

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor UNBM



Bc. Eva, Tarabová

Studium funkce vybraných genů v koloniích divokých kmenů

kvasinek

Study of the function of selected genes in the colonies of wild

yeast strains

diplomová práce

vedoucí práce: Mgr. Martin Kuthan, Ph.D

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2013

podpis

Mé poděkování za vedení práce, mnohé cenné rady a inspiraci v průběhu jejího vzniku a také za ochotu a nekonečnou trpělivost patří především mému školiteli Mgr. Martinovi Kuthanovi, Ph.D a nedocenitelnému konzultantovi Mgr. Vratislavovi Šťovíčkovi, Ph.D.

Všem dalším kolegům z laboratoře děkuji za pomoc a rady a za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Vladce Haislové a Hance Žďárské patří velký dík za zajištění bezproblémového chodu laboratoře.

Alexandře Pokorné děkuji za spolupráci při přípravě proteinových elektroforéz.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala také své rodině, přátelům a Ondrovi za jejich morální podporu.

Abstrakt

Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* izolované ze svého přirozeného prostředí jsou schopny mnohobuněčného sociálního chování a tvorby komplexních strukturovaných kolonií v řadě vlastností podobným velmi odolným biofilmům patogenních kvasinek. Dalším typickým rysem přírodních kmenů je jejich fenotypová variabilita, tedy schopnost přecházet s relativně vysokou frekvencí mezi dvěma či více fenotypy. V případě patogenních kvasinek jsou takové fenotypové změny často provázeny odlišnou virulencí, rezistencí vůči různým stresovým podmínkám a léčbě antimykotiky. V důsledku dlouhodobé kultivace přírodních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v laboratorních podmínkách dochází k jejich domestikaci, tedy přechodu na hladké kolonie a ztrátě některých vlastností typických pro strukturované kolonie. Tento proces je, stejně jako přepínání fenotypů, spojen s výraznými změnami v expresi genů a s celkovou změnou životní strategie kolonií. Mechanismy fenotypových přechodů u kvasinek jsou spojovány s epigenetickou regulací genové exprese pomocí transkripčního umlčování zajišťovaného histonovými deacetylázami. Studium těchto mechanismů pomocí delečních mutant vybraných genů s potenciálním vlivem na tvorbu a vývoj kolonií divokých i domestikovaných kmenů se zabývá tato práce. Dosažené výsledky prokazují, že NAD⁺-závislá histonová deacetyláza Sir2p má vliv na morfologii kolonie domestikovaných kmenů, kdy může negativně regulovat geny zodpovědné za strukturu a vlastnosti komplexních kolonií. Získaná data tedy naznačují, že se histonové deacetylázy skutečně účastní fenotypových přechodů divokých kmenů *Saccharomyces cerevisiae* a podílejí se tak na jejich adaptaci na rychle se měnící nepříznivé podmínky prostředí.

klíčová slova:

kvasinkové kolonie, divoké kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, transkripční umlčování, histonové deacetylázy, přepínání fenotypů, domestikace

Abstract

Saccharomyces cerevisiae strains isolated from the wild are able to exhibit multicellular social behaviour and to form complex structured colonies resembling in many properties highly resistant biofilms of pathogenic yeasts. The capability of phenotypic variability, i.e. high frequency transition between two or more different phenotypes, is another feature typical for the wild yeast strains. Such phenotypic changes are in case of pathogenic yeast often connected with changes in virulence and resistance to stress and antifungal treatment. Long-term cultivation of the wild yeast strains under laboratory conditions leads to their domestication, i.e. transition to smooth colonies and loss of some features typical for structured colonies. This process is, similarly to phenotypic switching, accompanied by significant changes in gene expression and global change of colony lifestyle. Mechanisms underlying yeast phenotypic transitions are ascribed to epigenetic regulation of gene expression via transcriptional silencing conferred by histone deacetylases. This work deals with the study of such mechanisms using knock-outs of selected genes with putative function in formation of structured colonies in wild and domesticated strains. The achieved results show, that NAD⁺-dependent histone deacetylase Sir2p influences morphology of colonies of domesticated strains. Sir2p can negatively regulate the expression of genes responsible for formation of complex colonies. The obtained data also reveal, that histone deacetylases are involved in phenotypic transitions of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains and participate in adaptation of such strains to harmful and changing environmental conditions.

keywords:

yeast colonies, wild strains of *Saccharomyces cerevisiae*, transcriptional silencing, histone deacetylases, phenotypic switching, domestication

Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	11
3. Přehled literatury.....	12
3.1. Mnohobuněčné populace mikroorganismů.....	12
3.1.1. Kvasinkové biofilmy.....	12
3.1.2. Kvasinkové kolonie.....	14
3.2. Přepínání fenotypů	15
3.2.1. Přepínání fenotypů u kvasinky <i>Candida albicans</i>	16
3.2.2. Přepínání fenotypů u kvasinky <i>Cryptococcus neoformans</i> ..	19
3.3. Divoké kmeny kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.3.1. Výjimka mezi laboratorními kmeny.....	21
3.3.2. Struktura komplexních kolonií divokých kmenů.....	22
3.3.3. Fenotypová variabilita a domestikace divokých kmenů	23
3.3.4. Reverzibilita procesu domestikace	28
3.4. Zvažované mechanismy přepínání fenotypu a domestikace	31
3.4.1. Genetické pozadí přepínání fenotypů u kmene WO-1	32
3.4.2. Transkripční umlčování a histonové deacetylázy.....	33
4. Materiál a metody.....	37
4.1. Materiál.....	37
4.1.1. Použité mikroorganismy	37
4.1.2. Kultivační média	37
4.1.3. Roztoky.....	38
4.1.4. Materiál pro práci s DNA a proteiny.....	41
4.1.5. Použité primery	41
4.1.6. Použité plasmidy	44
4.1.7. Přístroje	44
4.1.8. Počítačové programy a databáze	45
4.2. Metody	46
4.2.1. Sterilizace	46
4.2.2. Uchovávání zásobních kultur	46
4.2.3. Kultivace	46

4.2.4.	Stanovení počtu buněk.....	46
4.2.5.	Izolace chromozomální DNA z kvasinek zymolýzou.....	46
4.2.6.	Izolace chromoz. DNA z kvasinek skleněnými kuličkami ...	47
4.2.7.	Stanovení koncentrace DNA	48
4.2.8.	Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu.....	48
4.2.9.	Amplifikace DNA pomocí polymer. řetězové reakce (PCR) ..	49
4.2.10.	Transformace kvasinkových buněk	50
4.2.11.	Ověření úspěšnosti transformace	53
4.2.12.	Stanovení počtu kolonií na misce	54
4.2.13.	Určení stability fenotypu	54
4.2.14.	Extrakce extracelulárních proteinů z kolonií	55
4.2.15.	Stanovení mokré a suché hmotnosti kvasinkové kolonie...	55
4.2.16.	Srážení proteinů	55
4.2.17.	Vertik. elektroforéza v polyakrylamid. gelu (SDS-PAGE)...	55
4.2.18.	Barvení proteinů stříbrem	56
5.	Výsledky.....	57
5.1.	Příprava kvasinkových kmenů s proteiny znač. pomocí GFP...	59
5.1.1.	Kmen BR-F: <i>CWP1</i> -GFP/ <i>CWP1</i>	59
5.1.2.	Kmen BR-F: <i>BNA1</i> -GFP-kanMX/ <i>BNA1</i>	60
5.2.	Příprava delečních mutantů výchozího kmene BR-F.....	61
5.3.	Experimenty s delečními mutanty výchozího kmene BR-F.....	64
5.3.1.	Porovnávání morfologie kolonií	64
5.3.2.	Stabilita fenotypu	65
5.4.	Příprava delečních mutantů výchozích kmenů BR-S a BR-S ^{new}	66
5.5.	Fenotypové charakteristiky kmen BR-S ^{new} Δ <i>sir2</i>	69
5.5.1.	Porovnávání morfologie kolonií a buněk.....	69
5.5.2.	Porovnávání mokré a suché hmotnosti kolonií	71
5.5.3.	Stabilita fenotypu	72
5.5.4.	Analýza extracelulárních proteinů	73
6.	Diskuze	74
7.	Souhrn	83
8.	Seznam použité literatury	84

Seznam zkratek

AEBSF	aminoethyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride – inhibitor proteáz
APS	persíran amonný
BFM	brom fenolová modř
ECM	extracelulární matrix
GM	glycerolové médium
GPI	glykosylphosphatidylinositol – glykosylfosfatidylinositol
HDAC	histone deacetylase – histonová deacetyláza
HDAC3/SMRT	histone deacetylase 3/silencing mediator for retinoid and thyroid receptors – komplex tvořený histonovou deacetylázou 3 a korepresorem represorů jaderných hormonů
HAST	Hda1-affected subtelomeric domain – subtelomerické chromozomální oblasti ovlivňované specifickou deacetylásou Hda1p
HMWGP	high molecular weight glycoprotein – glykoprotein s vysokou molekulovou hmotností
MSE	middle sporulation element – součást promotoru středních genů sporulace
MTL	mating type locus – lokus párovacího typu
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
rDNA	ribozomální DNA
SDS	sodium dodecyl sulfate – dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate - polyacrylamid gel electrophoresis – polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Set3C	Set3p complex – komplex proteinu Set3p
TBE	Tris/Borate/EDTA – Tris/kyselina boritá/EDTA
TE	Tris/EDTA

TEMED	tetramethyl-ethylen diamin
yEGFP	yeast enhanced green fluorescent protein – zelený fluorescenční protein pro značení kvasinkových proteinů
YEPG	yeast extract/peptone/glucose – kvasničný autolyzát/pepton/glukóza

1. Úvod

Přestože jsou stále často považovány za jednoduché jednobuněčné organismy, v přírodních podmínkách se kvasinky sdružují do rafinovaných mnohobuněčných populací. Jako příklad takových populací mohou sloužit biofilmy, které jsou v přirozených ekosystémech velmi rozšířené. Rovněž v případě patogenních kvasinek způsobující mnohá závažná onemocnění u člověka, jež jsou i vzhledem ke značné rezistenci biofilmů obtížně léčitelná. Nesnadná kultivace biofilmů v laboratorních podmínkách však silně ztěžuje jejich výzkum. Dalším příkladem mnohobuněčných útvarů kvasinek jsou v mnohém definovanější, jednodušší a snáze kultivovatelné kolonie, tvořící se na libovolném pevném povrchu, v laboratořích zpravidla na agarovém médiu. Buněčné populace v rámci mnohobuněčných útvarů mají na rozdíl od homogenních populací buněk kultivovaných v tekutých kulturách schopnost diferenciaci a tvorby specializovaných buněčných typů, které mohou vykonávat specifické, např. ochranné funkce, komunikovat pomocí určitých signálních molekul a synchronizovat tak vývoj celé populace. Výše uvedené příklady sociálního chování kvasinek, realizovatelného pouze na úrovni populací buněk, představují výhodnou strategii pro přežívání kvasinek v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí.

Naše laboratoř se zabývá studiem divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, tedy kmenů izolovaných ze svých přírodních ekosystémů. Tyto kmeny tvoří prostorově velmi komplexní strukturované kolonie na rozdíl od jednoduchých hladkých kolonií běžně studovaných laboratorních kmenů. Díky svým specifickým vlastnostem jako například adhezivita, tvorba extracelulární matrix a rezistence vůči stresu, jsou velmi podobné již zmíněným biofilmům patogenních kvasinek. Kolonie divokých kmenů mohou být proto považovány za vhodný model pro studium mechanismů podílejících se na tvorbě, vývoji a rezistenci patogenních biofilmů.

Další typickou vlastností divokých kmenů je změna fenotypu části populace buněk strukturovaných kolonií a ztráta řady vlastností charakteristických pro strukturované kolonie, ke které dochází při dlouhodobější kultivaci v laboratorních podmínkách. Buňky procházející

takovým procesem změny fenotypu zvaným domestikace pak dávají vznik koloniím hladkým, nerozeznatelným od kolonií kmenů laboratorních. Domestikované kmeny si svůj fenotyp na komplexních médiích udržují, recentní výsledky však ukazují, že při jejich kultivaci v nepříznivých stresujících podmínkách dochází k obnově tvorby některých vlastností typických pro divoké kmeny a vzniku strukturovaných kolonií. Je tedy zřejmé, že výše zmíněná fenotypová variabilita divokých kmenů souvisí se změnou metabolismu a reakcí a adaptací na specifické podmínky vnějšího prostředí. V tomto kontextu připomíná domestikace a její reverzní proces fenomén přepínání fenotypů mnohých druhů především patogenních kvasinek. Kvasinky rodu *Candida* a *Cryptococcus* s vysokou frekvencí reverzibilně mění svůj fenotyp. Takové přechody jsou velmi často spojeny se změnami ve virulenci a rezistenci vůči stresu a také s adaptací na specifické podmínky v těle hostitele.

Při domestikaci i opětovném vzniku strukturovaných kolonií dochází k dramatickým změnám v expresi mnoha genů, jejichž funkce při vývoji komplexních strukturovaných kolonií není zcela objasněna. Tato práce se tedy snaží odpovědět na otázku, zda a jak jsou některé vybrané geny významné pro tvorbu takových typů kolonií. Dalším úkolem je sledovat lokalizaci proteinových produktů některých z těchto genů v buňkách strukturovaných kolonií v průběhu jejich vývoje.

Molekulární mechanismy fenotypových přechodů kvasinek nejsou zcela uspokojivě objasněny. Jednou z uvažovaných hypotéz, vysvětlujících regulaci fenotypových změn u patogenních kvasinek, je epigenetická regulace exprese specifických genů vlivem transkripčního umlčování, zprostředkovaného histonovými deacetylázami. Dalším úkolem této práce je pak studovat funkci a význam specifických histonových deacetyláz pro fenotypové přechody a pro tvorbu strukturovaných kolonií u divokých kmenů *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Cíle práce

- I. Značení vybraných proteinů pomocí GFP a sledování jejich buněčné lokalizace v koloniích divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
- II. Tvorba a studium delečních mutant vybraných genů s potenciální funkcí při tvorbě strukturovaných kolonií.
- III. Studium vlivu vybraných histonových deacetyláz a transkripčního umlčování na fenotypové přechody kmene BR-F.

3. Přehled literatury

3.1. Mnohobuněčné populace mikroorganismů

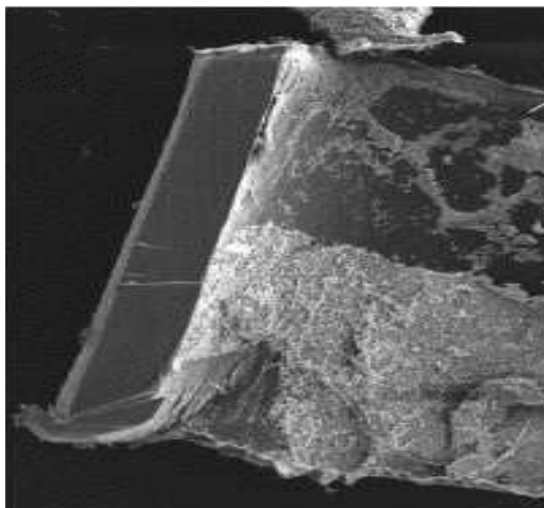
Kvasinky a další mikroorganismy jsou tradičně studovány jako jednobuněčné organismy, sloužící za dobrý model pro výzkum základních procesů na buněčné úrovni. V laboratořích jsou kultivovány v tekutých médiích, často navíc protřepávaných pro lepší zajištění přístupu kyslíku k buňkám. Takové podmínky však brání buněčné komunikaci, vytváření gradientů signálních molekul, změnám ve vývoji vedoucím k adaptaci na stres a dlouhodobé přežívání, diferenciaci buněk a tvorbě jejich specializovaných variant a také specifické orientaci buněk v jejich nejbližším okolí. Navíc nejsou v přirozeném prostředí téměř dosažitelné a našemu poznání tak mohou unikat mnohé důležité informace o mechanismech a strategiích chování a života mikroorganismů (Palková, 2004).

Mnohé mikroorganismy totiž ve svém přirozeném prostředí vytváří mnohobuněčné populace diferencovaných buněk, které se vzájemně ovlivňují a synchronizují své chování podle konkrétních podmínek prostředí ku prospěchu celé populace. Jsou schopné reagovat a částečně se přizpůsobit nedostatku živin nebo jiným stresovým faktorům. Příkladem může být využívání vlastních metabolitů (amoniaková signalizace u kvasinek), tvorba specifické extracelulární matrix nebo programovaná buněčná smrt (Palková & Váchová, 2006; Palková, 2004; Váchová *et al.*, 2009a).

3.1.1. Kvasinkové biofilmy

Nejčastější formou mnohobuněčných populací mikroorganismů, tedy i kvasinek, jsou biofilmy. Ty jsou definovány jako navzájem fyzicky a metabolicky propojené populace kvasinkových buněk, uzavřené ve hmotě nazývané extracelulární matrix (ECM) (Costerton, 1999; Ramage *et al.*, 2005). V přírodě se s biofilmy můžeme setkat téměř všude, povrchy těl rostlin a živočichů, nebo umělé povrchy nevyjímaje. Tvorba biofilmů je charakteristická zejména pro patogenní druhy kvasinek. Takové útvary jsou odolné vůči imunitnímu systému hostitele a v porovnání s planktonními

buňkami i několikanásobně rezistentnější k léčbě antibiotiky (d'Enfert, 2006; Ashbee & Bignell, 2009). Působí tak značné problémy v medicíně. Například kvasinka *Candida albicans* tvoří biofilmové povlaky na zdravotnických prostředcích (obrázek 1) zanechávaných uvnitř těla (katétrů, zubní implantáty a podobně). Výzkum biofilmů, který by objasnil mechanismy jejich vysoké rezistence, je však vzhledem k jejich nesnadné kultivaci v laboratorních podmínkách velmi obtížný (Donlan & Costerton, 2002).



Obrázek 1 Biofilmový povlak kvasinky *Candida albicans* na žilním katéttru, upraveno z Nett & Anders, 2006

3.1.1.1. Vlastnosti biofilmů

S organizací, vývojem a přežitím kvasinkových biofilmů jsou úzce spojovány následující vlastnosti: dimorfický přechod, adheze k pevným povrchům, produkce extracelulární matrix a buněčná komunikace (Douglas, 2003). ECM usnadňuje tvorbu pórů pro tok vody a živin a chrání tak populaci vůči dehydrataci (Baillie & Douglas, 2000). Dimorfický přechod na (pseudo)hyfální růst buněk byl zdokumentován u různých druhů kvasinek včetně *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se o rychlou morfologickou změnu kulatých buněk na protáhlé buňky tvořící hyfy a pseudohyfy, vyvolanou například nedostatkem zdrojů živin, zvýšenou teplotou a dalšími faktory prostředí. Bylo prokázáno, že je důležitý pro zrání biofilmů a tvorbu kolonií kvasinky *Candida albicans* a pro úspěšné přilnutí biofilmů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* k povrchu. V literatuře je často spojován s patogenitou (Gancedo, 2001; Inglis *et al.*, 2013). Vznik biofilmů pozorujeme také například u další patogenní kvasinky *Cryptococcus neoformans* (Martinez & Casadeval, 2006).

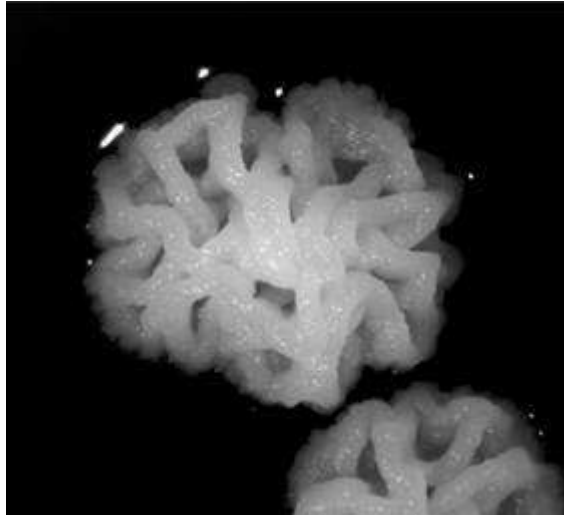
3.1.2. Kvasinkové kolonie

Kolonie kvasinek jsou produktem růstu nepohyblivých buněk na povrchu pevného média. Tvar kolonií je ve stabilních podmínkách charakteristický pro daný druh i kmen a je často využíván jako diagnostický a systematický znak (přestože může být značně ovlivněn vnějšími podmínkami prostředí) (Palková, 2004; Aguilar *et al.*, 2007). V těchto poměrně jednoduchých útvarech dochází již v raných fázích vývoje k diferenciaci buněk. Buňky ve středu kolonie pak přechází do stacionární fáze, kdežto buňky na okrajích kolonie pokračují v růstu. Přechod mezi oběma fázemi je ostrý, což naznačuje synchronizaci buněk a jejich vzájemnou komunikaci (Meunier & Choder, 1999). Buňky ve středu a na okraji kolonie se liší také mírou organizace. Čím blíže k okraji, tím jsou buňky ve svém uspořádání organizovanější, a tento rozdíl se zvyšuje se stářím kolonie. I hustota buněk na povrchu kolonie roste s jejím stářím (Varon & Choder, 2000).

Také při amoniakové signalizaci mezi kvasinkovými koloniemi (Palková *et al.*, 1997) dochází k diferenciaci buněk v rámci kolonie. Buňky na okrajích vylučují větší množství amoniaku (univerzální signální molekuly kvasinek) než buňky ve středu. Je zde totiž lokalizován protein Ato1p, který souvisí právě s exportem amoniaku (Váchová *et al.*, 2009b). S přechodem do alkalické fáze, kdy je růst celé kolonie zpomalen, prochází buňky na okrajích kolonie metabolickou změnou a adaptací na sníženou dostupnost živin. Oproti tomu středové, chronologicky starší buňky takovéto adaptace nejsou schopny. Na druhou stranu si však udrží vyšší obsah nejrůznějších proteinů sloužících na obranu vůči stresu (Váchová *et al.*, 2009a; Váchová *et al.*, 2009b).

3.1.2.1. Kolonie přírodních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

Divoké kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, tedy kmeny izolované ze svých přirozených ekosystémů, tvoří (na rozdíl od laboratorních kmenů) komplexní strukturované kolonie (obrázek 2), které vykazují mnohé vlastnosti (například tvorba velkého množství ECM) typické pro přírodní biofilmy. Kvasinkové kolonie tak představují ideální model pro studium biofilmů.



Obrázek 2 Kolonie divokého kmene BR-F kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Tyto vrásčité kolonie jsou větší a díky vysokému obsahu ECM zadržující vodu jsou také objemnější než hladké kolonie laboratorních kmenů. Jsou tvořené menším počtem buněk, zato větších, často monopolárně pučících (Šťovíček *et al.*, 2010) a tvořících subpopulace pseudohyf zarůstajících do agaru a lépe tak přichycujících kolonii k povrchu média (Váchová *et al.*, 2011). ECM je složená zejména z polysacharidů a může obsahovat vysokomolekulární glykoproteiny (Kuthan *et al.*, 2003). Přesná funkce a složení ECM však nejsou zcela objasněny, navíc se liší v závislosti na genetickém původu konkrétního kmene (Šťovíček *et al.*, 2010). Pro strukturované kolonie je také charakteristická zvýšená exprese genu *FLO11*, který kóduje jeden z flokulinů, zajišťující vzájemnou adhezi buněk (Šťovíček *et al.*, 2010). Jeho exprese nezávisí na tvaru buněk, pro strukturovanost kolonie je však nezbytná (Vopálenská *et al.*, 2010).

3.2. Přepínání fenotypů

Přepínání fenotypů je definováno jako vratný přechod původního fenotypu kolonie na morfologicky odlišný fenotyp, který nastává s frekvencí vyšší ($10^{-2} - 10^{-5}$) než je běžná frekvence somatických mutací ($10^{-7} - 10^{-8}$) (Soll, 1992; Fries *et al.*, 2002). Přepnutý fenotyp je stabilní a dále dědičný. K přepínání dochází jen u části populace, k převládnutí nových fenotypů dochází pod selekčním tlakem, čímž se přepínání fenotypů liší od masové změny fenotypu, jenž probíhá najednou u celé populace a bývá součástí životního cyklu některých parazitů (Fries *et al.*, 2002). Příkladem změny

fenotypu celé populace u kvasinek je přizpůsobení buněk omezenému přísunu zdrojů zahájením filamentárního růstu (Gimeno *et al.*, 1992).

U kvasinek rodu *Candida* a kmene *Cryptococcus neoformans* byl fenomén přepínání fenotypů popsán již před mnoha lety (Goldmann *et al.*, 1998; Slutsky *et al.*, 1985). Schopnost náhodně měnit vlastnosti části populace se zdá být v kontextu mnohobuněčných populací účinným adaptačním mechanismem. Poskytuje totiž populaci variabilitu a flexibilitu v možnostech rychlého přizpůsobení se měnícím se nepříznivým podmínkám prostředí. Jedná se tedy o rychlou mikroevoluci dané populace. K přepínání fenotypů často dochází za konstantních podmínek, jeho frekvence však může být modulována nebo dokonce vyvolána specifickými faktory (Fries *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2008).

Změny v morfologii kolonie pochopitelně odrážejí celou řadu změn ve fyziologických a morfologických charakteristikách buněk. V případě patogenních kvasinek vykazuje každý fenotyp daného kmene rozdílnou virulenci, přepnutím na jiný morfologický typ kolonie často vznikají virulentnější a rezistentnější formy (Soll, 1992; Jain *et al.*, 2008).

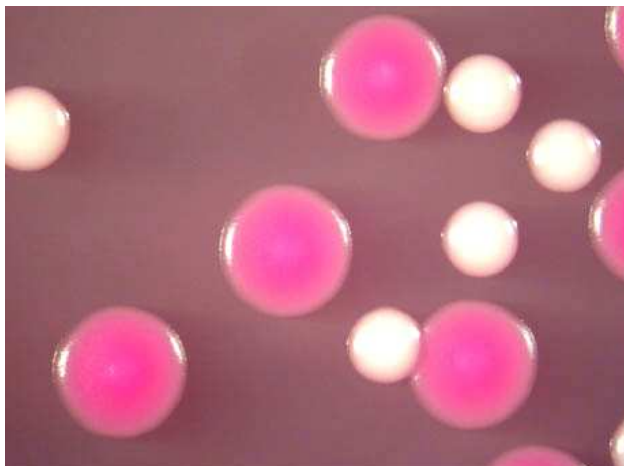
3.2.1. Přepínání fenotypů u kvasinky *Candida albicans*

Většina zdravých lidí má ve své vnitřní mikroflóře mimo jiné přítomnu i kvasinku *Candida albicans*, která se může stát patogenní, je-li obrana hostitele oslabena (Morschhäuser, 2010). A právě u této kvasinky bylo před více než 25 lety poprvé popsáno přepínání fenotypů. Změny ve struktuře a organizaci kolonií jsou zde spojeny s odlišnými adhezivními vlastnostmi a invazivním růstem, ovlivňující virulenci různých klinických izolátů (Slutsky *et al.*, 1985). Nejznámějším a také nejprostudovanějším přepínacím systémem je reverzibilní přechod mezi bílou (white) a matnou (opaque) kolonií kmene WO-1 kvasinky *Candida albicans*.

3.2.1.1. „White-opaque“ přechod

Přechod spočívá ve změně bílé kopulovité kolonie, běžné pro laboratorní kmeny, na plošší a větší kolonii matnou, zbarvenou do šeda a *vice versa* (Slutsky *et al.*, 1987) (obrázek 3). Rozdíly jsou především v morfologii buněk, ale také v reakcích na vnější okolí, v chování vůči imunitnímu systému hostitele, ve schopnosti párovat se a v genové expresi. Bylo objeveno několik

genů spojujících tvorbu biofilmů, tvorbu hyf a pseudohyf, patogenitu, adhezi buněk a přepínání fenotypů u kvasinky *Candida albicans* (Inglis *et al.*, 2013).



Obrázek 3 „White“ a „opaque“ kolonie na médiu obsahujícím phloxin B specificky barvicím „opaque“ kolonie, upraveno z Morschhäuser, 2010

„White“ buňky jsou tvarem, velikostí a i typem pučení shodné s laboratorními kmeny. Jsou většinou kulaté nebo elipsoidní, pučí unipolárně a tvoří také hyfy, které zarůstají do agarového média pod kolonií a jsou nezbytné pro narušení tkáně hostitele. „Opaque“ buňky jsou větší i objemnější (přestože obsahují stejné množství DNA jako „white“ buňky), rostou však pomaleji. Jsou protáhlejší (fazolovitý tvar), ale nejsou schopny tvořit hyfy a pučí bipolárně. Ve stacionární fázi růstu mají „opaque“ oproti „white“ buňkám větší jádro a struktura chromatinu je mnohem rozvolněnější (Slutsky *et al.*, 1987).

Přepínání je dědičné a vratné a dochází k němu s frekvencí asi 10^{-4} – 10^{-2} buněk. Vyskytují se i „white“ kolonie zahrnující „opaque“ sektory nebo naopak (Slutsky *et al.*, 1987). Frekvence přepínání může být ovlivněna vnějšími podmínkami prostředí. U „opaque“ kolonií jsou to například extrémní teploty. Po jejich kultivaci ve 4°C, respektive ve 37°C a následném přenesení a kultivaci ve 24°C se výrazně zvýší frekvence přepnutí na „white“ kolonie (Slutsky *et al.*, 1987, Morschhäuser, 2010). Vystavení kolonií nízkým dávkám UV záření zvýší frekvenci přepínání v obou směrech, stresové podmínky ve směru z „white“ na „opaque“ (Morschhäuser, 2010).

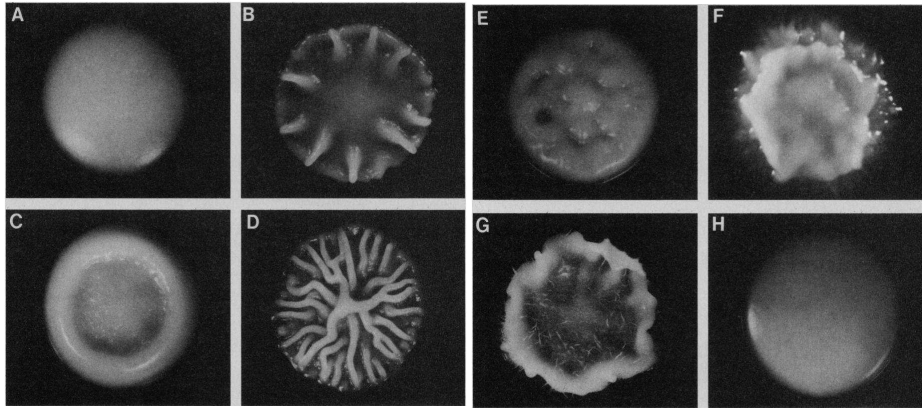
„Opaque“ buňky mají mnohem horší schopnost způsobit systémové infekce, jsou však lépe přizpůsobené pro kolonizaci jiných částí těla hostitele, především pokožky. Rozdíly mezi jednotlivými typy jsou i v expresi genů,

zahrnující mimo jiné geny související s metabolismem, což naznačuje přizpůsobení se odlišným zdrojům živin (Kvaal *et al.*, 1999).

Candida albicans se přepínáním fenotypů také brání imunitnímu systému hostitele. „White“ buňky jsou odolnější vůči leukocytům a kyslíkovým radikálům, kdežto „opaque“ buňky jsou výrazně méně fagocytovány. Vystavení „white“ buněk neutrofilům má pak za následek zvýšení frekvence přepínání na „opaque“ buňky. „Opaque“ buňky si svůj fenotyp při anaerobních podmínkách nebo při zvýšené koncentraci CO₂ udrží i po vystavení 37°C. Jsou však méně virulentní a více citlivé na nepříznivé podmínky (Morschhäuser, 2010).

3.2.1.2. Přepínání fenotypů u kmene 3153A

Druhý typ přepínání fenotypů u kvasinky *Candida albicans* byl popsán u laboratorního kmene 3153A. Ten běžně tvoří hladké kolonie (original smooth – o-smooth) bez vzdušných mycelií. Buňky z povrchu těchto kolonií jsou pučivé, hyfy prorůstající do podkladu jsou tvořeny pouze buňkami na styku s agarovým médiem. S frekvencí řádově 10⁻⁴ dochází ke změně morfologie a tvorbě dalších typů kolonií: hvězda (star), prstenec (ring) a nepravidelně vrásčitý typ (irregular wrinkle). Po vystavení hladkých kolonií nízké dávce UV záření se frekvence přepínání téměř 200-krát zvýší a navíc se objeví další morfotypy: tečkovaný (stipple), klobouk (hat) a plstnatý (fuzzy) (obrázek 4). Buňky z povrchu strukturovaných typů kolonií jsou jak pučivé, tak hyfální. Jejich opětovná kultivace ukázala, že vysoké procento (lišící se podle typu morfologie a případného předchozího vystavení UV záření) buněk si zachová původní morfologii, zbylé buňky ale přepínají na další morfotypy. Mezi nimi se objevují i hladké kolonie (revertant smooth – r-smooth), které však zcela neodpovídají úplnému přepnutí na původní hladké kolonie o-smooth. Navíc tvoří další subfenotypy (flat-top a cone) (Slutsky *et al.*, 1985).



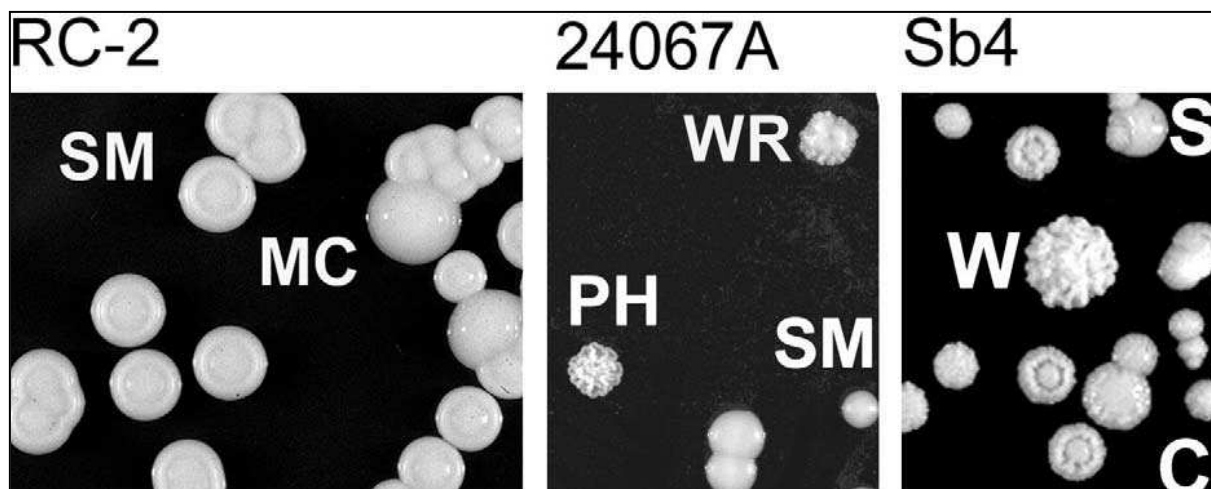
Obrázek 4 Strukturované kolonie kmene 3153A kvasinky *Candida albicans*, A: o-smooth, B: star, C: ring, D: irregular wrinkle, E: stipple, F: hat H: r-smooth, upraveno ze Slutsky *et al.*, 1985

Zdá se, že kmeny rodu *Candida* jsou schopny rychlé adaptace na léčbu, odpověď imunitního systému, přesuny v těle hostitele i změny v jeho fyziologii. Za hlavní mechanismy této změny jsou kromě přepínání fenotypů považovány také přechod z pučení na hyfální růst a regulace exprese genů souvisejících s virulencí, zapříčiněná faktory vnějšího prostředí (Soll, 2002).

3.2.2. Přepínání fenotypů u kvasinky *Cryptococcus neoformans*

Kvasinka *Cryptococcus neoformans* způsobuje onemocnění nejen u jedinců s oslabenou imunitou, ale i u zdravých jedinců. Zvláště u pacientů nemocných AIDS je pak, navzdory efektivní léčbě, obtížné zbavit se infekce. To může být, alespoň částečně, způsobeno přepínáním fenotypů tohoto patogena (Jain *et al.*, 2006).

Přepínání fenotypů bylo u *Cryptococcus neoformans* popsáno u třech kmenů a to: SB4 (hladké, „zubaté“ a vrásčité kolonie), 24067A (varianta kmene 24067; hladké, vrásčité a pseudohyfální kolonie) (Goldman *et al.*, 1998) a RC-2 (varianta kmene 24067; hladké a mukózní kolonie) (Franzot *et al.*, 1998) (obrázek 5). Hladké a mukózní kolonie jsou běžné u mnohých kmenů *Cryptococcus neoformans* a jejich vnitřní architektura se nijak neliší (Fries *et al.*, 1999). Ostatní fenotypy jsou v klinických izolátech poměrně vzácné, změny v morfologii těchto kolonií mohou být výsledkem odlišné vnitřní architektury podobně jako je tomu u kmene 3153A kvasinky *Candida albicans* (Fries *et al.*, 1999; Radford *et al.*, 1994) (kapitola 3.2.1.2).



Obrázek 5 Přepínání fenotypů u kvasinky *Cryptococcus neoformans*, SM nebo S hladké, MC mukózní, WR a W vrásčité, PH pseudohyální a C „zubaté“, upraveno z Fries *et al.*, 2002

Jednotlivé fenotypy se obecně liší morfologií kolonie, strukturou kapsulárních polysacharidů, tvarem a velikostí buněk, obsahem sterolů v buněčné membráně a virulencí. Jsou nezávislé na dostupnosti zdrojů nebo teplotě prostředí, ale frekvence přepínání se zvýší působením UV záření. Původní fenotypy tvoří kolonie hladké, změněné fenotypy vykazují zvýšenou přilnavost k agaru a tvorbu shluků v tekutém médiu, vyvolávají také odlišnou imunitní odpověď hostitele. Architektura strukturovaných kolonií je přičítána nepravidelnému shlukování buněk způsobenému vysokým obsahem exopolysacharidu (Guerrero *et al.*, 2010).

Kolonie kmenů SB4 a 24067A vykazují rozdíly ve struktuře a velikosti kapsulárních polysacharidů glukuronoxylomananů, které jsou hlavním faktorem virulence (Goldman *et al.*, 1998). Hladké a mukózní kolonie kmene RC-2 se liší biofyzikálními vlastnostmi těchto polysacharidů, kdy mukózní kolonie tvoří v porovnání s hladkými větší a viskóznější polysacharid, avšak se stejnou biochemickou strukturou. Je také účinnější v obraně vůči fagocytóze, čím činí mukózní kolonie virulentnějšími (Fries *et al.*, 2002). Na druhou stranu jsou mukózní kolonie citlivější na lytické enzymy a pomaleji rostou. Jejich lesklý vzhled je způsoben zvýšenou produkcí viskózního exopolysacharidu na povrchu kolonie (Jain *et al.*, 2006).

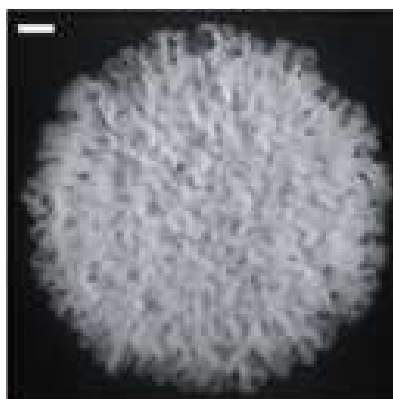
Jinou motivací pro přepínání fenotypů může být skutečnost, že *Cryptococcus neoformans* je v průběhu infekce haploidní a množí se pouze nepohlavně. Populace tak mají klonální strukturu s omezenými možnostmi

rychlé změny jako odpovědi na stresové faktory okolního prostředí. Přepínání fenotypů pak tuto rychlou reakci umožní bez nevýhody zvýšeného počtu a kumulace znevýhodňujících mutací (Fries *et al.*, 2002).

3.3. Divoké kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1. Výjimka mezi laboratorními kmeny

Na úvod stojí za zmínku laboratorní kmen $\Sigma 1278$ (obrázek 6), který ale podstatnou část svého genomu získal křížením s kmeny pekařských kvasinek a v mnoha vlastnostech je podobný spíše kmenům divokým. Je prototrofní, vykazuje silnou adhezivitu a je schopný přechodu na pseudohyfální růst, tvorby strukturovaných kolonií i exprese genu *FLO11* (na rozdíl od jiných laboratorních kmenů) a má také funkční alelu genu *AQY1* (Vopálenská *et al.*, 2010; Kron, 1997; Bonhivers *et al.*, 2010). Diploidní i haploidní (ΣS^h) varianta prochází během vývoje kolonie dvěma dimorfickými přechody, důležitými pro vývoj populace (Vopálenská *et al.*, 2010).



Obrázek 6 Kolonie haploidní varianty ΣS^h kmene $\Sigma 1278$, měřítko 1 mm, upraveno z Vopálenská *et al.*, 2010

První z nich vede k orientovanému vláknitému růstu buněk na okrajích těsně sousedících mikrokolonií (vzdálenost menší než 0,2 mm) a jejich následnému srůstu. Dochází k němu krátce po výsevu buněk, není tedy zapříčiněn nedostatkem živin, ale souvisí pouze s hustotou výsevu a vzdáleností k sousední mikrokolonii (Vopálenská *et al.*, 2010). Je to tedy odlišný proces od dříve objeveného vláknitého růstu indukovaného nedostatkem dusíku nebo jiných živin (Gimeno *et al.*, 1992; Braus *et al.*, 2003; Zaragoza & Gancedo, 2000). Osamocené kolonie tento přechod nepodstupují, ale lze ho indukovat zdrojem amoniaku nebo jiných těkavých aminů. Vlákňitý růst je pak orientován ke zdroji induktoru, což opět

odkazuje na mezibuněčnou signalizaci kolonií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (více viz Palková *et al.*, 1997).

Druhý přechod na vláknitý růst nastává v době, kdy kolonie začínají vytvářet trojrozměrnou strukturu a rostou především ve vertikálním směru. Přesné načasování také souvisí s hustotou výsevu, kdy je u samostatných kolonií rychlejší. K přechodu dochází v rámci celé kolonie a je závislý na přítomnosti Flo11p. I produkce tohoto adhezinu je závislá na hustotě výsevu. Buňky, které postrádají gen *FLO11* nejsou schopny prodlužování buněk a tvorby pseudohyf při druhém dimorfickém přechodu, kvůli čemuž ztrácí i schopnost tvorby strukturovaných kolonií. Flo11p je také nezbytný pro přichycení kolonie k agarovému médiu (Vopálenská *et al.*, 2010).

3.3.2. Struktura komplexních kolonií divokých kmenů

Jak již bylo zmíněno výše (kapitola 3.1.2.1), na rozdíl od laboratorních kmenů je typickou vlastností divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* tvorba kolonií se složitou trojrozměrnou strukturou (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček *et al.*, 2010) (obrázek 2). Vnitřní struktura kolonie je tvořena nadpovrchovou částí s dutinou a pseudohyfami, či řetízky buněk pod povrchem substrátu. Je zpevněna mezibuněčnými spoji, vytvářenými pouze za přítomnosti proteinu Flo11p, a chráněna membránovými transportéry a extracelulární matrix (ECM). Během vývoje kolonie dochází k diferenciaci buněk a lokalizaci ochranných i jiných mechanismů na konkrétní místa v kolonii. Některé z těchto mechanismů souvisí i s tvorbou komplexních biofilmů (Váchová *et al.*, 2011).

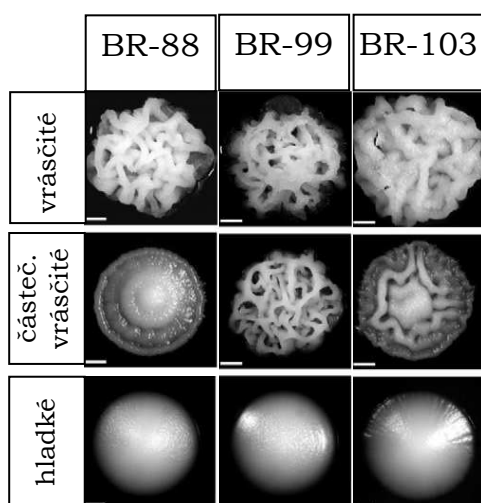
Na počátku vývoje je kolonie chráněna díky membránovým přenašečům, schopným odstraňovat toxické látky. Jejich aktivita je však později zachována jen u povrchových buněk, které navíc přechází do stacionární fáze a stávají se tak rezistentnějšími. Vzhledem k tomu, že propojujícími vlákny efektivně proudí živiny, zdá se vznik těchto nedělicích se buněk kontrolovaným procesem zajišťujícím ochranu povrchu kolonie. Zároveň u dělicích se buněk uvnitř kolonie dochází k tvorbě protektivní ECM. Ty jsou tak velmi dobře chráněny. Také buňky na styku kolonie s podkladem tvoří nepropustnou ECM. Vyčnívají z ní pouze špičky pseudohyf, kde je ale

zachována aktivita membránových přenašečů. Mohou tak sloužit jako senzory okolního prostředí (Váchová *et al.*, 2010).

S dalším vývojem se vrstva stacionárních buněk zužuje a membránové transportéry jsou degradovány. V důsledku dělení a tedy nabývání počtu buněk uvnitř kolonie, tvořících ECM, se pak vrchní vrstva nedělicích se buněk zvlí, a vytvoří tak typickou strukturu kolonie. ECM pak zřejmě vyplňuje vnitřní dutinu, která je ve struktuře kolonie patrná již od časných fází vývoje, vnukávajíc tak funkci ECM jako zásobárny vody a živin. Zároveň přítomnost ECM usnadňuje rychlou expanzi populace do prostoru. U domestikovaných a laboratorních kmenů se žádná vnitřní dutina netvoří (Šťovíček *et al.*, 2012).

3.3.3. Fenotypová variabilita a domestikace divokých kmenů

Vedle tvorby strukturovaných kolonií je další typickou vlastností divokých kmenů značná fenotypová variabilita, jež se projevuje schopností tvořit více morfologicky odlišných typů kolonií od vrásčitých (fluffy), přes částečně vrásčité (semi-fluffy, tvoří méně strukturované kolonie, nebo je vrásčitá architektura formována až později ve vývoji kolonie), až po hladké (smooth) (Šťovíček *et al.*, 2010) (obrázek 7), podobně jako v případě přepínání fenotypů u výše popsaných patogenních kvasinek (kapitola 3.2).

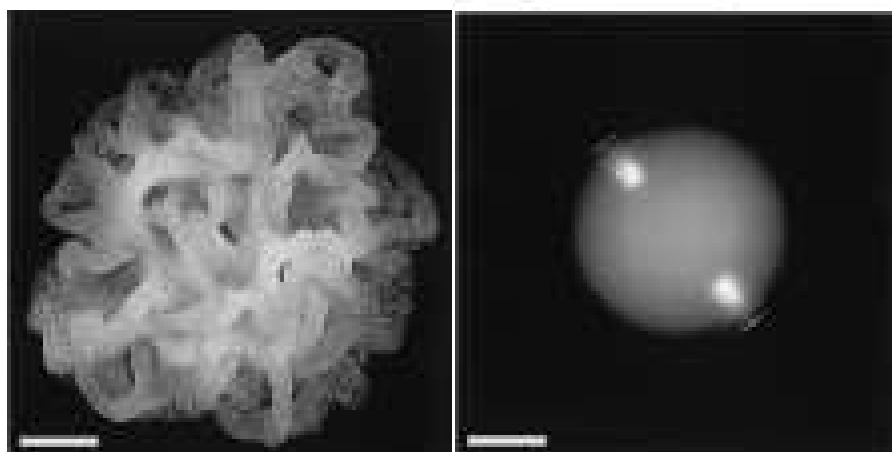


Obrázek 7 Vrásčité, částečně vrásčité a hladké kolonie divokých kmenů BR-88, BR-99 a BR-103 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, měřítko 1 mm, upraveno z Šťovíček *et al.*, 2010

Po několika generacích kultivace ve standardních laboratorních podmínkách (komplexní médium, stálá teplota a vlhkost) ztrácí divoké kmeny schopnost tvorby strukturované kolonie a přepínají na kolonie s hladkou morfologií, nerozeznatelné od kolonií laboratorních kmenů. Tento

fenomén byl nazván domestikace (Kuthan *et al.*, 2003). Nevratný domestikací proces, představující evoluci laboratorních kmenů mikroorganismů, má na pozadí dlouhodobý vývoj těchto kmenů ve stabilních podmínkách a selekci a fixaci pomalých mutačních změn (Aguilar *et al.*, 2007; Kron, 1997). Domestikace divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je však rychlá a efektivní, splňuje tak spíše charakter přepínání fenotypů (Kuthan *et al.*, 2003).

K přechodu z kmene BR-F (tvoří strukturované kolonie) na kmen BR-S (tvoří hladké kolonie) (obrázek 8) dochází s frekvencí zhruba $2 \times - 3 \times 10^{-5}$ (2 – 3 % buněk znovu vyseté kolonie tvořené řádově 10^7 buňkami). Ta je jednoznačně vyšší než frekvence mutací, což znamená, že přechod je regulovanou a kontrolovanou změnou fenotypu (Kuthan *et al.*, 2003). Jedná se o stabilní proces, neboť kolonie domestikovaných kmenů si i při dalších výsevech udržují svou hladkou morfologii (Šťovíček *et al.*, 2010).



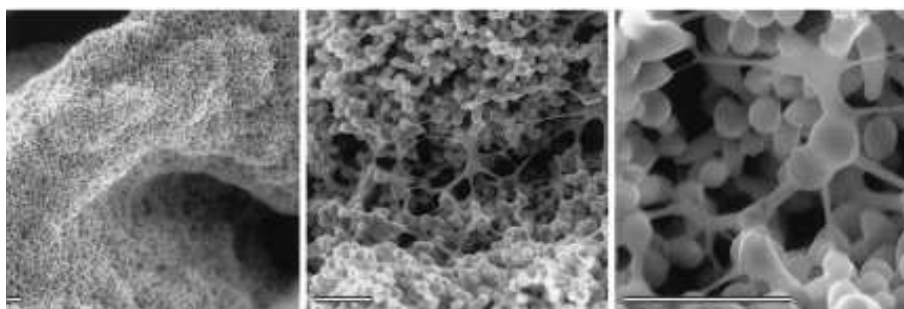
Obrázek 8 Kmeny BR-F (vlevo) a BR-S, měřítko 1 mm, upraveno z Kuthan *et al.*, 2003

Oba kmeny, reprezentující jednak strukturované a jednak hladké morfotypy, se od sebe liší řadou dalších vlastností. Kolonie kmene BR-F jsou větší, ovšem tvořené méně buňkami (Kuthan *et al.*, 2003). Stejně tak vrásčité kolonie dalších divokých kmenů jsou větší (vyšší a objemnější) a mají až 3-krát vyšší mokrou hmotnost než hladké kolonie tvořené po domestikaci těchto kmenů i přesto, že sestávají z menšího počtu stejně velkých buněk. Suchá hmotnost je u vrásčitých kolonií naopak nižší, což opět poukazuje na vysoký obsah vody v těchto koloniích. Částečné vrásčité kolonie zapadají naměřenými hodnotami mezi vrásčité a hladké kolonie (Šťovíček *et al.*, 2010).

Kmen BR-F má kromě standardních kulatých buněk také buňky protáhlé, vykazující pseudohyfální růst a tvorbu extracelulární hmoty (Kuthan *et al.*, 2003). Vyskytují se zejména na bázi kolonie a s pozdějším vývojem kolonie prorůstají do agaru a připevňují tak kolonii k podkladu. Vrstva buněk na povrchu zase chrání kolonii před nežádoucími toxickými látkami v okolí díky aktivním transportérům v jejich membráně (Kuthan *et al.*, 2003, Štoviček *et al.*, 2010).

Přírodní a domestikované kmeny se liší také typem buněčného dělení a jeho polaritou. Morfologie a typ pučení však překvapivě nepatří mezi charakteristiky, které přímo souvisí s tvorbou komplexních strukturovaných kolonií. Tvar, vláknitý růst a charakter pučení buněk v populaci kolonií jsou vlastnosti odlišné mezi jednotlivými divokými kmeny, kdy vrásčité kolonie některých kmenů (BR-99 a BR-88) jsou složeny z poměrně významného počtu pseudohyfálních, polárně pučících buněk, zatímco morfologicky velmi podobné kolonie jiného kmene (BR-103) jsou složeny pouze z klasických kulatých či oválných buněk, typických pro částečně vrásčité a hladké kolonie (Štoviček *et al.*, 2010). Potvrzuje to i skutečnost, že delece genu *BUD1*, důležitého pro určení místa pučení buněk, nijak neovlivní morfologii kolonií laboratorních kmenů (Vopálenská *et al.*, 2005).

Architekturu kolonie tedy zřejmě nezajišťuje pseudohyfální růst buněk, ale spíš jejich organizace uvnitř kolonie. Buňky na povrchu hladkých kolonií jsou v těsné blízkosti, kdežto povrch strukturovaných kolonií je nerovný a skupiny buněk jsou prostorově oddělené. Jsou také pokryté extracelulární matrix a propojené vlákny tvořenými ECM (Kuthan *et al.*, 2003) (obrázek 9). U laboratorních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla propojení pozorována pouze mezi hladovějícími buňkami v pozdní stacionární fázi růstu (Varon & Choder, 2000). Tvorba ECM u divokých kmenů je však pozorována již u velmi mladých kolonií, není tedy důsledkem nedostatku živin. Může být důležitá pro udržení vzdálenosti mezi buňkami a pro ochranu celé kolonie před nepříznivými podmínkami (Kuthan *et al.*, 2003).



Obrázek 9 Povrch kolonií kmene BR-F v environmentálním skenovacím elektronovém mikroskopu, měřítko 20 μm , upraveno z Kuthan *et al.*, 2003

Extracelulární hmota obalující a propojující buňky v kmeni BR-F je selektivně propustná a chrání tak buňky uvnitř kolonie. Pravděpodobně je její součástí vysokomolekulární glykoprotein (>200 kDa), jenž není kovalentně spojený s buněčnou stěnou a nevyskytuje se u kmene BR-S ani u laboratorních kmenů (Kuthan *et al.*, 2003). Skenovací elektronová mikroskopie prokázala přítomnost ECM i ve vrásčitých koloniích dalších divokých kmenů (BR-88, BR-99 a BR-103), v menší míře také v jejich částečně vrásčitých koloniích, nikoli však v hladkých koloniích. Vysokomolekulární glykoprotein (HMWGP) stejný jako v kmeni BR-F byl však prokázán pouze u vrásčitých a částečně vrásčitých kolonií kmene BR-88 (Šťovíček *et al.*, 2010).

Kvůli rezistenci vůči endoglykosidázám se ale přesné složení a funkce ECM určuje velmi obtížně (Kuthan *et al.*, 2003). Složení se navíc liší u různých divokých kmenů v závislosti na jejich konkrétním genetickém pozadí, převládající obsah polysacharidů by tak například mohl zastínit přítomnost HMWGP. Souvislost s odlišným složením ECM u různých kvasinkových kmenů (a jejím požíváním nálevníky) by mohla mít i funkce ECM jako bariéra a zároveň zásobárna živin (Váchová *et al.*, 2011).

Další rozdíly mezi přírodními a domestikovanými kmeny nacházíme v expresi genů, přičemž například subtelomerické geny vykazují v kmeni BR-F zvýšenou expresi (Kuthan *et al.*, 2003). Transkripce subtelomerických genů může být ovlivněna strukturou chromatinu. Analýza exprese vybraných genů prokázala, že odlišnosti jsou spíše spojené s genetickým pozadím

konkrétního kmene než se změnou morfologie kolonie. Výjimku tvoří pouze dva studované geny: *FLO11* a *AQY1* (Šťovíček *et al.*, 2010).

Protein Flo11p, jehož produkce je také výrazně vyšší u kmene BR-F v porovnání s BR-S, patří mezi glykoproteiny buněčné stěny kovalentně s ní spojené GPI kotvou. Jeho zvýšená produkce byla zaznamenána také u vrásčitých kolonií všech ostatních divokých kmenů, kdy v prvních dnech vývoje byla až 5-krát vyšší než u hladkých kolonií. S vývojem kolonie pak míra exprese klesala, kdežto u hladkých kolonií zůstala stejná. Hodnoty exprese u částečně vrásčitých kolonií opět spadají mezi hodnoty naměřené u vrásčitých a hladkých kolonií. Zajímavé však je, že míra exprese se držela na maximální výši až do 5. dne kultivace, kdy u částečně vrásčitých kolonií dochází k zahájení formování složité architektury kolonií (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček *et al.*, 2010).

Souvislost mezi zvýšenou expresí *FLO11* a strukturovaností kolonie byla naznačována také u „flor“ kvasinek (vinařské kmeny kvasinek *S. cerevisiae* účastníci se procesu zrání sherry, tvořící po skončení fermentace na povrchu vína blanku, v aerobním prostředí metabolizující ethanol na acetaldehyd a dodávající pak vínu jeho specifické chuťové vlastnosti) (Barrales *et al.*, 2008; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001).

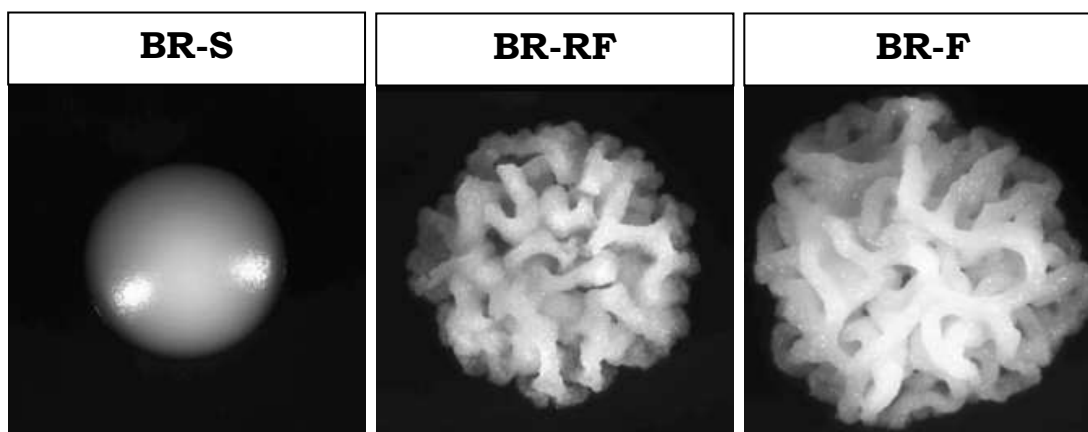
Kmen BR-F vykazuje zvýšenou expresi také u genu *AQY1*. To způsobuje změny v propustnosti buněk pro vodu a v dalších jejich povrchových vlastnostech (Kuthan *et al.*, 2003). Jeho exprese byla zvýšena i u vrásčitých kolonií ostatních divokých kmenů, narozdíl od hladkých i částečně strukturovaných kolonií. Její míra byla nejvyšší 7. den kultivace, což naznačuje, že protein Aqy1p je důležitý až v pozdějších fázích vývoje strukturovaných kolonií. Potvrzuje to i zjištění, že delece genu *AQY1* nemá vliv na morfologii kolonie (Šťovíček *et al.*, 2010). U laboratorních kmenů se zdá gen *AQY1* mutovaný (Bonhivers *et al.*, 1998).

Tvorba strukturované kolonie, ECM a schopnost domestikace jsou obecnými vlastnostmi divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Strukturovanost kolonie však není vlastností trvalou a je ovlivňována vnějšími podmínkami, domestikace se zdá být spojena s komplexní změnou životního stylu buňky. Při domestikaci neexistuje mezi hladkou

a strukturovanou kolonií žádný mezistupeň. Mechanismus by tak mohl připomínat přepínání mezi párovacími typy (Kuthan *et al.*, 2003) (kapitola 3.4).

3.3.4. Reverzibilita procesu domestikace

Domestikace divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* výrazně připomíná přepínání fenotypů pozorované u některých druhů patogenních kvasinek (kapitola 3.2). V podmínkách dlouhodobé statické kultivace domestikovaného kmene BR-S s omezeným přísunem živin dochází k modulaci fenotypu a vzniku strukturovaných kolonií. Fenotypů vzniká více, liší se morfologií kolonie, přičemž některé jsou však nerozeznatelné od původního přírodního kmene BR-F. Kmen, vykazující tento fenotyp, byl označen BR-RF (obrázek 10). Jeho bližší analýza prokázala obnovení řady vlastností typických pro strukturované kolonie kmene BR-F (produkce ECM, exprese genu *FLO11*), ovšem odhalila také odlišnosti mezi oběma kmeny (výrazně vyšší frekvence přechodu na hladké kolonie, morfologie buněk) (Šťovíček, 2012). Avšak i v případě přepínání fenotypů u kmene 3153A kvasinky *Candida albicans* byly mezi původním fenotypem (original smooth) a fenotypem považovaným za obnovu původního (revertant smooth) nalezeny odlišnosti (Slutsky *et al.*, 1985). Mechanismy přepínání fenotypů a domestikace by tedy mohly být podobné (kapitola 3.4).



Obrázek 10 Kolonie kmenů BR-S, BR-RF a BR-F, upraveno z Šťovíček, 2012

3.3.4.1. Charakteristika kmene BR-RF

Stejně jako u kmene BR-F i kolonie kmene BR-RF mají svrchní část s dutinami a podpovrchovou část upevňující kolonii k substrátu. Jsou však tvořeny pouze kulatými buňkami, včetně podpovrchové části, kde jsou tyto

kulaté buňky spojeny v řetízky. Kmen BR-RF je tak z pohledu morfologie buněk shodný se svým přímým předchůdcem – kmenem BR-S. Obsah vody v koloniích kmene BR-RF je téměř shodný s hodnotami kmene BR-F, avšak kolonie jsou menší (Šťovíček, 2012).

U kmene BR-RF je také obnovena tvorba HMWGP, i když v menší míře než jaké je dosahováno u kmene BR-F. HMWGP kmene BR-RF vykazuje také nižší molekulovou hmotnost, což by mohlo být zapříčiněno nižší mírou glykosylace. Vnitřní oblasti kolonie jsou však stejně jako u kmene BR-F chráněny málo propustnou ECM (Šťovíček, 2012), jejíž tvorba je také charakteristická pro biofilmy (Costerton, 1999).

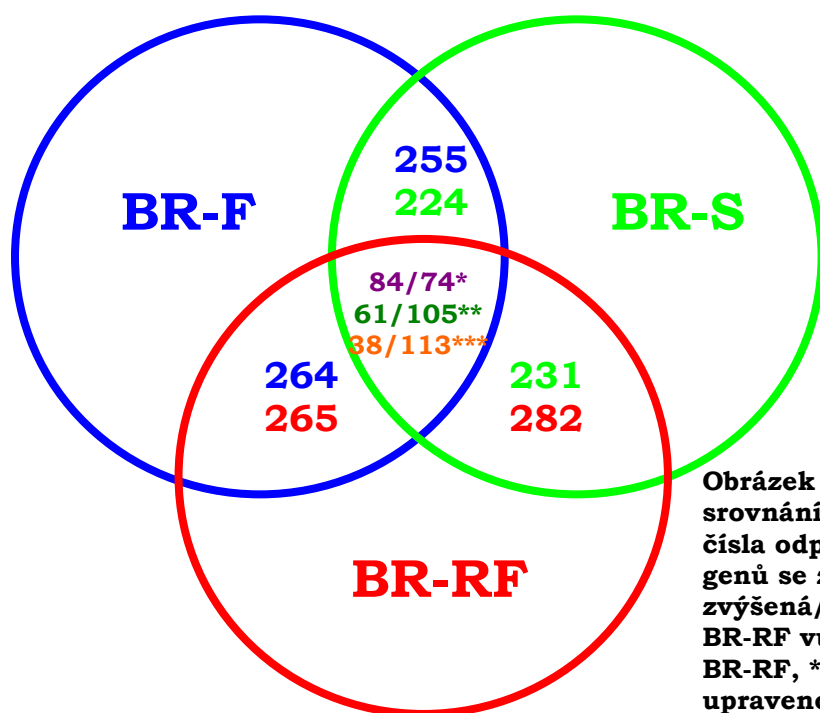
Produkce proteinu Flo11p je nezbytná pro tvorbu strukturované kolonie (Vopálenská *et al.*, 2010, Šťovíček *et al.*, 2010) a byla tedy nutně obnovena i v kmeni BR-RF. Gen *FLO11* však během domestikace prochází úpravami, protože jeho mRNA je u kmene BR-RF delší než u kmene BR-F. Transkript je stejné velikosti jako u kmene BR-S, kde je velmi nízká exprese genu *FLO11* také patrná (Šťovíček, 2012). Geny pro adheziny jsou ovšem známy svým značným rekombinačním potenciálem, který způsobuje změny ve velikosti genů a s tím často spojené i odlišnosti ve funkci proteinů (Verstrepen *et al.*, 2004; Fidalgo *et al.*, 2006). Variabilita ve velikosti transkriptu genu *FLO11* je patrná i v koloniích dalších divokých kmenů, ovšem nijak nekoreluje s morfologií kolonie. Pro tvorbu strukturované kolonie je tak zřejmě důležitější míra exprese, která roste s komplexitou architektury, než délka tohoto proteinu (Šťovíček, 2012).

Frekvence přechodu na hladké kolonie (domestikace) je u kmene BR-RF při růstu na médiu s fermentovatelným, respektive nefermentovatelným, zdrojem uhlíku 4-krát, respektive 8-krát, vyšší oproti kmeni BR-F. Je tedy mnohem méně stabilní, což naznačuje, že dlouhodobé vystavení nedostatku zdrojů není pro úplné přepnutí na původní fenotyp kmene BR-F dostačující (Šťovíček, 2012).

3.3.4.2. Odlišnosti a shody v genové expresi

Transkriptomové srovnání kmenů BR-F, BR-S a BR-RF (obrázek 11) umožnilo identifikaci molekulárních faktorů, které se mohou podílet na tvorbě struktury kolonie, a naznačilo, že alespoň některé vlastnosti

původního divokého kmene jsou kontrolovány epigenetickými mechanismy (remodelace chromatinu, exprese genů lokalizovaných v subtelomerických oblastech, viz kapitola 3.4) (Šťovíček, 2012).



Obrázek 11 Transkriptomové srovnání kmenů BR-F, BR-S a BR-RF, čísla odpovídající barvy značí počet genů se zvýšenou expresí, zvýšená/snížená exprese u * BR-F a BR-RF vůči BR-S, ** BR-F a BR-S vůči BR-RF, *** BR-S a BR-RF vůči BR-F, upraveno z Šťovíček, 2012

Rozdíly byly nalezeny v expresi genů pro sekreci a modifikaci proteinů, které mohou mít vliv na strukturu buněčné stěny a membrány, a stejně tak u genů pro proteiny buněčné stěny (u některých zvýšená, u jiných snižená). Strukturované a hladké kolonie se tedy liší sacharidovým a proteinovým složením buněčné stěny (Šťovíček, 2012).

Také exprese metabolických genů a transportérů živin se liší ve strukturovaných a v hladkých koloniích. Například exprese genů pro metabolismus vitamínů nebo β -oxidaci mastných kyselin je zvýšená ve strukturovaných koloniích, v hladkých zas například u genů pro rezistenci a udržení homeostáze mědi a železa (Šťovíček, 2012).

V hladkých koloniích je navíc zvýšená exprese mnoha genů souvisejících se stresovou odpovědí. Je tomu tak zřejmě proto, že kmen BR-S nemá vyvinuté jiné ochranné mechanismy, jako je například energeticky náročná tvorba ECM, které jsou však ve strukturovaných koloniích i v biofilmech běžné (Šťovíček *et al.*, 2010; Costerton, 1999). Ve strukturovaných koloniích je z této skupiny genů exprese zvýšená pouze u genů odpovědi na oxidativní

stres a poškození a opravy DNA. Ve strukturovaných koloniích jsou také více exprimovány transpozony, nacházející se v subtelomerických oblastech (Šťovíček, 2012).

Ovlivněná je také exprese genů pro komponenty signálních kaskád, transkripční regulátory (filamentární a pseudohyfální růst indukován ve strukturovaných koloniích, integrita buněčné stěny a remodelace struktury chromatinu v hladkých koloniích) a také genů pro translaci a úpravy RNA (Šťovíček, 2012).

Mnoho genů, jejichž exprese se liší v kmenech BR-RF oproti kmeni BR-F, BR-S nebo oběma, se nachází na levém rameni chromozomu XV a na chromozomech IX a XII. Ovšem geny s rozdílnou expresí v kmenech BR-F a BR-S, ani geny specificky exprimované ve strukturovaných koloniích v relativně úzkých oblastech specifických chromozomů ve zvýšené míře lokalizovány nejsou. Zdá se tedy, že specificky u kmene BR-F dochází k chromozomálním přestavbám (translokace, duplikace), které ovlivňují expresi mnoha funkčně nesouvisejících genů, nikoliv však genů, které by souvisely s tvorbou strukturovaných kolonií (Šťovíček, 2012).

3.4. Zvažované mechanismy přepínání fenotypu a domestikace

Přepínání fenotypu umožňuje vznik virulentnějších a rezistentnějších kvasinkových kmenů a tím rychlou adaptaci na měnící se podmínky vnějšího prostředí (Fries *et al.*, 2002; Váchová *et al.*, 2011; Kuthan *et al.*, 2003; Inglis *et al.*, 2013; Slutsky *et al.*, 1985; Soll, 2002). Molekulární mechanismy zajišťující u kvasinek přepínání fenotypů nebo domestikaci a případně také její reverzní proces však doposud nebyly zcela objasněny.

Mnohé studie, zabývající se těmito tématy nabízejí několik možných alternativ, ať genetických, či epigenetických, jako například transpozice mobilních elementů, transkripční umlčování, aktivace mutátorových genů a infekce priony, modifikujícími přesnost terminace translace. Chromozomální přestavby a jimi způsobené změny v karyotypu jsou také uvažovány jako jeden z mechanismů ovlivňující fenotypové změny u kvasinek (Guerrero *et al.*, 2006). Změny v karyotypu často vznikají

v průběhu přepínání fenotypů u kvasinek *Cryptococcus neoformans* i *Candida albicans* (Fries *et al.*, 1999; Soll, 1992). Význam takových reorganizací genomu však není zřejmý, jelikož tyto změny nejsou u řady kmenů vratné a neodpovídají konkrétní morfologii kolonie (Fries *et al.*, 2002). Je také možné, že jsou změny v karyotypu spíše vedlejším efektem jiných genetických mechanismů podobně jako je tomu pravděpodobně i v případě domestikace a reverzního procesu divokého kmene *Saccharomyces cerevisiae* BR-F (Šťovíček, 2012).

3.4.1. Genetické pozadí přepínání fenotypů u kmene WO-1

Kmen WO-1 kvasinky *Candida albicans* běžně podstupuje přechod mezi „white“ a „opaque“ morfologií kolonií (kapitola 3.2.1.1). Pouze „opaque“ a nikoliv „white“ buňky jsou však schopny párování (Miller & Johnson, 2002). Není pak velkým překvapením, že „white-opaque“ přepínací systém je kontrolován expresí lokusu párovacího typu (*Mating Type Lokus*, *MTL*). Ten se u kvasinky *Candida albicans* vyskytuje ve dvou alelách *MTLa* a *MTLa*. Heterozygotní „white“ kolonie tvoří **a1-a2** represor (Miller & Johnson, 2002), který potlačuje expresi hlavního transkripčního faktoru *WOR1* (White-Opaque Regulator) a tím přepínání na „opaque“ morfologii. Tak je zajištěno, že pouze homozygotní „white“ buňky jsou schopné přechodu na párující se „opaque“ buňky. Pokud je *WOR1* exprimován v dostatečné míře, dojde k přepnutí fenotypu. Při vzniku tetraploidní buňky ze dvou různě homozygotních (*MTLa/MTLa* a *MTLa/MTLa*) diploidních „opaque“ buněk dochází opět k produkci **a1-a2** dimeru, tedy potlačení exprese *WOR1* a přepnutí z „opaque“ zpět na „white“ morfologii (Bennett & Johnson, 2003).

Kromě genů důležitých pro párování se exprese liší i u genů pro různé adheziny. „White“ a „opaque“ buňky se tak váží na zcela jiné povrchy: „white“ na sliznice a „opaque“ na pokožku. Ta také usnadňuje párování (Morschhäuser, 2010). Na povrchu těla mají totiž homozygotní buňky s odlišnými alelami *MTL* vyšší pravděpodobnost setkání než uvnitř hostitele (Soll, 2004). Přepínání fenotypu pak bylo uvažováno jako alternativní způsob dosažení variability nezbytné pro přežití v nepříznivých stresových podmínkách, podobně jako u kvasinky *Cryptococcus neoformans*, jejíž hladké

kolonie jsou tvořené haploidními buňkami množícími se pouze nepohlavně (Pérez-Martín *et al.*, 1999, Fries *et al.*, 2002).

Aktivita transkripčního faktoru *Wor1p* je také řízena epigeneticky a podléhá pozitivní autoregulaci. *Wor1p* navíc v „opaque“ buňkách, kde je přítomen, řídí také další geny (Zordan *et al.*, 2007). Zřejmě i veškeré faktory vnějšího prostředí mající vliv na přepínání přímo nebo nepřímo působí na množství *Wor1p* v buňkách. Pro udržení „white“ fáze je nutný regulátor *Efg1p*, který také podporuje přechod z „opaque“ na „white“ fázi (Morschhäuser, 2010).

V literatuře bylo doposud popsáno 31 genů souvisejících s „white-opaque“ přepínáním, z nichž 14 má vliv na patogenitu. Gen *WOR1* je hlavním regulátorem přepínání, jeho spojení s patogenitou však nebylo prokázáno (Inglis *et al.*, 2013).

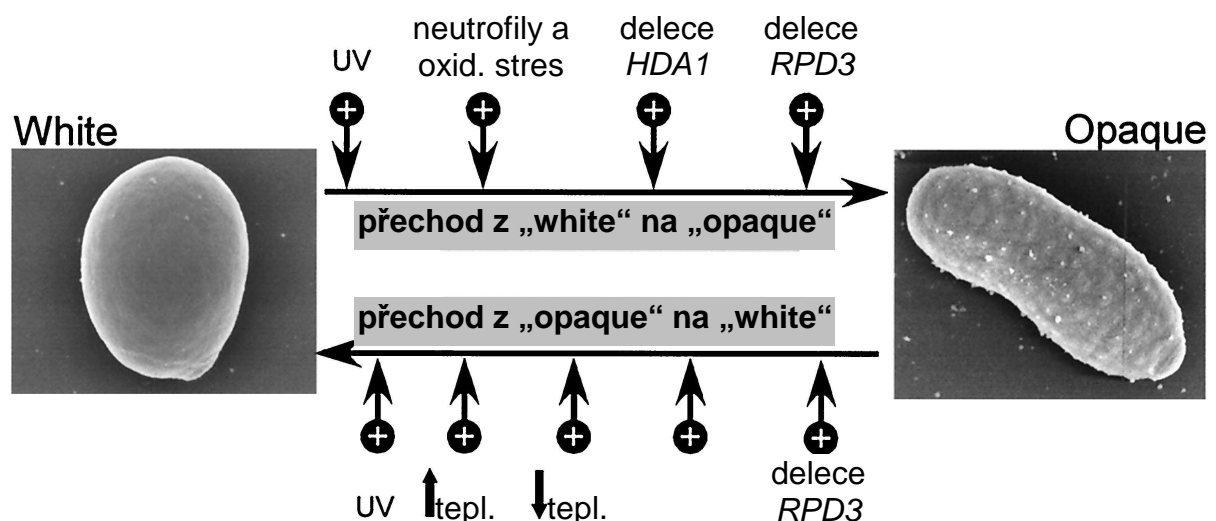
3.4.2. Transkripční umlčování a histonové deacetylázy

Dalším ze zvažovaných mechanismů, zajišťujících dědičnost fenotypu epigeneticky, je transkripční umlčování genů. To je velmi dobře prostudováno u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Huang, 2002). Geny, které kontrolují specifické vlastnosti určitého fenotypu by tak mohly být lokalizovány na specifických částech chromozomů, jejichž struktura buď umožňuje, nebo neumožňuje expresi. Změna chromatinové struktury ovlivněná specifickými enzymy modifikujícími histony - histonovými deacetylázami by tak mohla zapříčinit přepnutí fenotypu, stejně jako je tomu v případě přepínání párovacího typu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (viz dále; Kuthan *et al.*, 2003; Montelone, 2002).

Delece genu *SIR2*, u *Saccharomyces cerevisiae* zásadního pro udržení transkripčně neaktivního stavu chromatinu (Huang, 2002), vede u divokých kmenů kvasinky *Candida albicans* k přepínání na morfologicky odlišné typy kolonií, podobné jako u laboratorního kmene 3153A (kapitola 3.2.1.2). Frekvence přepínání byla navíc výrazně vyšší a to až 10^{-1} , i když s určitou frekvencí ($10^{-1} - 10^{-2}$) zůstává morfologie kolonie po dalším výsevu zachována. U laboratorních kmenů neměla delece genu *SIR2* žádný efekt (Pérez-Martín *et al.*, 1999). Na základě funkcí genu *SIR2* známých u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pak byly navrženy dva modely mechanismu

přepínání fenotypů: telomerický poziční efekt, kdy by se regulátory morfologie kolonie měly nacházet v oblasti vlivem Sir2p transkripčně neaktivní, a přestavby DNA, kdy Sir2p brání těmto přestavbám a udržuje stabilitu chromozomů (Pérez-Martín *et al.*, 1999; Bedalov *et al.*, 2001). Sir2p je totiž využíván také pro opravy DNA a spojování nehomologních konců chromozomů (Guarente, 2000).

Vliv dalších histonových deacetyláz na přepínání mezi „white“ a „opaque“ fázemi u kvasinky *Candida albicans* byl objeven ve stejné laboratoři, kde byl tento fenomén také poprvé popsán (Slutsky *et al.*, 1987). Snížená exprese genů *HDA1* a *RPD3* v „opaque“ buňkách vedla k delečním pokusům s těmito deacetylázami. V případě delece genu *HDA1* se zvýšila frekvence přepínání na „opaque“ buňky, v případě delece genu *RPD3* v obou směrech (obrázek 12). Tyto a další výsledky naznačují, že histonové deacetylázy Hda1p a Rpd3p potlačují přepínání fenotypů, regulují fázově specifické geny a jejich aktivita je zároveň regulována přepínáním mezi fázemi. Za důležitý mechanismus je pak považována modifikace struktury chromatinu deacetylací histonů, vedoucí k potlačení exprese lokusu klíčového pro přepínání. Identifikace tohoto lokusu je však nesnadná (Srikantha *et al.*, 2001; Klar *et al.*, 2001).

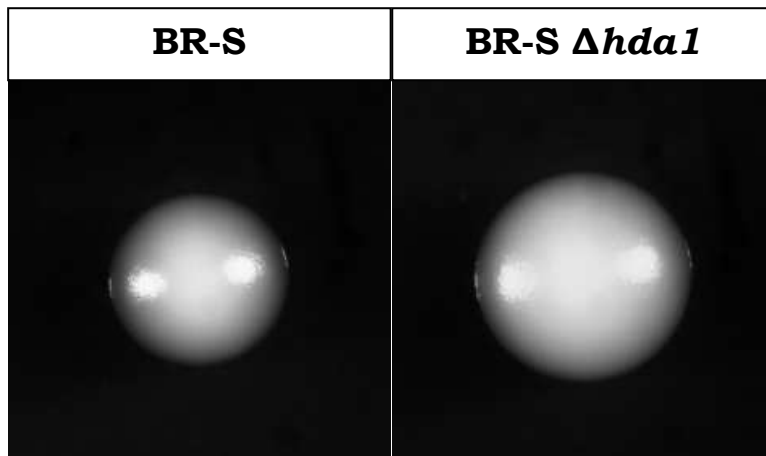


Obrázek 12 Faktory ovlivňující „white-opaque“ přepínání u kvasinky *Candida albicans*, upraveno z Srikantha *et al.*, 2001

Mechanismy transkripčního umlčování a tedy enzymy specificky remodelující strukturu chromatinu, zejména pak histonové deacetylázy Sir2p, Hda1p a Rpd3p, jsou hojně spojovány s přepínáním fenotypů u kvasinky *Candida albicans* (viz výše). Navíc skutečnost, že při domestikaci kmene BR-F na kmen BR-S nedochází ke vzniku žádných přechodných morfotypů by mohla vést ke spekulacím, že mechanismus domestikace bude podobný jako v případě přepínání mezi párovacími typy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, tedy závislý na transkripčním umlčování (Kuthan *et al.*, 2003). Nezbyvá než poznamenat, že i tento přechod je regulován NAD⁺-závislou histonovou deacetylázou Sir2p (Huang, 2002). A dále, mnohé z genů, jejichž exprese je zvýšená v kmenech BR-F, BR-S nebo v biofilmech, se nacházejí v subtelomerických oblastech, kde mohou podléhat telomerickému pozičnímu efektu (Šťovíček, 2012).

Možná souvislost procesu domestikace a enzymů transkripčního umlčování vedla k porovnání genů s odlišnou expresí v kmenech BR-F, BR-S a BR-RF (Šťovíček, 2012) s geny nacházejícími se v tzv. HAST doménách. HAST domény jsou subtelomerické oblasti chromozomů pod represivní kontrolou histonové deacetylázy Hda1p (Robyr *et al.*, 2002). Výsledky ukázaly korelaci mezi geny lokalizovanými v těchto HAST doménách a geny se zvýšenou expresí v kmeni BR-F. Oproti kmenům BR-S a BR-RF je tedy aktivita Hda1p v kmeni BR-F nižší. Příprava a následná analýza mutantního kmene BR-S $\Delta hda1$ s úplnou delecí genu *HDA1* ukázala, že produkty genů, jejichž exprese je kontrolována Hda1p histonovou deacetylázou, mají vliv na povrchové vlastnosti buněk důležité pro rezistenci kvasinkových kolonií vůči okolnímu prostředí. Kmen BR-S $\Delta hda1$ totiž vykazuje zvýšenou rezistenci vůči barvivu vážícímu se na chitin – calcoflour, a vůči vysoké teplotě, tedy vlastnosti charakteristické pro divoký kmen BR-F (Šťovíček, 2012).

Hda1p je také epigenetickým negativním regulátorem exprese genu *FLO11* (Halme *et al.*, 2004), přesto její delece v kmeni BR-S neumožnila produkci Flo11p v množství dostatečném pro tvorbu komplexní architektury strukturovaných biofilmových kolonií (Šťovíček, 2012) (obrázek 13).



Obrázek 13 Morfologie kolonií kmenů BR-S a BR-S $\Delta hda1$, upraveno z Štoviček, 2012

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vede delece histonové deacetylázy *RPD3* k dalšímu zvýšení represe oblastí, které jsou již potlačeny vlivem Sir2p (Srikharta *et al.*, 2001). Protein Rpd3p totiž deacetylací konkrétního místa histonu H4 ruší transkripční umlčování genů zapříčiněné proteinem Sir2p. Tyto dvě deacetylázy tak mají protichůdné vlivy na expresi genů. Například gen *BNA1*, související s metabolismem NAD^+ , je aktivován pomocí Rpd3p a inhibován pomocí Sir2p (Bernstein *et al.*, 2000).

Každá histonová deacetyláza tedy zřejmě ovlivňuje expresi jiných genů. U *HDA1* se jedná například o snížení exprese genů pro transport a využití sacharidů a uhlíkových metabolitů, *SIR2* kromě genů v oblasti telomer, lokusu párovacího typu a rDNA potlačuje také expresi genů pro biosyntézu aminokyselin a *RPD3* má vliv na expresi genů souvisejících s buněčným cyklem (Bernstein *et al.*, 2000).

V procesu domestikace také není jasné kdy a u kterých buněk dojde k přepnutí. Je možné, že některé buňky uvnitř rostoucí strukturované kolonie zaznamenají změnu prostředí, přepnou fenotyp a po následném vysetí jsou základem pro hladkou kolonii. Objevující se strukturované kolonie s hladkými sektory podporují tuto myšlenku. Nelze ale vyloučit ani možnost, že se každá vysetá buňka „sama rozhodne“ o morfologii kolonie, kterou vytvoří (Kuthan *et al.*, 2003).

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Použité mikroorganismy

Saccharomyces cerevisiae BR-F:

MAT a/a, prototrofní, získán ze sbírky Chemického ústavu Akademie věd Slovenské republiky v Bratislavě, kat. číslo CCY 21-4-97

Saccharomyces cerevisiae BR-S:

MAT a/a, prototrofní, ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze (Kuthan *et al.*, 2003)

Saccharomyces cerevisiae BR-S^{new}:

MAT a/a, prototrofní, ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze (izoloval V. Šťovíček)

4.1.2. Kultivační média

Média byla připravována v destilované vodě vyrobené v aparatuře Rowapur (Watrex). Chemikálie jsou od firmy Lach-Ner, pokud není v závorce uvedeno jinak.

4.1.2.1. Tekutá média

YEPG: 1% kvasničný autolyzát (Imuna)

1% pepton (Imuna)

2% glukosa (sterilizována samostatně)

selekční YEPG: 1% kvasničný autolyzát (Imuna)

1% pepton (Imuna)

2% glukosa (sterilizována samostatně)

phleomycin (koncentrace 10 µg/ml)

selekční GM s galaktózou: 1% kvasničný autolyzát

1% galaktóza

1% rafinóza

phleomycin (InvivoGen) (koncentrace 10 µg/ml)

skladovací médium: 60% glycerol

10% glukosa

2% pepton (Imuna)

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

4.1.2.2. Pevná média

GM: 2% agar (Dr. Kulich Pharma)

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

3% glycerol

selekcční GM: 2% agar (Dr. Kulich Pharma)

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

3% glycerol

a přídavek potřebného antibiotika:

G418 geneticin (Duchefa Biochemie) (konc. 200 µg/ml)

nourseothricin (Werner Bioagents) (konc. 100 µg/ml)

phleomycin (InvivoGen) (konc. 10 µg/ml)

YEPG: 2% agar (Dr. Kulich Pharma)

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

1% pepton (Imuna)

2% glukosa (sterilizována samostatně)

4.1.3. Roztoky

Většina uvedených roztoků byla připravována v destilované vodě. Destilovaná H₂O byla vyrobena v aparatuře Rowapur (Watrex). Demi-H₂O je destilovaná voda deionizovaná v aparatuře Ultrapur (Watrex). Většina chemikálií je od firmy Lach-Ner, jiný výrobce je uveden v závorce.

4.1.3.1. Jednoduché roztoky

1% agarosový gel: 200 mg agarosy (Serva) rozvařit v 20 ml 0,5x TBE pufru (viz složené roztoky)

1000x EtBr: 10 mg ethidium bromidu (Sigma-Aldrich)/1 ml H₂O

0,5M EDTA-NaOH: 18,6 g Na₃EDTA (Serva)/100 ml H₂O, pH upravit 1M NaOH na 8,0

1M Tris-HCl: 12,1 g Tris báze (Serva)/100 ml H₂O, pH upravit podle potřeby

3M octan sodný: 40,8 g NaAc/100 ml H₂O

1M NaOH: 4 g NaOH/100 ml H₂O

3M NaCl: 17,5 g NaCl/100 ml H₂O

10% SDS: 10 g SDS (Sigma-Aldrich)/100 ml H₂O

10% (w/v) persíran amonný: 10 mg APS (Serva)/90 µl H₂O

7,5M octan amonný: 57,7 g CH₃COONH₄/100 ml H₂O

1M octan litný: 10,2 g CH₃COOLi/100 ml H₂O

50% (w/v) PEG 3500: 50g PEG (Sigma-Aldrich)/50 ml, po sterilizaci
doplněno na celkový objem 100ml

4.1.3.2. Složené roztoky

0,5x TBE pufr: 20mM Tris

1mM EDTA

45 mM kyselina boritá

BFM: 50% glycerol

0,13M EDTA-NaOH (pH 8,0)

0,12% bromfenolová modř

mix I: 50 µl 1 M Tris pH 8

20 µl 0,5 M EDTA pH 8

3 µl merkaptoethanol

1 mg zymolyáza

1 ml destilované H₂O

mix II: 2% Triton 100X

1% SDS

100 mM NaCl

10 mM Tris pH 8

1mM EDTA

upravený fenol: fenol několikrát protřepat s 1M Tris-HCl (pH 8) a jednou
s 0,1 M Tris-HCl (pH 8), pak uskladnit při -20°C

upravený chloroform: 24 dílů chloroformu

1 díl isoamylalkoholu

TE pufr: 10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8

všechny následující roztoky byly připravovány v demi H₂O

30 % akrylamid mix: 29% (w/v) akrylamid (Sigma-Aldrich)

1% (w/v) N,N'-metylen-bis-acrylamid (Sigma-Aldrich)

separační pufr pH 8,8: 1,5M Tris

0,4% SDS

upravit pH na 8,8

7,5% separační gel (na 4 gely): 5 ml 30% akrylamidového mixu
5 ml separačního pufru
10 ml H₂O
120 μl persíranu amonného (10%)
20 μl tetramethyl-elthylen diaminu (TEMED,
Serva)

zaostřovací pufr pH 6,8: 0,5M Tris
0,4% SDS
upravit pH na 6,8

4% zaostřovací gel (na 4 gely): 1,3 ml 30% akrylamidového mixu
2,5 ml zaostřovacího pufru
6,1 ml H₂O
60 μl persíranu amonného (10%)
20 μl TEMEDu

elektrodový pufr: 0,05M Tris, pH 8,3
0,384M glycin (Sigma-Aldrich)
0,1% SDS

denaturační pufr: 312mM Tris pH 6,8
50% glycerol
0,02 % BFM
10% SDS

roztok inhibitorů proteáz: 1880 μl 10mM MES pH 6
80 μl PIC (Sigma-Aldrich)
40 μl 25mM AEBSF (Sigma-Aldrich)

fixační roztok I: 40% ethanol
10% kyselina octová

fixační roztok II: 0,83M octan sodný
8,3mM K₂S₄O₆
0,5% glutaraldehyd (50%)
30% ethanol

AgNO₃ barvicí roztok: 12mM AgNO₃
0,0025 % formaldehyd

vyvíjecí roztok: 0,22M K₂CO₃

47μM Na₂S₂O₃

0,0015% formaldehyd

transformační směs: 240 μl 50% (w/v) PEG 3500

36 μl 1M LiAc

50 μl ssDNA salmon sperm (Invitrogen) (konc. 2 μg/μl)

30 μl transformační kazety (produkt PCR)

4.1.4. Materiál pro práci s DNA a proteiny

PPP Master Mix: 150mM Tris pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄; 0,02% Tween;

20,5mM MgCl₂ 400mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 100 U/ml Taq purple

DNA polymeráza, stabilizátory, barviva (Top-Bio)

standardy molekulových hmotností pro DNA elektroforézu:

Gene Ruler DNA ladder (Fermentas)

1 kb DNA Ladder (Sigma-Aldrich)

vzorková barva pro elektroforézu: 6x Loading dye (Fermentas)

standard molekulových hmotností pro proteiny:

Kaleidoscope Precision Plus Protein Standard (10 – 250 kD, Bio-Rad)

4.1.5. Použité primery

Metodika značení: GENpoužitíSMĚR

GEN = zkratka názvu genu

použití: gfp = primer pro fúzi s kódující sekvencí genu pro GFP

del = primer pro přípravu deleční kazety

ver = primer pro ověření úspěšnosti delece

SMĚR: FW = přímý primer z promotorové oblasti genu

RV = reverzní primer z kódující sekvence genu, tedy z oblasti mezi start a stop kodónem

FWmiddle = přímý primer z kódující sekvence genu, tedy z oblasti mezi start a stop kodónem

RVutr = reverzní primer z 3' netranslatované oblasti genu

	primer	sekvence	použití
značení GFP	BNA1gfpFW	5' TGTTTCCATTGCAAGACGTTAAA CTACGCACGCCCTCAATCTAAT GGTGACGGTGCTGGTTTA 3'	přímý primer pro značení proteinu Bna1p pomocí GFP
	BNA1gfpRV	5' GTAACAAGAGAGCTATAAAAG TACAATAACAACCTTTCTAATAC TCGATGAATTCAGCTCG 3'	reverzní primer pro značení proteinu Bna1p pomocí GFP
	CWP1gfpFW	5' TCTGTCGCTTTATTCGCCTTGG CTAAGATGGTCATTGCCGATTCC TGCAGGTCGACAACCCTTAAT 3'	přímý primer pro značení proteinu Cwp1p pomocí GFP
	CWP1gfpRV	5' TCTGTCGCTTTATTCGCCTTGG CTAAGATGGTCATTGCCGATTCC CTGCAGGTCGACAACCCTTAAT 3'	reverzní primer pro značení proteinu Cwp1p pomocí GFP
deleční kazety	BNA1delFW	5' ACAAGTAACTGAAATAGCATA ATTTACCAAAAAATCGAAAAA CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>BNA1</i>
	BNA1delRV	5' GTAACAAGAGAGCTATAAAAGT ACAATAACAACCTTTCTAATACG CATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>BNA1</i>
	BNA2delFW	5' TTTAGCATATATAAAGCGAAAAT AAAAGAAAGAGTCAACGCCGAT CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>BNA2</i>
	BNA2delRV	5' TCAATTTTATCTTCATTTTAAAT GTCCGCAGTGCGACAGTCTCG CATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>BNA2</i>
	BNA3delFW	5' CAATTTACTATAATTGCGTATAG AATCCATTGTTACTTGTCTCA CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>BNA3</i>
	BNA3delRV	5' TTATAAGTAGTCCTTGAGTAGTT TTAATCTCTCTACGGCATTTC GCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>BNA3</i>
	HST1delFW	5' CACTATTGCTATGTTGTGATAA CCCTCTTGGTAGTGATACGAAC CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>HST1</i>
	HST1delRV	5' TTAGTGTGTTTCTTTTCGTGGCT GTTTCTTAATCTTATACGTACC GCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>HST1</i>
	SET3delFW	5' TACAACAGTTTTAGATCGTACTT CACAAAATACGAGAAGTGAATC CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>SET3</i>
	SET3delRV	5' GAATATACTTAAGTTTATATAGG TGTAAGAAGGAAATGTCCATGTG CATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>SET3</i>
	SIR2delFW	5' AGACACATTCAAACCATTTTTCC CTCATCGGCACATTAAGCTGG CAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'	přímý primer pro deleci genu <i>SIR2</i>
	SIR2delRV	5' ATGATATTAATTTGGCACTTTT AAATTATTAATTTGCCTTCTACG CATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'	reverzní primer pro deleci genu <i>SIR2</i>

ověření úspěšnosti transformace	BNA1verFW	5' CTGACACCTGTACTCCTGAA 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>BNA1</i>
	BNA1verRV	5' CAATACCCACAGTATCAGCA 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>BNA1</i>
	BNA2verFW	5' CGTCGTAAACTGCCTTAACC 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>BNA2</i>
	BNA2verRV	5' AACGAGGAGTACGTAGCTAA 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>BNA2</i>
	BNA3verFW	5' TTAGCAAGTGCCTGGTAGTG 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>BNA3</i>
	BNA3verRV	5' CCGCAAAGTTCGATATTTGG 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>BNA3</i>
	CWP1verFW	5' TAACTTACTCCAGGAGAGCC 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>CWP1</i>
	CWP1verRV	5' GGAAGTTTCCACAGTAGTAG 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>CWP1</i>
	HST1verFW	5' AACTTAGAGAACACCAGCGC 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>HST1</i>
	HST1verRV	5' TTGACGTCGAATCCCAGCAA 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>HST1</i>
	SET3verFW	5' CCGTTGGAAGTGATCGTTGT 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>SET3</i>
	SET3verRV	5' TCAGGTGCCATCCCAATATC 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>SET3</i>
	SIR2verFW	5' GTATATGCTTATATGCATGCG 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>
	SIR2verRV	5' ATTGACACTACTGAAGCTGC 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>
	SIR2verFWnew	5' ATCTAGCACTCCTTCCAACC 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>
	SIR2verRVnew	5' TTCGAGCATTGAGAGACTCT 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>
	SIR2verFWmiddle	5' CCAGATATCACATTCTTTGGC 3'	přímý primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>

SIR2verRVutr	5' TGAGATTCTGAGGCTATAACC 3'	reverzní primer pro ověření delece genu <i>SIR2</i>
kanMXverRV	5' CGTGAGTCTTTTCCTTACCC 3'	reverzní primer pro ověření vložení genu pro rezistenci na geneticin
NATverRV	5' GAGTACGAGATGACCACGAA 3'	reverzní primer pro ověření vložení genu pro rezistenci na nourseothricin
yEGFPverFW	5' TTGGTGATGGACCAGTCTTG 3'	přímý primer pro ověření vložení genu pro GFP

Tabulka 1 Seznam použitých primerů

4.1.6. Použité plasmidy

plasmid	použití	marker	reference
pAG25	delece pomocí holomogní rekombinace	rezistence na nourseothricin	Gueldener <i>et al.</i> , 2002
pKT127	fúze genu pro GFP	rezistence na G418 (geneticin)	Mark & Thorn, 2004
pOM40	fúze genu pro GFP	rezistence na G418 (geneticin)	Gauss <i>et al.</i> , 2005
pSH65	odstranění markeru pomocí Cre rekombinázy	rezistence na phleomycin	Garí <i>et al.</i> , 1997
pUG6	delece pomocí holomogní rekombinace	rezistence na G418 (geneticin)	Gueldener <i>et al.</i> , 2002

Tabulka 2 Seznam použitých plasmidů

4.1.7. Přístroje

Aparatura pro vertikální elektroforézu (BioRad)

Aparatura pro horizontální elektroforézu (Thermo Scientific)

Centrifugy: Centrifuga Hettich (výměnný rotor Hettich 1617 pro 8x50 centrifugačních zkumavek, max. 5000 ot./min; výměnný rotor Hettich 1653 pro 30 mikrozukumavek, max. 13000 ot./min)

Mikrocentrifuga Hettich (rotor Hettich 2073 pro 24 mikrozukumavek, max. 13000 ot./min)

Mikrocentrifuga Labnet (rotor Labnet pro 24 mikrozukumavek, max. 13300 ot./min)

Elektroforéza-zdroj (E-C apparatus corporation)

Fluorescenční mikroskop Leica DMR (objektivy 10x, 20x, 40x, imerzní objektivy 100x; Nomarského kontrast, GFP filtr BP 470/40)
Kamera barevná (Jenoptik ProgRes CT3), objektivy Navitar, Cosmimar
Kamera monochromatická (Jenoptik ProgRes MT^{cool})
Osvětlovací systémy (Leica CLS 150X, Kaiser)
PCR cyklér (XP Cyclor Bioer)
pH metr (Hamilton)
Sonikátor (Ultrasonic Compact Cleaner PSO 2000A NOTUS-POWERSONIC)
Spektrofotometr (NanoDrop 1000, Thermo Scientific)
Třepačky (Labnet, Lab-Therm)
Termostaty (Laboratorní přístroje Praha)
UV transiluminátor (Ultra-Lum)
Vakuová sušička s centrifugou (Speed Vac Plus SC110A Savant, Refrigerated Condensation Trap RT 100 Savant, Membrane-vacupump Vacubrand GMBH)
Vodní lázeň (Grant instruments)
Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

4.1.8. Počítačové programy a databáze

programy pro práci s DNA sekvencemi

Sequence Manipulation Suite

<http://www.bioinformatics.org/sms2/>

MBCF Oligo Calculator

<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligoalc.html>

NCBI Blast

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

software pro analýzu kolonií na miskách

Colony Counter (Schier & Kovář, 2011)

software pro analýzu obrazu

NIS-Elements AR 3.0 (Laboratory Imaging)

databáze

Saccharomyces Genome Database (SGD)

<http://www.yeastgenome.org/>
přehled informací o genech

Pubmed Medline

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

odborné články

Yeast proteome database (YPD)

<https://portal.biobase-international.com/>

přehled informací o proteinech

4.2. Metody

4.2.1. Sterilizace

Roztoky, párátko, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky jsem sterilizovala v autoklávu při tlaku 120 kPa po dobu 20 minut, umělohmotné centrifugační zkušavky po dobu 24 hodin parami kyseliny peroctové v uzavřeném igelitovém sáčku. Chemické sklo jsem sterilizovala suchým teplem při teplotě 160°C, drobné předměty (mikrobiologická klíčka) pak žiháním v plameni nebo namočením v ethanolu a následným zapálením.

4.2.2. Uchovávání zásobních kultur

Kvasinkové kultury jsem uchovávala v mikrozkušavkách ve skladovacím médiu při teplotě -80°C, krátkodobě na Petriho miskách s YEPG (2% glukosa) médiem obalených parafilmem v lednici.

4.2.3. Kultivace

Kultury kvasinek jsem kultivovala v tekutých médiích aerobně v Erlenmayerových baňkách, na pevných médiích v termostatu při teplotě 28°C na Petriho miskách.

4.2.4. Stanovení počtu buněk

Počet buněk jsem stanovovala pomocí Thomovy počítací komůrky v mikroskopu s objektivem 10x.

4.2.5. Izolace chromozomální DNA z kvasinek zymolýzou

Kvasinkové buňky jsem nechala narůst přes noc v tekutém médiu při 28°C. 2 ml suspenze jsem zcentrifugovala (2 min, 13000 ot./min, 4°C), a po odebrání vodné fáze resuspendovala ve 150 µl roztoku mix I. Směs jsem nechala 1 hod inkubovat v 37°C.

Poté jsem přidala 20 μ l 10% SDS a 100 μ l 7,5M octanu amonného. Na 15 min jsem vzorky uložila do -80°C , poté jsem je centrifugovala (15 min, 13000 ot./min, 4°C), supernatant přenesla do mikrozkušavky, přidala 0,01 objemu RNázy (koncentrace 1 mg/ml) a inkubovala 30 min ve 37°C .

Poté jsem přidala 300 μ l fenolu (Sigma-Aldrich, pH 8,0), důkladně promíchala a následně centrifugovala 15 min při 13000 ot./min. Tento čistící krok jsem zopakovala ještě jednou.

K supernatanu jsem přidala 300 μ l chloroformu (Sigma-Aldrich), promíchala na vortexu a centrifugovala 5 min při 13000 ot./min. K supernatantu jsem přidala 0,6 objemu isopropanolu a na 15 min uložila do -80°C .

Poté jsem vzorky centrifugovala 5 min při 13000 ot./min, slila jsem vodnou fázi a k peletu přidala 500 μ l 80% ethanolu a uložila minimálně na 1 hodinu (nejlépe přes noc) do -80°C .

Poté jsem odlila ethanol, vzorky nechala oschnout při laboratorní teplotě a nakonec rozpustila v destilované vodě.

4.2.6. Izolace chromozomální DNA z kvasinek skleněnými kuličkami

Kvasinkové buňky jsem nechala narůst přes noc v tekutém médiu při 28°C . 10 ml suspenze jsem zcentrifugovala (3 min, 5000 ot./min, 4°C), a po odebrání vodné fáze resuspendovala v 1 ml destilované vody a znovu centrifugovala.

Po odebrání vodné fáze jsem biomasu resuspendovala v 200 μ l roztoku mix II, přidala 100 μ l fenolu (Sigma-Aldrich, pH 8,0), 100 μ l chloroformu (Sigma-Aldrich) a asi 200 μ l skleněných kuliček. Směs jsem nejméně 5 minut promíchávala.

Poté jsem přidala 200 μ l TE pufru a vzorky zcentrifugovala (5 min, 13000 ot./min, 4°C). Supernatant jsem přenesla do mikrozkušavky, přidala 1 ml 96% ethanolu, znovu zcentrifugovala (5 min, 13000 ot./min, 4°C) a poté slila supernatant.

Pelet jsem resuspendovala ve 400 μ l TE pufru, přidala 4 μ l RNázy (1 mg/ml) a inkubovala 30 min při laboratorní teplotě.

Poté jsem přidala 2,5 objemu ethanolu podchlazeného na -20°C a 0,1 objemu 3M octanu sodného a nejméně na 1 hod umístila do -80°C .

Následně jsem vzorky centrifugovala 15 min při 13000 ot./min a 4°C, slila supernatant, pelet nechala nejméně 10 min osušit při laboratorní teplotě a nakonec ho resuspendovala v demi-H₂O.

4.2.7. Stanovení koncentrace DNA

Ke stanovení koncentrace jsem využívala spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), který umožňuje měření vzorků v objemech 0,5 – 2 µl bez nadbytečného ředění (změří až 50 x vyšší koncentraci než běžný kyvetový spektrofotometr). Nanášela jsem tedy vzorky o objemu 1 µl na podstavec, kde je umístěn konec kabelu optického vlákna, a přitiskla konec druhého optického vlákna. Vzorek byl osvícen pulzní xenonovou lampou a analyzován pomocí počítačového softwaru. Měření absorbance probíhalo při 280 nm. Kvalita naizolované DNA byla ověřena s využitím poměru absorbancí 260 : 280 a 260 : 230.

4.2.8. Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu

Rozehrátím agarosy ve 20 ml (příp. 50 ml nebo 80 ml) TBE pufru jsem si připravila agarosový gel. Po ochlazení na 50-60°C jsem přidala 20 µl (příp. 50 µl nebo 80 µl) roztoku EtBr a agarosu nalila do plexisklového bločku s připraveným hřebenem (cca 1cm od okraje). Po ztuhnutí gelu (cca 20 min.) jsem bloček umístila do elektroforetické vany a přelila TBE puforem tak, aby hladina sahala nad povrch gelu. Poté jsem z gelu vyjmula hřeben a do vzniklých jamek nanasla mikropipetou vzorky.

Elektroforetickou vanu jsem připojila ke zdroji stejnosměrného proudu a spád napětí nastavila na 5V/cm. Po doputování čela elektroforézy asi 1 cm od okraje jsem odpojila zdroj napětí a gel analyzovala v UV transiluminátoru.

4.2.9. Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

4.2.9.1. Transformační kazeta

Do tenkostěnných PCR mikrozkušavek jsem napipetovala následující směs:

delece nebo C-koncová fúze:	intergenová fúze:
25 μl PPP Master Mixu	10 μl Phusion Buffer
2 μl templátové DNA (100 ng/ μl)	1 μl PCR DNTP mix
0,5 μl 10 pmol/ μl přímého primeru	0,5 μl Phusion DNA polymerase
0,5 μl 10 pmol/ μl reverzního primeru	2 μl templátové DNA (100 ng/ μl)
22 μl PCR H ₂ O	5 μl 10 pmol/ μl přímého primeru
	5 μl 10 pmol/ μl reverzního primeru
	26,5 μl PCR H ₂ O

Směs jsem promíchala, krátce zcentrifugovala, vložila do PCR cykléru a navolila následující program:

1. 94°C (start reakce)	5 min	
2. 94°C (denaturace dsDNA)	1 min	← 35x
3. 54°C (připojení primerů)	45 s	
4. 72°C (extenze)	2 min 30 s	
5. 72°C (dosyntetizování)	15 min	
6. 4°C (ukončení reakce)	∞	

4.2.9.2. Pro ověření úspěšnosti transformace

Do tenkostěnných PCR mikrozkušavek jsem pro napipetovala následující směs:

- 5 μl PPP Master Mixu
- 1 μl 100 pmol/ μl přímého primeru
- 1 μl 100 pmol/ μl reverzního primeru
- 2 μl PCR H₂O
- 1 μl DNA (viz níže)

DNA jsem získala dvěma způsoby:

1) rychlou extrakcí z buněčné biomasy, kdy jsem malé množství biomasy (zhruba 10⁹ buněk) kultivované 1 den na pevném YEPG médiu přenesla do 20 μl 20mM NaOH, denaturovala 15 min v 95°C, krátce centrifugovala a použila 1 μl vzniklého lyzátu.

2) izolací chromozomální DNA zymolyázovou (kapitola 4.2.5), nebo kuličkovou (kapitola 4.2.6) metodou, pak jsem použila DNA v koncentraci 50 – 150 ng/μl.

Směs jsem promíchala, krátce zcentrifugovala, vložila do PCR cykléru a navolila následující program:

1. 95°C (start reakce)	5 min	
2. 95°C (denaturace dsDNA)	1 min	← 35x
3. 50°C (připojení primerů)	45 s	
4. 72°C (extenze)	1 min	
5. 72°C (dosyntetizování)	12 min	
6. 4°C (ukončení reakce)	∞	

4.2.10. Transformace kvasinkových buněk

4.2.10.1. Delece genu nebo genová fúze

K transformaci dochází na základě homologní rekombinace, kdy se díky krátkým komplementárním úsekům zamění část genomu transformovaného kmene za transformační kazetu (kapitola 4.2.9.1) obsahující selekční marker a dvě *loxP* místa. Dojde tak k deleci konkrétního genu.

Druhou možností transformace je genová fúze, kdy je transformační kazeta vložena na konkrétní místo v genomu, většinou na 3'-konec genu zájmu. Protein tak může být například označen pomocí GFP. Zároveň je do genomu zařazen i selekční marker (Gueldener *et al.*, 2002).

(Gietz & Woods, 2002)

Do tekutého YEPG média jsem zaočkovala biomasu kultivovanou 1 den při 28°C na pevném YEPG médiu a nechala kultivovat při 28°C přes noc. Pomocí Thomovy komůrky jsem spočítala buňky, v tekutém YEPG médiu naředila inokulum na výslednou koncentraci 5×10^6 buněk/ml do celkového objemu 50 ml a asi dvě generační doby (4 hodiny) kultivovala při 28°C.

Buňky jsem opět počítala pomocí Thomovy komůrky a po dosažení koncentrace alespoň 2×10^7 buněk/ml jsem celý objem zcentrifugovala (5 min, 5000 ot./min). Buňky jsem promyla ve 25 ml sterilní H₂O (centrifugace 5 min, 5000 ot./min) a následně v 1 ml sterilní H₂O (centrifugace 1 min, 13000 ot./min).

Pelet jsem resuspendovala ve sterilní H₂O tak, aby výsledná koncentrace byla 2 x 10⁹ buněk/ml. Z buněčné suspenze jsem odebrala 2 x 10⁸ buněk, 1 min centrifugovala při 13000 ot./min, odebrala vodnou fázi a resuspendovala v 356 µl transformační směsi. Jako ssDNA jsem použila salmon sperm DNA, kterou jsem před přidáním asi 2 minuty povařila, a poté ponechala v ledové lázni. Suspenzi buněk jsem inkubovala 40 min ve vodní lázni při 42°C.

Po inkubaci jsem buňky zcentrifugovala (1 min, 13000 ot./min), resuspendovala v 1 ml YEFG média a kultivovala 2 hod při 28°C. Po kultivaci jsem vzorky znovu zcentrifugovala (1 min, 13000 ot./min), resuspendovala ve 300 µl sterilní H₂O a po 100 µl vysela na misky se selekčním GM médiem s příslušným antibiotikem.

Biomasu jsem kultivovala 3 – 4 dny a poté jednotlivé kolonie přenesla na čerstvé selekční GM médium.

Pro ověření úspěšnosti transformace (kapitola 4.2.11) jsem biomasu po 1 dni kultivace na selekčním GM přenesla na pevné YEFG médium.

4.2.10.2. Intergenová fúze

Některé proteiny mají na svém C-konci glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvu, proto není možné připojit GFP protein právě sem a často ani na N-konec, kde je zařazen signální peptid, který je z proteinu po opuštění endoplazmatického retikula odštěpen. Řešením pro značení takových proteinů je intergenová fúze, kdy se transformační kazeta vloží za sekvenci pro signální peptid. Sekvence pro selekční marker je velmi dlouhá, proto je nutné ji z genu odstranit. K tomu se při další transformaci využívá Cre rekombináza, místně specifická rekombináza, která je schopna odstranit určitou sekvenci pokud je tato sekvence ohraničena *lox-P* místy. Gen pro Cre rekombinázu je obsažen v expresních plasmidech pod kontrolou silného indukovatelného promotoru *GAL1* (Gueldener *et al.*, 2002).

První transformace probíhá stejně jako při delecí nebo genové fúzi. Následuje druhá transformace:

Do tekutého YEFG média jsem zaočkovala biomasu kultivovanou 1 den při 28°C na pevném YEFG médiu a nechala kultivovat při 28°C přes noc.

Pomocí Thomovy komůrky jsem spočítala buňky, v tekutém YEFG médiu naředila inokulum na výslednou koncentraci 5×10^6 buněk/ml do celkového objemu 50 ml a asi dvě generační doby (4 hodiny) kultivovala při 28°C.

Buňky jsem opět počítala pomocí Thomovy komůrky a po dosažení koncentrace alespoň 2×10^7 buněk/ml jsem celý objem zcentrifugovala (5 min, 5000 ot./min). Buňky jsem promyla ve 25 ml sterilní H₂O (centrifugace 5 min, 5000 ot./min), a následně v 1 ml sterilní H₂O (centrifugace 1 min, 13000 ot./min).

Pelet jsem resuspendovala ve sterilní H₂O tak, aby výsledná koncentrace byla 2×10^9 buněk/ml. Z buněčné suspenze jsem odebrala 2×10^8 buněk, 1 min centrifugovala při 13000 ot./min, odebrala vodnou fázi a resuspendovala v 356 µl transformační směsi, kde byl místo transformační kazety použit plasmid pSH65 (koncentrace 5 µg/µl). Jako ssDNA jsem použila salmon sperm DNA, kterou jsem před přidáním asi 2 minuty povařila a poté ponechala v ledové lázni. Vzorky jsem inkubovala 40 min ve vodní lázni při 42°C.

Poté jsem je zcentrifugovala (1 min, 13000 ot./min), resuspendovala v 1 ml YEFG média a kultivovala 2 hod při 28°C. Po kultivaci jsem vzorky znovu zcentrifugovala (1 min, 13000 ot./min), resuspendovala ve 300 µl sterilní H₂O a po 100 µl vysela na misky se selekčním GM médiem s phleomycinem.

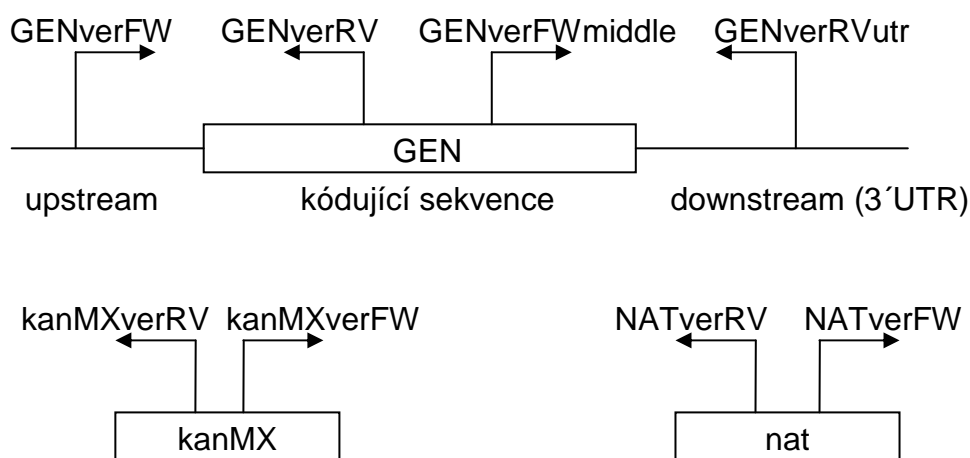
Biomasu jsem kultivovala 3 – 4 dny a poté kmen zaočkovala do selekčního YEFG média s phleomycinem. Pro aktivaci Cre rekombinázy jsem následující den 1 ml buněčné suspenze přidala do 20 ml tekutého selekčního GM média s galaktózou, 3 hodiny kultivovala a poté zcentrifugovala (5 min, 13000 ot./min). Pelet jsem resuspendovala v 1 ml sterilní vody a v několika paralelách vysela na misky s GM médiem tak, aby výsledný počet kolonií byl řádově $1 \times - 2 \times 10^2$ buněk/misku.

Po několikadenní kultivaci jsem kolonie přetiskla na selekční GM médium s geneticinem. Za kolonie s odstraněným markerem jsem považovala ty, jejichž repliky nenarostly na selekčním GM médiu.

Pro ověření úspěšnosti transformace (kapitola 4.2.11) a případné další skladování (kapitola 4.2.2) jsem biomasu po 1 dni kultivace přenesla na pevné YEFG médium.

4.2.11. Ověření úspěšnosti transformace

Pro ověření úspěšnosti transformace jsem využila amplifikaci DNA natransformovaných kmenů (kapitola 4.2.9.2) pomocí specifických primerů (obrázek 14, viz též seznam primerů v kapitole 4.1.5). Jednotlivými PCR reakcemi A, B, C, D, E a F (tabulka 3) jsem zjišťovala přítomnost či nepřítomnost vybraného genu, respektive vloženého markeru. Reakce A a D měly zajistit amplifikaci části sekvence kódující vybraný gen, reakce B a E části sekvence geneticinového markeru a reakce C a F části sekvence nourseothricinového markeru.



Obrázek 14 Schéma lokalizace primerů pro ověření úspěšnosti transformace

Konkrétní reakce probíhaly podle tabulky 3:

	primery	cíl reakce
reakce A	GENverFW + GENverRV	ověření přítomnosti genu
reakce B	GENverFW + kanMXverRV	ověření přítomnosti genu pro rezistenci na geneticin
reakce C	GENverFW + NATverRV	ověření přítomnosti genu pro rezistenci na nourseothricin
reakce D	GENverFWmiddle + GENverRVutr	ověření přítomnosti genu
reakce E	kanMXverFW + GENverRVutr	ověření přítomnosti genu pro rezistenci na geneticin
reakce F	NATverRV + GENverRVutr	ověření přítomnosti genu pro rezistenci na nourseothricin

Tabulka 3 Konkrétní reakce PCR

Vzorky z PCR reakcí jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy (kapitola 4.2.8) a gely jsem vyhodnocovala pomocí UV transiluminátoru. Přítomnosti či nepřítomnosti proužků produktů PCR reakcí by u očekávaných výsledků měly být ve shodě s tabulkami 4 a 5 (+ symbolizuje přítomnost proužku, – nepřítomnost):

primery \ kmen	delece jedné alely	bez delece
GENverFW + GENverRV	+	+
GENverFW + kanMXverRV	+	-
GENverFWmiddle + GENverRVutr	+	+
kanMXverFW + GENverRVutr	+	-

Tabulka 4 Očekávaná přítomnost proužku DNA odpovídající velikosti produktů po deleci první alely genu

primery \ kmen	delece obou alel	delece jedné alely	bez delece
GENverFW + GENverRV	-	+	+
GENverFW + kanMXverRV	+	+	-
GENver FW + NATverRV	+	-	-
GENverFWmiddle + GENverRVutr	-	+	+
kanMXverFW + GENverRVutr	+	+	-
NATverRV + GENverRVutr	+	-	-

Tabulka 5 Očekávaná přítomnost proužku DNA odpovídající velikosti produktů po deleci druhé alely

4.2.12. Stanovení počtu kolonií na misce

Petriho misky s koloniemi rostoucími na GM médiu jsem vyfotila pomocí kamery a počet kolonií následně analyzovala pomocí programu Colony Counter.

4.2.13. Určení stability fenotypu

Biomasu po jednodenní kultivaci na YEPG médiu jsem resuspendovala ve sterilní H₂O vysela na 3 misky s GM médiem tak, abych dosáhla koncentrace řádově $1 \times - 2 \times 10^2$ buněk/misku. Po 10 dnech kultivace jsem náhodně vybrala 8 kolonií a znovu každou vysela na 5 misek ve výše zmíněné koncentraci. Narostlé kolonie jsem spočítala pomocí programu Colony Counter a určila relativní četnost kolonií se změněnou morfologií. Po 10 dnech kultivace jsem opět náhodně vybrala pět kolonií s nezměněnou morfologií a znovu každou vysela na 5 misek ve výše zmíněné koncentraci. Narostlé kolonie jsem opět spočítala a určila relativní četnost kolonií se změněnou morfologií.

4.2.14. Extrakce extracelulárních proteinů z kolonií

(Kuthan *et al.*, 2003)

Biomasu kolonií rostoucích na pevném GM médiu jsem odebrala párátkem a přenesla do mikrozkušavky. Obsah jsem řádně promíchala párátkem a poté centrifugovala 15 minut při teplotě 4°C a 5500 ot./min. Supernatant jsem opatrně odebrala a uložila v mikrozkušavce do -20°C.

4.2.15. Stanovení mokré a suché hmotnosti kvasinkové kolonie

Biomasu kolonií rostoucích na pevném GM médiu jsem odebrala párátkem a přenesla do předvážené mikrozkušavky. Každý vzorek jsem zvážila a netto mokrou hmotnost vydělila počtem kolonií, které jsem do vzorku odebrala. Poté jsem obsah řádně promíchala párátkem a vzorky centrifugovala 15 minut při teplotě 4°C a 5500 ot./min. Odebrala jsem supernatant a vzorky několik hodin sušila ve vakuové sušičce s centrifugou. Vzorky jsem opět zvážila a netto suchou hmotnost vydělila počtem kolonií, které jsem do vzorku odebrala.

4.2.16. Srážení proteinů

(Wessel & Fluge, 1984)

K proteinovým extraktům jsem postupně přidávala: 4 objemy methanolu, řádně promíchala a centrifugovala (13000 ot./min., 2 min), 1 objem chloroformu (promíchala, centrifugovala) a 2 objemy demi H₂O. Vzorky jsem centrifugovala 10 minut (do úplného oddělení fází).

Posléze jsem odebrala vodnou fázi, přidala 2 objemy methanolu, promíchala a 10 minut centrifugovala. Odpipetovala jsem vodnou fázi a řádně vysušené vzorky jsem resuspendovala v roztoku denaturačního pufru a roztoku inhibitorů proteáz v poměru 1:3. Poté jsem je několik minut promíchávala a následně umístila na 5 minut do sonikátoru. Tento krok jsem čtyřikrát zopakovala. Nakonec jsem vzorky přes noc umístila do -20°C.

4.2.17. Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Řádně umytá a odmaštěná skla jsem zafixovala v upínači skel a umístila do nalévacího stojánku. Asi 1,5 cm pod okraj nižšího skla (objem zhruba 5 ml) jsem nanesla roztok separačního gelu (polymerační složky persíran

a TEMED jsem přidala až těsně před nanášením) a převrstvila isopropanolem (150 – 200 µl).

Po ztuhnutí gelu (cca 30 min.) jsem odsála isopropanol a nanasla roztok zaostřovacího gelu, do kterého jsem ihned zasunula hřeben. Po zpolymerování gelu jsem hřeben vyjmula, upínač skel umístila do elektroforetické aparatury a přelila elektrodoým pufrem. Do vypláchnutých jamek jsem nanášela vzorky smíchané s denaturačním pufrem a roztokem proteáz a řádně promíchané.

Aparaturu jsem připojila ke zdroji stejnosměrného proudu a spád napětí nastavila na 10V/cm, proud pak na 70mA. Po doputování čela na konec gelu (asi 70 minut), jsem elektroforézu ukončila.

4.2.18. Barvení proteinů stříbrem

4.2.18.1. metoda I

(Rabilloud, 1992)

Polyakrylamidový gel jsem při mírném třepání inkubovala 1 hodinu ve fixačním roztoku I. Pak jsem fixační roztok I odsála a gel inkubovala přes noc ve fixačním roztoku II. Poté jsem gel promývala 4 x 15 min demi H₂O.

Barvení proběhlo v AgNO₃ barvicím roztoku po dobu 30 min. Po opláchnutí demi vodou, jsem gel na 5 – 8 min přemístila do vyvíjecího roztoku. K zastavení vyvíjení jsem použila 1% kyselinu octovou (asi 10 min) a následně gel opláchla vodou.

4.2.18.2. metoda II

ProteoSolver™ Plus Silver train Kit

Polyakrylamidový gel jsem při mírném třepání inkubovala přes noc ve fixačním roztoku I. Poté jsem roztok odsála a gel 10 min proplachovala ve 30% ethanolu a následně 10 min v demi H₂O. Poté jsem gel inkubovala 10 min v senzibilizačním roztoku (1% roztok ProteoSilver Sensitizer) a následně proplachovala 2 x 10 min v demi H₂O.

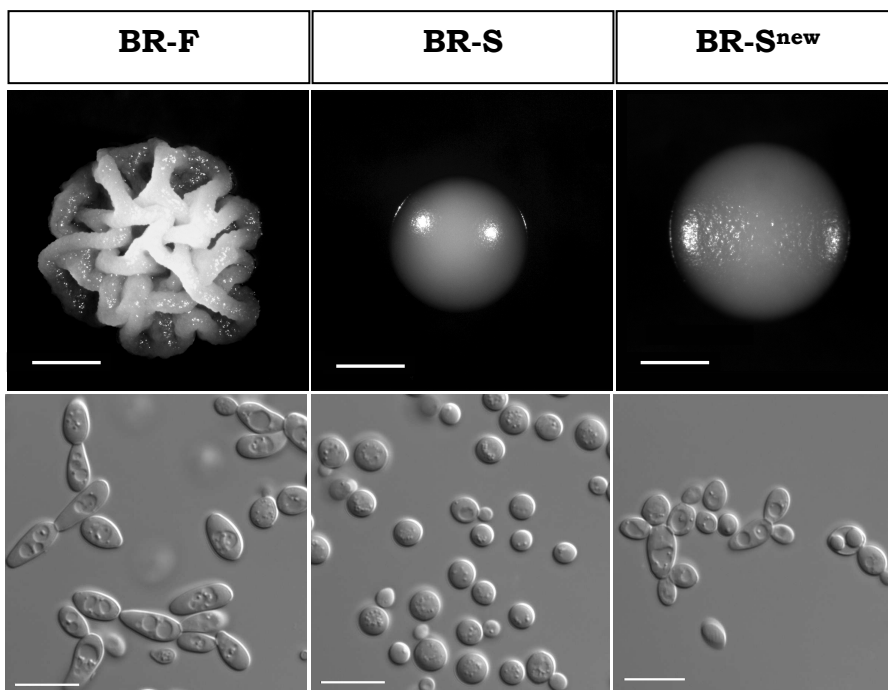
Barvení proběhlo v 1% roztoku ProteoSilver Silver Solution po dobu 10 minut. Po opláchnutí demi vodou, jsem gel přemístila do vyvíjecího roztoku (5% roztok ProteoSilver Developer 1 a 0,1% roztok ProteoSilver Developer 2) na 5 – 8 min. K zastavení vyvíjení jsem použila ProteoSilver Stop Solution (inkubace 5 min) a následně gel 15 min oplachovala demi H₂O.

5. Výsledky

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem třech izogenních divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* BR-F, BR-S a BR-S^{new}. Navzdory stejnému genetickému pozadí se však jejich fenotypové charakteristiky zásadně liší. Kmen BR-F tvoří strukturované kolonie a při kultivaci v laboratorních podmínkách dochází s relativně vysokou frekvencí ke změně fenotypu části populace buněk a vzniku kmene BR-S, který tvoří kolonie hladké (Kuthan *et al.*, 2003). Kmen BR-S^{new} byl izolován z kmene BR-F v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií v průběhu mého studia, a, byť tvoří rovněž hladké kolonie, od původního kmene BR-S se řadou dalších vlastností liší. Mým prvním cílem bylo porovnat vlastnosti výše uvedených divokých kmenů. Sledovala jsem morfologii kolonie, tvar buněk (kulaté, oválné, protáhlé), tvorbu pseudohyf a buněčných shluků, přítomnost specifického proteinu s vysokou molekulární hmotností (HMWGP) (kapitola 4.2.14) a mokrou a suchou hmotnost kolonie (kapitola 4.2.15). Shrnující srovnání vlastností analyzovaných kmenů je uvedeno v tabulce 6 a na obrázku 15:

charakteristika \ kmen	BR-F	BR-S	BR-S^{new}
morfologie kolonie	strukturovaná	hladká	hladká
tvar buněk	protáhlé i kulaté	kulaté	protáhlé i kulaté
tvorba pseudohyf	ano	ne	ne
tvorba shluků	ano	ne	ano
tvorba HMWGP	ano	ne	ano
mokrý hmotnost na kolonii (5. den kultivace)	1.717 mg	0.086 mg	0.459 mg
suchá hmotnosti na kolonii (5. den kultivace)	14,6 %	24,6 %	20,9 %

Tabulka 6 Fenotypové charakteristiky kmenů BR-F, BR-S a BR-S^{new}



Obrázek 15 Morfologie kolonií a tvar buněk divokých kmenů (5. den kultivace na GM médiu, horní měřítko představuje 1 mm, dolní měřítko představuje 10 μ m)

Na základě srovnávání transkriptomů kolonií kmenů BR-F, BR-S a BR-RF (kmen tvořící strukturované kolonie odvozený od kmene BR-S po kultivaci v nepříznivých stresových podmínkách) bylo vybráno několik genů, jejichž exprese by mohla souviset s tvorbou strukturované kolonie (Šťovíček, 2012). Proto jsem se v mé práci zaměřila na studium některých z těchto genů a to následujících: *BNA1*, *BNA2*, *BNA3*, *CWP1*, *HST1*, *SET3* a *SIR2*.

BNA1 a *BNA2* (Biosynthesis of Nicotinic Acid) jsou geny, jejichž produkty se účastní de novo syntézy NAD^+ z tryptofanu kynureninovou cestou. Jejich exprese je regulována NAD^+ -závislou histonovou deacetylázou Hst1p a jejich produkt je lokalizován v cytoplazmě. Produkt genu *BNA3* katalizuje vznik kyseliny kynurenové z kynureninu při de novo syntéze NAD^+ , je lokalizován v cytoplazmě a také v mitochondriích (Bedalov *et al.*, 2003; Kucharczyk *et al.*, 1998; Panozzo *et al.*, 2002).

Produkt genu *CWP1* (Cell Wall Protein) je podobně jako Flo11p součástí buněčné stěny, kam je zacílen díky signálnímu peptidu na N-konci a ukotven pomocí GPI kotvy na jeho C-konci. Je lokalizován především v místech jizev po pučení (van der Vaart *et al.*, 1995).

Hst1p (*Homolog of Sir Two*), Set3p (*SET* domain-containing) a Sir2p (*Silent Information Regulator*) jsou NAD⁺-závislé histonové deacetylázy související s umlčováním a regulací exprese genů (Derbyshire *et al.*, 1996; Pijnappel *et al.*, 2001; Rine & Herskowitz, 1987).

5.1. Příprava kvasinkových kmenů s proteiny značenými pomocí GFP

5.1.1. Kmen BR-F: *CWP1*-GFP/*CWP1*

Cíl

Příprava kmene BR-F s proteinem Cwp1p značeným GFP
(BR-F: *CWP1*-GFP/*CWP1*)

Značení proteinu se většinou provádí fúzí GFP za C-konec vybraného proteinu. Protein Cwp1p má ovšem na svou C-koncovou část připojenou GPI kotvu a na svém N-konci signální peptid, který je odštěpen během úprav v endoplazmatickém retikulu. Proto je nutné pro jeho značení využít intergenovou fúzi blízko N-konce.

Podle predikce z genomové databáze *Saccharomyces cerevisiae* (www.yeastgenome.org/) je signální peptid proteinu Cwp1p dlouhý 20 aminokyselin, primery pro fúzi tedy byly navrženy tak, aby se gen pro GFP zařadil za 22 aminokyselinu od N-konce genu *CWP1* (obrázek 16).



Obrázek 16 Intergenová fúze genu pro GFP do genu pro *CWP1*

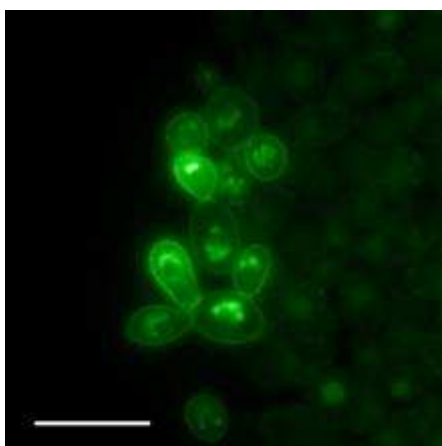
Postup

Výchozím kmenem je BR-F. Prvním krokem transformace bylo vložení genu pro GFP a selekce pomocí rezistence na geneticin. Pro přípravu transformační kazety (kapitola 4.2.9.1) jsem použila primery CWP1gfpFW a CWP1gfpRV a jako templátovou DNA plasmid pOM40 obsahující sekvenci genu pro yEGFP. Vložení jsem ověřila pomocí dvou reakcí PCR s dvojicemi primerů CWPverRV, yEGFPverFW a CWP1verFW, kanMXverRV.

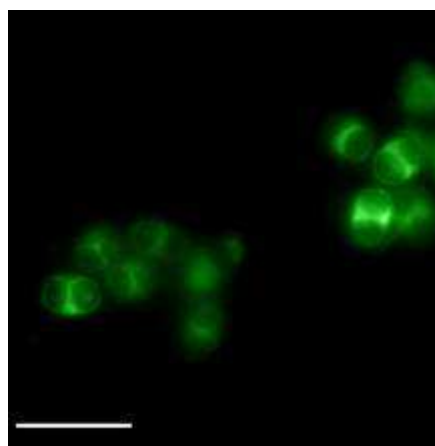
Ve druhém kroku jsem pomocí transformace plasmidem pSH65, obsahujícím Cre rekombinázu zařazenou pod kontrolu indukovatelného promotoru, vyjmula z genomu gen pro rezistenci na geneticin. Fluorescenci transformovaného kmene jsem pozorovala pod mikroskopem.

Výsledky

Fluorescence u kmene BR-F: *CWP1*-GFP/*CWP1* je jasně viditelná již v prvních dnech kultivace. Protein Cwp1p je v mladších buňkách lokalizován na jejich povrchu a také uvnitř buněk (obrázek 17), ve starších buňkách je patrný téměř výhradně na povrchu spor (obrázek 18). Dal by se proto dobře využít jako indikátor sporulace.



Obrázek 17 Lokalizace proteinu Cwp1p značeného GFP v kvasinkových buňkách (4. den kultivace na GM médiu, měřítko 10



Obrázek 18 Lokalizace proteinu Cwp1p značeného GFP v kvasinkových buňkách (10. den kultivace na GM médiu, měřítko 10

5.1.2. Kmen BR-F: *BNA1*-GFP-kanMX/*BNA1*

Cíl

Příprava kmene BR-F s proteinem Bna1p značeným GFP

(BR-F: *BNA1*-GFP-kanMX/*BNA1*)

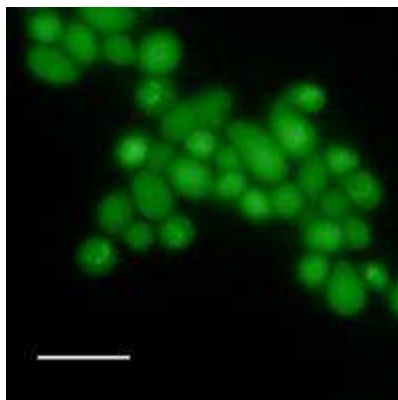
Kmen jsem připravila standardní fúzí genu pro GFP spolu s genem pro rezistenci na geneticin na C-konec genu *BNA1*.

Postup

Výchozím kmenem je BR-F. Pro přípravu transformační kazety jsem použila primery BNA1gfpFW a BNA1gfpRV a jako templátovou DNA plasmid pKT127 obsahující sekvenci genu pro yEGFP. Úspěšnost transformace jsem ověřovala mikroskopicky podle přítomnosti fluorescenčního signálu.

Výsledky

Fluorescence u kmene BR-F: *BNA1*-GFP-kanMX/*BNA1* je slabá, ale patrná. Signál je po 6 dnech kultivace kolonií na GM médiu difúzní v celé cytoplazmě (obrázek 19).

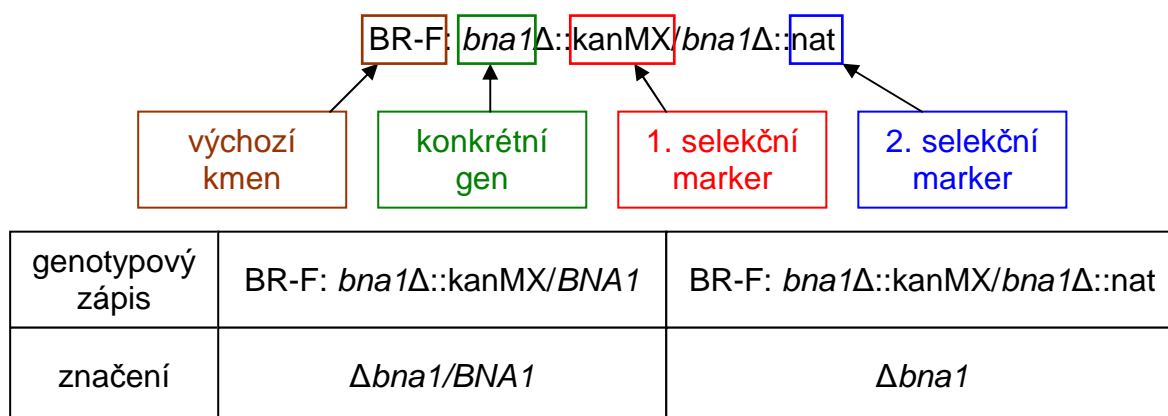


Obrázek 19 Lokalizace proteinu Bna1p značeného GFP v kvasinkových buňkách (6. den kultivace na GM médiu, měřítko 10 μ m)

5.2. Příprava delečních mutantů výchozího kmene BR-F

Vzhledem k tomu, že divoký kmen BR-F kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je diploidní, je při přípravě delečních kmenů potřeba provést transformaci dvakrát za sebou, pokaždé s jiným selekčním markerem, aby byly odstraněny obě alely genu. Používala jsem rezistenci na antibiotika geneticin a nourseothricin.

Značení kmenů v dalších částech práce je vysvětleno na příkladu mutantního kmene s úplnou delecí genu *BNA1* (obrázek 20).



Obrázek 20 Schéma značení delečních mutantů

Cíl

Příprava kmenů BR-F s delecí genu *BNA1*, *BNA2*, *BNA3*, nebo *HST1* (BR-F: *bnal1Δ::kanMX/bnal1Δ::nat*, BR-F: *bnal2Δ::kanMX/bnal2Δ::nat*, BR-F: *bnal3Δ::kanMX/bnal3Δ::nat* a BR-F: *hst1Δ::kanMX/hst1Δ::nat*)

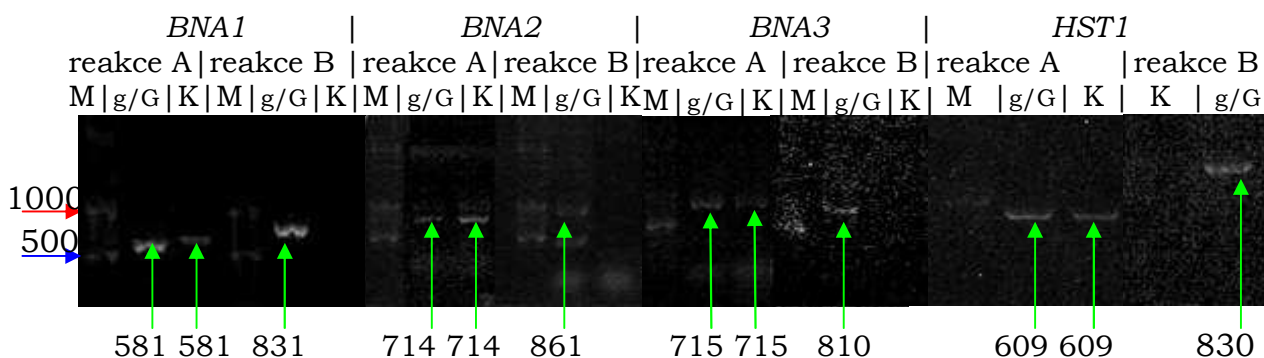
Symbol x v názvu kmene (případně primeru) zastupuje číslo příslušného *BNA* genu.

Postup

Výchozím kmenem je BR-F. Pro přípravu transformační kazety pro delecí první alely jsem použila primery *BNAxdelFW* a *BNAxdelRV*, respektive *HST1delFW* a *HST1delRV* a jako templátovou DNA plasmid pUG6 obsahující sekvenci genu pro rezistenci na geneticin. Úspěšnost transformace jsem ověřovala pomocí PCR s reakcemi A a B. U reakce A jsem očekávala produkt délky 581 bp pro gen *BNA1*, délky 714 bp pro gen *BNA2*, délky 715 bp pro gen *BNA3* a délky 609 bp pro gen *HST1*. U reakce B jsem u transformovaných kmenů očekávala produkt délky 831 bp pro gen *BNA1*, délky 861 bp pro gen *BNA2*, délky 810 bp pro gen *BNA3* a délky 830 bp pro gen *HST1*. Jako kontrolu jsem použila kmen BR-F (obrázek 21). Značení kmenů u obrázků elektroforéz je vysvětleno v tabulce 7.

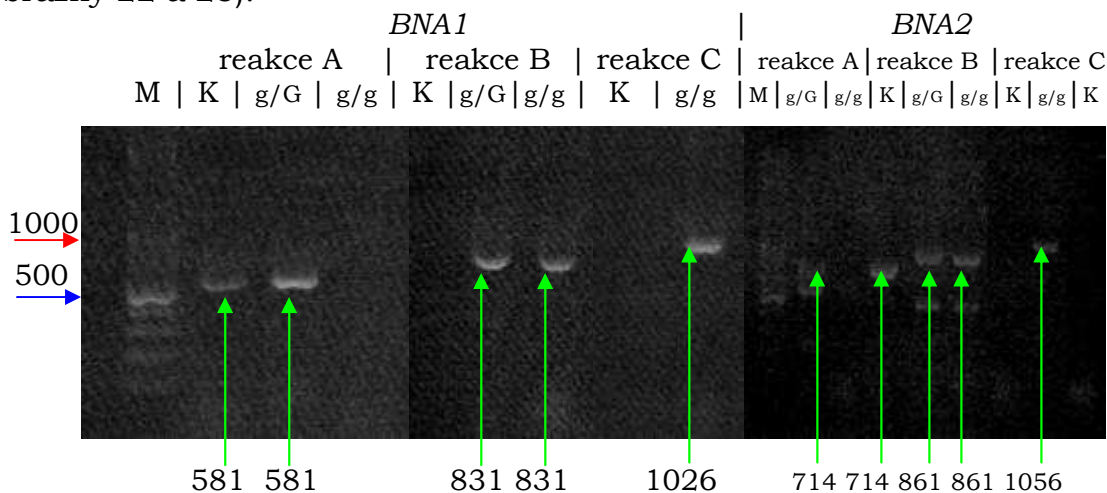
genotyp	bez delece	delece 1 alely	delece 2 alel	marker
značení	K	g/G	g/g	M

Tabulka 7 Značení kmenů na elektroforézách ověření delece vybraného genu

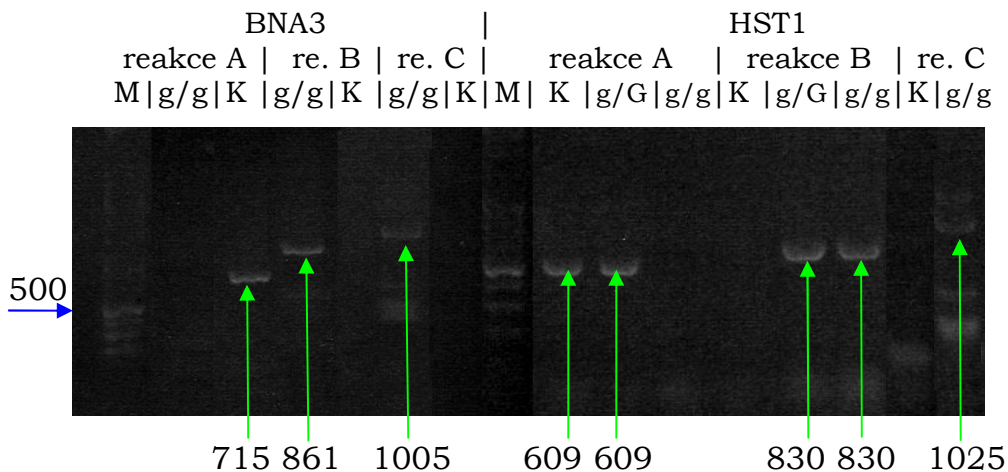


Obrázek 21 Ověření delece první alely genů *BNA1*, *BNA2*, *BNA3* a *HST1*

Získala jsem tedy kmeny $\Delta bnax/BNAx$ a $\Delta hst1/HST1$ a pokračovala v transformaci delecí druhé alely. Pro přípravu transformační kazety jsem použila stejné primery a jako templátovou DNA plasmid pAG25 obsahující sekvenci genu pro rezistenci na nourseothricin. Úspěšnost transformace jsem ověřovala pomocí PCR s reakcemi A, B a C. U reakce A jsem očekávala produkt délky 581 bp pro gen *BNA1*, délky 714 bp pro gen *BNA2*, délky 715 bp pro gen *BNA3* a délky 609 bp pro gen *HST1*. U reakce B jsem u transformovaných kmenů očekávala produkt délky 831 bp pro gen *BNA1*, délky 861 bp pro gen *BNA2*, délky 810 bp pro gen *BNA3* a délky 830 bp pro gen *HST1*. U reakce C jsem u transformovaných kmenů očekávala produkt délky 1026 bp pro gen *BNA1*, délky 1056 bp pro gen *BNA2*, délky 1005 bp pro gen *BNA3* a délky 1025 bp pro gen *HST1*. Jako kontrolu jsem použila kmen BR-F (ozn. K) a příslušné výchozí kmeny s delecí 1 alely (ozn. g/G) (obrázky 22 a 23).



Obrázek 22 Ověření delece druhé alely genů *BNA1* a *BNA2*



Obrázek 23 Ověření delece druhé alely genů *BNA3* a *HST1*

Výsledky

Podářilo se mi připravit kmeny $\Delta bna1$, $\Delta bna2$, $\Delta bna3$, $\Delta hst1$. Morfologie jejich kolonií ani buněk nebyla odlišná od výchozího kmene BR-F.

Kmeny $\Delta bna1$ a $\Delta hst1$ jsem využila při dalších experimentech.

5.3. Experimenty s delečními mutanty výchozího kmene BR-F

5.3.1. Porovnávání morfologie kolonií

Cíl

Sledovat morfologii kolonií kmene BR-F a připravených mutantních kmenů.

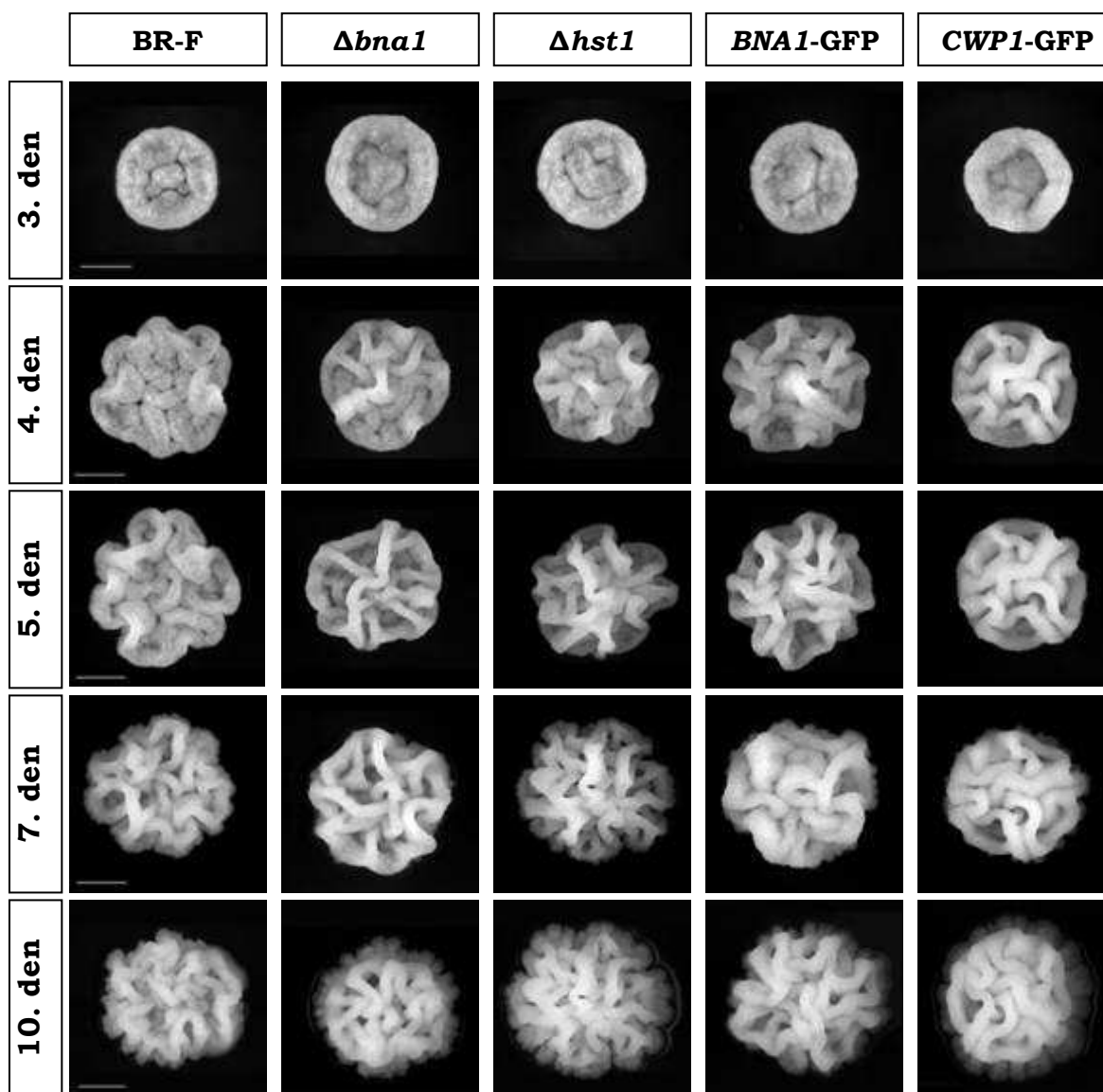
Postup

Vybrané kmeny (tabulka 8) jsem vysela na čerstvé GM médium v koncentraci 1×10^2 – 2×10^2 buněk na misku a ve stejných časových intervalech kultivace zaznamenávala vzhled jejich kolonií.

Porovnávané kmeny	kmen	označení
výchozí kmen	BR-F	BR-F
deleční mutanti	BR-F: <i>bna1</i> Δ ::kanMX/ <i>bna1</i> Δ ::nat	$\Delta bna1$
	BR-F: <i>hst1</i> Δ ::kanMX/ <i>hst1</i> Δ ::nat	$\Delta hst1$
značené GFP	BR-F: <i>BNA1</i> -GFP-kanMX/ <i>BNA1</i>	<i>BNA1</i> -GFP
	BR-F: <i>CWP1</i> -GFP/ <i>CWP1</i>	<i>CWP1</i> -GFP

Tabulka 8 Kmeny vybrané pro porovnávání morfologie kolonií

Výsledky



Obrázek 24 Morfologie kolonií vybraných kmenů (kultivace na GM médiu, měřítko 1 mm)

Kolonie porovnávaných kmenů se neliší ani velikostí, ani morfologií. Oproti hypotéze se kolonie delečního mutanta $\Delta hst1$ jeví v porovnání s výchozím kmenem BR-F dokonce více strukturované (obrázek 24).

5.3.2. Stabilita fenotypu

Cíl

Porovnat stabilitu fenotypu (frekvenci přepínání) výchozího kmene a delečních mutantů.

Postup

Metodou pro určení stability fenotypu (kapitola 4.2.13) jsem u vybraných kmenů (tabulka 9) stanovila relativní četnosti kolonií se změněnou morfologií a porovnávala je. Všechny kmeny měnily morfologii kolonie ze strukturované na hladkou.

Porovnávané kmeny	kmen	označení
výchozí kmen	BR-F	BR-F
deleční mutanti	BR-F: <i>bna1</i> Δ::kanMX/ <i>bna1</i> Δ::nat	Δ <i>bna1</i>
	BR-F: <i>hst1</i> Δ::kanMX/ <i>hst1</i> Δ::nat	Δ <i>hst1</i>

Tabulka 9 Kmeny vybrané pro porovnání stability fenotypu

Výsledky

kmen	četnost přepnutých fenotypů [%]
BR-F	1,37
Δ <i>bna1</i>	0,34
Δ <i>hst1</i>	0,38

Tabulka 10 Relativní četnost přepnutých fenotypů po prvním výsevu

kmen	četnost přepnutých fenotypů [%]
BR-F	0,22
Δ <i>bna1</i>	0,28
Δ <i>hst1</i>	0,41

Tabulka 11 Relativní četnost přepnutých fenotypů po druhém výsevu

kmen	četnost rozdílných fenotypů [%]	směrodatná odchylka
BR-F	0,79	0,4048
Δ <i>bna1</i>	0,31	0,0216
Δ <i>hst1</i>	0,40	0,0113

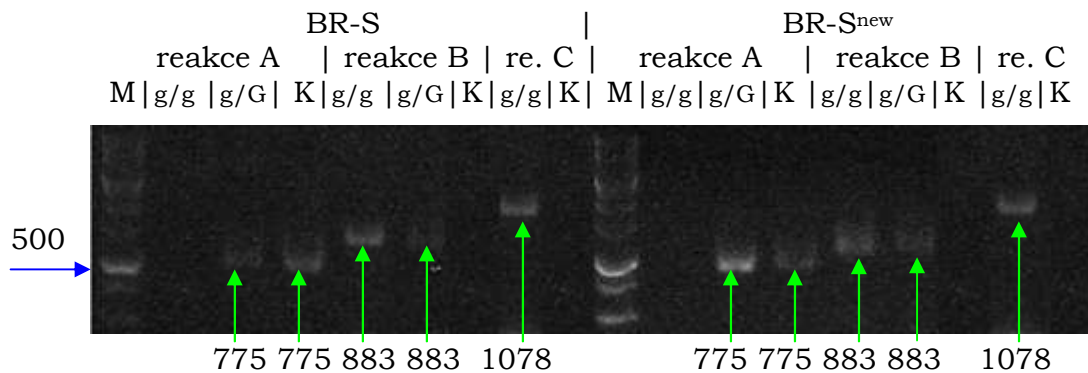
Tabulka 12 Průměrná relativní četnost a směrodatná odchylka přepnutých fenotypů

Četnost kolonií se změněnou morfologií se (s ohledem na směrodatnou odchylku) u vybraných kmenů nijak neliší (tabulky 10, 11 a 12).

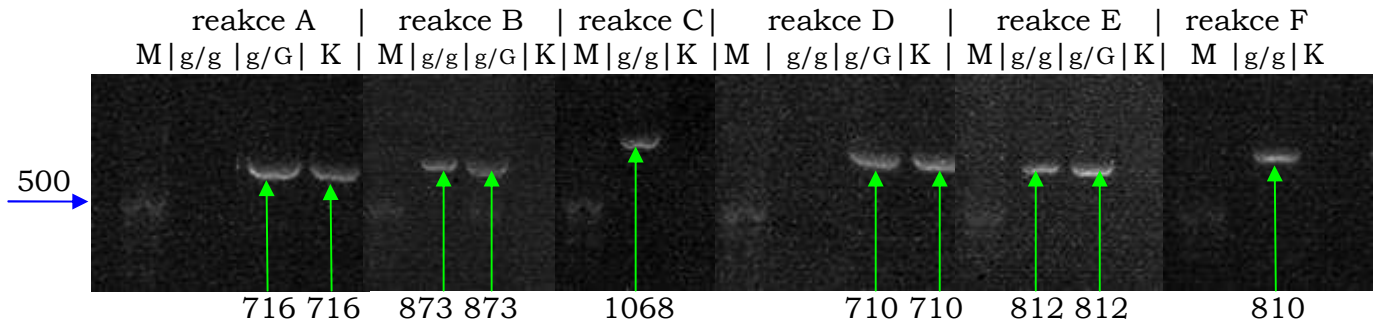
5.4. Příprava delečních mutantů výchozích kmenů BR-S a BR-S^{new}

Srovnání transkriptomů kolonií kmenů BR-F, BR-S a BR-RF (kmen tvořící strukturované kolonie odvozený od kmene BR-S) prokazuje, že v buňkách kolonií kmene BR-F dochází ke zvýšené expresi genů, které jsou pod kontrolou histonové deacetylázy Hda1p. Zdá se tedy, že Hda1p, jakožto negativní regulátor exprese určitých genů, je v kmeni BR-F málo aktivní (Šťovíček, 2012). Tato skutečnost naznačuje, že k epigenetické kontrole genové exprese vlivem transkripčního umlčování zprostředkovaného

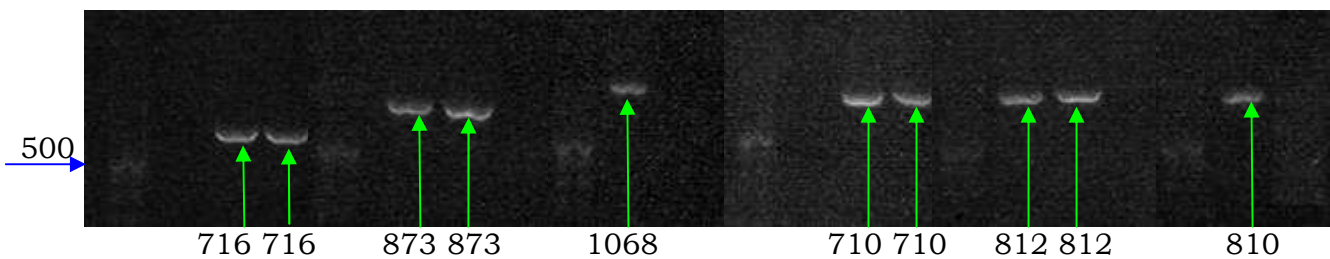
jsem ověřovala pomocí PCR s reakcemi A, B a C. U reakce A jsem očekávala produkt délky 775 bp pro gen *SET3* a délky 716 bp pro gen *SIR2*, u reakce B jsem u transformovaných kmenů očekávala produkt délky 883 bp pro gen *SET3* a délky 873 bp pro gen *SIR2*, u reakce C délky 1078 bp pro gen *SET3* a délky 1068 bp pro gen *SIR2*, u reakce D délky 710 bp, u reakce E délky 812 bp a u reakce F délky 810 bp. Jako kontrolu jsem použila příslušné výchozí kmeny (ozn. K) a příslušné kmeny s delecí jedné alely (ozn. g/G) (obrázky 26, 27 a 28).



Obrázek 26 Ověření delecce druhé alely genu *SET3*



Obrázek 27 Ověření delecce druhé alely genu *SIR2* u výchozího kmene BR-S^{new}



Obrázek 28 Ověření delecce druhé alely genu *SIR2* u výchozího kmene BR-S

Výsledky

Podářilo se mi připravit kmeny $\Delta set3$ a $\Delta sir2$. Morfologie kolonií ani buněk kmenů $\Delta set3$ ani kmene $\Delta sir2$ výchozího kmene BR-S nebyla odlišná od výchozího kmene.

Podářilo se však připravit kmen s odlišnou morfologií kolonií i buněk a to u kmene BR-S^{new}: *sir2* Δ ::kanMX/*sir2* Δ ::nat (zkrácený zápis BR-S^{new} $\Delta sir2$). Tento kmen jsem využila k dalším experimentům. Z důvodu vyloučení vzniku nového fenotypu vlivem náhodných mutací jsem delecí druhé alely genu *SIR2* opakovala. Jako výchozí kmen jsem použila jiný klon kmene $\Delta sir2/SIR2$. Opět jsem získala klon s odlišnou morfologií kolonie i buněk, ovšem stejnou jako v případě první prováděné transformace.

5.5. Fenotypové charakteristiky kmen BR-S^{new} $\Delta sir2$

5.5.1. Porovnávání morfologie kolonií a buněk

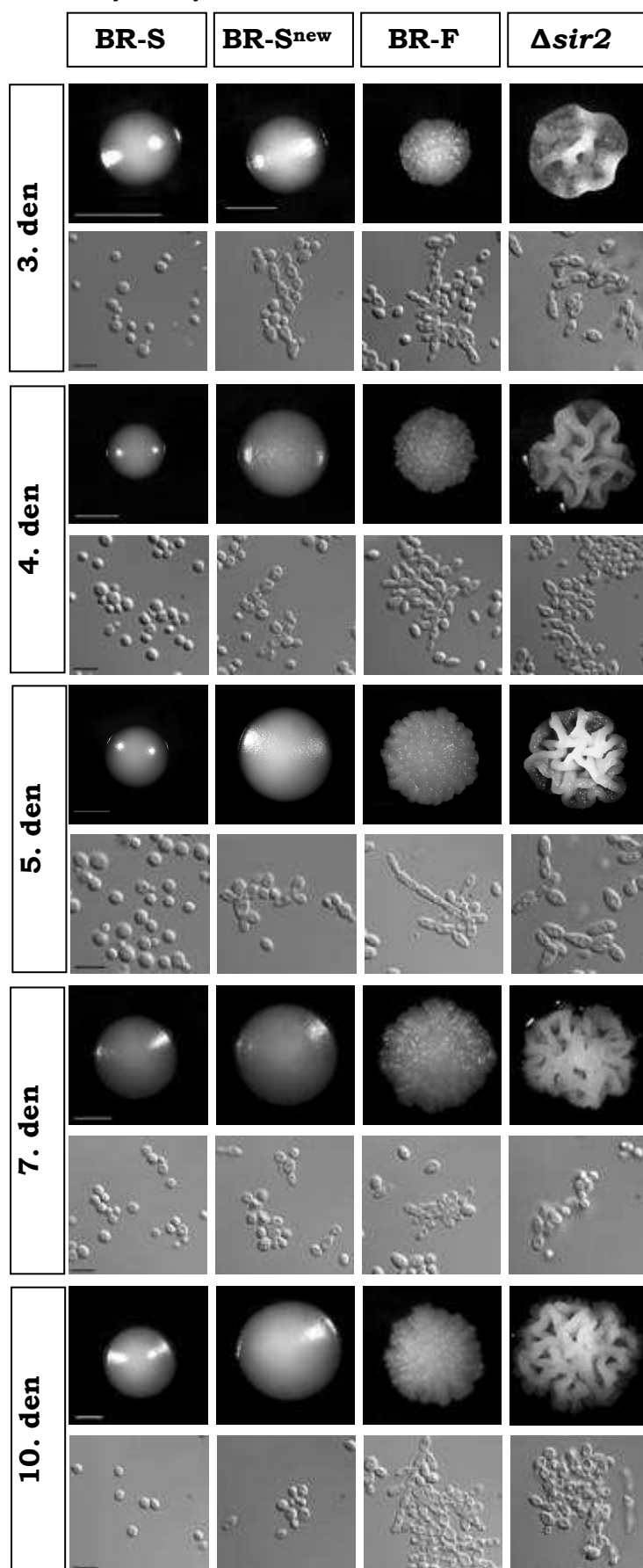
Cíl

Objevit rozdíly a shody v morfologii kolonií a buněk kmenů BR-F, BR-S a BR-S^{new} a kmene BR-S^{new} $\Delta sir2$ (ozn. $\Delta sir2$).

Postup

Vybrané kmeny jsem vysela na čerstvé GM médium v koncentraci 1×10^2 – 2×10^2 buněk na miskou a ve stejných časových intervalech kultivace zaznamenávala vzhled jejich kolonií a buněk.

Výsledky



Obrázek 29 Morfologie kolonií a buněk vybraných kmenů (kultivace na GM médiu, měřítko u kolonií představuje 1 mm, u buněk 10 μ m)

Kolonie kmene $\Delta sir2$ jsou zřetelně více strukturované než zcela hladké kolonie výchozího kmene BR-S^{new}, ale zdaleka nedosahují složitosti architektury kolonií kmene BR-F. Jsou tvořené oválnými buňkami stejně jako kolonie kmene BR-S^{new} a z velké části také výrazně protáhlými buňkami tvořícími dlouhé řetízky a shluky podobně jako buňky tvořící kolonie kmene BR-F. Ve shlucích je nahloučeno více buněk než u kmene BR-F, díky čemuž shluky působí kompaktněji (obrázek 29).

5.5.2. Porovnávání mokré a suché hmotnosti kolonií

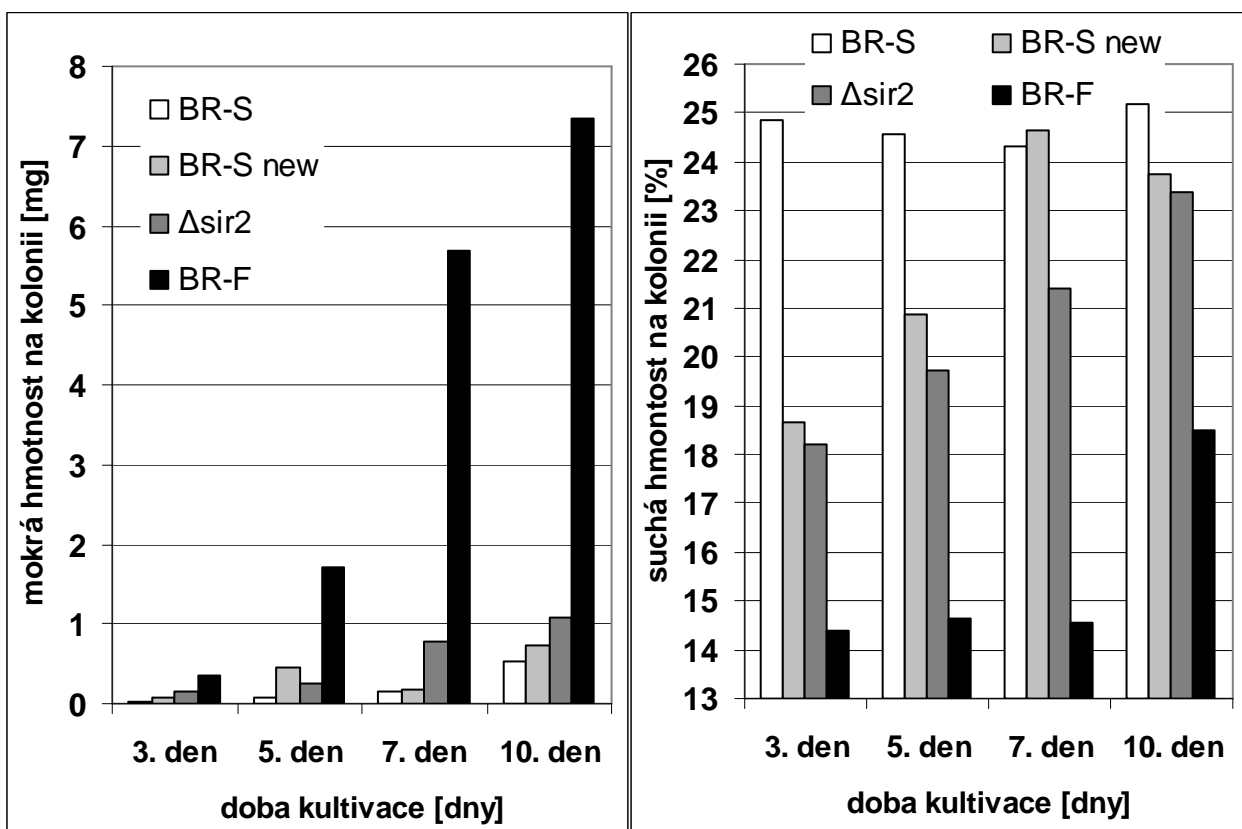
Cíl

Vzájemně porovnat mokrou a suchou hmotnost kolonií kmenů BR-F, BR-S a BR-S^{new} a kmene $\Delta sir2$.

Postup

Vybrané kmeny jsem vysela na čerstvé GM médium v koncentraci 1×10^2 – 2×10^2 buněk na misku a po určitých časových intervalech kultivace stanovila mokrou a suchou hmotnost kolonie (4.2.15).

Výsledky



Graf 1 Porovnání mokré hmotnosti

Graf 2 Porovnání suché hmotnosti

Hodnoty mokré i relativní suché hmotnosti (grafy 1 a 2) kolonie kmene $\Delta sir2$ se pohybují mezi hodnotami naměřenými u kmenů BR-S^{new} a BR-F, přičemž s prodlužující se dobou kultivace (a také zvyšující se složitostí architektury kolonií kmene BR-F) výrazně narůstá rozdíl mokré hmotnosti a snižuje se z počátku výrazný rozdíl relativní suché váhy mezi kmenem BR-F a ostatními kmeny.

5.5.3. Stabilita fenotypu

Cíl

Porovnat stabilitu fenotypů (frekvenci přepínání) kmenů BR-F, BR-S a BR-S^{new} a kmene BR-S^{new}: *sir2Δ::kanMX/sir2Δ::nat* (ozn. $\Delta sir2$).

Postup

Metodou pro určení stability fenotypu (kapitola 4.2.13) jsem u vybraných kmenů stanovila relativní četnosti kolonií se změněnou morfologií a porovnála je. V případě kmenů BR-F a $\Delta sir2$ jsem stanovovala vznik hladkých kolonií v populaci kolonií původně strukturovaných, v případě kmenů BR-S a BR-S^{new} pak potenciální vznik strukturovaných kolonií typu kmene BR-F v populaci kolonií původně hladkých.

Výsledky

kmen	četnost přepnutých fenotypů [%]
BR-S	0
BR-S ^{new}	0,238
$\Delta sir2$	0,153
BR-F	0,535

Tabulka 13 Relativní četnost přepnutých fenotypů po prvním výsevu

kmen	četnost přepnutých fenotypů [%]
BR-S	0
BR-S ^{new}	2,114
$\Delta sir2$	0
BR-F	0,051

Tabulka 14 Relativní četnost přepnutých fenotypů po druhém výsevu

kmen	četnost rozdílných fenotypů [%]	směrodatná odchylka
BR-S	0	0
BR-S ^{new}	1,176	0,938
$\Delta sir2$	0,077	0,077
BR-F	0,293	0,242

Tabulka 15 Průměrná relativní četnost a směrodatná odchylka přepnutých fenotypů

Stabilita fenotypu je (s ohledem na směrodatnou odchylku) u vybraných kmenů shodná (tabulky 13, 14 a 15).

5.5.4. Analýza extracelulárních proteinů

Cíl

Porovnat různorodost a množství proteinů tvořících ECM kmenů BR-F, BR-S a BR-S^{new} a kmene BR-S^{new}: *sir2Δ::kanMX/sir2Δ::nat* (ozn. $\Delta sir2$).

Postup

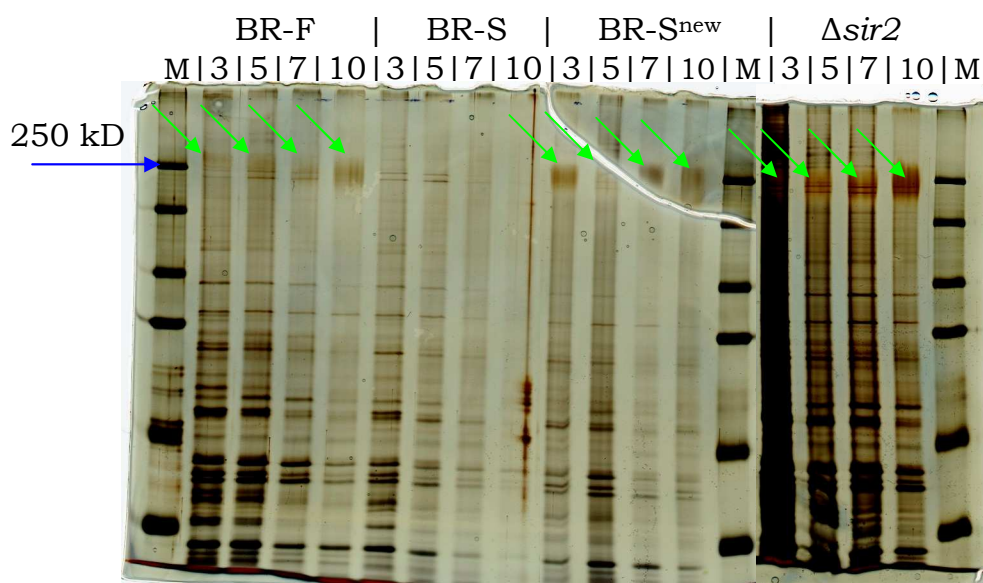
Vybrané kmeny jsem vysela na čerstvé GM médium v koncentraci 1×10^2 – 2×10^2 buněk na misku a po určitých časových intervalech kultivace extrahovala jejich ECM (kapitola 4.2.14). Proteiny ve vzorcích jsem vysrážela (kapitola 4.2.16), rozdělila na vertikální elektroforéze (kapitola 4.2.17) a následně obarvila stříbrem (kapitola 4.2.18).

Výsledky

Analýza extracelulárních proteinů (obrázek 30) ukázala, že glykoprotein s vysokou molekulovou hmotností (~250 kD, HMWGP), který zřejmě má úzkou souvislost s tvorbou ECM, důležité pro tvorbu architektury kvasinkových kolonií (Šťovíček *et al.*, 2012), je přítomen v kmenech BR-F, BR-S^{new} i $\Delta sir2$, nikoli však v kmeni BR-S.

Ve složení extracelulárních proteinů kmene $\Delta sir2$ nejsou při pohledu na akrylamidový gel žádné zásadní rozdíly oproti výchozímu kmeni BR-S^{new}, ani oproti kmeni BR-F. Pro preciznější potvrzení této skutečnosti by však byla nutná detailnější analýza.

Celkové množství extracelulárních proteinů je u kmene $\Delta sir2$ výrazně vyšší než u kmenů s hladkými koloniemi a blíží se množství u kmene BR-F.



Obrázek 30
Proteinová analýza kmenů BR-F, BR-S, BR-S^{new} a $\Delta sir2$ (modrá šipka značí velikost proteinů 250 kD, zelené šipky poukazují na přítomnost HMWGP, čísla značí dobu kultivace kolonií před sběrem biomasy pro analýzu, vzorky kmene BR-F jsou 3 x více ředěné, než ostatní vzorky)

6. Diskuze

Mnohé mikroorganismy, kvasinky nevyjímaje, které jsou stále považovány a také studovány spíše jako jednobuněčné organismy, vytváří ve svém přirozeném prostředí mnohobuněčné populace z funkčně i prostorově diferencovaných buněk. Jednotlivé populace se pak vzájemně ovlivňují a synchronizují své chování ve prospěch celého mnohobuněčného útvaru bez ohledu na osud jednotlivých buněk, připomínajíce tak tkáň mnohobuněčných organismů. Mezi některými mechanismy a životními strategiemi mikroorganismů a vyšších mnohobuněčných organismů by pak mohla existovat jistá analogie (Palková & Váchová, 2006; Palková, 2004).

Divoké kmeny kvasinek tvoří na rozdíl od hladkých kolonií laboratorních kmenů komplexní strukturované kolonie, jejichž tvorba je sice z hlediska energetické zátěže náročnější, zato pro přežití populace v nepříznivých podmínkách může být vznik takových útvarů výhodnější. Díky vlastnostem, které jsou pro ně charakteristické (například tvorba velkého množství ECM), splňují obecnou definici biofilmů (Šťoviček *et al.*, 2010; Costerton, 1999). Biofilmová společenstva jsou v přírodě velmi častá. Nacházíme je téměř na všech površích a substrátech včetně těl rostlin i živočichů i umělých materiálů. Kvůli vysoké rezistenci vůči antimykotikům, působí mnohé problémy v lékařství i dalších oborech lidské činnosti (Donlan & Costerton, 2002; Palková & Váchová, 2006).

Souvislost se zvýšenou rezistencí vůči antimykotikům i patogenitou některých kmenů kvasinek má proces přepínání fenotypů (kapitola 3.2). Přepínání fenotypů bylo popsáno mimo jiné u mnoha patogenních kvasinek rodu *Candida* a *Cryptococcus neoformans* (Slutsky *et al.*, 1985, 1987; Xie *et al.*, 2012; Arzmi *et al.*, 2012; Goldman *et al.*, 1998). Jedná se o náhodnou změnu původního fenotypu s frekvencí vyšší než je běžná u somatických mutací, u kvasinek se projevuje vznikem morfologicky odlišných typů kolonií (Soll, 1992; Soll, 2002). S přepnutím fenotypu dochází nejen ke změnám ve struktuře kolonie, ale také v morfologii a typu pučení buněk, genové expresi, struktuře chromatinu a stabilitě chromozomů, složení buněčné stěny a s tím většinou související virulenci (Fries *et al.*, 1999; Morschhäuser, 2010; Pérez-Martín *et al.*, 1999). Frekvence, nebo dokonce iniciace přepínání,

může být ovlivněna vnějšími podmínkami jako je změna teploty, vystavení UV záření, nedostatek živin, nebo naopak zvýšená koncentrace určitých látek (Trichostatin A) a jiné stresové faktory (Inglis *et al.*, 2013; Morschhäuser, 2010; Soll, 2002).

Divoké kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* také vykazují fenotypovou variabilitu a při kultivaci v laboratorních podmínkách podstupují proces domestikace (kapitola 3.3.3), který je přepínání fenotypů v mnohém podobný. Dochází při něm k přechodu ze strukturované (kmen BR-F) na hladkou (kmen BR-S) kolonii, doprovázeném mnohými dalšími změnami jako je změna morfologie buněk, ztráta tvorby extracelulární matrix a dramatická změna v genové expresi (Kuthan *et al.*, 2003).

Naše laboratoř se, s ohledem na podobnosti komplexních kvasinkových kolonií s biofilmy, studiem tohoto fenoménu intenzivně zabývá a snaží se porozumět a vysvětlit mechanismy, které ho vyvolávají a řídí. Nápomocná by byla identifikace oněch přírodních podmínek, ve kterých se strukturované kolonie běžně tvoří a udržují si svůj fenotyp, nebo odhalení mechanismů procesu reverzního. Dlouhodobá statická kultivace kmene BR-S (domestikovaná forma kmene BR-F tvořící hladké kolonie) v nepříznivých stresujících podmínkách vedla ke vzniku několika nových fenotypů tvořících strukturované kolonie. Fenotyp s morfologií kolonie nerozeznatelnou od původního přírodního kmene BR-F byl označen BR-RF a podroben dalším analýzám (Kuthan *et al.*, 2003, Šťovíček, 2012).

Fyziologické porovnání vedlo ke zjištění, že buňky strukturovaných kolonií kmene BR-RF jsou, na rozdíl od protáhlých a pseudohyfálních buněk původního divokého kmene BR-F, kulaté a tedy podobné buňkám hladkých kolonií kmene BR-S. Tato skutečnost podporuje zjištění, že morfologie buněk přímo nesouvisí s morfologií kolonie (Šťovíček *et al.*, 2010; Šťovíček, 2012). Původní fenotyp tak nebyl zcela obnoven, ovšem vlastnosti považované za esenciální pro tvorbu strukturovaných kolonií (tvorba ECM a exprese genu *FLO11*) (Šťovíček *et al.*, 2010) obnoveny byly. Byla prokázána i přítomnost HMWGP, charakteristická pro kmen BR-F (Kuthan *et al.*, 2003). Na základě transkriptomového srovnání kmenů BR-F, BR-RF a BR-S byly

identifikovány geny specifické pro strukturované a pro hladké kolonie (Šťovíček, 2012).

Jedním z genů, jehož exprese byla zvýšená v kmenech se strukturovanými koloniemi, je gen *CWP1* (Cell Wall Protein), který kóduje protein buněčné stěny. Protein Cwp1p je stejně jako Flo11p lokalizován na povrchu buněk, kde je upevněn pomocí GPI kotvy (van der Vaart *et al.*, 1995; Lo & Dranginis, 1996). Současná delece genu *CWP1* a genu *CWP2*, kódujícího další mannoprotein buněčné stěny, vedla u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* k výrazným rozdílům ve struktuře a propustnosti buněčné stěny. U delečního kmene byla několikanásobně zvýšená citlivost na látky s vysokou molekulovou hmotností (například phleomycin). Mannoproteiny buněčné stěny jsou tak považovány za hlavní součásti bariéry vůči toxickým látkám z okolí (Zhang *et al.*, 2008). Morfologie kolonie však nebyla delecí genu *CWP1* v kmeni BR-F nijak ovlivněna (Hlaváček, ústní sdělení). Nezdá se tedy, že by protein Cwp1p hrál významnou roli při tvorbě strukturované kolonie.

Avšak díky označení tohoto proteinu pomocí GFP metodou intergenové fúze (kapitola 5.1.1) bylo možné sledovat jeho lokalizaci v průběhu vývoje kolonií kmene BR-F. V mladších buňkách se nachází na jejich povrchu a také uvnitř buněk, s rostoucím stářím buněk je patrný především na povrchu spor. Zřejmě se tedy podílí na stavbě buněčné stěny spor a mohl by být dobrým indikátorem sporulace v koloniích divokých kmenů (kapitola 3.1.2.1).

Mezi další geny se zvýšenou expresí ve strukturovaných koloniích patří také *BNA* geny (Biosynthesis of Nicotinic Acid) (Šťovíček, ústní sdělení). Geny *BNA1*, *BNA2* i *BNA3*, kterými jsem se ve své práci zabývala, jsou součástí kynureninové dráhy *de novo* syntézy NAD⁺ z tryptofanu.

Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) je esenciálním kofaktorem redoxních reakcí a energetického metabolismu buňky a důležitým substrátem mnoha biologických procesů jako například regulace transkripce, opravy DNA, Ca²⁺ signalizace, prodlužování životnosti buněk omezením přísunu živin a poruchy při stárnutí (Anderson *et al.*, 2003; Lin & Guarente, 2003).

V kmeni kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s nefunkční syntézou NAD⁺ pomocí jiné dráhy (salwage pathway) došlo ke zvýšení exprese genů *BNA1* a *BNA2* a jejich jednotlivé delece v tomto kmeni vedly k úplnému zastavení syntézy NAD⁺ a zpomalení růstu kolonií. Delece genu *BNA3* však syntézu kynureninovou dráhou nepřerušila, funkce tohoto genu (arylformamidáza) zde tedy zřejmě může být nahrazena jiným enzymem nebo jejich kombinací (*ADE8*, *ADE16* a *ADE17* kódují další arylformamidázy *Saccharomyces cerevisiae*). Všechny geny kynureninové dráhy jsou indukovány nízkým obsahem NAD⁺ v buňce, čímž je jeho zásoba neustále doplňována (Bedalov *et al.*, 2003; Panozzo *et al.*, 2002).

Jednotlivé delece těchto genů (kapitola 5.2) v kmeni BR-F nevedly ke změně morfologie kolonií (kapitola 5.3.1) ani ke snížení schopnosti růstu a v případě delece genu *BNA1* ani k odlišnostem ve stabilitě fenotypu (kapitola 5.3.2). Označení proteinu Bna1p pomocí GFP ukázalo jeho difúzní výskyt v celé cytoplazmě (kapitola 5.1.2). Nezdá se tedy, že by se produkty těchto genů nějak významně podílely na tvorbě strukturovaných kolonií nebo na mechanismech přepínání fenotypů.

Řada studií naznačuje souvislost přepínání fenotypů s transkripčním umlčováním a regulací struktury chromatinu histonovými deacetylázami (Pérez-Martín *et al.*, 1999; Srikantha *et al.*, 2001; Klar *et al.*, 2001; Morschhäuser, 2010). Poměrně velké množství genů se zvýšenou expresí v kmeni BR-F je lokalizováno v HAST doménách, tedy v oblastech pod negativní kontrolou histonové deacetylázy Hda1p. To vede k domněnce, že aktivita tohoto enzymu bude v kmeni BR-S oproti BR-F vyšší. Mutantní klon s úplnou delecí genu *HDA1* kmene BR-S sice stále tvoří hladké kolonie, nicméně vykazuje některé charakteristiky kmene BR-F související s rezistencí a povrchovými vlastnostmi kolonií (rezistence vůči barvivu calcoflour a vysoké teplotě) (Šťovíček, 2012). Hda1p ovlivňuje přepínání fenotypů také u kvasinky *Candida albicans* (Srikantha *et al.*, 2001; Klar *et al.*, 2001). Ve své práci jsem se proto zaměřila i na další histonové deacetylázy. Stojí za zmínku, že homologii genů histonových deacetyláz můžeme pozorovat napříč všemi eukaryotními organismy a jejich role

v transkripčním umlčování je diskutována i v savčích buňkách (Brachmann *et al.*, 1995; Hassig *et al.*, 1998).

Histonová deacetyláza Hst1p (*Homolog of Sir Two*) je NAD⁺-závislá, i když v menší míře než ostatní enzymy z této skupiny. Potlačuje geny *de novo* syntézy NAD⁺ a slouží tak jako senzor a regulátor buněčného obsahu NAD⁺ (Bendalov *et al.*, 2003). Je také spojována s transkripčním umlčováním a potlačením exprese genů pod kontrolou promotoru MSE (Middle Sporulation Element), důležitých pro sporulaci (Xie *et al.*, 1999).

Úplná delece genu *HST1* v kmeni BR-F (kapitola 5.2) nezpůsobila žádné defekty v morfologii kolonií, naopak architektura kolonií mutantního kmene působila ještě strukturovaněji než u výchozího kmene (kapitola 5.3.1). Také stabilita fenotypu zůstala zachována (kapitola 5.3.2). Z výše uvedených výsledků se zdá, že aktivita histonových deacetyláz je vyšší v kmenech s hladkými koloniemi, kde by se mohly účastnit negativní regulace exprese genů spojených se specifickými vlastnostmi kmenů se strukturovanými koloniemi.

Také Set3p je NAD⁺-závislou histonovou deacetylázou, která tvoří komplex s dalšími enzymy včetně Hst1p. Účastní se potlačení exprese genů pro časnou sporulaci včetně regulátorů meiózy. Homologie byla objevena mezi kvasinkovým komplexem Set3C, jehož součástí je i enzym Set3p, a savčím komplexem HDAC3/SMRT (Pijnappel *et al.*, 2001). Odstranění genu *HST1* u kmene BR-S (Šťovíček, ústní sdělení), ani odstranění genu *SET3* z genomu kmenů BR-S a BR-S^{new} (kapitola 5.4) nevedlo k žádné morfologické změně ve struktuře jejich kolonií.

Gen *SIR2* kóduje další z NAD⁺-závislých histonových deacetyláz, zakonzervovanou v mnohých eukaryotních organismech. Je zásadní pro transkripční umlčování lokusu párovacího typu (*MTL*), telomer a rDNA, kde je chromatinová struktura díky hypoacetylovanému stavu kompaktnější, a tak méně přístupná transkripčnímu aparátu (Guarente, 2000), a zřejmě i dalších genů (Bernstein *et al.*, 2000). S ohledem na jeho další funkci při opravách DNA spojováním jejich nehomologních konců, NAD⁺-závislost a spotřebu NAD⁺ glykolytickými enzymy je také spojován s prodloužením životnosti buněk při omezeném přísunu živin,

mechanismem efektivně fungujícím v nejrůznějších organismech. Čím méně živin buňka dostává, tím méně NAD^+ je spotřebovááno enzymy glykolýzy a tím více ho může být využito Sir2p pro opravy DNA, případně pro represi transkripce rDNA kroužků. rDNA kroužky se totiž při dělení kvasinek hromadí v mateřské buňce, čímž snižují její životaschopnost (Guarente, 2000).

U divokého kmene kvasinky *Candida albicans* způsobila ztráta genu *SIR2* zvýšení frekvence přepínání fenotypu na strukturované kolonie s morfologií podobnou jako v případě kmene 3153A, doprovázené přestavbami DNA a nestabilitou karyotypu (Pérez-Martín *et al.*, 1999). Také „white-opaque“ přepínání fenotypů, řízené geny lokalizovanými na *MTL*, zřejmě souvisí s aktivitou Sir2p (Morschhäuser, 2010).

Přestože úplná delece genu *SIR2* nezpůsobila žádnou změnu v morfologii kolonií u mutantního klonu kmene BR-F (Šťovíček, 2012) ani BR-S, zcela jiného výsledku bylo dosaženo v případě výchozího kmene BR-S^{new} (kapitola 5.4). I když architektura struktury kolonií nedosahuje složitosti generované kmenem BR-F, je rozhodně výrazně složitější než u hladkých kolonií kmene BR-S^{new}. U tohoto delečního kmene, označeného jako $\Delta sir2$, jsem provedla fenotypové srovnání s kmeny BR-F, BR-S a BR-S^{new} v několika charakteristikách obecně souvisejících s tvorbou strukturovaných kolonií (kapitola 5.5). Mé výsledky u kmenů BR-F a BR-S se shodují s výsledky publikovanými v dřívější studii (Kuthan *et al.*, 2003).

Kmen BR-F vykazuje tvorbu výrazně větších kolonií (horizontálně i vertikálně) než kmen BR-S, přestože velikost buněk je srovnatelná. Kolonie kmenů BR-S^{new} a $\Delta sir2$ svou velikostí zapadají mezi oba tyto kmeny, u kolonií kmene $\Delta sir2$ je však v porovnání s oběma kmeny s hladkými koloniemi lehce výraznější vertikální růst. Ve velikosti buněk rozdíly patrné nejsou. Tvar a typ pučení buněk, přestože zřejmě není charakteristickým znakem strukturovaných kolonií (Šťovíček *et al.*, 2010), se však zásadně liší. Kolonie kmene $\Delta sir2$ jsou, na rozdíl od kmene BR-S a ve shodě s kmenem BR-S^{new}, tvořené oválnými buňkami. Velké procento však zastupují také výrazně protáhlé buňky, spojené v dlouhé řetízky (pseudohyfy) a shluky

podobně jako buňky kmene BR-F. Ve shlucích je často navázáno i více buněk než u kmene BR-F, díky čemuž tyto shluky působí kompaktněji.

Pro kolonie kmene BR-F je také charakteristický vysoký obsah vody, stanovený rozdílem mokré a suché hmotnosti kolonie. Mokrý hmotnost u kmene BR-F je až 3-krát větší než u kmene BR-S. Hodnoty naměřené u kmenů BR-S^{new} a $\Delta sir2$ jsou vyšší než u kmene BR-S, přičemž kmen $\Delta sir2$ se pohybuje mezi BR-S^{new} a BR-F. S prodlužující se dobou kultivace a tím i zvyšující se mírou strukturovanosti kolonií vzrůstá rozdíl v obsahu vody u kmene BR-F ve srovnání s ostatními kmeny. Suchá hmotnost kolonií (v relativním měřítku) je naopak nejvyšší u kmene BR-S, následuje kmen BR-S^{new}, pak kmen $\Delta sir2$ a nejnižších hodnot dosahuje kmen BR-F. To tedy potvrzuje zjištění, že se složitostí struktury kolonie se zvyšuje i obsah vody (Šťovíček *et al.*, 2010).

S obsahem vody v kolonii zřejmě souvisí i tvorba a množství ECM. Produkují ji buňky všech analyzovaných kmenů s výjimkou kmene BR-S. HMWGP typický pro kmen BR-F, který je považován za součást ECM (Kuthan *et al.*, 2003), byl detekován i u kmenů BR-S^{new} a $\Delta sir2$. Kmeny se podle první hrubé analýzy neliší ani dalším proteinovým složením extracelulární hmoty (kromě přítomnosti HMWGP se zdá shodné i u kmene BR-S), ovšem jejich celkové množství je u obou kmenů se strukturovanými koloniemi mnohem vyšší (kapitola 5.5.4). Zdá se tedy, že spíše než složení ECM je pro architekturu kolonie důležitější její množství.

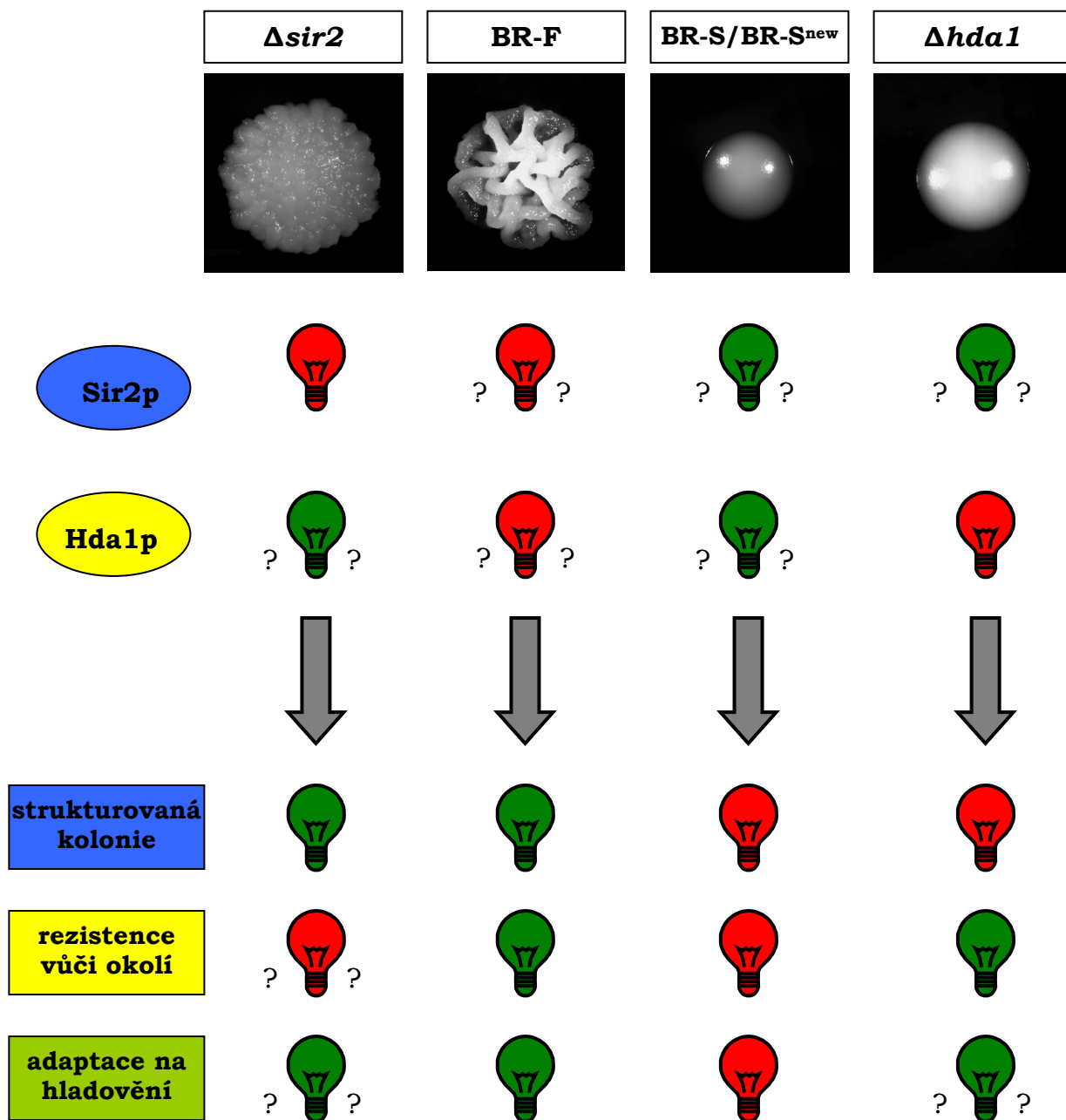
Nově vzniklý kmen $\Delta sir2$ udržuje svůj fenotyp i při opakovaných výsevech na komplexním médium a na hladké kolonie přechází s frekvencí srovnatelnou s kmenem BR-F (kapitola 5.5.3), přičemž vzniká pouze hladký fenotyp, podobně jako je tomu v případě domestikace kmene BR-F.

Expresí alespoň některých z genů, souvisejících s morfologií kolonie, je tedy pod přímou nebo nepřímou kontrolou NAD⁺-závislé histonové deacetylázy Sir2p. Mechanismus přepínání fenotypů a procesu domestikace je však velmi komplexní a zřejmě zahrnuje více různých enzymů a regulátorů, které by se mohli vzájemně ovlivňovat. Výsledky této práce naznačují souvislost epigenetické regulace genové exprese zprostředkované

histonovými deacetylázami s přepínáním fenotypů a zajištěním fenotypové variability u divokých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

V naší laboratoři jsme prokázali funkci alespoň dvou NAD⁺-závislých histonových deacetyláz (Hda1p, Sir2p) v negativní regulaci genů, jejichž exprese vede k vytvoření vlastností typických pro strukturované kolonie. V případě Hda1p jsou to geny související s rezistencí kolonie vůči některým stresorům (Šťovíček, 2012). V případě Sir2p jsou to geny, které mohou souviset se strukturovanou morfologií kolonie. Funkce obou enzymů by se mohla překrývat v regulaci genů souvisejících se stresovou odpovědí na nedostatek živin (obrázek 31). Přepínání fenotypů i domestikace a její reverzní proces jsou úzce spojeny se změnami v metabolismu (Kuthan *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2002; Šťovíček *et al.*, 2010). Sir2p je ve strukturovaných koloniích spíše neaktivní, nebo je jeho aktivita zaměřena více na opravy DNA, čímž je umožněna exprese genů, které jsou v buňkách hladkých kolonií působením Sir2p potlačeny, jako například geny pro biosyntézu aminokyselin (Bernstein *et al.*, 2000). V buňkách hladkých kolonií domestikovaných a laboratorních kmenů, kde je Sir2p aktivní, pak není exprese těchto genů potřebná, protože přísun živin je na komplexních médiích v laboratorních podmínkách zpravidla dostatečný. Podobně jako v případě Hda1p, která svou aktivitou snižuje expresi genů souvisejících s transportem a využitím sacharidů a uhlíkových metabolitů (Bernstein *et al.*, 2000) a v buňkách strukturovaných kolonií je neaktivní (Šťovíček, 2012).

Kromě genů diskutovaných v této práci byly rozdíly v genové expresi u buněk strukturovaných a hladkých kolonií popsány také u celé řady dalších genů (Kuthan *et al.*, 2003, Šťovíček *et al.*, 2010, Váchová *et al.*, 2011, Šťovíček *et al.*, 2012, Šťovíček, 2012). Podrobnější genetická analýza a transkriptomové srovnání kmenů BR-F, původního divokého kmene, kmene BR-S^{new}, jedné z jeho domestikovaných variant a delečního kmene $\Delta sir2$ zajisté pomohou odhalit další faktory, důležité pro změnu fenotypu a tvorbu strukturované architektury kolonie, tedy vlastnosti typické pro divoké kmene kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.



Obrázek 31 Schéma aktivity proteinů Sir2p a Hda1p a jimi pravděpodobně ovlivňovaných vlastností v mutantních a divokých kmenech kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, zelená barva indikuje aktivitu proteinu/projev dané vlastnosti, červená opak.

7. Souhrn

V rámci své diplomové práce jsem se zabývala studiem strukturovaných kolonií divokého kmene *Saccharomyces cerevisiae* BR-F a jeho domestikovaných variant tvořících kolonie hladké a dosáhla jsem následujících výsledků:

Vytvořila jsem deleční mutanty genů *BNA1*, *BNA2* a *BNA3* a *HST1*, jejichž exprese je zvýšená ve strukturovaných koloniích oproti koloniím hladkým, v divokém kmeni BR-F. Morfologie kolonií těchto kmenů a stabilita jejich fenotypu se ovšem zásadně neliší od původního kmene BR-F. Nezdá se tedy, že by výše uvedené geny měly přímý vliv na tvorbu architektury kolonie.

Zkonstruovala jsem kmeny s geny *BNA1* a *CWP1* značenými pomocí fluorescenčního proteinu GFP a sledovala lokalizaci fúzního proteinu v průběhu vývoje kolonie. Bna1p-GFP je v buňkách difúzně rozptýlen v celé cytoplazmě po celou dobu vývoje kolonie. Cwp1p-GFP je lokalizován na povrchu buněk, ve stárnoucích koloniích pak výhradně na povrchu vznikajících spor a může tak být vhodným indikátorem sporulace v koloniích divokých kmenů.

V domestikovaných kmenech BR-S a BR-S^{new} jsem vytvořila delece genů kódujících NAD⁺-závislé histonové deacetylázy Set3p a Sir2p. Zatímco absence genu *SET3* nevede k žádným zásadním změnám ve fenotypu domestikovaných kmenů, odstranění genu *SIR2* vede ke vzniku částečně strukturované kolonie. Vedle změn ve struktuře kolonie dochází při absenci *SIR2* rovněž ke změně v morfologii a mezibuněčné adhezivitě buněk a zvýšené produkci extracelulárních proteinů.

Získané výsledky naznačují, že histonová deacetyláza Sir2p se může účastnit regulace exprese alespoň některých genů, které mají vliv na vznik strukturovaných kolonií a projev jejich specifických vlastností. Epigenetická regulace genové exprese zprostředkovaná histonovými deacetylázami se tak zdá být možným molekulárním mechanismem podílejícím se na fenotypové variabilitě a adaptaci divokých kmenů *Saccharomyces cerevisiae* na měnící se podmínky prostředí.

8. Seznam použité literatury

- Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R. & Kolter, R. (2007): Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr Opin Microbiol.* 2007 (10): 638 – 643
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O. & Sinclair, D. A. (2003): Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2003 (423): 181 – 185
- Arzmi, M. H., Abdul Razak, F., Yusoff Musa, M. & Wan Harun, W. H. (2012): Effect of phenotypic switching on the biological properties and susceptibility to chlorhexidine in *Candida krusei* ATCC 14243. *FEMS Yeast Res.* 2012 (3): 351 – 358
- Ashbee, H. R., Bignell, E. M. 2009 (eds). Pathogenic yeasts. Springer, Berlin.
- Baillie, G. S. & Douglas, L. J. (2000): Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000 (46): 397 – 403
- Barrales, R. R., Jimenez, J. & Ibeas, J. I. (2008): Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2008 (178): 145 – 156
- Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E. & Simon J. A. (2001): Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 (98): 15113 – 15118
- Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M. & Simon, J. A. (2003): NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2003 (23): 7044-7054
- Bennett, R. J. & Johnson, A. D. (2003): Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* 2003 (22): 2505 – 2515
- Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L. (2000): Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 (97): 13708 – 13713

- Bonhivers, M., Carbrey, J. M., Gould, S. J. & Agre, P. (1998): Aquaporins in *Saccharomyces* genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *J. Biol. Chem.* 1998 (273): 27565 – 27572
- Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L. & Boeke, J. D. (1995): The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* 1995 (9): 2888 – 2902
- Braus, G. H., Grundmann, O., Bruckner, S. & Mosch, H. U. (2003): Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003 (14): 4272 – 4284
- Costerton, J. W. (1999): Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1999 (11): 217 – 221; discussion 237 – 239
- Derbyshire, M. K., Weinstock, K. G. & Strathern, J. N. (1996): *HST1*, a new member of the *SIR2* family of genes. *Yeast* 1996 (12): 631 – 640
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 (15): 167 – 193
- Douglas L. J. (2003): *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003 (11): 30 – 36
- d'Enfert C. (2006): Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets.* 2006 (7):465 – 470
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M. J., Garcia-Maiquez, E., Uruburu, F. & Querol, A. (2001): Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol.* 2001 (67): 2056 – 2061
- Fidalgo, M., Barrales, R. R., Ibeas, J. I. & Jimenez, J. (2006): Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 (103): 11228 – 11233
- Franzot, S. P., Mukherjee, J., Cherniak, R., Chen, L. C., Hamdan, J. S. & Casadevall, A. (1998): Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun.* 1998 (66): 89 – 97

- Fries, B. C., Goldman, D. L., Cherniak, R., Ju, R. & Casadevall, A. (1999): Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun.* 1999 (67): 6076 – 6083
- Fries, B. C., Goldman, D. L. & Casadevall, A. (2002): Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection* 2002 (4): 1345 – 1352
- Gancedo, J. M. (2001): Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2001 (25): 107 – 123
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. (1997): A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1997 (13): 837 – 848
- 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* 2005 (22): 1 – 12
- Gietz, R. D., Woods, R. A. (2002): Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 2002 (350): 87 – 96
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992): Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 1992 (68): 1077 – 1090
- Goldman, D. L., Fries, B. C., Franzot, S. P., Montella, L. & Casadevall, A. (1998): Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998 (95): 14967 – 14972
- Goldstein, A. L. & McCusker, J. H. (1999): Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1999 (15): 1541 – 1515
- Guarente, L. (2000): Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes & Development* 2000 (14): 1021 – 1026
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. & Hegemann, J. H. (2002): A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 2002 (30): e23

- Guerrero, A., Jain, N., Goldman, D. L. & Fries, B. C. (2006): Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2006 (152): 3 – 9
- Guerrero, A., Jain, N., Wang, X. & Fries, B. C. (2010): *Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation. *Infect Immun.* 2010 (78): 1049 – 1057
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. & Fink, G. R. (2004): Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 2004 (116): 405 – 415
- Hassig, C. A., Tong, J. K., Fleischer, T. C., Owa, T., Grable, P. G., Ayer, D. E. & Schreiber, S. L. (1998): A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 (95): 3519 – 3524
- Huang, Y. (2002): Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomices pombe*. *Nukleic acid research* 2002 (7): 1465–1482
- Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Binkley, J., Shah, P., Wymore, F. & Sherlock, G. (2013): Improved gene ontology annotation for biofilm formation, filamentous growth, and phenotypic switching in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2013 (12): 101 – 108
- Jain, N., Guerrero, A. & Fries, B. C. (2006): Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research* 2006 (6): 480 – 488
- Jain, N., Hasan, F. & Fries, B. C. (2008): Phenotypic switching in fungi. *Curr Fungal Infect Rep.* 2008 (2): 180 – 188
- Kron, S. J. (1997): Filamentous growth in budding yeast. *Trends Microbiol.* 1997 (5): 450 – 454
- Kucharczyk, R., Zagulski, M., Rytka, J. & Herbert, C. J. (1998): The yeast gene YJR025c encodes a 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase and is involved in nicotinic acid biosynthesis. *FEBS Lett.* 1998 (424): 127 – 130
- Kuthan, M., Dévaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacques, C. & Palková, Z. (2003): Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology* 2003 (47): 745 – 754

- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D. R. (1999): Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun.* 1999 (67): 6652 – 6662
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W. & Agabian, N. (2002): Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 (99): 14907 – 14912
- Lin, S. J. & Guarente, L. (2003): Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 (15): 241 – 246
- Lo, W. S. & Dranginis, A. M. (1996): *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol.* 1996 (178): 7144 – 7151
- Martinez, L. R. & Casadevall, A. (2006): Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 (50): 1021 – 1033
- Meunier, J. R. & Choder, M. (1999): *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast.* 1999 (15):1159 – 1169
- Miller, M. G. & Johnson, A. D. (2002): White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 2002 (110): 293 – 302
- Montelone, B. A. (2002): Yeast Mating Type. *Encyklopedia of life sciences* 2002: 1 – 6
- Morschhäuser, J. (2010): Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010 (199): 165 – 172
- Nett, J. & Andes, D. (2006): *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2006 (9): 340 – 345
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M. & Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 1997 (390): 532 – 536

- Palková, Z. (2004): Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* 2004 (5): 470 – 476
- Palková, Z. & Váchová, L. (2006): Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 (30): 806 – 824
- Panozzo, C., Nawara, M., Suski, C., Kucharczyka, R., Skoneczny, M., Bécam, A. M., Rytka, J. & Herbert, C. J. (2002): Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2002 (517): 97 – 102
- Pérez-Martín, J., Uría, J. A. & Johnson, A. D. (1999): Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *The EMBO Journal* 1999 (18): 2580 – 2592
- Pijnappel, W. W., Schaft, D., Roguev, A., Shevchenko, A., Tekotte, H., Wilm, M., Rigaut, G., Séraphin, B., Aasland, R. & Stewart, A. F. (2001): The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev.* 2001 (15): 2991 – 3004
- Rabilloud, T. (1992): A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 1992 (13): 429 – 439
- Radford, D., Challacombe, S. & Walter, J. (1994): A scanning electron microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching in *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 1994 (40): 416 – 423
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., López-Ribot, J. L. (2005): *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005 (4): 633 – 638
- Rine, J. & Herskowitz, I. (1987): Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1987 (116): 9 – 22
- Roby, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N. & Grunstein, M. (2002): Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* (109): 437 – 446.
- Schier, J. & Kovář, B. (2011): Automated counting of yeast colonies using the fast radial transform algorithm. *Bioinformatics – International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms* 2011: 22 – 27

- Soll, D. R. (1992): High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1992 (5): 183 – 203
- Soll, D. R. (2002): *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002 (81): 101 – 110
- Soll, D. R. (2004): Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* 2004 (26): 10 – 20
- Slutsky, B., Buffo, J. & Soll, D. R. (1985): High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 1985 (230): 666 – 669
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987): "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 1987 (169): 189 – 197
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A. J. & Soll, D. R. (2001): The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 2001 (183): 4614 – 4625
- Štoviček, V., Váchová, L., Kuthan, M. & Palková, Z. (2010): General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology.* 2010 (47): 1012 – 1022
- Štoviček, V., Váchová, L. & Palková, Z. (2012): Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism. *Communicative & Integrative Biology* 2012 (5):1 – 3
- Štoviček, V. (2012): Molekulární mechanismy tvorby a vývoje kolonií přírodních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha
- Tarabová, E. (2010): Umlčování genů u kvasinek. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha
- van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1995): Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1995 (177):3104 – 3110
- Varon, M. & Choder, M. (2000): Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *Journal of Bacteriology* 2000 (182): 3877 – 3880

- Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Ferčíková, I., Kubínová, L. & Palková, Z. (2009a): Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental Microbiology* 2009 (11): 1866 – 1877
- Váchová, L., Kučerová, H., Devaux F., Úhelová, M. & Palková Z. (2009b): Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental Microbiology* 2009 (11): 494 – 504
- Váchová, L., Štoviček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L. & Palková, Z. (2011): Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J Cell Biol.* 2011 (194): 679 – 687
- Verstrepen, K. J., Reynolds, T. B. & Fink, G. R. (2004): Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol.* 2004 (2): 533 – 540
- Vopálenská, I., Hůlková, M., Janderová, B. & Palková, Z. (2005): The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Res Microbiol.* 2005 (156): 921 – 931
- Vopálenská, I., Štoviček, V., Janderová, B., Váchová, L. & Palková, Z. (2010): Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol.* 2010 (12): 264 – 277
- Wessel, D. & Flugge, U. I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 1984 (138): 141 – 143
- Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E. & Vershon, A. K. (1999): *Sum1* and *Hst1* repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1999 (18): 6448 – 6454
- Xie, J., Du, H., Guan, G., Tong, Y., Kourkoumpetis, T. K., Zhang, L., Bai, F. Y. & Huang, G. (2012): N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. *Eukaryot Cell* 2012 (6): 773 – 782

- Zaragoza, O. & Gancedo, J. M. (2000): Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000 (78): 187 – 194
- Zhang, M., Liang, Y., Zhang, X., Xu, Y., Dai, H. & Xiao, W. (2008): Deletion of yeast *CWP* genes enhances cell permeability to genotoxic agents. *Toxicol Sci.* 2008 (103): 68 – 76
- Zordan, R. E., Miller, M. G., Galgoczy, D. J., Tuch, B. B. & Johnson, A. D. (2007): Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PloS Pathog* 2007 (4): e1000089