

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Podholová

Retrogradní signalizace mezi mitochondriemi a jádrem u kvasinek
Retrograde signalization between mitochondria and nucleus in yeast

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2014

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za pomoc při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ladislavě Hatakové a kolektivu laboratoře S15 za cennou podporu. V neposlední řadě děkuji příteli Michalovi Krut'ovi za psychickou podporu.

Abstrakt

Retrográdní dráha je signální dráha probíhající mezi mitochondriemi a jádrem. Pomocí retrográdní dráhy se kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae* vyrovnávají se zhoršujícími se podmínkami pro život jako je vyčerpání bohatých zdrojů živin a přechod na chudé zdroje živin, pokles mitochondriálního membránového potenciálu, ztráta mitochondriální DNA a s tím spojená nefunkčnost citrátového cyklu. Většina těchto podmínek je spojena se stárnoucí populací. Mezi klíčové proteiny retrográdní dráhy patří RTG proteiny zahrnující transkripční faktor Rtg1p/Rtg3p a cytoplazmatický protein Rtg2p. Retrográdní dráha je složitě regulovaná pomocí několika negativních a pozitivních regulátorů včetně TOR dráhy, která negativně reguluje retrográdní dráhu. Mezi cílové geny retrográdní dráhy patří geny pro enzymy citrátového cyklu, pro peroxisomální enzymy, pro transportéry a pro další enzymy anaplerotických drah. Pomocí retrográdní odpovědi se buňka snaží upravit svůj metabolismus tak, aby byla schopná překonat nepříznivé podmínky prostředí, v němž žije.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, retrográdní dráha, diauxická tranzice, citrátsyntáza, glyoxalátový cyklus, mitochondrie, peroxisom

Abstract

Retrograde signaling pathway is the pathway between mitochondria and nucleus. This pathway helps *Saccharomyces cerevisiae* to cope with worsening of conditions of life, such as depletion of rich nutrient sources and necessity of use poor resources, reduction of mitochondrial membrane potential, or loss of mitochondrial DNA causing disturbances in the citric acid cycle. Most of these conditions are associated with aging yeast populations. Key retrograde pathway proteins include RTG transcription factors Rtg1p/Rtg3p and cytoplasmic protein Rtg2p. Retrograde pathway is upregulated by several positive and negative regulators including the TOR pathway, which negatively regulates retrograde pathway. The retrograde pathway target genes include genes coding for tricarboxylic cycle enzymes, peroxisomal enzymes, transporters and other enzymes of anaplerotic pathways. Retrograde response help cells to modify their metabolism so that they are able to overcome unfavorable environmental conditions in which they live.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, retrograde pathway, diauxic transition, citrate synthase, glyoxylate cycle, mitochondria, peroxisome

Seznam zkratk

AD doména	acidická (kyselá) doména
AK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
bHLH proteiny	helix-loop-helix-leucin zipper
CS1	mitochondriální citrátsyntáza
CS2	peroxisomální citrátsyntáza
MMP	mitochondriální membránový potenciál
mtDNA	mitochondriální DNA
MTS	mitochondrial target sequence; adresná sekvence pro mitochondrie
NLS sekvence	nuclear localization sequence, adresná sekvence pro jádro
PDR	pleotropic drug resistance
PDRE	pleotropic drug response element
PTS1	peroxisome target sequence, adresná sekvence pro peroxisom
ROS	reaktivní kyslíkový radikály
RTG dráha	retrográdní dráha
SAGA komplex	histon acetyltransferázový komplex
SKL	serin-leucin-lysin
SLIK komplex	SAGA like komplex
USA	ureidosukcinát

Obsah

1. Úvod.....	1
2. RTG dráha a její regulace.....	2
a. Pozitivní regulátory RTG dráhy.....	2
b. Negativní regulátory RTG dráhy.....	5
c. Interakce Mks1p s Rtg2p, spouštěč RTG dráhy.....	8
3. Retrogradní odpověď buňky (metabolická odpověď).....	9
a. Přehled metabolických změn u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
b. Cílové geny RTG dráhy.....	15
4. RTG nezávislá retrogradní signalizace mezi mitochondriemi a jádrem.....	17
5. Závěr.....	19
6. Použitá literatura.....	21

1. Úvod

Buněčná signalizace a signální dráhy jsou důležitým předmětem studia současné vědy a poznatky, které se jich týkají, mohou být využity v lékařství při vývoji nových léčiv, v biotechnologických procesech při produkci potravin a při obnovování životního prostředí. Jejich pochopení je tedy důležité pro řadu oborů. Jednou z významných signálních drah je retrográdní (RTG) dráha, která je nejvíce studována na modelovém organismu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Retrográdní dráha byla u kvasinek poprvé objevena v roce 1989 skupinou Parikh et al (1989). Tato dráha je drahou vnitrobuněčnou a probíhá mezi mitochondriemi a jádrem. Jedná se o reakci buňky na stres, případně na zhoršené životní podmínky. Stresová situace může být vyvolána nedostatkem živin, mutacemi v jaderné a mitochondriální DNA (mtDNA), špatnou funkcí mitochondrií zahrnující poruchy elektrontransportního řetězce a citrátového cyklu. Retrográdní dráha spouští expresi řady jaderných genů, které buňce umožní překonání stresové situace. Při zapnuté signalizaci dochází k produkci proteinů zajišťujících alternativní anaplerotické dráhy, doplnění intermediátů citrátového cyklu a zdroj intermediátů pro biosyntézu aminokyselin a produkci energie. (Epstein et al., 2001; Parikh et al., 1987; Traven et al., 2001)

Na RTG dráhu mají také vliv živiny obsažené v médiu. Na spuštění RTG dráhy nemá vliv zdroj dusíku, ale produkt jeho degradace. Z tohoto hlediska pak můžeme zdroje dusíku rozdělit do skupiny reprimujících a aktivujících RTG dráhu. Reprimující jsou glutamát a zdroje, při jejichž degradaci glutamát vzniká, jako je např. glutamin a prolin. Mezi zdroje aktivující RTG dráhu patří např. alantoin a amoniak (Tate et al., 2002).

Pro studium RTG dráhy se často využívají buňky ρ^+ a ρ^0 , případně ρ^- . Buňky ρ^+ jsou buňky s nepoškozenou mtDNA, buňky ρ^- mají mtDNA poškozenou tj. s mutacemi a buňky ρ^0 mtDNA neobsahují vůbec. Buňky ρ^0 (a často i ρ^-) jsou respiračně deficientní a RTG dráha je v ρ^0/ρ^- buňkách neustále aktivovaná. Metabolismus kvasinek se změní natolik, aby byly schopné co nejlépe překonat dysfunkci mitochondrií a pomocí retrográdní dráhy doplnit chybějící intermediáty. Doplnění intermediátů probíhá hlavně prostřednictvím glyoxalátového cyklu. Glyoxalátový cyklus probíhá částečně v peroxisomech, cytosolu a mitochondriích. V reakcích glyoxalátového cyklu vznikají intermediáty, které doplňují citrátový cyklus v mitochondriích. Mezi tyto intermediáty patří především oxalacetát, ale i sukcinát a citrát. Pomocí RTG dráhy je také doplňován acetylCoA a propinylCoA pomocí β -oxidace mastných kyselin probíhající v peroxisomech (Epstein et al., 2001; Traven et al., 2001).

Stav aktivace RTG dráhy lze velmi dobře pozorovat na změnách hladiny exprese genu *CIT2*, kódující citátsyntázu (CS2), která je lokalizována v peroxisomech mitochondrií (Chelstowska and Butow, 1995; Lee et al., 2000; Liao and Butow, 1993; Liao et al., 1991). Při spuštění RTG dráhy se exprese *CIT2* zvyšuje a pokud je dráha vypnutá exprese *CIT2* se snižuje (Rothermel et al., 1997).

Obdobně lze při studiu RTG dráhy sledovat změnu exprese genu *DLD3*, který kóduje D-laktát dehydrogenázu (Chelstowska et al., 1999).

2. RTG dráha a její regulace

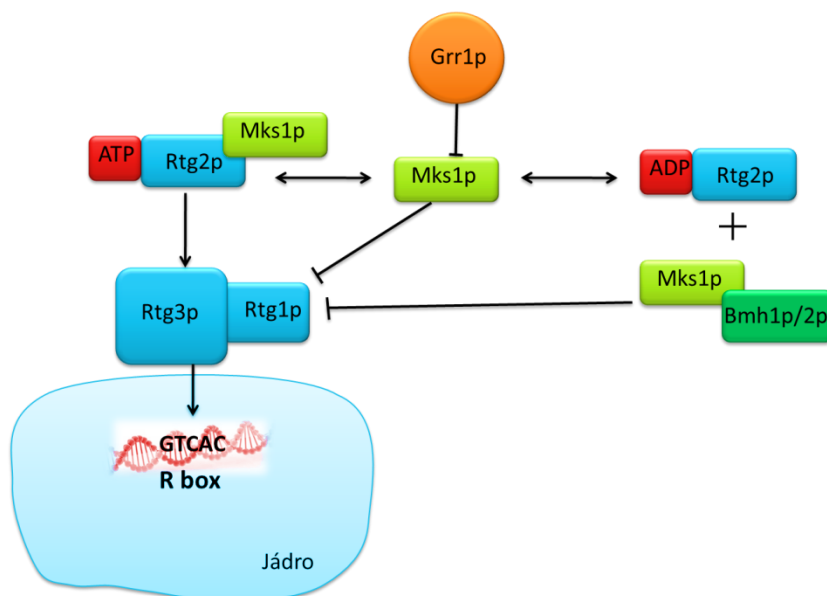
Pomocí RTG dráhy dochází k meziorganelové komunikaci mezi mitochondriemi a jádrem. Tato komunikace vede ke koordinaci metabolických aktivit a jejich odpovědi na změny v mitochondriích (Chelstowska and Butow, 1995; Jia et al., 1997).

Hlavními regulátory RTG dráhy jsou geny RTG. Doposud jsou známy geny *RTG1*, *RTG2* a *RTG3*. Geny *RTG1* a *RTG3* kódují helix-loop-helix leucin zipper (bHLH/Zip) transkripční faktory a gen *RTG2* kóduje cytoplazmatický protein regulující lokalizaci dimeru Rtg1p/Rtg3p (Jia et al., 1997; Liao and Butow, 1993).

Všechny tři RTG proteiny jsou potřebné pro transkripci cílových genů RTG dráhy. Jejich jednotlivé mutace či delece (*rtg1Δ*, *rtg2Δ*, *rtg3Δ*) mají za následek například neschopnost zpracovávat acetát jako zdroj uhlíku. Buňky s mutací či delecí RTG genů jsou auxotrofní pro glutamát a vyžadují jej pro svůj růst (Jia et al., 1997).

a. Pozitivní regulátory RTG dráhy

Podle současných znalostí je RTG dráha regulována čtyřmi hlavními pozitivními regulátory Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a Grr1p (viz Obr. 1.).



Obr. 1. Schéma RTG dráhy.

Proteiny Rtg1p a Rtg3p tvoří dimer (Rtg1p/Rtg3p), který funguje jako transkripční faktor a řadí se mezi bHLH transkripční faktory.

Rtg1p/Rtg3p dimer je lokalizován v cytoplazmě, nebo v jádře nasedá do velkého žlábků DNA na specifickou sekvenci GTCAC, nazvanou jako R-box (viz Obr. 1) (Jia et al., 1997; Liao and Butow, 1993; Rothermel et al., 1995).

Protein Rtg1p má duální funkci. V jádře funguje jako pozitivní regulátor, bez kterého by se nespustila transkripce cílových genů (Jia et al., 1997; Rothermel et al., 1997). V cytoplazmě pak hraje důležitou roli při udržení dimeru Rtg1p/Rtg3p v cytoplazmě (Dilova et al., 2002).

Protein Rtg1p je fosfoprotein jehož množství v buňce se prokazatelně nemění v závislosti na aktivaci RTG dráhy – tj. Rtg1p je syntetizován neustále bez ohledu na to, zda bude potřeba. Funkce fosforylace Rtg1p dosud nebyla objasněna a pravděpodobně nehraje roli v jaderné translokaci a ani nemá žádnou funkci v cytoplazmě (Sekito et al., 2000).

Rtg1p není schopen se sám o sobě vázat na DNA a potřebuje k tomu další protein ze skupiny bHLH proteinů, protein Rtg3p (Rothermel et al., 1995). Poškození genu *RTG1*, případně jeho delece vede k neudržení Rtg3p v cytoplazmě a dochází proto k translokaci Rtg3p do jádra, kde se ale tento protein nemůže sám o sobě vázat na DNA a spouštět transkripci RTG kontrolovaných genů včetně *CIT2* (Rothermel et al., 1997; Sekito et al., 2000).

Rovněž Rtg3p je fosfoprotein. Fosforylace Rtg3p ale, na rozdíl od Rtg1p, hraje důležitou roli při translokaci dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra. Největší počet potenciálně fosforylačních míst Rtg3p je lokalizovaný na N-terminálním konci tohoto proteinu, který obsahuje 80% serinu a threoninu z celkového obsahu aminokyselin. Threonin a serin jsou aminokyseliny obsahující hydroxylové skupiny, které mohou být potenciálně fosforylované. Hyperfosforylovaný protein Rtg3p se nalézá v cytoplazmě, zatímco částečně defosforylovaná varianta je lokalizovaná v jádře. Delece N-terminálního konce Rtg3p neovlivňuje interakci s Rtg1p, nicméně takto změněný Rtg3p je permanentně lokalizován v jádře, protože nedochází k jeho hyperfosforylaci. (Dilova and Powers, 2006; Jia et al., 1997; Rothermel et al., 1997; Sekito et al., 2000).

Rtg3p obsahuje 2 aktivační domény. Silnou na C-konci (375 – 486 aminokyselin (AK)) a slabší na N-konci proteinu (1 – 175 AK). Oblast od 176 do 282 AK pravděpodobně funguje jako inhibitor N a C oblastí (Jia et al., 1997; Rothermel et al., 1997).

U Rtg3p byl na N-konci proteinu nalezen LSDF motiv, který je konzervovaný napříč eukaryoty. Součástí motivu je acidická doména (AD) aktivující transkripci RTG cílových genů, která je tvořena kyselými zbytky aminokyselin. LSDF motiv přímo interaguje se SAGA histon acetyltransferázovým komplexem (Massari et al., 1999, 1996), což je proteinový komplex ovlivňující transkripci pomocí acetylace N-konců histonů. Součástí SAGA komplexu jsou proteiny Gcn5p a Ada2p, které jsou esenciální pro správnou funkci SAGA komplexu. Předpokládalo se, že Rtg3p by pomocí interakce se SAGA komplexem mohl ovlivňovat transkripci genu *CIT2*. V kmeni *gcn5Δ* s nefunkčním SAGA komplexem došlo k poklesu exprese genu *CIT2* o 50%. Na základě těchto výsledků bylo tvrzení o ovlivnění transkripce *CIT2* pomocí interakce Rtg3p se SAGA komplexem vyvráceno (Massari et al., 1999; Sterner et al., 1999).

Rtg3p také obsahuje NLS sekvenci („nuclear localization sequence“) v doméně bHLH motivu. Delece NLS sekvence vede ke ztrátě schopnosti translokace Rtg3p do jádra (Sekito et al., 2000). Ačkoliv Rtg3p obsahuje NLS sekvenci, nedokáže se sám dostat ven z jádra. Exportní sekvenci z jádra obsahuje pouze Rtg1p. V kmeni s delecí genu *RTG1* se protein Rtg3p nalézá v jádře, zatímco v kmeni s mutací v *RTG3* se protein Rtg1p nalézá v cytoplasmě (Komeili et al., 2000). Export z jádra je zprostředkován Msn5p proteinem z rodiny importinů, který je nutný pro export dimeru Rtg1p/Rtg3p z jádra. Při delecí genu *MSN5* je komplex Rtg1p/Rtg3p permanentně lokalizován v jádře (Komeili et al., 2000; Sekito et al., 2000).

Rtg1p a Rtg3p spolu interagují bez ohledu na to, zda je RTG dráha aktivovaná nebo ne. Z toho vyplývá, že se tyto dva proteiny vyskytují ve formě dimeru v cytoplasmě i v jádře a do jádra putují rovněž jako dimer (Sekito et al., 2000).

Syntéza Rtg3p je závislá na stavu buňky a jeho množství je proto proměnlivé. Například v ρ^0 buňkách dochází ke zvýšení exprese *RTG3* (Jia et al., 1997). Díky této vlastnosti funguje Rtg3p jako limitující faktor RTG dráhy (Rothermel et al., 1997).

Rtg2p je další RTG protein, jehož hlavní funkcí v RTG dráze je ovlivnění translokace dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra (Rothermel et al., 1997). Rtg2p částečně defosforyluje Rtg3p. Defosforylovaný dimer Rtg1p/Rtg3p se dostává do jádra a spouští transkripci RTG regulovaných genů. Sám o sobě je Rtg2p především cytoplazmatickým proteinem (Sekito et al., 2000). Interakce Rtg2p s dimerem Rtg1p/Rtg3p probíhá pravděpodobně nepřímo (Rothermel et al., 1997). Při delecí genu *RTG2* zůstává Rtg3p hyperfosforylovaný a cytosolicky lokalizován i u ρ^0 buněk (Sekito et al., 2000).

Rtg2p obsahuje Hsp70p-like ATP-vazebnou doménu a z tohoto důvodu Rothermel et al. (1997) předpokládal, že by mohl působit jako molekulární chaperon a napomáhat tvorbě dimeru Rtg1p/Rtg3p. Nicméně tento předpoklad se nepotvrdil (Rothermel et al., 1997). ATP vazebná doména Rtg2p se nachází na N-konci a je potřebná pro interakci s dalším regulačním proteinem RTG dráhy, proteinem Mks1p (Ünlü et al., 2013).

V eukaryotických organismech je Rtg2p konzervován v oblasti 154 – 266 AK (Ünlü et al., 2013). U savců homolog pro protein Rtg2p nebyl doposud nalezen.

Rtg2p je součástí SLIK komplexu (SAGA-like komplex), který patří mezi histon-acetyltransferázové komplexy, které ovlivňují transkripci genů. Oproti SAGA komplexu, postrádá protein Spt8p a navíc obsahuje protein Rtg2p. Rtg2p je esenciální pro stabilní a aktivní SLIK komplex. Podle Pray-Grant et al. (2002), SLIK komplex ovlivňuje transkripci cílových genů RTG dráhy. SLIK komplex se váže přes Rtg2p do promotoru RTG cílových genů a aktivuje jeho transkripci. Vazba do promotoru probíhá při spuštěné RTG dráze (Pray-Grant et al., 2002).

Rtg2 je rovněž esenciální pro potlačení expanze trinukleotidových repetitiv (Bhattacharyya et al., 2002).

Grr1p, kódovaný genem *GRR1*, je podjednotkou SCF^{GRR1} E3 komplexu ubiquitinligasy. Grr1p je pozitivní regulátor RTG dráhy, protože ubiquitínuje negativní regulátor Mks1p a ten je následně degradován v proteasomu (Liu et al., 2005).

b. Negativní regulátory RTG dráhy

Kromě pozitivních regulátorů, je RTG dráha regulována pomocí čtyř negativních regulátorů Mks1p, Lst8p a pomocí dvou 14-3-3 proteinů Bmh1p a Bmh2p.

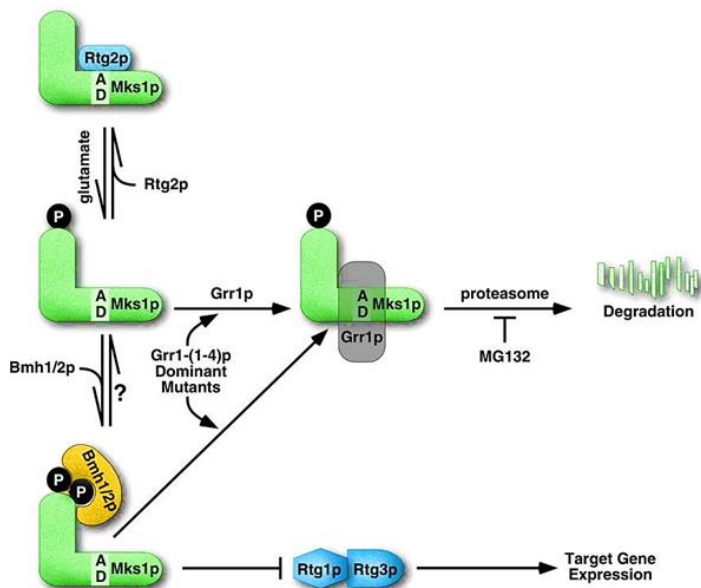
Mks1p („Multicopy Kinase Suppressor“) je pleiotropní negativní transkripční regulátor, který byl původně nalezen jako negativní regulátor Ras/cAMP dráhy (Matsuura and Anraku, 1993). Později byl protein Mks1p určen jako negativní regulátor biosyntézy lysinu (Dilova et al., 2002; Feller et al., 1997). Prekurzorem biosyntézy lysinu je α -ketoglutarát. Pokles tvorby α -ketoglutarátu je zprostředkován Mks1p přes RTG dráhu a vede ke snížení biosyntézy lysinu (Sekito et al., 2002). Mks1p se nepřímo účastní kontroly exprese genů, které jsou zároveň pod kontrolou dusíkové katabolické represe (Tate et al., 2002). Mks1p se podílí na regulaci dusíkového katabolismu přes Ure2p, což je transkripční regulátor dusíkové katabolické represe (Coschigano and Magasanik, 1991; Courchesne and Magasanik, 1988). Ure2p je potřebný pro tvorbu prionového agregátu [URE3] (Edsket et al. (1999) a nezbytný je i Mks1p (Sekito et al., 2002). Edsket et al. (1999) testovali, zdali RTG dráha ovlivňuje tvorbu [URE3]. V delečních kmenech *rtg2Δ* a *rtg3Δ* se přibližně 20-30x zvýšil obsah ureidosukcinátu, který je nepřímým projevem přeměny Ure2p na [URE3]. V kmeni *mks1Δ*, stejně jako při růstu v médiu s glutamátem, nedochází k tvorbě prionu [URE3] (Edskes et al., 1999). Mks1p se dále účastní přepínání mezi normálním a pseudohyfálním růstem kvasinkových buněk (Edskes et al., 1999). Mks1p je rovněž součástí TOR dráhy (Dilova et al., 2002)

Většina zjištění tedy ukazuje na roli Mks1p jako negativního regulátoru RTG dráhy (Dilova et al., 2004, 2002; Tate et al., 2002). Nicméně existují i další výsledky (Samji et al. (2000)), které uvádějí Mks1p jako pozitivní regulátor RTG dráhy. Tyto výsledky byly založeny na pozorování, kdy v kmeni s delecí *mks1Δ* genu docházelo k redukcí bazální hladiny Cit2p (Shamji et al., 2000). Jejich pozorování na stejném kmeni bylo opakováno jinou laboratoří se stejnými výsledky. Samji et al. (2000) nicméně deletovali gen *MKS1* i v dalších třech laboratorních kmenech *S. cerevisiae* a ve všech případech kmeny *mks1Δ* vedly ke zvýšení exprese genů *CIT2* a *DLD3* v souladu s původním předpokladem o roli Mks1p jako negativního regulátoru RTG dráhy. Na základě těchto pozorování bylo vyvozeno, že kmen připravený Shamji et al. (2000) má i další delece vedoucí k opačnému projevu funkce proteinu Mks1p (Dilova et al., 2002; Shamji et al., 2000; Tate et al., 2002).

Mks1p je fosfoprotein a míra jeho fosforylace ovlivňuje expresi RTG závislých genů. Protein Mks1p v cytoplasmě může interagovat s Rtg2p (Dilova et al., 2002; Liu et al., 2003; Sekito et al., 2002; Tate et al., 2002).

N-terminální oblast Mks1p obsahuje doménu nutnou pro inhibici translokace dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra a podobné vlastnosti mají fragmenty z C-terminální oblasti Mks1p. Dilova et al.

(2002) předpokládají, že Mks1p může interagovat s komplexem Rtg1p/Rtg3p v cytosolu díky interakci s NLS sekvencí Rtg3p. Rtg2p by mohl tuto interakci ovlivňovat (Dilova et al., 2002). Naproti tomu Liu et al. (2003) předpokládají, že by Mks1p mohl podporovat fosforylaci Rtg3p či blokovat Rtg3p fosfatázovou aktivitu (Liu et al., 2003). Protein Mks1p je zřejmě prostředníkem interakce Rtg2p s dimerem Rtg1p/Rtg3p. Rtg2p může na základě podnětu z mitochondrií inhibovat Mks1p přímou vazbou (Dilova et al., 2002).



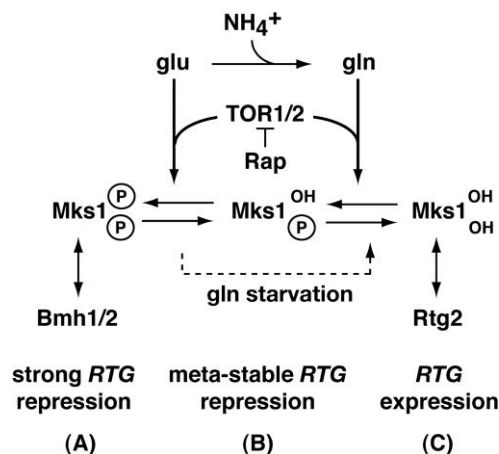
Obr. 2. Schéma interakce Mks1p s pozitivními a negativními regulátory RTG dráhy (Liu et al., 2005).

Protein Mks1p obsahuje na C-terminálním konci kyselou doménu (AD) obsahující zbytky kyselých aminokyselin mezi AK 291 a 325. Do kyselé domény se váží proteiny Grr1p a Rtg2p (viz. Obr. 2.) (Liu et al., 2005, 2003). Grr1p, kódovaný genem *GRR1*, je podjednotkou SCF^{GRR1} E3 komplexu ubiquitinligasy. Ubiquitinace Mks1p je závislá na Grr1p. Po označení ubiquitinem je Mks1p degradován v proteasomu. Pokud je Mks1p vázáno na Rtg2p nebo 14-3-3 proteiny není substrátem pro Grr1p. Substrátem pro Grr1p je pouze volné Mks1p. Fosforylace Mks1p nehraje roli při interakci s Grr1p (Liu et al., 2005).

Mks1p se může vyskytovat ve 3 stavech (viz. Obr. 3):

- I. **Hyperfosforylovaný:** Hyperfosforylovaný Mks1p je v cytoplasmě volný nebo ve vazbě s 14-3-3 proteiny. V případě hyperfosforylovaného Mks1p je RTG dráha neaktivní (Dilova et al., 2004; Liu et al., 2003; Zhang et al., 2013).
- II. **Defosforylovaný:** Po defosforylaci Mks1p dochází k uvolnění z vazby s 14-3-3 proteiny a vazbě s Rtg2p. Když je Mks1p vyvazován Rtg2p je RTG dráha aktivovaná. Dimer Rtg1p/Rtg3p je rovněž defosforylován a přemístí se do jádra (Dilova et al., 2004; Liu et al., 2003; Zhang et al., 2013).

III. Semifosforylovaný: Mezi stavy, kdy je Mks1p hyperfosforylovaný a defosforylovaný, je Mks1p semifosforylovaný. To znamená, že nedochází k plnohodnotné represi RTG dráhy. Mks1p je v cytoplasmě volný bez vazeb k 14-3-3 proteinů či Rtg2p. Volný Mks1p slouží jako substrát pro Grr1p a po ubiquitinaci je degradován v proteasomu (Dilova et al., 2004).



Obr. 3. Vliv živin na fosforylaci Mks1p (Dilova et al., 2004).

Delece genu *MKS1* vede k permanentní aktivaci RTG dráhy a zvýšené expresi cílových genů RTG dráhy (Ünlü et al., 2013).

14-3-3 proteiny tvoří rodinu proteinů, které byly nalezeny napříč eukaryotickou říší. U *S. cerevisiae* byly nalezeny 2 geny, které jsou sekvenčně homologní. Jsou to geny *BMH1* a *BMH2*. BMH je zkratka z brain modulosignalin homolog, protože 14-3-3 proteiny byly objeveny při izolaci proteinů z mozku dobytka. Proteiny Bmh1p a Bmh2p nejsou potřebné pro růst na bohatém médiu. Delece každého z BMH genů způsobuje špatný růst na chudých médiích s obsahem acetátu nebo glycerolu jako zdroje uhlíku. Navzájem je funkce obou Bmh proteinů zaměnitelná. Přesto je v buňce 5 krát více zastoupen Bmh1p než Bmh2p. Delece obou genů je u většiny laboratorních kmenů letální (Gelperin et al., 1995; Heusden et al., 1995, 1992; Roberts et al., 1997).

Bmh1p a Bmh2p se účastní regulace retrográdní dráhy jako negativní regulátory. Interagují s N-koncem fosforylovaného proteinu Mks1p a společně dráhu inaktivují. 14-3-3 proteiny obvykle interagují s motivy RxxpS/pT a RxxxpS/pT. Několik takových motivů je lokalizováno na N-terminálním konci (1-346 AK) Mks1p. Nicméně do těchto míst se Bmh proteiny prokazatelně neváží, patrně se váží do zcela nových nepopsaných míst na N-konci Mks1p. Fosforylovaný Mks1p bez interakce s Bmh1p a Bmh2p nedokáže sám o sobě inhibovat RTG dráhu (Bruckmann et al., 2004; Liu et al., 2005, 2003). Dále byla popsána interakce 14-3-3 proteinů s fosforylovaným Rtg3p, vedoucí k inhibici RTG dráhy (van Heusden and Steensma, 2001).

Při deleci obou Bmh proteinů dochází k trvalému poklesu hladiny Mks1p. Mks1p není při deleci Bmh proteinů fosforylovaný, i když médium obsahuje glutamát (Liu et al., 2005, 2003). Pokles hladiny Mks1p je zapříčiněn vychytáváním volného Mks1p pomocí Grr1p, který Mks1p ubiquitínuje a

degraduje v proteasomu (Dilova et al., 2004). Delece obou Bmh proteinů způsobují až 40ti násobné zvýšení exprese genu *CIT2* (Liu et al., 2003).

Bmh1p a Bmh2p kromě retrogradní dráhy regulují i mnoho dalších buněčných pochodů jako je třeba vezikulární transport (Gelperin et al., 1995). Jsou rovněž esenciální pro RAS/MAPK signální kaskádu během pseudohyálního růstu (Roberts et al., 1997).

TOR dráha negativně reguluje cílové geny RTG dráhy. Produkty exprese těchto genů jsou součástí anaplerotických drah (Dilova et al., 2004; Tate et al., 2002). Pokud buňka roste na médiu s dobrým zdrojem dusíku, TOR dráha inhibuje RTG dráhu. Pokud dojde k vyčerpání zdroje dusíku nebo je buňka vystavena působení rapamycinu, dochází k translokaci dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra a ke spuštění retrogradní odpovědi (Komeili et al., 2000; Sekito et al., 2000). Rapamycin inhibuje TOR dráhu a navozuje v buňce stav hladovění na dusík. Pokud je TOR dráha inhibována rapamycinem dochází k interakci Mks1p s Rtg2p, stejně jako když kvasinková buňka roste na médiu se špatným zdrojem dusíku (Dilova et al., 2004; Liu et al., 2003; Tate et al., 2002). Dochází k aktivaci RTG dráhy a zvyšuje se exprese *CIT2* genu (Sekito et al., 2002). Rapamycin indukuje expresi *CIT2* genu, i když buňky rostou na médiu s glutamátem jako zdrojem dusíku (Tate et al., 2002).

LST8 je esenciální gen kódující protein Lst8p má dvě na sobě nezávislé funkce. Negativně reguluje RTG dráhu a kontroluje přemísťování aminokyselinového senzoru Ssy1p mezi vakuolou a plazmatickou membránou. (Liu et al., 2001; Roberg et al., 1997). Ssy1p je součástí senzoru reagujícího na hladinu aminokyselin vně buňky. Ssy1p se nachází na plazmatické membráně spolu s Ptr3p. Ptr3p funguje jako transportér pro peptidy a nachází se mimo lipidickou dvojvrstvu plazmatické membrány. Za přítomnosti glutamátu nebo glutaminu komplex Ssy1p-Ptr3p inaktivuje Rtg2p (Barnes et al., 1998; Forsberg and Ljungdahl, 2001; Jørgensen et al., 1998; Klasson et al., 1999; Liu et al., 2001). Lst8p je součástí Tor1p a ovlivňuje TOR dráhu. Spolu s Tor1p reguluje translokaci dimeru Rtg1p/Rtg3p a prostřednictvím Lst8p jsou dráhy RTG a TOR propojeny (Chen and Kaiser, 2003; Giannattasio et al., 2005).

c. Interakce Mks1p s Rtg2p, spouštěč RTG dráhy

Na základě jakého podnětu interaguje Rtg2p s Mks1p není zcela objasněno. Uvažuje se o klesající koncentraci ATP (Zhang et al., 2013), ztrátě membránového potenciálu, vzniku ROS (reaktivních kyslíkových radikálů) (Miceli et al., 2012), či nedostatku glutamátu a špatném zdroji dusíku (viz Obr. 6) (Komeili et al., 2000; Tate et al., 2002).

Při dostatku ATP by mohlo docházet k uvolnění Rtg2p z interakce s Mks1p ve spojitosti s hydrolýzou ATP (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2013). Aby došlo k uvolnění z vazby, musela by se podle Zhang et al, (2013) koncentrace ATP v buňce pohybovat mezi 5 - 6 mM. U nižších koncentrací byl zaznamenán minimální nebo žádný efekt. ATP se na Rtg2p váže přímo a uvolňuje tento protein z komplexu s Mks1p. Tento proces je specifický a vyžaduje pouze ATP a jeho hydrolýzu. Prostřednictvím ATP by mohla být signalizována nedostatečná funkce mitochondrií s cílem změnit

metabolismus a pomoci tak udržení ATP homeostázy. Nicméně, celý pokus byl prováděn na buněčných lyzátech, takže je otázka, zda tento mechanismus platí *in vivo* v cytoplasmě buňky. V kvasinkách *Kluyveromyces lactis* a *Kluyveromyces waltii*, byla rovněž prokázána interakce Mks1p s Rtg2p a jejich následné uvolnění při vyšší koncentraci ATP (3 – 4,5 mM) (Zhang et al., 2013).

Pro studium změny mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) byly použity mutované kmeny *cox4Δ*, kmen s mutací ATP1-111, ρ^0 a ρ^+ buňky. *COX4* kóduje cytochrom oxidasu a jeho delece způsobuje pokles membránového potenciálu. Mutace ATP1-111 má hyperaktivní podjednotku F1 – ATPasy a tím zvyšuje membránový potenciál. Expres *CIT2* v ρ^0 buňkách je téměř 3x vyšší než v ρ^+ . V ρ^0 buňkách s mutací ATP1-111 dochází ke zvýšení MMP a exprese *CIT2* byla prokazatelně nižší. Podobně tomu bylo u *cox4Δ* kmene (ρ^+), když došlo k poklesu MMP a zvýšení exprese *CIT2* při porovnávání s kontrolou ρ^+ . Z těchto výsledků vyplývá, že pokles MMP signifikantně zvyšuje expresi *CIT2* a tedy zapíná RTG dráhu a také to, že exprese *CIT2* je závislá na RTG dráze. Vše bylo potvrzeno studiem dalších tří genů, které jsou pod kontrolou RTG dráhy – *IDH1*, *IDH2* a *ACO1*. Stejně tak lokalizace Rtg3p je závislá na MMP. Při nízkém až žádném MMP je Rtg3p v jádře a při vysokém v cytoplasmě. Micely et al. (2012), také předpokládá, že se na aktivaci RTG dráhy podílejí i jiné faktory než jen MMP.

ROS vznikají při přerušení elektrontransportního řetězce v mnoha místech (Barros et al., 2003). Ačkoliv se předpokládalo, že by ROS mohly spouštět RTG dráhu, tak to s největší pravděpodobností tak není (Miceli et al., 2012).

Další možností regulace RTG dráhy je zdroj dusíku v médiu. Glutamát a glutamin inhibují RTG dráhu. Pokud se v médiu vyskytuje glutamát je dimer Rtg1p/Rtg3p v cytoplasmě. Pokud je zdrojem dusíku močovina, dimer se vyskytuje v jádře. Pokud jsou v médiu dva zdroje dusíku, glutamát a močovina, dimer se vyskytuje v cytoplasmě a RTG dráha je inhibována. Glutamát je zpracováván přednostně (Komeili et al., 2000; Liu and Butow, 1999).

3. Retrogradní odpověď buňky (metabolická odpověď)

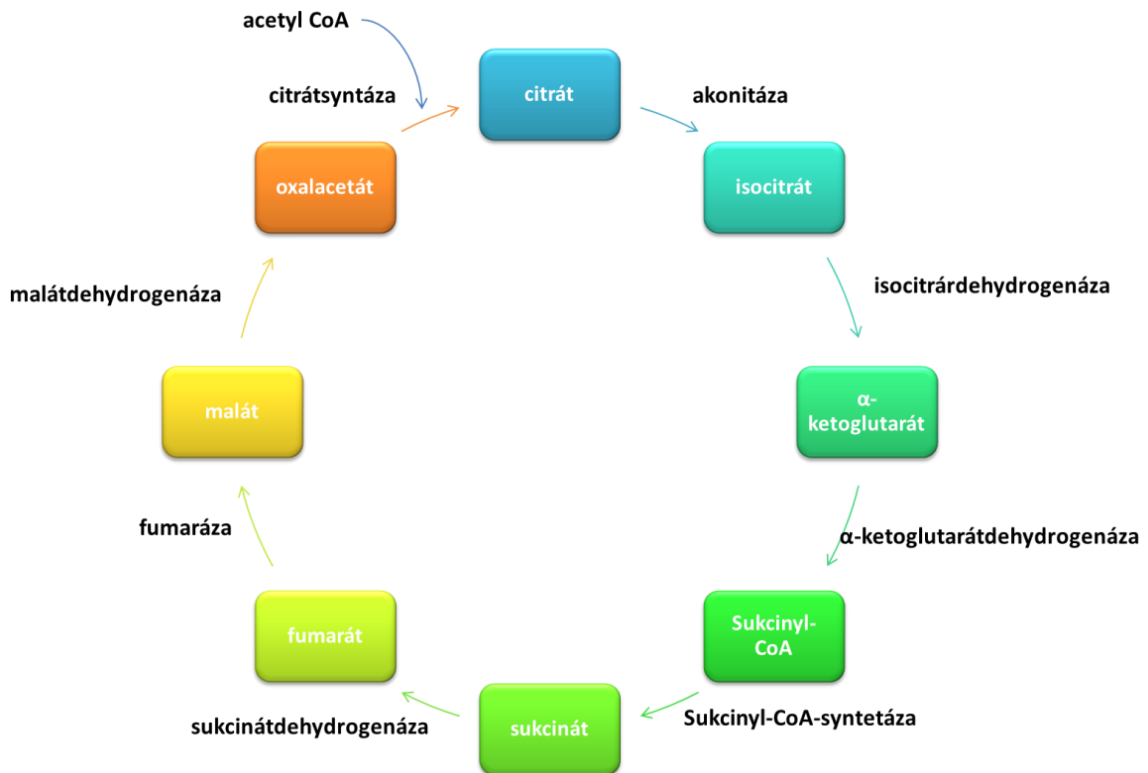
Expres genů se liší podle stavu buňky a prostředí v jakém se buňka nalézá. Rovněž kvasinka *S. cerevisiae* svůj metabolismus upravuje podle prostředí, v jakém se vyskytuje, zejména podle růstových podmínek. Snaží se co nejlépe využít nejbohatší zdroje dusíku a uhlíku v prostředí a teprve po jejich vyčerpání přechází na zpracování méně bohatých zdrojů (Komeili et al., 2000; Traven et al., 2001).

V přítomnosti fermentovatelného zdroje uhlíku, jako je glukóza, získávají kvasinky energii pomocí substrátové fosforylace, kdy je glukóza fermentací přeměňována na ethanol. Za těch to podmínek je potlačena tvorba mitochondrií, stejně jako je snížena transkripce genů kódujících mitochondriální proteiny. Při represi tvorby mitochondrií za přítomnosti glukózy dochází ke zvýšení transkripce genů kódující enzymy citrátového a glyoxalátového cyklu. Vyčerpání glukózy vede k přechodnému stavu nazvanému diauxie. Při diauxii se obnovuje exprese mitochondriálních proteinů a

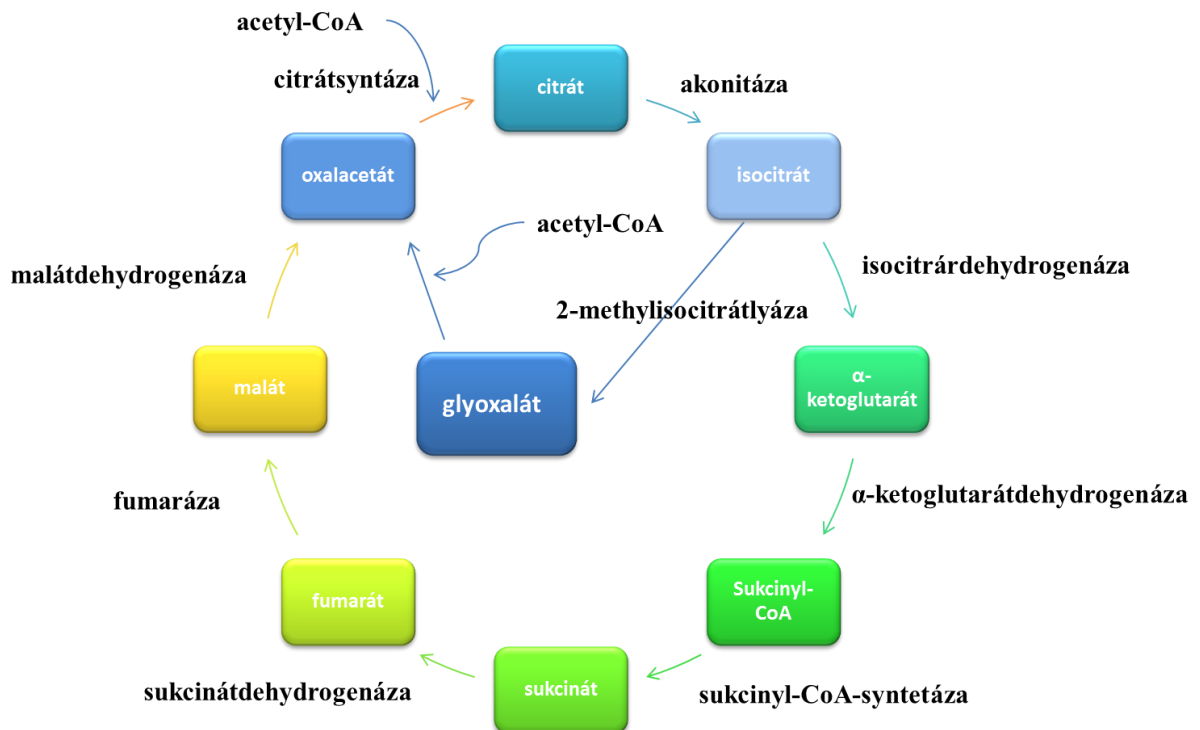
funkce respiračního řetězce. Růst na glukóze inhibuje RTG dráhu, zatím co růst na nefermentovatelném zdroji uhlíku jako je glycerol vede k aktivaci RTG dráhy (DeRisi et al., 1997; Kos et al., 1995; Traven et al., 2001).

V mitochondriích probíhají velmi důležité metabolické pochody. Citrátový cyklus probíhá v mitochondriální matrix. Prvním z enzymů citrátového cyklu je citrátsyntáza, která katalyzuje vznik citrátu z acetylCoA a oxalacetátu (viz Obr. 4). Tato reakce se řadí mezi aldolové kondenzace. Následuje reakce katalyzovaná akonitázou a z citrátu se stává isocitrát. Další reakcí je přeměna isocitrátu na 2-oxalacetát pomocí isocitrátdehydrogenázy. 2-oxalacetát může sloužit jako prekurzor pro glutamát a další aminokyseliny (aspartát, alanin a glutamin) (Krebs and Lowenstein, 1960). Tyto první tři reakce citrátového cyklu jsou při mitochondriální dysfunkci regulovány pomocí RTG a HAP genů (Epstein et al., 2001). Citrátový cyklus je důležitým zdrojem intermediátů pro biosyntézu aminokyselin a dalších metabolitů. Velmi důležitým pro biosyntézu aminokyselin je α -ketoglutarát a oxalacetát (Komeili et al., 2000; Stucka et al., 1991; Walker et al., 1991).

Glyoxalátový cyklus je cyklus probíhající v buňkách kvasinky *S. cerevisiae*. Jeho hlavní úlohou je doplňovat některé intermediáty do citrátového cyklu a pro syntézu aminokyselin. Zvýšená aktivita glyoxalátového cyklu je pozorována u buněk s aktivní RTG drahou. Pomocí glyoxalátového cyklu je doplňován oxalacetát a za specifických podmínek sukcinát a v menší míře citrát. Sukcinát a citrát jsou doplňovány z glyoxalátového cyklu do citrátového v přítomnosti glukózy. A oxalacetát je pak doplňován z pyruvátu pomocí pyruvátcarboxylázy (viz Obr. 7) (Epstein et al., 2001; Komeili et al., 2000; Stucka et al., 1991). Bez přítomnosti glukózy se využívá přeměny isocitrátu na glyoxalát a pak na oxalacetát, aniž by docházelo k uvolnění uhlíku v podobě CO_2 , jako je tomu při citrátovém cyklu. Acetyl-CoA je doplňován pomocí β -oxidace mastných kyselin. Zvýšená aktivita glyoxalátového cyklu se projevuje při růstu na dvou-uhlíkatých sloučeninách, jako je ethanol nebo acetát, nebo při stárnutí kultury. Během stárnutí dochází k dlouhodobému poklesu aktivity citrátového cyklu a naopak dochází ke zvýšení aktivity anaplerotických drah včetně glyoxalátového cyklu (Dixon and Kornberg, 1959; Lin et al., 2011; Samokhvalov et al., 2004).



Obr. 4. Schéma citrátového cyklu .



Obr. 5. Schéma propojení citrátového cyklu a glyoxalátového cyklu.

Signalizace mezi jádrem a mitochondriemi je velmi důležitá pro mnoho buněčných funkcí zahrnujících metabolismus dusíku a uhlíku, křížení a sporulaci, buněčné dělení, růst a morfogenezu a také determinaci dlouhověkosti.

Regulace exprese genů proteinů dýchacího řetězce a citrátového cyklu je zajišťována přes transkripční faktory Hap2-5 (Forsburg and Guarente, 1989; McNabb et al., 1997; Olesen and Guarente, 1990). Glukóza potlačuje komplex Hap2-5 prostřednictvím umlčení exprese genu *HAP4*, kódující protein tvořící komplex s Hap2-5 proteiny (Forsburg and Guarente, 1989).

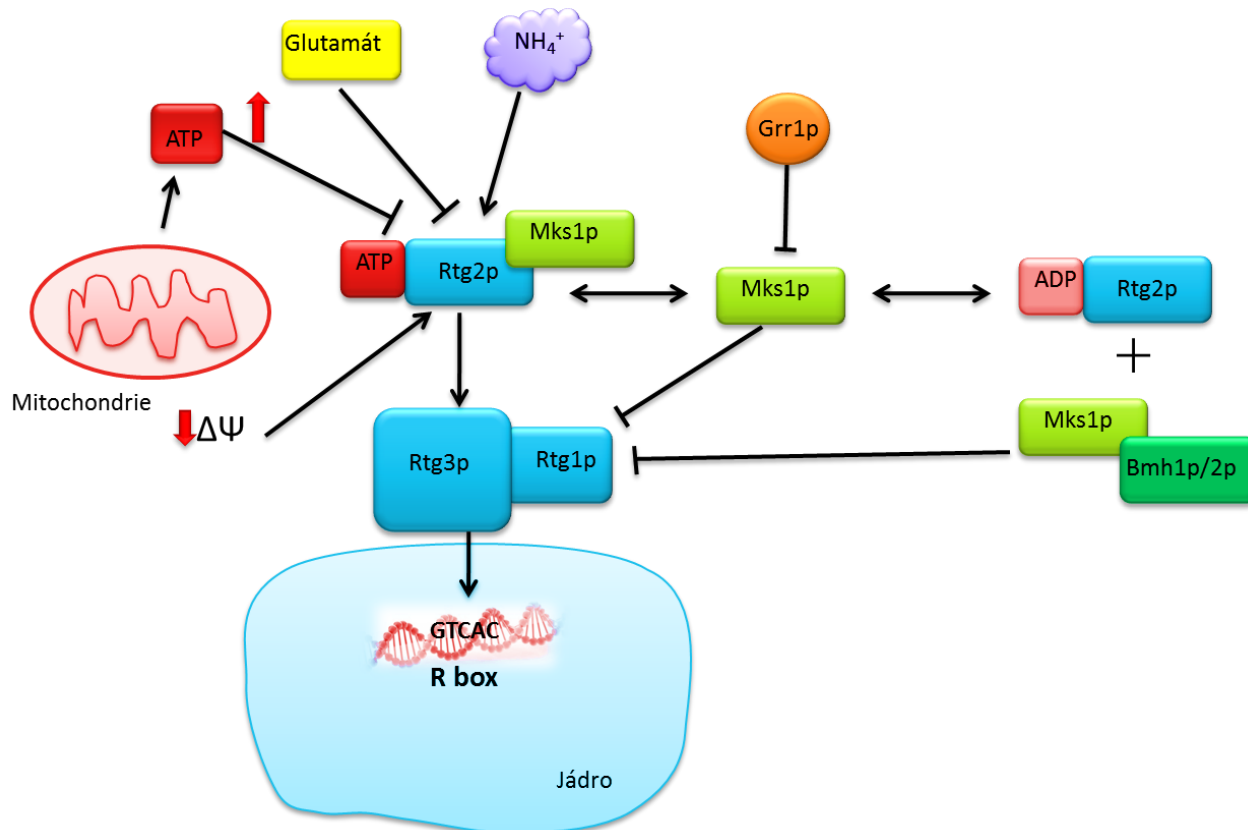
Podobně jako represe glukózou funguje represe bohatým zdrojem dusíku. Exprese genů může být ovlivněna různými zdroji dusíku. Podle kvality a množství zdroje dusíku se exprimují geny pro transportní systémy a alternativní dráhy zpracovávající chudé zdroje dusíku. Mezi chudé zdroje dusíku patří například amoniak a močovina (Komeili et al., 2000). Při růstu na chudých zdrojích dusíku jsou pro biosyntézu aminokyselin *de novo* potřeba intermediáty z citrátového cyklu. Tyto intermediáty jsou doplňovány prostřednictvím reakcí glyoxalátového cyklu a pyruvátkarboxylázy. Glyoxalátový cyklus doplňuje sukcinát, oxalacetát a citrát. Oxalacetát pro syntézu aminokyselin může být doplňován přímo z pyruvátu pomocí pyruvátkarboxylázy kódované genem *PYCI* (Komeili et al., 2000; Stucka et al., 1991; Walker et al., 1991).

Mezi bohaté zdroje dusíku podle Komeili et al. (2000) patří glutamát a glutamin (Komeili et al., 2000). Glutamát inhibuje RTG dráhu (Liu and Butow, 1999; Sekito et al., 2002). Glutamát slouží jako prekurzor pro biosyntézu několika aminokyselin (glutamin, arginin a prolin). Pokud glutamát v médiu chybí, musí si buňka najít prekurzor zdroje biosyntézy aminokyselin. Jako prekurzor využívá α -ketoglutarát, produkovaný citrátovým cyklem. Naopak při nadbytku glutamátu a glutaminu může být α -ketoglutarát syntetizován z obou aminokyselin (Komeili et al., 2000; Liu and Butow, 1999).

Kvalitu zdroje dusíku v médiu lze posoudit dle exprese dvou genů *GAP1* a *GATI*. Čím je jejich exprese vyšší, tím je kvalita zdroje dusíku nižší. Na základě exprese *GAP1* a *GATI* lze stanovit, že alantoin, prolin, glutamát a močovina jsou špatnými zdroji dusíku a glutamin a amoniak jsou dobrými zdroji dusíku. Tyto výsledky kontrastují s výsledky Komeili et al. (2000), který tvrdí, že glutamát je dobrý zdroj dusíku a amoniak je chudý zdroj dusíku. Nicméně Komeili et al. (2000) své výsledky zakládal na měření exprese RTG cílových genů. Tate et al. (2002) dále měřili hladinu exprese genů *CIT2* a *DLD3* jako ukazatelů aktivity RTG dráhy. Při růstu na močovinně, alantoinu a amoniaku byla exprese vyšší (zapnutá RTG dráha), než při růstu na prolinu a glutamátu. Alantoin a močovina jsou degradovány na amoniak, zatímco prolin je degradován na glutamát. Amoniak je transportován a degradován mnohem rychleji než močovina, což mu dává represivní vlastnosti, na rozdíl od močoviny. Ačkoliv je prolin špatný zdroj dusíku reprimuje expresi genů *CIT2* a *DLD3* díky tomu, že exprese těchto genů je reprimována glutamátem. Z těchto poznatků vyplývá, že ne kvalita zdroje dusíku, ale produkt jeho degradace je rozhodující při kontrole exprese *CIT2* a *DLD3*. Pokud je produktem amoniak, RTG dráha je zapnutá a zvyšuje se exprese *CIT2* a *DLD3* a pokud je produktem glutamát je exprese nízká (Komeili et al., 2000; Tate et al., 2002).

Ačkoliv se uvádí, že represorem RTG dráhy přes TOR dráhu je glutamát (Liu and Butow, 1999; Sekito et al., 2000), Crespo et al. (2002) se pokusil toto tvrzení vyvrátit. Použil MSX inhibitor glutaminsyntetázy, která přeměňuje glutamát na glutamin a kulturu rostoucí v médiu s jediným zdrojem uhlíku glutamátem. Po 30 minutách od použití inhibitoru MSX, došlo k změně lokalizace dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra (Crespo et al., 2002), ačkoliv glutamát je represor RTG dráhy (Liu and Butow, 1999). Ke stejnému výsledku došli i při měření exprese *CIT2*. Při růstu v médiu s obsahem glutamátu byla velmi nízká exprese genu *CIT2* a po přidání MSX se jeho exprese zvýšila. Z těchto výsledků vyplývá, že ne glutamát, ale glutamin reprimuje RTG dráhu (Crespo et al., 2002).

Jak už bylo řečeno, protein Mks1p je negativním regulátorem RTG dráhy (viz Obr. 6). V buňkách s delecí genu *MKS1* dochází k vysoké expresi genů regulovaných RTG drahou za podmínek, kdy je v médiu přítomen jeden ze zdrojů dusíku reprimujících RTG dráhu, tj. glutamát, glutamin, nebo prolin. Kmen *mks1Δ* v přítomnosti reprimujících zdrojů dusíku roste velmi pomalu. (Tate et al., 2002)

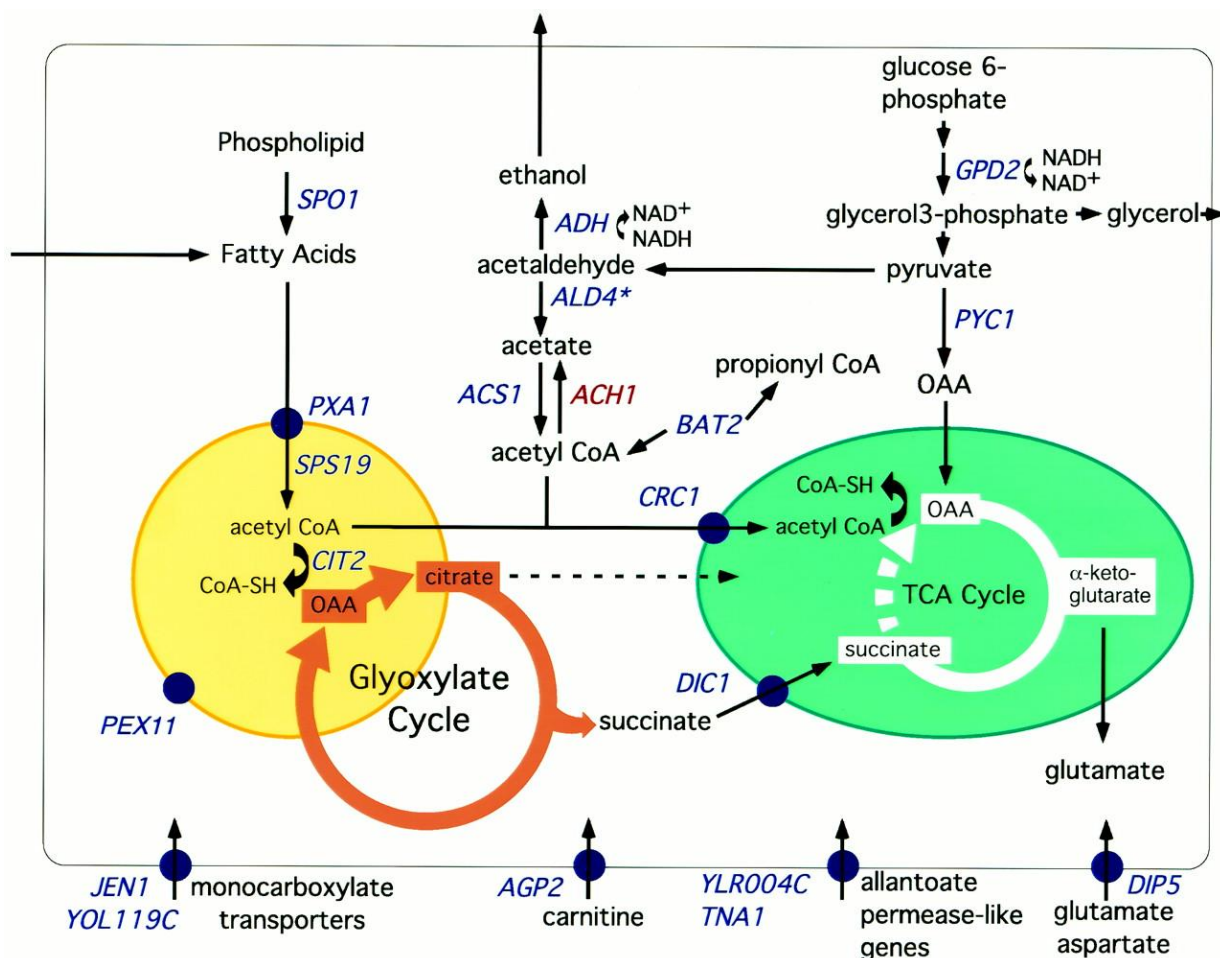


Obr. 6. Schéma retrográdní dráhy včetně vlivů, které jí regulují.

a. Přehled metabolických změn u *Saccharomyces cerevisiae*

Po vyčerpání bohatých zdrojů uhlíku a dusíku dochází k využití alternativních drah jako je glyoxalátový cyklus a využití odlišných enzymů než je obvyklé (viz. Obr. 7). Zvýšení aktivity glyoxalátového cyklu je spojeno s aktivací RTG dráhy. (Epstein et al., 2001; Komeili et al., 2000). ρ^0 buňky mají permanentně zapnutou RTG dráhu a jsou respiračně deficientní a tedy závislé na produkci energie pouze pomocí substrátové fosforylace. Jelikož mají často nefunkční i citrátový cyklus jsou

závislé na glykolýze a energii při ní vznikající. Buňky ρ^0 ale indukují transkripci genů pro tvorbu mitochondrií, i když mají k dispozici fermentovatelný zdroj uhlíku (Traven et al., 2001).



Obr. 7. Přehled exprese některých genů při aktivní RTG dráze (Epstein et al., 2001).

U kvasinek *S. cerevisiae*, které mají spuštěnou retrogradní dráhu, dochází k reprogramování metabolismu. Podle příčiny dysfunkce mitochondrií se liší i odpověď na ni. Podle Epstein et. al. (2001) je tato odpověď různá u ρ^0 a u ρ^+ buněk podle použitého inhibitoru dýchacího řetězce. U ρ^0 došlo ke změně regulace u 43 genů, z toho 13 peroxisomálních. Nejvíce byla zvýšena transkripce genů na přeměnu produktů metabolitů z β -oxidace mastných kyselin (probíhající v peroxisomech) na intermediáty citrátového a glyoxylátového cyklu. Kvasinková buňka potřebuje doplňovat acetylCoA a oxalacetát včetně jeho derivátů. Z tohoto důvodu se mění i množství přenašečů karboxylových kyselin a acylkarnitin transferáz. Například se výrazně zvyšuje exprese genu *DIC1* kódujícího mitochondriální přenašeč dikarboxylových kyselin, *CRC1* kódujícího acylkarnitinový přenašeč vnitřní mitochondriální membrány a *AGP2* kódujícího karnitinový transportér na plasmatické membráně. Další gen, u kterého byla pozorována zvýšená exprese, je gen *CIT2* pro perioxosomální citrátsyntázu. Kvasinky bez mtDNA tedy svůj metabolismus promění tak, aby byly schopné co nejlépe překonat dysfunkci mitochondrie a

pomocí retrográdní dráhy doplnit chybějící oxalacetát, acetylCoA a propionylCoA (Epstein et al., 2001).

Při studiu ρ^+ buněk byli použity 3 inhibitory dýchacího řetězce antimycin, CCCP a oligomycin. Antimycin blokuje reoxidaci cytochromu b. CCCP rozpráhuje elektronový transport, čímž zabraňuje syntéze ATP a porušuje vodíkový gradient na vnitřní mitochondriální membráně. Oligomycin je specifický inhibitor, který blokuje aktivitu F_0 podjednotky F_0F_1 ATPázy. Inhibitory elektron-transportního řetězce vyvolávají odlišnou buněčnou odpověď. K nejpodobnější odpovědi jako u ρ^0 buněk dochází při použití antimycinu. Změna transkripce se projeví u 19 genů a produkty většiny z nich jsou peroxisomální. Z výsledků Epstein et al. (2001) vyplývá, že buňky respiračně deficientní, na rozdíl od buněk s nedostatkem ATP, mohou zvýšit biogenezi peroxisomů (Epstein et al., 2001).

Zvýšená proliferace peroxisomů byla pozorována i při kultivaci na olejovém médiu. U mutantů *rtg1Δ*, *rtg1Δ/rtg2Δ* a *rtg2Δ* bylo v porovnání s rodičovským kmenem mnohem méně peroxisomů a byly podstatně menší. Z tohoto zjištění vyplývá, že geny RTG dráhy přispívají ke zvýšené tvorbě peroxisomů (Kos et al., 1995).

b. Cílové geny RTG dráhy

Jedním z mnoha cílových genů je gen *CIT1* kódující majoritní citrátsyntázu, která se nachází v mitochondriích a účastní se citrátového cyklu. Je transkribována v buňkách rostoucích na nefermetovatelném zdroji uhlíku např. acetát a pyruát (Rickey and Lewin, 1986). Pro transport do mitochondrie je potřeba adresný signál MTS (mitochondrial target sequence) na N-konci proteinu. Po translokaci Cit1p do mitochondrie je tento 37 aminokyselin dlouhý úsek proteolytickými drahami odštěpen (Rosenkrantz et al., 1986; Suissa et al., 1984).

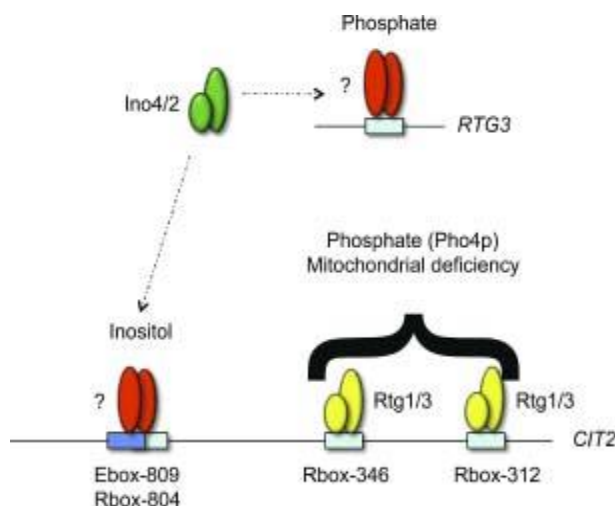
Sekvence před genem *CIT1* obsahuje R-box, místo nasednutí dimeru Rtg1p/Rtg3p a také CCAAT místo pro nasednutí Hap2,3,4,5p (Liu and Butow, 1999).

Dalším z cílových genů RTG dráhy je *CIT2*. Při spuštění RTG dráhy se exprese *CIT2* zvyšuje. Pokud je dráha vypnutá, exprese *CIT2* se snižuje. Na projevu exprese genu *CIT2* se nejlépe zkoumají změny retrográdní odpovědi. Jeho exprese je velmi citlivá a snadno pozorovatelná díky vysokým rozdílům. Obzvláště v buňkách s defektními mitochondriemi, které mohou obsahovat různé mutace v mtDNA. Tyto mutace mohou zapříčinit inhibici dýchacího řetězce, poruchu funkce citrátového cyklu nebo může dojít i ke ztrátě mtDNA (Chelstowska and Butow, 1995; Liao and Butow, 1993; Liao et al., 1991). Exprese *CIT2* se výrazně liší u ρ^0 a ρ^+ buněk (Rothermel et al., 1997).

CIT2 gen kóduje peroxisomální citrátsyntázu 2, jenž je izoformou citrát syntázy Cit1p (vzájemná DNA homologie 75 % DNA). Oba enzymy se liší v N-terminální části, která obsahuje adresnou sekvenci MTS. Na rozdíl od Cit1p není MTS u Cit2p hlavním signálem pro transport do mitochondrií (Rosenkrantz et al., 1986). I přesto je 15 aminokyselin z N-konce Cit2p po translokaci do peroxisomu odštěpeno. Další zvláštností je, že sekvence 20-ti aminokyselin z N-konce je schopna translokovat protein do obou organel, tj. do mitochondrie i peroxisomu. Cit2p je tedy prototypem

enzymu s adresami do více organel (Lee et al., 2000). Hlavní adresný signál Cit2p se nachází na C-konci proteinu a je tvořen motivem serin-lysin-leucin (SKL sekvence), neboli PTS1 a je nezbytný pro transport Cit2p do peroxisomu. Během transportu do peroxisomu sekvence SKL není odštěpena (Gould et al., 1988; Lee et al., 2000). Transport je zprostředkován pomocí proteinu Pex5p, receptoru pro SKL sekvenci. Pokud je SKL signál nefunkční je Cit2p transportována do mitochondrií pomocí MTS signálu (Lee et al., 2000).

CIT2 má regulační místo na 5' konci, které je tvořeno 607 bp *HinfI* fragmentu od kódující oblasti (Liao et al., 1991). Exprese genu *CIT2* je regulována pomocí bHLH proteinů. Majoritní regulace probíhá přes Rtg1p-Rtg3p dimer, který se váže na R-boxy v místech -346 a -312 v promotoru *CIT2*. Dále pak existuje inositolem-zprostředkovaná indukce (bHLH protein Ino2p/Ino4p), která probíhá pouze u buněk bez mitochondriální DNA. Heterodimer Ino2p/Ino4p se váže do E-box/R-boxu (-809 a -804) (viz Obr. 8) (Chen and Lopes, 2010).



Obr. 8. Inositolem zprostředkovaná aktivace genu *CIT2* (Chen and Lopes, 2010).

Cit2p pomáhá s utilizací zdrojů uhlíku, které *S. cerevisiae* neumí fermentovat, např. acetát (Rosenkrantz et al., 1986). Cit2p může částečně nahradit funkci Cit1p u respiračně deficientních buněk. (Rickey, et al. 1986 a Liao et al., 1991) Z toho vyplývá, že při snížení funkce Cit1p se zvyšuje transkripce genu *CIT2*. Transkripce *CIT2* se zvyšuje i při snížení hladiny uhlíku, která je limitující pro citrátový cyklus (Liao et al., 1991). Zvýšená aktivita Cit2p může kompenzovat snížení aktivity citrátového cyklu tak, že do mitochondrie doplňuje citrát (Chelstowska and Butow, 1995; Liao et al., 1991).

Kmeny deficientní v genech *CIT1* a *CIT2* jsou auxotrofní na glutamát (Kim et al., 1986) a uracil a zároveň nejsou schopné utilizace acetátu jako zdroje uhlíku (Lee et al., 2000). Lewin et al. (1990) také prokázali úlohu *CIT2* produktu při katabolismu mastných kyselin .

Jedním z mnoha dalších cílových genů je gen *DLD3*. Na základě studia jeho exprese se používá spolu s genem *CIT2* pro sledování aktivity RTG dráhy (Tate et al., 2002). Gen *DLD3* kóduje D-laktát dehydrogenázu, která se nachází v cytoplasmě (Chelstowska et al., 1999). Transkripce *DLD3* se při

aktivaci RTG dráhy zvyšuje. Zvýšená exprese byla pozorována u ρ^0 buněk, kde je RTG dráha stále aktivovaná. V promotoru genu *DLD3* se nachází dva R boxy, místa pro nasednutí transkripčního aktivátoru Rtg1p/Rtg3p (Chelstowska et al., 1999; Jia et al., 1997; Tate et al., 2002).

Pro svou expresi *DLD3* stejně jako *CIT2* potřebuje RTG proteiny Rtg1p, Rtg2p i Rtg3p (Chelstowska et al., 1999). *CIT2* a *DLD3* jsou exprimovány ve vysokých hladinách u kmene *mks1Δ*, i když roste na bohatém médiu. Zvýšení exprese koreluje s lokalizací dimeru Rtg1p/Rtg3p v jádře. Dále dochází ke zvýšení exprese genů pro syntézu lysinu. Expese genů pro syntézu lysinu je sekundární projev následující po aktivaci RTG dráhy v buňkách bez Mks1p. Expese genů *CIT2* a *DLD3* genů u kmenů *rtg1Δ* a *rtg3Δ/mks1Δ* nebyla zaznamenána. U *mks1Δ* není potřeba Rtg2p pro transkripci cílových genů. (Dilova et al., 2002)

4. RTG nezávislá retrogradní signalizace mezi mitochondriemi a jádrem

Při rozsáhlých genomových analýzách buněk bylo objeveno zvýšení exprese skupiny genů, které nejsou pod kontrolou RTG dráhy, což poukazuje na další možnosti retrogradní signalizace mezi mitochondriemi a jádrem.

Jedním z genů nezávislých na RTG dráze je gen *PDR5*, kódující protein lokalizovaný na plazmatické membráně a patří do skupiny genů hrající roli v mnohačetné lékové rezistenci („pleotropic drug resistance“) (Balzi et al., 1994, 1987). V buňkách bez mtDNA dochází ke zvýšení jeho exprese (Hallstrom and Scott, 2000).

Pro expresi *PDR5* jsou potřeba produkty genů *PDR1* a *PDR3*, které patří mezi pozitivní regulátory *PDR5* (Balzi et al., 1994, 1987; Katzmann et al., 1996, 1994). Pdr3p i Pdr1p jsou transkripční faktory a váží se do oblasti PDRE („pleotropic drug response element“). Typická PDRE oblast je GC bohatá a sestává se ze sekvence TTCCGCGGAA (Katzmann et al., 1996, 1994). Pdr1p i Pdr3p obsahují na svém N-konci doménu zprostředkovávající vazbu na DNA (Delaveau et al., 1994).

Přestože jsou Pdr1p a Pdr3p sekvenčně téměř homologní, jejich regulace je odlišná. V ρ^0 buňkách je exprese PDR cílových genů závislá pouze na Pdr3p a nezávislá na Pdr1p (Delaveau et al., 1994, 1992; Devaux et al., 2002; Nourani et al., 1997). *PDR3* je schopný autoregulace a ve svém promotoru má 2 PDRE oblasti. Do těchto dvou PDRE oblastí může nasedat sám Pdr3p nebo Pdr1p (Delahodde et al., 1995). Jeho aktivace a aktivace exprese dalších genů je spojená s dysfunkcí mitochondrií. Přesto, že transkripční faktor Pdr3p je RTG nezávislým proteinem, je tento transkripční faktor částečně propojen s RTG geny. Na toto propojení poukázal fakt, že v buňkách bez *RTG1* nebo *RTG2* genů dochází ke snížení transkripce *PDR3* genu (Hallstrom and Scott, 2000).

PDR1 na rozdíl od *PDR3* není schopný autoregulace a ve svém promotoru neobsahuje PDRE oblasti (Delahodde et al., 1995).

Pdr5p je membránový transportér patřící do ABC transportérové rodiny (Balzi et al., 1994). Ztráta mtDNA vede ke zvýšení exprese *PDR5* genu (Hallstrom and Scott, 2000) a zároveň i ke zvýšení rezistence vůči cykloheximidu. Naopak při delecí genu *PDR5* je kmen k cykloheximidu hypersenzitivní

(Leppert et al., 1990). Promotor genu *PDR5* obsahuje 3 PDRE oblasti, kam se váží Pdr1p nebo Prd3p. Všechny tři oblasti jsou si rovnocenné. Odstranění jedné oblasti PDRE se projevilo v 50 % poklesu exprese *PDR5*. Při odstranění všech míst, byla exprese nulová. Toto zjištění dokazuje, že je exprese *PDR5* striktně závislá na Pdr1p a Prd3p transkripčních faktorech (Katzmann et al., 1996).

Další RTG nezávislý gen je *ATO3*, kódující protein plazmatické membrány důležitý pro produkci amoniaku (Palková et al., 2002). Exprese genu *ATO3* se prokazatelně zvyšuje u ρ^0 buněk. Přestože se uvádí, že je exprese genu *ATO3* nezávislá na RTG, u ρ^0 buněk s delecí v genech *RTG1* a *RTG3* docházelo ke snížení exprese genu *ATO3*. Pro plnou transkripci *ATO3* je potřeba transkripční faktor Gcn4p, nicméně při retrográdní odpovědi se neúčastní exprese. Při delecí genu *SSY1*, kódujícího podjednotku plazmatického aminokyselinového senzoru, exprese *ATO3* v ρ^+ buněk byla beze změny u, ρ^0 buněk se exprese snížila až o 60 %. Z těchto výsledků vyplývá, že u ρ^+ buněk je exprese *ATO3* závislá jen na transkripčním faktoru Gcn4p, zatímco u ρ^0 buněk je exprese *ATO3* závislá z cca 50% na RTG genech a z 50 – 60% na senzoru aminokyselin na plazmatické membráně Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (Forsberg and Ljungdahl, 2001; Guaragnella, 2003).

RTG nezávislá signalizace je zatím málo prozkoumanou oblastí signalizace buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Ve vědecké literatuře se objevují předpoklady, že genů účastnících se retrográdní odpovědi, ale nezávislých na RTG genech, je více.

5. Závěr

Objev retrográdní dráhy přispěl k rozšíření poznatků o metabolismu kvasinek a pomohl částečnému pochopení využívání živin v přirozených podmínkách v přírodě. Retrográdní dráha byla nejvíce studována na modelovém organismu kvasinky *S. cerevisiae*. Protože je retrográdní dráha přítomna napříč eukaryoty, je možné některé poznatky získané u kvasinek aplikovat i na jiné organismy, včetně člověka.

Homology RTG proteinů lze najít u člověka vyjma proteinu Rtg2p (Aguilera et al., 2006; Biswas et al., 1999). Pochopení RTG dráhy a metabolismu kvasinek může pomoci při léčbě vážných onemocnění způsobených ztrátou mtDNA a dysfunkcí mitochondrií. Využití poznatků ve změnách metabolismu může přispět k vylepšení diet u pacientů včetně ketodiety a dalších druhů půstu (Friis et al., 2014).

Nabízí se rovněž využití retrográdní signalizace při vývoji léku proti rakovině. U kvasinkových buněk se při ztrátě mtDNA mění složení plazmatické membrány. U ρ^0 buněk byla pozorována zvýšená rezistence vůči toxickým látkám, což je způsobeno zvýšením exprese genů pro ABC transportéry, jako je *PDR5*. Rakovinové buňky jsou rovněž rezistentní vůči toxickým látkám, stejně jako buňky kvasinkové. Studium genu *PDR5* může také přispět k nalezení medikamentu potlačujícího rezistenci některých patogenních kvasinek jako je *Candida albicans* (shrnuto v Prasad and Goffeau, 2012) či *Cryptococcus neoformans* (shrnuto v Posteraro et al., 2003)

V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o retrográdní dráze u kvasinek. Další studium by se mohlo zaměřit na problematiku, která ještě není zcela prozkoumaná. Stále není jasné, za jakých podmínek a který signál je spouštěčem interakce negativního regulátoru Mks1p s proteinem Rtg2p. Tedy jaký je primární spouštěč RTG dráhy. Podle současných poznatků jsou navrženy 3 možné teorie. Spouštěčem může být pokles koncentrace ATP (Zhang et al., 2013), pokles mitochondriálního membránového potenciálu (Miceli et al., 2012) a změna zdroje dusíku (Komeili et al., 2000). Miceli et al. (2012) připouštějí, že kromě MMP je pravděpodobné, že RTG dráha bude regulována i dalšími faktory. Uvažovalo se o ROS jako spouštěčích RTG dráhy, ale tato hypotéza byla vyvrácena (Miceli et al., 2012).

Při inaktivované RTG dráze je dimer Rtg1p/Rtg3p cytoplazmaticky lokalizován, stejně jako Mks1p v komplexu s proteiny Bmh1p/Bmh2p. Doposud nezodpovězenou otázkou je také jakým způsobem Mks1p inhibuje translokaci dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra.

Rovněž není jasné, které kinázy se podílejí na fosforylaci Mks1p a transkripčního faktoru Rtg3p. O kinázách, které se podílejí na inaktivaci RTG dráhy, nebylo zatím nic publikováno.

Doposud víme velmi málo o RTG nezávislé signalizaci, která zahrnuje například PDR geny a gen *ATO3* (Balzi et al., 1994, 1987; Guaragnella, 2003).

Je proto do budoucna důležité pokračovat nejen ve studiu dráhy závislé na RTG genech, ale pokusit se identifikovat a lépe charakterizovat i další RTG dráhy nezávislé na RTG genech, které mohou být důležité v různých situacích a reakcích buňky na měnící se prostředí.

6. Použitá literatura

- Aguilera, C., Fernández-Majada, V., Inglés-Esteve, J., Rodilla, V., Bigas, A., Espinosa, L., 2006. Efficient nuclear export of p65-I κ B α complexes requires 14-3-3 proteins. *J. Cell Sci.* 119, 3695–3704. doi:10.1242/jcs.03086
- Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E., Goffeau, A., 1987. The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 16871–16879.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., Goffeau, A., 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J. Biol. Chem.* 269, 2206–2214.
- Barnes, D., Lai, W., Breslav, M., Naider, F., Becker, J.M., 1998. PTR3, a novel gene mediating amino acid-inducible regulation of peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 29, 297–310. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00931.x
- Barros, M., Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., 2003. H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: effect of cytochrome c. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 179–188. doi:10.1016/S0891-5849(03)00307-1
- Bhattacharyya, S., Rolfmeier, M.L., Dixon, M.J., Wagoner, K., Lahue, R.S., 2002. Identification of RTG2 as a Modifier Gene for CTG·CAG Repeat Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162, 579–589.
- Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., Avadhani, N.G., 1999. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J.* 18, 522–533. doi:10.1093/emboj/18.3.522
- Bruckmann, A., STEENSMA, H., TEIXEIRA, de M.M., van HEUSDEN, G., 2004. Regulation of transcription by *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins. *Biochem J* 382, 867–875.
- Chelstowska, A., Butow, R.A., 1995. RTG Genes in Yeast That Function in Communication between Mitochondria and the Nucleus Are Also Required for Expression of Genes Encoding Peroxisomal Proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 18141–18146. doi:10.1074/jbc.270.30.18141
- Chelstowska, A., Liu, Z., Jia, Y., Amberg, D., Butow, R.A., 1999. Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new d-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*, 13 15, 1377–1391. doi:10.1002/(SICI)1097-0061
- Chen, E.J., Kaiser, C.A., 2003. LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J. Cell Biol.* 161, 333–347. doi:10.1083/jcb.200210141
- Chen, L., Lopes, J.M., 2010. Multiple bHLH proteins regulate *CIT2* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* n/a–n/a. doi:10.1002/yea.1757

- Coschigano, P.W., Magasanik, B., 1991. The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Mol. Cell. Biol.* 11, 822–832.
- Courchesne, W.E., Magasanik, B., 1988. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J. Bacteriol.* 170, 708–713.
- Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., Hall, M.N., 2002. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6784–6789.
- Delahodde, A., Delaveau, T.H., Jacq, C., 1995. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4043–4051.
- Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J., Jacq, C., 1994. PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol. Gen. Genet.* MGG 244, 501–511. doi:10.1007/BF00583901
- Delaveau, T., Jacq, C., Perea, J., 1992. II. Yeast sequencing reports. Sequence of a 12.7 kb segment of yeast chromosome II identifies a PDR-like gene and several new open reading frames. *Yeast* 8, 761–768. doi:10.1002/yea.320080909
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686.
- Devaux, F., Carvajal, E., Moye-Rowley, S., Jacq, C., 2002. Genome-wide studies on the nuclear PDR3-controlled response to mitochondrial dysfunction in yeast. *FEBS Lett.* 515, 25–28.
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J., Powers, T., 2004. Tor Signaling and Nutrient-based Signals Converge on Mks1p Phosphorylation to Regulate Expression of Rtg1p{middle dot}Rtg3p-dependent Target Genes. *J. Biol. Chem.* 279, 46527–46535. doi:10.1074/jbc.M409012200
- Dilova, I., Chen, C.-Y., Powers, T., 2002. Mks1 in Concert with TOR Signaling Negatively Regulates RTG Target Gene Expression in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 389–395.
- Dilova, I., Powers, T., 2006. Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 112–119. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00008.x
- Dixon, G.H., Kornberg, H.L., 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J* 1959.
- Edskes, H.K., Hanover, J.A., Wickner, R.B., 1999. Mks1p Is a Regulator of Nitrogen Catabolism Upstream of Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153, 585–594.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R., Butow, R.A., 2001. Genome-wide Responses to Mitochondrial Dysfunction. *Mol. Biol. Cell* 12, 297–308. doi:10.1091/mbc.12.2.297
- Feller, A., Ramos, F., Piérard, A., Dubois, E., 1997. Lys80p of *Saccharomyces cerevisiae*, Previously proposed as a specific repressor of LYS genes, is a pleiotropic regulatory factor identical to

- Mks1p. *Yeast* 13, 1337–1346. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1337::AID-YEA186>3.0.CO;2-O
- Forsberg, H., Ljungdahl, P.O., 2001. Genetic and Biochemical Analysis of the Yeast Plasma Membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p Sensor of Extracellular Amino Acids. *Mol. Cell. Biol.* 21, 814–826. doi:10.1128/MCB.21.3.814-826.2001
- Forsburg, S.L., Guarente, L., 1989. Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3, 1166–1178. doi:10.1101/gad.3.8.1166
- Friis, R.M.N., Glaves, J.P., Huan, T., Li, L., Sykes, B.D., Schultz, M.C., 2014. Rewiring AMPK and Mitochondrial Retrograde Signaling for Metabolic Control of Aging and Histone Acetylation in Respiratory-Defective Cells. *Cell Rep.* 7, 565–574. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.029
- Gelperin, D., Weigle, J., Nelson, K., Roseboom, P., Irie, K., Matsumoto, K., Lemmon, S., 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11539–11543.
- Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A., 2005. Retrograde Response to Mitochondrial Dysfunction Is Separable from TOR1/2 Regulation of Retrograde Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 280, 42528–42535. doi:10.1074/jbc.M509187200
- Gould, S.J., Keller, G.-A., Subramani, S., 1988. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* 107, 897–905.
- Guaragnella, N., 2003. ATO3 Encoding a Putative Outward Ammonium Transporter Is an RTG-independent Retrograde Responsive Gene Regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 Amino Acid Sensor System. *J. Biol. Chem.* 278, 45882–45887. doi:10.1074/jbc.M309301200
- Hallstrom, T.C., Scott, W., 2000. Multiple Signals from Dysfunctional Mitochondria Activate the Pleiotropic Drug Resistance Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 37347–37356. doi:10.1074/jbc.M007338200
- Heusden, G.P.H., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Schrader, P.A., Carr, A.M., Steensma, H.Y., 1995. The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Can be Replaced by a Plant Homologue. *Eur. J. Biochem.* 229, 45–53.
- Heusden, G.P.H. van, Wenzel, T.J., Lagendijk, E.L., Steensma, H.Y. de, Berg, J.A. van den, 1992. Characterization of the yeast {BMH1} gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase {II} activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Lett.* 302, 145–150. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80426-H
- Jia, Y., Rothermel, B.A., Thornton, J., 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.*

- Jørgensen, M.U., Bruun, M.B., Didion, T., Kielland-Brandt, M.C., 1998. Mutations in five loci affecting GAP1-independent uptake of neutral amino acids in yeast. *Yeast* 14, 103–114. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<103::AID-YEA203>3.0.CO;2-C
- Katzmann, D.J., Burnett, P.E., Golin, J., Mahe, Y., Moye-Rowley, W.S., 1994. Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4653–4661.
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Mahé, Y., Moye-Rowley, W.S., 1996. Multiple Pdr1p/Pdr3p Binding Sites Are Essential for Normal Expression of the ATP Binding Cassette Transporter Protein-encoding Gene PDR5. *J. Biol. Chem.* 271, 23049–23054. doi:10.1074/jbc.271.38.23049
- Kim, K.-S., Rosenkrantz, M.S., Guarente, L., 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1936–1942.
- Klasson, H., Fink, G.R., Ljungdahl, P.O., 1999. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5405–5416.
- Koivistoinen, O.M., Kuivanen, J., Barth, D., Turkia, H., Pitkänen, J.-P., Penttilä, M., Richard, P., 2013. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Microb. Cell Factories* 12, 82.
- Komeili, A., Wedaman, K.P., O’Shea, E.K., Powers, T., 2000. Mechanism of Metabolic Control Target of Rapamycin Signaling Links Nitrogen Quality to the Activity of the Rtg1 and Rtg3 Transcription Factors. *J. Cell Biol.* 151, 863–878.
- Kos, W., Kal, A.J., van Wilpe, S., Tabak, H.F., 1995. Expression of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by different circuits of transcriptional control. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Genet. Struct. Expr.* 1264, 79–86.
- Krebs, H., Lowenstein, J., 1960. The tricarboxylic acid cycle. *Metab. Pathw.* 1, 129–203.
- Lee, J.G., Cho, S.P., Lee, H.S., Lee, C.H., Bae, K.S., Maeng, P.J., 2000. Identification of a cryptic N-terminal signal in *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal citrate synthase that functions in both peroxisomal and mitochondrial targeting. *J. Biochem. (Tokyo)* 128, 1059–1072.
- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S.C., Van Dyk, T.K., Ficke, M.B., Golin, J., 1990. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* 125, 13–20.
- Liao, X., Butow, R.A., 1993. Rtg1 and RTG2 two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A., Butow, R.A., 1991. Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 38–46.
- Lin, A.-P., Anderson, S.L., Minard, K.I., McAlister-Henn, L., 2011. Effects of Excess Succinate and Retrograde Control of Metabolite Accumulation in Yeast Tricarboxylic Cycle Mutants. *J. Biol. Chem.* 286, 33737–33746. doi:10.1074/jbc.M111.266890

- Liu, Z., Butow, R.A., 1999. A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6720–6728.
- Liu, Z., Sekito, T., Spírek, M., Thornton, J., Butow, R.A., 2003. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell* 12, 401–411.
- Liu, Z., Sekito, T., Epstein, C.B., Butow, R.A., 2001. RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.* 20, 7209–7219.
- Liu, Z., Spírek, M., Thornton, J., Butow, R.A., 2005. A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCFGrr1. *Mol. Biol. Cell* 16, 4893–4904.
- Massari, M.E., Grant, P.A., Pray-Grant, M.G., Berger, S.L., Workman, J.L., Murre, C., 1999. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol. Cell* 4, 63–73.
- Massari, M.E., Jennings, P.A., Murre, C., 1996. The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 121–129.
- Matsuura, A., Anraku, Y., 1993. Characterization of the MKS1 gene, a new negative regulator of the Ras-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 238, 6–16. doi:10.1007/BF00279524
- McNabb, D.S., Tseng, K.A., Guarente, L., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7008–7018.
- Miceli, M.V., Jiang, J.C., Tiwari, A., Rodriguez-Quiñones, J.F., Jazwinski, S.M., 2012. Loss of Mitochondrial Membrane Potential Triggers the Retrograde Response Extending Yeast Replicative Lifespan. *Front. Genet.* 2. doi:10.3389/fgene.2011.00102
- Nourani, A., Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C., Subik, J., 1997. Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol. Gen. Genet.* MGG 256, 397–405.
- Olesen, J.T., Guarente, L., 1990. The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes Dev.* 4, 1714–1729. doi:10.1101/gad.4.10.1714
- Palková, Z., Devaux, F., Ricicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C., 2002. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* 13, 3901–3914.
- Parikh, V., Morgan, M., Scott, R., Clements, L., Butow, R., 1987. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235, 576–580. doi:10.1126/science.3027892

- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Sanglard, D., La Sorda, M., Boccia, S., Romano, L., Morace, G., Fadda, G., 2003. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Mol. Microbiol.* 47, 357–371. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03281.x
- Prasad, R., Goffeau, A., 2012. Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 39–63. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150111
- Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., McMahon, S.J., Wood, J.M., Kennedy, E.L., Cook, R.G., Workman, J.L., Yates III, J.R., Grant, P.A., 2002. The Novel SLIK Histone Acetyltransferase Complex Functions in the Yeast Retrograde Response Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8774–8786. doi:10.1128/MCB.22.24.8774-8786.2002
- Rickey, T.M., Lewin, A.S., 1986. Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast. *Mol. Cell. Biol.* 6, 488–493. doi:10.1128/MCB.6.2.488
- Roberg, K.J., Bickel, S., Rowley, N., Kaiser, C.A., 1997. Control of Amino Acid Permease Sorting in the Late Secretory Pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST78. *Genetics* 147, 1569–1584.
- Roberts, R.L., Mösch, H.-U., Fink, G.R., 1997. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* 89, 1055–1065.
- Rosenkrantz, M., Alam, T., Kim, K.S., Clark, B.J., Srere, P.A., Guarente, L.P., 1986. Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4509–4515.
- Rothermel, B.A., Shyjan, A.W., Etheredge, J.L., Butow, R.A., 1995. Transactivation by Rtg1p, a Basic Helix-Loop-Helix Protein That Functions in Communication between Mitochondria and the Nucleus in Yeast. *J. Biol. Chem.* 270, 29476–29482. doi:10.1074/jbc.270.49.29476
- Rothermel, B.A., Thornton, J.L., Ronald A. Butow, 1997. Rtg3p, a Basic Helix-Loop-Helix/Leucine Zipper Protein that Functions in Mitochondrial-induced Changes in Gene Expression, Contains Independent Activation Domains. *J. Biol. Chem.* 272, 19801–19807. doi:10.1074/jbc.272.32.19801
- Samokhvalov, V., Ignatov, V., Kondrashova, M., 2004. Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. *Biochimie* 86, 39–46. doi:10.1016/j.biochi.2003.10.019
- Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A., 2002. RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell* 13, 795–804.
- Sekito, T., Thornton, J., Butow, R.A., 2000. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Sci. Signal.* 11, 2103.

- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G., Schreiber, S.L., 2000. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.* 10, 1574–1581.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., Winston, F., Workman, J.L., Berger, S.L., 1999. Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 86–98.
- Stucka, R., Dequin, S., Salmon, J.-M., Gancedo, C., 1991. DNA sequences in chromosomes 11 and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol. Gen. Genet.* 229, 307–315.
- Suissa, M., Suda, K., Schatz, G., 1984. Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. *EMBO J.* 3, 1773.
- Tate, J.J., Cox, K.H., Rai, R., Cooper, T.G., 2002. Mks1p Is Required for Negative Regulation of Retrograde Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* but Does Not Affect Nitrogen Catabolite Repression-sensitive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 277, 20477–20482. doi:10.1074/jbc.M200962200
- Traven, A., Wong, J.M.S., Xu, D., Sopta, M., Ingles, C.J., 2001. Interorganellar Communication. ALTERED NUCLEAR GENE EXPRESSION PROFILES IN A YEAST MITOCHONDRIAL DNA MUTANT. *J. Biol. Chem.* 276, 4020–4027. doi:10.1074/jbc.M006807200
- Ünlü, E.S., Narayanan, L., Gordon, D.M., 2013. Characterization of fungal *RTG2* genes in retrograde signaling of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 13, 495–503. doi:10.1111/1567-1364.12055
- Van Heusden, G.P.H., Steensma, H.Y., 2001. 14-3-3 Proteins are essential for regulation of RTG3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 1479–1491.
- Walker, M.E., Val, D.L., Rohde, M., Devenish, R.J., Wallace, J.C., 1991. Biochemical and Biophysical Research Communications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1210–1217.
- Zhang, F., Pracheil, T., Thornton, J., Liu, Z., 2013. Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. *Genes* 4, 86–100. doi:10.3390/genes4010086