Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie

Produkce amoniaku koloniemi mutantů a stárnutí strukturovaných kolonií *Saccharomyces cerevisiae*

Jana Nedbálková

Praha 2010

vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Blanka Janderová, Csc.

RNDr. Blanka Zikánová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a pouze s použitím citované literatury.

1. května 2010

Tato práce vznikla v letech 2008-2010 a spadá do řešení grantových projektů Centrum GAČR, č. 204/08/0718 a MŠMT, LC531.

Chtěla bych vyjádřit své poděkování všem, kteří mi při zpracovávání diplomové práce pomáhali. Především bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Blance Janderové CSc. a RNDr. Blance Zikánové, pod jejichž vedením tato práce vznikla, nejen za odborné vedení a všestrannou pomoc, ale i trpělivost a důvěru, kterou mi dodávaly po celou dobu mé práce.

Rovněž bych velmi ráda poděkovala všem členům Laboratoře biologie kvasinkových kolonií za jejich přátelskou pomoc a čas, který mi vždy věnovali. Paní Bohdance Maišaidrové děkuji za technickou pomoc v laboratoři.

Ráda bych také poděkovala své rodině, za jejich podporu a pomoc, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

Production of ammonia by the colonies of mutants and aging of wrinkled colonies of *Saccharomyces cerevisiae*

The aim of this diploma thesis is to observe the development, respectively the aging of cells in yeast colonies *Saccharomyces cerevisiae.* Yeast cells *S. cerevisiea* form multicellular organized structures on a solid substrate, i.e. colonies, which the intercellular interactions occur in. These interactions influence forming, morphology and aging of yeast colonies. This diploma thesis is focused partly on the changes in ammonia production by giant colonies of deletion mutants and partly on the aging of colonies with the wrinkled morphology.

I characterized mutant strains of *S. cerevisiae* with the deletion in *RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2* genes. Their products play an important role in the colony development. The transcription of these genes changes during the transition from the acidic to alkali phase during developmental process of the colonies. I have found out that the ammonium production rate was in accordance with the results of the alkalization in giant colonies surroundings and mentioned mutants derived from the BY strain has been producing ammonia since the 15th day. The rate of the ammonia production by rtg3Δ strain was comparable to the parental strain. Compared to parental strain, lower production was discovered in fis1Δ, rtg1Δ and rtg2Δ. In contrast to it, the production of ammonia was higher in the cit2 strain.

I prepared *S. cerevisiae* ΣS^h strains where *GUT1* and *SMI1/KNR4* genes expressed in the exponential phase of the growth in the liquid culture and *SSA3* a *HSP30* genes expressed in the stationary phase of the growth was marked by the GFP (green fluorescent protein) gene. The development of the yeast colonies with the wrinkled morphology was observed in above mentioned strains. It was discovered that the gene expression occurs in the appropriate phase of the growth in the liquid culture. Based on the induction of fused fluorescent proteins in cells taken from the defined parts of the colony it was proved that older cells are located mainly on the top of the colony while the younger cells are located mainly along the border of the colony and in the middle of the bottom part of the colony. The presence of dead cells in the *S. cerevisiae* ΣS^h strain growing on a agar containing BKP indicator was also observed. Dead cells were not proved in colonies however the presence of reactive oxygen radicals was confirmed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ammonia production, gene expression, colony development, apoptotic features.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, produkce amoniaku, genová exprese, vývoj kolonií, apoptotické znaky.

Seznam použitých zkratek 10
1. ÚVOD 11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 12
2.1 Morfologie a vývoj kvasinkových kolonií 12
2.2 Komunikace mezi kvasinkovými koloniemi 16
2.3 Amoniaková signalizace a změny pH v kvasinkových koloniích 16
2.3.1 Funkce amoniaku a amonných transportérů 18
2.3.2 Účinek aminokyselin a změny metabolismu při přechodu kolonií z kyselé k alkalické fázi 20
2.4 Retrográdní signalizace 21
2.5 Mitochondriální geny *Saccharomyces cerevisiae* 23
2.6 Geny exprimované v exponenciální fázi růstu *Saccharomyces cerevisiae* 26
2.6.1 Gen *GUT1*, enzym Gut1p 26
2.6.2 Gen *SMI1/KNR4*, protein Smi1/Knr4 30
2.7 Geny exprimované ve stacionární fázi růstu *Saccharomyces cerevisisae* 34
2.7.1 Gen *SSA3*, protein Ssa3 35
2.7.2 Gen *HSP30*, protein Hsp30 38
2.8 Zelený fluorescenční protein Gfp 42
3. MATERIÁL A METODY 44
3.1 Materiál 44
3.1.1 Použité mikroorganizmy 44
3.1.2 Přístroje 45
3.1.3 Kultivační média 46
3.1.3.1 Tekutá média 47
3.1.3.2 Pevná média 47
3.1.4 Roztoky 49
3.1.4.1 Jednoduché roztoky 49
3.1.4.2 Složené roztoky 51
3.1.5 Antibiotika 51
3.1.6 Barevné indikátory 51
3.1.7 Ostatní 52
3.1.8 Materiál pro práci s DNA 52
3.1.9 Plazmid a primery 52
3.1.10 Počítačové databáze a programy 55
3.2 Metody 56
3.2.1 Sterilizace 56

3.2.2 Uchovávání zásobních kultur 56
3.2.2.1 Krátkodobé skladování 56
3.2.2.2 Dlouhodobé skladování 56
3.2.3 Stanovení počtu buněk 56
3.2.4 Stanovení růstové křivky a optické denzity (OD) 57
3.2.5 Kultivace mikroorganizmů 57
3.2.5.1 Kultivace v tekutém médiu 57
3.2.5.2 Kultivace na pevném médiu 57
3.2.5.3 Výsevy monokolonií 57
3.2.5.4 Výsevy obřích kolonií 57
3.2.6 Fotografování kvasinkových kolonií a mikroskopických preparátů 58
3.2.7 Příprava řezů koloniemi 58
3.2.8 Barvení ROS 59
3.2.9 Stanovení amoniaku 59
3.2.10 Amplifikace DNA úseku z plazmidu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) 60
3.2.11 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)-ověřovací 61
3.2.12 Izolace chromozomální DNA z kvasinek 62
3.2.13 Horizontální elektroforéza v agarozovém gelu 63
3.2.14 Transformace kvasinek – LiAc/ssDNA/PEG METODA 63
3.2.14.1 Příprava buněk 63
3.2.14.2 Transformace buněk 63
3.2.15 Mikromanipulace 64
3.2.16 Průtoková cytometrie 64
4. VÝSLEDKY 65
4.1 Produkce amoniaku obřími koloniemi kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742α a alkalizace média v okolí rostoucích kolonií 65
4.2 Sledování vývoje kolonií *S. cerevisiae* ΣSh, výběr genů exprimovaných v exponenciální a stacionární fázi růstu 68
4.2.1 Příprava kazet pro transformaci 68
4.2.1.1 Návrh primerů 69
4.2.1.2 Příprava kazety s *GFP* genem pomocí PCR 70
4.2.2 Příprava kmenů s GFP 71
4.2.2.1 Citlivost *S. cerevisiae* ΣSh ke G418 72
4.2.2.2 Transformace 73
4.2.2.3 Ověření exprese GFP a ověření rezistence na kanamycin 73
4.2.2.4 Izolace monokoloniových izolátů a ověření exprese GFP 75

4.2.2.5 Ověření integrace genu GFP 76
4.2.3 Sledování exprese genů v tekutém glycerolovém médiu 78
4.2.4 Sledování exprese genů v koloniích 85
4.2.5 Sledování exprese genů v různých částech kolonií 104
4.2.6 Exprese genů v koloniích sledovaná průtokovým cytometrem 117
4.2.7 Výskyt apoptotických znaků v monokoloniích 123
4.2.7.1 Výskyt mrtvých buněk v kvasinkové kolonii 123
4.2.7.2 Výskyt radikálů oxidativního stresu (ROS) 130
4.2.8 Sledování exprese genů v obřích koloniích 132
5. DISKUZE 145
6. SOUHRN 154
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY 156

Seznam použitých zkratek

AMK	aminokyseliny
BKP	bromkresolový purpur
bp	páry bazí (base pair)
DHE	dihydroethidium
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidiumbromid
EtOH	etanol
Gfp	zelený fluorescenční protein
GM	glycerolové médium
G418	geneticin
kDa	tisíc daltonů
LiAc	octan lithný
NCR	katabolická represe dusíku (nitrogen catabolite represion)
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetezová reakce
PEG	polyethylenglykol
SDS	dodecylsulfát sodný
STRE	elementy v promotorové oblasti (stress responsive element)
ssDNA	jednořetězcová DNA
TBE	Tris-borátový pufr
TOR	protein kináza Tor
YEPG	komplexní glukózové médium
ROS	radikály oxidativního stresu (reactive oxygene species)
RTG	retrográdní odpověď (reactive oxygen species)

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá tématem, řešeném Laboratoří biologie kvasinek Katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze za podpory grantu GAČR, č. 204/08/0718 a MŠMT, LC531 Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek.

Kvasinkové buňky patří mezi jednobuněčné organizmy tvořící na pevném médiu kolonie jako organizované struktury složené z mnoha buněk, specifické pro daný druh i kmen. Vzhledem k tomu, že kvasinkové buňky jsou nepohyblivé, je výsledná morfologie kolonie dána hlavně buněčným dělením. Lze proto předpokládat existenci řady mezibuněčných signálů a interakcí, určující polaritu růstu a lokalizaci dělících se buněk v kolonii (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003).

Kromě komunikací mezi buňkami v kolonii byla pozorována signalizace na dlouhou vzdálenost, kdy dochází ke komunikaci mezi jednotlivými kvasinkovými koloniemi. Signální molekulou je amoniak, který je v průběhu růstu a vývoje kolonií uvolňován v pulzech (PALKOVÁ *et al.* 1997).

V průběhu růstu *S. cerevisiae* v tekuté kultuře se výrazně mění exprese jednotlivých genů. Geny exprimované v exponenciální fázi růstu jsou potlačeny a dochází k expresi genů, které napomáhají kvasinkám přežít období hladovění ve fázi stacionární. Na základě těchto znalostí je možné expresi genů sledovat také v koloniích, a zaznamenat tak proces stárnutí buněk v kolonii.

Má práce se skládá ze dvou částí. První část se věnuje charakterizaci mutantních kmenů *S. cerevisiae*, s delecí v genech *RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2* jejichž produkty hrají významnou roli ve vývoji respektive stárnutí kolonie, jejichž transkripce se mění v průběhu vývoje kolonií, při přechodu z acidické do alkalické fáze. Sledovala jsem vývoj obřích kolonií kmene *S. cerevisiae* BY4742α a delečních mutantů z hlediska produkce amoniaku a alkalizace média.

Ve druhé části práce jsem připravila kmeny *S. cerevisiae* ΣS^h, u kterých jsem s pomocí genu GFP pro zelený fluorescenční protein označila geny *GUT1* a *SMI1/KNR4*, které se exprimují v exponenciální fázi růstu a geny *SSA3* a *HSP30,* které se exprimují ve stacionární fázi růstu v tekuté kultuře. U těchto kmenů jsem sledovala vývoj a stárnutí buněk v kvasinkových koloniích s výraznou zvrásněnou morfologií.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Morfologie a vývoj kvasinkových kolonií

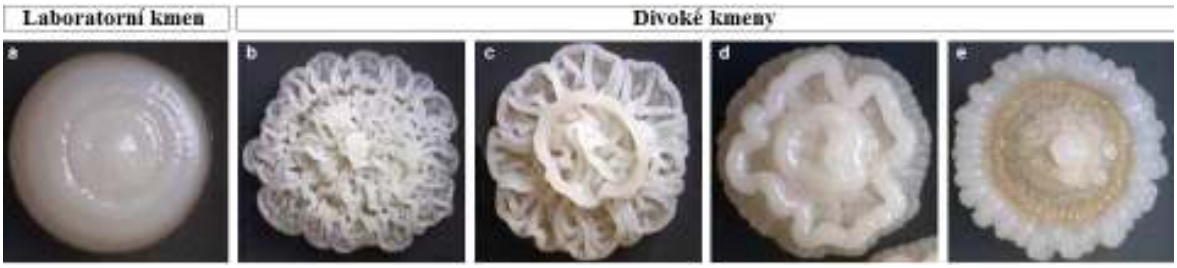
Studie mnohobuněčného chování mikroorganizmů dosáhly v posledních letech významných pokroků. U různých mikroorganizmů byla prokázána tvorba mnohobuněčných struktur, schopnost mezibuněčné komunikace, diferenciace a také prostorové organizace v rámci vícebuněčných populací (KAISER 1999).

Je obvyklé dělit organizmy do dvou základních kategorií: jednobuněčné a mnohobuněčné. Při pozorování jednobuněčných organizmů, žijících v přírodních podmínkách, můžeme vidět jejich schopnost tvořit mnohobuněčné struktury, jako jsou biofilmy, kolonie a plodnice (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Bakterie a kvasinky vytvářejí v přírodě mnohobuněčná společenství, která jim ve srovnání s individuálně se vyskytujícími buňkami umožňují výrazně zvýšit pravděpodobnost přežití (COSTERTON *et al.* 1995). Buňky v mnohobuněčné populaci mají více příležitostí jak získávat informace z okolního prostředí, interagovat mezi s sebou navzájem a diferencovat. Například kvasinkové kolonie jsou schopny produkovat signální molekuly jako je amoniak (viz kap. 2.3). Výskyt komunikace u mnoha druhů mikroorganizmů jednoznačně prokazuje, že mnohobuněčné chování je obecnou vlastností, umožňující účinnější kolonizace okolního prostředí a ochranu proti nepříznivým podmínkám prostředí (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003).

Morfologie kvasinkových kolonií do určité míry odráží morfologii buněk, ze kterých jsou kolonie složeny. Růst a morfologie kvasinek závisí na faktorech prostředí, jako je dostatečné množství živin, kyslíku a na množství buňkou vyprodukovaných metabolitů (GIMENO *et al.* 1992). Kvasinkové druhy v závislosti na těchto vnějších podmínkách tvoří několik základních typů buněk. Buňky kulatého až oválného tvaru, vznikající v průběhu standardního buněčného cyklu (např. u *S. cerevisiae*). Poté co buňka dosáhne kritické velikosti, zahájí tvorbu nové buňky – pupene. K tvorbě pupene, dochází poté, kdy buňka projde fází startu, který je na rozhraní G1 a S fáze buněčného cyklu. Přestože vzniklý pupen roste až do cytokineze a velikost mateřské buňky se již nemění, nově vzniklá buňka bývá po oddělení menší než buňka mateřská. Pro dosažení kritické

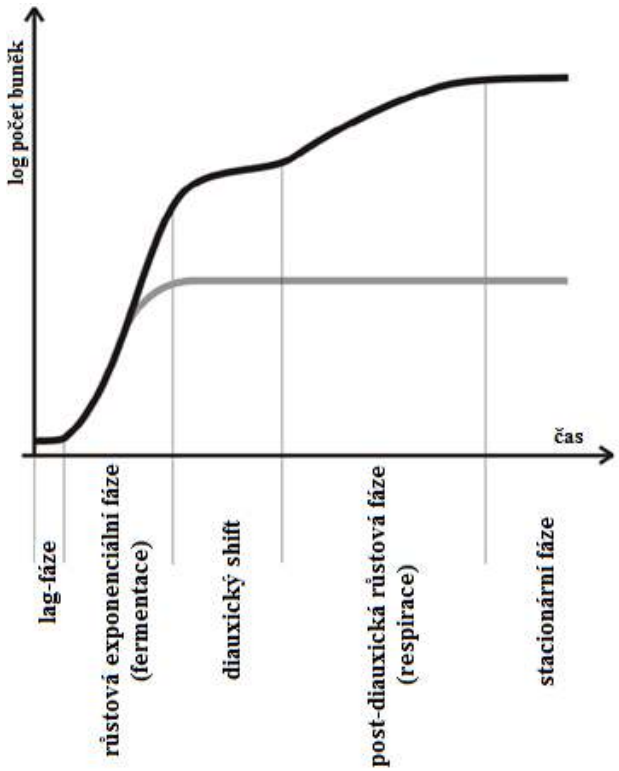
velikosti nově vzniklé buňky, zahájení dalšího pučení a replikace DNA, dochází k prodlužování G1 fáze oproti trvání G1 fáze v mateřské buňce (HARTWELL a UNGER 1977). Při růstu kvasinek například s limitovaným množstvím dusíku, dochází ke změnám v buněčném cyklu a tvorbě pseudohyf, což jsou řetězce prodlužovaných buněk, kdy nedochází po vypučení dceřiné buňky k jejímu oddělení od buňky mateřské, a hyf, které vznikají dělením buněk, kdy přepážky tvoří ve vrcholové části rostoucího vlákna (GIMENO *et al.* 1992). U *Candida albicans*, významného lidského patogena, bylo zjištěno, že vzhled kolonie je úzce spojen s morfologií buněk. U hladkých kolonií byla prokázána přítomnost klasických kvasinkových buněk, ale i u takzvaných „zvrásněných" kolonií byly prokázány převážně pseudohyfy i pravé hyfy (RADFORD et al. 1994). V koloniích s extrémně strukturovanou morfologií byly pozorovány především pseudohyfy. Strukturovaná kolonie vzniká v závislosti na typu buněk v kolonii, může tvořit buňky jednoho typu, nebo může vznikat jako důsledek kombinace několika typů buněk, což se projevuje odlišnou morfologií kolonií (BRAUN a JOHNSON 2000).

Laboratorní kmeny *S. cerevisiae* při kultivaci na bohatých médiích tvoří převážně hladké kolonie (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). „Divoké" kmeny *S. cerevisiae,* izolované z přírody a kultivované na médiích s 3% glycerolem, vytváří kolonie s morfologií zvrásněnou (KUTHAN *et al.* 2003). Takovou morfologii lze ale pozorovat i u některých laboratorních kmenů při kultivaci za určitých podmínek. Například u kolonií *S. cerevisiae* ΣS^{h} se zvrásněnou morfologií, dochází k tvorbě shluků, které jsou složeny z protáhlých buněk – pseudohyf a na kolonii se vytvářejí útvary podobné střevům či špagetám (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2005).



Obr. 1: *Srovnání bohaté morfologie divokých kmenů a hladkého laboratorního kmene S.cerevisiae (Převzato podle Palková 2004).*

Růst a stárnutí kvasinkových buněk je dobře popsán v tekutém médiu bohatém na glukózu při optimálních podmínkách, kde jsou rozlišovány tři základní růstové fáze: logaritmická, post-diauxická a stacionární (Obr. 2). Během exponenciální fáze se buňky velmi rychle dělí, energii získávají fermentací, kdy je glukóza přednostně metabolizována glykolýzou na nezkvasitelný zdroj uhlíku, zejména etanol. Po vyčerpání glukózy přizpůsobí kvasinky svůj metabolismus k utilizaci nezkvasitelného zdroje uhlíku, přítomného v médiu (převážně etanolu). Buňky přestávají rychle růst. Tento přechod se nazývá diauxický shift, po němž následuje post-diauxická fáze růstu, kdy se buňky jednou nebo dvakrát rozdělí. Po vyčerpání všech nezkvasitelných zdrojů uhlíku dojde k úplnému zastavení proliferace a buňky se nacházejí ve stacionární fázi (SWINNEN *et al.* 2006).



Obr. 2: *Růstová křivka: černá – růst na fermentovatelném zdroji uhlíku, šedivá – na nefermentovatelném zdroji uhlíku. (Převzato podle SWINNEN et al. 2006).*

Jedním z hlavních rozdílů růstu v tekuté kultuře a na pevném podkladě je dostupnost živin. Zatímco v tekutém médiu dochází po celou dobu kultivace k rovnoměrnému rozložení živin, na pevném povrchu se v průběhu růstu kolonie vytváří gradient živin a v pozdějších fázích růstu dochází k postupnému hromadění buněk, takže nejsou všechny v přímém kontaktu se živinami (MEUNIER a CHODER 1999). Podobně jako v tekuté kultuře dochází na pevném povrchu k růstu kolonií *S. cerevisiae* minimálně

ve dvou základních fázích. Exponenciální fáze je obdobná jako v tekuté kultuře, kdy dochází k intenzivnímu dělení buněk. Druhá fáze vývoje kolonie je poznamenaná dříve vzniklým gradientem živin a metabolitů, a dochází v ní k zastavení dělení buněk uprostřed kolonie (buňky vstupují do stacionární fáze). Dále se dělí jen buňky na periferii, kde mají lepší přísun živin (MEUNIER a CHODER 1999). V tekuté kultuře také dochází ke zpomalení růstu, ale většina buněk se nadále dělí. Přechod z první do druhé růstové fáze na pevném podkladě zjevně není oddělen tzv. diauxickým shiftem, tj. přechodem mezi anaerobním a aerobním metabolismem tak, jak je tomu v tekuté kultuře (MEUNIER a CHODER 1999). V průběhu vývoje kolonií *S. cerevisiae* začíná docházet k výrazným změnám jak v buněčné morfologii, tak v organizaci vícebuněčné populace. V počátcích vývoje kolonie po dobu dostatečného množství živin se buňky *S. cerevisiae* vyvíjejí nezávisle jedna na druhé. V průběhu růstu kolonie, kdy se živiny pro některé buňky stávají hůře dostupné, dochází ke koordinaci buněčného dělení a vývoje celé buněčné populace (MEUNIER a CHODER 1999). Mladé kvasinkové kolonie jsou tvořeny populací buněk s hladkými buněčnými stěnami, které jsou od sebe relativně vzdálené. U starších kolonií dochází k zdrsnění buněčných stěn, zmenšuje se vzdálenost mezi jednotlivými buňkami a celkové uspořádání se jeví jako více organizované. Rozdíly v organizaci jsou patrné i mezi středem a okrajem kolonie. Se vzrůstajícím stářím kolonie je střed více organizován, zatímco na okraji s dostatkem živin zůstává uspořádání nahodilé a množství množících se buněk je výrazně vyšší na okraji než ve středu kolonie (VARON a CHODER 2000). Experimenty na obřích koloniích, rostoucích z kapky suspenze buněk prokázaly, že vlivem nedostatku živin dochází k metabolickým změnám, mající za následek apoptotickou smrt buněk lokalizovaných v centru kolonie, což poskytuje živiny pro růst buněk v okrajových částech kolonie, a také potvrzuje existenci regulované buněčné smrti v kvasinkách. Odstranění středové části kolonie vedlo k redukci růstu kolonie na okraji (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005).

Kvasinkové buňky vstupují do stacionární fáze vlivem mnoha stresových faktorů, jedním z nich je i oxidativní stres. Oxidativní stres vzniká působením oxidantů, které narušují redoxní rovnováhu v buňce. Hlavními oxidanty vyvolávajícími oxidativní stres za fyziologických podmínek jsou tzv. ROS – reactive oxygene species. Hlavním zdrojem buněčných ROS jsou mitochondrie (CADENAS a DAVIS 2000). Celoživotní produkce ROS jako vedlejších produktů oxidačního metabolismu má za následek hromadění chyb v DNA a poškození bílkovin (SALVIOLI *et al.* 2001). Aerobně rostoucí kultura, u které ke

vzniku ROS dochází, je schopna poškození oxidanty opravit, kdežto starší buňky nikoli. ROS jsou považovány za jeden z typických znaků apoptózy signalizující stárnutí kolonie.

2.2 Komunikace mezi kvasinkovými koloniemi

Jedna z výhod vyšších mnohobuněčných organizmů je jejich schopnost komunikovat mezi sebou prostřednictvím výměny signálů na dlouhou vzdálenost, a tím se vzájemně ovlivňovat. Mechanismus komunikace zahrnuje chemické signály (například feromony hmyzu), akustické signály (komunikace savců akustickými signály) a optické signály (medúza *Aequorea aequorea*, hmyz). Důležitost signálu pro synchronizovanou odpověď mikroorganizmů na enviromentální změny byla popsána u bakterií jako takzvaný "quorum sensing", umožňující kontrolovat hustotu jednotlivých buněk a koordinovaně reagovat na změnu výživové hladiny (MATSUHASHI *et al.* 1995). Signál reguluje různé fyziologické procesy zahrnující bioluminiscenci, plazivý růst bakterií, syntézu antibiotik a virulentní determinanty v patogenních bakteriích (MILLER a BASSLER 2001). Nejlépe pochopenou signální molekulou u gram negativních bakterií jsou N-acetyl-hemoserin laktony (AHL), které jsou rozšířeny po celé bakteriální říši a jsou zodpovědné za regulaci vývoje celé řady různých fenotypů. Tyto signály jsou obvykle specifické pro jednotlivé mikroorganizmy (LAZAZZERA 2000). U bakterií bylo popsáno mnoho dalších signálních molekul rozmanitého chemického složení. Poslední dobou bylo pozorováno koordinované chování na vzdálené signály nejen mezi jednotlivými mikroorganizmy, ale také mezi jejich mnohobuněčnými strukturami. Byla zjištěna existence ultrazvukové signalizace mezi bakteriálními koloniemi (MATSUHASHI *et al.* 1995) a chemické signály mezi kvasinkovými koloniemi (PALKOVÁ *et al.* 1997).

2.3 Amoniaková signalizace a změny pH v kvasinkových koloniích

Jedny z prvních studií o vývoji kolonií různých kvasinkových druhů odhalily, že jednotlivé kolonie periodicky vykazují změny chování, změny pH jejich okolí z acidické fáze po alkalickou fázi a naopak (PALKOVÁ *et. al.*1997). Bylo zjištěno, že kromě krátké

komunikace mezi buňkami, kvasinkové kolonie vykazují signály na dlouhé vzdálenosti mezi koloniemi (PALKOVÁ *et. al.*1997). Při vývoji kvasinkových kolonií hraje velmi důležitou roli amoniak působící jako signální molekula na velkou vzdálenost mezi koloniemi. Produkce amoniaku probíhá v pulsech. První puls alkalizace se objevuje brzy po nanesení kultury a pomine do 24 hod. Poté následuje fáze acidická, kdy je médium v okolí kolonie okyselováno. Po určité době dochází k přechodu do neutrální fáze, po které následuje fáze alkalická. Bylo zjištěno, že druhý alkalický puls je zvýšený a je orientován směrem k sousedním koloniím. Amoniakový signál má za následek přechodnou inhibici čelních okrajů ze sousedních kolonií, a následkem tohoto asymetrického růstu jsou kolonie rozšiřovány k volné oblasti. Po jejím odeznění dochází k nové acidické fázi a po ní opět k alkalické. Alkalizace média v okolí kolonie je způsobena právě produkcí amoniaku, kdy kvasinková kolonie rostoucí na komplexním agarovém médiu s glycerolem (GM médium) a vysokou koncentrací Ca_2^+ iontů vytvářejí komunikační zóny orientované od jedné kolonie ke druhé (PALKOVÁ *et al.* 1997). Druhý amoniakový signál tedy není konečným stádiem vývoje kolonie. Kolonie může vstoupit do další kyselé fáze, která by mohla být následována 3. pulsem amoniakové produkce. Celkový počet amoniakových pulsů závisí na prostoru a živinách, které jsou dostupné (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Indukce metabolických změn vedoucích k intenzivní amonné produkci, je relativně rychlý proces (několik hodin) mající za následek přepnutí celé populace kolonie k fázi produkující amoniak s přechodnou inhibicí růstu (PALKOVÁ a FORTOVÁ 2000). Toto chování se zdá být univerzální a je rozšířené u řady kvasinek, zahrnující kvasinky rodů např. *Saccharomyces, Candida, Kluyveromyces, Hansenula* a jiné. (PALKOVÁ *et al.* 1997). Kolonie různých kvasinkových druhů, které dosáhnou fáze produkce amoniaku dříve, navodí amoniakovou odezvu v koloniích dalších druhů rostoucích v jejich blízkosti. Tyto výsledky potvrzují univerzální amoniakovou signalizaci a ukazují, že bez ohledu na jejich taxonomickou pozici, jsou kvasinkové kolonie schopné synchronizovat svůj růst (PALKOVÁ a FORTOVÁ 2000). Bylo prokázáno, že nejen kvasinky, ale i další organizmy včetně savců používají amoniak jako signální molekulu. Základem je zvýšení autoindukce signální komponenty, které může být dosaženo zvýšením množství indukovaných buněk v kolonii. Tato populace může měnit své chování, což představuje obrovskou výhodu v přírodních podmínkách (PALKOVÁ a VACHOVÁ 2003).

2.3.1 Funkce amoniaku a amonných transportérů

V zásadě jsou 2 hlavni zdroje amoniaku/amonného iontu v kvasinkových buňkách. Buď je amonný iont importovaný do buněk ze svého okolí, nebo je amonný iont uvolněný během katabolismu a transaminace z aminokyselin (PALKOVÁ a VACHOVÁ 2003).

NH_3 - amoniak je všudypřítomný ve vodě rozpustný plyn, který je významnou živinou. Nenabitá forma NH_3 může proniknout přes fosfolipidovou membránu prostou difuzí, ale pro jeho nabitou formu, amoniový kationt NH_4^+, je membrána téměř nepropustná (HEITMAN a ARGE 2000). NH_4^+ je hlavním zdrojem dusíku u bakterií a hub, ale také pro většinu rostlin (MARINI *et al.* 2000). Pokud organizmus přijímá dusík ve formě NH_4^+, vyžaduje tento proces přítomnost vhodného transportéru. Byla identifikována řada transportních proteinů, které jsou schopné transportu amonných iontů do buňky, jako jsou například Mep/Amt rodiny (Mep-methylamonium permease, Amt-ammonium transporter) (MARINI *et al.* 1997).

Absorpci amonných kationtů zajišťují v kvasince *S. cerevisiae* tři plazmatické membránové transportní proteiny Mep1p, Mep2p a Mep3p, které se z hlediska transportu amonného kationtu navzájem liší v kinetických vlastnostech. Svůj název, methylamoniumpermeázy, získaly tyto proteiny pro svoji schopnost transportovat methylovaný kationt, analog NH_4^+. Sekvenčně jsou Mep transportéry velmi podobné. Hlavní funkcí Mep transportérů je získávat NH_4^+ z okolí buňky, kdy každý Mep protein je sám o sobě NH_4^+ transportérem (MARINI *et al.* 1997, 2000). Mep2 permeáza, kromě schopnosti transportovat amonný iont, také funguje jako senzor pro tvorbu signálu, který řídí filamentární růst v odpovědi na extracelulární koncentraci amonného iontu (na hladovění). Bylo zjištěno, že produkce amoniaku v kvasinkových koloniích není závislá na externím amonném iontu a na absorpci amonného iontu permeázou Mep1p (PALKOVÁ *et al.* 1997). Změny ve vnější koncentraci amonného iontu nemají významný vliv na amoniakové pulsy v koloniích. Pravidelná produkce amoniaku kmene *S. cerevisiae* defektního v Mep permeázách (včetně Mep2p) se neliší od produkce v rodičovském kmeni. Nebyl zjištěn účinek změny exprese z *GPA2* genu na amoniakovou produkci v koloniích. Transportéry amonného iontu do buňky se nezdají být důležité pro amoniakovou signalizaci v kvasinkových koloniích (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002) a je tedy nepravděpodobné, že externí amonný iont je užívaný jako zdroj pro produkci amoniaku v kvasinkových koloniích (PALKOVÁ *et al.* 1997).

Bylo prokázáno, že Ato proteiny (ammonium transport outward) mají roli v amoniakové signalizaci u *S. cerevisiae*. Ato1p, Ato2p a Ato3p proteiny patří do rodiny transportních proteinů. Tyto proteiny jsou navzájem vysoce homologní. Ato proteiny jsou lokalizované v plazmatické membráně a jejich exprese koreluje se začátkem alkalické fáze. Exprese *ATO* genů je tedy řízena amoniakem. Delece každého ze 3 genů má za následek snížení produkce amoniaku koloniemi a tomu také odpovídá navrhovaná role Ato proteinů - jako exportního systému pro amonné ionty. Bylo také zjištěno, že kolonie kmene defektního v Sok2p, transkripčního faktoru, nedostatečně navodí expresi *ATO* genů (ŘIČICOVÁ *et al.* 2007). Buňky ze starých kolonií *S. cerevisiae* sok2, defektní pro Sok2p, nejsou schopné uvolnit dostatečné množství amoniaku z buněk ven. Jsou více křehké než buňky z nemutovaných kvasinkových kolonií a vykazují defekt v životaschopnosti kolonie. Kolonie s delecí sok2 genu nejsou schopné efektivně zapnout geny pro adaptivní metabolismus a mají nesouměrnou aktivaci různých enzymů spojených s buněčnou ochranou proti poškození. Zhoršený aminokyselinový metabolismus a nedostatečná aktivace genů pro údajný export amonných iontů, může být zodpovědný za pozorované defekty v produkci amoniaku. *SOK2* gen se zdá být důležitým regulátorem *S. cerevisiae* při vývoji kolonií (VÁCHOVÁ *et al*. 2004, VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005).

Jeden z *ATO* genů, *ATO3*, není pod přímou kontrolou genů rtg dráhy, ale reaguje na ni (GUARAGNELLA a BUTOW 2003). Vlastní exprese *ATO3* genu je pod kontrolou Gcn4p, transkripčního faktoru, který je součástí SPS aminokyselinového senzoru (FORSBERG et al. 2001). *ATO3* v ρ^0 petit buňkách pomáhá předcházet toxickým účinkům nadbytku amoniaku, který by mohl v respiračně deficientních buňkách vznikat jako důsledek možného defektu v asimilaci amoniaku (GUARAGNELLA a BUTOW 2003). Závislost exprese *ATO3* genu na SPS systému je v souladu se zjištěním, že produkce amoniaku u kolonií kmenů s defektem v SPS systému je snížená (ZIKÁNOVÁ *et al*. 2002).

2.3.2 Účinek aminokyselin a změny metabolismu při přechodu kolonií z kyselé k alkalické fázi

Bylo ale zjištěno, že schopnost kvasinkových kolonií produkovat amoniak je snížena, pokud kolonie rostou na minimálním médiu. Přidáním aminokyselinové směsi k minimálnímu médiu se plně obnoví produkce amoniaku. Přímá měření produkce amoniaku koloniemi *Candida mogii* pěstovaných na agaru s přidáním různých aminokyselin ukázala schopnost aminokyselin navodit produkci amoniaku (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Kolonie *S. cerevisiae* shr3 mutant neprodukují amoniak a nejsou indukovány amoniakem produkovaného koloniemi (PALKOVÁ *et al.* 1997). *SHR3* gen kóduje protein lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu, který je odpovědný za správnou lokalizaci několika kvasinkových aminokyselinových permeáz (LJUNGDAHL *et al.* 1992). Aminokyseliny mohou být transportovány do kvasinkových buněk díky velké rodině aminokyselinových permeáz, kde hlavní aminokyselinovou permeázou je Gap1p (transportující většinu aminokyselin), která se zdá být důležitá pro produkci amoniaku. Členem této rodiny je také Ssy1, který ale nepracuje jako transportér. Společně se dvěma asociovanými plazmaticko membránovými proteiny Ptr3p a Ssy5p, má roli senzoru pro extracelulární, nebo intracelulární aminokyseliny (SPS aminokyselinový senzor) (FORSBERG a LJUNGDHAL 2001).

Přepnutí kvasinek z kyselé do alkalické fáze se zdá být doprovázené různými metabolickými změnami, zahrnujícími změny v aminokyselinovém metabolismu, progresivní snížení mitochondriální oxidativní fosforylace a degradativní fázi citrátového cyklu, zvýšení peroxisomální biogeneze a funkce, a změny v několika enzymech spojených s tvorbou NADH (PALKOVÁ *et al.* 2002). Pozorování, že mnoho aminokyselinových metabolických genů je indukováno před objevením produkce amoniaku, potvrzuje hypotézu, že první exportovaný amonný iont přichází z aminokyselinové deaminace (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003).

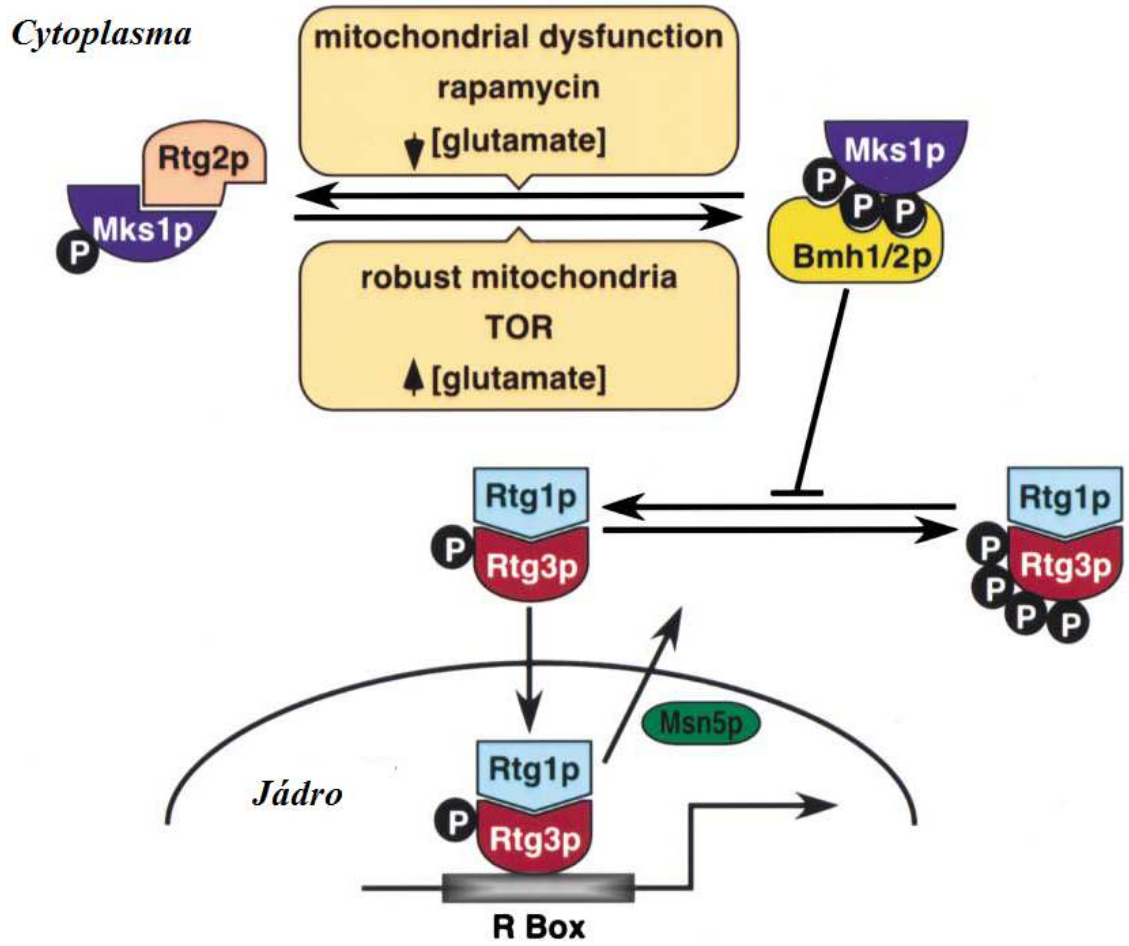
Přechod kolonií z kyselé do alkalické fáze je doprovázený progresivním snížením mitochondriální funkce. Coby společný rys stárnutí bylo popsáno, že mitochondrie hrají hlavní roli v apoptotických procesech vedoucích k progresivnímu snížení mitochondriální funkce a smrti starých buněk (SALVIOLI *et al.* 2001). Proto pozorování snížení respirační

funkce v alkalické fázi může znamenat, že kolonie následně dosáhnou konečného stádia svého vývoje a následkem toho zemřou. Všechna pozorovaní ale signalizují, že fáze produkce amoniaku není smrtelnou. Později začnou růst kolonie znovu, vstoupí do další kyselé fáze a jsou schopné přežít několik týdnů a možná měsíců. Z tohoto hlediska by mohla snížená regulace specifických mitochondriálních genů reprezentovat strategii buněk v koloniích překonat oxidativní stres a další projevy vedoucí k apoptóze (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). Na základě několika studií bylo zjištěno, že snížená mitochondriální funkce je charakteristická pro stárnutí. Mitochondrie jsou považovány za tzv. biologické hodiny buněčného stárnutí a následné smrti (de GREY 1997). Rozdíly v mitochondriální funkci během stárnutí (např. akumulace bodových mutací v mitochondriální DNA, snížení řetězového transportu elektronů aktivity enzymů, postupné zhoršení respirační funkce vedoucí ke zvýšení produkce ROS, a změny v mitochondriální morfologii a snížení mitochondriálního membránového potenciálu hnací síly pro syntézu ATP) ovlivní důležitou roli mitochondrie - buněčný zdroj energie. Obrat toku informací z mitochondrie do jádra změní dění uvnitř mitochondrie (SALVIOLI *et al.* 2001).

2.4 Retrográdní signalizace

Signální dráha poskytující informaci o stavu mitochondrií se nazývá “retrográdní odpověď“. Byla popsána u *S. cerevisiae* a zajišťuje komunikaci mezi mitochondriemi a jádrem. Součástí retrográdní odpovědi je několik proteinů lokalizovaných v mitochondriích a v cytoplazmě (JAZWINSKI 2000, BUTOW a AVADHANI 2004). K aktivaci retrográdní dráhy dochází vlivem mitochondriální dysfunkce, nebo inhibicí TOR kináz, což má za následek hromadění jaderných transkripčních faktorů. Jedná se o *RTG* geny, obsahujících v promotorech R-box. Retrográdní odpověď má za následek modifikaci různých celulárních a organických procesů, zahrnujících metabolismus, výživové vnímání, odpověď na stres, přecitlivělost k lékům, nádorový růst, délku života a zajištění kompenzace nefunkčních mitochondrií aktivací glyoxalátového cyklu a biogeneze peroxisomů (LIU et al. 2003, LIAO a BUTOW 1993, KIRCHMEN et al. 1999). K aktivaci retrográdní dráhy dochází vlivem Rtg2 cytoplazmatického proteinu s N-terminální ATP vazebnou doménou, který aktivuje dimerní transkripční faktor Rtg1-Rtg3, který lokalizuje do jádra (LIU et al. 2003, LIAO a BUTOW 1993). Součástí retrográdní dráhy jsou tři

pozitivní regulátory Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a čtyři negativní regulátory Mks1, Lst8p, Bmh1 a Bmh2 (BUTOW a AVANDHANI 2004). Rtg2 ovládá retrográdní dráhu reverzibilní vazbou s Mks1p. RTG dráha je aktivována v okamžiku vazby defosforylované formy Mks1p přes C-terminální doménu k Rtg2p. Snížení regulace retrográdní dráhy je způsobené uvolněním Mks1p od Rtg2p. Uvolněná forma je hyperfosforylována a vázána na proteiny Bmh1p a Bmh2p přes Mks1p N-terminální doménu. Bmh1p a Bmh2p fungují jako negativní regulátory retrográdní dráhy. Hyperfosforylovaná forma Mks1p vázána na Rtg2p je inaktivní. Bodové mutace v Rtg2p, ATP vazebné doméně současně blokují retrográdní odpověď a Mks1p-Rtg2p interakci (LIU et al. 2003). Exprese většiny genů nezbytných pro přestavbu metabolismu u respiračně deficientních kmenů je pod kontrolou Rtg1, Rtg2 a Rtg3 pozitivních regulátorů. Delece *RTG1*, *RTG3* nebo *RAS2* potlačuje prodlužování života petit kmenů (GUARAGNELLA a BUTOW 2003, ŘIČICOVÁ *et al*. 2007). Regulace Rtg2 probíhá přes Tor kinázu, která inaktivuje retrográdní dráhu. Lst8p byl nedávno identifikován jako komponenta z TOR1 a TOR2 komplexů v kvasince. Rtg2p je inhibován přítomností bohatého zdroje dusíku, účastní se dusíkové katabolické regulace (NCR). V buňkách s nedostatkem dusíku jsou aktivovány NCR-cílové exprimované geny, jako je Gln3p a Gat1p, stejně jako Rtg1p a Rtg3p přemístěné z cytoplazmy do jádra. (LIU et al. 2003). Při stárnutí kvasinkových buněk dochází k poklesu mitochondriální aktivity a zvyšuje se poškození mitochondrií, zejména oxidativní. Retrográdní signalizace toto poškození kompenzuje a její aktivita s věkem roste. Postupné přepnutí z Krebsova cyklu na glyoxalátový cyklus během stárnutí bylo potvrzeno biochemickou analýzou chronologicky stárnoucí kultury (BUTOW a AVANDHANI 2004).



Obr. 3: *Model regulace RTG dráhy: Aktivace dráhy má za následek asociaci Mks1p přes jeho C-terminální doménu s Rtg2p, kde Mks1p je převážně defosforylován. To umožní částečnou defosforylaci Rtg3p a vstup Rtg1p a Rtg3p do jádra, kde vážou R-box místa v promotorech RTG cílových genů. V buňkách s mitochondriální funkcí, s aktivací TOR komplexů, nebo rostoucí v médiu obsahující glutamát, se Mks1p oddělí od Rtg2p, je hyperfosforylován a je asociován přes jeho N-terminální doménu s Bhm1p a Bhm2p. Export Rtg1p/Rtg3p z jádra nastane přes Msn5p-dependentní proces (Převzato podle LIU et al. 2003).*

2.5 Mitochondriální geny *Saccharomyces cerevisiae*

Byla testována celá řada delečních mutant *S. serevisiae* s poruchami v signalizačních drahách, ale také mnoho mutantů deletovaných v genech důležitých pro různé bilologické procesy v kvasinkových buňkách (PALKOVÁ *et al.* 1997). Z tohoto

důvodu se krátce zmíním o genech souvisejících s uvedenou retrográdní dráhou a mitochondriální funkcí.

CIT2:

Interakce mezi jádrem a mitochondrií jsou velice komplikované a zahrnují velké množství jaderných genů, jejichž produkty jsou požadovány pro stavbu funkční mitochondrie a pro expresi relativně malého počtu mitochondriálních genů. Příkladem je již zmíněná retrográdní odpověď, kdy v závislosti na mitochondriálním stavu dochází k transkripci *CIT2* genu (LIAO a BUTOW 1993). *CIT2* slouží jako modelový výstup pro retrográdní odpověď (BUTOW a AVADHANI 2004). U *S. cerevisiae* byly objeveny 2 formy citrát syntázy – mitochondriální citrát syntáza a peroxisomální citrát syntáza, které jsou kódované různými jadernými geny. Peroxisomální citrát syntáza je kódována genem CIT2 (citrát syntáza 2) (LEWIN et al. 1990). Produkt *CIT2* genu obsahuje serin-lysin-leucin jako karboxylový terminační tripeptid skládající se ze 460 aminokyselin s molekulární hmotností 51,4 kDa a je lokalizován v peroxisomech (LEE *et al*. 2000). U *S. cerevisiae* se peroxisomální citrát syntáza účastní glyoxalátového cyklu a je inhibována NADH a NADPH. *CIT2p* přeměňuje acetyl-CoA a oxalacetát na citrát a CoA (LEWIN et al. 1990). Pokud je funkce mitochondrií změněna, například v ρ^0 petit buňkách, transkripce *CIT2* genu je zvýšená. Pro retrográdní expresi *CIT2* jsou požadovány *RTG* geny (LIAO a BUTOW 1993). Bylo ověřeno, že tři pozitivní regulátory Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a čtyři negativní regulátory Mks1, Lst8p, Bmh1 a Bmh2 regulují základní i indukovanou retrográdní expresi *CIT2* (BUTOW a AVADHANI 2004). Peroxisomální citrát syntáza je také charakteristická svojí citlivostí k alkalickému pH. Buňky s přerušením v cit2 genu nebyly schopné mobilizovat uložené lipidy a tvořit stabilní peroxisom (LEWIN et al. 1990). Aktivita citrát syntázy se snižuje během chronologického stárnutí (SAMOKHVALOV *et al*. 2004).

RTG1, RTG2, RTG3:

Jak již bylo zmíněno, *RTG* geny jsou součástí retrográdní dráhy. Produkty těchto genů jsou považovány za součást funkční metabolické interakce mezi cyklem TCA a glyoxalátovým cyklem, určující tak jejich důležitou fyziologickou roli pro retrográdní regulaci ve spojení s těmito metabolickými drahami (LIAO a BUTOW 1993).

RTG1 a *RTG3* (retrograde regulation 1, 3) kódují základní bHLH/Zip transkripční faktory (LIAO a BUTOW 1993, SEKITO *et al.* 2000). Rtg1p obsahuje 177 aminokyselin s molekulární hmotností 19,0 kDa a Rtg3p obsahuje 486 aminokyselin s molekulární hmotností 54,1 kDa (JIA *et al.* 1997). Jejich hlavní funkce je v retrográdní signální dráze (JAZWINSKI 2000, DILOVA *et al.* 2002), jsou také požadovány pro expresi retrográdních cílových genů jako je *CIT2* (SEKITO *et al.* 2000) a jednají jako transkripční aktivátory *ENO1* genu. Mutace těchto genů způsobuje snížení množství *CIT2* mRNA (JIA *et al.* 1997).

Třetím *RTG* genem je *RTG2* (retrograde 2), který kóduje cytoplazmatický protein s N-terminální ATP vazebnou doménou. Je to senzor mitochondriální dysfunkce a TOR dráhy (LIU et al. 2003). Protein kódovaný *RTG2* genem obsahuje 588 aminokyselin a jeho molekulární hmotnost je 65,6 kDa (LIAO a BUTOW 1993, SEKITO et al. 2000). Také reprimuje cirkulární DNA formu během stárnutí a hraje roli v akumulaci podjednotky SAGA-like (SLIK) komplexu (DILOVA *et al.* 2002).

FIS1:

Na vnější mitochondriální membránu u *S. cerevisiae* působí 2 GTPázy, které regulují dělení. Ke GTPáze příbuzný kvasinkový Dnm1 protein se shromažďuje na vnější straně mitochondriální membrány, v místech pravděpodobného dělení organel. Při studiu funkce Dnm1p byly identifikovány geny *FIS1* a *FIS2* (tzv. Mdv1p). *FIS1* (fission 1) kóduje vnější mitochondriální membránový protein, se svým N-amino koncem vystaveným k cytoplazmě a C-karboxylovým koncem vázaným přímo do mitochondriální membrány, skládající se ze 155 aminokyselin a molekulární hmotností 17,0 Da. Fis1p je první integrální membránový protein účastnící se membránového dělení a regulovaný dynamickou GTPázou. Bylo prokázáno, že Fis1p je požadovaný pro řádné uspořádání a správnou funkci Dnm1p-skládajícího komplexu na mitochondriálních tubulech během dělení (MOZDY et al. 2000). Fis1p je také nezbytný pro správnou funkci Mdv1p, kdy oba jsou součástí stejné dráhy jako Dnm1p, regulující mitochondriální dělení (IVANOVSKA a HARDWICK 2005). U fluorescenčně značených proteinů Dnm1p a Fis1p byla zjištěna lokalizace na mitochondiích, ale i v peroxisomech. Delece genu *DNM1* způsobila snížené množství peroxisomů. Bylo prokázáno, že Dnm1p a Fis1p hrají roli v regulaci množství peroxisomů v kvasince (KURAVI *et al.* 2006). Kvasinkové buňky s defektním *FIS1* genem vykazují poruchy v mitochondriálním dělení a defekty v transportu Mdv1p z mitochondrií

(SUZUKI *et al.* 2005). Mitochondriální dělení v kvasince je mnohostupňový proces a Fis1p genový produkt je pro tento proces nezbytný. Fis1p homology byly identifikovány v dělících se kvasinkách, rostlinách, u hmyzu, ale také u lidí, což dokazuje, že funkce FIS byla během evoluce zachována (MOZDY et al. 2000).

2.6 Geny exprimované v exponenciální fázi růstu *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1 Gen *GUT1*, enzym Gut1p

Exponenciální růst v kvasince *Saccaromyces cerevisiae* vyžaduje řádně řízenou expresi mnoha genů kódovaných jadernými i mitochondriálními (mt) geny. Jejich exprese je výrazně ovlivňována výživovými podmínkami (LU *et al*. 2003).

S. cerevisiae, stejně jako mnoho jiných organizmů, má vyvinuté komplexní systémy, které umožní rychle reagovat na změny ve výživovém složení. Obecně geny, nutné pro využití určitých živin, jsou potlačované, pokud je k dispozici lépe využitelný substrát. Příkladem toho je glukózová katabolická represe, kde přítomnost rychle zkvasitelného cukru glukózy potlačí expresi velkého množství genů. Glukózou-reprimované geny zahrnují ty, jimiž kódované proteiny jsou esenciální pro katabolismus pomalu zkvasitelných nebo nezkvasitelných cukrů, glukoneogenezi, cyklus trikarboxylových kyselin a respiraci. Mezi geny takto regulované patří gen *GUT1* (GRAUSLUND *et al.* 1999).

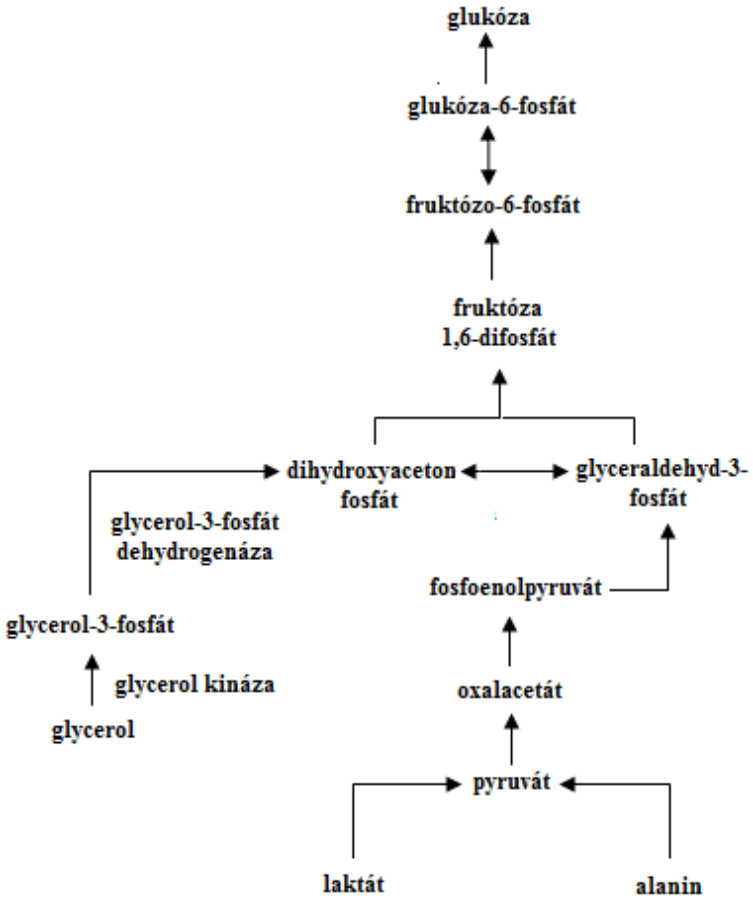
Kvasinky *S. cerevisiae* kultivované na médiu obsahujícím glycerol, coby jediný zdroj uhlíku, vyžadují expresi genu *GUT1*, který kóduje enzym glycerol kinázu a *GUT2*, který kóduje enzym glycerol-3-fosfát dehydrogenázu. *GUT1* a *GUT2* jsou jaderné geny. Gut1p kináza je cytoplazmatický enzym, Gut2p dehydrogenáza je lokalizována uvnitř mitochondrie (LU *et al*. 2003).

Klonováním strukturních genů *GUT1* a *GUT2*, byla prokázána podobnost prokaryotických a eukaryotických homologů (GRAUSLUND *et al.* 1999). Klonovaný genomový *GUT1* DNA fragment u *S. cerevisiae* obsahuje otevřený čtecí rámec, kódující

protein skládající se ze 709 AMK s homologií k bakteriální glycerol kináze (PAVLIK *et al.* 1993). Klonování a sekvenace *GUT1* genu u *S. cerevisiae* prokázalo, že kóduje glycerol kinázu a že exprese je řízena *ADR1* proteinem (PAVLIK *et al.* 1993). Během růstu na nezkvasitelných uhlíkatých zdrojích vyžaduje buňka funkční *ADR1* pro expresi z *GUT1*, *ADH2* (katabolická alkohol dehydrogenáza), *ASC1* (syntéza acetyl-CoA) a geny spojené s proliferací peroxisomu (GRAUSLUND *et al.* 1999). Genetické a biochemické studie prokázaly, že glycerol kináza, glycerol-3-fosfát dehydrogenáza a proteiny spojené s usnadněním difuze glycerolu, jsou součástí kvasinkové i bakteriální glycerol-utilizační cesty (PAVLIK *et al.* 1993).

Glycerol může prostupovat plazmatickou membránou pasivním transportem, usnadněnou difůzí Fsp1p proteinovým kanálem a glycerol/protonovým symportním systémem (GRAUSLUND *et al.* 1999). U *S. cerevisiae* byl Fps1p kanál označen jako „usnadňující prostředek“ pro zajištění glycerolového transportu, ke kterému dochází vlivem glycerol kinázové aktivity. Bylo prokázáno, že kanál zprostředkuje hlavní část glycerolového pasivního transportu. To se neslučuje s dřívější studií, kdy bylo zjištěno, že hlavní role Fsp1p v živých organizmech je kontrola nad glycerolovým exportem pod osmotickým stresem, nebo reakcí na změny napětí (OLIVERIRA *et al*. 2003).

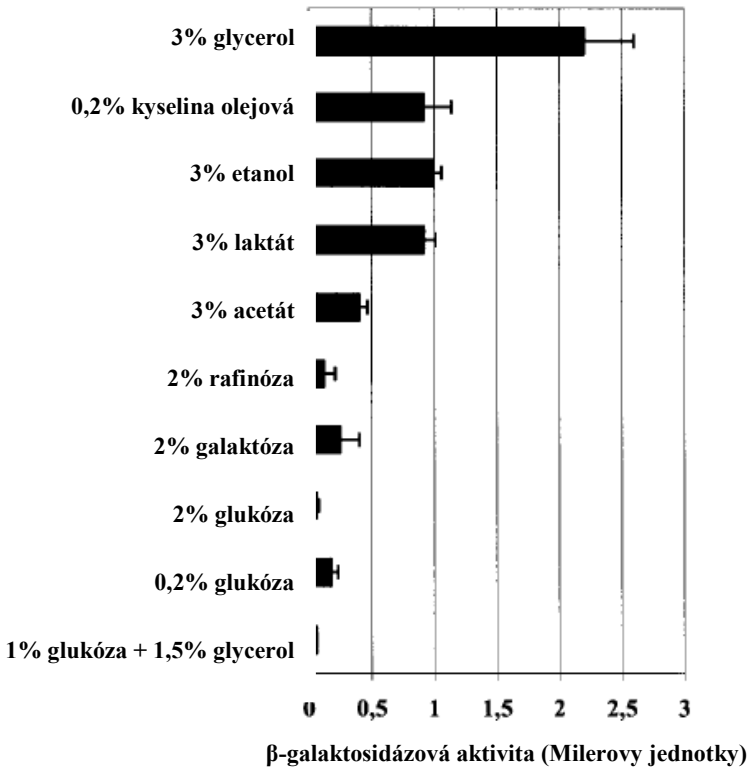
Degradace glycerolu nastane fosforylativní cestou. V prvním kroku je glycerol přeměněn na glycerol-3-fosfát v cytosolu glycerol kinázou. Glycerol-3-fosfát pak v mitochondriální membráně oxiduje na dihydroxyaceton fosfát (DHAP) vnitřním mitochondriálním membránovým enzymem FAD-depndentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázou. DHAP se vrací do cytosolu, kde vstoupí buď do katabolické glykolýzy, nebo je využitý na syntézu z glukózy-6-fosfátu během glukoneogeneze (Obr. 4) (GRAUSLUND *et al.* 1999).



Obr. 4: *Role glycerolu a glycerol kinázy v glukoneogenezi (Převzato podle SJARIF et al. 2000).*

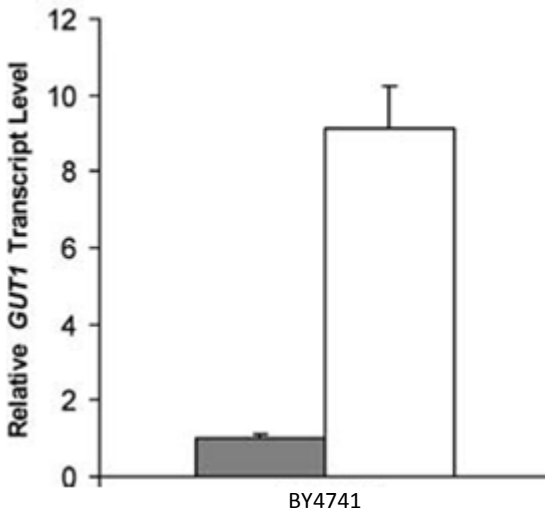
Glycerol hraje také hlavní roli v regulaci procesů jako je syntéza lipidů a redoxní rovnováha. Enzymy glycerol kináza a glycerol-3-fosfát dehydrogenáza určují redox rovnováhu mezi mitochondrií a cytoplazmou. Jedná se o glycerolovou signální cestou, která zmírňuje syntézu glycerolu a je pod transkripční kontrolu *GPD* genů. To hraje důležitou roli v zásadních odpovědích na osmotický, solný, nebo tepelný šok (GOMES *et al*. 2005).

Regulace genu *GUT1* uhlíkovým zdrojem byla studována pomocí fúze promotor-reportérového genu. Aktivace promotoru byla nižší během růstu na glukóze a vyšší na nezkvasitelných uhlíkových zdrojích glycerolu, etanolu, laktátu, acetátu a kyselině olejové (Obr. 5). *GUT1* exprese se zvýšila, když koncentrace glukózy klesla pod 0,2% (GRAUSLUND *et al.* 1999).



Obr. 5: *LacZ exprese z GUT1 promotoru na různých uhlíkových zdrojích (Převzato podle GRAUSLUND et al. 1999).*

Přerušení *GUT1* genu potvrdilo, že gen je potřebný pro růst na glycerolu, ale ne na glukóze, nebo etanolovém médiu. V takovém mutantu nebyla objevena žádná glycerol kinázová aktivita (LU *et al.* 2005). Podle aktivity enzymů a transkripční analýzy, je syntéza glycerol kinázy reprimována glukózou. Bylo tak potvrzeno, že enzym glycerol kináza je regulován katabolickou represí (PAVLIK *et al.* 1993).



Obr. 6: *RT-PCR analýza určující relativní transkripční hladinu GUT1 genu u kvasinkového kmenu BY4741, rostoucího na glycerolovém a glukózovém médiu. Šedá barva představuje růst na glukóze a bílá na glycerolu (Převzato podle LU et al. 2005).*

Fosforylace glycerolu proteinem Gut1 na glycerol-3-fosfát je častým prostředníkem v syntéze fosfolipidů. Mnoho genů spojených s biosyntézou mastných kyselin a fosfolipidů jsou koordinovaně regulované trans-působícími regulačními proteiny Ino2p, Ino4p a Opi1p. *GUT1* promotor také obsahuje Ino2p/Ino4p vazebné místo (GRAUSLUND *et al.* 1999). Exprese *GUT1* je pozitivně řízená přes Ino2p/Ino4p a Adr1p, kdežto negativně regulovaná Opi1 proteinem (LU *et al*. 2003).

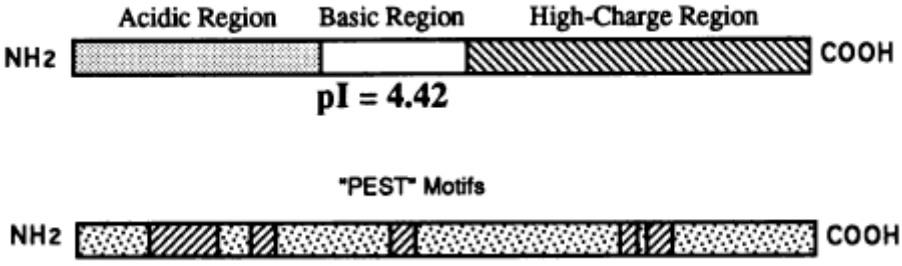
Analýza mutace v *GUT1* promotoru ukázala, že 2 cis-působící elementy UAS_{ADR1} a UAS_{INO} jsou zodpovědné za přibližně 90% expresí během růstu na glycerolu (GRAUSLUND *et al.* 1999). Bylo prokázáno, že Adr1p a Ino2p/Ino4p jsou vázané na analogické cis-acting elementy v *GUT1* promotoru a negativní regulátor Opi1p zprostředkuje represi z *GUT1* promotoru. Exprese genu *GUT1* je tedy regulována systémy různých aktivací a represí (GRAUSLUND *et al.* 1999).

2.6.2 Gen *SMI1/KNR4*, protein Smi1/Knr4

Gen *KNR4* (killer nine rezistent 4, také známý jako *SMI1*), byl původně izolován komplementací buněk *S. cerevisiae* hyperrezistentních proti killer toxinu HM-1 z *Hansenulla mrakii.* Tento toxin způsobuje vznik pórů ve vrcholu rostoucího pupene, jimiž unikají celulární komponenty. Ztráta *KNR4* vede k pozměněnému složení a struktuře

buněčné stěny: množství chitinu je čtyřikrát zvýšené, zatímco (1,3)-β-glukansyntetázová aktivita a hladina (1,3)-β-glukanu jsou z 50 % redukované. Dochází také k osmotické citlivosti, hypersenzitivitě ke kofeinu, SDS, kongo červeni, calcofluoru, caspofunginu, cerosporamidu, zastavení růstu s malým pupenem při teplotě nad 37 °C (GONZALEZ-RAMOS *et al.* 2008, MARTIN-YKEN *et al.* 2002, HONG *et al.* 1993, DURAND *et al.* 2008, BASMAJI *et al.* 2005). Delece *KNR4* v laboratorním kmeni *S. cerevisiae* má za následek také uvolnění zvýšeného množství mannanproteinů do média (GONZALEZ-RAMOS *et al.* 2008). U *S. cerevisiae* bylo prokázáno, že s *KNR4* je 100% identický gen *SMI1*, identifikovaný při hledání proteinů, které se vážou na DNA v oblastech matrixového asociačního komplexu. *SMI1* homologové existují také v jádrech savčích buněk (FISHEL *et al.* 1993, HONG *et al.* 1993).

U *S. cerevisiae* gen *SMI1/KNR4* kóduje protein Smi1/Knr4 o velikosti 57 kDa, složený z 505 AMK. Je to vysoce nabitý, kyselý protein s pI 4,42 (Obr. 7). Proteinová sekvence má 31 % nabitých AMK s vnitřními oblastmi bohatými na asparagin a glutamin (FISHEL *et al.* 1993, HONG *et. al*. 1993, DURAND *et al*. 2008). Většina kyselých zbytků je lokalizována na koncích proteinu, zatímco 100 aminokyselin lokalizovaných uprostřed je považováno za základní region. Sekvence obsahuje 5 údajných PEST domén, které se často vyskytují v rychle degradovaných proteinech (BASMAJI *et al.* 2005).



Obr. 7: *Profil KNR4 proteinu. Většina kyselých zbytků je rozdělena buď v karboxylovém konci (šrafovaná část), nebo amino konci (tečkovaná část) oblasti proteinu. Uprostřed je umístěna nabitá základní oblast proteinu (bílá část). B) 5 údajných PEST motivů (šrafované úseky) (Převzato podle HONG et al. 1993).*

Knr4 protein je nově identifikovaný člen z IPDs rodiny (DURAND et al. 2008). Knr4 protein migruje na SDS gelové elektroforéze s molekulovou hmotností ~100 kDa, která je vyšší než jeho teoretická hmotnost (potvrzená hmotnostní spektrometrií). Tento

druh abnormální pohyblivosti na SDS-PAGE byl stejný jako u několika neuspořádaných proteinů (IPDs). Proto bylo navrženo, že Knr4 by mohl patřit do této proteinové rodiny. Analýza aminokyselinového složení Knr4 je velmi podobná jako pro typický IDPs. Další důkaz, že Knr4 je neuspořádaný protein, byl získán použitím sekvenační analýzy (DURAND *et al.* 2008). Neuspořádané regiony (zahrnující 40 % z jeho AMK sekvence), které jsou umístěny na N- a C-konci, jsou odpovědné za vybranou regulační funkci. Biofyzikální a biochemické rozbory potvrdily, že C-terminální oblast z Knr4 je nepostradatelný region. Tento region je vysoce flexibilní, díky čemuž může protein působit spolu s různými partnery v různých lokalitách. Tato schopnost interakce s různými partnery je také vlastností neuspořádaných proteinů (IDPs). Krátká N-terminální část Knr4 (1-80 AMK) je také neuspořádaná a je specificky zapletena do PKC1-SLT2 buněčné integrální dráhy. Centrální jádro Knr4 (80-340) je kompaktnější a vykonává většinu biologické aktivity (DURAND *et al.* 2008).

S použitím Western-blotu a anti-Knr antiséra bylo měřeno množství Knr4 proteinu během růstu na glukóze, které se neustále snižovalo a zůstalo extrémně nízké ve stacionární fázi buněk. Knr4 je tedy nestabilní protein, který je degradován v okamžiku, kdy buňky vstoupí do stacionární fáze (BASMAJI *et al.* 2005).

Rozdíl hladin *KNR4* mRNA byl také sledován Northern blot analýzou u buněk ze dvou různých stupňů růstového cyklu, středního logaritmické fáze růstu a pozdního stacionárního stádia. Z výsledků vyplynulo, že *KNR4* mRNA byla exprimována dočasně během proliferace a mitózy. Exprese *KNR4* mRNA byla úplně potlačena ve stacionární fázi, kdy buňky zastaví svůj růst (HONG *et al.* 1993).

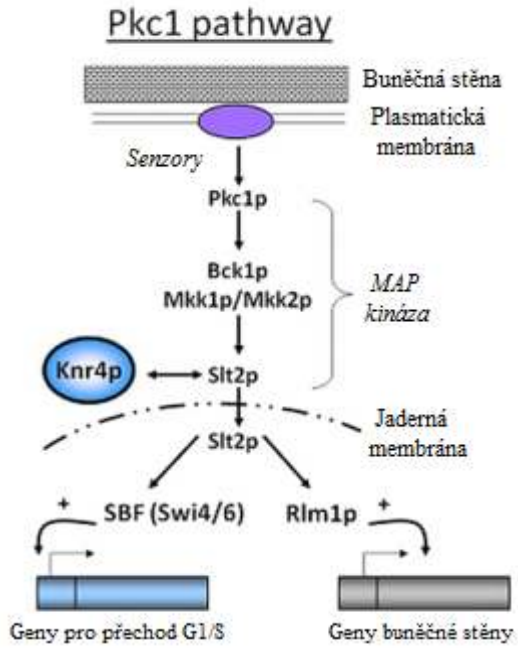
Experimenty s transformovanými buňkami rostoucími exponenciálně na SD médiu odhalily, že protein fúzovaný s GFP je lokalizován jako cytoplazmatická políčka blízko předpokládaného místa pučení v nepučících buňkách a pupenovém krčku v pučících buňkách. Během dalšího růstu dceřiných buněk, se GFP-Knr4p nachází stále v krčku pupene. Před jaderným dělením se protein rozdělí na dvě části, část proteinu přejde do cytoplazmy dceřiných buněk, zbývající protein zůstává v mateřské buňce (MARTIN *et al.* 1999, DURAND *et al*. 2008, BASMAJI *et al.* 2005).

U Knr4 proteinu bylo zjištěno více než 100 genetických a 20 fyziologických interakcí s různými partnery. Uvnitř této biologické sítě bylo identifikováno 5 hlavních procesů, včetně údržby buněčné stěny (nejvyšší množství partnerů), vzniku polarizovaného

růstu pupene, buněčného cyklu/mitózy, osmoregulace/metabolismu a utváření spór (DURAND *et al.* 2008). S tím souhlasí i výsledky získané pomocí TAP-tag metodiky. U exponenciálně rostoucích buněk na glukóze je Knr4 přítomný v bílkovinném komplexu, v němž bylo identifikováno 9 potenciálních partnerů, které je možné rozdělit do 3 biologických procesů. 1. skupina se skládá ze Slt2 a Pil1, dvou proteinů určených k údržbě buněčné stěny a biogeneze, 2. skupina zahrnovala 4 proteiny (Bud6, Act1, Cin8 a Jnm1) zapojené do organizace buněčné polarity a pučící integrity během dělení buněk. Poslední skupina obsahovala 4 proteiny (Asc1, Ubc1, Hsc82 a Gvp36) pravděpodobně zajišťující stabilitu/degradaci bílkovin (BASMAJI *et al.* 2005).

Protein Knr4 je členem PKC1 dráhy. Knr4 je naprosto nezbytný pro životaschopnost buňky v nepřítomnosti funkční PKC1 dráhy (DURAND *et al.* 2008). Je zapojen do koordinace syntézy buněčné stěny s buněčným dělením (DURAND et al. 2008, BASMAJI et al. 2005), prostřednictvím genetické interakce s Bck2, proteinem požadovaným v G1 a S fázovém přechodu a interakcí se SLT2 kinázou (BASMAJI *et al.* 2005). PKC1 signální dráha se skládá ze 4 proteinových kináz počínaje Pkc1, která aktivuje kinázu Bck1, ta aktivuje další kinázu Mkk1/Mkk2, která posléze způsobuje aktivaci MAP kinázy SLT2/MPK1. Aktivovaná SLT2/MKP1 kináza vstoupí do jádra a aktivuje přepis genů spojených s přestavbou buněčné stěny. Tato indukce nastane přes transkripční aktivaci Rim1p a přispěje k přechodnému zastavení buněčného cyklu. Knr4p protein je členem PCK1 dráhy, nutný pro správné cílení Stl2 MAP kinázy do jeho dvou známých transkripčních cílů, Rim1p a Swi4p, a účastní se koordinace syntézy buněčné stěny, se vznikem pupene (GONZALEZ-RAMOS *et al.* 2008, DURAND *et al.* 2008, BASMAJI *et al.* 2005). *KNR4* a *BCK2* geny jsou zapojeny také společně s Cln3-Cdc28 v G1 a S fázi buněčného cyklu. Ztráta Knr4 byla smrtící v kombinaci se ztrátou Cln3. *BCK2* a *KNR4* ale působí také samostatně (MARTIN-YKEN *et al.* 2002). Cln3-Cdc28 nezávislá transkripční aktivace z SBF/MBF cílových genů vyžaduje oba funkční Bck2 a Knr4 proteiny (MARTIN-YKEN *et al.* 2002). Slt2 a nebo Bck1 jsou aktivované jen v přítomnosti Knr4 (DURAND *et al.* 2008). Analýza aminokyselin odhalila přítomnost fosforylačních míst pro potenciální fosforylaci různými kinázami: 2 údajná místa pro fosforylaci protein kinázou C, 2 pro tyrozin kinázu, 7 pro kasein kinázu CKII a jeden pro cAMP-dependentní a kalmodulin-dependentní kinázu. Není ovšem jasné, zda Knr4 protein je regulovaný proteinkinázou C, nebo CKII přes fosforylaci (HONG et al. 1993).

Lokalizace Knr4 je velmi podobná proteinům spojeným s biosyntézou chitinu včetně Chs3p, Chs4p a Bni4p. Z toho vyplývá, že Knr4p může být komponentou tohoto enzymatického mechanismu (MARTIN et al. 1999). Knr4 inhibuje expresi genů kódujících chitin syntetázy (MARTIN *et al.* 1999).



Obr. 8: *Schéma reprezentující PCK1-SLT2 dráhu a možnou pozici Knr4 v této dráze (Převzato podle DURAND et al. 2008).*

.

2.7 Geny exprimované ve stacionární fázi růstu *Saccharomyces cerevisisae*

Jednobuněčné organizmy v přírodě jen sporadicky zažijí podmínky, které podporují rychlý růst, častěji musí zvládat období hladovění (PAZ, MEUNIER *et al.* 1999). U přechodu buněk *S. cerevisiae* z logaritmického (exponenciálního) růstu k hladovění ve stacionární fázi (SP – stationary phase), bylo zjištěno celkové snížení výměny látek. Snížená, výměna látek během hladovění šetří energii, a tak umožní buňkám přežít dlouhé

období stacionární fáze. Stacionární fáze, nebo také G_0 fáze, je stádiem růstu kvasinkové kultury, během kterého nedochází k zvýšení počtu buněk. Naopak dochází k charakteristickým fyziologickým a morfologickým změnám, vyskytujícím se během vstupu do stacionární fáze. Zahrnují akumulaci sacharidů, posílení buněčné stěny a hromadění elektron-denzního materiálu ve vakuole. Buňky získávají termotoleranci, jsou více odolné proti zvýšení teploty (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1989). V té době také různé molekulární procesy jako je transkripce a translace, vykazují relativně nízkou aktivitu (PAZ, MEUNIER *et al.* 1999), neboť u *S. cerevisiae* je většina genů exprimována v exponenciální fázi růstu buněk. Nicméně ve stacionární fázi dochází i ke změnám ve smyslu zvýšení exprese některých genů. Většina z těchto genů je exprimována jako výsledek hlavní stresové odpovědi. Např. mnoho genů tepelného šoku je indukováno vstupem do stacionární fáze (DONALIES *et al.* 2001). Hlavním rysem stresové odpovědi je silná indukce malého počtu proteinů tepelného šoku. Některé z těchto proteinů slouží k oddělení poškozených, denaturovaných, nebo nesprávně složených proteinů, zatímco další proteiny tepelného šoku pomáhají při degradaci poškozených proteinů. Zvýšení hladiny proteinů tepelného šoku slouží proto tedy k zvýšení schopnosti buněk přežít vnitrobuněčné hromadění odlišných, nebo nesprávně složených proteinů (PANARETOU *et al.* 1992).

2.7.1 Gen *SSA3*, protein Ssa3

Gen *SSA3* patřící do rodiny *HSP70* genů kóduje heat shock protein (Heat Shock Protein, 70kDa). Heat shock proteiny byly nalezeny v prokaryotických i eukaryotických buňkách (KIANG a TSOKOS 1998). Homologické geny byly nalezeny v každém studovaném organizmu (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1987). První zpráva o *HSP70* genu je z roku 1962. U buněk *Drosophila melanogaster* vystavených vyšší teplotě, byla zjištěna zvýšená exprese proteinů s molekulovou hmotností 70 a 26 kDa. Tyto proteiny byly pojmenované jako "heat shock proteiny" a od té doby bylo objeveno velké množství proteinů, souhrnně označených jako Hsp (KIANG a TSOKOS 1998). Teplotní stres není jediný podnět, který může navodit zvýšenou syntézu Hsp proteinů. Vystavení buněk analogům glukózy a aminokyselin, etanolu (4-6%), oxidačnímu stresu, těžkých kovů, mikrobiální infekci, hormonům a antibiotik aj. také navodí expresi Hsp proteinů. (KIANG a TSOKOS 1998).

U *S. cerevisiae* nejčastější a nejlépe prostudované z heat shock proteinů jsou právě ty kódované *HSP70* genovou rodinou. (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1987). Jejich vysoce konzervovaná struktura ukazuje na to, že hrají roli v základních buněčných procesech. Hsp70 proteiny jsou přítomné v cytosolu, mitochondriích, v endoplazmatickém retikulu a v jádře (KIANG a TSOKOS 1998). 70 kDa heat shock proteiny (Hsp70), jsou všudypřítomné molekulární chaperony, které hrají hlavní roli ve skládání, syntéze, shromáždění, degradaci a transportu proteinů přes biologické membrány. Jsou také spojeny s regulačními procesy, jako je skládání proteinů po stresovém poškození a řídí aktivitu regulačních proteinů v přenosu signálu a také řídí buněčnou proliferaci (SHERMA *et al.* 2009). Proteiny Hsp70 jsou také zapojeny do opravy buněk a poškozených tkání v odpovědi na tepelný šok a další formy poškození (QUAN *et al.* 2004). Členové *HSP70* rodiny sdílejí vysoce zachovanou molekulární strukturu v N-terminální 44 kDa ATPázové doméně (nazývané také adenin-nukleotid vazebná doména, nebo NBD – nukleotid binding domain), následuje 18 kDa substrát-vazebné domény (SBD – substrate-binding domain) a dále C-terminální (závěsné) domény (SHERMA *et al.* 2009). Tedy všechny *HSP70* vážou ATP (KIANG a TSOKOS 1998).

U *S. cerevisiae* bylo zatím nalezeno devět genů z *HSP70* rodiny. Na základě srovnání DNA sekvence, byla rodina genů rozdělena do čtyř podrodin nazývajících se *SSA*, *SSB*, *SSC* a *SSD*. Genetické studie ukázaly rozdíly v lokalizaci nebo funkci mezi produkty genů jednotlivých podrodin. Bylo zjištěno, že členové z podrodiny *SSA* a *SSC*, jsou nezbytné pro životaschopnost buněk (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1989). Proteiny ze *SSA* rodiny se nacházejí v cytoplazmě (QUAN *et al.* 2004). Procesy ve kterých jsou Ssa proteiny zapojeny jsou termotolerance, odpověď na heat shock a skládání nově syntetizovaných a denaturovaných proteinů (BAXTER, CRAIG 1998).

SSA rodina, identifikována sekvenční homologií, obsahuje čtyři geny, *SSA1*, *SSA2*, *SSA3* a *SSA4* (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1987). Proteiny ze *SSA* rodiny, mají víc než 80% shodných aminokyselin. Ssa proteiny obecně jsou esenciální pro vegetativní růst. Aby byly buňky životaschopné, musí být exprimován alespoň jeden z těchto proteinů (BAXTER, CRAIG 1998). Genové produkty ze *SSA* rodiny jsou vysoce homologní, a bylo zjištěno, že *Ssa1*, *Ssa2*, *Ssa3* a *Ssa4* proteiny jsou si funkčně podobné, nicméně jejich exprese je regulována různě (QUAN at al. 2004).

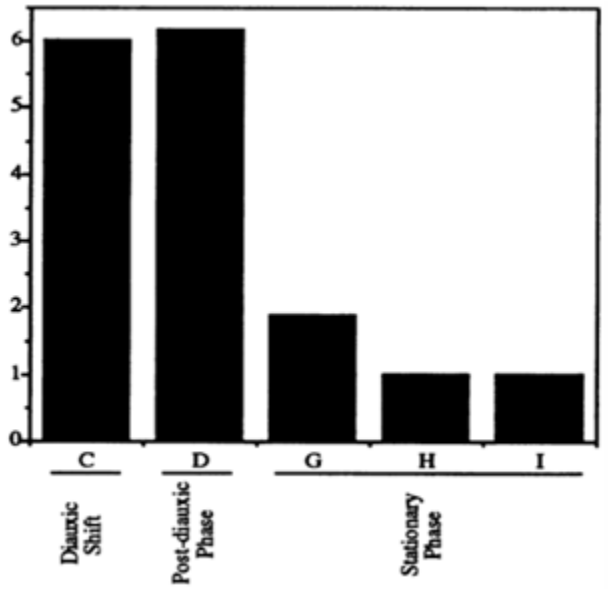
Jako první z těchto genů byly studovány *SSA1* a *SSA2*. *SSA1* a *SSA2* jsou z 96% identické a oba jsou exprimovány konstitutivně již během vegetativního růstu. Kmeny nesoucí přerušení v kterémkoli z těchto genů, jsou fenotypicky nerozeznatelné od standardního (divokého) kmene. Kmeny obsahující přerušení v obou těchto genech mají dramaticky pozměněný fenotyp, rostou pomalu jako malé kolonie, ale schopné tvořit kolonie při teplotě 37°C. Kmeny obsahující mutace v *SSA1* a *SSA2* jsou při svém růstu citlivé na teplo (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1987). *SSA1* a *SSA2* jsou tedy výrazně exprimovány za nestresových růstových podmínek (BOORSTEIN, CRAIG 1990).

SSA3 a *SSA4* jsou teplotním stresem indukované geny. Nukleotidová sekvence těchto genů je přibližně z 80% identická. *SSA3* a *SSA4* nejsou běžně exprimovány, nebo jsou exprimovány v nízkých hladinách v kvasinkových buňkách pěstovaných při teplotě 23°C. Exprese těchto dvou genů se dramaticky zvýší, jestliže jsou buňky vystavené zvýšení teploty z 23°C na 37°C. *SSA3* a *SSA4* byly také exprimovány v buňkách pěstovaných při 37°C, ale v mnohem nižších hladinách než po tepelném šoku (WERNER-WASHBURNE *et al.* 1987). *SSA3* a *SSA4* jsou tedy exprimovány v extrémě nízkých hladinách v optimálních podmínkách růstu, ale jsou rychle indukovány jako odpověď na stres (BOORSTEIN, CRAIG 1990).

Řada heat shock proteinů zvyšuje syntézu proteinů v diauxickém shiftu. V experimentech se *S. cerevisiae* se *SSA3* mRNA, která nebyla zjištěna během exponenciální fáze, začala hromadit v diauxickém shiftu a její obsah se zvýšil přibližně pětinásobně během postdiauxické fáze, dále ještě dvojnásobně během stacionární fáze, a zůstal na této hladině až do 21. dne experimentu. Podobně protein Ssa3, byl syntetizován vysokou rychlostí během diauxického shiftu a postdiauxické fáze, ale jeho syntéza se zvýšila pouze dvojnásobně po vstupu do fáze stacionární. Jeho hladina opět zůstala během stacionární fáze konstantní. To znamená, že SSA3 mRNA je efektivněji translatována během diauxického shiftu a časné postdiauxické fáze, než ve fázi stacionární (FUGE *et al.* 1994).

Na rozdíl od *SSA3* mRNA, akumulace mRNA pro *SSA1* a *SSA2* geny byla vysoká během exponenciálního růstu, klesla přibližně šestinásobně během diauxického shiftu a dodatečně desetinásobně během postdiauxické fáze. V průběhu stacionární fáze *SSA1* a *SSA2* mRNA akumulace zůstala v této nízké hladině šedesátinásobně nižší než během exponenciální fáze. Ve stacionární fázi buněk byla rychlost syntézy Ssa1p a Ssa2p překvapivě srovnatelná s Ssa3p syntézou, navzdory snížené akumulaci *SSA1* a *SSA2*

mRNA a vzrůstu u *SSA3* mRNA. Vztah mezi syntézou proteinů a akumulací mRNA pro *SSA1* a *SSA2* a pro *SSA3* je komplikovaný a pravděpodobně odráží změny v traslatovatelnosti těchto mRNA (FUGE *et al.* 1994).



Obr. 9: *Poměr relativní proteosyntézy a akumulace SSA3 mRNA během růstu do stacionární fáze. Vyjádření efektivity translace SSA3 mRNA (Převzato podle FUGE et al. 1994)*

2.7.2 Gen *HSP30*, protein Hsp30

Gen *HSP30* kóduje rovněž protein tepelného šoku u *Saccharomyces cerevisie* (PIPER *et. al.* 1996). Byla určena nukleotidová sekvence, která odhalila 332 aminokyselin proteinu. Protein o velikosti 30kDa byl rozpoznaný protilátkami proti N-terminální části genového produktu. Díky jeho odpovědi na stres a zejména podle molekulové hmotnosti jeho produktu, byl tento gen pojmenovaný *HSP30* (RÉGNACQ a BOUCHERIE 1992).

Produkt *HSP30* genu - Hsps30 protein, byl primárně prokázán jako membránový protein, lokalizovaný v plazmatické membráně *S. cerevisiae* (WU *et al.* 1999). Tento stresový protein byl také identifikován v dalších eukaryotických systémech, například

v kořenech sojových bobů a osmotickým stresem indukovaný 30 kDa protein v řase Dunaliella (PIPER *et al.* 1996).

Hsp30 je tedy vysoce hydrofobní integrální protein plazmatické membrány, který je indukovaný v *S. cerevisiae* nejen v odpovědi na tepelný šok (BRALEY a PIPER 1997) ale i dalšími stresy, limitací glukózy, vystavením etanolu, slabé organické kyselině (WU *et al.* 1999), ale také prudkému osmotickému stresu (PIPER *et al.* 1996) nebo zvýšenému hydrostatickému tlaku. Bylo zjištěno, že indukce HSP30 závisí na typu stresu (GALEOTE *et al.* 2007).

Zvýšená koncentrace etanolu v kvasince *S. cerevisiae*, coby primárního produktu fermentace, má vliv na fluiditu membrány. Etanol se stává toxický pro membránové proteiny, což vede k inhibici buněčného růstu a dokonce k smrti. Ačkoli je málo informací o komplexní signální síti reakcí na etanolovou stresovou odpověď v kvasinkových buňkách, několik mechanismů již bylo objeveno. Zahrnují změny exprese genů, změny ve složení membrány a zvyšování množství proteinových chaperonů, které mohou skládat denaturované proteiny (DING *et al.* 2009). Etanol v koncentracích 4-10%, který působí na růst a kvašení, silně indukuje proteiny tepelného šoku, včetně exprese genu *HSP30*. Tato indukce nastane nad prahovou úrovní okolo 4% etanolu. *HSP30* byl indukovaný v 6% etanolu, ačkoli jeho indukce byla znatelně menší než s 8% etanolem (PIPER *et al.* 1994).

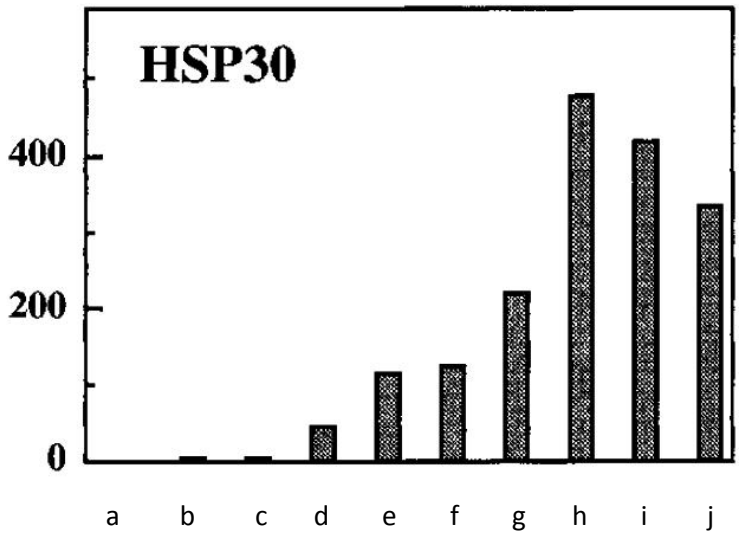
Stresová odpověď na slabé organické kyseliny vedla k silné indukci 2 membránových proteinů Pdr12 a Hsp30. Studie prokázaly, že mutované hsp30 buňky vlivem slabých organických kyselin aktivují zvýšení aktivity plazmatické membránové H+-ATPázy, která je kódována genem *PMA1,* což znamená, že Hsp30 určitým způsobem limituje aktivaci H^+-ATPázy stresem. Hsp30 může tedy sloužit v hospodaření s energií ve stresovaných buňkách (PIE *et al.* 2001).

Bylo také prokázáno, že gen *HSP30* je silně exprimován hydrostatickým tlakem (200 MPa; 30 min) (FERNANDES *et al.* 2003).

V několika pracích bylo zjištěno, že gen *HSP30* je také přednostně exprimován během vstupu do stacionární fáze (RÉGNACQ a BOUCHERIE 1992, PANARETOU a PIPER 1992, DONALIES a STAHL 2001). Mnohé z proteinů tepelného šoku jsou indukované, jakmile kvasinkové buňky zahájí přechod z exponenciální fáze růstu do stacionární fáze růstu. Proto byla provedena analýza proteinů z plazmatické membrány

buněk, kdy po 12 nebo 18 hodinovém růstu ve SF (díky nedostatku glukózy) se zřetelně prokázala přítomnost Hsp30, a také pokles aktivity plazmatické H+-ATPázy (PANARETOU a PIPER 1992). I v tomto případě bylo zjištěno, že funkcí Hsp30 je mimo jiné přímá nebo nepřímá regulace aktivity plazmatické membránové H+-ATPázy (WU *et al.* 1999). Pokles aktivity ATPázy má pravděpodobně důležitý vliv na schopnost buněk udržovat ATPázovou aktivitu, a díky tomu vnitrobuněčné pH během období stresu (PANARETOU a PIPER 1992).

Předchozí práce prokázaly, že Hsp30 mRNA je indukována během vstupu do stacionární fáze v podmínkách, kdy se koncentrace glukózy stává limitující a při mnoha dalších stresových podmínkách. *HSP30* mRNA je ve velmi nízkých koncentracích přítomna dokonce během exponenciální fáze na glukóze, ale je dále indukována tepelným šokem a etanolem. Různé druhy prudkého osmotického stresu způsobují jen malou indukci mRNA. Mírná indukce je také vidět s oxidačním stresem. Chladový šok, nebo mírnější osmotický stres indukci nezpůsobí. Ale stres slabou organickou kyselinou byl ještě silnější než navození exprese *HSP30* teplem, nebo etanolovým působením (SEYMOUR *et al*. 1999). Exprese *HSP30* byla studována také s použitím HSP30::LacZ fúze na multikopiových a monokopiových vektorech. Produkce ß-galaktosidázy rekombinantními buňkami byla měřena během buněčného růstu a kvašení na přírodním vinném moštu. Bylo zjištěno, že mírná exprese genu *HSP30* je zahajována při přechodu do stacionární fáze růstu a k výrazné indukci dochází až během pozdní stacionární fáze (po 72 až 85 hodinách) a zůstává aktivní až dokonce vinného fermentačního procesu, kdy vysoká hladina mRNA transkriptů byla až do konce fermentace (Obr. 10) (RIOU *et al.* 1997). Ovšem na komplexním médiu s glukózou dochází k expresi *HP30* už dříve, a to hned na počátku stacionární fáze, kdy silná exprese byla detekována i po dalších 8-10 hodin (DONALIES a STAHL 2001).



Obr. 10: *Exprese genu HSP30 (hladina mRNA) během vinné fermentace. a: start fermentace (15h), b,c: exponenciální fáze (24h, 35h), d: začátek přechodu do stacionární fáze (45h), e,f,g,h: stacionární fáze (55h, 61h, 72h, 85h), i, j: konec fermentace (96h, 106h) (Převzato podle RIOU et al. 1997).*

Aktivaci genů tepelného šoku mohou řídit dvě zcela odlišné sekvence promotoru *S. cerevisiae*. Jsou to heat shock elementy (HSE) a hlavní stres citlivé elementy (STRE). HSE jsou vazebná místa pro heat shock faktor (Hsf1) a transkripční transaktivátor, který řídí indukci exprese genu a odpověď na tepelný šok. STRE jsou na rozdíl od HSE aktivované nejen tepelným šokem, ale také různou řadou dalších stresových podmínek. Zdá se, že jednotlivé geny tepelného šoku mohou být pod kontrolou HSE, STRE, nebo mohou být řízeny jak HSE tak STRE. Za účelem zjištění, zda *HSP30* gen je pod HSE nebo STRE kontrolou, byla provedena řada experimentů. Bylo vyhodnoceno, že *HSP30* není pod kontrolou ani jednoho z těchto elementů a že musí v kvasince existovat třetí systém pro aktivaci genu tepelným šokem (SEYMOUR *et al.* 1999). Bylo tedy prokázáno, že aktivace Hsp30 je velkou měrou nezávislá na Hsf1 a částečně nezávislá na Msn2p/Msn4p (DING *et al.* 2009).

Dále bylo zjištěno, že do transkripční aktivace *HSP30* je jako klíčová komponenta zapojený protein Sfl1. Sfl1 protein, který byl dříve identifikován jako represor, ale funguje také jako aktivátor *HSP30*. Bylo prokázáno, že Sfll1p reguluje transkripci z *HSP*30 genu

během exponenciálního růstu na glukóze, stejně jako pod stresovými podmínkami. Pozitivní účinky Sfl1 na expresi *HSP30* byly potvrzeny microarray analýzou v etanolových podmínkách (GALEOTE *et al.* 2007). Bylo ovšem pozorováno, že delece *SFL1* způsobí expresi *HSP30*, ke které by ale mělo docházet pouze ve stresových podmínkách. Z tohoto vyplynulo, že aktivace *HSP30* pravděpodobně zahrnuje ještě i další signální transdukční cestu (DING *et al.* 2009).

2.8 Zelený fluorescenční protein Gfp

Ke studiu lokalizace proteinů v buňce se dnes velice hojně využívá možnosti „označit" protein pomocí fluoreskující „značky". Nejčastěji se jedná o využití genu *GFP* a jím kódovaného proteinu Gfp.

Green Fluorescence Protein (Gfp) je fluorescenční protein láčkovců - mořské medúzy *Aequorea victora* a mořské fialky *Ranilla reniformis*. Je to molekula o 238 aminokyselinách, jejíž přirozenou funkcí je převádět chemiluminiscenci modrého Ca^{2+} senzitivního fotoproteinu aequorinu na zelené světlo (510 nm) (WARD *et al.* 1979). Je kódován genem *GFP*, který se v současné době používá jako neinvazivní marker v živých buňkách ke značení proteinů a buněk. Původní Gfp protein má dva excitační vrcholy: hlavní na 395 nm a vedlejší na 475 nm. Dnes existuje více mutantů genu, které mají větší intenzitu fluorescence, a hlavní excitační maximum je posunuto k delším vlnovým délkám. Je různě upravován, takže vedle zeleného fluorescenčního proteinu jsou dnes k dispozici také jeho žlutá (Yfp) a modrozelená (Cfp a Bfp) varianta, ale také nepříbuzný červený fluorescenční protein.

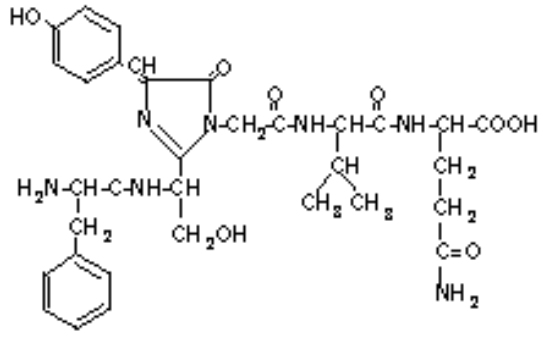
Chromofor *GFP* (p-hydroxybenzylidene-imidazolidone), odpovědný za absorpci světla, vzniká postranslačními změnami (oxidací a cyklizací) tripeptidové sekvence Ser-Tyr-Gly na pozicích 65-67 (HEIM *et al.* 1994). Pro vytvoření fluoroforu je Gly esenciální aminokyselinou, žádná jiná ji nemůže zastoupit (ORMÖ *et al.* 1995). Atmosférický kyslík je velice významný pro fluorescenci. *GFP* v anaerobním růstu *E. coli* je nefluoreskující, ale *GFP* exprese v aerobním růstu *E. coli* má stejné vlastnosti jako izolovaný protein z *A. victora* (NIEDENTHAL 1996).

GFP je velice často využíván především díky jeho schopnosti exprese v různých organizmech, a to bez zásahu do cellulárních funkcí (GRILLY *et al.* 2007). K expresi *GFP* není zapotřebí přidání žádné externí látky. *GFP* geny mohou být přeneseny a exprimovány v širokém okruhu organizmů, například savců, ryb, hmyzu, rostlin, kvasinek a různých druhů bakterií. *GFP* neinterferuje s růstem hostitele, proto je také vynikající volbou pro nondisruptivní studie bakteriálních společností, nebo dalších systémů vyžadující živé buňky (ANDERSEN 1998). Hlavní nevýhodou Gfp je, že je velmi stabilní (ANDERSEN 1998). Ve většině buněk se jeho stabilita pohybuje v časovém měřítku hodin ke dnům. Z buněk je odstraňován hlavně díky růstu a následnému ředění (GRILLY *et al.* 2007).

Gfp protein je velmi stabilní i v různých podmínkách – ve vysoké teplotě (termostabilní při 90°C), v extrémním pH (pH < 4 a >12), k chemickým prostředkům a je také odolný proti denaturaci (YANG *et al.* 1996*)*. Fluoreskuje do teplot 65°C, pH>11, v přítomnosti různých detergentů a dokonce v 6M guanidinium chloridu je odolný k účinkům většiny proteáz po mnoho hodin (ORMÖ *et al.* 1995).

Buněčné peptidy a bílkoviny mají také vlastní (vnitřní) fluorescenci díky třem aromatickým aminokyselinám (tryptofan, tyrosin, fenylalanin). Fluorescence proteinů je „směsí“ fluorescence jednotlivých aminokyselin. Jsou excitovány při 280 nm a emitují kolem 330 nm. Jedná se o tzv. autofluorescenci.

Pomocí fluorescenčního sledování GFP značených buněk, lze především hlavně stanovit lokalizaci proteinů v buňce, ale také přesně a citlivě stanovit biomasu a lokalizovat kulturu bez komplikovanějšího stanovení pomocí biochemických testů.



Obr. 11: *Chemická struktura chromoforu Gfp v Aequorea victora. Cyklický chromofor je vytvořený z trimeru Ser-dehydroTyr-Gly uvnitř proteinu neznámým mechanismem (Převzato podle PRASHER et al. 1991).*

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Použité mikroorganizmy

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h

kmen odvozený od *S. cerevisiae* Σ1278 (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2005)

MATa; prototrofní , sbírka DMUP

Kmeny odvozené od *Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h:

místo stop kodonu příslušného genu byla vložena kazeta s genem *yEGFP* a *Kan*

(tato práce):

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h-*GUT1*

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h-*SMI1*

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h-*SSA3*

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h-*HSP30*

Saccharomyces cerevisiae ΣS^h Δ*flo11*

MATa; prototrofní (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2009), sbírka DMUP

Saccharomyces cerevisiae BY4742α

MATα*; his3Δ1,leu2Δ0, lys 2Δ0,ura3Δ0,* rodičovský kmen

Kmeny odvozené od *Saccharomyces cerevisiae* BY4742α,

příslušný gen byl nahrazen genem *kanMX4:*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α Δ*rtg1*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α Δ*rtg2*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α Δ*rtg3*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α Δ*fis1*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α Δ*cit2*

Saccharomyces cerevisiae BY4742α

MATα*; his3Δ1,leu2Δ0, lys 2Δ0,ura3Δ0,* YNR002c::kanMX4

Kmeny pocházejí ze sbírky EUROSCARF (sbírka kmenů s deletovanými geny - www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf), ostatní kmeny byly získány ze sbírky kvasinek DMUP Katedry genetiky a mikrobiologie Univerzity Karlovy v Praze.

3.1.2 Přístroje

- Centrifuga – Hettich, výměnný rotor pro 8x50 nebo 8x15 centrifugačních zkumavek, max. 5500 ot./min.; rotor pro 30 mikozkumavek, max. 13000 ot./min.
- Mikrocentrifuga – Hettich, rotor pro 24 mikrozkumavek, max. 13000 ot./min.
- Elektroforéza – zdroj (E-C Apparatus Corporation)

- Světelný mikroskop (objektiv 10x, 20x, 45x, imerzní objektiv 100x)
- Fluorescenční mikroskop Leica DMR: (objektivy 10x, 25x, 40x, imerzní objektiv 100x, Nomarského kontrast)
- Fluorescenční lupa Leica MZ16F
- Kamera barevná Nicon DS-U1
- Kamera Matrox Meteor II
- Kamera ProgRES$_{CT3}$
- Spektrofotometr Helios
- Magnetická míchačka Micro Stirrer (Scientifica)
- Mikromanipulátor Jena2230 (Carl Zeiss)
- Osvětlovací systém Fiber-Lite PL-800 (Dolan Jenner)
- PCR MiniCycler^{TM} (MJ Research)
- Spektrofotometr DU-530 (Beckman Coulter)
- Průtokový cytometr BD^{TM} LSR II
- Termostat „Biological termostat type BT 120“
- Thomova počítací komůrka
- UV transiluminátor (Ultra-Lum)
- Sterilní box TELSTAR AH-1
- Vodní lázeň (Grant Instruments)
- Vodní třepačka MENNERT
- Vortex Genie 2^{TM}

3.1.3 Kultivační média

Pokud není uvedeno jinak, veškeré složení médií a roztoků je uváděno v hmotnostních procentech. Roztoky a média jsem připravovala z uvedených chemikálií a z destilované vody upravené na přístroji Rowapur (Watrex). Ze stejného přístroje byla i DEMI voda (demineralizovaná). Všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a.

3.1.3.1 Tekutá média

YEPG: 0,5% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 77)

1% pepton (Imuna)

2% glukóza

GM: 1% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 77)

3% glycerol

3.1.3.2 Pevná média

YEPG: 2% agar (Kulich)

0,5% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 77)

2% pepton (Imuna)

2% glukóza

- agar a glukóza sterilizovány společně

- pepton a kvasničný autolyzát sterilizovány společně

YEPG s antibiotikem G418: YEPG s přidáním požadované množství antibiotika (400 μg / ml média) přidáno ke sterilnímu médiu po ochlazení média na teplotu přibližně 60 °C.

GM: 2% agar (Kulich)

1% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 77)

3% glycerol

- kvasničný autolyzát sterilizován samostatně

Obměny GM média:

GMe: GM s přidáním 1% etanol

GMeB: GM s přidáním 1% etanol, 100 mg BKP (Sigma)

GMCa: 2% agar (Kulich)

1% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 68)

3% glycerol

1% etanol

30 mM $CaCl_2$ (Sigma)

- glycerol a agar sterilizovány společně

- kvasničný autolyzát sterilizován samostatně, po sterilizaci upraveno pH 5

- $CaCl_2$ sterilizován samostatně

- před nalitím ploten přidán etanol

GMCaB: GMCa s přidáním 100 mg BKP (Sigma)

- před nalitím ploten přidán etanol s BKP

Mikromanipulační agar:	0,5% kvasničný autolyzát (Imuna – šarže 77)
	1% bactopepton (Imuna)
	2% glukóza
	2% agar (Oxoid)
Skladovací médium:	2,5% malt. extrakt (Oxoid)
	0,25% kvasničný autolyzát (Serva)
	0,5% bactopepton (Oxoid)
	15% hovězí sérum
	10% dimethyl sulfoxid (DMSO) (Serva)

3.1.4 Roztoky

3.1.4.1 Jednoduché roztoky

1% agarózový gel	agarózu (Serva) dle požadovaného množství rozvařit v 1x TBE pufru
1000 x EtBr:	5 mg etidiumbromidu (Serva) / 1 ml H_2O
1% agaróza	agarózu (Serva) dle požadovaného množství rozvařit v H_2O
1 M $CaCl_2$:	14,1 g $CaCl_2$ (Sigma) / 100 ml H_2O

1 M HCl:	3 ml zásobní kyseliny (36%; Lachema)/100ml H_2O
1 M NaOH:	4 g NaOH / 100 ml H_2O
10% kys. citrónová:	10 g kyseliny citrónové / 100 ml demi H_2O
Roztok N:	2,3585 g $(NH_4)_2SO_4$ / 1000 ml demi H_2O (tj. 1 µg N/1 µl roztoku)
40% PEG:	40g polyethylenglykolu (Sigma) / 60 ml H_2O
1 M LiAc:	10,2 g LiAc (Sigma) / 100 ml H_2O
0,5 M EDTA-NaOH:	18.6 g Na_3EDTA (Chelaton 3; Serva) / 100 ml H_2O (pH upravené 1 M NaOH podle potřeby)
1 M Tris-HCl:	12,1 g Tris báze (Sigma) / 100 ml H_2O (pH 7,5 či 8)
1M kys. boritá	6,18 g kyseliny borité / 100 ml H_2O
DHE:	5 µg dihydroethidia / 1 ml H_2O

PI: 16 µg propidiumiodidu / 1 ml H_2O

3.1.4.2 Složené roztoky

TBE 10x: 40 mM Tris, pH 8 (Lachema)

2 mM EDTA, pH 8 (Lachema)

90 mM kyselina boritá (Lachema)

LiAC/ss-DNA/PEG: 50% polyethylen glykolu 3350 (Sigma)

1 M LiAc

ss-DNA

DNA-inzerční kazeta

3.1.5 Antibiotika

Geneticin G418 (Duchefa biochemie) – 400 µg / 1 ml média

Amplicilin (Biotika) – 20 µg / 1 ml média

3.1.6 Barevné indikátory

BKP – bromkresolový purpur (Sigma) rozpuštěný v 96% etanolu (10 mg / ml etanolu)

konečná koncentrace v kultivačním médiu – 0,1 mg/ml média

indikátor pH: fialová (pH ≥ 6,8)

žlutá (pH ≤ 5,2)

3.1.7 Ostatní

Agarózový gel – TBE, 1% agaróza (Serva)

Nesslerovo činidlo (Merck)

3.1.8 Materiál pro práci s DNA

Standard molekulových hmotností pro DNA: GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix (MBI Fermentas)

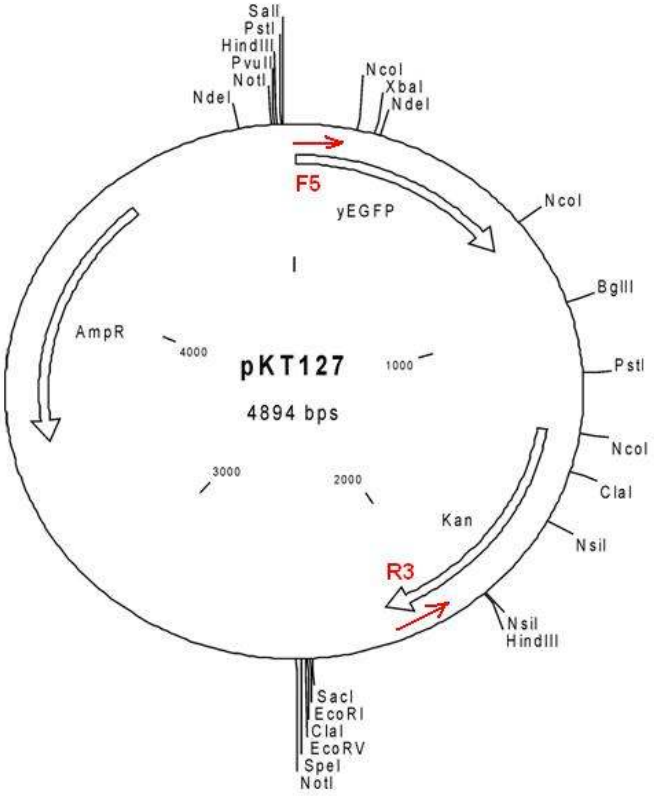
ssDNA - Salmon sperm (BioLabs)

PCR: PPP Master Mix (Top Bio)

PCR H_2O (Top Bio)

3.1.9 Plazmid a primery

Plazmid pKT127 (Obr. 12) nese gen *GFP* a Kan selekční marker. Tento úsek o velikosti 2500 bp byl použit pro přípravu transformačních kazet.



Obr. 12: *Plazmid pKT127*

Primery:

Primery pro konstrukci transformačních kazet. Velká písmena - sekvence z konce příslušného genu (F2) nebo komplementární k oblasti těsně za jeho stop kodonem (R1). Malá písmena - sekvence z plazmidu (F5 a R3).

Pro *GUT1* gen *(YHL032C),* který leží na VIII. chromosomu (38506 až 36377).

- *Přímý* (F2+F5):
  5´CATAGAAGGTGAACACGAACAGGTTCTAGAAAACTTCCAAggtgacggtgc tggttta 3´
- *Reverzní* (R1+R3):
  5´ATTATGGAAATTACATTGTTAATAGAAATTATTTATGTTGtcgatgaattcgag ctcgtt 3´

Pro *SMI1/KNR4* gen *(YGR229C),* který leží na VII. chromosomu (950902 až 949385).

- *Přímý* (F2+F5):
  5´AGTGGAAGAAGCGAGAGAAGAATTTGAAAATATAGCTTTAggtgacggtgc tggttta 3´
- *Reverzní* (R1+R3):
  5´CCAAATTTCTTTTTGGTTGTAGAATGTTAATTGTGATATTtcgatgaattcgagc tcgtt 3´

Pro *SSA3* gen *(YBL075C),* který leží na II. chromosomu (86446 až 84497).

- *Přímý* (F2+F5):
  5´AGGTGGAGAAGATACAGGTCCAACAGTGGAAGAGGTTGATggtgacggtgc tggttta 3´
- *Reverzní* (R1+R3):
  5´AACATAAAAAGTAGCTAAATAGAACACTATAGAAGAATAAtcgatgaattcg agctcgtt 3´

Pro *HSP30* gen *(YCR021C),* který leží na III. chromosomu (157103 až 156105).

- *Přímý* (F2+F5):
  5´ACCCGAACCTGAAGCAGAGCAAGCTGTCGAAGATACTGCTggtgacggtgctggttta 3´
- *Reverzní* (R1+R3):
  5´TGTGTTAAGCAAAGAATGATTAAGACAATCTCAAGCTGCTtcgatgaattcgagctcgtt 3´

Primery pro ověření integrace genu *GFP*. Přímý primer Ext F – vymezující oblast sekvence z poslední třetiny příslučného genu (546 nukleotidů - *GUT1*, 599 nukleotidů - *SMI1*, 535 nukleoidů - *SSA3*, 524 nukleotidů - *HSP30*). Reverzní primer yEGFP Int R – vymezující sekvenci z první třetiny genu *GFP* (601 nukleotidů – *GFP*).

Pro ΣS^h-*GUT1*:

GUT1 Ext F: 5´GGGCTATCTTGAAGGCAATG 3´

yEGFP Int R: 5´CTGGACCATCACCAATTG 3´

Pro ΣS^h-*SMI1*:

SMI1 Ext F: 5´TTAGCGGTGATGGTGAATTG 3´

yEGFP Int R: 5´CTGGACCATCACCAATTG 3´

Pro ΣS^h-*SSA3*:

SSA3 Ext F: 5´GTGTCTGCTTTGGAAAAGGG 3´

yEGFP Int R: 5´CTGGACCATCACCAATTG 3´

ΣS^{h}-*HSP30*:

HSP30 Ext F: 5´CGTGGGTACCTTATTCTGGG 3´

yEGFP Int R: 5´CTGGACCATCACCAATTG 3´

3.1.10 Počítačové databáze a programy

Databáze:

Saccharomyces Genome Database (SGD)

http://genome-www.Stanford.edu/Saccharomyces

Pubmed Medline

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Yeast Proteome Database

http://www.proteome.com

Návrh CHK primerů

http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp

Software pro analýzu obrazu:

NIS – Elements AR 3.0 (Laboratory Imaging)

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace

Roztoky, párátka, špičky k mikropipetám a mikrozkumavky Eppendorf jsem sterilizovala vodní parou v autoklávu při tlaku 120 kPa a teplotě 127,6 °C po dobu 20 minut. Petriho misky, upravené pro zachycení amoniaku, jsem sterilizovala 24 hodin parami Persterilu (30% roztok kyseliny peroctové) v uzavřeném igelitovém sáčku. Laboratorní sklo jsem sterilizovala suchým teplem při teplotě 160 °C po dobu 90 minut. Drobné předměty (pinzety, hokejky, mikrobiologická klička) jsem sterilizovala žíháním za sucha nebo po namočení v etanolu. Všechny manipulace s buňkami jsem prováděla ve sterilním boxu.

3.2.2 Uchovávání zásobních kultur

3.2.2.1 Krátkodobé skladování

Kvasinkové kultury jsem krátkodobě skladovala na pevných médiích v Petriho miskách s YEPG médiem, zalepených parafilmem, při teplotě 4 °C.

3.2.2.2 Dlouhodobé skladování

Pro dlouhodobé skladování jsem kvasinkové kultury uchovávala v mikrozkumavkách ve skladovacím médiu v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.2.3 Stanovení počtu buněk

Počet buněk jsem stanovovala pomocí Thomovy počítací komůrky v mikroskopu při zvětšení 10x20.

3.2.4 Stanovení růstové křivky a optické denzity (OD)

Kvasinkové kmeny jsem kultivovala v tekutých GM médiích (30 ml) aerobně v Erlenmayerových baňkách při 28 °C. Optickou denzitu rostoucích kvasinkových kultur jsem měřila na spektrofotometru při vlnové délce 490 nm ve skleněných kyvetách (optická dráha 10 nm). Jako srovnávací vzorek jsem použila příslušné GM médium.

3.2.5 Kultivace mikroorganizmů

3.2.5.1 Kultivace v tekutém médiu

Kvasinky jsem kultivovala v tekutých YEPG médiích aerobně v Erlenmayerových baňkách na třepačce při 28 °C. Erlenmayerova baňka byla naplněna médiem z 1/3.

3.2.5.2 Kultivace na pevném médiu

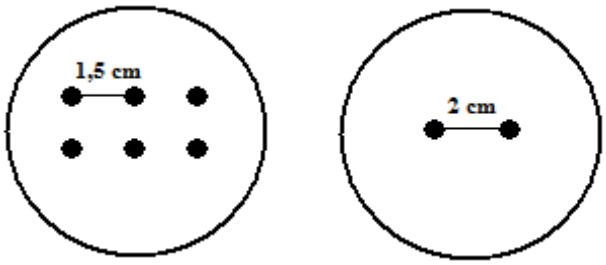
Kvasinky jsem kultivovala na Petriho miskách formou nátěru, nebo jako kolonie v termostatu při 28 °C. Kultivace ve formě nátěru jsem dosáhla nanesením kultury pomocí mikrobiologické kličky nebo párátka.

3.2.5.3 Výsevy monokolonií

Biomasu narostlých buněk jsem odebrala párátkem (množství odpovídající velikosti špendlíkové hlavičky) a resuspendovala v 1 ml destilované vody. Kulturu naředěnou na požadovanou hustotu jsem nanesla na agarovou plotnu a rozetřela hokejkou.

3.2.5.4 Výsevy obřích kolonií

Biomasu narostlých buněk jsem odebrala párátkem (množství odpovídající velikosti špendlíkové hlavičky) a resuspendovala v 1 ml destilované vody. V závislosti na zvoleném experimentu jsem koncentraci biomasy dále naředila. Kapky o objemu 10 µl jsem nakapávala na střed misky, nebo 1,5 cm od sebe pro šestice a 2 cm pro dvojice na střed misky (Obr. 13).



Obr. 13: *Nanášení obřích kolonií na Petriho misku s pevným médiem.*

3.2.6 Fotografování kvasinkových kolonií a mikroskopických preparátů

Mikroskopické preparáty jsem fotografovala černobíle a pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu Leica DMR v programu NIS-Elements. Pro viditelné světlo s využitím Nomarského kontrastu pod 100x imerzním objektivem a pro fluorescenci s GFP filtrem a filtrem pro červené světlo. Pro pozorování kolonií a řezů kolonií jsem používala fluorescenční lupu Leica MZ16F v programu NIS-Elements. Při sledování kolonií značených GFP jsem používala filtr GFP a pro kolonie s BKP jsem používala filtr TXR. Fotografie celých kultivačních ploten jsem pořizovala pomocí barevné kamery $ProgRES_{CT3}$ v programu NIS-Elements.

3.2.7 Příprava řezů koloniemi

Vybrané kolonie jsem zalila 1% agarem (teplota cca 50-60 °C) tak, aby byly zcela překryté. Po ztuhnutí této horní vrstvy jsem vyřízla bloček agaru s vybranou kolonií a z něj pomocí žiletky připravila řezy vedené středem kolonie a pozorovala pod fluorescenční lupou.

3.2.8 Barvení ROS

Použila jsem 21 dnů staré kolonie kvasinkových kmenů rostoucích na GM médiu s 3% glycerolem. Buňky jsem odebírala z definovaných částí kolonie a barvila dihydroethidiem (DHE) při finální koncentraci 5µg/ml. DHE jsem nechala 10 minut působit, a poté buňky pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem.

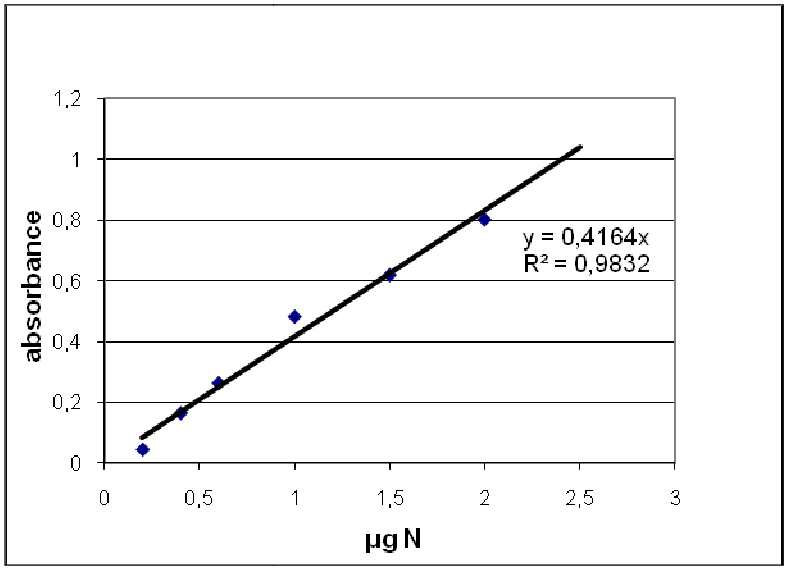
3.2.9 Stanovení amoniaku

Amoniak produkovaný obřími kvasinkovými koloniemi jsem zachytávala do dvou malých mističek s 10% kyselinou citrónovou (500 µl kyseliny na nádobku). Nádobky byly umístěny ve víčku Petriho misky naproti dvojici kolonií.

Vlastní stanovení amoniaku je založené na reakci amoniaku a hydroxidu alkalických kovů s tetrajódrtuťnatanem sodným (Nesslerovo činidlo) za vzniku tzv. Millonovy báze. Millonova báze je žlutohnědá sloučenina, jejíž koloidní roztoky je možné kolorimetricky vyhodnocovat (HOLZBECHER *et al.* 1968).

Ke 100 µl vzorku (amoniak absorbovaný kyselinou citrónovou) jsem přidala 900 µl demi H_2O a 1000 µl Nesslerova činidla. Po deseti minutách jsem změřila absorbanci při vlnové délce 430 nm (HELIOS). Pomocí kalibrační přímky (obr. 14) jsem k zjištěným hodnotám absorbance přiřadila hodnoty udávající množství přítomného dusíku (amoniaku).

Kalibrační přímku jsem zhotovila pomocí roztoku síranu amonného (roztok N). Tento roztok jsem použila na přípravu šesti vzorků, tvořených kyselinou citrónovou a definovaným množstvím amonných iontů. Vzorky jsem výše popsaným způsobem nechala reagovat s Nesslerovým činidlem a potom změřila absorbanci. Z naměřených hodnot jsem sestrojila kalibrační přímku.



Obr. 14: *Kalibrace obsahu dusíku pro stanovení produkce amoniaku obřími koloniemi S. cerevisiae pomocí Nesslerova činidla.*

3.2.10 Amplifikace DNA úseku z plazmidu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Do tenkostěnných PCR mikrozkumavek jsem napipetovala následující množství reakční směsi:

12,5 µl PPP Master Mix

2 µl templátové DNA (plazmid pKT127)

1 µl primeru přímého (10x ředěný 100pmol/µl)

1 µl primeru reverzního (10x ředěný 100pmol/µl)

8,5 µl PCR H_2O

Směs jsem promíchala na vortexu, krátce zcentrifugovala, vložila do PCR cykléru a zvolila následující program 2 cyklové PCR:

1.	94 °C	5 min
2.	94 °C	30 sec
3.	55 °C	45 sec
4.	72 °C	2 min
5.	94 °C	30 sec
6.	68 °C	45 sec
7.	72 °C	2 min
8.	72 °C	12 min
9.	4 °C	∞

Oba cykly (2. - 4. a 5. - 8.) byly 35x opakované. Přítomnost PCR produktu jsem ověřovala pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu, vzorky po PCR jsem uchovávala při -20 °C.

3.2.11 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)-ověřovací

Do tenkostěnných PCR mikrozkumavek jsem napipetovala následující množství rekční směsi:

12,5 µl PPP Master Mix

0,5 µl templátové DNA (izolovaná chromozomální DNA)

1 µl primeru přímého (10x ředěný 100pmol/µl)

1 µl primeru reverzního (10x ředěný 100pmol/µl)

10 µl PCR H_2O

Směs jsem promíchala na vortexu, krátce centrifugovala, vložila do PCR cykleru a zvolila následující program PCR - Actin:

1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	1 min
3.	50 °C	45 sec
4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	12 min
9.	4 °C	∞

Cyklus 2. – 4. byl opakován 40x. Přítomnost PCR produktu jsem ověřovala pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu.

3.2.12 Izolace chromozomální DNA z kvasinek

Z kvasinkových kmenů, kultivovaných 48 hod při teplotě 28 °C na pevném YEPG médiu, jsem nabrala buňky a resuspendovala v 15 µl NaOH (20 mM). Všechny vzorky jsem inkubovala 15 min při teplotě 95 °C v cykleru. Vzorky jsem několik minut vortexovala a poté centrifugovala (2 min, 4000 ot./min.). Pro PCR jsem použila supernatant těchto vzorků.

3.2.13 Horizontální elektroforéza v agarozovém gelu

Rozvařením příslušného množství agarózy v 50 ml TBE pufru byl připraven 1% agarózový roztok, k němuž bylo přidáno 20 µl EtBr. Po ochlazení na 50-60 °C byla agaróza nalita do plexisklového bločku s připraveným hřebenem. Po ztuhnutí gelu byl bloček umístěn do elektoforetické vany a přelit opět TBE pufrem tak, aby hladina sahala nad povrch gelu. Byl vyjmut hřeben z gelu a do vzniklých jamek byly napipetovány vzorky. Standart molekulových hmotností pro DNA byl nanášen v množství 1 µl a vzorky DNA 3 µl. Elektroforetické bločky byly připojeny ke zdroji 5 V/cm. Po doputování čela asi 2 cm od kraje byl zdroj napětí odpojen. Po skončení elektroforetického dělení byl gel analyzován a focen v UV transiluminátoru.

3.2.14 Transformace kvasinek – LiAc/ssDNA/PEG METODA

(Gietz *et al*. 2002)

3.2.14.1 Příprava buněk

Kvasinkovou kulturu jsem zaočkovala do 25 ml tekutého YEPG média a aerobně kultivovala při 28 °C přes noc. Druhý den jsem buňky spočítala a zaočkovala do YEPG média na hustotu 5 x 10^6 b/ml média. Buňky jsem dále aerobně kultivovala při 28 °C do hustoty 2 x 10^7 b/ml média. Kulturu jsem centrifugovala (5 min, 3000 rpm), poté promyla v 25 ml sterilní destilované vody a buňky jsem resuspendovala v 1 ml sterilní destilované vody. Připravené buňky jsem převedla po 100 µl (cca 10^8 buněk) do 1,5 ml ependorfky (počet zkumavek podle počtu vzorků), centrifugovala 30 sec a pipetmanem odstranila supernatant.

3.2.14.2 Transformace buněk

Podle počtu vzorků jsem připravila dostatečné množství transformační směsi, kterou jsem udržovala na ledové lázni. Na 1 vzorek směs obsahovala 50 µl nosičové jednořetězové DNA (salmon sperm DNA, denaturovaná před použitím 10 minut varem a

zchlazená na ledu), 34 µl plazmidové DNA, 36 µl LiAc (1,0 M) a 240 µl PEG. Takto připravenou směs (360 µl) jsem přidala spolu s buňkami (100 µl) do transformační mikrozkumavky, celou směs jsem promíchala na vortexu a inkubovala 40 minut při 42 °C na vodní lázni. Potom jsem vzorek dvakrát krátce centrifugovala (30 s; max. rpm) a pipetmanem odstranila supernatant. Nakonec jsem buňky resuspendovala v 1 ml sterilního tekutého YEPG média a aerobně kultivovala při 28 °C 3 hod. Po třech hodinách jsem kultury vysela na selekční médium (YEPG médium s geneticinem 400 µg/ml).

3.2.15 Mikromanipulace

Z čerstvě přeočkovaných kvasinkových kmenů, kultivovaných 48 hod na pevném YEPG médiu, jsem kvasinky naředila sterilní vodou, suspenzi buněk jsem přenesla kličkou na mikromanipulační agar. Kličkou se suspenzí jsem vytvořila tenkou linii, ze které jsem pak následně mikromanipulací oddělovala jednotlivé buňky rozmístěny po agaru tak, aby každá buňka rostla jako samostatná monokolonie. Po skončení mikromanipulace jsem tyto kultivační misky inkubovala při teplotě 28 °C.

3.2.16 Průtoková cytometrie

Kvasinkové kmeny jsem kultivovala na pevném GM médiu při teplotě 28 °C. V příslušných dnech a z definovaných částí kolonie jsem odebírala malé množství kvasinkových buněk, které jsem resuspendovala v destilované vodě (100 µl) v mikrotitrační destičce. U takto připravených buněk jsem měřila fluorescenci pomocí průtokového cytometru BD^{TM} LSR II. Průtokovým cytometrem jsem také měřila buňky obarvené PI.

4. VÝSLEDKY

4.1 Produkce amoniaku obřími koloniemi kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742α a alkalizace média v okolí rostoucích kolonií

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat časový vývoj obřích kolonií kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742α a mutant deletovaných v genech *RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2* z hlediska produkce amoniaku a alkalizace média.

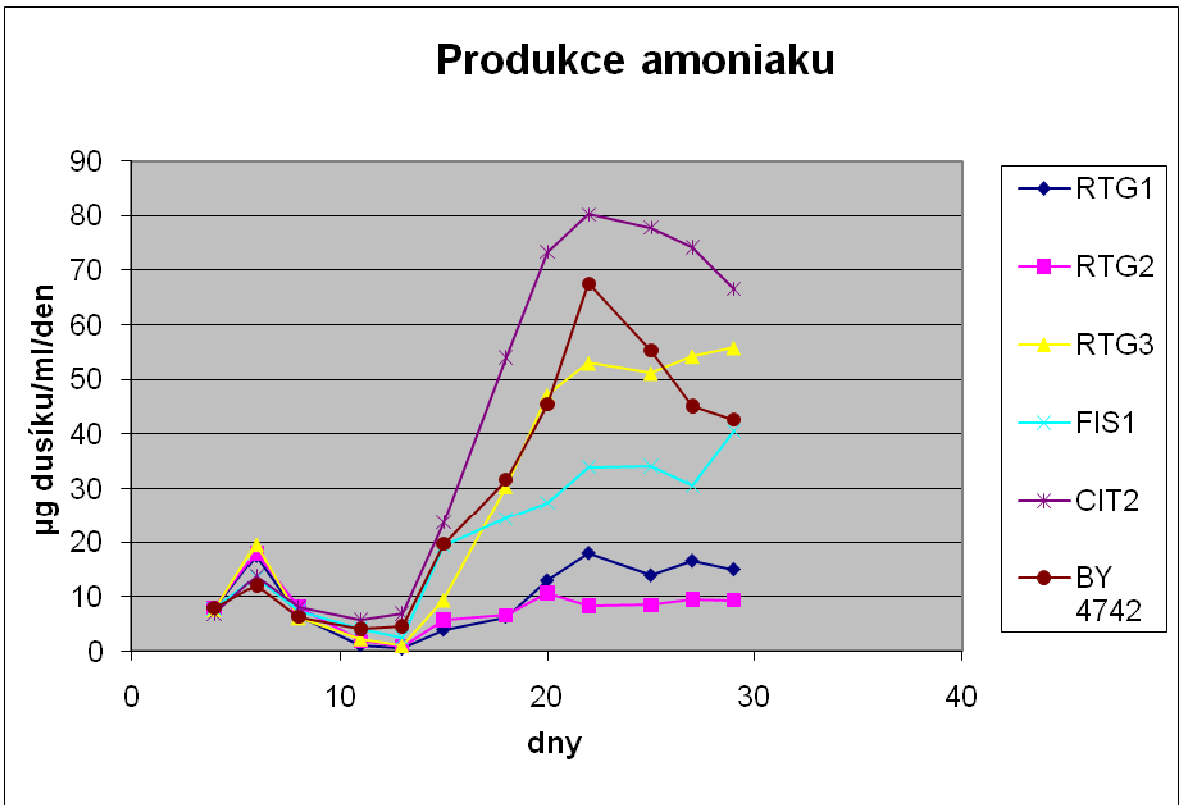
Produkce amoniaku, alkalizace/acidifikace média

Zjišťovala jsem produkci amoniaku obřími koloniemi a alkalizaci média u delečních mutant *RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2* a porovnávala jsem je s produkcí obřích kolonií rodičovského kmene BY4742α.

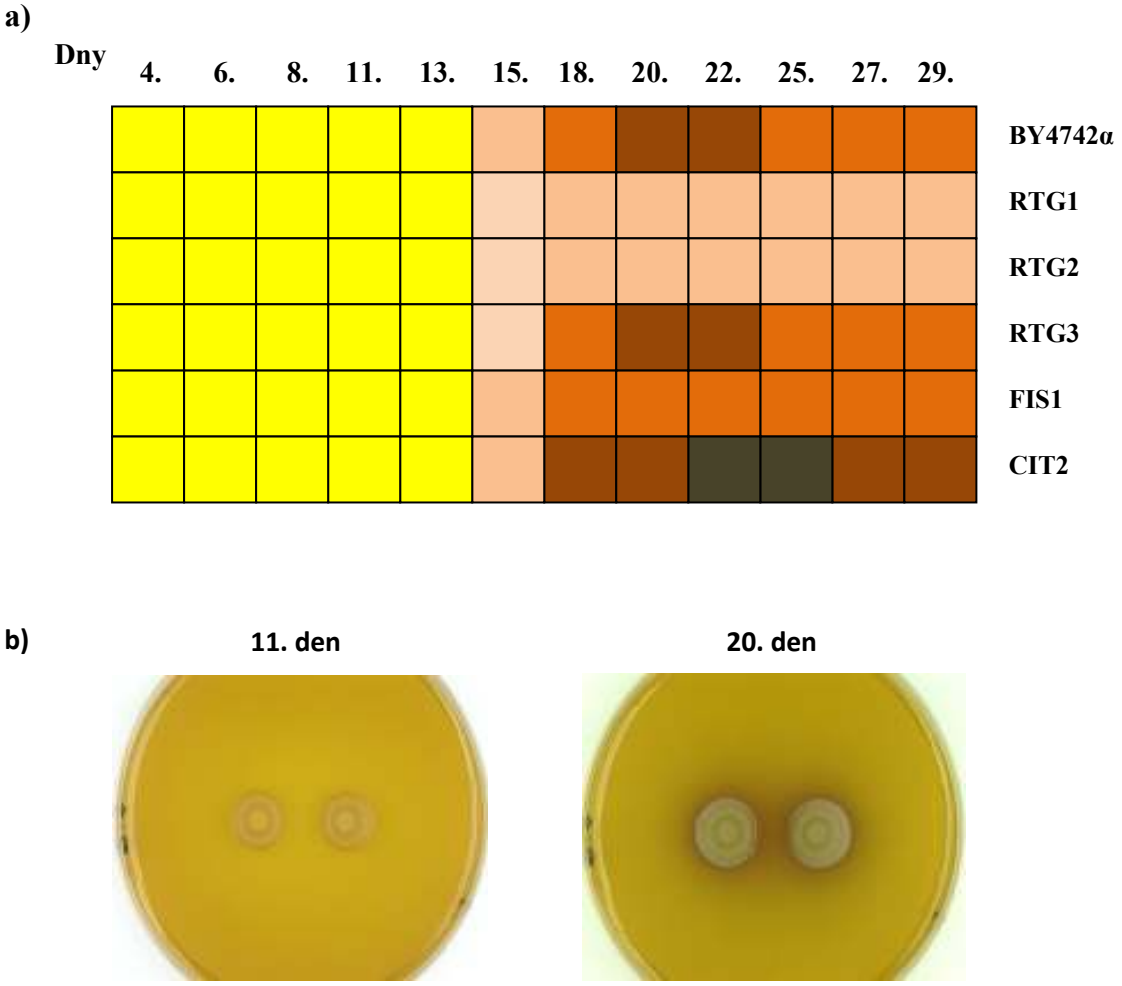
Z čerstvě vyočkované kultury kultivované 48 hod na pevném YEPG médiu s 1% glukózou jsem připravila suspenzi buněk a nakapala obří kolonie (dvojice ve vzdálenosti 1,5 cm) na glycerolové GM médiu, kdy kultivace probíhala při 28 °C 29 dnů. Amoniak jsem zachytávala do dvou malých nádobek s 10% kyselinou citronovou, které byly umístěny ve víčku Petriho misky naproti dvojici kolonií. Měřila jsem množství amoniaku vyprodukované koloniemi za jeden časový interval (1-4 dní), kdy pro jsem pro každý odběr použila dvě paralelní misky se dvěma obřími koloniemi od všech kmenů. V příslušných časových intervalech, jsem tedy pro všechny kmeny získala údaje o produkci amoniaku u dvou párů kolonií. Na odběry v každém z intervalů jsem použila vždy nové dvojice Petriho misek. Amoniak jsem stanovovala kolorimetricky pomocí Nesslerova činidla (kalibrační křivka viz Obr. 14). Pro sledování alkalizace média jsem použila GM médium s pH indikátorem BKP. Alkalizaci/acidifikaci média jsem sledovala na základě barevných změn pH indikátoru. Fialová barva indikuje alkalizaci (pH > 6,8), zatímco žlutá okyselení (pH < 5,2). Experiment jsem dvakrát opakovala.

Množství amoniaku vyprodukované v příslušných časových intervalech obřími koloniemi všech stanovovaných kmenů jsem vynesla v grafu (Graf 1). Z grafu vyplývá, že dvojice obřích kolonií všech kmenů produkovaly amoniak ve viditelném druhém pulzu, a

to 15. dne. Výrazně vyšší produkci, ve srovnání s rodičovským BY4742α, jsem zaznamenala u kmene cit2Δ. U kmene rtg3Δ se produkce amoniaku příliš nelišila od produkce kmene BY4742α. U kmene FIS1Δ byla produkce o něco nižší než u kmene BY4742α a u rtg1Δ, rtg2Δ ve srovnání s kmenem BY4742α bylo amoniaku vyprodukováno nejméně. Tato produkce byla ve shodě s výsledky alkalizací média v okolí obřích kolonií, kde jsem sledovala pouze druhý pulz alkalizace (Obr. 15). Odeznění alkalizace, resp. nástup druhé, acidické fáze, nebyl v průběhu experimentu pozorován. U kmenů delečních mutant nebyla zaznamenána změna morfologie oproti rodičovskému kmeni.



Graf 1: *Produkce amoniaku obřími koloniemi kmenů rtg1Δ, rtg2Δ, rtg3Δ, fis1Δ, cit2Δ a kontrolního kmene BY4742α.*



Obr. 15: *Průběh alkalizace/acidifikace obřích kolonií delečních mutant RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2 a kontrolního rodičovského kmene S. cerevisiae BY4742α. a) V grafu jsou barevně označené dny, kdy rodičovký kmen S. cerevisiae BY4742α a deleční mutanty RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2 byly ve fázi růstu acidické (žlutá barva) a kdy ve fázi alkalické (intenzita alkalizace je označená od světlé po tmavou barvu). b) Na obrázku jsou fotografie obřích kolonií rodičovského kmene S. cerevisiae BY4742α v acidické fázi (vlevo) a alkalické fázi (vpravo).*

4.2 Sledování vývoje kolonií *S. cerevisiae* ΣSh, výběr genů exprimovaných v exponenciální a stacionární fázi růstu

Kvasinkové kolonie jsou mnohobuněčné útvary vznikající při růstu kvasinkových buněk na pevném substrátu. Za standardních podmínek je typ kolonie charakteristický pro daný rod, druh i kmen. Může se však také lišit v rámci samotného kmene v závislosti na různých růstových podmínkách.

Kvasinkový kmen *S. cerevisiae* ΣS^h, který v této části práce používám, je haploid a je odvozen od kmene *S. cerevisiae Σ1278d. S. cerevisiae* ΣS^h vykazuje axiální a monopolární pučení a pseudohyfální růst (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2005). Pro tento kmen je typické, že buňky při kultivaci na médiích s nezkvasitelným zdrojem uhlíku (např. GM médium) drží v klastrech a vytváří fluffy (krabatou) morfologii kolonií - podobně jako některé kmeny *S. cerevisiae,* izolované z přírody (Kuthan *et al.* 2003).

V průběhu růstu *S. cerevisiae* v tekuté kultuře se výrazně mění exprese jednotlivých genů, především během přechodu z fáze exponenciální do fáze stacionární. Geny exprimované v exponenciální fázi růstu jsou potlačeny a dochází k expresi genů, které napomáhají kvasinkám přežít období hladovění ve fázi stacionární. Na základě tohoto předpokladu, a také dle informací z literatury, jsme vybrali čtyři geny. Geny *GUT1 (YHL032C)* a *SMI1/KNR4 (YGR229C)*, které se exprimují v exponenciální fázi růstu a geny *SSA3 (YBL075C)* a *HSP30 (YCR021C)*, které se exprimují ve stacionární fázi růstu. Zajímalo nás, zda v případě označení těchto genů s pomocí GFP budeme schopni zaznamenat vývoj buněk v kvasinkové kolonii.

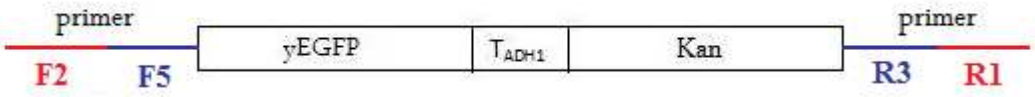
4.2.1 Příprava kazet pro transformaci

Abych byla schopna sledovat expresi vybraných genů, bylo nutné tyto geny označit, a to vložením inzerční kazety s GFP genem. Zabývala jsem se tedy přípravou inzerční kazety obsahující gen pro *GFP* a selekční marker pro Kan rezistenci, a to s použitím plazmidu pKT127 (viz kapitola 3). Cílem tohoto pokusu bylo připravit jednotlivé inzerční kazety, které budou následně vloženy místo stop kodonů vybraných genů.

4.2.1.1 Návrh primerů

Na základě informací z článků SHEFF a THORN 2004 jsem zjistila, že tato pracovní skupina vyvinula kazety pro značení genů s širokým rozsahem sekvencí, umožňující značení zeleným fluorescenčním proteinem pro účely fluorescenční mikroskopie. Výsledný fúzovaný fluorescenční protein je možné pozorovat v živých buňkách pod fluorescenčním mikroskopem s minimem odchylek. Právě za tímto účelem bylo specificky navrženo několik plazmidů kódujících různé varianty GFP i různé varianty markerů.

Pro naše účely jsem vybrala plazmid pKT127, který obsahuje gen pro GFP spolu s genem pro selekční marker – kanamycinovou resistenci. Primery pro tento účel obsahovaly čtyřicetinukleotidové sekvence, homologické s úseky kódující oblasti kvasinkových genů, a zbylou část vymezující úsek plazmidu, určený k vložení do kvasinkové chromozomální DNA (viz kap. 3.1.9). Přímý primer F2 se skládá ze 40 nukleotidů z konce určitého genu a je spojen s primerem F5 pro yEGFP z plazmidu. Reverzní primer R1 se skládá ze 40 reverzních komplementárních nukleotidů pro sekvenci za stop kodonem příslušného genu a je spojen s primerem R3, pro Kan marker (Obr. 16). Primery F5, R3 pro plazmid pKT127 byly převzaty ze článku SHEFF a THORN 2004. Primery F2, R1 pro jednotlivé geny jsem navrhovala na základě srovnání sekvence vybraných genů s databází Howson_Oligo_ Table_supple (HOWSON *et al.* 2005 - suplementární materiály), kde jsou již primery pro jednotlivé geny navrženy.



Obr. 16: *Návrh primerů pro amplifikaci konstruktu z plazmidu pKT127.*

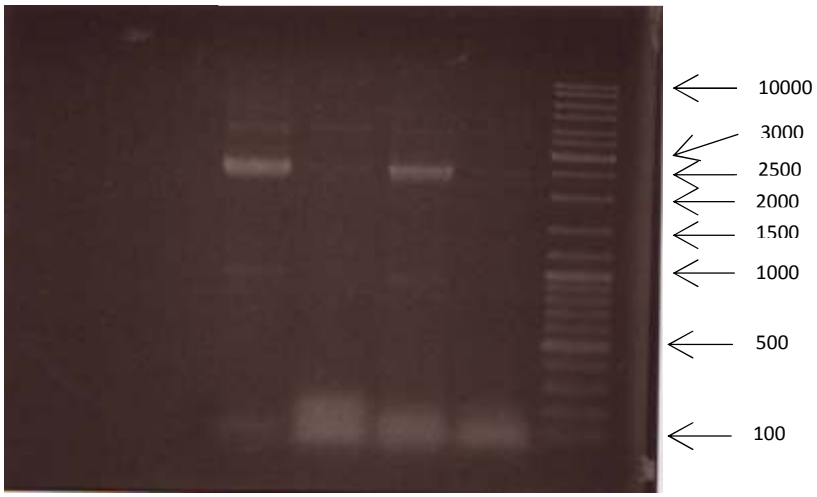
4.2.1.2 Příprava kazety s *GFP* genem pomocí PCR

Pro amplifikaci úseku plazmidu obsahujícího gen pro *GFP* a selekční marker pro rezistenci Kan jsem také vycházela z práce SHEFF a THORN 2004. Pro navázání primerů na komplementární sekvenci matricového řetězce byla použita teplota 65 °C. PCR (polymerázová řetězová reakce) provedená dle podmínek nastavených na základě výše uvedené literatury se příliš nedařila. Nakonec jsem podmínky pro PCR modifikovala a optimalizovala výchozí profil reakce, jak je uvedeno v kapitole 3.2.10.

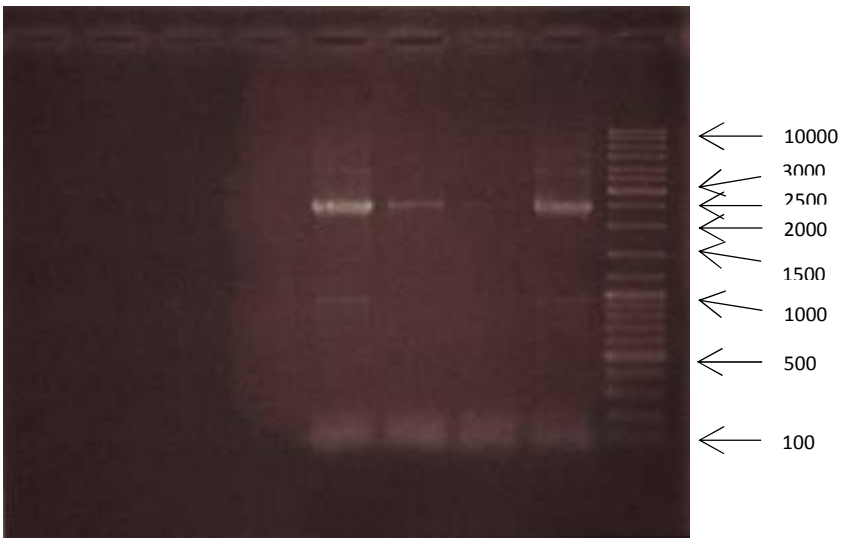
Výsledek PCR reakce ověřený na gelové elektroforéze prokázal přítomnost aplifikovaných produktů z plazmidu pKT127 u všech použitých kombinací primerů. Velikost úseků obsahujících gen pro *GFP* a gen pro Kan rezistenci byla přibližně 2500 bp (Obr. 17 a, b).

SMI1 GUT1 HSP30 SSA3 ladder

a)



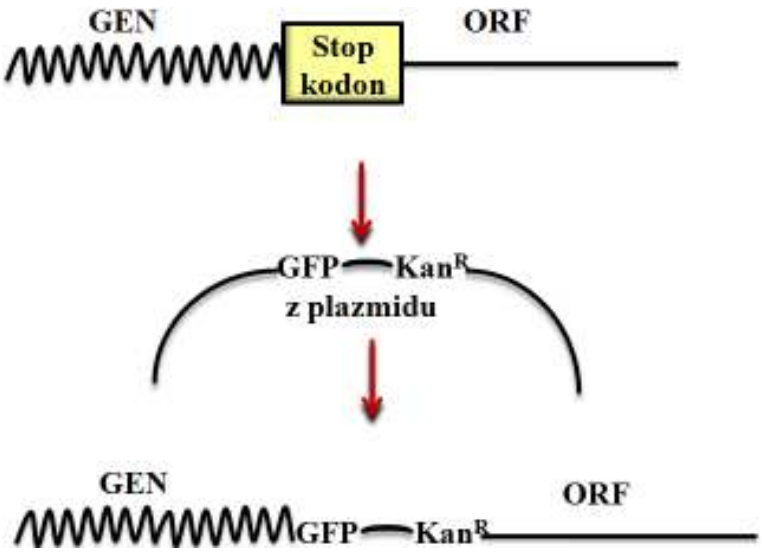
b) *GUT1 SMI1 HSP30 SSA3* ladder



Obr. 17: *Fotografie 1% agarózového gelu, výsledek PCR. Jako srovnávací vzorek byl nanesen standard „DNA ladder" obsahující fragmenty o známých molekulových hmotnostech. a) vzorky s primery genů a plazmidu byly nanášeny v tomto pořadí (zprava): SSA3, HSP30, GUT1, SMI1. Pro vzorky SMI1 a HSP30 byl získán amplifikovaný úsek plazmidu + primery SMI1 a HSP30 o velikosti 2500 bp. b) vzorky s primery genů a plazmidu byly nanášeny v tomto pořadí (zprava): SSA3, HSP30, SMI1, GUT1. Pro vzorky GUT1 a SSA3 byl získán amplifikovaný úsek plazmidu + primery GUT1 a SSA3 o velikosti 2500 bp.*

4.2.2 Příprava kmenů s GFP

Na základě výsledků z gelové elektroforézy jsem ověřila, že produty získané PCR reakcí mají požadovanou délku (viz Obr. 17). Následně jsem se pokusila připravit kmeny s inzertovanou kazetou do kvasinkového genomu v oblasti stop kodonů *GUT1*, *SMI1, SSA3 a HSP30* genů (Obr. 18). Pro přípravu těchto kmenů jsem použila kvasinkový kmen *S. cerevisiae* ΣS^h. Cílem tohoto experimentu bylo připravit kvasinkové kmeny s geny značenými GFP a Kan rezistencí.

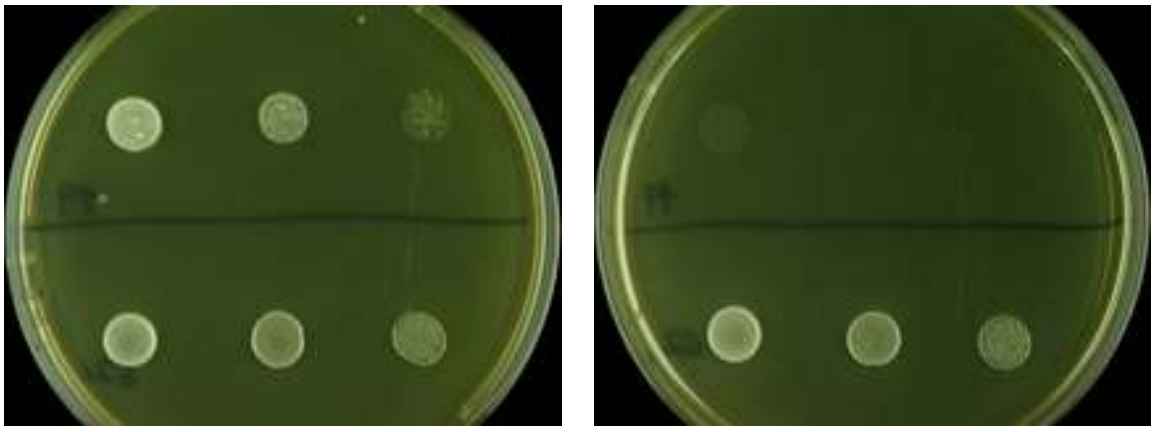


Obr. 18: *Schéma vložení kazety s GFP genem a Kan markerem místo stop kodonu daného genu.*

4.2.2.1 Citlivost *S. cerevisiae* ΣSh ke G418

Inzerční kazeta obsahuje jako selekční marker kanamycin, proto se kvasinkové kmeny, které obsahují gen značený touto kazetou, stanou vůči kanamycinu rezistentní. Musela jsem tedy stanovit, při jaké koncetraci kanamycinu je rodičovský kmen *S.cerevisiae ΣS*^{h} vůči kanamycinu citlivý. K tomu jsem použila antibiotikum G418 (geneticin), ktere se používá pro selekci kanamycin resistentních buněk.

Z čerstvě přeočkované kultury kvasinek kmene ΣS^{h}, kultivované 48 hod na pevném YEPG médiu, jsem si naředila biomasu o koncentraci 10^{7}, 10^{6} a 10^{5} a vysela jak na YEPG médium tak na YEPG médium s G418 (o různých koncentracích) v podobě kapky. Růst probíhal při teplotě 28 °C. Jako kontrolu jsem použila kmen Σ62. Růst kolonií jsem hodnotila po jednom, dvou a třech dnech. Testovala jsem, při kterých koncentracích G418 kmen ΣS^{h} roste a při kterých už k růstu nedochází. *S. cerevisiae* ΣS^{h} neroste na YEPG médiu s geneticinem při koncentraci 400 µg/ml. Na uvedených fotografiích je vidět, že *S.cerevisiae* ΣS^{h} na kultivačních plotnách s YEPG médiem bez G418 roste, ale na YEPG médiu s G418 při již zmíněné koncentraci neroste. Kontrolní kmen *S. cerevisiae* Σ62, který je na geneticin rezistentní roste na obou kultivačních plotnách (Obr. 19).



Obr. 19: *Stanovení citlivosti kmene S. cerevisiae ΣS*^{h} *k G418. Na fotografii na levé straně vidíme kultivační plotnu s YEPG médiem bez geneticinu, kde v horní polovině plotny jsou kolonie kmene ΣS*^{h} *a ve spodní části kolonie kmene Σ62. Na fotografii v pravo je kultivační plotna s YEPG médiem s geneticinem při koncentraci 400 µg/ml.*

4.2.2.2 Transformace

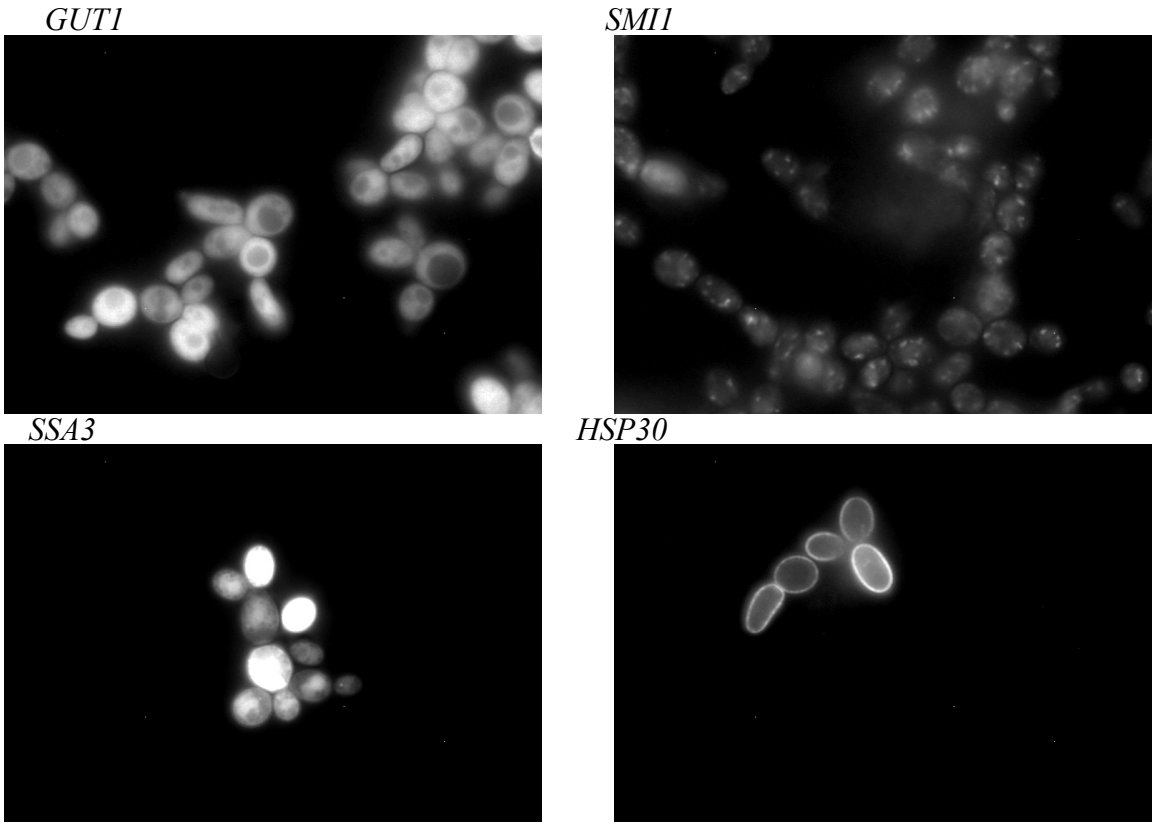
Pro přípravu kvasinkových kmenů s geny značenými GFP genem a Kan rezistencí jsem použila metody genového inženýrství - transformaci. Transformace kmenů *S.cerevisiae* ΣS^h posloužila k přípravě transformovaných kvasinkových kmenů rezistentních na kanamycin a schopných produkovat proteiny značené GFP.

Kvasinkové kultury kmene *S. cerevisiae* ΣS^h jsem aerobně kultivovala přes noc v YEPG tekutém médiu při 28 °C. S přesnou stanovenou koncentrací buněk jsem dále postupovala na základě transformačního LiAc/SS-DNA/PEG TRAFO protokolu (viz kap. 3.2.14). Transformační směs jsem vysévala na selekční YEPG pevné médium s G418. Získala jsem poměrně velké množství transformantů – pro kmen s označeným *GUT1* genem 18 transformantů, pro kmen s označeným *SMI1* genem 22 transformantů, pro kmen s označeným *SSA3* genem 31 transformantů a pro kmen s označeným *HSP30* genem 29 transformantů. Vzhledem k tomu, že tyto transformované buněčné kolonie vyrostly na selekčním médiu, předpokládala jsem, že došlo k požadovanému vložení kazet místo stop kodonů značených genů.

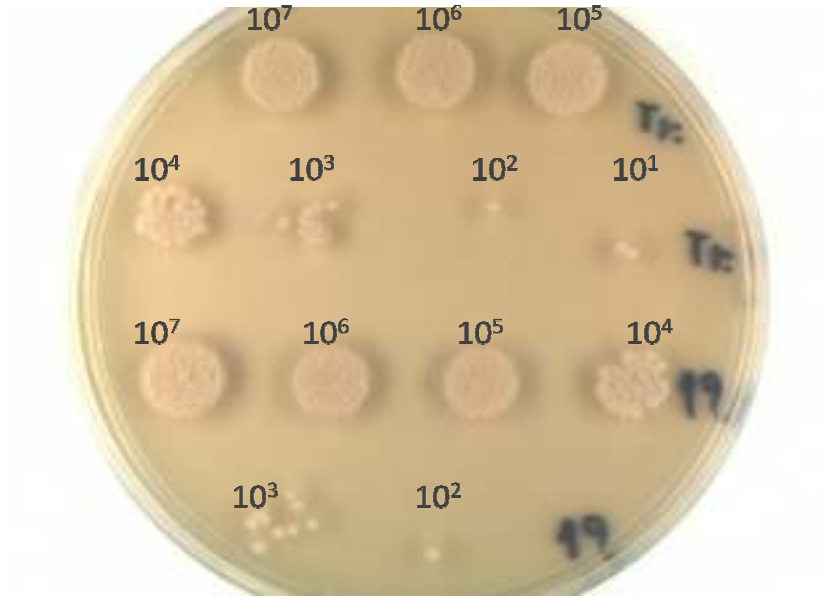
4.2.2.3 Ověření exprese GFP a ověření rezistence na kanamycin

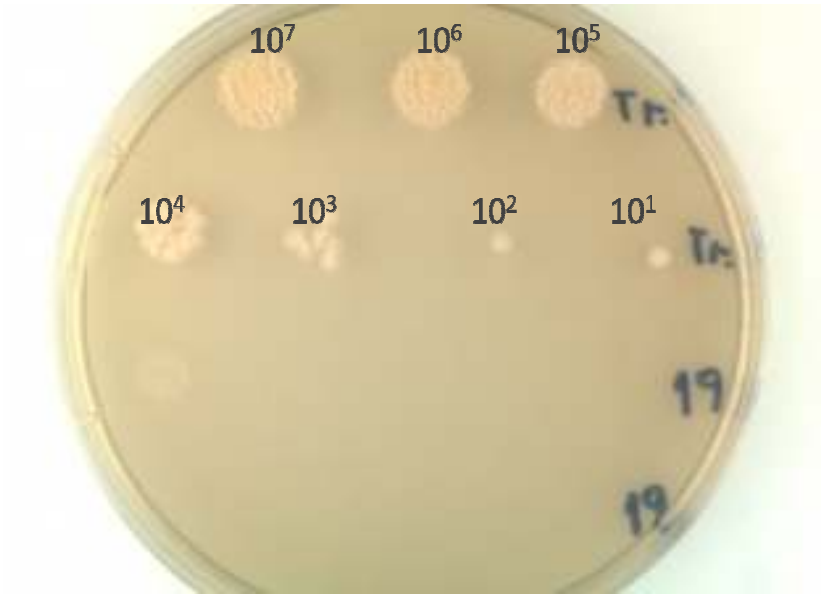
Po transformaci jsem u všech získaných transformantů ověřovala, pomocí fluorescenčního mikroskopu, zda dochází k expresi značených genů a zda jsou skutečně rezistentní na kanamycin.

Téměř u všech transformantů jsem prokázala, že dochází k indukci fluorescenčních proteinů. Jednotlivé kvasinkové buňky výrazně fluoreskují, a to s rozdílnou lokalizací odpovídající informacím získaným z literatury (Obr. 20). Přestože po transformaci byla transformační směs vysévána na selekční médium s kanamyciem, u vybraných transformantů jsem znovu ověřovala rezistenci ke kanamycinu. U všech transformantů byla tato rezistence prokázána. Pro ukázku uvádím fotografie kultivačních ploten YEPG bez G418 a s G418, kde je transformant ΣS^h-SSA3 a ΣS^h o naředěných koncentracích biomasy 10^7 až 10^1 (Obr. 21).



Obr. 20: *Ověření exprese GFP. Fluorescence proteinu Gut1, Smi1, Ssa3 a Hsp30 v koloniích kmenů S. cerevisiae ΣS^h s GUT1, SMI1, SSA3 a HSP30 geny značenými GFP, kultivovanými na pevném YEPG médiu. Na fotografiích jsou kvasinkové buňky fotografované pod fluorescenčním mikroskopem s GFP filtrem při času expozice 5s.*





Obr. 21: *Ověření rezistence ke G418. Na první fotografii je kultivační plotna s YEPG médiem bez geneticinu, kde v horní polovině plotny jsou kolonie kmene ΣS^h se značeným SSA3 genem a ve spodní části jsou kolonie kmene ΣS^h při různých ředěních. Na druhé fotografii je kultivační plotna s YEPG médiem s geneticinem při koncentraci 400 µg/ml, také s kmenem ΣS^h-SSA3 a neznačeným kmenem ΣS^h při různých koncentracích.*

4.2.2.4 Izolace monokoloniových izolátů a ověření exprese GFP

Kvasinkový kmen *S. cerevisiae* ΣS^h vytváří shluky. Abych měla jistotu, že všechny transformanty obsahují pouze buňky s *GFP* genem, použila jsem mikromanipulaci (viz kap. 3.2.15), kterou lze na agaru oddělit jednotlivé buňky a získat tak kolonii vyrostlou průkazně z jediné buňky. Cílem bylo získat takové kvasinkové kmeny, kde buňky, které obsahují GFP gen, vznikly pomnožením konkrétně z jedné mateřské buňky.

Pro mikromanipulaci jsem použila dostatečně vyschlé kultivační plotny s technicky čistým agarem. Po mikromanipulaci jsem buněčné kolonie všech transformantů hodnotila opět pod fluorescenčním mikroskopem a ověřovala expresi GFP i ověřovala kanamycinovou resistenci. Pro další experimenty jsem již používala kmeny transformantů z těchto izolátů.

4.2.2.5 Ověření integrace genu GFP

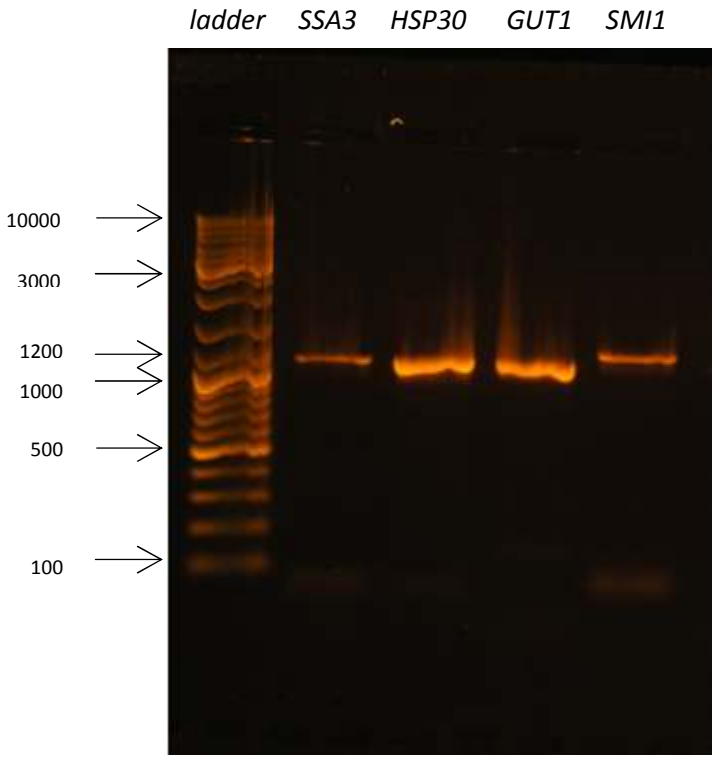
Pomocí PCR reakce jsem u transformovaných kmenů ΣS^{h}-*GUT1*, ΣS^{h}-*SMI1*, ΣS^{h}-*SSA3*, ΣS^{h}-*HSP30*, se kterými jsem nadále pracovala, ověřovala, že gen pro *GFP* je lokalizován za příslušným genem.

Z důvodu velikosti ověřovaných úseků jsem se rozhodla pro návrh primerů vymezující pouze část ze značeného genu a část z genu pro GFP (Obr. 22). Velikost výsledných amplifikovaných produktů je přibližně 1200 bp. Přímé primery pro jednotlivé geny obsahují 20 nukleotidů z příslušného genu a reverzní primer pro GFP gen 18 nukleotidů (viz kap. 3.1.9).

Z kvasinkových kmenů ΣS^{h}-*GUT1*, ΣS^{h}-*SMI1*, ΣS^{h}-*SSA3*, ΣS^{h}-*HSP30* kultivovaných 48 hod při teplotě 28 °C na pevném YEPG médiu, jsem izolovala chromozomální DNA, které sloužily jako templát pro PCR (podmínky kap. 3.2.11). Výsledek PCR rekce ověřený gelovou elektroforézou potvrdil přítomnost amplifikovaných produktů u všech genů o velikosti 1200 bp (Obr. 23). Na základě těchto výsledků jsem prokázala, že *GFP* gen je skutečně lokalizován za příslušnými geny.



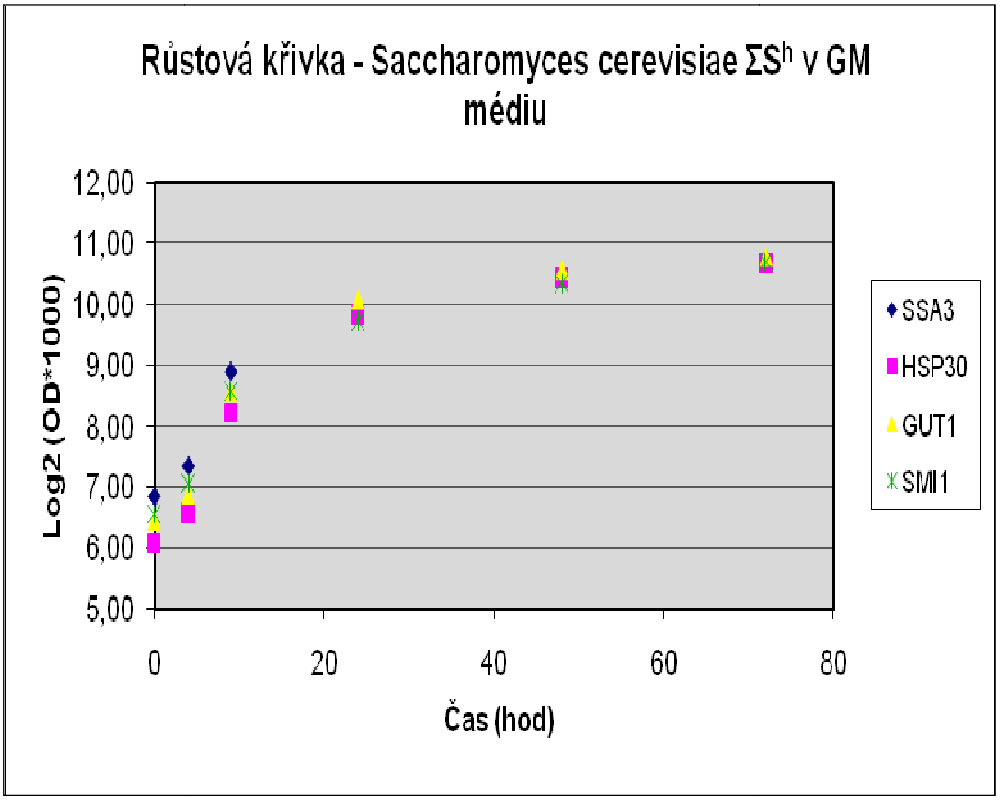
Obr. 22: *Schéma pro ověření lokalizace GFP genu.*



Obr. 23: *Fotografie 1% agarózového gelu, ověření integrace genu GFP. Jako srovnávací vzorek byl nanesen standard „DNA ladder" obsahující fragmenty o známých molekulových hmotnostech. PCR produkty byly nanášeny v tomto pořadí (zleva): SSA3, HSP30, GUT1, SMI1. Byly získány produkty o velikosti 1200 bp.*

4.2.3 Sledování exprese genů v tekutém glycerolovém médiu

Pomocí experimentů v glycerolovém tekutém médiu jsem ověřovala, v jakých fázích růstu a v jaké síle se příslušné geny exprimují. Expresi jsem hodnotila pomocí sledování fluorescence fúzovaných proteinů pod fluorescenčním mikroskopem. Cílem bylo ověřit, zda opravdu dochází k expresi genů v příslušných fázích růstu, jak deklaruje literatura. Fáze růstu jsme schopni zjistit pouze v tekuté kultuře, a to pomocí růstové křivky. Růst kultury ΣS^h-*GUT1*, ΣS^h-*SMI1*, ΣS^h-*SSA3*, ΣS^h-*HSP30* a kontrolní ΣS^h neoznačenou GFP, probíhal 9 dnů v tekutém glycerolovém médiu při 28°C, zhruba do 20hod exponenciálně, poté následoval přechod do stacionární fáze (Obr. 24).



Obr. 24: *Růstová křivka - Saccharomyces cerevisiae ΣS^h se GFP značenými geny v glycerolovém médiu při 28°C a 175 c.p.m.*

GUT1: Přítomnost proteinu Gut1 byla detekována v cytoplazmě po 24 hodinách, maximum fluorescence po 48 hodinách a po zbytek kultivace byla fluorescence výrazně snížena, protein se již nacházel ve vakuolách (Obr. 25).

SMI1: Pro Smi1 protein byl průběh obdobný, začátek fluorescence byl také za 24 hodin, ale ve formě teček, maximum fluorescence po 48 hodinách a po zbytek kultivace byla fluorescence výrazně snížena, protein se nacházel ve vakuolách (Obr. 26).

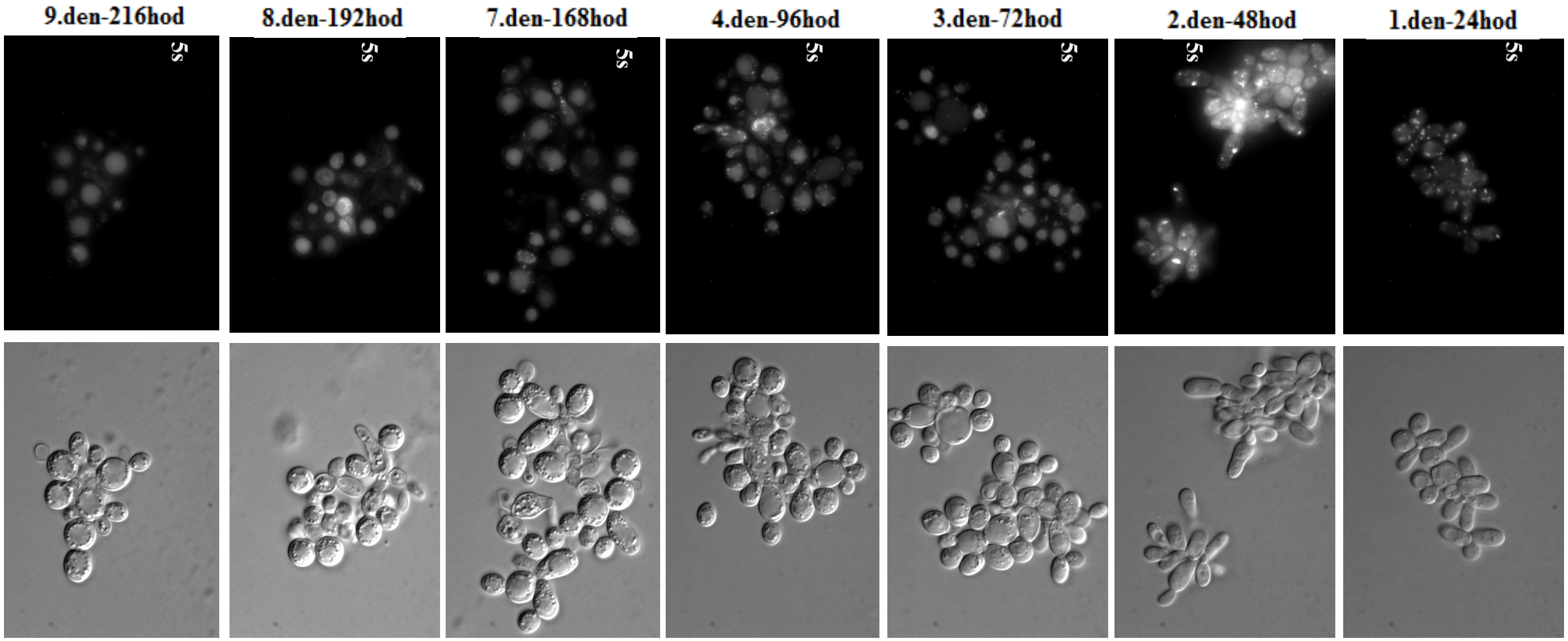
SSA3: Začátek fluorescence Ssa3 proteinu byl po 48 hodinách v cytoplazmě, maximum fluorescence po 168 hodinách a na konci kultivace, po 216 hodinách, byla fluorescence stále velmi výrazná (Obr. 27). Fluorescence Ssa3 proteinu byla ze sledovaných proteinů nejintenzivnější.

HSP30: U proteinu Hsp30 byl začátek fluorescence po 48 hodinách, maximum fluorescence nebylo možné přesně určit, protože po 72 hodinách protein zrnitě svítí v cytoplazmě a od 6. dne se začíná objevovat fluorescence v plazmatické membráně, kde je výrazná hlavně za 192 hodin. Ke konci kultivace byla fluorescence u Hsp30 stále dobře patrná v plazmatické membráně (Obr. 28).

ΣS^h: Standartní kmen ΣS^h jsem použila jako kontrolu autofluorescence. U mladších buněk je autofluorescence zanedbatelná, ale u starších buněk je podstatně výraznější a lehko zaměnitelná se slabou fluorescencí (Obr. 29).

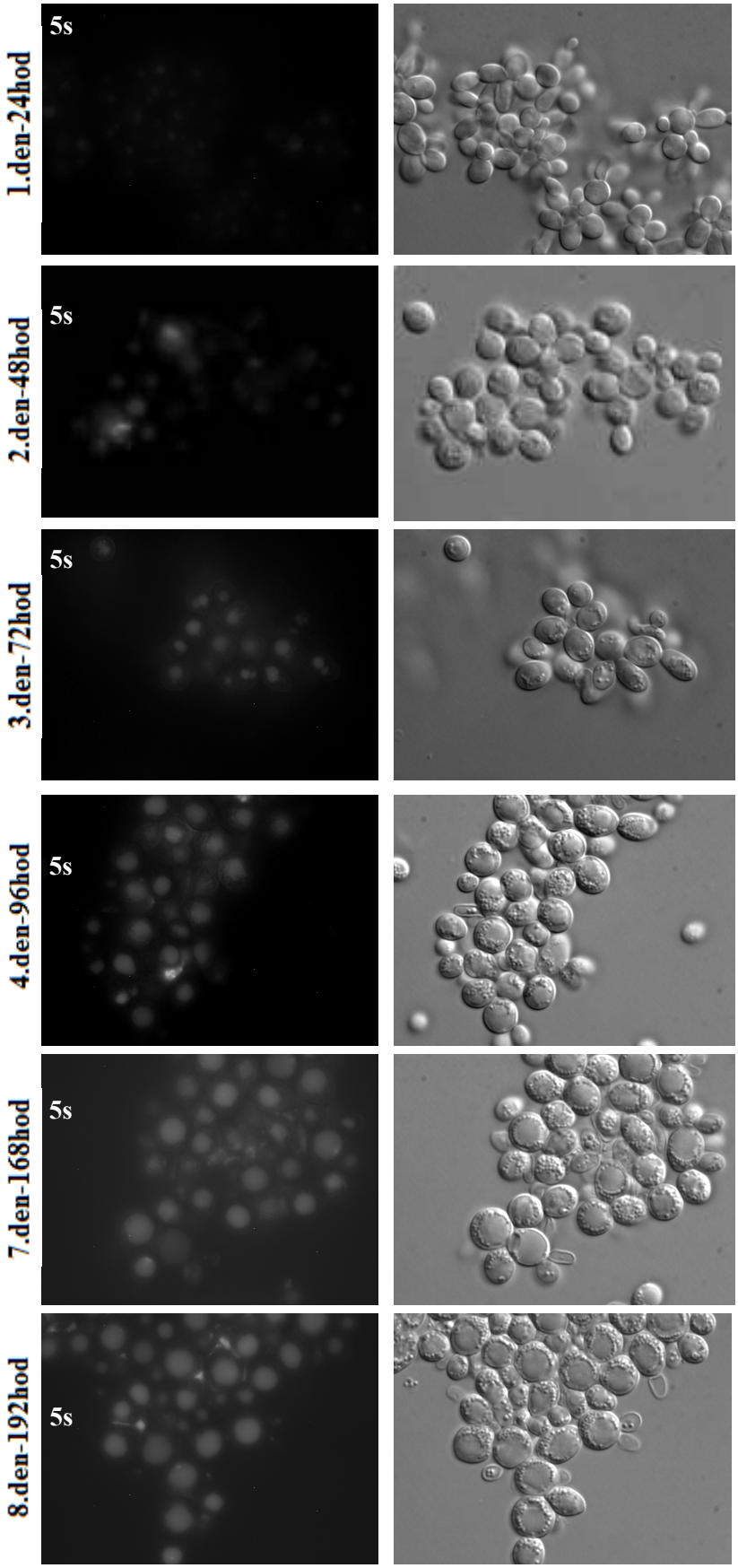
U dvou značených genů (*GUT1*, *SMI1*) jsem tedy potvrdila expresi v exponenciální a u dvou značených genů (*SSA3, HSP30*) při přechodu do stacionární fáze a během ní, jak uváděla literatura. Zjistila jsem, kdy se jednotlivé geny začínají exprimovat, kdy se jedná o maximum exprese, a kdy je přítomnost proteinu výrazně snížena a proteiny se dostávají do vakuol.

1.den-24hod
5s
2.den-48hod
5s
3s
3.den-72hod
5s
6.den-144hod
5s
7.den-168hod
5s
8.den-192hod
5s


9.den-216hod
8.den-192hod
7.den-168hod
4.den-96hod
3.den-72hod
2.den-48hod
1.den-24hod
5s

1.den-24hod
5s
2.den-48hod
5s
3.den-72hod
5s
4.den-96hod
5s
3s
7.den-168hod
3s
1s
8.den-192hod
3s
1s
9.den-216hod
5s
3s

1.den-24hod
5s
2.den-48hod
5s
3.den-72hod
5s
4.den-96hod
5s
7.den-168hod
5s
8.den-192hod
5s
9.den-216hod
5s
3s


1.den-24hod
5s
2.den-48hod
5s
3.den-72hod
5s
4.den-96hod
5s
7.den-168hod
5s
8.den-192hod
5s

4.2.4 Sledování exprese genů v koloniích

Na základě výsledků z kultivace buněk *S.cerevisiae* ΣS^h s geny označenými GFP v tekuté kultuře jsem získala představu o přítomnosti proteinů v jednotlivých fázích buněčného růstu. Nicméně exprese jednotlivých genů v průběhu buněčného růstu se může také měnit podle podmínek kultivace. A to u buněk rostoucích ve vzdušněném tekutém médiu, nebo za statických podmínek na pevném médiu. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, kdy se jednotlivé geny v koloniích exprimují.

Z čerstvě přeočkované kultury kvasinek kmenů ΣS^h-GUT1, ΣS^h-SMI1, ΣS^h-SSA3, ΣS^h-HSP30, kultivované 48 hod na pevném YEPG médiu jsem si naředila biomasu a vysela na GM médium s 3% glycerolem v počtu buněk 40-50 buněk/misku, kdy růst kolonií probíhal při teplotě 28 °C. Jako kontrolu jsem použila kmen ΣS^h neoznačený GFP. V průběhu čtrnácti dnů jsem sledovala morfologii kolonií a expresi genů pod fluorescenční lupou, a také morfologii buněk a expresi genů pod fluorescenčním mikroskopem. S koloniemi jsem pomocí fluorescenční lupy a fluorescenčního mikroskopu pracovala až od třetího dne, protože do té doby byly kolonie příliš malé. Fluorescenční lupou jsem fotografovala celé kolonie a řezy kolonií po zalití kolonií 1% agarózovým gelem. Fluorescenčním mikroskopem jsem fotografovala buňky odebírané povětšinou ze střední části kolonií při viditelném světle podle Nomarského a také s GFP filtrem.

Exprese genu *GUT1*: 3. den je Gut1 protein v buňkách přítomen a celá kolonie výrazně svítí, stejně tak i v průřezu kolonií. Kontrolou jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu, kde vidíme lokalizaci Gut1 proteinu v cytoplazmě (Obr. 30a). 4. den je Gut1 protein v buňkách ještě lépe patrný, proteinu je podstatně více, což potvrzuje fotografie z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 30a). Od 5. do 7. dne je proteinu v buňkách o něco méně, přesto v koloniích stále dobře svítí. Z fotografií z fluorescenčního mikroskopu je ale vidět, že protein se již dostal do vakuol (Obr. 30b). Od 8. do 9. dne je proteinu v buňkách podstatně méně (Obr. 30c), ale pouze fotografie z fluorescenční lupy jsou srovnatelné s autofluorescencí kmene neoznačeného GFP - ΣS^h. Přítomnost Gut1 proteinu v koloniích je tedy zaznamenatelná již od 3. dne stáří kolonie, 4. den se jedná o maximum, do 7. dne je lokalizován ve vakuolách a 9. den je jeho fluorescence již lehko zaměnitelná s autofluorescencí.

Exprese genu *SMI1*: Proteinu Smi1, ve srovnání s Gut1 proteinem, je v buňkách o něco méně, ale průběh exprese je obdobný. 3. den je Smi1 protein v buňkách dobře patrný, celá kolonie svítí a lokalizace proteinu podle fluorescenčního mikroskopu není v cytoplazmě, jako u Gut1, ale svítí ve formě čárek, pravděpodobně v organelách (Obr. 31a). 4. den je proteinu Smi1 podstatně více, než den předcházející, jak je vidět i z fotografií z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 31a). Od 5. do 7. dne kolonie svítí o něco méně, ale stále výrazně. Z fluorescenčního mikroskopu je ale vidět, že protein se již dostal do vakuol (Obr. 31b). Od 8. do 9. dne je proteinu v buňkách podstatně méně (Obr. 31c), ale pouze fotografie z fluorescenční lupy jsou srovnatelné s autofluorescencí ΣS^h. Přítomnost Smi1 proteinu v koloniích je tedy již od 3. dne stáří kolonie, 4. den se jedná o maximum, do 7. dne je lokalizován ve vakuolách a 9. den je jeho fluorescence již lehko zaměnitelná s autofluorescencí.

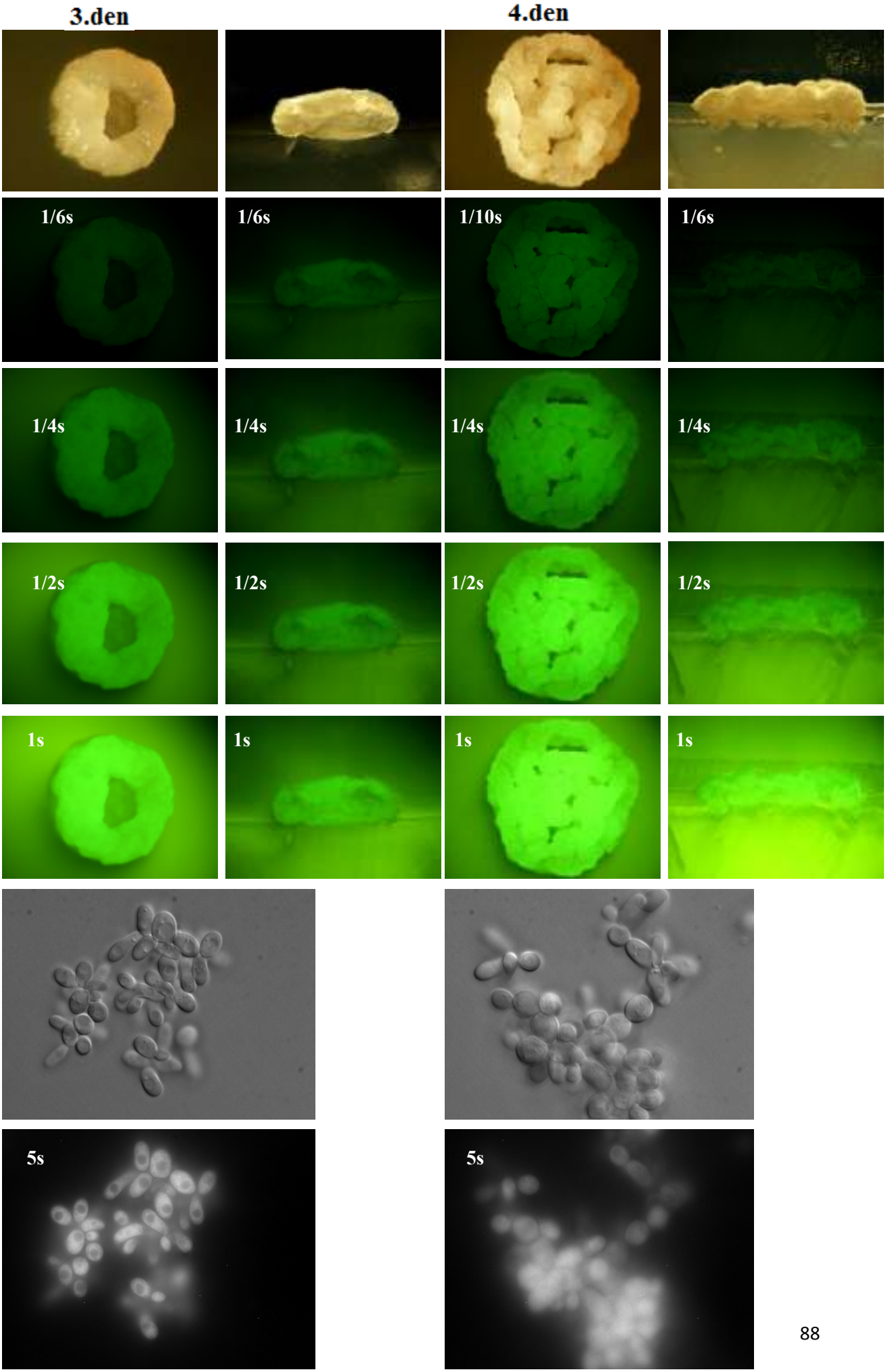
Exprese genu *SSA3*: Protein Ssa3 je nejlépe patrný od 5. dne růstu kolonií, jak je vidět na fotografiích z fluorescenční lupy i z mikroskopu, kdy je protein lokalizován v cytoplazmě (Obr. 32a). Přesto však podle fotografií z mikroskopu a částečně i z lupy vyplývá, že Ssa3 protein se nachází v některých starších buňkách i v předcházejících dnech (Obr. 32a). Od 6. do 7. dne je přítomnost proteinu stále velmi výrazná, jak v koloniích, tak v jednotlivých buňkách. Na řezu kolonií je dobře vidět, že svítí pouze buňky na vrcholu kolonie (viz.šipky) (Obr. 32b). 8. a 9. den je přítomnost proteinu mnohem silnější, opět na řezu kolonií můžeme vidět, že svítí pouze buňky, které jsou na vrcholu kolonie (viz.šipky) (Obr. 32c). 10. a 11. den je množství proteinu srovnatelné s 9. dnem, jak je vidět na fotografiích z lupy i z mikroskopu (Obr. 32d), stejně tak i 12. a 13. den kolonie a jednotlivé buňky výrazně svítí (Obr. 32e). 14. den je proteinu o něco méně, přesto je jasné, že indukce tohoto proteinu neustává. Je také stále dobře vidět i lokalizace svítících buněk na vrcholu kolonie (Obr. 32f). Ssa3 protein je tedy v koloniích přítomen od 4. až 5. dne stáří kolonie, 9. den se jedná o maximum a do 14. dne se jeho přítomnost výrazně nesníží. Fluorescence Ssa3 proteinu byla ze sledovaných proteinů nejintenzivnější.

Exprese genu *HSP30*: Ve srovnání se Ssa3 proteinem, je proteinu Hsp30 výrazně méně. Protein Hsp30 je nejlépe patrný od 6. dne růstu kolonií, jak je vidět na fotografiích z fluorescenční lupy i z mikroskopu, kdy je lokalizován v plazmatické membráně (Obr. 33b). Přesto však, stejně jako u proteinu Ssa3, podle fotografií z mikroskopu a částečně i z lupy vyplývá, že se protein Hsp30 nachází v některých starších buňkách i v předcházejících dnech (Obr. 33a). 7. a 8. den je proteinu o něco více než 6. den, což

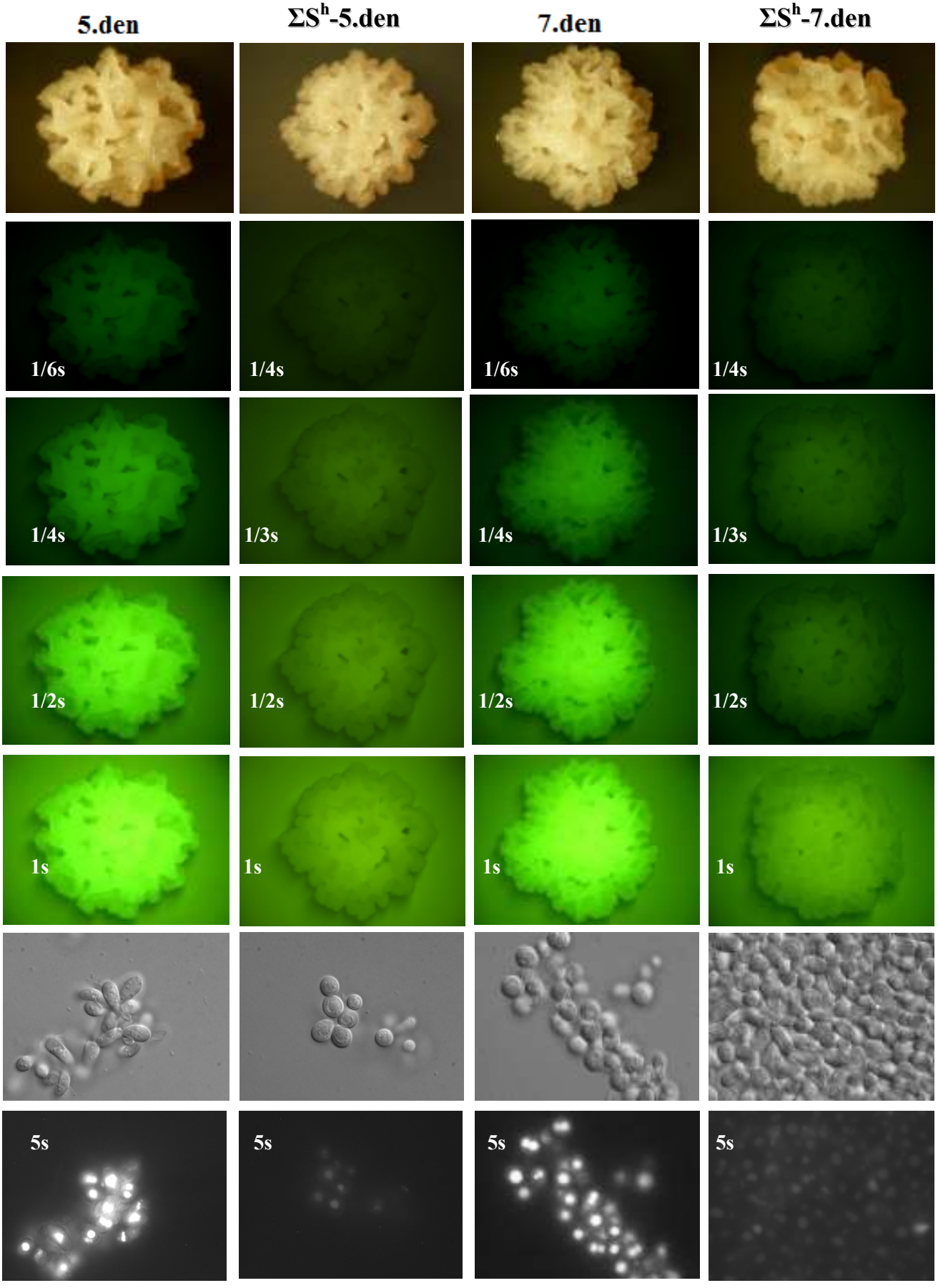
potvrzují jak fotografie z lupy (Obr. 33b). Další dny zůstává množství proteinu srovnatelné, je však už lokalizován nejen na plasmatické membráně, ale i ve vakuolách (Obr. 33c). 14. den růstu kolonie jsou fotografie z fluorescenční lupy i z fluorescenčního mikroskopu srovnatelné s autofluorescencí ΣS^h (Obr. 33d). Přítomnost Hsp30 proteinu v koloniích je tedy od 5. až 6. dne stáří kolonie, 9. den se jedná o maximum a do 13. dne se jeho přítomnost sníží. 14. den je jeho fluorescence již lehko zaměnitelný s autofluorescencí. U proteinu Hsp30 bylo po všechny dny kultivace typické, že nesvítily všechny nebo většina buněk, ale jen část buněk. Lokalizace fluorescence do vrchní vrstvy kolonie u tohoto kmene pozorována nebyla.

Fluorescence u kmene ΣS^h: Standardní kmen ΣS^h jsem použila jako kontrolu autofluorescence. U mladších buněk a kolonií je autofluorescence zanedbatelná, ale u starších buněk je podstatně výraznější a lehko zaměnitelná se slabou fluorescencí.

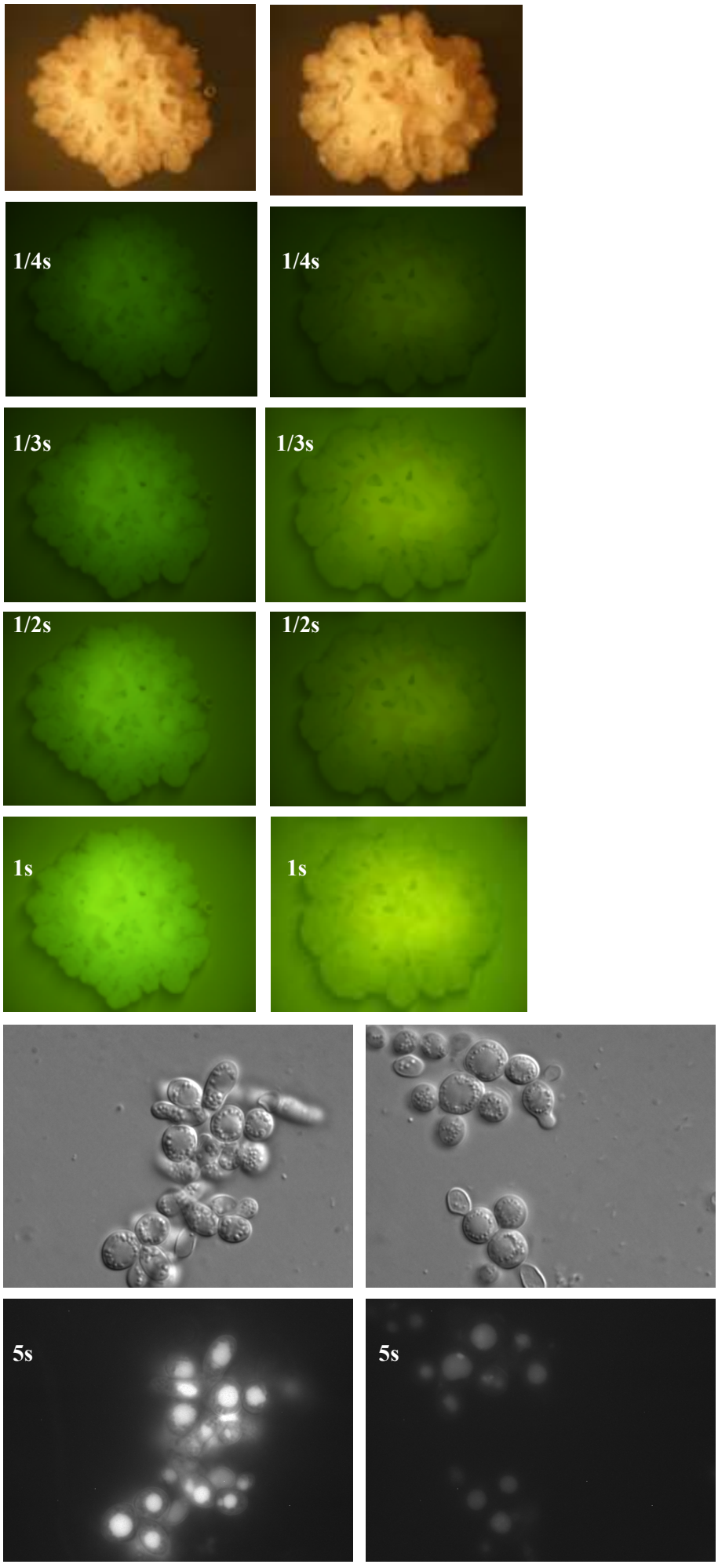
Obr. 30a


3.den
4.den
1/6s
1/6s
1/10s
1/6s
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
5s

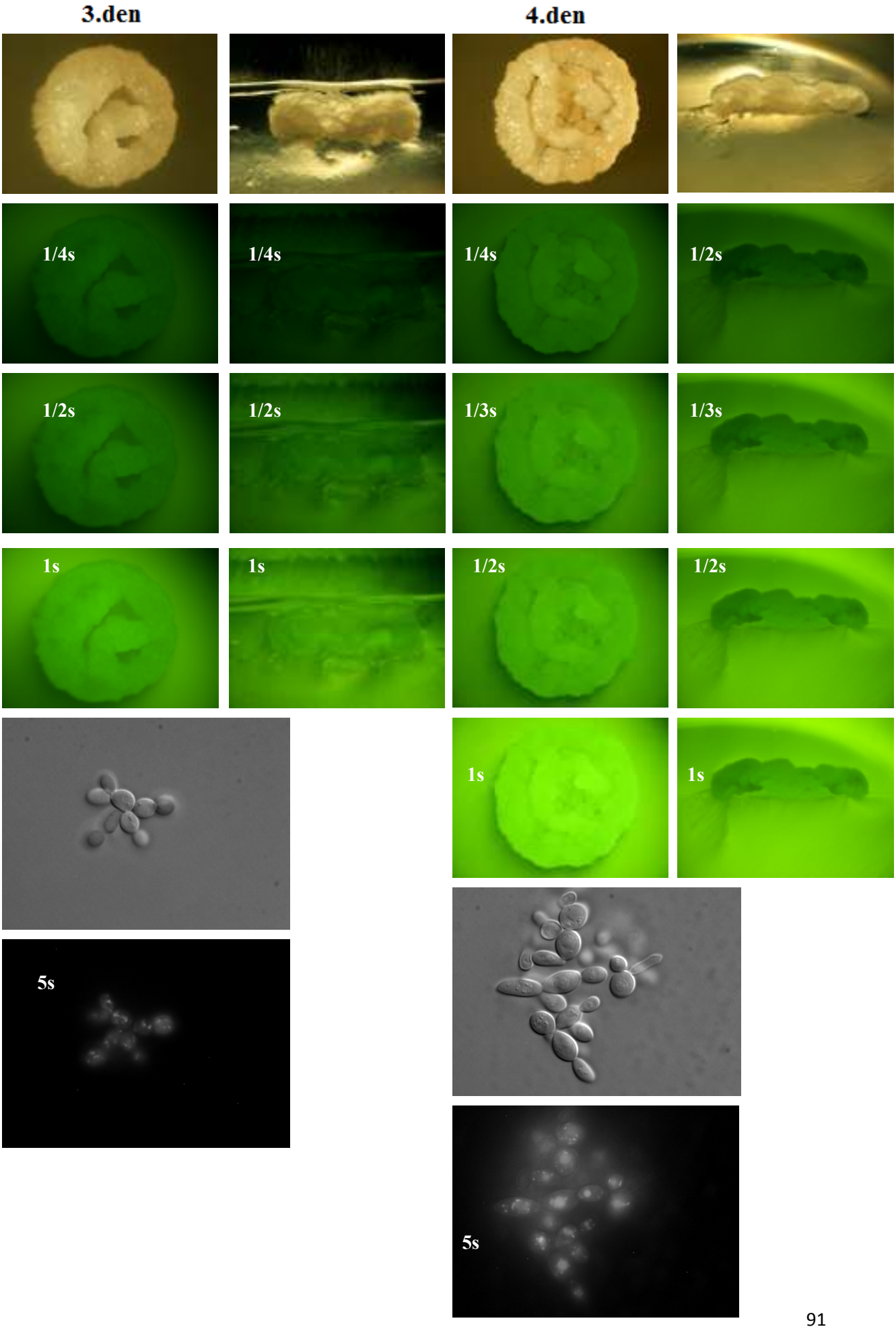
Obr. 30b


5.den
ΣS^h-5.den
7.den
ΣS^h-7.den
1/6s
1/4s
1/6s
1/4s
1/4s
1/3s
1/4s
1/3s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
5s
5s
5s

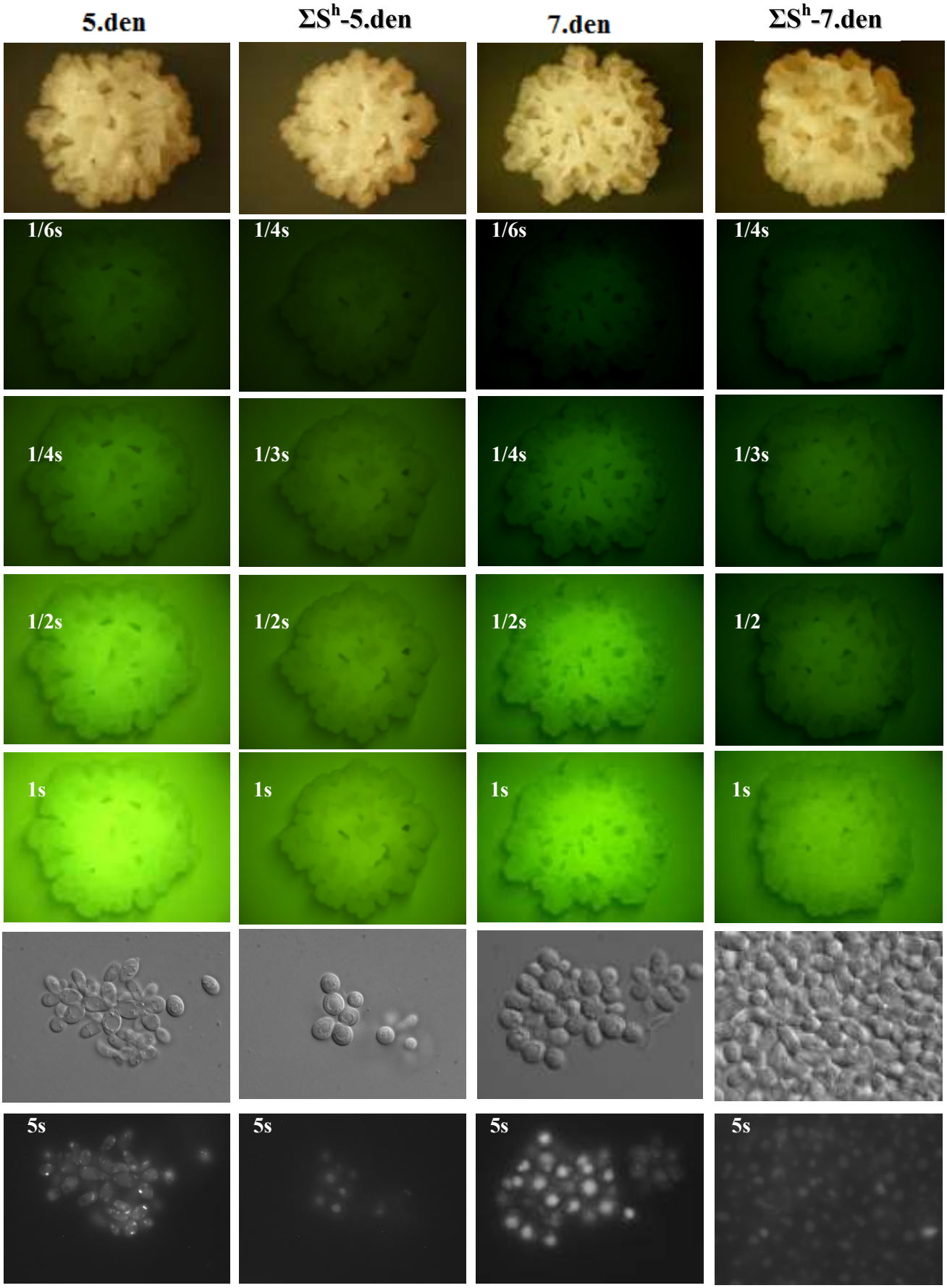
Obr. 30c



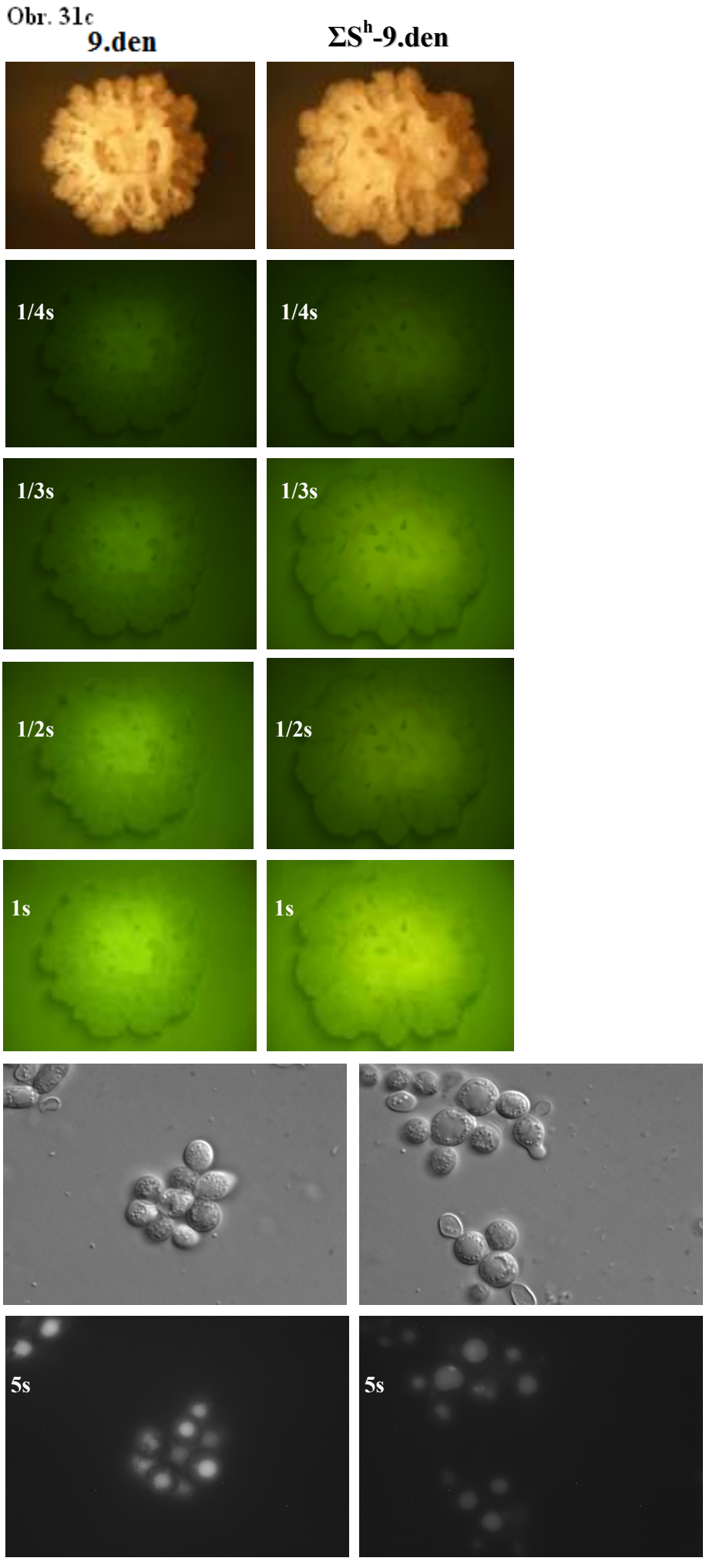
Obr. 31a


3.den
4.den
1/4s
1/4s
1/4s
1/2s
1/2s
1/2s
1/3s
1/3s
1s
1s
1/2s
1/2s
1s
1s
5s
5s

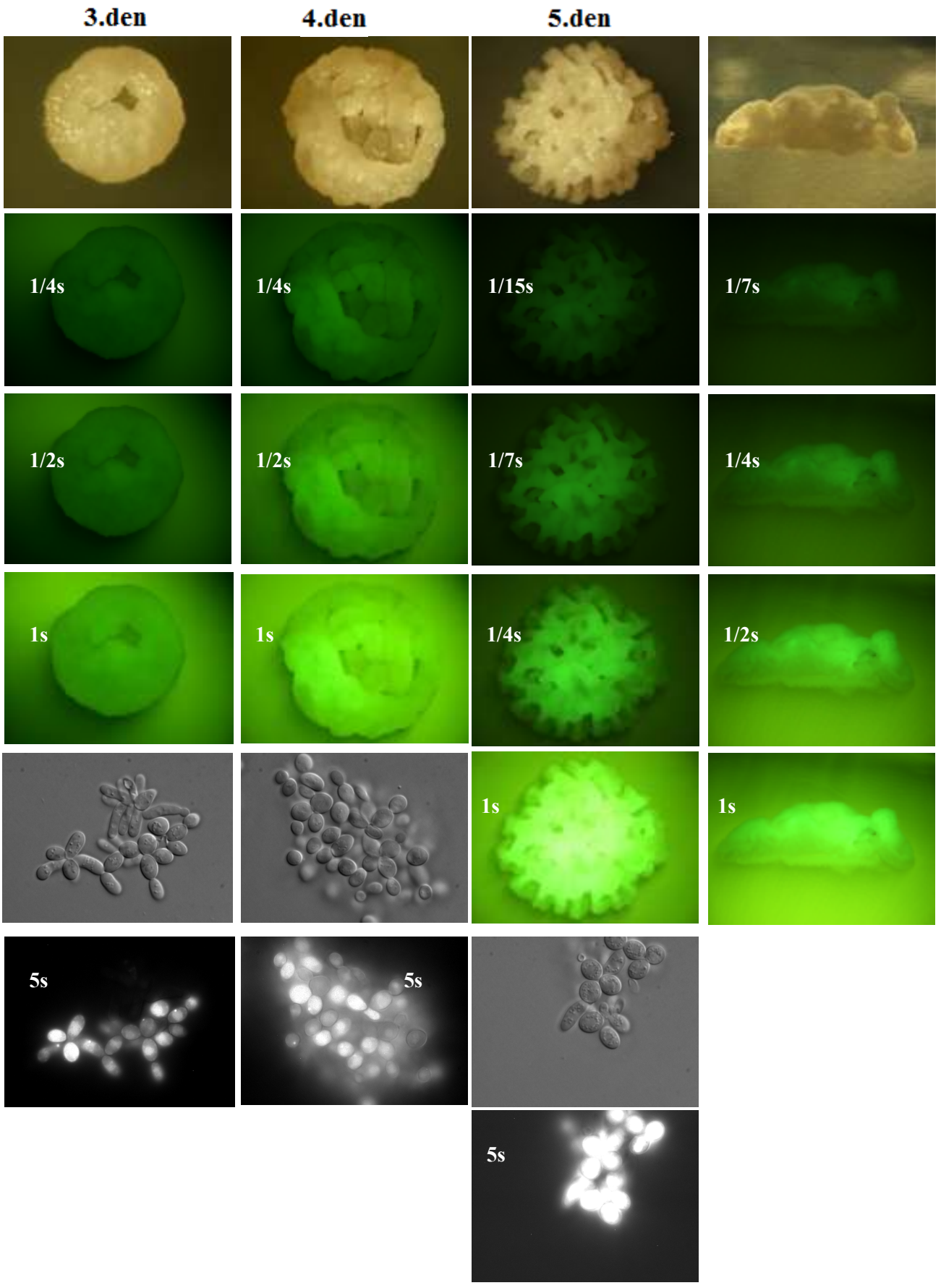
Obr. 31b


5.den
ΣS^h-5.den
7.den
ΣS^h-7.den
1/6s
1/4s
1/6s
1/4s
1/4s
1/3s
1/4s
1/3s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2
1s
1s
1s
1s
5s
5s
5s
5s

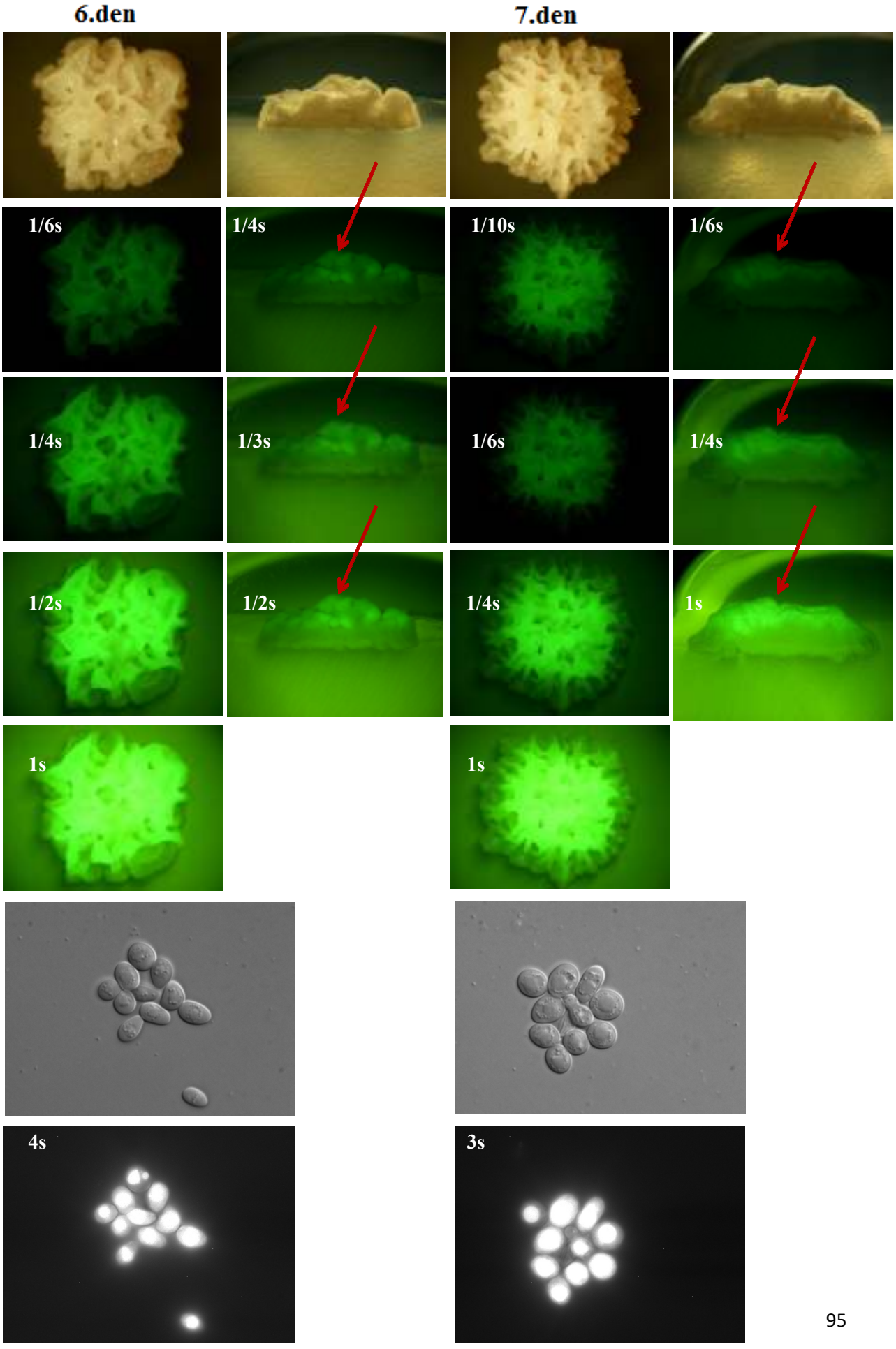
Obr. 31c



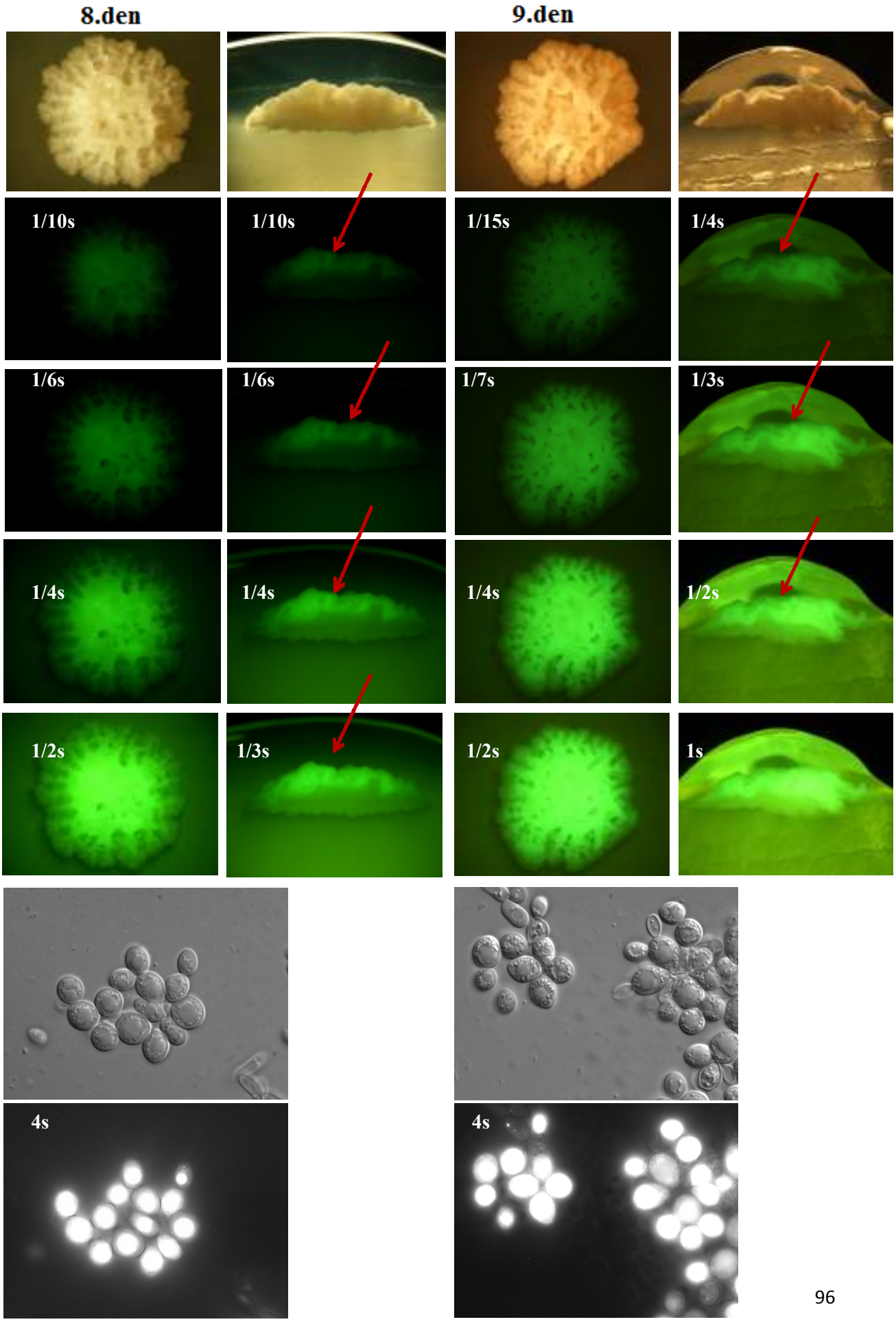
Obr. 32a


3.den
4.den
5.den
1/4s
1/4s
1/15s
1/7s
1/2s
1/2s
1/7s
1/4s
1s
1s
1/4s
1/2s
1s
1s
5s
5s
5s

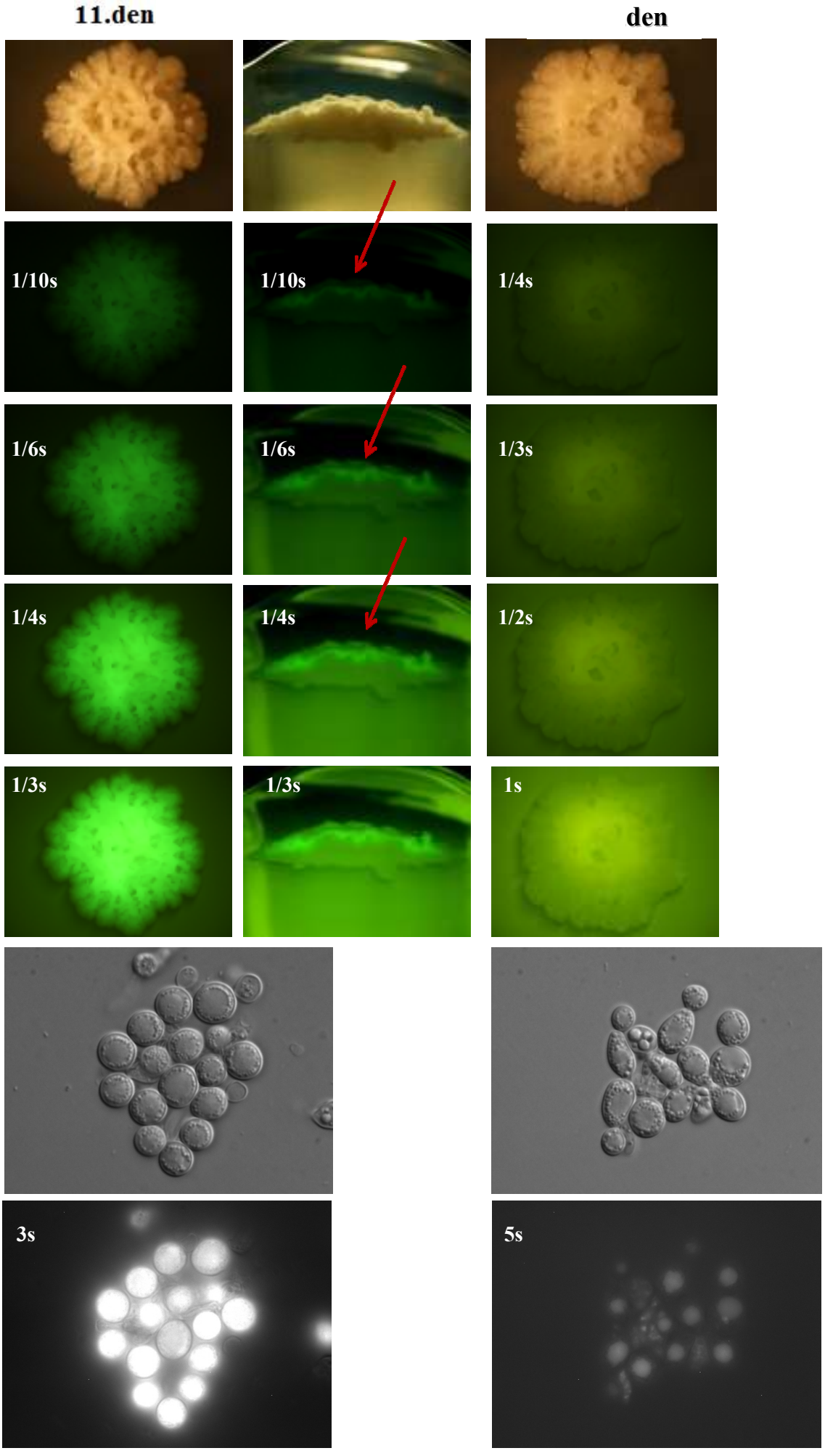
Obr. 32b


6.den
7.den
1/6s
1/4s
1/10s
1/6s
1/4s
1/3s
1/6s
1/4s
1/2s
1/2s
1/4s
1s
1s
1s
4s
3s

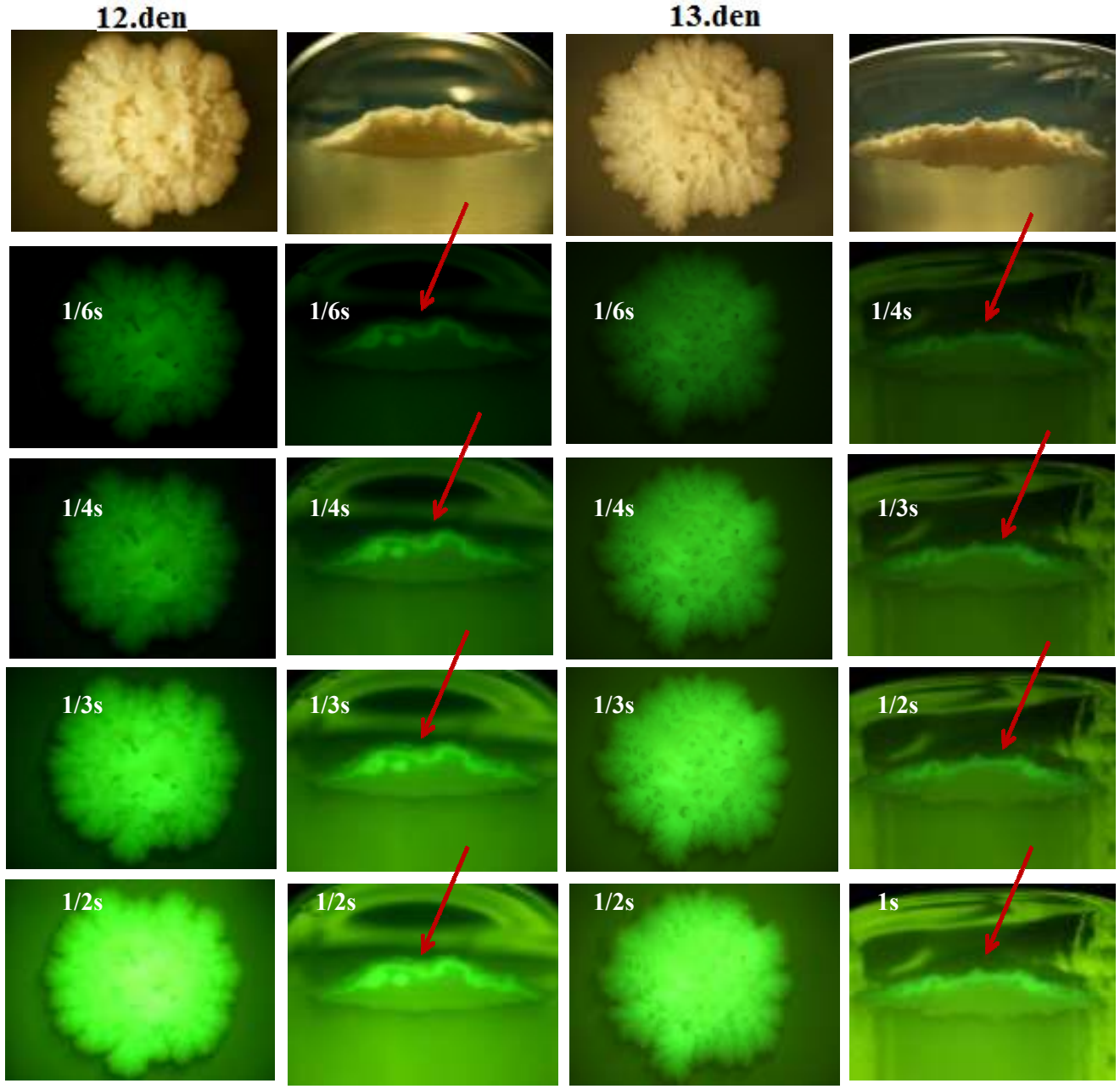
Obr. 32c

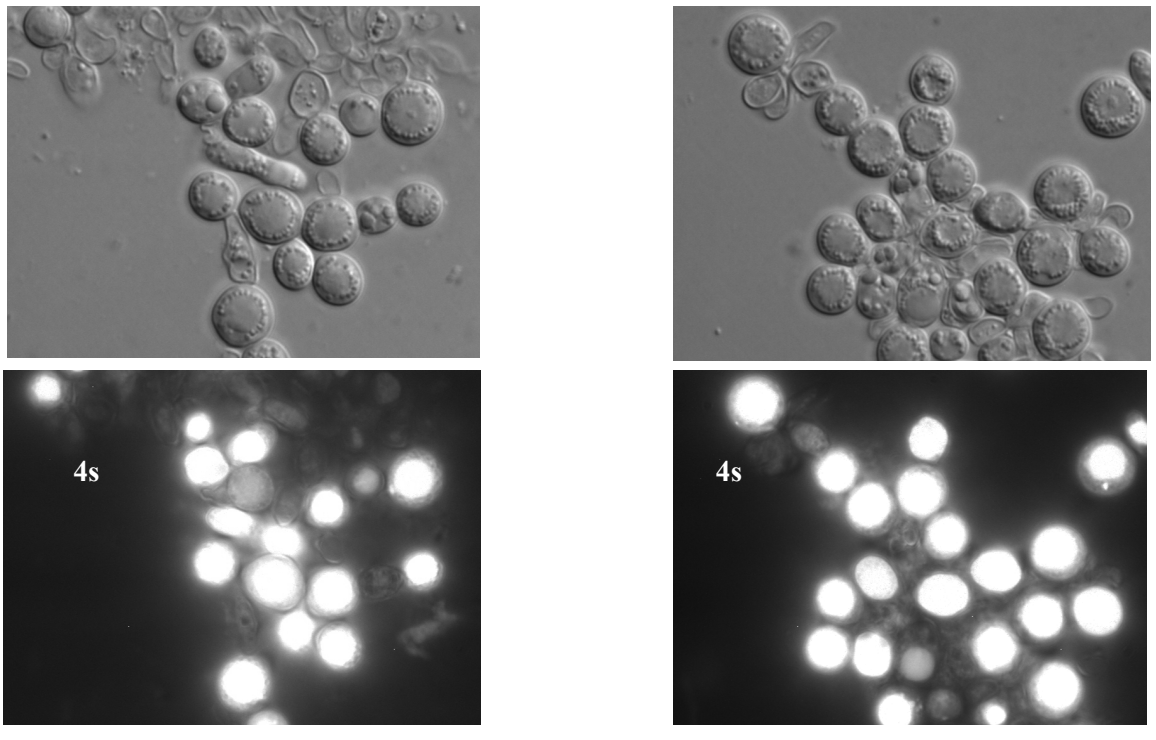

8.den
9.den
1/10s
1/10s
1/15s
1/4s
1/6s
1/6s
1/7s
1/3s
1/4s
1/4s
1/4s
1/2s
1/2s
1/3s
1/2s
1s
4s
4s

Obr. 32d

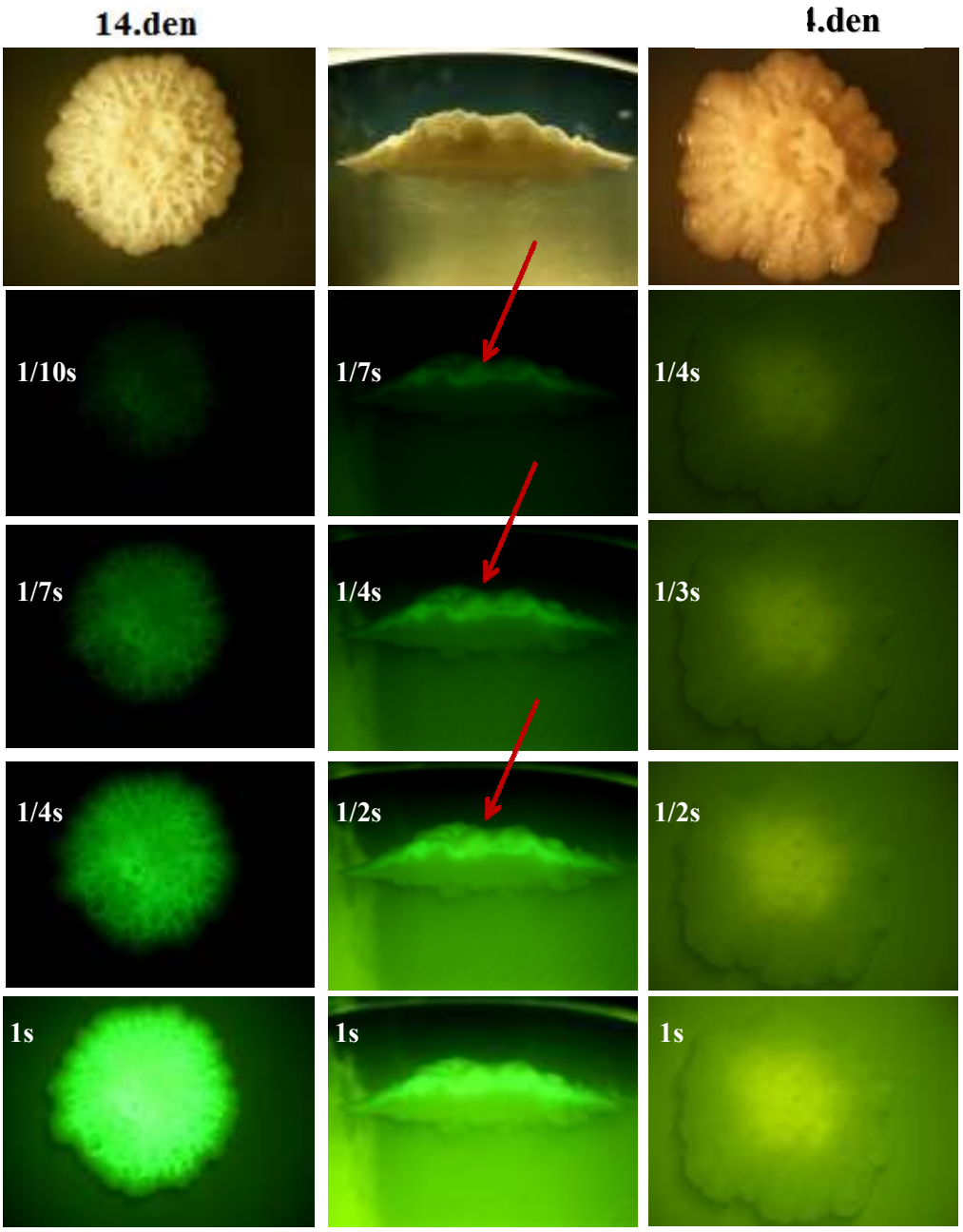


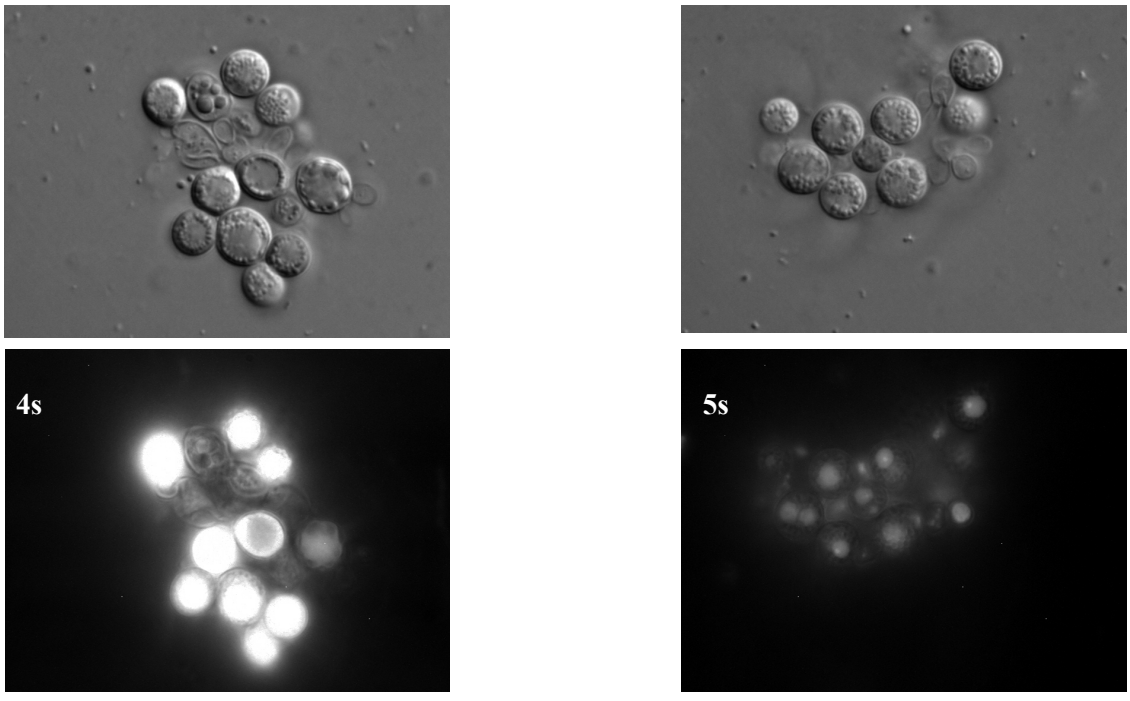
Obr. 32e


12.den
13.den
1/6s
1/6s
1/6s
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/3s
1/3s
1/3s
1/3s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s

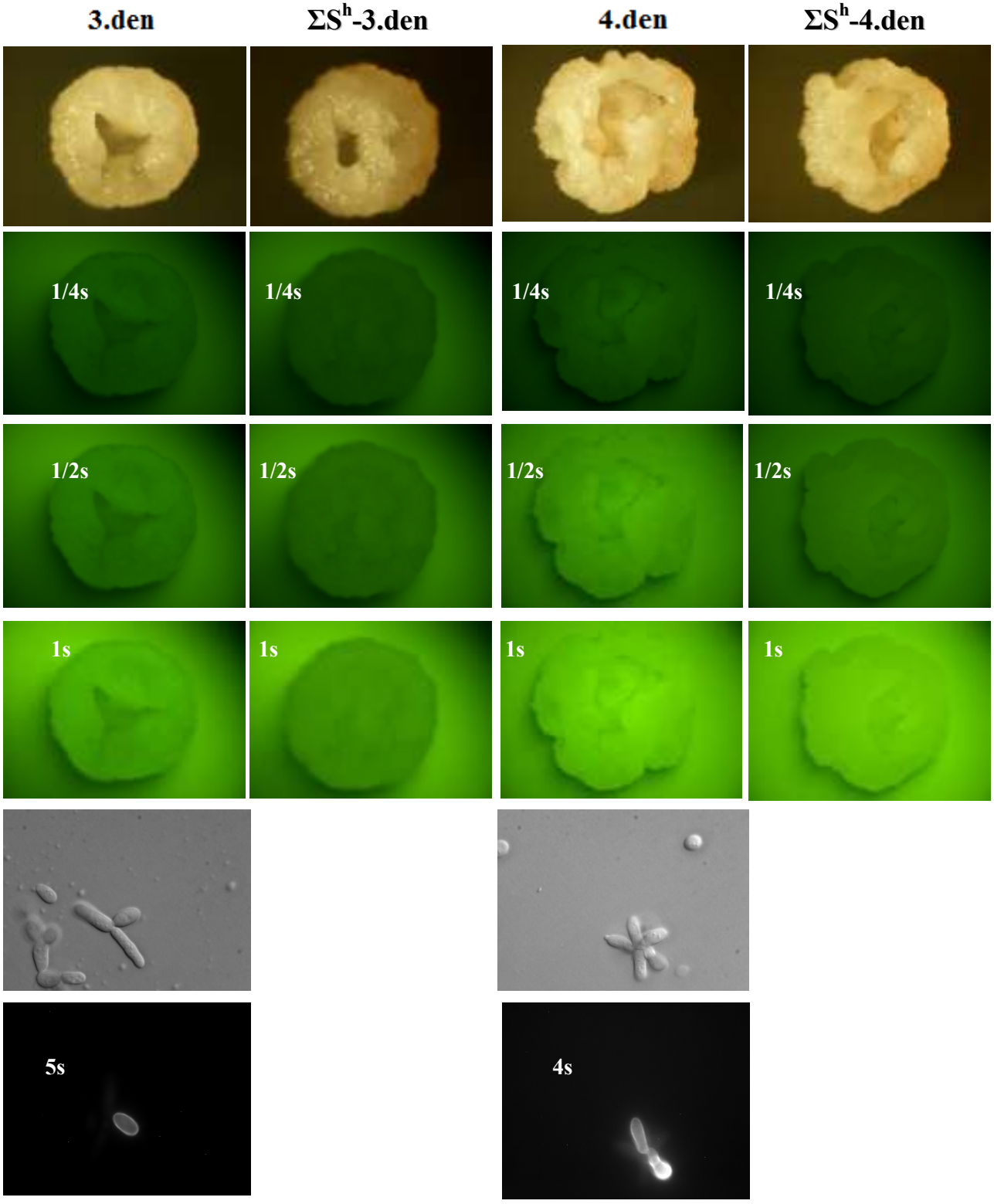

4s
4s

Obr. 32f

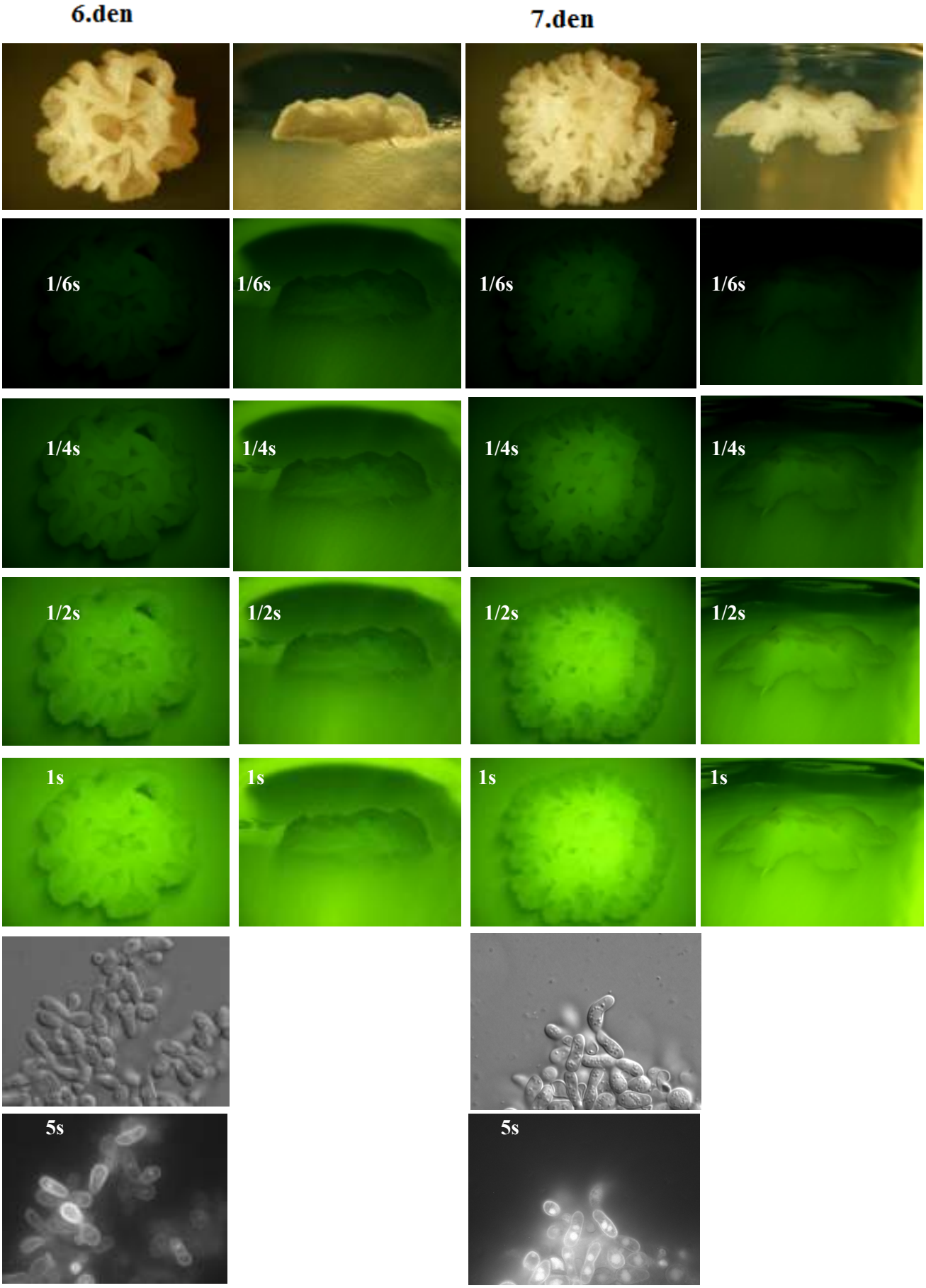




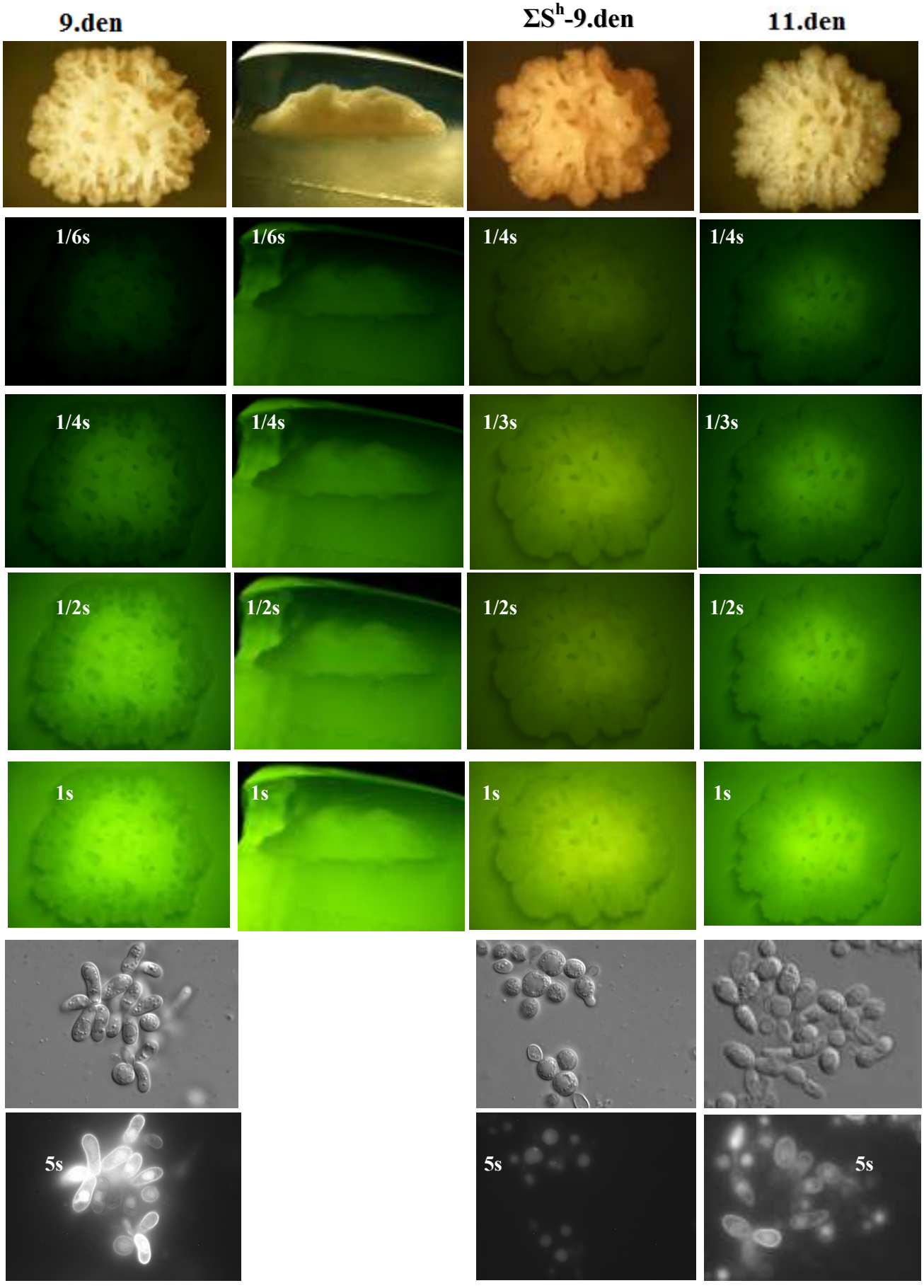
Obr. 33a


3.den
ΣS^h-3.den
4.den
ΣS^h-4.den
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
4s

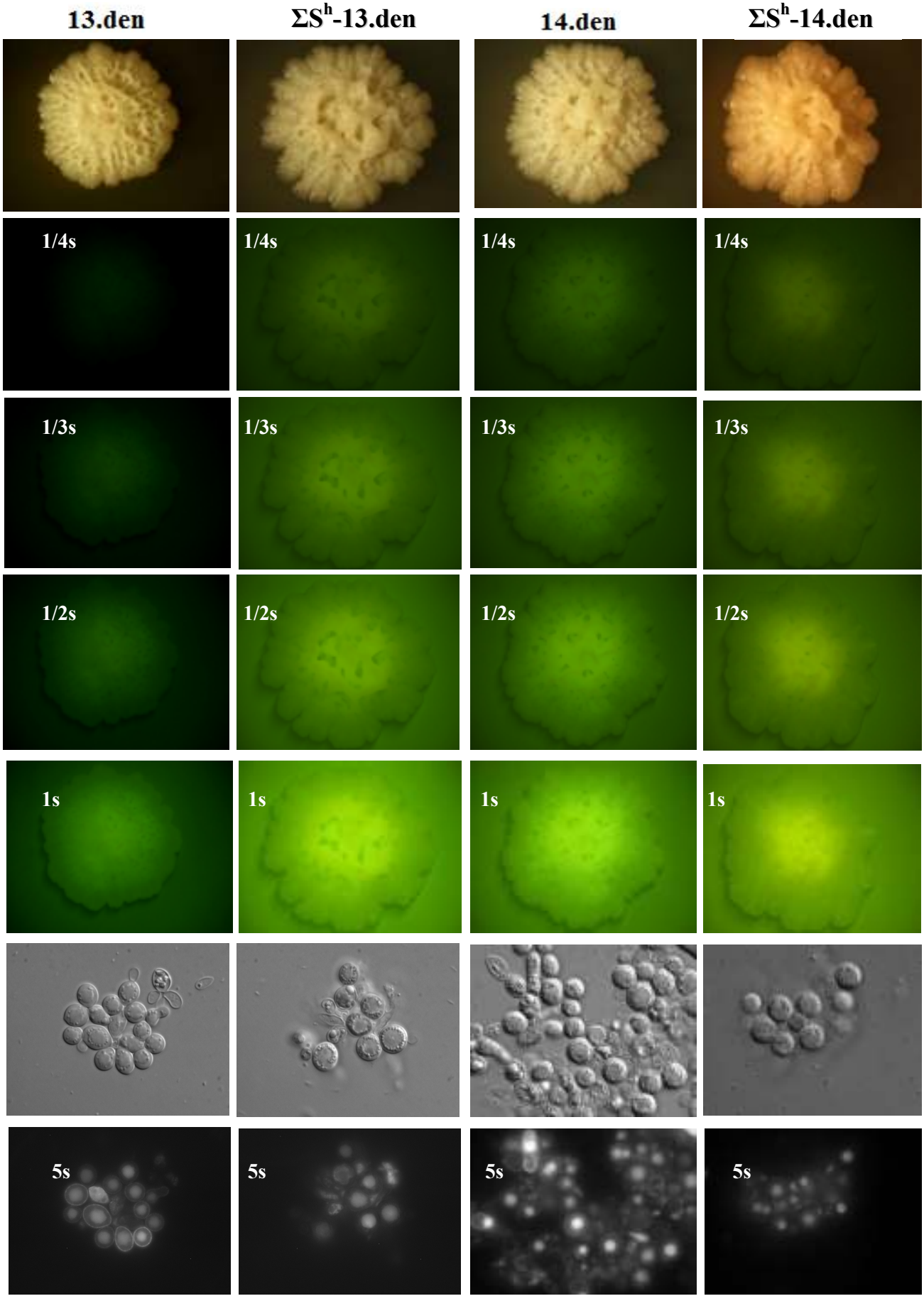
Obr. 33b


6.den
7.den
1/6s
1/6s
1/6s
1/6s
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
5s

Obr. 33c


9.den
ΣS^h-9.den
11.den
1/6s
1/6s
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/3s
1/3s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
5s
5s

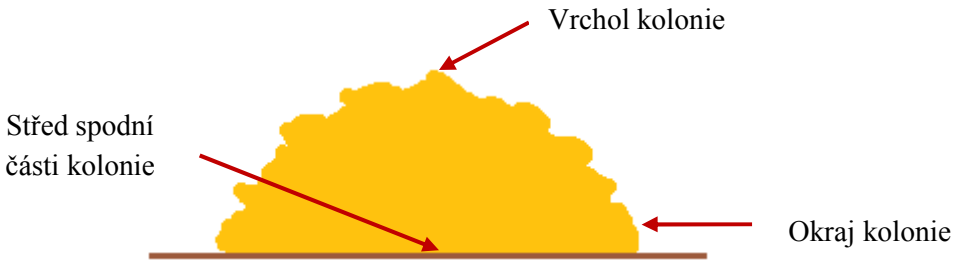
Obr. 33d


13.den
ΣS^h-13.den
14.den
ΣS^h-14.den
1/4s
1/4s
1/4s
1/4s
1/3s
1/3s
1/3s
1/3s
1/2s
1/2s
1/2s
1/2s
1s
1s
1s
1s
5s
5s
5s
5s

4.2.5 Sledování exprese genů v různých částech kolonií

V kvasinkové kolonii se nachází populace různě starých buněk. Proto mě zajímalo, zda se v různých částech kolonie mohou nacházet buňky různého stáří. Sledovala jsem proto buňky odebírané z definovaných částí kolonie. Na základě výsledků z předchozího experimentu jsem se u tohoto pokusu rozhodla sledovat expresi jen u 2 ze 4 značených genů. Pro exponenciální fázi růstu genu *GUT1* a pro stacionární fázi genu *SSA3*. Fluorescence těchto proteinů byla mnohem výraznější a odlišná od autofluorescence u kmene ΣS^h. U kmenů ΣS^h-SMI1a ΣS^h-HSP30 fluorescence nebyla natolik výrazná a také někdy lehko zaměnitelná s autofluorescencí ΣS^h. Cílem tohoto experimentu bylo tedy zjistit expresi sledovaných genů v buňkách odebíraných z definovaných částí kolonie a také zjistit stáří těchto buněk.

Postupovala jsem opět obdobným způsobem jako v předchozím experimentu při sledování exprese genů ve standardních koloniích. Jako kontrolu jsem opět použila kmen ΣS^h neoznačený GFP. Fluorescenční lupou jsem fotografovala celé kolonie a řezy kolonií po zalití kolonií 1% agarózovým gelem. Fluorescenčním mikroskopem jsem fotografovala buňky odebírané z okraje kolonií, z vrcholu kolonií a ze středu spodní části kolonií (Obr. 34), při viditelném světle podle Nomarského a také s GFP filtrem. Kolonie a buňky jsem fotografovala ve vytypovaných dnech z předchozího pokusu.



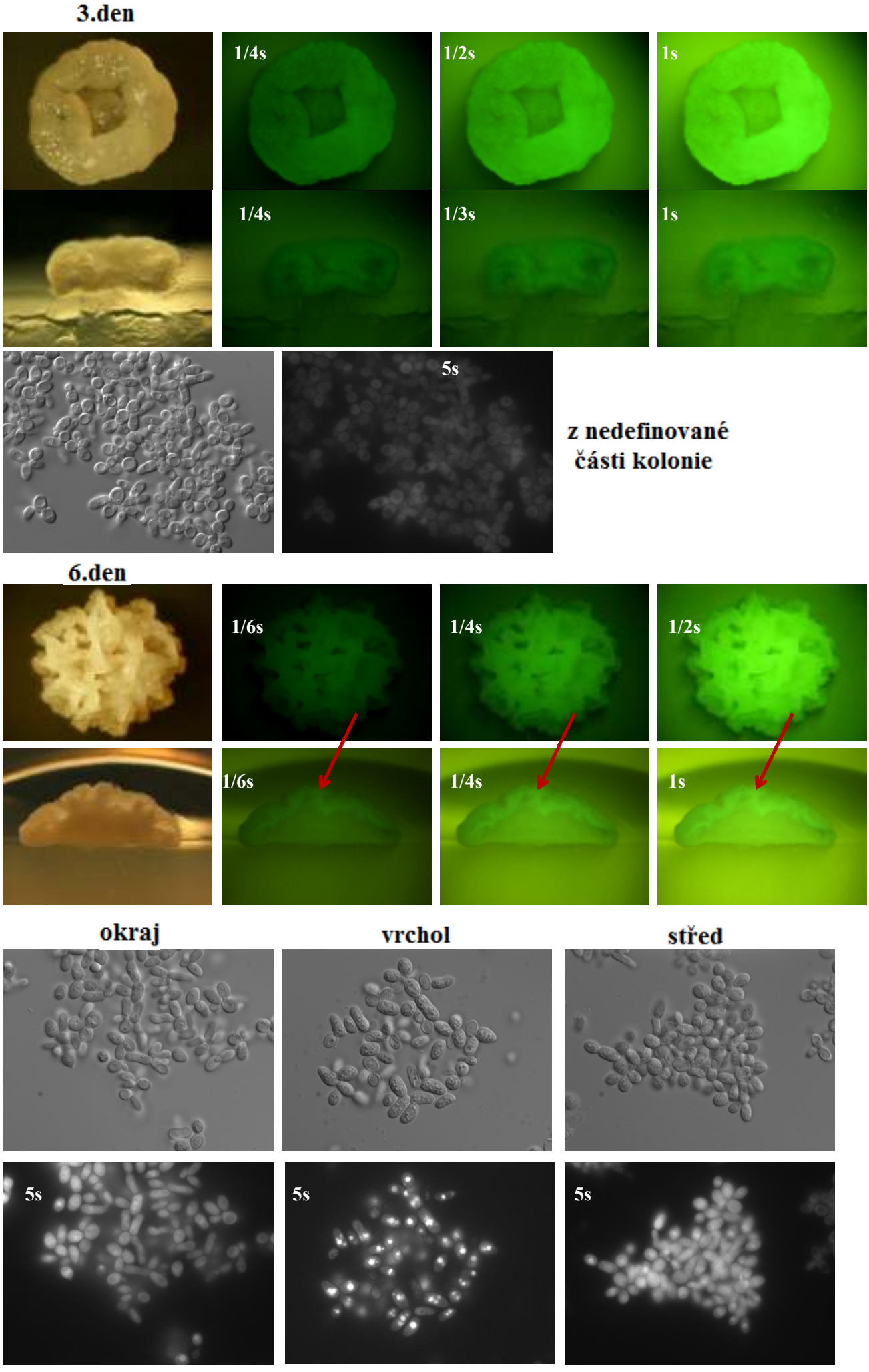
Obr. 34: *Obrázek kolonie v průřezu s označenými místy odběru kvasinkových buněk.*

Exprese genu *GUT1*: Výsledky u Gut1 proteinu, získané z fotografií z fluorescenční lupy, jsou stejné jako u předchozího experimentu (4. 4.). 3. den je Gut1 protein v buňkách přítomen a celá kolonie výrazně svítí, stejně tak i v průřezu kolonií. Kontrolou jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu, kde vidíme lokalizaci Gut1 proteinu v cytoplazmě. 3. den jsou kolonie stále příliš malé na přesný odběr buněk z kolonie (Obr. 35a). 6. den je Gut1 protein v buňkách stále dobře patrný, což potvrzují i fotografie z fluorescenčního mikroskopu. Na těchto fotografiích je vidět, že Gut1 protein, v buňkách odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie, je lokalizován v cytoplazmě a u buněk odebíraných z vrcholu kolonie se již dostává do vakuol. Na fotografiích řezu kolonií je ale vidět, že výrazněji svítí buňky na vrcholu kolonie (Obr. 35a). Od 9. dne je proteinu v buňkách podstatně méně, ale pouze fotografie z fluorescenční lupy jsou téměř srovnatelné s autofluorescencí kmene neoznačeného GFP - ΣS^h. Na fotografiích z fluorescenčního mikorskopu je jasně vidět, že protein Gut1 se dostal do vakuol pouze u buněk odebíraných z vrcholu kolonie. U buněk odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie je protein stále lokalizován v cytoplazmě buněk (Obr. 35b). 14. den u fotografií z fluorescenční lupy je fluorescence Gut1 proteinu srovnatelná s autofluorescencí kmene neoznačeného GFP - ΣS^h. U fotografií z fluorescenčního mikroskopu, v buňkách odebíraných z vrcholu a okraje kolonie se Gut1 protein dostal do vakuol a u buněk odebíraných ze středu spodní části kolonie je u morfologicky mladších buněk Gut1 protein stále v cytoplazmě. Z těchto výsledků lze tedy usuzovat, že starší buňky jsou lokalizované na vrcholu kolonie, mladší na okraji a nejmladší na středu spodní části kolonie.

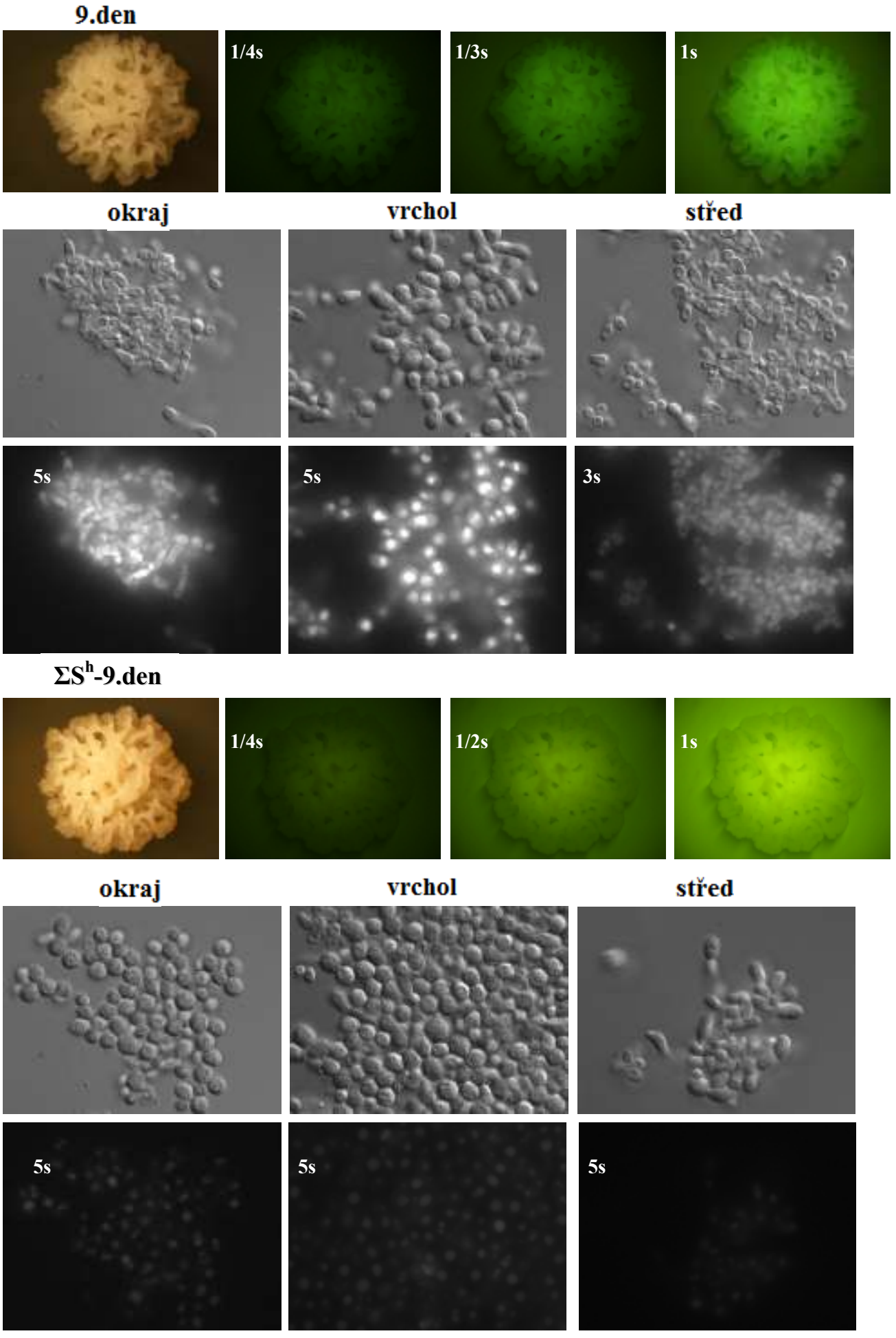
Exprese genu *SSA3*: Výsledky u Ssa3 proteinu, získané z fotografií z fluorescenční lupy jsou stejné jako u předchozího experimentu (4. 4.). Podle fotografií z fluorescenčního mikroskopu a částečně i z fluorescenční lupy vyplývá, že Ssa3 protein se 3. den v některých starších buňkách nachází (Obr. 36a). Od 6. dne je přítomnost proteinu velmi výrazná, jak v koloniích, tak v jednotlivých buňkách, kdy Ssa3 protein je lokalizován v cytoplazmě. Na řezu kolonií je dobře vidět, že buňky lokalizované na vrcholu kolonie svítí (viz šipky). To potvrzují i výsledky získané z fluorescenčního mikroskopu, kdy nejvýrazněji svítí buňky odebírané z vrcholu kolonie a svítí zde většina buněk. Na fotografiích s buňkami odebíranými z okraje a ze středu spodní části kolonie je jasně vidět směs různě starých buněk, kdy protein je lokalizován právě jen v některých buňkách (Obr. 36a). 9. den je přítomnost proteinu ještě mnohem silnější, na řezu kolonií opět svítí buňky,

které se nacházejí na vrcholu kolonie (viz šipky). U fotografií z fluorescenčního mikroskopu, je Ssa3 protein v buňkách velmi intenzivní. Nejintenzivnější je u buněk odebíraných z vrcholu a z okraje kolonie, oproti buňkám odebíraným ze středu spodní části kolonie (Obr. 36b). 14. den je proteinu o něco méně, přesto je jasné, že indukce tohoto proteinu neustává. Je stále dobře vidět i lokalizace svítících buněk na vrcholu kolonie. Nejvýrazněji svítí buňky odebírané z vrcholu kolonie, poté z okraje kolonie a nejméně buňky odebírané ze středu spodní části kolonie (Obr. 36c). Z výsledků vyplývá, že starší buňky jsou lokalizované na vrcholu kolonie, mladší na okraji a nejmladší na středu spodní části kolonie.

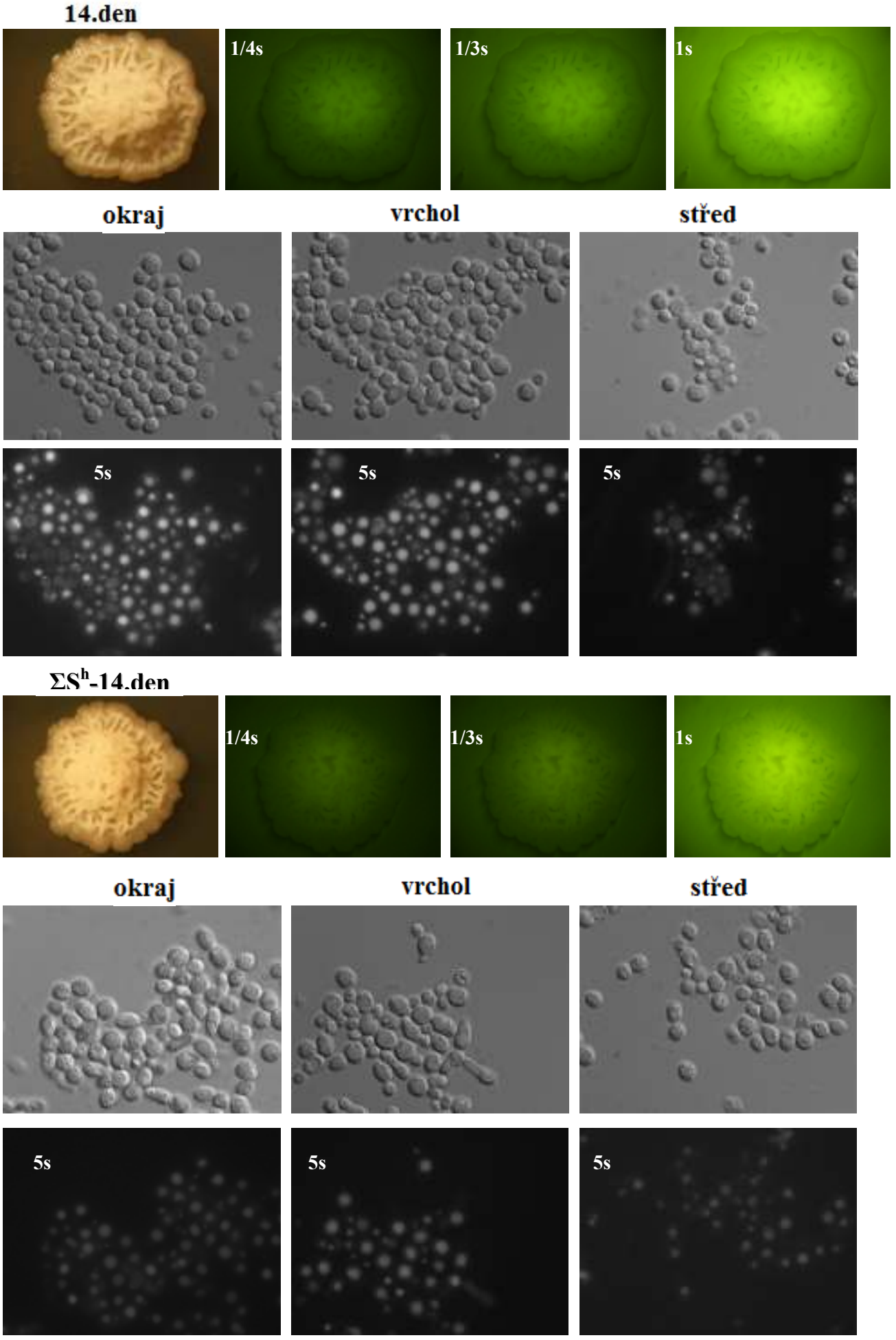
Obr. 35a


3.den
1/4s
1/2s
1s
1/4s
1/3s
1s
5s
z nedefinované
části kolonie
6.den
1/6s
1/4s
1/2s
1/6s
1/4s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

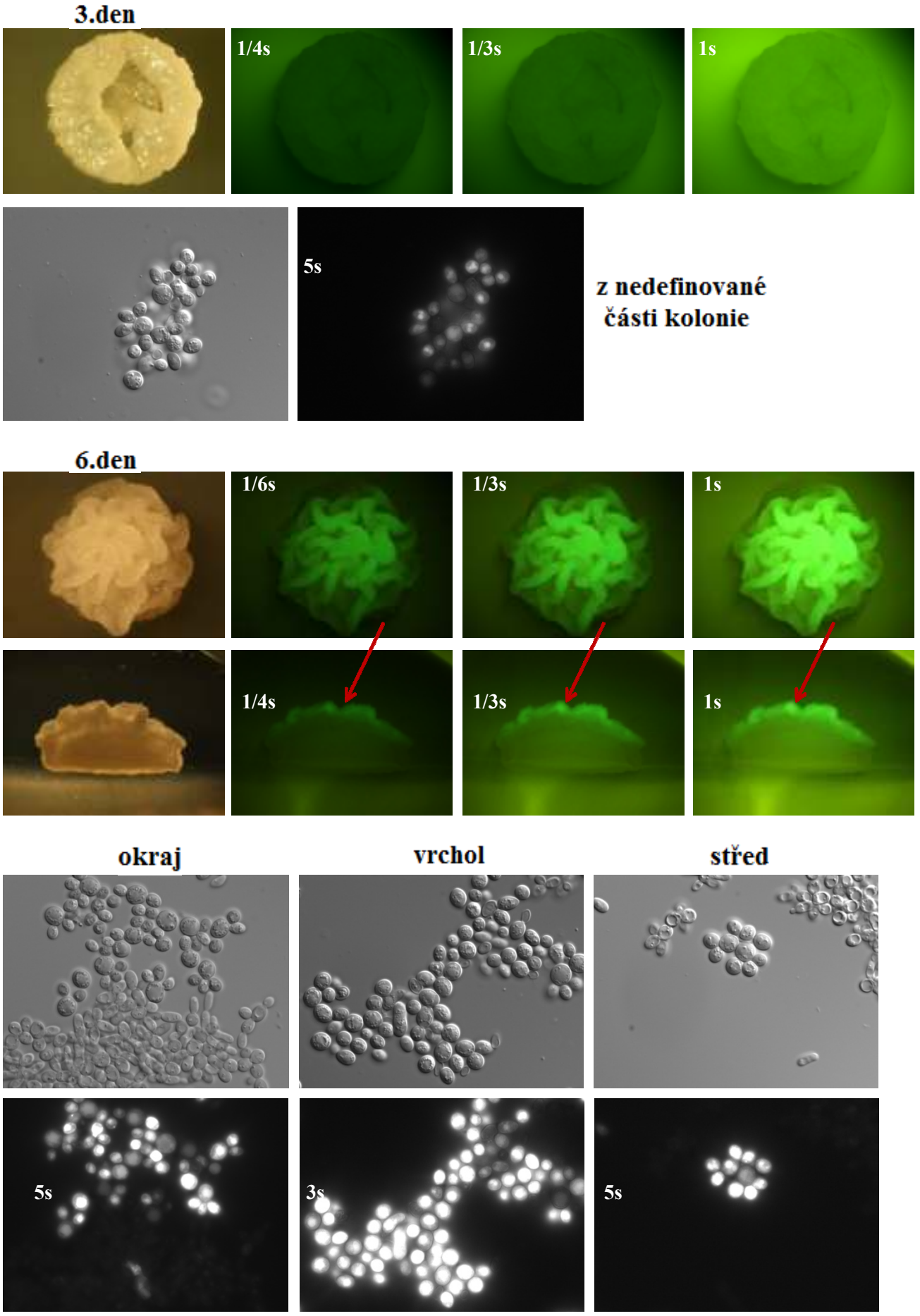
Obr. 35b


9.den
1/4s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
3s
ΣS^h-9.den
1/4s
1/2s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

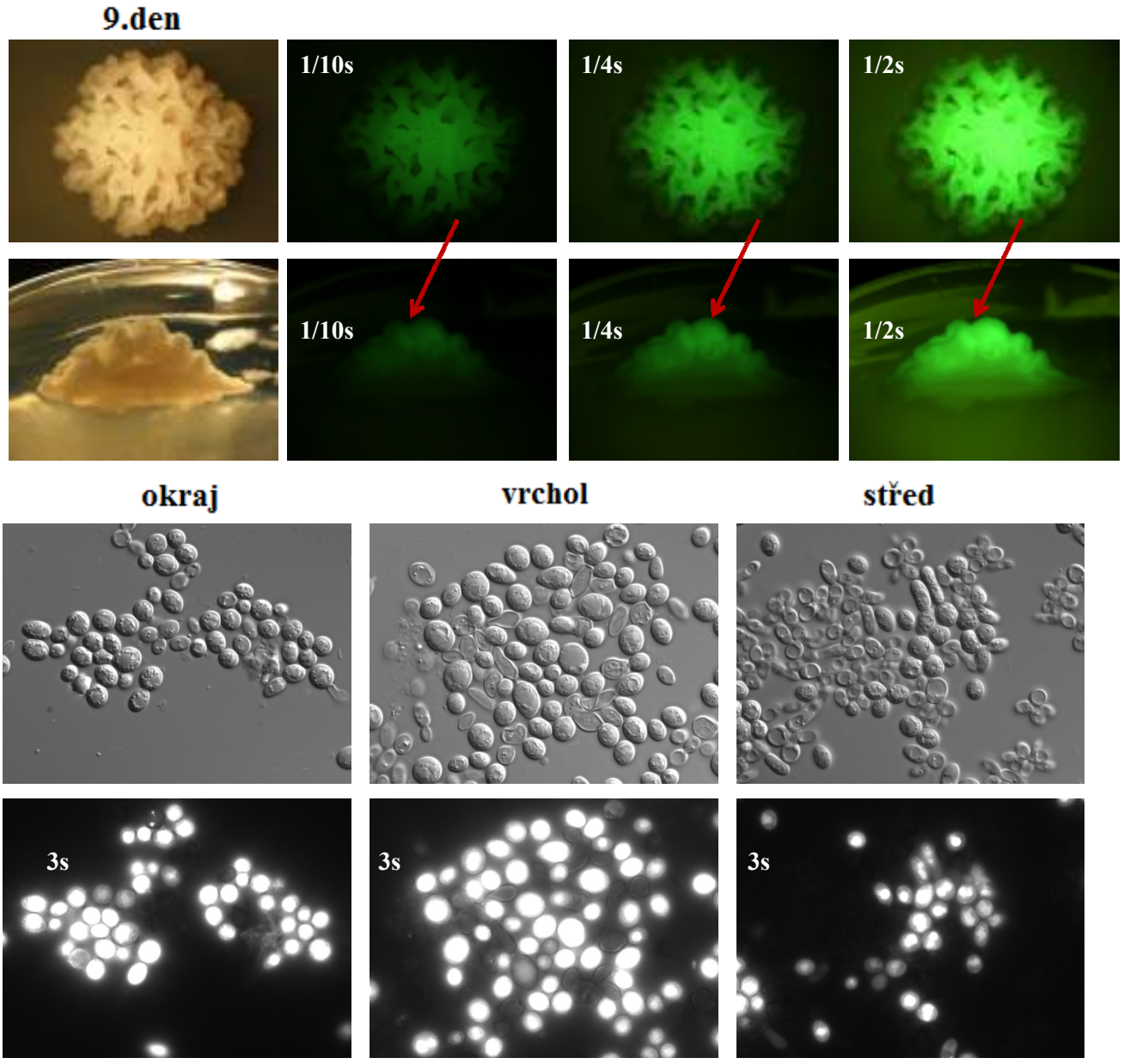
Obr. 35c


14.den
1/4s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
ΣS^h-14.den
1/4s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

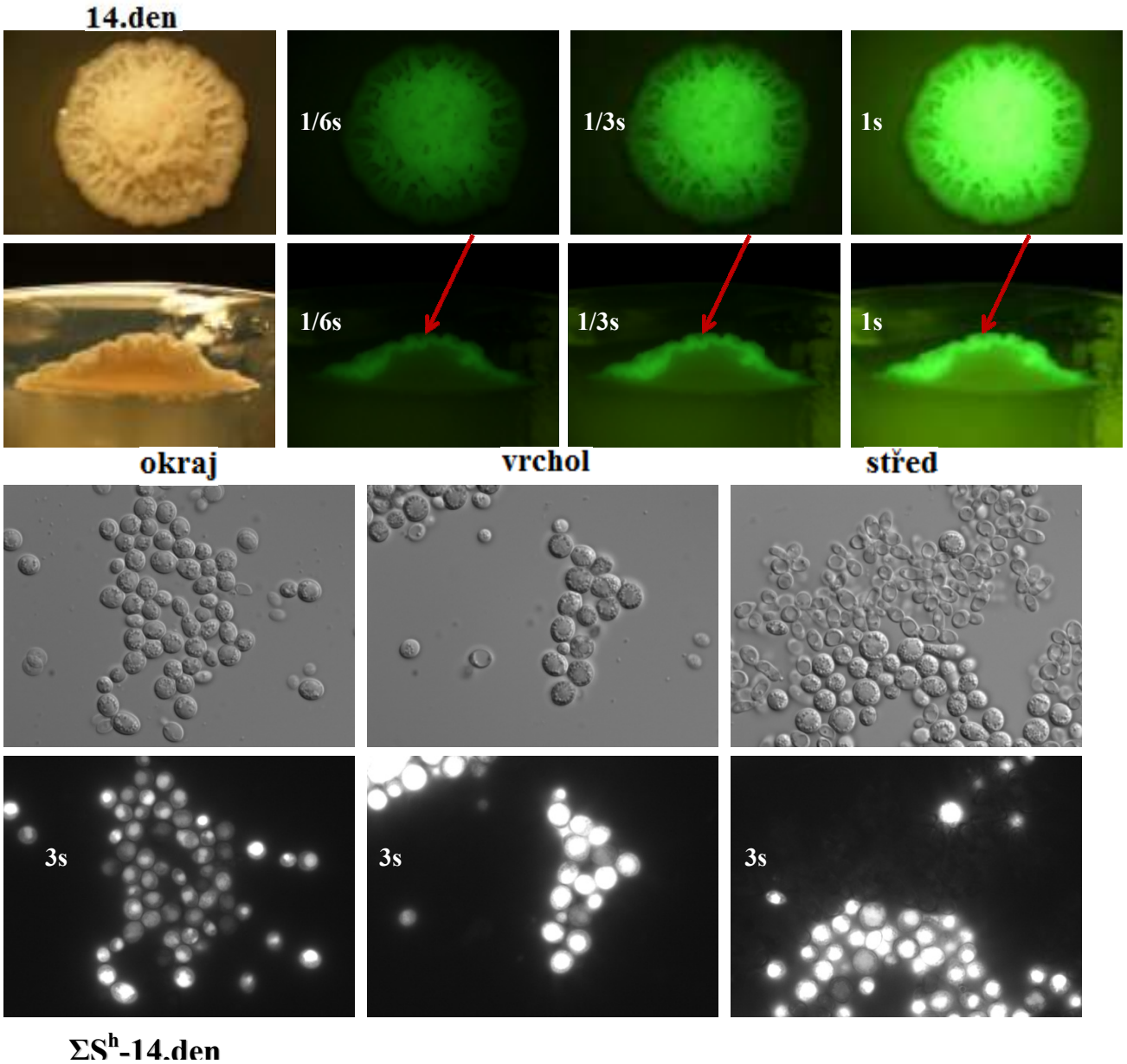
Obr. 36a

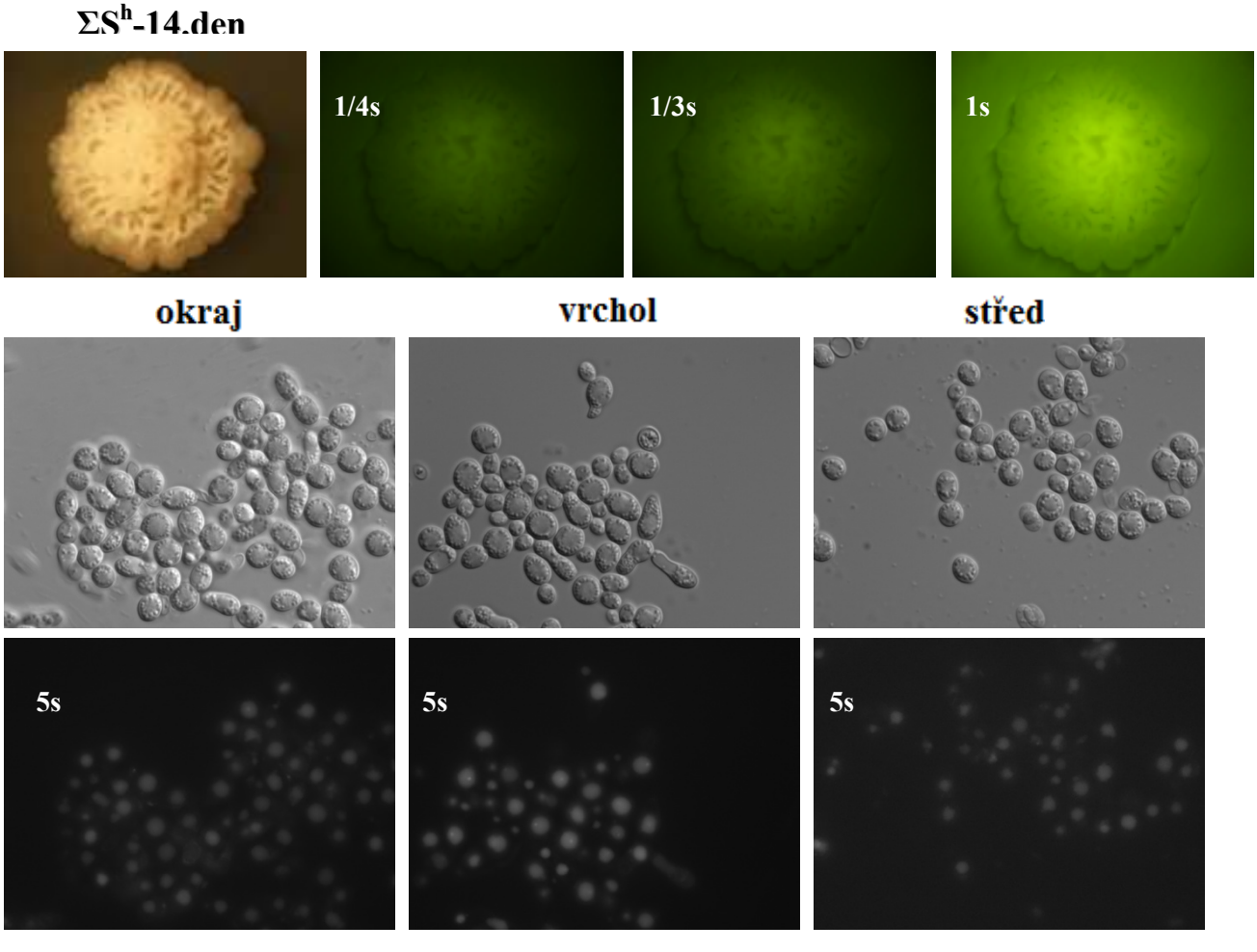

3.den
1/4s
1/3s
1s
5s
z nedefinované
části kolonie
6.den
1/6s
1/3s
1s
1/4s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
3s
5s

Obr. 36b



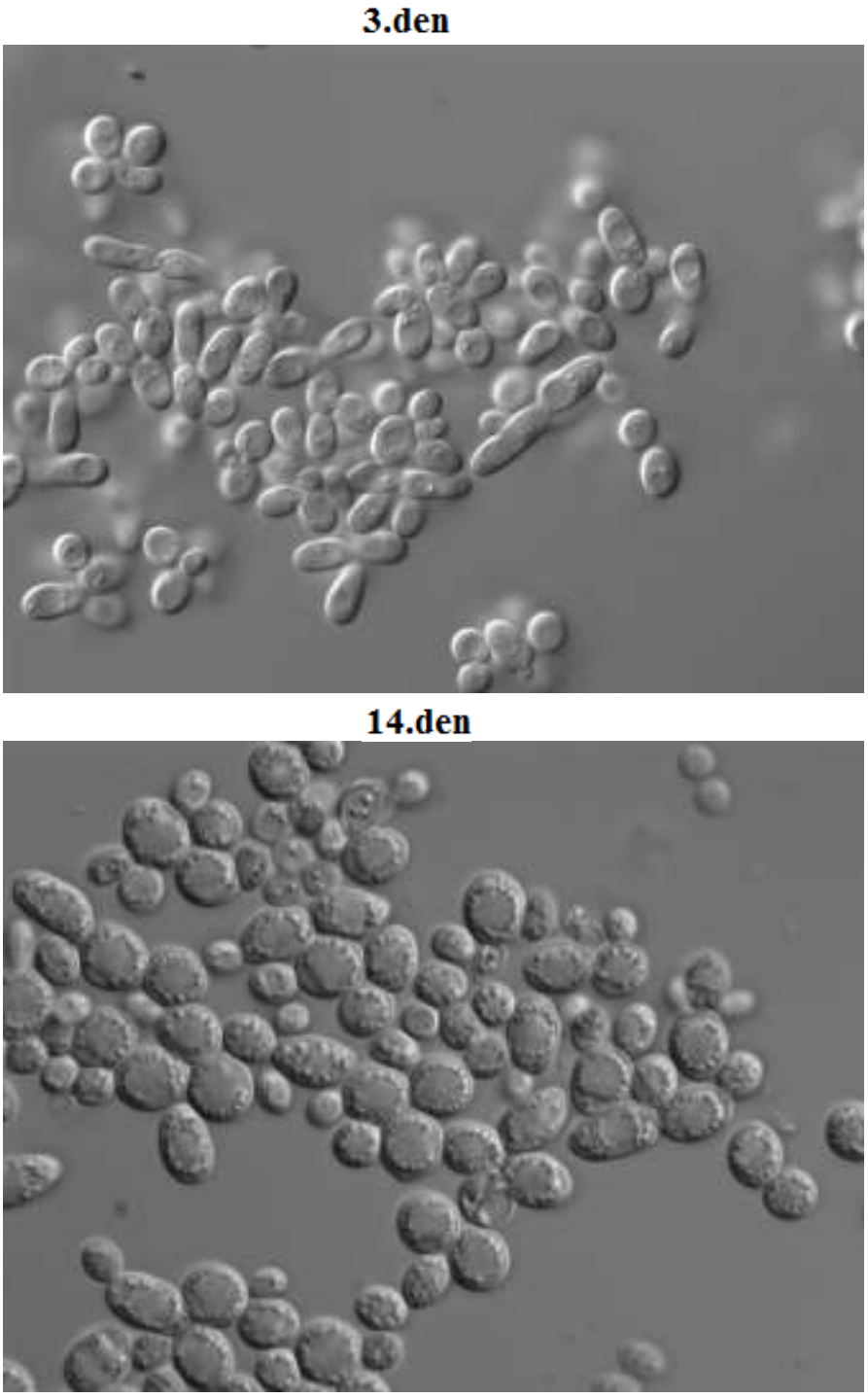
Obr. 36c


14.den
1/6s
1/3s
1s
1/6s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
3s
3s
3s

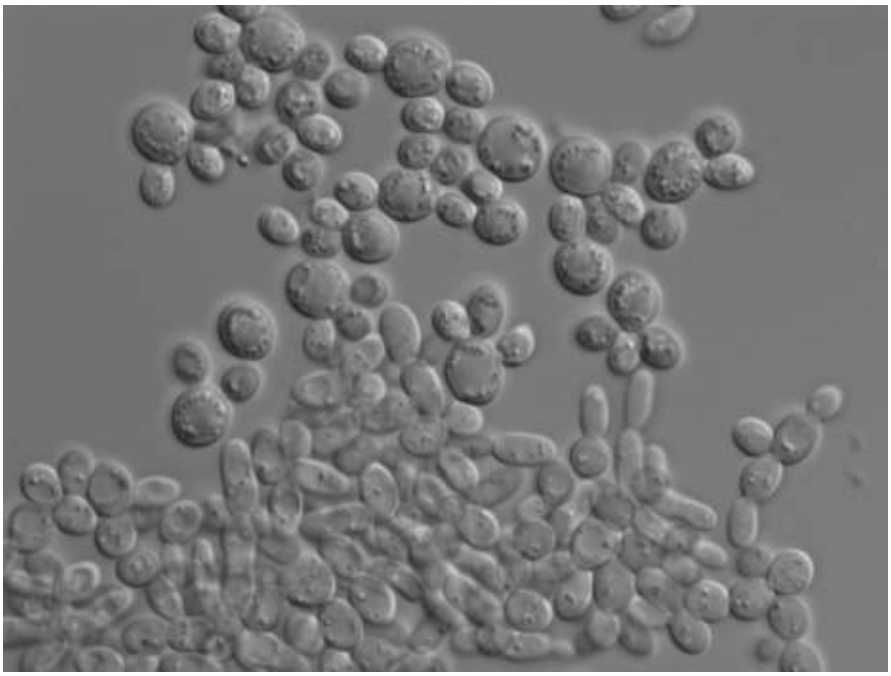

ΣS^h-14.den
1/4s
1/3s
1s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

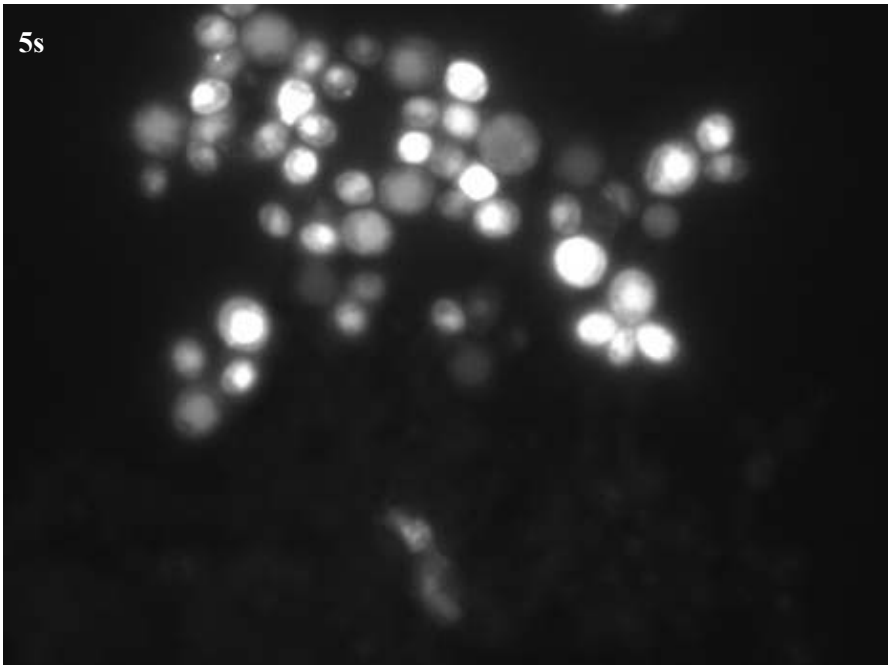
Morfologie buněk:

V průběhu růstu kolonie se výrazně mění morfologie jednotlivých buněk. 3. den růstu jsou buňky podstatně menší než buňky ze 14. dne. U těchto mladších buněk je také vidět, že buňky mají homogenní obsah, s dobře viditelnou vakuolou a téměř bez viditelných vezikulů. U starších buněk je obsah nehomogenní s velkým množstvím váčků, které jsou výrazně vidět ve všech buňkách (Obr. 37a). Při odběru buněk z definovaných částí kolonie se ne vždy podařilo odebrat stejně staré buňky. Na některých fotografiích, například z 6. dne u SSA3, je vidět směs různě starých buněk. U morfologicky mladších buněk k indukci Ssa3 proteinu nedošlo, na rozdíl od buněk morfologicky starších, kde je protein v buňkách dobře patrný v cytoplazmě (Obr. 37b). Na základě fotografií z mikroskopu jsme také zjistili, že u genů exprimovaných v exponenciální fázi růstu, se indukovaný protein při přechodu do stacionární fáze dostává do vakuol, kde intenzita fluorescence je o něco výraznější než při lokalizaci proteinu v cytoplazmě nebo organelách. Jako příklad uvádím 6. den u Gut1, fotografie kvasinkových buněk odebíraných z okraje a z vrcholu kolonie (Obr. 37c).

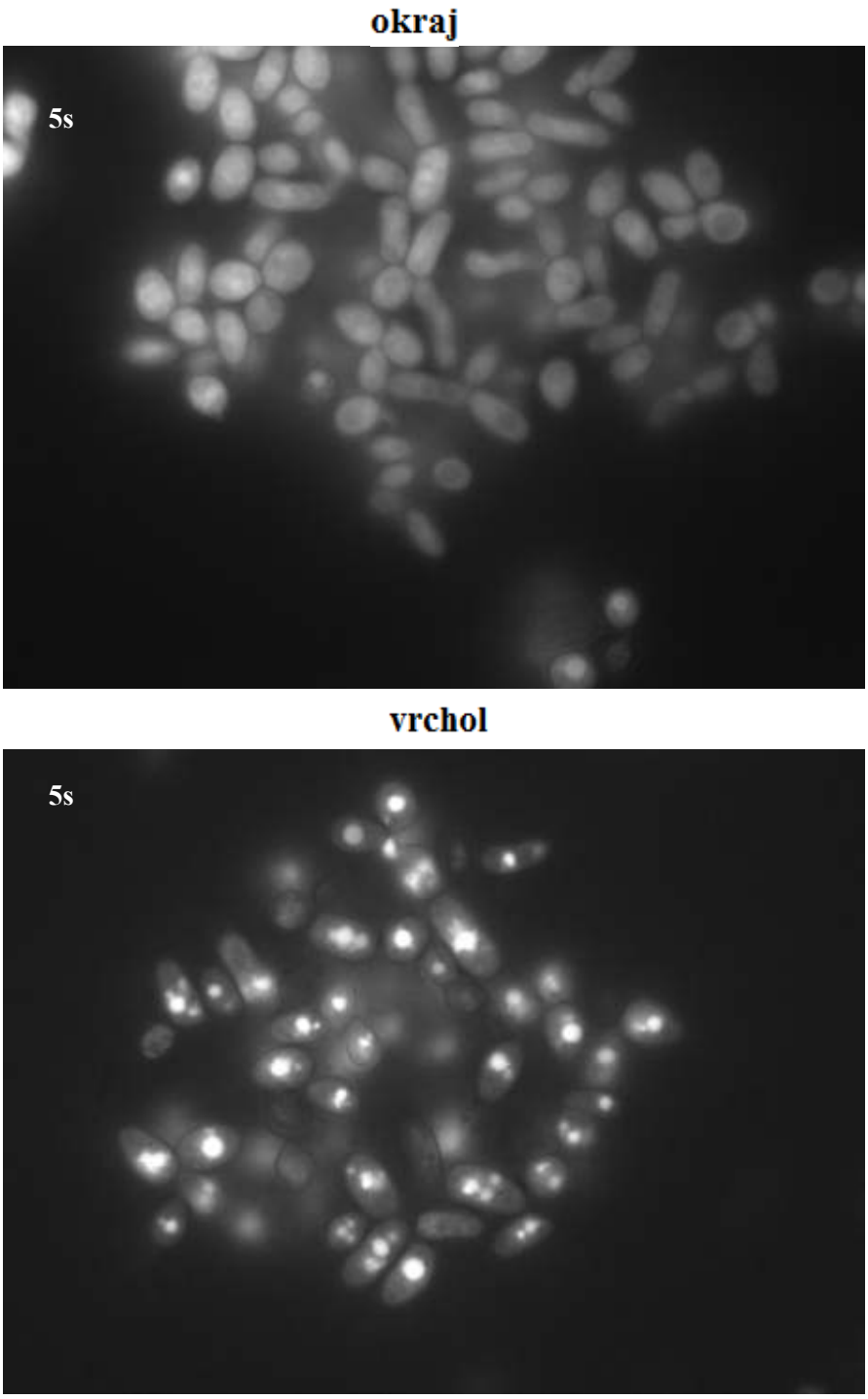


Obr. 37a: *Morfologie kvasinkových buněk kmene S. cerevisiae* ΣS^h *kultivovaných na pevném, GM médiu 3. den (horní fotografie) a 14. den (spodní fotografie, buňky z vrcholu kolonie). Kvasinkové buňky jsou fotografované podle Nomarského při 100 násobném zvětšení s imerzí.*





Obr. 37b: *Morfologie a fluorescence proteinu Ssa3 v kvasinkových buňkách z kolonií kmene S. cerevisiae ΣS^{h} se SSA3 genem značeným GFP, kultivovaných na pevném, GM médiu 6. den. Kvasinkové buňky jsou fotografované podle Nomarského při 100 násobném zvětšení s imerzí a s GFP filtrem při času expozice 5s.*



Obr. 37c: *Morfologie a fluorescence proteinu GUT1 v kvasinkových buňkách z kolonií kmene S. cerevisiae ΣS^{h} s GUT1 genem značeným GFP, kultivovaných na pevném, GM médiu 6. den. Kvasinkové buňky jsou fotografované s GFP filtrem při času expozice 5s.*

4.2.6 Exprese genů v koloniích sledovaná průtokovým cytometrem

Pro zjištění procentuálního zastoupení buněk, u kterých dochází k indukci proteinů ve sledovaných dnech, a také pro ověření výsledků získaných z fluorescenčního mikroskopu a fluorescenční lupy, jsem použila metody průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je standardní metodou pro analýzu buněk v suspenzi.

Kolonie jsem napěstovala opět shodným způsobem jako v předchozích pokusech. Jako kontrolu jsem použila kmen ΣS^h neoznačený GFP. Buňky jsem hodnotila ve vytypovaných dnech z předchozích pokusů 3., 6., 9. a 14. den, kdy jsem pomocí průtokového cytometru v buněčné populaci hodnotila procento buněk s indukovanými proteiny. Hodnotila jsem opět buňky odebírané z okraje kolonií, z vrcholu kolonií a ze středu spodní části kolonií (Obr. 34). V bodových grafech, získaných měřením suspenze buněk v průtokovém cytometru, každá tečka představuje buňku, nebo několik buněk, které mají zcela stejnou intenzitu fluorescence. Sledovaným parametrem je fluorescence populace buněk a intenzita fluorescence těchto buněk. Bodový graf je rozdělen na dva kvadranty, kde v horním kvadrantu grafu (červeně tečky) jsou buňky s indukovaným proteinem a ve spodním kvadrantu grafu jsou buňky (černé tečky), u kterých k indukci proteinu nedošlo. Cílem bylo ověřit expresi genů pomocí průtokové cytometrie a to sledováním fluorescence fúzovaných proteinů v buněčné populaci.

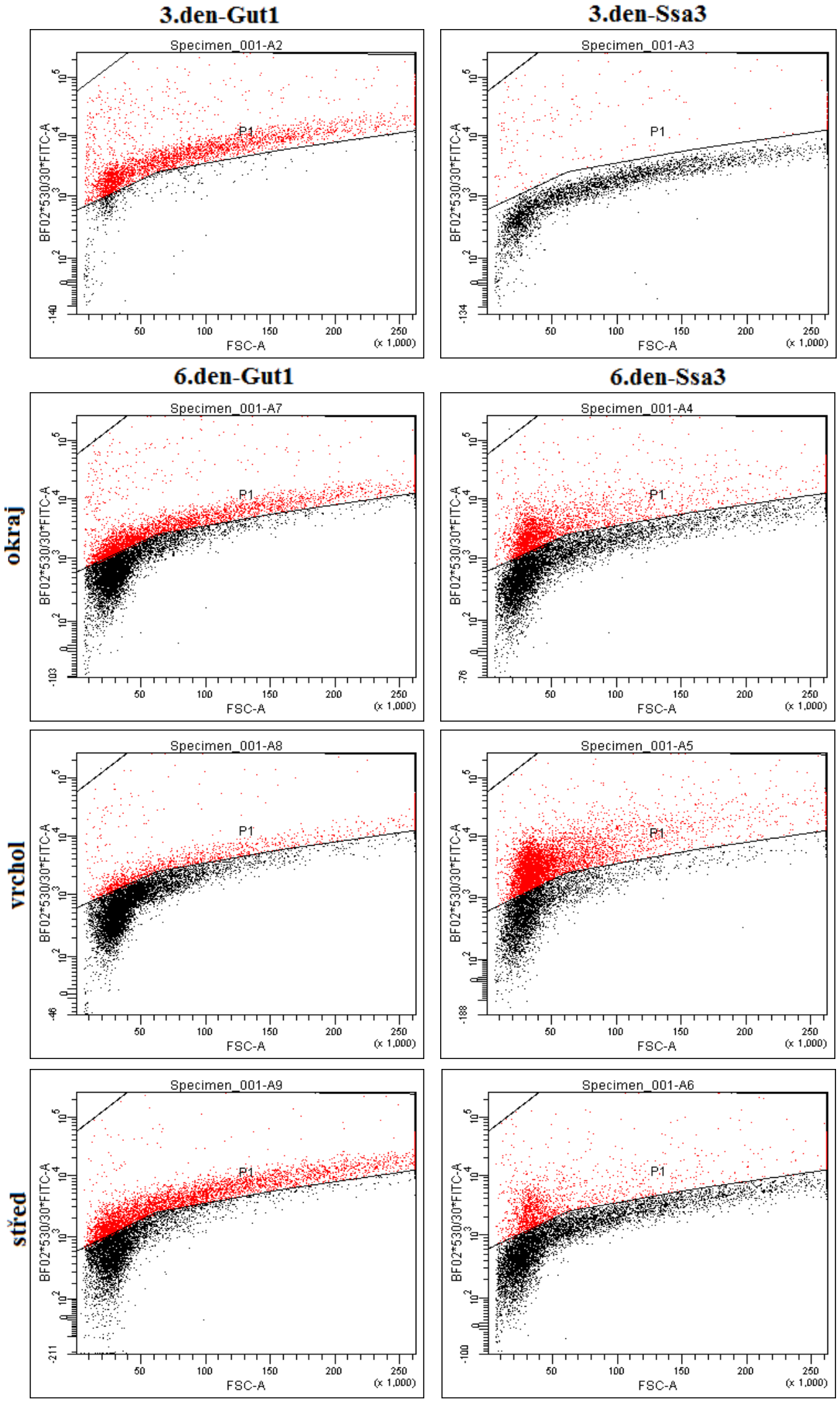
Exprese genu *GUT1*: 3. den ve srovnání s kontrolním kmenem ΣS^h, je Gut1 protein v buňkách výrazně indukován. Z celkové populace buněk, dosahuje fluorescence 88 % buněk. 3. den jsou kolonie příliš malé na přesný odběr buněk z kolonie, proto byly hodnoceny buňky z celé kolonie (Obr. 38a). 6. den je Gut1 protein přítomen především v buňkách odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie, kde fluorescence je u 41% a 51% z celkové populace buněk. U buněk z vrcholu kolonie fluoreskuje pouze 16% buněk (Obr. 38a). 9. dne se protein v buňkách stále nachází. U buněk odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie je fluorescence u 49% a 58% buněk z celkové populace buněk. U buněk z vrcholu kolonie fluoreskuje pouze 27% buněk (Obr. 38b). 14. den u buněk odebíraných z okraje kolonie fluoreskuje 46%, u buněk ze středu spodní části kolonie je fluorescence 64% a u buněk z vrcholu kolonie je pouze 11% (Obr. 38c). Tyto výsledky se téměř shodují s výsledky z fluorescenční lupy a z fluorescenčního mikroskopu pro Gut1. Pouze 14. den se výsledky rozcházejí. Vyplývá, že po celou dobu růstu kolonie se nejméně

svítících buněk vyskytuje ve vrcholu kolonie a dále, že nejvíce svítících buněk je až do 14. dne růstu na spodu střední části kolonie, a poté na okraji kolonie.

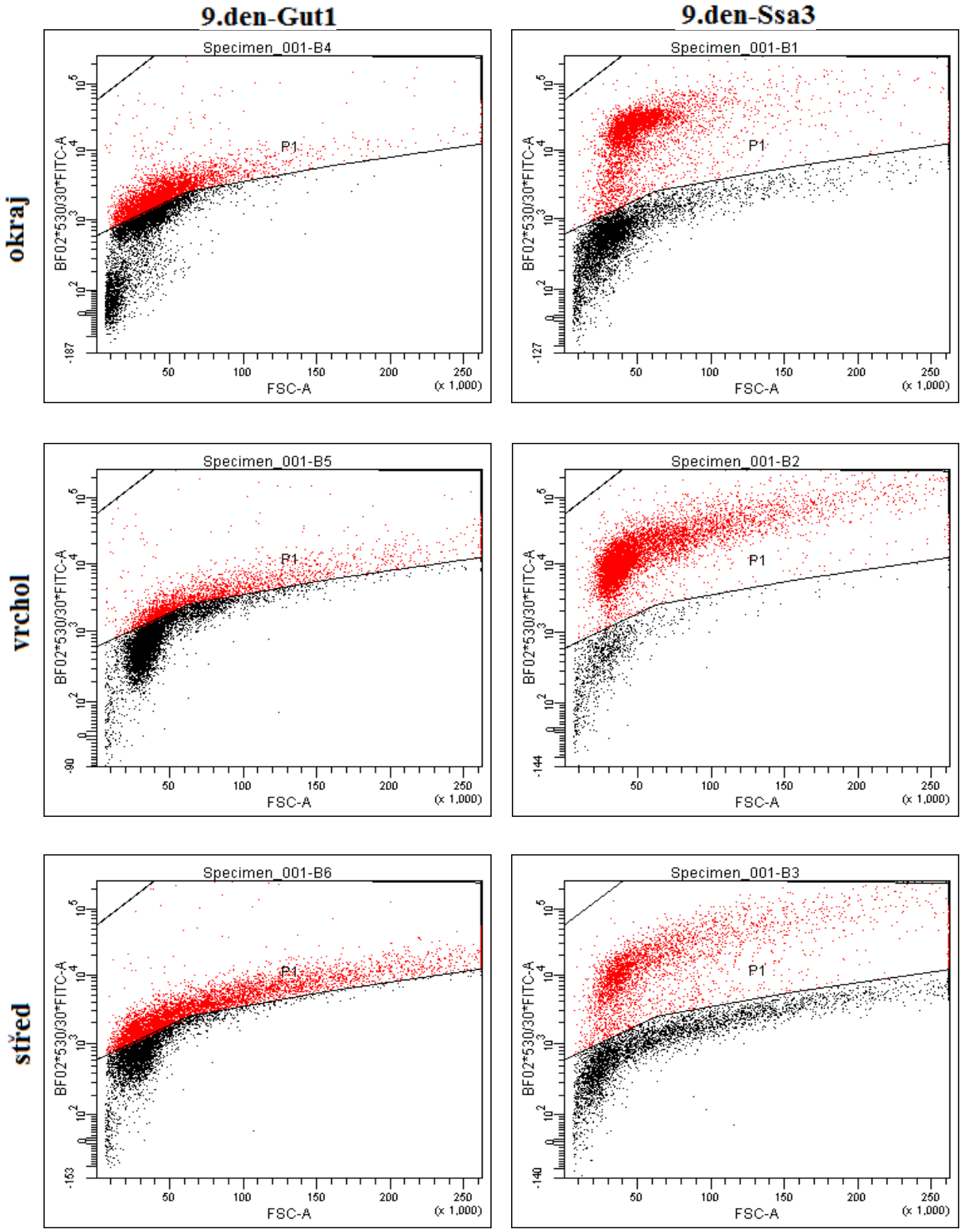
Exprese genu *SSA3*: 3. den fluoreskuje 7% buněk kmene ΣS^h -Ssa3. 6. den je Ssa3 protein přítomen především v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie, kde je zaznamenána fluorescence u 59% buněk z celkové populace buněk. U buněk z okraje a ze středu spodní části kolonie je fluorescence u 33% a 22% buněk z celkové populace buněk (Obr. 38a). 9. den je proteinu v buňkách mnohem více než 6. den a stejně tak i intenzita fluorescence je vyšší. U buněk odebíraných z vrcholu kolonií fluoreskuje až 89%, z okraje 47% a ze středu spodní části kolonie 46% z celkové populace buněk (Obr. 38b). 14. den nejvíce a nejintenzivněji fluoreskují buňky z vrcholu kolonie 76% z celkové populace buněk, poté z okraje kolonie 70% a nejméně u buněk ze středu spodní části kolonie 47% buněk (Obr. 38c). U Ssa3 intenzita fluorescence buněčné populace byla nejintenzivnější 9. a 14. den, ve srovnání s Gut1, kde intenzita fluorescence buněčné populace byla výrazně nižší. Tyto výsledky potvrzují výsledky z fluorescenční lupy a z fluorescenčního mikroskopu pro Ssa3. Z těchto výsledků také vyplývá, že protein Ssa3 se nejvíce nachází v buňkách z vrcholu kolonie a poté z okraje kolonie. Nejnižší množství proteinu je u buněk odebíraných ze středu spodní části kolonie.

Fluorescence u kmene ΣS^h: Standardní kmen ΣS^h jsem použila jako kontrolu autofluorescence. Autofluorescence je u tohoto pokusu zanedbatelná, nejvýraznější je 14 den (viz tab. 1).

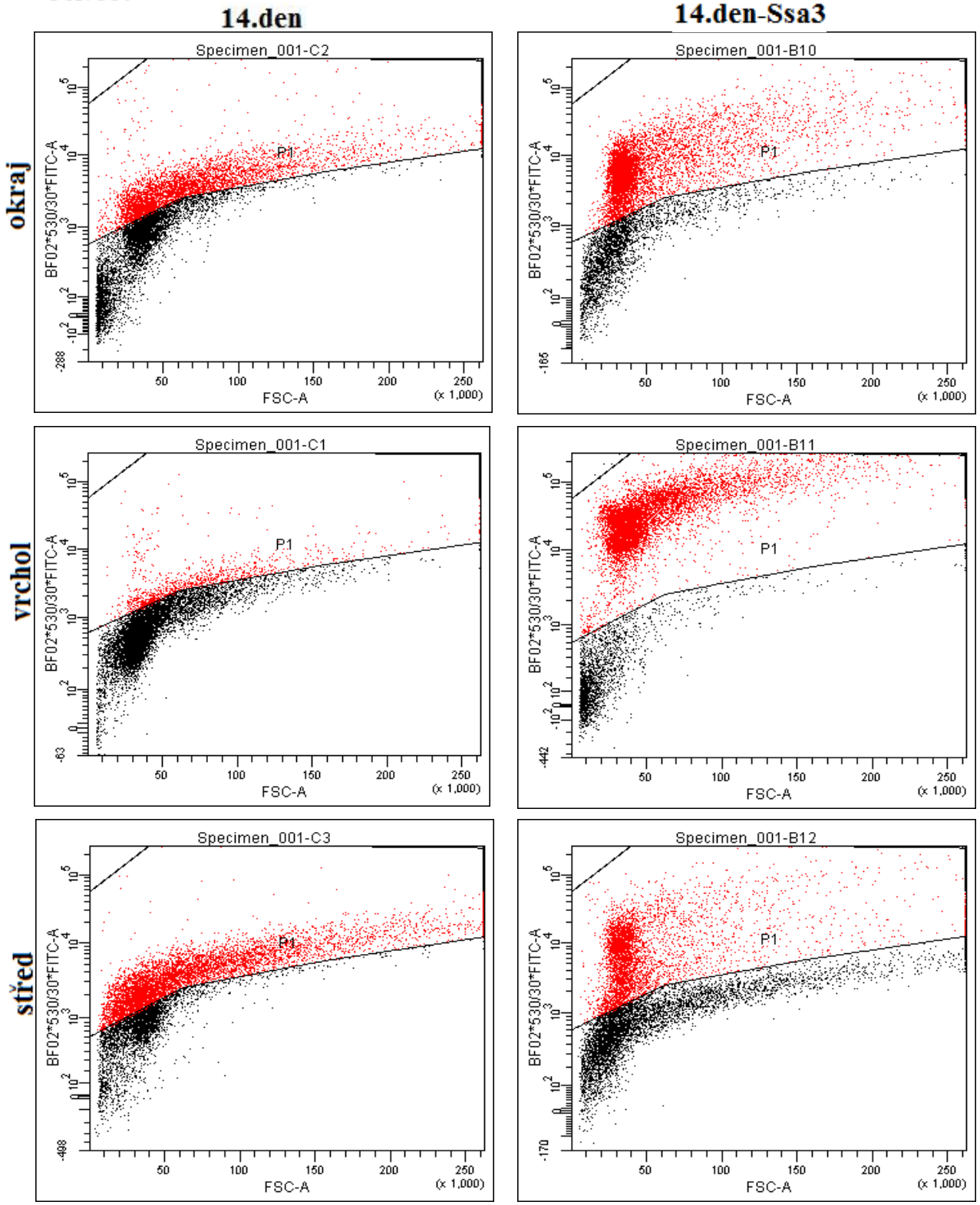
Obr. 38a

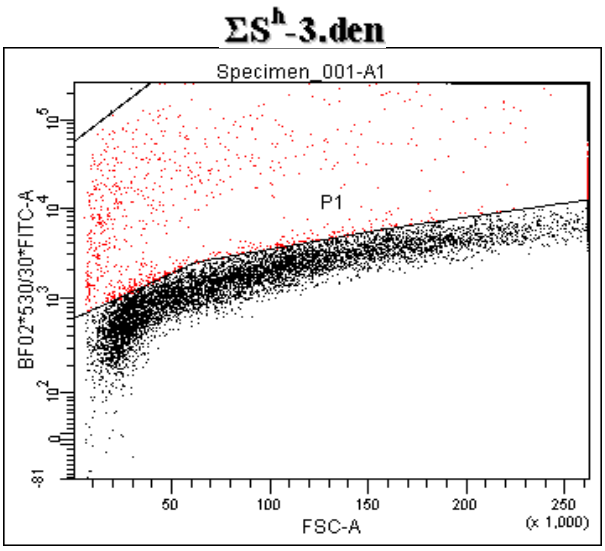

3.den-Gut1
3.den-Ssa3
6.den-Gut1
6.den-Ssa3
okraj
vrchol
střed
Specimen_001-A2
Specimen_001-A3
Specimen_001-A7
Specimen_001-A4
Specimen_001-A8
Specimen_001-A5
Specimen_001-A9
Specimen_001-A6
P1
BF02*530/30*FITC-A
FSC-A
(x 1,000)

Obr. 38b

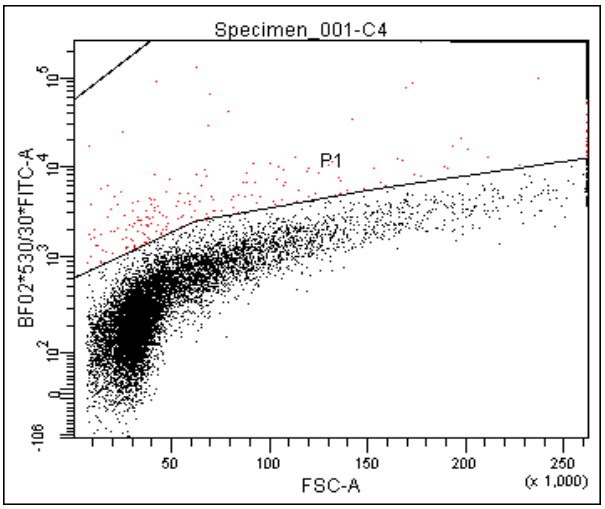

9.den-Gut1
9.den-Ssa3
okraj
vrchol
střed
Specimen_001-B4
Specimen_001-B1
Specimen_001-B5
Specimen_001-B2
Specimen_001-B6
Specimen_001-B3
P1
BF02*530/30*FITC-A
FSC-A
(x 1,000)

Obr. 38c

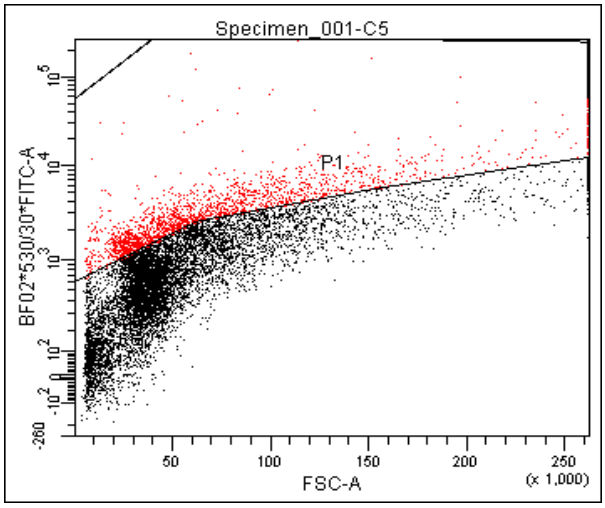

14.den
14.den-Ssa3
okraj
vrchol
střed
Specimen_001-C2
Specimen_001-B10
Specimen_001-C1
Specimen_001-B11
Specimen_001-C3
Specimen_001-B12
P1
BF02*530/30*FITC-A
FSC-A
(x 1,000)



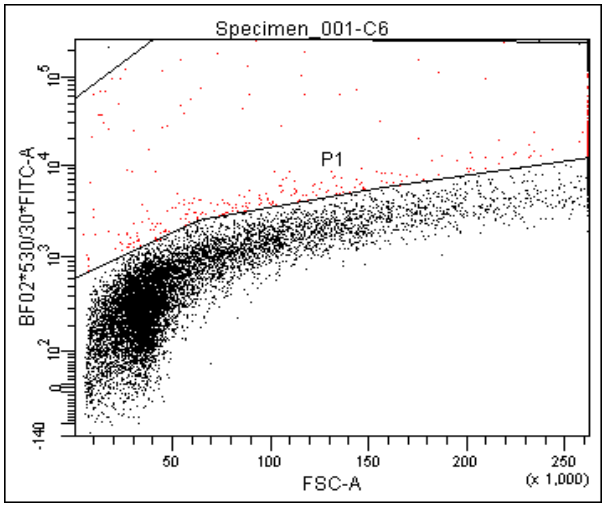
okraj



vrchol



střed



Tab. 1

dny	ΣS^h
3. den	14%
6. den-okraj	4%
6. den-vrchol	2%
6. den-střed	5%
9. den-okraj	2%
9. den-vrchol	4%
9. den-střed	3%
14. den-okraj	2%
14. den-vrchol	19%
14. den-střed	3%

4.2.7 Výskyt apoptotických znaků v monokoloniích

Vzhledem k tomu, že v této práci sleduji vývoj a stárnutí kolonií, přirozeně mě také zajímalo, zda v průběhu sledovaného růstu kolonií dochází k úmrtí buněk, nebo k výskytu některých apoptotických znaků, jako například reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). K těmto experimentům jsem použila kmen *Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h (neoznačený GFP).

4.2.7.1 Výskyt mrtvých buněk v kvasinkové kolonii

Pro stanovení výskytu mrtvých buněk u kvasinkového kmene *S. cerevisiae* ΣS^h, jsem použila barvení bromkresolovým purpurem (BKP). Cílem tohoto experimentu bylo zjistit výskyt mrtvých buněk v kolonii.

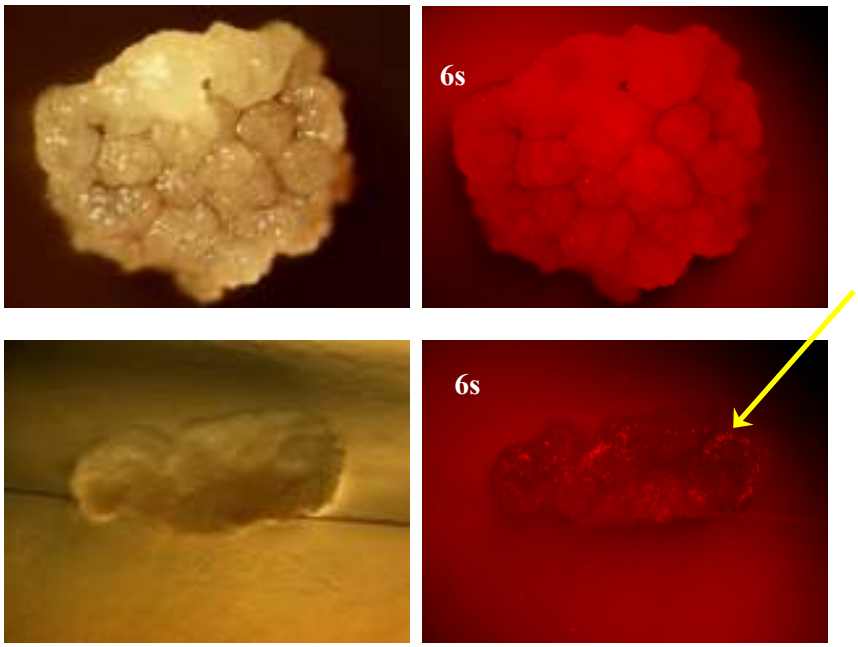
Při přípravě a výsevu kolonií jsem postupovala zcela obdobně jako při sledování standardních kolonií. Výsev jsem ale prováděla na kultivační misky s GMeB médiem obsahujícím etanol a BKP a jako kontrolu jsem použila misky s GMe médiem s etanolem bez BKP. Práce s fluorescenčním mikroskopem byla obdobná, jako když jsem odběry buněk prováděla z definovaných oblastí kolonie. Při práci s fluorescenční lupou jsem nepoužívala GFP filtr, ale filtr pro červené světlo TXR. S koloniemi jsem pracovala až od třetího dne stáří kolonie.

U tohoto experimentu jsem do čtrnáctého dne růstu kolonie výskyt mrtvých buněk neprokázala. Přesto uvádím fotografie z vybraných dnů - 3., 6., 9. a 14. dne. 3. den se výsledky z fluorescenční lupy a z fluorescenčního mikroskopu neshodují. Fotografie z mikroskopu neprokazují výskyt mrtvých buněk. Přesto ale kolonie rostoucí na médiu s BKP svítí na fotografiích z lupy výrazněji oproti koloniím rostoucím na médiu bez BKP (Obr. 39a). Na průřezu kolonií je také vidět, že některé z částí kolonie svítí výrazněji (viz šipka Obr. 39a). V následujících dnech jsem se ale přesvědčila o tom, že se nejedná o mrtvé buňky, které v kolonii svítí. 6. den, podle fotografií z lupy, kolonie svítí výrazněji. Fotografie z mikroskopu ale výskyt mrtvých buněk nepotvrdil. Barevný indikátor BKP pravděpodobně reagoval s povrchem buněčné stěny a u všech pozorovaných buněk vytváří dojem lokalizace v membráně. U buněk, odebíraných z okraje, vrcholu i středu spodní části

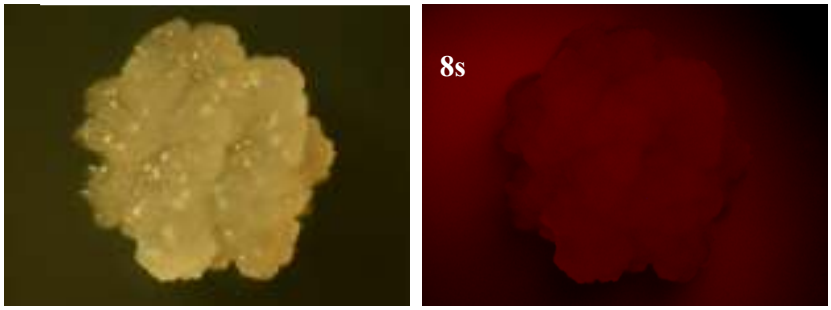
kolonie svítí celý povrch buněk. Buňky rostoucí v koloniích na GMe médiu bez BKP tento efekt nevykazují (Obr. 39b). Stejné výsledky jsem zaznamenala i v dalších dnech, pouze s tím rozdílem, že kolonie svítily ještě intenzivněji (Obr. 39c,d). Na základě těchto výsledků jsem se rozhodla experiment zopakovat s kmenem ΣS^h s deletovaným *FLO11*. U tohoto deletovaného kmene jsem BKP na povrchu buněk neprokázala a fotografie z mikroskopu jsou téměř srovnatelné s kmenem ΣS^h rostoucím na médiu bez BKP. Pro představu uvádím fotografie ze 6. dne růstu kmene ΣS^h Δ*FLO11* (Obr. 39e). Pro potvrzení, že mrtvé buňky se v koloniích do 14. dne růstu nevyskytují, jsem použila také metody průtokové cytometrie. Místo BKP barevného indikátoru jsem použila propidium jodid (PI). Jako kontrolu jsem použila kvasinkový kmen BY4742α. Pomocí průtokové cytometrie jsem výskyt mrtvých buněk rovněž neprokázala.

Obr. 39a

3. den-ΣS^h-s BKP

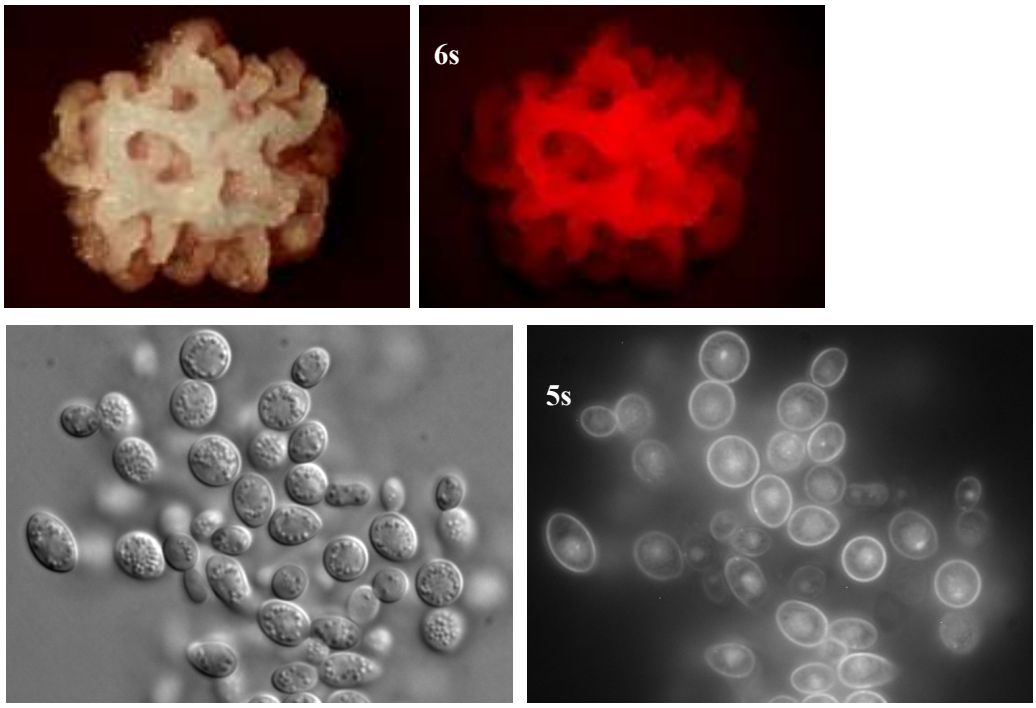


3. den-ΣS^h-bez BKP

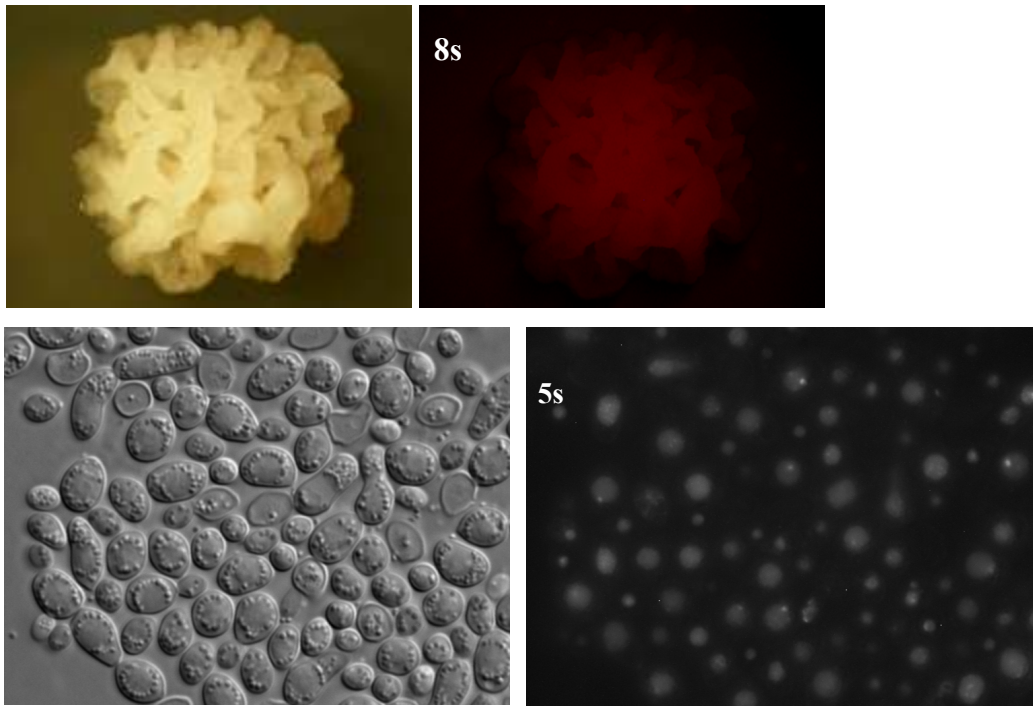


Obr. 39b

6. den-ΣS^{h}-s BKP

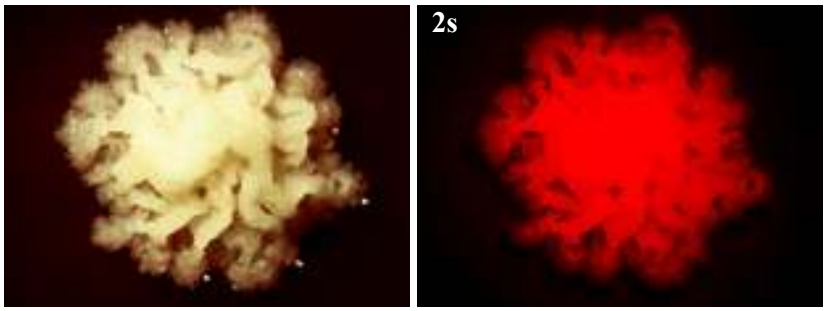


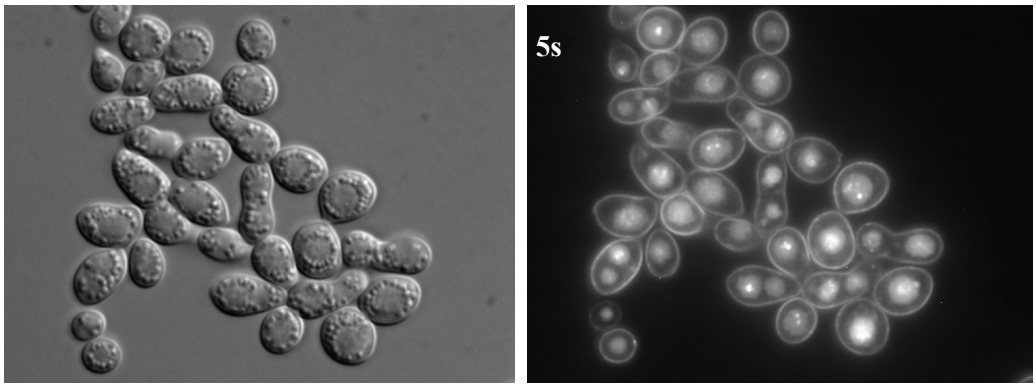
6. den-ΣS^{h}-bez BKP



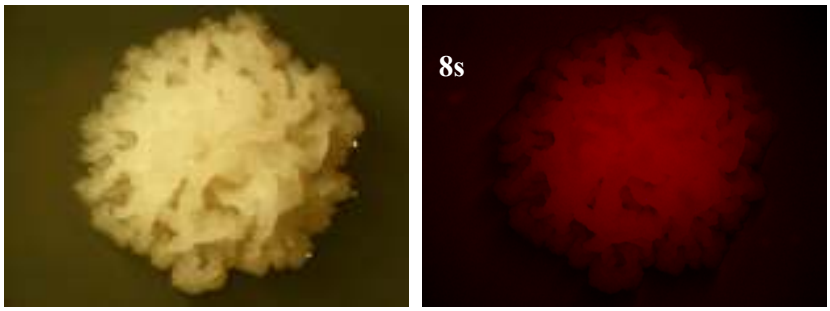
Obr. 39c

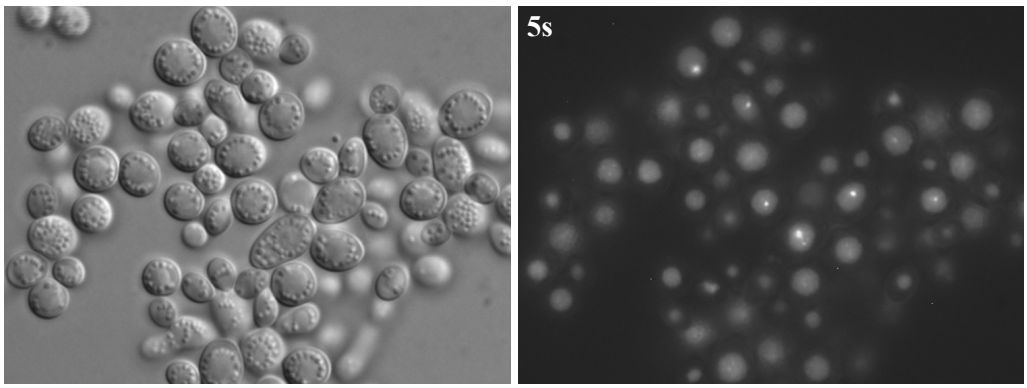
9.den-ΣS^{h}-s BKP





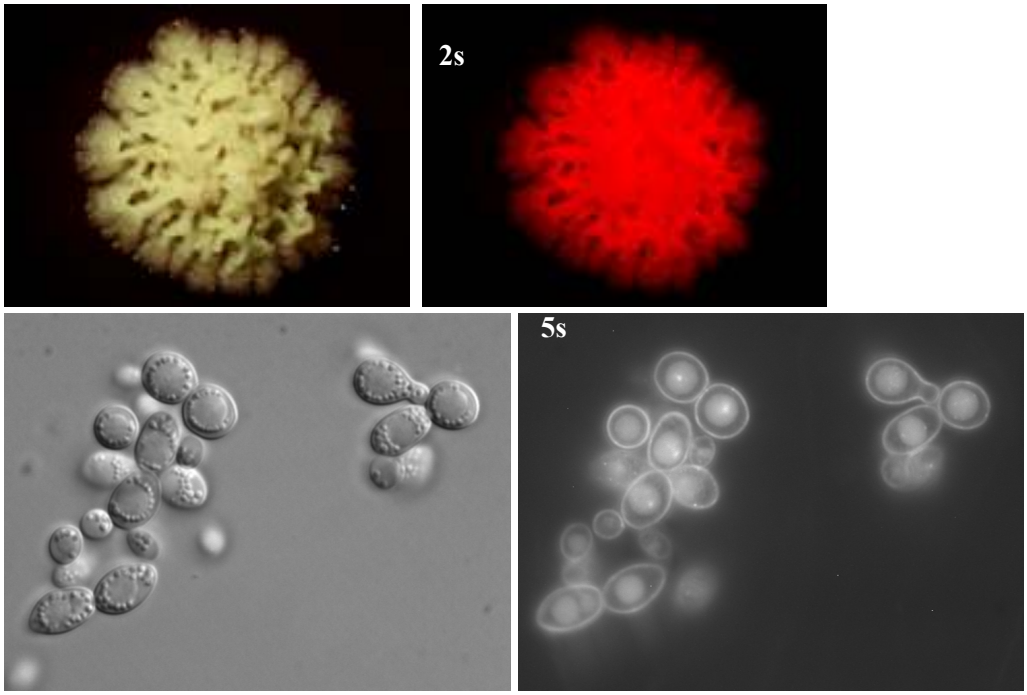
9.den-ΣS^{h}-bez BKP



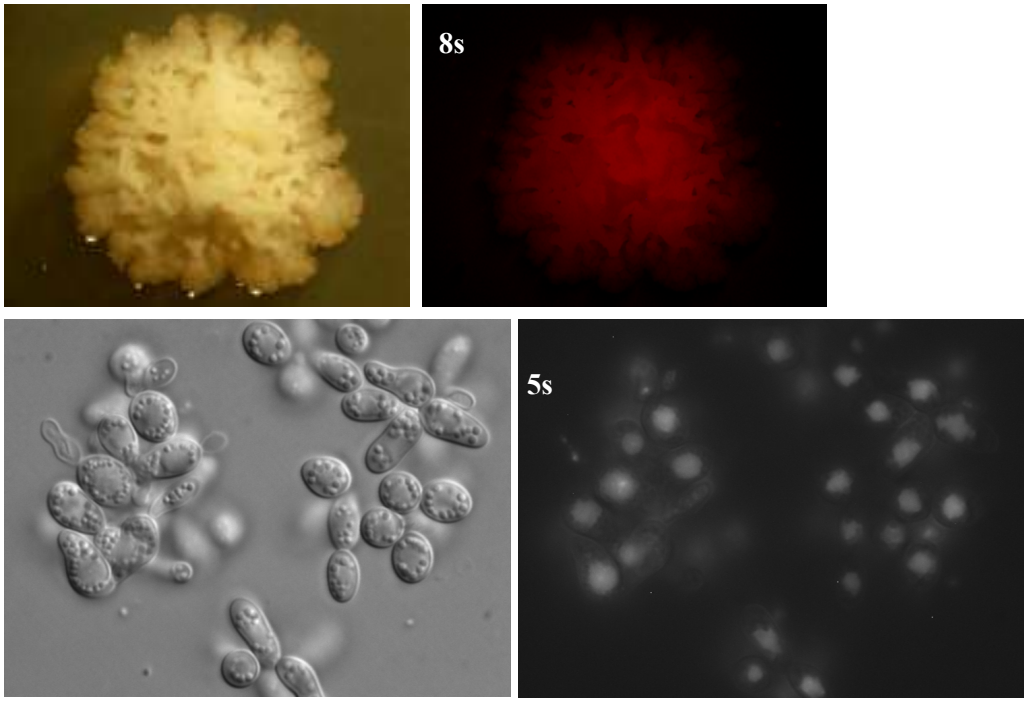


Obr. 39d

14.den-ΣS^{h}-s BKP

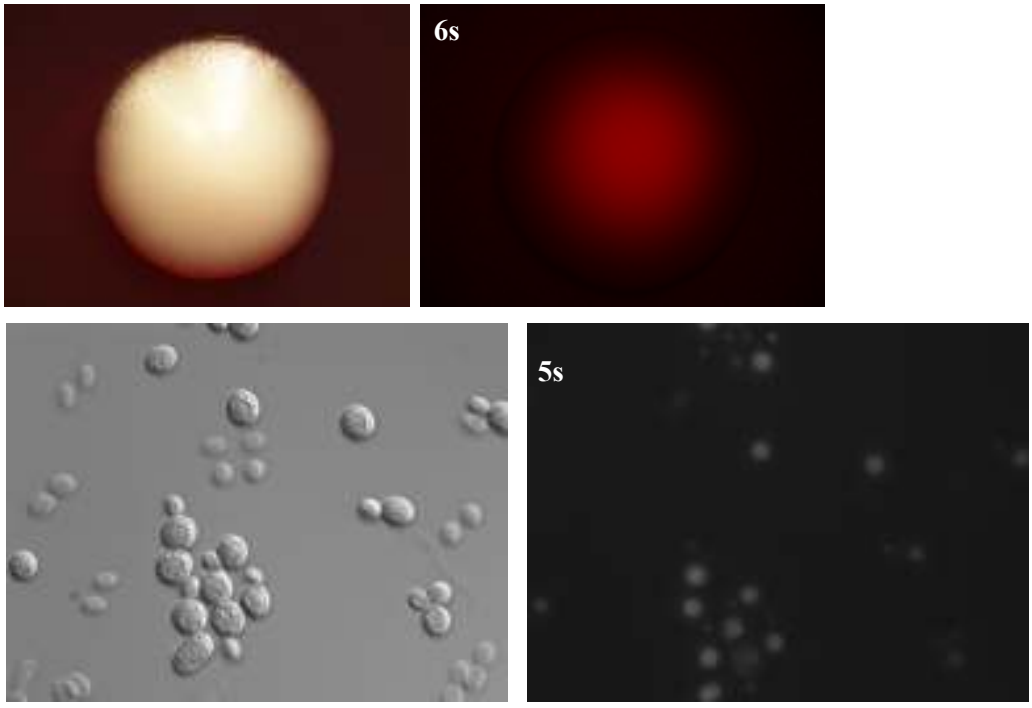


14.den-ΣS^{h}-bez BKP

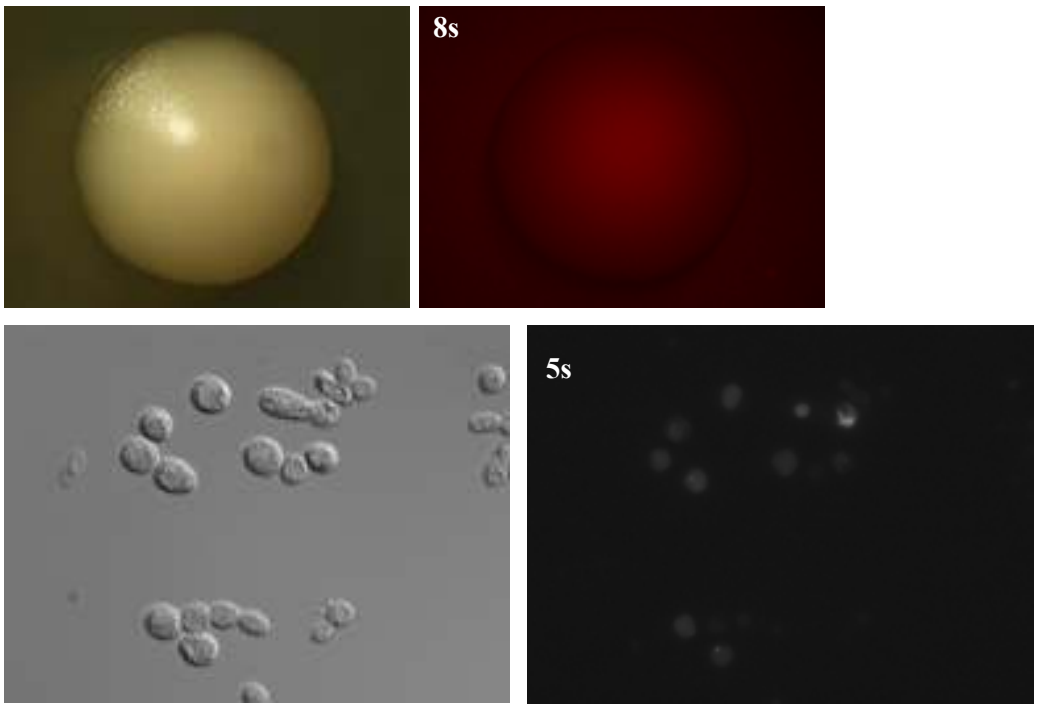


Obr. 39e

6. den-ΣS^{h}Δ*FLO11*-s BKP



6. den-ΣS^{h}Δ*FLO11*-bez BKP



4.2.7.2 Výskyt radikálů oxidativního stresu (ROS)

Pro stanovení hlavních oxidantů, vyvolávajících oxidativní stres v buňkách, jsem použila barvení dihydroethidiem (DHE), který se stává fluorescenčním při výskytu ROS. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit výskyt ROS v buňkách z různých částí kolonií kmene *Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h (neoznačeného GFP).

Při přípravě a výsevu kolonií *S. cerevisiae* ΣS^h jsem postupovala obdobně, jako při sledování standardních kolonií. Výsev jsem prováděla na kultivační misky s GM médiem s 3% glycerolem. Pro práci s fluorescenčním mikroskopem jsem buňky odebírala z definovaných částí kolonie, z vrcholu a středu spodní části kolonie. Kolonie byly 21 dnů staré a buňky byly fotografované při viditelném světle podle Nomarského se 100 násobným zvětšením s imerzí, ale také se zvětšením 25 násobným pro hodnocení frekvence výskytu ROS. Pro fluorescenci jsem pracovala s filtrem pro červené světlo. Při 25 násobném zvětšení jsem hodnotila 10 zorných polí pro buňky odebírané z vrcholu kolonie a 10 zorných polí pro buňky odebírané z okraje kolonie, a to jak ve viditelném světle, tak s fluorescencí. Zjistila jsem tak procentuální zastoupení buněk s ROS.

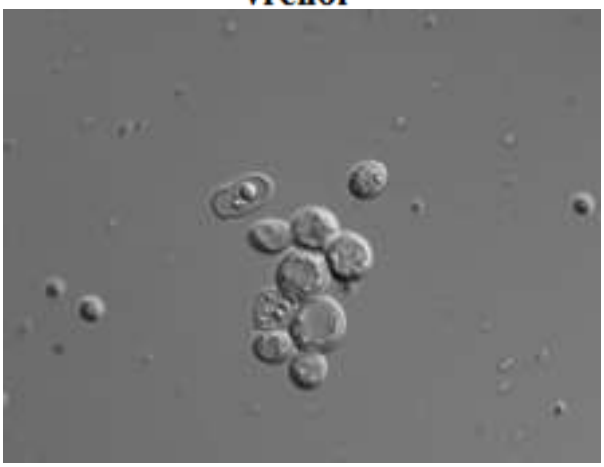
ΣS^h:

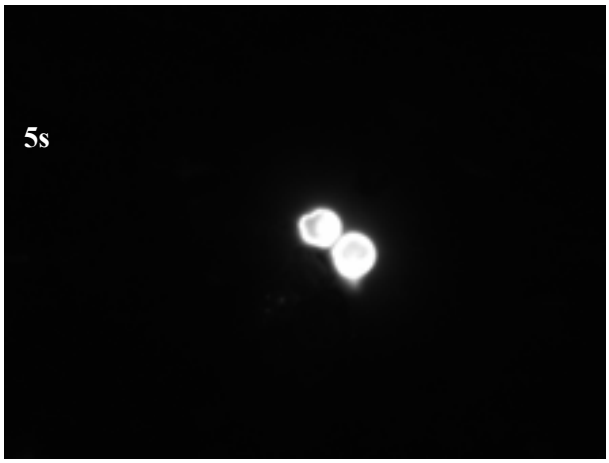
U buněk odebíraných z vrcholu kolonie jsem vyhodnotila celkem 6724 buněk, z nich svítilo 545, to znamená, že přítomnost kyslíkových radikálů byla prokázána u 8% buněk. U buněk odebíraných ze středu spodní části kolonie jsem hodnotila 6283 buněk, z nich svítilo 323, takže přítomnost kyslíkových radikálů byla prokázána u 5% buněk. Na obvodu jsem buňky nehodnotila, předpokládala jsem, že zde svítících buněk bude minimum. Pro ukázku uvádím fotografii při 25 násobném zvětšení, a také fotografii buněk při 100 násobném zvětšení (Obr. 40). Z těchto výsledků se zdá, že buňky, které jsou lokalizované na vrcholu kolonie, obsahují o něco více buněk s ROS, nežli buňky na středu spodní části kolonie. U morfologicky mladších buněk jsem výskyt ROS nepozorovala.

Obr. 40

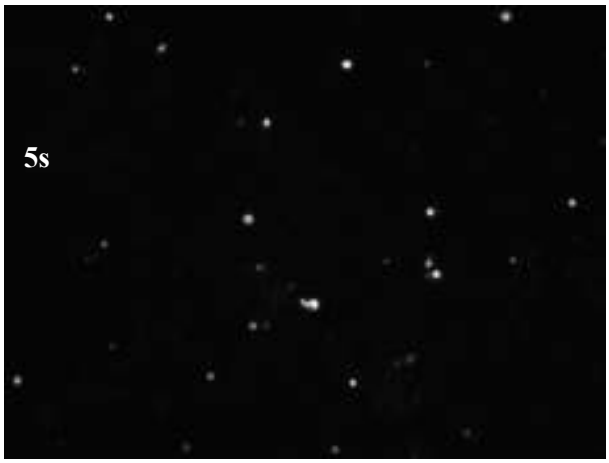
21. den-ΣS^h

vrchol





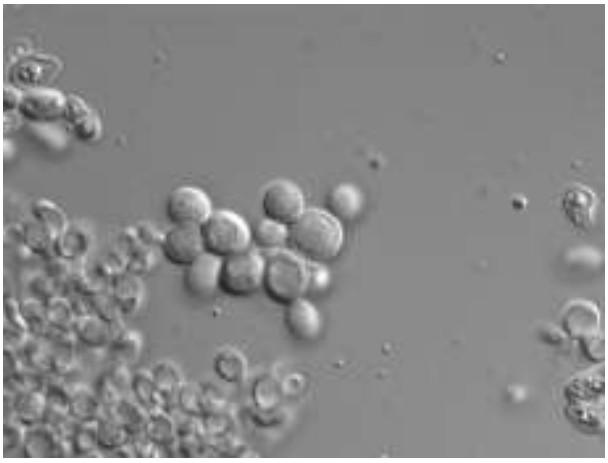




střed









4.2.8 Sledování exprese genů v obřích koloniích

Kvasinková kolonie je mnohobuněčná struktura, kde v průběhu růstu kolonie, jednotlivé buňky přirůstají, a kolonie se zvětšuje. U klasických kolonií se jedná o růst kolonie z jedné mateřské buňky, kdežto u obřích kolonií se jedná o růst z kapky suspenze buněk. V naší pracovní skupině se mnoho experimentů realizuje právě na obřích koloniích. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda se námi sledované geny exprimují u obřích kolonií podobně jako u standardních kolonií.

Postupovala jsem zcela obdobně jako při sledování standardních kolonií, pouze se dvěma rozdíly: na misku jsem nakapala suspenzi buněk (1 makrokolonie / misku) a s obřími koloniemi jsem pracovala již od prvního dne stáří kolonií.

Exprese genu *GUT1*: Výsledky u Gut1 proteinu, jsou srovnatelné s předchozími experimenty (4. 4., 4. 5.). Už 1. den, se Gut1 protein v buňkách nachází. Vidíme lokalizaci Gut1 proteinu v cytoplazmě. 1. den ještě nebyl prováděn cílený odběr buněk v obřích koloniích (Obr. 41a). 2. den je Gut1 proteinu více. Nejvýrazněji Gut1 protein svítí v buňkách odebíraných z vrcholu obří kolonie, kde se již dostává do vakuol a v buňkách odebíraných z okraje. V buňkách ze středu spodní části kolonie je lokalizován v cytoplazmě. U těchto buněk je vidět i rozdílná morfologie (Obr. 41a). 3. den je Gut1 protein v buňkách přítomen a celá kolonie výrazně svítí, stejně tak i v průřezu kolonií. Z fluorescenčního mikroskopu je možno nejvíce Gut1 proteinu pozorovat v buňkách odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie. Buňky z vrcholu kolonie svítí podstatně méně a Gut1 protein je lokalizován ve vakuolách. Opět je vidět rozdílná morfologie buněk (Obr. 41b). 6. den je Gut1 protein v buňkách stále dobře patrný, což potvrzují i fotografie z fluorescenčního mikroskopu. Zde je vidět, že Gut1 protein, v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie a částečně i z okraje kolonie, je lokalizován ve vakuolách a u buněk ze středu spodní části kolonie je lokalizován stále v cytoplazmě (Obr. 41b). Od 9. dne jsou fotografie z fluorescenční lupy téměř srovnatelné s autofluorescencí kmene neoznačeného GFP - ΣS^h. Na fotografiích z mikroskopu je jasně vidět, že protein Gut1 se dostal do vakuol u všech odebíraných buněk (Obr. 41c). Z těchto výsledků lze tedy usuzovat, že starší buňky jsou lokalizované na vrcholu kolonie, mladší na okraji a nejmladší na středu spodní části kolonie, což také potvrzuje morfologie těchto buněk.

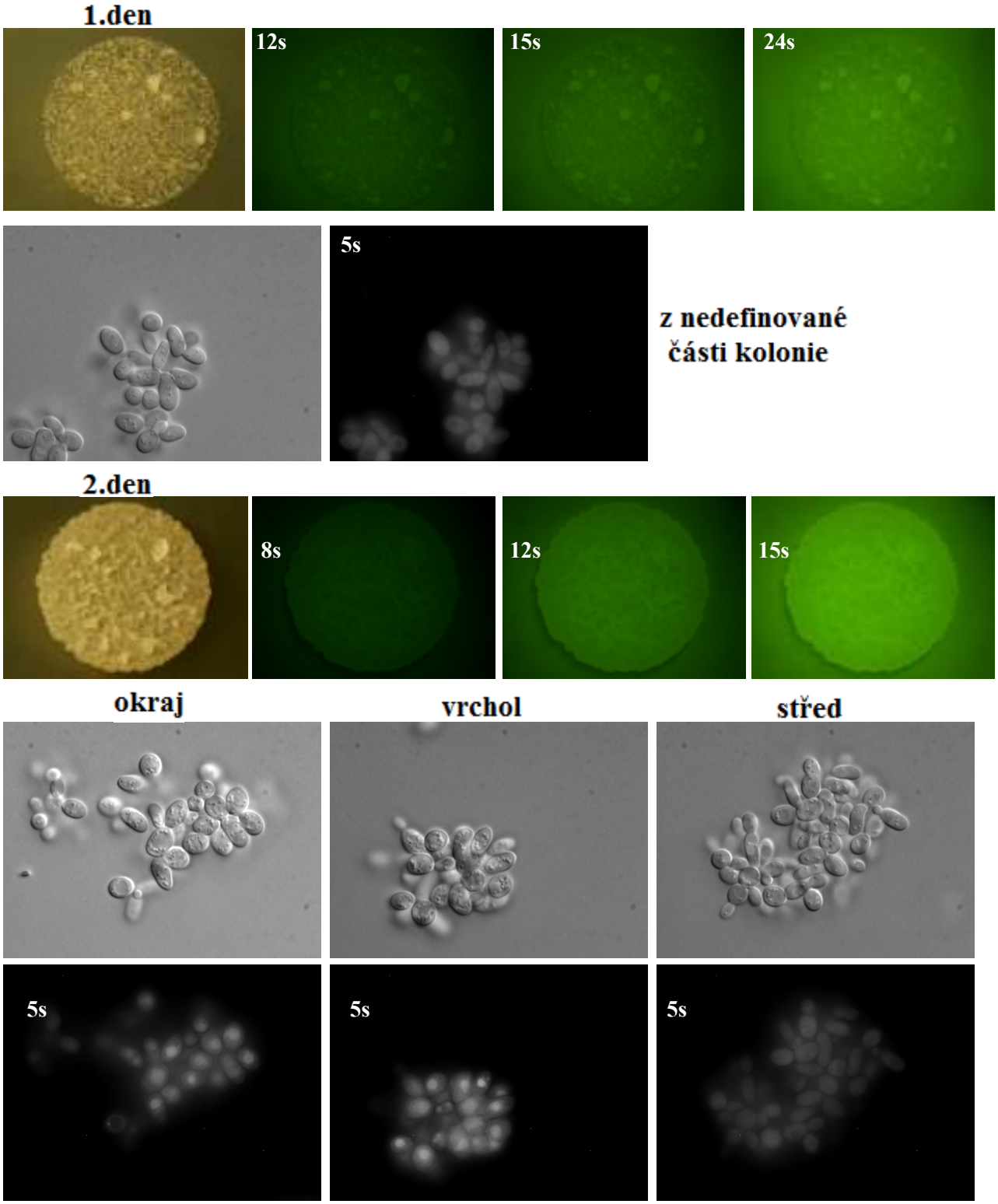
Exprese genu *SMI1*: Výsledky u Smi1 proteinu jsou také srovnatelné s předchozími experimenty (4. 4., 4. 5.). Proteinu Smi1, ve srovnání s Gut1 proteinem, je v buňkách o něco méně, ale průběh exprese je obdobný. Od 1. dne se Smi1 protein v buňkách nachází. Nenachází se v cytoplazmě, jako u Gut1, ale svítí ve formě čárek, pravděpodobně v organelách (Obr. 42a). 2. den je Smi1 proteinu více, jak je vidět na fotografiích z lupy i z mikroskopu. Nejintenzivněji protein Smi1 svítí v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie (Obr. 42a). 3. den je Smi1 protein v koloniích dobře patrný, celá kolonie svítí, stejně tak i v průřezu kolonií. Smi1 protein u buněk odebíraných z okraje a ze středu spodní části kolonie, svítí v celé buňce ve formě čárek. U buněk z vrcholu kolonie, je Smi1 protein lokalizován ve vakuolách. Opět je vidět rozdílná morfologie buněk (Obr. 42b). 6. den, kolonie svítí výrazně méně, ale v buňkách je Smi1 protein stále patrný. Stejně jako 3. den, v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie, je protein lokalizován ve vakuolách a u buněk ze středu spodní části kolonie svítí v celé buňce (Obr. 42b). Od 9. dne je proteinu v buňkách podstatně méně, ale pouze fotografie z fluorescenční lupy jsou téměř srovnatelné s autofluorescencí kmene neoznačeného GFP - ΣS^h (Obr. 42c). Z těchto výsledků také vyplývá, že starší buňky jsou lokalizované na vrcholu kolonie, mladší na okraji a na středu spodní části kolonie, což také potvrzuje morfologie těchto buněk.

Exprese genu *SSA3*: Výsledky u Ssa3 proteinu jsou také srovnatelné s předchozími experimenty (4. 4., 4. 5). Fotografie z 1. a 2. dne neuvádím, indukce Ssa3 proteinu se v těchto dnech neprojevila. 3. den se Ssa3 protein v buňkách nachází, jak je vidět na fotografiích z fluorescenční lupy a z fluorescenčního mikroskopu. Neintenzivněji Ssa3 protein svítí v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie a je lokalizován v cytoplazmě (Obr. 43a). Od 7. dne je přítomnost proteinu velmi výrazná, a to jak v koloniích, tak v jednotlivých buňkách. Na řezu kolonií je dobře vidět, že svítí buňky lokalizované na vrcholu kolonie (viz šipky). To potvrzují i výsledky, získané z fluorescenčního mikroskopu, kdy nejvýrazněji svítí buňky odebírané z vrcholu kolonie, kdežto u odběru z okraje středu kolonie svítí vždy jen část buněk (Obr. 43a). 9. den je přítomnost proteinu ještě mnohem silnější, na řezu kolonií opět svítí buňky, které se nacházejí na vrcholu kolonie (viz šipky). U fotografií z fluorescenčního mikroskopu, je Ssa3 protein v buňkách velmi intenzivní, nejvíce opět u většiny buněk z vrcholu kolonie (Obr. 43b). Tyto výsledky také potvrzují, že starší buňky jsou lokalizované na vrcholu kolonie, mladší na okraji a na středu spodní části kolonie.

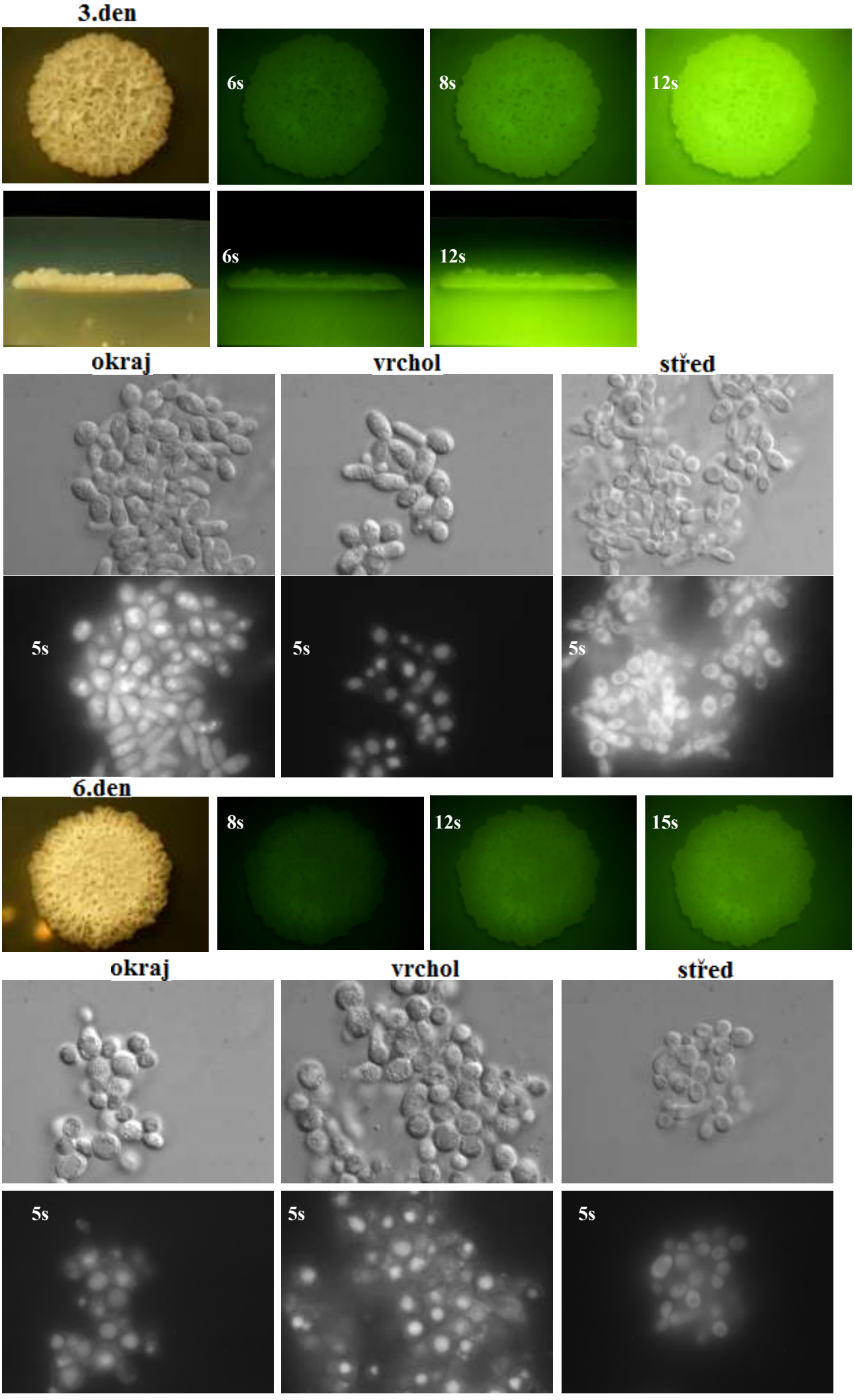
Exprese genu *HSP30*: Výsledky u Hsp30 proteinu, získané z fotografií z fluorescenční lupy nejsou zcela srovnatelné s předchozími experimenty. Fotografie z 1. a 2. dne neuvádím, indukce Hsp30 proteinu se v těchto dnech neprojevila. Od 3. dne se podle fotografií z fluorescenční lupy protein Hsp30 v obřích koloniích nachází. Z fotografií z mikroskopu nejvýrazněji svítí buňky odebírané z okraje a ze střední části kolonie, kde je Hsp30 protein lokalizován v plazmatické membráně (Obr. 44a). Svítí ovšem jen část buněk. 7. den, podle fotografií z fluorescenčního mikroskopu, se Hsp30 protein nachází ve všech odebíraných buňkách, na okraji kolonie, na vrcholu i na středu spodní části kolonie. Fotografie z fluorescenční lupy to ale zcela nepotvrzují (Obr. 44a). 9. den je množství proteinu Hsp30 podle fotografií z fluorescenční lupy srovnatelné s autofluorescencí ΣS^h, to se ale neshoduje s fotografiemi z fluorescenčního mikroskopu. Zde je dobře vidět, že v buňkách odebíraných z vrcholu kolonie je Hsp30 protein lokalizován ve vakuolách a u buněk odebíraných z okraje a střední části kolonie je stále v plasmatické membráně (Obr. 44b). U proteinu Hsp30 bylo po všechny dny kultivace typické, že nesvítily všechny nebo většina buněk, ale jen část buněk. Lokalizace fluorescence do vrchní vrstvy obří kolonie u tohoto kmene pozorována nebyla.

Fluorescence u kmene ΣS^h: Jako kontrolu autofluorescence jsem opět použila standardní kmen ΣS^h. Srovnání autofluorescence standardního kmene ΣS^h s kmeny značenými GFP uvádím jen na fotografiích z 9. dne.

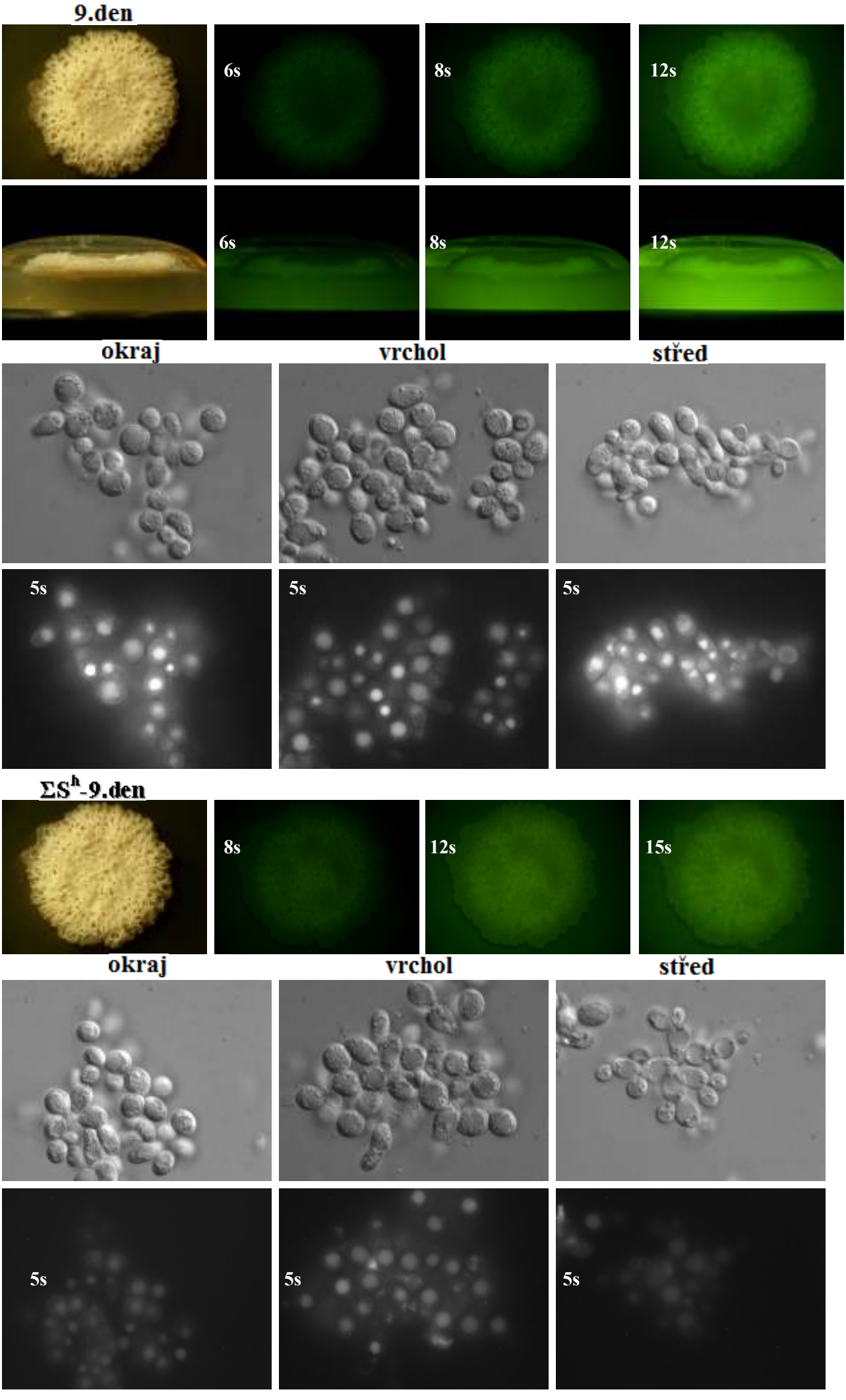
Obr. 41a


1.den
12s
15s
24s
5s
z nedefinované
části kolonie
2.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

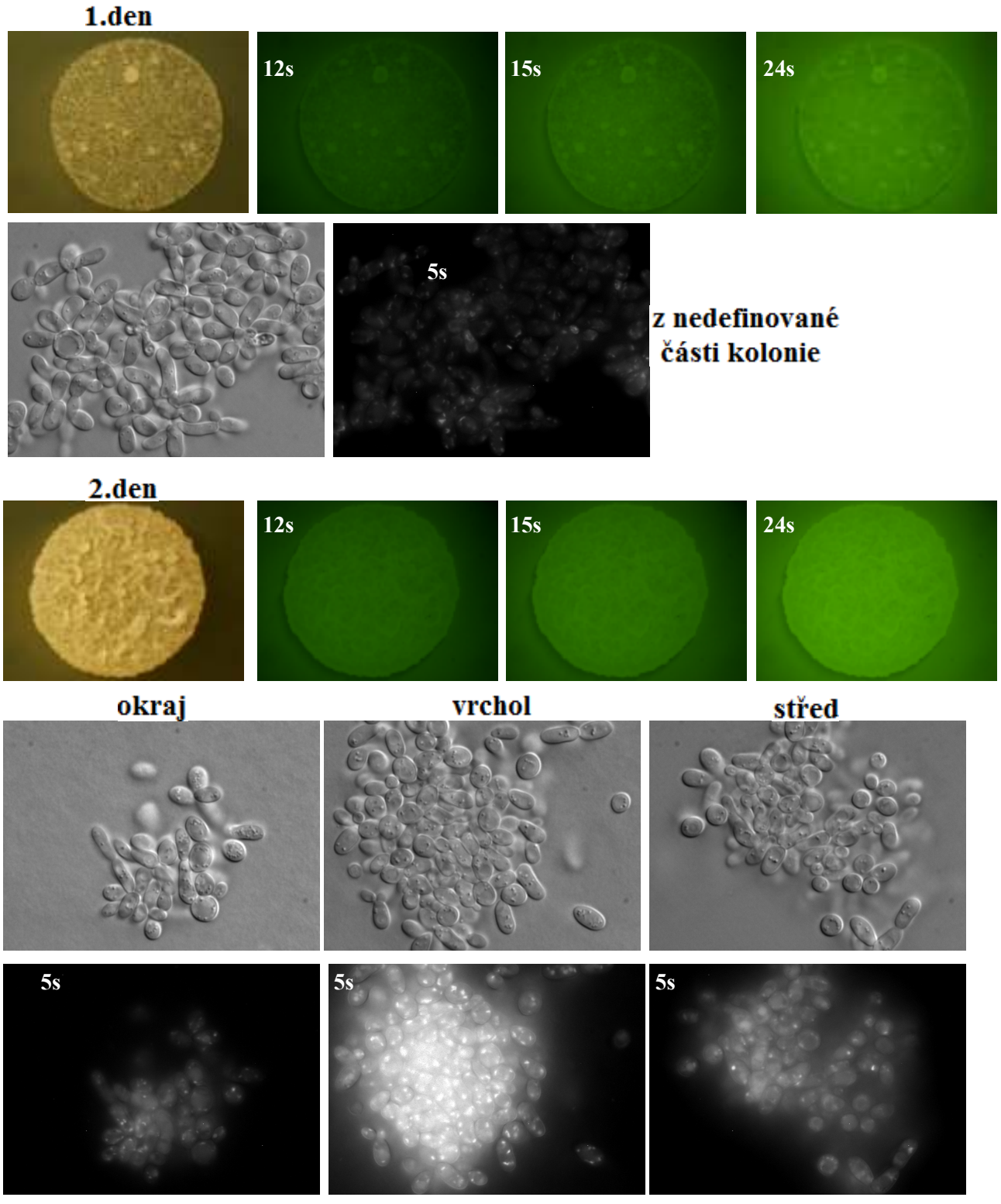
Obr. 41b


3.den
6s
8s
12s
6s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
6.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

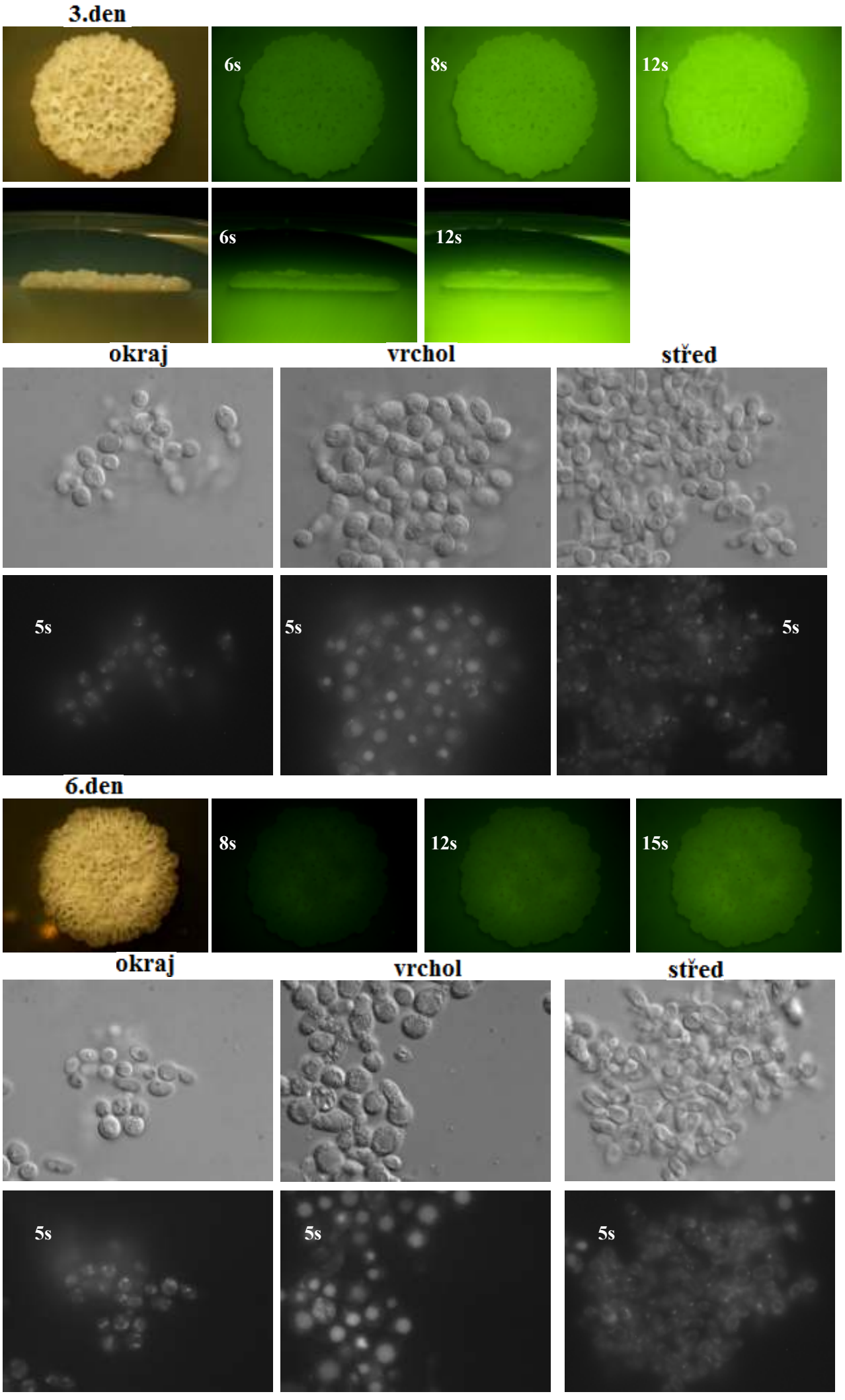
Obr. 41c


9.den
6s
8s
12s
6s
8s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
ΣS^h-9.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

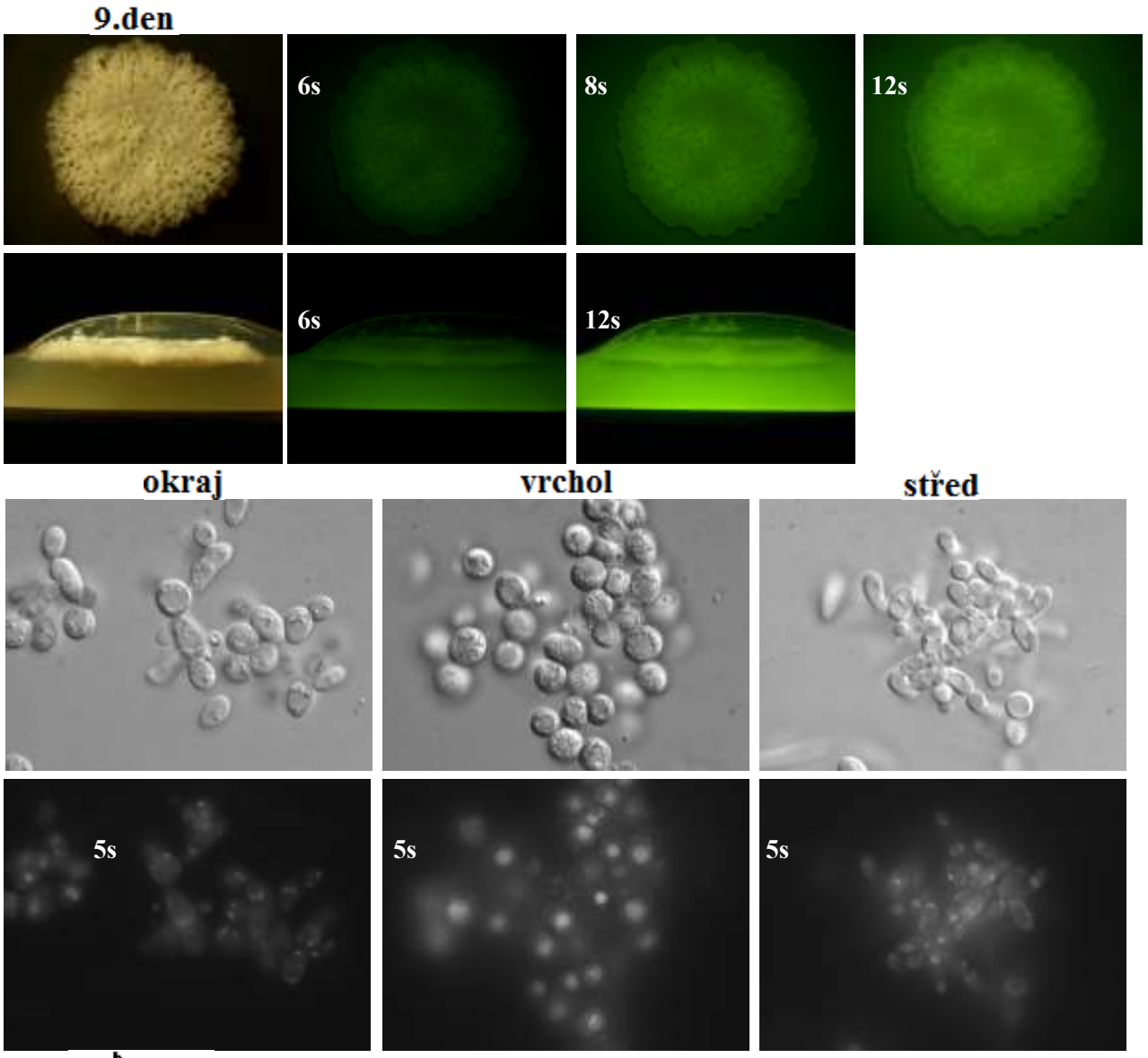
Obr. 42a

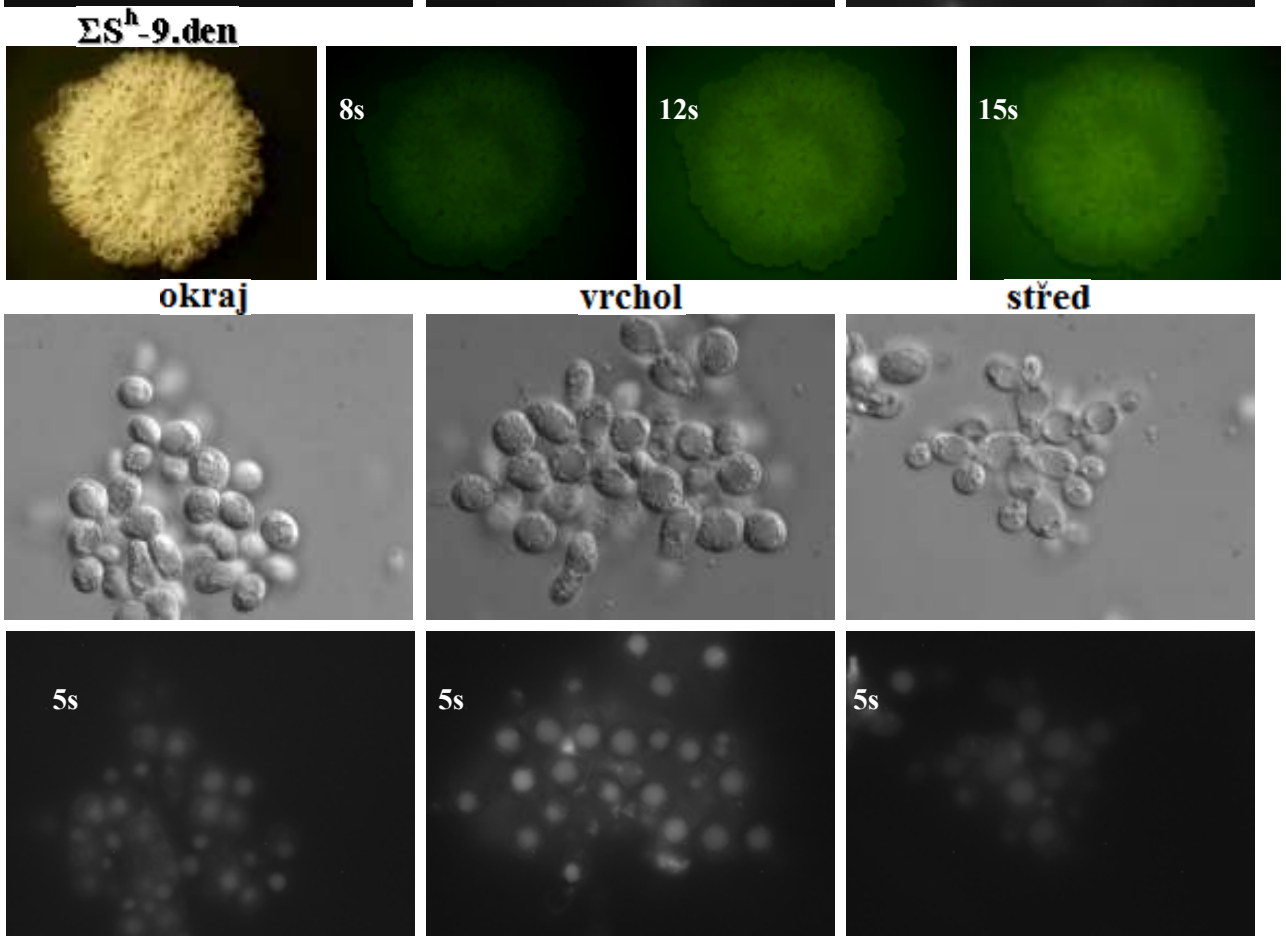

1.den
12s
15s
24s
5s
z nedefinované
části kolonie
2.den
12s
15s
24s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

Obr. 42b

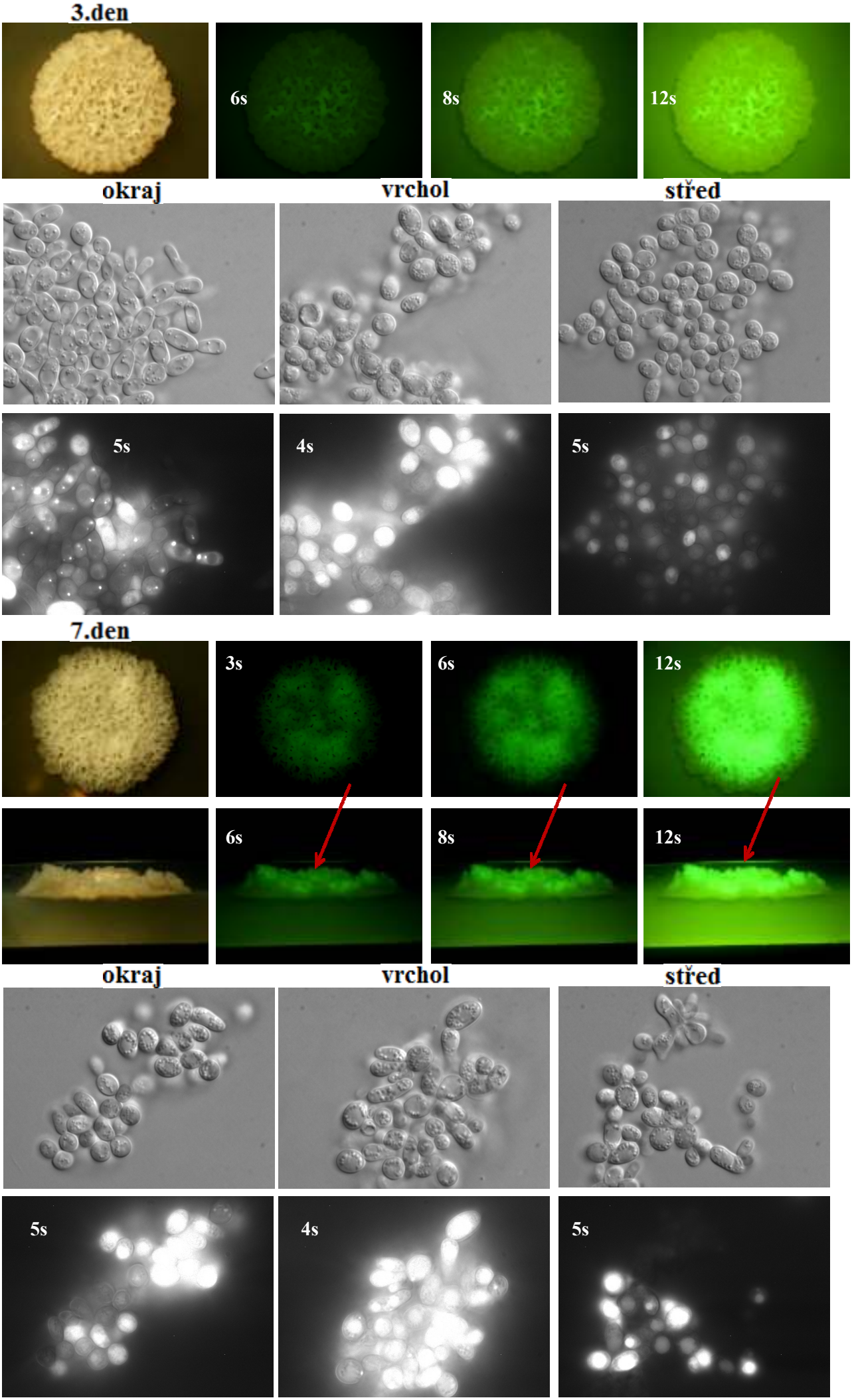

3.den
6s
8s
12s
6s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
6.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

Obr. 42c

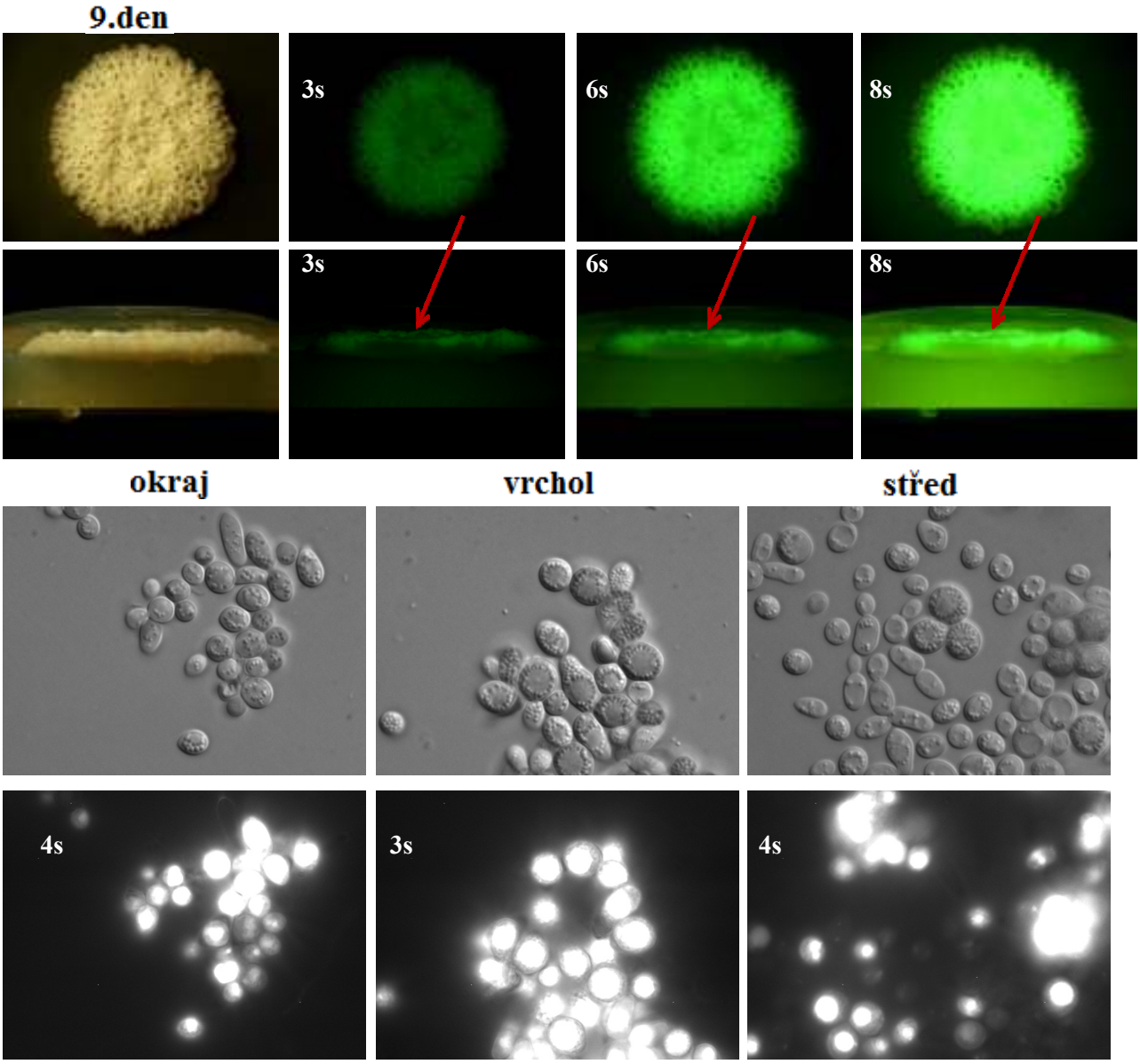

9.den
6s
8s
12s
6s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s


ΣS^h-9.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

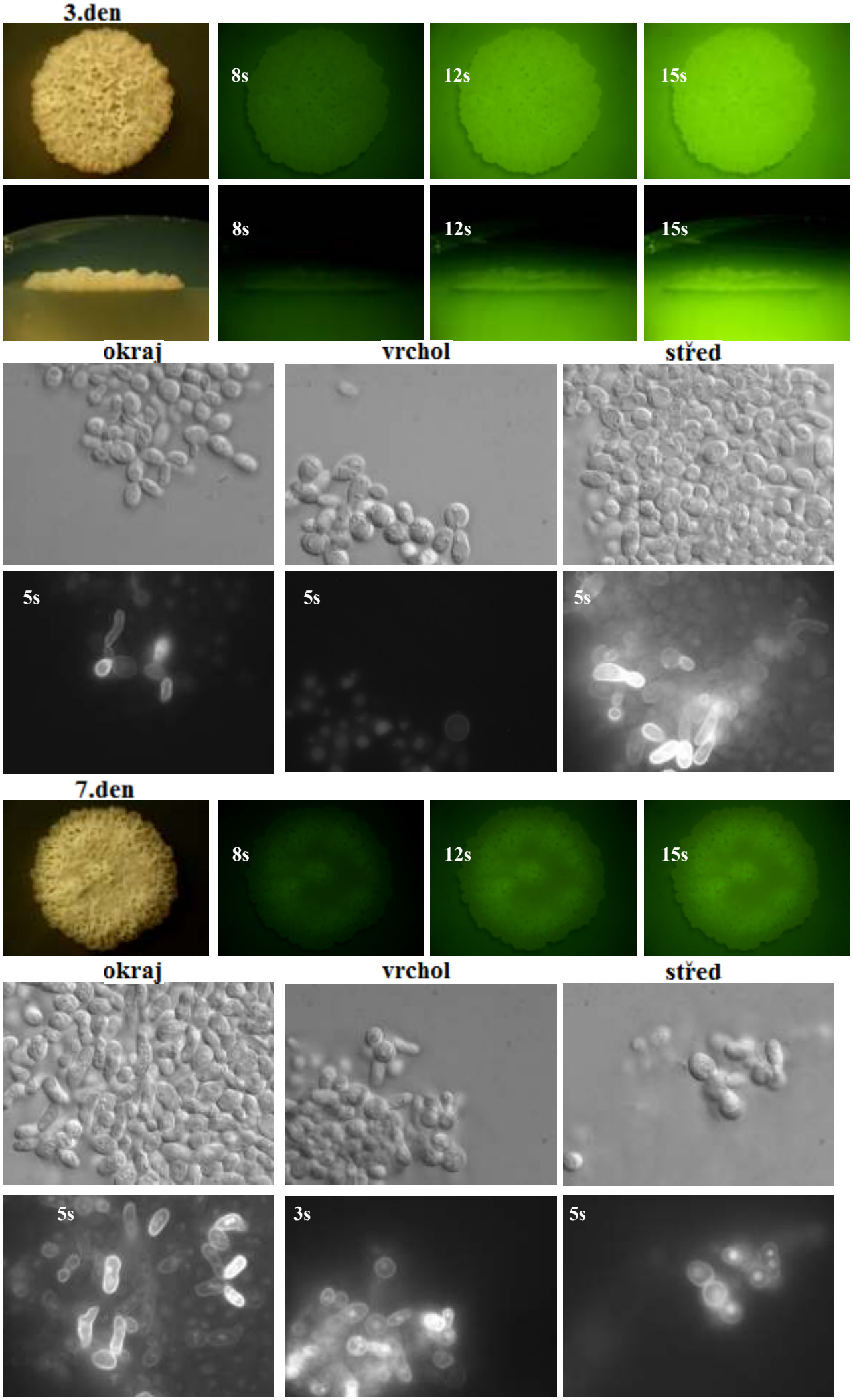
Obr. 43a


3.den
6s
8s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
4s
5s
7.den
3s
6s
12s
6s
8s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
4s
5s

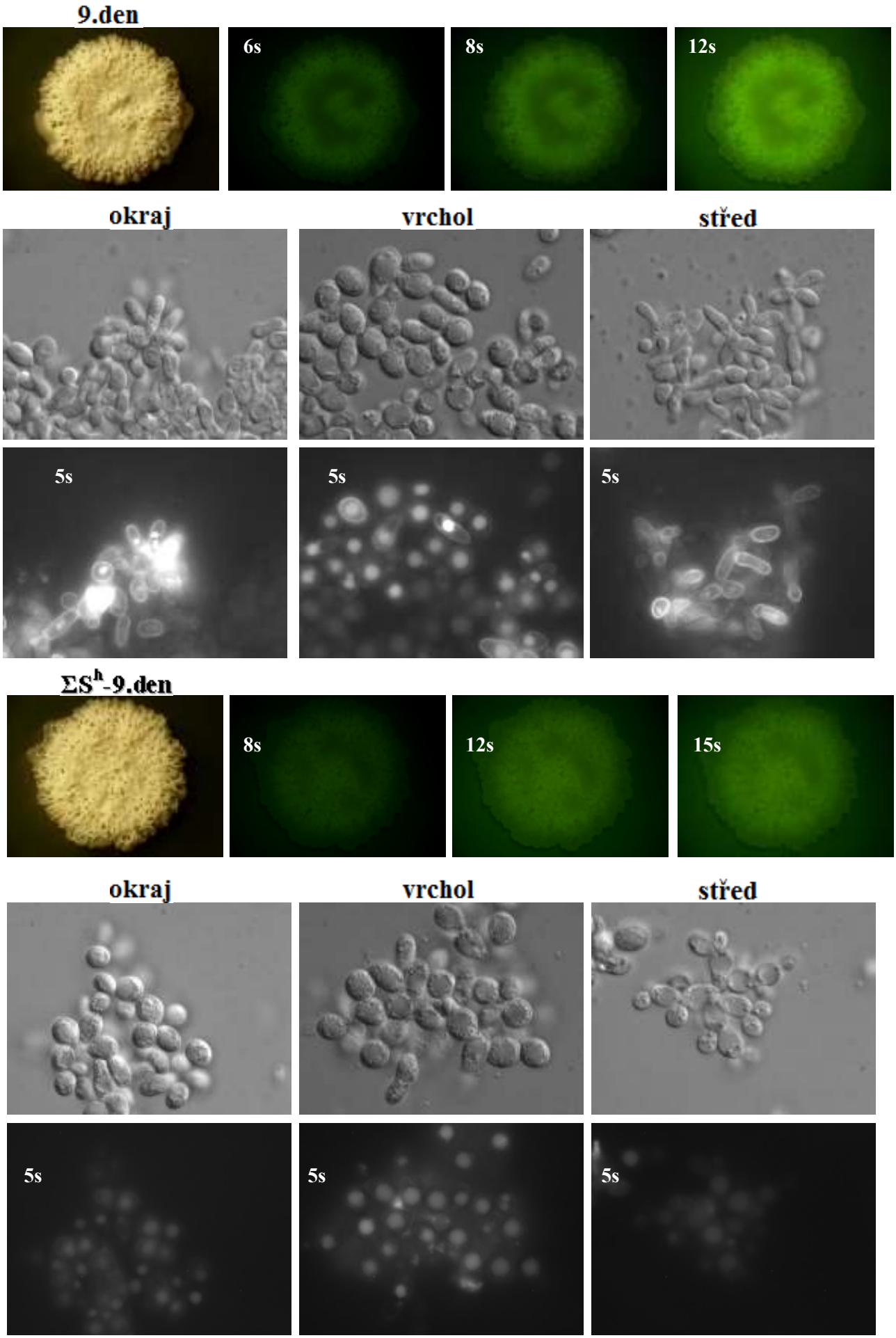
Obr. 43b



Obr. 44a


3.den
8s
12s
15s
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
7.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
3s
5s

Obr. 44b


9.den
6s
8s
12s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s
ΣS^h-9.den
8s
12s
15s
okraj
vrchol
střed
5s
5s
5s

5. DISKUZE

Produkce amoniaku a růst mutantních kmenů *rtg*1Δ, *rtg*2Δ, *rtg3*Δ, *fis1*Δ a *cit2*Δ na GM médiu s pH indikátorem ve srovnání s rodičovským kmenem BY4742α

Sledování alkalizace pevného GM média, obsahující pH indikátor BKP, činností kvasinek, nám umožňuje zachytit změny, kterými kolonie během svého vývoje prochází. Uvolnění amoniaku, kterým je alkalizace média způsobena (PALKOVÁ *et al.* 1997), totiž slouží jako signál stresové situace vyvolané nedostatkem živin. Podrobnější studium přechodu kolonií z acidické do alkalické fáze odhalilo, že přechod je spojen s významnými změnami v genové expresi (PALKOVÁ *et al.* 2002). Buňky jednak mění svůj metabolický program (přepnutí mitochondrií z dosavadního citrátového cyklu na glyoxalátový, aktivace β-oxidace v peroxisomech a biosyntetických drah) a současně u nich v pozdější alkalické fázi dochází k represi stresových genů uplatňujících se při obraně proti nejrůznějším stresům (teplotní, nutriční, oxidativní). Probíhající změny tedy buňkám umožňují přizpůsobit se stresové situaci (VÁCHOVÁ *et al.* 2004).

Pro sledování alkalizace a produkce amoniaku koloniemi kmenů BY4742α s deletovanými geny *rtg*1Δ, *rtg*2Δ, *rtg3*Δ, *fis1*Δ a *cit2*Δ byly vybrány, protože produkty těchto genů souvisejí s funkcí mitochondrií. Během exponenciální růstové fáze mají buňky *S. cerevisiae* několik mitochondrií (asi 10) a jedna z nich, zpravidla největší, je asi o polovinu objemu chondriomu větší. Mitochondrie tvoří rozvětvenou tubulární síť lokalizovanou bezprostředně pod povrchem. Mitochondriální retikulum je vysoce dynamická struktura, která je udržována neustálými protichůdnými, ale vyváženými procesy fúze a dělení (fragmentace nastane zhruba každé 2 min). Během přechodu do stacionární fáze je chondriom fragmentován a celkový počet mitochondrií se zvyšuje na 30-50 mitochondrií na buňku (POLYAKOV et al. 2003). Mitochondrie hrají jednu z hlavních rolí v apoptotických procesech vedoucích k progresivnímu snížení mitochondriální funkce a smrti starých buněk (SALVIOLI *et al.* 2001). Při stárnutí kvasinkových buněk dochází k poklesu mitochondriální aktivity a zvyšuje se poškození mitochondrií, zejména oxidativní. Retrográdní signalizace toto poškození kompenzuje a její aktivita s věkem roste. Postupné přepnutí z Krebsova cyklu na glyoxalátový cyklus

během stárnutí bylo potvrzeno biochemickou analýzou chronologicky stárnoucí kultury (BUTOW a AVANDHANI 2004).

Produkty všech *RTG* genů a *CIT2* genu jsou důležité pro správnou funkci zmiňované retrogádní odpovědi (LIAO a BUTOW 1993), kdežto produkt *FIS1* genu je membránový protein účastnící se mitochondriálního dělení (MOZDY et al. 2000). Alkalizace rodičovského kmene i všech delečních mutant byla prokázána 15. den růstu obřích kolonií. U kmenů s delecí v *RTG* genech nejvýrazněji produkoval amoniak kmen rtg3Δ, kdy produkce amoniaku a alkalizace média byla po celou dobu růstu stejně intenzivní jako u rodičovského kmene BY4742 α. Protein Rtg3 je nezbytný při aktivaci retrográdní odpovědi, při tvorbě takzvaného dimerního transkripčního faktoru Rtg1-Rtg3. Delece *RTG3* genu nemá výrazný vliv na produkci amoniaku. U ostatních *RTG* delečních kmenů Rtg1Δ a Rtg2Δ, byla produkce amoniaku a alkalizace média výrazně snížená. Proteiny Rtg1 a Rtg2 mají pravděpodobně vliv na amoniakovou signalizaci. Delece *RTG* genů ovlivňuje také růst kvasinkových buněk v koloniích. Kolonie všech RtgΔ kmenů byly menší než kolonie rodičovského kmene BY4247α. Bylo prokázáno, že delece *RTG* genů, potlačuje prodlužování života petit kmenů, tedy respiračně deficitních kmenů postrádající mitochondriální DNA (GUARAGNELLA a BUTOW 2003). Mutace *RTG1* a *RTG3* způsobuje snížení množství *CIT2* mRNA (JIA *et al.* 1997).

Produkce amoniaku a alkalizace média u kmene *fis1*Δ byla po celou dobu růstu nepatrně nižší než u rodičovského kmene BY4742α. Proto se domnívám, že delece *FIS1* genu pravděpodobně nemá významnou roli v amoniakové signalizaci. Fis1p je požadovaný pro řádné uspořádání a správnou funkci Dnm1p-skládajícího komplexu na mitochondriálních tubulech během dělení (MOZDY et al. 2000) a kvasinkové buňky s defektním *FIS1* genem vykazují poruchy právě v mitochondriálním dělení (SUZUKI *et al.* 2005).

Více než rodičovský kmen produkoval amoniak kmen s delecí v *CIT2* genu. Produkt *CIT2* genu je zavislý na správné funkci mitochondrií. Pokud je funkce mitochondrií změněna například při stárnutí, kdy je jejich funkce snížena, dochází k zapnutí retrográdní signalizace a ke zvýšení transkripce *CIT2* genu. Pro retrográdní expresi *CIT2* jsou požadovány *RTG* geny (LIAO a BUTOW 1993). Produkt *CIT2* genu se účastní glyoxalátového cyklu kde přeměňuje acetyl-CoA a oxalacetát na citrát a CoA (LEWIN et al. 1990). Přepnutí kvasinek z kyselé do alkalické fáze je mimo jiné

doprovázeno přepnutím mitochondrií z dosavadního citrátového cyklu na glyoxalátový (VÁCHOVÁ *et al.* 2004). Je možné, že zvýšená produkce amoniaku u *cit2*Δ kmene ukazuje, že cest k překonání stresu je pravděpodobně více a delece *CIT2* genu zvyšuje odpověď na stres prostřednictvím amoniakové signalizace.

Sledování exprese genů během vývoje kvasinkových buněk v tekuté kultuře

Charakteristiky kvasinkových buněk různých kmenů jako například rychlost množení, způsob pučení, morfologie a stárnutí buněk, bývají obvykle stanovovány v tekutých kulturách. Proto je růst kvasinkových buněk nejlépe popsán u buněk rostoucích v tekutém médiu, bohatém na živiny při optimálních růstových podmínkách. V průběhu růstu buněk dochází k mnohým změnám ovlivňujícím morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti, kterými se buňky značně odlišují v různých fázích růstu. Růst kvasinkových buněk je doprovázen také výraznými změnami v genové expresi (WERNER-WASHBURNE et al. 1993). Exprese genů je různá ve fázi růstu časné i pozdní, kdy produkty těchto genů napomáhají buňkám k intenzivnímu množení, nebo k přežívání v období hladovění.

Při analýze vývoje a stárnutí kvasinkových kolonií jsem využila právě možnosti sledovat průběh exprese různých genů. Expresi genů exponenciální fáze růstu *GUT1*, *SMI1/KNR4* a geny stacionární fáze růstu *SSA3*, *HSP30 S. cerevisiae* jsem sledovala z hlediska změn lokalizace příslušných proteinů při vývoji kvasinkových kolonií a z hlediska změn množství proteinů v buňkách v průběhu růstu kolonií. Zviditelnění exprese všech sledovaných genů je umožněno značením genů zeleným fluorescenčním proteinem, kdy výsledný fúzovaný fluorescenční protein je možné pozorovat v živých buňkách pod fluorescenčním mikroskopem (SHEFF a THORN 2004). Aby bylo možné detekovat změny v průběhu růstu spojené s tvorbou a degradací fúzovaných proteinů v buňkách rostoucích v koloniích, je nutné ověřit expresi sledovaných genů v tekuté kultuře.

Exprese a lokalizace sledovaných genů v tekuté kultuře se příliš nelišila od informací z literatury (kap. 4.2.3). Gut1p je cytoplazmatický enzym, který je nezbytný pro kultivaci kvasinek v médiích obsahujících glycerol jako jediný zdroj uhlíku (LU *et al*.

2003). U Gut1p značeného GFP byla však zaznamenána lokalizace jak v cytoplazmě, tak v mitochondriích (HUH et al. 2003). Výsledky získané kultivací buněk v glycerolovém médiu kmene ΣS^{h}-*GUT1* potvrdily lokalizaci Gut1p značeného GFP pouze v cytoplazmě. Zda byl protein lokalizován také v mitochondriích, nebylo možné rozlišit. Potvrdila jsem také, že Gut1p byl indukován v počátečních fázích vývoje stejně jako protein Smi1/Knr4. Smi1/Knr4 protein je zapojen do mnoha genetických a fyziologických interakcí, zahrnujících údržby buněčné stěny, vznik polarizovaného růstu pupene, buněčného cyklu/mitózy, osmoregulace/metabolismu a utváření spór (DURAND *et al.* 2008). V závislosti na širokém uplatnění, byla u tohoto proteinu zjištěna lokalizace na více místech v buňce. U Smi1p-GFP byla zjištěna lokalizace v podobě cytoplazmatických políček v předpokládaném místě pučení v nepučících buňkách a pupenovém krčku v pučících buňkách. Před jaderným dělením přejde část proteinu do cytoplazmy dceřiných buněk, zbývající protein zůstává v mateřské buňce (MARTIN *et al.* 1999). Výsledkem kultivace kvasinkového kmene ΣS^{h}-*SMI1* byla fluorescence proteinu Smi1 v cytoplazmě buňky v podobě „čárek“, rozptýlených v celé buňce. Lokalizaci proteinu v místě pučení jsem nezaznamenala. U kmenů ΣS^{h}-*SSA3*, ΣS^{h}-*HSP30* s geny značenými GFP jsem zaznamenala indukci fluorescenčních proteinů ve stacionární fázi. Toto zjištění odpovídá literatuře, kdy Ssa3 a Hsp30 jsou považovány za „heat shock proteiny“ indukované ve stacinární fázi vlivem stresových podmínek (KIANG a TSOKOS 1998). Výsledkům z literatury při kultivaci kmene ΣS^{h}-SSA3 odpovídala také lokalizace Ssa3 proteinu a to v cytoplazmě, ale také intenzita svícení fúzovaného proteinu. Exprimován byl podstatně dříve než Hsp30 a intenzita svícení proteinu nebyla do konce experimentu změněna. FUGE *et al.* 1994 prokázali, že protein Ssa3 byl syntetizován vysokou rychlostí během diauxického shiftu a postdiauxické fáze a byl detekován v průběhu stacionární fáze až do 21. dne experimentu. Protein Hsp30 je lokalizován v plazmatické membráně (WU *et al.* 1999) a k výrazné indukci dochází až během pozdní stacionární fáze (RIOU *et al.* 1997). Tyto informace se zcela neshodují se skutečností, kdy u kmene ΣS^{h}-*HSP30,* kultivovaného aerobně v tekuté kultuře, byla lokalizace proteinu prokázána převážně v celé buňce. Protein fluoreskoval zrnitě v cytoplazmě. V plazmatické membráně byl Hsp30 lokalizován především u buněk kultivovaných staticky v tekuté kultuře, nebo v buňkách rostoucích v koloniích na pevném médiu. Přítomnost proteinu v cytoplazmě by mohla být způsobena přítomností Gfp části fúzovaného proteinu. U Hsp30p s navázaným HA epitopem, který je extrémně hydrofilní, bylo totiž zjištěno, že je lokalizován jak na periferiích buňky, tak v cytoplazmě a barví se v granulích (KUMAR et al. 2002). Tomu by odpovídala zrnitá

fluorescence Hsp30 proteinu u kmene ΣS^{h}-*HSP30* v cytoplazmě. Z růstové křivky kmenů ΣS^{h}-GUT1, ΣS^{h}-SMI1, ΣS^{h}-SSA3, ΣS^{h}-HSP30 s geny značenými GFP kultivovaných v tekutém glycerolovém médiu, která ukazuje shodnou růstovou rychlost všech kmenů, se zdá, že GFP gen neovlivňuje funkci značených proteinů. Ověřila jsem však lokalizaci sledovaných produktů jak deklaruje literatura. Využívání GFP jako fluorescenční „značky" pro zjištění lokalizace proteinů v buňce je stále častější. Gfp protein je ale velmi stabilní a v buňce přetrvává dlouho, přestože k další expresi značeného proteinu nedochází (GRILLY *et al.* 2007). Myslím si, že stabilita Gfp je při pozorování lokalizace proteinů výhodou. U proteinů exponenciální fáze jsem tak mohla pozorovat přechod do stacionární fáze, kdy proteiny již nebyly buňkou využívány, ale byly odbourávány ve vakuolách.

Vývoj kvasinkových buněk v kolonii a sledování exprese genů během vývoje v kvasinkové kolonii

Jak již bylo zmíněno, vývoj kvasinkových buněk je nejčastěji popisován v tekuté kultuře. O chování buněk v koloniích je dosud známo mnohem méně. Vývoj kvasinkových kolonií *S. cerevisiae* byl sledován v několika málo studiích, některé z nich se dokonce v informacích rozcházejí. Studiem kolonií s hladkou morfologií se mimo jiné podrobněji zabývali MEUNIER a CHODER.Ve své práci sledující růst kvasinkových kolonií zjistili, že tento růst má bifázický charakter. V prvních přibližně dvou dnech se buňky v kolonii množí exponenciálně (s dobou zdvojení cca 1,75 h) maximální rychlostí, i když nejsou v přímém kontaktu s agarem, ale leží jedna na druhé. K buňkám se živiny pravděpodobně dostávají pasivním kapilárním pohybem (MEUNIER a CHODER 1999). Mladou kvasinkovou kolonii (4-5 dělení, 8 hodin) tvoří heterologní populace s hladkými buněčnými stěnami. Buňky jsou od sebe relativně vzdálené, orientace pupenů je náhodná. Se stářím kolonie se zvyšuje buněčná organizace a zdá se, že buňky jsou vůči sobě navzájem uspořádány a jejich vzájemná vzdálenost se snižuje (VARON a CHODER 2000). Navíc se tato organizace zvyšuje směrem z okraje do centra kolonie a je v korelaci s dostupností živin. Mechanizmus, jakým dochází k uspořádání, není znám. Jisté je, že organizovanost musí být indukována ještě v době, než dojde k hladovění, možná na jeho počátku. S vývojem kolonií se zvyšuje i buněčná hustota na povrchu kolonie. Vysoká hustota buněk není charakteristická jen pro staré kolonie, ale i pro mladé hladovějící

kolonie. Buněčné stěny se začínají zhruba po 24 hod vrásčit (VARON a CHODER 2000). MEUNIER a CHODER také uvádějí, že v druhé růstové fázi (asi po 5 dnech) po dosažení počtu řádově 10^7 buněk (v závislosti na počtu kolonií na misku) se rychlost růstu kolonie s časem postupně zpomaluje a dělení buněk probíhá především v okrajových oblastech. Přechod mezi fázemi může být analogem diauxického shiftu pozorovaného v tekuté kultuře, ačkoli v tekuté kultuře je druhá růstová fáze (post-diauxická) výhradně poháněna aerobním metabolizmem, kdežto druhá růstová fáze kolonie může být poháněna i fermentací. Bylo ukázáno, že kolonie má dvoufázový růst, i když roste na etanolu, tedy na nefermentovatelném zdroji uhlíku (MEUNIER a CHODER 1999). Přechod je též doprovázený represí transkripce většiny genů. Naopak se zvyšuje hladina transkriptu některých heat shock genů (MEUNIER a CHODER 1999). U buněk starých kolonií (3 týdny) byly zjištěny intercelulární fibrily. Vznik souvisí zřejmě s hladověním, protože se objevují pouze ve starých koloniích nebo koloniích limitovaných růstovým faktorem. Zdá se, že tvoří komunální síť. Dokonce se i uvažovalo, že by mohly sloužit jako kanály pro transport molekul od buňky k buňce (VARON a CHODER 2000).

Při pozorování růstu kmenů kvasinkových kolonií ΣS^h-*GUT1*, ΣS^h-*SMI1*, ΣS^h-*SSA3* a ΣS^h-*HSP30* jsem získala poznatky o lokalizaci buněk v různých částech kolonie v průběhu růstu kolonie zcela odlišné morfologie – tedy kolonie silně zvrásněné, se střevovitým vzhledem (kap. 4.2.5). Stejně jako MEUNIER a CHODER jsem ověřila, že se stářím kolonie se zvyšuje buněčná organizace – ve mnou sledovaných koloniích ve smyslu rozlišení lokalizace starších a mladších buněk, dělení buněk probíhá v okrajových oblastech. Lokalizaci indukovaných fluorescenčních proteinů v buňkách odebíraných z různých částí kolonie jsem pozorovala především díky expresi *GUT1* a *SSA3* genů. Produkty těchto genů jsou lokalizovány v cytoplazmě, jejich exprese je mnohem výraznější než u proteinů lokalizovaných v organelách či plazmatické membráně, jako u Smi1 a Hsp30. Podařilo se mi prokázat, že starší buňky se nacházejí na vrcholu kolonie, což potvrdila především lokalizace Ssa3 proteinu na vrcholu kolonie v pozdějších fázích růstu, ale i morfologie kvasinkových buněk, kdy starší buňky jsou větší a mají vnitřní obsah výrazně zrnitý. Na základě exprese obou genů, ale i morfologie byla lokalizace mladších buněk zjištěna na okraji kolonie. Zajímavé bylo zjištění, že se ve středu spodní části kolonie také vyskytuje velké množství mladých buněk. Výskyt mladých buněk na okraji kolonie je pochopitelný, a jak již bylo zmíněno, shodný s dalšími studiemi. Buňky na okrajích kolonie mají dostatečný přísun živin, mohou se tak dělit, aniž by výrazně

regulovaly svůj růst. Z jakého důvodu se ale nacházejí mladší buňky ve středu spodní části kolonie, není jednoduše zřejmé. VÁCHOVÁ a PALKOVÁ se zabývaly výskytem apoptotických znaků v obřích koloniích, kde hodnotily buňky z centra a okraje kolonie. Byl prokázán výskyt mrtvých buněk především v centru kolonie, kdy mrtvé buňky pravděpodobně poskytují živiny pro růst buněk v okrajových oblastech kolonie (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Podstatným rozdílem u mých experimentů je časové období, ve kterém sleduji vývoj buněk (14 dnů růstu kolonie), lokalizace odběrů buněk a také rozdíl v morfologii kmenů. K pozorování obřích kolonií použily Váchová a Palková kmen *S. cerevisiae* tvořící hladké kolonie. Domnívám se, že buňky mých kmenů rostoucí na středu spodní části kolonie se výrazně množí především díky své lokalizaci - přímo u agaru, kde mohou získávat větší množství živin, než buňky na vrcholu kolonie, které jsou od agaru více vzdáleny. Důsledkem růstu nových buněk ve středu spodní části a na okraji kolonie jsou pravděpodobně staré buňky vytlačovány na vrchol kolonie. Je také možné, že starší buňky, vyskytující se především na vrcholu kolonie a vykazující poněkud vyšší výskyt ROS mohou být zdrojem živin pro nově vznikající buňky nejen na okrajích (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005), ale právě i pro buňky lokalizované ve středu spodní části kolonie.

Zajímavé rozlišení vrstev různých typů buněk svědčících o existenci výživových gradientů a gradientů signálních molekul pozorovali v hladkých koloniích diploidního kmene *S. cerevisiae* rostoucích na chudém sporulačním agaru také PICCIRILLO *et al.* 2010. V kolonii se v průběhu jejího vývoje postupně objevovaly ostře oddělené vrstvy sporulujících a nesporulujících buněk. Sporulace začínala ve velmi úzké vrstvě naspodu kolonie a dále výrazně vzrostl obsah vřecek v horních vrstvách.

U kvasinkového kmene *S. cerevisiae* ΣS^h je pravděpodobně zvrásněná morfologie výhodou pro nově vznikající buňky. Kyslík se k těmto buňkám přes střevovité uspořádání kolonie dostává pravděpodobně snadněji, než u kolonií s hladkým povrchem. „Divoké“ kvasinkové kmeny *Saccharomyces cerevisiae* se od laboratorních kmenů s hladkými koloniemi výrazně liší právě zvrásněnou morfologií. Některé laboratorní kmeny, například *S. cerevisiae* $\Sigma 1278^d$, od kterého je ΣS^h odvozen, v závislosti na kultivačních podmínkách, tvoří také zvrásněné kolonie (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2005). Na první pohled je rozdíl v morfologii kmenů tvořících hladké a zvrásněné kolonie dobře patrný, přesto však jsou mezi těmito kmeny rozdíly, které už tak dobře viditelné nejsou. U divokých kmenů a u kmene *S. cerevisiae* $\Sigma 1278^d$ byl prokázán růst kolonií především do výšky. Rostoucí

kolonie se tedy nezvětšuje tolik do šířky, jako je tomu u hladkých kolonií, ale vytváří vysoké zvrásněné kolonie (VOPÁLENSKÁ osobní sdělení). Tomu by odpovídala hypotéza o pravděpodobném vytlačování starých buněk na vrchol kolonie, díky růstu mladých buněk rostoucích ve středu kolonie.

Při vývoji kvasinkových kolonií je důležitý také vznik apopototických znaků v buňkách, který ovlivňuje jejich další vývoj (kap. 4.2.7). Hlavním zdrojem energie pro starší buňky je mitochondriální respirace. Vlivem mitochondriální respirace dochází k produkci velkého množství reaktivních kyslíkových látek (ROS), které na buňky působí toxicky. Buňky ve stacionární fázi růstu, na rozdíl od proliferujících buněk, nemohou opravovat poškození proteinů a DNA buněčným dělením a rychlou syntézu nových molekul. Buňky jsou více citlivé k vnitřním i vnějším stresům (GRALLA a KOSMAN 1992). Reaktivní kyslíkové radikály se tedy nacházejí v buňkách výrazně starších. Proto jsem zjišťovala výskyt ROS v buňkách kmene *Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h, rostoucích v koloniích 21 dní. Vyšší procento buněk s ROS, jsem zaznamenala u buněk lokalizovaných na vrcholu, potvrzující tak výsledky získané expresí fluorescenčních proteinů, přestože tyto závěry byly hodnoceny u buněk rostoucích v koloniích během 14 dnů. V tomto časovém období mě také zajímal výskyt dalšího apoptotického znaku kolonie – mrtvé buňky. Bromkresolový purpur, který jsem pro identifikaci mrtvých buněk použila, by měl sloužit k detekci mrtvých či alespoň výrazně poškozených buněk (KURZWEILOVA a SIGLER 1993). Autoři ověřovali svá pozorování paralelním stanovením podílu životaschopných buněk pomocí výsevu a došli k závěru, že barvení pomocí BKP vede spíše k podhodnocení skutečného počtu mrtvých buněk. V mém experimentu s kmenem *S. cerevisiae* ΣS^h na médiu s BKP indikátorem jsem výskyt mrtvých buněk (tj. buněk, které by se celé obarvily) ve 14 dnů starých koloniích neprokázala, přesto však došlo k obarvení povrchu buněčné stěny buněk rostoucích na médiu s BKP. Kvasinkové buňky tvořící kolonie se zvrásněnou morfologií mají pravděpodobně schopnost vázat toto barvivo, což jsem potvrdila kultivací kmene ΣS^h s deletovaným genem *FLO11*. Tento kmen vykazuje hladkou morfologii. K obarvení buněčné stěny buněk kmene flo11Δ nedošlo. Protein Flo11, který je lokalizován v buněčné stěně u kmenů odvozených od *S. cerevisiae* $\Sigma 1278^d$ je pravděpodobně hydrofobní, neboť vytváří biofilm na rozhraní vodního a hydrofobního pevného povrchu (REYNOLDS a FINK 2002) a hydrofobní buněčné agregáty (ZARA *et al*. 2005). Stejně tak hydrofobní charakter má zřejmě bromkresolový purpur (FAIZUL *et al.* 2008, KAMAT B a

SEETHARAMAPPA 2004). Pravděpodobně tedy dochází k hydrofobní interakci těchto dvou komponent a vazbě barviva na povrch buněk.

Výskyt mrtvých buněk jsem sledovala ještě s použitím interkalárního barviva PI – propidium iodid. PI neporušenými membránami živých buněk neprochází, pokud však mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenu, barvivo volně proudí do buněk. Má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a po vazbě cca 40x větší fluorescenci. Toho se využívá právě ke značení mrtvých buněk, které po excitaci UV zářením svítí intenzivně červeně (JOUX a LEBARON 2000). S použitím tohoto barviva jsem opět výskyt mrtvých buněk u ΣS^h ani kontrolního kmene BY4742α u 14 dnů starých kolonií neprokázala.

6. SOUHRN

V rámci své diplomové práce, zaměřené na změny v produkci amoniaku obřími kmenů delečních mutant *S. cerevisiae* a změny v expresi genů v exponenciální a stacionární fázi růstu, monitorující vývoj a stárnutí buněk v kvasinkových koloniích *S. cerevisiae,* jsem získala následující výsledky:

1. Chrakterizovala jsem kmeny *S. cerevisiae* BY4742α deletované v genech *RTG1, RTG2, RTG3, FIS1, CIT2* z hlediska produkce amoniaku a alkalizace glycerolového média. Zjistila jsem, že produkce byla ve shodě s výsledky alkalizací média v okolí obřích kolonií a že uvedené mutanty odvozené od kmene BY4742α produkovaly amoniak od 15. dne. Ve srovnání s rodičovským BY4742α jsem zaznamenala výrazně vyšší produkci amoniaku u kmene *cit2*Δ, srovnatelnou produkci amoniaku u kmene *rtg3*Δ, nižší produkci amoniaku u kmene *fis1*Δ a nejnižší produkci amoniaku u kmenů *rtg*1Δ a *rtg*2Δ.

2. Připravila jsem 4 kmeny *S. cerevisiae* ΣS^h, u nichž byly pomocí GFP označeny geny pro exponenciální fázi růstu - *GUT1* a *SMI1/KNR4*, a také pro stacionární fázi růstu - *SSA3* a *HSP30*. U těchto značených genů byla potvrzena exprese v příslušných fázích růstu v tekuté kultuře.

3. Sledovala jsem změny v expresi značených genů během vývoje kvasinkových kolonií. Zjistila jsem, že proteiny Gut1 a Smi1/Knr4 jsou nejintenzivněji indukovány v počátečních fázích vývoje kolonie 3. a 4. den růstu. U proteinů Ssa a Hsp30 jsem zaznamenala indukci v pozdějších fázích vývoje kolonie.

4. Sledovala jsem vývoj buněk v různých částech kolonií a obřích kolonií zjišťováním přítomnosti fúzovaných fluorescenčních proteinů. Na základě morfologie buněk a fluorescence indukovaných proteinů jsem zjistila, že starší buňky jsou lokalizované hlavně na vrcholu kolonie, kdežto mladší na okraji a na středu spodní části kolonie.

Při vývoji zvrásněné kolonie tedy dochází k množení buněk hlavně na okraji a ve středu kolonie a „vytlačování“ starších buněk do horní zvrásněné části kolonie.

5. U kvasinkových buněk kmene *S. cerevisiae* ΣS^h, rostoucích v koloniích na glycerolovém médiu s BKP indikátorem, jsem během 14 dnů neprokázala výskyt mrtvých buněk, přesto však povrch buněk svítil. Barevný indikátor BKP reagoval s povrchem buněčné stěny a u všech pozorovaných buněk vytvořil dojem lokalizace v membráně. U kmene ΣS^h s deletovaným genem *FLO11* jsem BKP na povrchu buněk neprokázala.

6. Zjišťovala jsem výskyt reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v buňkách kmene *Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h, rostoucích v koloniích 21 dní. Buňky lokalizované na vrcholu kolonie obsahovaly více buněk s ROS (8 %), nežli buňky na středu spodní části kolonie (5 %). Ověřila jsem, že reaktivní kyslíkové radikály se nacházejí v morfologicky starších buňkách.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

BASMAJI, F., MARTIN-YKEN, H., DURAND, F., DAGKESSAMANSKAIA, A., PICHEREAUX, C., ROSSIGNOL, M., FRANCOIS, J. (2005): The "interactome" of the Knr4/Smi1, a protein implicated in coordinating cell wall synthesis with bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genomics 257: 217-230.

BAXTER, B. K., CRAIG, E. A. (1998): Suppression of an Hsp70 Mutant Phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* trough Loss of Function of the Chromatin Component Sin1p/Spt2p. J Bacteriol 180: 6484-6492.

BOORSTEIN, W. R., CRAIG, E. A. (1990): Transcriptional Regulation of SSA3, an HSP70 Gene from *Saccharomyces cerevisce.* Mol. Cell. Biol. 10: 3262-67.

BRALEY, R., PIPER, P. W. (1997): The C-terminus of yeast plasma membrane H+-ATPase is essential for the regulativ of this enzyme by heat shock protein *HSP30*, but not for stress activation. FEBS 418: 123-6.

BRAUN, B. R., JOHNSON, A. D. (2000): TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. Genetics 155: 57-67.

BUTOW, R. A., AVADHANI, N. G. (2004): Mitochondrial signaling: review the retrograde response. Mol. Cell 14: 1-5.

CADENAS, E. DAVIES, K. J. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free. Radic. Biol. Med. 29: 222-30

CHALFIE M. (1995): Green fluorescent protein. Photochem. and Photobiol. 62: 651-6.

CHODER, M. (1991): A general topoisomerase I-dependent transcriptionalrepression in the stationary phase in yast. Gene 5: 2315-26.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995): Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbial. 49: 711-75.

DILOVA, I., CHEN, C. Y., POWERS, T. (2002): Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in S. cerevisiae. Curr. Biol. 12: 389-95.

DING J., HUANG, X., ZHANG, L., ZHAO, N., YANG, D., ZHANG, K. (2009): Tolerance and stress response to etanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 85: 253-63.

DURAND, F., DAGKESSAMANSKAIA, A., MARTIN-YKEN, H., GRAILLE, M., VAN DONALIES, U. E. B., STAHL, U. (2001): Phase-specific gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* using as carbon source under oxygen-limitin conditions. Curr Genet 39: 150-5.

FAIZUL, F. M., KADIR, H. A., TAYYAB, S. (2008): Spectroscopic studies on the binding of bromocresol purple to different serum albumins and its bilirubin displacing action. J. Photochem. and Photobiol. 90: 1-7

FERNANDES, P. M. B., DOMITROVIC, T., KOA, C. M., KURTENBACH, E. (2003): Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. FEBS 556: 153-60.

FIRON, A., LESAGE, G., BUSSEY, H. (2004): Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. Current Opinion in Microbiology 7: 617-23.

FISHEL, R. B., SPERRY, A. O., GARRARD, W. T. (1993): Yeast calmodulin and a conserved nuclear protein participate in the in vivo binding of a matrix association region. Genetics 90: 5623-7.

FORSBERG, H., GILSTRING, C. F., ZARGARI, A., MARTNEZ, P., LJUNGDHAL, P. O. (2001): The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. Mol. Microbiol. 42: 215-28.

FORSBERG, H., LJUNGDHAL, P. O. (2001): Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p–Ptr3p–Ssy5p sensor of extracellular amino acids. Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 814–826.

FUGE, E. K., BRAUN, E. L., *et. al.* (1994): Prothein synthesis in Long-Term Stationary.Phase Cultures of *Saccharomyces cerevisiae.* J Bacteriol 176: 5802-13.

GALEOTE, V. A., ALEXANDRE, H., BACH, B., DELOBEL, P., DAQUIN, S., BLONDIN, B. (2007): SFL1p acts as an activator of the *HSP30* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 52: 55-63.

GIMENO, C. J., LJUNGDHAL, P. O., STYLES, C. A., FINK, G. R. (1992): Unipolar cell division in yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell. 68: 1077-90.

GOMES, K. D., FREITAS, S. M. A. C., PAIS, T. M., FIETTO, J. L. R., TOTOLA, A. H., ARANTES, R. M. E., MARTINS, A., LUCAS, C., SCHULLER D., CASAL, M., CASTRO, I. M., FIETTO, L. G., BRANDAO, R. L. (2005): Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Elsevier 5: 767-76.

GONZALEZ-RAMOS, D., CEBOLLERO, E., GONZALEZ, R. (2008): A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. Appl. Environ. Microbial. 74: 5533-40.

GOS, P., EICHER, B., KOHLI, J., HEYER, W. D. (1997): Extremely high frequency electromagnetic fields at low power density do not affect the division of exponential phase *Saccharomyces cerevisiae* cells. Bioelectomagnetics 18: 142-55.

GRALLA, E. B., KOSMAN, D. J. (1992): Molecular genetics of superoxide dismutates in yeast and related fungi. Adv. Genet. 30: 251-319.

GRAUSLUNG, M., LOPE, J. M., RØNNOW, B. (1999): Expression of *GUT1*, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positiveregulators Adr1p, Ino2p and Ino2p and the negaticve regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. Nucleic Acids Research 27: 4391-8.

DE GREY, A. D. (1997): A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. Bioessays 19: 161-166.

GRILLY, CH., STRICKER, J., PANG, W. L., BENNETT, M. R., HASTY, J. (2007): A synthetic gene network for tuning protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO 127: 1-5.

GUARAGNELLA, N., BUTOW, R. A., (2003): ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy-Ptr3-Ssy5 amino acid senzor systém. J. Biol. Chem. 278: 45882-7.

HARTWELL, L. H., UNGER, M. W. (1977): Unequal division in Saccharomyces cerevisiae and its implications for the control of cell division. J. Cell. Biol. 75: 422-35.

HEIM, R., PRASHER, D. C., TSIEN R. Y. (1994): Wavelengh mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Prac. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12501-4.

HEITMAN, J., AGRE, P. (2000): A new face of the Rhesus antigen. 26: 258-9.

HONG, Z., MANN, P., BROWN, N. H., TRAN, L. E., SHAW, K. J., HARE, R. S., DiDOMENICO, B. (1993): Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)-β-glucan synthesis. Mol. Cell. Biol. 14: 1017-25.

IVANOVSKA, I., HARDWICK, J. M. (2005): Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. J. Cell Biol. 170: 391-9.

JAZWINSKI, S. M. (2000): Metabolic control and ageing. Trends Genet. 16: 505-11.

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: 1110-7.

JOUX, F., LEBARON, P. (2000): Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes and Ifection 2: 1523-35.

KAISER, D. (1999): Cell fate and organogenesis in bacteria. Trends Genet. 16: 506-11.

KAMAT B, P., SEETHARAMAPPA, J. (2004): Fluorescence and circular dichroism studies on the interaction of bromocresol purple with bovine serum albumin. Polish journal of chemistry. 78: 723-32.

KIANG, J. G., TSOKOS, G. C. (1998): Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiolgy. Pharmacol 80: 183-201.

KUMAR, A., AGARWAL, S., HEYMAN, J. A., MATSON, S., HEIDTMAN, M., PICCIRILLO, S., UMANSKY, L., DRAWID, A., JENSEN, R.., LIU, Y., CHEUNG, K. H., MILLER, P., GERSTEIN, M., ROEDER, G. S., SNYDER M. (2002): Subcellular localization of the yeast proteome. Genes Dev. 16: 707-19.

KURAVI, K., NAGOTU, S., KRIKKEN A. M., SJOLLEMA, K., DECKERS, M., ERDMANN, R., VEENHUIS, M., VAN DER KLEI, I. J. (2006): Dynamin-related proteins Vps1p a Dnm1p control peroxisome abundance in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Sci. 119: 3994-4001.

KURZWEILOVA, H., SIGLER, K. (1993): Fluorescent staining with bromcresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity. Yeast 9: 1207-11.

KUTHAN, M., DEVAUX, F., JANDEROVÁ, B., SLANINOVÁ, I., JACQ, C., PALKOVÁ, Z. (2003): Domestification of wild *Saccharomyces cerevisiae* colonies is accompanied by changes in gene expression and colony. Mol. Microbiol. 47: 745-54.

LASAGE, G., SDICU, A. M., MÉNARD, P., SHAPIRO, J., HUSSEIN, S., BUSSEY, H. (2004): Analysis og β-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. Genetics 167: 35-49.

LAZAZZERA, B. A. (2000): Quorun sensing and starvation: Signals for intry into stationary phase. Curr. Opin. Microbial. 3: 177-182.

LEE, J. G., CHO, S. P., LEE, H. S., LEE, C. H., BAE, K. S. MAENG, P. J. (2000): Identification of a cryptic N-terminal signal in *Saccharomyces cerevisisae* peroxisomal citrate synthase that functions in both peroxisomal and mitochondrial targeting. J. Biochem. 128: 1059-72.

LEWIN, A. S., HINES, V., SMALL, G. M. (1990): Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of Saccharomyces cerevisiae is peroxisomal. Mol. Cell Biol. 10: 1399-405.

LJUNGDAHL, P. O., GIMENO, C. J., STYLES, C. A., FINK, G. R. (1992): SHR3: A novel component of teh secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. Cell 71: 463-478.

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 72: 61-71.

LIU, Z., SEKITO, T., ŠPÍREK, M., THORNTON, J., BUTOW, R. A. (2003): Retrograde signaling is regulated by the dynamis interaction between Rtg2p a Mks1p. Cell 12: 401-11.

LU, L., ROBERTS, G. G., OSZUST, C., HUDSON, A. P. (2005): The YJR127/*ZMS1* gene product is involved in glycerol-based respiratory growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 48: 235-46.

LU, L., ROBERTS, G., SIMON, K., YU, J., HUDSON, A. P. (2003): Rsf1p, a protein required for respiratory growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 43: 263-72.

MARTIN-YKEN, H., DAGKESSAMANSKAIA, A., TALIBI, D., FRANCOIS, J. (2002): *KNR4* is a member of the *PKC1* signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 41: 323-32.

MARTIN, H., DAGKESSAMANSKAIA, A., SATCHANSKA, G., DALLIES, N., FRANÇOIS, J. (1999): *KNR4*, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae cwh* mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. Microbiology 145: 249-58.

MARINI, A. M., MATASSI, G., RAYNAL., V., ANDRE. B., CARTRON, J. P., CHERF-ZAHAR, B. (2000): The human Rhesus-accociated PhAG protein and a kidney homologue proteome ammonium transport in yeast. Nat. Genet. 26: 341-44.

MARINI, A. M., SOUSSI-BOUDEKOU, S., VISSERS, S., ANDRE, B. (1997): A family of ammonium transporters in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell Biol. 17: 4282-93.

MATSUHASHI, M., PANKRISHINA, A. N., ENDOH, K., WATENABE, H., MANO, Y., HYODO, M., FUJITA, T., KUNUGITA, K., KANEO, T., OTANI, S. (1995): Studies on carbon material reguiremenst for bacterial proliferation and spore germination under stress conditions: A new mechanism involving transmission of physical signals. J. Bacteriol. 177: 688-93.

MEUNIER, J., CHODER, M. (1999): *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and agging: biphasis growth accompanied by changes in gene expression. Yeast 15: 1159-69.

MILLER, M. B., BASSLER, B. L. (2001): Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55: 165-99.

MOZDY, A. D., McCAFFERY, J. M., SHAW, J. M. (2000): Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. J. Cell Biol. 151: 367-79.

NIEDENTHAL, R. K., RILES, L., JOHNSTON, M., HEGEMANN, J. H. (1996): Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. Yeast 12: 773-86.

OLIVERIA, R., LAGES, F., SILVA-GRACA, M., LUCAS, C. (2002): Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and redefinitions. Biochim Biophys Acta 1613: 57-71.

ORMÖ, M., CUBITT, A. B., KALLIO, K., GROSS, L. A., TSIEN, R. Y., REMINGTON, S. J. (1995): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science 273: 1392-1395.

PALKOVÁ, Z. (2004): Multicellular Microorganisms: Laboratory Versus Nature. EMBO Rep. 5: 470-476.

PALKOVÁ, Z., FORSTOVÁ, J. (2000): Yeast colonies synchronise their growth and development. J. Cell. Sci. 113: 1923-8.

PALKOVÁ, Z., JANDEROVÁ, B., GABRIEL, J. ZIKÁNOVÁ, B., POSPÍŠEK, M. FORSTOVÁ, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast clonies. Nature 390: 532-6.

PALKOVÁ, Z., VÁCHOVÁ, L. (2003): Ammonia signaling in yeast colony formation. Int. Rev. Cyt. 225: 229-72.

PANARETOU, B., PIPER, P. W. (1992): The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to beth heat shock and the entry to stationary phase. Eur. J. Biochem. 206: 635-40.

PAVLIK, P., SIMON, M., SCHUSTER, T., RUIS, H. (1993): The glycerol kinase (*GUT1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Curr Genet 24:21-5.

PAZ, I., MEUNIER, J. R., *et. al.* (1999): Monitoring dynamics of gene expression in yeast during stationary phase. Gene 236: 33-42.

PIE, P., CALDERON, C. O., HATZIXANTHIS, K., MOLLAPOUR, M. (2001): Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. Microbiol 147: 2635-42.

PIPER, P. W., CALDERON, C. O., HOLYOAK, C., COOTE, P., COLE, M. (1996): Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H^+-ATPase. Pearson Profesional Ltd 2: 12-24.

PIPER, P. W., TALREJA, K., PANARETOU, B., MORADAS-FERREIRA, P., BYRNE, K., PRAEKELT, U. M., MEACOCK, P., RÉCNACQ, M., BOUCHERIE, H. (1994): Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical treshold. Microbiology 140: 3031-8.

POLYAKOV, V. Z., SOUKHOMLINOVA, M. Y., FAIS, D. (2003): Fission, fragmetation and fission on mitochondria. Biochemistry (Mosc) 68: 838-49.

PRASHER, D. C., ECKENRODE, E. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G., CORMIER, M. J. (1991): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene 111: 229-33.

QUAN, X., RASSADI, R., *et. al.*(2004): Regulated nuclear accumulation of the yeast hsp70 Ssa4p in etanol-stressed cell sis mediated N-terminal doamin, requires the nuclear carrier Nmd5p and protein kinase C. Faseb J 18: 899-901.

RADFORD, D. R., CHALLACOMBE, S. J., WALTER, J. D. (1994): A scanning electron microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. 40: 416-23.

RÉGNACQ, M., BOUCHERIE, H. (1992): Isolation and sequence of *HSP30*, a yeast heat-shock gene coding for a hydrophobic membrane protein. Curr Genet 23: 435-42.

REYNOLDS, T. B., FINK, G. R. (2001): Bakers yeast, a model for fungal biofilm formation. Science 291: 878-81.

RIOU, CH., NICAUD, J. M., BARRE, P., GAILLARDIN, C. (1997): Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Yeast 13: 903-15.

ŘIČICOVÁ, M., KUČEROVÁ, H., VÁCHOVÁ, L., PALKOVÁ, Z. (2007): Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. Biochim. Biophys. Acta 1768: 1170-8.

SALVIOLI, S., BONAFÉ, M., CAPRI, M., MONTI, D., FRANCESCHI, C. (2001): Mitochondria, aging and longevity-a new perspective. FEBS Letters 492: 9-13.

SAMOKHVALOV, V., IGNATOV, V., KONDRASHOVA, M. (2004): Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxalate cycle in the cource of chronological aging

of *Saccharomyces cerevisisae*, compensatory role of succinate oxidation. Biochem. 86: 39-46.

SAYMOUR, I. J., PIPER, P. W. (1999): Stress induction of *HSP30*, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known sress-regulated transcription factors. Microbiol 145: 231-9.

SCHÜLLER, CH., MAMNUM, Y. M., MOLLAPOUR, M., KRAPF, G., SCHUSTER, M., BAUER, B. E., PIPER, P. W., KUCHLER, K. (2004): Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 15: 706-20.

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: 2103-15.

SHARMA, D., MARTINEAU, C. N., *et. al*.(2009): Function of SSA Subfamily of HSP70 Within and Across Species Varies Widely in Complementing *Saccharomyces cerevisiae* Cell Growth and Prion Propagation. PLoS ONE 4: 1-16.

SHEFF, M. A., THORN, K. S. (2004): Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 21: 661-70.

SJARIF, D. R., PLOOMS VAN AMSTEL, J. K., DURAN, M., BEEMER, F. A., POLL-THE, B. T. (2000): Isolated and contiguous glycerol kinase gene disorders: A review. J. Inherit. Metab. Dis. 23: 529-47.

SUZUKI, M., NEUTZNER, A., TJANDRA, N., YOULE, R. J. (2005): Novel structure of the N terminus in yeast fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. J. Biol. Chem. 280: 21444-52.

SWINNEN, E., WANKE, V., ROOSEN, J., SMETS, B., DUBOULOZ, F., PEDRUZZI, I., CAMERONI, E., DE VIRGILIO, C., WINDERICKX, J. (2006): Rim15 and the

crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell. Div. 1: 3.

TILBOURGH, H., UVERSKY, V. N., FRANÇOIS, M. (2008): Structure-function analysis of Knr4/Smi1, a newly member of intrinsically disordered proteins family, indispensable in the absence of functional PCK1-SLT2 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 25: 563-76.

VÁCHOVÁ, L., DEVAUX, F., KUČEROVÁ, H., ŘIČICOVÁ, M., JACQ, C., PALKOVÁ, Z. (2004): Sok2 transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. J. Biol. Chem. 279: 37973-81.

VÁCHOVÁ, L., PALKOVÁ, Z. (2005): Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. J. Cell Biol. 169: 711-17.

VARON, M., CHODER, M. (2000): Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. J. Bacteriol. 182: 3877-80.

VOPÁLENSKÁ, I., HŮLKOVÁ, M., JANDEROVÁ, B., PALKOVÁ, Z. (2005): The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. Research in Microbiology 156: 921-31.

WERNWR-WASHBURNE, M., BECKER, J., *et. al.* (1989): Yeast Hsp70 RNA Levels Vary in Response to the Physiological Status of the Cell. J Bacteriol 171: 2680-8.

WERNWR-WASHBURNE, M., STONE, D. A., *et. al.* (1987): "Complex Interactions among Members of an Essential Subfamily of hsp70 Genes in *Saccharomyces cerevisce.* Mol. Cell. Biol. 180: 2568-77.

WILLIAM, W. W. (1979): Energy transfer processes in bioluminiscence." Photochem. Photobiol. Rev. 4: 1-57.

WU, K., DAWE, J. H., ARIS, J. P. (1999): Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*. BBA 1463: 477-82.

YANG, F., MOSS, L. G., PHILIPS, G. N. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. Nat. Biotechnol. 14:1246-51.

ZARA, S., BAKALINSKY, A. T., ZARA, G., PIRINO, G., DEMONTIS, M. A., BUDRONI, M. (2005): *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae.* App. Env. Microbiol.

ZIKÁNOVÁ, B., KUTHAN, M., ŘIČICOVÁ, M., FORSTOVÁ, J. PALKOVA, Z. (2002): Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. Biochem. Biophys. Res. Commun. 294: 962-7.