

Univerzita Karlova v Praze
Prírodovedecká fakulta

Študijný program: Biológia
Študijný odbor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Martina Belovičová

Funkcia proteínu Pmp3p

The function of Pmp3p protein

Diplomová práca

Vedúci záverečnej práce: prof. RNDr. Zdena Palková CSc.

Praha, 2011

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Tato práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 24.08.2011

Podpis

Táto práca vznikla pod vedením prof. RNDr. Zdeny Palkovej CSc., ktorej by som chcela touto cestou úprimne poďakovať nie len za odborné vedenie a trpezlivosť, ale tiež za prívetivosť a podporu, ktorú mi dodávala po celú dobu mojej práce.

Ďakujem všetkým členom Laboratória bunkovej biológie z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Menovite za cenné rady a inšpiratívne postrehy ďakujem RNDr. Libuše Váchovej. Za pomoc s proteínovými analýzami ďakujem RNDr. Helene Kučerovej a nie len za pomoc s izoláciami membrán ďakujem Alexandre Pokornej.

Taktiež by som veľmi rada poďakovala všetkým mojím kolegom z Laboratória biológie kvasinkových kolónií za vytvorenie príjemného pracovného prostredia a za praktické rady.

Na záver by som rada poďakovala mojej rodine a kamarátom za pomoc a podporu, ktorú mi poskytovali počas celej doby môjho štúdia.

Táto práca vznikala v rokoch 2008 až 2011 a spadá do riešenia grantových projektov Centrum základného výskumu LC06063, GAČR 204/08/0718 a GAUK263206.

Abstrakt

Kvasinková kolónia počas svojho rastu na pevnom médiu prechádza metabolickými prestavbami, ktoré sa prejavujú jednak zmenou pH v jej okolí a taktiež zmenou membránového potenciálu buniek. Pri skúmaní oscilácií membránového potenciálu bolo zistené, že pri tomto procese hrá dôležitú úlohu malý membránový proteolipid, Pmp3p (**P**lasma **M**embrane **P**roteolipid 3). Táto práca sa zameriava na bližšie pochopenie funkcie Pmp3p najmä cez priame pozorovanie jeho lokalizácie v bunkách rastúcich za rôznych podmienok. Boli pripravené kvasinkové kmene, ktoré produkovali rôznym spôsobom značený Pmp3p proteín, čo umožnilo určiť jeho bunkovú lokalizáciu a množstvo v bunkách. Bolo zistené, že Pmp3p je lokalizovaný na plazmatickej membráne a v lipidických partikulách. Počas vývoja kolónie na respiratívnom i fermentovateľnom médiu bola pozorovaná jeho stabilná koncentrácia. Pri raste v médiu obsahujúcom zvýšenú koncentráciu chloridu sodného nenastalo zvýšenie hladiny Pmp3p-GFP proteínu v bunke.

Kľúčové slová: Pmp3p, proteolipidy, UPF0057 (PMP3) rodina, *Saccharomyces cerevisiae*, dlhodobé prežívanie, lipidické partikuly

Abstract

During development of *Saccharomyces cerevisiae* colonies on solid substrate, metabolic transitions occur, which are reflected by pH changes around the colony and also by changes in cell membrane potential. Analyses of transmembrane potential oscillations revealed a function for **P**lasma **M**embrane **P**roteolipid 3 (Pmp3p) in this process. The thesis discusses possible function of Pmp3p protein mainly on the basis of direct observation of Pmp3p localization *in vivo* under variety of cultivation conditions. Yeast strains with different variants of Pmp3p protein fused with different protein tags that allow monitoring of Pmp3p localization and concentration in cells were prepared by homologous recombination. Localization of Pmp3p in the plasma membrane and in lipid particles was found. The Pmp3p level in cells was stable during development of colonies growing on either respirative or fermentative carbon source medium. High concentration of extracellular sodium chloride did not evoke increase in Pmp3p-GFP concentration.

Key words: Pmp3p, proteolipids, UPF0057 (PMP3) family, *Saccharomyces cerevisiae*, long term survival, lipid particles

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Literárny prehľad.....	12
2.1. Proteolipidy.....	12
2.2. UPF0057 (PMP3) rodina proteínov u rôznych organizmov.....	15
2.2.1. Kvasinkové PMP3 gény.....	15
2.2.2. Bakteriálne PMP3 homológne gény.....	18
2.2.3. Rastlinné Pmp3p homológy.....	19
2.2.4. SNA rodina u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3. Materiál a meódy.....	25
3.1. Materiál.....	25
3.1.1. Použité kmene.....	25
3.1.2. Použité plazmidy.....	26
3.1.3. Použité primery	27
3.1.4. Špeciálne prístroje.....	29
3.1.5. Kultivačné médiá.....	29
3.1.6. Roztoky.....	31
3.1.7. Materiál pre prácu s DNA a proteínmi.....	34
3.1.8. Internetové databázy a počítačové programy	35
3.2. Metódy.....	36
3.2.1. Skladovanie kvasinkových kmeňov.....	36
3.2.2. Kultivácia.....	36
3.2.3. Stanovenie optickej denzity kultúr	36
3.2.4. Výsev obrých kolónií.....	36
3.2.5. Fotografovanie mikroskopických preparátov.....	37
3.2.6. Farbenie bunkových kompartmentov.....	37
3.2.7. Izolácia chromozomálnej DNA.....	37
3.2.8. Transformácia kvasiniek LiAc metódou.....	38
3.2.8.1. Príprava transformačnej kazety.....	38
3.2.8.2. Príprava kompetentných buniek.....	38
3.2.8.3. Transformácia buniek.....	49

3.2.8.4.	Overovacia PCR reakcia.....	40
3.2.9.	Horizontálna elektroforéza v agarózovom gély	40
3.2.10.	Stanovenie proteínov z celých buniek.....	41
3.2.10.1.	Izolácia proteínov.....	41
3.2.10.2.	SDS-PAGE elektroforéza.....	41
3.2.11.	Stanovenie proteínov z lipidických partikul.....	43
3.2.11.1.	Príprava sféroplastov.....	43
3.2.11.2.	Izolácia proteínov.....	44
3.2.11.3.	SDS-PAGE elektroforéza.....	44
3.2.12.	Stanovenie proteínov z plazmatických membrán.....	45
3.2.12.1.	Izolácia plazmatických membrán.....	45
3.2.12.2.	Tris-Tricine SDS-PAGE	45
3.2.12.3.	Farbenie proteínov striebrom.....	46
4.	Výsledky.....	47
4.1.	Určenie lokalizácie Pmp3p proteínu v kvasinkových bunkách...47	
4.1.1.	Príprava kmeňov so značeným Pmp3p proteínom.....	47
4.1.1.1.	Fluorescenčné značenie Pmp3p proteínu.....	47
4.1.1.2.	Nefluorescenčné značenie Pmp3p proteínu.....	51
4.1.2.	Určenie bunkovej lokalizácie Pmp3p.....	52
4.1.2.1.	Určenie lokalizácie Pmp3p pomocou kmeňa BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N.....	53
4.1.2.2.	Identifikácia intracelulárných váčkov obsahujúcich Pmp3p...54	
4.2.	Zistenie času a podmienok produkcie Pmp3p v kolóniách	59
4.2.1.	Prítomnosť Pmp3p na fermentovateľnom médiu.....	59
4.2.2.	Prítomnosť Pmp3p na respiračnom médiu	61
4.3.	Bližšie určenie fyziologickej funkcie Pmp3p proteínu.....	63
4.3.1.	Vplyv zvýšenej koncentrácie solí na stabilitu buniek bez Pmp3p alebo s čiastočne funkčným Pmp3p.....	63
4.3.2.	Pozorovanie hladiny Pmp3 počas stresu.....	68
4.3.3.	Lokalizácia Ato proteínov v neprítomnosti Pmp3p.....	69
4.3.3.1.	Príprava fluorescenčne značených Ato proteínov v kmeni BY- pmp3Δ.....	70
4.3.3.2.	Lokalizácia Ato-GFP proteínov v kmeni BY-pmp3Δ.....	72

4.3.4. Porovnanie proteínového zloženia plazmatických membrán u rodiča a u BY-pmp3Δ kmeňa.....	72
4.3.5. Porovnanie proteínového zloženia lipidických partikul u rodiča a u BY-pmp3Δ kmeňa.....	75
5. Diskusia.....	77
6. Záver.....	83
7. Zoznam citovanej literatúry.....	85

Zoznam použitých skratiek

ABA – kyselina abcisová

APL - alkalická fosfatáza

ER – Endoplazmatické retikulum

ESI family- (**E**arly salt **S**tress **I**nduced) rodina génov aktivovaná v skorej stresovej odpovedi na soľný stres, opísaná u *Lophopyrum elongatum*

ESCRT proteíny – (Endosomal sorting complex required for transport) – proteíny endozómov, zapojené v transportnej MVB dráhe

Fcor 1-3 - (**F**ragaria **c**old-**r**egulated) gény

GA – Golgiho aparát

GFP -green fluorescent protein zelený fluorescenčný proteín

LP – Lipidické partikuly

MAPK - Mitogen - activated protein kinase – stresom indikujúca dráha

MVB dráha - (Multivesicular bodies) dráha – sekretorická dráha spojená z ESCRT proteínmi, transportuje proteíny z ER do vakuol pomocou váčkou.

NLM - U.S. National Library of Medicine – National Library of Health

PLP1 - Proteolipid proteín 1

PM – Plazmatická membrána

PMP3 –*Plasma membrane proteolipid 3*

RCI rodina – (**R**are **C**old **I**nducible genes) rodina, chladom indukované gény u *Arabidopsis thaliana*

SNA rodina – (**S**ensitive to **Na**⁺) rodina, na soľ citlivých génov

SHP - The (Salt or Low Temperature) **S**tress-induced **H**ydrophobic **P**eptide Family

TM – Transmemránový hélix

WW doména – doména Rsp5p proteínu bohatá na tryptofán

1 Úvod

Folch a Less (1951) popísali nový typ proteínov, ktorý sa od všetkých do tej doby známych proteínov líši svojou rozpustnosťou v organických rozpúšťadlách. Členovia tejto skupiny, nazvanej proteolipidy, nie sú charakterizovaní na základe podobnej štruktúry, ale výlučne na ich hydrofóbnom charaktere. Do tejto skupiny sa zaraďuje aj (Plasma Membrane Proteolipid 3) Pmp3p proteín. Tento malý hydrofóbný proteín patrí do evolučne konzervovanej rodiny, označovanej ako PMP3 rodina proteínov. Jej zástupcovia sa nachádzajú u baktérií, kvasiniek, ale tiež aj u *Nematoda* a vo veľkej miere sú študovaní zástupcovia u rastlín. Rastlinné homológy sa skúmajú najmä pre ich prepojenie s prežívaním počas rôznych stresových podmienok, ako je zvýšená koncentrácia solí v pôde, sucho, alebo znížená teplota prostredia (Goddard *et al.* 1993, Gulick *et al.* 1994, Koike *et al.* 2008, Medina *et al.* 2001). U *Saccharomyces* bola na základe nepriamych indícií navrhnutá hypotéza, že bunky, ktorým chýba *PMP3* gén majú zvýšený membránový potenciál (Navarre a Goffeau 2000).

Kvasinková kolónia počas rastu na pevnom médiu prechádza viacerými fázami počas ktorých sa mení celkový membránový potenciál buniek. Zmeny membránového potenciálu prebiehajú v pulzoch s oscilačnou periódou niekoľkých dní (Palková *et al.* 2009). Pre bližšie pochopenie týchto oscilačných zmien sa začal skúmať Pmp3p proteolipid, ktorý sa podľa literatúry uplatňuje pri udržiavaní vitálneho membránového potenciálu. Oproti predpokladu sa ukázalo, že *pmp3Δ* kmeň má v porovnaní s rodičovským kmeňom naopak výrazne znížený membránový potenciál. Typická oscilácia objavujúca sa počas vývoja kolónie nebola u kolónii kmeňa *pmp3Δ* vôbec pozorovaná (Palková, osobná komunikácia).

Cieľom mojej diplomovej práce bolo bližšie objasniť funkciu Pmp3p proteínu. V prvom kroku pripraviť kvasinkové kmene ktoré by umožnili priamo, alebo prostredníctvom protilátok detegovať Pmp3p proteín. Ďalej potvrdiť predikovanú bunkovú lokalizáciu u *Saccharomyces cerevisiae* a následne zistiť za akých podmienok je tento proteín prítomný v bunke. Ako sa mení jeho hladina v závislosti od fázy vývoja kolónie a pôsobenia solného stresu. Prípadne určiť jeho interakcie s inými proteínmi. V závere práce potom navrhnúť možnú funkciu Pmp3p proteínu.

2 Literárny prehľad

2.1 Proteolipidy

Proteolipidy boli prvýkrát izolované a popísané, keď pri skúmaní lipidového zloženia bielej mozgovej hmoty Folch a Lees (1951) zistili, že lipidická frakcia obsahuje viac dusíku, ako by sa dalo usudzovať z jej štruktúry. Keď sa snažili izolovať túto dusíkatú zložku vyzrážala sa im určitá frakcia (cca 15 %), ktorá sa počas vysušania stala nerozpustnou v rovnakom chloroform-metalovom rozpúšťadle, aké bolo použité pri jej extrakcii a zároveň bola nerozpustná aj vo vode. Po hydrolyze kyselinou chlorovodíkovou sa z tejto frakcie uvoľňovali aminokyseliny. Takže bolo jasné že sa nejedná o lipid, ale o proteín, obsahujúci malé množstvo lipidu. V tej dobe už boli známe lipoproteíny, vo vode rozpustné komplexy proteínov vnorených v jednej vrstve fosfolipidov a ohraničujúcou hydrofóbne jadro zložené z triglyceridov a esterov cholesterolu. Preto uvažovali, že proteín sa skombinoval s lipidom za vzniku proteín-lipidického komplexu, kde lipid vytváral vonkajší obal, vďaka čomu sa celý komplex rozpúšťal v nepolárnom rozpúšťadle. Po mnohých neúspešných pokusoch oddeliť lipid od proteínu Folch a Lees (1951) uznali, že sa jedná o nový typ proteínov, ktorý má na sebe pevne naviazaný lipid.

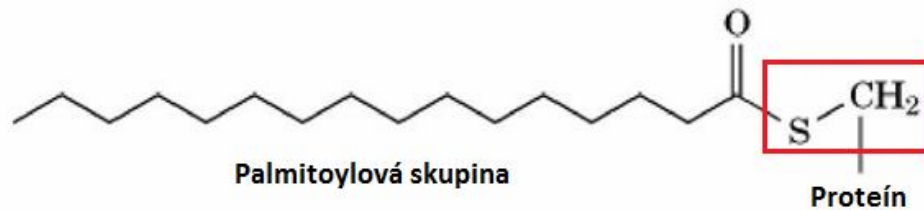
Prvých tridsať rokov pojem proteolipid zahŕňal výlučne proteíny, ktorých jedinou spoločnou vlastnosťou bola rozpustnosť v nepolárnom rozpúšťadle, v zmesi chloroform/metanol/voda. Schlesinger (1981) navrhuje alternatívnu definíciu pre proteolipidy, proteíny obsahujúce lipidický zvyšok ako súčasť ich primárnej štruktúry. Proteolipidy definované týmto spôsobom mali byť analógmi glykoproteínov, fosfoproteínov, metalloproteínov, hemeoproteínov a nukleoproteínov. Ale táto definícia nie je všeobecne akceptovaná, pretože aj lipoproteíny majú na sebe naviazaný lipidický zvyšok, alebo hydrofóbny prenyl, a napriek tomu nie sú rozpustné v organických rozpúšťadlách. Na druhej strane u niektorých proteolipidov nebol pozorovaný kovalentne napojený hydrofóbny zvyšok a aj napriek tomu majú silný hydrofóbny charakter (NLM 2011). Nakoľko proteolipidy a lipoproteíny zdieľajú niektoré lipidické modifikácie, dalo by sa o nich uvažovať ako o jednej skupine, preto je niekedy ťažké ich od seba rozlíšiť (Menon 2008). V súčasnosti sa proteolipidy okrem rozpustnosti definujú aj na základe asociácie s rôznymi

skupinami lipidov. Zatiaľ čo proteolipidy sú asociované s glycerofosfátmi, sulfoglykosfingolipidmi a cerebrozidmi, ako som už spomínala lipoproteíny vytvárajú komplexy s cholesterolmi, triglyceridmi a esterami cholesterolu (NLM 2011). Takéto rozdelenie zjednodušuje priradovanie membránových proteínov k jednotlivým skupinám. Zaviedlo sa z dôvodu, že analýza proteolipidov získaných chloroform/metanolovou metódou je náročná, pretože roztoky použité pri izolácii nie sú kompatibilné s bežne používanými technikami proteínových elektroforéz a hmotnostnou spektrometriou. Pri dvojrozmernej elektroforéze u niektorých proteolipidov vznikajú tri základné problémy: (i) nerozdelia sa v prvom (izoelektrickom) smere, (ii) nie sú citlivé k detekčným farbičkám a (iii) ich veľkosť je pod detekčným minimom (menšia ako 10 kDa). Určovanie proteolipidov hmotnostnou spektrometriou je problematické, okrem kompatibility roztokov najmä správnym určením o aký proteín sa jedná. Sekvencie proteolipidov nie sú známe a často dochádza k posttranslačným modifikáciám (Mayer *et al.* 2006).

Prvým opísaným proteolipidom bol (Proteolipid protein 1) PLP1 označovaný tiež lipofilín. Je súčasťou myelínovej zložky neurónov. Podieľa sa na stabilizácii membrány, ktorá je bohatá na cholesterol. Poškodenie *PLP1* génu vyvoláva u ľudí degeneratívne poškodenie centrálnej nervovej sústavy prejavujúce sa stratou motoriky a intelektových funkcií, Pelizaeus-Merzbacherovu chorobu (Dyken a Zeman 1964; Gow a Lazzarini 1996). Neskôr bolo zistené, že katalytické podjednotky mitochondriálnych, vakuolárných i sarkoplazmatických H⁺ adenozíntrifosfátsyntetáz (ATPáz) sú tvorené proteolipidmi (Fillingame 1976; Rea *et al.* 1987; Velours *et al.* 1984; Finbow a Harrison 1997, Whyteside *et al.* 2005). Katalytické podjednotky sú tvorené hexamérom proteolipidov a svojou rotáciou umožňujú pohyb protónov cez membránu (Adachi *et al.* 2000). Proteolipidy u ktorých bola potvrdená transportná funkcia majú obyčajne izoelektrický bod vyšší ako 10. Proteolipidy transportujúce iné látky, alebo bez potvrdenej transportnej funkcie sú napr.: Na⁺, Pi viažúci proteín v obličkách (Debiec a Lorenc 1988), b₆f komplex podjednotiek cytochrómu c oxidázy (Terzi *et al.* 1990), fosforilovaný 15 kDa veľký proteín kostrových svalov (Walaas *et al.* 1988), Rh antigén červených krviniek (Sinor *et al.* 1984), proteín zvyšujúci permeabilitu membrány pre Na⁺ v elektrickom orgáne *Narke japonica* (Kometani *et al.* 1975), alebo napríklad bakteriálny 5,5 kDa veľký proteolipid spôsobujúci vznik zubného kameňa, vyzrážaním vápniku a taktiež transportujúci anorganický fosfát (van Dijk *et al.*

1998). Protóny prenášajúce podjednotky ATPáz sa pravdepodobne podielajú aj na Ca^{2+} vyvolanej exocytóze. Bolo dokázané, že sa viažu ku calmodulinu (Ca^{2+} viažucemu proteínu) a že katalyzujú spájanie membrán. zatiaľ sa nevie akým mechanizmom sa rozrušia interakcie v rámci membrány, ale lipofilný charakter proteolipidu ponúka viacero hypotéz (Zimmerberg 2001).

Nejednotnosť v definícii proteolipidov spôsobená Schlesingerovou úpravou v roku 1981, niekedy vedie k rozdeleniu proteolipidov podľa naviazaného lipidu a autori uvádzajú aj lipoproteínových zástupcov s danou modifikáciou. Časté je aj chybné rozdelenie proteolipidov podľa naviazaného acetylového zvyšku na myristoylované a palmitoylované. V súčasnosti sa zdôrazňuje najmä vysoký obsah hydrofóbných aminokyselín v štruktúre. Napriek tomu u mnohých proteolipidov bola pozorovaná práve S-palmitoylácia. Palmitoylované proteíny vznikajú v cytozole posttranslačným napojením kyseliny palmitovej (C16:0) prostredníctvom kovalentnej tioesterovej väzby na postranný reťazec cysteínového zvyšku (Obr. 2.1.)



Obrázok 2.1.: Schéma palmitoylovaného proteínu. Červeným štvorcom je označený cysteín. Upravené podľa <http://what-when-how.com/molecular-biology/myristoylation-molecular-biology/>

Tento typ kovalentnej väzby bol prvý krát popísaný u lipofilínu (PLP1). Ale ako bolo zistené deacetylácia nespôsobí výraznejšiu stratu funkcie, preto je pravdepodobné, že palmitoylová skupina, nie je zodpovedná za zbalenie ale iba za spevnenie proteínu (Bizzoero a Lees 1986). Predikcia palmitoylácie je všeobecne rozšírená, niekoľkonásobná palmitoylácia bola pozorovaná napr. u pľúcneho proteínu CP-C (Gustafsson *et al.* 1997).

2.2 UPF0057 (PMP3) rodina proteínov u rôznych organizmov

UPF0057 (PMP3) rodina proteínov býva označovaná tiež ako SHP rodina, z anglického názvu The (Salt or Low Temperature) **S**tress-induced **H**ydrophobic **P**eptide Family, čo sa dá voľne preložiť ako rodina hydrofóbných proteínov indukovaných počas soľného stresu alebo pri nízkej teplote. Jedná sa o zatiaľ bližšie necharakterizovanú proteínovú rodinu, ktorej členovia sa nachádzajú u baktérií, kvasiniek, rastlín a zástupcovia boli objavení aj u *Ceanorhabditis*. Obyčajne sa vyskytujú vo viacerých homológoch. Štúdium tejto rodiny prebieha najmä na úrovni transkripcie, pozorovaním mRNA.

UPF0057 (PMP3) proteíny sú malé, silne hydrofóbné proteíny. Väčšina členov má veľkosť okolo 54 aminokyselín, ale pohybuje sa od 52 do 140 aminokyselín (5,8 až 15,6 kDa). Majú predikované dve transmembránové domény a dlhú signálnu sekvenciu, ktorá tvorí takmer celý proteín TMHMM Server v 2.0.

2.2.1. Kvasinkové PMP3 gény

a) *Saccharomyces cerevisiae*

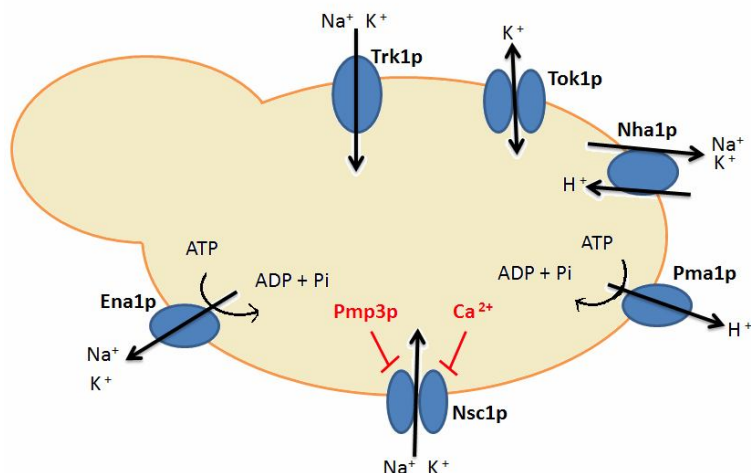
Pri mikrosekvenácii chloroform-metanolového extraktu proteínov nachádzajúcich sa v cytoplazmatickej membráne u *S. cerevisiae*, boli objavené dva hydrofóbné izoproteíny pomenované Pmp1p a Pmp2p, názov je odvodený z anglického **P**lasma **M**embrane **P**roteolipid, čiže proteolipidy plazmatickej membrány (Navarre *et al.* 1992, 1994). Tieto dva veľmi podobné proteíny tvoria väčšinu membránových proteolipidov v bunke a ich gény sú si identické na 92%. Pmp1p funguje ako regulačná podjednotka cytoplazmatickej H⁺ATPázy (Pma1p). Má jeden transmembránový hélix a pozitívne nabitý C-koniec, ktorý interaguje s fosfatidylserínmi. Pmp2p má taktiež jeden transmembránový hélix a tiež čiastočne ovplyvňuje aktivitu Pma1p proteínu. U týchto proteolipidov je predikovaná acetylácia kyselinou palmitovou a izoelektrický bod 12. Ako v poradí tretí kvasinkový proteolipid plazmatickej membrány bol objavený Pmp3p proteín (Navarre a Gofeau 2000). Jeho obsah bol menší ako 10 % z celkového proteolipidického zloženia extraktu. Novoobjavený proteolipid Pmp3p však nevykazuje žiadnu podobnosť s predtým popísanými Pmp proteínmi. Má

predikované dva transmembránové hélíxy a že jeho prítomnosť či neprítomnosť nijakým spôsobom neovplyvňuje aktivitu Pma1p. Izoelektrický bod má 4 a nemá predikciu pre palmitoyláciu. Podľa sekvenčnej podobnosti sa *PMP3* gén zaraďuje k skupine rastlinných génov, ktorých expresia je indukovaná počas soľného stresu alebo pri nízkej teplote.

PMP3 gén sa nachádza na IV chromozóme medzi génmi YDR275w a MTH1 (YDR277c) v pozícii od 1013467 do 1013634. Northern blot analýza ukázala, že sa jedná o hojne zastúpený transkript veľký približne 500 bp. Pred génom vo vzdialenosti 54 bp sa nachádza TATA box (TATAATA) (Navarre a Goffeau 2000).

Pri skúmaní Pmp3p pracovali Navarre a Goffeau (2000) s kvasinkovým kmeňom *pmp3Δ*, ktorý mal deletovaný *PMP3* gén. Zistili, že v *pmp3Δ* bunkách je počas inkubácie v 1M NaCl takmer dvakrát vyššia hladina Na⁺ v porovnaní s rodičovskými bunkami (*PMP3*). Porovnávaním rastových rýchlostí u mutantov, ktorým chýbali Na⁺ pumpy (Ena1p/Pmr2p Na⁺- ATPáza a Nha1 Na⁺/H⁺ antiportér) a mali prítomný resp. neprítomný *PMP3* gén, zistili, že Pmp3p neovplyvňuje ani jeden z doteraz známych systémov podieľajúcich sa na uvoľňovaní sodíka z bunky. Trojitá delécia (*ena1Δ nha1Δ pmp3Δ*) v týchto génoch participujúcich na homeostáze Na⁺ vyvolala výrazné zníženie prežívania v médiu so zvýšenou koncentráciou Na⁺.

Navarre a Goffeau (2000) prekvapivo zistili, že u buniek *pmp3Δ*, ktorým chýbali transportéry pre príjem draslíka Trk1p a Trk2p, sa čiastočne obnovil rast na médiu s nízkou koncentráciou KCl rast tohto kmeňa sa dokonca obnovil aj v prostredí s nízkym pH. Taktiež pozorovali zvýšenú citlivosť *pmp3Δ* buniek k ďalším rôznym toxickým katiónom, k hygromycínu B a k tetrametylamóniu. Pozorovali, že po pridaní 10 mM CaCl₂ sa u *pmp3Δ* kmeňa obnovoval pôvodný fenotyp, čo viedlo k hypotéze, že by Pmp3p inhiboval zatiaľ neznámy kanál (**N**on **s**pecific **c**hannel) Nsc1p, prenášajúci Na⁺ a K⁺ (Obr. 2.2.). Ďalej usúdili, že hlavný vplyv delécie *PMP3* génu na bunku je, že vyvoláva hyperpolarizáciu cytoplazmatickej membrány.



Obrázok 2.2.: Hypotetický model funkcie Pmp3p

Erez a Kahana (2002) pracujúci s proteínovými kinázami Sky1p a Ptk2p si všimli podobnosť vo zvýšenom prežívaní kmeňa *trk1Δ trk2Δ* na KCl médiu po delécii génu *Pmp3p* s tým, čo pozorovali v tomto kmeni po delécii nimi skúmaných proteínkináz. Preto sa rozhodli overiť, či *Pmp3p* nie je súčasťou nimi skúmanej regulačnej dráhy zahrňujúcej *Sky1p* a *Ptk2p*. Zistili, že delécia *PMP3* u *trk1,2Δ* buniek nepatrne zvýši prežívanie na spermíne, čo je v súladne s pozorovaním u *sky1Δ* resp. *ptk2Δ* kmeňov, ale úplne obnoví čiastočnú stratu rastu u *trk1,2Δ* na LiCl. Ďalej pozorovali, že pridanie *sky1Δ* delécie do *trk1,2Δ pmp3Δ* kmeňa umožní prežívanie buniek na 0,4 mM spermíne, ale nejakým spôsobom aj zruší získanú rezistenciu na chlorid lítny (Tab. 2.1.). Z týchto dát usúdili, že *Pmp3p*, *Sky1p* a *Ptk2p* nie sú súčasťou jednej MAP dráhy.

Kmeň	0,4 mM spermín	25 mM LiCl
BY4742	+++	+++
<i>pmp3Δ</i>	+++	+/-
<i>trk1,2Δ</i>	-	++
<i>trk1,2Δ sky1Δ</i>	+	-
<i>trk1,2Δ pmp3Δ</i>	++	+++
<i>trk1,2Δ sky1Δ pmp3Δ</i>	+++	++

Tabuľka 2.1.: Zhrnutie fenotypového prejavu pri pokuse s prežívaním v stresových podmienkach. +++ - neovplyvnené prežívanie, ++ - intermediálny fenotyp, a +- označuje čiastočné prežívanie.

b) *Schizosaccharomyces pombe*

Gén *pmp3*⁺ nachádzajúci sa u *Sch. pombe* kóduje proteín s veľkosťou 50 aminokyselín, ktorý má 47% identitu a 76% similaritu s *PMP3* génom *S. cerevisiae*. Wang a Shiozaki (2006) sa pri jeho skúmaní zamerali na regulačné transkripčné faktory. Fyziológia buniek, ktoré nemali *PMP3* gén, pripomínala bunky, ktorým chýbala Spc1-Atf1 regulačná dráha. Predpokladali, že Pmp3p by mohol byť (spolu so Sod2p) ďalším proteínom tejto dráhy umožňujúcim bunke kationovú rezistenciu. Vychádzali z údajov, ktoré boli známe u *Saccharomyces*, že zvýšená senzitivita k iónom je spôsobená hyperpolarizáciou membrány. U *Sch. pombe* sa podarilo preukázať len citlivosť k hygromycínu B. Rast *pmp3*⁺ Δ buniek v prítomnosti Na⁺, Li⁺, Cs⁺ TI⁺, Ca₂⁺ či na tetrametylammonium bol porovnateľný s nemutovaným kmeňom. Nezistili žiadnu zmenu membránového potenciálu u *pmp3*⁺ Δ buniek. Na rozdiel od *S. cerevisiae* pozorovali zvýšenú expresiu *PMP3* génu počas teplotného šoku, osmotického (2 M sorbitol) a oxidačného (0,5 mM H₂O₂) stresu. Expresia *PMP3* génu u kmeňov, ktoré mali deletované SPC1 a/alebo ATF1 transkripčné faktory bola len na bazálnej úrovni. Autori zistili, že Pmp3p u *Sch. pombe* je regulovaný kinázami stresovej (Mitogen - activated protein kinase) MAPK dráhy, ale nakoľko u *pmp3*⁺ Δ nenastalo zvýšenie membránového potenciálu, zapája sa iným mechanizmom ako bol pozorovaný u *S. cerevisiae*.

2.2.2. Bakteriálne PMP3 homológne gény

Homológy *PMP3* génu sa vyskytujú taktiež u baktérií, ich prítomnosť bola zistená u *Escherichia coli* a u *Pseudomonas aureginosa*. O funkcii Pmp3p v týchto mikroorganizmoch však neboli dosiaľ zverejnené žiadne práce.

a) *yqaE* u *E. coli*

Na základe sekvenčnej podobnosti bol u baktérie *E.coli* objavený gén *yqaE* (Perna *et al.* 2001). De Lay a Gottesman (2008) pri skúmaní malej nekódujúcej regulačnej RNA (CyaR sRNA), ktorá je pod kontrolou globálneho regulátora Crp (cAMP receptorový proteín, CAP) sa zistili ich prepojenie na expresiu *yqaE* génu. Crp je dimér viažuci sa na DNA prostredníctvom štruktúry hélix-otočka-hélix a aktivuje množstvo proteínov zapojených v transporte aj katabolizme cukrov a mastných kyselín. V podmienkach, keď je prítomný cAMP (médium bez glukózy),

Crp aktivuje aj ďalšie transkripčné faktory, medzi ktoré patrí práve aj CyaR sRNA. Táto malá regulačná RNA negatívne ovplyvňuje prepis viacerých génov na posttranskripčnej úrovni. Analýzy microarray a Northern blot odhalili výraznejšiu zmenu v 15 génoch, pričom najväčší rozdiel bol pozorovaný u štyroch, ktoré sú prekvapivo zapojené v rôznych bunkových procesoch - ompX, v adherencii (prilnavosti) buniek; nadE v NAD biosyntéze; luxS v *quorum sensing* a yqaE je homológ *PMP3* génu s neznámou funkciou. Za normálnych okolností sa CyaR páruje s oblasťou dlhou približne 9 nukleotidov, kde sa viaže ribozóm, avšak v prípade yqaE génu sa táto oblasť nachádza priamo za ŠTART kodónom a dokonca zmena troch nukleotidov vedie len k čiastočnému uvoľneniu CyaR. Celkový pokles hladiny yqaR mRNA v bunkách, ktoré normálne prepisovali CyaR v porovnaní s tými, ktoré mali jeho prepis blokový, bol takmer 9 krát nižší, s čoho sa dá usudzovať dôležitosť tohto malého proteolipidu.

2.2.3. Rastlinné Pmp3p homológy

Zasolovanie poľnohospodárskych pôd je jedným z najrozšírenejších procesov degradácie pôd na svete. Sekundárne vzniká ako dôsledok intenzívneho zavlažovania. Zvýšenie koncentrácie solí v prostredí škodí rastlinám viacerými spôsobmi: zvyšuje osmotický tlak, narúša iónovú rovnováhu a dochádza k toxickému pôsobeniu soli na rastlinu. Na silne zasolených pôdach v extrémnych prípadoch môže nastať zníženie vodného potenciálu v takej miere, že bude nižší ako vodný potenciál koreňov, čím sa zablokuje príjem vody rastlinou. Soľ ostáva dlhodobo v povrchových vrstvách pôdy a z tohto dôvodu klesá úrodnosť. Zvýšením odolnosti poľnohospodárskych plodín sa vedci snažia zabrániť zníženiu úrodnosti na takto postihnutých pôdach. Skúmajú sa gény zodpovedné jednak za rýchlu stresovú odpoveď, jednak aj tie, čo sú potrebné pre dlhodobé prežívanie v nepriaznivých podmienkach.

Na štúdium génov umožňujúcich prežívanie rastlín na zasolených pôdach sa používa viacero modelových organizmov. Jednotlivé rastlinné druhy, ktoré majú deletovaný *PMP3* gén, vykazujú okrem iného aj rôznu úroveň prežívania na zasolených pôdach, počas teplotného stresu a pri dehydratácii. Napriek vysokej homológii týchto proteínov (Obr. 2.3.) nie je vždy ich čas expresie a lokalizácia v pletivách rastlín rovnaká.

RCI2A	HP	S	N	C	E	I	I	A	I	L	L	P	P	L	G	V	C	F	R	K	G	C	T	V	E	F	L	I	C	L	V	L	T	L	G	Y	V	P	G	I	I	Y	A	I	Y	W	I	V	F	Q	H	R	E	E	Y	F	E	D	E	F	R	P	I	F	S	A						
RCI2B	M	S	T	A	T	F	V	D	I	I	I	A	I	L	L	P	P	L	G	V	F	L	R	F	G	C	G	V	E	F	W	I	C	L	V	L	T	L	G	Y	I	P	G	I	I	Y	A	I	Y	V	L	T	K																			
BLT101	H	R	S	A	T	F	I	E	V	I	L	A	I	L	P	P	V	G	V	E	L	R	Y	G	L	R	V	E	F	W	I	C	L	L	L	T	L	G	Y	I	P	G	I	I	Y	A	V	V	L	V	R																					
ESI3	H	G	S	A	T	V	L	E	V	I	L	A	I	L	P	P	V	G	V	E	L	R	Y	K	L	G	V	E	F	W	I	C	L	L	L	T	L	G	Y	I	P	G	I	I	Y	A	V	V	L	V	R																					
FCOR1	H	G	R	A	T	C	V	D	V	I	A	I	L	P	P	L	G	V	F	L	R	F	G	C	G	V	E	F	W	I	C	L	L	T	C	G	T	F	L	G	S	S	H	L	S	G	P	S	P	S	D	D	O	P	L	V	L	H	F	L	W	S	Y	E	C	E	G	H	I	R	P	H

Obrázok 2.3.: Porovnanie vybraných rastlinných zástupcov PMP3 rodiny. Zdroj ClustalW

a) ESI3 gén u *Lophopyrum elongatum*

Patric Gulick *et al.* (1994) publikovali krátky článok, v ktorom podrobnejšie opisujú prvého známeho člena budúcej PMP3 rodiny – ESI3, nachádzajúceho sa u asi meter vysokej trávy *Lophopyrum elongatum*, rastúcej na slaných, flovitých pôdach, ktoré v lete vysychajú.

ESI3 patrí k ESI (**E**arly salt **S**tress **I**nduced) rodine génov (Gulick a Dvořák 1990). Táto rodina má jedenásť členov a *ESI3* má druhú najvyššiu hladinu expzie po ošetrení rastliny 250 mM roztokom chloridu sodného. Zvýšenie transkripcie nastáva aj po ošetrení chloridom draselným, kyselinou abcisovou a osmotickým šokom sprostredkovaným manitolom (Galvez *et al.* 1993).

Zvýšená hladina *ESI3* mRNA bola pozorovaná v koreni rastlín, no nebola nezistená žiadna zmena transkripcie u buniek výhonku. Kultivar ktorý nedokáže prežívať na pôdach so zvýšenou hladinou soli, mal dvakrát nižšiu úroveň mRNA transkriptu *ESI3* génu (Gulick *et al.* 1994).

b) *Blt101* gén u *Hordeum vulgare*

Počas prehľadávania cDNA knižnice, pripravenej z koreňov jačmeňa (*Hordeum vulgare*) rastúceho v chladnom prostredí, bol objavený ďalší homológ *PMP3* génu - *blt101* (Goddard *et al.* 1993). Pearce *et al.* (1998) zistili, že gén *blt101* sa u trojtýždňových rastlín prepisuje nie len v koreni, ale aj v steblo a v listoch a že je špecifický len pre chladový šok. Autori nepozorovali zvýšenie transkripcie počas dehydratácie a ani po postriekaní listov kyselinou abcisovou (ABA).

Koike *et al.* (2008) chceli odhaliť chladovú špecificitou jačmenného *blt101p*. Porovnávaním promótorových oblastí zistili, že jačmeň na rozdiel od pšenice má v tejto oblasti tzv. Xmet element. Pri stresových testoch s päť dní starými rastlinami zistili, že sa jačmenný *blt101* gén prepisoval aj počas sucha, v prítomnosti ABA a aj počas solného stresu. Pozorované rozdiely medzi ich výsledkami a predchádzajúcim pozorovaním (Goddard *et al.* 1993; Pearce *et al.* 1998) si vysvetľujú rôznym vekom

skúmaných rastlín. Keďže väčšina pokusov sa robí za tých istých podmienok, toto zistenie ponúklo nový pohľad na Pmp3p ako na komplexnejší stresový faktor, ktorý závisí taktiež od stavu vývoja rastliny.

c) *Fcor1* gén u *Fragaria*

Jahoda (*Fragaria*) patrí medzi modelové organizmy čeľade *Rosaceae*. Rôzne kultivary jahody sa používajú na štúdium najmä prežívania rastlín v chladových podmienkach.

Pri prehľadovaní cDNA knižnice jahôd, ktoré boli aklimatizované na chladnejšie podmienky Dong *et al* (1997) pozorovali výraznú zmenu v hladine transkriptov u troch génov a nazvali ich Fcor 1-3 (**F**ragaria **c**old-**r**egulated) gény. Fcor1 sa začal akumulovať hneď od začiatku teplotného šoku a maximum dosiahol v druhý pozorovaný deň. Fcor2 mal najvyššiu hladinu prepisu po dvoch týždňoch rastu v chlade a hladina Fcor3 transkriptu prudko klesla počas prvých 24 hodín. *FCOR3* je gén kódujúci podjednotku fotosystému I, Fcor2p nevykazuje žiadnu podobnosť s doteraz známymi proteínmi a práve *FCOR1* je homológom *PMP3* génu.

FCOR1 patrí ku génom, ktoré sa začnú mohutne prepisovať v koreňoch a v menšej miere v listoch, po prenesení rastlín z 21°C do 3°C. No významná hladina tohto transkriptu sa udržuje počas celej dlhodobej chladovej kultivácie. Zistilo sa, že hladina mRNA Fcor1 je vyššia u tých kultivarov, ktoré lepšie prežívajú chladnejšie podmienky. Aj keď je známe, že väčšina génov regulovaných nízkou teplotou sú indukované aj počas vodného stresu, kyselinou abcisovou alebo zvýšeným obsahom solí v pôde, za týchto podmienok nebola pozorovaná žiadna zmena v prepise *FCOR1* génu. Zatiaľ nie je známa príčina, prečo sa Fcor1p ako jediný z rodiny *PMP3* vyskytuje len počas chladového šoku a nie aj za iných stresových podmienok.

d) *RCI2A* a *RCI2B* gény u *Arabidopsis thaliana*

U *Arabidopsis thaliana* sa vyskytujú hneď dva gény podobné *PMP3*, označené *RCI2A* a *RCI2B* pretože boli identifikované počas v poradí druhého experimentu zameraného na hľadanie génov prepisujúcich sa s nižšou hladinou pri kultivácii v chlade - **R**are **C**old **I**nducible genes. Vznikli tandemovou duplikáciou a vykazujú 78% sekvenčnú homológiu, no ich regulačná oblasť je natoľko odlišná, že za určitých podmienok majú rozdielnú expresiu (Medina *et al.* 2001).

Transport Sna2p z endoplazmatického retikula (ER) do vakuol prebieha po dvoch nezávislých dráhach využívajúcich klatrínové adaptorové proteíny (AP). V C-koncovej doméne Sna2p proteínu boli zistené dva tyrozínové motívy Y₇₅XXØ a Y₆₅XXØ (Ø znamená hydrofóbná aminokyselina (AK), X ľubovoľná AK), umožňujúce jeho uvoľnenie z endoplazmatického retikula a transport do Golgiho aparátu (GA) a zároveň pre relokalizáciu z GA do vakuolárnej membrány.

Motív Y₆₅XXØ je rozoznávaný adaptorovými proteínmi AP-1 komplexu. Touto cestou sa klatrínom obalené mikrovezikuly odčlenenia z GA a spájajú s endozómami. Následne prebieha transport do vakuolárnej membrány. AP-3 dráha rozoznávajúca druhý signál, Y₇₅XXØ motív, prenáša proteíny priamo z GA do vakuoly bez účasti endozómov (Renard *et al.* 2010).

Sna3p proteín nesie na svojej C-koncovej doméne diprolínový PPAY motív, ktorý sa po polyubiquitinácii priamo naväzuje na tryptofán-obsahujúcu doménu (WW doménu) Rsp5p proteínu. Takto naviazaný prechádza MVB (Multivesicular bodies) dráhu, ktorá využíva endozomálne proteíny ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) komponenty triedy E, čím prenáša vezikuly z GA cez endozómy do vakuol. Transport cez vakuolárnu membránu do lumen prebieha po ďalšom označení Sna3p ubiquitínmi. Na rozdiel od iných proteínov tejto dráhy, pre translokáciu nie je nutná deubiquitinácia Doa4p proteínom (Amerik *et al.* 2006; McNatt *et al.* 2007).

Na C-koncovej doméne proteín Sna4p obsahuje dva rôzne motívy. Rovnako ako Sna3p má prolínový PPPY motív sprostredkujúci priamy kontakt s WW doménou Rsp5p. A tak nasmeruje Sna4p do lumenu vakuol cez MVB dráhu využívajúc ESCRT komponenty triedy E. Na rozdiel od Sna3p je pre prechod z vakuolárnej membrány do lumen potrebný deubiquitylačný enzým Doa4p a dileucínový motív ETPLL transportujúci Sna4p z ER cez dráhu alkalickej fosfatázy, (**A**lcalic **p**hosphatase) ALP dráhu, do vakuolárnej membrány. Táto dráha využíva AP-3 adaptorové proteíny (Pokrzywa *et al.* 2008).

Pri narušení smerovacích motívov, nastávala čiastočná relokalizácia všetkých pozorovaných členov do lipidických partikul. Preto môžeme predpokladať, že špecifický motív pre transport do lipidických partikul sa nachádza v homológnej N-terminálnej oblasti a je podriadený signálom z C-konca proteínov. Pmp3p/Sna1p neobsahuje žiadnu C-terminálnu doménu, preto sa bude pravdepodobne dostávať do

plazmatickej membrány cez lipidické partikuly. (Reggiori a Pelham 2001; Renard *et al.* 2010)

Autori sa vo svojich prácach nezamýšľajú nad možnou funkciou proteínov kvasinkovej SNA rodiny.

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1. Materiál

3.1.1. Použité kmene

V tejto práci sme použili kmene uvedené v tabuľke 3.1. Základným rodičovským kmeňom, od ktorého boli všetky ostatné odvodené, bol *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 MAT α zakúpený v Euroscarf. Jedná sa o bežne používaný laboratórny kmeň, ktorý je auxotrofný v štyroch aminokyselinách (histidín, uracil, leucin a lyzín), čo umožňuje tvorbu konštruktov vložení transformlačnej kazety obsahujúcej selekčný marker.

Názov	Genotyp	Zdroj
BY4742	MAT α , his3, ura3. leu2, lys2	Euroscarf
BY-pmp3 Δ	BY4742 pmp3 Δ ::URA3	Euroscarf
BY-Ato1-GFP	BY4742 Ato1-yEGFP1	M. Řičicová
BY-Ato2-GFP	BY4742 Ato2-yEGFP1	M. Řičicová
BY-Ato3-GFP	BY4742 Ato3-yEGFP1	M. Řičicová
BY-pmp3 Δ -ATO1-GFP	BY4742 pmp3::URA3 ATO1-GFP	D. Strachotová
BY-pmp3 Δ -ATO2-GFP	BY4742 pmp3::URA3 ATO2-GFP	Pripravené v práci
BY-pmp3 Δ -ATO3-GFP	BY4742 pmp3::URA3 ATO3-GFP	Pripravené v práci
BY-Pmp3-HA	BY4742 PMP3-6HA	Pripravené v práci
BY-Pmp3-GFP-C	BY4742 PMP3-yEGFP1	Pripravené v práci
BY-Pmp3-GFP-N	BY4742 yEGFP3-PMP3	Pripravené v práci
BY-ycp4 Δ	BY4742 ycp4::KAN	Pripravené v práci

Tabuľka 3.1.: Kmene Saccharomyces cerevisiae použité v práci

3.1.3. Použité primery

Primery využité pri tvorbe a overovaní konštruktov sú uvedené v tabuľke 3.3. Sekvencia označená sivou farbou je homológa k sekvencii nachádzajúcej sa v okolí génu a bola použitá pre integráciu kazety

Názov	Sekvencia	Pre kmeň
pKT Pmp3 F	TTGGCTTGGTCCCAGGTATGCTAT ATGCCTTGTACATTGTCCTACAAG ATGGTGACGGTGCTGGTTTA*	BY-Pmp3-GFP-C
pKT-Pmp3 R	AATACTGCTTCCTTATTTCAATTTGA TAGTTACTTTCGTTTATTGAATGAG CTCGATGAATTCGAGCTCG*	BY-Pmp3-GFP-C
Pmp3 ext F	GGAAGGTCCTCTGAATCG	BY-Pmp3-GFP-C BY-Pmp3-HA
yEGFP Int R	CTGGACCATCACCAATTG	BY-Pmp3-GFP-C BY-pmp3-Ato2-GFP BY-pmp3-Ato2-GFP
pOM PMP3 F	AATTGATTATACATTTTGA ACTAA ACAGCACAGCACAATACAACAATG TGCAGGTCGACAACCCTTAAT	BY-Pmp3-GFP-N
pOM PMP3 R	GACTGGTGGTAAGAAAAGGGATA ATATAATGTTAATGATCTTGGCAG AATCGCGGCCGCATAGGCCACT	BY-Pmp3-GFP-N
PMP3 ext R	CGAACATGTTGATACCGTTTC	BY-Pmp3-GFP-N BY-Pmp3-HA
Ura int R	GGTATCAACGTCAATTGATG	BY-Pmp3-GFP-N
yEGFP int F	GACGGTAACTACAAGACC	BY-Pmp3-GFP-N
pYM Pmp3 F	TTGGCTTGGTCCCAGGTATGCTAT ATGCCTTGTACATTGTCCTACAAG AT CGTACGCTGCAGGTCGAC	BY-Pmp3-HA
pYM Pmp3 R	ACTGCTTCCTTATTTCAATTTGATAG TTACTTTCGTTTATTGAATGAGCtta ATCGATGAATTCGAGCTCG	BY-Pmp3-HA

Názov	Sekvencia	Pre kmeň
pUG YCP4 F	AGAGAGTAAACAAAACAATACAG ACTCAATTGAAGCACTATAAGACA GCTGAAGCTTCGTACGC	BY-ycp4Δ
pKT-YCP4 R	GCTAAAACGTCTATGTGCCCGTAG GTAGAGTAAGTAATTATCGCAATC TTTACGCGGCCGCATAGGCCACT	BY-ycp4Δ
YCP4 ext F	CACTATTCGCGCAGCTAGTTG	BY-ycp4Δ
YCP4 int R	CTCTTAGCCGCATCAGAAGTAG	BY-ycp4Δ
Kan int R	GGATGTATGGGCTAAATG	BY-ycp4Δ
BY-pmp3-Ato2 F	TACATTATGGTCCATCCATTCGCAT TACCTAGCAATGATAAGGTGTTCT TCGGTGACGGTGCTGGTTTA	BY-pmp3-Ato2-GFP
BY-pmp3-Ato2 R	TTAGAATATATAATAGGGGTAAAA GTTATTTTAGCCTGCACTTTTGTGT TTTCGATGAATTCGAGCTCG	BY-pmp3-Ato2-GFP
ATO2 F	TTTGAAGTTCTTGACTACCC	BY-pmp3-Ato2-GFP
BY-pmp3-Ato3 F	CCTTCAAATTCTTATTTAGCCTTCA GGGCGCACACAATGCCAAATGCTC CTGGTGACGGTGCTGGTTTA	BY-pmp3-Ato3-GFP
BY-pmp3-Ato3 R	TTATTAAATCATTTTAATGTTTTAT AAGTTTTGTTTTTCATTCATACCC TTTCGATGAATTCGAGCTCG	BY-pmp3-Ato3-GFP
ATO3 F	CGGCTACAAACATAACTCCA	BY-pmp3-Ato3-GFP

Tabuľka 3.3.: Integračné a overovacie primery pre konštrukciu kmenov BY-Pmp3-GFP-C, BY-Pmp3-GFP-N a BY-Pmp3-HA a BYycp4Δ

* sivou sú označené úseky homológne k sekvenciám v oblasti génov

3.1.4. Špeciálne prístroje

Drtič buniek pre väčšie objemy - B.Braun Apparatebau Melsungen (Nemecko)

Fluorescenčný mikroskop - Leica DMR (Nemecko)

FastPrep® FP120 (drtič buniek) - Thermo Savant (USA)

Mini-PROTEAN 3 - BIO-RAD (USA)

Ultracentrifúga Optima L-100K Beckman (Nemecko) – rotor Swi40

Zdroj DNA elektroforézy - E-C Apparatus Corporation (USA)

Zdroj proteínovej elektroforézy - BIO-RAD (USA)

3.1.5. Kultivačné médiá

Na prípravu kultivačných médií bola použitá destilovaná voda.

GMA pevné (pH 5)

1% (w/v)	kvasničný autolyzát (AES laboratoire, Francúzko)
3% (w/v)	glycerín (Lach-Ner, ČR)
10 mM	CaCl ₂ (Sigma-Aldrich, USA)
2% (w/v)	agar (Kulich, ČR)

Minimálne médium (MM)

2% (w/v)	agar (Kulich, ČR)
2% (w/v)	glukóza (Kulich, ČR)
0,5% (w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Lach-Ner, ČR)
0,1% (w/v)	KH ₂ PO ₄ (Lach-Ner, ČR)
0,05% (w/v)	MgSO ₄ (Lach-Ner, ČR)
20 µg	aminokyseliny*) na 1 ml média
50 µg	bázy*) na 1 ml média
0,1% (v/v)	Wickerhamov roztok (Sigma-Aldrich, USA)
	0,2 mg biotín
	200 mg inozitol
	20 mg riboflavín
	40 mg thiamín
	20 mg kyselina p-aminobenzoová
	40 mg pantotenát vápenatý
	40 mg kyselina nikotínová

0,2 mg kyselina listová

100 ml voda

*) *S. cerevisiae* BY4742 je auxotrof pre aminokyseliny leucín, lysín, histidín a bázu uracil

Skladovacie médiu pre kvasinky

1% (w/v)	kvasničný autolyzát (AES laboratoire, Francúzko)
2% (w/v)	peptón (Imuna, SR)
10% (w/v)	glukóza (Kulich, ČR)
60% (w/v)	glycerín (Lach-Ner, ČR)

YEPG tekuté

1% (w/v)	kvasničný autolyzát (AES laboratoire, Francúzko)
2% (w/v)	glukóza (Kulich, ČR)
1% (w/v)	peptón (Imuna, SR)

YEG tekuté (pH 5)

1% (w/v)	kvasničný autolyzát (AES laboratoire, Francúzko)
2% (w/v)	glukóza (Kulich, ČR)

YEPG pevné

1% (w/v)	kvasničný autolyzát (AES laboratoire, Francúzko)
2% (w/v)	glukóza (Kulich, ČR)
1% (w/v)	peptón (Imuna, SR)
2% (w/v)	agar (Kulich, ČR)

Farebný indikátor pH

10 mg BKP (brómkresolový purpur) (Sigma-Aldrich. USA) na 1 ml 96% etanolu

Konečná koncentrácia v kultivačnom médiu 0,1mg na 1 ml média

3.1.6. Roztoky

Ak nie je uvedené inak roztoky a média boli pripravené z destilovanej vody upravenej prístrojom Ultrapur (Watrex). Demineralizovaná (demi) voda bola upravená rovnakým prístrojom.

Jednoduché roztoky:

10 % (w/v)	SDS (Serva, SRN)
7,5 M	Octan amónny CH ₃ COONH ₄ (Lach-Ner, ČR)
10% (w/v)	kyselina citrónová (Lach-Ner)
1 M	LiAc (CH ₃ COOLi) (Serva, SRN)
1000x riedený	Etídium bromid (Serva, SRN)
1M Tris-HCl	Tris bázy (Serva, SRN)
0,5M EDTA-NaOH	Na ₃ EDTA (Serva, SRN)
1% (w/v) agarózový gél	agaróza (Lach-Ner, ČR) v 0,5x TBE pufre
1% (v/v)	kyselina octová (Penta, ČR)

Elfo Running pufr (pH 8,3)

15 g/l	TRIS (Serva, SRN)
72 g/l	glycín (Lach-Ner, ČR)
5 g/l	SDS (Serva, SRN)

Farbiaci roztok pre PVDF membránu

100 ml	metanol (Lach-Ner, ČR)
25 ml	konc. kys. octová (Penta, ČR)
0,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, SRN)
125 ml	voda

Fixačný roztok 1 použitý pri farbení proteínov striebrom

40 ml	etanol (Lach-Ner, ČR)
10 ml	kyselina octová (Penta, ČR)
50 ml	demi voda

Fixačný roztok 2 použitý pri farbení proteínov striebrom

50% (v/v)	glutaraldehyd (Sigma-Aldrich. USA)
0,3% (v/v)	etanol (Lach-Ner, ČR)

0.0003g	CH ₃ COONa (Penta, ČR)
0,125g	K ₂ S ₄ O ₆ (Penta, ČR)

Homogenizačný roztok pri izolácii plazmatických membrán (pH 7,5)

10 mM	Tris (Serva, SRN)
1 mM	EDTA (Serva, SRN)
1 mM	MgSO ₄ (Lach-Ner, ČR)

Lyzogénny pufoer (pH 7,4)

10mM	MES-Tris (Serva, SRN)
12% (w/v)	Ficoll PM 400 (Sigma-Aldrich, USA)
0,2 mM	EDTA (Serva, SRN)
1 mM	fenylmetylsulfonyl fluorid PMSF a PIC
90 mM	kyselina boritá (Serva, SRN)

Mix I (pH 8)

50 µl	1M Tris (Serva, SRN)
20 µl	0,5 M EDTA (Serva, SRN)
3 µl	merkptoetanol (Calbiochem, SRN)
1 mg	zymolyáza (Sigma-Aldrich, USA)
1 ml	voda

Odfarbovací roztok pre PVDF membránu

400 ml	metanol (Lach-Ner, ČR)
100 ml	konc. kys. octová (Penta, ČR)
500 ml	voda

PBS-pufoer (pH 7,4)

9 g/l	NaCl (Penta, ČR)
3,58 g/l	Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O (Penta, ČR)

- Tween 20 v PBS-pufri: 0.05 %
- Protílátky v PBS-pufri: 0.1%
- Kazeín v PBS-pufri: 1%

Pufor na rozbíjanie buniek pri izolácii plazmatických membrán (pH 7,5)

250 mM	sacharóza (Serva, SRN)
50 mM	Tris (Serva, SRN)
5 mM	EDTA (Serva, SRN)

Pufor na rozbíjanie buniek pri izolácii proteínov z lyzátu (pH 6,0)

1,9 ml	10mM Mes (Serva, SRN)
80 µl	Pic
20 µl	AEBSF
10 µl	PMSF

Sféroplastový pufor

1,2 M	sorbitol (Penta, ČR)
20 ml	fosfátový pufor (Sigma-Aldrich, USA)
100 ml	voda

Separáčny pufor na prípravu separačného gélu (pH 8,8)

1,5 M	Tris (Serva, SRN)
0,4%	SDS (Serva, SRN)

Separáčny pufor 1 pre izoláciu lipidických partikul (pH 6,9)

10 mM	MES-Tris (Serva, SRN)
8% (w/v)	Fikoll PM 400 (Sigma-Aldrich, USA)
0,2 mM	EDTA (Serva, SRN)
1 mM	PMSF a PIC

Separáčny pufor 2 pre izoláciu lipidických partikul (pH 6,9)

10 mM	MES-Tris (Serva, SRN)
0,25 M	sorbitol (Penta, ČR)
0,2 mM	EDTA (Serva, SRN)
1 mM	PMSF a PIC

Separáčny pufor 3 pre izoláciu lipidických partikul (pH 6,9)

10 mM	MES-Tris (Serva, SRN)
0,15 M	sorbitol (Penta, ČR)
0,2 mM	EDTA (Serva, SRN)
1 mM	PMSF a PIC

Stříbro obsahující roztok použitý při zviditelňování proteinů

0,1g	AgNO ₃ (Sigma-Aldrich. USA)
12,5μl	Formaldehyd (Lach-Ner, ČR)
50 ml	demi vody

TBE pufoř 50x (pH 8)

40 mM	Tris (Serva, SRN)
2 mM	EDTA (Serva, SRN)

TGM-pufoř

3,025 g	TRIS (Serva, SRN)
14,42 g	glycín (Lach-Ner, ČR)
150 ml	metanol (Lach-Ner, ČR)
850 ml	voda

Vyvolávací roztok použitý při farbení proteinů stříbrem

1,5g	K ₂ CO ₃ (Sigma-Aldrich. USA)
38 mg	Na ₂ S ₂ O ₃ (Sigma-Aldrich. USA)
7,5μl	Formaldehyd (Lach-Ner, ČR)
50 ml	demi vody

Zaostrovací pufoř na přípravu zaostrovacího gélu (pH 6,8)

0,5 M	Tris (Serva, SRN)
0,4%	SDS (Serva, SRN)

3.1.7. Materiál pre prácu s DNA a proteínmi

Štandard molekulových hmotností pre DNA elektroforézu - GeneRuler DNA Ladder MIX SM0333 (MBI Fermentas, USA)

PPP Master Mix (Top Bio, ČR)

PCR H₂O (Top Bio, ČR)

ssDNA – Salmon sperm (BioLabs)

Štandard molekulových hmotností pre proteínovú elektroforézu: Precision Plus

Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad, USA)

Luminiscenčný roztok -SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution (Pierce, USA)

Peroxidázový roztok - SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)

anti-HA v goat antibodies (Invitrogen, USA)

Hovädzí sérový albumín (BSA), Carl Roth, SRN

Tris-tricín- SDS pufor (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.8. Internetové databázy a počítačové programy

DNA Calculator

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

Information hyperlinked over proteins

<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>

National Library of Medicine - Medical Subject Headings (MeSH)

www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/

NIS – Elements AR 3.0 (Laboratory Imaging) – program na úpravu obrázkov

NLM - U.S. National Library of Medicine – National Library of Health

Pubmed medline

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

Saccharomyces Genome Database (SGD)

<http://www.yeastgenome.org/>

SwissProt

<http://expasy.org/sprot>

The MYR Predictor

<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>

TMHMM Server v. 2.0 Prediction of transmembrane helices in proteins

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

3.2. Metódy

3.2.1. Skladovanie kvasinkových kmeňov

Zásobné kvasinkové kultúry pripravené z buniek rastúcich 48 hodín na YEPG miskách obsahujúcich 20 ng/ml edicínu (Lek, Slovinsko), sme dlhodobo uchovávali v mikroskúmavkách v skladovacom médiu pri teplote -80°C .

3.2.2. Kultivácia

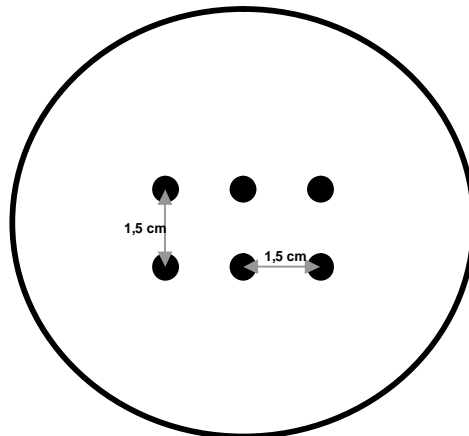
Bunky sme kultivovali aeróbne v tekutých médiách v teplo vzdušnej trepačke pri 160 rpm a na pevných médiách v termostate pri teplote 28°C .

3.2.3. Stanovenie optickej denzity kultúr

Optickú denzitu buniek sme merali spektrofotometrom (SPEKOL11 Carl Zeiss, Nemecko) v plastových kyvetách s optickou dráhou 1 cm pri vlnovej dĺžke 580 nm. Pred meraním sme odrátali pozadie média.

3.2.4. Výsev obrých kolónií

Kultivácii „obrých“ kolónií na pevnom médiu prebiehala v tvz. šesticich, ktoré sme pripravili nakvapkaním $10\ \mu\text{l}$ riedkej bunkovej suspenzie (množstvo biomasy odpovedajúce veľkosti špendlíkovej hlavičky v 1 ml sterilnej vody) tak, aby jednotlivé kvapky boli od seba vzdialené 1,5 cm (Obr.3.2).



Obrázok 3.2.: Nanesenie buniek na Petriho misku s pevným médiom

3.2.5. Fotografovanie mikroskopických preparátov

Na pozorovanie a fotografovanie buniek sme použili mikroskop Nazov mikroskopu s imerzným objektívom so zväčšením 100x. Využili sme filtre umožňujúce sledovať zelené (BP 470/40 a BP 525/50) , modré (BP 450-490 a LP 515) a červené (BP 546/12 a 480/40) emisné svetlo .

/

3.2.6. Farbenie bunkových kompartmentov

Farbenie vakuolárnych membrán: Bunky rastúce na miske sme opláchli destilovanou vodou a narieslili na koncentráciu 2×10^6 a následne pridali farbičku FM4-64, do výslednej koncentrácie 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Po 10 minútovej inkubácii boli vzorky pripravené na mikroskopické pozorovanie.

Farbenie bunkových jadier: Bunky rastúce na miske sme opláchli destilovanou vodou a narieslili na koncentráciu 2×10^6 a následne pridali farbičku DAPI do výslednej koncentrácie 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Po 5 minútovej inkubácii boli vzorky pripravené na mikroskopické pozorovanie.

Farbenie lipidických partikul (LP) Bunky rastúce na miske sme opláchli destilovanou vodou a narieslili na koncentráciu 2×10^6 a následne pridali Nílsku červenú do výslednej koncentrácie 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Po 5 minútovej inkubácii boli vzorky pripravené na mikroskopické pozorovanie.

3.2.7. Izolácia chromozomálnej DNA

2 ml kvasinkovej kultúry inkubovanej cez noc v tekutom YEPG sme centrifugovali 2 min pri 3000g. Sediment sme rosuspendovali v 150 μl mixu I a inkubovali 1 hod pri 37 °C. K vzniknutým protoplastom sme pridali 20 μl SDS a 100 μl octanu amónneho a následne sme bunky rozbili v -80°C po dobu 15 minút. Bunkové kompartmenty sme sedimentovali centrifugáciou 15 min pri 3000g. Supernatant obsahujúci DNA a proteíny sme odobrali do čistej mikrocentrifugčnej skúmavky a objem doplnili demineralizovanou vodou do 500 μl . DNA sme prečistili fenol/chloroformovou extrakciou. K supernatantu sme pridali rovnaké množstvo prečisteného fenolu a centrifugovali 10 min pri 21 000g. K vrchnej fáze sme pridali polovičný objemu prečisteného fenolu a polovičný objemu upraveného chloroformu a roztok sme centrifugovali 10 min pri 21 000g. Tento krok sme opakovali kým nezmizla biela medzifáza vyzrážaných proteínov. Potom sme k vrchnej fáze pridali

rovnaký objem upraveného chloroformu a opäť centrifugovali 10 min pri 21 000g. Na prečistenie sme pridali 60% objemu izopropanolu. DNA sme zrážali 15 minút pri -80°C. Vyzrážanú DNA sme sedimentovali centrifugáciou 15 minút pri 21 000g. Odmyli sme izopropanol a aby sme sa zbavili zvyškového izopropanolu, prečistili sme vzorku 70 % etanolom. Centrifugovali sme 2 minúty pri 21 000g, odpipetovali sme čo najväčšie množstvo etanolu a zvyšok sme nechali odpariť pri laboratórnej teplote v laminárnom boxe. Sediment sme rosuspendovali v 20 µl demi vody.

3.2.8. Transformácia kvasiniek LiAc metódou

3.2.8.1. Príprava transformačnej kazety

Lineárnu DNA, včleňovanú pri transformáciách do genómu kvasiniek homológnu rekombináciu, sme pripravili PCR reakciou. K príprave reakcie sme využili 100 ng plazmidovej DNA a 50 ng z priameho aj reverzného primeru v celkovom objeme 12,5µl PCR vody a 12,5 µl PPP Master mix-u zmiešaného v mikroskúmavke. Na amplifikáciu sme použili cyklus popísaný v tabuľke 3.3

Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklov
94	5:00	1
94	0:30	8
57	0:30	
72	2:30	
94	0:30	25
72	2:30	
72	15	1
4	∞	1

Tabuľka 3.3.: PCR program na amplifikáciu transformačnej kazety

3.2.8.2. Priprava kompetentných buniek

Bunky rastúce jeden deň na miske s YEPG médiom, obsahujúcim 20 µg/ml edicínu (Lek, Slovinsko), sme preočkovali do 10 ml tekutého YEPG média a inkubovali cez noc pri 28°C. Na druhý deň sme určili koncentráciu buniek a kultúru nariedili do 50 ml nového tekutého YEPG média tak, aby výsledná hustota kultúry

činila 5×10^6 buniek na ml. Po dvoch generačných dobách (približne 4 hodiny) sme spočítali koncentráciu buniek a bunky sme sedimentovali centrifugáciou 10 minút pri 3000-g. Následne sme bunky dvakrát premyli v 25 ml sterilnej demineralizovanej vody. Po každom premytí sme centrifugovali 10 minút pri 3 000-g. Premyté bunky sme nariesili v sterilnej demineralizovanej vode na koncentráciu 2×10^9 buniek na ml. Na jednu transformáciu sme využili 100 μ l takto pripravenej suspenzie.

3.2.8.3. Transformácia buniek

Postupovali sme podľa metódy, ktorú publikovali Gietz a Woods ~~v roku~~ (2002).

K 100 μ l kompetentných buniek sme pridali 10 μ l ssDNA, ktorú sme predtým 5 minút inkubovali vo vriacej vode a okamžite schladili v ľadovom kúpeli. Následne sme pridali 240 μ l PEG, 36 μ l LiAc a 34 μ l transformačnej kazety. Špičkou sme jemne rosuspendovali objem a pri 42°C inkubovali 40 minút. Bunky sme následne centrifugovali 30 sekúnd pri 13 000 rpm a pridali 1 ml sterilnej destilovanej vody. Celkový objem sme rovnomerne rozdelili na misky umožňujúce rast len transformovaných buniek. Zloženie média záviselo od selekčného markeru nachádzajúceho sa na použítom plazmide *). Misky sme inkubovali 3-4 dni. Narastené kolónie sme preniesli na nové selekčné médium a následne sme pripravili z pozitívnych klonov skladovacie konzervy (vid'. 3.2.1.)

*) pri transformácii kazetou nesúcou hphNT1 rezistenciu sme bunky pred vysiatím na selekčné médium inkubovali 2 hodiny v 1 ml tekutého YEPG média pri teplote 28°C, aby nastala expresia génu pre kanamycínovú rezistenciu.

Príprava BY-Pmp3-GFP-N kmeňa vyžadovala ďalšiu transformačnú reakciu spojenú s následným vyštípením selekčného markeru. Postupovali sme podľa metódy Gauss *et al.* (2005). Kompetentné bunky sme pripravili z kmeňa, ktorý mal vloženú transformačnú kazetu, obsahujúcu sekvencie GFP génu a selekčný marker URA3 ohraničený loxP miestami. Transformačná reakcia obsahovala 100 μ l kompetentných buniek, 10 μ l ssDNA, ktorú sme predtým 5 minút inkubovali vo vriacej vode a okamžite schladili v ľadovom kúpeli, 240 μ l PEG, 36 μ l LiAc a 60 ng pSH62 plazmidu rozpusteného v 34 μ l demi vody. Špičkou sme objem jemne rosuspendovali a pri 42°C inkubovali 40 minút. Bunky sme následne centrifugovali 30 sekúnd pri 13 000 rpm a pridali 1 ml sterilnej destilovanej vody. Následne sme vysiali 10 μ l, 100 μ l a 890 μ l suspenzie na selekčné misky, v tomto prípade sa jednalo

o minimálne médium pre kmeň BY4742, ale bez pridania histidínu (MM –his). Misky sme inkubovali 3 dni. Narastené mikrokolónie sme zaočkovali do tekutého MM –his a kultivovali cez noc. Na druhý deň sme bunky nariedili na optickú denzitu 0,2 do MM – his obsahujúceho zdroj uhlíku 2% galaktózu a nechali inkubovať 4 hodiny. Počas kultivácie sa aktivovala Cre rekombináza kódovaná pod galaktózovým promótorom a nastalo vyštípenie URA3 markeru vloženého pri prvej transformácii. Následne sme vysiali 5µl suspenzie na misky s minimálnym médiom pre kmeň BY4742, obsahujúcom kyselinu 5-fluorouracil-4-karboxylovú. Narastené bunky sme preniesli do nového selekčného média a následne sme pripravili z pozitívnych klonov zásobné konzervy (viď. 3.2.1)

3.2.8.4. Overovacia PCR reakcia

Správne vloženie transformačnej kazety sme overovali zmiešaním 100 µg vyizolovanej DNA metódou 3.2.9 a 50 pmol z priameho aj spätného overovacieho primeru rozpustených v 12,5 µl PCR vody a 12,5 µl PPP Master mix-u v mikrskúmavke. Používali sme cyklus uvedený v tabuľke 3.4..

Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklov
94	5:00	1
94	0:30	30
52	0:30	
72	2:00	
72	15	1
4	∞	1

Tabuľka 3.4.: PCR program použitý na overenie včlenenia kazety

3.2.9. Horizontálna elektroforéza v agarózovom géle

Prítomnosť DNA naamplifikovanej PCR reakciou sme overovali horizontálnou elektroforézou. Používali sme 1% agarózový gél s tisícinu objemu etídium bromidu. Agarózu sme naliali do plexisklového bločku a do vzdialenosti 1 cm od okraja sme umiestnili hrebeň. Keď gél úplne ztuhol (cca 20 minút), vložili sme ho aj s bločkom do elektroforetickej vaničky a priliali sme TBE pufor tak, aby hladina siahala až nad povrch gélu. Potom sme vytiahli hrebeň a do vzniknutých jamiek sme nanášali

vzorky DNA. Zdroj jednosmerného napätia sme nastavili tak, aby napätie zodpovedalo približne $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Zdroj sme odpojili po 45 minútach a následne sme pozorovali géľ pod UV transluminátorom (Herolab, Nemecko).

3.2.10. Stanovenie proteínov z celých buniek

3.2.10.1. Izolácia proteínov

K 35-60 mg biomasy odobratej z obrých kolónií do mikroskúmavky sme pridali 200-300 μl pufru na rozbíjanie a resuspendovali vortexom. Prisykali sme balotiny cca 2-3 mm pod hladinu tekutiny a následne sme bunky rozbíjali štyrikrát v prístroji FAST PREP 20 sekúnd, stupeň intenzity 4. Mezi každým rozbíjaním sme mikroskúmavky chladili 2 minúty v ľadovom kúpeli. Špičkou sme odpipetovali pufo do nových mikroskúmaviek a dvakrát sme premyli balotiny 100 μl rozbíjacieho pufru. Na oddelenie proteínov od bunkového debris sme využili dvojstupňovú centrifugáciu. Centrifugovali sme 1 minútu pri 1000g pri 4°C a následné získaný supernatant 5 minút pri 1890g pri 4°C . U výsledného supernatantu (hrubého lyzátu) sme zmerali jeho presný objem

Zmerali sme obsah proteínov vo vzorkách použitím Bradfordovho činidla. Najprv sme si pripravili vzorku na orientačné meranie 1000 násobným zriedením hrubého lyzátu. K 1 μl hrubého lyzátu sme pridali 800 μl demi vody a 200 μl Bradfordovho činidla. Vzorky sme merali spektrofotometrom (SPEKOL11 Carl Zeiss, Nemecko) po 10 minútach inkubácie pri absorbanzii A_{595} , na vynulovanie prístroja sme použili 800 μl demi vody a 200 μl Bradfordovho činidla. Podľa nameraných hodnôt sme doriedili hrubý lyzát pufrom na rozbíjanie tak, aby sme mali približne absorbanciu 0,300, tj. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bielkovín. Presné stanovenie bielkovín sme robili v dvoch paralelách. Pripravili som si 50x nariadenú vzorku hrubého lyzátu v demi vode, ktorú sme ďalej riedili. Zmiešali som 750 μl demi vody, 50 μl nariadenej vzorky a 200 μl Bradfordovho činidla. Po 10 minútovej inkubácii sme merali rovnako ako v predchádzajúcom orientačnom meraní. Z nameraných hodnôt so vypočítali priemer absorbancií a z toho, aké je množstvo bielkovín (mg/ml).

3.2.10.2. SDS-PAGE elektroforéza

Postupovali sme podľa metódy ktorú zaviedol Leammli (1970). Pripravili sme separačný géľ zmiešaním 1,5 ml riedeného akrylamidu, 1,25 ml separačného

pufri a 2,25 ml demi vody. Zmes sme poriadne premiešali a pridali sme iniciátory polymerizácie, 7 μ l TEMED a 15 μ l persíranu amónneho. Po naliatí medzi sklá sme gél prevrstvili 200 μ l izopropanolu, ktorý bráni prístupu vzduchu a tým umožňuje správnu polymerizáciu gélu. Po hodine sme izopropanol zliali a vrchnú časť gélu premyli demi vodou, zvyšnú vodu medzi sklami sme opatrne odsali filtračným papierom. Zaostrovací gél sme pripravili zmiešaním 270 μ l riedeného akrylamidu, 520 μ l zaostrovacieho pufri a 1,25 ml demi vody. Roztok sme poriadne premiešali a pridali sme iniciátory polymerizácie, 4 μ l TEMED a 10 μ l persíranu amónneho. Po naliatí gélu medzi sklá sme ihneď vložili hrebene. Nechali sme polymerizovať 20 minút.

Sklo sme vložili do elektródového elfo-držiaku tak, aby kratšie sklo bolo orientované do vnútra a do druhej strany držiaku sme vložili plastovú náhradu skla, ktorá vytvorila nepriepustnú hranicu vo vnútri elfo držiaku a do tohto priestoru sme naliali 5x riedený elfo-Running pufor.

Do jednotlivých jamôk vzniknutých odstránením hrebienka sme nanášali nariedené a zdenaturované vzorky. Nariedené tak, aby bolo v rovnakom objeme rovnaké množstvo bielkovín. Riedili sme v rozbíjacom pufre a pridávali sme denaturačný pufor s DTT, ktorého bola 1/5 výsledného objemu s pridaným DTT (30mg/ml). Denaturovali sme 2 minúty vo vriacej vode. Do prvej jamky sme naniesli farebný štandard molekulových hmotností (Protein Kaleidoscope Standard).

Elfo-držiak sme následne zasunuli do elfo-vane a naliali sme 5x riedený elfo-Running pufor, tak aby boli ponorená spodná hrana skiel.

Zdroj napätia sme nastavili na 25 mA, volty sme obmedzili na 200 V po dobu 45 minút

Aktivovali sme PVDF membránu v metanole, opláchli vo vode a nechali minimálne 15 minút v TGM pufre. Na 15 minút sme namočili vláknité koberčeky (súčasť Mini Trans-Blot sady) do TGM pufri. Následne sme zostavovali tvz. „sendvič“, na čiernu stranu držiaku sme položili nasiaknutý koberček, naň Whatman papier namočený v TGM pufre, gél s rozdelenými proteínmi, PVDF membránu a opäť Whatman papier namočený v TGM pufre a v TGM pufre nasiaknutý koberček. Celú aparatúru sme priklopili bielou časťou držiaka a držiak vložili do vane s magnetickým miešadlom.

Vložili sme chladiacu jednotku, celú vaňu ponorili do ľadového kúpeľa a postavili na elektromagnetické miešadlo. Doliali sme TGM pufor po horný okraj „sendviča“ a na zdroji napätia nastavili 100mA po dobu 1,5 hodiny. Po skončení sme membránu

farbili 10 sekúnd vo farbiacom roztoku a následne premývali v odfarbovacom roztoku, kým sa membrána úplne neodfarbila a nevystúpili ~~ni~~ modré pružky zafarbených proteínov. Na záver sme membránu premyli v demi vode, nechali vysušiť na vzduchu a naskenovali (CanoScan9000F, Canon, Japonsko).

Suchú membránu s namodro zafarbenými bielkovinami sme znova zaktivovali metanolom, opláchli vo vode nechali 30 minút nasycovať na trepačke v roztoku PBS s 1 % kazeínom. Potom sme roztok zliali a na 1 hodinu sme pridali 1000x riedené protilátky v PBS pufri. Na záver sme membránu premyli štyrikrát v 5 minútových intervaloch v 0.05 % roztoku Tween v PBS pufri. Membránu sme vložili do fólie a zaliali čerstvou zmesou luminiscenčného a peroxidázového roztoku v pomere 1:1. Na jednu membránu sme dali 2 ml zmesi a nechali 5 minút pôsobiť. Membránu sme nechali odkvapkať, umiestnili do rádiografickej kazety a v tmavej komore exponovali rôzne dlhé časy. Filmy sme vyvolávali vo vývojke 2 minúty, opláchli vo vode, stabilizovali v ustaľovači a na záver poriadne premyli pod prúdom vody. Suché filmy sme naskenovali (CanoScan9000F, Canon, Japonsko).

3.2.11. Stanovenie proteínov z lipidických partikulí

3.2.11.1. Príprava sféroplastov

Kvasinkové bunky sme kultivovali v tekutom YEPG médiu 60 hodín do optickej denzity $OD_{580} \sim 0,4$; do začiatku stacionárnej fázy. Získanú biomasu sme premyli v demi vode a inkubovali v DTT pufri 20 min pri 30°C . Následne sme bunky najprv premyli v sféroplastovom pufri a potom resuspendovali v pomere 2 g biomasy na 20 ml pufru. Medzi každým premývaním sme bunky sedimentovali 5 minútovou centrifugáciou pri 3000g. Takto nariedené bunky sme temperovali na 30°C a potom sme pridali 500 jednotiek zymolýazy na 1 g biomasy. Po 50 minútach sme spektrofotometrom (SPEKOL11 Carl Zeiss, Nemecko) merali $1 \mu\text{l}$ suspenzie v 1ml demi vody a pozorovali sme pokles z pôvodného $OD_{580} \sim 0,4$ až na $OD_{580} \sim 0,1$. Pripravené sféroplasty sme sedimentovali 5 minútovou centrifugáciou pri 3000g.

Bunky sme následne dvakrát premyli v sféroplastovom pufri a nariedili v lyzogénnom pufri v pomere 0,2 g biomasy na 1 ml pufru. Homogenizovali sme 25 ťahmi Dounceho homogenizátora. Získaný homogenát sme naliali do ultracentrifugačných skúmaviek a prekryli vrstvou lyzogénneho pufru. Po 1 hodine

ultracentrifugácie pri 100 000g pri 4°C sme odobrali hornú fázu do nových ultracentrifugačných skúmaviek a prekryli vrstvou separačného pufri 1. Po 30 minútach ultracentrifugácie pri 100 000g pri 4°C sme odobrali vrchnú fázu, ktorú sme prekryli vrstvou separačného pufri 2. Opäť sme ultracentrifugovali 30 minút pri 100 000g pri 4°C a odoberali hornú fázu do nových skúmaviek a prevrstvovali sme ju separačným pufrom 3. Záverečná ultracentrifugácia pri 4°C taktiež trvala 30 minút pri 100 000g.

3.2.11.2. Izolácia proteínov

Proteíny z vyzolovaných partikul sme získali odstránením lipidov. Použili sme metyl-chloroformovou metódou. K celkovému objemu LP sme pridali 4 objemy metanolu a 10 sekúnd centrifugovali pri 21000g. Následne sme pridali 1 objem chloroformu, premiešali a centrifugovali 10 minút pri 21000g.

Potom sme pridali 3 objemy vody, opäť premiešali a centrifugovali 10 minút pri 21000g. Na záver sme pridali 3 objemy metanolu a centrifugovali 5 minút. Maximum metanolu sme odsali pipetou a zvyšok sme nechali odpariť v laminárnom boxe.

3.2.11.3. SDS-PAGE elektroforéza

Separáciu pomocou SDS-PAGE elektroforézy a detekciu proteínov špecifickými protilátkami sme robili rovnakým spôsobom ako v metodike 3.2.11.2 s tým rozdielom, že okrem jednokrokovej detekcie GFP proteínu sme detegovali aj hemaglutinínovú doménu s využitím primárnych a sekundárnych protilátok.

Suchú membránu s namodro zafarbenými bielkovinami sme znova zaktivovali metanolom, opláchli vo vode a nechali 45 minút nasycovať na trepačke v roztoku PBS pufri s 1 % kazeínom a 10% azidom sodným. Potom sme roztok zliali a membránu sme päťkrát premyli v PBS pufri v 5 minútových intervaloch. Následne sme pridali 1000x riedenú primárnu protilátku anti-HA v PBS pufri a nechali sme ju naväzovať pri 4°C cez noc. Ráno sme membránu štyrikrát v 5 minútových intervaloch premyli v 0,05 % roztoku Tweenu v PBS pufri. K premytej membráne sme pridali sekundárnu protilátku (anti-mouse) nariadenú v PBS pufri s timerozalom a pri laboratórnej teplote sme ju nechali na trepačke 1 hodinu. Na záver sme membránu premyli štyrikrát v 5 minútových intervaloch v 0,05 % roztoku Tweenu v PBS pufri. Membránu sme vložili do fólie a zaliali čerstvou zmesou luminiscenčného a peroxidázového roztoku v pomere 1:1. Na jednu membránu sme

dali 2 ml zmesi a prikryté nechali 5 minút pôsobiť. Membránu sme nechali odkvapkať, umiestnili do rádiografickej kazety a v tmavej komore exponovali rôzne dlhé časy. Filmy sme vyvolávali vo vývojke 2 minúty, opláchli vo vode, stabilizovali v ustaľovači, na záver poriadne premyli pod prúdom vody a suché filmy sme naskenovali (CanoScan9000F, Canon, Japonsko).

3.2.12. Stanovenie proteínov z plazmatických membrán

3.2.12.1. Izolácia plazmatických membrán

Bunky sme kultivovali 20 hodín v tekutom YEPG médiu, po tejto dobe kultúra narástla na optickú denzitu $OD_{580} \sim 4$. Bunky sme premyli v destilovanej vode a odvážili ich hmotnosť. Resuspendovali ich v rozbíjacom pufri v pomere 1 ml média na 2g buniek a prepipetovali do rozbíjacej fľaštičky. Pridali sme inhibítory proteáz a balotiny tak, aby siahali 2 mm pod hladinu suspenzie. Bunky sme rozbíjali pomocu prístroja B.Braun Apparatebau Melsungen v šiestich cykloch :10 sekúnd rozbíjanie, 5 sekúnd chladenie pomocou CO_2 . Rozbité bunky sme preliali do centrifugačných skúmaviek a centrifugovali 5 minút pri 1200g pri 4°C. Supernatant sme preliali do nových centrifugačných skúmaviek a centrifugovali 5 minút pri 2100g pri 4°C. Supernatant sme opäť preniesli a v nových centrifugačných skúmavkách centrifugovali 40 minút pri 18 400g pri 4°C. Potom sme zliali supernatant a pelet sme resuspendovali v malom množstve homogenizačného roztoku (cca 6ml) média a zhomogenizovali 10 pohybmi piestu homogenizátora. Zhomogenizovaný pelet sme preliali do kadičky a upravili pH 16,7% kyselinou octovou na pH 5,2-5,5. Centrifugovali sme 2 minúty pri 11500g. Supernatant sme preniesli do kadičky a pridali NaOH, aby námsme získali pH 7,5. Zmes sme preniesli do ultracentrifugačných skúmaviek a ultracentrifugovali sme 23 minút pri 45 000g pri 4°C. Následne sme pelet homogenizovali v malom množstve (cca 400 μ l) MES pufru s pH 6. Výsledná zmes obsahovala vyizolované proteíny plazmatických membrán. Proteíny sme stanovili rovnako ako v 3.2.11.1.

3.2.12.2. Tris-Tricine SDS-PAGE

Postupovali sme rovnako ako v metóde 3.2.11.2. s tým rozdielom, že sme použili iný separačný a zaostrovací gél a iné pufre. Separačný gél sme pripravili

zmiešaním 2,17 ml riedeného akrylamidu, 2 ml Tris-Cl/SDS pufru, 1,19 ml demi vody a 635 μ l glycerolu. Zmes sme poriadne premiešali a pridali sme iniciátory polymerizácie, 6 μ l TEMED a 10 μ l persíranu amónneho. Po naliatí medzi sklá sme gél prevrstvili 100 μ l demi vody, ktorá bráni prístupu vzduchu a tým umožňuje správnu polymerizáciu gélu. Po hodine sme vodu opatrene odsali filtračným papierom. Zaostrovací gél sme pripravili zmiešaním 240 μ l riedeného akrylamidu, 620 μ l Tris-Cl/SDS pufru a 1,64 ml demi vody. Roztok sme poriadne premiešali a pridali sme iniciátory polymerizácie, 18 μ l TEMED a 20 μ l persíranu amónneho. Po naliatí gélu medzi sklá sme ihneď vložili hrebene.

Nechali sme polymerizovať 20 minút.

3.2.12.3. Farbenie proteínov striebrom

Po elektroforéze sme gél kultivovali 1 hodinu vo fixačnom roztoku 1. Potom sme ho preniesli do fixačného roztoku 2. Následne sme gél štyrikrát po 15 minút premývali v demineralizovanej vode. Pridali sme roztok so striebrom minimálne na pol hodinu a po premytí demi vodou sme pridali vyvolávací roztok približne na 5 minút. Keď sa objavili dostatočne jasné pružky proteínov tak sme roztok vyliali a pridali 1% kyselinu octovú.

4. Výsledky

4.1. Určenie lokalizácie Pmp3p proteínu v kvasinkových bunkách

Na zistenie lokalizácie a kvantifikácie proteínu v bunkách sme označili proteín na úrovni génu prostredníctvom jeho fúzie so zeleným fluorescenčným proteínom (green fluorescent protein) GFP a s hemaglutinínovou doménou. Pripravené konštrukty nám umožnili detegovať signál fúzneho proteínu špecifickými protilátkami metódou Western blot, alebo *in vivo* pozorovaním fluorescenčného signálu.

4.1.1. Príprava kmeňov so značeným Pmp3p proteínom

Cieľ: Pripraviť kmeň, ktorým by sa dala určiť lokalizácia Pmp3p v bunke a súčasne zachovať natívny promótor na sledovanie regulácie Pmp3

Nakoľko neboli známe žiadne väzobné domény, či iné kľúčové miesta nevyhnutné pre správne fungovanie Pmp3p proteínu no hlavne kvôli jeho veľkosti (6 kDa) pripravili sme sadu kmeňov, ktoré mali k Pmp3p proteínu kovalentne napojené rôzne sekvencie proteínov, resp. proteínových domén, ktoré umožnili jeho detekciu. Vo všetkých prípadoch sme robili genómovú fúziu, ktorá zaručila stabilitu skonštruovaného kmeňa a umožnila zachovanie natívneho promótoru a tým i prirodzenú reguláciu génu.

4.1.1.1 Fluorescenčné značenie Pmp3p proteínu

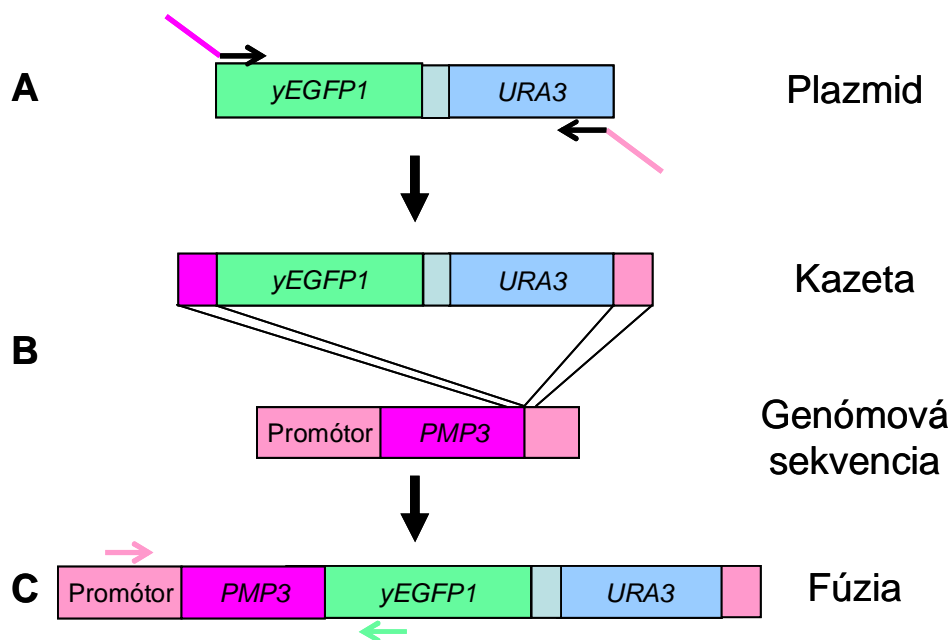
Najpoužívanejší spôsob zviditeľnenia proteínu v bunke je jeho kovalentná fúzia s GFP. Vloženie GFP génu do špecifického miesta kvasinkového genómu je založené na konštrukcii lineárneho fragmentu, ktorý obsahuje okrem GFP sekvencie aj selekčný marker pre kvasinkové bunky a jeho konce sú homológne s oblasťou, do ktorej má byť daný fragment vložený.

Vzhľadom na to, že nie sú žiadne známe poznatky o funkčných doménach Pmp3p proteínu, pripravili sme dva kmene, z ktorých jeden mal nanaviazaný GFP na

C-konci Pmp3p proteínu (BY-PMP3-GFP-C) a druhý kmeň na N-konci (BY-PMP3-GFP-N).

a) Pripojenie fluorescenčného proteínu na C-koniec Pmp3 proteínu

Príprava kmeňu produkujúceho fúzny proteín, ktorý má na karboxylovom konci Pmp3p proteínu napojené GFP zahŕňa jednokrokovú transformáciu (Metóda 3.2.8., obr. 4.1.). V prvom kroku sme pripravili lineárnu kazetu za použitia plazmidu pKT209 (Tab. 3.2.) naštiepeného endonukleázou HindIII a primerov (pKT Pmp3 F a pKT Pmp3 R; tab. 3.3.), ktoré mali jeden koniec homológny k plazmidu a druhý k sekvencii nachádzajúcej sa v okolí STOP kodónu *PMP3* génu (Obr. 4.1.A.) Pripravené kazety sme za použitia teplotného a chemického šoku vpravili do buniek kmeňu BY4742 a následne sme bunky vysiali na minimálne médium určené pre daný kmeň bez obsahu uracilu, nakoľko gén *URA3* pre biosyntézu uracilu sme využili ako selekčný marker. V kvasinkách si celá kazeta vymenila homológnu rekombináciou miesto so STOP kodónom *PMP3* génu čím sa sekvencia GFP génu prepisovala bez prerušenia priamo za *PMP3* génom a vznikol jeden fúzny proteín (Obr. 4.1.B.). Z vyrastených kolónií sme náhodne vybrali 20 klonov u ktorých sme najprv overili včlenenie kazety pozorovaním fluorescenčného signálu v mikroskope a potom sme u štyroch klonov porovnali priebeh vývojových fáz počas rastu na respiračnom médiu s rodičovským kmeňom. U klonov ktoré sa vyvíjali porovnateľne s rodičovským sme overili správne vloženie kazety využitím sady primerov (Pmp3 ext F a yEGFP int R, tab. 3.3.), ktorou sme pripravili úseky DNA obsahujúce celý *PMP3* gén a začiatok GFP sekvencie (obr. 4.1.C.) a následne sme tieto úseky analyzovali sekvenáciou.



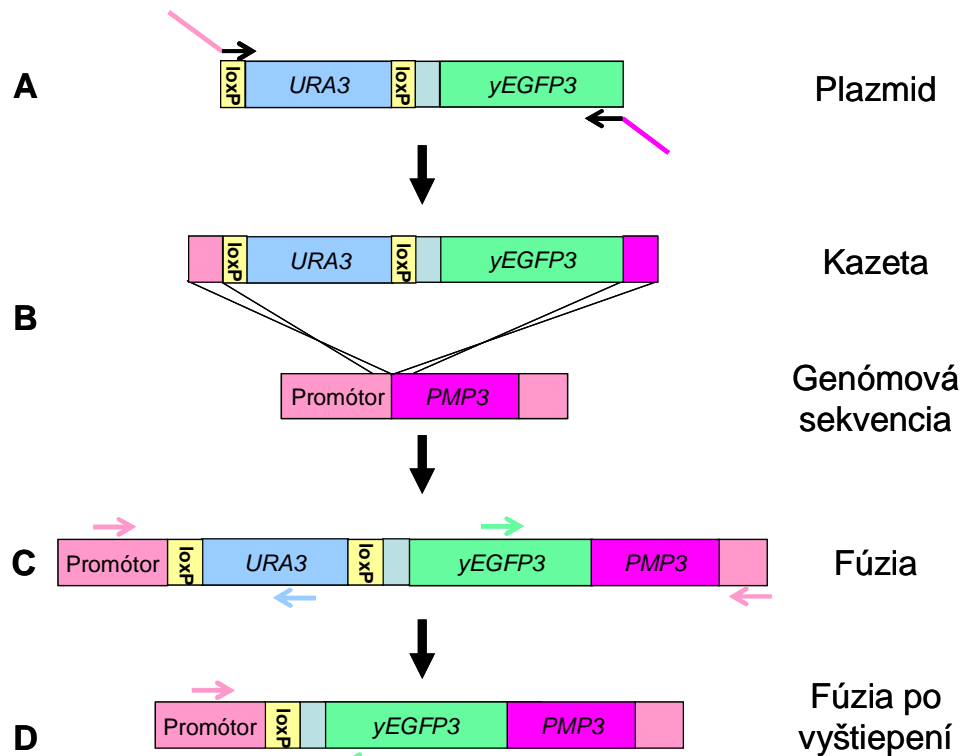
Obrázok 4.1: Schéma prípravy *BY-Pmp3-GFP-C* kmeňa. **A.** Príprava transformačnej kazety. Farebné šípky naznačujú naviazanie primerov. **B.** Integrácia kazety homológnu rekombináciou do DNA sekvencie *PMP3* génu. **C.** Situácia po včlenení kazety do genómu. Farebné šípky naznačujú naviazanie overovacích primerov

b) Pripojenie fluorescenčného proteínu na N- koniec Pmp3p proteínu

Transmembránová sekvencia na karboxylovom konci proteínu je evolučne konzervovaná a za ňou sa nachádzajú už len dve aminokyseliny. Pripojenie GFP k tomuto koncu by mohlo ovplyvniť funkciu proteínu a preto sme pripravili kmeň, ktorý má GFP naviazané na N-terminálny koniec proteínu.

Vloženie GFP génu do genómu tak, aby výsledný kmeň produkoval Pmp3p proteín s GFP pripojeným na N-konci vyžaduje dvojkrovú konštrukciu (Metóda 3.2.8., obr. 4.2.). Transformačnú kazetu pre pripojenie zeleného fluorescenčného proteínu pred *PMP3* gén sme pripravili pomocou pOM42 plazmidu (Tab. 3.2.) a sady primerov v okolí ŠTART kodónu *PMP3* génu (pOM PMP3 F a pOM PMP3 R, tab. 3.3.; obr. 4.2.A.). Pre vloženie celej kazety do genómu kvasinky sme použili ako selekčný marker gén *URA3* (Obr. 4.2.B.). Z vyrastených kolónií sme u desiatich overili správne vloženie kazety využitím dvoch sád primerov (Pmp3 ext R a yEGFP int F, Pmp3 ext F a Ura int R, tab. 3.3.), ktorými sme pripravili úseky DNA. Tie obsahovali koniec GFP sekvencie a celý *PMP3* gén a DNA úsek obsahujúci celý

PMP3 gén a začiatok *URA3* sekvencie (obr. 4.2.C.). Na vyštiepenie *URA3* sme použili Cre rekombinázu z plazmidu pSH62 (Tab. 3.2.), ktorá bola regulovaná galaktóзовým promótorom. Po vyštiepení *URA3* sme vysiali bunky na médium s kyselinou 5-fluoruracil-4-karboxylovou, ktorá pôsobí toxicky na bunky tvoriace uracil a preto vyrastené kolónie boli len tie, ktorým sa správne vyštiepil selekčný marker vložený pri prvej transformácii. Včlenenie kazety sme overili u dvadsiatich náhodne vybraných klonov pozorovaním fluorescenčného signálu v mikroskope a potom sme u štyroch klonov porovnali priebeh vývojových fáz počas rastu na respiračnom médiu s rodičovským kmeňom. U klonov ktoré sa vyvíjali porovnateľne s rodičovským sme overili správne vloženie kazety (Obr. 4.2.D.) pomocou sekvenácie DNA úsekov, ktoré sme naamplifikovali PCR reakciou použitím primerov yEGFP int F a Pmp3 ext R (Tab. 3.3.).



Obrázok 4.2.: *Schema prípravy BY-Pmp3-GFP-N kmeňa. A. Príprava transformačnej kazety. Farebné šípky naznačujú nadviazanie primerov. B. Integrácia kazety homológou rekombináciou do DNA sekvencie PMP3 génu. C. Situácia po včlenení kazety do genómu. Farebné šípky naznačujú nadviazanie overovacích primerov. D. Situácia po vyštiepení markeru pomocou loxP miest. Farebné šípky naznačujú nadviazanie overovacích primerov.*

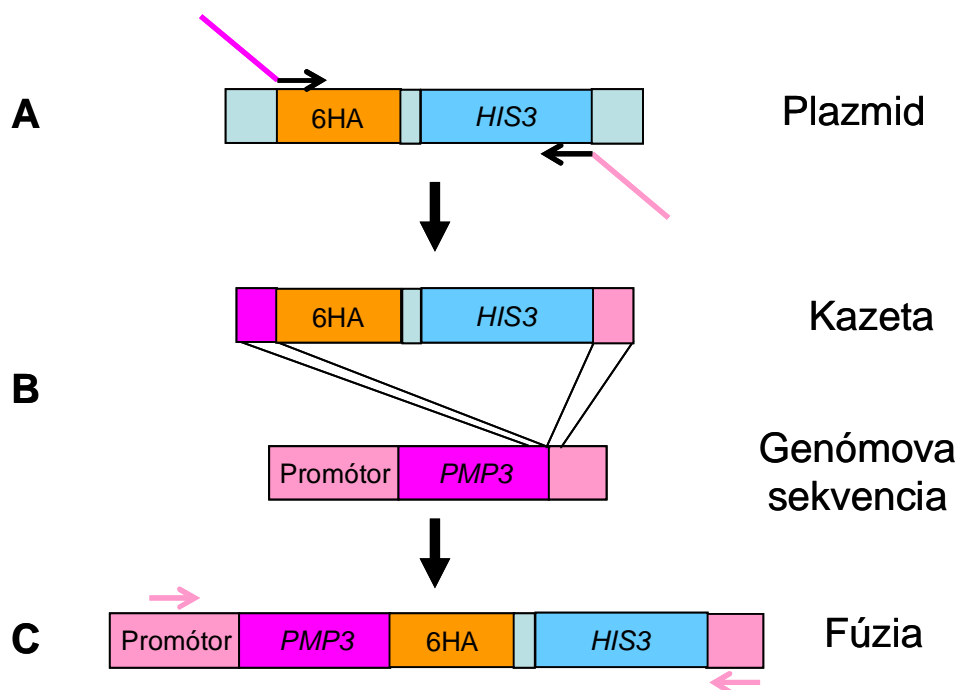
4.1.1.2. Nefluorescenčné značenie Pmp3p proteínu

Nefluorescenčné značenie proteínov v bunke má istú nevýhodu a to, že neumožňuje sledovať lokalizáciu proteínu v bunke pod mikroskopom. Hoci na druhej strane takéto pripojenie špecifickej globulárnej sekvencie neovplyvňuje vlastnosti proteínu do takej miery ako by to urobil veľký β -barel GFP. Veľkosť detekčnej sekvencie bola pre nás obzvlášť dôležitá, pretože veľkosť Pmp3p proteínu je v porovnaní s GFP päťnásobná. Molekulová hmotnosť Pmp3 proteínu je 6,1 kDa oproti molekulovej hmotnosti GFP (29,6 kDa).

Pripojenie hemaglutinínu na C-koniec Pmp3 proteínu

Príprava BY-Pmp3-HA kmeňa zahrňovala jednu transformačnú reakciu. Postupovali sme podľa metodiky 3.2.8., lineárnu transformačnú kazetu sme pripravili PCR reakciou v ktorej sme použili plazmid pYM15 (Tab. 3.2.), obsahujúci šesť hemaglutinínových zvyškov a HIS3 gén, spolu s primerami, ktorých časť boli homológna k plazmidu a druhá časť k oblasti okolo 5' konca *PMP3* génu (pYM PMP3 F a pYM PMP3 R, tab. 3.3.; obr. 4.3.A.).

Prípravené kazety sme za použitia teplotného a chemického šoku vložili do genómu rodičovského BY4742 kmeňa. Po vysiatí na minimálnom médiu bez histidínu (gén HIS3 pre biosyntézu histidínu bol použitý ako selekčný marker) nám narástli iba kolónie, ktoré mali integrovanú kazetu. Celá kazeta si homológnu rekombináciou vymenila miesto so STOP kodónom *PMP3* génu, čím sa sekvencia GFP génu prepisovali bez prerušenia priamo za *PMP3* génom a vznikol jeden fúzny proteín (Obr. 4.3.B.). Správne včlenenie kazety sme overovali u desiatich klonov s použitím Pmp3 ext F a Pmp3 ex R primerov (Tab. 3.3.). Z pozitívnych klonov sme vybrali štyri, u ktorých sme porovnali priebeh vývojových fáz počas rastu na respiračnom médiu s rodičovským kmeňom. U klonov ktoré sa vyvíjali porovnateľne s rodičovským sme overili správne vloženie kazety sekvenáciou DNA úsekov obsahujúcich celý *PMP3* gén s napojenými hemaglutinínovými doménami (Obr. 4.3.C.).



Obrázok 4.3.: Schéma prípravy BY-Pmp3-HA kmeňa. A. Príprava transformačnej kazety. Farebné šípky naznačujú naviazanie primerov. B. Integrácia kazety homológnu rekombináciou do DNA sekvencie PMP3 génu. C. Situácia po včlenení kazety do genómu. Farebné šípky naznačujú naviazanie overovacích primerov.

4.1.2 Určenie bunkovej lokalizácie Pmp3p

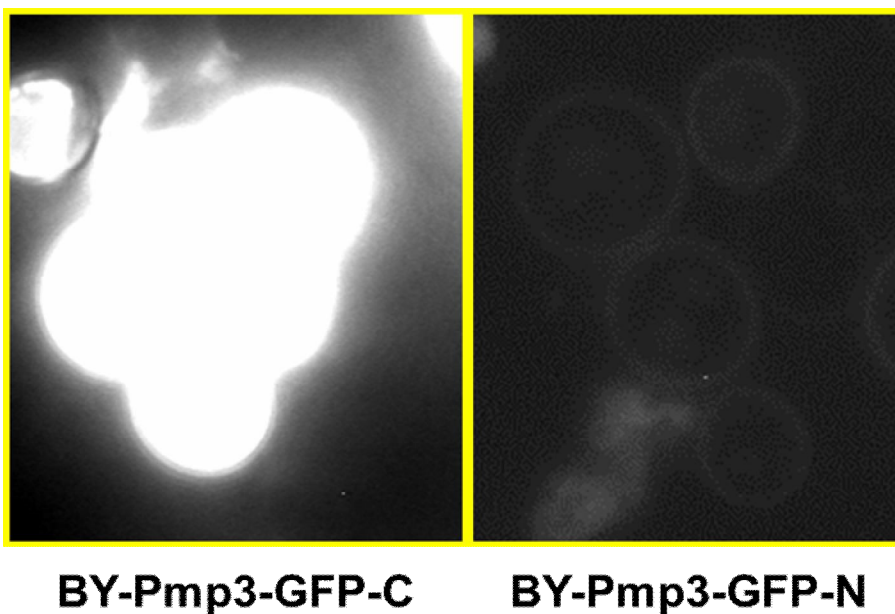
Cieľ: Zistenie vitálnej lokalizácie Pmp3p proteínu

Napriek tomu, že Pmp3p proteín bol objavený v roku 2000 jeho lokalizácia u *Saccharomyces cerevisiae* na začiatku tohto výskumu nebola určená. Pomocou GFP bola pozorovaná iba lokalizácia jeho rastlinného homológu (PutPmp3-1-GFP) v kvasinkovom kmeňe, ktorý mal deletovaný vlastný PMP3 gén. A navyše prepis prebiehal z expresného vektoru pod konštitutívnym promótorom (Chang-Qing *et al.* 2008).

Lokalizáciu proteínu sme zisťovali dvoma spôsobmi, vo fluorescenčnom mikroskope *in vivo* a po izolácii bunkových kompartmentov s využitím imunodetekcie metódou Western blot.

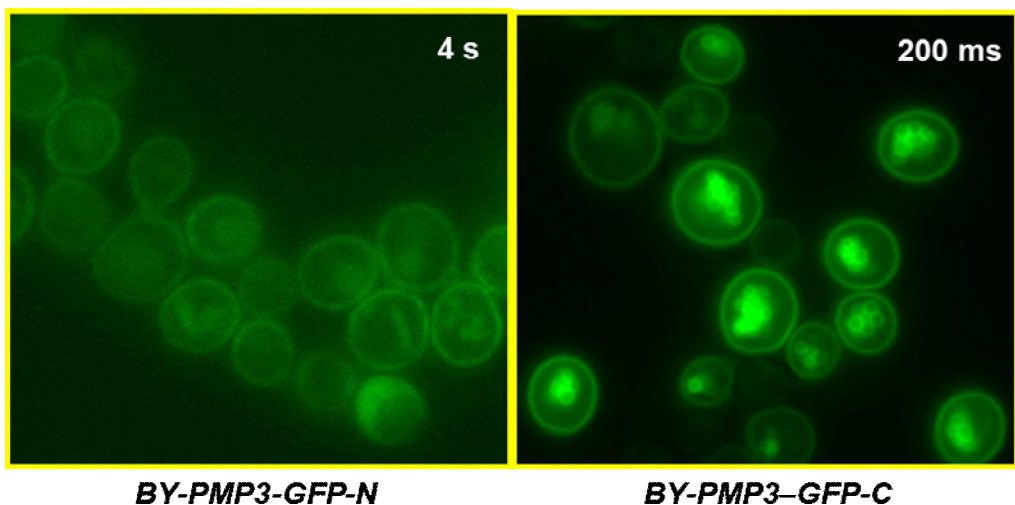
4.1.2.1. Určenie lokalizácie Pmp3p pomocou kmeňa BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N

Lokalizáciu Pmp3p-GFP fúzneho proteínu sme pozorovali na bunkách pripravených kmeňov, BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N (Tab. 4.1.) Pozorované bunky boli odobraté z YEPG misiek inkubovaných pri 28°C v termostate po dobu 48 hodín. GFP signál bol monitorovaný fluorescenčným mikroskopom (Kapitola 3.2.5) a z pozorovaním vyplynulo, že fluorescenčný signál bol výrazne slabší u kmeňa BY-Pmp3-GFP-N v porovnaní s BY-Pmp3-GFP-C (Obr. 4.4.).



Obrázok 4.4.: Porovnanie intenzity fluorescenčného GFP signálu u BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N kmeňov. Obrázky boli snímané za rovnakých podmienok, doba expozície 1 sekunda.

U buniek oboch kmeňov (BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N) sme pozorovali dvojitú lokalizáciu fúzných proteínov Pmp3p s GFP. V súlade s *in silico* predikciou na plazmatickej membráne a intracelulárne, v membránach malých váčkov pravidelného sférického tvaru. Intracelulárna lokalizácia GFP bola dobre viditeľná najmä u C-terminálnej fúzie.

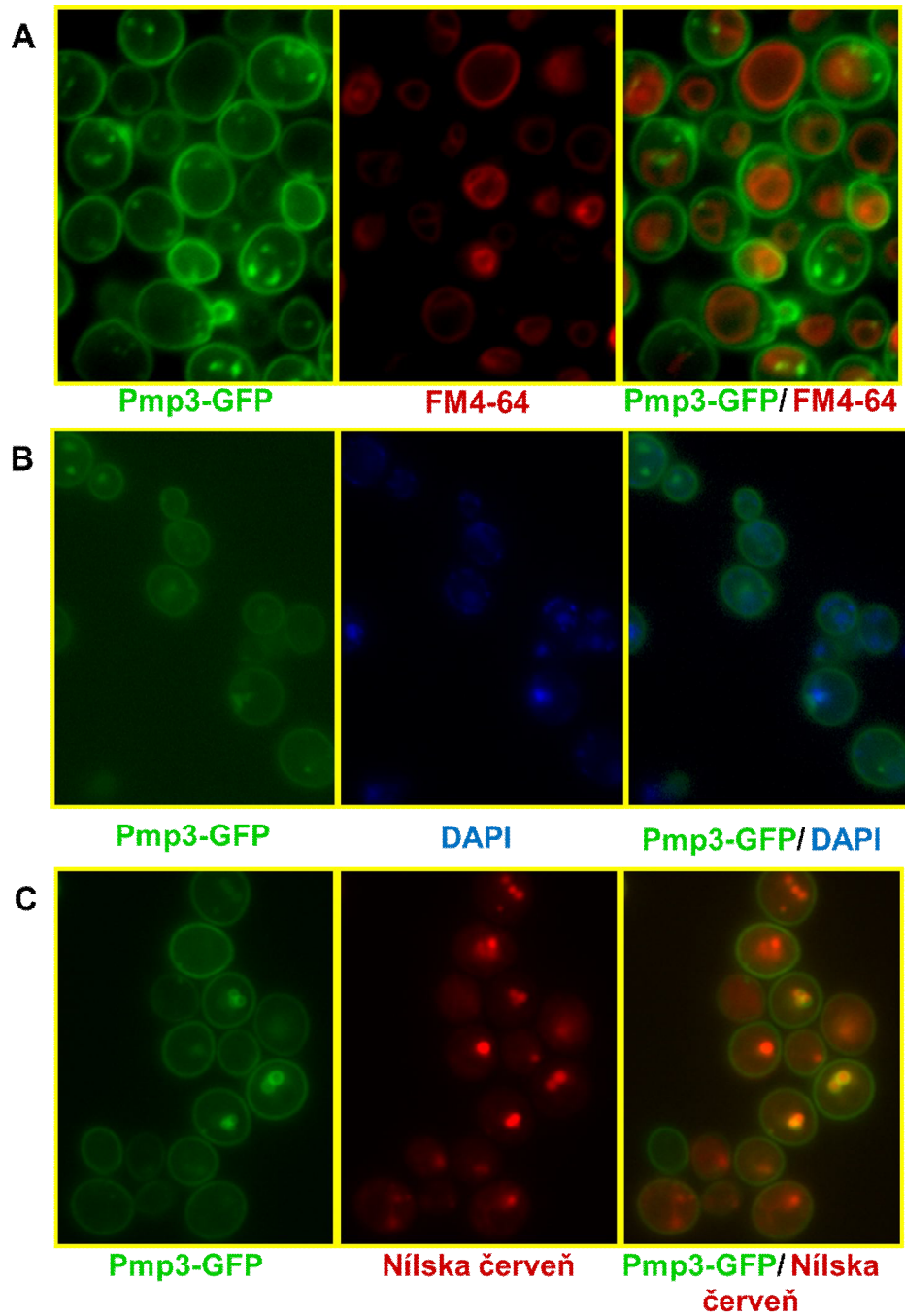


Obázokr. 4.5.: Porovnanie lokalizácie fluorescenčného signálu GFP u BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N kmeňov. Zistená rovnaká lokalizácia u oboch kmeňov. Doba expozície snímania je uvedená v pravom hornom rohu.

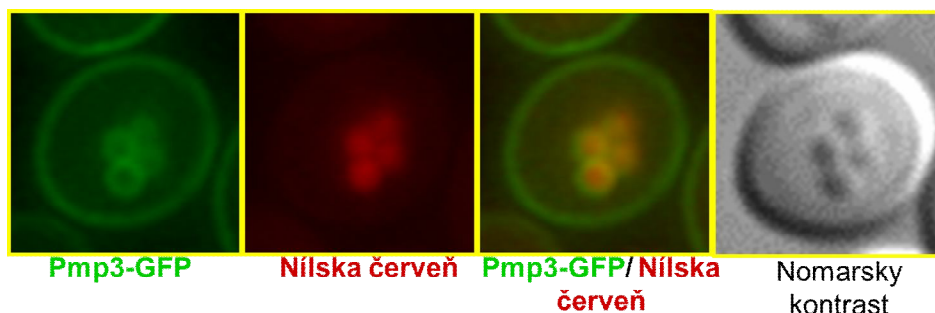
4.1.2.2. Identifikácia intracelulárnych váčkov obsahujúcich Pmp3p

Vzhľadom k slabému fluorescenčnému signálu fúzneho proteínu Pmp3p-GFP u kmeňu BY-Pmp3-GFP-N (Obr.4.4.), sme používali na zisťovanie lokalizácie a pre kolokalizačné experimenty kmeň BY-PMP3-GFP-C. Pozorované bunky kmeňa BY-PMP3-GFP-C boli kultivované na YEG miskách, v termostate 48 hodín pri 28°C. Následne boli paralelne farbené fluorescenčnými farbičkami - DAPI, ktorá umožnila vizualizáciu jadrovej a mitochondriálnej DNA, FM4-64 farbičku sme použili na vizualizáciu vakuolárnych membrán a od nej odvođených váčkov a Nílsku červenú viažucu sa do lipidických partikúl a lipidov iných membrán. Spôsob farbenia a detekcie je popísaný v kapitolách 3.2.5. a 3.2.6. GFP signál bol monitorovaný fluorescenčným mikroskopom (Metódy 3.2.5.).

Výsledky jasne ukázali, že intracelulárne lokalizovaný Pmp3p-GFP nekolokalizuje ani s jadrovou membránou (Obr. 4.6.A.), ani s vakuolou či od nej odvođenými vezikulami (Obr. 4.6.B.), ale naopak jednoznačne kolokalizuje s lipidickými partikulami (Obr. 4.6.C.). Lipidické partikuly sú dobre pozorovateľné aj vo svetelnom mikroskope pomocou Nomarského kontrastu (Obr. 4.7.).



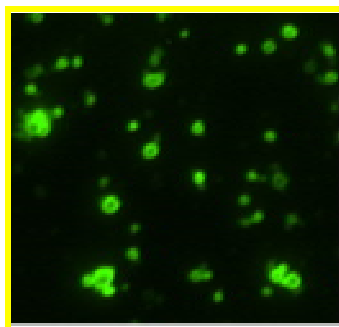
Obrázok 4.6.: Kolokalizácia *Pmp3-GFP* s rôznymi fluorescenčnými faričkami viažúcimi sa do bunkových organel. *A*: zviditeľnenie vakuolárnych membrán využitím FM4-64. *B*: zviditeľnenie DNA využitím DAPI. *C*: zviditeľnenie lipidov využitím Nílskej červeň.



Obrázok 4.7.: Lokalizácia Pmp3p-GFP v lipidických partikulách. Porovnanie fluorescenčných signálov Pmp3p-GFP fúzneho proteínu a lipofilnej farbičky Nile red a obrázok spravený pri viditeľnom svetle s využitím Nomarskeho kontrastu. Potvrdenie lokalizácie Pmp3p na membráne a v lipidických partikulách kvasinkových buniek inými technikami

V experimentoch sme použili kmeň BY-Pmp3-GFP-C. Lokalizáciu na cytoplazmatickej membráne overovala laborantka Alexandra Pokorná z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Bunky na izoláciu membrán inkubovala 16 hodín v tekutom YEG médiu v teplovzdušnej trepačke pri 28°C a následne ich sacharózovou gradientovou centrifugáciou rozdelila na kompartmenty. Z vyizolovaných membrán separovala proteíny (Metóda 3.2.13).

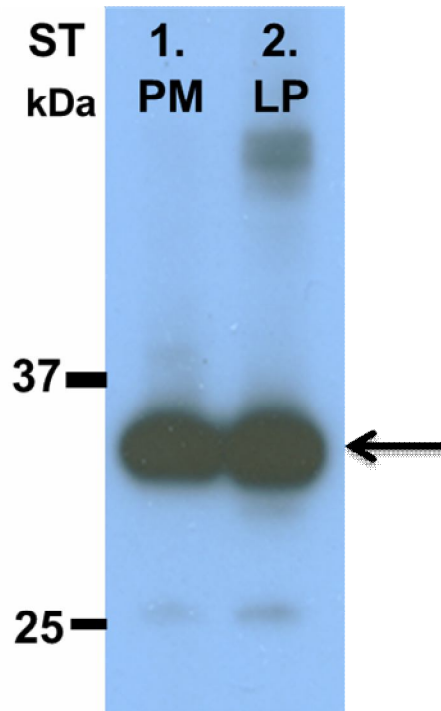
Pre potvrdenie intracelulárnej lokalizácie Pmp3p sme zaviedli metódu izolácie lipidických partikul (kapiptole 3.2.12.). Bunky sme inkubovali 60 hodín v tekutom YEG médiu v teplovzdušnej trepačke pri 28°C. Vyizolovali sme lipidické partikuly gradientovou ultracentrifugáciou, mikroskopicky sme si overili úspešnosť izolácie (Obr. 4.8.) a následne sme z nich izolovali proteíny.



Obrázok 4.8.: Lipidické partikuly kmeňa BY-Pmp3-GFP-C izolované z buniek. Doba expozície fluorescenčného signálu 200 ms.

Obe proteínové frakcie analyzovala A. Pokorná Tris-tricínovou SDS-PAGE elektroforézou (3.2.12.2.) a po prenesení proteínov na PVDF membránu detegovali prítomnosť Pmp3p pomocou špecifických protilátok proti GFP. Výsledky preukázali,

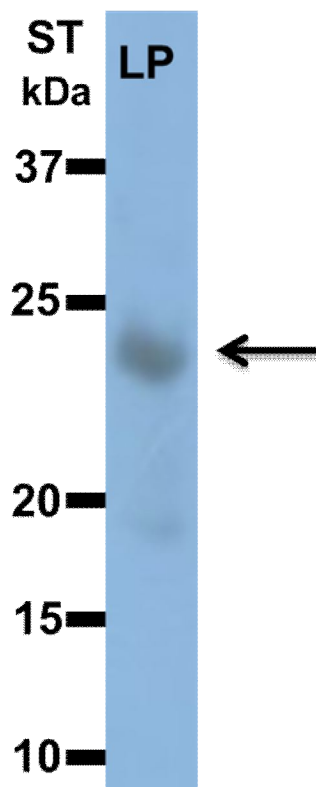
že Pmp3-GFP proteíny sa nachádzajú vo frakcii plazmatických membrán a aj medzi proteínmi lipidických partikul (Obr. 4.9.). Čistota frakcie LP bola pozitívne overená detekciou Pma1p, typického membránového proteínu (Pokorná, osobná komunikácia).



Obrázok 4.9.: Prítomnosť Pmp3p-GFP v proteínových frakciách stanovených metódou Western blot. ST - Štandard molekulových hmotností. 1. PM - vzorka frakcie proteínov z plazmatických membrán. 2. LP - vzorka frakcie proteínov z lipidických partikul. Šípka ukazuje na signál vzniknutý chemoluminiscenčnou reakciou v mieste kde sa nachádza Pmp3p-GFP fúzny proteín.

Keďže lokalizácia Pmp3p na plazmatickej membráne bola *in silico* predikovaná, rozhodli sme sa overiť len novozistenú lokalizáciu v lipidických partikuliach. Kmeň BY-Pmp3-GFP-C vykazuje intermediálne prežívanie (horšie ako rodičovský kmeň BY4742 lepšie ako deletant BY-pmp3 Δ) za stresových podmienok. Na základe tohto poznatku sme použili kmeň BY-Pmp3-HA, ktorý má na Pmp3p napojenú menšiu globulárnu detekčnú doménu a v stresových podmienkach sa správa takmer ako rodičovský kmeň (Kapitola 4.3.1.). Bunky sme kultivovali za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom experimente a rovnakou metódou sme vyizolovali proteíny lipidických partikul. Prítomnosť Pmp3p-HA fúzneho proteínu sme detegovali po SDS-PAGE elektroforéze a po prenesení proteínov na PVDF membránu sekundárnymi protilátkami proti HA (Metóda 3.2.12.3.).

Prítomnosť Pmp3p-HA proteínu (Obr. 4.10.) bola rovnako ako Pmp3p-GFP potvrdená vo frakcii lipidických partikul a je teda pravdepodobné, že aj natívny Pmp3p bez naviazanej detekčnej sekvencie má rovnakú lokalizáciu.



Obrázok 4.10.: Prítomnosť Pmp3p-HA vo frakcii proteínov lipidických partikul stanovená metódou Western blot. ST- Štandard molekulových hmotností. LP- vzorka frakcie proteínov z lipidických partikul. Šípka ukazuje na signál vzniknutý chemoluminiscenčnou reakciou v mieste kde sa naviazali protilátky proti HA .

4.2 Zistenie času a podmienok produkcie Pmp3p v kolóniách

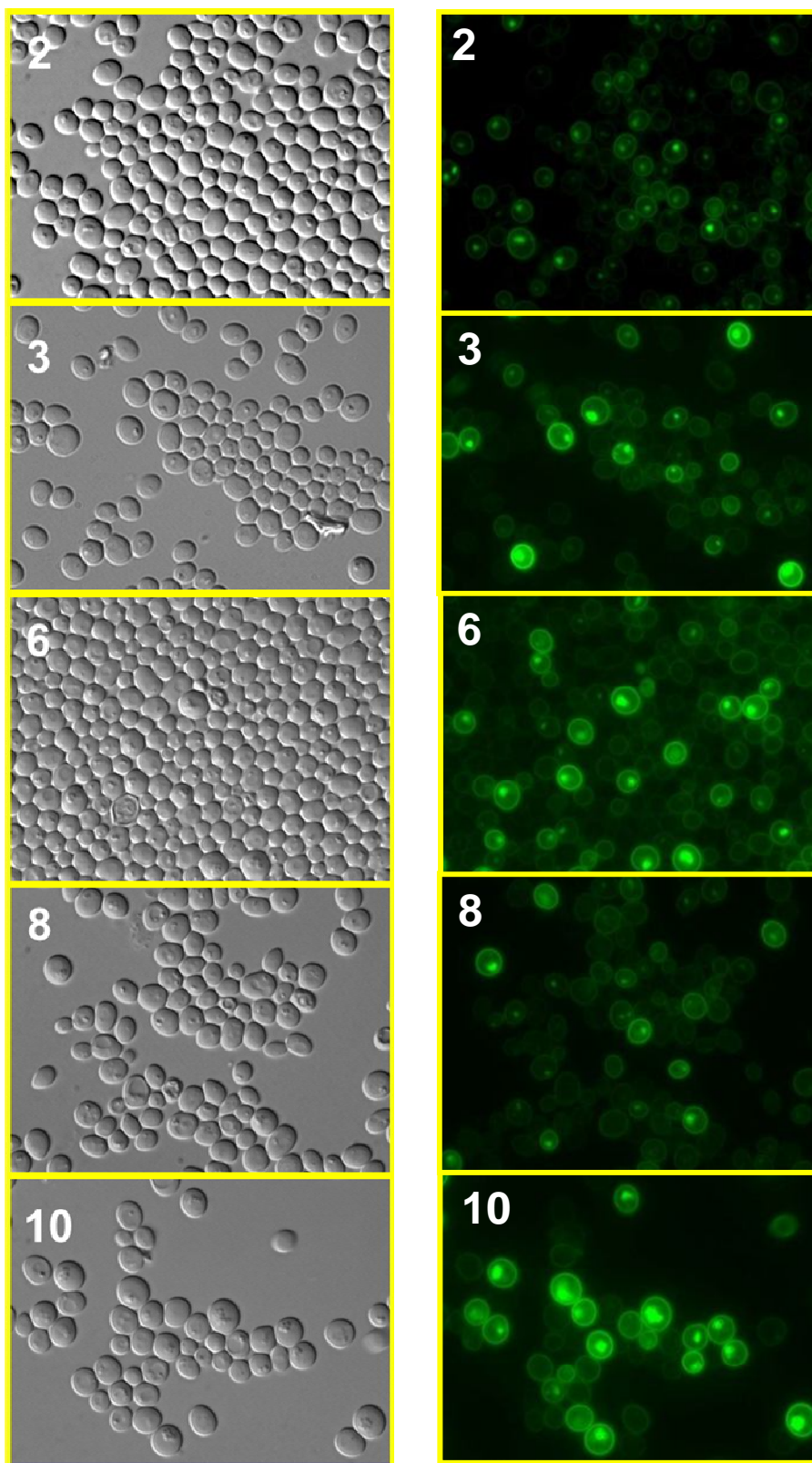
Cieľ: Zistiť hladinu Pmp3p počas vývoja kolónie v závislosti od kultivačných podmienok.

Pripravený kmeň BY-Pmp3-GFP-C nesúci značený Pmp3p sme použili na zisťovanie prítomnosti a množstva Pmp3p-GFP proteínu v kvasinkových bunkách kultivovaných za rôznych podmienok. Porovnávali sme rast na fermentovateľnom zdroji uhlíka a na respiratívnom médiu s cieľom zistiť jeho dôležitosť pre dané podmienky počas vývoja kolónie.

Pre stanovenie hladiny Pmp3p sme použili fluorescenčnú mikroskopiu a techniku Western blot (Metódy kapitola 3.2.5. a 3.2.11.)

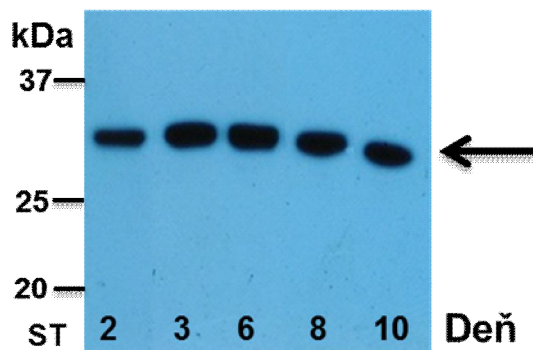
4.2.1. Prítomnosť Pmp3p na fermentovateľnom médiu

Kolónie kmeňa BY-Pmp3-GFP-C sme kultivovali na pevnom YEG médiu po dobu 10 dní. Vo vybraných časoch, ktoré sú uvedené na obrázok 4.11. v ľavom hornom rohu, sme odobrali vzorky buniek. Signál GFP sme detegovali fluorescenčným mikroskopom (Metóda. 3.2.5.). Bunky z kolónií vykazovali stabilnú hladinu a identickú lokalizáciu Pmp3p proteínu počas celej doby ich kultivácie (Obr. 4.11.). Rozdiely intenzity signálu na obrázkoch vznikli ako dôsledok oslabenia signálu spôsobeného rozpadom aktívnych centier GFP, ktoré sa prejavili v dôsledku krátkej expozičnej doby snímania.



Obrázok 4.11.: Lokalizácia Pmp3p-GFP proteínu v bunkách kolónií kmeňa *BY-Pmp3-GFP-C* rastúcich na pevnom YEG médiu. Číslo v ľavom hornom rohu udáva deň kultivácie. Obrázky boli snímané za rovnakých podmienok, doba expozície pri fluorescenčných obrázkoch je 200ms.

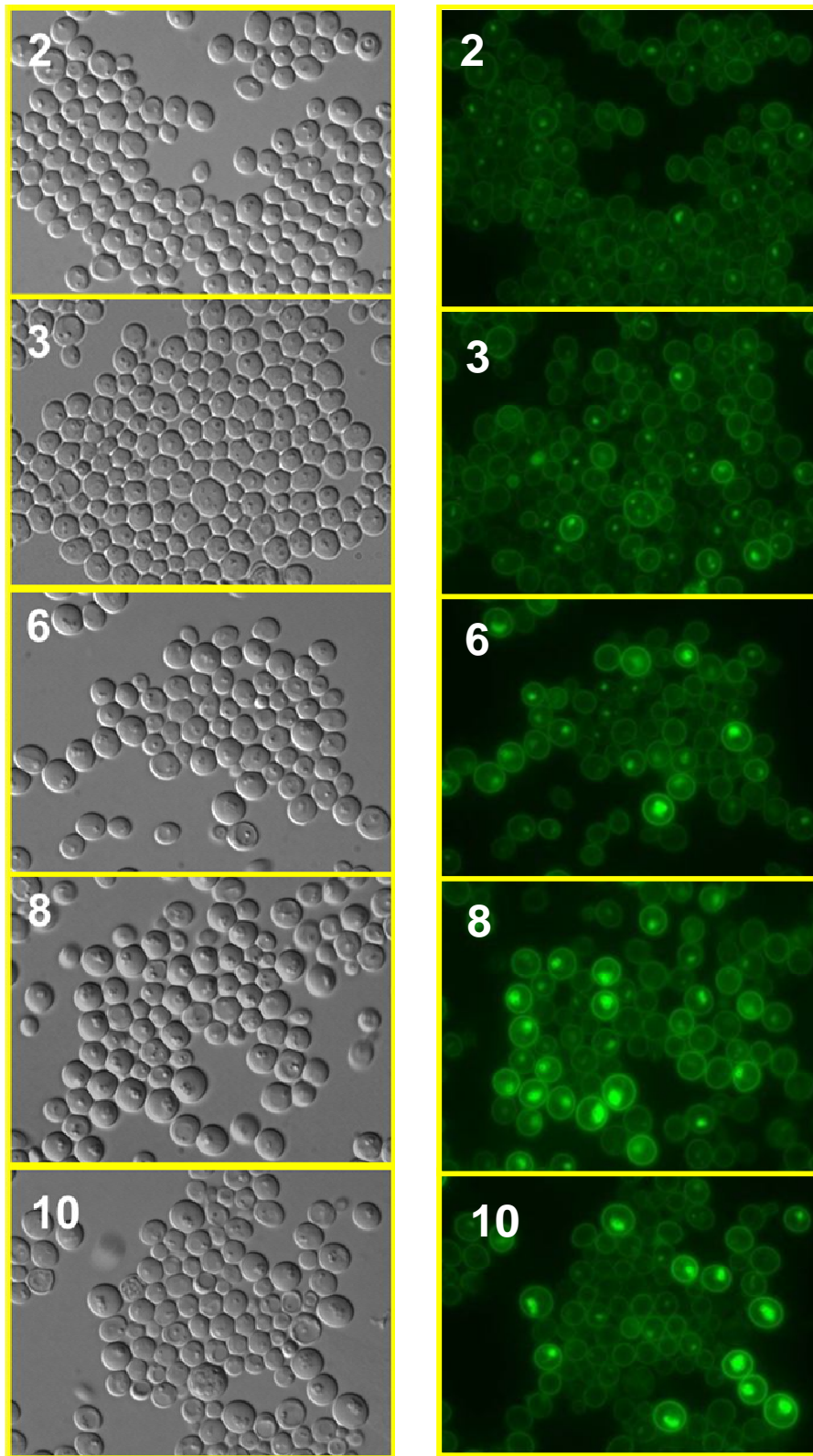
Krátke expozičné doby použité pri fluorescenčnej mikroskopii nám neumožnili porovnať množstvo proteínu v rámci bunkovej populácie. Preto sme pripravili paralelne kvantifikáciu Pmp3p-GFP proteínu pomocou metódy Western blot. Z buniek odobratých z kolónií v jednotlivých časoch v priebehu 10 dní sme izolovali proteíny (Metóda 3.2.11.1.), ktoré sme rozdelili metódou SDS-PAGE (Metóda 3.2.11.2.) a následne sme detegovali GFP-špecifickou protilátkou. Výsledky jasne ukázali, že hladina Pmp3p-GFP proteínu je stabilná v priebehu sledovaného vývoja rastu na YEG pôde v rámci celej populácie (Obr. 4.12.).



Obrázok 4.12.: Hladina Pmp3p proteínu v kolóniách rastúcich na YEG stanovená metódou Western blot. ST - Štandard molekulových hmotností. Čísla v jednotlivých dráhach udávajú počet dní kultivácie buniek. Šípka ukazuje na signál vzniknutý chemoluminiscenčnou reakciou v mieste kde sa naviazali špecifické protilátky proti GFP.

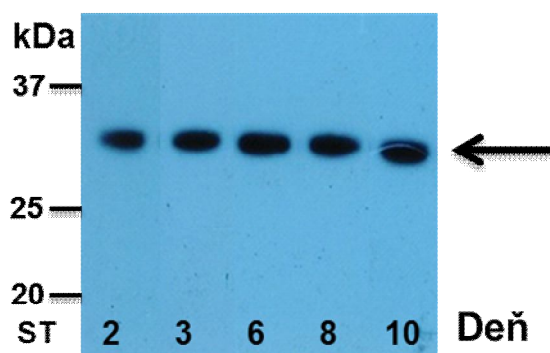
4.2.2. Prítomnosť Pmp3p na respiračnom médiu

Kolónie kmeňa BY-Pmp3-GFP-C sme kultivovali na pevnom GMA médiu po dobu 10 dní. Vo vybraných časoch, ktoré sú uvedené na obrázku 4.13. v ľavom hornom rohu, sme odobrali vzorky buniek. Signál GFP sme detegovali fluorescenčným mikroskopom (Metóda 3.2.5.). Bunky z kolónií vykazovali stabilnú hladinu a identickú lokalizáciu Pmp3p proteínu počas celej doby ich kultivácie (Obr. 4.13). Rozdiely intenzity signálu na obrázkoch vznikli ako dôsledok oslabenia signálu spôsobeného rozpadom aktívnych centier GFP, ktoré sa prejavili v dôsledku krátkej expozičnej doby snímania.



Obrázok 4.13.: Lokalizácia Pmp3-GFP proteínu v bunkách kolónii kmeňa BY-Pmp3-GFP-C rastúcich na pevnom GM médiu. Číslo v ľavom hornom rohu udáva deň kultivácie. Obrázky boli snímané za rovnakých podmienok, doba expozície pri fluorescenčných snímkoch je 200 ms.

Rovnako ako v predchádzajúcom pokuse (4.2.3.) sme paralelne kvantifikovali hladinu Pmp3p-GFP proteínu pomocou metódy Western blot. Izolovali sme proteíny z buniek odobratých v jednotlivých časoch v priebehu 10 dní (Metóda 3.2.11.1.), ktoré sme rozdelili metódou SDS-PAGE (Metóda 3.2.11.2.) a následne sme detegovali GFP-špecifickou protilátkou. Výsledky jasne ukázali, že hladina Pmp3p-GFP proteínu je stabilná v priebehu sledovaného vývoja rastu na GMA pôde v rámci celej populácie (Obr. 4.14.)



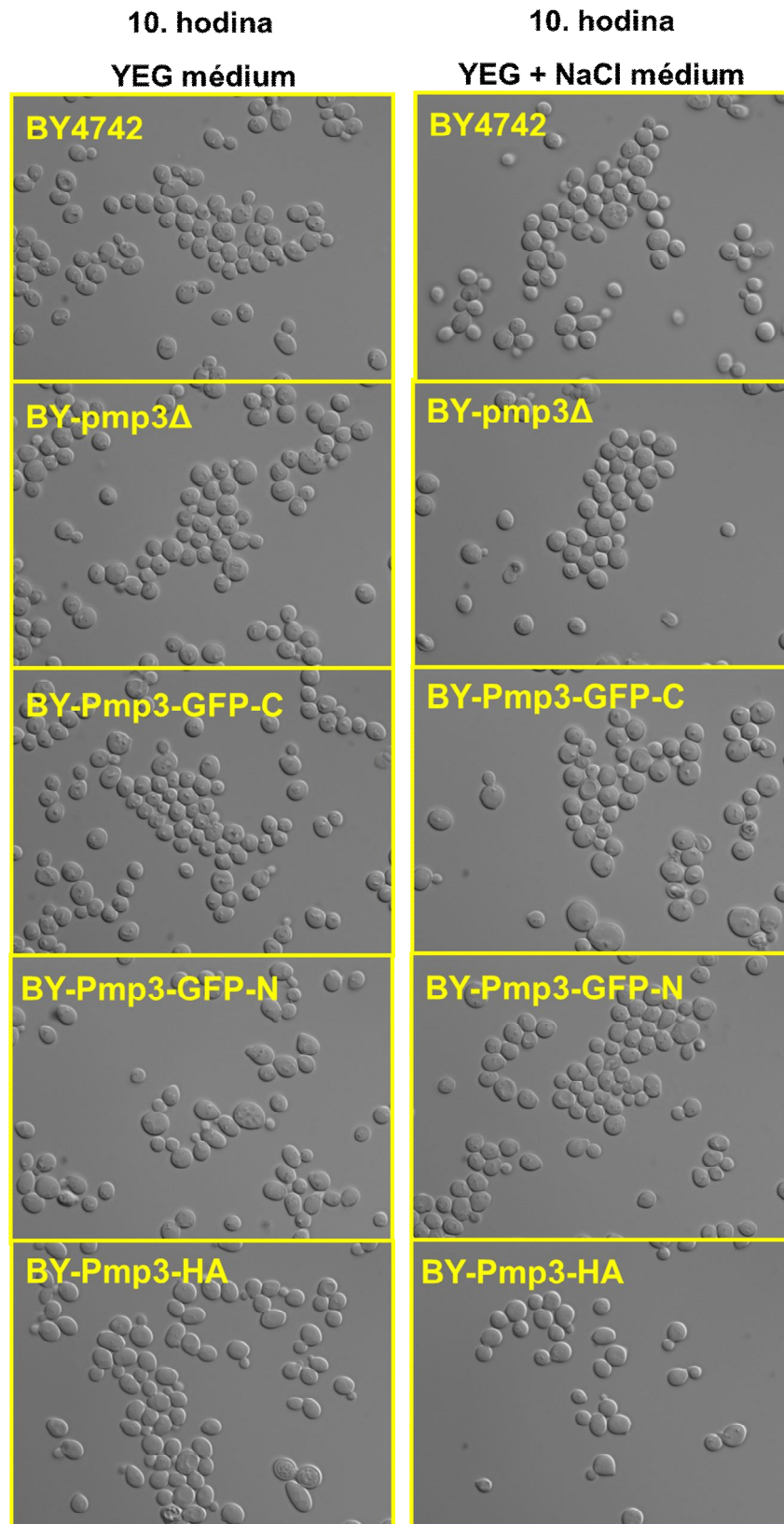
Obrázok 4.14.: Hladina Pmp3p proteínu v kolóniách rastúcich na GMA pôde stanovená metódou Western blot. ST - Štandard molekulových hmotností. Čísla v jednotlivých dráhach udávajú počet dní kultivácie buniek. Šípka ukazuje na signál vytvorený chemoluminiscenčnou reakciou v mieste kde, sa naviazali špecifické protilátky proti GFP.

4.3.1 Vplyv zvýšenej koncentrácie solí na stabilitu buniek bez Pmp3p alebo s čiastočne funkčným Pmp3p

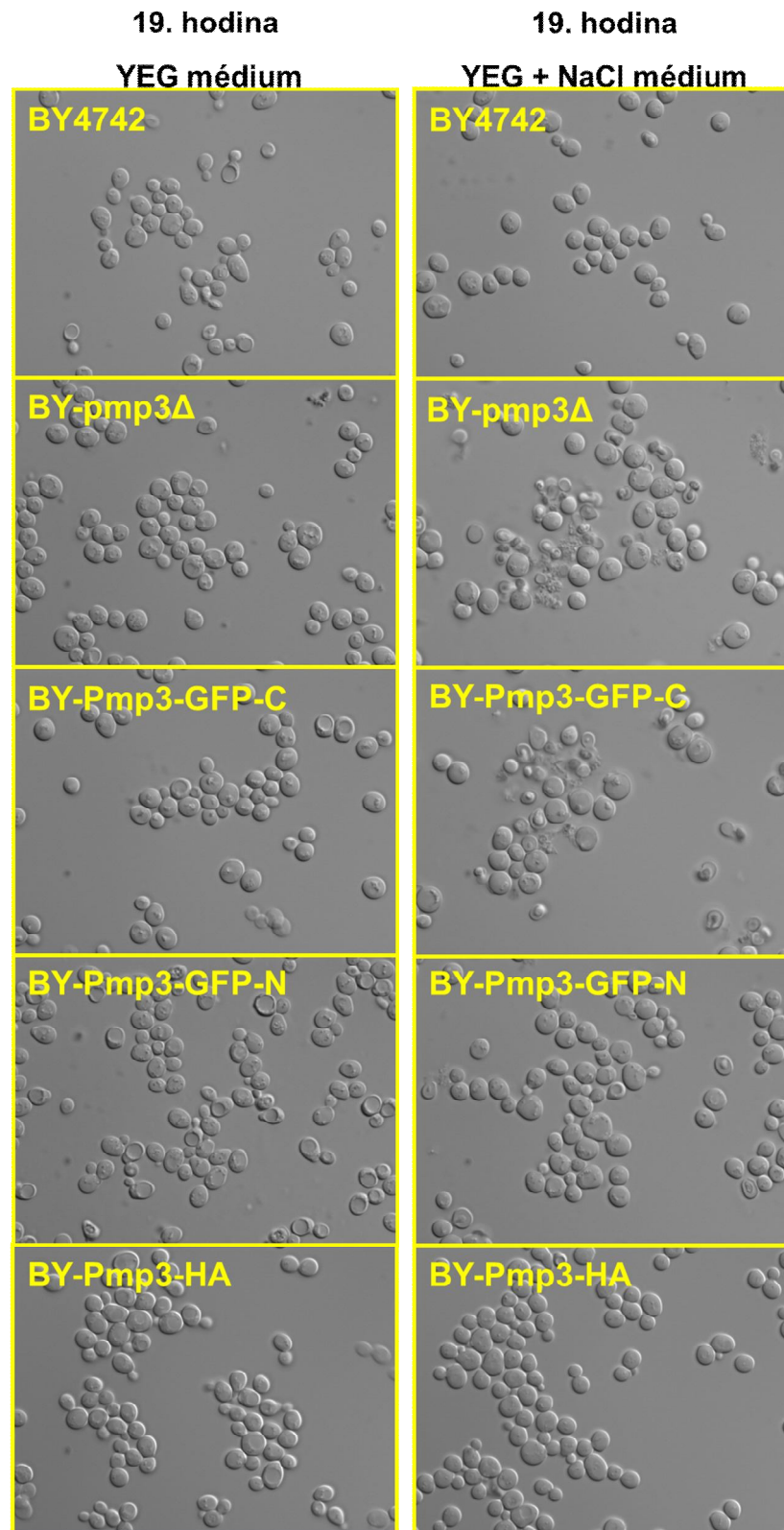
Aby sme zistili nakoľko zostala zachovaná funkčnosť Pmp3 v konštruktoch BY-PMP3-GFP-C, BY-PMP3-GFP-N a BY-Pmp3-HA porovnali sme prežívanie jednotlivých konštruktov v médiu obsahujúcom chlorid sodný a v médiu bez soli.

Porovnávali sme rast pripravených konštruktov s rastom rodičovského kmeňa BY4742 a kmeňa BY-pmp3Δ. Bunky sme nariesili na pomerne vysokú počiatočnú optickú denzitu ($OD_{580} \sim 2$), ktorá nám umožnila pozorovať stacionárnu fázu rastu, kde sa prejavuje daný fenotyp. Kmene sme kultivovali v tekutom YEG médiu a v rovnakom médiu, ktoré obsahovalo 0,4M chlorid sodný. Z mikroskopických pozorovaní sme zistili, že bunky všetkých konštruktov nevykazovali známky

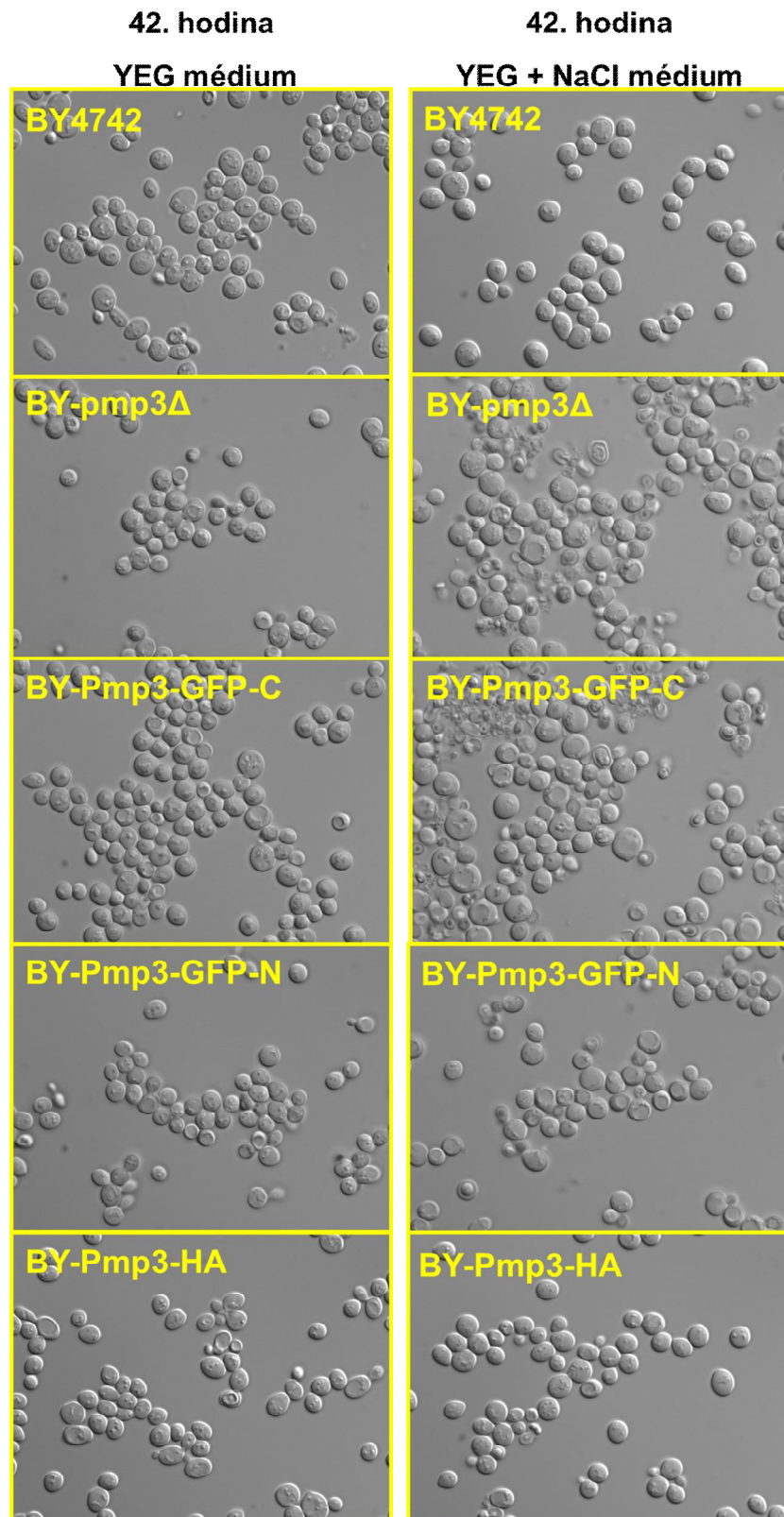
poškodenia počas prvých 10 hodín rastu (Obr. 4.15.). Prvý rozdiel sme pozorovali v 19 hodine kultivácie - bunky kmeňov BY-pmp3 Δ a BY-Pmp3-GFP-C rastúce na YEG + NaCl boli poškodené (Obr.4.16.). V 42 hodine rastu sme pozorovali prvé rozbitie buniek aj u kmeňa BY-Pmp3-GFP-N rastúcich na médiu YEG + NaCl (Obr.4.17.). Za sledovaných podmienok sme nepozorovali výraznejšie poruchy štruktúry buniek kmeňa BY-Pmp3-HA rastúcich na YEG + NaCl médiu.



Obrázok 4.15.: Fitnes buniek v 10. hodine kultivácie na YEG médiu a na YEG médiu s 0,4M chloridom sodným. Porovnanie prežívania buniek BY4742, BY-pmp3Δ, BY-Pmp3-GFP-C, BY-Pmp3-GFP-N a BY-Pmp3-HA



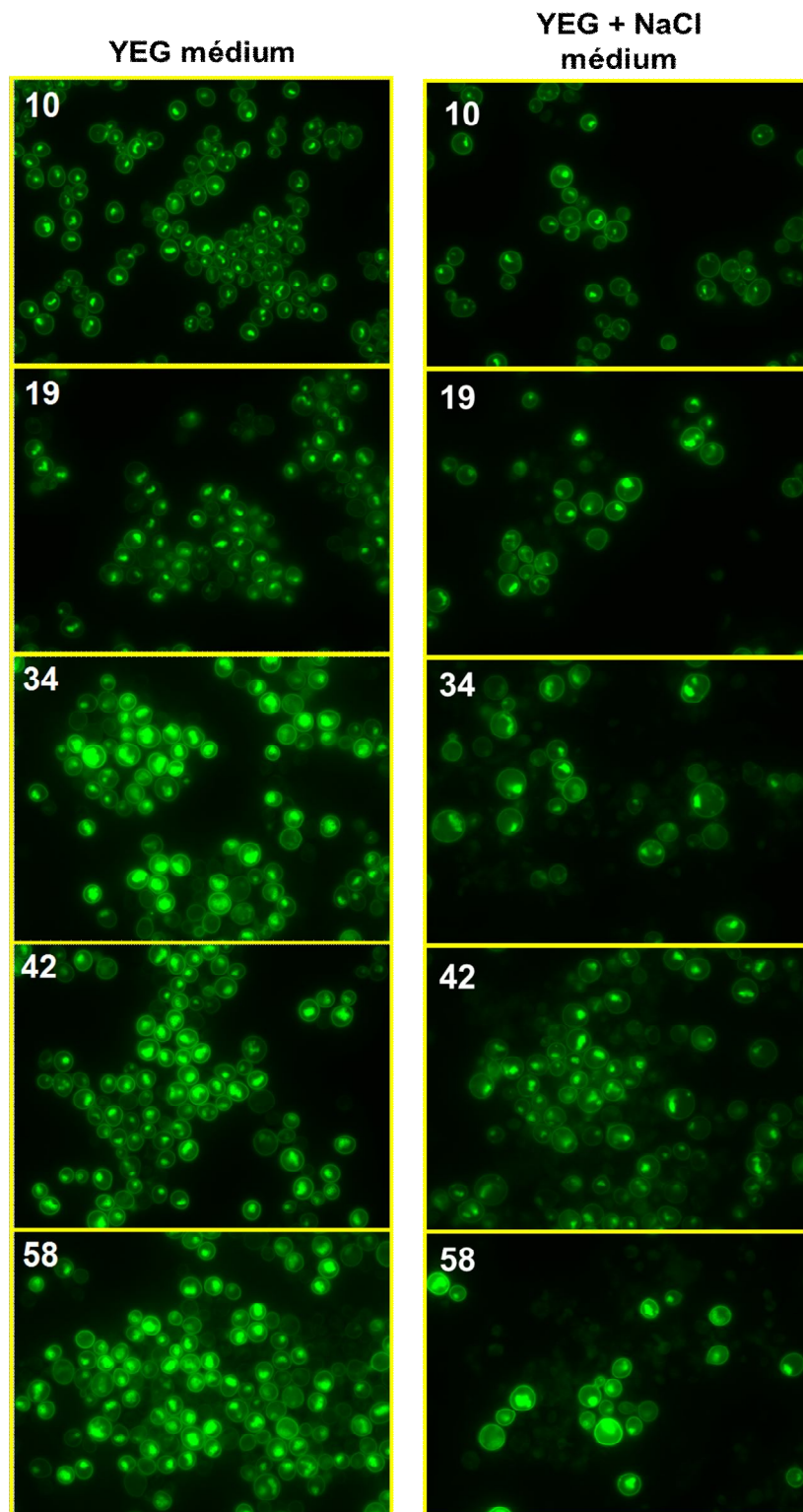
Obrázok 4.16.: *Fitness buniek v 19. hodine kultivácie na YEG médiu a na YEG médiu s 0,4M chloridom sodným. Porovnanie prežívania buniek BY4742, BY-pmp3Δ, BY-Pmp3-GFP-C, BY-Pmp3-GFP-N a BY-Pmp3-HA*



Obrázok 4.17.: *Fitness buniek v 42. hodine kultivácie na YEG médiu a na YEG médiu s 0,4M chloridom sodným. Porovnanie prežívania buniek BY4742, BY-pmp3 Δ , BY-Pmp3-GFP-C, BY-Pmp3-GFP-N a BY-Pmp3-HA.*

4.3.2. Pozorovanie hladiny Pmp3 počas stresu

Možné zvýšenie hladiny Pmp3p počas soľného stresu znamenajúce jeho potrebnosť v týchto podmienkach sme pozorovali u kmeňa BY-Pmp3-GFP-C pomocou fluorescenčného mikroskopu. Porovnávali sme hladinu Pmp3p-GFP fúzneho proteínu počas rastu v tekutom glukózovom médiu obsahujúcom 0,4M chlorid sodný a v médiu bez soli. Vo vybraných časoch, ktoré sú uvedené na obrázku v ľavom hornom rohu, sme odobrali vzorky buniek. Od 34. hodiny kultivácie sme pozorovali poškodenie buniek v médiu obsahujúcom soľ. Do tej doby sme nepozorovali výraznejší rozdiel v intenzite fluorescenčného signálu a ani v stresom poškodených bunkách sa výrazne nemenila hladina Pmp3p-GFP proteínu (Obrázok 4.18.).



Obrázok 4.18.: Hladina Pmp3p-GFP proteínu v tekutom YEG médiu a v YEG médiu s 0,4M chloridom sodným. Od 34. hodiny boli bunky poškodené.

4.3.3. Lokalizácia Ato proteínov v neprítomnosti Pmp3p

Prepojenie funkcie Pmp3p s vytváraním raftových domén sme overili porovnaním lokalizácie amoniakových (Ammonia (Ammonium) Transport Outward) Ato transportérov. Pre overenie tejto hypotézy sme porovnávali kmene, ktoré mali deletovaný *PMP3* gén a GFP proteínom označené amoniakové transportéry (BY-pmp3 Δ -Ato1-GFP, BY-pmp3 Δ -Ato2-GFP a BY-pmp3 Δ -Ato3-GFP kmene). U rodičovských kmeňov BY-Ato1-GFP, BY-Ato2-GFP a BY-Ato3-GFP, ktoré majú fluorescenčne značené Ato proteíny bola už v minulosti potvrdená raftová lokalizácia (Řičicová *et al.* 2007)

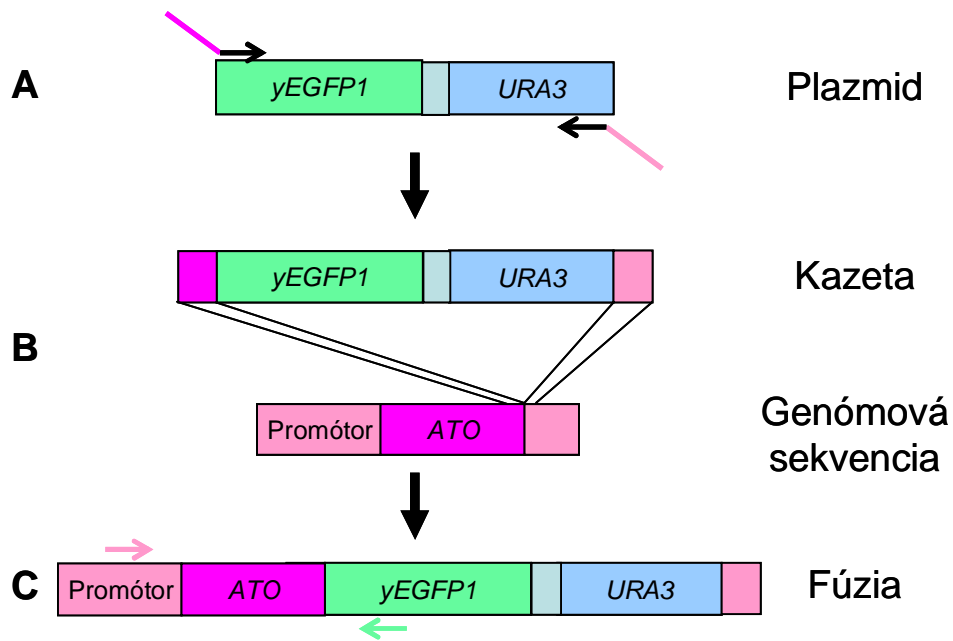
4.3.3.1. Príprava fluorescenčne značených Ato proteínov v kmeni BY-pmp3 Δ

Pri vytváraní kmeňov, ktoré mali značené Ato proteíny a neobsahovali *PMP3* gén, sme použili ako rodičovský kmeň BY-pmp3 Δ kúpený v EUROSCARF (Tab. 3.1.). Kmeň BY-pmp3-Ato1-GFP pripravila Mgr. Dita Strachotová. Kmene BY-Ato1-GFP, BY-Ato2-GFP a BY-Ato3-GFP pripravila Mgr. Markétou Řičicovou. Kmene BY-pmp3-Ato2-GFP a BY-pmp3-Ato3-GFP sme pripravili v rámci tejto práce.

Príprava BY-pmp3-Ato2-GFP kmeňa zahrňala jednu transformačnú reakciu. Postupovali sme podľa metodiky 3.2.8, lineárnu kazetu sme pripravili za použitia plazmidu pKT209 (tab. 3.2) naštiepeného endonukleázou HindIII a primerov (pKT Ato2 F a pKT Ato2 R, resp. pKT Ato3 F a pKT Ato3 R; tab. 3.3.), ktoré mali jeden koniec homológny k plazmidu a druhý k sekvencii nachádzajúcej sa v okolí STOP kodónu *ATO2* (resp. *ATO3*) génu (Tab. 3.2., obr. 4.19.A.).

Za použitia teplotného a chemického šoku sme pripravené kazety (Obr. 4.19.B.) vpravili do buniek kmeňa BY-pmp3 Δ a následne sme tieto bunky vysiali na minimálne médium bez obsahu uracilu, pretože gén *URA3* pre biosyntézu uracilu sme využili ako selekčný marker. V kvasinkách sa celá kazeta vymenila homológnou rekombináciou za STOP kodón *ATO2* (resp. *ATO3*) génu čím sa sekvencia *GFP* génu prepisovala bez prerušenia priamo za *ATO2* (resp. *ATO3*) génom a vznikol jeden fúzny proteín (Obr. 4.19.C.). Z vyrastených kolónií sme náhodne vybrali šesť, ktoré sme paralelne preniesli na YEPG médium a na GMA médium s pH indikátorom brómkrezolová purpur (BKP), ktorý umožnil určiť alkalickú fázu

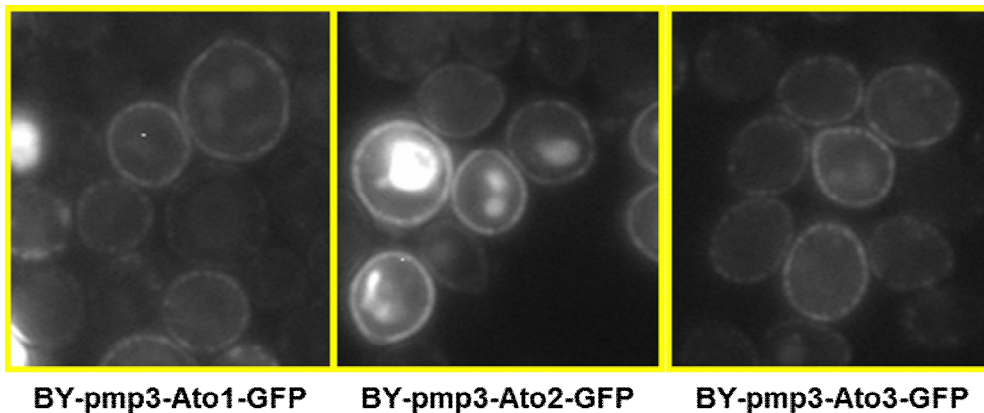
vývinu buniek, typickú pre produkcia Ato proteínov. Bunky z YEPG média sme potom využili na tvorbu zásobných konzerv. U štyroch klonov, ktoré mali pozitívny fluorescenčný signál v mikroskope sme porovnali priebeh vývojových fáz počas rastu na respiračnom médiu s vývojom rodičovského kmeňa. U klonov ktoré sa vyvíjali porovnateľne s rodičovským kmeňom sme overili správne vloženie kazety využitím sady primerov (Ato2 int F a yEGFP int R; resp. Ato3 int F a yEGFP int R, tab. 3.3.), ktorou sme pripravili úseky DNA obsahujúce koniec *ATO2* (resp. *ATO3*) génu a začiatok GFP sekvencie. Následne sme tieto DNA úseky sekvenovali.



Obrázok 4.19.: Schéma prípravy *BY-pmp3-ATO-GFP* kmeňov. . **A.** Príprava transformačnej kazety. Farebné šípky naznačujú naviazanie primerov. **B.** Integrácia kazety homológnu rekombináciou do DNA sekvencie v oblasti *ATO* génu. **C.** Situácia po včlenení kazety do genómu. Farebné šípky naznačujú naviazanie overovacích primerov

4.3.3.2. Lokalizácia Ato-GFP proteínov v kmeni BY-pmp3 Δ .

Jednotlivé kmene (BY-Ato1-GFP, BY-Ato2-GFP, BY-Ato3-GFP, BY-pmp3-Ato1-GFP, BY-pmp3-Ato2-GFP a BY-pmp3-Ato3-GFP) sme kultivovali na respiračnom GMA médiu s pH indikátorom ako šesticu makrokolónií (Metóda 3.2.4.). V alkalickú fázu rastu sme odobrali bunky a mikroskopicky sme pozorovali lokalizáciu GFP signálu (Metóda 3.2.5.). Výsledky ukázali, že aj v neprítomnosti Pmp3p ostáva zachovaná lokalizácia Ato proteínov v membránových raftových mikrodomén (Obr. 4.20.). Na obrázku 4.20 sú zachytené len bunky kmeňov, ktoré mali deletovaný *PMP3* gén. V kmeňoch BY4742 so značenými Ato proteínmi bola lokalizácia rovnaká.



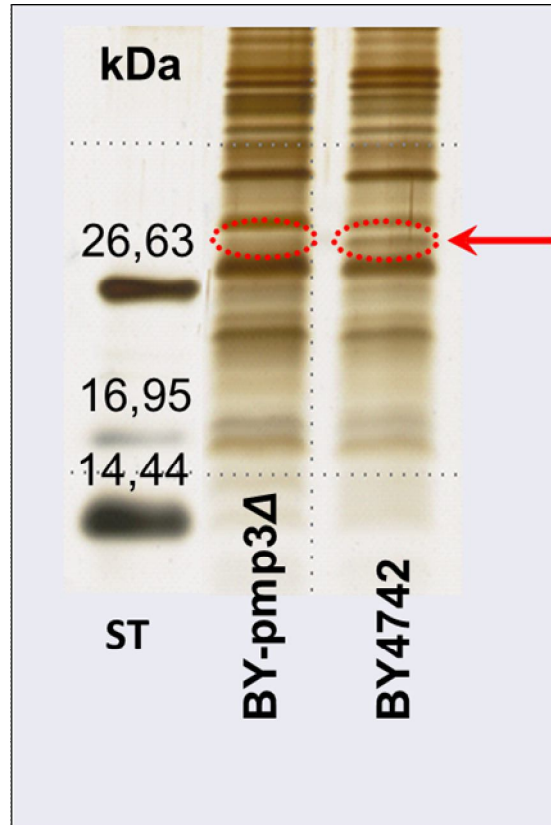
Obrázok 4.20.: Lokalizácia Ato-GFP proteínov v neprítomnosti Pmp3p.

4.3.4. Porovnanie proteínového zloženia plazmatických membrán u rodiča a u kmeňa BY-pmp3 Δ

Jednou z ďalších možných funkcií Pmp3p proteínu je ovplyvnenie funkcie (lokalizácie alebo aktivity) neznámeho transportného systému plazmatickej membrány. Pokúsili sme sa preto zistiť, či neprítomnosť Pmp3p vedie k zmene proteínového zloženia plazmatickej membrány.

V spolupráci s Alexandrou Pokornou z Mikrobiologického ústavu AV ČR sme porovnali proteíny plazmatických membrán u buniek kmeňov BY4742 a BY-pmp3 Δ . A. Pokorná bunky kultivovala 16 hodín v tekutom YEG médiu v teplovzdušnej trepačke pri 28°C. Následne izolovala proteíny z membrán, ktoré rozdelila podľa veľkosti tricínovou SDS-PAGE elektroforézou a farbila striebrom. Výsledky

preukázali rozdielne proteínové zloženie plazmatických membrán. BY-pmp3Δ kmeňu chýbal proteín v oblasti 27 kDa (Obr.4.2.1.).



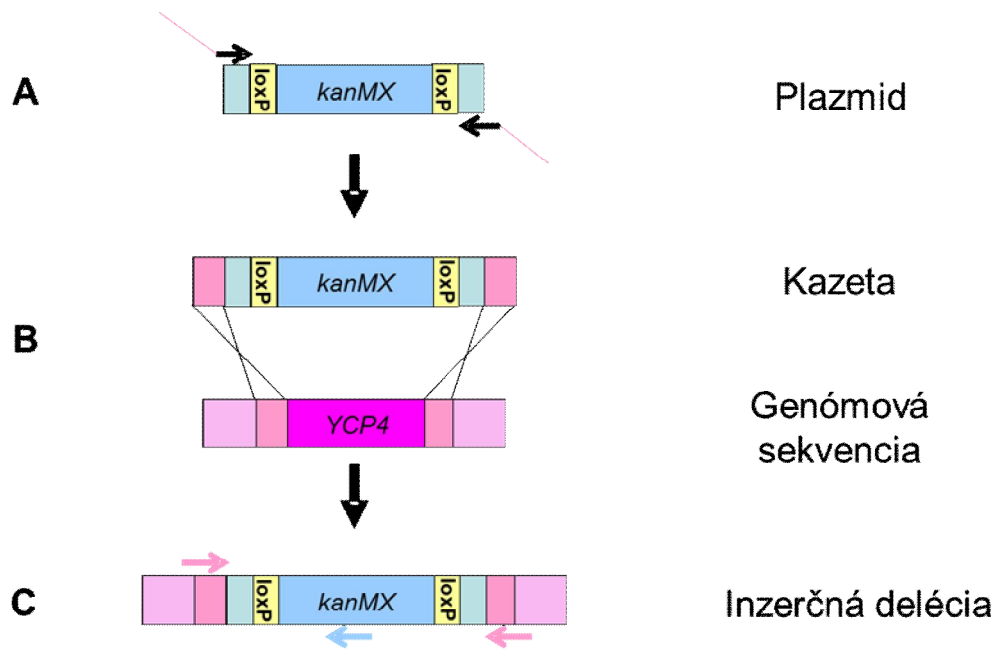
Obrázok 4.21.: Porovnanie proteínového zloženia plazmatických membrán rodičovského kmeňa BY4742 a BY-pmp3Δ po elektroforetickom rozdelení a farbení striebrom. ST- Štandard molekulových hmotností.. Prvá dráha (BY-pmp3Δ) - proteínová frakcia plazmatických membrán kmeňa BY-pmp3Δ. Druhá dráha (BY4742) - proteínová frakcia plazmatických membrán kmeňa BY4742. Červenými krúžkami je zvýraznený rozdiel v proteínovom zložení.

Sekvenácia tejto oblasti naznačila, že by sa mohlo jednať o chýbajúci Ycp4p, neznámej funkcie, ktorý má sekvenčnú podobnosť s flavodoxínmi (Grandori a Carey 1994).

Z tohto dôvodu sme pripravili BY-ycp4Δ kmeň. Postupovali sme podľa metodiky 3.2.8. Lineárnu transformačnú kazetu sme pripravili PCR reakciou v ktorej sme použili plazmid pUG6 (Tab. 3.2.) (obsahujúci hphNT1 gén ako selekčný marker) spolu s primerami, ktorých časť bola homológna k plazmidu a druhá časť k oblasti okolo YCP4 génu (pUG YCP4 F a pUG YCP4 R, tab.3.3.) (Obr. 4.22.A).

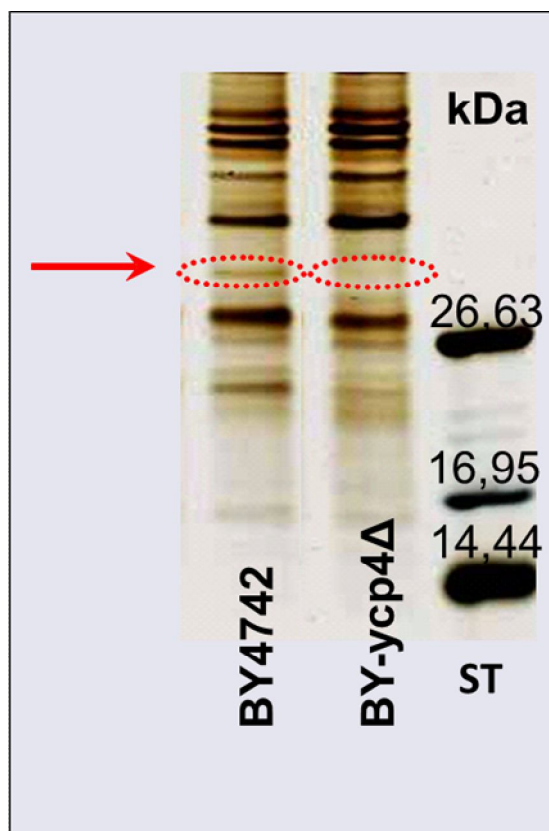
Pripravené kazety sme vložili do genómu rodičovského BY4742 kmeňa. Po vysiati na selekčné médiu s antibiotikom G418 prebehla transformácia (Obr. 4. 22.B.) a narástli nám iba kolónie, ktoré mali namiesto YCP4 génu integrovanú kazetu (Obr.

4.22.C.). Správne včlenenie kazety sme overili u 10 klonov s použitím dvoch sád primerov, YCP4 F a YCP4 R, a YCP4 F a Kan R (Tab. 3.3.).



Obrázok 4.22.: Schéma prípravy BY-ycp4Δ kmeňa. A. Príprava transformačnej kazety. Farebné šípky naznačujú naviazanie primerov. B. Integrácia kazety homológnu rekombináciou do DNA sekvencie v oblasti YCP4 génu. C. Situácia po včlenení kazety do genómu. Farebné šípky naznačujú naviazanie overovacích primerov

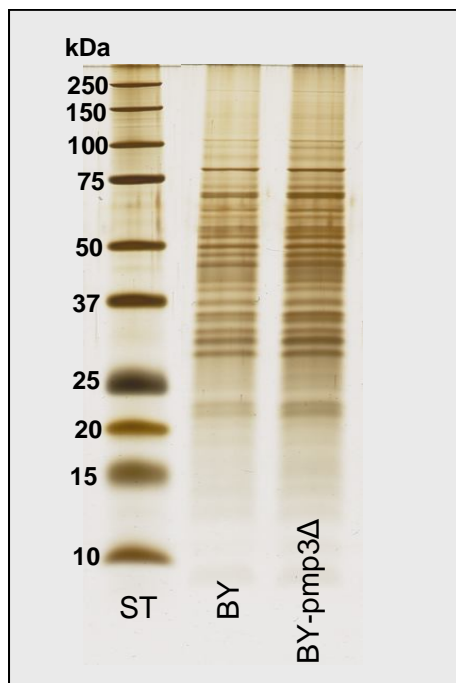
Pre potvrdenie, či sa naozaj jednalo o stratu Ycp4p, sme v spolupráci s Alexandrou Pokornou porovnali proteínové zloženie plazmatických membrán u kmeňov BY4742 a BY-ycp4 Δ. Bunky sa kultivovali 16 hodín v tekutom YEG médiu v teplovzdušnej trepačke pri 28°C . Následne sme izolovali proteíny z membrán (Metóda 3.2.12.1.), rozdelili podľa veľkosti tricínovou SDS-PAGE a farbili striebrom (Metóda 3.2.12.2.). Výsledky preukázali podľa očakávania rozdielne proteínové zloženie plazmatických membrán. BY-ycp4Δ kmeňu chýbal proteínový prúžok presne v tej oblasti a takej intenzity, ako u kmeňa BY-pmp3Δ (Obr. 4.2.3.)



Obrázok 4.23.: Porovnanie proteínového zloženia plazmatických membrán rodičovského kmeňa BY4742 a BY-ycp4Δ po elektroforetickom rozdelení a farbení striebrom. ST- Štandard molekulových hmotností. Prvá dráha (BY4742) - proteínová frakcia plazmatických membrán kmeňa BY4742. Druhá dráha (BY-ycp4Δ) - proteínová frakcia plazmatických membrán kmeňa BY-ycp4Δ. Červenými krúžkami je zvýraznený rozdiel v proteínovom zložení.

4.3.5. Porovnanie proteínového zloženia lipidických partikul u rodiča a u kmeňa BY-pmp3Δ

Po zistení zmien proteínového zloženia plazmatických membrán medzi kmeňmi BY4742 a BY-pmp3Δ sme sa rozhodli porovnať proteínové zloženie lipidických partikul. Bunky oboch kmeňov sme kultivovali 60 hodín pri 28°C v tekutom YEG médiu a následne sme izolovali proteíny LP (Metóda 3.2.12.). Rozdelenie podľa veľkosti tricínovou SDS-PAGE elektroforézou a nafarbenie striebrom spravila laborantka A. Pokorná z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Výsledky nepreukázali významnejšie rozdiely v proteínovom zložení lipidických partikul medzi BY4742 a BY-pmp3Δ kmeňmi (Obr. 4.2.4.).



Obrázok 4.24.: Porovnanie proteínového zloženia lipidických partikul rodičovského kmeňa BY4742 a BY-pmp3Δ po elektroforetickom rozdelení a farbení striebrom. ST- Štandard molekulových hmotností. Prvá dráha (BY4742) - proteínová frakcia lipidických partikul kmeňa BY4742. Druhá dráha (BY-pmp3Δ) - proteínová frakcia lipidických partikul kmeňa BY-pmp3Δ.

5. Diskusia

V dobe keď som začínala pracovať na mojej diplomovej práci už prebiehal výskum Pmp3p proteínom v našom laboratóriu. Rovnako ako v iných pracoviskách sa zameriaval na skúmanie *pmp3Δ* kmeňu. Týmto proteolipidom sa v našom laboratóriu začali zaoberať potom, ako pozorovali, že počas vývoja kvasinkovej kolónie na pevnom médiu prebiehajú zmeny celkového membránového potenciálu (cMP) s amplitúdov niekoľkých dní pričom odzrkadľujú zmeny pH v okolí kolónie. Maximum cMP je v strede vývojových fáz (Palková *et al.* 2009).

Pre bližšie pochopenie významu potenciálu počas vývoja kolónie hľadali nejaký proteín, ktorý by ovplyvňoval membránový potenciál. Navarre a Goffeau (2000) publikovali článok v ktorom opisujú nový proteolipid Pmp3p nachádzajúci sa u *Saccharomyces cerevisiae*. Uvádzajú že kmeň *pmp3Δ* má zvýšený cMP oproti rodičovskému kmeňu W303-1B. Vychádzali z pozorovaní, že v *pmp3Δ* bunkách v podmienkach zvýšenej hladiny extracelulárneho Na⁺ sa zvyšuje aj jeho intracelulárna hladina a že v neprítomnosti známych K⁺ importérov sa zvyšovalo prežívanie buniek na médiu so zníženým obsahom draslíku (Navarre a Goffeau 2000). Z ich analýz usúdili, že Pmp3p sa podieľa na nešpecifickom transporte kationov cez membránu. Hyperpolarizáciu membrány v kmeni *pmp3Δ* potvrdili aj meraním hladiny prítoku [14C] metylamónnia do bunky, markeru na meranie membránového potenciálu. Keď v našom laboratóriu zisťovali, či má delécia *PMP3* génu vplyv aj na osciláciu potenciálu obrátili sa na profesorku Gáškovú z MFF UK a zistili, že BY-*pmp3Δ* kmeň má znížený celkový membránový potenciál v porovnaní s rodičovským kmeňom BY4742 pri všetkých skúmaných podmienkach. Pre vylúčenie endogénnych vplyvov dvoch rôznych kmeňov *S. cerevisiae*, alebo kultivačných podmienok, zmerali potenciál aj u *pmp3Δ* odvedeného od kmeňa W303-1B kmeňu za rovnakých podmienok kultivácie, ktoré boli použité v hore uvedenej publikácii. Ale aj opakované merania ukázali takmer o polovicu nižšiu hladinu cMP (Palková, osobná komunikácia). Rozdiel v meraní si vysvetľujeme rozdielnou metódou merania. Navarre a Goffeau (2000) použili metódu využívajúcu detekciu rádioaktívne značeného metylamín hydrochloridu, ktorá vyžaduje dlhšiu kultiváciu a agresívnejšie chemikálie a navyše implikuje hladinu cMP len nepriamo - na základe citlivosti buniek k toxickým extracelulárnym

agens. Zatiaľ čo Palková a Gášková (2009) využili detekciu fluorescenčne značenej sondy 3,3'-dipropylhiakarbokyanín jodid diS-C₃(3), ktorá sa používa v nízkych koncentráciách. Využitie tejto sondy bolo v minulosti preverená a v súčasnosti sa štandardne používa. (Gášková *et al.* 2002; Marešová *et al.* 2006; Godelová *et al.* 2011). Vzhľadom k celkovému zníženému prežívaniu BY-*pmp3Δ* buniek predpokladáme, že zvýšená citlivosť *pmp3Δ* buniek, na základe ktorej autori predpokladali zvýšenú hladinu membránového potenciálu bola spôsobená tým, že bunky použité pri meraní boli oslabené a teda citlivejšie k stresu. Z pokusov prevedených v našom laboratóriu vyplýva, že funkcia Pmp3p by mohla byť viac prepojená s udržiavaním vitálnej membránovej integrity potrebnej pre udržanie cMP ako s priamym prenosom katiónov do bunky. Pokusy kde sa porovnávalo prežívanie *pmp3Δ* kmeňa za rôznych respiračných podmienok ukázali, že nezáleží či kvasinky rastú na fermentovateľnom alebo respiračnom médiu, ale že ich prežívanie závisí iba od pH média. *pmp3Δ* bunky nie sú schopné dlhodobo rásť a prežívať pri vyššom, alkalickom pH (Palková, osobná komunikácia).

Určenie lokalizácie Pmp3p proteínu v kvasinkových bunkách

Lokalizácia Pmp3p u *S. cerevisiae* nebola pozorovaná, hoci bol izolovaný z proteínovej frakcie plazmatických membrán (Navarre a Goffeau 2000), nebola vytvorená genómová fúzia umožňujúca pozorovať jeho výskyt v živých bunkách. Lokalizovaný bol len rastlinný homológ PutPmp3p v kvasinkovom kmeni, ktorý mal deletovaný vlastný *PMP3* gén, ale prepis prebiehal z DNA vektoru využívajúceho konštitutívny promótor (Chang-Qing *et al.* 2008). Pvým krokom v tejto práci bolo pripraviť kmeň, ktorý by umožňoval sledovať lokalizáciu Pmp3p v bunke. Vytvorili sme kmeň, ktorý mal na Pmp3p kovalentne naviazaný zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein - GFP). Fluorescenčný signál Pmp3-GFP fúzneho proteínu umožnil priamu detekciu v živých bunkách. Analýzou sekvencie Pmp3p pomocou ScanProside databázy sa nenašli žiadne známe motívy. Na základe nedostatku informácií sme pripravili kmene, ktoré mali naviazané GFP na N-konci proteínu a tiež na C-konci. Mikroskopickým pozorovaním sme zistili, že oba fúzne proteíny majú rovnakú predikovanú lokalizáciu na membráne bunky. a tiež sa vyskytujú aj intracelulárne v lipidických partikulách (LP) (Obr. 4.5.). GFP signál detegovaný z kmeňa BY-Pmp3-GFP-N bol výrazne nižší oproti signálu z kmeňa BY-Pmp3-GFP-C (Obr. 4.4.). Pozorované zoslabenie signálu u kmeňa BY-Pmp3-GFP-N mohlo byť

spôsobené problémom pri prechode sekretorickou dráhou, čo by spätne znížilo produkciu proteínu, alebo znížením stability proteínu, či prítomnosťou potenciálnych regulačných sekvencií v kódujúcej sekvencii *PMP3* génu.

Intracelulárnu lokalizáciu Pmp3p-GFP v LP som overovala kolokalizačnými pokusmi s fluorescenčnými farbami, viažucimi sa na bunkové kompartmenty (Obr. 4.6.). Renard *et al.* (2010) publikovali, že proteíny Sna2-4p v neprítomnosti svojej C-treminálnej domény opúšťajú endoplazmatické retikulum v lipidických partikuliach. Pmp3p/Sna1p nemá C-koncovú doménu. Ako sme my overili, autori predpokladali správne, že sa bude Pmp3p nachádzať v partikuliach.

LP boli v minulosti chápane ako zásobné organely neutrálnych lipidov, ale nové výsledky ukazujú, že v nich prebieha biosyntéza lipidov a metabolizmus mastných kyselín, a že takýmto spôsobom udržujú lipidickú homeostázu v bunke. (Athenstaedt *et al.*, 1999). Väčšina proteínov nemá predikované typické transmembránové oblasti, čo je pochopiteľné, pretože LP obsahujú iba jednu fosfolipidovú vrstvu. Do LP lokalizujú na základe ich silného hydrofóbného charakteru. Na druhej strane ani Pmp3p nemá typické transmembránové (TM) domény. 73 % aminokyselín tvoriacich Pmp3p proteín je hydrofóbných a z toho 38 % predstavujú silne hydrofóbné aminokyseliny (leucín, izoleucín a fenylalanín). Uprostred prvej predikovanej TM domény sa nachádzajú dva evolučne konzervované prolíny (P16 a P17) a uprostred druhej TM prolín-glycínový motív (P43 a G44). Prolín ako jediná aminokyselina nemôže vytvárať hydrofóbné väzby s ďalšími aminokyselinami a tým rozrušuje stabilitu transmembránových alfa hélíxov. Bolo dokázané, že jediný prolín v membránovom proteíne červených krviniek - stomatínu je zodpovedný za formovanie unikátnej „hairpin-loop“ štruktúry. Zámena tohto prolínu za inú aminokyselinu spôsobí, že sa topológia stomatínu zmení z integrálnej na transmembránovú (Umlauf *et al.* 2009). Okrem prolínu môžu zlom v α -hélixe spôsobiť aj glycín a serín (Pace CN, Scholtz JM. 1998). Vzhľadom k tomu, že prolín-prolín (PP) a prolín-glycín (PG) sekvencie sú konzervované, predpokladáme že by sa Pmp3p mohol vyskytovať v membráne lipidických partikul, ktorá ako som spomínala má len jednu vrstvu fosfolipidov. V LP by sa vyskytoval ako integrálny proteín a v plazmatickej membráne ako transmembránový. Taktiež je možné, že v plazmatickej membráne sa mení jeho topológia. Otázkou budúcnosti bude vyriešiť problém presnej topológie.

Fakt, že Pmp3p nebol pozorovaný pri analýze proteínového zloženia LP si vysvetľujem nevhodne zvolenou detekčnou metódou. Pmp3 má hmotnosť 6,1 kDa a na zistenie jeho prítomnosti sme použili SDS-PAGE elektroforézu, ktorej detekčný limit je 10-15 kDa (Athenstaedt *et al.* 1999). Na druhej strane má silným hydrofóbnym charakter a pri detekcii proteínového zloženia plazmatických membrán sa na rozdiel od stanovenia proteínového zloženia LP neodstraňuje lipidická zložka a ani proteolipidy. Metódou Western blot u kmeňa, ktorý mal fúzované Pmp3p a GFP sme overili molekulovú hmotnosť Pmp3p-GFP. Nepozorovali sme rozdiel vo veľkosti, ktorá by znamenala, že nastala proteínová modifikácia a ako bolo predikované veľkosť Pmp3p-GFP fúzneho proteínu bola 33 kDa (Obr. 4.9.). Naviazanie pomerne veľkého β -barelu GFP spôsobilo, že sme tento fúzny proteín izolovala s hydrofilnými proteínmi. Aby som zistila, či ale mohlo výrazne pozmeniť priestorovú štruktúru iba 6,1 kDa veľkého Pmp3p. Pripravila som kmeň, ktorý mal na Pmp3p napojenú menšiu globulárnu hemaglutínínovú doménu. Po detekcii anti-HA protilátkami som zistila, že Pmp3p-HA je približne o 8,5 kDa väčší než predikcia na základe sekvencie aminokyselín. To by nasvedčovalo, že buď je Pmp3p skutočne nejakým spôsobom posttranslačne modifikovaný alebo s ním interaguje iný malý proteín a to prostredníctvom veľmi silnej interakcie, ktorá sa neuvoľní ani pôsobením SDS a DTT vo vzorkovom pufre a že sa samotný Pmp3p-HA vôbec nevyskytuje, alebo dochádza k strate hydrofobity (Obr. 4.10.). Na metóde izolácie hydrofóbných proteolipidov z lipidických partikul sa pracuje.

Zistenie času a podmienok produkcie Pmp3p v kolóniách a v tekutých médiách

Ďalšou úlohou bolo určiť podmienky a čas expresie Pmp3p. Zistili sme, že hladina Pmp3p-GFP v membráne je neobyčajne stála za všetkých pozorovaných podmienok počas celého kvasinkového vývoja. Nezáležalo či kolónia rástla na respiračnom, alebo fermentovateľnom médiu (Kapitola 4.2.). Tieto pozorovania potvrdzujú naše predchádzajúce zistenia, že výskyt Pmp3p nie je viazaný na prežívanie na určitom zdroji uhlíku, ale že je nevyhnutný pre udržiavanie membránového potenciálu počas celého vývoja kolónie. Znížené prežívanie *pmp3Δ* buniek na médiu s glycerolom nie je spojené so zvýšenou expresiou Pmp3p za týchto kultivačných podmienok, ale nastáva z toho dôvodu, že pri týchto rastových podmienok sa zvyšuje pH, čo spôsobuje vybíjanie membránového potenciálu. Naopak umelé udržiavanie nízkeho pH glycerolového média pomocou biologického

pufru, výrazne vylepšilo prežívanie *pmp3Δ* buniek na tomto médiu (Palková, osobná komunikácia).

Pre rastlinné homológy je síce typická zvýšená expresia počas soľného stresu (Mitsuya *et al.* 2005), ale nepozorovala som žiadne zvýšenie hladiny Pmp3p proteolipidu počas rastu na médiu obsahujúcom 0,4 M NaCl (Obr. 4.18.). Tento výsledok iba potvrdzuje, že sa jedná o stabilnú súčasť bunkového proteómu a nie o stresový agens.

Charakteristickou vlastnosťou *pmp3Δ* buniek je ich citlivosť k zvýšenej koncentrácii katiónov (Navarre a Goffeau, 2000). Na základe tohto znaku sme overovali zachovanie funkčnosti Pmp3p u pripravených kmeňov BY-PMP3-GFP-C, BY-PMP3-GFP-N a BY-Pmp3-HA produkujúcich rôzne fúzne proteíny v médiu obsahujúcom chlorid sodný. Z experimentov vyplynulo, že pripojenie GFP na C-koniec Pmp3p proteínu výrazne zhorší životaschopnosť buniek, hoci toto zhoršenie nie je tak výrazné ako u deletantov.

Dvojitá lokalizácia Pmp3p proteínu v lipidických partikuliach a na plazmatickej membráne a ďalšie pozorovania, ako je zníženie membránového potenciálu, vplyv extracelulárneho pH na životaschopnosť BY-*pmp3Δ* buniek a ich destabilizácia, poukazujú na to, že v neprítomnosti Pmp3p by sa membrána mohla stávať čiastočne „priepustnejšia“ pre rôzne ióny vrátane H^+ . Pmp3p proteín by preto teoreticky mohol hrať úlohu pri určovaní lipidického zloženia membrány a jej stabilizácii. Preto sme sa rozhodli porovnať lokalizáciu proteínov nachádzajúcich sa v raftových doménach, tj. doménach plazmatickej membrány, ktoré majú špecifické lipidické zloženie. Neprítomnosť Pmp3p nespôsobila rozrušenie raftovej lokalizácie u nami pozorovaných transportérov. Vieme, že bunky BY-*pmp3Δ* kmeňa sú schopné vytvárať raftové mikrodomény (Obr.4.20.), ale nemôžeme presne povedať, či iné membránové proteíny v BY-*pmp3Δ* kmeni nemajú problém s lokalizáciou do raftových mikrodomén. Zamerali sme sa na otázku, či by neprítomnosť Pmp3p mohla ovplyvniť prítomnosť proteínov v plazmatickej membráne. V spolupráci s laborantkou Alexandrou Pokornou z Mikrobiologického ústavu AV ČR sme porovnali proteínové zloženie plazmatických membrán a lipidických partikulí BY-*pmp3Δ* kmeňa a rodiča. Proteínové zloženie lipidických partikulí nepreukázalo žiadny významný rozdiel v zastúpení proteínov. Pri porovnávaní plazmatických

membrán sme po elektroforéze a farbení proteínov striebrom pozorovali stratu proteínu v oblasti 27 kDa. Analýza pomocou MALDI-TOF naznačila, že by sa mohlo jednať o proteín neznámej funkcie Ycp4p, s homológiou k flavodoxínom, na základe čoho sme spravili deléciu tohto génu. Porovnanie proteínov plazmatických membrán rodičovského kmeňa a kmeňa BY-ycp4 Δ následne ukázalo, že by sa naozaj mohlo jednať o Ycp4p proteín, ktorý chýba (alebo má zníženú koncentráciu) v membráne BY-pmp3 Δ buniek. Či existuje nejaký funkčný vzťah medzi Pmp3p a Ycp4p, a či je prítomnosť Ycp4p pre bunky kvasiniek dôležitá, je v súčasnosti predmetom ďalšieho skúmania. Rovnako bude v budúcnosti dôležité spraviť analýzu membránových proteínov podrobnejšie (prípadne proteínov lipidických partikulí – aj keď u nich nebol pozorovaný výraznejší rozdiel obr. 4.24.) s cieľom zistiť potenciálne rozdiely. Predbežné výsledky naznačili ďalšie chýbajúce proteíny, ktoré sa ale v BY-pmp3 Δ membráne vyskytujú vo výrazne nižšej koncentrácii ako Ycp4p a ich identifikácia pomocou MALDI-TOF je preto náročnejšia. Ďalším dôležitým krokom bude orientačné porovnanie lipidického zloženia plazmatických membrán rodičovského kmeňa a BY-pmp3 Δ buniek metódou TLC chromatografie. V spolupráci s Mgr. Karlem Harantom sa na nej intenzívne pracuje.

6. Záver

Počas vypracovávania diplomovej práce, zameranej na zistenie funkcie Pmp3p proteínu u *Saccharomyces cerevisiae*, sme dosiahli nasledujúcich výsledkov:

1. Pripravili sme kvasinkové kmene, ktoré mali Pmp3p označený proteínom, respektíve proteínovou doménou umožňujúcou detekciu Pmp3p (BY-Pmp3-GFP-C, BY-Pmp3-GFP-N a BY-Pmp3-HA). U konštruktov BY-Pmp3-GFP-C a BY-Pmp3-GFP-N je možné sledovať fluorescenčný signál fúzneho proteínu Pmp3p-GFP *in vivo* v bunkách a taktiež umožňujú detekciu signálu u izolovaných proteínov metódou Western blot. Kmeň BY-Pmp3-HA umožňuje iba detekciu využitím metódy Western blot, no HA doména ovplyvňuje v oveľa menšom rozsahu funkciu Pmp3p proteínu.
2. Zistili sme, že napojenie GFP proteínu na karboxylový koniec Pmp3p proteínu výrazne poškodí jeho funkčnosť. Čiastočnú stratu funkcie, prejavujúcou sa nestabilitou buniek v médiu so zvýšeným obsahom soli, sme pozorovali aj u kmeňa BY-Pmp3-GFP-N. Takmer rovnaký fenotyp aj v stresových podmienkach sme pozorovali u buniek kmeňa BY-Pmp3-HA.
3. Fluorescenčnou a protilátkovou detekciou sme potvrdili predikovaný výskyt Pmp3p-GFP fúzneho proteínu prepisovaného z genómovej sekvencie v plazmatickej membráne.
4. Využitím fluorescenčného signálu z Pmp3p-GFP proteínu a následnými kolokalizačnými pokusmi sme zistili intracelulárnu lokalizáciu Pmp3p v lipidických partikuliach.
5. V našom laboratóriu sme zaviedli novú metódu izolácie lipidických partikul (LP) a následnú izoláciu proteínov. Izoláciu proteínov z LP sme potvrdili, že Pmp3p sa vyskytuje v tejto frakcii aj u kmeňa BY-Pmp3-HA, ktorý má takmer nezmenené prežívanie oproti rodičovskému kmeňu BY4742. Z toho usudzujeme, že zistená lokalizácia sa zhoduje s lokalizáciou nefúzovaného Pmp3p proteínu.

6. Fluorescenčnou a protilátkovou detekciou sme pozorovali stabilnú hladinu Pmp3p-GFP proteínu počas vývoja kolónie na respiračnom i fermentovateľnom médiu.
7. Porovnaním fluorescenčného signálu mikroskopom sme zistili, že nenastáva zvýšenie hladiny Pmp3p-GFP proteínu počas rastu buniek na médiu so zvýšeným obsahom NaCl oproti rastu na médiu bez soli.
8. Pripravili sme kmene BY-pmp3-Ato2-GFP a BY-pmp3-Ato3-GFP umožňujúce porovnať výskyt týchto transportérov v lipidických raftoch. Pozorovaním fluorescenčného signálu Ato transportérov, zistili sme, že delécia *PMP3* génu nespôsobí stratu ich raftovej lokalizácie.
9. Pripravili sme kmeň BY-ycp4 Δ a v spolupráci s A. Pokornou sme pomocou elektroforézy proteínov plazmatických membrán a následným farbením proteínov striebrom potvrdili, že pozorovaný rozdiel v proteínovom zložení plazmatických membrán medzi BY4742 a BY-pmp3 Δ je spôsobený stratou Ycp4p u kmeňa BY-pmp3 Δ z membrány.
10. Nepozorovali sme výraznejší rozdiel v proteínovom zložení lipidických partikul

11. Zoznam citovanej literatúry

Amerik A, Sindhi N, Hochstrasser M. (2006) A conserved late endosome-targeting signal required for Doa4 deubiquitylating enzyme function. *J Cell Biol.* **175**(5):825-35.

Adachi K, Yasuda R, Noji H, Itoh H, Harada Y, Yoshida M, Kinosita K Jr. (2000) Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(13):7243–7247.

Athenstaedt K, Zweytick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G. (1999) Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **181**(20):6441-8.

Bizzozero OA, Lees MB. (1986) Spectroscopic analysis of acylated and deacylated myelin proteolipid protein. *Biochemistry.* **25**(22):6762-8.

Boyot P, Trifilieff E, Van Dorsselaer A, Luu B. (1988) Purification and characterization of low-molecular-weight beef heart proteolipids: use of fast atom bombardment-mass spectrometry for identification. *Anal Biochem.* **173**(1):75-85.

Bünger H, Krüger RP, Pietschmann S, Wüstneck N, Kaufner L, Tschiersch R, Pison U. (2001) Two hydrophobic protein fractions of ovine pulmonary surfactant: isolation, characterization, and biophysical activity. *Protein Expr Purif.* **23**(2):319-27.

Čáp M, Váchová L, Palková Z. (2009) Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem.* **284**(47):32572-81.

Carroll J, Fearnley IM, Walker JE. (2006) Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(44):16170-5. Epub 2006 Oct 23.

Chang-Qing Z, Shunsaku N, Shenkui L, Tetsuo T. (2008): Characterization of two plasma membrane protein 3 genes (PutPMP3) from the alkali grass, *Puccinellia tenuiflora*, and functional comparison of the rice homologues, OsLti6a/b from rice. *BMB Rep.* **41**(6):448-54.

Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E., and Smith J. L. (1996) Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **47**, 477–508

De Lay N, Gottesman S. (2009) The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *J Bacteriol.* **191**(2):461-76

Debiec H, Lorenc R. (1988) Identification of Na⁺, Pi-binding protein in kidney and intestinal brush-border membranes. *Biochem J.* **255**(1):185-91.

Dyken PR, Zeman W. (1964) A Clinical, Pathological, and genetic study of an unusual form of Tay-Sachs disease with macular degeneration in the family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **27**:29-37.

Erez O, Kahana C (2002) Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.*; **295**(5):1142-9.

Fillingame RH. (1976) Purification of the carbodiimide-reactive protein component of the ATP energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **251**(21):6630-7.

Finbow ME, Harrison MA. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J.* **324** (Pt 3):697-712.

Folch J, Lees M. (1951) Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol Chem.* **191**(2):807-17.

Galvez AF, Gulick PJ, Dvorak J. (1993) Characterization of the Early Stages of Genetic Salt-Stress Responses in Salt-Tolerant *Lophopyrum elongatum*, Salt-Sensitive Wheat, and Their Amphiploid. *Plant Physiol.*; **103**(1):257-265.

Gásková D, Cadek R, Chaloupka R, Vacata V, Gebel J, Sigler K. (2002) Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C3(3) fluorescence. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**(8):931-7.

Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A. (2005) New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**(1):1-12.

Gietz RD, Woods RA. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87-96.

Goddard NJ, Dunn MA, Zhang L, White AJ, Jack PL, Hughes MA. (1993) Molecular analysis and spatial expression pattern of a low-temperature-specific barley gene, *blt101*. *Plant Mol Biol.* **23**(4):871-9.

Grandori R, Carey J. (1994) Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Sci.* **3**(12):2185-93.

Gow A, Lazzarini RA. (1996) A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat Genet.* **13**(4):422-8.

Gulick PJ, Shen W, An H. (1994) *ESI3*, a stress-induced gene from *Lophopyrum elongatum*. *Plant Physiol.* **104**(2):799-800.

Gulick PJ, Dvorák J. (1990) Selective enrichment of cDNAs from salt-stress-induced genes in the wheatgrass, *Lophopyrum elongatum*, by the formamide-phenol emulsion reassociation technique. *Gene.* **95**(2):173-7.

Gustafsson M, Curstedt T, Jörnvall H, Johansson J. (1997) Reverse-phase HPLC of the hydrophobic pulmonary surfactant proteins: detection of a surfactant protein C isoform containing Nepsilon-palmitoyl-lysine. *Biochem J.* **326** (Pt 3):799-806.

Hiraki T, Abe F. (2010) Overexpression of Sna3 stabilizes tryptophan permease Tat2, potentially competing for the WW domain of Rsp5 ubiquitin ligase with its binding protein Bull. FEBS Lett., **584**(1):55-60.

Huflejt ME, Tremolieres A, Pineau B, Lang JK, Hatheway J, Packer L. (1990) Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol.* **94**:1512-21.

Kessler RJ, Vaughn DA, Fanestil DD. (1982) Phosphate-binding proteolipid from brush border. *J Biol Chem.* **257**(23):14311-7.

Kodedová M, Sigler K, Lemire BD, Gášková D. (2011) Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells. *Biotechniques.* **50**(1):58-63.

Koike M, Kato H, Imai R. (2008) Diversification of the barley and wheat blt101/wpi6 promoters by the Xumet element without affecting stress responsiveness. *Mol Genet Genomics.* **280**(1):41-7.

Kometani T, Ikeda Y, Kasai M. (1975) Acetylcholine-binding substance extracted by using organic solvent and acetylcholine receptor of electric organ of *Narke japonica*. *Biochim Biophys Acta.* **413**(3):415-24.

Maresova L, Urbankova E, Gaskova D, Sychrova H. (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* **6**(7):1039-46

McNatt MW, McKittrick I, West M, Odorizzi G. (2007) Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway. *Mol Biol Cell.* **18**(2):697-706.

Medina J, Ballesteros ML, Salinas J. (2007): Phylogenetic and functional analysis of Arabidopsis RCI2 genes. *J Exp Bot.* **58**(15-16):4333-46.

Medina J, Catalá R, Salinas J. (2001) Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of arabidopsis encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol.* **125**(4):1655-66.

Menon A K Lipid modifications of proteins, Chapter 2, *Biochemistry of Lipids and Membranes* 5th Edn., Vance D.E. and Vance J.E. (Eds), 2008 Elsevier B.V.

Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H, Takabe T. (2005) Disruption of RCI2A leads to over-accumulation of Na⁺ and increased salt sensitivity in Arabidopsis thaliana plants. *Planta.* **222**(6):1001-9.

Meyer B, Wittig I, Trifilieff E, Karas M, Schägger H. (2007) Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol Cell Proteomics.* **6**(10):1690-9.

Navarre C, Catty P, Leterme S, Dietrich F, Goffeau A. (1994) *Two* distinct genes encode small isoproteolipids affecting plasma membrane H(+)-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **269**(33):21262-8.

Navarre C, Ghislain M, Leterme S, Ferroud C, Dufour JP, Goffeau A. (1992) Purification and complete sequence of a small proteolipid associated with the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **267**(9):6425-8.

Navarre C, Goffeau A. (2000) Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J.* **19**(11):2515-24.

- NDong C, Ouellet F, Houde M, Sarhan F** (1997) Gene expression during cold acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiol.* **38**(7):863-70.
- Nylander M, Heino P, Helenius E, Palva ET, Ronne H, Welin BV.** (2001) The low-temperature- and salt-induced RCI2A gene of Arabidopsis complements the sodium sensitivity caused by a deletion of the homologous yeast gene SNA1. *Plant Mol Biol.* **45**(3):341-52.
- O'Brien PJ, St Jules RS, Reddy TS, Bazan NG, Zatz M.** (1987) Acylation of disc membrane rhodopsin may be nonenzymatic. *J Biol Chem.* **262**(11):5210-5.
- Oestreich AJ, Aboian M, Lee J, Azmi I, Payne J, Issaka R, Davies BA, Katzmann DJ.** (2007) Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5. *Mol Biol Cell.* **18**(2):707-20.
- Okubo K, Hamasaki N, Hara K, Kageura M.** (1991) Palmitoylation of cysteine 69 from the COOH-terminal of band 3 protein in the human erythrocyte membrane. Acylation occurs in the middle of the consensus sequence of F--I-IICLAVL found in band 3 protein and G2 protein of Rift Valley fever virus. *J Biol Chem.* **266**(25):16420-4.
- Pace CN, Scholtz JM.** (1998) A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys J.* **75**(1):422-7.
- Palková Z., Váchová L., Gášková D., Kučerová H.** (2009): Synchronous plasma membrane electrochemical potential oscillations during yeast colony development and aging. *Mol. Membr. Biol.* **26** (4): 228-235.
- Pearce RS, Houlston CE, Atherton KM, Rixon JE, Harrison P, Hughes MA, Alison Dunn M.** (1998) Localization of expression of three cold-induced genes, blt101, blt4. 9, and blt14, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley *Plant Physiol.* **117**(3):787-95.

- Pokrzywa W, Guerriat B, Dodzian J, Morsomme P.** (2009) Dual sorting of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar protein Sna4p. *Eukaryot Cell.* **8**(3):278-86
- Rea PA, Griffith CJ, Sanders D.** (1987) Purification of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **262**(30):14745-52.
- Reggiori F, Pelham HR.** (2001) Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.* **20**(18):5176-86.
- Renard HF, Demaegd D, Guerriat B, Morsomme P.** (2010) Efficient ER exit and vacuole targeting of yeast Sna2p require two tyrosine-based sorting motifs. *Traffic.* **11**(7):931-46.
- Ricicová M, Kucerová 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**(5):1170-8.
- Ruppert C, Schmid R, Hedderich R, Müller V.** (2001) Selective extraction of subunit D of the Na⁽⁺⁾-translocating methyltransferase and subunit c of the A(1)A(0) ATPase from the cytoplasmic membrane of methanogenic archaea by chloroform/methanol and characterization of subunit c of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* as a 16-kDa proteolipid. *FEMS Microbiol Lett.* **195**(1):47-51.
- Stawiecka-Mirota M, Pokrzywa W, Morvan J, Zoladek T, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D, Morsomme P.** (2007) Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation. *Traffic.* **8**(9):1280-96.
- Serrahima-Zieger M, Monteil H, Luu B.** (1982) Isolation and purification of dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteolipid from *Bacillus subtilis* membrane. *Biochim Biophys Acta.* **679**(3):369-75.

Sinor LT, Brown PJ, Evans JP, Plapp FV. (1984) The Rh antigen specificity of erythrocyte proteolipid. *Transfusion*. **24**(2):179-80.

Terzi E, Boyot P, Van Dorsselaer A, Luu B, Trifilieff E. (1990) Isolation and amino acid sequence of a novel 6.8-kDa mitochondrial proteolipid from beef heart. Use of FAB-MS for molecular mass determination. *FEBS Lett*. **260**(1):122-6.

Umlauf E, Mairhofer M, Prohaska R. (2006) Characterization of the stomatin domain involved in homo-oligomerization and lipid raft association. *J Biol Chem*. **281**(33):23349-56.

van Dijk S, Dean DD, Liu Y, Zhao Y, Chirgwin JM, Schwartz Z, Boyan BD. (1998) Purification, amino acid sequence, and cDNA sequence of a novel calcium-precipitating proteolipid involved in calcification of corynebacterium matruchotii. *Calcif Tissue Int*. **62**(4):350-8.

Velours J, Esparza M, Hoppe J, Sebald W, Guerin B. (1984) Amino acid sequence of a new mitochondrially synthesized proteolipid of the ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **3**(1):207-12.

Walaas SI, Horn RS, Albert KA, Adler A, Walaas O. (1988) Phosphorylation of multiple sites in a 15,000 dalton proteolipid from rat skeletal muscle sarcolemma, catalyzed by adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and calcium/phospholipid-dependent protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. **968**(1):127-37.

Wang LY, Shiozaki K. (2006) The fission yeast stress MAPK cascade regulates the *pmp3+* gene that encodes a highly conserved plasma membrane protein. *FEBS Lett.*; **580**(10):2409-13.

Watson H, Bonifacino JS. (2007) Direct binding to Rsp5p regulates ubiquitination-independent vacuolar transport of Snz3p. *Mol Biol Cell.*; **18**(5):1781-9.

Whyteside G, Meek PJ, Ball SK, Dixon N, Finbow ME, Kee TP, Findlay JB, Harrison MA. (2005) Concanamycin and indolyl pentadienamide inhibitors of

the vacuolar H⁺-ATPase bind with high affinity to the purified proteolipid subunit of the membrane domain. *Biochemistry*. **44**(45):15024-31.

Zimmerberg J. (2001) How can proteolipids be central players in membrane fusion? *Trends Cell Biol.* **11**(6):233-5.