

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Martina Čapková

Role mitochondrií při stresu a stárnutí

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha 2007

Obsah

1. Abstrakt	3
2. Úvod – co jsou mitochondrie a jakou roli v buňce mají	4
3. Proč jsou mitochondrie v aerobní eukaryotické buňce důležité.....	4
3.1. Tvorba ATP	4
3.2. Metabolismus sacharidů a lipidů	5
4. Skrytá hrozba vycházející z mitochondrií	5
5. Možnosti obrany proti poškozením vyvolaným oxidativním stresem.....	6
5.1. 5.1 Enzymy ochrany	6
5.2. 5.2 Kalorická restrikce.....	7
5.3. Retrográdní odpověď	9
6. Kde, proč a jak působí retrográdní odpověď a její složky	10
6.1. Kde retrográdní dráha působí	10
6.2. Proč je retrográdní odpověď významná	11
6.3. Jak je signál z mitochondrií přenášen do jádra.....	12
6.4. Složky retrográdní signalizace	13
6.4.1. SLIK a SAGA komplexy.....	13
6.4.2. Rtg2p.....	14
6.4.3. Rtg1p-Rtg3p komplex	14
6.4.4. Ras proteiny, Phb1 a Phb2.....	15
6.4.5. TOR dráha	16
7. Závěr	17
8. Seznam použitých zkratk.....	19
9. Literatura	23

1. Abstrakt

Mitochondrie jsou producenty ROS, které představují pro buňky nebezpečí a vedou ke zkrácení délky jejich života. Je zde však několik mechanismů, které buňka má na svoji ochranu, jako např. enzymy, kalorická restrikce nebo tzv. retrográdní systém. Existují spojení těchto mechanismů mezi sebou (např. Ras-cAMP dráha spojuje kalorickou restrikci a retrográdní odpověď) nebo s jinými drahami v buňce (např. TOR dráha reguluje retrográdní odpověď).

Důležitou drahou pro prodloužení života buňky je právě retrográdní odpověď, která přenáší signál z dysfunkčních mitochondrií do jádra. Na této signalizaci se podílí především tři proteiny a jeden proteinový komplex – proteiny Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a SLIK komplex. Jedním z cílových genů retrográdní odpovědi je *CIT2* (citrát syntáza), který se používá jako marker pro sledování retrográdní odpovědi. Protein Rtg2p přenáší signál z mitochondrií na komplex proteinů Rtg1p-Rtg3p (v cytosolu) a způsobí jeho translokaci do jádra. Komplex Rtg1p-Rtg3p je transkripční faktor a spolu s transkripčním koaktivátorem SLIK komplexem zajistí expresi cílových genů. Produkovaná citrát syntáza je součástí glyoxalátového cyklu, který kompenzuje nižší aktivitu Krebsova cyklu způsobenou stárnutím buňky a akumulací poškození mitochondriálních funkcí.

Mitochondria produce ROSes, which represent danger for cells and lead to curtailment of their life-span. There is various protecting mechanisms e.g. enzyme, caloric restriction or retrograde response. These mechanism could be associated with each other (e.g. Ras-cAMP pathway associates with caloric restriction and with retrograde response) or with other pathways in the cell (e.g. TOR pathway regulates retrograde response).

The retrograde response is important pathway for cell longevity it transfers signal from dysfunction mitochondria to nucleus. This signaling pathway consists mainly of three proteins and of the protein complex, i.e. proteins Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p and SLIK complex. One of the target genes of retrograde response is *CIT2* (citrate synthase), that is used to like a marker for monitoring retrograde response. Rtg2p mediates signal from mitochondria to Rtg1p-Rtg3p complex (in the cytosol) and induces translocation of the complex to the nucleus. Rtg1p-Rtg3p is transcription factor, which together with SLIK complex (transcription co-activator) provides target gene expression. Citrate synthase, which is produced, is involved in glyoxalate cycle. This cycle compensates low activity of Crebs cycle, which is caused by aging and accumulation of mitochondrial function damages.

Klíčová slova: ROS, kalorická restrikce, retrográdní odpověď, Ras-cAMP dráha, TOR dráha

2. Úvod – co jsou mitochondrie a jakou roli v buňce mají

Mitochondrie jsou buněčné organely ohraničené dvěma membránami. Toto je důležité, protože právě s membránou je spjata hlavní role mitochondrií v buňce. Na vnitřní mitochondriální membráně probíhá oxidativní fosforylace, při níž jsou membránou transportovány elektrony a vzniká protonový gradient. Tento gradient pohání syntézu ATP, jež je hlavním zdrojem energie buňky. U aerobních organismů je konečným akceptorem elektronu kyslík a po navázání dvou vodíkových kationů vzniká voda. Ne ve všech případech ovšem dochází k tomuto ideálnímu stavu. Elektrony mohou z přenašečů uniknout, navázat se na kyslík a vzniká superoxidový anion. Ten spolu s peroxidem vodíku, hydroxylovým radikálem a kyslíkem v singletovém stavu patří mezi hlavní představitele ROS (reactive oxygen species), způsobujících oxidativní stres. U buněk s aerobním metabolismem nelze vzniku těchto ROS zabránit, a proto má buňka několik mechanismů, jak se oxidativnímu stresu bránit. Vedle enzymatické ochrany a nízkomolekulárních antioxidantů existují mimo jiné také mechanismy oprav oxidativního poškození jako jsou kalorická restrikce a retrográdní odpověď.

3. Proč jsou mitochondrie v aerobní eukaryotické buňce důležité

3.1. Tvorba ATP

Mitochondrie patří mezi buněčné organely s dvěma membránami. Na vnitřní mitochondriální membráně probíhá děj zvaný oxidativní fosforylace. Při tomto ději dochází k přenosu elektronů proteiny ve vnitřní membráně a zároveň k čerpání protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Tím vzniká protonový gradient, který poté pohání syntézu ATP na proteinu vnitřní membrány zvaném ATP-syntáza. Konečným akceptorem pro přenášené elektrony je molekula kyslíku, která následně reaguje také s protony přečerpanými do matrix ATP-syntázou. Pokud by buňky neměly mitochondrie, musely by získávat ATP pouze pomocí glykolýzy, která v tomto ohledu není tak výkonná. (Alberts et al., 1998)

Na transportu elektronů membránou se podílí 4 proteinové přenašeče – komplex NADH dehydrogenázy (I), sukcinát dehydrogenasa (II), cytochrom b-c1 (III) a komplex

cytochromoxidázy (IV). Právě na komplexech I a III čas od času dochází k tomu, že se některý z elektronů uvolní, dojde k přeskoku na molekulu kyslíku a tím ke vzniku ROS (reactive oxygen species vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku se silnými oxidačními schopnostmi). Mezi ROS patří především peroxid vodíku, radikál superoxidový aniont, hydroxylový radikál a kyslík v singletovém stavu. ROS vyvolávají oxidativní stres, který se podílí na poškození buňky a tím jejímu stárnutí. Jde o poškození genů, proteinů i lipidů, čímž je narušena jejich správná funkce. (M. Čáp 2004; R.S. Balaban et al., 2005)

3.2. Metabolismus sacharidů a lipidů

V mitochondriích eukaryotních organismů (u kvasinek však pouze v peroxisomech) probíhá oxidace mastných kyselin, kdy se mastná kyselina při každém cyklu zkracuje o dva uhlíky a dává vznik acetyl-CoA. Zároveň s ním vzniká i NADH a FADH₂, které jsou následně využity v oxidativní fosforylaci (jejich oxidací se uvolňují elektrony a protony, které jsou přenášeny komplexy na vnitřní mitochondriální membráně).

Také je zde dekarboxylován pyruvát vzniklý v glykolýze. Na tomto ději se podílí komplex třech enzymů, který se nazývá pyruvátdehydrogenázový komplex. Produkty jsou pak CO₂ a acetyl-CoA.

Acetyl-CoA mitochondrie využívají v Krebsově cyklu, kdy s jejich pomocí dávají vznik NADH, FADH₂, CO₂ a také GTP. Mitochondrie mohou využívat také acetyl-CoA vzniklý při zpracování určitých aminokyselin. Hrají tedy klíčovou roli při získávání energie v buňce. (Alberts et. al. 1998)

4. Skrytá hrozba vycházející z mitochondrií

Jak již bylo naznačeno výše, mitochondrie nejsou pouze dobrým pomocníkem buňky, ale skrývají v sobě také hrozbu v podobě ROS. Ty vznikají jak na komplexu I v Fe-S centru, tak i v komplexu III. Pokusy s cytochromem c (komplexem I) ukázaly, že jeho poškození vede dramatickému vzrůstu produkce ROS a tím inhibice respirace. Produkce ROS v komplexu I je závislá na množství redukovatelného NAD(P)⁺ v mitochondriích. Je-li nedostatek NAD(P)⁺, je pravděpodobnost vzniku ROS vyšší.

Inhibitorem elektron-transportního řetězce je také například rotenon, který působí v místě komplexu I. Existují také další chemické inhibitory elektron-transportního řetězce, které působí na dalších přenašečích zapojených v řetězci. Tyto inhibitory mohou přispívat ke vzniku ROS. (Kushnareva et al., 2002). Záleží však také na přítomnosti dalších látek. Pokud

jsou například přítomny substráty pro oxidaci na komplexu I, pak rotenon snižuje produkci ROS. Avšak jsou-li přítomny i substráty pro oxidaci na komplexu II a antimycin A (inhibitor komplexu III), pak rotenon produkci ROS zvyšuje. (Chen et al. 2003).

Není zcela jasné, co ovládá vztah mezi hladinou metabolismu a vznikem ROS. Trochu jasnější je to, co je cílem ROS a jak to může ovlivňovat délku života. ROS vyvolávají oxidativní stres, který se podílí na poškozování genů, proteinů i lipidů, čímž je narušena jejich správná funkce. Poškození se v buňce akumulují a buňka stárne. Ačkoli ROS vznikají i jinde v buňce, např. na plasmatické membráně nebo v peroxisomech při metabolismu lipidů, za největšího producenta lze považovat právě mitochondrie. Podle dřívějších studií bylo usuzováno, že elektron z transportního řetězce unikne a vzniká nevídaný vedlejší produkt. Podle novějších teorií by však mohlo jít o důležitou složku v redox-dependentních signálních procesech stejně jako v určování délky života.

Přesný mechanismu generace ROS není zcela znám. Ale obecně lze říci, že záleží na rozdílu mezi redox-potenciálem pro darování jednoho elektronu kyslíku a redox potenciálem konkrétního donoru elektronu v určitém reakčním místě. Mimoto záleží také na tlaku kyslíku a reakční konstantě. Jistý vliv mají i kultivační podmínky – např. dáme-li mitochondrie do redukovaného prostředí bez ADP nebo Pi pro oxidativní fosforylaci, příp. přidání inhibitorů transportu elektronů, sekundárně zvyšuje rozdíl potenciálů v komplexech I a III a pak je i sklon k větší produkci ROS. (R.S. Balaban et al., 2005)

5. Možnosti obrany proti poškozením vyvolaným oxidativním stresem

Mechanismů obrany proti stárnutí buňky je několik a patří mezi ně např. retrogradní odpověď, kalorická restrikce nebo činnost ochranných enzymů.

5.1. Enzymy ochrany

Enzymy buňku chrání tak, že ROS v reakcích přeměňují na látky pro buňku neškodné. Mezi tyto enzymy patří: superoxidodismutasa, katalasa a různé druhy peroxidasy. Superoxidodismutasy se rozdělují podle toho, jaký kov je navázán v jejich aktivním centru. U různých organismů jsou lokalizovány různě – např. v cytosolu, plastidech, extracelulárně nebo v periplazmatickém prostoru. Tyto enzymy katalyzují přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Na ně navazuje katalasa přeměnou peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tento enzym je

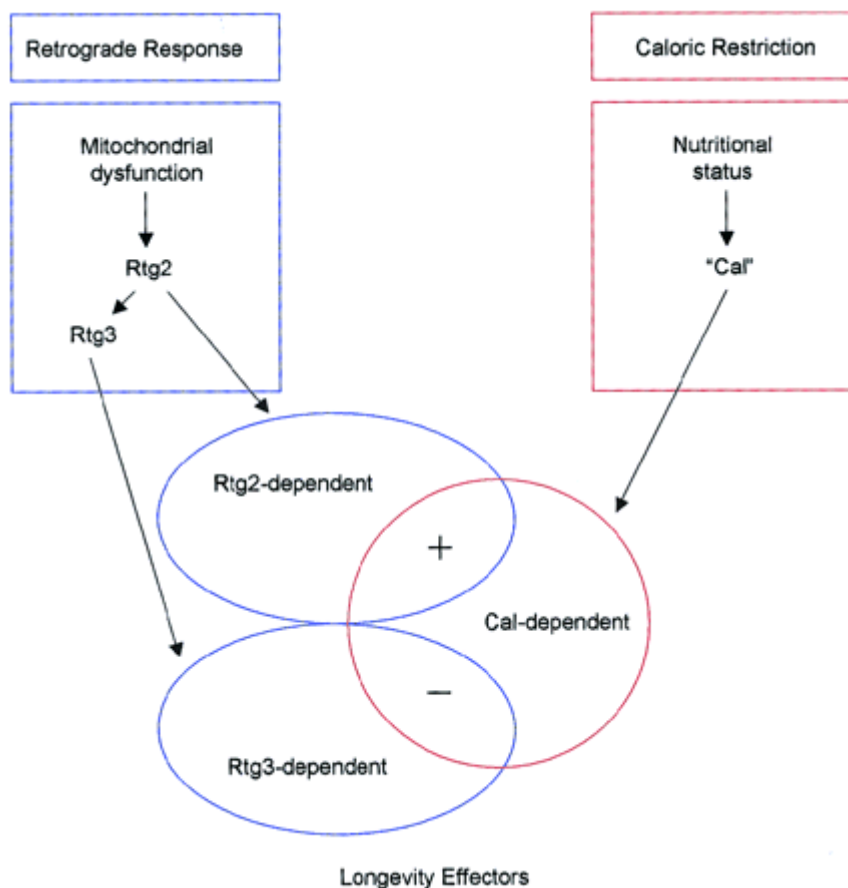
buď v cytosolu nebo peroxisomech (příp. extracelulárně). Peroxidasy odstraňují peroxid vodíku jako katalasy, ale jako donory elektronů používají organické molekuly (Čáp, 2004).

5.2. Kalorická restrikce

Manipulace s obsahem živin v mediu ukazují na roli metabolismu v určování délky života. Snížíme-li v růstovém mediu obsah neesenciálních aminokyselin a do jisté míry i glukosu, dojde u kvasinek k prodloužení života. Nižší obsah glukozy má za následek i prodloužení generační doby (tj. doby zdvojení). Pro prodloužení života kvasinek je důležité, aby ke snižování koncentrace docházelo postupně až na optimální hodnotu. Pokusy ukázaly, že optimální koncentrace je odlišná v minimálním mediu a komplexním mediu.

Další studie naznačují, že redukce obsahu glukosu by mohla prodloužit také život savčích buněk. Je známo prodloužení života o několik let a zpomalení manifestace stárnutí. Důležité je ovšem podotknout, že tento způsob „obrany“ je dobrý na úrovni buňky, ne však mnohobuněčného organismu.

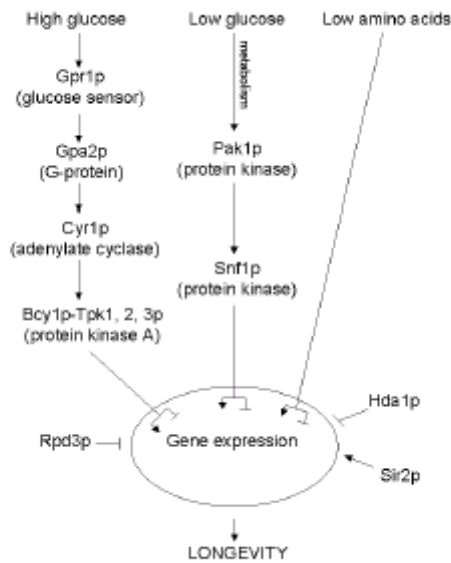
Kalorická restrikce probíhá jinými drahami než retrogradní odpověď (viz kap. 5.3). Některé efekty jsou však sdíleny oběmi drahami, mohou působit současně a ještě výrazněji tak prodlužovat délku života (Jiang et al., 2000).



Obr. 1.: Kalorická restrikce a retrográdní odpověď jsou dráhy, které se nepřekrývají. Představují náhradní adaptaci a ochrannou úpravu před dysfunkcemi a deficitem spojenými se stárnutím. Tyto dráhy působí na úrovni efektorů dlouhověkosti. Vzájemné působení může být pozitivní (+), ale i negativní(-). Míra překrytí efektorů obou drah je zatím neznámá. Rtg2 a Rtg3 jsou mediátory retrográdní odpovědi a „Cal“ je hypotetický mediátor kalorické restrikce. ↓ Značí aktivaci. Převzato z Jiang et al. (2000).

Je zajímavé, že kalorická restrikce dokáže překlenout defekty v retrográdní signalizaci. V kalorické restrikci se uplatňují tři základní signální dráhy – Ras-cAMP, Gpr1p/Gpa2p a Snf1p. Ras-cAMP je známa především v souvislosti se zkrácováním délky života, ale Ras2p se může podílet i na jeho prodloužení (viz kap. 6.4.4). Gpr1p slouží jako receptor pro glukosu a díky GTP vazebnému proteinu Gpa2p se předává signál dál na adenylát cyklázu a protein kinázu A. Gpr1p/Gpa2p se s velkou pravděpodobností pozitivně podílí na prodloužení života.

Snf1p je protein kináza potřebná pro derepresi genů blokových glukosou, které kvasinkám pomáhají využít alternativní zdroje uhlíku. Přestože je Snf1p aktivován nízkou hladinou glukosy v mediu, zkracuje život..(Jazwinski, 2003)



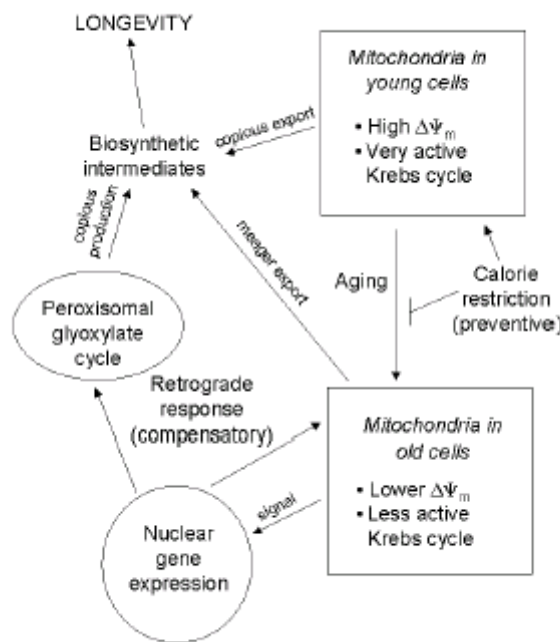
Obr. 2.: Kalorická restrikce vyvolává změny v genové expresi, které prodlužují život kvasinek. Omezení živin, glukózy nebo aminokyselin aktivují dráhy, jež mění expresi genů v buňce.

↓ Značí stimulaci/aktivaci a ⊥ represi/inhibici. Převzato z Jazwinski (2003).

5.3. Retrográdní odpověď

Retrográdní odpověď je druhem meziorganelové komunikace, do které jsou zapojeny proteiny cytoplasmy, mitochondrií i peroxisomů. Obsahuje minimálně tři zesilovací proteiny – Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p (viz kap. 6.4.2 a 6.4.3). Retrográdní odpověď prodlužuje replikativní délku života. Jejím vlivem dochází ke změnám v expresi jaderných genů pro enzymy metabolismu a stresové odpovědi. Retrográdní odpověď u kvasinek je vyvolána částečnou nebo úplnou delecí mitochondriální DNA. Odráží tedy změny funkčního stavu mitochondrií (Jazwinski, 2005). U kvasinkových buněk je retrográdní odpověď spojena s TOR signální drahou (viz kap. 6.4.5), avšak detaily tohoto propojení nejsou zatím známy (Butow et al., 2004). Retrográdní signalizace představuje pojitko mezi metabolismem, odolností proti stresu, chromatin-dependentní genovou regulací a genovou stabilitou, které jsou základem procesu stárnutí mateřských buněk (Jazwinski, 2000).

Byly provedeny také pokusy s živočišnými buňkami a i zde byla pozorována retrográdní signalizace. Opět bylo zjištěno spojení s TOR drahou, ale zatím nejsou odhaleny všechny interakce. Je známo, že v savčích buňkách je kaskáda retrográdní odpovědi spouštěna Ca^{2+} (Butow et al., 2004).



Obr. 3.: Mitochondrie během stárnutí hrají roli jak v kompenzačních, tak i ochranných mechanismech. Funkci ochrannou zastává kalorická restrikce a funkci kompenzační retrogradní odpověď. Tento model zdůrazňuje vliv mitochondrií na délku života v závislosti na biosyntetických mediátorech získaných z Krebsova a glyoxalátového cyklu. Svůj vliv zde má i mitochondriální membránový potenciál, který je nezbytný pro export látek z mitochondrií. ↓ Značí aktivaci a ⊥ značí inhibici. Převzato z Jazwinski (2003).

6. Kde, proč a jak působí retrogradní odpověď a její složky

6.1. Kde retrogradní dráha působí

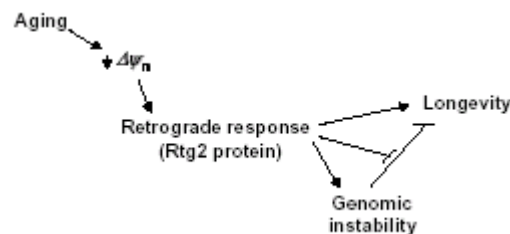
Retrogradní odpověď vychází z mitochondrií, kde je vyvolána dysfunkcemi této organely. Různými proteiny z rodiny Rtg je signál přenášen do jádra, kde vyvolá expresi genů retrogradní odpovědi, které byly do té doby inhibovány korepresorovými komplexy obsahujícími histon deacetylázy Rpd3p a Hda1p (viz kap. 6.4.1). Následně produkované proteiny výrazně prodlužují život kvasinky (Jazwinski, 2005).

Pro expresi genů stresové odpovědi je důležitý i transkripční koaktivátor SLIK komplex, neboli „SAGA-like komplex“ (viz kap. 6.4.1) (Huisinga and Pugh, 2004).

6.2. Proč je retrográdní odpověď významná

Jak již bylo řečeno, retrográdní odpověď přispívá k prodloužení života kvasinkových buněk změnami v expresi jaderných genů. K prodloužení délky života přispívá také funkční produkt genu RAS2. Ten kóduje G-protein Ras2p jež se podílí na signalizaci Ras-cAMP drahou (viz kap. 6.4.4). Při delecii tohoto genu bylo pozorováno zkrácení délky života (Kirchman et al., 1999).

Důležitým proteinem, zapojeným do retrográdní signalizace, je Rtg2p (viz kap. 6.4.2). Tento protein však také chrání buňku před vznikem ERCs (extrachromosomal ribosomal DNA circles). ERCs vznikají díky jednosměrné replikaci rDNA repetice a podílí se na zkrácování délky života. Jsou považovány za senescenční faktor. Overexprese genu *RTG2* brání produkci ERCs, zatímco jeho delece znamená hromadění ERCs v buňce. Aby však mohl být Rtg2p účinnou ochranou před vznikem ERCs, nesmí být zapojen v retrográdní signalizaci. Paradoxně tak retrográdní odpověď může nepřímo přispívat ke vzniku ERCs, jeho hromadění a zkrácení délky života (Borghouts et al., 2004).



Obr. 4.: Retrográdní odpověď spojuje stárnutí s genomovou stabilitou. Stárnutí u kvasinek vede k mitochondriálním dysfunkcím projevujících se snížením mitochondriálního membránového potenciálu. To je spojeno s aktivací retrográdní odpovědi, která zároveň prodlužuje život a zároveň nepřímo přispívá k tvorbě ERCs. Místem větvení v této signální dráze je Rtg2p. ↓ Značí aktivaci a ⊥ značí inhibici. Převzato z Jazwinski (2005).

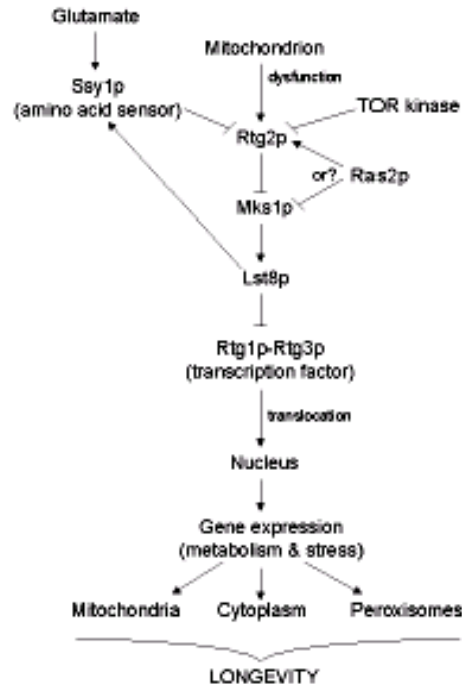
Stárnutí kvasinek je studováno jak z pohledu chronologické, tak i replikativní délky života (Jazwinski, 2003). Chronologická délka života je určena časem, po který buňky přežívají ve stacionární fázi. Replikativní délka života vypovídá o tom, kolik potomků buňka za svůj život vyprodukuje. Mezi mateřskou a dceřinnou buňkou existuje věková asymetrie (Jazwinski, 2005), která však s vyšším replikativním věkem mateřské buňky klesá (Kennedy et al., 1994). Do dceřinné buňky se tak dostává více nefunkčních mitochondrií, čímž se zkracuje její replikativní délka života (Jazwinski, 2000).

6.3. Jak je signál z mitochondrií přenášen do jádra

Dysfunkce mitochondrií a inhibice TOR kinázy způsobí aktivaci retrográdní dráhy. Signál je zesílen proteinem Rtg2, na který se může reverzibilně vázat negativní regulátor retrográdní odpovědi Mks1p. Aby došlo k interakci Rtg2p a Mks1p a následné inhibici retrográdní odpovědi, musí být Mks1p v komplexu s proteiny Bmh1p a Bmh2p. Zde pravděpodobně dochází k propojení aktivace retrográdní odpovědi s inhibicí TOR dráhy (viz kap. 6.4.5) (Liu et al., 2003).

Je nutné uvědomit si, že v případě retrográdní odpovědi nejde pouze o přepínání mezi stavy „zapnuto/vypnuto“, ale jedná se o kontinuální děj. Čím větší je mitochondriální dysfunkce, způsobená např. poklesem membránového potenciálu mitochondrií v závislosti na replikativní délce života, tím intenzivnější je i retrográdní odpověď (Jazwinski, 2005).

Nezastupitelnou roli v retrográdní signalizaci hrají proteiny Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a SLIK komplex (viz kap. 6.4.1, 6.4.2, 6.4.3). Rtg2p zabraňuje produkci ERCs a také přenáší signál z dysfunkčních mitochondrií na transkripční faktor představovaný komplexem Rtg1p-Rtg3p. Transkripční faktor následně umožní expresi cílových genů, mj. také genu *CIT2*, jehož produktem je cytochrom syntáza uplatňující se dále v glyoxalátovém cyklu, životně důležitém pro buňky s dysfunkčními mitochondriemi. Na regulaci retrográdní odpovědi se vedle pozitivně působících proteinů, jakými jsou Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p (Jia et al., 1997), uplatňují i negativní regulátory – Mks1p (Dilova et al., 2002), Lst8p (Liu et al., 2001), Bmh1p a Bmh2p (Liu et al., 2003).



Obr. 5.: Retrográdní odpověď signalizuje mitochondriální dysfunkce a prodlužuje délku života kvasinky. Je vyvolána vznikem dysfunkcí v mitochondriích, které vznikají během normálního stárnutí kvasinek. Tato signální dráha z mitochondrií do jádra vyúsťuje ve změny v expresi genů metabolismu a odpovědi na stres, jejichž produkty jsou směřovány do cytoplasmy, mitochondrií a peroxisomů. ↓ Značí aktivaci a ⊥ značí inhibici. Převzato z Jazwinski (2003).

6.4. Složky retrográdní signalizace

6.4.1. SLIK a SAGA komplexy

SLIK i SAGA komplex jsou transkripčními koaktivátory. Oba komplexy obsahují Gcn5p, díky němuž mají histonacetyltransferázovou aktivitu. Jejich funkce se mohou často překrývat. Pro retrográdní odpověď je však důležitý SLIK komplex, neboli SAGA-like komplex. Oproti SAGA komplexu totiž obsahuje navíc mj. také Rtg2p, který představuje pojitko s retrográdní drahou. SLIK komplex se tedy podílí na prodloužení života kvasinek tím, že umocňuje aktivaci retrográdních genů (Pray-Grant et al., 2002).

SAGA komplex může být někdy zastupitelný transkripčním faktorem TFIID, který je normálně aktivní především v promotorech „housekeeping genů“, zatímco SAGA komplex je specializován na geny stresové odpovědi (Jazwinski, 2005). SAGA tak zajišťuje přepis asi 10% genomu a TFIID asi 90%. Funkce SAGA komplexu je nezávislá na TAF (TATA-binding protein-associated factor) a je výrazně regulována dalšími proteiny jako TBP (TATA-binding protein) nebo regulátory RNA polymerasy II. Na druhou stranu TFIID není

regulován tolika dalšími proteiny, ale výraznou měrou závisí na TAF (Huisinga and Pugh, 2004).

Histondeacetylázy Rpd3p a Hda1p jsou korepresorovými komplexy, které působí na stejný soubor genů jako SLIK komplex. Studie ukázaly, že delece *RPD3* vede k prodloužení života. Naopak delece *HDA1* nemá na délku života téměř žádný vliv, pokud není spojena ještě s delecí *SIR2*, genu pro NAD^+ -dependentní histondeacetylázu. Je-li zároveň deletován *RPD3* i *HDA1*, dochází ke zkrácení délky života (Kim et al., 1999).

6.4.2. Rtg2p

Protein Rtg2p je hlavním senzorem mitochondriálních dysfunkcí a jejich metabolického stavu (Pray-Grant et al., 2002). Jde o cytoplasmatický protein s N-koncovou ATP-vazebnou doménou, který má vlastnosti chaperonu. Mutace v této doméně znamená blokaci retrográdní odpovědi, ale také znemožnění interakce s negativním regulátorem Mks1p (Liu et al., 2003). Rtg2p pomáhá translokaci komplexu Rtg1p-Rtg3p z cytoplazmy do jádra tím, že zajišťuje částečnou defosforylaci Rtg3p (Sekito et al., 2000). Jak již bylo zmíněno, Rtg2p interaguje také s Mks1p a je součástí SLIK komplexu. Skrze Rtg2p je tak spojena retrográdní odpověď s metabolismem, rezistencí vůči stresu (Epstein et al., 2001), chromatin dependentní genovou aktivací a genovou stabilitou.

Dojde-li k delecí *RTG2*, pak se gen *CIT2*, použitý jako marker, neexprimuje a buňka není schopná růst na acetátu jako nefermentovatelném zdroji uhlíku. Pro růst je potřeba medium s glutamátem nebo aspartátem (Sekito et al., 2000).

6.4.3. Rtg1p-Rtg3p komplex

Rtg1p-Rtg3p tvoří heterodimerní komplex, který je transkripčním faktorem genů retrográdní odpovědi. Komplex Rtg1p-Rtg3p se, na rozdíl od většiny bHLH transkripčních faktorů interagujících s E boxem, váže na R box. Jde o neobvyklou sekvenci GGTCAC v promotorech cílových genů. Rtg1p-Rtg3p komplex tak upstream aktivuje krom jiného transkripci *CIT2* genu pro peroxisomální isoformu citrát syntázy. Oba Rtg proteiny obsahují bHLH/Zip doménu (basic helix-loop-helix/leucine zipper). V případě Rtg3p jde o běžnou formu, kterou lze pozorovat i u jiných proteinů s touto doménou. Avšak doména proteinu Rtg1 je poněkud odlišná. Její leucine-zipper DNA-vazebná doména je kratší a smyčka naopak delší než u běžných bHLH/Zip domén (Liao and Buton, 1993; Jia et al., 1996). Součástí Rtg3p je i doména bohatá na serinové a threoninové zbytky. Tato doména nabízí možnost fosforylace a tím také inhibice vstupu Rtg3p do jádra (Rothermel et al., 1997).

Míra fosforylace Rtg3p určuje, zda komplex s Rtg1p bude lokalizován v cytosolu nebo jádře. Rtg2p částečně defosforyluje Rtg3p a tím umožní translokaci celého komplexu Rtg1p-Rtg3p do jádra. Není-li však Rtg2p přítomen, je Rtg3p silně fosforylován a lokalizován v cytoplasmě. K aktivaci transkripce cílových genů (např. *CIT2*) tedy nedochází. U buněk s nepoškozenou mitochondriální DNA (ρ^+) je komplex Rtg1p-Rtg3p lokalizován především v cytoplasmě a exprese *CIT2* je tedy nízká. Avšak u buněk s poškozenou nebo zcela chybějící mitochondriální DNA (ρ^0) je většina Rtg1p-Rtg3p v jádře a exprese genů retrogradní odpovědi je vysoká (Sekito et al., 2000).

6.4.4. Ras proteiny, Phb1 a Phb2

Mezi Ras proteiny patří Ras2p a Ras1p, malé G-proteiny. Jsou součástí Ras-cAMP dráhy, kde aktivují adenylát cyklázu. Bylo pozorováno, že vyšší koncentrace cAMP v cytosolu vedla ke zkrácení délky života buněk. Avšak Ras-cAMP dráha může délku života i prodloužit (viz níže). cAMP dráha tak představuje pouze možnost a ne podmínku pro dlouhověkost.

Bylo pozorováno, že pokud dojde k poškození genu *RAS2*, je délka života kratší, zatímco overexprese znamená jeho prodloužení. Tento protein napomáhá potlačení prodloužení generační doby, jednoho ze senescenčních faktorů. Při overexpresi *RAS1* nebylo pozorováno prakticky žádné prodloužení života. Ovšem delece tohoto genu k prodloužení život vedla. Lze tedy říci, že Ras2p a Ras1p mají v determinaci délky života reciproké role (Sun et al. 1994; Kirchman et al., 1999)

Ras-cAMP dráha se objevuje ve spojení s retrogradní odpovědí. Obě dráhy jsou inhibovány proteinem Mks1p. Je-li tento protein zapojen do inhibice Ras-cAMP dráhy, nepodílí se na inhibici retrogradní odpovědi. Ras-cAMP tedy podporuje retrogradní signalizaci a tím přispívá k prodloužení života kvasinkových buněk (viz obr. 4.) (Jazwinski, 2003).

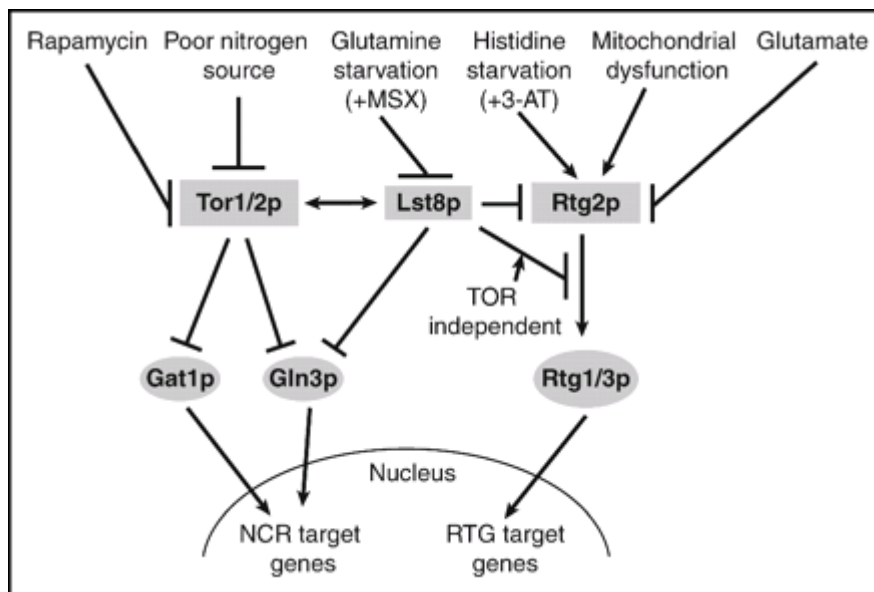
S Ras2p se pojí také dva prohibitiny – Phb1p a Phb2p. Tyto proteiny jsou uloženy na vnitřní mitochondriální membráně, kde působí jako chaperony při translokaci nově syntetizovaných proteinů mitochondriální membrány. Delece jednoho nebo obou genů u ρ^0 buněk vedla ke změnám v morfologii mitochondrií, jejich distribuci do dceřinných buněk a tím způsobila výrazný pokles replikativní délky života. Delecí *RAS2* lze tento efekt potlačit. U ρ^+ buněk žádné změny způsobující zkrácení replikativní délky života pozorovány nebyly. (Kirchman et al., 2003).

6.4.5. TOR dráha

Retrográdní odpověď je v kvasinkových (ale i v živočišných buňkách) spojena také s TOR kinasovou drahou, i když přesné spojení ještě není zcela jasné (Butow and Avadhani, 2004). Tato dráha umožňuje eukaryotickým buňkám regulovat růst v závislosti na obsahu a kvalitě živin v médiu, především zdrojů uhlíku a dusíku. Inhibice TOR dráhy znamená aktivaci exprese genů kódujících enzymy syntézy glutaminu a glutamátu. Bylo pozorováno, že v případě exprese genů aktivovaných retrográdním signálem a genů pod kontrolou katabolické dusíkové represe (NCR-senzitivní geny) jsou vlivy TOR a retrográdní dráhy oddělitelné. Pokud však k inhibici retrográdní signalizace TOR drahou dochází, negativním regulátorem je Lst8p. Tento protein vytváří komplex s proteiny Tor1p a Tor2p (proteinkinázy) a inhibuje expresi *CIT2* a *GLN1* (glutamin syntetáza). Lst8p by mohl představovat spojení mezi TOR a retrográdní drahou. (Giannattasio et al., 2005). Podle jiné studie by křížení těchto drah mohlo být zajištěno proteinem Mks1p (Liu et al. 2003; Dilova et al., 2002).

TOR dráha hraje roli při určování lokalizace Rtg1p-Rtg3p komplexu. Má-li buňka dostatek dusíku, je TOR dráha aktivní a většina Rtg1p-Rtg3p je v cytoplazmě. Avšak dojde-li k inaktivaci TOR dráhy, Rtg1p-Rtg3p se translokují do jádra a tím aktivují expresi genů retrográdní odpovědi.

Tato dráha je inhibována antibiotikem rapamycinem (Target Of Rapamycin – TOR), který zastavuje růst v mnoha eukaryotických buňkách, včetně *S. cerevisiae*. Rapamycin může inhibovat jak Tor1p, tak i Tor2p. U buněk ošetřených rapamycinem dochází např. k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi, inhibici syntézy proteinů a biogeneze ribosomů (Komeili et al., 2000).



Obr. 6.: Model TOR regulace v NCR a retrográdní dráze. Inhibice rapamycinem vede k aktivaci genů NCR a retrográdní odpovědi. Retrográdní dráha aktivovaná dysfunkcemi mitochondrií je nezávislá na fungování TOR. Lst8p jako součást TOR-kinázového komplexu způsobuje změny v aktivitě Rtg1p-Rtg3p a Gln3p, ale ne v aktivitě Gat1p. Lst8p inhibuje retrográdní dráhu na dvou místech („upstream“ a „downstream“ inhibice Rtg2p). Nedostatek glutaminu aktivuje Gln3p a Rtg1p-Rtg3p, ale ne Gat1p. Avšak nedostatek histidinu vede k aktivaci pouze Rtg1p-Rtg3p. ↓ Značí aktivaci a ⊥ značí inhibici. Převzato z Giannattasio et al. (2005).

7. Závěr

Mitochondrie jsou důležité tvorbou ATP při oxidativní fosforylaci. Zároveň však představují hrozbu ve formě produkce ROS. K uvolnění elektronu, který se následně váže na kyslík a dává tak vzniknout ROS, nejčastěji dochází na komplexech I a III. ROS se na stárnutí buňky podílí poškozováním důležitých genů, proteinů a lipidů.

V buňkách však existuje několik mechanismů obrany, které dokáží většinu poškození zabránit nebo kompenzovat jejich vliv, takže přispívají k prodloužení života buňky. Na obraně buňky se mohou podílet enzymy jako např. superoxiddismutasa, katalasa a různé druhy peroxidas, které nebezpečné ROS přemění na vodu a kyslík.

Další možností obrany buňky je kalorická restrikce. Pozorování ukázala, že postupné snižování obsahu neesenciálních aminokyselin a glukosy vede u kvasinek k prodloužení života. Při kalorické restrikci se uplatňují tři základní signální dráhy, a to Ras-cAMP, Gpr1p/Gpa2p a Snf1p.

Ras-cAMP dráha může představovat jakési pojitko s dalším mechanismem obrany, kterým je retrográdní signalizace. V této dráze se uplatňují především tři proteiny – Rtg1p,

Rtg2p a Rtg3p. Retrográdní odpověď vychází z mitochondrií s poškozenou funkcí a signál je pomocí Rtg2p přenesen na komplex Rtg1p-Rtg3p, který je transkripčním faktorem. Jedním z cílů tohoto transkripčního faktoru je i *CIT2*, gen pro citrát syntázu. Rtg2p se objevuje také ve spojitosti se vznikem ERCs, které na délku života mají negativní vliv. Další složkou retrográdní odpovědi je SLIK komplex, který obsahuje mj. histonacetyltransferasu. Je tedy důležitým transkripčním koaktivátorem. Během stárnutí kvasinek dochází k poškození Krebsova cyklu a tím snížení jeho aktivity. Retrográdní odpověď zajišťuje částečnou kompenzaci tohoto stavu zvýšením produkce citrát syntázy, která je zapojena v glyoxalátovém cyklu.

Další drahou, která má vliv na retrográdní odpověď, je kromě Ras-cAMP také TOR dráha. TOR dráha monitoruje stav živin v mediu. Má-li buňka dostatek dusíku a uhlíku, je TOR aktivní, většina Rtg1p-Rtg3p je v cytosolu a k přepisu genů retrográdní odpovědi nedochází. Avšak je-li inaktivována, Rtg1p-Rtg3p komplex je traslokován do jádra a dojde k přepisu genů retrográdní odpovědi. TOR dráha je tedy negativním regulátorem retrográdní odpovědi. Přesný mechanismus propojení obou drah je zatím nejasný, avšak objevují se náznaky, že by zde klíčovou roli mohly hrát proteiny Lst8p a Mks1p.

Retrográdní odpověď je pro prodloužení života buněk důležitá a je proto tématem mnohých experimentů. Během výzkumu retrográdní dráhy bylo zjištěno velké množství důležitých informací, jejichž část jsem se v této práci pokusila nastínit. Je však ještě mnoho nejasností např. v regulaci a interakci s jinými drahami v buňce, které zůstávají předmětem bádání.

8. Seznam použitých zkratek

Zkratka	Základní charakteristika	Podrobnější popis funkce v buňce
Bmh1p, Bmh2p (Brain Modulosignalin Homolog)		Proteiny podílející se na vazbě proteinů a DNA, regulaci exocytosy, transportu váčků, TOR signální dráhy a Ras/MAPK signalizaci.
CIT2 (CITrate synthase)	Gen pro citrát syntasů	Katalyzuje kondenzaci acetyl koenzymu A a oxaloacetátu za vzniku citrátu; zapojena v glyoxalátovém cyklu.
DNA-ERCs (DNA Extrachromosomal Ribosomal Circles)	Fragmenty chromosomální ribosomální DNA	Vznikají v důsledku stárnutí buněk a zkracují délku života.
Gat1p	Transkripční aktivátor s DNA- vazebným motivem GATA-1-type Zn finger	Transkripční aktivátor genů zapojených v NCR; příslušník GATA rodiny DNA vazebných proteinů; aktivita a lokalizace regulovány limitací dusíku a Ure2p
Gcn5p (General Control Nonderepressible)	Histon acetyltransferasa	Acetylace lysinů na histonech H2B a H3; katalytická podjednotka ADA a SAGA acetyltransferázových komplexů.
GLN1 (GLutamiNe metabolism)	Glutamin syntetasa	Syntéza glutaminu z glutamátu a amoniaku ; exprese regulována zdrojem dusíku a nedostatkem aminokyselin.
Gln3p (GLutamiNe metabolism)	Transkripční aktivátor	Transkripční aktivátor genů regulovaných NCR; lokalizace a regulace aktivity podle kvality zdroje dusíku.
Gpr1p/Gpa2p (G-Protein coupled Receptor) (G Protein Alpha subunit)	Gpr1p – membránový receptor spřažený s G-proteinem (plasmatická membrána) Gpa2p – podjednotka G proteinu	Spojuje nutriční signalizaci s modulací osudu buněk skrze PKA a cAMP syntesu

Zkratka	Základní charakteristika	Podrobnější popis funkce v buňce
HDA1 (Histone DeAcetylase)	Gen pro histon deacetylasi	Pravděpodobně katalytická podjednotka histon deacetylase komplexu, který obsahuje také Hda2p a Hda3p.
Lst8p (Lethal with Sec Thirteen)		Protein potřebný k transportu permeasy aminokyselin Gap1p z Golgiho aparátu na povrch buněk; součást TOR signální dráhy.
MKS1 (Multicopy Kinase Suppressor)	Negativní transkripční regulátor	Pleiotropní regulační faktor zahrnutý v Ras-cAMP, biosyntese lysinu a regulaci dusíkem; zapojen také do retrogradní signalizace
NCR geny (Nitrogen Catabolite Repressed)	Geny ovlivňující metabolismus dusíku	Geny kódující transportery nebo katabolické enzymy zodpovědné za přizpůsobení se nepreferovaným zdrojům dusíku.
Phb1p, Phb2p (ProHiBitin)	Chaperony	Podjednotky komplexu prohibitinu; chaperony u vnitřní mitochondriální membrány, které slouží ke stabilizaci nově syntetizovaných proteinů; určují replikativní délku života; zapojeny do segragace mitochondrií.
RAS1 (homologous to RAS proto-oncogene)	Gen pro Ras1p (GTPasa)	GTPasa zapojená v G-proteinové signalizační dráhy aktivující adenylát cyklastu; role v buněčné proliferaci; v plasmatické membráně; homolog savčích RAS proto-onkogenů.
RAS2 (homologous to RAS proto-oncogene)	Gen pro Ras2p (GTP vazebný protein)	GTP vazebný protein, který reguluje odpověď na nedostatek dusíku; sporulaci; filamentární růst; homolog savčích Ras proto-onkogenů.

Zkratka	Základní charakteristika	Podrobnější popis funkce v buňce
ROS (Reactive Oxygen Species)		Vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku se silnými oxidačními schopnostmi.
RPD3 (Reduced Potassium Dependency)	Gen pro histon deacetylasi	Regulace transkripce a umlčení (silencing).
Rtg1p(ReTroGrade regulation)	Transkripční faktor	Transkripční faktor zapojený do interorganelové komunikace mezi mitochondriemi, peroxisomy a jádrem.
Rtg2p (ReTroGrade regulation)	Regulátor transkripce	Sensor mitochondriálních dysfunkcí; reguluje lokalizaci Rtg1p a Rtg3p v buňce; transkripční aktivátor retrográdní odpovědi a TOR dráhy; inhibován fosforylací.
Rtg3p (ReTroGrade regulation)	Transkripční faktor	Transkripční faktor s helix-loop-helix leucinovým zipem (bHLH/Zip), který vytváří komplexy s jinými proteiny, jež mají také tuto doménu (bHLH/Zip) – Rtg1p. Tím se podílí na aktivaci retrográdní odpovědi a TOR dráhy.
SAGA komplex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase complex)	Proteinový komplex	Velký multiproteinový komplex, který obsahuje histonacetyltransferasu; zapojen v regulaci transkripce.
SIR2 (Silent Information Regulator)	Gen pro jadernou NAD-dependentní deacetylasi	NAD ⁺ dependentní histon deacetylasi zapojená do regulace délky života; role při umlčování HML, HMR telomer a dalších oblastí na rDNA; negativní regulace iniciace replikace DNA.
SLIK komplex (Saga LIKe complex)	Proteinový komplex	Proteinový komplex podobný SAGA komplexu, ale obsahující Spt7p místo Spt8p.

Zkratka	Základní charakteristika	Podrobnější popis funkce v buňce
Snf1p (Sucrose NonFermenting)	Serin/threonin protein kinasa	AMP aktivovaná kinasa v komplexu s dalšími proteiny; nutná k transkripci genů potlačených glukosou, termotoleranci, sporulaci a biogenesi peroxisomů.
TAF (TATA-binding protein (TBP)-Associated Factor)	Podjednotka TFIID	Vazba na promotory a iniciace transkripce RNA polymerasou II.
TBP (TATA-binding protein)	Hlavní transkripční faktor	Transkripční faktor, který interaguje s dalšími faktory za vzniku preiniciačního komplexu v promotorech; pro životaschopnost esenciální.
TOR1 (Target Of Rapamycin)	Gen pro protein kinasu	S PIK související protein kinasa a cíl pro rapamycin; podjednotka komplexu TORC1, který kontroluje růst v odpovědi na živiny regulací translace, transkripce, biogenese ribosomů, transportu živin a autofagií; zapojena do meiosis.
TOR2(Target Of Rapamycin)	Gen pro protein kinasu	S PIK související protein kinasa a cíl pro rapamycin; podjednotka komplexu TORC1, který kontroluje růst v odpovědi na živiny a komplexu TORC2, který reguluje polarizaci aktinového cytoskeletu buňky v závislosti na buněčném cyklu; zapojen do meiosis

9. Literatura

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998):
Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, s.r.o.

Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005): Mitochondria, oxidants and aging.
Elsevier Inc. 120, 483-495

Borghouts, C., Benguira, A., Wawryn, J., Jazwinski, S.M. (2004): Rtg2 protein links
metabolism and genome stability in yeast longevity.
Genetics. 166(2):765-77.

Butow, R.A., Avadhani, N.G. (2004): Mitochondrial signaling: The retrograde response.
Cell Press 14,1-15

Čáp, M. (2004): Mitochondrie a oxidativní stres při apoptose a stárnutí u *Sacharomyces cerevisiae*.
Biologické listy 69 (4): 279-321

Dilova, I., Chen, C.Y., Powers, T. (2002): Mks1 in concert with TOR signaling negatively
regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*.
Curr Biol. 5;12(5):389-95.

Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W. 4th, Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner,
H.R., Butow, R.A. (2001): Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction.
Mol Biol Cell. 12(2):297-308.

Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A (2005): Retrograde response to
mitochondrial dysfunction is separable from TOR1/2 regulation of retrograde gene
expression.

J. Biol. Chem. 30;280(52):42528-35. Epub 2005 Oct 27.

Huisinga, K.L., Pugh, B.F. (2004): A genome-wide housekeeping role for TFIID and a
highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell
27;13(4):573-85.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J. (2003): Production of
reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III.

J Biol Chem. 19;278(38):36027-31. Epub 2003 Jul 2.

Jazwinski, S.M. (2000), Metabolic control and aging. Elsevier Science

Jazwinski, S.M. (2003): Mitochondria, metabolism, and aging in yeast. Current Genetics
3,39-59

Jazwinski, S.M. (2005): The retrograde response links metabolism with stress responses,
chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. Gene 354:22-7

- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., Butow, R.A. (1997): A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol.* 17(3):1110-7.
- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V., Jazwinski, S.M. (2000): An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J.* 14(14):2135-7.
- Kennedy, B.K., Austriaco, N.R. Jr, Guarente, L. (1994): Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol.* 127(6 Pt 2):1985-93.
- Kim, S., Benguira, A., Lai, C.Y., Jazwinski, S.M. (1999): Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10(10):3125-36.
- Kirchman, P.A., Kim, S., Lai, C.Y., Jazwinski, S.M. (1999): Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152(1):179-90.
- Kirchman, P.A., Miceli, M.V., West, R.L., Jinag, J.C., Kim, S., Jazwinski, S.M. (2003): Prohibitins and Ras2 protein cooperate in the maintenance of mitochondrial function during yeast aging. *Acta Biochim Pol.* 50(4):1039-56.
- Komeili, A., Wedaman, K.P., O'Shea, E.K., Powers, T. (2000): Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell. Biol.* 13;151(4):863-78.
- Kushnareva, Y., Murény, A.N., Andreyev, A. (2002): Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J.* 1;368(Pt 2):545-53.
- Lai, C.Y., Jaruga, E., Borghouts, C., Jazwinski, S.M. (2002): A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162(1):73-87.
- Liao, X., Butow, R.A. (1993): RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell.* 15;72(1):61-71.
- Liu, Z., Sekito, T., Epstein, C.B., Butow, R.A. (2001): RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.* 17;20(24):7209-19.
- Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J., Butow, R.A. (2003): Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol Cell.* 12(2):401-11.

Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., McMahon, S.J., Wood, J.M., Kennedy, E.L., Cook, R.G., Workman, J.L., Yates, J.R. 3rd, Grant, P.A. (2002): The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol Cell Biol.* 22(24):8774-86.

Rothermel, B.A., Thornton, J.L., Butow, R.A. (1997): Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J Biol Chem.* 8;272(32):19801-7.

Sekito, T., Thornton, J., Butow, R.A. (2000): Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell* 11(6):2103-15.

Sun, J., Kale, S.P., Childress, A.M., Pinswasdi, C., Jazwinski, S.M. (1994): Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J. Biol. Chem.* 269(28):18638-45.

Sun, J., Kale, S.P., Childress, A.M., Pinswasdi, C., Jazwinski, S.M. (1994): Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J.Biol.Chem.* 15;269(28):18638-45.