

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání - Biologie se zaměřením na  
vzdělávání



**Eliška Pavelková**

Metabolismus methioninu a jeho role v buněčných procesech  
u *Saccharomyces cerevisiae*.

Metabolism of methionine and its role in cellular processes  
in *Saccharomyces cerevisiae*.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Blanka Zikánová

Praha, 2015

**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, dne 6. května 2015

.....

Podpis

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce RNDr. Blance Zikánové za cenné rady, připomínky a konzultace, které mi pomáhaly při vypracování této práce. Také jí děkuji za vstřícný přístup. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mě podporovali během studia.

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Chemická charakteristika methioninu.....	2
3	Metabolismus methioninu .....	3
3.1	Příjem methioninu.....	3
3.2	Biosyntéza methioninu <i>de novo</i> .....	6
3.3	Šetřící dráhy methioninu .....	7
3.3.1	Cyklus S-adenosyl methioninu (methylační cyklus).....	8
3.3.2	Cyklus 5-methylthioadenosinu .....	8
3.4	Degradace methioninu .....	10
4	Regulace příjmu a biosyntézy methioninu .....	10
5	Role methioninu v buněčných procesech v <i>S. cerevisiae</i> .....	12
5.1	Vliv methioninu na autofagii .....	12
5.1.1	Regulace autofagie .....	12
5.1.2	Autofagie nezávislá na hladovění na dusík.....	13
5.2	Vliv methioninu na růst .....	15
5.3	Vliv methioninu na buněčné stárnutí .....	16
5.3.1	Prodloužení dožití zprostředkované autofagií.....	16
5.3.2	Stárnutí způsobené oxidací methioninu.....	17
6	Závěr .....	18
7	Seznam literatury .....	19

## Seznam zkratk

AdoMet	S- Adenosylmethionin
ATP	Adenosintrifosfát
CLS	Chronologické dožití (Chronological life-span)
Met	Methionin
MetR	Hladovění na methionin (Methionine restriction)
NCR	Dusíková katabolická represe (Nitrogen catabolite repression)
PP2A	Protein fosfatáza 2A

## Abstrakt

Methionin je proteinogenní aminokyselina, kterou kvasinky, na rozdíl od savců, dokáží v případě jejího nedostatku syntetizovat. Methionin je pro buňku nepostradatelný i z toho důvodu, že je výchozí molekulou pro S-Adenosylmethionin (AdoMet). Ten se účastní biosyntézy dalších molekul, jako jsou například polyaminy nebo biotin. AdoMet je donorem methylové skupiny při transmethylačních reakcích proteinů a lipidů, čímž se podílí na regulaci celé řady buněčných procesů. Ačkoliv kvasinky mohou methionin syntetizovat, je pro ně z energetického hlediska výhodnější přijmout ho z extracelulárního prostředí. Extracelulární koncentrace methioninu tedy ovlivňuje expresi permeáz podílejících se na jeho transportu do buňky a zároveň ovlivňuje biosyntézu methioninu.

Intracelulární dostupnost methioninu je monitorována thiolací tRNA a na základě množství thiolované tRNA je pozitivně ovlivňován růst buňky a stárnutí. Negativně je ovlivňována biosyntéza methioninu, míra translace a metabolismus uhlíku.

Nedávno bylo zjištěno, že za určitých podmínek u *Saccharomyces cerevisiae* nedostatek methioninu indukuje autofagii nezávislou na hladovění na dusík, výrazně zpomaluje růst a prodlužuje dožití buněk.

Studium úlohy methioninu v buněčných procesech může v budoucnu přispět k lepšímu pochopení dějů spojených i s procesem stárnutí u lidí.

**Klíčová slova:** Methionin, *Saccharomyces cerevisiae*, autofagie, růst, stárnutí

## **Abstract**

Methionine is a proteinogenic amino acid which can be in case of its lack synthesized by yeast, in contrast to mammals. Methionine is also indispensable for cells because it is a precursor molecule for S-adenosylmethionine (AdoMet). AdoMet participates in a biosynthesis of other molecules such as polyamines or biotin. AdoMet is a donor of a methyl group in transmethylation reactions of proteins and lipids. Due to this fact, AdoMet is involved in regulation of a variety of cellular processes. Although yeast can synthesize methionine, from energy point of view, it is more advantageous to take up methionine from the extracellular environment. Extracellular methionine concentration also affects the expression of permeases involved in its transport into the cell and methionine biosynthesis.

Intracellular availability of methionine is monitored by tRNA thiolation. Cell growth and aging is positively influenced based on the amount of thiolated tRNA. Methionine biosynthesis, translation rate and carbohydrate metabolism are negatively influenced.

Recently, it has been found out that under certain conditions, lack of methionine induces non nitrogen starvation autophagy, rapidly decreases growth rate and extend life-span of cells in *Saccharomyces cerevisiae*.

Study of the role of methionine in the cellular processes may, in the future, contribute to a better understanding of the processes associated with the human aging process.

**Key words:** Methionine, *Saccharomyces cerevisiae*, autophagy, growth, aging

# 1 Úvod

Methionin je proteinogenní aminokyselina obsahující síru. Na rozdíl od savců, kteří ji získávají z potravy, si ji kvasinky umí syntetizovat. Disponují ve své genetické výbavě genem *MET6*, jehož produktem je homocystein - methyltransferáza, která je zodpovědná za metylaci homocysteinu. Po připojení methylové skupiny k homocysteinu vzniká methionin (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Kvůli dosažení homeostázy buňka udržuje intracelulární koncentraci methioninu v určitém rozmezí (Chiao & Peterson 1953).

Již dlouho je známo, že methionin je aminokyselina nezbytná pro tvorbu S-adenosylmethioninu, který je donorem methylové skupiny při transmethylacích (Schlenk & Depalma 1957). V posledních letech se ukazuje, že transmethylace jsou běžnou součástí v regulaci a signalizaci v buněčných procesech v kvasinkách (Wang et al. 2014).

Hladovění buněk na methionin vede u *S. cerevisiae* k zastavení buněčného cyklu na počátku G<sub>1</sub> fáze (Unger & Hartwell 1976) a podobá se hladovění na základní živiny, jako jsou fosfáty, sulfáty, leucin nebo uracil (Petti et al. 2011).

Ke zvýšenému zájmu o studium metabolismu methioninu a vlivu methioninu na procesy probíhající v buňce vedlo zjištění, že nižší příjem methioninu u krys, octomilek, kvasinek a možná i u lidí vede k prodloužení jejich dožití (Orentreich & Zimmerman 1993; Lee et al. 2014; Johnson & Johnson 2014). Vědci se tedy v souvislosti s omezením příjmu methioninu začali zabývat mechanismy, které vedou k prodloužení dožití organismů.

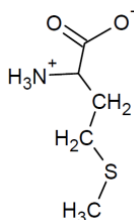
Cílem této práce je u *S. cerevisiae* popsat metabolismus methioninu, což zahrnuje jeho příjem, biosyntézu a degradaci, k čemuž se pojí také popis regulace těchto drah. Dalším cílem je shrnout informace o buněčných procesech, které jsou ovlivněny methioninem. Shrnutí všech procesů by bylo nad rámec této práce, proto je zaměřena pouze na vybrané procesy. Těmi jsou autofagie, růst a stárnutí buněk.



## 2 Chemická charakteristika methioninu

L - methionin (Obrázek 1) je proteinogenní nevětvená  $\alpha$  - aminokyselina, která v postranním řetězci obsahuje síru, přesněji thioether (tzn. vazbu C-S-C). Vazba mezi sírou a uhlíkem je slabší (střední vazebná entalpie 259 kJ/mol a délka vazby 181 pm) než vazba mezi dvěma uhlíky s hybridizací  $sp^3$  (střední vazebná entalpie 348 kJ/mol - délka 154 pm) (Atkins & Paula 2013). Na rozštěpení vazby mezi sírou a uhlíkem je tím pádem potřeba méně energie, z čehož plyne, že thioether je reaktivnější než uhlíkatý skelet. Síra disponuje šesti valenčními elektrony, díky kterým vystupuje thioether jako nukleofil. To umožňuje vznik trialkylsulfoniové soli (v případě methioninu je takovou solí S-adenosylmethionin), která se uplatňuje při transmethylacích (McMurry 2007).

L-methionin v závislosti na pH vystupuje jako báze nebo jako kyselina. Methionin je tedy amfiont. Karboxylová skupina v zásaditém prostředí odštěpuje proton, v kyselém prostředí aminoskupina proton přijímá. Cytoplazmatické pH buněk se pohybuje v rozmezí přibližně od 4,7 do 7,4 (Bracey et al. 1998; Diakov et al. 2013) a v tomto rozmezí je L-methionin prakticky zcela vnitřně nabitý, jak je ukázáno na obrázku 1 (Voet & Voet 2004).



Obrázek 1: L-methionin

Koncentrace methioninu v buňce závisí na kultivačních podmínkách a také na konkrétním kmeni kvasinek (viz tabulka 1). V tabulce 1 jsou uvedena hmotnostní procenta methioninu vztahovaná na hmotnost sušiny buněk. Z hodnot uvedených v tabulce 1 je zřejmé, že je pro kvasinku velmi důležité udržovat určitou optimální koncentraci methioninu v buňce (Chiao & Peterson 1953).

**Tabulka 1: Množství methioninu udané v hmotnostních procentech, která byla vztažena na hmotnost sušiny kvasinek.** Medium havajský sirup, doba kultivace 24 hodin při teplotě 30 °C. Převzato a upraveno z Chiao & Peterson, 1953.

Kmen	% methioninu v sušině
<i>S. cerevisiae</i> Y-30	0,75
<i>S. cerevisiae</i> 53	0,71
<i>S. cerevisiae</i> 49	0,67
<i>S. cerevisiae</i> G. M.	0,78
<i>S. cerevisiae</i> F-53	0,85
<i>S. cerevisiae</i> F-22	0,73

### 3 Metabolismus methioninu

Pro porozumění tomu, jak methionin ovlivňuje buněčné procesy, je důležitá znalost jeho metabolismu a jeho regulace. Methionin může být buňkou transportován z extracelulárního prostředí (kapitola 3.1), nebo, v případě jeho nedostatku ve vnějším prostředí, si jej mohou buňky samy nasyntetizovat (kapitola 3.2.). Významnou součástí metabolismu methioninu je jeho recyklace (kapitola 3.3).

#### 3.1 Příjem methioninu

Kvasinky, na rozdíl od savců, dokáží methionin syntetizovat. Pro biosyntézu methioninu je však nutné redukovat siřičitanový anion na sulfidový anion, přičemž na redukcí jednoho siřičitanového aniontu na sulfidový anion se spotřebovávají dvě molekuly ATP a čtyři molekuly redukčního činidla NADPH, takže to je energeticky velmi náročný proces (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Tedy z důvodu energetických úspor je důležitý i transport methioninu do buněk z okolního prostředí (Menant et al. 2006). Methionin je jedním z možných zdrojů síry (Thomas & Surdin-Kerjan 1997), ale co je podstatnější, methionin je donorem methylové skupiny při transmethylacích, proto je pro buňku velmi důležité zachovat přiměřenou koncentraci methioninu, která je udržována množstvím a aktivitou permeáz v plazmatické membráně (Voet & Voet 2004). Na transportu methioninu do buňky *S. cerevisiae* se podílí permeázy s různou afinitou a specifitou k methioninu. Exprese jednotlivých permeáz je řízena extracelulární koncentrací methioninu.

Mup1p, Mup3p, Agp3p, Agp1p, Bap2p, Bap3p, Gnp1p a Gap1p jsou permeázy, které transportují methionin (Menant et al. 2006; Ljungdahl & Daignan-Fornier 2012). *MUP1* kóduje specifickou vysokoafinitní permeázu, která hraje hlavní úlohu při příjmu methioninu

(Isnard et al. 1996), a jak se později ukázalo, tak i při příjmu cysteinu. Avšak methionin je přijímán přednostně před cysteinem (Kosugi et al. 2001). Střední afinitu k methioninu mají permeázy Agp1p, Bap2p, Bap3p, Gnp1p, které jsou širokospektré (Menant et al. 2006). Permeázy Mup3p a Gap1p jsou nízkoafinitní a širokospektré (Isnard et al. 1996; Garrett 2008; Ljungdahl & Daignan-Fornier 2012). Přehled zmíněných permeáz je v tabulce 2.

**Tabulka 2: Přehled nejdůležitějších permeáz, které se podílí na příjmu methioninu.** Převzato a upraveno dle Ljungdahl & Daignan-Fornier 2012, informace byly doplněny z Menant et al. 2006; Shamji et al. 2000; Ring-Olsen & Holmberg 1999.

Permeáza	Název permeázy	Pro met specifická	Afinita k met	TF spouštějící expresi permeázy	Regulace	Reakce na vysokou koncentraci extracelulárního methioninu
Mup1p	High affinity methionine permease	Ano	Vysoká	<i>Met4p</i>		Represe
Mup3p	Very low affinity methionine permease	Ne	Nízká	<i>Met4p</i>	GAAC	Represe
Agp3p	Low-affinity glutamine permease	Ne	Střední	<i>Met4p</i>		Represe
Agp1p	High-affinity glutamine permease	Ne	Střední	<i>Stp1p</i>	SPS, NCR, GAAC	Expresie
Bap2p	Branched-chain amino acid permease	Ne	Střední	<i>Stp1p</i>	SPS	Expresie
Bap3p	Branched-chain amino acid permease	Ne	Střední	<i>Stp1p</i>	SPS, GAAC	Expresie
Gnp1p	Glutamine permease	Ne	Střední	<i>Stp1p</i>	SPS	Expresie

Při vysoké extracelulární koncentraci methioninu ubiquitin ligáza SCF<sup>Met30</sup> ubiquitínuje transkripční faktor Met4p, který je ubiquitinací inaktivován. Met4p je zodpovědný za expresi permeáz Mup1p, Mup3p, Agp3p a genů podléjících se na biosyntéze methioninu. Je tedy logické, že při vysoké koncentraci methioninu není potřeba methionin syntetizovat, tudíž ani permeázy Mup1p, Mup3p a Agp3p nejsou při vysoké koncentraci methioninu exprimovány (Ljungdahl & Daignan-Fornier 2012; Menant et al. 2006). Navíc specifická vysokoafinitní

permeáza Mup1p, vyskytující se v plazmatické membráně, je za vysoké koncentrace extracelulárního methioninu ubiquitinována ubiquitin ligázou Rsp5p, což způsobí, že je permeáza Mup1p endocytována, a tak deaktivována. V důsledku stresu z nedostatku sirných aminokyselin, tudíž i methioninu, SCF<sup>Met30</sup> ubiquitin ligáza disociuje na SCF a Met30p. V této disociované formě nemůže ubiquitinovat transkripční faktor Met4p, takže není inaktivován (Barbey et al. 2005).

Neubiquitinovaný Met4p vytváří komplex se svými kofaktory, kterými jsou Met31p, Met32p, Cbf1p a Met28p, díky nimž Met4p nasedá na DNA a spouští expresi genů (Ouni et al. 2011). Těmito geny jsou i geny pro permeázy Mup1p, Mup3p a Agp3p (Menant et al. 2006). Avšak v případě, že jsou kofaktory ubiquitinovány, jsou degradovány v proteozomu a transkripční faktor Met4p nemůže spustit expresi genů pod kontrolou Met4p (Ouni et al. 2011).

Při vysoké extracelulární koncentraci methioninu je díky signalizaci SPS senzoru spouštěna exprese permeáz Agp1p, Bap2p, Bap3p a Gnp1p, čímž je umožněn transport methioninu do buňky (Menant et al. 2006), a naopak, exprese permeázy Gap1p je v důsledku dráhy SPS potlačena (Klasson & Fink 1999). SPS senzor je umístěn v plazmatické membráně a je složen ze tří vzájemně se ovlivňujících komponent, tj. Ssy1p, Ptr3p a Ssy5p. Ssy1p je integrální protein, který po navázání aminokyseliny, například methioninu, z extracelulárního prostředí změní svoji konformaci, čímž předá signál o přítomnosti aminokyselin proteinům Ssy5p a Ptr3p (Forsberg & Ljungdahl 2001). Signalizací SPS jsou negativně regulovány faktory Std1p a Mth1p, které brání hyperfosforylaci Ptr3p. Má-li být aktivována exprese permeáz, musí být faktory Std1p a Mth1p odstraněny. Mth1p a Std1p jsou po fosforylaci kasein dependentní kinázou Yck1/2 ubiquitinovány ubiquitin ligázou SCF<sup>Grr1</sup> a následně degradovány (Spielewoy et al. 2004; Liu et al. 2008). Poté kinázy Yck1 a Yck2 hyperfosforylují Ptr3p, čímž se aktivuje Ssy5p, který má proteolytickou aktivitu (Liu et al. 2008). V cytoplazmě se nachází transkripční faktor Stp1p s navázanou N-terminální doménou, která mu znemožňuje vstup do jádra. Je-li Ssy5p aktivován, způsobí odstřihnutí této N-terminální domény a Stp1p se dostává do jádra, kde spouští expresi permeáz Agp1p, Bap2p, Bap3p a Gnp1p (Menant et al. 2006). Na defosforylaci Ptr3p, tedy na utlumení SPS dráhy, se podílí protein fosfatáza 2A (PP2A) s regulační podjednotkou Rts1 (Liu et al. 2008).

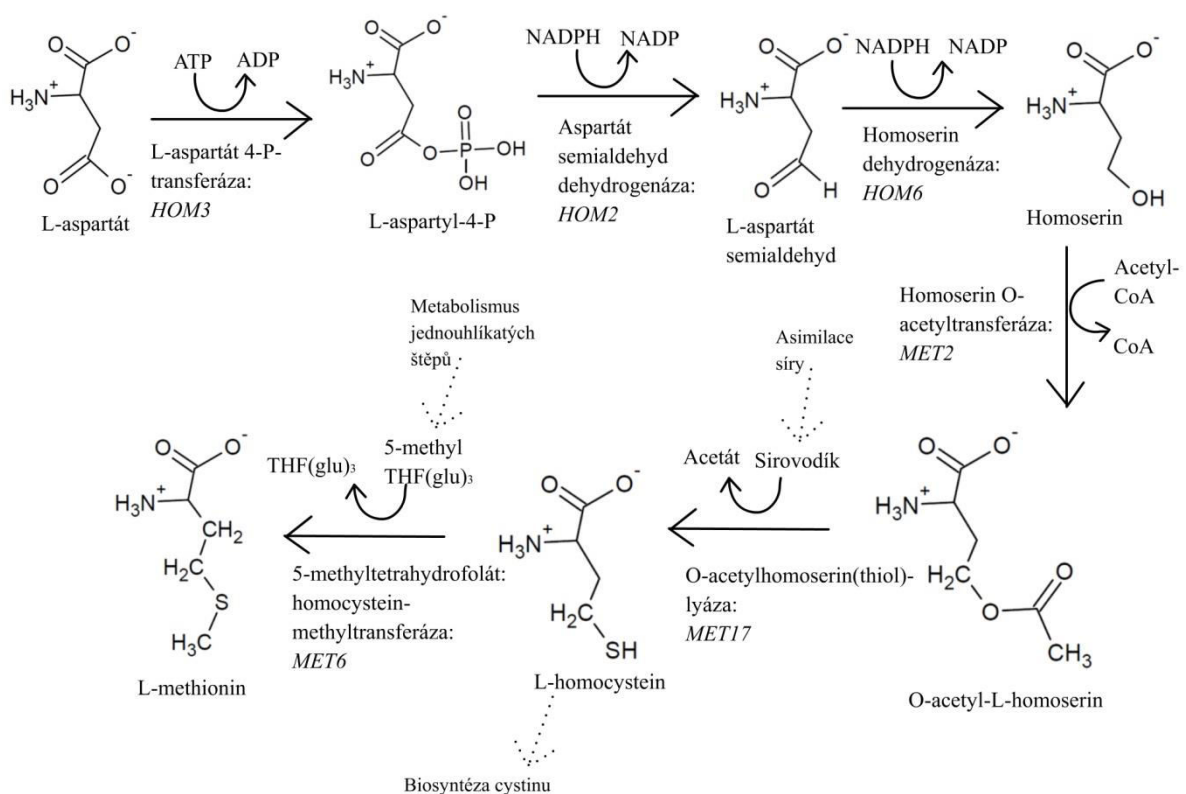
Expres permeázy Gap1p je řízena GAAC („general amino acid control“) dráhou (Natarajan et al. 2001). Během hladovění na dusík je pro buňku výhodné exprimovat permeázu Gap1p, protože je uzpůsobena na transport širokého spektra aminokyselin (Grenson 1983).

### 3.2 Biosyntéza methioninu *de novo*

Biosyntéza methioninu *de novo* začíná sloučeninou, která je za běžných podmínek snadno dostupná. Je jí kyselina asparagová, nebo přesněji L-aspartát. L-aspartát vzniká transaminací oxalacetátu, který je produktem citrátového cyklu nebo karboxylace pyruvátu (Voet & Voet 2004). Biosyntéza methioninu z aspartátu probíhá v šesti krocích přes pět různých intermediátů, z nichž homocystein propojuje biosyntézu methioninu s biosyntézou L-cysteinu a naopak (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). V první reakci je L-aspartát fosforylován za spotřeby jednoho ATP enzymem L-aspartát 4-P-transferázou (kódovaným *HOM3*) na L-aspartyl-4-fosfát. Ten je redukován enzymem aspartát semialdehyd dehydrogenázou (kódovaným *HOM2*) na L-aspartátsemialdehyd. Při této reakci je spotřebována jedna molekula NADPH, která slouží jako redukční činidlo. NADPH je spotřebováno i v následující reakci, ve které je aspartátsemialdehyd redukován enzymem homoserin dehydrogenázou (kódovaným *HOM6*) na homoserin (Robichon-Szulmajster et al. 1965). Homoserin je prekurzorem jak methioninu a cysteinu, tak i threoninu a isoleucinu. Biosyntetická dráha methioninu dále pokračuje navázáním acetylové skupiny na homoserin, čímž vznikne O-acetyl-homoserin. Kofaktorem této reakce je acetyl-koenzym A, acetylová skupina se estericky váže na homoserin. *S. cerevisiae* na rozdíl od *E. coli* přednostně využívá O-acetyl-homoserin nikoliv O-sukcinyl-homoserin (Wiebers & Garner 1967). Reakce je katalyzována enzymem homoserin O-acetyltransferázou, která je kódována genem *MET2*. V předposlední reakci je využit produkt asimilace síranu, tedy sirovodík. Esterická skupina O-acetyl-L-homoserinu je za působení enzymu O-acetylhomoserin (thiol)-lyázy (kódována genem *MET17*) nahrazena za spotřeby sirovodíku sírou. Vedlejším produktem je acetát a vzniká homocystein (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Závěrečná reakce je závislá na metabolismu jednouhlíkatých štěpů. Molekula 5-methyl-THF(glu)<sub>3</sub>, která se stane donorem methylové skupiny, vzniká z 5-methyl-tetrahydropteroylmono-L-glutamát, který je polyglutamován enzymem folylpolyglutamát syntetázou (kódovanou *MET7*) za spotřeby

dvou ATP a dvou molekul L-glutamátu na tetrahydropteroyltri-L-glutamát, zkráceně 5-methyl-THF(glu)<sub>3</sub> (Cherest 2000). Po navázání methylové skupiny na thioskupinu vzniká thioetherová vazba, a tak je dokončena přeměna homocysteinu na methionin. Této reakce se účastní enzym homocystein-methyltransferáza (u kvasinek na kobalaminu nezávislá), který je kódován genem *MET6*, a donorem methylové skupiny je 5-methyl-THF(glu)<sub>3</sub> (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Tyto výše popsané reakce zúčastňující se biosyntézy methioninu *de novo* jsou znázorněny na obrázku 2.

**Obrázek 2: Biosyntetická dráha L-methioninu *de novo*.** Převzato a upraveno dle SGD\_project 2007.



### 3.3 Šetřící dráhy methioninu

Význam methioninu stoupá, když si uvědomíme, že je esenciální pro vznik S-adenosyl-L-methioninu (AdoMet). AdoMet je někdy též nazývaný aktivovaný methionin. Tato molekula je považována za druhou nejčastější molekulu účastnící se reakcí v buňce. Uplatňuje se při transmethylačních reakcích, biosyntéze vitamínů, biotinu a polyaminů (Thomas & Surdin-Kerjan 1997), přičemž z polyaminů dále vzniká koenzym A, který se účastní řady reakcí (White et al. 2001). Methionin je recyklován dvěma drahami, které jsou níže popsány a schematicky znázorněny na obrázku 3.

### 3.3.1 Cyklus S-adenosyl methioninu (methylační cyklus)

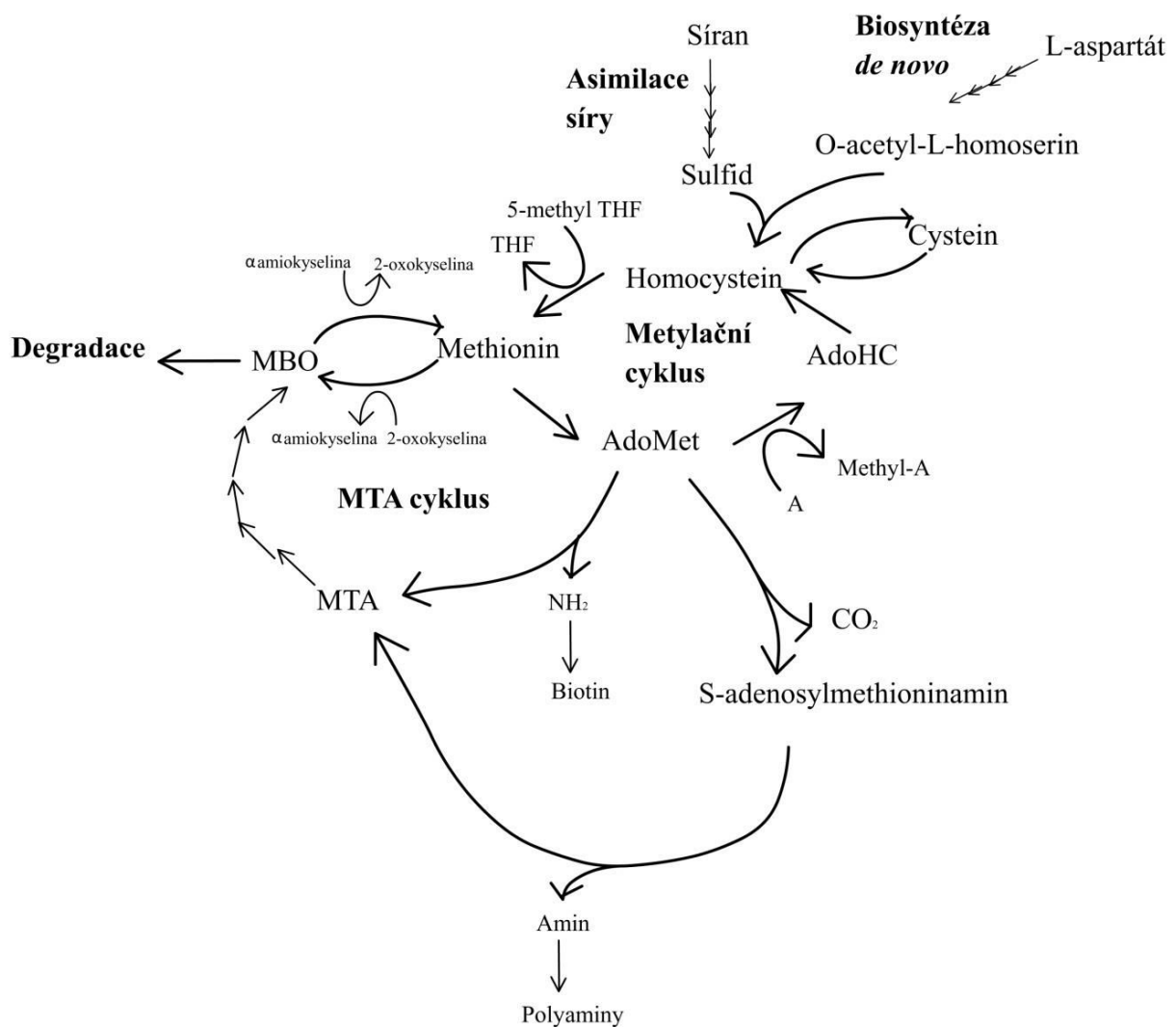
Kvasinka s pomocí enzymu S-adenosylmethionin syntetázy biosyntetizuje z methioninu AdoMet. S-adenosylmethionin syntetázy jsou kódované geny *SAM1* a *SAM2*, které jsou z 92% shodné a plní tutéž funkci. AdoMet je biosyntetizován z L-methioninu a ATP, který je kompletně defosforylován, takže z reakce odstupuje pyrofosfát a anorganický fosfát. Tento krok je tedy energeticky náročný. V molekule AdoMet jsou na síru navázány tři funkční skupiny, takže se stává kladně nabitou. Jedna ze tří skupin je skupina methylová, která se uplatňuje při transmethylacích. Po odstoupení této methylové skupiny z AdoMet vznikne S-adenosyl-homocystein (AdoHC) (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Methylová skupina může být navázána například na nukleové kyseliny, proteiny či lipidy (Thomas et al. 2000). V molekule AdoHC je vázána redukovaná síra a cílem cyklu AdoMet je udržet tento atom síry v redukovaném stavu a vyhnout se tak energetickým ztrátám. Proto je AdoHC sledem dvou reakcí přeměněn zpět na methionin (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Nejprve proběhne hydrolýza AdoHC, na které se podílí enzym S-adenosyl-L-homocystein hydroláza (kódovaná genem *SAH1*) a molekula vody. AdoHC je rozštěpen na dvě molekuly, a to na adenosin a homocystein. Nicméně tato reakce je reverzibilní a nahromadění AdoHC by působilo inhibičně na transmethylace. Proto je produkt hydrolýzy, adenosin, rychle odčerpáván na další enzymatickou reakci. Adenosin je fosforylován, takže vzniká AMP. Tímto mechanismem je posunuta rovnováha hydrolýzy AdoHC ve prospěch produktů, tudíž AdoHC není hromaděno (Tehlivets et al. 2004; Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Tato reakce je katalyzována enzymem adenosin kinázou, které je kódována genem *ADO1* (Kanai et al. 2013). Následně je cyklus S-adenosylmethioninu uzavírán reakcí totožnou se závěrečnou reakcí biosyntézy methioninu. Z homocysteinu vzniká methionin za účasti enzymu 5-methyltetrahydrofolát: homocystein-methyltransferázy, kde jako donor methylové skupiny slouží 5-methyl THF (Thomas & Surdin-Kerjan 1997).

### 3.3.2 Cyklus 5-methylthioadenosinu

V případě, že AdoMet není spotřebován na transmethylace, ale na syntézu polyaminů nebo biotinu, vzniká vedlejší produkt 5-methylthioadenosin (MTA), který obsahuje stejně jako AdoHC síru v redukované formě. MTA je tedy z energetických důvodů recyklován zpět na methionin, a to přes šest reakcí. V prvním kroku šetřící dráhy je MTA fosforylován MTA fosforylázou (kódovanou genem *MEU1*), přičemž se odštěpuje adenin. Vzniká

5-methylthioribóza - 1 - fosfát, přičemž ribóza slouží jako uhlíkatý skelet vznikajícího methioninu. Sledem dalších čtyř reakcí katalyzovaných enzymy, které jsou kódovány geny, postupně *MRI1* (isomeráza), *MDE1* (dehydratáza), *UTR4* (fosfatáza) a *ADI1* (dioxygenáza), vznikne kyselina 2-oxo-4-methylthiobutanová (MOB). Závěrečný krok této dráhy spočívá v transaminaci MOB na konečný produkt – methionin. Při této reakci bývají nejčastěji donorem aminoskupiny aromatické a rozvětvené aminokyseliny. Bylo zjištěno, že na tomto kroku se mohou podílet čtyři různé transaminázy s různou specifitou k různým aminokyselinám (Pirkov et al. 2008). Množství transamináz lze vysvětlit tím, že je pro buňku důležité, aby MOB nebyla hromaděna, neboť její zvýšená koncentrace indukuje apoptózu buňky (Tang et al. 2006).

**Obrázek 3: Šetřící dráhy methioninu a jejich zasazení do metabolismu methioninu.** Převzato a upraveno z Thomas & Surdin-Kerjan 1997. „A“ značí akceptor methylu. Ostatní zkratky jsou popsány v textu.





### 3.4 Degradace methioninu

V případě přebytku methioninu a potřeby jeho degradace buňka využívá Ehrlichovu dráhu, při které methionin podstupuje transaminaci a stává se z něj kyselina 2-oxo-4-methylthiobutanová (MOB). Ta je dále dekarboxylována enzymem Aro10p, čímž vznikne aldehyd – methional. Aldehydy je obecně možné oxidovat na karboxylové kyseliny nebo redukovat na alkoholy. Methional může být buď oxidován na „fusel“ kyselinu - kyselinu 3-(methylthio)propanovou (Perpète et al. 2006), nebo, jak je tomu většinou, redukován s pomocí alkohol dehydrogenázy na „fusel“ alkohol - methionol. Redukce se účastní redukční činidlo NADH, naopak oxidace se účastní  $\text{NAD}^+$ . Oxidací methanalu na kyselinu 3-(methylthio)propanovou je  $\text{NAD}^+$  recyklováno na NADH, který může být využit v jiných metabolických drahách. Methionol i kyselina 3-(methylthio)propanová jsou vyloučeny z buňky. Membránový transportér pro transport methionolu z buňky není znám. Export „fusel“ kyselin zajišťuje transportér Pdr12p, jehož aktivita je spojena se spotřebou ATP (Hazelwood et al. 2008).

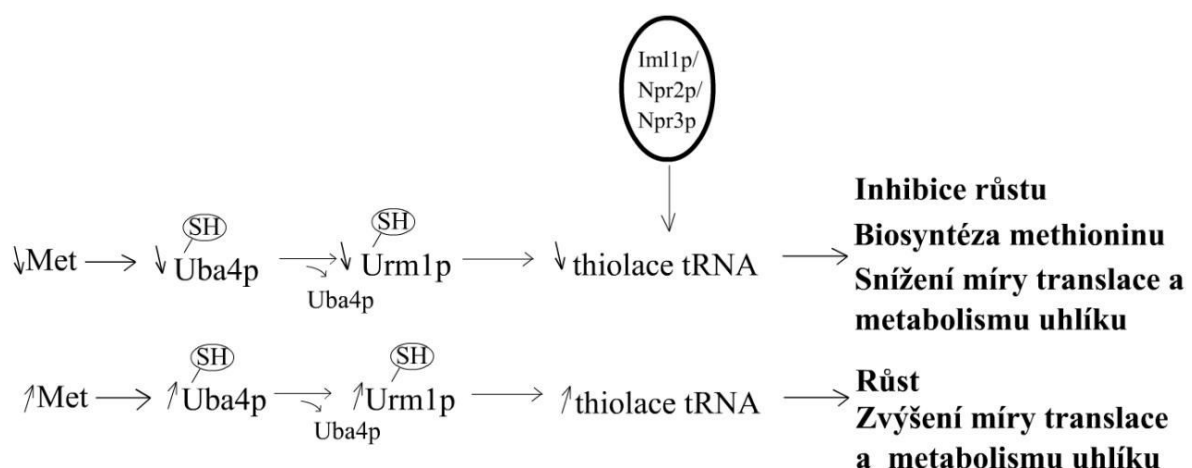
Další cesta, jak buňka degraduje methionin, je, že ho s pomocí demethiolázy rozštěpí na methanthiol (Perpète et al. 2006) a pravděpodobně kyselinu  $\alpha$ -aminobutanovou, která je nejspíše transaminací přeměněna na  $\alpha$ -ketobutyrát. Nebo tatáž demethioláza štěpí rovnou MOB, nikoliv methionin, na methanthiol a  $\alpha$ -ketobutyrát. Methanthiol je vyloučen z buňky, zatímco  $\alpha$ -ketobutyrát, na rozdíl od produktů Ehrlichovy dráhy, může být znovu využit jakožto prekurzor pro biosyntézu isoleucinu. (Perpète et al. 2006).

## 4 Regulace příjmu a biosyntézy methioninu

Ačkoliv je methionin chudým zdrojem dusíku (Godard et al. 2007), navíc jeho intracelulární koncentrace je v porovnání s ostatními proteinogenními aminokyselinami jedna z nejnižších (Drillien & Lacroute 1972) a při jeho degradaci není využit uhlíkatý skelet (s výjimkou degradace na  $\alpha$ -ketobutyrát, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole (Perpète et al. 2006)), je pro život buňky nepostradatelný. Účastní se totiž důležitých reakcí a metabolických drah, jako je například transmethylace a s ní související biosyntéza polyaminů (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Přes jeho nepostradatelnost je však nezbytné, aby buňka udržovala jeho koncentraci v určitém optimálním rozmezí (Chiao & Peterson 1953).

Má-li buňka řídit intracelulární koncentraci methioninu, musí ji určitým způsobem monitorovat. K tomu slouží modifikace tRNA. Jedná se o tRNA nabíjecí se lysinem, glutaminem nebo glycinem. Díky nim buňka rozpoznává intracelulární dostupnost methioninu, cysteinu, AdoMet a síry v redukované formě. Tyto tRNA mohou být modifikovány připojením methoxykarbonylmethylové (mcm) funkční skupiny na pátý atom uridinu, který se nachází v oblasti antikodonu („wobble“ pozice). Taková modifikace je zapisována jako mcm<sup>5</sup>U tRNA. V případě intracelulárního dostatku síry v redukované formě a sirmých aminokyselin enzym Uba4p thioluje enzym Urm1p, který substituuje oxo skupinu uridinu thio skupinou. Oxo, respektive thio skupina se nachází na druhém atomu uridinu, proto je vzniklá tRNA označována mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U tRNA, která bývá také označována jako thiolovaná tRNA a proces se nazývá thiolace. Donorem thiolové skupiny (-SH) je cystein a enzym katalyzující tuto reakci je cystein desulfuráza (kódovaný genem *NFS1*) (Noma et al. 2009). Nižší množství thiolované tRNA dává buňce signál o nedostatku sirmých aminokyselin, což má za následek spuštění biosyntézy methioninu a cysteinu, aktivaci jejich šetřících drah, snížení míry translace a zpomalení růstu buňky. Naopak vyšší množství thiolované tRNA dává buňce signál, že sirmých aminokyselin je dostatek. Tento signál vede ke zvýšení míry translace a metabolismu uhlíku a zahájení růstu buněk (Laxman et al. 2013). Vztah methioninu, thiolace tRNA a jejího působení je znázorněn na obrázku 4.

**Obrázek 4: Mechanismus a vliv thiolace tRNA.** Převzato, upraveno a doplněno na základě informací z článků Noma et al. 2009) a Laxman et al. 2013. Vznik a funkce Iml1p/Npr2p/Npr3p komplexu jsou vysvětleny v kapitole 5.1.2 „Autofagie nezávislá na hladovění na dusík“



Expresi genů pro biosyntézu methioninu *de novo*, asimilaci síry i methylační cyklus jsou pod kontrolou transkripčního faktoru Met4p. Jeho aktivita je pozitivně řízena nedostatkem methioninu, cysteinu nebo AdoMet v intracelulárním prostředí. Tudíž v případě intracelulárního nedostatku methioninu, cysteinu nebo AdoMet je aktivován Met4p, což má za následek expresi genů pro biosyntézu těchto dvou sirných aminokyselin a AdoMet (Ljungdahl & Daignan-Fornier 2012). Aktivace Met4p může souviset se snížením míry thiolované tRNA, avšak mechanismus ani hypotéza nebyly doposud zkoumány.

Navíc, jak bylo popsáno v kapitole 3.1, je Met4p spouštěna exprese permeáz Mup1p, Mup3p a Agp3p, které zvýší míru transportu methioninu z extracelulárního prostředí do buňky (Menant et al. 2006). V kapitole 3.1 „Příjem methioninu“ je popsána regulace transkripčního faktoru Met4p.

## **5 Role methioninu v buněčných procesech v *S. cerevisiae***

Methionin ovlivňuje mnoho buněčných procesů, které probíhají v *S. cerevisiae*. Tyto procesy jsou komplexní a často vzájemně provázané. Tato kapitola je věnována vlivu methioninu na autofagii, růst a buněčné stárnutí.

### **5.1 Vliv methioninu na autofagii**

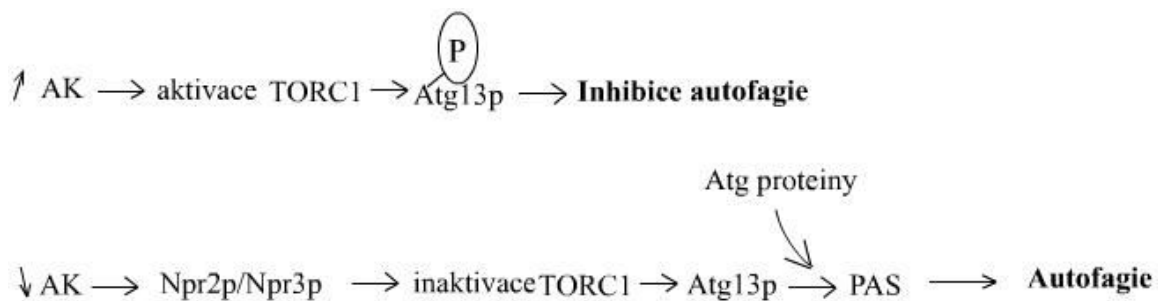
Pro přežití buněk je důležitá adaptace na změny vnějšího prostředí a udržování vnitřní homeostázy. K tomu přispívá proces zvaný autofagie, který se objevuje napříč organismy, což potvrzuje jeho nepostradatelnost pro přežití (Reggiori & Klionsky 2013; Hansen et al. 2008). Autofagie má navíc vliv na zpomalení stárnutí (Alvers et al. 2009). Účastní se jí produkty *ATG* genů, které jsou vysoce konzervované. Proces autofagie spočívá v tom, že buňka ve vakuole degraduje nepotřebné nebo poškozené organely, makromolekuly nebo proteiny na jednotlivé molekuly, které dále využije pro biosyntézu potřebných organel, makromolekul a proteinů (Reggiori & Klionsky 2013). Nicméně autofagie musí být regulována, aby nedocházelo k degradaci nepostradatelných organel a proteinů (Reggiori & Klionsky 2013).

#### **5.1.1 Regulace autofagie**

Regulace je většinou zajištěna TOR („target of rapamycin“) dráhou, kdy je v důsledku nedostatku živin nebo v důsledku působení rapamycinu aktivita komplexu TORC1 (TOR komplex 1) snížena.

Jednou z možností, jak kvasinka reaguje na nedostatek aminokyselin a dusíku, je vznik Npr2p/Npr3p komplexu, který snižuje aktivitu komplexu TORC1 (Neklesa & Davis 2009). V důsledku snížení aktivity TORC1 není Atg13p fosforylován. Defosforylovaný Atg13p se váže s Atg1p, které dohromady s dalšími Atg (autophagy) proteiny vytváří preautofagozomální strukturu (PAS), která vede k tvorbě autofagozomu. Má-li buňka dostatek živin, komplex TORC1 TOR dráhy fosforyluje Atg13p, takže se nemůže vázat s Atg proteiny, tudíž nevzniká PAS a autofagie je tak inhibována (Kamada et al. 2010). Regulace autofagie TORC1 komplexem v případě nedostatku aminokyselin je znázorněna na obrázku 5.

**Obrázek 5: Působení TOR dráhy na autofagii. AK značí aminokyseliny.** Obrázek vychází z informací článků Kamada et al. 2010 a Neklesa & Davis 2009.



Další cesta regulace autofagie vede přes cAMP-dependentní proteinkináza (PKA), která, stejně jako TORC1 (ale nezávisle na něm), fosforyluje Atg13p a je tedy také inhibítorem autofagie. Přičemž inaktivace PKA taktéž vyvolává spuštění autofagie (Stephan et al. 2009).

### 5.1.2 Autofagie nezávislá na hladovění na dusík

Nedávno bylo u prototrofního kmene *Saccharomyces cerevisiae* pozorováno, že po přenesení kvasinek z bohatého média do chudého média byla indukována autofagie. Chudé médium obsahovalo anorganický dusík a obě média obsahovala laktát, jakožto nefermentovatelný zdroj uhlíku. Tento typ autofagie nebyl indukován hladověním ani na uhlík ani na dusík, proto byl nazván autofagií nezávislou na hladovění na dusík NNS („non-nitrogen-starvation“)-indukovaná autofagie. NNS-autofagie nebyla indukována v případě změny složení chudého média. Pokud chudé médium obsahovalo místo laktózy glukózu, nebyla autofagie indukována. V případě pozdějšího přídavku glukózy do chudého média byla autofagie inhibována. Na základě těchto výsledků byla vyslovena hypotéza, že NNS-indukovaná autofagie může být pod kontrolou katabolické represe (Wu & Tu 2011).

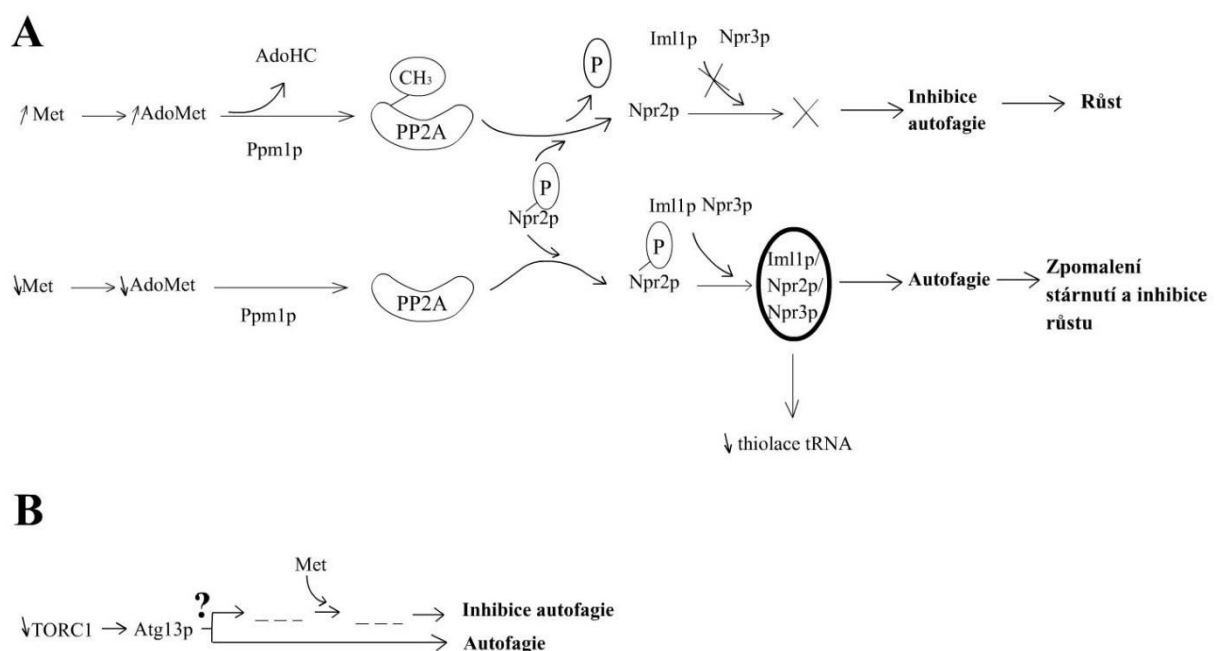
Pozdější studie ukázaly, že přidavek methioninu, na rozdíl od přídatku jiných aminokyselin, do chudého média způsobí silnou inhibici NNS-indukované autofagie. Na základě tohoto pozorování bylo vyvozeno, že methionin je limitující aminokyselina pro růst a její nedostatek vede ke spuštění autofagie (Sutter et al. 2013). Díky sériím experimentů, publikovaných autory Sutter a kol. v roce 2013, byl navržen mechanismus působení methioninu na NNS-indukovanou autofagii.

Bylo zjištěno, že methionin a homocystein inhibují NNS-autofagii, zatímco sirná aminokyselina cystein a z ní biosyntetizovaný glutathion (GSH) nemají na inhibici NNS-autofagie znatelný vliv (Sutter et al. 2013). Glutathion je důležitým buněčným redoxním pufrem a působí tedy proti oxidativnímu stresu, který je vyvolán vyšší koncentrací reaktivních forem kyslíku, zkráceně ROS (reactive oxygen species) (Grant et al. 1997). Zjištěním, že glutathion nepůsobí inhibici NNS-autofagie bylo vyloučeno, že NNS-autofagii spouští oxidativní stres. Dále bylo zjišťováno, zda se na regulaci NNS-autofagie podílí TORC1 komplex. Při spuštění NNS-autofagie byla detekována vyšší míra defosforylovaného proteinu Atg13p, který je schopen vytvořit PAS. Nicméně po přidání methioninu byla autofagie inhibována, ačkoliv Atg13p vykazoval obdobnou míru defosforylace jako bez přídatku methioninu. Z tohoto pozorování byl vyvozen závěr, že methionin působí buď na nějaký další produkt po proudění defosforylovaného Atg13p, čímž je inhibována NNS - autofagie (znázorněno na obrázku 6B), nebo že methionin inhibuje NNS autofagii nezávisle na TOR dráze (znázorněno na obrázku 6A) (Sutter et al. 2013).

Jak již bylo několikrát zmíněno, methionin, potažmo AdoMet, jsou klíčové molekuly pro transmethylační reakce (Thomas & Surdin-Kerjan 1997). Další bádání se tedy ubíralo cestou zjišťování, zda delece některé transmethylázy nezpůsobí zrušení efektu přídatku methioninu do chudého média, ve kterém kvasinky prochází NNS-autofagií. Při deleci methyltransferázy Ppm1p skutečně nedošlo k inhibici NNS-autofagie, ačkoliv byl methionin přidán do média (Sutter et al. 2013). Ppm1p je methyltransferáza, která methyloje katalytickou doménu C protein fosfatázy 2A (PP2Ap) (Wu et al. 2000). Po přenesení methylové skupiny z AdoMet na katalytickou podjednotku PP2Ap vykazuje methylovaná PP2Ap odlišnou substrátovou specifitu než nemethylovaná PP2Ap. Methylovaná PP2Ap defosforyluje Npr2p, což vede k inhibici NNS-autofagie a zrychlení růstu buňky. Naopak v případě přenesení buňky

z bohatého média do chudého média, ke kterému nebyl přidán methionin, zůstává PP2A nemetylovaná, takže Npr2p zůstává fosforylovaný (Sutter et al. 2013). Na fosforylovaný Npr2p se naváže Iml1p a Npr3p, čímž se vytvoří Iml1p/Npr2p/Npr3p komplex spouštějící NNS-indukovanou autofagii (Wu & Tu 2011). Tento komplex velmi pravděpodobně působí na snížení množství thiolované tRNA (Laxman et al. 2013). Vliv methioninu na tvorbu Iml1p/Npr2p/Npr3p komplexu a jeho další působení je znázorněno na obrázku 6A.

**Obrázek 6A, 6B: Vliv methioninu na autofagii a růst. A: První z možných modelů, kterým methionin spouští NNS-autofagii.** Křížek značí, že nevzniká komplex. **B: Druhý z možných modelů, kterým methionin spouští NNS-autofagii** Symbol \_\_\_ značí hypotetický následný produkt po proudu Atg13p. Obrázek vychází z informací článků Laxman et al. 2014; Sutter et al. 2013 a Ruckenstuhl et al. 2014.

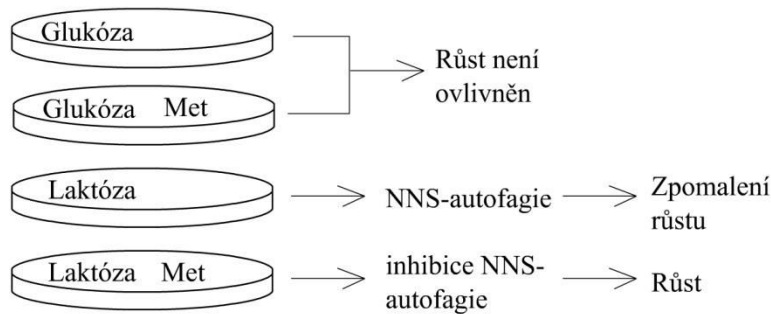


## 5.2 Vliv methioninu na růst

Auxotrofní kvasinky, které nejsou schopny syntetizovat methionin, se v případě hladovění na methionin zastavují na počátku G<sub>1</sub> fáze. Populace kvasinek tak přestává růst (Unger & Hartwell 1976). Na prototrofní kvasinky mají změny koncentrace methioninu v extracelulárním prostředí pouze malý vliv na růst populace. V tomto případě je vliv dostupnosti methioninu srovnatelný s vlivem ostatních, pro kvasinky neesenciálních aminokyselin (Wu et al. 2013). To ale pravděpodobně platí pouze pro média, která obsahují fermentovatelný zdroj uhlíku, jakým je například glukóza. Jiná studie přinesla poznatek, že v médiu s nefermentovatelným zdrojem uhlíku (laktózou) a nedostatkem methioninu prototrofní kmen kvasinek téměř nerostl (Sutter et al. 2013). Naopak v médiu s přidavkem methioninu a s laktózou populace kvasinek rostla. Bylo zjištěno, že kvasinky s delecí genu

kódující Ppm1p nevykazují tak výrazné zvýšení růstu po přidavku methioninu. Děje se tak z toho důvodu, že v případě absence Ppm1p není inhibována NNS-autofagie. Růst buněk je tedy velmi pravděpodobně regulován autofagií, která je regulována dostupností methioninu (Sutter et al. 2013). Vliv methioninu na růst je znázorněn na obrázku 7.

**Obrázek 7: Vliv methioninu na růst.** Obrázek vychází z informací z článků Wu et al. 2013 a Sutter et al. 2013.



### 5.3 Vliv methioninu na buněčné stárnutí

V roce 1993 bylo zjištěno, že omezení příjmu methioninu (MetR) způsobuje u krys prodloužení života (Orentreich & Zimmerman 1993), později to bylo prokázáno také u dalších živočišných druhů, například u octomilek (Lee et al. 2014), krys a nejspíše i u lidí (Johnson & Johnson 2014). U prototrofních kvasinek bylo zjištěno, že snížená koncentrace methioninu způsobí prodloužení replikativního (Koc et al. 2004) a chronologického stárnutí, naopak zvýšená koncentrace methioninu snižuje chronologické dožití buněk. Prodloužení dožití buněk za podmínek MetR se projeví i u buněk, které mají deletován gen pro Tor1p, což znamená, že TORC1 neindukuje buněčnou odpověď na MetR (Wu et al. 2013).

#### 5.3.1 Prodloužení dožití zprostředkované autofagií

V roce 2014 byly publikovány výsledky pokusu skupiny Ruckenstuhl a kolektiv, které ukázaly spojitost omezení methioninu s autofagií a dlouhověkostí. Na pokus byly použity dva auxotrofní kmeny kvasinek, a to s delecí genu *MET17* a genu *MET2*, které mají omezenou biosyntézu methioninu, přičemž  $\Delta met17$  je schopen pouze omezené biosyntézy methioninu a  $\Delta met2$  není vůbec schopen methionin biosyntetizovat. Buňky těchto dvou auxotrofních kmenů vykazovaly delší dobu chronologického dožití oproti prototrofnímu kmeni. U auxotrofních kvasinek bylo během hladovění na methionin pozorováno rychlé spuštění autofagie. Souvislost autofagie s prodloužením CLS způsobené MetR byla prokázána pomocí delece genů, jejichž produkty se účastní autofagie. Jednalo se o deleci genů *ATG5*, *ATG7* a *ATG8*. Buňky, které byly vystaveny MetR (tj. kmeny  $\Delta met17$  a  $\Delta met2$ ) a byla jim inaktivována

autofagie, umíraly rychleji oproti kvasinkám, které měly methioninu dostatek. Z těchto pozorování bylo vyvozeno, že v důsledku hladovění na methionin je spuštěna autofagie, díky které se prodlužuje chronologické dožití buněk (Ruckenstuhl et al. 2014). Jelikož médium, ve kterém byl pokus realizován, bylo bohaté a kvasinky hladověly pouze na methionin, lze usuzovat, že se jednalo o již zmíněnou NNS-autofagii. Je tedy pravděpodobné, že při nedostatku methioninu je indukována NNS-autofagie, díky které se buňky dožívají vyššího chronologického věku (Ruckenstuhl et al. 2014; Sutter et al. 2013). Vliv MetR a autofagie na stárnutí je znázorněn na obrázku 6A.

### **5.3.2 Stárnutí způsobené oxidací methioninu**

Na buňky může působit oxidativní stres, který je způsobován zvýšenou koncentrací reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty jsou produkovány jako vedlejší produkt respiračního řetězce a při poškození mitochondrií jsou produkovány ve vyšší míře (Adam-Vizi & Chinopoulos 2006). Methionin velmi snadno podléhá oxidaci způsobenou ROS. Atom síry methioninu je oxidován do oxidačního stavu čtyři plus, přijímá dva elektrony a váže se dvojnou vazbou s atomem kyslíku, čímž vzniká methionin sulfoxid (MetO). Protein, který obsahuje MetO namísto methioninu, nemůže dokonale plnit svoji funkci, což urychluje replikativní stárnutí buněk. Antioxidační enzymy MrsAp a MrsBp (methionin sulfoxid reduktáza A a B) redukují atom síry MetO, tudíž MetO je redukován opět na methionin. V důsledku této zpětné redukce se protein stává funkčním a díky tomu dochází k prodloužení replikativního dožití buněk. Zde methionin nevystupuje jako modulátor buněčného stárnutí, ale prostřednictvím oxidace methioninu jako nástroj buněčného stárnutí (Koc et al. 2004).



## 6 Závěr

Tato práce se zabývá metabolismem methioninu a vlivem methioninu na autofagii, růst a stárnutí. Tyto procesy jsou vzájemně propojeny a jedním z jejich společných jmenovatelů je právě methionin.

Hladovění na methionin u *S. cerevisiae* indukuje autofagii nezávislou na hladovění na dusík. Pro tento nový způsob indukce autofagie byly zatím navrženy dva modely, kterými může být autofagie indukována (Sutter et al. 2013). Autofagie vyvolaná hladověním na methionin prodlužuje dožití buněk (Ruckenstuhl et al. 2014) a výrazně zpomaluje jejich růst (Sutter et al. 2013). Nedostatek methioninu vede ke snížení množství thiolované tRNA v buňce (Noma et al. 2009), což vede ke zpomalení růstu, k utlumení uhlíkového metabolismu a k aktivaci drah biosyntézy methioninu (Laxman et al. 2013).

Ukazuje se, že množství dostupného methioninu může ovlivňovat i lidskou dlouhověkost. Lidské fibroblasty, které jsou na podkladě genetické dispozice vystaveny restrikci methioninu (delecí genu *MTR*, což je homolog genu *MET17* u kvasinek), jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu a zpomaluje se jejich replikativní stárnutí (Johnson & Johnson 2014). Navíc oxidativní stres způsobuje oxidaci methioninu (Koc et al. 2004) a bylo prokázáno, že vysoké množství oxidovaného methioninu (navýšené v důsledku oxidativního stresu a nedostatku antioxidantů – methionin sulfoxid reduktáz) způsobuje u lidí neurodegenerativní onemocnění (Weissbach et al. 2005; Berlett & Stadtman 1997). Je tedy možné, že restrikce methioninu by mohla přispívat k prodloužení dožití u lidí. Otázkou ale zůstává, zda by tento způsob prodloužení dožití neměl vedlejší účinky. (Johnson & Johnson 2014). Proto jako příspěvek k možnému prodloužení délky života vidím spíše omezení nadkonzumace potravin s obsahem methioninu než jeho úplnou restrikci.

## 7 Seznam literatury

- Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C., 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(12), pp.639–645.
- Alvers, A.L. et al., 2009. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy*, 5(6), pp.847–849.
- Atkins, P. & Paula, J. de, 2013. *Fyzikální chemie* Czech edit. P. Chuchvalec, ed., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Barbey, R. et al., 2005. Inducible dissociation of SCF(Met30) ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium. *The EMBO journal*, 24(3), pp.521–32.
- Berlett, B.S. & Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 272(33), pp.20313–20316.
- Bracey, D. et al., 1998. Methods Determination of the intracellular pH ( pH <sub>i</sub> ) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* : the effect of reduced-expression of the membrane H<sup>+</sup> -ATPase. *Journal of Microbiological Methods*, 31, pp.113–125.
- Diakov, T.T., Tarsio, M. & Kane, P.M., 2013. Measurement of vacuolar and cytosolic pH in vivo in yeast cell suspensions. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (74), pp.1–7.
- Drillien, R. & Lacroute, F., 1972. Ureidosuccinic Acid Uptake in Yeast and Some Aspects of Its Regulation. *Journal of Bacteriology*, 109(1), pp.203–208.
- Forsberg, H. & Ljungdahl, P.O., 2001. Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Molecular and cellular biology*, 21(3), pp.814–26.
- Garrett, J.M., 2008. Amino acid transport through the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1 permease is controlled by the Ras/cAMP pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(3), pp.496–502.
- Godard, P. et al., 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 27(8), pp.3065–86.
- Grant, C.M., MacIver, F.H. & Dawes, I.W., 1997. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular biology of the cell*, 8(9), pp.1699–1707.
- Grenson, M., 1983. the Positive Control of the General Amino-Acid Permease and Other Ammonia-Sensitive Uptake Systems by the Product of the. *Eur. J. Biochem.*, 144, pp.141–144.
- Hansen, M. et al., 2008. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS genetics*, 4(2), p.e24.

- Hazelwood, L. a et al., 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), pp.2259–66.
- Cherest, H., 2000. Polyglutamylation of Folate Coenzymes Is Necessary for Methionine Biosynthesis and Maintenance of Intact Mitochondrial Genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp.14056–14063.
- Chiao, J.S. & Peterson, W.H., 1953. Yeasts, Methionine and Cystine Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(16), pp.1005–1008.
- Isnard, A., Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y., 1996. The Study of Methionine Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a New Family of Amino Acid Permeases. *Journal of Molecular Biology*, pp.473–484.
- Johnson, J.E. & Johnson, F.B., 2014. Methionine restriction activates the retrograde response and confers both stress tolerance and lifespan extension to yeast, mouse and human cells. *PLoS one*, 9(5), p.e97729.
- Kamada, Y. et al., 2010. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and cellular biology*, 30(4), pp.1049–58.
- Kanai, M. et al., 2013. Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates S-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), pp.1183–90.
- Klasson, H. & Fink, G.R., 1999. Ssy1p and Ptr3p Are Plasma Membrane Components of a Yeast System That Senses Extracellular Amino Acids. *Molecular and cellular biology*, 19(9), pp.5405–5416.
- Koc, A. et al., 2004. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. *PNAS*, 101(21), pp.7999–8004.
- Kosugi, A. et al., 2001. MUP1, high affinity methionine permease, is involved in cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(3), pp.728–731.
- Laxman, S. et al., 2013. Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell*, 154(2), pp.416–429.
- Laxman, S., Sutter, B.M. & Tu, B.P., 2014. Methionine is a signal of amino acid sufficiency that inhibits autophagy through the methylation of PP2A. *Autophagy*, 10(2), pp.386–7.
- Lee, B.C. et al., 2014. Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status. *Nature communications*, 5, p.3592.
- Liu, Z. et al., 2008. Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Molecular and cellular biology*, 28(2), pp.551–63.
- Ljungdahl, P.O. & Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3), pp.885–929.

- McMurry, J., 2007. *Organická chemie* 1st ed., Brno: Vysoké učení technické v Brně, Nakladatelství VUTIUM.
- Menant, A., Barbey, R. & Thomas, D., 2006. Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells. *The EMBO journal*, 25(19), pp.4436–47.
- Natarajan, K. et al., 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and cellular biology*, 21(13), pp.4347–68.
- Neklesa, T.K. & Davis, R.W., 2009. A genome-wide screen for regulators of TORC1 in response to amino acid starvation reveals a conserved Npr2/3 complex. *PLoS Genetics*, 5(6).
- Noma, A., Sakaguchi, Y. & Suzuki, T., 2009. Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic acids research*, 37(4), pp.1335–52.
- Orentreich, N. & Zimmerman, J.A.Y.A., 1993. Nutrient Requirements and Interactions Low Methionine Ingestion by Rats Extends Life Span Orentreich Foundation for the Advancement. *Nutrient Requirements and Interactions*, (October 1992), pp.269–274.
- Ouni, I., Flick, K. & Kaiser, P., 2011. Ubiquitin and transcription: The SCF/Met4 pathway, a (protein-) complex issue. *Transcription*, 2(3), pp.135–139.
- Perpète, P. et al., 2006. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 6(1), pp.48–56.
- Petti, A. a et al., 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), pp.E1089–98.
- Pirkov, I. et al., 2008. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *The FEBS journal*, 275(16), pp.4111–20.
- Regenberg, B. et al., 1999. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, pp.317–328.
- Reggiori, F. & Klionsky, D.J., 2013. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194(2), pp.341–61.
- Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y. & Mortimer, R.K., 1965. Genetic and biochemical studies of genes controlling the synthesis of threonine and methionine in *Saccharomyces*. *Genetics*, 53(March), pp.609–619.
- Ruckenstuhl, C. et al., 2014. Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS genetics*, 10(5), p.e1004347.

- SGD\_project, 2007. SGD project. Available at: <http://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY30-954&detail-level=3&detail-level=2> [Accessed January 2, 2015].
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G. & Schreiber, S.L., 2000. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Current Biology*, 10(24), pp.1574–1581.
- Schlenk, F. & Depalma, R.E., 1957. The formation of S-adenosylmethionine in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 229, pp.1037–1050.
- Spielewoy, N. et al., 2004. Regulation and Recognition of SCF Grr1 Targets in the Glucose and Amino Acid Signaling Pathways. *Molecular and cellular biology*, 24(20), pp.8994–9005.
- Stephan, J.S. et al., 2009. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), pp.17049–54.
- Sutter, B.M. et al., 2013. Methionine Inhibits Autophagy and Promotes Growth by Inducing the SAM-Responsive Methylation of PP2A. *Cell*, 154(2), pp.403–415.
- Tang, B. et al., 2006. The methionine salvage pathway compound 4-methylthio-2-oxobutanate causes apoptosis independent of down-regulation of ornithine decarboxylase. *Biochemical Pharmacology*, 72(7), pp.806–815.
- Tehlivets, O., Hasslacher, M. & Kohlwein, S.D., 2004. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS letters*, 577(3), pp.501–6.
- Thomas, D., Becker, A. & Surdin-Kerjan, Y., 2000. Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(52), pp.40718–24.
- Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y., 1997. Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(4), pp.503–532.
- Unger, M.W. & Hartwell, L.H., 1976. Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* by methionyl-tRNA. *Cell biology*, 73(5), pp.1664–1668.
- Voet, D. & Voet, J., 2004. *Biochemistry* 3rd ed. D. Harris & P. Fitzgerald, eds., Wiley.
- Wang, K. et al., 2014. Proteomic analysis of protein methylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of proteomics*, 114, pp.226–33.
- Weissbach, H., Resnick, L. & Brot, N., 2005. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.203–12.
- White, W.H., Gunyuzlu, P.L. & Toyn, J.H., 2001. *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de Novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of beta-alanine production from spermine. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), pp.10794–800.

- Wiebers, .Joyce L. & Garner, H.R., 1967. Acyl Derivatives of Homoserine as Substrates for Homocysteine Synthesis in *Neurospora crassa*, Yeast , and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 242(10), pp.5644–5649.
- Wu, J. et al., 2000. Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *The EMBO journal*, 19(21), pp.5672–5681.
- Wu, X. & Tu, B.P., 2011. Selective regulation of autophagy by the Iml1-Npr2-Npr3 complex in the absence of nitrogen starvation. *Molecular biology of the cell*, 22(21), pp.4124–33.
- Wu, Z. et al., 2013. Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity. *PloS one*, 8(11), p.e79319.