between strains and growth phases as shown by western blotting (Fig. 35C).

Discussion

To gain more insight into the calnexin-independent state, we characterized the Cin strain in comparison to WT and the *mini_cnx1* and Δhcd_cnx1 deletion mutants, which are both devoid of chaperone function.

Cin cells were smaller and displayed aberrant pear or round shape morphology at 30°C; phenotypes that are diagnostic of cell-wall defects. Indeed, Cin cells were more sensitive than the *mini_cnx1* and Δhcd_cnx1 mutants to the cell-wall stresses Calcofluor white, hygromycin B, caffeine, and SDS. As *mini_Cnx1p* and Δhcd_Cnx1p lack chaperone activity *in vitro*, it appears then that the chaperone function of calnexin/Cnx1p may not be absolutely required for cell-wall biosynthesis at 30°C. On the other hand, the altered morphology and cell-wall sensitivity of Cin cells was rescued by reintroduction of plasmid-borne *cnx1*⁺. These observations suggest a role of the calnexin/Cnx1p molecule in the integrity of the *S. pombe* cell-wall that appears to be other than its chaperone function, and that could reside in its interactions with other components of the ER quality-control mechanism. The involvement of the ER quality-control machinery in yeast cell-wall biogenesis has been documented. In *S. cerevisiae* for instance, the ER chaperone Kar2p/BiP and the quality-control proteins glucosidase I (*CWH41*) and glucosidase II (*GLS2*) are necessary for the formation of a functional cell wall, but not for efficient protein secretion (Simons *et al.*, 1998; Shahinian *et al.*, 1998). In *S. pombe*, genetic depletion of the quality-control sensor protein UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) was also reported to cause cell-wall defects (Fanchiotti *et al.*, 1998). Moreover, the fission yeast's calnexin/Cnx1p was shown to functionally interact with UGGT, glucosidases I and II, and to form a complex with BiP *in vivo* (Jannatipour & Rokeach, 1995; Franchiotti *et al.*, 1998; Elagöz *et al.*, 1999). *In vivo*, the interaction with BiP occurs via a 52-residue portion of calnexin/Cnx1p found in both *mini_Cnx1p* and Δhcd_Cnx1p mutants (Elagöz *et al.*, 1999; Maréchal *et al.*, 2004). Since no interaction between calnexin/Cnx1p and BiP could be observed *in vitro*, it was proposed that *in vivo* this 52-residues region of

calnexin/Cnx1p could act in the scaffolding of a complex including BiP (Elagöz *et al.*, 1999; Maréchal *et al.*, 2004). Thus, one could speculate that the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* strains are more resistant to cell-wall stresses as compared to Cin cells because the calnexin/Cnx1p mutants engage via the 52-residue region in interactions with components of the folding/quality control machineries that are important for cell-wall integrity.

Because of its various implications in the protein folding process, we investigated if the absence of calnexin/Cnx1p resulted in a higher sensitivity to protein folding stresses. Cin cells displayed the same sensitivity to DTT and EtOH stresses as the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants. This lack of sensitivity to protein folding stresses for Cin cells correlated with undetected UPR induction in these cells. These phenotypes suggest that the sum of chaperones and accessory proteins in Cin cells is sufficient to cope with the amount of misfolded proteins caused by DTT and EtOH treatments in the absence of calnexin/Cnx1p.

Calnexin is implicated in the correct folding of secretory proteins. Experimentally, protein secretion can be modulated by altering the folding and quality control machinery of the ER, but different effects are observed depending on the substrates studied (reviewed in Conesa *et al.*, 2001). For example, deletion of the calnexin homologue *CNE1* did not alter the secretion levels of non-glycosylated proteins in *S. cerevisiae*, but it did affect differently the secretion of two glycosylated proteins (Song *et al.*, 2002). In *S. pombe*, *cnx1*-deletion mutants devoid of chaperone function showed increased secretion of several proteins (Maréchal *et al.*, 2004). The results presented here demonstrate that the absence of calnexin/Cnx1p chaperone activity in Cin cells did not influence the secretion of the non-glycosylated protein HSA, while it resulted in a considerable increase in secretion of the glycosylated protein cellulase. Interestingly, both model proteins were shown to transiently bind calnexin/Cnx1p *in vivo* (Maréchal *et al.*, 2004). Further analysis of the cellulase secreted by Cin cells revealed a lowered activity/amount ratio than that secreted by the WT

strain, indicating a reduced efficiency of quality control of folding for this glycoprotein. Intriguingly, the Cin and *cnx1*-mutant strains studied did not exhibit significant UPR induction nor were they severely affected by protein-folding stresses, suggesting that the balance of chaperones in the ER is adequate to ensure protein folding. Thus these observations suggest that calnexin/Cnx1p may be of greater importance for the folding and quality control of specific proteins as is the case for cellulase. Also, because of the cell-wall sensitivity displayed by the Cin cells, it appears reasonable to assume that calnexin/Cnx1p would be implicated directly or indirectly in the biosynthesis of some cell-wall proteins. On the other hand, the reintroduction of plasmid-borne *cnx1*⁺ in Cin cells resulted in a diminished cellulase secretion of about half WT levels while the secreted proteins display a 4-times higher activity. One could envisage that the quality-control machinery in place in Cin cells replaces some of calnexin's functions and the addition of *cnx1*⁺ to the system somewhat enhances the quality control levels. The apparent increase in quality control in Cin + *pcnx1*⁺ cells may result from the enhanced retention of secreted glycosylated proteins in which a protein can only escape the machinery when correctly folded.

Heat-shock response and thermosensitivity imply two distinct pathways in yeast (Lindquist, 1992). In the primary response after heat shock, the expression of numerous genes (hsp), including chaperones, increases significantly in order to aid the cell in recuperating from heat stress, and this is different from the pathways required to tolerate prolonged culture at elevated temperature (Morano *et al.*, 1998). In this vein, calnexin/Cnx1p seems to have a role in the heat-shock response since Cin cells display higher sensitivity than the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutant strains. This also indicates that the pathway compensating for the essential function(s) of calnexin/Cnx1p in Cin cells does not provide sufficient protection against heat shock. Since the role of calnexin/Cnx1p in response to heat shock is accomplished by the *mini_cnx1* and *Δhcd_cnx1* mutants, which lack chaperone activity, these observations suggest that this calnexin/Cnx1p function may lie in its interactions with other components of the protein folding machinery, such as BiP.

On the other hand, the pathway compensating for the essential function(s) of calnexin/Cnx1p provides enough resistance to Cin cells to afford prolonged growth at 37°C and resistance to folding stresses.

Initial indications for PCD in *S. pombe* were obtained by examining the effects of expressing human Bcl-2 family proteins Bax, Bak, Bcl-2, and Bcl-XL in the fission yeast (Jurgensmeier *et al.*, 1997; Low *et al.*, 2005). Expression of the pro-apoptotic proteins Bak resulted in *S. pombe* lethality and this phenotype was suppressed by co-expression of the anti-apoptotic protein Bcl-XL or Bcl-2. A two-hybrid system screen aimed at discovering the *S. pombe* lethal partner of Bak identified calnexin/Cnx1p as required for Bak-induced cell death (Torgler *et al.*, 1997). On the basis of the potential implication of calnexin/Cnx1p in apoptosis, it was interesting to explore the possible induction of caspase activity as a marker for apoptosis in the Cin strain, since it is able to survive in the absence of calnexin/Cnx1p. The use of a fluorogenic marker in exponential phase revealed that all strains undergo approximately the same level of caspase activation as WT. However, after four days in stationary phase, increased caspase response was observed for the Cin strain as compared with WT. Because of the alluded implication of calnexin/Cnx1p in apoptosis signalling, it appears that the mini_Cnx1p and Δ hcd_Cnx1p mutants may efficiently act in apoptosis signalling. The high rate of caspase activation in Cin cells could be due to the absence of calnexin/Cnx1p. Interestingly however, reintroduction of WT calnexin/Cnx1p into the Cin strain did not re-establish the basal level of metacaspase activation, indicating that the Cin state could itself be implicated in the induction of the apoptosis cascade. This also suggests a dominance of the Cin state on calnexin function as we previously observed (Collin *et al.*, 2004). Our results are consistent with the notion that calnexin/Cnx1p plays a role in signalling apoptosis in *S. pombe*, a hypothesis which is now under investigation in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP-62703) to L.A.R. P.B.B. received an NSERC PhD studentship, and P.S., an FRSQ MSc studentship. R.G., A.R., P.S and C.T. received scholarships from Faculté des Études Supérieures-Département de biochimie, Université de Montréal.

We thank Alexandre Leroux and Dr. Jim Omichinski for critical reading of the manuscript and useful suggestions.

Reference

- Ahner A and Brodsky JL (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* **14**: 474-478.
- Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, and Hartl FU (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 17-29.
- Beaulieu H, Elagöz A, Crine P, and Rokeach LA (1999) Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem J* **340**: 813-819.
- Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, Ramachandran L, Urso G, and Huberman JA (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat. Res.* **532**: 227-243.
- Burke JD and Gould KL (1994) Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe his3* gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **242**: 169-176
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bahler J (2003) Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.
- Chien P, Weissman JS, and DePace AH (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Ann Rev Biochem* **73**: 617-656.

- Collin P, Beauregard PB, Elagöz A, and Rokeach LA (2004) A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* **117**: 907-918.
- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, and van den Hondel CAMJJ (2001) The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genet Biol* **33**: 155-171.
- Dean N (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1287-1291.
- Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890.
- Elagöz A, Callejo M, Armstrong J, and Rokeach LA (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* **112**: 4449-4460.
- Elbe R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**: 18-19.
- Ellgaard L and Frickel E (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* **39**: 223-347.
- Ellgaard L and Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 181-191.
- Fanchiotti S, Fernandez F, D'Alessio C, and Parodi AJ (1998) The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biol* **143**: 625-635.

- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, and Brodsky JL (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* **35**: 149-191.
- Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, and Aguzzi A (2005) Human Prion Diseases: Molecular and Clinical Aspects. *Arch Neurol* **62**: 545-552.
- Hampsey M (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1099-1133.
- Hebert DN, Garman SC, and Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends in Cell Biol* **15**: 364-370
- Helenius A and Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, 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.
- Ihara Y, Cohen-Doyle MF, Saito Y, and Williams DB (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell* **4**: 331-341
- Jannatipour M, Callejo M, Parodi AJ, Armstrong J, and Rokeach LA (1998) Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *S. pombe*. *Biochemistry* **37**: 17253-17261.
- Jannatipour M and Rokeach LA (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* **270**: 4845-4853.

- Jimenez J and Oballe J (1994) Ethanol-hypersensitive and ethanol-dependent cdc-mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **245**: 86-95.
- Jurgensmeier JM, Krajewski S, Armstrong RC, Wilson GM, Oltersdorf T, Fritz LC, Reed JC, and Otilie S (1997) Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **8**: 325-339.
- Kleizen Z and Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Cur Opin Cell Biol* **16**: 343-349.
- Knorre DA, Smirnova EA, and Severin FF (2005) Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* **270**: 264-266.
- Kretschmar H (1999) Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249 S3**: 56-63.
- Kuznetsov G and Nigam SK (1998) Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng J Med* **339**: 1668-1695.
- Lederkremer GZ and Glickman MH (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 297-303.
- Liebman SW and Derkatch IL (1999) The yeast (*PSI*⁺) prion: making sense of nonsense. *J Biol Chem* **274**: 1181-1184.
- Lindquist S (1992) Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Cur Opin Gen Develop* **2**: 748-755.

- Low CP, Liew LP, Pervaiz S, and Yang H (2005) Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1199-1206.
- Ma Y and Hendershot LM (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* **28**: 51-65.
- Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wising S, and Frölich K-U (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with application in cell biology and medicine. *Curr Genet* **41**: 208-216.
- Maréchal A, Tanguay P-L, Callejo M, Guérin R, Boileau G, and Rokeach LA (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* **380**: 441-448.
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, and Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, and Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**: 766-772.
- Morano KA, Liu PCC, and Thiele DJ (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 197-203.
- Moreno S, Klar A, and Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* **194**: 795-823.
- Parlati F, Dignard D, Bergeron JJM, and 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.

- Parsell DA and Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496.
- Parsons WJ, Ramkumar V, and Stiles GL (1988) Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol Pharmacol* **34**: 37-41
- Pidoux AL and Armstrong J (1992) Analysis of the BiP and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **11**: 1583-1591.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13363-13383.
- Rose MD and Fink GR (1987) *KARI*, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* **48**: 1047-1060.
- Ross ED and Wickner RB (2004) Prions of yeast fail to elicit a transcriptional response. *Yeast* **21**: 963-972.
- Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, and Williams DB (1999) Calreticulin functions as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J* **18**: 6718-6729.
- Saris N and Makarow M (1998) Transient ER retention as stress response: conformational repair of heat-damaged proteins to secretion-competent structures. *J Cell Sci* **111**: 1575-1582.
- Schrag JD, Procopio DO, Cygler M, Thomas DY, and Bergeron JJM (2003) Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 49-57

- Schroder M and Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63
- Selkoe D (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**: 900-904.
- Shahinian S, Dijkgraaf GJP, Sdicu AM, Thomas DY, Jakob CA, Aebi M, and Bussey H (1998)
Involvement of protein *N*-glycosylation and processing in the biosynthesis of cell wall β -1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**: 843-856.
- Simons JF, Ebersold M, and Helenius A (1998) Cell wall β -1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J* **17**: 396-405.
- Sirisattha S, Momose Y, Kitagawa E, and Iwahashi H (2004) Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research* **38**: 61-70.
- Song Y, Azakami H, Shamima B, Jianwei H, and Kato A (2002) Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Lett* **512**: 213-217.
- Stronge VS, Saito Y, Ihara Y, and Williams DB (2001) Relationship between Calnexin and BiP in Suppressing Aggregation and Promoting Refolding of Protein and Glycoprotein Substrates. *J Biol Chem* 276: 39779.
- Torgler CN, Tiani M, Raven T, Aubry J, 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 and Differen* **4**: 263-271.

- Trombetta ES and Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 649-676.
- Uptain SM and Lindquist S (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* **56**: 703-741.
- van Anken E and Braakman I (2005) Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 191-228.
- Wickner RB, Edskes HK, Ross ED, Pierce MM, Baxa U, Brachmann A, and Shewmaker F (2004) Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Ann Rev Genet* **38**: 681-707.

Legends

Figure 31. Cin cells display aberrant morphology. **A)** Cells were grown to mid-exponential phase at 30°C and observed by differential interference contrast (Nomarski) microscopy. Bar corresponds to 5 µm. **B)** Exponentially growing cells were spotted (10^{-1} - 10^{-4}) on MM plates with or without 1.2 M sorbitol. Strains were incubated at 30°C or 37°C for 7 days. Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102). Results are representative of three independent assays.

Figure 32. Cin cells display cell-wall sensitivity. **A)** Exponentially growing cells were serially diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on MM plates with or without the indicated chemicals. Strains were incubated at 30°C for 7 days. Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102). Results are representative of three independent assays. **B)** To measure sensitivity of mutants to SDS, exponentially growing cells were spread in top agar (0.7%) to a lawn. Disc diffusion assays were performed by placing a 3M paper disc in the center of the plate and 10 µl 10% SDS was spotted on the disc. After 5 days of incubation at 30°C or 37°C, the diameter of the zone of growth inhibition (halo) was measured and reported as a ratio of mutant on WT. The WT halo had a diameter of 28mm, which was arbitrarily set as 100%. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the strain values are significantly different (30°C, P = 0.03; 37°C, P = 0.0005). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102).

Figure 33. Phenotypic characterisation of Cin cells. **A)** Exponentially growing cells were treated at 50°C with or without a 30 minutes preheating at 37°C. Cells were serially

diluted (10^{-1} - 10^{-4}), spotted on MM, and grown for 7 days at 30°C. The growth extent is indicated by the number of the dilutions where growth was observed, from +++++ (10^{-4}) to - (no growth). Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102). Results are the mean of three independent assays. **B)** Exponentially growing cells were serially diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on MM plates with or without chemicals, as indicated. All strains were incubated at 30°C or 37°C for 7 days. Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102). **C)** Relative levels of BiP protein. Samples of 50 μg protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-10% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against BiP. The same membrane was subsequently immunoblotted with antibodies directed against PCNA as an internal control. The level of the ratio BiP/PCNA of the WT strain was arbitrary set to 1.0. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the values obtained among the strains were not significantly different ($P = 0.06$). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *Δhcd_cnx1* (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102).

Figure 34. Cin cells secrete considerably more cellulase than wild type. Samples of 12 ml of media from exponentially growing cells expressing the model protein HSA or Cellp were concentrated 50X using Amicon Ultra 10 000 MWCO concentrators (Millipore, Bedford, USA). The equivalent of 1 OD₅₉₅ concentrated supernatant or 0.25 OD₅₉₅ of cells for HSA and 1 OD₅₉₅ cells for Cellp were subsequently loaded on SDS-12% polyacrylamide gel, and quantified by western blotting against an HA-tag for both HSA and Cellp. **A)** Secretion efficiency was determined by calculating the ratio of secreted proteins on total (secreted + intracellular) model protein. Results are the mean of three independent assays. An ANOVA test showed that the differences between strains for HSA secretion were not significant ($P = 0.4$), but were significant for cellulase secretion ($P < 0.001$). Strains tested were for HSA secretion WT (SP8655), Cin (SP8670) and Cin +

pcnx1⁺ (SP8675) and for cellulase secretion WT (SP9672), Cin (SP11338) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP11345). **B)** Quality-control efficiency was calculated by dividing cellulase activity (see experimental procedures) by the amount of secreted protein. The quality-control efficiency of the WT strain was arbitrarily set to 1.0. An ANOVA test showed that the difference observed among the strains was significant (P = 0.0005). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP9672), Cin (SP11338) and Cin + *pcnx1*⁺ (SP11345). **C)** Relative levels of Cnx1p. Samples of 50 µg protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and stained with Ponceau Red. A band at about 50 kDa was chosen as internal control for loading. The same membrane was subsequently immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against Cnx1p. The level of the ratio Cnx1p/reference band of the WT strain was arbitrarily set to 1.0. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the variations observed among the strains (excluding the Cin strains) were not significant (P = 0.43). Results are the mean of two independent assays. Strains tested were WT (SP3232), Cin (SP7188), Cin + *pcnx1*⁺ (SP7102), WT cellulase (SP9672), Cin cellulase (SP11338) and Cin + *pcnx1*⁺ cellulase (SP11345).

Figure 35. Increased caspase induction in Cin cells and *cnx1* mutants. Caspase activity was evaluated by the CaspACETM FITC-VAD-fmk fluorescence assay on exponential phase and 4 days stationary phase cultures. **A)** Cells displaying caspase activation are shown by fluorescence microscopy. Nomarski microscopy is shown as control. **B)** Stained cells were counted by flow cytometry analysis. Samples of 10,000 cells were analysed from 3 independent cultures for each strain. Results are the mean of these three assays. The significance of differences in the results was evaluated by a Student test, calculated with respect to the WT strain. An ANOVA test showed that the difference observed among the strains was not significant for the exponential phase values (P = 0.09), but are significant for the stationary phase values (P = 0.0004). An additional statistical analysis was performed pair-wise with respect to the WT strain by the test of Student. For this panel, strains tested were WT (SP3232), *mini_cnx1* (SP7109), *mini_cnx1* + *pcnx1*⁺

(SP7181), *Δhcd_cnx1* (SP3234), *Δhcd_cnx1 + pcnx1⁺* (SP7061), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1⁺* (SP7102). C) The relative levels of calnexin/Cnx1p were determined as the ratio of Cnx1p/BiP. Samples of 50 μg protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against Cnx1p. The same membrane was subsequently stripped and immunoblotted with rabbit polyclonal anti-BiP antibodies as an internal control. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the variations observed among the strains were not significant (P = 0.73). Results are the mean of two independent assays. Strains tested were WT (SP3232) and Cin + *pcnx1⁺* (SP7102).

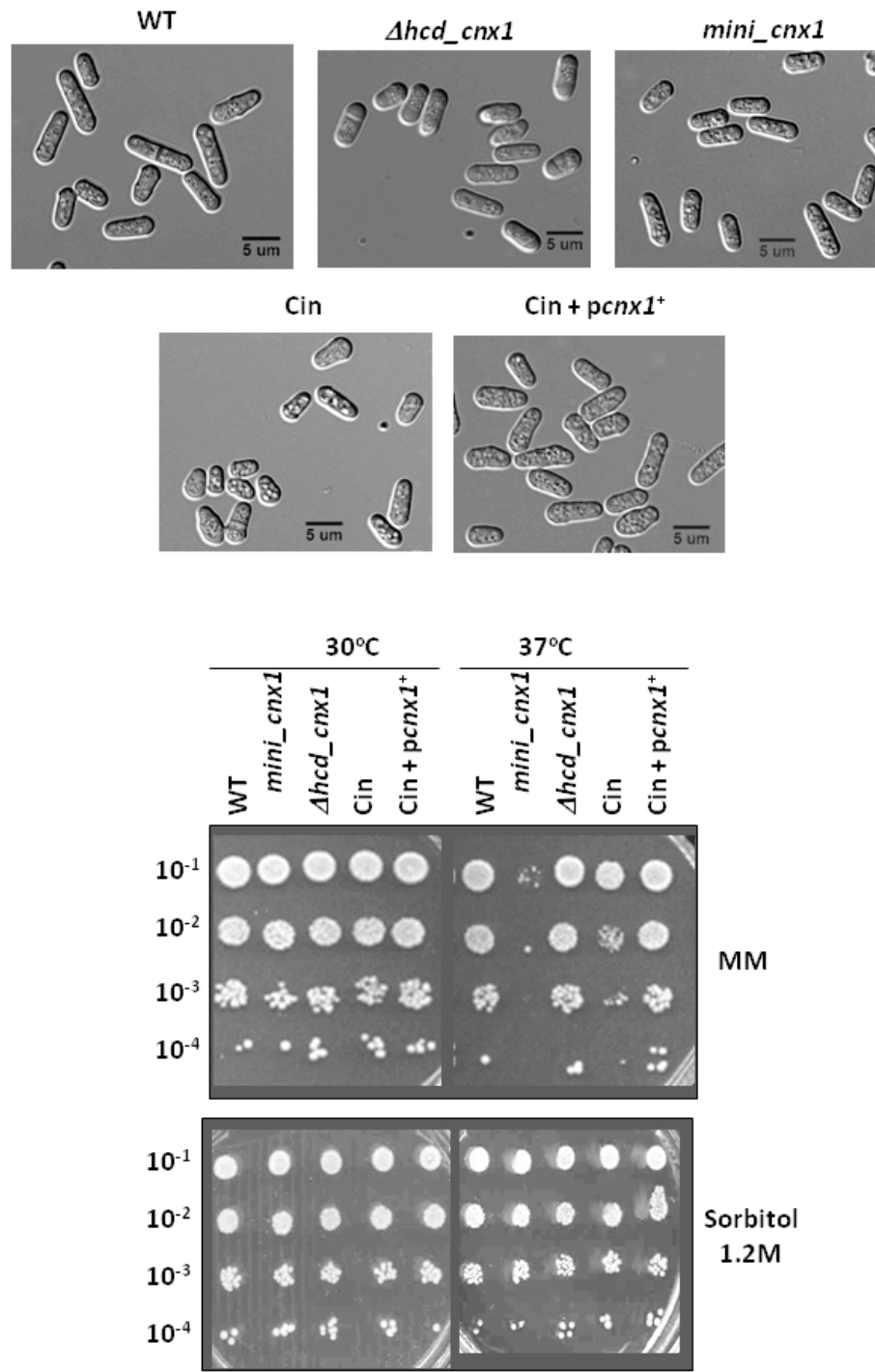


Figure 31. Cin cells display aberrant morphology.

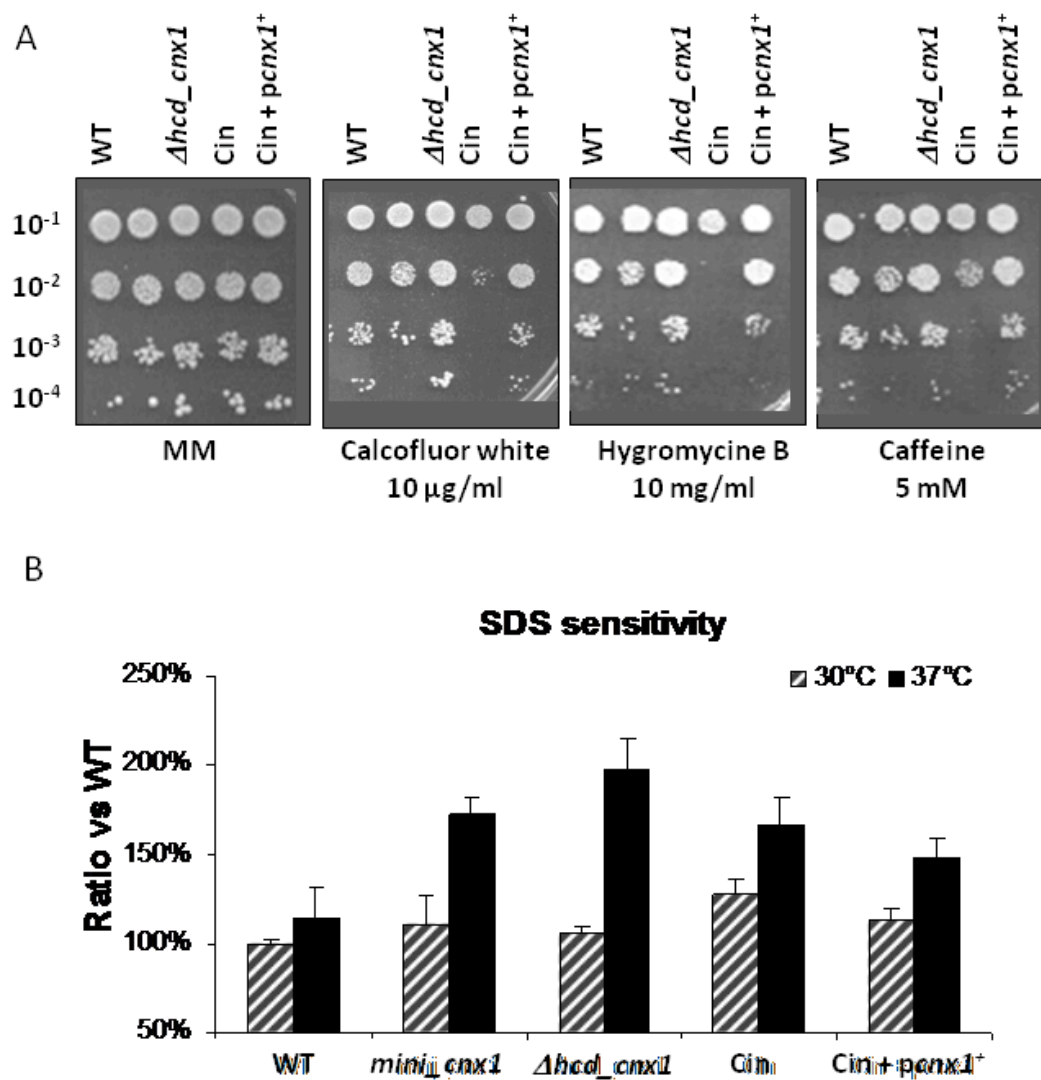


Figure 32. Cin cells display cell-wall sensitivity.

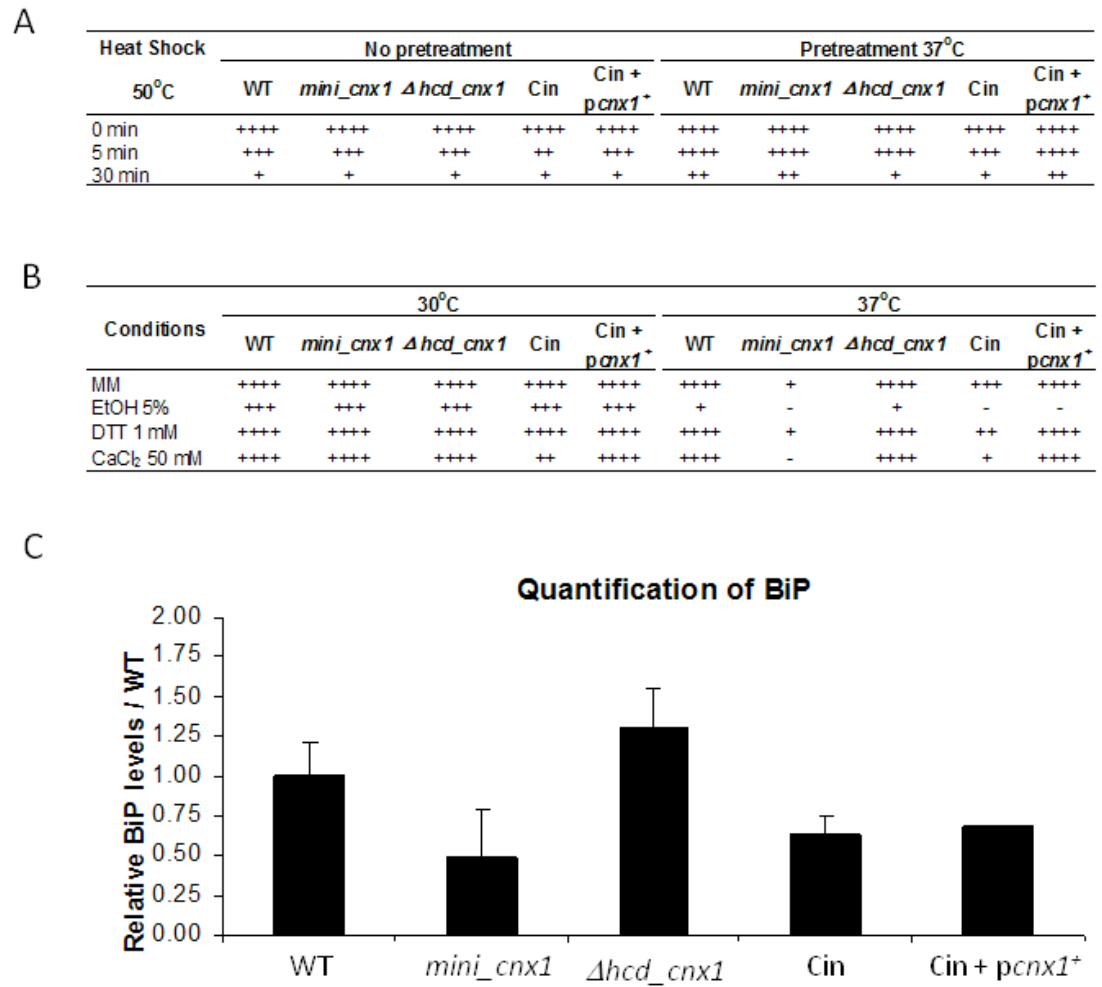


Figure 33. Phenotypic characterisation of Cin cells.

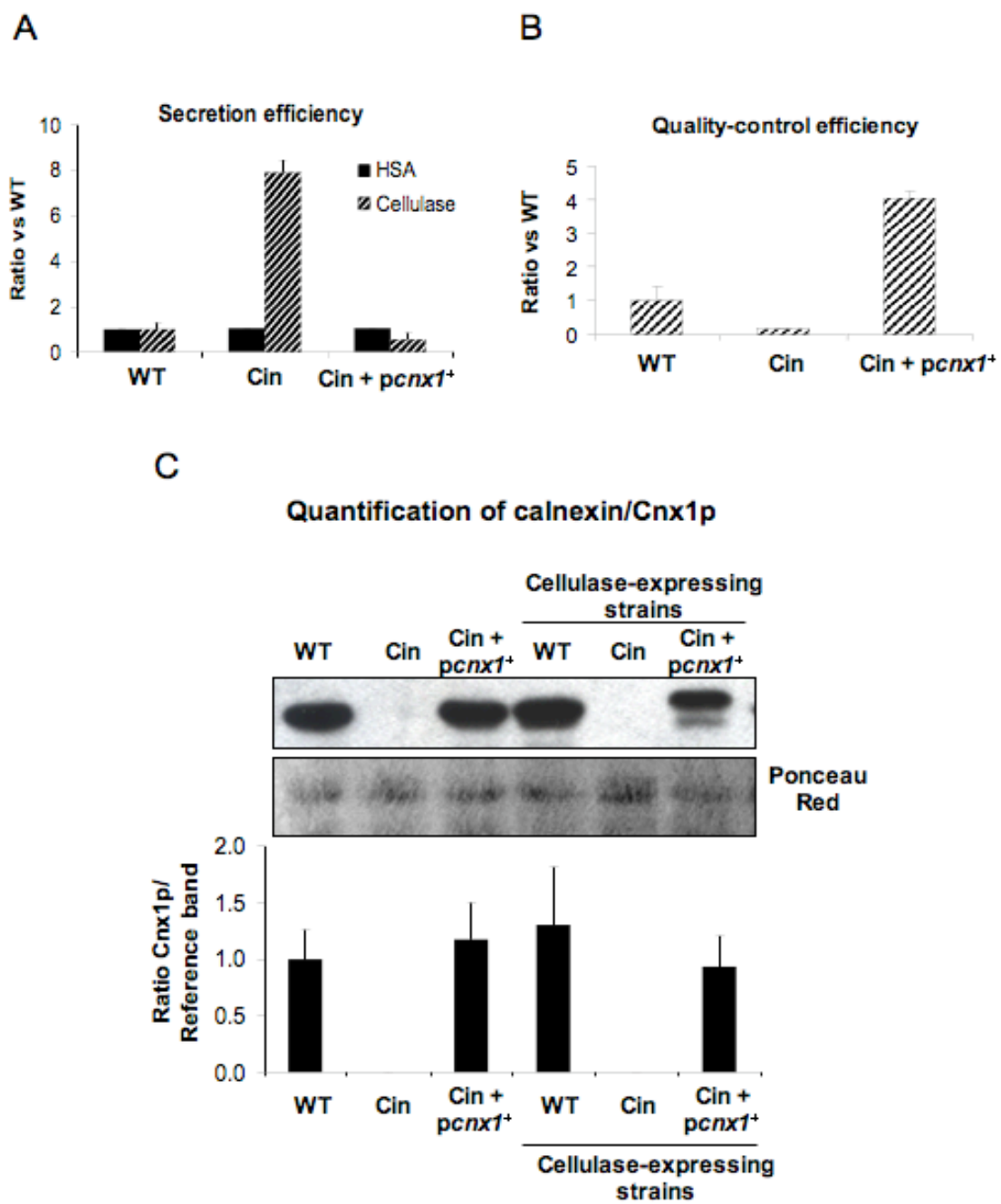


Figure 34. Cin cells secrete considerably more cellulase than wild type.

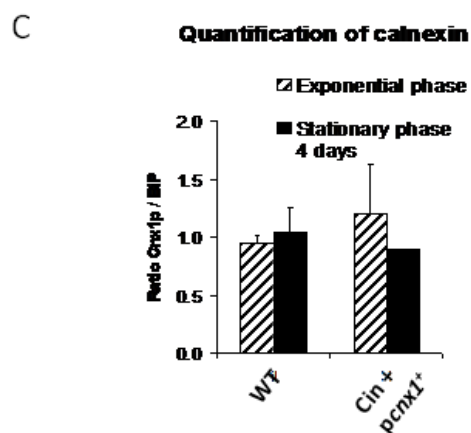
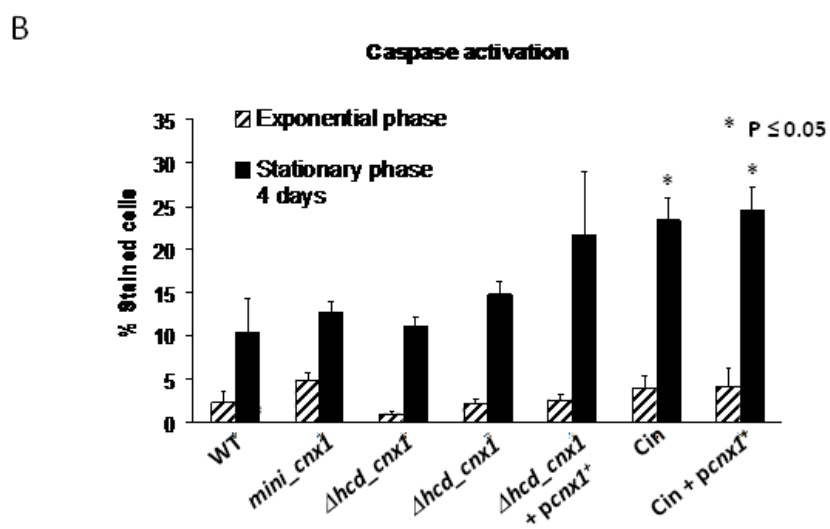
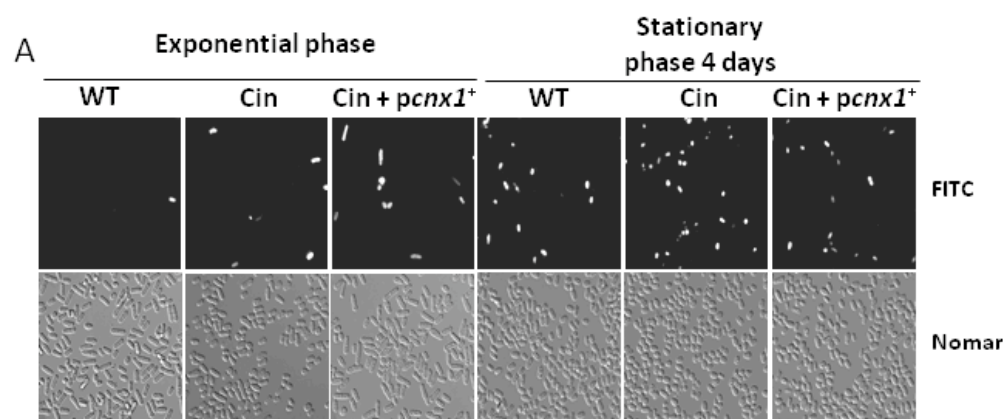


Figure 35. Increased caspase induction in Cin cells and *cnx1* mutants.