

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHÉMIE**

Ing. Martina Neboháčová

REGULÁCIA GÉNOV KÓDUJÚCICH ADP/ATP PRENÁŠAČE V KVASINKÁCH
Saccharomyces cerevisiae a Candida parapsilosis

**Autoreferát dizertačnej práce na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae
doctor v odbore doktorandského štúdia: 14-10-9 biochémia**

Bratislava 2000

Školiace pracovisko: Katedra biochémie Prírodovedeckej fakulty
Univerzity Komenského Bratislava

Dizertant: Ing Martina Neboháčová
Katedra biochémie
Prírodovedecká fakulta UK
Mlynská dolina CH1
84215 Bratislava

Školiteľ: Prof. RNDr. Jordan Kolarov, DrSc.

Oponenti: 1. Ing. A. Brešler, etc.
2. Ing. Z. Zuzinská, etc.
3. Doc. RNDr. P. Šmigaj, DrSc.

Autoreferát bol rozoslaný dňa: 30.8.2000

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa 27.9.2000 o 9:00 hodine pred
komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia 14-10-9 biochémia,
vymenovanej predsedom spoločnej odborovej komisie na
Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave v miestnosti B2-107

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na Oddelení vedeckovýskumnej činnosti Dekanátu
Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, pavilón B2, č.
dv. 315.

Predseda komisie pre obhajoby dizertačných prác vo vednom odbore Biochémia:

Prof. RNDr. Marta Kollárová, CSc.

1. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Pred niekoľkými desiatkami rokov bola objasnená chemická štruktúra génu. Pred niekoľkými rokmi bola známa kompletná sekvencia prvého prokaryotického genómu. Pred niekoľkými mesiacmi bola zverejnená kompletná sekvencia ľudského chromozómu 22, pred pár dňami bol prečítaný takmer celý genóm. Čo príde potom? V čase rozlúštenia štruktúry dedičného materiálu bola myšlienka poznania kompletnej sekvencie DNA človeka stotožňovaná s objasnením všetkých tajomstiev živých systémov.

Dnes vieme, že poznanie primárnej štruktúry DNA predstavuje v chápaní živých systémov iba prvý krok. Druhým je hľadanie funkcie neznámych génov, tretím štúdiom regulácie expresie génov, štvrtým... Poznanie kompletnej sekvencie organizmu už dnes umožňuje sledovanie zmien v expresii génov na úrovni celého genómu, ku ktorým dochádza v dôsledku mutácie toho-ktorého génu alebo vplyvom prostredia na sledovanú bunku. Následne je organizmus nútený prispôsobiť vlastný metabolizmus novým podmienkam. Dochádza k zvýšeniu, resp. k zníženiu expresie celých skupín génov, kódujúcich proteíny určitých biologických dráh. Pre pochopenie regulačných mechanizmov dohliadajúcich na prispôsobenie sa bunky prostrediu však globálny pohľad nestačí. Je nevyhnutné kombinovať ho s detailným štúdiom regulácie expresie jednotlivých génov.

Kvasinky sú ideálnym modelom pre tento typ výskumu. Okrem jednoduchej manipulácie, dlhodobého štúdia a známej kompletnej sekvencie genómu sa vyznačujú rôznorodosťou životných podmienok, v ktorých sa vyskytujú. Niektoré druhy sú schopné rýchle reagovať na vonkajšie zmeny a prispôbovať vlastný metabolizmus novým podmienkam, kým iné sú viazané na jeden typ prostredia. A práve sledovanie regulácie syntézy niektorých proteínov v kvasinkách umožňuje hľadať odpovede na otázku, prečo sú niektoré druhy schopné rásť v určitom prostredí, kým iné nie.

Mitochondrie predstavujú životne dôležité organely buniek, kde v procese oxidačnej fosforylácie vzniká ATP, ktoré slúži ako hlavný zdroj energie v celej bunke. Kľúčovým proteínom energetického metabolizmu je ADP/ATP prenášač (AAC). Nachádza sa vo vnútornej mitochondriálnej membráne a jeho úlohou je vymieňať adenínové nukleotidy medzi mitochondriou a cytosolom. Je pozoruhodné, že v niektorých kvasinkách je kódovaný jediným génom (*Kluyveromyces lactis*,

Schizosaccharomyces pombe) zatiaľ čo v iných kvasinkách a vyšších organizmoch (*Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Bos taurus*, *Homo sapiens* a iné) je to viacero génov, ktoré sú odlišne regulované v závislosti od fyziologických podmienok, typu tkaniva, alebo vývojového stupňa. Okrem energetického metabolizmu sa ADP/ATP prenášač zúčastňuje aj iných procesov v bunke. Momentálne stúpa záujem o tento proteín v súvislosti s kontrolou permeability mitochondriálnej membrány a predpokladá sa aj jeho účasť v procesoch starnutia a apoptózy. Rôzne druhy kvasiniek sa ukazujú byť vhodným modelom pre štúdium týchto procesov.

Táto práca sa zaoberá štúdiom štruktúry a expresie génov kódujúcich ADP/ATP prenášač v dvoch odlišných kvasinkách. V prvej časti práce sme sa sústredili na majoritnú formu prenášača kódovanú génom *AAC2* vo fakultatívne anaeróbnej *Saccharomyces cerevisiae* s prevládajúcim fermentačným typom metabolizmu. Pokúsili sme sa o detailnú analýzu regulačnej oblasti tohto génu. V druhej časti je popísaná izolácia, štruktúra a regulácia génu kódujúceho ADP/ATP prenášač v obligátne aeróbnej kvasinke *Candida parapsilosis* s oxidačným typom metabolizmu.

1.1. Expresia ADP/ATP prenášača v kontexte celého genómu *S. cerevisiae*

Údaje získané z globálneho pohľadu na génovú expresiu ukázali úzku koordináciu expresie u skupín génov vzťahujúcich sa k tomu istému procesu v bunke. Takéto gény potom tvoria synexpresnú skupinu [Niehrs a Pollet, 1999]. Je preto možné očakávať, že promótorové oblasti týchto génov budú mať podobnú štruktúru. Koordinovaná expresia génov kódujúcich mitochondriálne proteíny bola dokázaná viacerými štúdiami v celogenómovom meradle [DeRisi a kol., 1997; Eisen a kol., 1998].

Gény *NDII* (kóduje NADH-ubichinón-6 oxidoreduktázu), *COX6* (kóduje šiestu podjednotku cytochróm *c* oxidázy) a *QCR8* (kóduje ôsmu podjednotku ubichinol-cytochróm *c* oxidoreduktázy) majú evolučne príbuznú expresiu ako nami študovaný gén *AAC2* (kóduje majoritnú izoformu ADP/ATP prenášača). Došlo u nich k adaptívnej zmene expresie v dôsledku dlhodobej kultivácie kvasiniek za podmienok limitujúcej glukózy [Ferea a kol., 1999]. Okrem toho majú gény *NDII*, *COX6* a *QCR8*, spolu s *QCR2* (kóduje druhú podjednotku ubichinol-cytochróm *c* oxidoreduktázy) podobnú štruktúru promótoru ako *AAC2*. Vo všetkých z nich boli nájdené funkčné *cis*-aktivačné sekvencie, na ktoré sa viaže proteín ABF1 a komplex HAP2/3/4/5.

1.1.1. ABF1 a HAP2/3/4/5 patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce *trans*-aktivátory génov kódujúcich mitochondriálne proteíny.

ABF1 samotný je slabým aktivátorom transkripcie, k silnej aktivácii dochádza v kombinácii s inými aktivátormi [Buchman a Kornberg, 1990, Goncalves a kol, 1995]. Predpokladá sa, že regulácia multifunkčným regulátorom ako ABF1 umožní kvasinkovej bunke prispôbiť rýchlosť biogenézy mitochondrií celkovému bunkovému metabolizmu a rýchlosti rastu. Regulácia jadrom kódovaných mitochondriálnych proteínov v závislosti od zdroja uhlíka je dosiahnutá pomocou HAP2/3/4/5, ktoré je spolu s ABF1 cieľovým faktorom signálnych dráh zahrnutých v nutričnom monitoringu a kontrole rastu [de Winde, 1992]. Tento predpoklad je zosilnený faktom, že väzbová aktivita ABF1 sa mení s rastovou rýchlosťou a jeho fosforylačný stav varíruje ako odozva na aktuálny zdroj uhlíka a prítomnosť mitochondriálneho genómu [Silve a kol., 1992]. Elektroforeticky je možné detekovať minimálne 4 rôzne fosforylačné stavy ABF1. V prítomnosti skvasiteľného zdroja uhlíka sa množstvo detekovateľných fosforylačných stavov znižuje [Silve a kol., 1992]. Funkčné SNF1-SSN6, známe ako mediátor signálu glukózovej represie, je súčasťou mechanizmu defosforylácie ABF1 [Silve a kol., 1992].

Synergický účinok ABF1- väzbového miesta s *cis*-aktivačnou sekvenciou pre väzbu HAP2/3/4/5 komplexu pri regulácii syntézy OXFOS proteínov bol pozorovaný okrem *S. cerevisiae* aj v kvasinkách *Kluyveromyces lactis* [Mulder a kol., 1995] a *Yarrowia lipolytica* [Madzak a kol., 1999].

1.1.2. Úloha ABF1- a HAP2/3/4/5-väzbových sekvencií v regulácii génov kódujúcich mitochondriálne proteíny.

Oblasti promótorov niektorých génov kódujúcich proteíny oxidačnej fosforylácie, ktoré sú zodpovedná za aktiváciu expresie, teda obsahujú konsenzus sekvencie pre väzbu faktorov ABF1 a HAP2/3/4/5. Aká je úloha ABF1- a HAP2/3/4/5-väzbových sekvencií v regulácii expresie týchto génov?

V promótoře génu *QCR8* sa prekrýva väzbové miesto pre ABF1 s miestom pre CPF1 multifunkčný transkripčný faktor a vo vzdialenosti 21 báz smerom k translačnému štartu sa nachádza miesto pre HAP2/3/4/5. Predpokladá sa, že komplex HAP2/3/4/5 je nevyhnutný pre rýchlu indukciu transkripcie pri zmene rastových podmienok z represných na derepresné a pre úplnu derepresiu. Je možné, že ABF1

zvyšuje HAP2/3/4/5-závislú derepresiu, pravdepodobne priamou interakciou s týmto komplexom. K tomu prispieva aj fakt, že skrátením vzdialenosti medzi väzbovými miestami pre oba aktivátory v *QCR8* promótoře sa účinnosť derepresie dramaticky zníži [de Winde a Grivell, 1993]. Okrem toho je ABF1 miesto potrebné pre transkripciu *QCR8* počas anaeróbného rastu a zabezpečuje bazálne a indukované transkripčné hladiny počas rastu na represných aj derepresných médiách. Dosahuje to udržiavaním beznukleozómovej oblasti na promótoře *QCR8* za rôznych rastových podmienok, čím pravdepodobne zabezpečuje prístupnosť pre HAP2/3/4/5 komplex [de Winde a kol., 1993]. Udržiavaním bazálnej hladiny transkripcie ABF1 zabraňuje úplnej represii mitochondriálnej biogenézy. CPF1 účinkuje ako represor expresie počas rastu na neskvasiteľnom substráte. Represívny účinok CPF1 je možné potlačiť kooperatívnym pôsobením ABF1 a HAP2/3/4/5 [de Winde a Grivell, 1995].

Indukcia expresie génu *QCR2* na neskvasiteľnom zdroji uhlíka je zabezpečená HAP2/3/4/5 komplexom. O úlohe ABF1 sa predpokladá, že slúži spolu s HAP2/3/4/5 na reguláciu expresie napojenú na bunkový rast [Dorsman a Grivell, 1990].

Transkripcia *COX6* podlieha kombinovanej regulácii. Je reprimovaná glukózou, aktivovaná hémom a znížená v neprítomnosti mitochondriálneho genómu [Poyton, 1996]. Kľúčovú rolu v regulácii hrá ABF1. Zmeny v jeho fosforylácii odrážajú rastové podmienky a korelujú so zmenami v expresii *COX6*. Pri raste na neskvasiteľných substrátoch je ABF1 fosforylovaný vo väčšej miere [Silve a kol., 1992]. Expresia *COX6* je úplne vypnutá v hém-deficitných a anaeróbných bunkách, v respiračne-deficitných bunkách (ρ^0) je výrazne znížená. Zníženie expresie *COX6* v ρ^0 bunkách je však nezávislé od zníženia expresie v bunkách deficitných na hém. ABF1 je rozdielne fosforylovaný v ρ^+ a ρ^0 bunkách a fosforylačný stav v ρ^0 bunkách je odlišný od stavov pozorovaných v ρ^+ bunkách za represných a derepresných podmienok [Poyton a McEwen, 1996]. Rozdielna fosforylácia môže byť dôsledkom viacerých kinázových dráh, SNF1-SSN6 dráha, zahrnutá v glukózovej represii, je zatiaľ známa ako jediná [Silve a kol., 1992]. Regulácie *COX6* zdrojom uhlíka sa zúčastňuje aj HAP2/3/4/5 komplex, ktorý je takisto súčasťou SNF1/TUP1/SSN6 dráhy [Trawick a kol., 1992]. Regulácia tohto génu predstavuje bazálnu expresiu v prítomnosti glukózy pomocou defosforylovaného ABF1 a kumulatívny účinok ABF1a HAP2/3/4/5 pri aktivácii na neskvasiteľnom zdroji uhlíka. Navyše, transkripcia *COX6* je ovplyvnená kyslíkom, a to hém-závislým spôsobom cez dve hém-závislé miesta. Schopnosť bunkových proteínov

viazat' jednu z týchto sekvencií, HDS1, bola indukovateľná kyslíkom a hémom [Wright a kol., 1995a]. Závislosť väzbovej aktivity ABF1 od kyslíka, alebo hému nebola pozorovaná [Wright a kol., 1995b].

Gén *AAC2* kóduje hlavnú izoformu ADP/ATP prenášača z vnútornej mitochondriálnej membrány. Expresia tohto génu je vysoká, je takisto ovplyvnená kyslíkom, hémom a podlieha glukózovej represii. [Betina a kol., 1995]. Navyše, *AAC2* promótor je schopný regulovať aj heterológnu expresiu cicavčích génov [Hashimoto a kol., 1999]. Preto je zaujímavé vedieť, akým spôsobom je takáto vysoká aktivácia dosiahnutá. Detailná analýza aktivačnej oblasti promótoru *AAC2* génu je predmetom tejto práce.

1.2. *AAC* gény v netradičných druhoch kvasiniek.

ADP/ATP prenášač je v *S. cerevisiae* kódovaný tromi jadrovými génmi, *AAC1*, *AAC2* a *AAC3*, ktoré sú rozdielne exprimované [Kolarov a kol., 1990]. Najväčšie množstvo transkriptu aj proteínu hlavnej izoformy *AAC2* je možné detekovať pri aeróbnom raste na nesekvasiteľných zdrojoch uhlíka [Betina a kol., 1995]. Pri nedostatku kyslíka expresia *AAC2* klesá a začína sa exprimovať hypoxická izoforma kódovaná génom *AAC3* [Šabová a kol., 1993]. Gén *AAC1* je za aeróbnych podmienok exprimovaný konštitutívne, úroveň expresie je však veľmi nízka. Pri nízkej koncentrácii kyslíka je reprimovaný. Prerušenie génu *AAC2*, ktoré navodí respiračne deficitný fenotyp, jeho expresiu neovplyvní [Gavurníková a kol., 1996].

S. cerevisiae je zatiaľ jediným nižším eukaryotom, v ktorom boli identifikované viaceré gény kódujúce ADP/ATP prenášač. Nedávne hybridizačné experimenty však naznačujú, že v kvasinkách *Bretanomyces anomalus* a *Candida utilis* sa nachádza viac *AAC* izogénov, aj keď v prípade *B. anomalus* je ich prítomnosť druhovo-špecifická. Expresia ADP/ATP prenášača v aeróbnjej *C. utilis* je negatívne regulovaná pri zníženej koncentrácii kyslíka, za aeróbnych podmienok je konštitutívna. Vo fakultatívne anaeróbnjej *B. anomalus* je expresia ADP/ATP prenášača regulovaná zdrojom uhlíka a indukuje sa počas rastu na respiračných substrátoch. Pri nedostatku kyslíka klesá, ale špecifický *AAC* transkript je prítomný aj v striktno anaeróbnych podmienkach [Zeman a Kolarov, 1997, Zeman, 1999].

V aeróbnych kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe* a *Kluyveromyces lactis* bol identifikovaný len jeden gén kódujúci ADP/ATP prenášač [Couzin a kol., 1996,

Viola a kol., 1995]. Obe kvasinky sú schopné vysokej fermentácie, ale podiel respirácie k fermentácii sa líši [Šubík a kol., 1974]. Kým v *S. pombe* je respirácia nízka, v *K. lactis* predstavuje až 70%-ný podiel na aeróbnom metabolizme [Gancedo a Serano, 1989]. V oboch kmeňoch boli pripravené nulové mutanty, neschopné rásť na nefermentovateľných zdrojoch uhlíka [Trézéguet a kol., 1999, Viola a kol., 1999]. Expresia *KIAAC* aj *SpANCI* je regulovaná podobným spôsobom. Indukuje sa počas rastu na respiračných substrátoch a je znížená za čiastočne anaeróbných podmienok [Trézéguet a kol., 1999]. V promótoře *KIAAC* sa nachádzajú väzbové miesta pre ABF1 a komplex HAP2/3/4/5. *KIHAP2* expresiu *KIAAC* génu neovplyvňuje [Viola a kol., 1999], ABF1 väzbová sekvencia zo *S. cerevisiae* je však schopná *in vitro* špecificky viazať jadrové proteíny z *K. lactis*, z čoho sa dá uvažovať o možnej regulačnej úlohe *KIABF1* [Zeman a Kolarov, 1997, Zeman, 1999].

Prekvapujúca je predpokladaná prítomnosť viac ako jedného ADP/ATP prenášača v obligátne aeróbnej kvasinke *Candida parapsilosis* [Guérin a kol., 1990]. Patrí medzi patogénne kvasinky, má vysokú respiračnú a veľmi nízku fermentačnú schopnosť [Šubík a kol., 1974, Guérin a kol., 1989]. Na rozdiel od *S. cerevisiae* má v dýchacom reťazci prítomný aj 1. fosforylačný stupeň podobný živočíšnemu a predpokladá sa prítomnosť mitochondriálneho prenášača vápnikových kationov [Camougrand a kol., 1987, Nosek a Fukuhara, 1994], čo sú atribúty blízke živočíšnym bunkám. Zaujímavý je jej oxidatívny metabolizmus, necitlivý na antimycín A [Šubík a kol., 1974]. Táto vlastnosť je zabezpečená prítomnosťou alternatívneho respiračného reťazca, schopného oxidovať cytoplazmatické NAD(P)H. Obsahuje dve dehydrogenázy, špecifické pre NADH a NADPH, umiestnené na vonkajšej strane vnútornej mitochondriálnej membrány a špecifické chinóny [Guérin a Camougrand, 1994, Guérin a kol., 1989]. Ako v zatiaľ jedinej kvasinke bol v *C. parapsilosis* imunologicky detekovaný rozprahač oxidačnej fosforylácie. Jeho úloha je pravdepodobne pri odbúrání nebezpečných kyslíkových radikálov pri vysokej respirácii [Jarmuszkiewicz a kol., 2000]. Akú úlohu by v metabolizme tejto kvasinky zohrávalo viacero izoforiem ADP/ATP prenášača nie je známe. Počtom *AAC* génov a ich reguláciou v *C. parapsilosis* sa zaoberá táto práca.

3. CIELE PRÁCE

Táto práca sa sústreďuje na štúdium génov kódujúcich ADP/ATP prenášač v dvoch druhoch kvasiniek.

Saccharomyces cerevisiae je fakultatívne anaeróbna kvasinka s prevažujúcim fermentačným metabolizmom. ADP/ATP prenášač je kódovaný tromi izogénmi – *AAC1*, *AAC2*, *AAC3*, ktoré sú odlišne regulované za rôznych fyziologických podmienok. Gén *AAC2*, ktorý kóduje hlavnú izoformu ADP/ATP prenášača, má silný indukovateľný promótor. Zaujímalo nás, ktoré oblasti promótoru *AAC2* génu sa regulácie zúčastňujú akú úlohu hrá ich topologické usporiadanie. Regulačnú oblasť tohto génu UAS_{AAC2} sme rozdelili na fragmenty a sústredili sme sa na schopnosť jednotlivých fragmentov UAS_{AAC2} a ich umelo vytvorených kombinácií:

- tvoriť komplexy s bunkovými proteínmi *in vitro*
- ovplyvňovať expresiu reportérového génu (fúzie kvasinkového izogénu *AAC3* s bazálnym promótorom (-93/+269) a bakteriálneho *lacZ* génu)
- stimulovať rast na nefermentovateľnom zdroji uhlíka

Candida parapsilosis je striktno aeróbna kvasinka s výlučne oxidačným metabolizmom. Zaujímalo nás:

- Aký je počet génov kódujúcich ADP/ATP prenášač v *C. parapsilosis*?
- Aká je sekvencia týchto génov a nakoľko sú proteíny nimi kódované podobné doteraz známym ADP/ATP prenášačom?
- Je expresia týchto génov regulovaná fyziologickými podmienkami?

3. MATERIÁL A METÓDY

Príprava a zloženie rastových médií a kultivácia baktérií a kvasiniek prebiehala podľa Ausubel a kol. [1989]. Izolácia plazmidovej DNA, štiepenie DNA restriktívnymi endonukleázami a opracovanie DNA modifikačnými enzýmami prebiehalo podľa štandardných protokolov [Sambrook a kol., 1989]. Fragmenty DNA boli izolované z gélu podľa Boyle a Lew [1995]. Baktérie boli transformované plazmidovou DNA v prítomnosti alkalických katiónov [Ano a Shoda, 1992]. Kvasinky boli transformované plazmidovou DNA s použitím octanu lítneho [Schiestl a Gietz, 1989]. DNA próby na hybridizácie boli značené použitím náhodných hexanukleotidov, [α - 32 P]dCTP a Klenowovho fragmentu DNA polymerázy I. systémom Multiprime DNA labelling

system (Amersham) a postupovalo sa podľa protokolu výrobcu. Pre štúdium DNA-proteínových interakcií sa používala koncovo značená próba pomocou [γ - 32 P]ATP a T4 polynukleotid kinázy po predchádzajúcej defosforylácii 5'-OH koncov podľa Ausubel a kol. [1989]. DNA-proteínové interakcie boli študované metódou gélovej retardácie podľa Silve a kol. [1992]. Aktivita β -galaktozidázy bola stanovená v kvasinkách kultivovaných do exponenciálnej fázy rastu a vyjadrená v Millerových jednotkách ako množstvo vznikajúceho *o*-nitrofenolu vzťahnuté na množstvo buniek za 1 minútu [Guarente, 1983]. Sekvenácia bola uskutočnená pomocou kitu Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham, kat. č. US 79565) podľa pokynov výrobcu. Analýza počtu *AAC* génov v *C. parapsilosis* bola vyšetovaná Southern analýzou [Ausubel a kol., 1989]. Expresia *CpAAC1* génu bola sledovaná na úrovni transkripcie Northern analýzou [Ausubel a kol., 1989].

4. VÝSLEDKY

4.1. *In silico* analýza skupiny mitochondriálnych génov kódovaných jadrom

Rozhodli sme sa porovnať, akým spôsobom je regulovaná expresia génov *QCR2*, *QCR8*, *COX6*, *ND11* a nami študovaného génu *AAC2* a jeho izogénov *AAC1* a *AAC3*. Údaje sme čerpali z databáz voľne prístupných na internete. Sledovali sme vplyv niekoľkých fenoménov: (i) zdroja uhlíka, (ii) koncentrácie kyslíka a (iii) mutácií v niektorých komponentoch transkripčného aparátu RNA Pol II na expresiu vybraných génov.

Expresia génu *AAC2* bola ovplyvňovaná zdrojom uhlíka a kyslíkom, ako aj niektorými zložkami transkripčného aparátu podobne, ako expresia ostatných vybraných génov. Všetky sledované gény kódujú proteíny oxidačnej fosforylácie. *AAC2* teda môže byť zaradený do synexpresnej skupiny génov kódujúcich proteíny oxidačnej fosforylácie. A v promótoroch týchto génov (okrem izogénov *AAC1* a *AAC3*) sa nachádzajú tie isté regulačné prvky vo veľmi podobnom usporiadaní ako u *AAC2*. Gén *AAC2* má však silný, indukovateľný promótor, schopný regulovať aj heterológnu expresiu cicavčích génov [Betina a kol., 1995, Hashimoto a kol., 1999]. Preto je nasledujúca časť práce venovaná štúdiu expresie *AAC2* génu.

4.2. Aktivačná oblasť promótoru *AAC2* génu *Saccharomyces cerevisiae*

Na 5'-neprepisovanom konci *AAC2* génu bola identifikovaná oblasť -393/-268, ktorá sa zdá byť esenciálnou pre aktiváciu transkripcie [Betina a kol., 1995]. Oblasť -380/-179 bola izolovaná označená ako UAS_{AAC2} [Ferková, 1995]. Sú v nej prítomné potenciálne väzbové miesta pre transkripčné faktory ABF1(-368/-354) a HAP2/3/4/5 (-307/-300). Pomocou restriktčných endonukleáz bolo možné UAS_{AAC2} rozdeliť tak, že jednotlivé fragmenty obsahovali jednotlivé uvedené väzbové sekvencie a oddelene ich analyzovať. Takto bolo možné nezávisle a v rôznych kombináciách skúmať a určiť príspevok jednotlivých sekvencií:

- a) pri tvorbe komplexov s bunkovými proteínmi
- b) pri ovplyvňovaní expresiu reportérového génu
- c) pri stimulácii rastu buniek, ktoré vyžadujú dostatočné množstvo AAC na neskvasiteľnom zdroji uhlíka

Účelom týchto experimentov bolo pokúsiť sa určiť, do akej miery sa jednotlivé promótorové elementy, a tým aj faktory, ktoré by sa na ne mohli viazať, zúčastňujú regulácie *AAC2* génu.

4.2.1. Väzba bunkových proteínov k častiam aktivačnej oblasti promótoru *AAC2* génu

Schopnosť jednotlivých fragmentov DNA viazať bunkové proteíny *in vitro* bola testovaná na základe zmeny ich elektroforetickej mobility (EMSA). Aktivačná oblasť promótoru *AAC2* génu (-380/-179), ktorá obsahuje väzbové miesto pre špecifický transkripčný faktor ABF1 a HAP2/3/4/5 komplex, je schopná vytvárať špecifické komplexy s proteínmi prítomnými v bunkovom lyzáte. Na vytvorenie špecifického komplexu je dostačujúca prítomnosť -380/-313 sekvencie obsahujúcej ABF1-väzbové miesto. Prítomnosť HAP2/3/4/5-väzbového miesta nie je k tomu potrebná. Väzba ABF1 faktora bola jednoznačne preukázaná pomocou špecifických protilátok. Navyše sa zdá, že väzba ABF1 na DNA je ovplyvnená fosforyláciou. Proteíny z buniek kultivovaných v prítomnosti rôznych zdrojov uhlíka vytvárajú rozdielny komplex len so sekvenciou obsahujúcou okrem ABF1 aj HAP2/3/4/5 väzbové miesto. Na druhej strane, znížená koncentrácia kyslíka a hému výrazne znižuje schopnosť proteínu(ov) viazať sa na sekvenciu obsahujúcu ABF1-väzbové miesto. Avšak tvorba komplexu v tomto prípade

nie je ovplyvnená prítomnosťou, resp. neprítomnosťou väzbového miesta pre HAP2/3/4/5.

Vzájomné interakcie medzi ABF1 a HAP2/3/4/5 komplexom, prípadne aj inými proteínmi, sme sa v ďalších experimentoch pokúsili sledovať tak, že sme menili vzájomnú polohu jednotlivých väzbových miest.

4.2.2. Vplyv jednotlivých častí promótoru *AAC2* a ich usporiadania na expresiu reportérového génu

Aby bolo možné určiť úlohu topologického usporiadania jednotlivých *cis*-aktivačných sekvencií, fragmenty *UAS_{AAC2}* a ich umelo vytvorené kombinácie boli vnesené pred reportérové gény na centromérnom plazmide a bola sledovaná ich schopnosť ovplyvňovať expresiu reportérových génov. Boli pripravené 4 nové kombinácie fragmentov *UAS_{AAC2}*, pomenované konštrukt A, 16, 25, 62 (obr. 5.8.). Používali sme dva reportérové gény:

1. *AAC3* gén s bazálnym promótorom bez regulačných oblastí (-93/+269) vo fúzii s bakteriálnym *lacZ* génom
2. *AAC3* gén (-93/+1397) s kompletnou kódujúcou sekvenciou a bazálnym promótorom bez regulačných oblastí

Gén *AAC3* je izogénom kódujúcim ADP/ATP prenášač v *S. cerevisiae*. Expresiu reportéra *AAC3/lacZ* bolo možné sledovať meraním aktivity enzýmu β -galaktozidázy. Expresia reportéra *AAC3* sa vyhodnocovala ako schopnosť rastu *aac2* mutantného kvasinkového kmeňa na neskvasiteľných substrátoch.

Najskôr bola testovaná schopnosť jednotlivých konštruktov aktivovať expresiu *AAC3/lacZ* génu za rôznych rastových podmienok ako aktivitu reportérového enzýmu β -galaktozidázy. Pripravené konštrukty na plazmidoch pZA, pZ16, pZ25 a pZ62 boli schopné aktivovať expresiu *AAC3-lacZ* len na úrovni 10-15% aktivity získanej s plazmidom pRSA2A3s. Konštrukty 16, 25 a 62 vykazovali podobnú aktivitu, zvýšenú pri kultivácii na neskvasiteľnom zdroji uhlíka, ktorá však nedosahovala ani pätinu aktivity sekvencie *UAS_{AAC2}*. Na aktiváciu reportérového génu za anaeróbných podmienok nie je prítomnosť bazálneho *AAC3* promótoru spolu s aktivačnou sekvenciou *AAC2* génu dostačujúca.

Pre aktiváciu expresie *AAC3* génu potrebného na prežívanie mutantných buniek na neskvasiteľných substrátoch je v komplexnom médiu postačujúca prítomnosť

tandemu HAP2/3/4/5-väzbovej sekvencie. Znižuje sa ale rýchlosť rastu i rastový výťažok. V syntetickom médiu došlo k 2-3-násobnému spomaleniu rastu všetkých kmeňov (tab. 5.2.). Navyše, okrem celej UAS_{AAC2} iba konštrukt 16 dokázal zabezpečiť aktiváciu AAC3 potrebnú k rastu, aj to len po dobu 4 generácií. Konštrukty 25 a 62 neboli schopné zabezpečiť ani takúto aktiváciu i napriek tomu, že dokázali aktivovať expresiu reportéra AAC3-lacZ.

Z uvedených výsledkov je možné vyvodit' nasledujúce faktory dôležité pre vysokú aktivačnú schopnosť UAS_{AAC2}:

1. *Prítomnosť konsenzus sekvencií pre väzbu faktorov ABF1 a HAP2/3/4/5 komplexu.*
2. *Usporiadanie aktivačnej oblasti.* Väzbová sekvencia ABF1 sa nachádza v smere 5' od HAP2/3/4/5-väzbovej sekvencie.
3. *Vzdialenosť medzi oboma miestami.* V promótoře génu AAC2 je to 47 nukleotidov. Skrátením tejto vzdialenosti dochádza k zníženiu aktivačných schopností aktivačnej sekvencie UAS_{AAC2}.

4.3. Charakterizácia CpAAC1 kódujúceho ADP/ATP prenášača v *Candida parapsilosis*

vo fakultatívne anaeróbnej kvasinke *S. cerevisiae* je ADP/ATP prenášač (AAC) kódovaný tromi génmi, ktorých expresia je precízne regulovaná v závislosti od rastových podmienok [Betina a kol., 1995; Šabová a kol., 1993; Gavurníková a kol., 1996]. Naproti tomu v genómoch aeróbných kvasiniek *Kluyveromyces lactis* a *Schizosaccharomyces pombe* bol nájdený len jeden gén kódujúci ADP/ATP prenášač [Viola a kol., 1995, Couzin a kol., 1996]. Úlohu jednotlivých izoform by pomohla ozrejmiť aj charakterizácia počtu a regulácie AAC génov v netradičných kvasinkách s odlišným energetickým metabolizmom a rastovými vlastnosťami. V literatúre existujú indície, že v striktno aeróbnej kvasinke *Candida parapsilosis* s mimoriadne nízkou fermentačnou kapacitou by mohol existovať viac ako jeden ADP/ATP prenášač [Guerin a kol., 1990]. Preto sme sa rozhodli zistiť, aký je počet génov pre ADP/ATP prenášač v *C. parapsilosis* a ako je regulovaná ich expresia.

Z genomického knižnice *C. parapsilosis* kmeňa SR23 bol izolovaný plazmid Yeplac181/CpAAC1 nesúci gén CpAAC1. Tento plazmid zabezpečil rast buniek *S. cerevisiae* JL-3 na neskvasiteľnom substráte a rast v neprítomnosti kyslíka. JL-3 má deléciu v génoch AAC2 a AAC3, kódujúcich izoenzýmy ADP/ATP prenášača,

dôsledkom čoho nedokáže rásť za anaerobiózy, ani na neskvasiteľných substrátoch. Inzert plazmidu Yeplac181/CpAAC1 bol schopný komplementovať uvedenú dvojitú deléciu, čo znamená, že nesie kompletnú sekvenciu génu ADP/ATP prenášača kvasinky *C. parapsilosis*. Komplementačná schopnosť CpAAC1 za anaerobiózy dokazuje, že hoci CpAAC1 pochádza zo striktne aeróbnej kvasinky s mimoriadne nízkou fermentačnou kapacitou [Šubík a kol., 1974, Guérin a kol., 1989], dokáže prenášať ATP obojsmerne. V mitochondrii nasyntetizované ATP do cytosolu, ako aj v neprítomnosti kyslíka ATP pochádzajúce z glykolýzy do mitochondrie.

Gén *CpAAC1* bol osekvenovaný a z DNA sekvencie bol odvodený otvorený čítací rámec obsahujúci 303 kodónov. Hypotetický *CpAAC1* obsahuje 6 predpokladaných hydrofóbných transmembránových oblastí a má zachovanú tripartitnú štruktúru AAC proteínov [Klingenberg a Nelson, 1994]. *CpAAC1* predstavuje doteraz najkratšiu známu sekvenciu tohto proteínu. Jeho podobnosť s ADP/ATP prenášačmi v kvasinkách je vysoká. Najviac identických aminokyselinových zvyškov má *CpAAC1* s AAC proteínom z *K. lactis* (84%). Najmenej homologickým kvasinkovým ADP/ATP prenášačom je *SpANC1* z *S. pombe* (71%). Zo všetkých doteraz známych kvasinkových ADP/ATP prenášačov je *CpAAC1* najviac homologický s cicavčiami AAC proteínmi. Najvyššiu homológiu má s hovädzou ANT1 izoformou, až 49,7%.

Existencia *CpAAC1* ako jediného génu kódujúceho ADP/ATP prenášač v *C. parapsilosis* bola potvrdená viacerými hybridizačnými experimentami. Po hybridizácii DNA próby obsahujúcej *CpAAC1* gén, či už s genomickou DNA štiepenou restriktívnymi endonukleázami, nepoškodenými chromozómami, alebo celkovou RNA, bolo možné detekovať jediný signál.

Na charakterizáciu úrovne expzie *CpAAC1* génu bola izolovaná celková RNA z buniek kultivovaných za rozličných podmienok a hybridizovaná s fragmentom *CpAAC1* génu. Expzia génu *CpAAC1* je zvýšená v prítomnosti neskvasiteľných substrátov, je nízka pri kultivácii na glukóze a nie je závislá od koncentrácie kyslíka. Regulácia prebieha formou indukcie neskvasiteľným substrátom, a nie represiou glukózou, ako je tomu u génu *AAC2* v *S. cerevisiae*.

5. ZÁVERY

Táto práca sa sústreďuje na štúdium génov kódujúcich ADP/ATP prenášač v kvasinkách.

Gén *AAC2* kóduje hlavný prenášačový proteín vo fakultatívne anaeróbnej kvasinke *Saccharomyces cerevisiae* s prevažujúcim fermentačným metabolizmom. Porovnaním údajov získaných z expresných štúdií a sústredených v databázach sme ho zaradili do synexpresnej skupiny génov kódujúcich proteíny oxidačnej fosforylácie. Regulačná oblasť génu *AAC2* obsahuje väzbové sekvencie pre sekvenčne-špecifické transkripčné faktory ABF1 a HAP2/3/4/5. Študovali sme, akú úlohu hrajú tieto dva faktory v regulácii expresie *AAC2* za odlišných fyziologických podmienok a nakoľko dôležité je topologické usporiadanie pre ich činnosť.

Metódou gélovej retardácie sa *in vitro* podarilo detekovať väzbu bunkových proteínov k -380/-179 aktivačnej oblasti promótoru *AAC2* génu. Tvorba komplexu proteínov s DNA bola silne ovplyvnená fosforylačným stavom proteínov. Experimenty s použitím Abf1 protilátky dokázali prítomnosť ABF1 proteínu v tomto komplexe. Proteíny z buniek kultivovaných v prítomnosti rôznych zdrojov uhlíka vytvárajú rozdielny komplex len so sekvenciou obsahujúcou ABF1- aj HAP2/3/4/5-väzbové miesto. Znížená koncentrácia kyslíka a efektorovej molekuly kyslíkovej signálnej dráhy hému v kultivačných médiách výrazne znižuje schopnosť proteínov takýchto buniek viazať -380/-313 sekvenciu obsahujúcu ABF1-väzbové miesto.

Fragmenty *UAS_{AAC2}* a ich umelo vytvorené kombinácie boli vnesené pred reportérové gény na centromernom plazmide a bola sledovaná ich schopnosť ovplyvňovať expresiu reportérových génov. Z výsledkov týchto analýz boli odvodené nasledujúce faktory dôležité pre vysokú aktivačnú schopnosť *UAS_{AAC2}*:

- prítomnosť konsenzus sekvencií pre väzbu faktorov ABF1 a HAP2/3/4/5 komplexu v aktivačnej oblasti promótoru
 - usporiadanie aktivačnej oblasti - väzbová sekvencia ABF1 sa nachádza v smere 5' od HAP2/3/4/5-väzbovej sekvencie
 - vzdialenosť medzi oboma miestami - v promótoře génu *AAC2* je to 47 nukleotidov
- S prihliadnutím na *in vitro* väzbové analýzy možno konštatovať, že HAP2/3/4/5-väzbová sekvencia je zodpovedná za indukciu aktivácie *AAC2* na neskvasiteľných zdrojoch uhlíka. Vysoká aktivácia *AAC2* génu je ale dosiahnuteľná len synergickým

pôsobením faktorov cez ABF1- a HAP2/3/4/5-väzbové sekvencie. Tieto sa ale musia nachádzať vo vyššie spomenutom usporiadaní.

Candida parapsilosis je striktne aeróbna kvasinka s výlučne oxidačným metabolizmom. Podarilo sa získať sekvenciu *CpAAC1* génu kódujúceho 303 aminokyselín dlhý ADP/ATP prenášač v *C. parapsilosis*. Tento gén dokáže komplementovať dvojitzú mutáciu v génoch *AAC2* a *AAC3* *S. cerevisiae*. V *C. parapsilosis* sa nenachádza iný gén homologický k *CpAAC1*. Jeho expresia je zvýšená v prítomnosti neskvasiteľných substrátov a nie je závislá od koncentrácie kyslíka.

6. LITERATÚRA

Ano, T. a Shoda, M. (1992) Ultra-rapid transformation of *Escherichia coli* by an alkali cation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1505

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. a Struhl, K. (1989) Current protocols in molecular biology. *Green Publishing Associates and Wiley-Interscience*, New York

Betina, S., Gavurníková, G., Haviernik, P., Šabová, I. a Kolarov, J. (1995) Expression of the *AAC2* gene encoding the major mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled at the transcriptional level by oxygen, heme and HAP2 factor. *Eur. J. Biochem.* **229**, 651-657

Boyle, J.S. a Lew, A.M. (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* **11**: 8

Buchman, A. R. a Kornberg, R. D. (1990) A yeast *ARS*-binding protein activates transcription synergistically in combination with other weak activating factors. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 887-897

Camougrand, N., Velours, G. a Guerin M. (1987) The energetic growth yields of the yeast *Candida parapsilosis*. *Biol. Cell* **61**, 171-5

Couzin, N., Trézéguet, V., LeSaux, A. a Laquin, G.J.-M. (1996) Cloning of the gene encoding the mitochondrial adenine nucleotide carrier of *Schizosaccharomyces pombe* by functional complementation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **171**, 113-117

de Winde, J. H. (1992) Global regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ph. D. Thesis*. University of Amsterdam

de Winde, J. H. a Grivell, L. A. (1993) Global regulation of mitochondrial biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* **16**, 51-91

de Winde, J. H. a Grivell, L. A. (1995) Regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **233**, 200-208

- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. a Brown, P. O.** (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686
- Dorsman, J. C. a Grivell, L. A.** (1990) Expression of the gene encoding subunit II of yeast QH2: cytochrome *c* oxidoreductase is regulated by multiple factors. *Curr. Genet.* **17**, 459-464
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. a Botstein, D.** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14863-14868
- Ferea, T.L., Botstein, D., Brown, P.O. a Rosenzweig, R.F.** (1999) Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9721-9726
- Ferková, Z.** (1995) Štúdium mechanizmov transkripčnej regulácie *AAC1* a *AAC2* génov, kódujúcich ADP/ATP translokátor v *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomová práca*. Katedra biochémie PRIF UK, Bratislava
- Gancedo, C. a Serrano, R.** (1989) Energy yielding metabolism. In: *The Yeast* (Rose, A.H. and Harrison, J.S., eds.) Academic Press, London, 205-259
- Gavurníková, G., Šabová, E., Kiššová, I., Haviernik, P. a Kolarov, J.** (1996) Transcription of the *AAC1* gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur. J. Biochem.* **239**, 759-763
- Goncalves, P. M., Griffioen, G., Minnee, R., Bosma, M., Kraakman, L. S., Mager, W. H. a Planta, R. J.** (1995) Transcription activation of yeast ribosomal protein genes requires additional elements apart from binding sites for Abf1p and Rap1p. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1475-1480
- Guarente, L.** (1987) Regulatory proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **21**: 425-452
- Guérin, M., Camougrand, N. M., Caubet, R., Zniber, S., Velours, G., Manon, S., Guelin, E. a Cheyrou, A.** (1989) The second respiratory chain of *Candida parapsilosis*: a comprehensive study. *Biochimie* **71**, 887-902
- Guérin, B., Bukosoglu, C., Rakotomanana, F. a Wohlrab, H.** (1990) Mitochondrial phosphate transport. *N*-ethylmaleimide insensitivity correlates with absence of beef heart-like Cys⁴² from the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transport protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 19736-19741
- Guérin, M. a Camougrand, N. M.** (1994) Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains. *Biochem. Biophys. Acta* **1184**, 111-117
- Hashimoto, M., Shinohara, Y., Majima, E., Hatanaka, T., Yamazaki, N. a Terada, H.** (1999) Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal

region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **1409**, 113-124

Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A.Z., Sluse, F.E. a Vercesi, A.E. (2000) First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett.* **467**: 145-149

Klingenberg, M. a Nelson, D.R. (1994) Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 241-244

Kolarov, J., Kolarova, N. a Nelson, N. (1990) A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**, 12711-12716

Madzak, C., Blanchin-Roland, S., Otero, R. R. C. a Gaillardin C. (1999) Functional analysis of upstream regulating regions from *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiology* **145**,75-87

Mulder, W., Scholten, I. H. J. M. a Grivell, L. (1995) Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* despite similar promoter structures. *Mol. Microbiol.* **17**, 813-824

Niehrs, C. a Pollet, N. (1999) Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* **402**, 483-487

Nosek, J. a Fukuhara, H. (1994) NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J. Bacteriol.* **176**, 5622-5630

Poyton, R. O. (1999) Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. *Resp. Physiol.* **115**, 119-133

Poyton, R. O. a McEwen, J. E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 563-607

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

Schiestl, R.H. a Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acid as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346

Silve, S., Rhode, P. R., Coll, B., Campbell, J. a Poyton, R. O. (1992) ABF1 is a phosphoprotein and plays a role in carbon source control of *COX6* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4197-4208

Šabová, E., Zeman, I., Supek, F. a Kolarov, J. (1993) Transcription control of *AAC3* gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen heme and ROX1 factor. *Eur. J. Biochem.* **213**, 547-553

Šubík, J., Kolarov, J. a Kováč, L. (1974) Anaerobic growth and formation of

respiration-deficient mutants of various species of yeasts. *FEBS Lett.* **45**, 263-266

Trawick, J. D., Kraut, N., Simon, F. R. a Poyton, R. O. (1992) Regulation of yeast *COX6* by the general transcription factor ABF1 and separate HAP2- and heme-responsive elements. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2302-2314

Trézéguet, V., Zeman, I., David, C., Lauquin, G. J.-M. a Kolarov, J. (1999) Expression of the ADP/ATP carrier encoding genes in aerobic yeasts; phenotype of an ADP/ATP carrier deletion mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Acta* **1410**, 229-236

Viola, A. M., Galeotti, C. L., Goffrini, P., Ficarelli, A. a Ferrero, I. (1995) A *Kluyveromyces lactis* gene homologue to *AAC2* complements the *Saccharomyces opl* mutant. *Curr. Genet.* **27**, 229-233

Viola, A. M., Lodi, T. a Ferrero, I. (1999) A *Klaac* null mutant of *Kluyveromyces lactis* is complemented by a single copy of the *Saccharomyces AAC1* gene. *Curr. Genet.* **36**, 29-36

Wright, R. M., Simpson, S. L a Lanoil, B. (1995a) Identification of a low specificity, oxygen, heme and growth phase regulated DNA binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Re. Comm.* **216**, 458-466

Wright, R. M., Simpson, S. L a Lanoil, B. (1995b) Oxygen regulation of the cytochrome *c* oxidase subunit VI gene, *COX6* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Re. Comm.* **216**, 676-685

Zeman, I. (1999) Regulácia expresie ADP/ATP translokátorov v niektorých netradičných druhoch kvasiniek vo vzťahu ku schopnosti anaeróbného rastu. *Dizertačná práca*. Katedra biochémie PRIF UK, Bratislava

Zeman, I. a Kolarov, J. (1997) Expression of genes coding for ADP/ATP translocator in various yeasts. *Folia Microbiol.* **42**, 256-257

7. PÔVODNÉ PRÁCE AUTORKY

Odborné publikácie:

Neboháčová, M., Nováková, Z., Haviernik, P., Betina, S. and Kolarov, J. (1996) Oxygen- and carbon source-dependent transactivation effect of ABF1 on the expression of the *AAC2* gene encoding mitochondrial ADP/ATP carrier. *Folia microbiol.* **41**, 115-116

van Heusden G., P., Neboháčová M., Overbeeke T., L., A. and Steensma H., Z. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae TGL2* gene encodes a protein with lipolytic activity and can complement an *Escherichia coli* diacylglycerol kinase disruptant. *Yeast* **14**, 225-232

Neboháčová, M., Mentel, M., Nosek, J. and Kolarov, J. (1999) Isolation and expression of the gene encoding mitochondrial ADP/ATP carrier (AAC) from the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Yeast* **15**, 1237-1242

Príspevky na konferenciách:

Gavurníková, G., Šabová, E., Betina, S., Neboháčová, M., Kolarov, J. (1995) Molekulárne mechanizmy transkripčnej regulácie AAC génov kódujúcich ADP/ATP translokátor v *Saccharomyces cerevisiae*. XIV. Biochemické dni, Bratislava, Zborník abstraktov

Neboháčová, M., Nováková, Z., Haviernik, P., Betina, S., Kolarov, J. (1995) Oxygen- and carbon source-dependent transactivation effect of ABF1 on the expression of the AAC2 gene encoding mitochondrial ADP/ATP carrier. Proceedings of the 13th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, Třešť, Česká republika

Šabová, E., Betina, S., Gavurníková, G., Neboháčová, M., Haviernik, P., Kiššová, I., Kolarov, J. (1996) Transcriptional regulation of genes encoding ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae*. International Symposium on Cell Components and their Function in Oncogenesis, Smolenice, Zborník abstraktov

Neboháčová, M., Betina, S., Kolarov, J. (1996) The role of transcriptional activators ABF1 and HAP2/3/4/5 in the regulation of expression of the AAC2 gene encoding mitochondrial ADP/ATP carrier. Gene Transcription in Yeast, Acquafredda di Maratea, Taliansko, Zborník abstraktov

Neboháčová, M., Mentel, M., Nosek, J. and Kolarov, J. (1998) Cloning of the gene encoding the mitochondrial ADP/ATP carrier of *Candida parapsilosis*. 16th SMYTE, Častá-Papiernička, *Folia Microbiol.* **44**, 231-232

Neboháčová, M., Horská, A., Betina, S. a Kolarov, J. (1998) *In vitro* and *in vivo* analysis of *cis*-activating sequences within the promoter of AAC2 gene *Saccharomyces cerevisiae*. XVI. Biochemický zjazd, Stará Lesná, *Chemical papers* **52**, 283

SUMMARY

Genes encoding a mitochondrial ADP/ATP carrier (AAC) in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida parapsilosis* were investigated.

AAC2 is coding for the major AAC isoform in *S. cerevisiae*. We suggest that AAC2 is a member of a synexpression group of genes encoding oxidative phosphorylation proteins. Within our previous studies on the regulation of the AAC2 transcription an UAS (-393/-268) was identified that is essential for the expression of this gene. Two functional regulatory *cis*-elements are located within this UAS - binding sites for an ABF1 factor and for HAP2/3/4/5 heteromeric complex. We examined

relative contributions and mutual interactions of the ABF1 and HAP2/3/4/5 factors in the activation of transcription from the UAS of the *AAC2* gene. The whole UAS was dissected into smaller subfragments and tested for (i) the ability to form DNA-protein complexes with cellular proteins *in vitro*, (ii) the ability to confer heterologous expression using *AAC3* gene lacking its own promoter, and (iii) the expression of *AAC3-lacZ* fusion instead of intact *AAC3* gene. The obtained results demonstrated that:

- a) The whole UAS as well as subfragment containing only ABF1-binding site are able to form DNA-protein complexes with cellular proteins in oxygen- and heme-dependent manner. The experiments with antibody against the ABF1 showed that the ABF1 factor is one of the proteins binding to *AAC2* promoter. We have been unsuccessful to prove the binding of cellular proteins to the HAP2/3/4/5-binding site. However, the presence of HAP2/3/4/5-binding site is necessary to drive a binding of cellular proteins to the ABF1-binding site in carbon source-dependent manner.
- b) The presence of both ABF1- and HAP2/3/4/5-binding sites and original spacing between them is necessary to confer the growth of $\Delta aac2$ mutant strain on non-fermentable carbon source when put in front of *AAC3* gene introduced on centromeric vector to $\Delta aac2$ mutant strain.
- c) For the activation of *AAC3-lacZ* expression on both fermentable and non-fermentable carbon sources the only presence of two copies of HAP2/3/4/5-binding site is sufficient. However, activation of *AAC3-lacZ* expression by two copies of HAP2/3/4/5-binding site is very low.

We can conclude that the presence of both ABF1- and HAP2/3/4/5-binding sites and original spacing between them is necessary to get strong activation of *AAC2* gene.

A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* *AAC* genes coding for mitochondrial ADP/ATP carriers has been cloned from pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. The cloned gene was sequenced and found to encode a polypeptide of 303 amino acids that shows homology with other yeast and mammal mitochondrial ADP/ATP carriers. The gene was designed *CpAAC1* and was able to complement the growth phenotype of *S. cerevisiae* double deletion mutant ($\Delta aac2\Delta aac3$). The expression of the *CpAAC1* gene was affected at normal aerobic conditions by the nature of carbon source used for growth. The concentration of oxygen had no effect to the expression of this gene. Hybridization experiments indicate that *C. parapsilosis* possesses a single gene encoding a mitochondrial ADP/ATP carrier.