

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

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



**Martina Pavlíčková**

Pleiotropní účinky transkripčního faktoru Opi1  
u *Saccharomyces cerevisiae*

Pleiotropic effects of transcriptional protein Opi1  
in *Saccharomyces cerevisiae*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

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, 12. 5. 2014

Podpis

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivost a ochotu, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady.

## Abstrakt

Biosyntéza fosfolipidů u *Saccharomyces cerevisiae* je regulována aktivačním komplexem Ino2p-Ino4p a represorem Opi1p. Nejvíce regulovaný gen je *INO1*, který kóduje inositol-3-fosfátsynthasu. Tento enzym katalyzuje první krok metabolické dráhy, při které vzniká inositol. Aktivační komplex Ino2p-Ino4p se váže přímo na DNA v promotorové oblasti genů a interaguje s dalšími proteiny nezbytnými pro aktivaci (Snf1p, SAGA, SWI/SNF, INO80). Opi1p způsobuje represi transkripce přímou vazbou na Ino2p a interakcí s dalšími proteiny (Sin3p, Cyc8p). Aktivita proteinu Opi1p je řízena jeho lokalizací v buňce a fosforylací. Regulace fosfolipidů je závislá na růstové fázi a dostupnosti prekursorů. Protein Opi1p kromě biosyntézy fosfolipidů ovlivňuje i další děje v buňce: metabolismus mitochondrií, stres v endoplazmatickém retikulu, velikost buněk, morfologii kolonií a invazivní růst.

**Klíčová slova:** biosyntéza fosfolipidů, inositol, cholin, regulace genové exprese, *OPI1*, *INO2*, *INO4*

## Abstract

Phospholipid biosynthesis in *Sacchromyces cerevisiae* is regulated by Ino2p-Ino4p activation complex and Opi1p repressor. The most highly regulated *INO1* gene encodes inositol-3-phosphate synthase. This enzyme catalyzes the first step of the metabolic pathway of inositol synthesis. The Ino2p-Ino4p activation complex binds to the promoter of the target genes and interacts with other proteins necessary for activation (Snf1p, SAGA, SWI/SNF, INO80). The Opi1p represses transcription by direct binding to Ino2p and by interaction with other proteins (Sin3p, Cyc8p). The activity of Opi1p protein is mediated by cellular localization and by phosphorylation. The regulation of phospholipids is dependent on the growth phase and on the availability of precursors. Apart from its repressor activity, Opi1p affects mitochondrial metabolism, endoplasmic reticulum stress, cell size, mat formation and invasive growth.

**Key words:** phospholipid biosynthesis, inositol, choline, gene expression regulation, *OPI1*, *INO2*, *INO4*

# Obsah

Abstrakt .....	iv
Obsah .....	v
Seznam použitých zkratek.....	vi
1 Úvod .....	1
2 Syntéza fosfolipidů .....	3
3 Geny významné pro regulaci metabolismu fosfolipidů.....	6
3.1 Strukturní gen <i>INO1</i> .....	6
3.2 Geny <i>INO2</i> a <i>INO4</i> kódující aktivační komplex .....	6
3.3 Gen <i>OPI1</i> kódující regulační protein .....	7
3.3.1 Struktura proteinu Opi1p .....	8
3.3.2 Fosforylace proteinu Opi1p.....	9
3.3.3 Lokalizace Opi1p .....	9
4 Principy regulace genové exprese závislé na ICRE elementu.....	12
4.1 Aktivace genů s ICRE elementem.....	13
4.2 Represe genů s ICRE elementem.....	15
4.3 Autoregulace <i>INO2</i> , <i>INO4</i> a <i>OPI1</i> .....	16
4.4 Závislost exprese genů <i>OPI1</i> a <i>INO1</i> na přítomnosti inositolu a růstové fázi .....	16
4.5 Regulace metabolismu fosfolipidů při nedostatku živin .....	19
5 Pleiotropní účinky <i>OPI1</i> .....	20
5.1 Vliv delece genu <i>OPI1</i> na obsah inositolu v buňce .....	20
5.2 Vliv delece genu <i>OPI1</i> na růst buněk a jejich citlivost k osmotickému stresu .....	21
5.3 Vliv delece genu <i>OPI1</i> na mitochondrie.....	21
5.4 Vztah genu <i>OPI1</i> ke stresu v ER .....	23
5.5 Vliv delece genu <i>OPI1</i> na morfologii kolonií a invazivní růst.....	25
5.6 Vliv delece genu <i>OPI1</i> na délku telomer .....	27
6 Gen <i>OPI1</i> u jiných organismů.....	28
7 Závěr.....	29
8 Literatura .....	30

## Seznam použitých zkratek

AID	doména proteinu Opi1p interagující s Ino2p	activator interaction domain
AK	aminokyseliny	amino acids
<b>ALK1</b>	gen kódující cytochrom P450 u <i>Yarrowia lipolytica</i>	gene encoding cytochrome P450
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
bHLH	doména pro dimerizaci a vazbu na DNA	basic helix-loop-helix domain
BiP	chaperon	chaperone
bp	páry bazí	base pair
<b>CaOPI1</b>	gen kódující protein CaOpi1p u <i>Candidy albicans</i> homologní k Opi1p	gene encoding transcription factor
CCCP	protonofor	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
<b>ccg-8</b>	regulační protein u <i>Neurospora crassa</i> homologní k Opi1p	transcription factor
CDP	cytidindifosfát	cytidine diphosphate
CDP-DAG	cytidindifosfodiacylglycerol	cytidine diphosphate diacylglycerol
CDP-Etn	cytidindifosfoethanolamin	cytidine diphosphate ethanolamine
CDP-Cho	cytidindifosfocholin	cytidine diphosphate choline
<b>CDS1</b>	gen kódující enzym Cds1p pro syntézu CDP-DAG	gene encoding CDP-DAG synthase
<b>CgIN01</b>	gen kódující protein CgIno1p u <i>Candidy glabrata</i> homologní k Ino1p	gene encoding inositol-3-phosphate synthase
<b>CgIN02</b>	gen kódující protein CgIno2p u <i>Candidy glabrata</i> homologní k Ino2p	gene encoding transcription factor
<b>CgIN04</b>	gen kódující protein CgIno2p u <i>Candidy glabrata</i> homologní k Ino4p	gene encoding transcription factor
<b>CgOPI1</b>	gen kódující protein CgOpi1p u <i>Candidy glabrata</i> homologní k Opi1p	gene encoding transcription factor
<b>CKI1</b>	gen kódující enzym Cki1p pro syntézu ChoP	gene encoding choline kinase
CKII	kaseinkinasa II	casein kinase II
CL	kardiolipin	cardiolipin
<b>CLD1</b>	gen kódující enzym Cld1p pro syntézu MLCL	gene encoding cardiolipin-specific phospholipase
<b>CPT1</b>	gen kódující enzym Cpt1p pro syntézu PC	gene encoding choline phosphotransferase
<b>CRD1</b> (= <b>CLS1</b> )	gen kódující enzym Crd1p pro syntézu MLCL	gene encoding cardiolipin synthase
CTP	cytidintrifosfát	cytidine triphosphate
<b>CYC8</b> (= <b>SSN6</b> )	gen kódující pleiotropní represor Cyc8p	gene encoding pleiotropic repressor
DAG	diacylglycerol	diacylglycerol
<b>DGK1</b>	gen kódující DAG-kinasu Dgk1p, katalyzuje přeměnu DAG na PA	gene encoding DAG kinase
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
<b>ECT1</b>	gen kódující enzym Ect1p pro syntézu CDP-Etn	gene encoding EtnP cytidyltransferase
<b>EKI1</b>	gen kódující enzym Eki1p pro syntézu EtnP	gene encoding ethanolamin kinase

EMS	ethylmethansulfonát	ethyl methansulfonate
<b>EPT1</b>	gen kódující enzym Ept1p pro syntézu PE	gene encoding ethanolamine phosphotransferase
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
<i>et al.</i>	et alii = a kolektiv	and others
EtnP	ethanolaminofosfát	ethanolamine phosphate
<b>FAS1</b>	gen kódující podjednotku enzymu katalyzujícího syntézu mastných kyselin	gene encoding fatty acid syntethase
<b>FAS2</b>	gen kódující podjednotku enzymu katalyzujícího syntézu mastných kyselin	gene encoding fatty acid syntethase
FFAT	vazebné místo na Opi1p, interaguje se Sin3p	2x phenylalanine in an acidic tract
<b>FLO11</b>	gen kódující flokulin Flo11p	gene encoding flocculin
GA	Golgiho aparát	Golgi apparatus
<b>GEP4</b>	gen kódující enzym Gep4p pro syntézu PG	gene encoding PGP phosphatase
Glu6P	glukosa-6-fosfát	glucose 6-phosphate
GPI kotva	glykosylfosfatidylinositol kovalentně vázající protein k membráně	glycosylphosphatidylinositol anchor
<b>HAC1</b>	gen kódující transkripční faktor Hac1p dráhy UPR	gene encoding transcription factor
<b>HDA1</b>	gen kódující histondeacetylasy Hda1p	gene encoding histone deacetylase
HDAC	histondeacetylasy	histone deacetylase
HID	doména proteinu Sin3p interagující s histondeacetylasy	HDAC interaction domain
<b>HNM1</b> (= <b>CTR1</b> )	gen kódující přenašeč Hnm1p pro ethanolamin a cholin	gene encoding choline/ethanolamine transporter
<b>HOS1</b>	gen kódující histondeacetylasy Hos1p	gene encoding histone deacetylase
<b>HOS2</b>	gen kódující histondeacetylasy Hos2p	gene encoding histone deacetylase
<b>HOS3</b>	gen kódující histondeacetylasy Hos3p	gene encoding histone deacetylase
<b>CHO1</b>	gen kódující enzym Cho1p pro syntézu PS	gene encoding PS synthase
<b>CHO2</b> (= <b>PEM1</b> )	gen kódující enzym Cho2p pro syntézu PC	gene encoding PE methyltransferase
ChoP	cholinfosfát	choline phosphate
I <sup>-</sup>	(médium) bez inositolu	inositol-free (medium)
I <sup>+</sup>	(médium) s inositolem	with inositol (medium)
ICRE	vazebné místo pro aktivační komplex Ino2p-Ino4p	inositol/choline responsive element
<b>INM1</b>	gen kódující enzym Inm1p pro syntézu inositolu	gene encoding inositol monophosphatase
<b>INO1</b>	gen kódující enzym Ino1p pro syntézu Ins3P	gene encoding inositol-3-phosphate synthase
<b>INO1-CYC1-lacZ</b>	UAS <sub>INO</sub> sekvence vložená do promotoru genu <b>CYC1</b> fúzovaného s genem pro β-galaktosidasu z <i>E. coli</i>	reporeter gene
<b>INO2</b>	gen kódující pozitivní transkripční faktor Ino2p	gene encoding transcriptional activator
<b>INO4</b>	gen kódující pozitivní transkripční faktor Ino4p	gene encoding transcriptional activator
INO80	komplex způsobující remodelaci chromatinu	chromatin remodeling complex

Ins	inositol	inositol
Ins3P	inositol-3-fosfát	inositol 3-phosphate
<b>IRE1</b>	gen kódující transmembránovou kinasu Ire1p dráhy UPR	gene encoding transmembrane kinase
<b>ITR1</b>	gen kódující přenašeč Itr1p pro inositol	gene encoding inositol transporter
<b>ITR2</b>	gen kódující přenašeč Itr2p pro inositol	gene encoding inositol transporter
<b>KAR2</b>	gen kódující chaperon BiP	gene encoding chaperone
<b>KEM1</b>	gen kódující G4-DNA-dependentní nukleasu	gene encoding 5'-3' exonuclease
LeuZ	leucinový zip	leucine zipper
<b>MATa, ino1-13, ade1</b>	kmen párovacího typu a, s mutacemi v syntéze inositolu a adeninu	indicator strain for Opi <sup>-</sup> phenotype
MLCL	monolysokardiolipin	monolysocardiolipin
mRNA	informační ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
<b>MSC2</b>	gen kódující přenašeč zinku	gene encoding zinc transporter
MSP-VAP	doména proteinu Sin3p, interaguje s Opi1p	major sperm protein – VAMP-associated protein
mt	mitochondriální	mitochondrial
mtDNA	mitochondriální DNA	mitochondrial DNA
NAD	nikotinamidadenindinukleotid	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	redukováná forma NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
<b>NRG2</b>	gen kódující represor genu <b>FLO11</b>	gene encoding transcriptional repressor
obr.	obrázek	figure
Opi <sup>-</sup>	fenotyp kmene <b>opi1Δ</b>	overproducer of inositol
<b>OPI1</b>	gen kódující negativní transkripční faktor Opi1p	gene encoding transcriptional repressor
Opi1-GFP	fluorescenčně značený protein Opi1p	green fluorescent protein
<b>OPI3</b> (= <b>PEM2</b> )	gen kódující enzym Opi3p pro syntézu PC	gene encoding phospholipid methyltransferase
OSID	doména proteinu Opi1p interagující s proteinem Sin3p	Opi1p-Sin3p interaction domain
PA	fosfatidová kyselina	phosphatidic acid
PAH	doména proteinu Sin3p	paired amphipathic helix domain
<b>PAH1</b>	gen kódující enzym Pah1p pro syntézu DAG	gene encoding PA phosphatase
PC	fosfatidylcholin	phosphatidylcholine
<b>PCT1</b> (= <b>CCT1</b> )	gen kódující enzym Pct1p pro syntézu CDP-Cho	gene encoding ChoP cytidyltransferase
PE	fosfatidylethanolamin	phosphatidylethanolamine
PG	fosfatidylglycerol	phosphatidylglycerol
PGP	fosfatidylglycerofosfát	phosphatidylglycerol phosphate
<b>PGS1</b>	gen kódující enzym Pgs1p pro syntézu PG	gene encoding PGP synthase
PI	fosfatidylinositol	phosphatidylinositol
<b>PIS1</b>	gen kódující enzym Pis1p pro syntézu PI	gene encoding PI synthase
PKA	proteinkinasa A	protein kinase A
PKC	proteinkinasa C	protein kinase C
PM	plazmatická membrána	plasma membrane
Pol II	RNA polymerasa II	RNA polymerase II
PolyQ	polyglutaminová oblast	polyglutamine tract



PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze	Faculty of Science Charles University in Prague
PS	fosfatidylserin	phosphatidylserine
<b>PSD1</b>	gen kódující enzym Psd1p pro syntézu PE	gene encoding PS decarboxylase
<b>PSD2</b>	gen kódující enzym Psd2p pro syntézu PE	gene encoding PS decarboxylase
RCR	poměr mezi respirací indukovanou ethanolem a respirací stimulovanou pomocí CCCP	respiratory control ratio
RID	doména proteinu Ino2p interagující s Opi1p	repressor interaction domain
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
<b>RPD3</b>	gen kódující histondeacetylasy Rpd3p	gene encoding histone deacetylase
SAGA	komplex aktivující transkripci	Spt-Ada-Gcn5-acetyl-transferase
<b>SCS2</b>	gen kódující protein Scs2p určující lokalizaci Opi1p na membráně ER	gene encoding ER transmembrane protein
<b>SIN3</b>	gen kódující pleiotropní represor Sin3p	gene encoding pleiotropic repressor
<b>SNF1</b>	gen kódující proteinkinasy Snf1p	gene encoding protein kinase
<b>SUA7</b>	gen kódující transkripční faktor Sua7p (TFIIB)	gene encoding transcription factor
SWI/SNF	komplex způsobující remodelaci chromatinu	chromatin remodeling complex
<b>SWI5</b>	gen kódující transkripční faktor buněčného cyklu	gene encoding transcription factor
tab.	tabulka	table
TAD	aktivační doména proteinu Ino2p	transcriptional activation domain
<b>TAZ1</b>	gen kódující enzym Taz1p pro syntézu CL	gene encoding MLCL acyltransferase
TPR	vazebná místa proteinu Cyc8p	tetratricopeptide repeat
<b>TUP1</b>	gen kódující globální represor	gene encoding global repressor
UAS	sekvence pro vazbu transkripčních faktorů	upstream activating sequence
UAS <sub>FAS</sub>	vazebné místo pro aktivační komplex Ino2p-Ino4p v promotorech genů <b>FAS1, FAS2</b>	upstream activating sequence
UAS <sub>INO</sub>	vazebné místo pro aktivační komplex Ino2p-Ino4p v promotoru <b>INO1</b> a dalších genů	upstream activating sequence
<b>UME6</b>	gen kódující pleiotropní represor Ume6p	gene encoding pleiotropic repressor
UPR	reakce na nesbalené proteiny v ER	unfolded protein response
UPRE	vazebné místo pro Hac1p u genů UPR	unfolded protein response element
URS1	vazebné místo na DNA pro protein Ume6p	upstream repression sequence
VAMP	membránový protein asociovaný s vesikly	vesicle-associated membrane protein
<b>YAS1</b>	gen kódující protein Yas1p u <i>Yarrowia lipolytica</i> homologní k Ino4p	gene encoding transcription factor
<b>YAS2</b>	gen kódující protein Yas2p u <i>Yarrowia lipolytica</i> homologní k Ino2p	gene encoding transcription factor
<b>YAS3</b>	gen kódující protein Yas3p u <i>Yarrowia lipolytica</i> homologní k Opi1p	gene encoding transcription factor

YEPD	komplexní růstové médium	yeast extract peptone dextrose
<i>YET1</i>	gen kódující protein Yet1p stabilizující lokalizaci Opi1p na membráně ER	gene encoding yeast ER transmembrane protein
<i>YET3</i>	gen kódující protein Yet3p stabilizující lokalizaci Opi1p na membráně ER	gene encoding yeast ER transmembrane protein
Δ	označuje kmen s delecí daného genu	gene deletion

# 1 Úvod

Fosfolipidy jsou hlavní strukturní složkou buněčných membrán, které jsou pro život buňky esenciální. Složení i množství membrán se neustále mění podle aktuálních potřeb buňky, tj. podle intenzity sekrece, oxidativní fosforylace, dostupnosti živin, teploty a podle dalších faktorů. Fosfolipidy slouží i jako prekursory pro syntézu jiných látek, k modifikaci proteinů a jako zdroj druhých posílů.

Transkripce genů kódujících enzymy pro biosyntézu fosfolipidů je řízena především proteinem Opi1p a heterodimerem Ino2p-Ino4p. Heterodimer Ino2p-Ino4p transkripci aktivuje, protein Opi1p jejich transkripci naopak potlačuje (Ambroziak & Henry, 1994; Wagner *et al.*, 2001). Tato regulace je specifická pro buňky *Saccharomyces cerevisiae*, homologní regulační proteiny však byly nalezeny i u některých dalších kvasinek (mj. u *Candida albicans*, známé pro svou patogenitu, Heyken *et al.*, 2003). Nejvíce regulovaným genem je *INO1*, který kóduje inositol-3-fosfátsynthasu. Tento enzym katalyzuje první krok metabolické dráhy, při které v buňce vzniká inositol (Donahue & Henry, 1981). Villa-García *et al.* (2011) zjistil, že sníženou produkci inositolu může způsobit delece 419 genů, které jsou zodpovědné především za odpověď na různé stresové podmínky, modifikaci proteinů, úpravy chromatinu, transkripci, buněčný cyklus, membránový transport a také metabolismus fosfolipidů a mastných kyselin. Růst v prostředí bez inositolu představuje pro kvasinky stres obdobný zvýšené teplotě nebo hyperosmotickému šoku. Absence inositolu proto vyvolává rozsáhlé změny v genové expresi, aktivaci signálních drah a také změny ve složení membrán (Villa-García *et al.*, 2011).

Buňky kvasinek žijí buď samostatně nebo v koloniích, oba typy růstu vyžadují odlišné metabolické dráhy vedoucí ke strukturním a morfologickým změnám buněk. Reynolds (2006) zjistil, že delece genu *OPI1* má negativní vliv na tvorbu kolonií a invazivní růst. Laboratoř biologie kvasinkových kolonií PřF UK se dlouhodobě zabývá přírodními kmeny kvasinek a jejich vrásčitými koloniemi. Zde se zjistilo, že Opi1p má vliv i na vrásčitost kolonií. Opi1p má nepřímý vliv i na proteiny s GPI kotvou, neboť fosfatidylinositol je jedním ze substrátů pro syntézu GPI. Tyto proteiny jsou důležitou součástí extracelulární matrix, která je výrazně rozvinutá u strukturovaných kolonií. Schopnost kvasinek přecházet z jednobuněčné formy do pseudohyfálního růstu a naopak je jedním z možných faktorů virulence, stejně jako schopnost adherovat k buněčným povrchům. Tato oblast je tedy zajímavá i z hlediska výzkumu ve zdravotnictví.

**Cíle této práce jsou:**

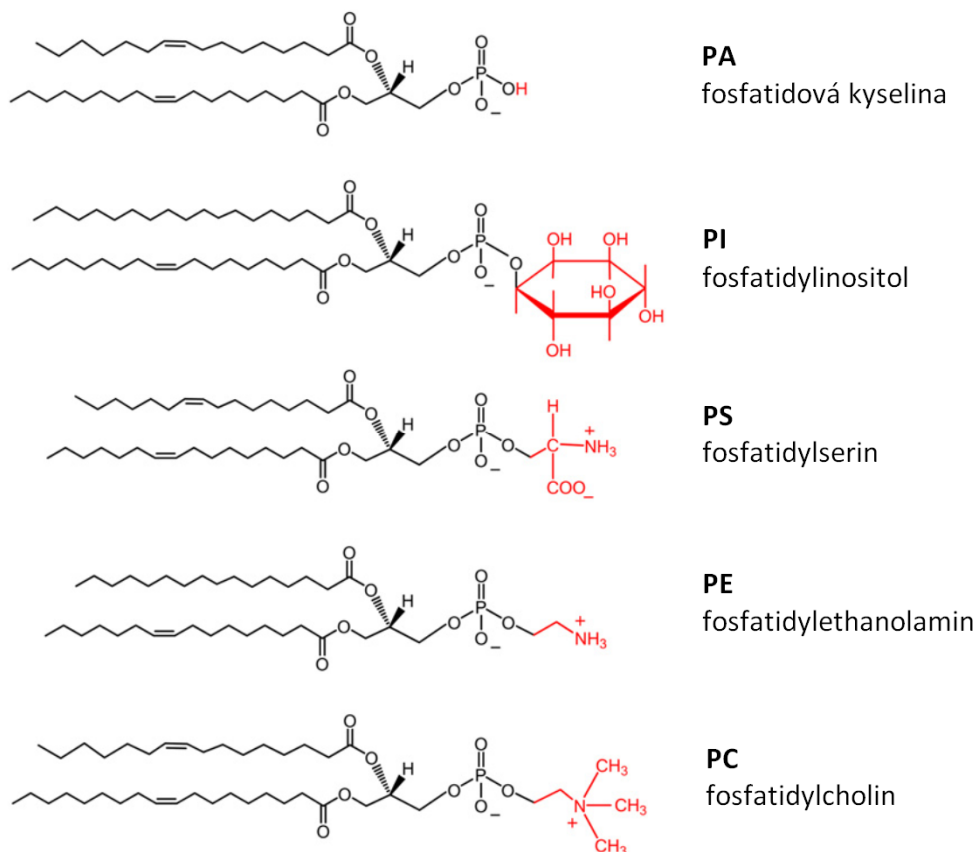
představit protein Opi1p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a vytvořit ucelený přehled dosavadních znalostí o tomto proteinu. Práce se zaměřuje na regulaci metabolismu fosfolipidů zprostředkovanou Opi1p a její závislost na růstové fázi a dostupnosti inositolu. Dalším cílem je popsat strukturu Opi1p a jeho interakční partnery. Dále pak zjistit, do kterých dějů a jakým způsobem protein Opi1p zasahuje, a popsat známé fenotypy kmene s delecí *OPI1*.

## 2 Syntéza fosfolipidů

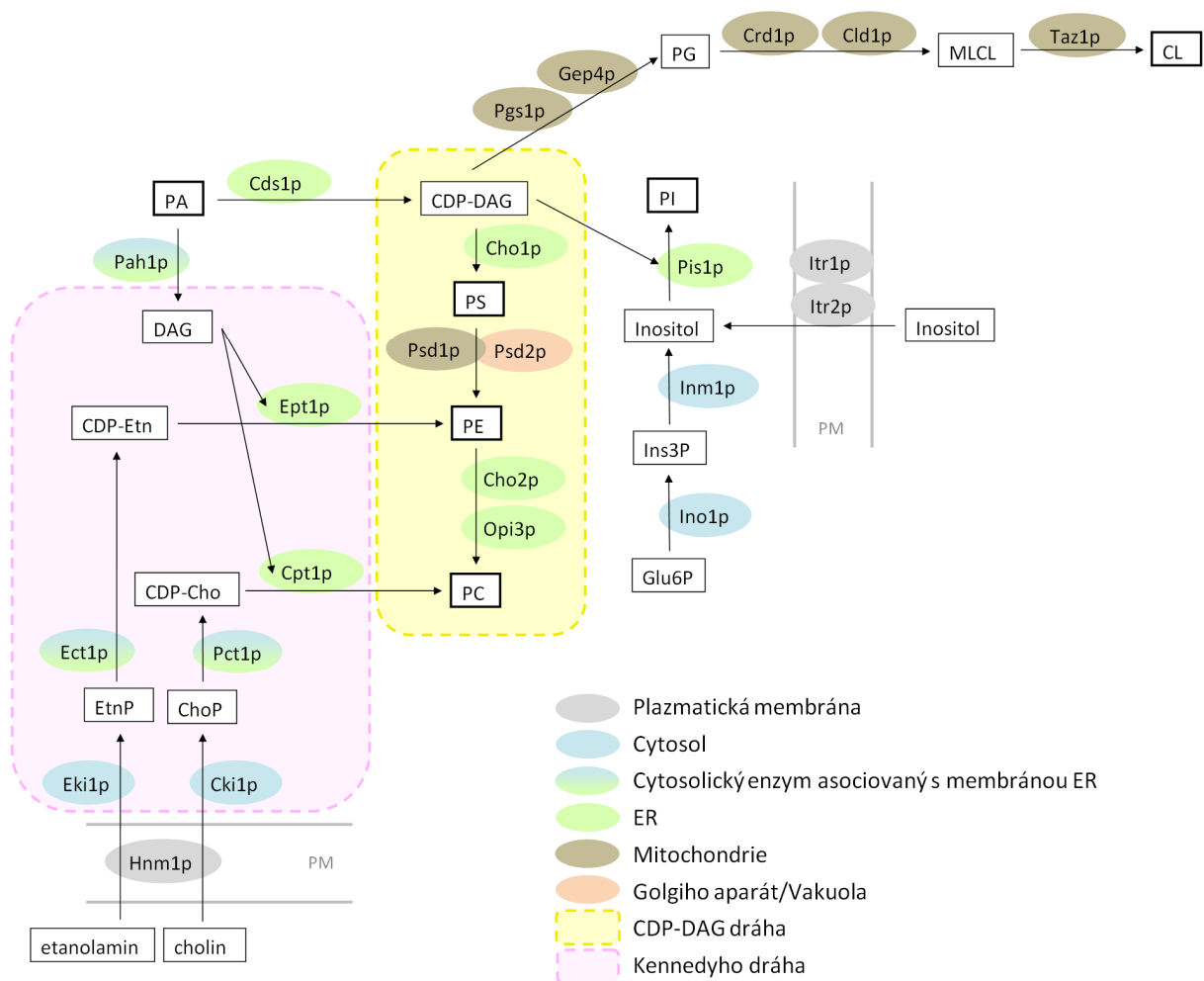
Hlavní fosfolipidy tvořící membrány *S. cerevisiae* jsou fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS), fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE) (obr. 1), fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL).

Syntéza membránových fosfolipidů probíhá *de novo* z fosfatidové kyseliny (PA) dvěma způsoby: Kennedyho dráhou a CDP-DAG dráhou (obr. 2). Všechny enzymy a jejich funkce jsou uvedeny v tabulce 1.

V CDP-DAG dráze je PA přeměněna na CDP-diacylglycerol (CDP-DAG) pomocí CDP-DAG-synthasy (kódované genem *CDS1*). CDP-DAG je poté přeměněn na PS pomocí PS-synthasy (kódované *CHO1*). Následujícím krokem je dekarboxylace PS za vzniku PE. Kvasinky mají dvě PS-dekarboxylasy kódované geny *PSD1* a *PSD2*. Obě mají stejnou funkci, ale liší se lokalizací v buňce. Psd1p je lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně, zatímco Psd2p je asociovaná s Golgiho aparátem nebo s vakuolou.



**Obrázek 1:** Schéma struktur fosfatidové kyseliny (PA) a hlavních fosfolipidů PI, PS, PE a PC, které jsou odvozeny od PA. Červeně jsou vyznačené hydrofilní hlavičky (vodík, inositol, serin, ethanolamin a cholin), které jsou připojené k základní fosfolipidové struktuře. Páteř fosfolipidu tvoří glycerol-3-fosfát a na něj jsou navázané zbytky mastných kyselin (nejčastěji jsou to kyseliny palmitová, palmitolejová, stearová a olejová). Poměr fosfolipidů a složení mastných kyselin v buňkách *S. cerevisiae* se liší v závislosti na kmeni a růstových podmínkách (Henry *et al.*, 2012).



**Obrázek 2:** Schéma syntézy fosfolipidů. Všechny enzymy a jejich funkce jsou uvedeny v tabulce 1. **ER** – endoplazmatické retikulum, **PM** – plazmatická membrána. Podle (Henry *et al.*, 2012).

PE podléhá třem postupným methylačním reakcím za vzniku PC (první reakce je katalyzovaná PE-methyltransferasou kódovanou **CHO2**, zatímco dvě následující methylace jsou katalyzované fosfolipidmethyltransferasou kódovanou **OPI3**).

Alternativou k CDP-DAG dráze je Kennedyho dráha, která využívá ethanolamin a cholin z vnějšího prostředí. Do buňky jsou transportovány pomocí přenašeče pro ethanolamin a cholin kódovaného genem **HNM1**. Ethanolaminkinasa kódovaná genem **EKI1** a cholinkinasa kódovaná genem **CKI1** jsou cytosolické enzymy, které fosforylují ethanolamin a cholin a vytvoří tak ethanolaminfosfát (EtnP) a cholinfosfát (ChoP). Enzymy EtnP-cytidyltransferasa (kódovaná **ECT1**) a ChoP-cytidyltransferasa (kódovaná **PCT1**) aktivují EtnP a ChoP pomocí CTP za vzniku CDP-ethanolaminu (CDP-Etn) a CDP-cholinu (CDP-Cho). Ethanolaminfosfotransferasa (kódovaná **EPT1**) a cholinfosfotransferasa (kódovaná **CPT1**) katalyzují reakce CDP-Etn a CDP-Cho s DAG, při kterých vzniká PE a PC. DAG v této reakci pochází z PA, která je přeměněna za pomoci PA-fosfatasy (kódované genem **PAH1**) (Henry *et al.*, 2012).

**Tabulka 1:** Přehled enzymů biosyntézy fosfolipidů.

Strukturní gen	Enzym	Lokalizace	Publikace
<i>CDS1</i>	CDP-DAG-synthasa	ER	Shen <i>et al.</i> , 1996
<i>CK1I</i>	Cholinkinasa	cytosol	Hosaka <i>et al.</i> , 1989
<i>CLD1</i>	Fosfolipasa specifická pro kardiolipin	mitochondrie	Beranek <i>et al.</i> , 2009
<i>CPT1</i>	Cholinfosfotransferasa	ER	Hjelmstad & Bell, 1987
<i>CRD1</i> (= <i>CLS1</i> )	Kardiolipinsynthasa	mitochondrie	Chang <i>et al.</i> , 1998b
<i>ECT1</i>	EtnP-cytidyltransferasa	cytosol/ER	Min-Seok <i>et al.</i> , 1996
<i>EKI1</i>	Ethanolaminkinasa	cytosol	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>EPT1</i>	Ethanolaminfosfotransferasa	ER	Hjelmstad & Bell, 1988
<i>GEP4</i>	PGP-fosfatasa	mitochondrie	Osman <i>et al.</i> , 2010
<i>HNMI</i> (= <i>CTR1</i> )	Přenašeč pro cholin a ethanolamin	PM	Nikawa <i>et al.</i> , 1986
<i>CHO1</i>	PS-synthasa	ER	Letts <i>et al.</i> , 1983
<i>CHO2</i> (= <i>PEM1</i> )	PE-methyltransferasa	ER	Kodaki & Yamashita, 1987
<i>INM1</i>	Inositolmonofosfatasa	cytosol	Murray & Greenberg, 2000
<i>INO1</i>	Inositol-3-fosfátsynthasa	cytosol	Donahue & Henry, 1981
<i>ITR1</i>	Přenašeč pro inositol	PM	Nikawa <i>et al.</i> , 1991
<i>ITR2</i>	Přenašeč pro inositol	PM	Nikawa <i>et al.</i> , 1991
<i>OPI3</i> (= <i>PEM2</i> )	Fosfolipidmethyltransferasa	ER	Kodaki & Yamashita, 1987
<i>PAH1</i>	PA-fosfatasa	cytosol/ER	Han <i>et al.</i> , 2006
<i>PCT1</i> (= <i>CCT1</i> )	ChoP-cytidyltransferasa	cytosol/ER	Tsukagoshi <i>et al.</i> , 1987
<i>PGS1</i>	PGP-synthasa	mitochondrie	Chang <i>et al.</i> , 1998a
<i>PIS1</i>	PI-synthasa	ER	Nikawa & Yamashita, 1984
<i>PSD1</i>	PS-dekarboxylasa	mitochondrie	Clancey <i>et al.</i> , 1993
<i>PSD2</i>	PS-dekarboxylasa	GA/vakuola	Trotter & Voelker, 1995
<i>TAZI</i>	MLCL-acyltransferasa	mitochondrie	Gu <i>et al.</i> , 2004

Kennedyho dráha je upřednostněna v případě, že buňky rostou v přítomnosti ethanolaminu a cholinu. V opačném případě probíhá syntéza PE a PC CDP-DAG dráhou (McMaster & Bell, 1994).

CDP-DAG je prekursorem i dalších fosfolipidů (PI, CL). Syntézu PI z inositolu a CDP-DAG katalyzuje PI-synthasa kódovaná genem *PIS1*. Inositol je buď syntetizován *de novo* nebo získán z růstového média za účasti inositolových přenašečů kódovaných geny *ITR1* a *ITR2*. Syntéza *de novo* využívá glukosu-6-fosfát (Glu6P) jako substrát. Přeměna na inositol-3-fosfát (Ins3P) je katalyzována inositol-3-fosfátsynthasou kódovanou genem *INO1* (enzym byl původně nazýván inositol-1-fosfátsynthasa). Následuje reakce, katalyzovaná inositol-3-fosfátfosfatase kódovanou genem *INM1*, jejímž produktem je inositol (Henry *et al.*, 2012).

V syntéze fosfolipidů specifických pro mitochondrie předává CDP-DAG svůj fosfatidyl na glycerol-3-fosfát a vzniká fosfatidylglycerofosfát (PGP) v reakci katalyzované PGP-synthasou kódovanou *PGS1*. PGP je potom defosforylován na fosfatidylglycerol (PG) pomocí PGP-fosfatasy kódované genem *GEP4*. *CRD1* kóduje kardiolipinsynthasu katalyzující syntézu prekursoru kardiolipinu z PG a CDP-DAG. Tento prekursorek je upraven na monolysokardiolipin (MLCL) fosfolipasou specifickou pro kardiolipin (kódovanou *CLD1*) a poté na kardiolipin (CL) pomocí MLCL-acyltransferasy (kódované *TAZI*) (Henry *et al.*, 2012).

### 3 Geny významné pro regulaci metabolismu fosfolipidů

V této kapitole budou popsány nejdůležitější složky regulace metabolismu fosfolipidů. Jedná se o geny *INO1*, *INO2*, *INO4*, *OPI1* a jimi kódované proteiny.

#### 3.1 Strukturní gen *INO1*

Gen *INO1* kóduje inositol-3-fosfátsynthasu (Donahue & Henry, 1981). Jeho exprese je přísně regulovaná především proteinem Opi1p a heterodimerem Ino2p-Ino4p. Princip regulace bude podrobněji popsán v dalších kapitolách.

Inositol-3-fosfátsynthasa je homotetramer. Katalyzuje přeměnu Glu6P na Ins3P, první ze dvou kroků syntézy inositolu. Tato reakce je závislá na NAD (Culbertson *et al.*, 1976; Donahue & Henry, 1981).

Na množství enzymu v buňce má vliv koncentrace inositolu, jeho přítomnost v buňce způsobí represí *INO1* (Donahue & Henry, 1981). Buňky s nefunkčním enzymem Ino1p jsou auxotrofní na inositol (Culbertson & Henry, 1975).

#### 3.2 Geny *INO2* a *INO4* kódující aktivační komplex

Protein Ino2p se skládá z 304 aminokyselinových zbytků. Je převážně hydrofilní a acidický (Nikoloff *et al.*, 1992). Protein Ino4p se skládá ze 151 aminokyselinových zbytků a je převážně hydrofilní a bazický (Hoshizaki *et al.*, 1990).

Ino2p a Ino4p jsou regulační proteiny, které pozitivně ovlivňují expresi genů pro enzymy biosyntézy fosfolipidů a dalších genů, obsahujících ICRE element (inositol/choline responsive element) (tab. 2 a 3, kapitola 4) (Ambroziak & Henry, 1994). Ani jeden z těchto proteinů netvoří homodimer (Schwank *et al.*, 1995). Svou funkci vykonávají v podobě heterodimeru Ino2p-Ino4p (Ambroziak & Henry, 1994). Tento komplex se konstitutivně váže na DNA v oblasti promotoru regulovaných genů (Brickner & Walter, 2004). Aby se vytvořil komplex s DNA, je nezbytná přítomnost obou proteinů (Ambroziak & Henry, 1994). V jejich struktuře se nacházejí bazické helix-loop-helix domény (bHLH) (Hoshizaki *et al.*, 1990; Nikoloff *et al.*, 1992). Amfipatické helixy umožňují dimerizaci těchto proteinů, bazické oblasti specificky interagují s DNA (Voronova & Baltimore, 1990). Ino2p obsahuje domény TAD1 a TAD2 (transcriptional activation domains), které jsou zodpovědné za aktivaci transkripce. Ino4p žádnou aktivační doménu nemá (Schwank *et al.*, 1995).

Ino4p je konstitutivně lokalizovaný v jádře, zatímco Ino2p se přemisťuje do jádra pouze, když je přítomen funkční Ino4p. Předpokládá se, že k dimerizaci proteinů dochází v cytoplasmě a do jádra vstupují s využitím jaderné lokalizační sekvence na Ino4p (Kumme *et al.*, 2008).

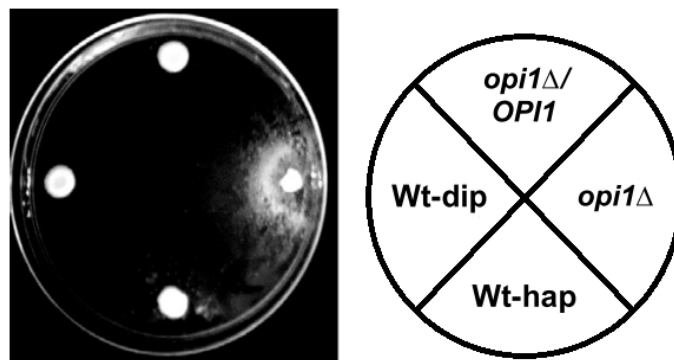
Delece v genech *INO2* nebo *INO4* vede k potlačení exprese *INO1* a dalších genů obsahujících ICRE element a k auxotrofii na inositol (Hirsch & Henry, 1986; Chumanpuen *et al.*, 2013).



### 3.3 Gen *OPI1* kódující regulační protein

Gen *OPI1* se nachází na chromozomu VIII. Otevřený čtecí rámeček má 1212 bp (White *et al.*, 1991). Kóduje protein, jehož hlavní funkcí je negativní regulace strukturního genu *INO1* (Greenberg *et al.*, 1982a) a dalších genů, které obsahují v promotorové oblasti ICRE element (tab. 2 a 3, kapitola 4) (Ambroziak & Henry, 1994; Wagner *et al.*, 2001). Srovnání transkriptomu u *opi1Δ* a standardního kmene odhalilo, že na Opi1p je plně závislá exprese genů *INO1*, *OPI3* a *PSD1*, které kódují enzymy biosyntézy fosfolipidů a potom dalších 7 genů (*SAM2*, *TPO2*, *UGA2*, *URA10*, *SRO77*, *YEL073C* a *YJR008W*) z jiných metabolických drah. Všechny tyto geny jsou pomocí Opi1p reprimovány v přítomnosti inositolu a cholinu (Santiago & Mamoun, 2003). Opi1p ovlivňuje také expresi genů *INO2*, *INO4* a dokonce i *OPI1* (více v kapitole 4.3) (Kumme *et al.*, 2008). U genu *MSC2* působí Opi1p naopak jako aktivátor transkripce (kóduje přenašeč zinku v ER) (Li & Kaplan, 2001; Santiago & Mamoun, 2003).

Greenberg *et al.* (1982b) izolovala po mutagenезi buněk *S. cerevisiae* pomocí EMS (ethylmethansulfonát) kmeny produkující inositol do média (Opi<sup>-</sup> fenotyp, vyvolaný konstitutivní expresí *INO1*). Mezi nimi byly kmeny OP1 a OP12, jejichž mutace byly označeny *opi1-1* a *opi1-12*. Bylo zjištěno, že se v obou případech jedná o mutaci téhož genu, tj. genu *OPI1* (overproducer of inositol) (Greenberg *et al.*, 1982b). Tento gen pro buňku není esenciální a jeho delece způsobuje Opi<sup>-</sup> fenotyp (White *et al.*, 1991). Pro určení Opi<sup>-</sup> fenotypu se používá komplexní médium bez inositolu, na kterém jsou vysety buňky indikátorového kmene (*MATa*, *ino1-13*, *ade1*). Defekt v syntéze adeninu způsobuje červené zbarvení, mutace *ino1-13* je příčinou auxotrofie na inositol. Na připravená média se zaočkují buňky testovaných kmenů (obr. 3). Buňky kmene s Opi<sup>-</sup> fenotypem vylučují inositol do média a umožňují růst indikátorového kmene, který v okolí kolonie testovaného kmene vytvoří červenou zónu. Fenotyp kmene *opi1Δ* je recesivní. Heterozygotní kmen *opi1Δ/OPI1* nemá Opi<sup>-</sup> fenotyp (Greenberg, *et al.*, 1982b). Vedle *OPI1* bylo nalezeno dalších 88 genů, jejichž delece způsobuje Opi<sup>-</sup> fenotyp. Tyto geny kódují proteiny s různými funkcemi: transport, regulace transkripce, modifikace proteinů, reakce na



**Obrázek 3:** Test na Opi<sup>-</sup> fenotyp u haploidního (Wt-hap) a diploidního (Wt-dip) standardního kmene a u kmenů *opi1Δ* a *opi1Δ/OPI1*. Opi<sup>-</sup> fenotyp se projevil pouze u haploidního kmene *opi1Δ* růstem indikátorového kmene v okolí kolonie (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

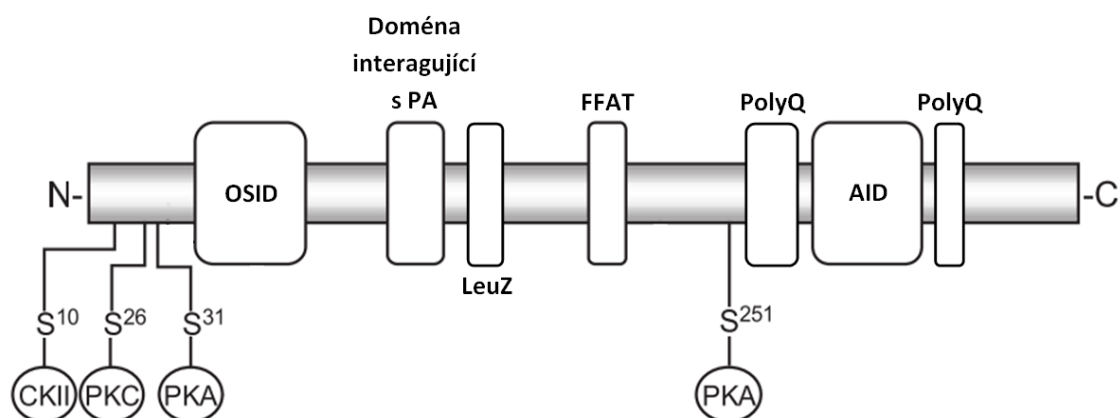
stres a další (Hancock *et al.*, 2006). V buňkách se zvýšenou expresí *OPI1* je potlačena exprese genů obsahujících ICRE element a tím je způsobena auxotrofie na inositol (Wagner *et al.*, 1999).

### 3.3.1 Struktura proteinu Opi1p

Podle analýzy nukleotidové sekvence genu *OPI1* byl predikován protein složený ze 404 aminokyselinových zbytků, s molekulární hmotností 40 000. Opi1p je poměrně acidický protein s izoelektrickým bodem 4,77. V aminokyselinové sekvenci nebyly nalezeny žádné výrazné hydrofobní oblasti (White *et al.*, 1991).

Opi1p interaguje s PA a s několika proteiny: Ino2p, Sin3p, Cyc8p (= Ssn6p) a Scs2p (Sin3p a Cyc8p hrají roli v represi genů pomocí Opi1p, Scs2p je transmembránový protein určující lokalizaci Opi1p). Přímá interakce s DNA nebyla prokázána.

Protein obsahuje motiv leucinového zipu, 2 oblasti bohaté na glutamin (White *et al.*, 1991) a několik funkčních domén, které budou probrány od N-konce k C-konci (obr. 4). Doména OSID (Opi1p-Sin3p interaction domain) má helikální strukturu s hydrofobním a hydrofilním povrchem a interaguje s ní doména PAH1 (paired amphipathic helix) proteinu Sin3p (Wagner *et al.*, 2001) a také TPR motivy (tetratricopeptide repeat) proteinu Cyc8p (Jäschke *et al.*, 2011). Vazebným místem pro PA je bazická oblast v blízkosti domény OSID (Loewen *et al.*, 2004). Opi1p dále obsahuje motiv FFAT (2x phenylalanine in an acidic tract) (Loewen *et al.*, 2003). Tento motiv se váže na doménu MSP-VAP (major sperm protein – VAMP-associated protein) proteinu Scs2p (Loewen & Levine, 2005). Další doménou Opi1p je AID (activator interaction domain) (Heyken *et al.*, 2005) interagující s doménou RID (repressor interaction domain), která je součástí proteinu Ino2p (Wagner *et al.*, 2001).



**Obrázek 4:** Schéma znázorňuje uspořádání funkčních domén proteinu Opi1p. S<sup>10</sup>, S<sup>26</sup>, S<sup>31</sup> a S<sup>251</sup> jsou aminokyseliny, které mohou být fosforylovány. **OSID** – doména interagující se Sin3p a Cyc8p, **LeuZ** – leucinový zip, **FFAT** – motiv interagující s Scs2p, **PolyQ** – polyglutaminová oblast, **AID** – doména interagující s Ino2p, **CKII** – kaseinkinasa II, **PKC** – proteinkinasa C, **PKA** – proteinkinasa A. Schéma podle (Heyken *et al.*, 2005; Chang & Carman, 2006).

### 3.3.2 Fosforylace proteinu Opi1p

Aktivita proteinu je ovlivněna různými fosforylacemi. Vliv přítomnosti fosforylovatelné aminokyseliny na funkci Opi1p byl sledován pomocí reporterového genu *INO1-CYC1-lacZ* (fúzní reporterový gen upravený pro expresi genů u kvasinek). Buňky byly kultivovány jak v represním prostředí (v přítomnosti inositolu), tak v nerepresním prostředí (bez inositolu). Proteinkinasa A (PKA) fosforyluje protein Opi1p na dvou místech: Ser<sup>31</sup> a Ser<sup>251</sup> (obr. 4). V buňkách, s Opi1p modifikovaným v těchto aminokyselinách (serin nahrazen alaninem), byla pozorována vyšší aktivita  $\beta$ -galaktosidasy v porovnání s buňkami s normálním Opi1p, a to v represních i nerepresních podmínkách. PKA tedy fosforylací stimuluje represní aktivitu Opi1p (Sreenivas & Carman, 2003). Další enzym, který má aktivační účinky, je kaseinkinasa II (CKII), fosforylující Opi1p na Ser<sup>10</sup>. V buňkách, s Opi1p modifikovaným v této aminokyselině, byla pozorována vyšší aktivita  $\beta$ -galaktosidasy v porovnání s buňkami s normálním Opi1p, ale pouze v nerepresních podmínkách (Chang & Carman, 2006). Opačně působí proteinkinasa C (PKC), která Opi1p inhibuje fosforylací na Ser<sup>26</sup>. V buňkách, s Opi1p modifikovaným v této aminokyselině, byla pozorována nižší aktivita  $\beta$ -galaktosidasy v porovnání s buňkami s normálním Opi1p, v represních i nerepresních podmínkách (Sreenivas *et al.*, 2001).

Absence jakéhokoliv fosforylačního místa v *OPI1* má jen malý vliv na expresi *INO1* v porovnání s delecí celého genu *OPI1* (Sreenivas *et al.*, 2001; Sreenivas & Carman, 2003; Chang & Carman, 2006). Pomocí fosforylace může být aktivita Opi1p koregulována s aktuálním stavem buňky, jehož odrazem je aktivita proteinkinasy. PKA i Opi1p ovlivňují buněčný cyklus, expresi některých enzymů pro biosyntézu fosfolipidů a pseudohyfální růst (kapitoly 5.2 a 5.5) (shrnuto v Sreenivas & Carman, 2003 a v Weeks & Spiegelman, 2003). PKC a CKII regulují buněčný růst, PKC navíc hraje roli i v reakci na osmotický stres, stejně jako Opi1p (kapitola 5.2) (shrnuto v Perez & Calonge, 2002 a Glover, 1998, cit. podle Chang & Carman, 2006).

### 3.3.3 Lokalizace Opi1p

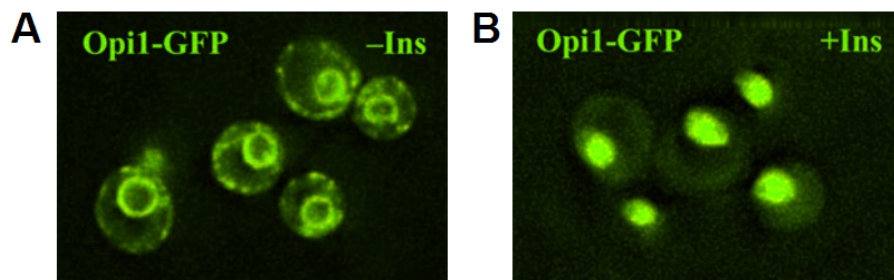
Pro regulaci metabolismu fosfolipidů je důležité regulovat přítomnost Opi1p v jádře v závislosti na hladině inositolu v buňce. Výsledky dostupných studií shrnují obrázky 5, 6 a 7. Opi1p se váže na protein Scs2p (Loewen *et al.*, 2003), který je transmembránovým proteinem lokalizovaným v membráně ER. Tento protein se podílí na transportu lipidů a biosyntéze fosfolipidů a není pro buňku esenciální, jeho delece způsobuje auxotrofii na inositol (Kagiwada *et al.*, 1998). Opi1p má také vazebné místo pro PA (fosfatidová kyselina). Aby byl Opi1p navázán přes Scs2p k membráně ER, je potřeba, aby se na Opi1p zároveň vážala PA. V přítomnosti inositolu se PA spotřebuje při syntéze PI. Opi1p se uvolní do cytosolu a přemístí se do jádra, kde funguje jako represor (obr. 6) (Loewen *et al.*, 2004).

Koncentrace PA je závislá především na enzymech Pah1p a Dgk1p. Pah1p je PA-fosfatasa a katalyzuje přeměnu PA na DAG (obr. 2) (Han *et al.*, 2006), zatímco DAG-kinasa Dgk1p katalyzuje

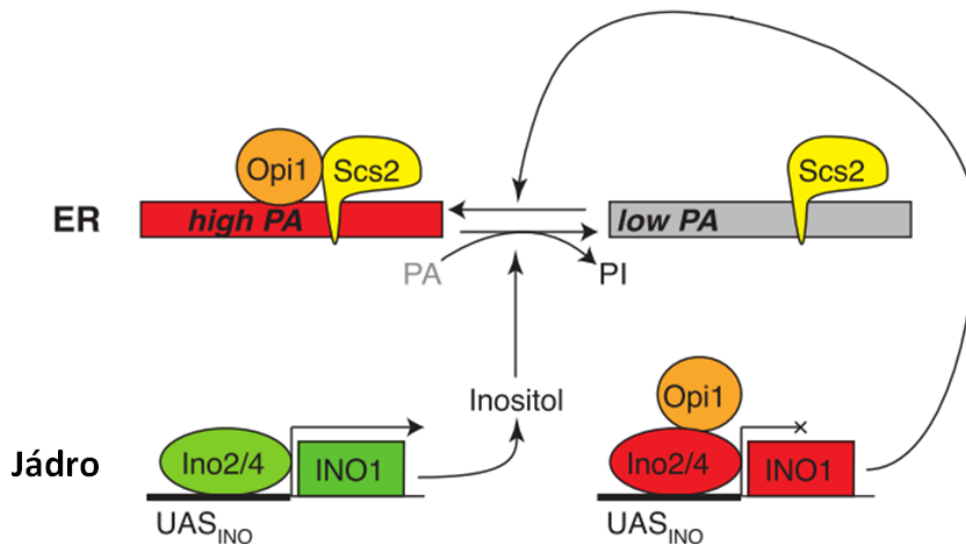
reakci opačnou (Han *et al.*, 2008). Dále koncentraci PA ovlivňuje dostupnost zinku. Při nedostatku zinku se zdvojnásobí exprese genu *PIS1* (Iwanyshyn *et al.*, 2004). Ten kóduje enzym katalyzující reakci, při které vzniká PI (obr. 2) (Nikawa & Yamashita, 1984). Zvýšená syntéza PI vede ke snížení koncentrace PA a tím zároveň k represí pomocí Opi1p.

Na lokalizaci Opi1p má vliv i pH v buňce, protože Opi1p má větší afinitu k deprotonované PA. Snížené pH v buňce tak způsobí uvolnění Opi1p z ER (Young *et al.*, 2010a). Ke snížení pH dochází např. při hladovění na glukosu (obr. 7) (Pena *et al.*, 1972; Young *et al.*, 2010a). Regulace metabolismu fosfolipidů je tedy prostřednictvím PA propojena s metabolismem sacharidů.

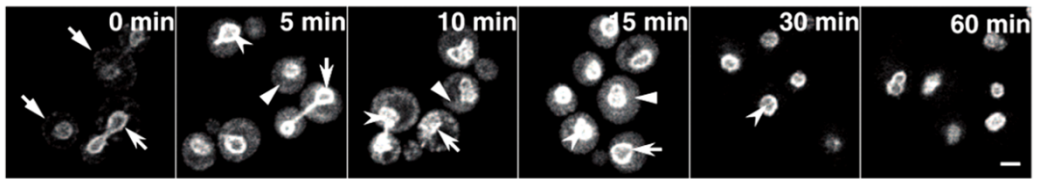
Komplex Scs2p-Opi1p je stabilizován i komplexem Yet1p-Yet3p, především při nedostatku inositolu v buňce. Protože je v buňkách *yet3Δ* narušená lokalizace Opi1p (Wilson *et al.*, 2011) a kmeny *yet1Δ* a *yet3Δ* jsou auxotrofní na inositol stejně jako *scs2Δ* (Wilson & Barlowe, 2010), lze předpokládat, že tento komplex zabraňuje represí strukturních genů metabolismu fosfolipidů v nepřítomnosti inositolu.



**Obrázek 5:** Lokalizace Opi1p v závislosti na inositolu. **A)** V nepřítomnosti inositolu je Opi1p asociován s membránou ER. **B)** Po přidání inositolu je Opi1p lokalizován v jádře. **Ins** – inositol, **Opi1-GFP** – fluorescenčně značený protein Opi1p (Henry *et al.*, 2012).



**Obrázek 6:** Lokalizace Opi1p závislá na koncentraci PA. **PA** – fosfatidová kyselina, **PI** – fosfatidylinositol, **UAS<sub>INO</sub>** – aktivační element v promotoru genu *INO1*. (Young *et al.*, 2010b)



**Obrázek 7:** Lokalizace Opi1p v buňkách standardního kmene. V čase 0 byly buňky přeneseny do média bez glukosy. (Young *et al.*, 2010a)

## 4 Principy regulace genové exprese závislé na ICRE elementu

Mnoho genů pro enzymy biosyntézy fosfolipidů (tab. 2), ale i genů s jinou funkcí (tab. 3), obsahuje ve své promotorové oblasti ICRE element (inositol/cholin responsive element) (Schüller *et al.*, 1995). ICRE element slouží k regulaci transkripce genů v závislosti na přítomnosti inositolu a cholinu. Schüller *et al.* (1992b) odvodil jeho konsensus sekvenci od UAS<sub>FAS</sub>, aktivační sekvence genů *FAS1* a *FAS2* (Schüller *et al.*, 1992b). Tyto geny kódují podjednotky enzymu, který katalyzuje syntézu mastných kyselin (shrnutí v Henry *et al.*, 2012) a jsou regulovány v závislosti na přítomnosti inositolu a cholinu. Porovnáním UAS (upstream activating sequence) podobných UAS<sub>FAS</sub> byla získána konsensus sekvence TYTTCACATGY\* a pojmenována jako ICRE element (Schüller *et al.*, 1992a). Dále byl zkoumán vliv mutací jednotlivých bází na funkci ICRE a byla odvozena optimální sekvence: WYTTTCAYRTGS\* (Schüller *et al.*, 1995). Na pozicích 5-10 je sekvence CANNTG\*, která je rozeznávána aktivačním

**Tabulka 2:** Geny *S. cerevisiae* s funkcí v biosyntéze fosfolipidů obsahující ICRE element (Schüller *et al.*, 1995).

Gen	Funkce	ICRE
<i>FAS1</i>	Fatty acid synthase, $\beta$ subunit	TTTTCACATGC
<i>FAS1</i>	Fatty acid synthase, $\beta$ subunit	ACTTCACATGC
<i>FAS2</i>	Fatty acid synthase, $\alpha$ subunit	TTTTCACATGC
<i>ACC1</i>	Acetyl-CoA carboxylase	TCTTCACATGG
<i>FAA1</i>	Acyl-CoA synthetase	TATTCACATGG
<i>FAA1</i>	Acyl-CoA synthetase	TCTTCATATTC
<i>ACB1</i>	Acyl-CoA binding protein	ATTTACATGT
<i>ITR1</i>	Inositol permease	TCTTCACATGC
<i>ITR1</i>	Inositol permease	TTTTCACATGC
<i>CTR1</i>	Choline permease	TTTTCACATGC
<i>INO1</i>	Inositol-1-phosphate synthase	TTTTCACATGC
<i>INO1</i>	Inositol-1-phosphate synthase	AATTCACATGG
<i>INO1</i>	Inositol-1-phosphate synthase	ATTTACATTC
<i>INO1</i>	Inositol-1-phosphate synthase	TCATCATATGC
<i>CHO1</i>	Phosphatidylserine synthase	CTTTCACATGG
<i>CPT1</i>	Diacylglycerol cholinephosphotransferase	TTTTCACATGC
<i>PSD1</i>	Phosphatidylserine decarboxylase	ATATCACATGC
<i>PSD1</i>	Phosphatidylserine decarboxylase	TTCCACATGC
<i>CKI1</i>	Choline kinase	TATTCACATGG
<i>PEM1</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase I	AATTCACATGT
<i>PEM1</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase I	TTTTCATATGC
<i>PEM1</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase I	TCTTCACATGA
<i>PEM2</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase II	TTCCACATGC
<i>PEM2</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase II	TCTTCATATGC
<i>PEM2</i>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase II	TCTTCATATGT
<i>PIS1</i>	Phosphatidylinositol synthase	ACTTCATATGC
<i>SLC1</i>	Long-chain acyl-CoA transferase	CCTTCATATGA
<i>SLC1</i>	Long-chain acyl-CoA transferase	GCTTCACATTC
<i>GUT1</i>	Glycerol kinase	TTTTCACATGG
<i>URA8</i>	CTP synthetase	TCTTCACATTC
<i>INO2</i>	Positive regulator of phospholipid biosynthesis	AATTCACATGT
<i>INO4</i>	Positive regulator of phospholipid biosynthesis	TATTCACATGT
<i>OPI1</i>	Negative regulator of phospholipid biosynthesis	TCTTCATATGC

\*W: A nebo T; R: A nebo G; S: C nebo G; Y: C nebo T; N: A, T, G nebo C

Tabulka 3: Geny *S. cerevisiae* obsahující ICRE element. Funkce těchto genů se netýkají biosyntézy fosfolipidů. (Schüller *et al.*, 1995)

Gen	Funkce	ICRE
<i>ARG4</i>	Argininosuccinate lyase	TTTTCACATGT
<i>MET2</i>	Homoserine O-transacetylase	TTTTCACGTGA
<i>MET8</i>	Unknown	ATTTCACGTGT
<i>MET14</i>	ATP:adenylylsulfate-3'-phosphotransferase	ATTTCACGTGA
<i>MET16</i>	3'-Phosphoadenylylsulfate reductase	ATTTCACGTGA
<i>SAM2</i>	S-adenosylmethionine synthetase	TCTTCACATGT
<i>SAM2</i>	S-adenosylmethionine synthetase	TCTTCATATGC
<i>MSW1</i>	Mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase	TTTTCACGTGA
<i>ADE12</i>	Adenylosuccinate synthetase	TTTTCATATGT
<i>CDC8</i>	Thymidylate kinase	ACTTCATATGC
<i>CDC8</i>	Thymidylate kinase	TTTTCATATGA
<i>CYC7</i>	Iso-2-cytochrome c	GTTTCACATGC
<i>COX4</i>	Cytochrome oxidase, subunit IV	TTTTCACATGA
<i>SOD1</i>	Cu,Zn-Superoxiddismutase	ATTTCACATGG
<i>MAL61</i>	Maltose permease	TTTTCATGTGT
<i>FPP1</i>	Farnesylpyrophosphate synthetase	TTTTCACATGT
<i>MFA1</i>	$\alpha$ -factor precursor	TTTTCACATGG
<i>STE2</i>	$\alpha$ -factor receptor	TCTTCATATGT
<i>STE4</i>	$\beta$ -subunit of receptor-coupled G-protein	CCTTCACATGA
<i>CCL1</i>	Negative regulator of pheromone response	TCTTCATGTGT
<i>SWI5</i>	Regulatory gene of mating type switch	TTTTCACATGC
<i>KAR1</i>	Nuclear fusion	TCTTCACATTC
<i>KSS1</i>	Protein kinase	TTTTCACATTC
<i>YCK1</i>	Casein kinase I	TTTTCATGTGG
<i>NUF1</i>	Component of nucleoskeleton	ATTTCATATGT
<i>SAC6</i>	Fimbrin (Actin binding protein)	TTTTCACATGA
<i>MSB1</i>	Morphogenesis	ATTTCATGTGC
<i>RAD9</i>	Cell cycle arrest protein	ATTTCATATGT
<i>RAD23</i>	Excision repair protein	ACTTCATATGT
<i>RAD52</i>	Recombination protein	TTTTCATATGT
<i>GCR2</i>	Glycolysis regulator	TCTTCACATTC
<i>MCM3</i>	Minichromosome maintenance	TTTTCATGTGC
<i>CAP1</i>	Capping protein, $\alpha$ -subunit	TTTTCACATTC
<i>YEF3</i>	Elongation factor 3	TTTTCACGTGC
<i>PMA2</i>	Transport ATPase	ACTTCATATGT
<i>AFG2</i>	Putative ATPase	TCTTCATATGT
<i>PEP12</i>	Sorting of vacuolar proteinases	TTTTCATGTGA
<i>PTP2</i>	Tyrosine phosphatase	CTTTCACATGC

heterodimerem Ino2p-Ino4p (Ambroziak & Henry, 1994). V případě, že tato sekvence má podobu CAYRTG\*, jsou tyto geny aktivovány silněji než geny s jinou variantou této sekvence (Schüller *et al.*, 1995).

U genu *INO1* se v promotoru nachází aktivační element nazývaný UAS<sub>INO</sub>. Jeho sekvence CATGTGAAAT se nachází na obou řetězcích DNA. Invertovaná repetice UAS<sub>INO</sub> motivu sekvenčně odpovídá ICRE elementu (Bachhawat *et al.*, 1995).

#### 4.1 Aktivace genů s ICRE elementem

Aktivace genů s ICRE elementem v promotorové oblasti je řízena komplexem Ino2p-Ino4p (obr. 8) a je závislá na mnoha dalších proteinech. Jedním z nich je kinasa Snf1p. Ta se váže přímo na TAD domény proteinu Ino2p a fosforyluje Ser<sup>10</sup> histonu H3, což vede k acetylaci Lys<sup>14</sup> histonu H3 pomocí komplexu SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyl-transferase). Ten není schopen interagovat

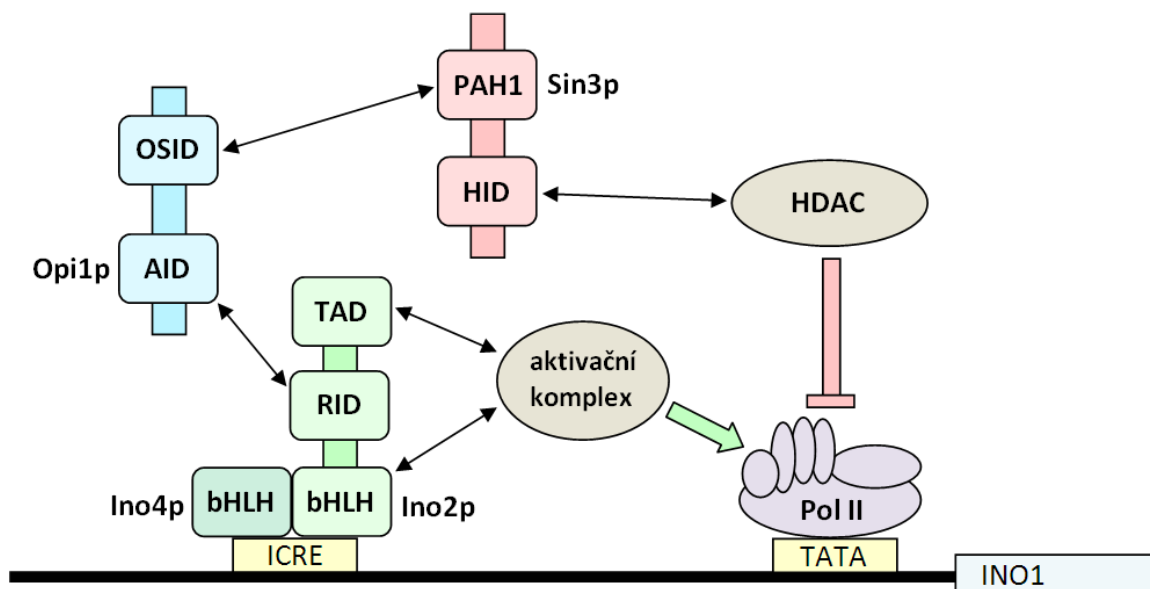
s Ino2p přímo. Fosforylace histonu H3 na Ser<sup>10</sup> vede také k interakci s TATA-vazebnými proteiny (Lo *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2005).

Pro remodelaci chromatinu jsou nezbytné komplexy SWI/SNF a INO80 (Ford *et al.*, 2007), které se vážou konstitutivně v oblasti promotoru (Ford *et al.*, 2008).

Zajímavá je interakce Ino2p s transkripčním faktorem Sua7p (TFIIB). Samotný Sua7p není schopen aktivovat expresi, ale je možné, že se na aktivaci podílí. Tento faktor se váže do stejného místa jako Ino4p (doména bHLH), což naznačuje možnost, že Sua7p může hrát roli i v negativní regulaci (Dietz *et al.*, 2003).

Ford *et al.* (2008) navrhl model průběhu aktivace. V represních podmínkách je v promotorové oblasti přes ICRE element vázán komplex Ino2p-Ino4p a zároveň komplexy SWI/SNF a INO80. Jsou však neaktivní kvůli vazbě Opi1p na Ino2p. V nepřítomnosti inositolu a cholinu (dereprese) se Opi1p uvolní. Aktivní komplex Ino2p-Ino4p stimuluje remodelaci chromatinu pomocí komplexů SWI/SNF a INO80, což umožní následnou acetylaci histonů pomocí dalších proteinů (Ford *et al.*, 2008). Účast komplexů remodelujících chromatin na aktivaci genu *INO1* potvrzuje auxotrofie na inositol u 50 kmenů s delecí genů, jejichž produkty ovlivňují úpravy chromatinu a transkripci (Villa-García *et al.*, 2011).

Pro aktivaci exprese genu *INO1* je důležitá i jeho lokalizace na jaderné membráně. Brickner a Walter (2004) zjistili, že v nepřítomnosti inositolu je promotor *INO1* vázán k membráně u 50 %



**Obrázek 8:** Interakce mezi funkčními doménami regulačních proteinů biosyntézy fosfolipidů. **AID** – activator interaction domain, **aktivační komplex** – SWI/SNF, INO80, SAGA, Sua7p, Snf1p, **HDAC** – histoneacetylase, **HID** – HDAC interaction domain, **bHLH** – basic helix-loop-helix, **OSID** – Opi1p-Sin3p interaction domain, **PAH1** – paired amphipathic helix, **Pol II** – RNA polymerase II, **RID** – repressor interaction domain, **TAD** – transcriptional activation domains. Podle (Wagner *et al.*, 2001).



buněk, zatímco v přítomnosti inositolu jen u 30 %. U kmene *opi1Δ* byl podíl buněk s promotorem *INO1* vázaným k jaderné membráně 70 %. Vazbu promotoru ovlivňuje i protein Hac1p (více v kapitole 5.4). U kmene s delecí genu *HAC1* byl podíl buněk s vázaným promotorem snížený (Brickner & Walter, 2004).

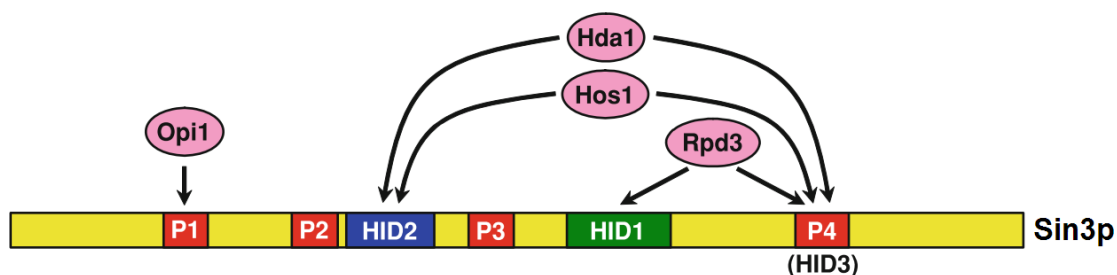
## 4.2 Represe genů s ICRE elementem

Represe genů s ICRE elementem v promotorové oblasti je řízena proteinem Opi1p (obr. 8). Ten nepřímo interaguje s různými histondeacetylasami (HDAC). Tyto interakce jsou zprostředkovány proteiny Sin3p (Grigat *et al.*, 2012) a Cyc8p (Davie *et al.*, 2003).

Sin3p je pleiotropní regulační protein ovlivňující několik regulačních systémů a expresi mnoha genů (Vidal *et al.*, 1991). Jeho struktura zahrnuje 4 domény typu PAH1-4 (paired amphipathic helix, na obr. 9 označené červenými bloky) (Wang *et al.*, 1990) a 3 domény HID1-3 (HDAC interaction domain, HID3 = PAH4) (Grigat *et al.*, 2012). Kromě Opi1p interaguje ještě s řadou dalších proteinů. Nejvýznamnější jsou interakce s histondeacetylasami Hda1p, Hos1p a Rpd3p: s doménami HID3 a HID2 interagují proteiny Hda1p a Hos1p, zatímco protein Rpd3p se váže na domény HID1 a HID3 (obr. 9) (Grigat *et al.*, 2012).

Pro regulaci transkripce genů, které mají v promotoru ICRE motiv, je protein Sin3p důležitý. Byla porovnána exprese reporterového genu s ICRE elementem v promotorové oblasti v buňkách standardního kmene a v buňkách kmene *sin3Δ*. Buňky byly kultivovány v represním prostředí s inositem a cholinem a v nerepresním prostředí bez inositolu a cholinu. U kmene s delecí byla exprese reporterového genu pětikrát vyšší v přítomnosti inositolu a cholinu a třikrát nižší v jejich nepřítomnosti ve srovnání se standardním kmenem (Wagner *et al.*, 2001).

V promotoru *INO1* se kromě ICRE sekvence nachází ještě negativní regulační element URS1 (upstream repression sequence). Ten potlačuje expresi řízenou ICRE elementem (Lopes *et al.*, 1993). Sin3p hraje roli v regulaci *INO1* také pomocí URS1 elementu, na který se váže přes Ume6p. Sin3p pak interaguje s histondeacetylasou Rpd3p, která potlačí transkripci genu (Kadosh & Struhl, 1997). Wagner *et al.* (2001) testoval, zda neprobíhá represe přes ICRE



**Obrázek 9:** Vazebné domény proteinu Sin3p. Šipkami jsou naznačené interakce s Opi1p a s histondeacetylasami. P1-4 – paired amphipathic helix, HID1-3 – HDAC interaction domain. (Grigat *et al.*, 2012)

element stejným způsobem. V kmenech s delecí genů *UME6* a *RPD3* ale represe nebyla nijak ovlivněna (Wagner *et al.*, 2001). Prokázalo se však, že jiné histondeacetylasy mohou nahradit protein Rpd3p v jeho funkci. Kvasinky kódují pět histondeacetylasek: Rpd3p, Hda1p, Hos1p, Hos2p a Hos3p. Byly testovány všechny životaschopné kombinace delecí genů kódujících tyto enzymy a ukázalo se, že u kmene s trojitou delecí *rpd3Δ*, *hda1Δ*, *hos1Δ* dochází ke stejné deregulaci jako u kmene *sin3Δ* (Grigat *et al.*, 2012).

Dalším proteinem, který hraje roli v represi pomocí Opi1p, je Cyc8p. Ten interaguje pomocí svých TPR motivů s histondeacetylasy Hos2p a Rpd3p (Davie *et al.*, 2003). Cyc8p také tvoří komplex s Tup1p (Williams *et al.*, 1991), který interaguje s málo acetylovanými histony H3 a H4 (Edmondson *et al.*, 1996). Komplex Cyc8p-Tup1p pravděpodobně udržuje nukleosom v oblasti TATA-boxu a tím brání transkripci (Chen *et al.*, 2013). Přímá interakce mezi Opi1p a Tup1p nebyla nalezena (Jäschke *et al.*, 2011).

Pleiotropní represory Sin3p a Cyc8p jsou pro buňku důležité. Kmen s dvojitou delecí *sin3Δ*, *cyc8Δ* je letální, což platí i pro kmen s dvojitou delecí *sin3Δ*, *tup1Δ* (Jäschke *et al.*, 2011).

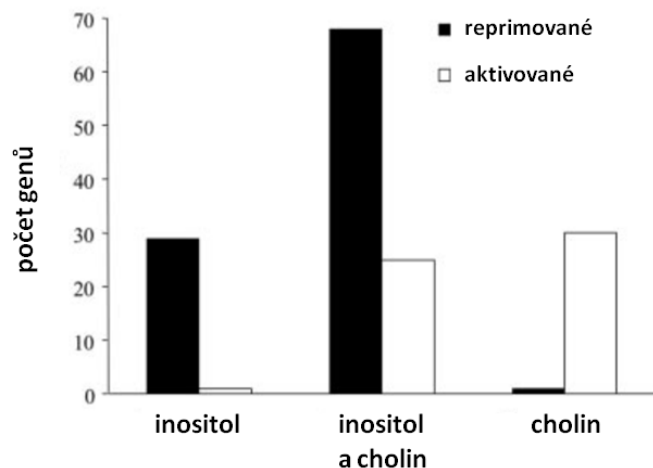
### 4.3 Autoregulace *INO2*, *INO4* a *OPI1*

Promotor genu *OPI1* také obsahuje regulační sekvenci ICRE (Wagner *et al.*, 1999). Některé výsledky dokazují, že tato sekvence je nezbytná pro jeho vlastní expresi (Nikawa & Kamiuto, 2004). Jiné experimenty (Kumme *et al.*, 2008) ukazují, že delece ICRE elementu v promotorové oblasti *OPI1* jeho expresi pouze oslabuje. V této práci byla zkoumána i autoregulace u genů *INO2* a *INO4*, které rovněž mají v promotorové sekvenci ICRE element. Exprese *INO4* však není ovlivněna přítomností inositolu a cholinu, na rozdíl od exprese *INO2* (Ashburner & Lopes, 1995). Jestliže ICRE element chyběl v některém ze tří genů *OPI1*, *INO2* nebo *INO4*, represe i aktivace cílových genů pomocí inositolu a cholinu byla méně účinná. Nicméně určitý stupeň regulace byl zachován, i když byl ICRE element odstraněn ze všech tří genů zároveň (Kumme *et al.*, 2008).

### 4.4 Závislost exprese genů *OPI1* a *INO1* na přítomnosti inositolu a růstové fázi

Vliv inositolu a cholinu v médiu na intenzitu transkripce genu *OPI1* byl sledován pomocí reporterového genu *lacZ* fúzovaného s promotorem *OPI1*. Nikawa a Kamiuto (2004) zjistili, že aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla v přítomnosti inositolu mírně snižena, zatímco přítomnost samotného cholinu v médiu neměla vliv. Avšak v přítomnosti obou prekursorů došlo ke snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy na polovinu. Exprese genu *OPI1* je tedy závislá na inositolu a cholinu a nejvíce je potlačena v přítomnosti obou prekursorů.

Stejný vliv má přítomnost inositolu, cholinu nebo obou prekursorů na expresi *INO1* (Hirsch & Henry, 1986). Tento princip regulace byl pozorován i u dalších genů. Jesch *et al.* (2005) analyzoval transkriptom kmene BY4752 (standardní kmen) v médiu bez inositolu a cholinu a

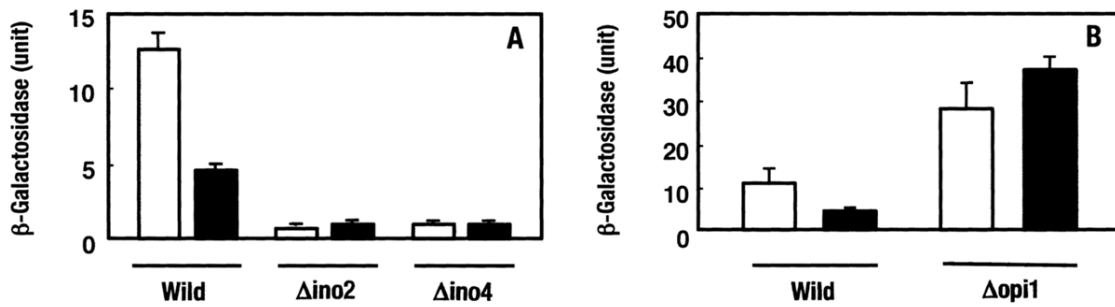


**Obrázek 10:** Počet reprimovaných (černé sloupce) a aktivovaných (bílé sloupce) genů v přítomnosti inositolu nebo cholinu a v přítomnosti obou prekursorů u standardního kmene (Jesch *et al.*, 2005).

v médiích s jedním nebo oběma prekursory. V přítomnosti inositolu byla snížena exprese 30 genů (obr. 10), mezi kterými se nacházely i geny pro enzymy biosyntézy fosfolipidů. V přítomnosti cholinu byla zvýšená exprese 30 genů, které ale nelze zařadit do společné skupiny podle funkce. Žádný z těchto genů se netýkal biosyntézy fosfolipidů. V přítomnosti obou prekursorů v médiu byla snížena exprese u 68 genů a zvýšena u 25 genů. Pouze 2 geny z těch, které aktivuje samotný cholin, byly aktivovány i v přítomnosti obou prekursorů. Z toho vyplývá, že přítomnost inositolu ruší aktivační schopnost cholinu. Geny reprimované v přítomnosti inositolu byly ze dvou třetin reprimované i v přítomnosti obou prekursorů. Geny, které mají v promotorové oblasti UAS<sub>INO</sub> sekvenci byly v přítomnosti obou prekursorů reprimovány více než v přítomnosti samotného inositolu (Jesch *et al.*, 2005).

Transkripce genu *OPI1* byla dále sledována pomocí reporterového genu *lacZ* fúzovaného s promotorem *OPI1* v buňkách kmenů *ino2Δ* a *ino4Δ* (obr. 11A). Aktivita β-galaktosidasy byla velice nízká nezávisle na přítomnosti inositolu a cholinu. Proteiny Ino2p a Ino4p jsou tedy pro expresi genu *OPI1* nezbytné. Naopak v buňkách kmene *opi1Δ* byla aktivita β-galaktosidasy výrazně vyšší než u standardního kmene. V přítomnosti inositolu a cholinu byla dokonce vyšší než v jejich nepřítomnosti (obr. 11B). To dokazuje, že represe genu *OPI1* pomocí inositolu a cholinu je závislá také na Opi1p (Nikawa & Kamiuto, 2004).

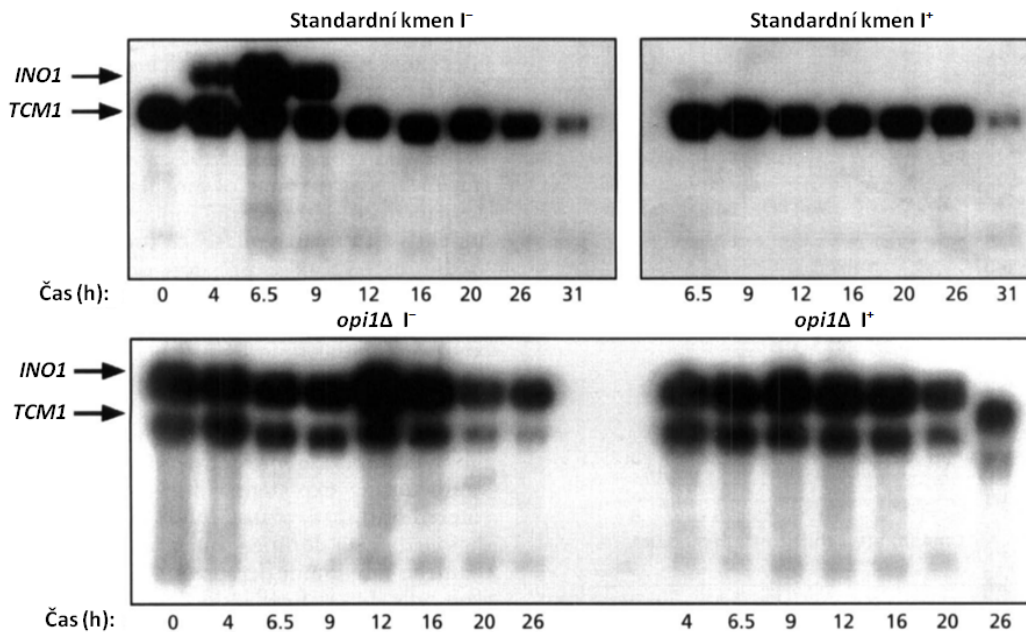
Jiranek *et al.* (1998) sledoval expresi genu *OPI1* v různých růstových fázích. U buněk standardního kmene pěstovaných v nepřítomnosti inositolu (I<sup>-</sup> médium) byla vysoká hladina transkriptu *OPI1* v exponenciální i stacionární fázi. Vrchol exprese byl v pozdní exponenciální fázi. U buněk rostoucích v přítomnosti inositolu (I<sup>+</sup> médium) byla exprese genu *OPI1* vždy snížena (Jiranek *et al.*, 1998).



**Obrázek 11:** Transkripce genu *OPI1* měřená pomocí aktivity β-galaktosidasy v buňkách standardního kmene (Wild) a v buňkách kmenů *ino2Δ*, *ino4Δ* a *opi1Δ* v přítomnosti inositolu a cholinu (černé sloupce) a bez inositolu a cholinu (bílé sloupce) v médiu (Nikawa & Kamiuto, 2004).

Závislost exprese na růstové fázi byla sledována také u genu *INO1* (obr. 12). Nejvíce transkriptu *INO1* u standardního kmene rostoucího v nepřítomnosti inositolu bylo v průběhu exponenciální fáze růstu. V buňkách pěstovaných v přítomnosti inositolu byla úroveň *INO1* transkriptu nízká ve všech růstových fázích. U kmene *opi1Δ* byla vysoká úroveň exprese *INO1* během všech růstových fází, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost inositolu v médiu.

Expres obou genů (*INO1* i *OPI1*) u standardního kmene je tedy reprimována v přítomnosti inositolu v médiu a závisí na růstové fázi (Jiranek *et al.*, 1998). Je zvláštní, že gen *OPI1* je regulován stejným způsobem jako geny, jejichž expresi potlačuje. Důvodem může být způsob, jakým je Opi1p odstraňován z jádra po navození represe cílových genů. V médiu bez inositolu je Opi1p pravděpodobně ubiquitinylován a degradován pomocí proteasomu. Kdyby byl degradován ihned po zahájení represe, bylo by výhodné, kdyby byla zároveň potlačena jeho exprese (Cox *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2007).

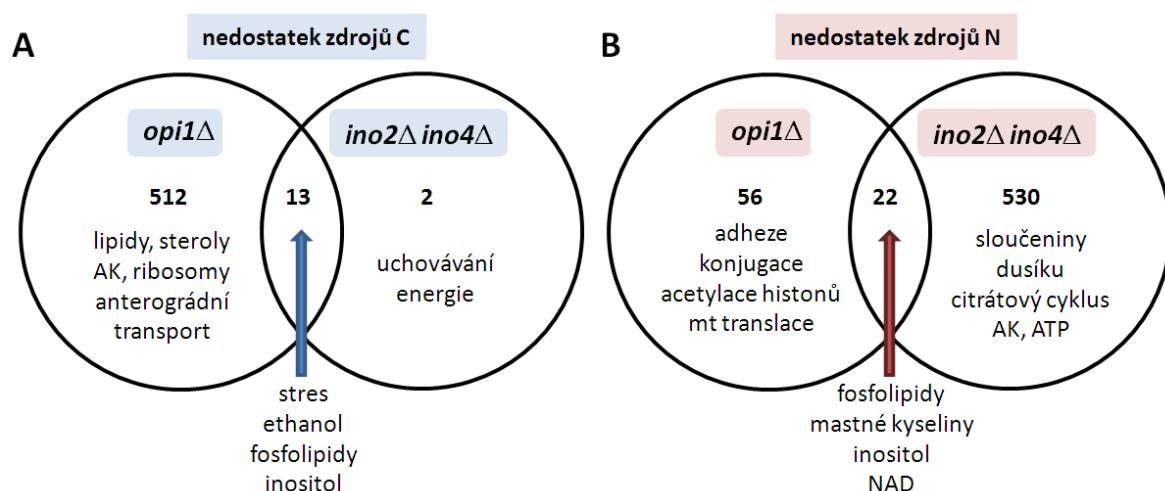


**Obrázek 12:** Sledování hladiny *INO1* mRNA během kultivace v I<sup>-</sup> médiu (vlevo) a v I<sup>+</sup> médiu (vpravo, 100 μM inositol) u standardního kmene a kmene *opi1Δ*. Pruhy jsou označeny časem od inokulace, ve kterém byly odebrány vzorky. Gen *TCM1* kódující ribosomální protein byl zahrnut jako kontrola. (Jiranek *et al.*, 1998)

Graves a Henry (2000) sledovali růst a expresi *INO1* u kmenů se všemi možnými kombinacemi delecí *OPI1*, *INO2*, *INO4* a *SIN3*. Kmeny *ino2Δ* a *ino4Δ* vykazovaly rozdílné výsledky, obzvláště v kombinaci s delecí *OPI1* (kmeny s dvojitou delecí *ino2Δ*, *opi1Δ* a *ino4Δ*, *opi1Δ*), což napovídá, že by proteiny Ino2p a Ino4p mohly mít i nějaké další funkce nezávislé na tvorbě heterodimeru. Tomu odpovídá i odlišná regulace exprese *INO2* a *INO4* nebo rozdílné transkriptomy kmenů *ino2Δ* a *ino4Δ* (zvláště při nedostatku zdrojů uhlíku) (Chumnanpuen *et al.*, 2013). Ani u kmene s delecí všech čtyř genů (*OPI1*, *INO2*, *INO4* a *SIN3*) nedošlo k úplné ztrátě regulace exprese *INO1* v závislosti na množství inositolu a cholinu. Zdá se, že zde existuje ještě jiný, dosud neznámý, mechanismus umožňující tuto regulaci (Graves & Henry, 2000).

#### 4.5 Regulace metabolismu fosfolipidů při nedostatku živin

Zatímco většina autorů sledovala metabolismus fosfolipidů a jeho regulaci za standardních podmínek, umožňujících exponenciální růst kultury (2% glukosa, optimální koncentrace živin) (Jesch *et al.*, 2005), Chumnanpuen *et al.* (2013) sledoval pomocí mikroarrayové analýzy transkriptomy u standardního kmene a také u delečních kmenů *ino2Δ*, *ino4Δ*, *opi1Δ* a u kmene s dvojitou delecí *ino2Δ*, *ino4Δ* v podmínkách s limitovaným zdrojem uhlíku nebo dusíku. Zatímco delece *OPI1* ovlivnila transkriptom více při nedostatku zdrojů uhlíku, kmeny s delecí *INO2* a zároveň *INO4* měly více změněný transkriptom v podmínkách s omezenou dostupností dusíku (obr. 13). Z porovnání souborů genů, které mění expresi v podmínkách s limitovaným uhlíkem nebo dusíkem a v podmínkách optimálních pro růst (Jesch *et al.* 2005) u kmene *opi1Δ*, vyplývá, že rozsah působení Opi1p je širší, pokud kultivace probíhá v limitujících podmínkách. Analýza rovněž přispěla k odhalení nových funkcí Ino2p a Ino4p ve vztahu k dějům stimulovaným při nedostatku aminokyselin v buňce (Chumnanpuen *et al.* 2013).



**Obrázek 13:** Srovnání transkriptomů kmene *opi1Δ* a kmene s dvojitou delecí *ino2Δ*, *ino4Δ* **A)** v podmínkách s omezenou dostupností zdrojů uhlíku, **B)** v podmínkách s omezenou dostupností zdrojů dusíku. Na obrázku je uveden počet genů, které změnilu svou expresi v daných podmínkách a seznam funkcí, které tyto geny plní v metabolismu buňky. **AK** – aminokyseliny, **mt** – mitochondriální. Upraveno podle (Chumnanpuen *et al.*, 2013).

## 5 Pleiotropní účinky *OPI1*

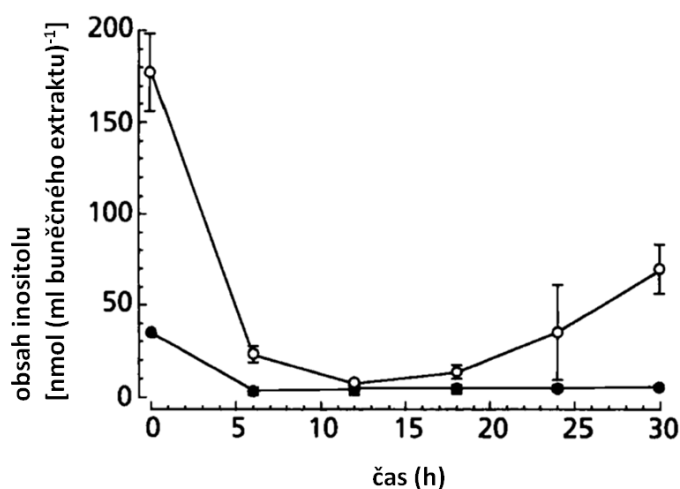
Funkce Opi1p zasahují do mnoha buněčných dějů. Tato kapitola pojednává o vlivu delece genu *OPI1* na buňku.

### 5.1 Vliv delece genu *OPI1* na obsah inositolu v buňce

U kmene s delecí *OPI1* jsou významné odchylky v lipidovém i inositolovém metabolismu ve všech fázích růstu. Z experimentů, které provedl Jiranek *et al.* (1998), vyplývá, že buňky kmene *opi1Δ* hromadí více intracelulárního inositolu než standardní kmen, především ve stacionární fázi.

Kultury kmenů (standardní i *opi1Δ*) byly pěstovány na bohatém médiu (YEPD). Z těchto kultur byly odebrány buňky v časně stacionární fázi růstu a přeneseny na I<sup>-</sup> médium. Hladina intracelulárního inositolu byla sledována v průběhu růstu (obr. 14). U obou kmenů byla hladina inositolu nejvyšší v čase 0. U kmene *opi1Δ* byla hladina inositolu v čase 0 pětkrát vyšší než u standardního kmene. V průběhu exponenciální fáze růstu u obou kmenů hladina inositolu postupně klesala. U kmene *opi1Δ* se obsah inositolu začal opět zvyšovat ve stacionární fázi.

Buňky standardního kmene zřejmě použijí všechny inositol, který vyprodukuje, během exponenciální fáze k syntéze fosfolipidů a postupně zastaví produkci inositolu ve stacionární fázi represí genu *INO1*. V buňkách *opi1Δ* není *INO1* reprimován a produkce inositolu pokračuje, i když buňky už nerostou. Za těchto okolností nemohou využít všechny inositol a nadbytek se hromadí v buňce. Inositol je také vylučován z buňky za vytvoření Opi<sup>-</sup> fenotypu (Jiranek *et al.*, 1998).



**Obrázek 14:** Obsah inositolu v buněčném extraktu u standardního kmene (plná kolečka) a *opi1Δ* kmene (prázdná kolečka) v průběhu růstu na I<sup>-</sup> médiu. (Jiranek *et al.*, 1998)

## 5.2 Vliv delece genu *OPI1* na růst buněk a jejich citlivost k osmotickému stresu

Nadprodukce inositolu nebo jiná související změna v biosyntéze fosfolipidů či její regulaci mohou ovlivnit růst buněk. Při kultivaci v I- médiu tvořil kmen *opi1Δ* přibližně dvojnásobný počet buněk než standardní kmen při srovnatelné optické denzitě a hmotnost buněk *opi1Δ* byla výrazně menší. Mutace ale neovlivnila frekvenci životaschopných buněk ani frekvenci pučících buněk (Jiranek *et al.*, 1998).

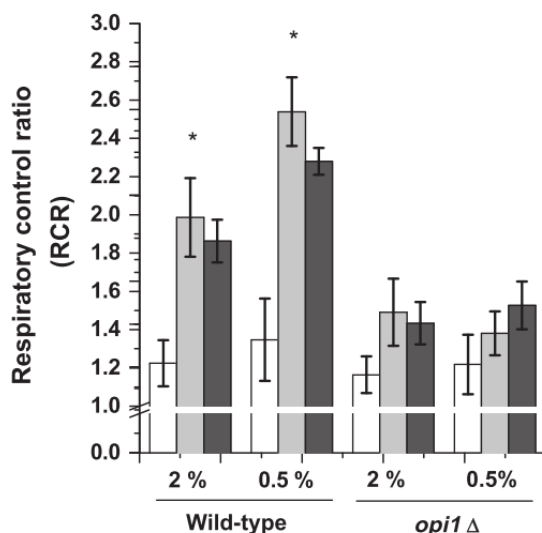
Redukce objemu buněk je spojována s odpovědí na zvýšený osmotický tlak. Jiranek *et al.* (1998) proto testoval, zda má menší velikost buněk kmene *opi1Δ* vliv na rezistenci k osmotickému stresu. Výrazná inhibice růstu byla pozorována u standardního i *opi1Δ* kmene po přenosu buněk rostoucích v I- médiu do média s 1,4 M NaCl (v porovnání s kulturami přenesenými do média bez NaCl). Avšak kmen *opi1Δ* měl při kultivaci v médiu s 1,4 M NaCl kratší prodlevu v růstu, dosáhl vyšší růstové rychlosti a větší konečné hustoty kultury než standardní kmen (Jiranek *et al.*, 1998). Jiné studie zkoumající rezistenci k osmotickému stresu nebyly provedeny. Zdá se, že kmen *opi1Δ* se s osmotickým stresem vyrovnává lépe a rychleji, ale příčina zůstává neznámá.

Menší velikost buněk může souviset také s regulací buněčného cyklu. Heterodimer Ino2p-Ino4p se v přítomnosti inositolu váže do oblasti promotoru genu *SWI5* (Lee *et al.*, 2002). Ten kóduje transkripční faktor, který reguluje expresi genů spojených s G1 fází a s přechodem z M do G1 fáze buněčného cyklu (Dohrmann *et al.*, 1992). Exprese *SWI5* sice nebyla změněna u kmene *opi1Δ* ani v závislosti na přítomnosti inositolu a cholinu, ale v přítomnosti inositolu byla pozorovaná zvýšená exprese 5 genů (*HO*, *PRY3*, *SCW11*, *WSC4*, a *YML131W*), jejichž expresi Swi5p reguluje (Stillman *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2002). Zvýšená hladina inositolu u *opi1Δ* může způsobit rychlejší postup G1 fází a tím zmenšení buněk. Dalším důvodem může být vysoká zátěž pro oxidoredukční metabolismus buňky, jelikož funkce Ino1p je závislá na NAD (Culbertson *et al.*, 1976; Donahue & Henry, 1981). Jesch *et al.* 2005 zjistil, že v buňkách rostoucích v médiu bez inositolu je zvýšená exprese genu *BNA2*, jehož produkt je nezbytný pro syntézu NAD (Panozzo *et al.*, 2002).

## 5.3 Vliv delece genu *OPI1* na mitochondrie

Opi1p zasahuje i do syntézy mitochondriálních fosfolipidů a tím ovlivňuje metabolismus mitochondrií.

Buňky standardního kmene rostoucí na médiu s 2% glukosou ve stacionární fázi mají kratší délku života (chronological lifespan) než buňky rostoucí na médiu s 0,5% glukosou (Smith *et al.*, 2007). U kmene s delecí *OPI1* se vliv snížené hladiny glukosy na prodloužení doby života neprojevil (Luévano-Martínez *et al.*, 2013). Prodloužená životnost buněk přímo souvisí s respirací (Tahara *et al.*, 2011; Tahara *et al.*, 2013).



**Obrázek 15:** Srovnání kapacity mitochondriálního respiračního řetězce u buněk standardního kmene (Wild-type) a kmene *opi1*Δ. Bílé sloupce ukazují RCR u buněk v exponenciální fázi růstu, šedé sloupce ukazují RCR po přidání ethanolu a černé sloupce ukazují RCR u buněk ve stacionární fázi. Oba kmeny byly kultivovány na médiu s 2% a 0,5% glukosou. (Luévano-Martínez *et al.*, 2013)

V buňkách standardního kmene a kmene *opi1*Δ byla měřena mitochondriální respirace. Ve stacionární fázi byl přidán ethanol (1 μl/ml), který je zpracováván v mitochondriích. Po vyčerpání většiny ethanolu byl přidán protonofor (CCCP, 20 μM), který indukuje maximální respirační kapacitu. Poměr mezi respirací indukovanou ethanolem a respirací stimulovanou pomocí CCCP (respiratory control ratio, RCR) ukazuje funkčnost mitochondriálního respiračního řetězce (obr. 15). Po přidání ethanolu měly buňky standardního kmene vyšší bazální respiraci i odpověď na CCCP, což znamená, že mají větší respirační kapacitu než buňky kmene *opi1*Δ, které na CCCP nereagovaly téměř vůbec (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

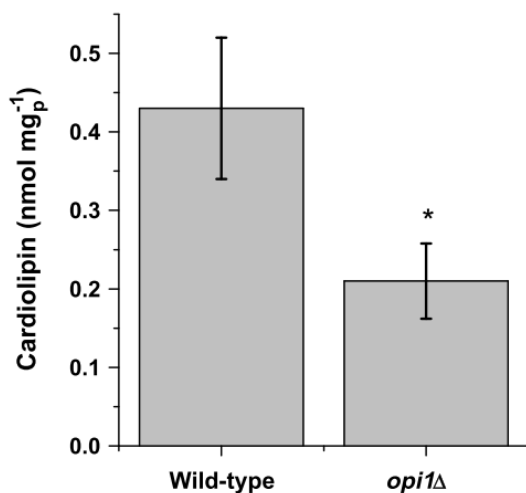
Ke zjištění příčiny snížené respirační kapacity u kmene *opi1*Δ byl zkoumán obsah izolovaných mitochondrií. Aktivita cytochrom-c-oxidasy a spotřeba kyslíku závislá na NADH byly u kmene *opi1*Δ značně nižší než u standardního kmene. Ve srovnání se standardním kmenem obsahovaly buňky kmene *opi1*Δ mnohem méně všech cytochromů (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

V buňkách *opi1*Δ je pozměněná i vnitřní mitochondriální membrána, která ve srovnání se standardním kmenem obsahuje méně záporně nabitých fosfolipidů (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

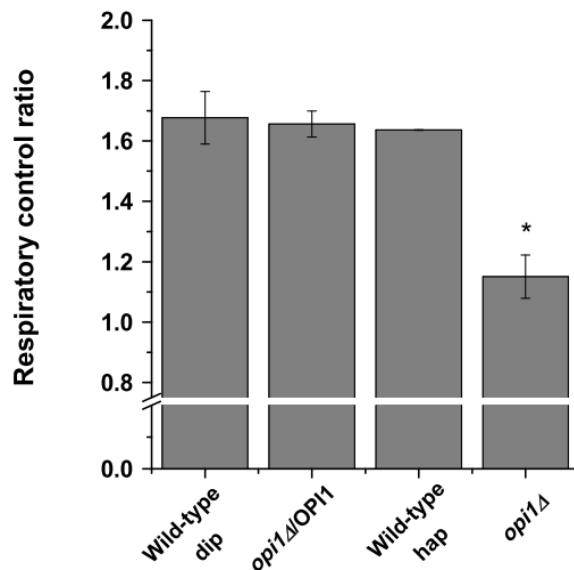
Delece genu *OPI1* má vliv i na stabilitu mtDNA. Pro kmeny bez mtDNA je typická tvorba malých kolonií tzv. *petite*. Kmen *opi1*Δ tvoří *petite* kolonie s větší frekvencí než standardní kmen, což naznačuje méně stabilní mtDNA (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

Tyto změny v metabolismu mitochondrií (menší respirační kapacita, menší obsah cytochromů) a nestabilita mtDNA mohou souviset se změnami v obsahu kardiolipinu v membráně mitochondrií. U kmene *opi1*Δ byl obsah kardiolipinu přibližně poloviční ve srovnání se standardním kmenem (obr. 16). U ostatních fosfolipidů (PI, PS) nebyly pozorovány





**Obrázek 16:** Obsah kardiolipinu v izolovaných mitochondriích standardního kmene (Wild-type) a kmene *opi1Δ*. (Luévano-Martínez *et al.*, 2013)



**Obrázek 17:** Porovnání kapacity mitochondriálního respiračního řetězce v buňkách diploidního (Wild-type dip) a haploidního (Wild-type hap) standardního kmene a u kmenů *opi1Δ/OPI1* a *opi1Δ*. (Luévano-Martínez *et al.*, 2013)

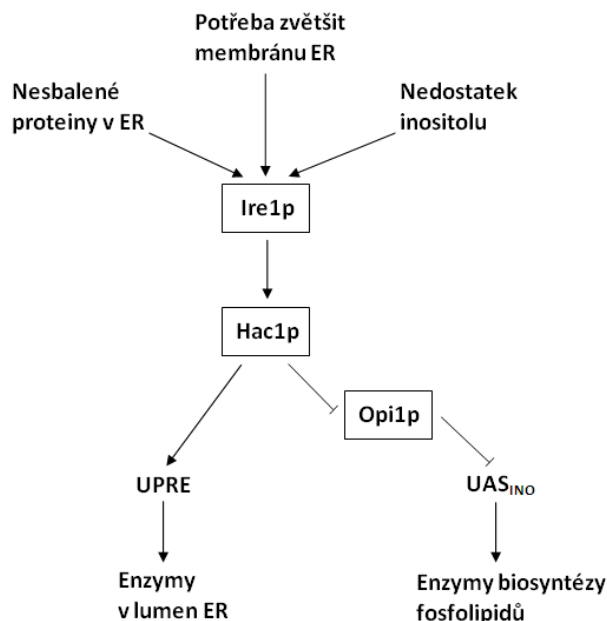
žádné změny. Nezměnil se ani obsah PG, který je prekursorem kardiolipinu (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

Dále byly testovány kmeny s delecí genů *CRD1*, *TAZ1* a *PGS1*, které kódují enzymy katalyzující reakce vedoucí ke kardiolipinu. Kmeny byly kultivovány v nerepresních podmínkách na kompletním médiu s nízkou koncentrací glukosy. V buňkách kmenů *crd1Δ* a *taz1Δ* se hromadily prekursor kardiolipinu: fosfatidylglycerol a monolysokardiolipin (Luévano-Martínez *et al.*, 2013). Přežívání ve stacionární fázi u těchto kmenů bylo nezměněné. Kmen *pgs1Δ* však vykazoval vážné poškození respirace, sníženou životaschopnost i délku života (Zhou *et al.*, 2009). Tyto výsledky ukazují, že fenotyp u kmene *opi1Δ* je způsoben narušením syntézy kardiolipinu v některém kroku před („upstream“) reakcemi katalyzovanými enzymy Crd1p a Taz1p (Luévano-Martínez *et al.*, 2013).

Fenotypové projevy delece *OPI1* jsou různé u haploidních a diploidních kmenů. Byl porovnán růst buněk na glycerolovém médiu u haploidního i diploidního standardního kmene a u kmenů *opi1Δ* a *opi1Δ/OPI1*. U všech kmenů byl také změřen RCR (obr. 17). V obou případech kmen *opi1Δ/OPI1* vykazoval stejný fenotyp jako standardní kmen, zatímco kmen *opi1Δ* rostl pomaleji na glycerolovém médiu a měl menší respirační kapacitu (Luévano-Martínez *et al.*, 2013). Z experimentů provedených v naší laboratoři vyplývá, že diploidní kmeny *opi1Δ/opi1Δ* rostou na glycerolovém médiu pomaleji než standardní kmen.

#### 5.4 Vztah genu *OPI1* ke stresu v ER

Stres v ER může vyvolat např. hromadění nesbalených proteinů. Reakce na přítomnost nesbalených proteinů v ER (UPR – unfolded protein response) zahrnuje aktivaci proteinů Ire1p a



**Obrázek 18:** Propojení regulace UPR a biosyntézy fosfolipidů.  $UAS_{INO}$  – aktivační element v promotoru genu *INO1*,  $UPRE$  – aktivační element genů UPR (Cox *et al.*, 1997).

Hac1p. Ire1p je transmembránový protein lokalizovaný v membráně ER (Cox *et al.*, 1993). Při nahromadění nesbalených proteinů vytvoří oligomer a aktivuje se autofosforylací (Shamu & Walter, 1996). Aktivovaný protein Ire1p katalyzuje sestřih mRNA pro Hac1p (Sidrauski & Walter, 1997), což je pozitivní transkripční faktor, který se váže specificky na  $UPRE$  element (unfolded protein response element) (Cox & Walter, 1996). Tento element mají ve své promotorové oblasti geny, které kódují enzymy usnadňující správné skládání proteinů v ER (např. chaperon BiP kódovaný genem *KAR2*) (Mori *et al.*, 1992).

Součástí UPR je i aktivace biosyntézy fosfolipidů, protože v buňce je potřeba koordinovat syntézu membrán se syntézou membránových proteinů. Cox *et al.* (1997) navrhl model (obr. 18) propojení mezi UPR a biosyntézou fosfolipidů. Ire1p je aktivován třemi možnými způsoby: při hromadění špatně sbalených proteinů v lumen ER, nadměrnou produkcí membránových proteinů, která vyžaduje zvětšení povrchu ER, nebo při nedostatku inositolu v buňce. Aktivní protein Ire1p vede k produkci Hac1p, který aktivuje expresi genů pro enzymy lokalizované v lumen ER a zároveň nepřímo aktivuje expresi genů pro enzymy biosyntézy fosfolipidů (Cox *et al.*, 1997).

Tento model podporují výsledky několika studií. Z experimentů, které provedl Jesch *et al.* (2005), vyplývá, že exprese 23 genů aktivovaných pomocí UPR je regulována v závislosti na přítomnosti inositolu (Jesch *et al.*, 2005). Regulace ale probíhá jiným způsobem než regulace genů pro enzymy biosyntézy fosfolipidů. Exprese této skupiny genů není závislá na heterodimeru Ino2p-Ino4p a není reprimována pomocí Opi1p (Lee *et al.*, 2002; Jesch *et al.*, 2005).

Kmeny s delecí *IRE1* nebo *HAC1* jsou auxotrofní na inositol (Sidrauski *et al.*, 1996), zatímco kmen s dvojitou delecí *ire1Δ*, *opi1Δ* roste i na médiu bez inositolu. Pro kmen *ire1Δ* je letální nadměrná exprese membránových proteinů, což neplatí pro kmen s dvojitou delecí *ire1Δ*, *opi1Δ* (Cox *et al.*, 1997). Při tvorbě membránových proteinů je potřeba zvětšit ER a k tomu je nezbytná UPR. Při aktivaci UPR se zároveň se zvětšováním ER zvedá hladina chaperonů. K podobnému zvětšení ER jako při aktivaci UPR dochází při konstitutivní expresi Ino2p (u kmene *opi1Δ*). Membrána ER se může zvětšovat nezávisle na UPR, v tomto případě zůstává hladina chaperonů nezměněná. Pro překonání stresu v ER je však důležitější zvětšení ER než produkce chaperonů, což vyplývá z výsledků, že kmen s dvojitou delecí *hac1Δ*, *opi1Δ* se se stresem v ER vyrovnává lépe než kmen *hac1Δ* (Schuck *et al.*, 2009). UPR je aktivována při nedostatku inositolu stejně jako geny pro enzymy biosyntézy fosfolipidů (Cox *et al.*, 1997). Aktivace exprese *INO1* však nekoreluje vždy s aktivací UPR. V případě, že je UPR aktivovaná kvůli stresu v sekreční dráze, exprese *INO1* je potlačena a je snížena i při nedostatku inositolu (Chang *et al.*, 2004).

Brickner a Walter (2004) pozorovali vazbu Opi1p do oblasti promotoru *INO1* u standardního kmene pouze v přítomnosti inositolu. U kmenů *hac1Δ* a *scs2Δ* byl výskyt Opi1p vyšší v represních i nerepresních podmínkách v porovnání se standardním kmenem. Hac1p i Scs2p tedy brání Opi1p v represi *INO1* (Brickner & Walter, 2004).

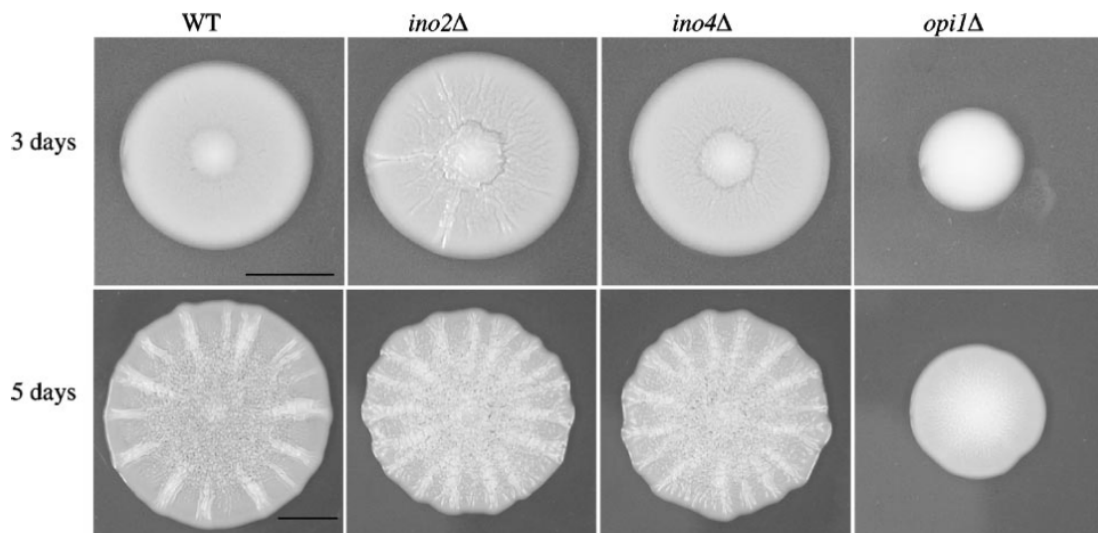
Zatím není jasné, jak UPR aktivuje transkripci závislou na komplexu Ino2p-Ino4p. Množství a lokalizace Opi1p, Ino2p ani Ino4p nejsou ovlivněny indukci UPR (Brickner & Walter, 2004). Je pravděpodobné, že Hac1p potlačuje aktivitu Opi1p. Opi1p i Hac1p obsahují leucinový zip, je možné, že tvoří neaktivní nebo nestabilní heterodimer (Cox *et al.*, 1997).

## 5.5 Vliv delece genu *OPI1* na morfologii kolonií a invazivní růst

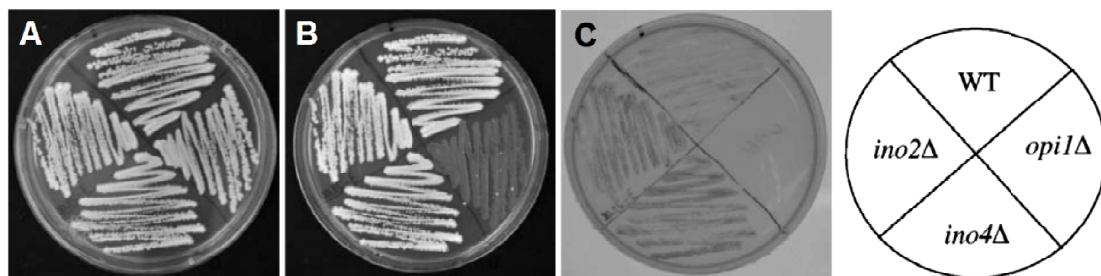
Morfologie kolonie je závislá na genu *FLO11* (Reynolds & Fink, 2001), který kóduje flokulin (Lo & Dranginis, 1996). Ten je nezbytný pro invazivní růst a pseudohyfální růst (Lo & Dranginis, 1998). Reynolds (2006) zjistil, že v buňkách kmene *opi1Δ* je potlačena exprese *FLO11*. Naopak v buňkách *ino2Δ* a *ino4Δ* je exprese *FLO11* mírně zvýšená. U těchto kmenů (odvozených od kmene Σ1278b) byla zkoumána morfologie kolonií a invazivní růst na YEPD médiu. Kmen *opi1Δ* měl v porovnání se standardním kmenem kolonie menší a hladké. Delece *ino2Δ* a *ino4Δ* neměly na tvorbu kolonií vliv (obr. 19) (Reynolds, 2006).

Vliv na invazivní růst se projevil u všech tří kmenů. Zatímco kmen *opi1Δ* nezarůstal do agarů vůbec, buňky kmenů *ino2Δ* a *ino4Δ* byly invazivnější než standardní kmen (obr. 20) (Reynolds, 2006).

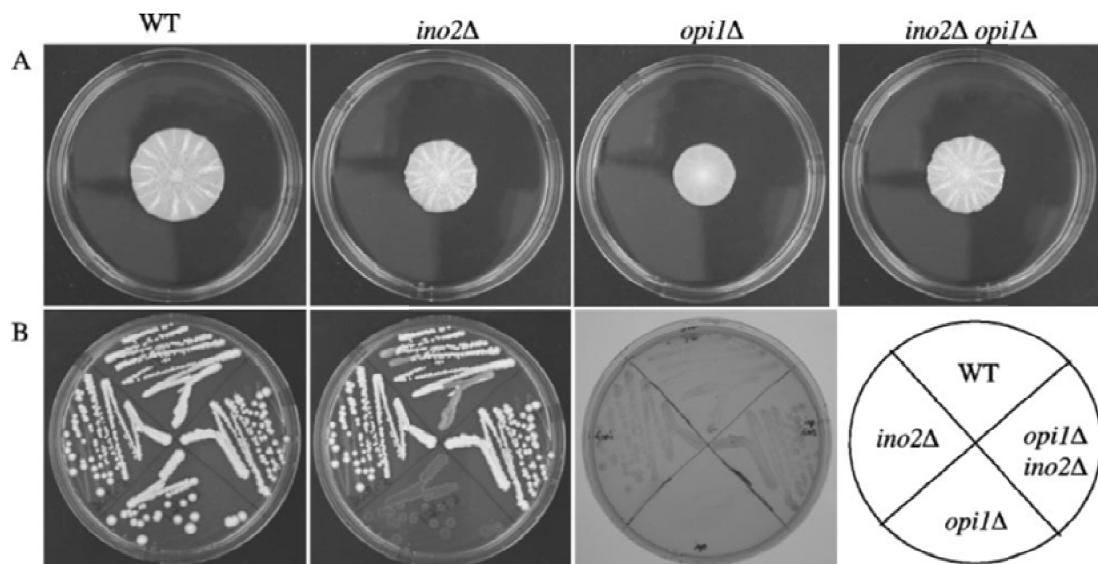
Defekt kmene *opi1Δ* v tvorbě kolonií a v invazivním růstu je závislý na *INO2*. Kmen s dvojitou delecí *opi1Δ*, *ino2Δ* se projevuje stejně jako kmen *ino2Δ* (obr. 21) (Reynolds, 2006).



**Obrázek 19:** Kolonie standardního kmene (WT) a delečních kmenů *ino2Δ*, *ino4Δ* a *opi1Δ* po třech a pěti dnech růstu. Měřítka: 1 cm. (Reynolds, 2006)



**Obrázek 20:** Kmen *opi1Δ* selhává v invazivním růstu, buňky kmenů *ino2Δ* a *ino4Δ* naopak zarůstají do agaru více než buňky standardního kmene. **A)** Kmeny *opi1Δ*, *ino2Δ*, *ino4Δ* a standardní kmen (WT) byly kultivovány 5 dní na pevném YEPD médiu. **B)** Plotny po mírném opláchnutí vodou. **C)** Plotny po důkladném opláchnutí buněk z povrchu média. (Reynolds, 2006)



**Obrázek 21:** **A)** Morfologie kolonií standardního kmene (WT), *ino2Δ*, *opi1Δ* a kmene s dvojitou delecí *ino2Δ*, *opi1Δ*. **B)** Test invazivního růstu. Kmeny byly kultivovány 5 dní na pevném YEPD médiu (vlevo). Plotny po mírném opláchnutí vodou (uprostřed). Plotny po důkladném opláchnutí buněk z povrchu média (vpravo). Kmen *opi1Δ* selhává v invazivním růstu, buňky kmene s dvojitou delecí *ino2Δ*, *opi1Δ* zarůstají do agaru stejně jako buňky kmene *ino2Δ*. (Reynolds, 2006)

Není zřejmé, jakým způsobem Opi1p ovlivňuje expresi *FLO11*. Defekt kmene *opi1Δ* v tvorbě kolonií a v invazivním růstu není způsoben zvýšenou expresí *INO1* a zvyšující se koncentrací inositolu, protože kmen s dvojitou delecí *opi1Δ*, *ino1Δ* se projevuje stejně jako *opi1Δ* (Reynolds, 2006). Opi1p interaguje s proteiny, které jsou zahrnuty v různých drahách ovlivňujících invazivní a pseudohyfální růst. Patří mezi ně interakce s PKA (Pan & Heitman, 1999; Sreenivas & Carman, 2003), interakce s kinasou Snf1p prostřednictvím Ino2p (Kuchin *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2005) nebo dráha UPR (Cox *et al.*, 1997; Schröder *et al.*, 2000). Z mikroarrayové analýzy, kterou provedl Jesch *et al.* (2005), vyplývá, že Opi1p by mohl regulovat i transkripci genu *NRG2*, který kóduje represor genu *FLO11* (Jesch *et al.*, 2005).

## 5.6 Vliv delece genu *OPI1* na délku telomer

Gen *OPI1* má také vliv na délku telomer. Buňky kmene s delecí tohoto genu mají zkrácené telomery přibližně o 50-150 bp ve srovnání se standardním kmenem. Stejně zkrácené telomery mají i buňky kmene s delecí *SIN3* (Askree *et al.*, 2004). U kvasinek je délka telomer během celého života buňky stejná (D'Mello & Jazwinski, 1991). Zkracování telomer, vlivem poškození některého z genů zodpovědných za udržování konstantní délky, vede k postupné ztrátě chromosomu a následné ztrátě proliferační schopnosti, např. u kmene s delecí genu *KEM1*, který kóduje G4-DNA-dependentní nukleasu. Většina buněk zahyne po 100 generacích (Liu *et al.*, 1995). Tento fenotyp se u kmenů *opi1Δ* a *sin3Δ* neprojevuje (Askree *et al.*, 2004). Je možné, že odlišná délka telomer souvisí se změnou velikosti buněk kmene *opi1Δ*. Zatím však nebylo zkoumáno, proč mají kmeny *opi1Δ* a *sin3Δ* kratší telomery a jestli to má na buňky nějaký vliv.

## 6 Gen *OPI1* u jiných organismů

*S. cerevisiae* není jediný organismus kódující protein Opi1p, homologní proteiny byly nalezeny i u některých dalších kvasinek a u askomycety *Neurospora crassa*. Sekvence aminokyselin Opi1p je velmi konzervovaná mezi různými druhy *Saccharomyces* (*S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*) (Kaadige & Lopes, 2006).

Kvasinka *Candida glabrata* kóduje nejen *CgOPI1*, ale i *CgIN01*, *CgIN02* a *CgIN04*. Tyto geny kódují proteiny s podobnou funkcí jako mají homologní proteiny u *S. cerevisiae*. Velkým rozdílem je, že *CgOPI1* je pro buňky esenciální. Čím je to způsobeno se zatím neví, byla pouze vyvrácena teorie, že životaschopnost narušuje zvýšená exprese *CgIN01* (Bethea *et al.*, 2010).

Kvasinka *Candida albicans*, známá pro svou patogenitu, také kóduje homologní protein k Opi1p. Podobnost aminokyselinových sekvencí proteinů Opi1p a CaOpi1p je pouze částečná, ale funkce proteinu je zachována. Exprese genu *CaOPI1* v buňkách *opi1Δ S. cerevisiae* dokonce komplementuje delecí *OPI1* (Heyken *et al.*, 2003).

Homolog Opi1p existuje i u askomycety *Neurospora crassa* a je označen *ccg-8* (clock-controlled gene). Má zde pravděpodobně stejnou funkci v regulaci biosyntézy fosfolipidů jako u *S. cerevisiae*. U *N. crassa* byla rovněž prokázána přítomnost homologů proteinů Ino4p, Scs2p a Sin3p, homolog Ino2p dosud nebyl odhalen. Metabolismus fosfolipidů je u *N. crassa* spojen s cirkadiánním rytmem (Lombardi & Brody, 2005).

Další kvasinkou, u které byl nalezen protein s velmi podobnou sekvencí aminokyselin, je *Yarrowia lipolytica*. Tento protein je označen Yas3p, zatímco heterodimer Yas2p-Yas1p odpovídá heterodimeru Ino2p-Ino4p u *S. cerevisiae*. Mechanismus regulace genové exprese je podobný, ale v tomto případě se jedná o regulaci genu *ALK1*, který kóduje cytochrom P450 katalyzující první krok v oxidaci alkanů. Regulace je závislá na přítomnosti alkanů, v jejich nepřítomnosti je gen *ALK1* inhibován. Yas3p, na rozdíl od Opi1p, nemá vliv na regulaci transkripce v závislosti na inositolu (Endoh-Yamagami *et al.*, 2007; Hirakawa *et al.*, 2009).

## 7 Závěr

Tato práce je přehledem znalostí o proteinu Opi1p a jeho působení v buňkách *S. cerevisiae*. Opi1p slouží především jako negativní regulátor transkripce genů kódujících enzymy biosyntézy fosfolipidů. K tomu jsou zapotřebí interakce s dalšími proteiny, např. s Ino2p (součást aktivačního komplexu Ino2p-Ino4p), Scs2p (protein určující lokalizaci Opi1p na membráně ER), Sin3p a Cyc8p (proteiny interagující s histondeacetylasy). Delece *OPI1* se projevuje zejména konstitutivní produkcí inositolu (Opi<sup>-</sup> fenotyp), který se hromadí v buňce a je vylučován do média v takovém množství, že lze kmen *opi1Δ* využít k průmyslové výrobě inositolu. Opi1p reguluje i biosyntézu fosfolipidů mitochondriální membrány. Zde se delece projevuje změnami v metabolismu mitochondrií, mezi které patří snížená respirační kapacita a menší množství cytochromů.

Metabolismus fosfolipidů úzce souvisí se vznikem buněčných membrán a tedy i s děním v ER. Opi1p hraje roli v reakci na špatně sbalené proteiny v ER a v koregulaci syntézy membránových proteinů a fosfolipidů.

Zásadní je také vliv Opi1p na růst a morfologii kolonií. Kmen s delecí genu *OPI1* má menší buňky a ztrácí schopnost invazivního růstu. Tato oblast je zatím poměrně málo probádaná, další výzkum však může vést k experimentům týkajícím se patogenity kvasinek.

Protein Opi1p je pro buňku velmi významný, jak dokazuje řada experimentů. Jedná se především o mikroarrayové analýzy transkriptomu buněk kmene *opi1Δ*, které odhalují vliv Opi1p na různé buněčné děje a jeho význam v podmínkách s omezenou dostupností živin. Zůstává však stále mnoho nezodpovězených otázek: Jak je ukončena represe genů s ICRE elementem a co se potom děje s Opi1p? Jak probíhá interakce mezi Opi1p a Hac1p? Jakým způsobem Opi1p ovlivňuje expresi *FLO11*? Na tyto a další otázky bude třeba odpovědět, abychom plně pochopili význam proteinu Opi1p.

## 8 Literatura

- Ambroziak, J., & Henry, S. A. (1994). *INO2* and *INO4* gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the *INO1* promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **269** (21), 15344–15349.
- Ashburner, B. P., & Lopes, J. M. (1995). Autoregulated expression of the yeast *INO2* and *INO4* helix-loop-helix activator genes effects cooperative regulation on their target genes. *Molecular and Cellular Biology*, **15** (3), 1709–1715.
- Askree, S. H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., *et al.* (2004). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (23), 8658–8663.
- Bachhawat, N., Ouyang, Q., & Henry, S. A. (1995). Functional characterization of an inositol-sensitive upstream activation sequence in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (42), 25087–25095.
- Beranek, A., Rechberger, G., Knauer, H., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., & Leber, R. (2009). Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene *CLD1* (*YGR110W*) in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **284** (17), 11572–11578.
- Bethea, E. K., Carver, B. J., Montedonico, A. E., & Reynolds, T. B. (2010). The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*. *Microbiology*, **156**, 452–462.
- Brickner, J. H., & Walter, P. (2004). Gene recruitment of the activated *INO1* locus to the nuclear membrane. *PLoS Biology*, **2** (11), e342.
- Chang, H. J., Jesch, S. A., Gaspar, M. L., & Henry, S. A. (2004). Role of the unfolded protein response pathway in secretory stress and regulation of *INO1* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **168** (4), 1899–1913.
- Chang, S.-C., Heacock, P. N., Clancey, C. J., & Dowhan, W. (1998a). The *PEL1* gene (renamed *PGS1*) encodes the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (16), 9829–9836.
- Chang, S.-C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., Voelker, D. R., & Dowhan, W. (1998b). Isolation and characterization of the gene (*CLS1*) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (24), 14933–14941.
- Chang, Y.-F., & Carman, G. M. (2006). Casein kinase II phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis transcription factor Opi1p. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** (8), 4754–4761.
- Chen, K., Wilson, M. A., Hirsch, C., Watson, A., Liang, S., *et al.* (2013). Stabilization of the promoter nucleosomes in nucleosome-free regions by the yeast Cyc8-Tup1 corepressor. *Genome Research*, **23**, 312–322.
- Chen, M., Hancock, L. C., & Lopes, J. M. (2007). Transcriptional regulation of yeast phospholipid biosynthetic genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771** (3), 310–321.
- Chumnanpuen, P., Nookaew, I., & Nielsen, J. (2013). Integrated analysis, transcriptome-lipidome, reveals the effects of *INO*-level (*INO2* and *INO4*) on lipid metabolism in yeast. *BMC Systems Biology*, **7** (Suppl 3).
- Clancey, C. J., Chang, S. C., & Dowhan, W. (1993). Cloning of a gene (*PSD1*) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (33), 24580–24590.



- Cox, J. S., Chapman, R. E., & Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell*, **8** (9), 1805–1814.
- Cox, J. S., Shamu, C. E., & Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, **73** (6), 1197–1206.
- Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, **87** (3), 391–404.
- Culbertson, M. R., Donahue, T. F., & Henry, S. A. (1976). Control of inositol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: properties of a repressible enzyme system in extracts of wild-type (Ino<sup>+</sup>) cells. *Journal of Bacteriology*, **126** (1), 232–242.
- Culbertson, M. R., & Henry, S. A. (1975). Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **80**, 23–40.
- D’Mello, N. P., & Jazwinski, S. M. (1991). Telomere length constancy during aging of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **173** (21), 6709–6713.
- Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B., & Dent, S. Y. R. (2003). Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** (50), 50158–50162.
- Dietz, M., Heyken, W.-T., Hoppen, J., Geburtig, S., & Schüller, H.-J. (2003). TFIIB and subunits of the SAGA complex are involved in transcriptional activation of phospholipid biosynthetic genes by the regulatory protein Ino2 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, **48** (4), 1119–1130.
- Dohrmann, P. R., Butler, G., Tamai, K., Dorland, S., Greene, J. R., Thiele, D. J., & Stillman, D. J. (1992). Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators *SWI5* and *ACE2* differentially control transcription of *HO* and chitinase. *Genes & Development*, **6** (1), 93–104.
- Donahue, T. F., & Henry, S. A. (1981). myo-Inositol-1-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **256** (13), 7077–7085.
- Edmondson, D. G., Smith, M. M., & Roth, S. Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes & Development*, **10** (10), 1247–1259.
- Endoh-Yamagami, S., Hirakawa, K., Morioka, D., Fukuda, R., & Ohta, A. (2007). Basic helix-loop-helix transcription factor heterocomplex of Yas1p and Yas2p regulates cytochrome P450 expression in response to alkanes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryotic Cell*, **6** (4), 734–743.
- Ford, J., Odeyale, O., Eskandar, A., Kouba, N., & Shen, C.-H. (2007). A SWI/SNF- and INO80-dependent nucleosome movement at the *INO1* promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361** (4), 974–979.
- Ford, J., Odeyale, O., & Shen, C.-H. (2008). Activator-dependent recruitment of SWI/SNF and INO80 during *INO1* activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **373** (4), 602–606.
- Glover III, C. V. C. (1997). On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **59**, 95-133. Citováno podle Chang & Carman (2006).
- Graves, J. A., & Henry, S. A. (2000). Regulation of the yeast *INO1* gene: The products of the *INO2*, *INO4* and *OPI1* regulatory genes are not required for repression in response to inositol. *Genetics*, **154** (4), 1485–1495.

- Greenberg, M. L., Goldwasser, P., & Henry, S. A. (1982a). Characterization of a yeast regulatory mutant constitutive for synthesis of inositol-1-phosphate synthase. *Molecular and General Genetics*, **186**, 157–163.
- Greenberg, M. L., Reiner, B., & Henry, S. A. (1982b). Regulatory mutations of inositol biosynthesis in yeast: Isolation of inositol-excreting mutants. *Genetics*, **100** (1), 19–33.
- Grigat, M., Jäschke, Y., Kliewe, F., Pfeifer, M., Walz, S., & Schüller, H.-J. (2012). Multiple histone deacetylases are recruited by corepressor Sin3 and contribute to gene repression mediated by Opi1 regulator of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, **287** (6), 461–472.
- Gu, Z., Valianpour, F., Chen, S., Vaz, F. M., Hakkaart, G. A., Wanders, R. J. A., & Greenberg, M. L. (2004). Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast taz1 mutant: a model for Barth syndrome. *Molecular Microbiology*, **51** (1), 149–158.
- Han, G.-S., O'Hara, L., Carman, G. M., & Siniosoglou, S. (2008). An unconventional diacylglycerol kinase that regulates phospholipid synthesis and nuclear membrane growth. *The Journal of Biological Chemistry*, **283** (29), 20433–20442.
- Han, G.-S., Wu, W.-I., & Carman, G. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** (14), 9210–9218.
- Hancock, L. C., Behta, R. P., & Lopes, J. M. (2006). Genomic analysis of the Opi<sup>-</sup> phenotype. *Genetics*, **173** (2), 621–34.
- Henry, S. A., Kohlwein, S. D., & Carman, G. M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **190** (2), 317–49.
- Heyken, W.-T., Repenning, A., Kümme, J., & Schüller, H.-J. (2005). Constitutive expression of yeast phospholipid biosynthetic genes by variants of Ino2 activator defective for interaction with Opi1 repressor. *Molecular Microbiology*, **56** (3), 696–707.
- Heyken, W.-T., Wagner, C., Wittmann, J., Albrecht, A., & Schüller, H.-J. (2003). Negative regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by a *Candida albicans* orthologue of *OPI1*. *Yeast*, **20** (14), 1177–1188.
- Hirakawa, K., Kobayashi, S., Inoue, T., Endoh-Yamagami, S., Fukuda, R., & Ohta, A. (2009). Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, **284** (11), 7126–7137.
- Hirsch, J. P., & Henry, S. A. (1986). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (*INO1*) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **6** (10), 3320–3328.
- Hjelmstad, R. H., & Bell, R. M. (1987). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in sn-1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, **262** (8), 3909–3917.
- Hjelmstad, R. H., & Bell, R. M. (1988). The sn-1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **263** (36), 19748–19757.
- Hosaka, K., Kodaki, T., & Yamashita, S. (1989). Cloning and characterization of the yeast *CKI* gene encoding choline kinase and its expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **264** (4), 2053–2059.
- Hoshizaki, D. K., Hill, J. E., & Henry, S. A. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* *INO4* gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, **265** (8), 4736–4745.

- Iwanyshyn, W. M., Han, G.-S., & Carman, G. M. (2004). Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (21), 21976–21983.
- Jäschke, Y., Schwarz, J., Clausnitzer, D., Müller, C., & Schüller, H.-J. (2011). Pleiotropic corepressors Sin3 and Ssn6 interact with repressor Opi1 and negatively regulate transcription of genes required for phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, **285** (2), 91–100.
- Jesch, S. A., Zhao, X., Wells, M. T., & Henry, S. A. (2005). Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (10), 9106–9118.
- Jiranek, V., Graves, J. A., & Henry, S. A. (1998). Pleiotropic effects of the *opi1* regulatory mutation of yeast: its effects on growth and on phospholipid and inositol metabolism. *Microbiology*, **144**, 2739–2748.
- Kaadige, M. R., & Lopes, J. M. (2006). Analysis of Opi1p repressor mutants. *Current Genetics*, **49** (1), 30–38.
- Kadosh, D., & Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell*, **89** (3), 365–371.
- Kagiwada, S., Hosaka, K., Murata, M., Nikawa, J., & Takatsuki, A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae SCS2* gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *Journal of Bacteriology*, **180** (7), 1700–1708.
- Kim, K., Kim, K.-H., Storey, M. K., Voelker, D. R., & Carman, G. M. (1999). Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae EKI1* gene encoding ethanolamine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (21), 14857–14866.
- Kodaki, T., & Yamashita, S. (1987). Yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **262** (32), 15428–15435.
- Kuchin, S., Vyas, V. K., & Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **22** (12), 3994–4000.
- Kumme, J., Dietz, M., Wagner, C., & Schüller, H.-J. (2008). Dimerization of yeast transcription factors Ino2 and Ino4 is regulated by precursors of phospholipid biosynthesis mediated by Opi1 repressor. *Current Genetics*, **54** (1), 35–45.
- Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., *et al.* (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, **298** (5594), 799–804.
- Letts, V. A., Klig, L. S., Bae-Lee, M., Carman, G. M., & Henry, S. A. (1983). Isolation of the yeast structural gene for the membrane-associated enzyme phosphatidylserine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80** (23), 7279–7283.
- Li, L., & Kaplan, J. (2001). The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (7), 5036–5043.
- Liu, Z., Lee, A., & Gilbert, W. (1995). Gene disruption of a G4-DNA-dependent nuclease in yeast leads to cellular senescence and telomere shortening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92** (13), 6002–6006.

- Lo, W. S., & Dranginis, A. M. (1996). *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *Journal of Bacteriology*, **178** (24), 7144–7151.
- Lo, W. S., & Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **9** (1), 161–171.
- Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C. T., Belotserkovskaya, R., Lane, W. S., Shiekhattar, R., & Berger, S. L. (2001). Snf1 – a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, **293** (5532), 1142–1146.
- Lo, W.-S., Gamache, E. R., Henry, K. W., Yang, D., Pillus, L., & Berger, S. L. (2005). Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *The EMBO Journal*, **24** (5), 997–1008.
- Loewen, C. J. R., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A., & Levine, T. P. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*, **304** (5677), 1644–1647.
- Loewen, C. J. R., & Levine, T. P. (2005). A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (14), 14097–14104.
- Loewen, C. J. R., Roy, A., & Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal*, **22** (9), 2025–2035.
- Lombardi, L. M., & Brody, S. (2005). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock gene homologues in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **42**, 887–892.
- Lopes, J. M., Schulze, K. L., Yates, J. W., Hirsch, J. P., & Henry, S. A. (1993). The *INO1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* includes an upstream repressor sequence (URS1) common to a diverse set of yeast genes. *Journal of Bacteriology*, **175** (13), 4235–4238.
- Luévano-Martínez, L. A., Appolinario, P., Miyamoto, S., Uribe-Carvajal, S., & Kowaltowski, A. J. (2013). Deletion of the transcriptional regulator opi1p decreases cardiolipin content and disrupts mitochondrial metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology*, **60**, 150–158.
- Mcmaster, C. R., & Bell, R. M. (1994). Phosphatidylcholine biosynthesis via the CDP-choline pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **269** (20), 14776–14783.
- Min-Seok, R., Kawamata, Y., Nakamura, H., Ohta, A., & Tagaki, M. (1996). Isolation and characterization of *ECT1* gene encoding CTP: Phosphoethanolamine cytidylyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biochemistry*, **120** (5), 1040–1047.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.-J., & Sambrook, J. F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO Journal*, **11** (7), 2583–2593.
- Murray, M., & Greenberg, M. L. (2000). Expression of yeast *INM1* encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Molecular Microbiology*, **36** (3), 651–661.
- Nikawa, J.-I., & Kamiuto, J. (2004). The promoter of the yeast *OPI1* regulatory gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **97** (6), 369–373.
- Nikawa, J.-I., Tsukagoshi, Y., & Yamashita, S. (1986). Cloning of a gene encoding choline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **166** (1), 328–330.

- Nikawa, J.-I., Tsukagoshi, Y., & Yamashita, S. (1991). Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *266* (17), 11184–11191.
- Nikawa, J.-I., & Yamashita, S. (1984). Molecular cloning of the gene encoding CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, *143* (2), 251–256.
- Nikoloff, D. M., McGraw, P., & Henry, S. A. (1992). The *INO2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Research*, *20* (12), 3253.
- Osman, C., Haag, M., Wieland, F. T., Brügger, B., & Langer, T. (2010). A mitochondrial phosphatase required for cardiolipin biosynthesis: the PGP phosphatase Gep4. *The EMBO Journal*, *29* (12), 1976–1987.
- Pan, X., & Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *19* (7), 4874–4887.
- Panozzo, C., Nawara, M., Suski, C., Kucharczyka, R., Skoneczny, M., *et al.* (2002). Aerobic and anaerobic NAD<sup>+</sup> metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *517*, 97–102.
- Pena, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., & Tunea, M. (1972). Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *153*, 413–425.
- Perez, P., & Calonge, T. M. (2002). Yeast protein kinase C. *The Journal of Biochemistry*, *132*, 513–517.
- Reynolds, T. B. (2006). The Opi1p transcription factor affects expression of *FLO11*, mat formation, and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *5* (8), 1266–1275.
- Reynolds, T. B., & Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*, *291* (5505), 878–881.
- Santiago, T. C., & Mamoun, C. Ben. (2003). Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *The Journal of Biological Chemistry*, *278* (40), 38723–38730.
- Shamu, C. E., & Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal*, *15* (12), 3028–3039.
- Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J., & Dowhan, W. (1996). The *CDS1* gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, *271* (2), 789–795.
- Schröder, M., Chang, J. S., & Kaufman, R. J. (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes & Development*, *14*, 2962–2975.
- Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C., & Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology*, *187* (4), 525–536.
- Schüller, H. J., Hahn, A., Tröster, F., Schütz, A., & Schweizer, E. (1992a). Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *The EMBO Journal*, *11* (1), 107–114.

- Schüller, H. J., Richter, K., Hoffmann, B., Ebbert, R., & Schweizer, E. (1995). DNA binding site of the yeast heteromeric Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix transcription factor: structural requirements as defined by saturation mutagenesis. *FEBS Letters*, **370** (1-2), 149–152.
- Schüller, H. J., Schorr, R., Hoffmann, B., & Schweizer, E. (1992b). Regulatory gene *INO4* of yeast phospholipid biosynthesis is positively autoregulated and functions as a trans-activator of fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **20** (22), 5955–5961.
- Schwank, S., Ebbert, R., Rautenstrauss, K., Schweizer, E., & Schüller, H. J. (1995). Yeast transcriptional activator *INO2* interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **23** (2), 230–237.
- Sidrauski, C., Cox, J. S., & Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, **87** (3), 405–413.
- Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, **90** (6), 1031–1039.
- Smith, D. L., McClure, J. M., Matecic, M., & Smith, J. S. (2007). Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell*, **6** (5), 649–662.
- Sreenivas, A., & Carman, G. M. (2003). Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase A. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** (23), 20673–20680.
- Sreenivas, A., Villa-Garcia, M. J., Henry, S. A., & Carman, G. M. (2001). Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (32), 29915–29923.
- Stillman, D. J., Bankier, A. T., Seddon, A., Groenhout, E. G., & Nasmyth, K. A. (1988). Characterization of a transcription factor involved in mother cell specific transcription of the yeast *HO* gene. *The EMBO Journal*, **7** (2), 485–494.
- Tahara, E. B., Cezário, K., Souza-Pinto, N. C., Barros, M. H., & Kowaltowski, A. J. (2011). Respiratory and TCA cycle activities affect *S. cerevisiae* lifespan, response to caloric restriction and mtDNA stability. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **43** (5), 483–491.
- Tahara, E. B., Cunha, F. M., Basso, T. O., Della Bianca, B. E., Gombert, A. K., & Kowaltowski, A. J. (2013). Calorie restriction hysteretically primes aging *Saccharomyces cerevisiae* toward more effective oxidative metabolism. *PloS One*, **8** (2).
- Trotter, P. J., & Voelker, D. R. (1995). Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (*PSD2*) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (11), 6062–6070.
- Tsukagoshi, Y., Nikawa, J.-I., & Yamashita, S. (1987). Molecular cloning and characterization of the gene encoding cholinephosphate cytidylyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, **169** (3), 477–486.
- Vidal, M., Strich, R., Esposito, R. E., & Gaber, R. F. (1991). *RPD1* (*SIN3/UME4*) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Molecular and Cellular Biology*, **11** (12), 6306–6316.
- Villa-García, M. J., Choi, M. S., Hinz, F. I., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., & Henry, S. A. (2011). Genome-wide screen for inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* implicates lipid

- metabolism in stress response signaling. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, **285** (2), 125–149.
- Voronova, A., & Baltimore, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4722–4726.
- Wagner, C., Blank, M., Strohmann, B., & Schüller, H. J. (1999). Overproduction of the Opi1 repressor inhibits transcriptional activation of structural genes required for phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 843–854.
- Wagner, C., Dietz, M., Wittmann, J., Albrecht, A., & Schüller, H.-J. (2001). The negative regulator Opi1 of phospholipid biosynthesis in yeast contacts the pleiotropic repressor Sin3 and the transcriptional activator Ino2. *Molecular Microbiology*, **41** (1), 155–166.
- Wang, H., Clark, I., Nicholson, P. R., Herskowitz, I., & Stillman, D. J. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* *SIN3* gene, a negative regulator of *HO*, contains four paired amphipathic helix motifs. *Molecular and Cellular Biology*, **10** (11), 5927–5936.
- Weeks, G., & Spiegelman, G. B. (2003). Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cellular Signalling*, **15**(10), 901–909.
- White, M. J., Hirsch, J. P., & Henry, S. A. (1991). The *OPI1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a negative regulator of phospholipid biosynthesis, encodes a protein containing polyglutamine tracts and a leucine zipper. *The Journal of Biological Chemistry*, **266** (2), 863–872.
- Williams, F. E., Varanasi, U., & Trumbly, R. J. (1991). The CYC8 and TUPI proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Molecular and Cellular Biology*, **11** (6), 3307–3316.
- Wilson, J. D., & Barlowe, C. (2010). Yet1p and Yet3p, the yeast homologs of BAP29 and BAP31, interact with the endoplasmic reticulum translocation apparatus and are required for inositol prototrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, **285** (24), 18252–18261.
- Wilson, J. D., Thompson, S. L., & Barlowe, C. (2011). Yet1p-Yet3p interacts with Scs2p-Opi1p to regulate ER localization of the Opi1p repressor. *Molecular Biology of the Cell*, **22** (9), 1430–1439.
- Young, B. P., Shin, J. J. H., Orij, R., Chao, J. T., Li, S. C., *et al.* (2010a). Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, **329** (5995), 1085–1088.
- Young, B. P., Shin, J. J. H., Orij, R., Chao, J. T., Li, S. C., *et al.* (2010b). Supporting online material (Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism). *Science (New York, N.Y.)*.
- Zhou, J., Zhong, Q., Li, G., & Greenberg, M. L. (2009). Loss of cardiolipin leads to longevity defects that are alleviated by alterations in stress response signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, **284** (27), 18106–18114.