

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



**ROLE SIGNÁLNÍ DRÁHY HOG MAPK PŘI OSMOTICKÉM
STRESU U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Michaela Vrbová

Praha 2007

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením uvedeného školitele.

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za odborné rady a čas, který mi věnoval. Neméně bych chtěla poděkovat Prof. Peru Sunnerhagenovi, Ph.D. za umožnění studia a praktické části diplomové práce v Lunbergově laboratoři (Göteborg University) a dále Malin Hult za vedení projektu a její ochotu.

Také děkuji Mgr. Václavu Vopálenskému, Mgr. Tomáši Maškovi, Mgr. Zuzaně Feketové a Mgr. Blance Vicenové za jejich ochotnou pomoc při experimentech a dobré rady. Můj dík patří i Vlastě Pelechové a Ing. Lucii Vortelové za zaučení základních metod molekulární biologie a za jejich pozitivní přístup. Nakonec děkuji své rodině, příteli a přátelům, kteří mě v mé práci podporovali.

Děkuji i Evropské kanceláři UK za zprostředkování pobytu na švédské univerzitě v Göteborgu v rámci výměnného programu Socrates/Erasmus.

Tato práce vznikala v letech 2006-2007 a byla financována z prostředků Lundbergovi laboratoře (Göteborg University), programem Socrates/Erasmus a částečně z projektu MŠMT ČR číslo LC 06066.

THE ROLE OF HOG MAPK SIGNALING PATHWAY DURING OSMOTIC STRESS IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells utilize a conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade (the high-osmolarity glycerol or HOG pathway) during conditions of increased external osmolarity. It evokes cellular responses necessary to permit continued growth. Activation of HOG pathway with Hog1 MAP kinase results in production of glycerol to prevent dehydration and up regulation of other Hog1 dependent genes because of cell adaptation. We were trying to find difference in translation between wild-type cells and two mutants of *hog1* gene before and after 0,4 M NaCl osmotic stress (2, 6, 30 min). We used deletion mutant *hog1Δ* and *hog1-as* mutant with point mutation which allows inhibition of Hog1 MAPK during presence of specific AS inhibitor. We tested AS inhibitor by plate test and have found optimal concentration of 5 μM for blocking Hog1 MAPK in *hog1-as* mutant. Translation profiling proves that osmotic stress decreases translation in general. *Hog1Δ* mutant and *hog1-as* AS inhibited mutant behave similarly and their translation recovers slower than the wild-type's. That confirms that *HOG1* gene is important for cell recovery from the osmotic stress.

Microarray analysis shows that Hog1 dependent genes in wild-type are induced under osmotic stress but not in *hog1* mutants. Genes up regulated after osmotic stress include genes responding to stimulus (stress), desiccation, water deprivation and sodium ion transport. After osmotic stress ribosomal genes are suppressed in wild-type cells but not in *hog1* mutants.

Saccharomyces cerevisiae, MAP kinase, osmotic stress, NaCl, adaptation, glycerol, HOG pathway, Hog1, polysomal profiling analysis, DNA microarray

Saccharomyces cerevisiae, MAP kináza, osmotický stres, NaCl, adaptace, HOG signální dráha, glycerol, Hog1, polyzomální profily, DNA čip

OBSAH

OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	10
2. VÝKLAD DŮLEŽITÝCH POJMŮ	11
2.1. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	11
2.2. OSMÓZA, OSMOTICKÝ ŠOK	12
2.3. POLYZOMY	13
3. PŘEHLED LITERATURY	14
3.1. MAP KINÁZA.....	14
3.2. <i>HOG1</i> GEN V PŘEHLEDU:.....	16
3.3. HOG SIGNÁLNÍ DRÁHA.....	16
3.3.1. <i>Sho1</i>	17
3.3.2. <i>Sln1</i>	17
3.3.3. Aktivace <i>Sln1</i> -větví.....	18
3.3.4. Aktivace <i>Sho1</i> -větví	19
3.3.5. Třetí větev HOG dráhy.....	21
3.3.6. Produkce glycerolu.....	21
3.3.7. Význam dvou větví HOG dráhy.....	22
3.3.8. ESR dráha	24
3.3.9. <i>Aquaglyceroporiny</i> a regulace intracelulárního glycerolu	25
3.3.10. Regulace HOG dráhy	26
3.3.11. Proteiny aktivované <i>Hog1</i> MAPK.....	27
3.3.12. Geny aktivované HOG dráhou	29
4. MATERIÁL A METODY	31
4.1. MATERIÁL.....	31
4.1.1. Kvasinkové kmeny:.....	31
4.1.2. Specifický AS inhibitor.....	31
4.1.3. Laboratorní přístroje.....	31
4.1.4. Speciální pomůcky.....	32
4.1.5. Chemikálie	32
4.1.6. Kultivační média.....	33
4.1.7. Roztoky.....	33
4.2. METODIKA	35
4.2.1.1. Kultivace kvasinek	35
4.2.1.2. Plotnový test – testování AS inhibitoru.....	35
4.2.1.3. Analýza polyzomálních profilů.....	36
4.2.1.3.1. Analýza polyzomálních profilů u mutantu <i>hog1Δ</i>	38
4.2.1.3.2. Analýza polyzomálních profilů u mutantu <i>hog1-as</i>	40
4.2.1.4. RNA extrakce.....	40
4.2.1.5. Agarózová elektroforéza	41
4.2.1.6. DNA čip.....	42
4.2.1.7. Protokol pro DNA čip	44
5. VÝSLEDKY	49

5.1.	PROJEKT	49
5.2.	PLOTNOVÝ TEST - TESTOVÁNÍ AS INHIBITORU	51
5.3.	ANALÝZA POLYSOMÁLNÍHO GRADIENTU	52
5.3.1.	<i>Ukázky polyzomálních profilů</i>	53
5.3.2.	<i>Analýza translační aktivity</i>	55
5.4.	DNA ČIP	58
5.4.1.	<i>Geny indukované osmotickým stresem</i>	58
5.4.2.	<i>Geny potlačené osmotickým stresem</i>	63
6.	DISKUZE	66
7.	SOUHRN	70
8.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	71

SEZNAM ZKRATEK

ATP = adenosintrifosfát

BFB = bromfenolová modř

BSA = hovězí sérum albumin

cDNA = komplementární DNA

CYC = cykloheximid

dH₂O = deionizovaná voda

ddH₂O = demineralizovaná voda

DNA = deoxyribonukleová kyselina

dNTP = deoxyribonukleotidtrifosfát

DTT = ditiotritol

dUTP = deoxyuridintrifosfát

ESR dráha = dráha reagující na environmentální stres (environmental stress response)

GDP = guanosindifosfát

GTP = guanosintrifosfát

HOG = glycerol s vysokou osmolaritou (high-osmolarity glycerol)

IAA = izoamylalkohol

MAPK = MAP kináza; mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)

MAPKK = MAP kináza kináza (mitogen-activated protein kinase kinase)

MAPKKK = MAP kináza kináza (mitogen-activated protein kinase kinase kinase)

mRNA = mediátorová (messengerová, informační) RNA

NaAc = octan sodný

OD = optická denzita

PKC = proteinkináza C

RA = doména umožňující asociaci s proteinem Ras (Ras association)

RNA = ribonukleová kyselina

rRNA = ribozomální RNA

SAM = sterilní α motiv doména

SAPK = stresem aktivovaná proteinkináza (stress-activated protein kinase)

SDS = dodecylsulfát sodný

SGD databáze = databáze kvasinkového genomu (*Saccharomyces* genome database)

snoRNP = malé jadéřkové ribonukleolární ribonukleoproteinový komplex

SSC = standardní citrátový pufr (standard saline citrate)

STRE = promotorová oblast DNA, na kterou nasedají transkripční faktory a regulují transkripci genů reagujících na stres (the stress response element)

tRNA = transferová RNA

UV = ultrafialové záření

1. ÚVOD

Cílem této práce bylo zaměřit se na gen *HOG1*, jehož produktem je MAPK zodpovědná za zotavení se z osmotického šoku u modelového organismu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

V první části práce byl testován AS inhibitor, který blokuje funkci enzymu Hog1 v mutantu *hog1-as*. A dále hledána nejvhodnější koncentrace tohoto specifického inhibitoru, která je k úplné inhibici Hog1 potřebná.

Druhá část projektu byla zaměřena na analýzu polyzomálních profilů aktivně translatovaných mRNA a to v buňkách divokého typu a *hog1* mutantech, a to před a po osmotickém stresu způsobeném 0,4 M NaCl.

V třetí části práce bylo úkolem provést analýzu mRNA pomocí DNA čipu. Porovnat profily z experimentů mezi kmeny divokého typu a *hog1* mutanty, konkrétně polyzomální a celková RNA před a po osmotickém šoku.

Celkovým cílem této práce je přispět k výsledkům projektu, který zkoumá posttranskripční regulaci v *Saccharomyces cerevisiae* zaměřenou na asociaci polyzomů u genů regulovaných stresem. Výsledky pak mohou být porovnávány s výsledky jiných druhů organismů či dalšími typy stresu pro nalezení základního modelu a odlišností v buněčné regulaci. Homologní MAPK ke kvasinkové Hog1 je lidská p38 MAPK, jež se účastní reakcí na zánět. Bližší charakterizace *HOG1* a HOG signální dráhy, by tak mohly vést i k lepšímu poznání funkce lidské p38 MAPK, a tak i k novým lékařským přístupům u některých nemocí.

2. VÝKLAD DŮLEŽITÝCH POJMŮ

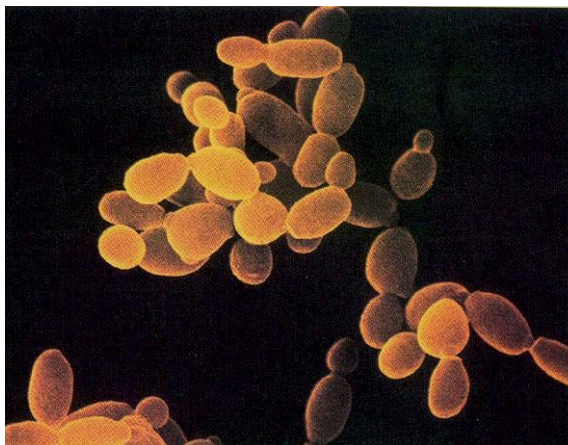
2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, patří do říše hub (Tab.1), jsou nejvíce studovaným a používaným modelovým eukaryotickým organismem v molekulární a buněčné biologii. Od roku 1996 je *S. cerevisiae* i prvním eukaryotickým organismem s kompletně osekvenovaným genomem. Kvasinkový genom je tvořen více než 6000 geny.

Kvasinky jsou malé jednobuněčné organismy s krátkou generační dobou, které mají kulatý až vejcovitý tvar s průměrem 5-10 mikrometrů (Obr. 1). *Saccharomyces cerevisiae* jsou také velmi známé díky procesu kvašení (fermentace), který provádějí. Fermentace lze zjednodušeně vyjádřit touto chemickou rovnicí: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$, kdy rozkladem glukózy produkují etanol a oxid uhličitý. Kvůli tomuto procesu jsou kvasinky používány od dávných dob a to především v pekařství a pivovarnictví (RAVEN a JOHNSON 1999).

říše:	<i>Houby</i>
kmen:	<i>Ascomycota</i>
podkmen:	<i>Saccharomycotina</i>
třída:	<i>Saccharomycetes</i>
řád:	<i>Saccharomycetales</i>
čeleď:	<i>Saccharomycetaceae</i>
rod:	<i>Saccharomyces</i>
druh:	<i>S. cerevisiae</i>

Tabulka 1. Systematické zařazení kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



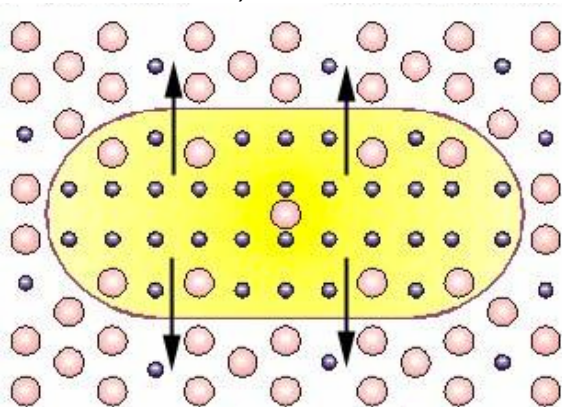
Obrázek 1. *Saccharomyces cerevisiae*, obrázek z elektronového mikroskopu. (RAVEN a JOHNSON 1999)

2.2. Osmóza, osmotický šok

Osmózou nazýváme difúzi kapalin přes polopropustnou překážku, například biologickou membránu. Je to velmi důležitý proces v živých organismech a v rostlinách. Například buněčná blána obsahující plazmu živé buňky je polopropustná. Pronikají jí molekuly různých látek potřebných k výživě buňky. Molekuly bílkovin buněčnou blánou neproniknou (SVOBODA *et al.* 1998).

Molekuly vody, ale i rozpuštěných látek, difundují z oblastí s vysokou koncentrací této látky do oblastí s nízkou koncentrací, tedy po koncentračním spádu. Pokud dvě prostředí mají různou osmotickou koncentraci, prostředí s vyšší koncentrací se nazývá hypertonické a prostředí s nižší koncentrací hypotonické. Pokud je osmotická koncentrace obou prostředí stejná, jedná se o roztoky izotonické (RAVEN a JOHNSON 1999).

Plazmatická membrána buňky od sebe odděluje dvě odlišná prostředí. Prvním je cytoplazma, tedy vnitřní prostředí buňky, druhým je okolí buňky, tedy extracelulární prostředí. Směr difúze molekul vody mezi prostředími oddělenými polopropustnou plazmatickou membránou závisí na koncentraci látek obou prostředí. Pokud je v okolí buňky hypotonické prostředí, molekuly vody difundují do vnitřku buňky a její objem se zvětšuje. V prostředí izotonickém jsou obě prostředí v termodynamické rovnováze. Když je extracelulární prostředí hypertonické, nasává vodu z buňky a ta se tím scvrkává (Obr. 2). V buňce tím klesá turgorový tlak, zastavuje se transport živin. Buňka se začíná potýkat s nedostatkem sloučenin důležitých pro život včetně vody. Dochází tím k ochromení buněčných aktivit a k tzv. osmotickému šoku (RAVEN a JOHNSON 1999).



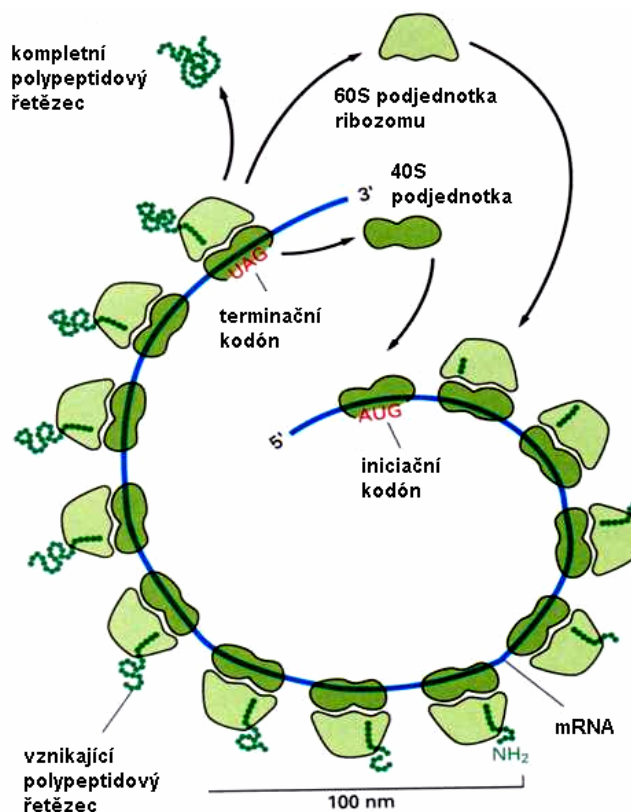
Obrázek 2. Hypertonické prostředí. Koncentrace rozpuštěné látky (větší růžové kruhy) je vyšší vně buňky. Koncentrace molekul vody (malé šedé kruhy) je větší uvnitř buňky (žlutě). Aby došlo k ustálení termodynamické rovnováhy, začnou molekuly vody vytékat z buňky (označeno šipkami) dokud se koncentrace obou prostředí nevyrovná.
<<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/hypert.jpg>> [cit. 2006-11-11]

2.3. Polyzomy

Polyzomy (*polyribozomy*) jsou shluky ribozomů přisedlých na molekule mRNA. Několik ribozomů tak může současně překládat jednu molekulu mRNA a syntetizovat tím stejné proteiny. Polyzomy mohou vypadat jako shluky, lineární řady nebo běžně jako rozety. mRNA se může stočit do kruhového útvaru, který napomáhá zužitkování a recyklaci ribozomů z 3' polyA konce k 5' čepičkovému konci (Obr. 3). Můžeme nalézt ribozomy volné nebo přisedlé a ty mohou být buď vázané k cytoskeletu nebo k membráně.

Počet polyzomů nasedlých na mRNA je známkou translační aktivity.

<<http://en.wikipedia.org/wiki/Polysome>>



Obrázek 3. Polyzomy. Jednotlivé eukaryotické ribozomy nasedlé na jedné molekule mRNA (označena modře), kterou synchronně translatují tvoří polyzomy. Na obrázku jsou vidět malé a velké podjednotky ribozomů vybarvené zelenou a světle zelenou barvou. Translací po sobě jdoucích tripletových kodonů (červeně je vyznačeny iniciační a terminační kodón) syntetizují ribozomy polypeptidové řetězce.

<http://www.unc.edu/courses/2005spring/biol/050/007/polysome_files/image002.jpg>

[cit. 2006-11-11]

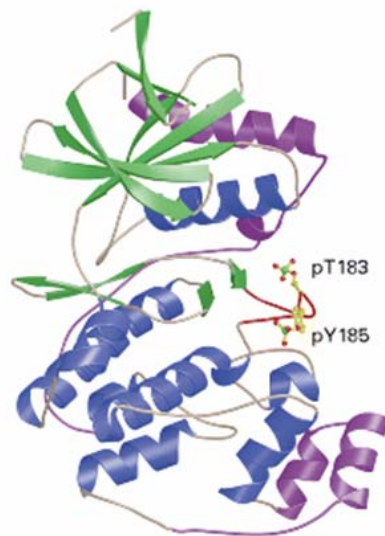
3. PŘEHLED LITERATURY

3.1. MAP kináza

MAP kináza je specifická serin/treoninová proteinkináza, která reaguje na extracelulární stimul (mitogen) a reguluje rozmanité aktivity buňky jako je například exprese genů, mitóza, dělení buňky, růst buňky, buněčná diferenciace, apoptóza (PEARSON *et al.* 2001).

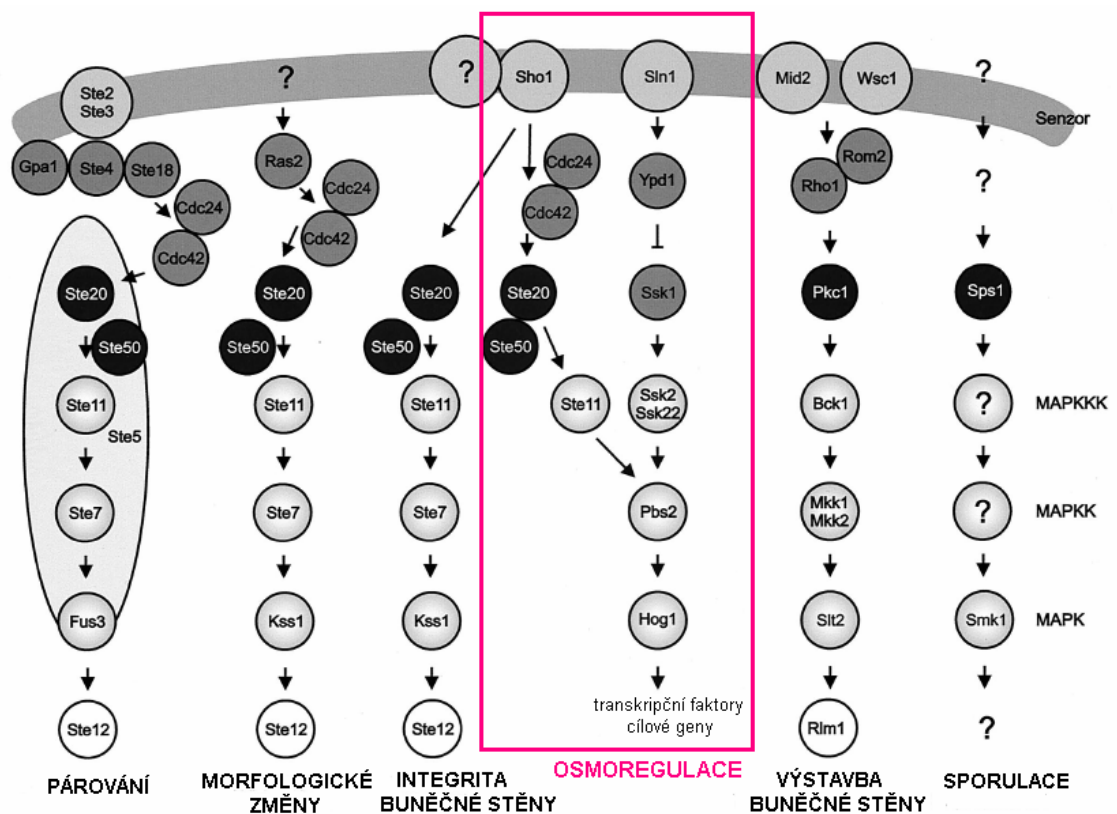
MAP kinázové kaskády jsou evolučně konzervované od kvasinek až po savce. Vnější podráždění buňky vede až k aktivaci MAP kinázy a to prostřednictvím tzv. signální kaskády (MAPK kaskáda) (Obr. 5). Na povrchu buňky dojde k navázání ligandu na transmembránový receptor, čímž dojde ke změně konformace receptoru

v intracelulární oblasti a tím je indukována změna konformace G-proteinu. G-protein uvolní GDP a naváže na sebe GTP čímž se zaktivuje. Poté putuje po vnitřní straně membrány, kde iniciuje aktivitu enzymu, který pak katalyzuje vznik malé molekuly, zvané druhý posel. Druhý posel vzniká ve velkém množství a difunduje po celé buňce, kde působí jako alosterický efektor různých proteinů. Dojde tím k aktivaci MAP kinázy kinázy kinázy (MAPKKK neboli MAP3K), ta aktivuje MAP kinázu kinázu (MAPKK též MAP2K) a ta nakonec MAP kinázu (MAPK). K aktivaci kináz dochází prostřednictvím fosforylace aminokyselinových zbytků. MAP kinázy jsou aktivovány fosforylací treoninu (občas serinu) a tyrozinu (Obr. 4). Dimerická forma aktivované MAP kinázy proniká do jádra, kde aktivuje tvorbu transkripčních faktorů (LODISH *et al.* 2000). Zdá se, že část aktivovaných MAPK je přítomna též v cytoplasmě, kde působí jako posttranslační regulát (HOHMANN 2002).



Obrázek 4. Struktura MAP kinázy – její aktivovaná forma s fosforylovaným tyrozinem 185 (pY185) a treoninem 183 (pT183). Narozdíl od neaktivované formy zde došlo ke konformační změně úseku označeného červeně. Tato změna umožňuje dimerizaci MAP kinázy a její navázání k určitému proteinu.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bo okres.fcgi/mcb/ch20f30.gif>>
[cit. 2007-03-27]

Různé MAP kinázy zprostředkovávají specifické buněčné odpovědi týkající se například morfogeneze, buněčné smrti a reakcí na stres (PEARSON *et al.* 2001). Jednotlivé signální dráhy MAP kináz bývají často vzájemně propojené sdílením některých kináz, z čehož vyplývá, že regulační systém signálních drah je vysoce spleťový (HOHMANN 2002). Na obrázku č. 5 je vidět schématické zobrazení šesti kvasinkových signálních MAPK drah, které si rozdělují pět MAP kináz. Jsou to (i) feromonová signální dráha (the mating pheromone response pathway) (MAP kináza Fus3), (ii) dráha pseudohyphálního růstu (the pseudohyphal development pathway) (Kss1p), (iii) the HOG dráha (Hog1), (iv) PKC dráha (the protein kinase C), neboli dráha buněčné integrity (Slit2/Mpk1) a (v) dráha sporulující stěny (the spore wall assembly pathway) (Smk1p) (ELION *et al.* 2000, GUSTIN *et al.* 1998, HERSKOWITZ *et al.* 1995, POSAS *et al.* 1998).



Obrázek 5. Kvasinkové MAPK kaskády. Receptor v plazmatické membráně buňky, reaguje na vnější signál. Postupně pak dojde k aktivaci MAPKKK, MAPKK a MAPK. MAP kináza poté vstupuje do jádra, kde aktivuje transkripci různých genů. HOG kaskáda reaguje na hypertonické podmínky vnějšího prostředí a je zvýrazněna rámečkem. Příslušná MAPK se nazývá Hog1. (HOHMANN 2002)

3.2. HOG1 gen v přehledu:

Systematický název: YLR113W

Alias: SSK3

Popis názvu: High Osmolarity Glycerol response

Popis: MAP kináza účastnící se osmoregulace

Produkt genu: MAP kináza

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

3.3. HOG signální dráha

Vystavení kvasinek vysoce osmotickému prostředí v okolním médiu způsobí rapidní ztrátu nitrobuňčné vody (HOHMANN 1997) provázené zhroucením cytoskeletu (CHOWDHURY *et al.* 1992), poškozením intracelulární části buňky a zastavením růstu (GUSTIN *et al.* 1998, ALEXANDER *et al.* 2001). Cílem adaptivních reakcí je tedy obnovit turgor, znovu sestavit cytoskelet, opravit další poškození buňky a pokračovat v růstu.

Sůl v obklopujícím prostředí buněk přináší buňce dva problémy. První je způsoben vysokou koncentrací kationů, která je toxická. Druhý je expozice osmotickému stresu. Některé ionty jako Na⁺ nebo Li⁺ jsou pro buňky toxické kvůli jejich schopnosti inhibovat určité metabolické dráhy. Vysoká koncentrace sodných iontů vně buňky vyvolá nárůst exprese genu *ENA1/PMR2A*, který kóduje ATPázu typu-P zodpovědnou za odtok iontů Na⁺ a Li⁺ z buňky (GARCIADEBLAS *et al.* 1993, WIELAND *et al.* 1995).

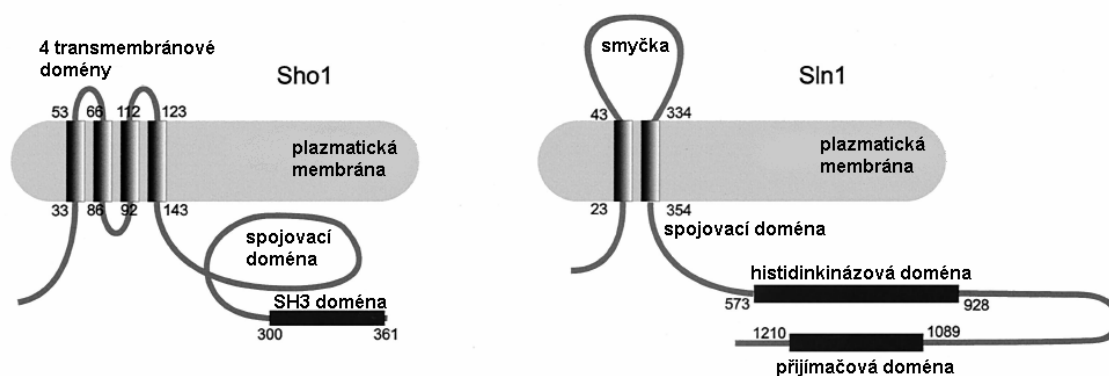
Zvýšení extracelulární osmolarity vede ke krátkodobé indukci exprese genů, které chrání buňku proti stresu. Hlavním výsledkem je pak akumulace glycerolu uvnitř buňky, která závisí na aktivaci HOG (high osmolarity glycerol) MAPK (mitogen-activated protein kinase) dráhy (BREWSTER *et al.* 1993, ALBERTYN *et al.* 1994).

HOG signální systém je nezbytný pro přežití kvasinek ve vysoce osmotickém prostředí (BREWSTER *et al.* 1993, ALBERTYN *et al.* 1994). Kvasinkové buňky používají tuto evolučně konzervovanou signální kaskádu k vyvolání buněčných odpovědí nutných pro umožnění kontinuálního růstu (WESTFALL a THORNER 2006). *S. cerevisiae* monitorují osmotické změny

prostřednictvím senzorů uložených v membráně. HOG dráha používá dva transmembránové proteiny (Sho1 a Sln1), které reagují na vysokou osmolaritu vnějšího prostředí (Obr. 6).

3.3.1. Sho1.

Sho1 je protein tvořený 367 aminokyselinami. Je složený ze čtyř předpovězených transmembránových domén, N-konce, spojovací domény a SH3 domény, která je důležitá pro protein-proteinovou interakci (Obr. 6) (POSAS a SAITO 1997, RAITT *et al.* 2000).



Obrázek 6. Topologie transmembránových receptorů HOG1 signální dráhy Sho1 a Sln1. Čísla označují pozice aminokyselin. (HOHMANN 2002)

3.3.2. Sln1.

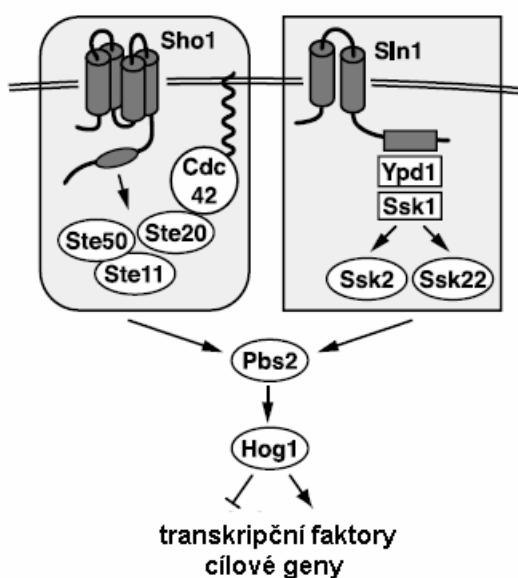
Sln1 je protein složený z 1 220 aminokyselin (Obr. 6) (OTA a VARSHAVSKY 1993). Sln1 je negativní regulátor HOG signální dráhy. Delece SLN1 genu způsobí nadměrnou aktivaci HOG dráhy, a proto je letální (MAEDA *et al.* 1994). Protein je uspořádán do čtyř zřetelných oblastí: (i) N-terminální část obsahující dvě předpovězené transmembránové domény oddělené smyčkou, pravděpodobně směřující do periplazmatického prostoru; (ii) spojovací část; (iii) histidinkinázová doména; (iv) přijímačová doména (OTA a VARSHAVSKY 1993). Histidinkinázová a přijímačová doména tvoří takzvaný dvoukomponentní systém, který je prototypem detekujících a signalizačních jednotek prokaryot (STOCK *et al.* 2000, SAITO 2001).

3.3.3. Aktivace Sln1-větví

Za izoosmotických podmínek je Sln1 aktivní a inhibuje signalizaci (POSAS a SAITO 1998). Po ztrátě turgorového tlaku, Sln1 je inaktivován což vyústí v aktivaci MAP kinázové kaskády a fosforylaci MAP kinázy Hog1. Sln1 protein používá Ypd1 a Ssk1 (Obr. 7) k aktivaci dvou navzájem zástupných MAPKKK, Ssk2 a Ssk22 (POSAS *et al.* 1996, POSAS a SAITO 1998). Oba tyto enzymy totiž fosforylují a aktivují MAPK kinázu (MAPKK) Pbs2, která pak fosforyluje Thr174 a Tyr176 v Hog1 MAPK (BREWSTER *et al.* 1993, SAITO a TATEBAYASHI 2004).

Sln1 histidinkináza je aktivována v hypoosmotickém prostředí (buňka zvětšuje svůj objem) a inhibována v hyperosmotickém prostředí (scvrknutí buňky). Sln1 a Ypd1 fungují jako negativní regulátory HOG signální dráhy jak naznačuje fakt, že delece genů *SLN1* a *YPD1* je letální kvůli přílišné aktivaci HOG signální kaskády (MAEDA *et al.* 1994). Kromě toho aktivace *SLN1* alel snižuje HOG dráze schopnost reagovat a tím i citlivost na vysokou osmolaritu (FASSLER *et al.* 1997).

Za nízké osmolarity se Sln1 protein konstantně autofosforyluje (aktivuje). Ypd1 je fosforylován za normálních podmínek ale i za méně osmoticky závažných podmínek po hyperosmotickém šoku (POSAS *et al.* 1996).



Obrázek 7. Model HOG signální dráhy. Obě větve HOG dráhy (Sho1 i Sln1) v konečném důsledku aktivují protein Pbs2, který aktivuje MAPK Hog1, ta následně vstupuje do jádra buňky, kde fosforyluje mnoho proteinů a vyvolá tak transkripci mnoha cílových genů. (O'ROURKE a HERSKOWITZ 2004)

3.3.4. Aktivace Sho1-větví

Když jsou buňky vystaveny prostředí s vyšší koncentrací rozpuštěné látky (např. 0,5 – 1,0 M NaCl), aktivace Hog1 se účastní také Sho1 receptor (MAEDA *et al.* 1995). Sho1 aktivuje GTPázu Cdc42, patřící do Rho-rodiny guanosintrifosfatáz, navázáním GTP. Cdc42 je do plazmatické membrány zakotvena C-terminálním geranylgeranyl substituentem. Cdc42 s navázaným GTP nasedne na proteinkinázu Ste20 čímž ji stimuluje a rekrutuje ji k plazmatické membráně (RAITT *et al.* 2000). Cílem Ste20 je MAPKK kináza (MAPKKK) Ste11, kterou fosforyluje (WU *et al.* 1995). Ste11 asociuje i s adaptorovým proteinem Ste50 (POSAS *et al.* 1998, WU *et al.* 1999) (Obr. 7, 8).

Ste11 zajišťuje odezvu MAPK drah během osmotického stresu, ale účastní se také MAPK dráhy pseudohyfálního růstu v diploidních buňkách během nedostatku specifických živin (ROBERTS a FINK 1994, MOSCH a FINK 1997, ERDMAN a SNYDER 2001).

Ste50 protein obsahuje N-terminální sekvenci pojmenovanou jako sterilní α motiv (SAM) doména. SAM doména je součástí několika dalších proteinů a účastní se protein-proteinových interakcí (PONTING 1995, JANSEN *et al.* 2001). Stejný typ domény vlastní i kináza Ste11 (KWAN *et al.* 2004). Hlavní funkcí SAM-SAM domén je zajistit interakci obou výše zmíněných proteinů (WU *et al.* 2006).

Součástí struktury Ste50 je kromě SAM domény ještě RA (Ras association) doména a to na C-konci (PONTING a BENJAMIN 1996). Ta zajišťuje lokalizaci proteinového komplexu Ste11-Ste50 do plazmatické membrány (WU *et al.* 2006), pravděpodobně nasednutím GDP- nebo GTP-formy GTPázy Cdc42 (TRUCKSES *et al.* 2006). Výsledky pokusů prokazují, že interakce Ste11 s Pbs2 (POSAS a SAITO 1997) a s Sho1 (ZARRINPAR *et al.* 2004) nejsou dostatečné pro aktivaci celé HOG dráhy, pokud proteinu Ste50 chybí již zmíněná RA doména (TRUCKSES *et al.* 2006).

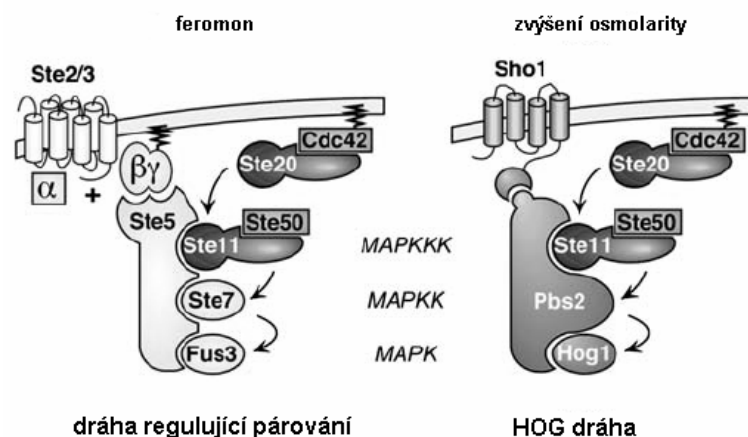
WU *et al.* (2006) objevili novou komponentu Sho1 větve HOG signální dráhy. Je jím jednoduchý transmembránový protein Opy2, který poskytuje proteinu Ste50 kotvu pro přichycení k buněčné membráně, a tak s ním interaguje. Pokusy potvrdily, že pro aktivaci HOG dráhy je nutný jak receptor

Sho1, tak protein Opy2, který zajišťuje lokalizaci proteinového komplexu Ste50/Ste11 k plazmatické membráně (WU *et al.* 2006).

Aktivace Sho1-větvě HOG signální dráhy zahrnuje náhlé a krátkodobé formování proteinového komplexu na povrchu buňky a to speciálně v místech buněčného růstu (RAITT *et al.* 2000, REISER *et al.* 2000). Vytvořený komplex je složen přinejmenším ze Sho1 a Pbs2 proteinů. Tyto dva proteiny interagují prostřednictvím prolin-bohaté oblasti (okolo 96. aminokyseliny na N-konci) u Pbs2 a SH3 domény lokalizované na hydrofóbním C-konci Sho1 (MAEDA *et al.* 1995, POSAS a SAITO 1997). Úspěšná signalizace, to jest fosforylace a aktivace Pbs2, vede k rozpadu zmíněného proteinového komplexu (REISER *et al.* 2000).

Proteinový komplex Sho1 větve HOG dráhy tvořený u povrchu buňky sdílí některé komponenty s proteinovým komplexem MAPK dráhy pseudohyfálního růstu aktivované feromonem a Ste2/3 receptory (DOHLMAN a THORNER 2001, O'ROURKE *et al.* 2002, SCHWARTZ a MADHANI 2004). Aktivace HOG dráhy i dráhy pseudohyfálního růstu je spjata s rekrutováním proteinů k plazmatické membráně (Pbs2 nebo Ste5) (PRYCIAK a HUNTRESS 1998, REISER *et al.* 2000), jak je vidět na obrázku č. 8.

Bylo zjištěno, že adaptorový protein Ste50 je zcela esenciální pro funkci Ste11 během reakcí na osmotický stres, ale je jen částečně vyžadován pro správnou funkci dráhy pseudohyfálního růstu (O'ROURKE a HERSKOWITZ 1998, POSAS *et al.* 1998, WU *et al.* 1999, JANSEN *et al.* 2001).



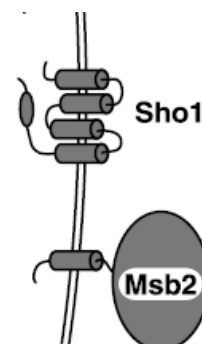
Obrázek 8. Model MAPK drah. Stejné komponenty MAPK drah Sho1 větve HOG dráhy a signální dráhy vedoucí k párování aktivované kontaktem feromonů s receptory Ste2/3. Obě tyto signální dráhy mají proteinový komplex tvořen některými společnými proteiny jako je Cdc42, Ste20, Ste11 a Ste50. Aktivace obou drah je spjata s rekrutováním proteinů k plazmatické membráně. (LAMSON *et al.* 2006)

3.3.5. Třetí větve HOG dráhy

O'ROURKE a HERSKOWITZ (2002) identifikovali třetí osmosenzor, který spouští HOG signální dráhu. Je jím receptor Msb2, který je tvořen jedním transmembránovým segmentem (pozice aminokyselin 1186-1208). Celkový obsah aminokyselin serinu a treoninu v molekule Msb2 je 43%. Velká extracelulární doména, která je tvořená 1166 aminokyselinami, pravděpodobně obsahuje sedm sedmnácti aminokyselinových repetitivních bohatých na serin a treonin. Krátká intracelulární část má jen 98 aminokyselin. Msb2 prostřednictvím velké extracelulární domény nejspíše umožňuje interakci plazmatické membrány s buněčnou stěnou, čímž by Msb2 mohlo monitorovat mechanický stres.

Protein Msb2 během zvýšené osmolarity pravděpodobně vzájemně s Sho1 receptorem (Obr. 9) spouští Sho1-Ste11 větev HOG dráhy. Aby během hyperosmotických podmínek došlo k maximální stimulaci prostřednictvím této větve jsou vyžadovány oba proteiny Sho1 i Msb2. Receptor Msb2 může též využívat i feromonovou dráhu pro fyziologicky významné procesy (O'ROURKE a HERSKOWITZ 2002).

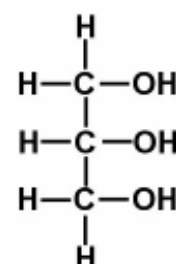
Obrázek 9. Transmembránové receptory Sho1 a Msb2 jejichž stimulací je aktivována Sho1-Ste11 větev HOG signální dráhy. Msb2 osmosenzor je tvořen velkou extracelulární a krátkou intracelulární doménou. Sho1 osmosenzor je složen ze čtyř transmembránových segmentů a intracelulární SH3 domény. (O'ROURKE a HERSKOWITZ 2002)



3.3.6. Produkce glycerolu

Obě větve Sho1 i Sln1 stimulují fosforylaci Pbs2 proteinu (POSAS a SAITO 1997, VAN WUYTSWINKEL *et al.* 2000), který následně aktivuje Hog1. Aktivní Hog1 je transportován do jádra (FERRIGNO *et al.* 1998, REISER *et al.* 1999), kde vyvolává transkripci asi 600 genů (O'ROURKE a HERSKOWITZ 2004). Dva cílové geny HOG

Obrázek 10. Chemický vzorec glycerolu



dráhy kódují enzymy účastníci se produkce glycerolu (chemický vzorec glycerolu Obr. 10), který slouží jako osmolyt zvyšující nitrobuňčný osmotický tlak (KLIPP *et al.* 2005). Malé molekuly glycerolu zvyšují celkovou koncentraci rozpuštěných látek v nitru buňky a tím zajišťují osmotickou stabilizaci (WESTFALL *et al.* 2004). Akumulace glycerolu je řízena také rychlým zavíráním aquaglyceroporinů Fps1, což jsou osmoticky řízené glycerolové kanály (KLIPP *et al.* 2005). Snížení aktivity HOG signální dráhy je způsobeno defosforylací proteinu Hog1 (WOJDA *et al.* 2003).

Glycerol je tvořen z meziprojektu glykolýzy dihydroxyacetonfosfátu dvěma kroky katalyzovanými nejprve glycerol-3-fosfátdehydrogenázou (Gpd) a poté glycerol-3-fosfatázou (Gpp). Oba tyto enzymy existují ve dvou izoformách, Gpd1, Gpd2 a Gpp1, Gpp2. Delecí odpovídajících genů *GPD1*, *GPD2*, *GPP1*, *GPP2* dojde ke zrušení produkce glycerolu, což zapříčiní přecitlivělost buňky na osmotické prostředí (LARSSON *et al.* 1993, ALBERTYN *et al.* 1994, NORBECK *et al.* 1996, ANSELL *et al.* 1997, SIDERIUS *et al.* 2000, PÅHLMAN *et al.* 2001).

Důležitým enzymem pro tvorbu a akumulaci glycerolu je PFK2 (6-fosfofrukto-2-kináza), jehož aktivace zvyšuje množství fruktózy-2,6-bisfosfátu a tím podněcuje větší aktivitu glykolýzy. Při vystavení buňky osmotickému šoku dojde k nápadnému zvýšení jeho hladiny a ke snížení hladiny glukózy-6-fosfátu, která je jednou z výchozích sloučenin glykolýzy. Buňky, které postrádají *PFK2*, shromažďují glycerol velmi pomalu a dosáhnou zhruba jen třetiny maximální koncentrace glycerolu u normálních buněk. V tomto případě hladina glukózy-6-fosfátu příliš neklesá a nedostatek glycerolu v hyperosmoticky stresované buňce nedovoluje pokračovat v růstu. Hyperosmolarita tedy aktivuje nejen MAP kinázu HOG, ale i enzym *PFK2*. Samotný *PFK2* bez aktivace HOG dráhy a bez zvýšené exprese glycerol-3-fosfátdehydrogenázy však není dostačující pro vyrovnání zvýšeného osmotického šoku (DIHAZI *et al.* 2004).

3.3.7. Význam dvou větví HOG dráhy

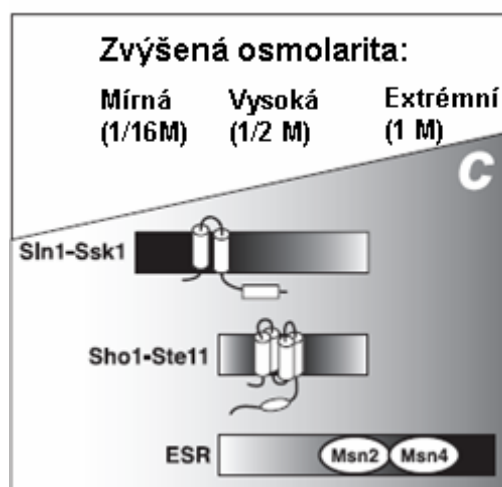
Některé genetické údaje naznačují, že horní větve HOG dráhy pracují nezávisle jedna na druhé. Zablokování jedné větve stále dovoluje během osmotického šoku prudkou fosforylací Hog1 proteinu a takové buňky jsou

očividně zcela odolné vůči vysoké osmolaritě. Ačkoliv tato pozorování napovídají o nadbytečné úloze dvou větví, je nepravděpodobné, že by si buňka udržovala dvě rozdílné dráhy k aktivaci Pbs2.

Bylo navrženo, že odlišná citlivost dvou větví možná umožňuje buňce zareagovat na širokou škálu osmotických změn (MAEDA *et al.* 1995). Ve dvojnásobném mutantovi *ssk2 Δ ssk22 Δ*, který je zcela závislý na Sho1 větvi, je potřeba přinejmenším 300 mM NaCl v extracelulárním prostředí buňky, aby došlo k fosforylaci tyrozinu Hog1 proteinu a tím i k jeho stimulaci. Aktivita Hog1 je viditelná asi po 2 minutách a dosahuje maxima v čase 5 minut. Oproti tomu v mutantovi *sho1Δ ssk22Δ*, který je naopak závislý pouze na Sln1 větvi je patrná fosforylace Hog1 už při koncentraci NaCl 100 mM a při koncentraci 300 mM NaCl je maximální již po 1 minutě. Tato data svědčí o tom, že Sln1 je citlivější receptor než receptor Sho1 větve (HOHMANN 2002).

Obě větve HOG dráhy pravděpodobně formují osmotické odezvy a spojují potřebu buněčné expanze v závislosti k osmotickým signálům vytvořených růstem a prostředím (HOHMANN 2002). Zdá se, že Sln1-Ssk1 větev HOG dráhy je specializována na odezvy podmínek s mírnou osmolaritou a další dráhy jako třeba základní dráha odpovídající na environmentální stres, tzv. ESR dráha (the environmental stress response pathway), zřejmě přispívají společně s oběmi větvemi HOG dráhy k reakcím na extrémnější hyperosmotické podmínky (O'Rourke a HERSKOWITZ 2004).

Obrázek 11. Odlišné hyperosmotické podmínky spouštějí různé dráhy. "C" označuje koncentraci rozpuštěné látky, která roste zleva doprava). ESR dráha je během extrémního osmotického stresu používána přednostně (GASCH *et al.* 2000). Větev HOG dráhy Sln1-Ssk1, ale ne větev Sho1-Ste11, je používána během mírného osmotického stresu. Během středního hyperosmotického stresu ke změnám genové exprese významně přispívají dráhy ESR, Sln1-Ssk1 i Sho1-Ste11. (O'Rourke a HERSKOWITZ 2004)



Nedostatečná aktivita HOG dráhy má za následek dramatické snížení odolnosti kvasinkových buněk na osmotický stres. To ukazuje, že tato signální dráha je důležitá v odezvách na vysoký osmotický stres (BREWSTER *et al.* 1993).

Hog1 aktivace a Hog1 dependentní stimulace transkripce jsou pomíjivé procesy indikující přísnou kontrolu zpětnou vazbou. O několika proteinfosfatázách je známo, že jsou negativními regulátory dráhy. Ačkoliv celková organizace systémů je dobře charakterizována, jsou zde stále otevřené otázky týkající se zásadních mechanismů jako je aktivace a deaktivace systému a kontroly zpětnou vazbou (KLIPP *et al.* 2005).

Homologem kvasinkové Hog1 kinázy je savčí MAPK p38, která se účastní reakcí buňky na zánět a různé druhy stresu (HAN *et al.* 1994, RAINGEAUD *et al.* 1995) jako je teplotní šok, hyperosmolarita, ultrafialové záření (HAN *et al.* 1994, PRICE *et al.* 1996). Aktivace p38 MAPK vede k aktivaci monocytů (makrofágů) (HAN *et al.* 1994), T-lymfocytů (MAULON *et al.* 1998) a k produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou interleukin (IL)-1 β a tumor nekrotizující faktor (TNF)-alfa (LEE *et al.* 1994).

3.3.8. ESR dráha

ESR dráha je signální dráha buňky reagující na environmentální stres jenž zahrnuje například náhlé změny teploty, osmolarity vnějšího prostředí, vystavení účinku chemické látky, nedostatku živin (GASH *et al.* 2000). Zahrnuje v sobě asi 900 genů, což je více než 14% kódujících sekvencí genomu kvasinek (BALL *et al.* 2000). V této dráze hrají důležitou roli transkripční faktory Msn2 a Msn4, které v jádře nasedají na promotorovou oblast DNA zvanou STRE (the stress response element) a aktivují transkripci mnoha genů (KOBAYASHI a McENTEE 1993, MARCHLER *et al.* 1993, MARTINEZ-PASTOR *et al.* 1996).

Mezi geny inhibované dráhou ESR patří přibližně 600 genů. Jsou to geny zahrnuté v růstových procesech, RNA metabolismu (úpravy RNA, iniciace a elongace, syntéza a úpravy tRNA), biosyntéze nukleotidů, sekreci a dalších metabolických procesech. Represi ribozomálních genů během mnohonásobného stresu buňky poprvé pozoroval WARNER (1999) a je známo,

že je regulovaná transkripčním faktorem Rap1 (Moehle a Hinnebusch 1991, Li *et al.* 1999).

Genů indukovaných ESR dráhou je asi 300 a z nich téměř 60% není kompletně charakterizováno. Tyto geny pomáhají buňce ubránit se nehostinným podmínkám během stresu. Účastní se rozmanitých biologických procesů jako je metabolismus sacharidů, detoxifikace kyslíkových radikálů, redoxních reakcí, modifikací buněčné stěny, skládání proteinů a jejich degradace, oprava poškozené DNA, metabolismus mastných kyselin, transport metabolitů, procesy odehrávající se ve vakuolách a mitochondriích a také intracelulární signalizace (GASH *et al.* 2000).

Bylo zjištěno, že buňka reaguje ESR dráhou na odlišné současně probíhající stresy tak, že jejich účinek sečte. Například reakce na teplotní šok a současné následky osmotických změn vyústí v aditivní efekt v genové expresi. Mohlo by se předpokládat, že ESR dráha bude regulována jedním univerzálním systémem. Důkazy ale naznačují, že dráha ESR není regulována jedním systémem, ale odlišnými regulačními systémy podle různých podmínek prostředí (GASH *et al.* 2000). Stejně tak i geny indukované během environmentálního stresu jsou regulovány různými transkripčními faktory v závislosti na konkrétních podmínkách prostředí (REP *et al.* 1999).

Některé geny regulované dráhou ESR (např. represe ribozomálních genů) byly původně demonstrovány jako geny regulované dráhou PKA (KLEIN a STRUHL 1994, NEUMAN-SILBERBERG *et al.* 1995, NIERRAS a WARNER 1999). Signální dráha PKA, která odpovídá na signály týkající se výživy buňky, je pravděpodobně nadřazena dráze ESR a reguluje ji. Podle situace je ESR dráha regulována i dalšími signálními dráhami. V stavu, kdy je narušena sekrece buňky, je aktivována PKC dráhou. Když dojde k poškození DNA v jádře, je aktivována specifickou Mec1 dráhou. ESR dráha je tedy regulována jinými signálními dráhami v závislosti na okolnostech (GASH *et al.* 2000).

3.3.9. Aquaglyceroporiny a regulace intracelulárního glycerolu

Pro regulaci glycerolu v buňce během osmotického šoku je velmi významný aquaglyceroporin Fps1, neboť plazmatická membrána kvasinek je

sama o sobě nepropustná pro glycerol (HOHMANN 2002, KARLGREN *et al.* 2005).

Hladina intracelulárního glycerolu je řízena pasivním exportem této chemické látky zprostředkovaným Fps1 kanálem (LUYTEN *et al.* 1995, TAMÁS *et al.* 1999, HOHMANN 2002, OLIVEIRA *et al.* 2003). Aby se během hyperosmotického šoku zaručilo udržování glycerolu uvnitř buňky, Fps1 zcela ztrácí schopnost přenosu glycerolu (LUYTEN *et al.* 1995, HOHMANN 2002). K tomu, aby byl transport zcela zastaven, je zapotřebí N-terminální část Fps1. Delecí této domény dochází k hyperaktivaci Fps1 (Fps1- Δ 1) (TAMÁS *et al.* 1999, TAMÁS *et al.* 2003) a buňka není schopná zadržet glycerol. Tudíž okamžitě po hypoosmotickém šoku Fps1 uvolňuje glycerol ven z buňky. Z tohoto důvodu se buňka stává přecitlivělou již na hypoosmotický šok (TAMÁS *et al.* 1999). KARLGREN *et al.* (2005) však zpochybňují důležitost N-terminální domény v Fps1 proteinu, jelikož pokusy prokázaly, že Fps1- Δ 1 nepropouští více molekul vody než kompletní kanál Fps1, a tak pravděpodobně zkrácení N-terminální části nebylo až tak zásadní pro konformaci Fps1.

Fps1 funguje jako ventil pro nadbytečný glycerol (HOHMANN *et al.* 2002). Pro kvasinku je životně důležité, že Fps1 je schopen rozeznat molekuly vody, které narozdíl od molekul glycerolu nepropouští. Expresе vodních kanálů učiní buňku osmoticky citlivou (PETTERSSON *et al.* (unpublished data) podle KARLGREN *et al.* 2005). SIDOUX-WALTER a HOHMANN zjistili, že během hyperosmotického stresu je u kvasinek redukována exprese aquaporinu Aqy2 (SIDOUX-WALTER a HOHMANN (unpublished data) podle KARLGREN *et al.* 2005).

Aquaglyceroporiny patří do skupiny MIP kanálových proteinů (BORGNI A *et al.* 1999, HOHMANN *et al.* 2001,), a tak jsou schopné zprostředkovávat pasivní transport chemických látek oběma směry. MIP kanály se nacházejí u mnoha organismů, od *Archea* až po člověka a hrají významnou roli v kontrole toku vody a rozpuštěných látek přes buňky a tkáně (HOHMANN *et al.* 2001).

3.3.10. Regulace HOG dráhy

Aktivace dráhy HOG, která zprostředkovává transkripční, posttranskripční a posttranslační odezvy v kvasinkách (HOHMANN *et al.* 2001,

DE NADAL *et al.* 2002, O'ROURKE *et al.* 2002) je krátkodobá a je striktně kontrolována zpětnou vazbou. Tato regulace je důležitá i proto, že aktivní Hog1 kináza zastavuje buněčnou proliferaci (ALEXANDER *et al.* 2001).

Deaktivace dráhy HOG koreluje s akumulací glycerolu uvnitř buňky a tím i úspěšnou adaptací na osmotický šok (SIDERIUS *et al.* 2000, KRANTZ *et al.* 2004). HOG dráha kontroluje produkci glycerolu přinejmenším na dvou úrovních. Nejprve MAPK Hog1 aktivuje enzym fosfofrukto-2-kinázu, který stimuluje glykolýzu a zvyšuje tím produkci glycerolu (DIHAZI *et al.* 2004). Dále tím, že Hog1 zvýší expresi genů *GPD1* a *GPP2*, a tak i produkci glycerolu (ALBERTYN *et al.* 1994, HIRAYAMA *et al.* 1995, NORBECK *et al.* 1996).

Aktivace i deaktivace HOG dráhy je pravděpodobně zprostředkována osmotickými změnami (KARLGREN *et al.* 2005). Aktivace Hog1 MAP kinázy je krátkodobá. Když je osmotický šok vyvolán nízkou dávkou osmotické látky (např. 0,4 M NaCl), Hog1 je maximálně fosforylován během jedné minuty a tato aktivace ustává okolo 30 minut. Při silném osmotickém šoku (např. 1,4 M NaCl) kulminuje fosforylace Hog1 v čase okolo 30 minut a přetrvává po několik hodin dokud neklesne. Načasování a doba odezvy závisí na vážnosti osmotického šoku. Tato pozorování demonstrují, že HOG dráha je regulována specifickou negativní zpětnou vazbou. Důležité je, že dráha může být po osmotickém šoku během momentu znovu stimulována a není znečitlivěna či automaticky inaktivována (HOHMANN *et al.* 2002).

3.3.11. Proteiny aktivované Hog1 MAPK

Mezi transkripční faktory aktivované během osmotického stresu dráhou HOG patří Sko1 (PROFT a SERRANO 1999), Msn1, Msn2 a Msn4 (SCHMITT a McENTEE 1996, REP *et al.* 1999), Hot1 (REP *et al.* 1999), Smp1 (De NADAL *et al.* 2003) a Crz1 (MATHEOS *et al.* 1997, STATHOPOULOS a CYERT 1997), Sgd1 (AKHTAR *et al.* 2000), Gcn4 (PASCUAL-AHUIR *et al.* 2001) a Skn7 (BROWN *et al.* 1994). Hog1 kináza nejen že přímo aktivuje výše zmíněné transkripční faktory, ale také v komplexu společně s nimi nasedá na promotory

osmoticky indukovaných genů a vyvolává transkripci (ALEPUZ *et al.* 2001, PROFT a STRUHL 2002).

Transkripční faktor Sko1 slouží jako represor osmoticky indukovaných genů společně s korepresorovým komplexem Cyc8-Tup1 (PROFT a SERRANO 1999). Asociací s kinázou Hog1 dojde k fosforylaci Sko1 a jeho konverzi v aktivátor (PROFT *et al.* 2001, PROFT a STRUHL 2002). Mezi osmoticky indukované cílové geny Sko1 patří *FAA1/COT1*, *GAT2*, *FMP43/YAP1802*, *CWP1*, *ROX1/YPR063c*, *CIN1/PUT4*, *HXT5*, *MOT3*, *MSN2*, *ALD6*, *STL1*, *SED1* (PROFT *et al.* 2005) a dále *ENA1* kódující P-typ ATPázy přenášející ionty Na⁺ a Li⁺ (PROFT a SERRANO 1999), *GRE2*, *AHP1*, glutationreduktázu *GLR1*, alkoholdehydrogenázu *SFA1* (REP *et al.* 2001), *HAL1* účastnící se iontové homeostázy (PASCUAL-AHUIR *et al.* 2001) a domnělou NAD-dependentní oxidoreduktázu *YML131w* (REP *et al.* 2001). Jak je vidět z výčtu cílových genů, Sko1 reguluje i expresi transkripčních faktorů Msn2, Mot3, Mga1 a Rox1, které zprostředkovávají expresi dalších genů reagujících na osmotický stres.

Tyrozinfosfatáza Ptp3, také indukovaná faktorem Sko1, defosforyluje Hog1 kinázu, a tak mechanismem zpětné vazby ukončí reakce HOG dráhy na osmotický stres. Proto je odezva na osmotický šok krátkodobá a přítomnost Sho1 je z důvodu regulace HOG dráhy tak důležitá (PROFT *et al.* 2005).

Transkripční faktor Mot3 umožňuje reakci na specifický stres a to tím, že sníží expresi genů, které zprostředkovávají biochemické reakce na odlišné druhy stresu, čímž umožní buňce soustředit energii na vyřešení právě probíhajícího problému. Mga1 se pravděpodobně podílí na utlumení vývoje a růstu buňky v průběhu většího stresu (PROFT *et al.* 2001).

Transkripční faktory Msn2 a Msn4, které patří k proteinům se zinkovými prsty (REP *et al.* 2000), spouštějí transkripci genů důležitých pro vyrovnání se stresem obecně, a to nasednutím na charakteristickou DNA sekvenci CCCCT v promotorech cílových genů, tzv. oblast STRE (stress response element) (MARCHLER *et al.* 1993, MARTINEZ-PASTOR *et al.* 1996, SCHMITT a McENTEE 1996). Transkripční aktivátor Msn1 patří do rodiny helix-smyčka-helix proteinů a je zahrnut v regulacích pseudohyfálního růstu a mnoha dalších procesech (REP *et al.* 1999).

Mezi cílové geny transkripčního faktoru Hot1 patří *GPD1* glycerol-3-fosfátdehydrogenáza, *GPP2* glycerol-3-fosfatáza (REP *et al.* 1999), hexózový

transporter *STL1*, katabolická L-serin/L-treoninová dehydratáza *CHA1*, symporter protonů *PHO84* a proteiny neznáme funkce *YGR043C*, *YGR052W*, *YHR087W* (REP *et al.* 2000).

Smp1 je členem proteinové rodiny obsahující MADS-box (DODOU a TREISMAN 1997). Crz1 patří mezi transkripční faktory se zinkovými prsty a je regulován defosforylací zprostředkovanou kalcineurinem (STATHOPOULOS a CYERT 1997, BOUSTANY a CYERT 2002). Sgd1 je esenciální jaderný aktivátor, který má strukturu zinkového prstu (Akhtar *et al.* 2000). Gcn4 je transkripční aktivátor, který zajišťuje biosyntézu aminokyselin a jeho exprese probíhá během strádání buňky pro nedostatek aminokyselin (HINNEBUSCH 1986). Gcn4 obsahuje ve své struktuře leucinový zip (bZIP) a ve formě homodimeru nasedá na DNA (HOPE a STRUHL 1987). Skn7 patří mezi proteiny teplotního šoku, účastní se mnoha buněčných procesů jako je oxidativní stres a metabolismus buněčné stěny. Tento aktivátor aktivuje hypoosmotické geny (BROWN *et al.* 1994).

Hog1 během hyperosmotického šoku aktivuje prostřednictvím fosforylace i proteinkinázu Rck2 patřící do rodiny kalmodulin-dependentních proteinkináz, která pak fosforyluje translační elongační faktor 2 (EF-2) (TEIGE *et al.* 2001).

3.3.12. Geny aktivované HOG dráhou

Mezi geny indukované osmotickým šokem patří například geny *GPD1* a *GPD2* kódující enzymy, které se účastní produkce glycerolu (REP *et al.* 1999). POSAS *et al.* (2000) uvedli následující výsledky indukovaných genů *Saccharomyces cerevisiae* v 0,4M NaCl po 10 min osmotického šoku. Kromě genů *GPD1* a *GPD2* zodpovědných za syntézu glycerolu detekovali zvýšenou expresi genů kódujících transmembránové transportery sacharidů jako jsou *STL1*, *HXT10*, *HXT7*, *HXT5* a domnělý hexózový transporter *STL1*, dále geny kódující enzymy, které fosforylují glukózu jako jsou *GLK1*, ale i *YDR516c* a *HXK2*. Také byla zvýšena exprese genů kódujících enzymy Tsl1, Tps1, Tps3 pro trehalózový metabolismus, jak již bylo zmíněno v dřívějších pracích

(PARROU *et al.* 1997, WINDERICKX *et al.* 1996). Hladina mRNA pro gen *NTH1* kódující neutrální trehalózu byla zvýšena také.

Do další skupiny genů aktivovaných osmotickým šokem patří geny vztažené k metabolismu glukózy *GSY2*, *GPH1*, *GLC7* (PARROU *et al.* 1997), *UGP1*, *GSY1*, *GLC3*, *GLG1*, a *GAC1*, *PPH21*. Také aktivita asi ¼ genů kódujících ribozomální proteiny byla zvýšena a rovněž genů týkajících se translace *TIF1*, *TIF2*, *PRT1*, *TIF11*, *HYP2* a *CDC95*. Osmotický stres vyústil i ke zvýšené expresi genů souvisejících s homeostázou iontů včetně ATPáz zodpovědných za odtok iontů Na⁺ a Li⁺ z buňky (*ENA1/PMR2A*) (GARCIASDEBLAS *et al.* 1993, WIELAND *et al.* 1995) a komponentů vakuolárních H⁺ ATPáz jako jsou *VMA6*, *VPH1*, *VMA7*, *VMA5* a *TFP1* vytvářejících elektrochemický gradient protonů nutný pro uložení sodných iontů do vakuoly (NASS *et al.* 1997).

A konečně geny nutné pro transdukci signálů včetně katalytické (*SRA3*) a regulační (*SRA1*) podjednotky cAMP dependentní proteinkinázy ale i cytozolické adenylátkinázy, transkripčního aktivátoru *MSN2* (SCHMITT a McENTEE 1996, MARTINEZ-PASTOR *et al.* 1996), transkripčního faktoru *HOT1* (REP *et al.* 1999), MAP kinázy *HOG1* (Gustin *et al.* 1998), kinázy *RCK2* (BILSLAND-MARCHESAN *et al.* 2000) a genu *BMH1* esenciálního pro Ras/MAPK signální kaskádu pseudohyfového růstu (ROBERTS *et al.* 1997).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Kvasinkové kmeny:

wt:

Saccharomyces cerevisiae W303-1B: MAT α , *ade2-1*, *his3-11,15* *leu2-3,112*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can1-100*

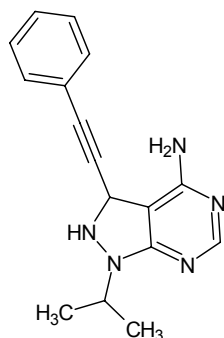
hog1 Δ :

Saccharomyces cerevisiae W303-1B: MAT α , *ade2-1*, *his3-11,15* *leu2-3,112*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can1-100*, *hog1 Δ*

hog1-as:

Saccharomyces cerevisiae W303-1B: MAT α , *ade2-1*, *his3-11,15* *leu2-3,112*, *ura3-1*, *trp1-1*, *can1-100*, *hog1-as*

4.1.2. Specifický AS inhibitor



1-isopropyl-3-(fenyletynyl)-2,3-dihydro-1H-pyrazolo[3,4d]pyrimidin-4-amin

4.1.3. Laboratorní přístroje

Fast prep 120 (Bio101) (Savant)

Ultracentrifuga XL-90 (Beckman)

Přístroj na polyzomální profily ISCO

Speed Vac Plus SC 110 A (Savant)
Skener pro DNA čipy: VersArray ChipReader (BioRad)
program Clarity® (DataApex)
program ImaGene® BioDiscovery
Microsoft® Office Excel
Chladicí centrifuga pro mikrozkušavky (Eppendorf): Microfuge R (Beckman)
Chladicí centrifuga pro kónické centrifugační zkumavky (Falcon): 4K15 (Sigma)

4.1.4. Speciální pomůcky

hybridizační komůrka - Hyb chamber (Sigma)
krycí sklíčka - Hybri-Slips 24x60 mm (Sigma)
kvasinková 6,4k microarray sklíčka - Yeast 6.4k microarray slides (Sigma)

4.1.5. Chemikálie

agar (Invitrogen)
adenin (Sigma)
kvasničný extrakt (Scharlau, Microbiology)
pepton (Scharlau)
Cycloheximid (Sigma)
Heparin (Sigma)
DTT (Sigma)
BSA (bovine serum albumin) (Amersham)
DIG Easy Hyb buffer (Roche) (pro kvasinkové 6.4k DNA čip sklíčka)
random primer (Invitrogen)
Anchored primer oligo dT (Invitrogen)
First strand buffer
dNTP mix
Cy3-dUTP (Amersham)
Cy5-dUTP (Amersham)
Superscript III enzym (Invitrogen)
CyScribe GFX Purification Kit (GE)
RiboPure™-Yeast Kit (Ambion)

mouse CotI DNA (Invitrogen)

marker Low Range Fast Ruler (Fermentas)

4.1.6. Kultivační média

a) Tekuté médium

YPD médium (1l): 20 g pepton, 10 g kvasničný extrakt, 0,06 g adenin, 960 ml dd H₂O. Sterilizovat autoklávováním. Pak přilít 40 ml sterilního 50% roztoku glukózy v dd H₂O.

b) Agarová půda

YPDA médium s 1M NaCl (100ml): 2 g pepton, 1 g kvasničný extrakt, 2,2g agar, 0,006 g adenin, 78,4 ml dd H₂O. Sterilizovat autoklávováním. Přilít 4 ml sterilního 50% roztoku glukózy ve vodě a 17,6 ml 5M NaCl.

4.1.7. Roztoky

BSA/DIG Hyb roztok: 0,25g (1%) BSA ve 25 ml DIG Easy Hyb buffer

dH₂O: deionizovaná voda

ddH₂O: demineralizovaná voda

DTT 1M, 1M roztok ditiotritolu v ddH₂O

EtOH 96 %, 96% roztok etanolu v ddH₂O

EtOH 75%, 75% roztok etanolu v ddH₂O

fenol:chloroform:IAA (PCI), fenol : chloroform : isoamylalkohol (25:24:1)

glukóza 50%, 50% roztok glukózy v ddH₂O

HCl 1M, 1M roztok kyseliny chlorovodíkové v ddH₂O

heparin, 10 mg heparinu na 1 ml ddH₂O, sterilizace filtrací, skladovat v -20 °C

CYC, 10 mg cykloheximidu na 1ml ddH₂O, sterilizace filtrací, skladovat v -20 °C

KCl 1M, 1M roztok chloridu draselného v ddH₂O

lyzační pufr: 20 mM Tris-HCl pH = 8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂,

0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml CYC, 0,5 mg/ml heparin, 1% Triton X-100

MgCl₂ 0,5M, 0,5 M roztok chloridu hořečnatého v ddH₂O

NaAc 3M, 3M roztok octanu sodného v ddH₂O, pH = 5,3

NaCl 5M, 5M roztok chloridu sodného v ddH₂O

NaOH 1M, 1M roztok hydroxidu sodného v ddH₂O

Promývací roztoky:

1. 2x SSC, 0,1%SDS

2. 1x SSC:

3. 0,1x SSC

RNAse-free H₂O

roztok A: 10% sacharóza, 20 mM Tris-HCl pH=8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂,
0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml CYC, 1 mg/ml heparin

roztok B: 50% sacharóza, 20 mM Tris-HCl pH=8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂,
0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml CYC, 1 mg/ml heparin.

sacharóza 60%, 60% roztok sacharózy v ddH₂O obarvený BFB

sacharóza 70%, 70% roztok sacharózy v ddH₂O, sterilizace filtrací

SDS, dodecylsulfát sodný

TE, pH = 8 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA)

Tris-HCl, pH = 8, 1M roztok Tris-HCl v ddH₂O

Triton X-100 20%

1x SSC, standardní citrátový pufr: 0,15 M roztok chloridu sodného a 0,015 M roztok octanu sodného

4.2. Metodika

4.2.1.1. Kultivace kvasinek

Aerobní kultivace kvasinek v tekutém médiu za třepání při teplotě 30 °C v Erlenmayerových baňkách. Kultivace na agarových půdách při teplotě 30 °C v termostatu.

4.2.1.2. Plotnový test – testování AS inhibitoru

1. Připravit 12 Petriho misek (ø 30 mm). Na každou misku je potřeba přibližně 3 ml agarového YPDA média s 1M NaCl.
2. Rozdělit médium po cca 10ml (YPDA s 1M NaCl) do 4 kónických centrifugačních zkumavek (Falcon). Uchovávat v teplotě 55 °C, aby neztuhlo. Přidat AS inhibitor a metanol podle tabulky 2. Výsledkem jsou čtyři agarová média s rozdílnými koncentracemi AS inhibitoru (0, 1, 5, 10 µM).

Tabulka 2.

inhibitor [µM]	inhibitor [µl]	metanol [µl]
0	-	20
1	5 µl 2 mM	15
5	10 µl 5 mM	10
10	20 µl 5 mM	-

3. Zaočkovat buňky do tekutého YPD média (2-3 ml). Inkubace v třepačce (225 rpm) při 30 °C během noci.

3 kmeny buněk: 1) *wt*
2) *hog1-as*
3) *hog1Δ*

4. Do 10 ml YPD média přidat 100 µl buněčné kultury z třepačky.
5. Nechat růst buňky do OD 0,3 - 0,4. Kontrola růstu kvasinek použitím spektrofotometru - měření absorbance při vlnové délce 600 nm.
6. Přenést 5 µl kapky buněčných kultur na připravené agarové misky. Ředění buněk: 0, 10x, 100x.
7. Inkubovat misky po dobu 48 hodin v termostatu při 30 °C.

4.2.1.3. Analýza polyzomálních profilů

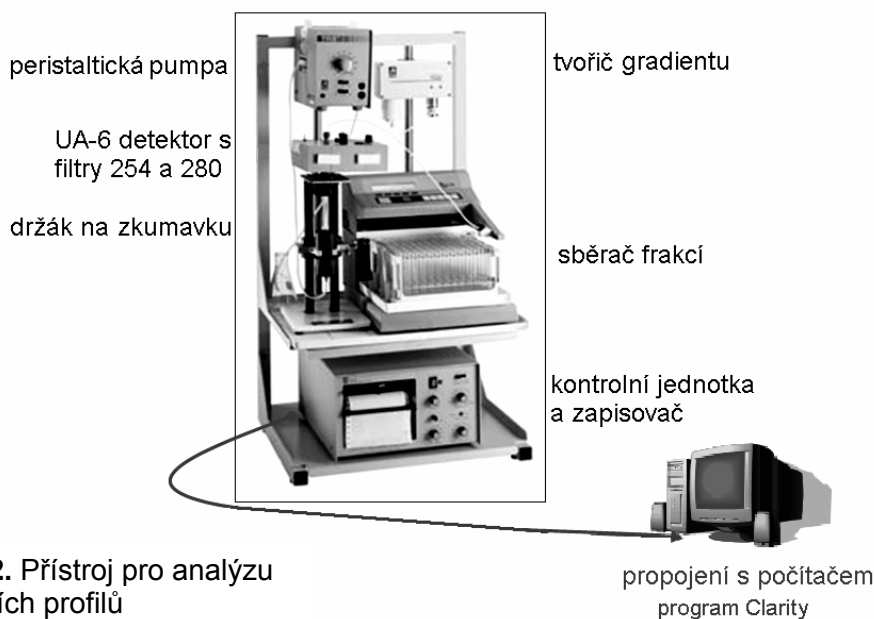
Množství polyzomů navázaných na mRNA indikuje translační aktivitu. Celková buněčná translační aktivita může být monitorována (UV měření) stejně jako mohou být zmapovány specifické geny (DNA čip, popř. Northern blot).

Při analýze polyzomálních profilů je zapotřebí připravit nejdříve buněčný lyzát, v kterém zůstanou translační komplexy neporušené. Abychom vytvořili „obraz“ asociace ribozomů v daném momentu, přidáme k rostoucím buňkám cykloheximid a ten zablokuje elongaci translace.

Rychlost sedimentace polyzomálních mRNA závisí na množství přisedlých ribozomů, přičemž čím více ribozomů na mRNA, tím více klesne. Díky tomu je možné oddělit aktivně translatovanou mRNA (polyzomální mRNA) od celkové mRNA nebo separovat různě translatované mRNA.

Aby mohlo dojít k oddělení mRNA s různým počtem ribozomů, používá se sacharózový gradient, který je ve zkumavce uspořádán od 10 % roztoku na hladině k 50% roztoku na dně. Vzorek s mRNA se pak nanese na sacharózový gradient a během ultracentrifugace sedimentuje podle množství nasednutých ribozomů. Čím více ribozomů je nasedlých na mRNA, tím níže mRNA klesne.

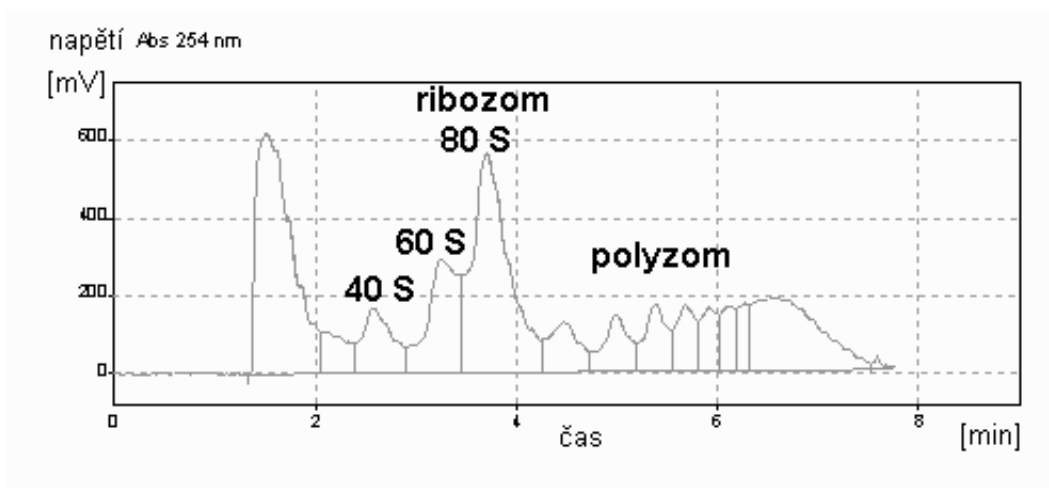
Zkumavka se sacharózovým gradientem a sedimentovanou mRNA se poté upevní do přístroje pro polyzomální analýzu (Obr. 12). Pumpa pomalu vtlačuje jehlou na dno zkumavky modře obarvený 60 % roztok sacharózy. Vzorek rozvrstvený v sacharózovém gradientu je tak pomalu vytlačován k UV detektoru, kde je proměřován při vlnové délce 254 nm.



Obrázek 12. Přístroj pro analýzu polyzomálních profilů

Po průchodu detektorem, vzorek s několikasekundovým zpožděním odtéká hadičkou, takže jej můžeme jímat a při sledování polyzomální křivky je možné od sebe oddělit různé frakce (např. polyzomální od celkové). Najímaný vzorek lze využít pro další experimenty (extrakce RNA, DNA čip).

Detektor je propojen s počítačem, kde můžeme na grafu vidět výsledky měření, tzv. polyzomální křivku (Obr. 13). Je zde zobrazena závislost napětí [mV] na čase [min]. Na křivce je patrný úsek odpovídající malé podjednotce eukaryotického ribozomu 40S, velké podjednotce ribozomu 60S, dále úsek odpovídající monozomu (na mRNA je nasednutý pouze jeden ribozom) a nakonec oblast zobrazující množství mRNA s větším počtem ribozomů (polyzomální mRNA). Z naměřených hodnot a ploch pod křivkou lze vypočítat tzv. translační aktivitu vyjádřenou v procentech. Z porovnání těchto hodnot lze vyvodit, jak se translace mění mezi odlišnými buněčnými kmeny či za různých situací.



Obrázek 13. Graf z programu Clarity zobrazující polyzomální profil. Jde o závislost napětí [mV] při absorpci 254 nm na čase [min]. Na křivce je vidět vrchol odpovídající malé podjednotce eukaryotického ribozomu 40 S, dále vrchol velké podjednotky 60 S, vrchol korespondující s celým ribozomem 80 S, a pak následuje poměrně široká polyzomální oblast.

4.2.1.3.1. Analýza polyzomálních profilů u mutantu *hog1Δ*

Připravit: 1l YPD media, 5l Erlenmayerovy baňky

Zásobní roztoky:

1. **Cycloheximid** (CYC): Rozpustit ve vodě 10 mg/ml. Sterilizace filtrací. Chránit před světlem a skladovat v -20°C.
2. **Heparin**: Rozpustit ve vodě 10 mg/ml. Sterilizace filtrací. Skladovat v -20°C.
3. **70% roztok sacharózy v ddH₂O**: Sterilizace filtrací.
4. **Lyzační pufr**: 20 mM Tris-HCl pH = 8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml CYC, 0,5 mg/ml heparin, 1% Triton X-100

Příprava buněk

1. Kultivace buněk v tekutém YPD médiu (10 ml) přes noc ve třepačce. Druhý den 50x naředěno (na OD<0,1). (10 ml buněčné kultury nalít do 1l YPD tekutého média a ponechat ve třepačce.)
2. Při hodnotě OD 0,4-0,6 odebrat první frakci kultury 200 ml (před stresem) a k ní přidat cykloheximid (čas 0). Koncentrace cykloheximidu v buněčné kultuře by měla být 0,1 mg/ml. Zchladit na ledu 5-10 min. (Cykloheximid způsobí, že ribozomy zůstanou přisedlé na mRNA v neporušeném stavu.)
3. Do buněčné kultury (800 ml) v Erlenmayerově baňce (v třepačce) přilít 69 ml 5M NaCl (0,4M osmotický stres).
4. Čas po přidání roztoku soli: 2, 6, 30 min. V příslušném čase odebrat náležitý objem buněčné kultury, přidat cykloheximid a postavit na led.

Tabulka 3.

čas	kultura [ml]	CYC [ml]	lyzační pufr [ml]
0	200	2	2,1
2	320	3,2	2,8
6	320	3,2	2,8
30	229	2,3	2,1

5. Centrifugace při 6000g, 4 °C po dobu 4 min.
6. Vylít kapalinu z láhve a k sedimentu buněk přidat 15 ml lyzačního pufru.

7. Přelít do 50 ml kónických centrifugačních zkumavek, centrifugace při 4 °C, 6000g po dobu 4 min.
8. Vylít kapalinu a přidat příslušný objem lyzačního pufru (Tab. 2).
9. Připravit mikrozkušavky se šroubovacím víčkem a naplnit je cca 0,5 ml chlazených skleněných kuliček. Přepipetovat do nich cca 700 µl buněk v lyzačním pufru.
10. Rozrušení buněk Fast prepem (2 x 45 s, rychlost 6).
11. Centrifugace: 2600g, 5 min, 4°C. Přenést supernatant (přibližně 500 µl) do čistých 1,5 ml mikrozkušavek.
12. Centrifugace: 7200g, 5 min, 4°C. Přepipetovat supernatant do nových 1,5 ml mikrozkušavek.
13. Zmrazit mikrozkušavky se vzorky na -70°C do další manipulace.

Vytvoření sacharózového gradientu

1. Připravit 50 ml 10% (roztok A) a 50% (roztok B) roztoku sacharózy obsahujícího 20 mM Tris-HCl pH = 8, 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml CYC, 1 mg/ml heparin.
2. Na přístroji pro polyzomální profily připravit do zkumavek pro rotor SW41 z výchozích roztoků A a B sacharózový gradient.
3. Zkušavky s namíchanými gradienty postavit na led.

Aplikace vzorku a ultracentrifugace

1. Buněčný lyzát (vzorky v mikrozkušavkách) vyndat z mrazáku a dát rozmraznout na led. Udržovat v chladu.
2. Opatrně aplikovat 800 µl vzorku do předchlazených zkumavek se sacharózovým gradientem.
3. Vyvážit protilehlé zkumavky se vzorky tak, aby rozdíl hmotnosti byl maximálně 0,02 g. Použít k tomu 10% sacharózový roztok (popř. lyzační pufr).
4. Ultracentrifugace vzorků v SW41 rotoru při rychlosti 225 000g po dobu 2h 40 min při 4 °C.
5. Uchovávat vzorky na ledu dokud nejsou proměřovány přístrojem na polyzomální profily.

Detekce/jímání frakcí

1. Do pumpy přístroje na polyzomální profily nasát hadičkou 60% sacharózový roztok obarvený BFB.
2. Připravit přístroj k měření. Opatrně vložit ultracentrifugovaný vzorek v SW41 zkumavce a pečlivě upevnit držákem.
3. Modrý 60% sacharózový roztok je peristalticky pumpován na dno SW41 zkumavky. Vzorek, který je po ultracentrifugaci v sacharózovém gradientu rozvrstven, je tak vytlačován do spektrofotometru, kde je proměřován.
4. Po proměření jsme vzorek jímali do čistých kónických centrifugačních zkumavek a to buď veškerý vzorek „celková RNA“ nebo jen polyzomální část „polyzomální RNA“. Postavit vzorek do ledu.
5. Přidat 1x objem GuHCl (8M), nechat 10 min na ledu. Potom přilít 1x objem chlazeného 96% etanolu. Dát přes noc do mrazáku s -20 °C.

4.2.1.3.2. Analýza polyzomálních profilů u mutantu *hog1-as*

U *hog1-as* kvasinek jsme postupovali téměř stejně jako u *hog1Δ* (viz výše). Protokol se liší v následujících bodech:

- 1) Na začátku je potřeba 1,2 l tekutého YPD média
- 2) Po odebrání 200 ml buněčné kultury (čas 0), přidat do zbylého 1 l YPD média 1 ml specifického AS inhibitoru (5 mM) (koncentrace inhibitoru v médiu je 5 μM). Nechat 15 minut třepat.

4.2.1.4. RNA extrakce

1. Centrifugace: 12 000g, 4°C, 20 min. Vylít supernatant.
2. Přidat 15 ml of 85% EtOH a znovu centrifugovat. Odstranit pečlivě supernatant a nechat uschnout za laboratorní teploty.
3. Resuspendovat ve 400 μl TE, pH = 8 (předehřátý na 50° C). Nechat několik minut dokud se vzorek nerozpustí.
4. Přepipetovat do mikrozkuvek a přidat 0,1x objem (cca 40 μl) 3M NaAc, pH = 5,3 a 2,5x objem (cca 1 ml) 100 % EtOH. Nechat 20 min v -20°C.

5. Resuspendovat v 650 μl RNase-free H_2O . Pro odstranění proteinů přidat 650 μl PCI a důkladně promíchat, a pak centrifugovat 2 min na nejvyšší rychlost.
6. Převést 500 μl vodné fáze (horní) do nové mikrokumavky.
7. Přidat 1x objem chloroformu, aby se odstranily zbytky fenolu. Míchat 2 minuty a znovu centrifugovat.
8. Přepipetovat vodnou fází do nové mikrokumavky. Přidat RNase-free H_2O , aby celkový objem vzorku byl 1 ml.
9. Přidat 450 μl 5M LiCl (konečná koncentrace 1,5M). Dát přes noc do -20°C . (Kvůli odstranění heparinu.)
10. Nechat rozmrznout vzorky na ledu. Centrifugace: 18 000g, 20 min, 4°C . Odstranit pečlivě supernatant. 2x promýt přidáním 200 μl 75% EtOH a znovu centrifugovat. Odstranit opět supernatant, nechat uschnout na vzduchu a rozpustit v 150 μl RNase-free H_2O .
11. Odstranit zbytkový LiCl přidáním 0,1x objemu (15 μl) 3M NaAc pH= 5,3 a 3x objem (600 μl) 100% EtOH. Dát do mrazáku na -20°C přinejmenším na jednu hodinu.
12. Centrifugace: 18 000g, 20 min, 4°C . Jedenkrát promýt 200 μl 75% EtOH, centrifugovat, odsát supernatant, nechat uschnout.
13. Resuspendovat v 25 μl RNase-free H_2O . Uložit do -20°C . (Dlouhodobé uskladnění v -70°C .)
14. Proměřit koncentraci RNA pomocí spektrofotometru $\lambda = 260 \text{ nm}$, 280 nm .
15. Kontrola kvality RNA (1 - 2 μg vzorku) pomocí agarózové elektroforézy.

4.2.1.5. Agarózová elektroforéza

1. Příprava 1,2% gelu: 1,2g agarózy rozpustit zahřátím v 100 ml 1xTAE pufru, zchladit na cca 60°C , nalít do vaničky a přidat ethidium bromid (výsledná koncentrace 0,175 $\mu\text{g}/\text{ml}$), zasunout hřeben a nechat ztuhnout
2. Vaničku s agarózovým gelem umístit do elektroforetického přístroje, přelít 1x TAE puftrem
3. Nanést pipetou vzorky RNA (1 - 2 μg vzorku), 12 μl marker Low Range Fast Ruler Fermentas.

4. Zapojit přístroj a nastavit napětí 75 V po dobu 35 min.
5. Gel byl vyfotografován při 280 nm

4.2.1.6. DNA čip

DNA čip (genový čip, DNA čip, genový array, DNA microarray) je metoda molekulární biologie vhodná pro porovnání exprese genů mezi různými buněčnými populacemi. Možnost použití DNA čipu pro tyto účely byla poprvé popsána v časopisu Science roku 1995.

DNA čip je tvořen tisíci jednotlivých sekvencí genů, jež jsou velmi hustě natištěny na skleněné mikroskopické sklíčko. To umožňuje studovat expresi velkého množství genů najednou. Geny jsou na sklíčkách zafixovány v podobě oligonukleotidů nebo denaturované jednořetězcové cDNA, která během experimentu slouží jako senzor. Na jednom sklíčku může být až 40 000 genových spotů. My jsme používali 6,4k sklíčka, na kterých je každý gen natištěn dvakrát a to ve formě cDNA.

Prvním krokem této metody (Obr. 14) je vybrat buněčnou populaci a extrahovat z ní RNA. Je nutné si připravit mRNA z buněk, které chceme prozkoumat (např. buňky stresované NaCl) a dále mRNA z buněk se kterými budeme výsledky srovnávat (tzv. referenční). Druhým krokem je reverzní transkripce během které se nasyntetizuje komplementární DNA (cDNA). Během této syntézy došlo k začlenění fluorescentně označeného dUTP a to prostřednictvím cy3 (u referenčních buněk) nebo cy5 (u stresovaných buněk). Třetí krok obnáší smíchání obou označených vzorků a vyčištění od nadbytečného barviva. Poté se vzorek nanese na sklíčko do vlhké hybridizační komůrky a nechá se přes noc ve tmě hybridizovat. Dojde k zde k hybridizaci cDNA ze vzorku s komplementární cDNA ze sklíčka DNA čipu.

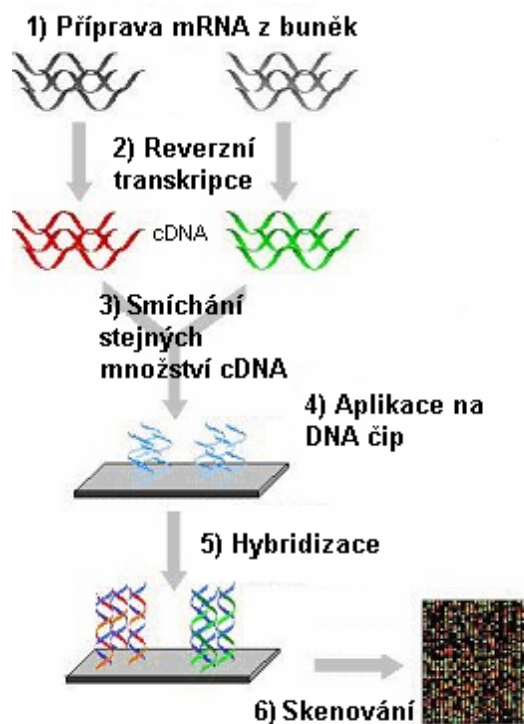
Posledním krokem je promytí sklíčka, skenování pomocí laserů a interpretace výsledků. Skenování probíhá tímto způsobem. Lasery osvětlí hybridizované cDNA, které jsou označené fluorescenčními molekulami (Cy3 a Cy5). Poté dojde k vyzáření světla excitovanými fluorescenčními molekulami, které je zachyceno detektorem. Každá fluorescenční sloučenina má svá charakteristická excitační a emisní vlnová spektra. Detektor měří a

zaznamenává intenzitu vyzářeného světla. Místa s větším množstvím navázané cDNA budou obsahovat více fluorescenčních molekul, a tak i fluorescence bude intenzivnější. Po skenování získáme dva pseudobarevné obrázky „červený“ a „zelený“ (každý pro jeden signál) jejich kombinací vznikne výsledný obrázek obsahující červená, zelená i žlutá místa. V případě, kdy je vzorek referenčních buněk označen „zeleně“ Cy3 barvivem a testované buňky „červeně“ Cy5 barvivem, lze různě barevné spoty na sklíčku DNA čipu vysvětlovat takto. Pokud má spot zelenou barvu, znamená to, že v kontrolních buňkách bylo více této mRNA, a tedy exprese konkrétního genu v testovaných buňkách byla potlačena stresem. Když je spot červený, situace je opačná. Ve stresovaných buňkách došlo k aktivaci těchto genů a ty byly více translatovány. Žlutá barva značí relativně stejnou expresi téhož genu u testovaných i referenčních buněk. Stres tyto geny tedy nijak neovlivňoval. Rozdílné intenzity barev jednotlivých spotů znázorňují odlišnosti v relativním množství genu v jednom či druhém vzorku.

Zdroj informací z příručky pro DNA čipy GE Healthcare (Amersham Biosciences)
[http://www4.amershambiosciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/WD:Microarray+Hand\(219987857-B500\)?OpenDocument&hometitle=search](http://www4.amershambiosciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/WD:Microarray+Hand(219987857-B500)?OpenDocument&hometitle=search)

Obrázek 14. Schéma metody DNA čip.
 1) Příprava mRNA ze zkoumaných a z referenčních buněk. 2) Reverzní transkripce za vzniku fluoroscenčně označených a zároveň odlišených cDNA. 3) Smíchání obou vzorků v poměrném množství. 4) Aplikace směsi cDNA na DNA čip. 5) Hybridizace s geny fixovanými na speciálním sklíčku pro DNA čip. 6) Skenování DNA čipu.

http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.microarray.lu/images/overview_1.jpg&imgrefurl=http://www.microarray.lu/en/MICROARRAY_Overview.shtml&h=377&w=393&sz=37&hl=cs&start=3&tbid=cHeAl4im1YueM:&tbnh=119&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Dmicroarray%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dcs%26newwindow%3D1%26client%3Dfirefox-a%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26sa%3DG



4.2.1.7. Protokol pro DNA čip

I. Příprava referenční RNA z nestresovaného kmene *wt* byla provedena za použití RiboPure™-Yeast Kit (Ambion)

1. **Rozrušení buněk a počáteční přečištění** pomocí chlazených kuliček oxidu zirkoničitého ve šroubovacích mikrozkuřavkách. Ultracentrifugace ve fast prepu s lyzačním pufrem, SDS a fenol:chloroform:IAA. Přesun vodné fáze s částečně přečištěnou RNA do čisté mikrozkuřavky.
2. **Finální purifikace RNA** pomocí „Binding Buffer“ a 100% etanolu aplikováním do „Filter Cartridge“ nasazených na mikrozkuřavkách. Použití promývací roztok „Wash Solutions“. Poté aplikovat vymývací roztok „Elution Solution“ a centrifugovat. RNA se nahromadí ve sběrné mikrozkuřavce.
3. **Přidání enzymu DNázy** a inkubace 30 min při 37 °C.
4. **Inaktivace DNázy** přidáním „DNase Inactivation Reagent“. Převést RNA do čisté mikrozkuřavky.

Skladování RNA vzorků v -20 °C po dobu 1-2 měsíců nebo v -80 °C po dobu delší než 2 měsíce.

II. Hybridizační protokol pro DNA čip

1. Syntéza cDNA:

a) **Nasedání primerů „Primer Annealing“**

V 1,5 ml mikrozkuřavce smíchat (je třeba 2 mikrozkuřavky na 1 DNA čip):

15-20 µg RNA

- 1 µl (3 µg) random primer (Invitrogen)
- 1.2 µl (3 µg) Anchored primer oligo dT (Invitrogen)
- RNase free H₂O doplnit do 15 µl

70°C po 10 min. Zchladit na ledu 5-10 min.

b) **Syntéza prvního vlákna „First Strand Synthesis“**

Vzorky je nutné udržovat po přidání Cy3-dUTP nebo Cy5-dUTP ve tmě! (Každý z dvojice vzorků musí být označen jinou barvou.)

Přidat:

- 6 μ l 5x First strand buffer
- 3 μ l 0,1M DTT
- 0,6 μ l dNTP mix (25mM dATP, dCTP, dGTP and 10mM dTTP)
- 3 μ l Cy3-dUTP nebo Cy5-dUTP
- 2 μ l enzymu Superscript III

Nechat 5-10 min při laboratorní teplotě (ve tmě). Poté inkubovat v 50 °C po 2h.

c) Vyčištění cDNA „cDNA Clean up“

1. Přidat 3 μ l 1M NaOH
2. Inkubovat v 70 °C po 10 minut.
3. Přidat 3 μ l 1M HCl.
4. Smíchat oba různě obarvené vzorky, které mají být hybridizovány do stejné mikrozkuhavky. (Stále chránit před světlem.)
5. Přečistit pomocí sady CyScribe GFX Purification Kit (GE).
6. Přidat 20 μ l mouse CotI DNA (Invitrogen).
7. K usušení použít Speed Vac. Nepřesušit!
8. Rozpustit v 80 μ l DIG easy Hyb buffer.
9. Zahřát ve 100 °C po 2 minuty.
10. Inkubovat ve 37 °C 20-30 min.

2. Přípravení sklíček:

Rozpustit 0,25g (1%) BSA (bovine serum albumin) ve 25 ml DIG Easy Hyb buffer předeřátého na 42°C. Nechat kývat minimálně hodinu. Stočit nerozpustné částice a přelit roztok do čisté centrifugační kónické zkuhavky.

Začít pre-hybridizaci sklíček v BSA/DIG Hyb roztoku při 42 °C v 50 ml centrifugační kónické zkuhavce. Nechat minimálně hodinu na kývačce, aby na povrchu sklíčka nedošlo k vytvoření BSA krystalů.

Poté rychle a důkladně opláchnout sklíčka ddH₂O, usušit stočením ve kónických centrifugačních zkuhavkách v centrifuze na 1000g, 1 min. Zkontrolovat zda nejsou na sklíčkách zaschlé skvrny, popřípadě znovu omýt stříčkou a stočit.

3. Hybridizace:

Položit DNA čip do hybridizační komůrky (Hyb chamber). Napipetovat 10 μ l DIG easy Hyb buffer do jamek uvnitř hybridizační komůrky, aby během hybridizace nevyschla. Přenést pipetou připravený vzorek na sklíčko (pozor na bubliny). Opatrně překrýt krycím sklíčkem Hybri-Slips 24x60 mm a uzavřít komůrku. Nechat hybridizovat při 42 °C přes noc ve tmě.

5. Promývání sklíčka po hybridizaci:

Opatrně vložit sklíčka do 50 ml kónických centrifugačních zkumavek a promývat následujícími roztoky. Zakrýt před světlem a nechat pomalu kývat.

1. 30 min v 2xSSC, 0.1%SDS předeřáté na 50 °C
2. 15 min v 1xSSC v laboratorní teplotě
3. 15 min v 0.1xSSC
4. Usušit stočením v centrifuze.
5. Skenovat.

III. Skenování DNA čipu (skener: VersArray ChipReader)

1. Vložit sklíčko.

2. Provést rychlé proskenování „quick search“ pro lokalizaci spotů:

- a. Označit oblast, kterou chceme oskenovat.

3. Pre-skenování.

- a. Rychlost 20, rozlišení 20
- b. Během pre-skenování sledovat oba barevné výstupy červený (Cy5, 635 nm) a zelený (Cy3, 532 nm) a poté upravit citlivost tak, abychom měli maximálně 1% saturovaných spotů v každém kanálu.

4. Skenování s vysokým rozlišením.

- a. Rychlost 10, rozlišení 10
- b. Použít nastavení z pre-skenování.

5. Uložit oba naskenované obrázky v podobě TIFF souborů.

jménosklíčka_1 = Cy3 (zelený)

jménosklíčka_2 = Cy5 (červený)

IV. Kvantifikace, normalizace a analýza (program Imogene®)

1. Výběr obrázku.

Načíst ve správném pořadí oba TIFF soubory programem ImaGene® BioDiscovery.

- a. Cy3 (zelený) výstup – sklíčko č.1 a Cy5 (červený) výstup – sklíčko č.2.
- b. Importovat předvytvořený templát (mřížku).

2. Urovnání mřížky.

- a. Automatické vyrovnání.
- b. Manuální upravení. Snaha aby mřížka byla správně uspořádána podle spotů.

3. Kvantifikace.

- a. Provést měření.
- b. Uložit.

4. Normalizace.

Pro normalizaci dat byla použita klasická metoda normalizace typu *lowess* (*locally weighted regression*) (CLEVELAND a DEVLIN 1988) přímo programem Imogene®

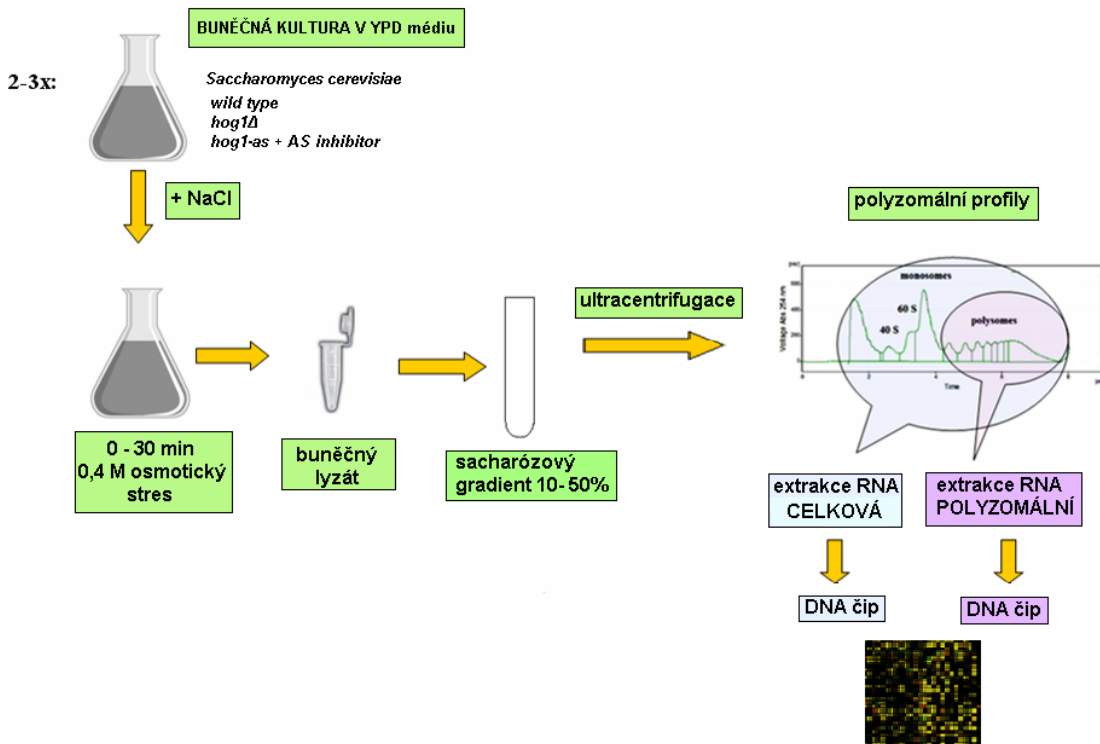
- a. Provést normalizaci s následujícími parametry:
 1. Background correction Measure: Background Mean
 2. Correction: None
 3. Transformation: Take log, Base 2
 4. Normalization type: LOWESS
 5. Scope: Subgrid
 6. Using all spots: No control spots defined
 7. Smoothing: 0,2
- b. Normalizovaná data se objeví v nové tabulce.

5. Analýza.

- a. Provést analýzu s následujícími parametry:
 - použít normalizované hodnoty („Normalize Signal Mean“)
 - kombinace obou signálů („Combine replicates“)
 - práh 2,0 (Fold threshold 2.0)
- b. Analyzovaná data se objeví v nové tabulce. Uložit výsledky.
- c. Kvantifikovaná data mohou být znovu otevřena a použita v programu Microsoft Excel.

5. VÝSLEDKY

5.1. Projekt



Obrázek 15. Zjednodušený schématický náčrt posloupnosti experimentů. Většina kvasinkové kultury byla vystavena 0,4 M osmotickému stresu chloridem sodným. Dále následovala příprava buněčného lyzátu z buněk nestresovaných a buněk stresovaných určitý čas (2, 6, 30 minut). Buněčný lyzát jsem aplikovala do zkumavky se sacharózovým gradientem a ultracentrifugovala. Pak jsem proměřila jednotlivé vzorky přístrojem na polyzomální profily. Některé vzorky jsem najímala kompletně (CELKOVÁ RNA) jiné jen polyzomální část (POLYZOMÁLNÍ RNA). Potom jsem RNA extrahovala a provedla analýzu pomocí DNA čipu.

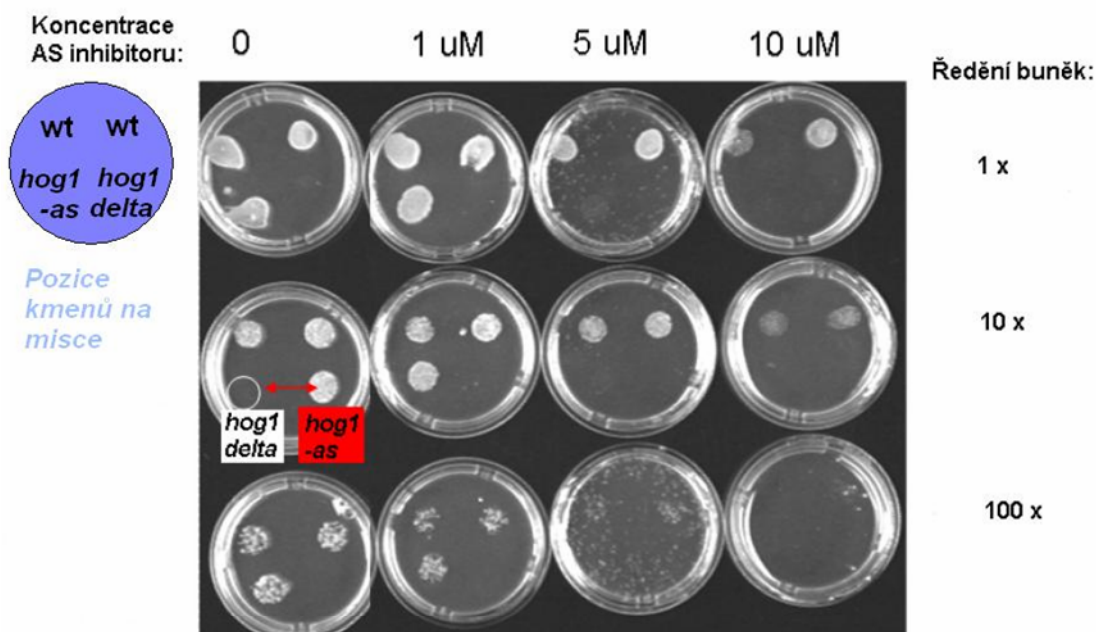
První fází projektu bylo provést plotnový test a určit vhodnou koncentraci AS inhibitoru pro inhibování Hog1 v *hog1-as* mutantovi. Poté jsem připravila buněčnou kulturu (*hog1Δ*, *hog1-as* + AS inhibitor) v YPD médiu a vystavila ji 0,4 M osmotickému stresu chloridem sodným (Obr. 15). Z buněčné kultury jsem získala buněčný lyzát s neporušeným translačním komplexem a vzorek nechala ultracentrifugovat ve zkumavce se sacharózovým gradientem. Následovalo proměření sedimentovaného vzorku v přístroji pro polyzomální profily. Poté jsem najímala vzorky buď kompletně (celková RNA) nebo jen část RNA

translatovanou polyzomálně (polyzomální RNA). Pak jsem extrahovala RNA a analyzovala ji prostřednictvím DNA čipu.

Každý pokus jsem zopakovala třikrát pro polyzomální i pro celkovou RNA v různých časových intervalech, tedy před stresem (0 min) a potom (2, 6, 30 minut) od počátku stresu. Získala jsem tak 24 grafů polyzomálních profilů u kvasinkového kmene *hog1Δ*. U kmene *hog1-as* jsem navíc proměřila i vzorky V čase 0 min po přidání specifického AS inhibitoru, a tak jsem dostala 30 grafů polyzomálních profilů. Analýzu DNA čipem jsem provedla dvakrát pro vzorky (celková RNA: 0 min, 6 min; polyzomální: 0 min, 6 min) *hog1Δ* a třikrát pro vzorky *hog1-as* (celková RNA: 0 min, 2 min, 6 min, 30 min; polyzomální 0 min, 2 min, 6 min, 30 min). Celkově bylo tedy analyzováno 32 DNA čipů.

Vzorky divokého kmene prozkoumala stejným způsobem Malin Hult (viz Obr. 15) a zpřístupnila mi výsledná data pro porovnání s *hog1* mutanty.

5.2. Plotnový test - testování AS inhibitoru



Obrázek 16. Výsledek plotnového testu, kdy byl testován AS inhibitor a hledána vhodná koncentrace tohoto inhibitoru pro další pokusy. Na fotografii jsou vidět Petriho misky uspořádané podle ředění buněk (1 x, 10 x, 100 x) a koncentrace AS inhibitoru (0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M). Pozice jednotlivých kvasinkových kmenů na miskách jsou schematicky popsány v modrém kolečku. U jedné misky došlo k záměně kmene *hog1-as* a *hog1 Δ* , což je zvýrazněno červeným a bílým rámečkem se správným popiskem.

Připravila jsem si Petriho misky s YPD médiem a současně obsahem NaCl o koncentraci 1M. Poté jsem přidala různé koncentrace specifického AS inhibitoru rozpuštěného v metanolu. Zaočkovala jsem tři kmeny buněk do tekutého YPD média a inkubovala přes noc ve třepačce. Druhý den jsem buňky stokrát naředila a nechala růst do hodnoty OD 0,3 – 0,4 měřené na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Pak jsem nakapala 5 μ l kapky buněčných kultur na misky s různou koncentrací AS inhibitoru. Zároveň jsem je i naředila: 0x, 10x, 100x. Nakonec jsem misky nechala inkubovat v teplotě 30 °C po 48 hodin a výsledek vyfotografovala.

Z výsledné fotografie plotnového testu (Obr. 16) můžeme vyčíst hned několik informací. Čím více byly buňky naředěné, tím méně narostly. Buňky divokého kmene narostly na všech miskách (Jsou slabě viditelné i na misce s největší koncentrací AS inhibitoru a největším naředěním buněk). *hog1 Δ* buňky nebyly schopné narůst na žádné misce, tak jak jsem předpokládala,

z důvodu nepřítomnosti MAPK Hog1, která umožňuje buňkám přežít v prostředí s obsahem NaCl.

Buňky *hog1-as* rostly jen na kontrolních miskách bez AS inhibitoru, a pak na miskách s koncentrací inhibitoru 1 μM . Je tedy patrné, že AS inhibitor je skutečně specifický a blokuje buňkám *hog1-as* proteinkinázu Hog1. V prostředí bez inhibitoru tyto buňky rostou stejně jako *wt*. Na miskách s koncentrací inhibitoru 1 μM také rostou, což znamená, že tato koncentrace je příliš nízká na zablokování Hog1 všech buněk. Na miskách s koncentrací inhibitoru 5 i 10 μM nerostou žádné *hog1-as* buňky. Je tedy očividné, že Hog1 MAPK je u nich inhibitorem zablokována. Pro další pokusy s *hog1-as* buňkami jsem zvolila koncentraci AS inhibitoru 5 μM .

Plotnový test byl úspěšný. Dokázal, že inhibitor je specifický a skutečně funguje. Buňky narostly tak, jak jsem předpokládala. Našla jsem vhodnou koncentraci AS inhibitoru pro další pokusy.

5.3. Analýza polysomálního gradientu

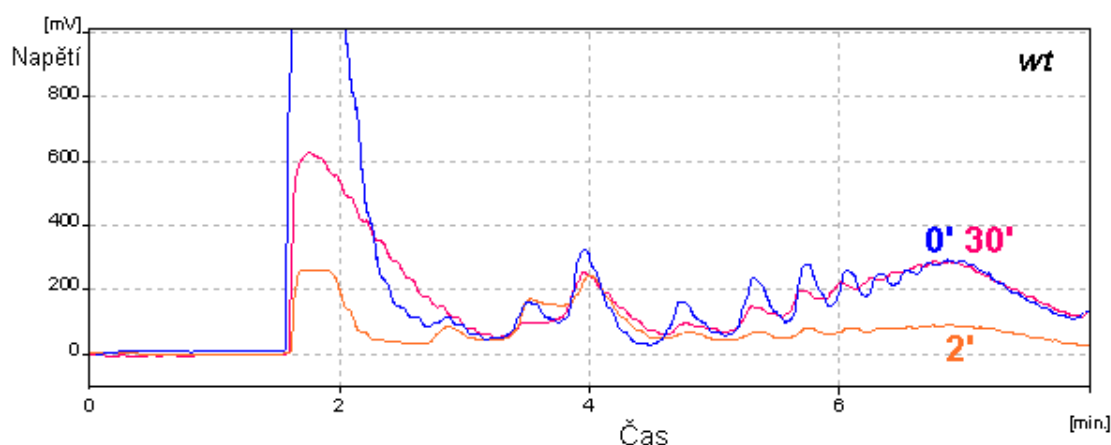
Jakmile byly buňky připraveny pro pokus, přidala jsem k nim cykloheximid. Tato chemická látka způsobila, že se zastavila elongace

translace a ribozomy tak zůstaly v neporušeném stavu přichycené na mRNA, kterou právě translatovaly. Lyzačním puforem, centrifugací a dalšími postupy jsem získala mRNA s různým počtem nasedlých ribozomů. Tento lyzát jsem aplikovala do SW41 zkumavky na hladinu sacharózového gradientu.

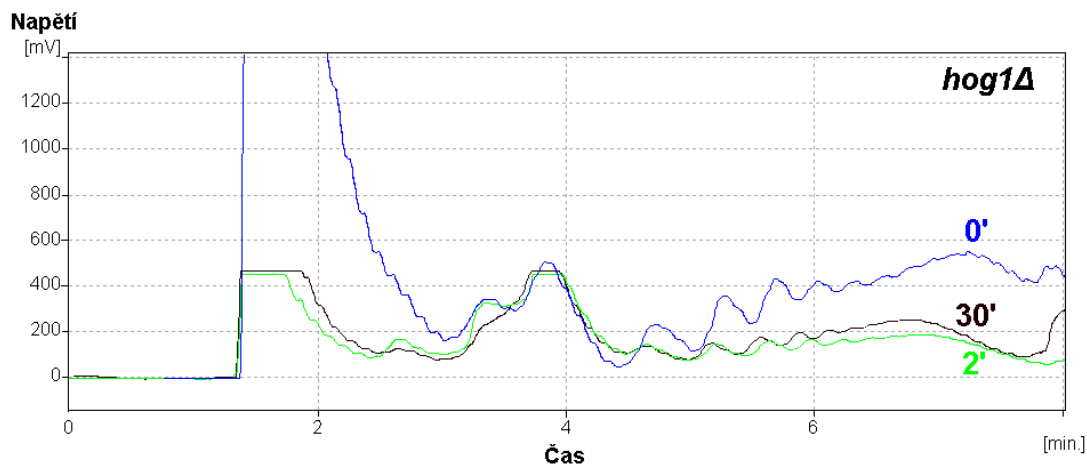
Sacharózový gradient zde byl vytvořen smícháním 50% vodného roztoku sacharózy s 10%, přičemž na dně byl koncentrovanější 50% roztok. Během ultracentrifugace došlo k sedimentaci mRNA podle různého počtu nasedlých ribozomů. V horní části zkumavky byla mRNA s nejmenším počtem přisedlých ribozomů a naopak.

Vzorek ve zkumavce byl poté upevněn v přístroji pro analýzu polyzomálních profilů a byl vytlačován modrým 60% roztokem sacharózy do spektrofotometru, kde byl kontinuálně proměřován. Jelikož je spektrofotometr propojen s počítačem, získala jsem z měření grafy zobrazující závislost napětí (při absorbanci 254 nm) na čase (Ukázky grafů z programu Clarity viz níže). Nakonec jsem jímala vzorek a to buď celkovou RNA nebo jen polyzomální část vzorku „polyzomální RNA“. Izolovaná polyzomální mRNA pak odráží míru translace, zatímco celková mRNA nám přibližuje úroveň transkripce.

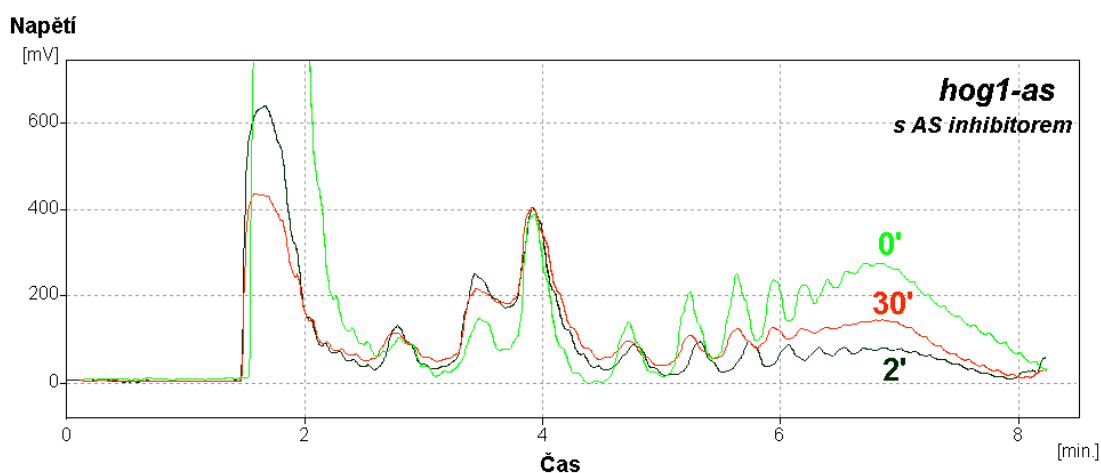
5.3.1. Ukázky polyzomálních profilů



Graf 1. Tři křivky polyzomálních profilů *Saccharomyces cerevisiae wt* před a po 0,4 M NaCl osmotickém šoku. Modrá barva znázorňuje situaci před osmotickým šokem (0 minut), oranžová barva stav 2 minuty po osmotickém šoku a růžová 30 min od počátku stresu.



Graf 2. Tři křivky polyzomálních profilů *Saccharomyces cerevisiae hog1Δ* před a po 0,4 M NaCl osmotickém šoku. Modrá barva znázorňuje situaci před osmotickým šokem (0 minut), zelená barva situaci 2 minuty po osmotickém šoku a hnědá barva 30 min od počátku stresu.



Graf 3. Tři křivky polyzomálních profilů *Saccharomyces cerevisiae hog-as* s AS inhibítorem před a po 0,4 M NaCl osmotickém šoku. Světle zelená barva znázorňuje situaci před osmotickým šokem (0 minut), tmavě zelená barva situaci 2 minuty po osmotickém šoku a oranžová barva 30 min od počátku stresu.

Na grafu č.1 jsou najednou zobrazeny celkem tři náhodně vybrané polyzomální křivky znázorňující situaci u divokého kmene *wt* před stresem (0 minut) a po osmotickém stresu způsobeném 0,4 M chloridem sodným (2 minuty a 30 minut). V pravé části grafu zobrazující množství mRNA s nasedlými polyzomy je možné porovnat míru translace mezi jednotlivými křivkami. Plocha pod modrou a růžovou křivkou je téměř stejná oproti menší ploše pod křivkou oranžovou. To znamená, že míra translace po osmotickém šoku prudce klesla a po pár minutách se opět pomalu zotavovala. V čase 30 minut od šoku je úroveň translace v podstatě na počáteční úrovni před stresem.

Na grafech č. 2 a 3 znázorňujících mutanty *hog1Δ* a *hog1-as* s inhibitorem je situace trochu odlišná. Na obou grafech je opět vidět, že translace klesá kvůli osmotickému stresu. Po několika minutách se translace sice znovu rozbíhá, ale trvá to mnohem pomaleji než u buněk *wt* a v čase 30 min úroveň translace zdaleka nedosahuje počátečních hodnot.

Z výsledků ukázaných na grafech je možné vyvodit, nejen že buňky po stresu velmi snížily úroveň translace a za určitý čas, co se adaptovaly nepříznivým podmínkám, začaly opět navracet hladinu translace do původního stavu, ale také, že oba *hog1* mutanti se chovali podobně a měli problémy s překonáním osmotického šoku. Tím lze též potvrdit důležitost funkčního proteinu Hog1 pro vyrovnání se s osmotickým šokem vyvolaným chloridem sodným.

5.3.2. Analýza translační aktivity

Z naměřených hodnot polyzomálních profilů zaznamenaných programem Clarity® (DataApex) jsem podle následujícího vzorce vypočítala tzv. translační aktivitu

$$\frac{\text{plocha pod polyzomální částí křivky}}{\text{plocha (polyzom+40S+60S+monozom)}} \%$$

Hodnoty translační aktivity jednotlivých měření všech tří kmenů jsou zaznamenány v Tabulce 4, 5 a 6. Z průměrných hodnot byl vytvořen graf 4, z kterého je možné podobně jako z grafů 1-3 vyčíst hned několik poznatků. U kvasinkových kmenů se účinnost translace po osmotickém šoku skutečně mění. Přesněji tedy klesá. Po určité době, když se buňky ze stresu zotaví, translace roste a časem se dostává na původní úroveň. V čase 2-6 minut po osmotickém stresu, se buňky začínají zotavovat. To je možné pozorovat u všech tří zobrazených křivek a tedy i buněčných kmenů.

U běžného kvasinkového kmene *wt* se translace vrátí do původního stavu přibližně 30 min od začátku stresu. U *hog1* mutantů je tomu jinak. Translace se zde obnovuje pomaleji než u *wt* a po 30 minutách je stále na nízké

úrovni. Naměřili jsme, že u *hog1* mutantů je translace po 30 minutách na úrovni asi 54% oproti *wt*, kde se hodnota translace pohybuje okolo 69%.

Všimli jsme si tedy, že *hog1* mutantní kmeny (*hog1Δ*, *hog1-as* s AS inhibitorem) se chovají velmi podobně. Po osmotickém šoku trvá déle než jsou schopny vrátit se do původního stavu. *HOG1* gen je skutečně velmi důležitý pro zotavení se buněk z osmotického stresu.

<i>hog1Δ</i>	translační aktivita				
čas [min]	repl 1	repl 2	repl 3	repl 4	průměr
0	75%	77%	75%	77%	76%
2	47%	48%	51%	48%	49%
6	51%	51%	50%	49%	50%
30	53%	50%	57%	54%	53%

Tabulka 4.

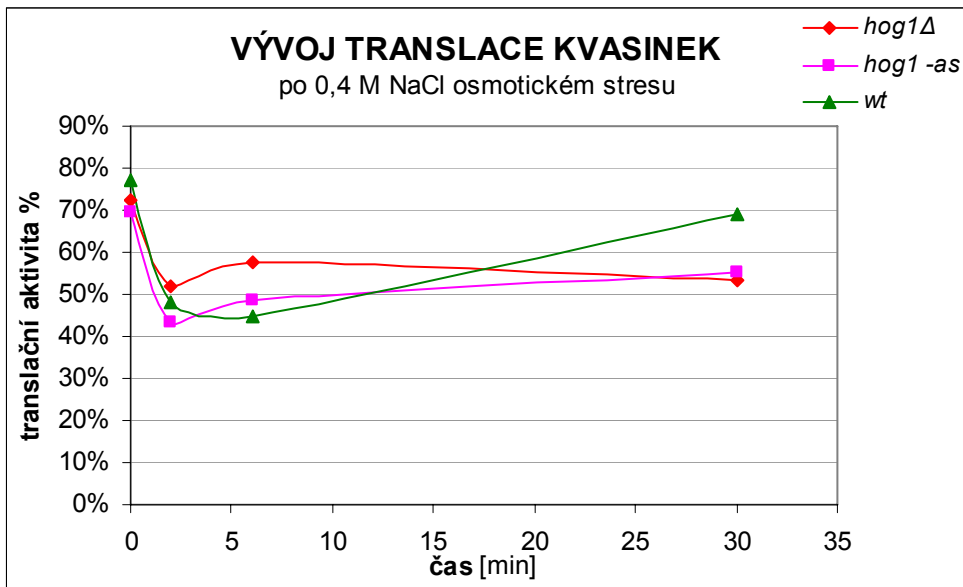
<i>hog1-as</i>	translační aktivita						
čas [min]	repl 1	repl 2	repl 3	repl 4	repl 5	repl 6	průměr
0	68%	68%	74%	-	67%	70%	69%
2	48%	35%	50%	50%	38%	38%	43%
6	47%	47%	61%	50%	45%	40%	48%
30	56%	57%	50%	-	57%	-	55%

Tabulka 5.

Tabulka 6.

<i>wt</i>	translační aktivita								
čas [min]	repl 1	repl 2	repl 3	repl 4	repl 5	repl 6	repl 7	repl 8	průměr
0	82%	74%	77%	69%	79%	80%	77%	75%	77%
2	53%	55%	-	43%	51%	43%	43%	50%	48%
6	18%	34%	44%	31%	63%	50%	58%	65%	45%
30	-	64%	48%	70%	74%	81%	73%	77%	69%

Tabulky 4, 5, 6. Hodnoty translační aktivity *hog1Δ*, *hog1-as* s AS inhibitorem a *wt* kvasinkových buněk. „repl“ označuje replikaci neboli měření. U *hog1Δ* proběhly 4 cykly měření, u *hog1-as* 6 cyklů měření a u *wt* 8 měření. V každém cyklu měření byly zaznamenány hodnoty z 0, 2, 6 a 30 min). V posledním sloupečku každé tabulky jsou zvýrazněny průměrné hodnoty translačních aktivit.



Graf 4. Vývoj průměrné translační aktivity buněk před a po osmotickém stresu. Mutant *hog1Δ* je označen červeně, *hog1-as* s AS inhibitorem růžově a kmen *wt* zeleně. Měření byla provedena před stresem (0 minut) a potom 2, 6 a 30 minut po 0,4 M NaCl osmotickém šoku. Z grafu je patrné, že hodnota translace po osmotickém šoku klesá u všech kvasinkových kmenů. U divokého kmene *wt* se přibližně po 30 minutách vrátí úroveň translace do původního stavu před stresem. U *hog1* mutantů se v průběhu času také dává do pořádku, ale oproti *wt* velmi pomalu. Po 30 minutách je translace na úrovni jen zhruba 55 % oproti původním cca 70 %. Je vidět, že oba *hog1* mutantů se chovají podobně a mají větší problém s adaptací na osmotický stres než *wt*.

5.4. DNA čip

Metodu DNA čipu jsem použila pro testování polyzomální i celkové RNA z kvasinkových kmenů *wt*, *hog1Δ* a *hog1-as* s 5 μM AS inhibitorem. Porovnávala jsem translaci v buňkách před stresem (0 min) a po NaCl stresu (2, 6, 30 min). Referenční mRNA byla izolována z nestresovaných *wt* buněk. Referenční vzorek byl obarven Cy3 a testovaný vzorek pomocí Cy5 barvivem. Hybridizovaný DNA čip byl oskenován skenerem VersArray ChipReader a data byla upravena a normalizována metodou *lowess* programem Imagene®.

5.4.1. Geny indukované osmotickým stresem

Následující tabulka 7 ukazuje názvy genů *wt* kmene, které byly 6 minut po osmotickém stresu výrazně transkribovány. Jsou to geny aktivované osmotickým stresem, které adaptují buňku na tyto nepříznivé podmínky. Že některé z těchto genů jsou za těchto či podobných podmínek více přepisovány a následně translatovány v proteiny bylo uveřejněno již ve vědecké práci POSAS *et al.* 2000, ty jsou zvýrazněny růžově a dále v práci REP *et al.* 2000, které jsou napsané modrým písmem.

Mezi geny jejichž hladina mRNA se během osmotického šoku výrazně zvýší patří např. transporter sacharidů plazmatické membrány *STL1*, glycerol-3-P-dehydrogenáza *GPD1* účastníci se produkce glycerolu, *ALD6* cytozolická aldehyddehydrogenáza, glykogensyntáza *GSY1*, transkripční aktivátor *MSN2*, který spouští ESR dráhu, dále mitochondriální aldehyddehydrogenáza *ALD4* ale i gen produkující protein neznámé funkce *YNR014W*. Tyto geny uvedl ve své práci i POSAS a jeho kolegové (2000).

REP a jeho kolegové (2000) uvedli ve své práci geny indukované po 0,7 M NaCl stresu. Některé z těchto genů se shodují s geny, které byly zjištěny jako výrazně indukované v této práci, ty jsou v tabulce 7 zvýrazněny modrou barvou. Jedná se opět o geny uvedené výše: *STL1*, *ALD6*, *GPD1*, *GSY1*, *ALD4*, *YNR014W* kromě *MSN2*. A dále jsou to cytozolická kataláza T *CTT1*, která chrání buňku před oxidativním a chemickým poškozením, serin/treoninová proteinkináza *FMP48* a proteiny neznámé funkce *PHM7*, *SYM1*, *RTN2*,

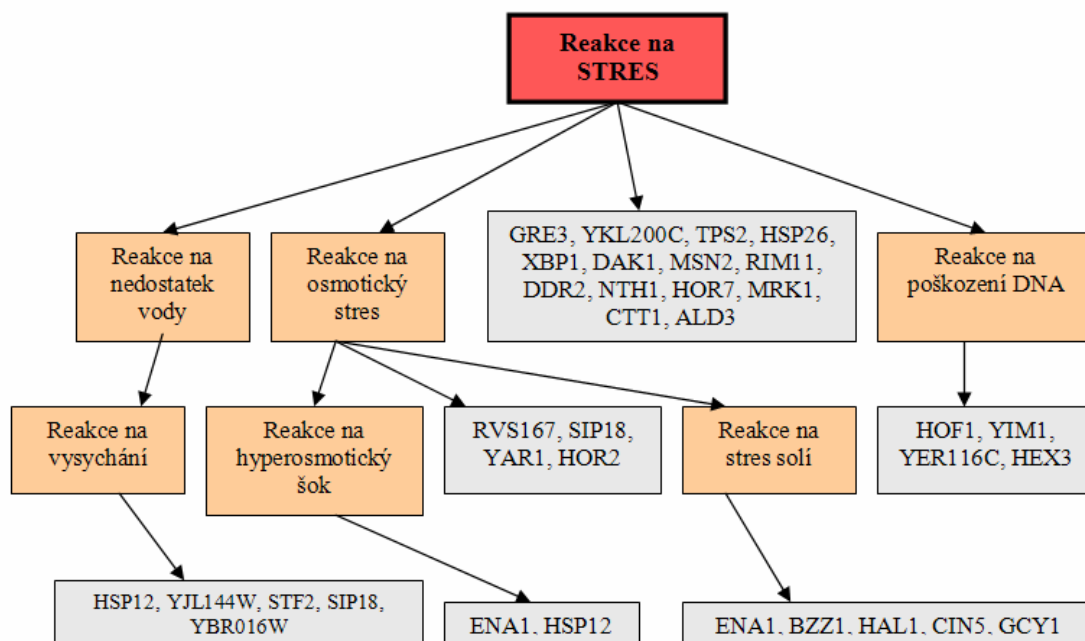
YHR087W, *YNL194C*, *YNL195C*, *YHR022C*, *YLR042C*. PROFT *et al.* (2005) uvedl jaderný transkripční faktor *MOT3*, aktivovaný proteinem *Sko1*, který se účastní odpovědi buňky na stresové podmínky, jež byl vysoce indukovaný i v mých výsledcích (Tab. 7).

systematický název	název	t6	induction fold	popis genu
<i>YDR536W</i>	<i>STL1</i>	6,33	80,31	transporter sacharidů plazmatické membrány, příjem cukrů
<i>YGR088W</i>	<i>CTT1</i>	5,8	55,86	Cytozolická kataláza T. Ochrana před oxidativním a chemickým poškozením.
<i>YGR052W</i>	<i>FMP48</i>	5,34	40,49	Serin/treonin proteinkináza neznámé funkce
<i>YDL022W</i>	<i>GPD1</i>	4,47	22,23	Glycerol-3-P dehydrogenáza, produkce glycerolu
<i>YJL107C</i>	<i>YJL107C</i>	4,23	18,82	Domnělý protein neznámé funkce; indukovaný HOG1 dráhou
<i>YHR087W</i>	<i>YHR087W</i>	4,2	18,41	protein neznámé funkce zahrnutý v RNA metabolismu
<i>YOL084W</i>	<i>PHM7</i>	4,14	17,62	protein neznámé funkce
<i>YDL023C</i>	<i>YDL023C</i>	3,85	14,42	neznámá funkce
<i>YFL013W-A</i>	<i>YFL013W-A</i>	3,67	12,7	neznámá funkce
<i>YNL194C</i>	<i>YNL194C</i>	3,63	12,36	Integral membrane protein; has homologs SUR7 and FMP45;
<i>YGR226C</i>	<i>YGR226C</i>	2,93	7,6	neznámá funkce
<i>YJL114W</i>	<i>YJL114W</i>	2,9	7,47	retrotransposon
<i>YNL195C</i>	<i>YNL195C</i>	2,74	6,68	protein neznámé funkce
<i>YLR327C</i>	<i>TMA10</i>	2,69	6,47	protein neznámé funkce který asociuje s ribozomy
<i>YDR043C</i>	<i>NRG1</i>	2,68	6,41	Transkripční repressor, který rekrutuje komplex Cyc8p-Tup1p na promotory; zprostředkovává represi glukózy a negativně reguluje různé procesy včetně filamentárního růstu a odezvy na alkalické pH
<i>YLR164W</i>	<i>YLR164W</i>	2,61	6,12	protein neznámé funkce
<i>YLR251W</i>	<i>SYM1</i>	2,57	5,93	Protein vyžadovaný pro etanolový metabolismus; indukován teplotním šokem
<i>YHR022C</i>	<i>YHR022C</i>	2,45	5,45	protein neznámé funkce
<i>YMR070W</i>	<i>MOT3</i>	2,43	5,4	Jaderný transkripční faktor s 2 zinkovými prsty
<i>YMR085W</i>	<i>YMR085W</i>	2,4	5,27	protein neznámé funkce
<i>YDL242W</i>	<i>YDL242W</i>	2,4	5,26	neznámá funkce
<i>YOR062C</i>	<i>YOR062C</i>	2,4	5,26	protein neznámé funkce
<i>YLR042C</i>	<i>YLR042C</i>	2,33	5,04	Domnělá protein s GPI-kotvou neznámé funkce
<i>YGR242W</i>	<i>YGR242W</i>	2,27	4,84	neznámá funkce
<i>YNR014W</i>	<i>YNR014W</i>	2,23	4,69	protein neznámé funkce
<i>YDR534C</i>	<i>FIT1</i>	2,22	4,65	protein inkorporovaný do buněčné stěny prostřednictvím GPI-kotvy
<i>YDL204W</i>	<i>RTN2</i>	2,15	4,42	protein neznámé funkce
<i>YPL061W</i>	<i>ALD6</i>	2,13	4,38	Cytozolická aldehyddehydrogenáza
<i>YFR015C</i>	<i>GSY1</i>	2,09	4,27	Glykogensyntáza, produkce glykogenu
<i>YMR040W</i>	<i>YET2</i>	2,09	4,25	protein neznámé funkce pravděpodobně interagující s ribozomy
<i>YLR108C</i>	<i>YLR108C</i>	2,07	4,19	protein neznámé funkce
<i>YOR374W</i>	<i>ALD4</i>	2,05	4,14	Mitochondriální aldehyddehydrogenáza
<i>YMR037C</i>	<i>MSN2</i>	2,03	4,08	Transkripční aktivátor se zinkovým prstem

Tabulka 7. Geny indukované osmotickým šokem ve *wt* buňkách 6 minut po 0,4 M NaCl stresu. Data z celkové RNA. Růžově jsou zvýrazněny geny, které jsou uveřejněny v práci POSAS *et al.* 2000 mezi indukovanými geny po 0,4 M NaCl stresu po 10 minutách. Modře napsané geny byly uveřejněny v práci REP *et al.* 2000, po 0,7 M NaCl.

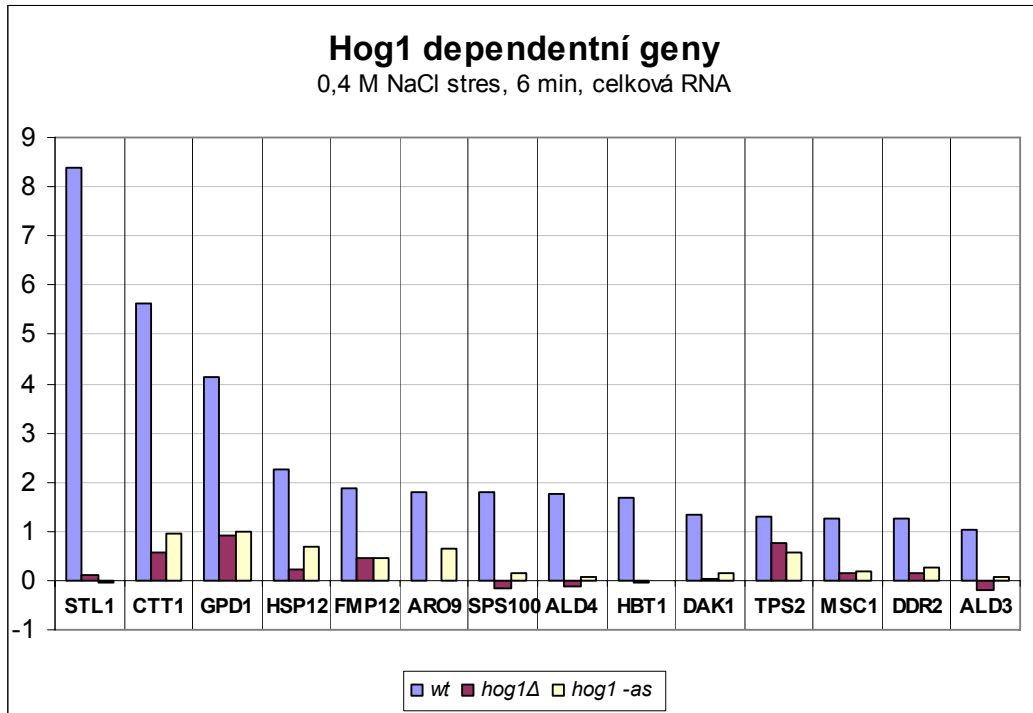
Geny, které byly indukovány 0,4 M osmotickým šokem a nebyly uvedeny v předchozích pracích jsou: transkripční repressor *NRG1*, protein neznámé funkce jenž asociuje s ribozomy *TMA10*, protein inkorporovaný do buněčné stěny prostřednictvím GPI-kotvy *FIT1*, a pak geny neznámé funkce *YET2*, *YJL107C*, *YDL023C*, *YFL013W-A*, *YGR226C*, *YJL114W*, *YLR164W*, *YMR085W*, *YDL242W*, *YOR062C*, *YGR242W*, *YLR108C*.

Názvy genů se zvýšenou expresí (fold >1) z *wt* 6 min po stresu jsem zkopírovala do SGD databáze Princetonské Univerzity (GO term finder). Ta vyhodnotila, že tyto geny reagují na stimul (stres) (Obr. 17), nedostatek vody a vysoušení buňky (*YJL144W*, *STF2*, *YBR016W*, *HSP12*, *SIP18*) a transport sodných iontů (*ENA1*, *ENA5*, *ENA2*).



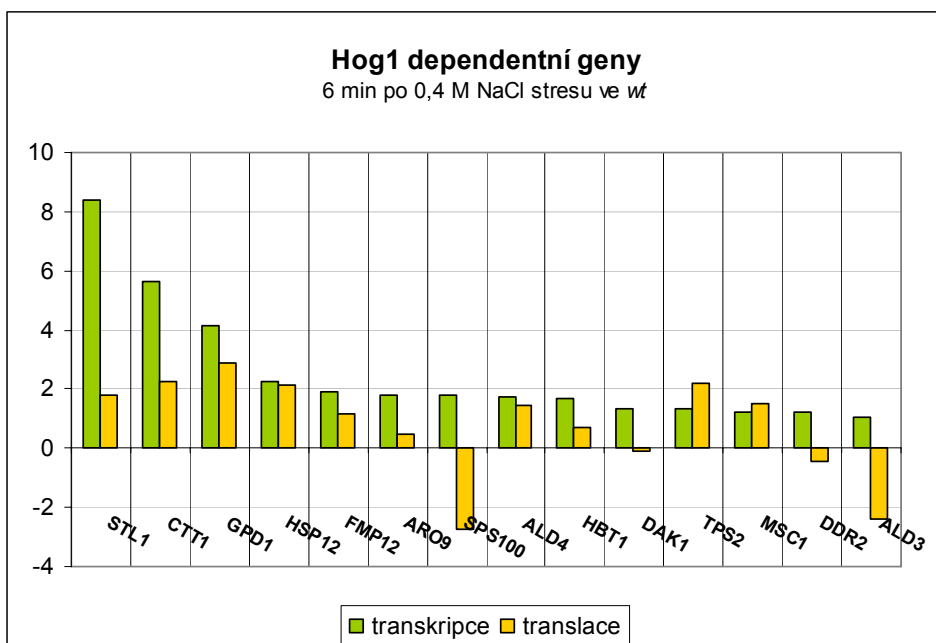
Obrázek 17. Geny reagující na stres. Růžově vybarvené rámečky znázorňují biologické procesy a šedé rámečky ukazují geny, které se jich účastní. Obrázek byl vytvořen podle výsledků z GO Term Finder SGD databáze Princetonské Univerzity. <<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>>

Když jsem se podívala do výsledných hodnot, jak to vypadá s některými známými Hog1 dependentními geny (REP *et al.* 2000), zjistila jsem, že jsou aktivní během osmotického stresu u *wt* buněk, ale není tomu tak u obou *hog1* mutantů. Je to z důvodu neaktivního Hog1 proteinu, který v mutantech nemůže aktivovat další geny. Graf 5, který popisuje tuto situaci, je zobrazen níže.



Graf 5. Některé Hog1 dependentní geny (REP *et al.* 2000), které jsou indukované ve *wt* buňkách 6 minut po osmotickém stresu. K měření byla použita celková RNA. Modré sloupce zde zobrazují *wt*, fialové *hog1Δ* a světle žlutá barva ukazuje *hog1-as* buňky s AS inhibitorem.

Když jsem porovnávala výsledky z polyzomální a celkové RNA, všimla jsem si u většiny genů nižší hodnoty translace než transkripce (Graf 6). Příkladem může být gen STL1, který je v buňkách transkripčně produkován na vysoké úrovni, ale poté je translací regulován zhruba na čtyřnásobně nižší hodnotu.



Graf 6. Hog1 dependentní geny, které jsou indukované ve *wt* buňkách 6 minut po 0,4 M NaCl osmotickém stresu.

gen	původ názvu genu	Výše zmíněné Hog1 aktivované geny
STL1	Sugar Transporter-Like protein	glycerol-protonový symporter plazmatické membrány
CTT1	CaTalase T	cytozolická kataláza T, má roli v ochraně buňky proti oxidativnímu poškození peroxidem vodíku
GPD1	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase	NAD-dependentní glycerol-3-fosfátdehydrogenáza, klíčový enzym syntézy glycerolu, esenciální pro růst buňky v osmotických podmínkách
HSP12	Heat shock protein 12	protein lokalizovaný v plazmatické membráně, který chrání membránu proti vysoušení
FMP12	Found in Mitochondrial Proteome	předpokládaný protein neznámé funkce
ARO9	AROMATIC amino acid requiring	aromatická aminotransferáza, která katalyzuje první krok metabolismu tryptofanu, fenylalaninu a tyrozinu
SPS100	SPorulation Specific	protein potřebný pro maturaci buněčné stěny spor, produkován v průběhu sporulace
ALD4	ALdehyde Dehydrogenase	mitochondriální aldehyddehydrogenáza
HBT1	HuB1 Target	substrát Hub1 proteinu podobného ubiquitinu
DAK1	DihydroxyAcetone Kinase	dihydroxyacetonkináza, vyžadovaná pro detoxifikaci dihydroxyacetonu, zahrnuta v adaptaci buňky na stres
TPS2	Trehalose-6-phosphate PhoSphatase	fosfatázová podjednotka trehalózy-6-fosfátsyntázy/fosfatázového komplexu; exprese je indukovaná stresovými podmínkami a potlačována Ras-cAMP signální dráhou
MSC1	Meiotic Sister-Chromatid recombination	protein neznámé funkce; mutant je defektní v meiotické rekombinaci homologních chromatid
DDR2	DNA Damage Responsive	protein reagující na mnoho typů stresů, exprese je aktivována různými cizorodými látkami a dalšími stresy
ALD3	ALdehyde Dehydrogenase	Cytoplazmatická aldehyddehydrogenáza účastnící se syntézy beta-alaninu

Tabulka 8. REP *et al.* 2000 uvedli Hog1 dependentní geny, jejichž hladina mRNA se po osmotickém šoku v mutantech s delecí *HOG1* genu snížila minimálně o 75%. Charakteristiky genů byly nalezeny v databázi SGD <<http://db.yeastgenome.org>>

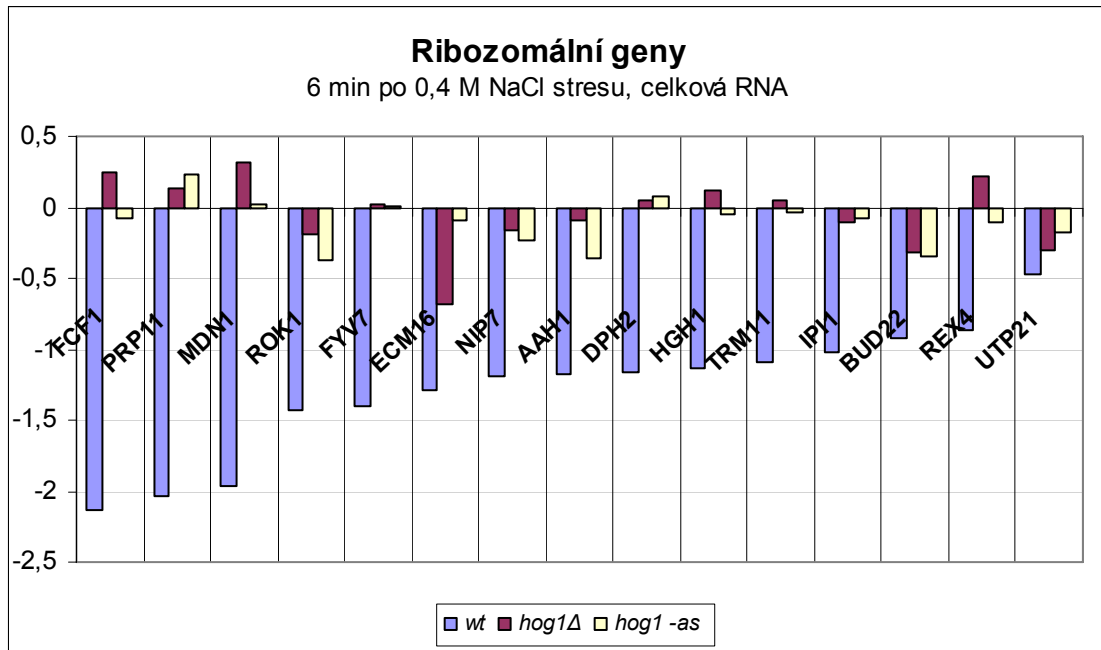
5.4.2. Geny potlačené osmotickým stresem

Do GO Term Finder databáze jsem vložila i seznam názvů genů, které byly osmotickým stresem potlačeny (fold > 2) ve *wt* buňkách 6 min po stresu. Databáze mi našla jisté souvislosti mezi těmito geny. Předpokládala jsem, že tyto geny budou zodpovědné za syntézu ribozomů a celkový průběh translace, což se potvrdilo. Jsou to geny zodpovědné za biosyntézu ribozomů, sestavování ribozomových podjednotek a úprav rRNA (Tabulka 9).

GO term	Geny anotované k pojmu
biosyntéza a sestavování ribozomů	YLR409C, YHR085W, YMR014W, YDR339C, HGH1, YOL124C, AAH1, ECM16, NIP7, DPH2, YLR068W, REX4, YLR106C, ROK1
biosyntéza a sestavování ribonukleoproteinového komplexu	PRP11, YLR409C, YHR085W, YMR014W, YDR339C, HGH1, YOL124C, AAH1, ECM16, NIP7, DPH2, YLR068W, REX4, YLR106C, ROK1
neokomentované	YLR334C, YDR445C, YOR376W, YAL058C-A, YOR235W, YOL079W, YPL142C, YBL100C, YGR160W, YGL188C, YGL204C, YLR434C, YLR282C, YLR124W, YAL069W, YOR029W, YDR544C, YPR142C, YCR013C, YLR374C, YMR306C-A, YLR111W, YKL131W
úpravy rRNA	YLR409C, YHR085W, YDR339C, ECM16, NIP7, YLR068W, REX4, YLR106C, ROK1

Tabulka 9. Společné vlastnosti inhibovaných genů (fold > 2) *wt* po 6 minutách od 0,4 M NaCl stresu. Výsledná tabulka získána z GO term databáze Princetonské Univerzity. <<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>>

Z grafu č.7 je patrné, že ribozomální geny jsou po osmotickém šoku potlačeny v buňkách *wt*, ale není tomu tak vždy u *hog1* mutantů.



Graf 7. Ribozomální geny a jejich situace ve *wt* 6 min po 0,4 M osmotickém stresu. Hodnoty byly změřeny z celkové mRNA. Modré sloupce zde zobrazují *wt*, fialové *hog1Δ* a světle žlutá barva ukazuje *hog1-as* buňky s AS inhibitorem. Po osmotickém šoku je translace ribozomálních genů ve *wt* buňkách potlačena, ale u *hog1* mutantů k tomuto jevu nedochází.

gen	původ názvu genu	Výše zmíněné deaktivované geny
FCF1	Faf1p Copurifying Factor	esenciální jaderný protein, který se účastní úprav pre-rRNA 40S ribozomální podjednotky
PRP11	Pre-mRNA Processing	podjednotka sestřihového komplexu
MDN1	MiDasiN	midazin, související s 60S podjednotkami ribozomu
ROK1		ATP-dependentní RNA helikáza vyžadovaná pro syntézu 18S rRNA
FYV7	Function required for Yeast Viability	protein neznámé funkce, zahrnutý v úpravách primárního transkriptu 35S rRNA
ECM16	ExtraCellular Mutant	esenciální ATP-dependentní RNA helikáza specifická k jaderné distribuci U3 snoRNP potřebné pro syntézu 18S rRNA
NIP7	Nuclear ImPort	jaderný protein důležitý pro 60S podjednotku ribozomu
AAH1	Adenine AminoHydrolase	adenindeamináza (adeninaminohydroláza), potřebná pro recyklaci purinů a dusíkovém katabolizmu
DPH2	DiPHthamide	protein vyžadovaný pro syntézu diptamidu
HGH1	HmG1/2 Homolog	protein neznámé funkce podobný lidským HMG1 a HMG2
TRM11	TRna Methyltransferase	katalytická podjednotka tRNA metyltransferázového komplexu
IPI1	Involved in Processing ITS2	esenciální komponent Rix1 komplexu potřebného pro úpravy ITS2 sekvencí 35S pre-rRNA
BUD22	BUD site selection	protein potřebný pro výběr místa, kde dojde k pučení buňky
REX4	RNA EXonuclease	údajná RNA exonukleáza, která se pravděpodobně účastní úprav pre-rRNA a sestavování ribozomů
UTP21	U Three Protein	Pravděpodobný U3 snoRNP protein, který se účastní maturace pre-18S rRNA

Tabulka 10. Stručná charakteristika výše zmíněných deaktivovaných genů v buňkách *wt* po 0,4 M osmotickém stresu chloridem sodným po 6 minutách. Hladina mRNA těchto genů po osmotickém šoku výrazně klesla. Charakteristiky genů byly nalezeny v databázi SGD <<http://db.yeastgenome.org>>

6. DISKUZE

Aby byl mikroorganismus schopný přežít v přírodních podmínkách, musí být schopný pohotově a přiměřeně reagovat na náhlé změny životního prostředí a tím se adaptovat na konkrétní změnu prostředí. U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* různé vnější signály (feromony, změny osmotického tlaku, teplotní šok, nedostupnost živin) aktivují MAPK signální kaskády, které potom aktivují řadu genů potřebných pro zmíněnou adaptaci na nové prostředí. Studium genové exprese kvasinek bylo odhaleno, že tyto organismy reagují odlišnými změnami genové exprese podle konkrétního prostředí a rovněž existují různé geny specifické pro zotavení šokovaných buněk v různých podmínkách (GASH *et al.* 1999).

Vystavení kvasinek podmínkám s vysokým obsahem chloridu sodného v okolním médiu způsobí rapidní ztráty intracelulární vody (HOHMANN 1997), což nakonec vyústí ve zhroucení cytoskeletu buňky (CHOWDHURY *et al.* 1992), zastavení buněčného růstu a v celkové poškození buňky (GUSTIN *et al.* 1998, ALEXANDER *et al.* 2001). Cílem adaptivních reakcí je obnovit turgor, opravit poškozené části buňky a obnovit růstové procesy.

Zvýšení extracelulární osmolarity vyvolá krátkodobou indukci exprese genů chránících buňku proti stresu. Důležitou signální dráhou adaptující buňky na osmotický šok je HOG MAPK signální dráha, která je aktivována stimulací transmembránových senzorů Sln1 a Sho1. Aktivací této signální dráhy dojde k rychlé stimulaci různých procesů, kterými šokovaná buňka vyrovnává ztráty vody. Nejprve se uzavřou aquaglyceroporinové kanály, které propouštějí glycerol, a poté buňka krátkodobě reguluje glykolýzu tak, aby došlo k výsledné produkci glycerolu. Glycerol zabraňuje vyschnutí buňky, udržuje turgor a zachovává biochemické procesy důležité pro přežití. Z těchto důvodů je HOG signální systém esenciální pro přežití buněk v hypertonickém prostředí.

Cílem mé diplomové práce bylo zaměřit se na gen *HOG1*, jehož produktem je MAP kináza zodpovědná za zotavení kvasinek z osmotického šoku. K pokusům jsem použila kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou vhodným eukaryotickým modelem. Kromě divokého kmene (wt) jsem pracovala ještě s dvěma *hog1* mutanty, a to s *hog1Δ* a *hog1-as*. *Hog1Δ* je mutant *Saccharomyces cerevisiae* s deletovaným *hog1* genem

Jelikož tento mutant dlouhodobě postrádá proteinkinázu Hog1, mohou se z důvodu adaptace v buňkách upravit některé přirozené biologické mechanismy a z tohoto důvodu může být chování tohoto mutantu s porovnání s fyziologií normálních buněk zavádějící (WESTFAL a THORNER 2006).

Proto byl připraven mutant *Saccharomyces cerevisiae hog1-as*, který má pozměněnou alelu bodovou mutací, což se projeví v odlišné stavbě ATP vazebného místa MAPK Hog1. Tímto se buňka stává snadno náchylnou k inhibici enzymatické funkce Hog1, a to pomocí specifického inhibitoru, analogu purinové báze adeninu, který je propustný buněčnou membránou. Za normálních podmínek se *hog1-as* mutant chová stejně jako divoký kmen, po přidání specificky zkonstruovaného AS inhibitoru dojde k inhibování Hog1 MAPK a buňky ztrácejí schopnost přežít v hyperosmotických podmínkách vyvolaných chloridem sodným. Tímto způsobem lze otestovat, zda je enzymatická aktivita Hog1 kinázy v *hog1-as* mutantovi zcela inhibována. Princip této metody vyvinul SHOKAT a jeho spolupracovníci (BISHOP *et al.* 1998, 2001, SPECHT a SHOKAT 2002, BENJAMIN *et al.* 2003) (WESTFAL a THORNER 2006).

Předtím než jsem provedla většinu experimentů bylo třeba otestovat specifitu AS inhibitoru, který jsem chtěla použít a najít jeho optimální koncentraci pro blokování Hog1 MAPK v *hog1-as* mutantních buňkách. Že je inhibitor skutečně specifický a koncentrace inhibitoru dostatečná jsem si potvrdila nejen v plotnovém testu, ale i dalších pokusech.

Po otestování specifického AS inhibitoru jsem provedla analýzu polyzomálních profilů aktivně translatovaných mRNA a to v buňkách divokého kmene *wt* a *hog1* mutantech, a to před a po 0,4 M osmotickém stresu způsobenému NaCl. Následovala analýza mRNA pomocí DNA čipu a porovnání výsledků.

Snažila jsem se nalézt rozdíly v translaci mezi divokým kmenem a mutanty *hog1* genu. Výsledky potvrdily, že kvůli osmotickému stresu dochází ke snížení translace, jak již bylo prokázáno v předchozích pracích (TEIGE *et al.* 2001, UESONSO a TOH 2002).

Buňky s mutovaným *hog1* genem se chovaly podobně a zotavení jejich translace trvalo mnohem déle než u *wt* buněk. To dokazuje, že *HOG1* gen je skutečně potřebný pro zotavení buněk z osmotického stresu.

Hog1 dependentní geny jsou u *wt* indukovány v důsledku osmotického stresu, ale není tomu tak u *hog1* mutantních buněk. Stres buněk vyvolaný osmotickým šokem aktivoval geny reagující na stimul (stres), nedostatek vody, vyschnutí buňky a regulace transportu sodných iontů. U divokého kvasinkového kmene *wt* jsem po 6 minutách od osmotického 0,4 M NaCl stresu naměřila tyto geny, které byly nepříznivými podmínkami aktivovány z důvodu adaptace buňky. Nejprve napíši geny, které nebyly uvedeny ve výsledcích DNA čipů předchozích prací (POSAS *et al.* 2000, REP *et al.* 2000). Jsou to transkripční repressor *NRG1*, protein neznámé funkce jenž asociuje s ribozomy *TMA10*, protein inkorporovaný do buněčné stěny prostřednictvím GPI-kotvy *FIT1*, a pak geny neznámé funkce *YET2*, *YJL107C*, *YDL023C*, *YFL013W-A*, *YGR226C*, *YJL114W*, *YLR164W*, *YMR085W*, *YDL242W*, *YOR062C*, *YGR242W*, *YLR108C*.

Mezi geny jejichž hladina mRNA se během osmotického šoku výrazně zvýšila patří například i transporter sacharidů plazmatické membrány *STL1*, glycerol-3-P dehydrogenáza *GPD1* účastníci se produkce glycerolu, *ALD6* cytozolická aldehyddehydrogenáza, glykogensyntáza *GSY1*, transkripční aktivátor *MSN2*, který spouští ESR dráhu, dále mitochondriální aldehyddehydrogenáza *ALD4*, ale i gen produkující protein neznámé funkce *YNR014W*. Že jsou tyto geny výrazně transkribovány po osmotickém šoku bylo uvedeno již v práci POSAS *et al.* (2000).

REP a jeho kolegové (2000) uvedli ve své práci geny indukované po 0,7 M NaCl stresu. Některé z těchto genů se shodují s geny, které byly výrazně indukovány v mých experimentech. Jedná se opět o geny uvedené výše: *STL1*, *ALD6*, *GPD1*, *GSY1*, *ALD4*, *YNR014W* kromě *MSN2*. A dále jsou to cytozolická kataláza *CTT1*, která chrání buňku před oxidativním a chemickým poškozením, serin/treoninová proteinkináza *FMP48* a proteiny neznámé funkce *PHM7*, *SYM1*, *RTN2*, *YHR087W*, *YNL194C*, *YNL195C*, *YHR022C*, *YLR042C*.

PROFT *et al.* (2005) uvedl jaderný transkripční faktor *MOT3*, který se účastní odpovědi buňky na stresové podmínky, jež byl vysoce indukovaný i v mých výsledcích.

Že během mnohonásobného stresu buňky dochází k represi ribozomálních genů poprvé pozoroval WARNER (1999). GASCH *et al.* (2000) se také přesvědčil, že geny kódující ribozomální podjednotky jsou inhibovány

během různých stresů včetně osmotického šoku. Proto mé zjištění, že osmotický stres u divokého kmene způsobil potlačení genů důležitých pro syntézu ribozomů a translaci vůbec, není až tak překvapivé. Tento jev jsem však nepozorovala u *hog1* mutantních kvasinek. Defekt v expresi těchto ribozomálních genů v *hog1* mutantech pravděpodobně vede k celkovým odlišnostem v syntéze proteinů mezi divokým kmenem a *hog1* mutanty, jak prohlásili O'ROURKE a HERSKOWITZ (2003).

Celkovým cílem této práce bylo lépe pochopit, jak je důležitá schopnost kvasinek, ale i dalších organismů adaptovat se na nepříznivé stresující podmínky a díky tomu přežít. A dále přispět k výsledkům projektu, který zkoumá posttranskripční regulaci v *Saccharomyces cerevisiae* zaměřenou na asociaci polyzomů u genů regulovaných stresem. Výsledky pak mohou být porovnávány s výsledky jiných druhů organismů či dalšími typy stresu pro nalezení základního modelu a odlišností v buněčné regulaci. Homologickou MAPK ke kvasinkové Hog1 je lidská p38 MAPK, jež se účastní reakcí na zánět. Bližší charakterizace MAPK p38 by mohla vést k novým lékařským přístupům u některých nemocí. Detailní charakterizace genů a signálních drah kvasinek je důležitým krokem k definování rolí všech genů a tím i přesnějšího pochopení dějů odehrávajících se v buňkách živých organismů

7. SOUHRN

- Otestovala jsem specifitu nového AS inhibitoru a našla vhodnou koncentraci pro inhibici Hog1 proteinu v kvasinkovém mutantu *hog1-as* prostřednictvím plotnového testu.
- Pomocí metody polyzomálních profilů jsem testovala kmeny *Saccharomyces cerevisiae* před stresem (0 min) a po 0,4 M NaCl osmotickým stresem (2 min, 6 min, 30 min). Celkem jsem proměřila 54 polyzomálních profilů. Z toho bylo 24 analýz polyzomálních profilů u kvasinkového kmene *hog1Δ* a 30 analýz u kmene *hog1-as* se specifickým AS inhibitorem.
- Úroveň transkripce a translace v kvasinkových buňkách jsem analyzovala pomocí metody DNA čipu. Celkem jsem provedla 32 analýz DNA čipů.
- Buňky po stresu velmi snížily úroveň translace a za určitý čas, co se adaptovaly nepříznivým podmínkám, začaly opět navracet hladinu translace do původního stavu.
- Oba *hog1* mutanti se chovali podobně a měli problémy s překonáním osmotického šoku.
- Hog1 dependentní geny byly indukovány v důsledku osmotického stresu, ale nestalo se tomu tak u *hog1* mutantních buněk.
- Stres buněk vyvolaný osmotickým šokem aktivoval geny reagující na stimul (stres), nedostatek vody, vyschnutí buňky a geny regulující transport sodných iontů.
- Nalezla jsem nové geny indukované osmotickým stresem: transkripční repressor *NRG1*, protein neznámé funkce jenž asociuje s ribozomy *TMA10*, protein inkorporovaný do buněčné stěny prostřednictvím GPI-kotvy *FIT1*, geny neznámé funkce *YET2*, *YJL107C*, *YDL023C*, *YFL013W-A*, *YGR226C*, *YJL114W*, *YLR164W*, *YMR085W*, *YDL242W*, *YOR062C*, *YGR242W*, *YLR108C*.
- Osmotický stres u divokého kmene způsobil potlačení genů důležitých pro syntézu ribozomů a translaci vůbec.
- Ověřila jsem, že *HOG1* gen je skutečně potřebný pro zotavení buněk z osmotického stresu.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Akhtar, N., Pahlman, A.K., Larsson, K., Corbett A.H., Adler, L. (2000): SGD1 encodes an essential nuclear protein of *Saccharomyces cerevisiae* that affects expression of the GPD1 gene for glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters* 483: 87–92.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A. (1994): GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology* 14: 4135–4144.
- Alepuz, M.P., Jovanovic, A., Reiser, V., Ammerer, G. (2001): Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular Cell* 7: 767–777.
- Alexander, M.R., Tyers, M., Perret, M., Craig, B.M., Fang, K.S., Gustin, M.C. (2001): Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Molecular Biology of the Cell* 12: 53–62.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. (1997): The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO Journal* 16: 2179–2187.
- Ball, C.A., Dolinski, K., Dwight, S.S., Harris, M.A., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Scafe, C.R., Sherlock, G., Binkley, G., Jin, H., Kaloper, M., Orr, S.D., Schroeder, M., Weng, S., Zhu, Y., Botstein, D., Cherry, J.M. (2000): Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Research* 28: 77–80.
- Benjamin, K.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Herskowitz, I. (2003): Control of landmark events in meiosis by the CDK Cdc28 and the meiosis-specific kinase Ime2. *Genes & Development* 17: 1524–1539.
- Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., Posas, F. (2000): Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology* 20: 3887–3895.
- Bishop, A.C., Buzko, O., Shokat, K.M. (2001): Magic bullets for protein kinases. *Trends in Cell Biology* 11: 167–172.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., Shokat, K.M. (1998): Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Current Biology* 8: 257–266.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., Agre, P. (1999): Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annual review of biochemistry* 68: 425–458.
- Boustany, L.M., Cyert, M.S. (2002): Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes & Development* 16: 608–619.
- Brewster, J.L., De Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259: 1760–1763.
- Brown, J.L., Bussey, H., Stewart, R.C. (1994): Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO Journal* 13: 5186–5194.
- Cleveland, W.S., Devlin, S.J. (1988): Locally-weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *Journal of The American Statistical Association* 83: 597–610.
- De Nadal, E., Alepuz, P.M., Posas, F. (2002): Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Reports* 3: 735–740.
- De Nadal, E., Casadome, L., Posas, F. (2003): Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 23: 229–237.
- Dihazi, H., Kessler, R., Eschrich, K. (2004): High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway-induced Phosphorylation and Activation of 6-Phosphofructo-2-kinase Are Essential for Glycerol Accumulation and Yeast Cell Proliferation under Hyperosmotic Stress. *The Journal Of Biological Chemistry* 279: 23961–23968.

- Dodou, E, Treisman, R. (1997): The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 17: 1848-1859.
- Dohlman, H.G., Thorner, J.W. (2001): Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annual review of biochemistry* 70: 703–754.
- Elion, E.A. (2000): Pheromone response, mating and cell biology. *Current Opinion in Microbiology* 3: 573–581.
- Erdman, S., Snyder, M. (2001): A filamentous growth response mediated by the yeast mating pathway. *Genetics* 159: 919–928.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., Silver, P.A. (1998): Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO Journal* 17: 5606-5614.
- Fassler, J.S., W. M. Gray, C.L. Malone, Tao, W., Lin, H., Deschenes, R.J. (1997): Activated alleles of yeast SLN1 increase Mcm1-dependent reporter gene expression and diminish signaling through the Hog1 osmosensing pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272: 13365–13371.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Banuelos, M.A., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A. (1993): Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in podium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 236: 363–368.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. (2000): Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11: 4241-4257.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. (1998): MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 62: 1264–1300.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J. (1994): A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811.
- Herskowitz, I. (1995): MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187–197.
- Hinnebusch, A.G. (1986): The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry* 21: 277-317.
- Hinnebusch, A.G., Natarajan, K. (2002): Gcn4, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryotic Cell* 1: 22-32.
- Hirayama, T., Maeda, T., Saito, H., Shinozaki, K. (1995): Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics* 249: 127–138.
- Hohmann, S. (1997): Shaping up: the responses of yeast to osmotic stress. In *Yeast Stress Responses*, pp. 101–146. Edited by Hohmann, S., Mager, W.H. Lexington: Landes, R.G.
- Hohmann, S. (2002): Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 66: 300–372.
- Hohmann, S. (2004): Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryotic Cell* 3: 1381–1390.
- Hohmann, S., Nielsen, S., Agre, P. (2001): Aquaporins. Academic Press. San Diego, Calif. 51: 235–276.
- Hope, I.A., Struhl, K. (1987): GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO Journal* 6: 2781-2784.
- Chowdhury, S., Smith, K.W., Gustin, M.C. (1992): Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *The Journal of Cell Biology* 118: 561–571.
- Jansen, G., Buhning, F., Hollenberg, C.P., Ramezani Rad, M. (2001): Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 265: 102–117.

- Karlgren, S., Pettersson, N., Nordlander, B., Mathai, J.C., Brodsky, J.L., Zeidel, M.L., Bill, R.M., Hohmann, S. (2005): Conditional Osmotic Stress in Yeast A System To Study Transport Through Aquaglyceroporins And Osmostress Signaling The Journal Of Biological Chemistry 280: 7186–7193.
- Klein, C., Struhl, K. (1994): Protein kinase A mediates growthregulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity. Molecular and Cellular Biology 14: 1920–1928.
- Klipp, E., Nordlander, B., Krüger, R., Gennemark, P., Hohmann, S. (2005): Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. Nature biotechnology 8: 975-982.
- Kobayashi, N., McEntee, K. (1993): Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology 13: 248–256.
- Krantz, M., Nordlander, B., Valadi, H., Johansson, M., Gustafsson, L., Dihazi, H., Kessler, R., Eschrich, K. (2004): High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. Journal of Biological Chemistry 279: 23961–23968.
- Kwan, J.J., Warner, N., Pawson, T., Donaldson, L.W. (2004): The solution structure of the *S. cerevisiae* Ste11 MAPKKK SAM domain and its partnership with Ste50. Journal of Molecular Biology 342: 681–693.
- Lamson, R.E., Takahashi, S., Winters, M.J., Pryciak, P.M. (2006): Dual Role for Membrane Localization in Yeast MAP Kinase Cascade Activation and Its Contribution to Signaling Fidelity. Current Biology 16: 618–623.
- Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P., Adler, L. (1993): A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 10: 1101–1111.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Stricker, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L., Young, P.R. (1994): A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature. 372: 739–746.
- Li, B., Nierras, C.R., Warner, J.R. (1999): Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. Molecular and Cellular Biology 19: 5393–5404.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000): Molecular Cell Biology. Fourth Edition, W. H. Freeman and Company.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (1995): Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO Journal 14: 1360–1371.
- Maeda, T., Takekawa, M., Saito, H. (1995): Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. Science 269: 554-558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H. (1994): A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. Nature 369: 242–245.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., Ruis, H. (1993): A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. EMBO Journal 12: 1997–2003.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (S.T.R.E). EMBO Journal 15: 2227–2235.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S., Cunningham, K.W. (1997): Tcn1/Crz1, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes & Development 11: 3445– 3458.
- Maulon, L., Guerin, S., Ricci, J.E., Breittmayer, D.F., Auberger, P. (1998): T-cell receptor signaling pathway exerts a negative control on thrombin-mediated increase in [Ca²⁺]_i and p38 MAPK activation in Jurkat T cells: implication of the tyrosine kinase p56Lck. Blood 91: 4232–4241.

- Moehle, C.M., Hinnebusch, A.G. (1991): Association of RAP1 binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11: 2723–2735.
- Mosch, H.U., Fink, G.R. (1997): Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145: 671–684.
- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R. (1997): Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26145–26152.
- Neuman-Silberberg, F.S., Bhattacharya, S., Broach, J.R. (1995): Nutrient availability and the RAS/cyclic AMP pathway both induce expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by different mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 15: 3187–3196.
- Nierras, C.R., Warner, J.R. (1999): Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 13235–13241.
- Norbeck, J., Pählman, A. K., Akhtar, N., Blomberg, A., Adler, L. (1996): Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13875–13881.
- Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graca, M., Lucas, C. (2003): Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1613: 57–71.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I. (1998): The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 12: 2874–2886.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I. (2004): Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular biology of the Cell* 15: 532–542.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., O'Shea, E.K. (2002): Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends in Genetics* 18: 405–412.
- Ota, I.M., Varshavsky, A. (1993): A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262: 566–569.
- Parrou, J.L., Teste, M.A., Francois, J. (1997): Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* 143: 1891–1900.
- Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., Proft, M. (2001): The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21: 16–25.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T, Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22: 153–183.
- Petterson, N., Bill, R.M., Hohmann, S. (unpublished data). Citováno podle Karlgren, S., Petterson, N., Nordlander, B., Mathai, J.C., Brodsky, J.L., Zeidel, M.L., Bill, R.M., Hohmann, S. (2005): Conditional Osmotic Stress in Yeast A System To Study Transport Through Aquaglyceroporins And Osmostress Signaling *The Journal Of Biological Chemistry* 280: 7186–7193.
- Ponting, C.P. (1995): SAM: A novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Science* 4: 1928–1930.
- Ponting, C.P., Benjamin, D.R. (1996): A novel family of Ras-binding domains. *Trends in Biochemical Sciences*. 21: 422–425.

- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., Nadal, E., Arino, J. (2000): The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 17249-17255.
- Posas, F., Saito, H. (1997): Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276: 1702-1705.
- Posas, F., Saito, H. (1998): Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO Journal*. 17: 1385-1394.
- Posas, F., Takekawa, M., Saito, H. (1998): Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Current Opinion in Microbiology* 1: 175-182.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H. (1996): Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86: 865-875.
- Price, M.A., Cruzalegui, F.H., Treisman, R. (1996): The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to active ternary complex factors and *c-fos* transcription in response to UV light. *EMBO Journal* 15: 6552-6563.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., Posas, F. (2001): Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO Journal* 20: 1123-1133.
- Proft, M., Serrano, R. (1999): Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Molecular and Cellular Biology* 19: 537-546.
- Proft, M., Struhl, K. (2002): Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell* 9: 1307-1317.
- Pryciak, P.M., Huntress, F.A. (1998): Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbg complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes & Development* 12: 2684-2697.
- Pålman, A. K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., Adler, L. (2001): The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 276: 3555-3563.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995): Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of Biochemistry* 270: 7420-7426.
- Raitt D.C., Posas F., Saito H. (2000): Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO Journal* 19: 4623-4631.
- Raven, P.H., Johnson, G.B. (1999): *Biology*. Fifth Edition; The McGraw-Hill Companies. 1284 s.
- Reiser, V., Ruis, Ammerer, G. (1999): Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 10: 1147-1161.
- Reiser, V., Salah, S.M., Ammerer, G. (2000): Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology* 2: 620-627.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (2000): The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 8290-8300.
- Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamas, M., Serrano, R., Thevelein J.M., Hohmann, S. (2001): The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Molecular Microbiology* 40: 1067-1083.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. (1999): Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5474-5485.

- Roberts, R.L., Fink, G.R. (1994): Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth. *Genes & Development* 8: 2974–2985.
- Roberts, R.L., Mosch, H.U., Fink, G.R. (1997): 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* 89: 1055–1065.
- Rosypal, S. a kol. (2003): *Nový přehled biologie*. Scientia.
- Saito, H. (2001): Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chemical Reviews* 101: 2497–2509.
- Saito, H., Tatebayashi, K. (2004): Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *The Journal of Biochemistry* 136: 267-72.
- Schmitt, A.P., McEntee, K. (1996): Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5777–5782.
- Schwartz, M.A., Madhani, H.D. (2004): Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics* 38: 725–748.
- Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K.A., Kelders, M., Mager, W.H. (2000): The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Molecular Microbiology* 36: 1381–1390.
- Sidoux-Walter, F., Hohmann, S. (unpublished data). Citováno podle Karlgren, S., Pettersson, N., Nordlander, B., Mathai, J.C., Brodsky, J.L., Zeidel, M.L., Bill, R.M., Hohmann, S. (2005): Conditional Osmotic Stress in Yeast A System To Study Transport Through Aquaglyceroporins And Osmostress Signaling *The Journal Of Biological Chemistry* 280: 7186–7193.
- Specht, K.M., Shokat, K.M. (2002): The emerging power of chemical genetics. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 155–159.
- Stathopoulos, A.M., Cyert, M.S. (1997): Calcineurin acts through the CRZ1(TCN1)-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Development* 11: 3432–3444.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000): Two-component signal transduction. *Annual Reviews Biochemistry* 69: 183–215.
- Svoboda, E., a kol. (1998): *Přehled středoškolské fyziky. 4. přepracované vydání*, Prometheus Praha. 497 s.
- Tamás, M.J., Karlgren, S., Bill, R.M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., Thevelein, J.M., Rydstrom, J., Mullins, J.G., Hohmann, S. (2003): A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6337–6345.
- Tamás, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C.W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (1999): Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology* 31: 1087–1104.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., Ammerer, G. (2001): Rck2, a member of calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 5625–5630.
- Truckses, D.M., Bloomekatz, J.E., Thorner, J. (2006): The RA Domain of Ste50 Adaptor Protein Is Required for Delivery of Ste11 to the Plasma Membrane in the Filamentous Growth Signaling Pathway of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* 26: 912–928.
- Uesono, Y., Toh, E.A. (2002): Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13848-13855.
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H., Mager, W.H. (2000): Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Molecular Microbiology* 37: 382-397.

- Warner, J.R. (1999): The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 437–440.
- Westfall, P., Ballon, D.R., Thorner, J. (2004): When the Stress of Your Environment Makes You Go HOG Wild. *Science* 306: 1511-1512.
- Westfall, P.J., Thorner, J. (2006): Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Specificity in Response to Hyperosmotic Stress: Use of an Analog-Sensitive HOG1 Allele. *Eukaryotic Cell* 5: 1215-1228.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H.K. (1995): The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO Journal* 14: 3870–3882.
- Winderickx, J., de Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. (1996): Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular and General Genetics* 252: 470–482.
- Wojda, I., Alonso-Monge, R., Bebelman, J.-P., Mager, W.H., Siderius, M. (2003): Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology* 149: 1193–1204.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., Lim, W.A. (2004): Sho1 and Pbs2 Act as Coscaffolds Linking Components in the Yeast High Osmolarity MAP Kinase Pathway. *Molecular Cell* 14: 825-832.