

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**  
**Přírodovědecká fakulta**

Genetika, molekulární biologie a virologie  
Molekulární biologie a genetika prokaryotických a eukaryotických mikroorganismů



**Bc. Viktória Fedorová**

Expres genů podílejících se na chronologickém stárnutí v kvasinkových mnohobuněčných  
strukturách

Expression of genes involved in chronological ageing in yeast multicellular structures

Diplomová práce

prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2022



Prohlášení:

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

V Praze, 04.08.2022

.....

Podpis

Táto práca vznikala za finančnej podpory grantových projektov LTAUSA18162 a GAČR 19-09381S v centre „BIOCEV“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

### **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať pani profesorku Palkovej za príležitosť byť súčasťou skupiny YCG a za čas a rady, ktoré mi venovala pri písaní nielen tejto, ale aj bakalárskej práce. Moja veľká vďaka patrí Jane, ktorá ma naučila pracovať v laboratóriu a tiež všetkým kolegom, ktorí ochotne odpovedali na moje otázky. Tá najväčšia vďaka patrí mojim rodičom, ktorí mi dávajú toľko dôvery a priestoru ísť za svojimi cieľmi, ako to nedokáže nikto a môjmu bratovi, ktorý mi je neustálym vzorom nezísť z cesty za lepšou verziou seba. Obrovská vďaka patrí tiež mojim spolubývajúcim a priateľom, ktorí ma podržali v ťažkých aj ľahších chvíľach a nedovolili mi vzdať sa.

## **Abstrakt**

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* tvoří strukturované mnohobuněčné populace, které v průběhu růstu procházejí několika růstovými fázemi v závislosti na množství přítomných živin v médiu. Poslední růstovou fází je tzv. chronologické stárnutí, v průběhu kterého se buňky dělí jen minimálně a dochází k tvorbě fyziologicky i metabolicky odlišných subpopulací. Cílem této práce je popsat expresi a buněčnou lokalizaci vybraných genů, které mohou sloužit jako markerové geny specificky exprimované během jednotlivých růstových fází kvasinkových mnohobuněčných populací ve fermentativním a respiračním médiu. Vybrané geny byly metodou transformace fluorescenčně označené připojením GFP proteinu a následně analyzované v průběhu růstu v tekutých médiích. Kmeny se specifickou expresí, lokalizací nebo výraznými rozdíly v expresi mezi dvěma zdroji uhlíku byly analyzovány pomocí Western blot analýzy proteinů a během růstu na pevných médiích ve formě mikrokolonií. Na základě množství exprimovaného proteinu v buňkách bylo vybráno 5 genů, které byly specificky exprimovány během exponenciální a stacionární fáze růstu a jejich exprese nebo lokalizace se výrazně lišila při růstu na fermentativním a respiračním médiu.

**Klíčová slova:** kvasinky, růstové fáze, exprese genů, fermentace, respirace

## **Abstract**

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* forms structured multicellular populations that undergo several growth phases during growth depending on the amount of nutrients present in the medium. The last growth phase is called chronological ageing, during which cell division is minimal and physiologically and metabolically distinct subpopulations are formed. The aim of this work is to describe the expression and cellular localization of selected genes that may serve as marker genes specifically expressed during the different growth phases of yeast multicellular populations in fermentative and respiratory media. The selected genes were tagged with the GFP gene using the transformation method and strain fluorescence subsequently analyzed during growth in liquid media. Strains with specific expression, localization, or significant differences in expression between the 2 carbon sources were analyzed by Western blots and during growth on solid media as microcolonies. Based on the amount of protein expressed in the cells, 5 genes were selected that were specifically expressed during the exponential and stationary growth phases, and their expression or localization differed significantly during growth on fermentative and respiratory media.

**Key words:** yeast, growth phases, gene expression, fermentation, respiration



## Zoznam skratiek

$\Delta$	delécia daného génu
a kol.	a kolektív
AAA+-ATPázy	AAA ATPázy s rôznou bunkovou funkciou
acetyl-CoA	acetyl-koenzým A
Acp1p	acylový prenášač mitochondriálnej matrix
<i>ACS1</i>	gén kódujúci proteín Acs1, z angl. acetylCoA synthetase
acyl-CoA	acyl-koenzým A
AdoHcy	S-adenozyl-L-homocysteín
AdoMet	S-adenozyl-L-metionín
Adr1p	transkripčný faktor odpovede na prítomnosť uhlíka
<i>ALD2</i>	gén kódujúci proteín Ald2, z angl. alcohol dehydrogenase
AmpR	gén ampicilínovej rezistencie
Ato proteíny	transmembránové proteíny prenášajúce amoniak, z angl. ammonia (ammonium) transport outward
Ato3p	transmembránový proteín prenášajúci amoniak
ATP	adenozíntrifosfát
<i>BCY1</i>	gén kódujúci regulačnú podjednotku proteínkinázy A Bcy1, z angl. bypass of cyclic-AMP requirement
BKP	brómkresolový pufo
bp	páry báz
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CLS	chronologické starnutie, z angl. chronological lifespan
Cox1p	podjednotka I cytochróm c oxidázy
COX5A	gén kódujúci proteín Cox5a, z angl. cytochrome c oxidase
CR	kalorická reštrikcia, z angl. caloric restriction
<i>CYC1</i>	gén kódujúci proteín Cyc1, z angl. cytochrome c
Cyc1p	cytochróm c, izoforma 1
<i>CYC7</i>	gén kódujúci proteín Cyc7, z angl. cytochrome c
ddH <sub>2</sub> O	demineralizovaná voda
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dnm1p	dynamínová GTPáza
Eeb1p	Acyl-koenzýmA:etanol O-acyltransferáza
eEF1A	eukaryotický elongačný faktor 1 alfa
eEF1B	eukaryotický elongačný faktor 1 beta
eEF1 $\gamma$	eukaryotický elongačný faktor 1 gama
<i>EHT1</i>	gén kódujúci proteín Eht1, z angl. ethanol hexanoyl transferase
Eht1p	octanoyl-CoA:etanol acyltransferáza
eIF2 $\alpha$	podjednotka alfa eukaryotického iniciačného translačného faktoru I, z angl. eukaryotic initiation factor 2 alpha
eRF3	eukaryotický uvoľňovací faktor 3, z angl. eukaryotic release factor
EtBr	etídiumbromid
EtOH	etanol
G418	geneticín
GDP	guanozín difosfát
GEF	guanín nukleotidový výmenný faktor, z angl. guanine nucleotide exchange factor

GFP	zelený fluorescenčný proteín, z angl. green fluorescent protein
GM	glycerolové médium
GMP	guanozínmonofosfát
GRE	cis-negatívny element génu <i>IMD2</i>
GTP	guanozíntrifosfát
<i>HAP4</i>	gén kódujúci proteín Hap4, z angl. heme activator protein
HSP	proteíny teplotného šoku, z angl. heat shock proteins
<i>HSP12</i>	gén kódujúci proteín Hsp12, z angl. heat shock protein
Hsp12p	proteín plazmatickej membrány organizujúci membránu
<i>HSP26</i>	gén kódujúci proteín Hsp26, z angl. heat shock protein
<i>HSP70</i>	gén kódujúci proteín HSP70, z angl. heat shock protein
<i>HSP104</i>	gén kódujúci proteín Hsp104, z angl. heat shock protein
Hsp104p	disagregáza
<i>HXT2</i>	gén kódujúci proteín Hxt2, z angl. hexose transporter
<i>HXT7</i>	gén kódujúci proteín Hxt7, z angl. hexose transporter
Icl2p	izocitrát lyáza mitochondriálnej matrix
<i>IMD1-4</i>	gény kódujúce proteíny Imd1-4, z angl. IMP dehydrogenase
<i>IMD2</i>	gén kódujúci proteín Imd2, z angl. IMP dehydrogenase
Imd2p	IMP-dehydrogenáza
KanMX	gén rezistencie voči kanamycínu (geneticínu)
kap.	kapitola
L bunky	bunky spodnej vrstvy pevnej kolónie, z angl. lower cells, L cells
MAT $\alpha$	párovací typ $\alpha$ haploidných buniek <i>S. cerevisiae</i>
Mig1p	transkripčný faktor glukózovej represie
Msn2p, Msn4p	multikópiové supresory mutácií SNF1
mRNA	mediátorová RNA, z angl. messenger RNA
NADPH	redukovaný nikotínamid-adenínnukleotidfosfát
napr.	napríklad
NBD1, NBD2	väzbové miesta pre nukleotidy
<i>NOP2</i>	gén kódujúci proteín Nop2, z angl. nucleolar protein
Nop2p	rRNA metyltransferáza
NQ bunky	aktívne (non-quiescentné) bunky, z angl. non-quiescent cells
NSE	kódujúca sekvencia, z angl. nutrient-sensing element
obr.	obrázok
octanoyl-CoA	octanoyl-koenzým A
OD	optická denzita
Ole1p	desaturáza
ORF	otvorený čítací rámeček, z angl. open reading frame
PARP	chromatín modifikujúci proteín
PCR	polymerázová reťazová reakcia, z angl. polymerase chain reaction
PEG	polyetylén glykol
PKA	proteínkináza A
<i>PUR5</i>	gén <i>IMD2</i>
Pox1p	oxidáza mastného acyl-koenzýmu A
pre-25S rRNA	prekurzor ribozomálnej podjednotky 25S
Q bunky	neaktívne (quiescentné) bunky, z angl. quiescent cells
resp.	respektíve
Rim15p	serín/treonínová kináza
RLS	replikatívne starnutie, z angl. replicative lifespan
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktívne kyslíkové formy, z angl. reactive oxygen species
RPM	otáčky za minútu

ssDNA	jednovláknová DNA, z angl. single strand DNA
SAGA	histónová acetyltransferáza
<i>SAH1</i>	gén kódujúci proteín Sah1, z angl. S-Adenosyl-L-Homocysteine hydrolase
Sah1p	S-adenozyl-L-homocystein hydroláza
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database, <a href="http://www.yeastgenome.org">www.yeastgenome.org</a>
<i>SSA1</i>	gén kódujúci stresový proteín, z angl. stress-seventy subfamily A
Ssa1p	ATPáza skladania proteínov a jadrového transportu
<i>SSA3</i>	gén kódujúci ATPázu Ssa3p, z angl. stress-seventy subfamily A
Ssa3p	ATPáza stresovej odpovede a skladania proteínov
Snf1p	AMP-aktivovaná S/T proteínkináza
tab.	tabuľka
TATA box	DNA-viažuca promotorová oblasť
TEA/AATS	konzervovaná doména translačných faktorov TEF
Tef1p	translačný elongačný faktor EF-1 alfa
Tef2p	translačný elongačný faktor EF-1 alfa
<i>TEF3</i>	gén kódujúci proteín Tef3, z angl. translation elongation factor
<i>TEF4</i>	gén kódujúci proteín Tef4, z angl. translation elongation factor
Tef4p	gama podjednotka translačného elongačného faktora eEF1B
TONDU	ľudský proteín interagujúci s TEF faktormi
TOR	cieľ pre rapamycín, z angl. target of rapamycin
TORC1	rapamycín-senzitívny komplex 1, z angl. target of rapamycin complex 1
TORC2	rapamycín-senzitívny komplex 2, z angl. target of rapamycin complex 2
<i>TPK1,2,3</i>	gény kódujúce katalytické podjednotky proteínkinázy A, z angl. Takashi's protein kinase
tRNA	transferová RNA, z angl. transfer RNA
tzv.	takzvaný
TY elementy	mobilné transponovateľné elementy
U bunky	bunky vrchnej vrstvy pevnej kolónie, z angl. upper cells, U cells
Uth1p	proteín vnútornej mitochondriálnej membrány
UV	ultrafialový
YEG	glukózové médium
YEPG	glukózové médium s pridaným peptónom
yEGFP	GFP optimalizovaný pre kvasinky

## Obsah

1. Úvod.....	15
2. Ciele práce .....	17
3. Literárny prehľad .....	18
3.1. Rastové fázy kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
3.1.1. Lag fáza .....	18
3.1.2. Exponenciálna fáza.....	20
3.1.3. Diauxický a postdiauxický posun.....	21
3.1.4. Stacionárna fáza a odumieranie.....	24
3.2. Chronologické starnutie kvasiniek.....	25
3.2.1. Definícia chronologického starnutia u kvasiniek .....	25
3.2.2. Iniciácia chronologického starnutia u <i>S. cerevisiae</i> a jeho hlavné regulačné dráhy .....	26
3.2.3. Typy chronologicky starnúcich kvasinkových buniek .....	28
3.2.3.1. Tekuté kultúry .....	29
3.2.3.2. Kolónie na pevnom médiu.....	30
3.2.4. Priebeh chronologického starnutia kvasinkových populácií.....	32
3.3. Charakteristika vybraných génov .....	32
3.3.1. Gény exprimované počas exponenciálnej fázy.....	32
3.3.1.1. <i>NOP2</i> .....	32
3.3.1.2. <i>TEF4</i> .....	33
3.3.1.3. <i>IMD2</i> .....	34
3.3.1.4. <i>SAHI</i> .....	35
3.3.2. Gény diauxického posunu .....	36
3.3.2.1. <i>EHT1</i> .....	36
3.3.3. Gény stacionárnej fázy .....	36
3.3.3.1. <i>SSA3</i> .....	36
3.3.3.2. <i>HSP12</i> .....	37
3.3.3.3. <i>HSP104</i> .....	37
3.3.3.4. <i>CYCI</i> .....	38
4. Materiál a metódy .....	39
4.1. Materiál.....	39
4.1.1. Rodičovský kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
4.1.2. Vektor využitý pri príprave transformačných kaziet .....	39
4.1.3. Primery .....	40
4.1.4. Štandard molekulových hmotností .....	42
4.1.5. Chemikálie a enzýmy .....	43
4.1.6. Roztoky .....	44
4.1.7. Média pre kultiváciu kvasiniek .....	45
4.1.7.1. Pevné médiá .....	45
4.1.7.2. Tekuté médiá .....	46
4.1.8. Laboratórne prístroje .....	47
4.2. Metódy.....	47
4.2.1. Sterilizácia .....	47
4.2.2. Práca s kvasinkami .....	48
4.2.2.1. Skladovanie kvasinkových kmeňov .....	48
4.2.2.2. Kultivácia kvasinkových kmeňov .....	48
4.2.2.3. Očkovanie tekutých kultúr .....	48
4.2.2.4. Meranie optickej denzity a tvorba rastovej krivky .....	48
4.2.2.5. Výsev mikrokolónií.....	49
4.2.2.6. Sledovanie alkalizácie .....	49
4.2.2.7. Príprava kmeňov s GFP fúziou pomocou transformácie .....	50

4.2.2.8. Mikroskopické pozorovanie a zachytenie fluorescencie .....	54
4.2.2.9. Western blot analýza .....	55
4.3. Použitý softvér .....	59
5. Výsledky .....	61
5.1. Konštrukcia a overenie kmeňov <i>S. cerevisiae</i> s vybranými proteínmi značenými pomocou GFP .....	61
5.1.1. Overenie úspešnosti transformácie pomocou PCR a DNA elektroforézy .....	62
5.1.2. Sledovanie alkalizácie a morfológie obrích kolónií .....	64
5.1.3. Overenie fluorescencie GFP proteínu .....	68
5.2. Analýza chovania konštruktov v tekutých kultúrach .....	71
5.2.1. BY-Nop2p-GFP .....	72
5.2.1.1. Kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom YEG médiu .....	73
5.2.1.2. Kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom GM médiu .....	76
5.2.2. BY-Tef4p-GFP .....	78
5.2.2.1. Kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom YEG médiu .....	79
5.2.2.2. Kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom GM médiu .....	82
5.2.3. BY-Imd2p-GFP .....	84
5.2.3.1. Kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG médiu .....	85
5.2.3.2. Kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom GM médiu .....	88
5.2.4. BY-Sah1p-GFP .....	90
5.2.4.1. Kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom YEG médiu .....	91
5.2.4.2. Kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom GM médiu .....	94
5.2.5. BY-Eht1p-GFP .....	96
5.2.5.1. Kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom YEG médiu .....	97
5.2.5.2. Kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom GM médiu .....	100
5.2.6. BY-Ssa3p-GFP .....	102
5.2.6.1. Kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom YEG médiu .....	103
5.2.6.2. Kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM médiu .....	106
5.2.7. BY-Hsp12p-GFP .....	108
5.2.7.1. Kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG médiu .....	109
5.2.7.2. Kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom GM médiu .....	112
5.2.8. BY-Hsp104p-GFP .....	114
5.2.8.1. Kultúry BY-Hsp104p-GFP v tekutom YEG médiu .....	115
5.2.8.2. Kultúry BY-Hsp104p-GFP v tekutom GM médiu .....	118
5.2.9. BY-Cyc1p-GFP .....	120
5.2.9.1. Kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom YEG médiu .....	121
5.2.9.2. Kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom GM médiu .....	124
5.3. Analýza expsie vybraných génov pomocou Western blot-u .....	127
5.4. Analýza expsie vybraných markerových génov v kolóniách rastúcich na pevnom médiu .....	131
5.4.1. BY-Nop2p-GFP .....	132
5.4.1.1. Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom YEG médiu .....	132
5.4.1.2. Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom GM médiu .....	134
5.4.2. BY-Tef4p-GFP .....	136
5.4.2.1. Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom YEG médiu .....	136
5.4.2.2. Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom GM médiu .....	138
5.4.3. BY-Imd2p-GFP .....	140
5.4.3.1. Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom YEG médiu .....	140
5.4.3.2. Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom GM médiu .....	142
5.4.4. BY-Ssa3p-GFP .....	144
5.4.4.1. Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom YEG médiu .....	144
5.4.4.2. Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom GM médiu .....	146
5.4.5. BY-Hsp104p-GFP .....	148
5.4.5.1. Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom YEG médiu .....	148

5.4.5.2. Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom GM médiu .....	150
6. Diskusia.....	152
6.1. BY-Nop2p-GFP.....	153
6.2. BY-Tef4p-GFP .....	155
6.3. BY-Imd2p-GFP .....	156
6.4. BY-Sah1p-GFP.....	157
6.5. BY-Eht1p-GFP .....	158
6.6. BY-Ssa3p-GFP .....	159
6.7. BY-Hsp12p-GFP .....	160
6.8. BY-Hsp104p-GFP .....	161
6.9. BY-Cyc1p-GFP .....	162
7. Záver .....	163
Bibliografia .....	164

## 1. Úvod

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednobunkový eukaryotický organizmus, v laboratórnej praxi využívaný ako modelový organizmus vďaka jednoduchej kultivovateľnosti a možnosti genetickej manipulácie. Vyznačuje sa tiež schopnosťou tvorby štruktúrovaných mnohobunkových populácií, ktoré môžu vzniknúť pri raste v tekutom médiu alebo pri kultivácii na pevnom agarovom médiu.

Počas rastu prechádzajú kvasinkové populácie fázami, v ktorých dochádza k zmene ich fyziológie a metabolizmu v súvislosti s množstvom dostupných živín. Svoj rast zastavujú počas stacionárnej fázy, počas ktorej sa delia len minimálne, dochádza u nich k tvorbe zásobných látok a v populácii je pozorovaný vznik 2 odlišných bunkových subpopulácií (\*Palková a kol., 2014).

Stacionárna fáza predstavuje pre kvasinkové populácie fázu tzv. chronologického starnutia, ktoré je charakterizované ako čas, ktorý sú kvasinky schopné prežiť vo fáze tzv. postdiauxického posunu a stacionárnej fáze. Ich životaschopnosť je pri tom posudzovaná ako schopnosť opätovného delenia po dodaní živín (\*Fabrizio a Longo, 2003; Burtner a kol., 2009). Vďaka schopnosti dlhodobého prežívania v nepriaznivých podmienkach je kvasinka *S. cerevisiae* modelom pre výskum bunkového starnutia vyšších organizmov, s ktorými zdieľa mnoho homológnych génov.

Pri prechode rastovými fázami dochádza v jednotlivých bunkách k expresii špecifických génov, ktoré môžu slúžiť ako markerové gény konkrétnej rastovej fázy. Ich identifikácia tak pomáha charakterizovať danú rastovú fázu, ale aj procesy, ktoré sú v bunkách aktivované pri zmene podmienok.

Typickým zdrojom uhlíka je pre kvasinky glukóza, ktorú spracovávajú procesom fermentácie. Po jej vyčerpaní však dokážu prostredníctvom respirácie metabolizovať tiež vedľajšie produkty fermentácie, medzi ktoré patrí napríklad etanol. Respirácia však môže u kvasiniek prebiehať aj ako primárny metabolizmus, ktorým spracovávajú okrem etanolu napr. glycerol, pričom aj s týmto zdrojom uhlíka prechádzajú rovnakými rastovými fázami ako v prípade glukózy (\*Matmati a Hannun, 2008). Respiratívne médium tak predstavuje alternatívu, ktorá môže priblížiť rast a procesy prebiehajúce v starnúcich bunkách pri iných než ideálnych podmienkach.

Cieľmi tejto práce bolo stručne charakterizovať jednotlivé rastové fázy a vybrané gény, ktoré sú špecificky exprimované v mnohobunkových populáciách kvasinky *S. cerevisiae* a následne pripraviť konštrukty, u ktorých vybrané gény nesú fluorescenčnú značku GFP. Dané konštrukty boli následne analyzované v priebehu rastu v tekutých kultúrach s 2 rôznymi zdrojmi uhlíka (glukóza a glycerol/etanol), pričom expresia jednotlivých génov bola pozorovaná ako intenzita fluorescenčného žiarenia. Cieľom tejto analýzy bolo vybrať gény, ktoré sú exprimované v konkrétnych rastových fázach a môžu tak slúžiť ako ich markerové gény pre ďalšie analýzy.

Zároveň bola analyzovaná lokalizácia týchto génov počas jednotlivých rastových fáz v rámci bunky. Odhadované množstvo proteínov v bunke v špecifickom čase bolo na koniec overené Western blot analýzou. Pozorované rozdiely boli v rámci ďalšieho cieľa tejto práce charakterizované rovnakou metódou počas rastu na pevných médiách s rovnakými zdrojmi uhlíka vo forme mikrokolónií.



## 2. Ciele práce

1. Pomocou transformácie vytvoriť konštrukty kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s vybranými markerovými génmi exprimovanými v odlišných rastových fázach s použitím materského laboratórneho kmeňa BY4742 s cieľom vybrať najvhodnejšie markerové gény pre zisťovanie rastových fáz na dvoch typoch médií – fermentatívnom a respiračnom.

2. Metódou merania optickej denzity pomocou spektrofotometra a pozorovaním fluorescencie analyzovať expresiu vybraných génov pri raste v tekutom médiu a porovnať túto expresiu pri raste na 2 rôznych zdrojoch uhlíka.

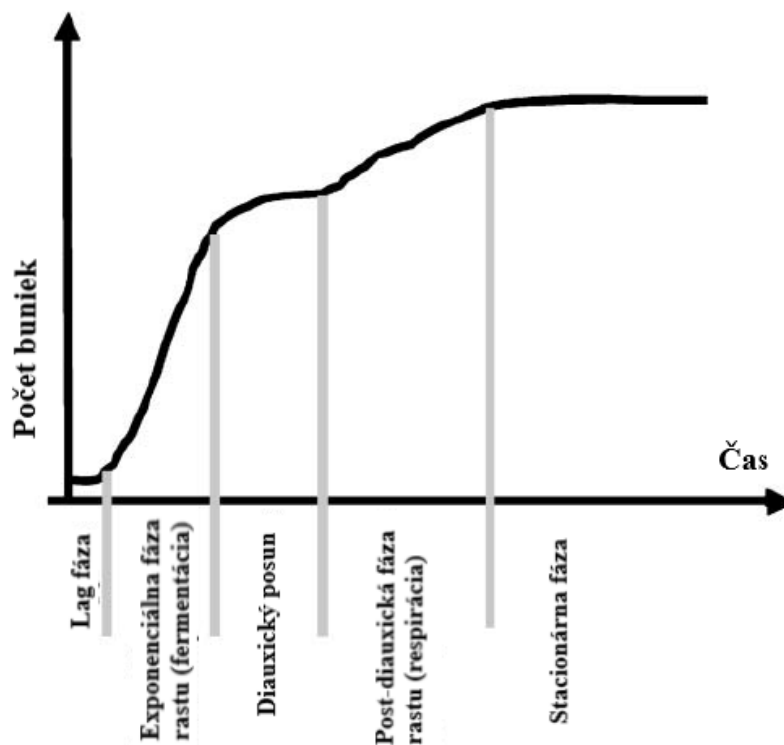
3. Pomocou Western blot analýzy vyhodnotiť expresiu vybraných markerových génov so špecifickými rozdielmi v expresii pri raste na 2 rôznych zdrojoch uhlíka.

4. Na základe získaných pozorovaní vybrať kmene so špecifickými rozdielmi a analyzovať expresiu týchto markerových génov počas rastu na pevnom médiu pri raste vo forme mikrokolónií na 2 rôznych zdrojoch uhlíka.

### 3. Literárny prehľad

#### 3.1. Rastové fázy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Rast kvasinkových, ako aj mikrobiálnych populácií je definovaný ako zvyšujúci sa počet buniek v čase, zobrazený vo forme rastovej krivky (obr. 1). Pri kultivácii v ideálnych podmienkach, napríklad s obsahom fermentovateľných zdrojov uhlíka, sa na tejto krivke dajú rozlíšiť štyri základné fázy, doplnené „prechodovou“ fázou spomalenia (\*“The Bacterial Growth Curve and the Factors Affecting Microbial Growth,”).



**Obr. 1:** Rastová krivka zobrazujúca základné fázy rastu kvasinkových populácií v čase. Po inokulácii dochádza k pomalému prispôsobeniu sa novým podmienkam, následne sa logaritmicke zvyšuje počet buniek v populácii až do vyčerpania živín, kedy bunky prechádzajú do stacionárnej fázy a nedelia sa (\*Matmati a Hannun, 2008).

##### 3.1.1. Lag fáza

Prvou fázou rastu je pre mnohobunkové populácie „lag“ fáza, ktorá nastáva po inokulácii do čerstvého média. Je to najkratšia fáza, počas ktorej kvasinky nepodstupujú delenie, teda nedochádza k rastu populácie, ale zväčšujú svoj objem a sú aktívne v produkcii proteínov a ďalších metabolitov, ktoré bunky vyžadujú pre svoje delenie (\*Matmati a Hannun, 2008; Alshaim a kol., 2012; \*“The Bacterial Growth Curve and the Factors Affecting Microbial Growth,”).

Táto fáza je najkratšia a počas nej je úlohou buniek prispôbiť sa novým podmienkam fyziologicky aj metabolicky natoľko, aby dokázali čo najlepšie využiť nové zdroje (Brejning a kol., 2005). Jej trvanie udáva štúdia z roku 2020 od približne 5 do viac ako 20 hodín, v závislosti od stavu buniek v populácii a jej heterogenity, teda obsahu buniek, ktoré sú schopné po lag fáze obnoviť svoj rast a tých, ktoré lag fázu nepodstupujú (Jariani a kol., 2020). Tieto rozdiely môžeme vidieť aj medzi materskými bunkami, ktoré už prešli delením a mladými dcérskymi bunkami – materské bunky dokážu na rozdiel od dcérskych buniek rýchlejšie nadobudnúť tzv. kritickú veľkosť potrebnú pre „štart“ bunkového cyklu, teda delenia. Pre dcérske bunky je nutná produkcia nových nutrientov a ich následná premena na biomasu, čo pre ne znamená viac času v prvotnej fáze populačného rastu (Powell a kol., 2003; Ginovart a kol., 2011). Výrazný efekt na dĺžku lag fázy má tiež veľkosť inokula, pričom Ding a kol., 2009 preukázali, že čím hustejšie je inokulum, tým ľahšie je pre populáciu prejsť lag fázou a tým kratšia je jej dĺžka.

Rast na glukózovom médiu je charakteristický tým, že v lag fáze dochádza v bunkách k navýšeniu koncentrácie druhého posla cAMP, ktorá sa postupne znižuje čím bližšie je bunka k vstupu do exponenciálnej fázy, čím aktivuje dôležitú pro-rastovú dráhu proteínkinázy A (PKA) (Ma a kol., 1997).

Experimenty sledujúce lag fázu pri prechode populácie z glukózového média na maltózové preukázali, že v tejto fáze bunky zvyšujú expresiu ribozomálnych génov, čo môže svedčiť o ich zníženej schopnosti správnej reakcie na limitáciu glukózy. Zistenie, že medzi nadmerne exprimované gény patrí aj skupina obsahujúca gény elektrónového transportného reťazca potvrdzuje hypotézu, že aktivácia respirácie je nevyhnutným krokom pri úniku z lag fázy pri prechode z jedného zdroja uhlíka na druhý. Dôkazom tohto tvrdenia je aj aktívnejšia expresia génu *HAP4*, tzv. „master regulator“ molekuly pre respiráciu, ktorej dôsledkom je kratšia lag fáza (Perez-Samper a kol., 2018; Jariani a kol., 2020).

Prekvapivo zvýšená expresia je u buniek podstupujúcich lag fázu pozorovaná pri zmene zdroja uhlíka tiež u génov stresovej odpovede, ako sú *HSP12* alebo *SSA1*, spolu s hexózovými transportérmi, napr. *HXT2* či *HXT7*. Súhrnom týchto zistení je predpoklad, že len bunky, ktoré dokážu generovať ATP sú v konečnom dôsledku schopné vystúpiť z lag fázy a vstúpiť do fázy exponenciálneho rastu (Jariani a kol., 2020).

Ďalšie štúdie skúmajúce expresiu génov v tomto štádiu rastu preukázali, že gény s podobnými funkciami boli exprimované v podobných intervaloch, pričom mnoho génov bolo aktívnejšie exprimovaných na začiatku lag fázy a postupne reprimovaných. Zhrnutím štúdie sústrediacej sa na transkripčné zmeny v celom genóme je poukázanie na to, že gény syntézy proteínov, ich skladania, modifikácie či translokácie a degradácie, gény ribozomálnej biogenézy, procesov s RNA, bunkovej polarity a delenia, gény kontrolujúce bunkový cyklus a transportné

a signálne gény boli aktívne exprimované už v skorých počiatoch lag fázy. Zároveň boli tieto gény exprimované kontinuálne počas celej lag fázy (Brejning a kol., 2003).

V neskoršom priebehu lag fázy boli exprimované najmä gény kódujúce proteíny upravujúce chromatinovú a chromozomálnu štruktúru a gény S-fázy bunkového cyklu. Úplne reprimované boli v bunkách gény procesov spracovávajúcich acetyl-CoA, gény glyoxalátového cyklu a respiračné gény, ktoré sú pre rast mnohobunkovej populácie potrebné až v neskorších fázach exponenciálneho rastu (Brejning a kol., 2003).

### 3.1.2. Exponenciálna fáza

Po lag fáze nasleduje najrýchlejšia, logaritická fáza (z angl. logarithmic phase), v ktorej sa jednotlivé bunky aktívne delia a dochádza k zdvojnásobeniu množstva buniek v kultivácii po každom delení, tzv. binárnemu deleniu (z angl. binary fission). Bunky sú metabolicky aktívne a spotrebávajú cukor za vzniku etanolu (\*Matmati a Hannun, 2008; \**“The Bacterial Growth Curve and the Factors Affecting Microbial Growth,”*; \**“What are the Stages of the Bacterial Growth Curve?”* 2021).

Skrátene „log“ fáza predstavuje čas, kedy sú bunky metabolicky veľmi aktívne, avšak prebiehajúce procesy sú obmedzené na procesy nutné pre delenie (\**“What are the Stages of the Bacterial Growth Curve?”* 2021).

Čo sa týka veľkosti buniek, počas log fázy sú dcérske a materské bunky symetrické a takmer nerozlíšiteľné, na rozdiel od skorších, ale aj neskorších fáz, kedy dochádza k vzniku asymetrie a ľahkej odlíšiteľnosti (Porro a kol., 2003; Portell a kol., 2011).

Proteomické analýzy kvasinkových buniek *S. cerevisiae* exponenciálnej fázy preukázali zvýšenú aktiváciu bunkových procesov, ako sú transkripcia, replikácia, translácia, delenie buniek, uhlíkový, ale aj dusíkový metabolizmus. Zároveň bunky aktívnejšie biosyntetizujú aminokyseliny a prebieha u nich glykolýza, glukoneogenéza, metabolizmus DNA a tRNA. Viditeľná bola aj proteazomálna degradácia, čo svedčí o dôležitosti programovanej degradácie proteínov (Huang a kol., 2012).

Čím bližšie boli bunky rastúce na médiu s obsahom glukózy k úniku z exponenciálnej fázy, tým výraznejší bol aj osmotický stres tvorený pravdepodobne ako dôsledok prítomnosti vedľajších produktov, napríklad etanolu. Bunky začínali postupne častejšie prechádzať k využívaniu respirácie oproti glykolýze, obohatený bol tiež výskyt a aktivita aktínového cytoskeletu. Ďalšie analýzy však ukázali, že gény respirácie, citrátového cyklu, etanolovej fermentácie, metabolizmu kyseliny octovej či glycerolu boli v bunke exprimované počas celej exponenciálnej fázy v bazálnom množstve aj napriek dostatku glukózy v médiu, vďaka čomu môžeme súdiť potrebu acetyl-CoA pre syntézu aminokyselín či mastných kyselín (Huang a kol., 2012).

V konečnom štádiu exponenciálnej fázy sa výrazne znižovala rýchlosť proliferácie sprevádzaná represiou ribozomálnych proteínov či transkripčných koaktivátorov (Huang a kol., 2012).

Už štúdia podľa Imai a Ohno z roku 1995 preukázala, že počas rastu kvasinkových populácií dochádza k zmene pH, ktoré z pôvodnej hodnoty 5,7 v lag fáze vystúpilo až na hodnotu 6,8 počas log fázy. Uvedený experiment skúmal vplyv extracelulárneho pH na pH intracelulárne a to za podmienok, kedy kvasinkové bunky rástli na médiu s glukózou a zároveň extracelulárne pH ich okolia bolo udržiavané na konštantnej hodnote pomocou amoniaku (NH<sub>3</sub>). Vďaka neustálej prítomnosti glukózy v kultivačnom médiu však pH v ďalšej fáze rastu opäť kleslo na hodnotu 5,6. Tieto poznatky potvrdili predpoklad o zmene pH pri dostatku glukózy a jej spotrebe z roku 1987 (Eraso a kol., 1987; Imai a Ohno, 1995).

Dôležitou „pro-rastovou“ dráhou je u kvasiniek tzv. cAMP-PKA dráha, ktorej hlavným komponentom je proteínkináza A (PKA) aktivovaná v prítomnosti fermentovateľných zdrojov uhlíka, ktorým je v prípade kvasiniek najmä glukóza. Jej najväčší vplyv sa prejavuje v „down-regulácii“ transkripcie stresových faktorov Msn2p a Msn4p, respektíve pozastavuje ich import do jadra (Görner a kol., 2002). PKA pozostáva z dvoch regulačných podjednotiek u kvasiniek kódovaných génom *BCY1* a dvoch katalytických podjednotiek, kódovaných génmi *TPK1*, *TPK2* a *TPK3*. Po naviazaní signálnej molekuly cAMP na regulačné podjednotky dochádza k uvoľneniu katalytických podjednotiek z holoenzýmu a PKA je tak aktivovaná (Toda a kol., 1987; Tudisca a kol., 2010; Dolz-Edo a kol., 2019). Štúdia z roku 2010 ukázala, že katalytické podjednotky PKA sú v kvasinkových bunkách rozlične lokalizované. Počas exponenciálnej fázy, keď je aktivita PKA najvyššia, teda v jej počiatku, je jasná lokalizácia kompartmentov Bcy1p a Tpk2p v jadre, kým zvyšok môžeme pozorovať najmä v cytoplazme. Inú lokalizáciu a tiež aktivitu pozorujeme vo fáze stacionárnej, kedy je pre bunky dôležitá práve inaktivácia tejto dráhy (Tudisca a kol., 2010).

### **3.1.3. Diauxický a postdiauxický posun**

Najpomalšou fázou je tzv. diauxický posun (z angl. diauxic shift), kedy z média úplne ubudne glukóza a bunky sú nútené prepnúť svoj metabolizmus, pričom prechádzajú do fázy postdiauxického posunu. V tomto štádiu už aktívne využívajú respiráciu za aeróbnej spotreby etanolu, pričom vzniká oxid uhličitý (\*Matmati a Hannun, 2008).

Bunky v diauxickom posune rastú v nedostatku živín a dochádza u nich k hromadeniu toxických metabolitov, najmä sekundárnych produktov oxidatívneho metabolizmu. Z tohto dôvodu postupne vstupujú do tzv. G0 štádia bunkového cyklu, teda sa stávajú quiescentnými (\*Herman, 2002; \*Gray a kol., 2004). V súvislosti s tým si začínajú hromadiť zásobné látky, predovšetkým polysacharid glykogén, ešte pred úplnou spotrebou glukózy, triacylglyceroly,

polyfosfáty a trehalózu, ktorej najviac pribúda až v postdiauxickom posune či začiatkom stacionárnej fázy po kompletom využití dostupnej glukózy (Taylor a Parks, 1979; Hosaka a Yamashita, 1984; \*Galdieri a kol., 2010).

Keďže hlavným rozdielom oproti skorším fázam je množstvo dostupných živín, vstup do fázy diauxie je pod kontrolou signálnych dráh reagujúcich na množstvo živín v médiu. Sú to najmä dráhy PKA, TOR (z angl. target of rapamycin), Snf1p a Rim15p (\*Galdieri a kol., 2010). Na rozdiel od log fázy, kedy sú najpodstatnejšie regulačné podjednotky PKA lokalizované najmä v jadre, pre diauxický posun je typická ich aktivita v cytoplazme, čím je umožnená fosforylácia stresových transkripčných faktorov Msn2p/Msn4p, ktoré vďaka tomu môžu byť translokované do jadra (Tudisca a kol., 2010).

Dráha TOR zahŕňa kinázové komplexy TORC2, ktorý reguluje aktínový cytoskelet a bunkovú polaritu a TORC1 inhibovaný rapamycínom. Komplex TORC1 reaguje na prítomnosť najmä dusíkatých zdrojov v médiu. Jeho inhibícia vedie súčasne k inhibícii syntézy proteínov, indukcii autofágie a vstupu do G0 stavu. Reprogramovaná je tiež expresia stresových faktorov (\*Galdieri a kol., 2010).

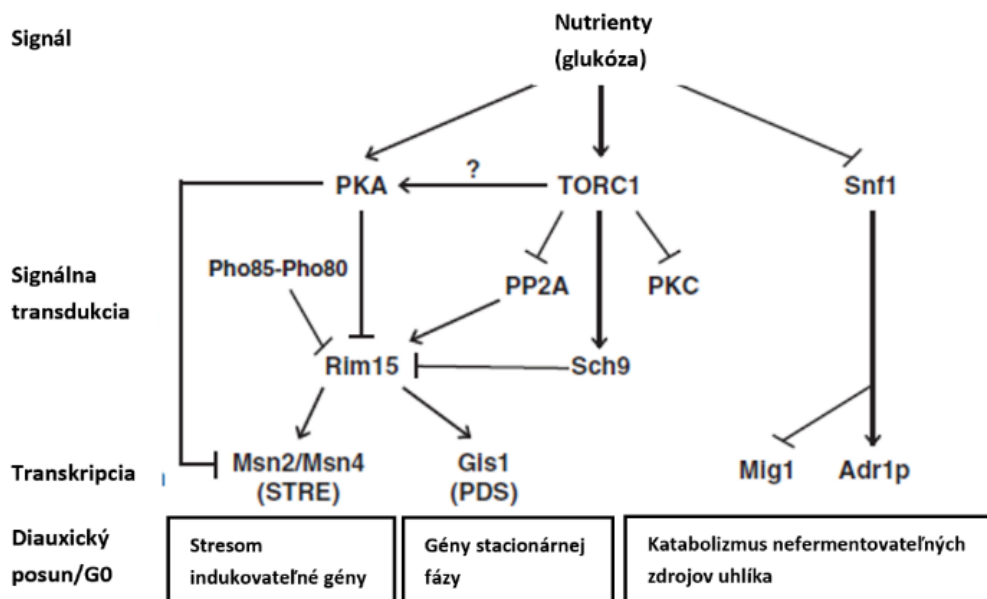
Snf1p je naopak katalytická podjednotka komplexu proteínov, ktorý je aktívny v neprítomnosti glukózy. Jeho úlohou je regulácia transkripčných faktorov a chromatinovej remodelácie (\*Galdieri a kol., 2010). Jeho „downstream“ cieľmi sú transkripčný represor Mig1p a aktivátor Adr1p, ktoré ďalej aktivujú gény metabolizmu glukózy. Funkcia Mig1p je po fosforylácii kinázou Snf1p potlačená a dochádza k aktivácii génov, ktoré v prítomnosti glukózy nie sú exprimované. Adr1p je naopak fosforyláciou kinázou Snf1p aktivovaný a umožňuje transkripciu génov, ktoré majú rolu v katabolizme nefermentovateľných uhlíkových zdrojov. Proteín Adr1 je zároveň počas exponenciálneho rastu na glukózovom médiu inhibovaný kinázou PKA (\*Schüller, 2003; \*Galdieri a kol., 2010). V súvislosti s chromatinovou remodeláciou sa Snf1p podieľa na fosforylácii serínu na históne H3 a zodpovedá tiež za indukciu histónovej acetyltransferázy SAGA (Lo a kol., 2001, p. 1; van Oevelen a kol., 2006).

Stretom všetkých dráh, ktoré sú pod vplyvom nutrientov, je kináza Rim15p (obr. 2), ktorá má pozitívny vplyv na transkripciu stresových génov a riadi vstup buniek do G0 fázy, resp. prechod medzi diauxickým až postdiauxickým posunom a stacionárnou fázou (\*Galdieri a kol., 2010).

Už v roku 1997 bol ozrejmenejší profil exprimovaných génov počas reprogramovania metabolizmu z fermentácie na respiráciu, ku ktorému dochádza práve vo fáze diauxie. DeRisi a kol. (1997) vo svojej štúdií pomocou DNA microarray analýzy zhrnuli prebiehajúce zmeny nasledovne: medzi najviac indukované zaradili enzýmy aldehyd dehydrogenázu *ALD2* a acetylkoenzým A syntázu *ACSI*, ktorých úlohou je tvorba acetyl-CoA z produktov alkoholovej

dehydrogenázy. Acetyl-CoA je následne využitý v trikarboxylovom a glyoxylátovom cykle (DeRisi a kol., 1997).

Novšia štúdia z roku 2020 sústrediaci svoje experimenty na mitochondrie popisuje zmeny týchto organel medzi jednotlivými fázami rastu, respektíve počas rozličných metabolizmov. Počas diauxického posunu bolo pozorovateľné takmer dvojnásobné zväčšenie objemu mitochondrií, pričom po úplnom prechode na respiráciu, počas postdiauxického posunu, sa tento objem zvýšil až približne trojnásobne oproti diauxii. Podľa očakávaní táto štúdia preukázala aktívnu reguláciu proteínov cyklu trikarboxylových kyselín, respiračného reťazca, ATP syntázy a mitochondriálnych transportérov, pričom tieto proteíny boli „up-regulované“ najmä na začiatku diauxického posunu, teda primárne ako odpoveď na nedostatok glukózy. Menej viditeľná bola ich regulácia v čase postdiauxického posunu, počas úplnej závislosti na respirácii. Špecificky „up-regulované“ boli viaceré mitochondriálne proteíny, vrátane acylového prenášača Acp1p, Cox16p súvisiaci s cytochróm c oxidázou či dynamínový proteín Dnm1p. Naopak výrazne „down-regulované“ boli proteíny Fe-S procesov, ale aj chaperóny. Oproti diauxii, v postdiauxickom čase bol „up-regulovaný“ jediný proteín, a to Uth1p vystupujúci v mitochondriálnej biogenéze (Di Bartolomeo a kol., 2020).



**Obr. 2:** Súhrn signálnych dráh, ktoré zodpovedajú za prechod medzi exponenciálnou fázou a fázou diauxického posunu. Pro-rastové dráhy PKA a TORC1 reagujúce na množstvo dostupných živín sa stretávajú pri negatívnej regulácii kinázy Rim15p, ktorej vplyv cieľi na gény aktívne počas stresových podmienok. Kináza Snf1p je oproti nim aktívna pri nedostatku živín, najmä glukózy, a jej účinok je viditeľný na expresii génov zodpovedných za katabolizmus nefermentatívnych uhlíkatých zdrojov (upravené podľa \*Galdieri a kol., 2010).

### 3.1.4. Stacionárna fáza a odumieranie

Najdlhšou fázou je fáza stacionárneho rastu, ktorá je charakteristická tým, že nedochádza k deleniu buniek, pretože z média boli vyčerpané všetky potrebné živiny. Táto fáza je známa tiež ako chronologické starnutie, počas ktorého dochádza k diferenciacii buniek na subpopulácie líšiace svojou fyziológiou, ale aj metabolizmom (\*Matmati a Hannun, 2008; \*Palková a kol., 2014).

Bunky v stacionárnej fáze rastu sa z fyziologického hľadiska výrazne líšia od buniek, ktoré sú v diauxickej fáze, sú v strese a dlhodobo prežívajú v nedostatku živín, prevažne v quiescentnom stave, pričom sú nútené exprimovať najmä gény odpovedajúce na stres, ako sú gény kódujúce proteíny teplotného šoku (HSP, z angl. heat-shock proteins) *HSP12*, *HSP26*, *HSP104* či *SSA3* (\*Herman, 2002; \*Gray a kol., 2004).

Oproti bunkám rastúcim exponenciálne vidíme v tejto fáze minimum pučiacich buniek s nereplikovanou DNA, transkripcia prebieha približne 5-krát menej a translácia len na 0,3 % kapacity (Fuge a kol., 1994). Výrazne redukované sú aj procesy rastu, naopak dochádza k aktívnejšiemu hromadeniu zásobných látok a rezistencii voči stresovým podmienkam, kam môžeme zaradiť okrem iného aj teplotný šok. Jedným zo znakov zvýšenej odolnosti sa stáva zhrubnutá bunková stena (\*Herman, 2002). Stresovou podmienkou je tiež neustála endogénna produkcia reaktívnych kyslíkových častíc (z angl. reactive oxygen species, ROS), ktorým sa bunka bráni syntézou kataláz a superoxidových dismutáz (Zakrajšek a kol., 2011).

Ako už bolo vyššie spomenuté, začiatkom tejto fázy dochádza k najvýraznejšiemu hromadeniu zásobného sacharidu, trehalózy, ktorá bunke slúži pri ochranných mechanizmoch voči stresu (\*Galdieri a kol., 2010; Zakrajšek a kol., 2011). Zároveň dochádza k hromadeniu triacylglycerolov aj napriek tomu, že celková produkcia fosfolipidov sa znižuje, čo nasvedčuje tomu, že aj triacylglyceroly slúžia bunkám v stacionárnej fáze ako zásobáreň energie (Zakrajšek a kol., 2011).

Zvýšená produkcia triacylglycerolov vo fáze stacionárnej je pravdepodobne výsledkom aktivity fosfatázy fosfatidylovej kyseliny. Zmeny v enzymatickej aktivite tejto dráhy boli pozorované na médiu s rôznou koncentráciou inozitol-cholínu. Výsledky preukázali zmeny fosfolipidového zloženia bunkovej steny oproti exponenciálnej fáze. Došlo k zvýšeniu obsahu fosfatidylozitolu oproti fosfatidylserínu vo vnútornej vrstve membrány pravdepodobne kvôli zníženiu aktivity enzýmu fosfatidylserín syntázy (Homann a kol., 1987).

Už viackrát opisovaná dráha PKA je v tejto fáze inaktivovaná. Cytoplazmatické proteíny Tpk2p a Tpk3p sú v tejto fáze sústredené v tzv. stresových granulách, čo môže byť pomocou pre vysporiadanie sa s vyššou koncentráciou katalyzačných podjednotiek PKA. Predpokladaný je tiež ich významný vplyv na transláciu mRNA (Tudisca a kol., 2010).



Za zmienku v súvislosti s transláciou stojí tiež faktor napomáhajúci predĺženiu tejto fázy, a to schopnosť fosforylovať translačný faktor eIF2 $\alpha$ . Jeho fosforylovaná forma sa v bunke vyskytuje tým viac, čím bližšie je bunka k prechodu do stacionárnej fázy. Translačný faktor eIF2 $\alpha$  je v bunke aktivovaný pri nedostatku uhlíkatých, ale aj dusíkatých zdrojov. Jeho fosforylácia znamená jeho inaktiváciu, čo v konečnom dôsledku vedie k redukcii translačných procesov a k odolnejšiemu zotrvaní buniek v stacionárnej fáze rastu, teda v nedostatku živín (Jiménez-Saucedo a kol., 2021).

Stacionárnej fáze a schopnosti buniek zotrvať v nej čo najdlhšie bude detailnejšie venovaná nasledujúca kapitola.

### **3.2. Chronologické starnutie kvasiniek**

Jednobunkový eukaryotický modelový organizmus, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, sa okrem iného ukazuje aj ako užitočný model pre výskum bunkového starnutia. Tento záver vychádza z poznatku, že spomínaná kvasinka exprimuje viacero génov vystupujúcich v uvedenom procese, ktoré sú homologické s génmi ďalších organizmov, vrátane cicavčích buniek (MacLean a kol., 2001; \*Longo a kol., 2012).

#### **3.2.1. Definícia chronologického starnutia u kvasiniek**

U *S. cerevisiae* rozlišujeme 2 typy starnutia – replikatívne a chronologické. Replikatívne starnutie (z angl. replicative lifespan, RLS) sa týka aktívne sa deliacich buniek, kam okrem kvasinkových patria napr. zárodočné kmeňové bunky. Je popisované ako počet delení, ktorým bunka dokáže prejsť, kým sa dostane do štádia odumierania a následnej smrti (\*Fabrizio a Longo, 2003; \*Carmona-Gutierrez a Büttner, 2014).

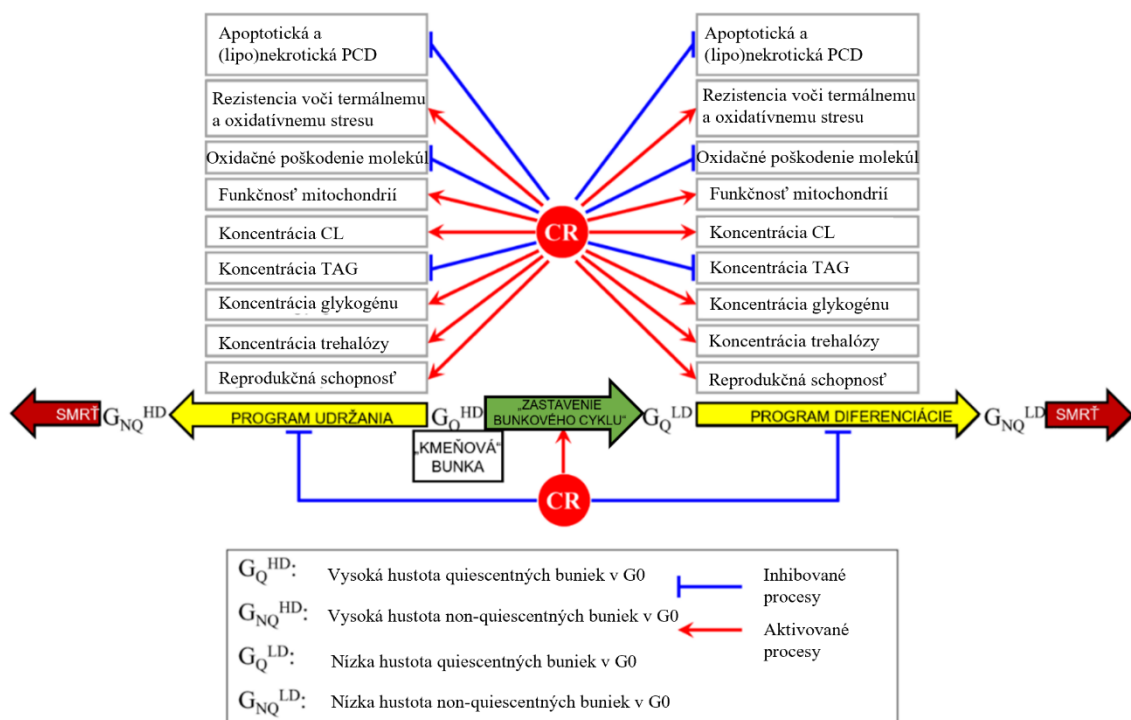
Chronologické starnutie (z angl. chronological ageing, CLS) definujeme ako čas, počas ktorého bunky prežívajú v postdiauxickom posune a stacionárnej fáze svojho rastu v postmitotickom stave (\*Fabrizio a Longo, 2003; \*Carmona-Gutierrez a Büttner, 2014). Ich životaschopnosť je v tejto fáze pozorovaná ako schopnosť znovu vstúpiť do bunkového cyklu po opätovnom doplnení živín a obnoviť tak svoje delenie (Burtner a kol., 2009). Toto štádium kvasinkové populácie dosiahnu približne 2 – 3 dni po začiatku kultivácie, respektíve 2 – 7 dní v závislosti od dodaného zdroja uhlíka, v okamihu, keď dôjde k vyčerpaniu väčšiny prístupných živín, čo je stav definovaný ako kalorická reštrikcia (\*Longo a kol., 2012). Tento stav vedie v jednotlivých bunkách k „down-regulácii“ biosyntézy, pozastaveniu bunkového cyklu, aktivácii respirácie, autofágie a odolnosti voči stresovým podmienkam. Podľa Pogoda a kol., 2021 za dlhšiu životaschopnosť kvasinkových buniek počas CLS môžu primárne gény lokalizované na vnútornej membráne a v matrixe mitochondrií a za ich odolnosť voči hladovaniu môže zvýšená hladina ATP a nižšia hladina ROS (Pogoda a kol., 2021).

Prvotným zdrojom uhlíka v experimentálnom prostredí skúmajúcom CLS je glukóza, po jej vyčerpaní bunky začínajú spotrebovať etanol, tvorený ako produkt fermentácie a prepínajú na oxidatívny metabolizmus (Burtner a kol., 2009; Enriquez-Hesles a kol., 2020). Využívanie nefermentovateľných zdrojov znamená pre kvasinky vstup do G0 fázy bunkového cyklu, nazývaného tiež latentný alebo quiescentný stav, ktorý podstupujú aj neuróny či svalové bunky ľudského organizmu (Enriquez-Hesles, 2020).

### **3.2.2. Iniciácia chronologického starnutia u *S. cerevisiae* a jeho hlavné regulačné dráhy**

Ako už bolo vyššie naznačené, za hlavného iniciátora fázy chronologického starnutia u kvasiniek je pokladaná kalorická reštrikcia (z angl. *caloric restriction*, CR) sprevádzaná acidifikáciou média. Ukázalo sa, že kalorická reštrikcia pozitívne vplyva na dĺžku chronologického starnutia naprieč všetkými organizmami, počnúc kvasinkami a siahajúc až k ľudským bunkám (\*Dawes a Perrone, 2020). Po vyčerpaní glukózy, dusíka či fosfátu dochádza u kvasinkových populácií k pozastaveniu bunkového cyklu vo fáze G1 a následne k diferenciacii buniek na subpopuláciu aktívnu a neaktívnu. Kalorickej reštrikcii podlieha tiež veľkosť či množstvo pučiacich a nepučiacich buniek v jednotlivých subpopuláciách. Medzi ďalšie procesy pod kontrolou kalorickej reštrikcie patrí zvyšovanie koncentrácie zásobných látok – glykogénu a trehalózy, a to v oboch subpopuláciách chronologicky starnúcej kultúry, množstvo lipidov v bunke, ale aj aktivita mitochondrií. Spoločným znakom vplyvu kalorickej reštrikcie na spomínané procesy je zlepšenie schopnosti rezistencie voči vysokej teplote a oxidatívne stresu (obr. 3) (Leonov a kol., 2017).

Množstvo živín pôsobí na 2 základné, tzv. „pro-rastové“ signálne dráhy zložené z proteínov a proteínových komplexov – dráhu TOR a Ras/cAMP/PKA, ktoré sú aktivované rozličnými nutrientmi. Pre TOR dráhu sú kľúčové aminokyseliny, pre Ras/PKA dráhu je to primárne glukóza, pričom ich spoločný stret predstavuje kináza Rim15p a transkripčné faktory Msn2p/Msn4p zodpovedajúce za rezistenciu voči stresovým podmienkam (\*Longo a kol., 2012; Leonov a kol., 2017).



**Obr. 3:** Vplyv kalorickej reštrikcie na jednotlivé procesy v bunke. Červenou farbou sú naznačené procesy a koncentrácie látok, ktoré CR aktivuje či zvyšuje, modrou farbou tie, ktoré CR inaktivuje či znižuje (upravené podľa Leonov a kol., 2017).

V závislosti najmä na glukóze je dôležitým regulátorom bunkového rastu a starnutia dráha Ras/PKA. Ras je proteín viažúci GTP, spolu s ktorým následne zvyšuje množstvo cAMP v bunke a ten potom aktivuje proteínkinázu A. To vedie bunku k aktívnejšiemu rastu a deleniu (Zaman a kol., 2009). Zároveň s aktívnejším delením dochádza v takýchto bunkách k zhoršeniu schopnosti odolávať stresu a hromadiť zásobné látky trehalózu či glykogén (Liu a kol., 2018). Na rozdiel od dráhy TOR, táto dráha má po inaktivácii pozitívny vplyv len na proces chronologického starnutia (\*Fabrizio a Longo, 2012).

TOR dráha spoločná pre všetky organizmy je u kvasiniek riadená komplexom TORC1, ktorý môže obsahovať kinázu Tor1p alebo Tor2p (\*Rohde a kol., 2008; \*Fabrizio a Longo, 2012). Zníženie jeho aktivity je prospešné pre dĺžku chronologického, ale aj replikatívneho kvasinkového starnutia (\*Fabrizio a Longo, 2012). Ukazuje sa, že množstvo komponent tohto multiproteínového komplexu má fyzickú aj funkčnú spojitosť s vnútornými membránami zúčastňujúcimi sa sekrečných procesov, ako sú vakuolárna či endozomálna membrána (\*Rohde a kol., 2008). Hlavným procesom pod vplyvom komplexu TORC1 je biogenéza ribozómov a s ňou spojená translácia mRNA v cytoplazme, negatívny vplyv má na procesy stresovej rezistencie (podobne ako dráha Ras/PKA), autofágiu, ale aj schopnosť bunky využívať alternatívne zdroje energie (Pan a Shadel, 2009). Inaktiváciou tejto dráhy je umožnené využitie

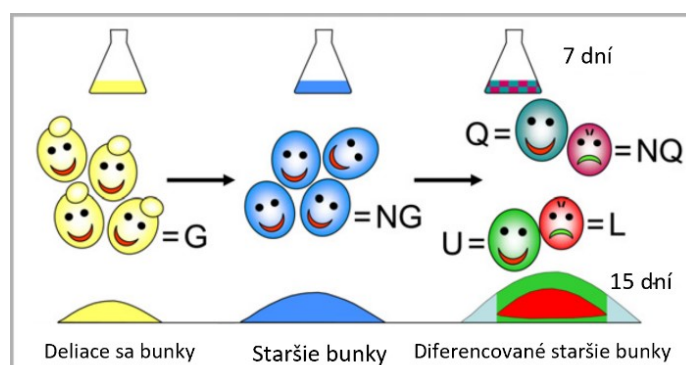
etanolu či kyseliny octovej, vznikajúcich ako vedľajšie produkty fermentácie prostredníctvom mitochondriálnej respirácie (Bonawitz a kol., 2007).

Ako možná príčina počiatku chronologického starnutia je však uvádzaná aj zmena extracelulárneho pH, ktorá je výsledkom zníženého množstva kyseliny octovej produkovanej ako vedľajší produkt fermentácie, ktoré nastáva pri zmene metabolizmu na respiráciu. Kyselina octová je vo veľkom množstve pre bunku toxická, čo vedie k bunkovej smrti. V protónovanom stave však dokáže prechádzať cez plazmatickú membránu kvasinkových buniek, čím dôjde k acidifikácii intracelulárneho priestoru a vyrovnaniu vonkajšieho a vnútorného pH. To má za následok vyššiu odolnosť bunky voči kyseline octovej a predĺženie CLS (Burtner a kol., 2009).

### 3.2.3. Typy chronologicky starnúcich kvasinkových buniek

Kvasinky *S. cerevisiae* a ich chronologické starnutie môžeme pozorovať u populácií rastúcich v tekutých kultúrach alebo pri raste (tvorbe) kolónií kultivovaných na pevnom médiu. Pri práci s tekutými kultiváciami pozorujeme vznik „quiescentných“ (Q bunky) a „non-quiescentných“ (NQ bunky) subpopulácií buniek, analogicky k nim dochádza v kolóniách na Petriho miskách k rozlíšeniu subpopulácií U buniek (z angl. „upper cells“) a L buniek (z angl. „lower cells“), pomenovaných podľa polohy, v ktorej sa v kolónii nachádzajú (obr. 4) (Čáp a kol., 2012; \*Palková a kol., 2014).

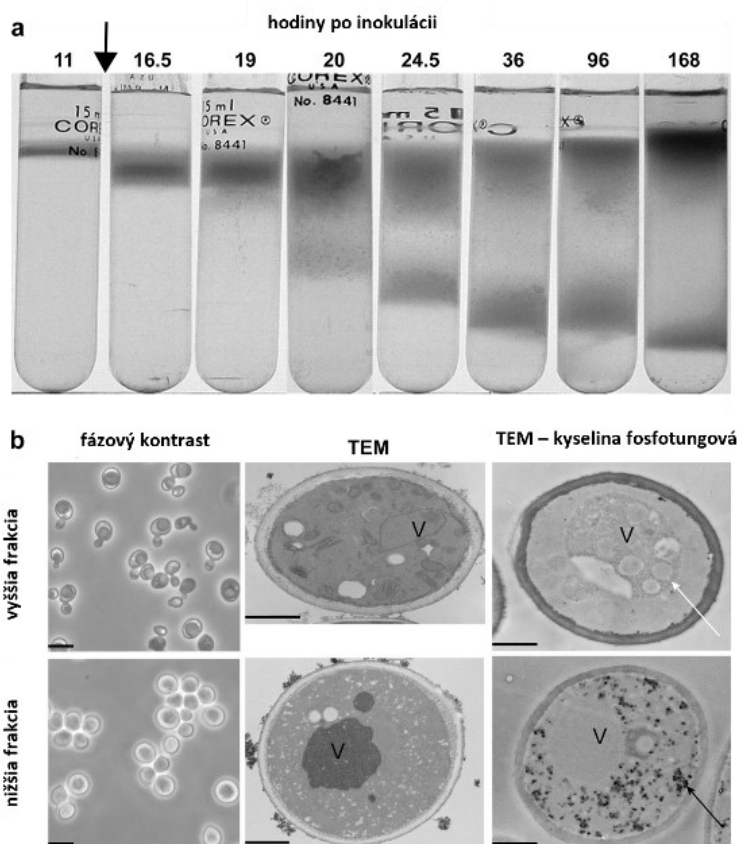
Každý typ chronologicky starnúcej kvasinky podstupuje metabolické zmeny ako dôsledok zmeny prostredia a vplyvu stresových podmienok. Patria sem transkripčné zmeny v „up-regulácii“ glykolytických, resp. fermentatívnych génov a zároveň „down-regulácia“ mitochondriálnych génov. Zásadnou zmenou je tiež aktivácia génov vystupujúcich v biosyntéze glycerolu, ktorý má tiež pozitívny vplyv na dĺžku CLS kvasiniek (Wei a kol., 2009).



**Obr. 4:** Diferenciácia buniek v tekutých kultúrach (vrchná časť) a v kolóniách na pevnom médiu (spodná časť) v čase. Približne po 7 dňoch pozorujeme v tekutých kultúrach subpopulácie „quiescentných“ a „non-quiescentných“ buniek, pri kolóniách dochádza k jednoznačnému rozlíšeniu U buniek a L buniek približne po 15 dňoch od inokulácie (upravené podľa \*Palková a kol., 2014).

### 3.2.3.1. Tekuté kultúry

Allen a kol., 2006 vo svojej štúdií preukázali, že po približne 20 hodinách od inokulácie došlo v tekutých kultúrach k vyčerpaniu glukózy, čo u jednotlivých buniek viedlo k prispôbeniu rastu na rast na nefermentovateľných zdrojoch a súčasne nastala diferenciácia populácie na dve subpopulácie líšiace sa svojou denzitou. Bunky, ktoré nepodstupovali delenie a boli uniformné vo svojej veľkosti, zaradili do „nižšej frakcie“ (z angl. lower-fraction) s vyššou hustotou (obr. 5). Tieto bunky obsahovali jadro a väčšie množstvo vakuol, avšak neboli u nich rozoznateľné iné organely, ako sú mitochondrie či endoplazmatické retikulum. Vo zvýšenej koncentrácii sa v týchto bunkách nachádzal zásobný glykogén hromadiaci sa v diauxickom posune. Oproti nej bola v kultúre odlišiteľná menej hustá, tzv. „vyššia frakcia“ (z angl. upper-fraction) – subpopulácia tvorená bunkami so zväčšenými vakuolami, ktoré boli pučiace, ale aj nepučiace, obsahovali mitochondrie aj endoplazmatické retikulum, ale menšie množstvo glykogénu. Ich vakuoly navyše obsahovali vezikuly, čo svedčí o tom, že tieto bunky podstupujú aktívnejšiu autofágiu. Bunky „vyššej frakcie“ v konečnom dôsledku vykazovali znaky latentných, čiže „quiescentných“ buniek (Allen a kol., 2006). Quiescenciu u kvasinkových buniek môžeme definovať ako stav, v ktorom sa nachádzajú bunky v saturovanom médiu, kedy kultúra dosiahla stacionárnu fázu svojho rastu. Sú to zároveň bunky, ktoré podstúpili únik z G1 fázy svojho bunkového cyklu do tzv. G0 fázy (Gray a kol., 2004).



**Obr. 5:** Rozlíšenie subpopulácií buniek v tekutej kultúre v čase. Časť „a“ zobrazuje postupné rozdelenie subpopulácií na základe hustotného gradientu, šípka označuje čas, kedy došlo k vyčerpaniu glukózy. Časť „b“ zobrazuje bunky jednotlivých subpopulácií vo fázovom kontraste a pod elektrónovým mikroskopom. Biela šípka označuje vakuoly, čierna šípka zásoby glykogénu (upravené podľa Allen a kol., 2006).

Z fyziologického hľadiska vykazovali dlhšiu životaschopnosť bunky „nižšej frakcie“, teda bunky „quiescentné“, ktoré boli súčasne odolnejšie voči teplotnému šoku a boli to prevažne dcérske bunky, ktoré vznikli pri prvom delení po vyčerpaní glukózy z média, pričom žiadna z nich neobsahovala viac ako 1 jazvu po pučaní. K hromadeniu zásobného glykogénu dochádzalo rovnako predovšetkým v tejto „quiescentnej“ subpopulácii (Allen a kol., 2006). V týchto bunkách boli zaznamenané tiež zvýšené hladiny mRNA dôležitých pre procesy exocytózy, tvorby membrán či vezikulárneho transportu. Zvýšená bola tiež hladina mRNA vystupujúcich v procesoch lipidového katabolizmu, ktorý je pre bunky dôležitý z hľadiska odolnosti voči stresu a tiež mRNA signálnej transdukcie, medzi ktoré radíme dráhy PKA či TOR dôležité pri reprogramovaní metabolizmu z fermentačného na respiračný (Aragon a kol., 2008).

Pohľad na markery apoptózy či nekrózy upriamuje naopak pozornosť na „non-quiescentné“ bunky, teda bunky „vyššej frakcie“, z ktorých približne polovica stratila schopnosť ďalšieho delenia. V tejto heterogénnej subpopulácii sú početnejšie bunky obsahujúce vyšší obsah reaktívnych kyslíkových častíc, ktoré v stacionárne rastúcej populácii vedú k bunkovej smrti (Allen a kol., 2006). NQ bunky zároveň vykazovali zvýšenú prítomnosť transpozíčných TY elementov a faktorov pre DNA rekombináciu, ktoré v konečnom dôsledku taktiež vedú k programovanej bunkovej smrti (Aragon a kol., 2008).

### **3.2.3.2. Kolónie na pevnom médiu**

Podobné zmeny, aké nastávajú u buniek rastúcich v tekutom médiu, sú viditeľné aj na kolóniách vznikajúcich po inokulácii na pevné médium, na ktorom môžeme pozorovať vznik mikrokolónií, ktorých pôvodcom je jediná bunka alebo vznik „obrích kolónií“ (z angl. giant colonies), ktorých rast docielime vyočkovaním bunkovej suspenzie v podobe kvapky (\*Palková a kol., 2014).

Kolónie rastúce na pevnom médiu vykazujú intenzívny rast počas prvých 4 dní, po ktorých nastáva spomalenie rastu a diferenciácia bunkových subpopulácií v rámci mikrokolónie (Palková a kol., 2002; Váchová a Palková, 2005).

U oboch typov spomenutých kolónií pozorujeme vznik subpopulácií, avšak tentoraz vo forme relatívne jasne definovaných vrstiev. U mikrokolónií sú to vonkajšia (z angl. outside cells) a vnútorná (z angl. inside cells) vrstva buniek, u obrích kolónií ich nazývame vrchné U bunky a spodné L bunky (\*Palková a kol., 2014).

### **3.2.3.2.1. Mikrokolónie**

Štúdie pracujúce s mikrokolóniami rastúcimi na médiu obsahujúcom glukózu popisujú vonkajšiu vrstvu mikrokolónií ako bunky, ktoré vykazujú vyššie hladiny exprimovaných génov nutných pre ribozomálnu biogenézu a enzýmov vystupujúcich v procesoch fermentácie glukózy. Tieto pozorovania svedčia o tom, že bunky vonkajšej vrstvy mikrokolónií sú schopné aktívne rásť, avšak súčasne exprimujú gény, ktoré bunka potrebuje v prostredí, kde nemá dostatok živín, medzi ktoré patria gény pre oxidáciu mastných kyselín a syntézu acetyl-CoA (Traven a kol., 2012). Morfologicky sú to väčšie bunky, ktoré obsahujú menšie alebo žiadne vakuoly, niekoľko veľkých lipidových kvapiek a vyznačujúce sa aktívnou autofágiou. Od buniek vnútornej vrstvy sa líšia exprimovaním proteínov Ato v plazmatickej membráne a aktívnym komplexom TORC1 (Váchová a kol., 2013).

Bunky vo vnútri mikrokolónií sú menšie a zvyčajne obsahujú jednu veľkú vakuolu. Oproti vonkajšej vrstve majú aktívnejšiu expresiu génov glukoneogenézy či represie dusíkového katabolizmu. Zvýšená je u nich tiež aktivita mitochondrií, ktorá ústi vo zvýšenej produkcii ROS a procesov spojených s prenosom železa, aktívnejšia je u nich tiež tvorba proteazómov. Tieto poznatky charakterizujú vnútornú vrstvu mikrokolónií ako bunky, ktoré aktívne nerastú a sú odolnejšie voči nepriaznivým podmienkam (Traven a kol., 2012; Váchová a kol., 2013).

### **2.2.3.2.2. Obrie kolónie**

Obrie kolónie, ako aj mikrokolónie, počas rastu na EtOH/glycerolovom médiu prechádzajú vývojovými fázami, ktoré možno popísať na základe zmeny pH v ich okolitom prostredí. Približne po 7 dňoch môžeme u obrích kolónií pozorovať alkalizačnú fázu, sprevádzanú produkciou amoniaku, za ktorú zodpovedajú staršie bunky (z angl. elders), nachádzané vo vonkajšej vrstve kolónie. Amoniak v tomto čase slúži ako signálna molekula pre synchronizáciu a ďalší vývoj kolónie a jeho produkcia je sprevádzaná metabolickými zmenami jednotlivých buniek (Palková a Forstová, 2000; Palková a kol., 2002; Váchová a kol., 2009).

Vrechnú vrstvu obrích kolónií tvoria väčšie U bunky, vyznačujúce sa lepšou životaschopnosťou než bunky vnútorné, teda L bunky. U bunky charakterizuje prítomnosť viacerých malých vakuol, ale väčších mitochondrií, obsahujú veľké lipidové kvapky a zásoby glykogénu. Pre tieto bunky sú typicky exprimované proteíny plazmatickej membrány, napr. Ato3p, peroxizomálny proteín Pox1p a mitochondriálny proteín Icl2p. U bunky sú rezistentnejšie voči pôsobeniu zymolyázy, ktorá cieľi na bunkovú stenu kvasiniek, lepšie odolávajú teplotnému šoku a pôsobeniu etanolu. Aktívnejšie sú u nich aj procesy metabolizmu aminokyselín a glykolýza a obsahujú viac ribozomálnych proteínov a proteínov nutných v procese translácie. Pre ich prežitie je dôležitý aj proces autofágie (Čáp a kol., 2012).

Naopak, L bunky sú menšie, zvyčajne obsahujú jedinou veľkú vakuolu a menej lipidových kvapiek a väčší počet mitochondrií s dobre diferencovanými kristami. Typické sú pre ne proteíny

endoplazmatického retikula, napríklad Ole1p. Indukované sú u nich metabolizmus lipidov a glukoneogenéza, merateľná je u nich vyššia hladina ROS. To svedčí o tom, že bunky v spodnej vrstve kolónií majú aktívnejšie mitochondrie spolu so zvýšenou spotrebou kyslíka, aj napriek tomu, že nie sú priamo vystavené vzdušnému prostrediu. Podobne ako vnútorné bunky mikrokolónií, aj L bunky aktívne exprimujú komponenty proteazomálnych procesov. V konečnom dôsledku sú tieto bunky menej životaschopné než U bunky a zdá sa, že ich úlohou je poskytnúť komponenty napomáhajúce prežitiu U buniek (Čáp a kol., 2012; \*Palková a kol., 2014).

#### **3.2.4. Priebek chronologického starnutia kvasinkových populácií**

Dĺžka CLS je podradená bunkovým procesom, ktoré bunka podstupuje ešte pred vstupom do tejto fázy. Je to napríklad hromadenie trehalózy zúčastňujúcej sa napr. procesov týkajúcich sa skladania proteínov či oxidatívneho poškodenia. V chronologicky mladých bunkách zastáva trehalóza prevažne ochrannú funkciu proteínov pred oxidatívnym stresom či nesprávnemu zloženiu prostredníctvom ich väzby. Tento proces je však v neskorších fázach skôr škodlivý, a preto má v chronologicky starších bunkách trehalóza skôr negatívny vplyv na dĺžku CLS. Kalorická reštrikcia a procesy s ňou spojené zohrávajú pri hromadení trehalózy tiež svoju rolu, a to tak, aby v mladších bunkách zabezpečovali jej hromadenie, na rozdiel od starších buniek, kedy jej hladinu znižujú. Medzi ďalšie procesy vplyvajúce na dĺžku CLS je zaradovaný import proteínov do peroxizómov či stav mitochondrií počnúc ich membránovým potenciálom a tvorbou ROS (\*Arlia-Ciommo a kol., 2014).

Javí sa, že procesy ovplyvňujúce chronologické starnutie kvasiniek v jeho počiatku, ale aj počas jeho trvania, môžu vytvoriť akúsi postupnosť spočívajúcu v prechode bunky niekoľkými kontrolnými bodmi. Tieto body sa dajú rozdeliť do tých, ktorými bunkami prechádza v skoršej fáze a tých, ktorými prechádza v neskoršej fáze CLS. Každému bodu je priradený istý „master regulator“ – metabolit, ktorého hladina sa mení a ktoré medzi sebou intracelulárne komunikujú a vzájomne sa ovplyvňujú a zároveň sú nadradené pro- a anti-rastovým procesom v bunke, čím určujú aj dĺžku CLS. Takýmito regulátormi môžu byť napríklad NADPH, glycerol, trehalóza, citrát, peroxid vodíka či spermidín (Burstein a kol., 2012; \*Arlia-Ciommo a kol., 2014; \*Dakik a Titorenko, 2016).

### **3.3. Charakteristika vybraných génov**

#### **3.3.1. Gény exprimované počas exponenciálnej fázy**

##### **3.3.1.1. *NOP2***

Gén *NOP2* lokalizovaný na chromozóme XIV kóduje rovnomenný esenciálny proteín Nop2 lokalizovaný primárne v jadierku, ktorého molekulárna hmotnosť bola pri jeho objave



určená na 69,8 kDa. V jeho štruktúre sa nachádzajú potenciálne väzbové miesta pre cAMP, proteínkinázu C, kazeínkinázu II a tyrozín. Nadprodukcia proteínu Nop2 spôsobila morfológické zmeny jadierka, konkrétne bolo pozorované jeho oddelenie od jadrového obalu a zaguľatenie na priereze. K aktívnej produkcii proteínu Nop2 dochádza 30 minút pred počiatkom rastu, v čase, kedy sa bunka pripravuje na proces delenia (de Beus a kol., 1994).

Funkcia proteínu Nop2 súvisí so skladaním pre-25S rRNA a syntézou ribozomálnej 60S podjednotky. Delečné experimenty viedli k zníženej hladine 25S a 5,8S rRNA v kvasinkových bunkách, čo môže byť dôsledkom chýb v skladaní 27S pre-rRNA a dochádzalo tiež k tvorbe zmenšených ribozomálnych podjednotiek 60S, monozómov aj polyzómov. Zároveň je v bunkách s deléciou proteínu Nop2 zvýšená hladina 40S podjednotky, čo vedie tiež k zvýšeniu hladiny 43S pre-iniciačných komplexov (Hong a kol., 1997).

V štruktúre Nop2p boli nájdené sekvencie spájané s metyláciou, čo naznačuje jeho možnú funkciu metyltransferázy (Hong a kol., 1997; Sharma a kol., 2013; Bourgeois a kol., 2015). Na N-konci tohto proteínu je vložená RNA-viažúca sekvencia, zatiaľ čo na jeho C-konci pozorujeme metyltransferázovú doménu zúčastňujúcu sa metylácie cytozínu (Sharma a kol., 2013). V delečných experimentoch Hong a kol., 1997 preukázali, že spolu s chybným skladaním 27S pre-rRNA došlo k zníženiu úrovne aj v jej metylácii. Obe tieto zmeny sú pozorovateľné pri premene 27S pre-rRNA na ribozomálnu podjednotku 25S (Hong a kol., 1997).

N-koncová doména proteínu zároveň obsahuje signálne sekvencie pre subcelulárnu lokalizáciu a je tak nevyhnutná pre správne lokalizovanie proteínu Nop2 do jadra. Ako doména viažúca RNA je dôležitá pre ribozomálnu syntézu, avšak podľa očakávaní nie je nevyhnutná pre metyláciu rRNA (Bourgeois a kol., 2015).

V náväznosti na tento poznatok, metyltransferázová aktivita Nop2p nie je nutná pre plnenie jeho funkcie pri skladaní pre-rRNA. Čo sa týka tejto funkcie Nop2p, jeho väzba na pre-rRNA umožní rozpoznanie zostrihovým aparátom. Za túto funkciu je opäť zodpovedná N-koncová sekvencia (Bourgeois a kol., 2015).

### **3.3.1.2. *TEF4***

Proteín Tef4 kódovaný rovnomenným génom *TEF4* je kvasinkový translačný elongačný faktor zo skupiny proteínov TEF (z angl. translation elongation factors). Tento gén je lokalizovaný na chromozóme XI, špecificky na jeho ľavom ramene. Proteín Tef4 je zložený zo 411 aminokyselín a jeho ORF (z angl. open reading frame) obsahuje 336 báz dlhý intrón. Molekulárna hmotnosť tohto proteínu je približne 47 kDa (Kinzy a kol., 1994).

*TEF4* kóduje  $\gamma$  podjednotku elongačného faktora eEF1B a jeho úlohou je uvoľnenie elongačného faktora eEF1A, tvoreného proteínommi Tef1p a Tef2p, čo umožní väzbu aminoacyl-tRNA k ribozómu. Ďalšou funkciou elongačného faktora eEF1B je funkcia tzv. GEF faktora (z

angl. guanine nucleotide exchange factor) pre translačný uvoľňovací faktor eRF3 (z angl. eukaryotic translation release factor), ktorá však preferenčne súvisí pravdepodobne s typom  $\gamma$  podjednotky tvorenej produktom génu *TEF3* (Kinzy a kol., 1994; Valouev a kol., 2009).

Ako je už vyššie naznačené,  $\gamma$  podjednotka elongačného faktora eEF1B je u kvasiniek kódovaná nielen génom *TEF4*, ale aj génom *TEF3*, ktorý tvorí funkčne odlišnú  $\gamma$  podjednotku. Tento fakt a zistenie, že delécia produktu ani jedného z génov pre  $\gamma$  podjednotku nie je pre kvasinkové bunky letálna a tiež nemá vplyv na mitotický rast buniek, svedčí o tom, že proteín Tef4 nie je pre bunky esenciálny a zároveň to naznačuje, že podjednotka translačného elongačného faktora eEF-1 $\gamma$  nemusí byť nevyhnutná pre proces translácie (Kinzy a kol., 1994).

Skupina translačných faktorov TEF je špecifická konzervovanou doménou TEA/AATS pre cis-regulačné oblasti a pre svoju funkciu vyžadujú špecifické koaktivátory. Medzi ne radíme napr. chromaín-modifikujúci proteín PARP alebo ľudský TONDU proteín (Butler and Ordahl, 1999; Vaudin et al., 1999; Belandia and Parker, 2000).

Funkcia proteínu Tef4 naznačuje jeho lokalizáciu v cytoplazme. Grousl a kol., 2013 však svojimi experimentmi zistili jeho sústredenie do stresových granúl za podmienok teplotného šoku. K tomuto hromadeniu dochádzalo pri teplote 46 °C (Grousl a kol., 2013).

### 3.3.1.3. *IMD2*

Na kvasinkovom chromozóme VIII, v blízkosti telomerovej oblasti, je lokalizovaný gén *IMD2*, v literatúre označovaný aj ako *PUR5* kódujúci proteín inozín monofosfát dehydrogenázu Imd2p dôležitú v *de novo* biosyntéze guanínových nukleotidov (Shaw a Reines, 2000; Escobar-Henriques a Daignan-Fornier, 2001). Dĺžka Imd2p je 523 aminokyselín s molekulárnou hmotnosťou približne 57 kDa (Escobar-Henriques a Daignan-Fornier, 2001; Loya a kol., 2012). Proteín Imd2 je pozorovaný v cytoplazme kvasinkových buniek (Huh a kol., 2003).

U kvasiniek nachádzame 4 gény skupiny inozín monofosfátových dehydrogenáz označovaných ako *IMD1 – IMD4*, zatiaľ čo v ľudskom, ale aj myšacom génóme sa takéto gény nachádzajú 2 (Hyle a kol., 2003). Expresia inozín monofosfátových dehydrogenáz je pozorovaná najmä v proliferujúcich bunkách, vrátane ľudských leukemických buniek a B- a T-lymfocytov (Escobar-Henriques a Daignan-Fornier, 2001). Delečné experimenty dokazujú, že štvornásobná delécia rodiny génov *IMD* je pre kvasinkové bunky za neprítomnosti guanínu letálna, avšak samostatne tieto gény esenciálne nie sú. Azda najväčším rozdielom medzi týmito štyrmi génmi je schopnosť génu *IMD2* poskytnúť rezistenciu voči imunosupresívam, čo ostatné gény nedokážu (Shaw a kol., 2001; Hyle a kol., 2003).

Expresia génu *IMD2* reaguje tiež na rastovú fázu populácie, pričom pri vstupe do stacionárnej fázy, už počas diauxického posunu, je znížená (DeRisi a kol., 1997). Pre túto zmenu však nebol dokázaný vplyv konkrétnych uhlíkových nutrientov v médiu, ale bola objavená

kódujúca sekvencia nazvaná NSE (z angl. nutrient-sensing element) reagujúca na množstvo nutričov v médiu. NSE sekvencia vykazuje podobnosť s konsenzus sekvenciami pre DNA-viažúce proteíny, ktoré by mohli byť dôležité pre reguláciu génu *IMD2* počas rastových fáz kvasinkových populácií (Escobar-Henriques a kol., 2003).

K represii týchto proteínov dochádza v prítomnosti guanínu metabolizovaného na GDP alebo jeho derivátov. Naopak k zvýšeniu ich aktivity dochádza po vystavení buniek mykofenolovej kyseliny v praxi využívanej ako imunosupresívum a inhibítor syntézy GMP. Táto regulácia je založená na väzbe *cis*-negatívneho elementu vyskytujúceho sa v promotóre génu *IMD2*. Nájdený element obsahuje sekvenciu GRE, ktorá svojím obsahom báz nápadne pripomína eukaryotickú sekvenciu TATA box. Oproti nemu má však negatívnu funkciu, čo nasvedčujú mutačné experimenty so zámennou báz, ktorých výsledkom bola zvýšená expresia génu *IMD2*. Predpokladá sa teda, že GRE element slúži ako väzbové miesto pre transkripčný represor (Escobar-Henriques a Daignan-Fornier, 2001).

#### **3.3.1.4. SAHI**

Enzým S-adenozyl-L-homocysteín hydroláza (Sah1p) je v kvasinkovom génome kódovaný génom *SAHI* lokalizovaným na chromozóme V. Dĺžka vznikajúceho proteínu sa udáva na 449 aminokyselín a jeho molekulárna hmotnosť zodpovedá približne 49 kDa (Tehlivets a kol., 2004). Lokalizáciu proteínu môžeme pozorovať v cytoplazme (Pitarch a kol., 2004).

Funkciou proteínu Sah1p je hydrolýza S-adenozyl-L-homocysteínu (AdoHcy), ktorý vzniká po prenose aktivovanej metylovej skupiny S-adenozyl-L-metionínu (AdoMet) na metylový akceptor a následne pôsobí ako kompetitívny inhibítor S-adenozyl-L-metionín-dependentných metyltransferáz. Reverzibilnou hydrolýzou vzniká v bunke adozín a homocysteín. Proces metyl-transferázovej reakcie je pre kvasinkové bunky dôležitý z pohľadu vzniku fosfolipidov, najmä majoritného fosfatidylcholínu či ergosterolu (Tehlivets a kol., 2004).

Tento proteín je esenciálny z hľadiska rozmnožovania, ale aj vegetatívneho rastu. Prejavom delécie génu *SAHI* bolo pozastavenie neskorej fázy cytokinézy a tiež zmena lipidového obsahu. Ak takto upravenému kmeňu dodáme glukózu, v bunke dochádza k hromadeniu fosfolipidov, najmä sterolov a triacylglycerolov. Regulácia Sah1p nastáva post-transkripčne, a to prostredníctvom metionínu a génov fosfolipidového metabolizmu, ktoré ho spolu s cholínom reprimujú (Tehlivets a kol., 2004).

Keďže ide o jeden z najviac konzervovaných enzýmov na škále organizmov od baktérií po ľudí a takisto je esenciálny z hľadiska lipidových metabolizmov či signálnej transdukcie, u cicavcov sa ukazuje tiež jeho veľký vplyv na kardiovaskulárne ochorenia, u myší navyše na rast a vývoj (Malanovic a kol., 2008).

### 3.3.2. Gény diauxického posunu

#### 3.3.2.1. *EHT1*

Jediným génom diauxického posunu, použitým pre účely tejto práce, je gén *EHT1* zo skupiny troch génov etylesterovej biosyntézy. Tento gén je lokalizovaný na chromozóme II. Jeho produktom je proteín Eht1, celým názvom etanol hexanoyl transferáza I a radí sa medzi acyl-CoA:etanol-O-acyl transferázy (\*Mason a Dufour, 2000; Knight a kol., 2014).

Eht1p je dlhý 451 aminokyselín s veľkosťou 51 kDa. V bunke je pozorovateľný v mitochondriálnych štruktúrach, konkrétne sa uvádza vonkajšia mitochondriálna membrána, môže sa však hromadiť aj v lipidových kvapôčkach (Athenstaedt a kol., 1999; Sickmann a kol., 2003; Zahedi a kol., 2006). Aktuálnejšia štúdia podľa Zhu a kol., 2019 ale upresňuje lokalizáciu proteínu Eht1 do endoplazmatického retikula, z ktorého sa následne presúva na povrch intracelulárnych lipidových kvapôčiek a tvrdí, že v mitochondriách je lokalizovaný jeho paralóg, proteín Eeb1 (Zhu a kol., 2019).

Aktivita Eht1p je zjavná v procesoch biosyntézy etylesterov masných kyselín so stredne dlhým reťazcom. Tieto masné kyseliny vznikajú ako vedľajší produkt fermentácie etanolu a sú pre kvasinky toxické, preto je nutná ich esterifikácia, čím dochádza k bunkovej detoxifikácii. Tento enzým vykazuje súčasne esterázovú aj esterovú aktivitu a jeho preferovaným substrátom je octanoyl-CoA (\*Mason a Dufour, 2000; Saerens a kol., 2006; Knight a kol., 2014). Eht1p zastáva tiež úlohu tioesterázy, v ktorej hydrolyzuje acyl-CoA so stredne dlhým reťazcom za tvorby voľných masných kyselín (Knight a kol., 2014). Podobne ako v prípade Sahlp, aj delécia proteínu Eht1 spôsobuje zvýšenú intracelulárnu koncentráciu triacylglycerolov (Saerens a kol., 2006).

### 3.3.3. Gény stacionárnej fázy

#### 3.3.3.1. *SSA3*

Pre stacionárnu fázu sú typické chaperóny skupiny proteínov teplotného šoku HSP. Jedným z nich je proteín Ssa3 kódovaný rovnomeným génom *SSA3* nachádzajúcim sa spolu s génom *EHT1* na chromozóme II. Produkt génu *SSA3* má dĺžku 649 aminokyselín a molekulárnu hmotnosť 70,5 kDa. Je to cytozolický proteín s uvádzaným názvom Stress-Seventy subfamily A, čo v preklade značí jeho zaradenie medzi podskupinu A stresových proteínov HSP70 (Werner-Washburne a kol., 1987).

Stresové proteíny sú v bunkách syntetizované najmä po fáze diauxického posunu a počas stacionárnej fázy (Fuge a kol., 1994). To platí aj pre proteín Ssa3, ktorého syntéza sa zvyšuje aj za pôsobenia stresových faktorov, napríklad pri zvýšení teploty, avšak jeho expresia sa zvyšuje len minimálne. Indukovaná je primárne pri zníženej koncentrácii druhého posla cAMP v bunke. Za optimálnych rastových podmienok k produkcii Ssa3p nedochádza. Mutantné kmene sú však

z hľadiska tvorby kolónií nerozoznatel'né od rodičovského kmeňa, čo svedčí o tom, že tento proteín nie je pre kvasinky esenciálny (Werner-Washburne a kol., 1987; Werner-Washburne a Craig, 1989; Becker a kol., 1996).

Funkciou podrodiny SSA proteínov je regulácia transkripcie HSP génov či translokácia niektorých proteínov do plazmatického retikula či mitochondrií (Murakami a kol., 1988; Stone a Craig, 1990).

### **3.3.3.2. HSP12**

Ďalším génom zo skupiny kódujúcej stresové proteíny (HSP) je *HSP12* lokalizovaný na chromozóme VI a kódujúci 12 kDa veľký proteín s dĺžkou 109 aminokyselín. Podobne ako pri géne *SSA3*, jeho expresia nebola pozorovaná počas exponenciálnej fázy rastu, avšak je indukovaná na začiatku stacionárnej fázy v súvislosti s koncentráciou cAMP, respektíve proteínkinázy A a pri teplotnom šoku. Expresia *HSP12* je oproti expresii *SSA3* značne zvýšená a počas teplotného šoku pri vstupe do stacionárnej fázy je považovaný za jeden z najhojnešie transkribovaných génov (Praekelt a Meacock, 1990). Indukčné podmienky zahŕňajú tiež vysokú osmolaritu, oxidatívny stres či nedostatok glukózy (Siderius a kol., 1997).

Kultivácia na peptónovom médiu preukázala lokalizáciu proteínu Hsp12 vo fáze logaritmickeho rastu do cytozolu, avšak v neskorších fázach bol proteín translokovaný do plazmatickej membrány. Ďalšie experimenty dokazujú, že tento proteín sa lokalizuje aj do iných membránových organel, ako sú endozómy či vakuoly, nie je však prítomný v mitochondriách ani v peroxizómoch (Garay-Arroyo a kol., 2000; Welker a kol., 2010).

Sekvencia Hsp12p neobsahuje cysteíny a je tvorená prevažne 5 aminokyselinami. V roztoku je tento monométny proteín úplne nezložený, pričom pri kontakte s dlhými lipidovými molekulami nadobúda alfa-helikálnu štruktúru a môže tak interagovať s membránami, čo je schopnosť veľmi dôležitá pre jeho protektívnu funkciu, vďaka ktorej môže modifikovať organizáciu samotných membrán a vplyvať na ich fluiditu. Interakcia s membránami je však pod vplyvom množstva proteínu Hsp12 v bunke, o čom svedčí už vyššie popísaná lokalizácia (Welker a kol., 2010).

### **3.3.3.3. HSP104**

Najväčším vybraným génom pre účely tejto práce je *HSP104* s molekulárnou hmotnosťou 102 kDa umiestnený na chromozóme XII, ktorý kóduje proteín teplotného šoku Hsp104p s dĺžkou 908 aminokyselín. Štruktúrne tvorí hexamér zo skupiny AAA+-ATPáz a obsahuje dve väzbové miesta pre nukleotidy označované NBD1 a NBD2. ATPázovú funkciu zastáva v tejto štruktúre prevažne väzbové miesto NBD1, zatiaľ čo NBD2 pravdepodobne zodpovedá za správne zloženie hexaméru (\*Bösl a kol., 2006).

Proteín Hsp104 za optimálnych podmienok nepredstavuje pre bunku esenciálnu súčasť a je tak syntetizovaný vo veľmi nízkych koncentráciách, avšak po vystavení buniek stresovým podmienkam dochádza k výraznému zvýšeniu jeho koncentrácie. Je to najmä všeobecný anti-stresový chaperónový proteín napomáhajúci napríklad odolnosti voči teplotnému šoku. Jeho úlohou je renaturácia proteínov agregovaných v cytozole, čím dochádza k opätovnému plneniu ich funkcií, k čomu potrebuje interakciu so skupinou proteínov HSP70, najmä s proteínom Ssa1 (Glover a Lindquist, 1998; \*Bösl a kol., 2006; Sathyanarayanan a kol., 2020).

Ako už naznačuje funkcia proteínu Hsp104, k jeho aktívnej syntéze dochádza najmä pri vstupe do stacionárnej fázy alebo pri procesoch, akým je sporulácia. Konštitutívne je však exprimovaný v respiračných médiách a médiách s obsahom acetátu alebo galaktózy. Tieto porovnania opisujú celkovo vyššiu expresiu *HSP104* v respirujúcich bunkách oproti bunkám konajúcim fermentáciu (Sanchez a kol., 1992).

#### **3.3.3.4. *CYCI***

*CYCI* lokalizovaný na chromozóme X kóduje 109 aminokyselín dlhý mitochondriálny izo-1-cytochróm c s molekulárnou hmotnosťou 12 kDa. Mitochondrie kvasiniek využívajú ešte jednu štruktúrne odlišnú izoformu cytochrómu c (kódovaný *CYC7*), v porovnaní s ktorou je Cyc1p majoritný, za aeróbnych podmienok tvorí približne 95 % cytochrómu c mitochondrií a je indukovaný spoločne s cytochróm c oxidázou COX5a (Sherman a kol., 1966; Burke a kol., 1997). Cyc1p je síce proteín kódovaný v jadre, avšak jeho finálna funkčná lokácia je medzimembránový priestor mitochondrií (Vögtle a kol., 2012).

Koncentrácia cytochrómu c je počas rastu podmienená prítomnosťou kyslíka či úbytkom glukózy, pričom platí, že v anaeróbných podmienkach je táto koncentrácia nízka, zatiaľ čo v prítomnosti glukózy sú cytochrómy aktívne biosyntetizované. Štúdia podľa Sherman a kol., 1965 popisuje rozdiely v koncentrácii cytochrómu c počas celého rastu kvasinkových populácií a zároveň uvádza, že množstvo cytochrómu c v mitochondriách kvasiniek závisí tiež na hustote počiatočného inokula (Sherman a kol., 1965).

Popisované izoformy cytochrómu c tvoria spolu s cytochróm c oxidázou podjednotku V respiračného reťazca. V tejto forme modifikujú kinetiku holocytochrómu c oxidázy. Úlohou izo-1-cytochrómu c je väzba elektrónu prostredníctvom kofaktoru hemu, pre ktorý má jedno väzbové miesto na jednu podjednotku. Elektrón ďalej predáva cytochróm c oxidáze (Allen a kol., 1995; Solmaz a Hunte, 2008).

## 4. Materiál a metódy

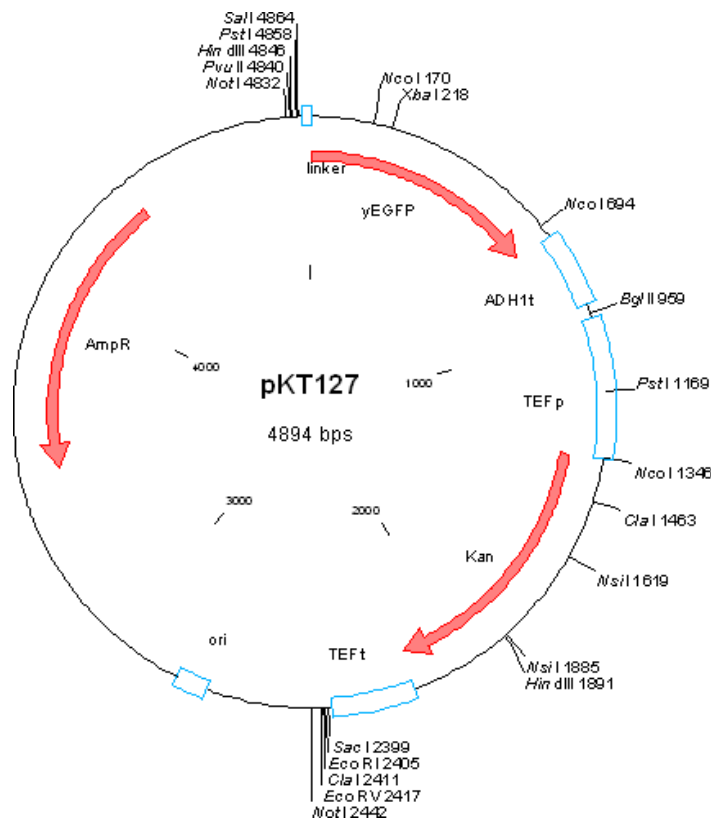
### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Rodičovský kmeň *Saccharomyces cerevisiae*

Pre účely tejto práce bol použitý auxotrofný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 s nasledovným genotypom: *MATa*, *his3Δ*, *ura3Δ*, *leu2Δ*, *lys2Δ* odvodený od laboratórneho kmeňa S288C. Tento kmeň bol získaný zo zbierky Euroscarf (European *S. cerevisiae* archive for functional analysis).

#### 4.1.2. Vektor využítý pri príprave transformačných kaziet

Vektorom bol plazmid pKT127 (obr. 6) s veľkosťou 4894 bp slúžiaci ako PCR templát pri príprave transformačných kaziet na C-koncové značenie proteínov pomocou GFP. Tento plazmid pochádza zo zbierky Euroscarf a nesie gén *yEGFP* (yeast-enhanced green fluorescent protein) spolu s génmi pre kanamycínovú (KanMX) a ampicilínovú rezistenciu (AmpR), ktoré následne tvoria selekčné markery (Sheff a Thorn, 2004).



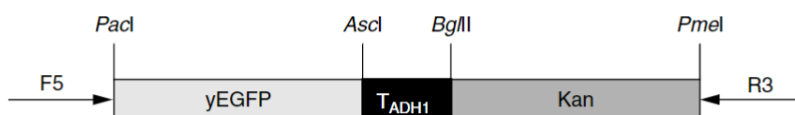
**Obr. 6:** Mapa plazmidu pKT127 využitého pre prípravu transformačných kaziet pre C-koncové značenie GFP. Na obrázku je znázornené usporiadanie génov pre rezistenciu, GFP a zostrihové miesta restriktčných endonukleáz.

Prevzaté z: [http://www.euroscarf.de/plasmid\\_details.php?accno=P30175](http://www.euroscarf.de/plasmid_details.php?accno=P30175)

### 4.1.3. Primery

Základom pri návrhu primerov bola kódujúca sekvencia daného génu a sekvencia plazmidu pKT127. K sekvencii génu boli v tesnej blízkosti pripojené nekódujúce sekvencie s dĺžkou 1000 bp pred aj za génom. Priame primery dostali označenie F (z angl. forward), reverzné primery boli označené písmenom R (z angl. reverse).

Pre každý gén boli navrhnuté primery pre vznik transformačných kaziet a zároveň overovacie primery (tab. 1). V prípade primerov pre prípravu transformačných kaziet bola pevne daná dĺžka a tiež ich umiestnenie (obr. 9). F primer bol navrhnutý v dĺžke 42 nt (pre *NOP2* a *TEF4*) a 50 nt (pre ostatné gény) bez STOP kodónu a bol spojený s F5 sekvenciou homológnou k oblasti pred GFP na plazmide pKT127. R primer mal takisto dĺžku 50 nt, avšak vrátane STOP kodónu a bol spojený s R3 sekvenciou homológnou k oblasti nachádzajúcej sa za KanMX na plazmide pKT127 (Sheff a Thorn, 2004). Pripravené transformačné kazety mali veľkosť 2535 bp. Lokalizácia sekvencií F5 a R3 na plazmide pKT127 je zobrazená na obrázku 7.



**Obr. 7:** Schéma zobrazujúca umiestnenie sekvencií F5 a R3 na plazmide pKT127 (Sheff a Thorn, 2004).

Východiskom pre návrh overovacích F primerov bola oblasť kódujúcej sekvencie vybraného génu nachádzajúca sa vo vnútri vybraného génu. Sekvenciu overovacieho R primeru navrhla RNDr. Michaela Schierová, PhD. a je vzdialený 609 bp od C-terminálneho konca vybraného génu. Tento R primer bol použitý pri overení všetkých pripravených konštruktov.

Návrh primerov pre overováciu PCR reakciu vychádzal z nasledujúcich podmienok:

- 18 – 22 bp dlhý,
- obsah GC párov cca 50 %,
- teplota nasadenia primerov medzi 50 – 55 °C,
- GC pár na konci sekvencie,
- neobsahuje vnútorné vlásenky,
- F a R primery vzdialené 500 až 1000 bp.



Gén/plazmid	Názov primeru	Smer	Sekvencia nt 5' → 3'
NOP2	Nop2-eGFP-F5	F	<b>AAGGGTGTCAATCCAAAAGCTAAAAGACCTTCTAACGAAAAA</b> ggtgacggtgctggttta
	Nop2-eGFP-R3	R	<b>GAGAAAACCTATGCTAACATGATGCCACTACGTTTGTGGGAAC</b> tcatgaattcgagctcg
	Nop2-eGFP-over	Over	ACTGCTGCTAGAAAGGAAGC
TEF4	Tef4-eGFP-F5	F	<b>AATGGCGAAGATAAGGAAATTGTTGACGGTAAGGTTTTGAAA</b> ggtgacggtgctggttta
	Tef4-eGFP-R3	R	<b>TATGTATATTGGGAAGAAAATATGGAAGAAGAGTTATTGAG</b> Atcgatgaattcgagctcg
	Tef4-eGFP-over	Over	GAGAAAGTACTCCAACGACG
IMD2	Imd2-eGFP-F5	F	<b>GGCGTTCATAATTTACATTCTTACGAAAAGCGTTTACATAAC</b> ggtgacggtgctggttta
	Imd2-eGFP-R3	R	<b>CATAACATCAGTAATACTGTATTGATGATGCCATTTTAACAT</b> tcatgaattcgagctcg
	Imd2-eGFP-over	Over	TCAGACAGTGTTTTGGTCGC
SAH1	Sah1-eGFP-F5	F	<b>ATTCCAGAAGAAGGTCCATTCAAGGCCGACCACTACAGATAT</b> ggtgacggtgctggttta
	Sah1-eGFP-R3	R	<b>AAAAATAGTGAGAAAGAAGAACTGAAATGGGAATTGAATTGA</b> tcatgaattcgagctcg
	Sah1-eGFP-over	Over	CATTCGAAGTTGGTGTCCAC
CYC1	Cyc1-eGFP-F5	F	<b>GACAGAAACGACTTAATTACCTACTTGAAAAAAGCCTGTGAG</b> ggtgacggtgctggttta
	Cyc1-eGFP-R3	R	<b>CATAACTAATTACATGATATCGACAAAGGAAAAGGGCCTGT</b> tcatgaattcgagctcg
	Cyc1-eGFP-over	Over	GGGTATTTCGTACACAGATGC
SSA3*	Ssa3-eGFP-F5	F	<b>GTGCTACGGGAGGTGGAGAAGATACAGGTCCAACAGTGGAAGAGGTTGAT</b> ggtgacggtgctggttta
	Ssa3-eGFP-R3	R	<b>TAAAAGGTTAAACATAAAAAGTAGCTAAATAGAACACTATAGAAGAATAA</b> tcatgaattcgagctcg
	SSA3 Chk Int Fd	Over	GTCTCAGGAAACCATTGAC

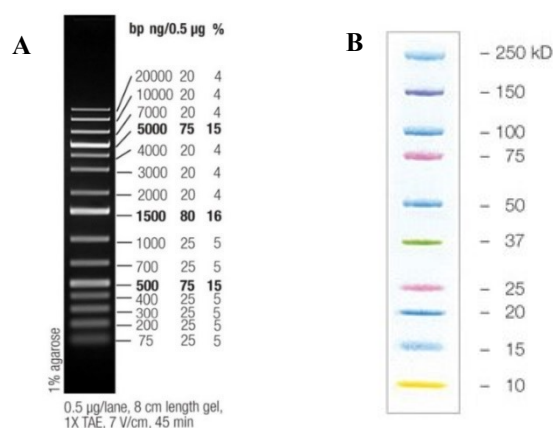
<b>HSP12*</b>	Hsp12-eGFP-F5	F	<b>TCGAATATGTTTCCGGTCGTGTCCACGGTGAAGAA GACCCAACCAAGAAG</b> ggtgacggtgctggttta
	Hsp12-eGFP-R3	R	<b>TCACACATCATAAAGAAAAACCATGTAACTACAA AGAGTTCCGAAAGAT</b> tcgatgaattcgagctcg
	Hsp12-GFP-over	Over	GGAATACATCACTGACAAGGC
<b>HSP104*</b>	Hsp104-eGFP-F5	F	<b>TAGGTGATGACGATAATGAGGACAGTATGGAAATT GATGATGACCTAGAT</b> ggtgacggtgctggttta
	Hsp104-eGFP-R3	R	<b>TATATTACTGATTCTTGTTCGAAAGTTTTTAAAAAT CACACTATATTTAA</b> tcgatgaattcgagctcg
	Hsp104-eGFP-over	Over	TTCCGATGATATGGGTGCAC
<b>pKT127</b>	F5	F	ggtgacggtgctggttta
	F3	R	cgatgaattcgagctcg

**Tab. 1:** Prehľad navrhnutých primerov pre prípravu transformačných kaziet. \*Primery navrhnuté študentkou Emou v predchádzajúcich experimentoch, konštrukty boli po kontrole pripravené znova.

Navrhnuté primery boli následne objednané u spoločnosti Sigma-Aldrich a po doručení nariadené prídavkom ddH<sub>2</sub>O na zásobnú koncentráciu 100 pmol/μl.

#### 4.1.4. Štandardy molekulových hmotností

Pre elektroforetickú analýzu DNA bol použitý štandard GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (obr. 8A). Pre SDS-elektroforézu bol použitý štandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, MBI Fermentas (obr. 8B).



**Obr. 8:** GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder – štandard molekulových hmotností fragmentov DNA použitý pre elektroforetickú analýzu DNA (A), Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, MBI Fermentas použitý pre SDS-elektroforézu (B).

#### 4.1.5. Chemikálie a enzýmy

Pre vypracovanie tejto diplomovej práce boli použité chemikálie a enzýmy uvedené v nasledujúcej tabuľke (tab. 2).

Názov	Skratka/chemický vzorec	Výrobca
10 mM deoxynukleotidy	dNTP	Top-Bio
4-(2-aminoethyl)benzénsulfonylfluorid, hydrochlorid	AEBSF	Fluka
6x DNA Loading Dye		MBI Fermentas
Acetát (octan) litný	LiAc	Sigma-Aldrich
Agar		Dr. Kulich Pharma, VWR
Agaróza (DNase and RNase free)		Amresco
Bradfordovo činidlo		Bio-Rad
Bromfenolová modrá	BFM	Bio-Rad
Bromkresolový pufor	BKP	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	Serva
Combi PPP PCR MasterMix		Top-Bio
D-glukóza		Lach-Ner
Deoxynukleotidy	dNTP	Top-Bio
Dimetyl sulfoxid pre PCR	DMSO	Top-Bio
DL-dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich
DNA zo spermii sled'a obyčajného lyofilizovaných NaCl	ssDNA	Boehringer Mannheim
Dodecylsulfát sodný	SDS	Sigma-Aldrich
Edicín	Edi	SANDOZ
Etanol (96 % - v/v)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH, EtOH	Penta, Lach-Ner
Etídiumbromid	EtBr	M.G.P.
Etyléndiamintetraacetát	EDTA	Serva
Fenylmetánsulfonyl fluorid	PMSF	Fluka
Geneticín	G418	MP Biochemicals
Glycerol bezvodný	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Lach-Ner
Glycín	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Serva
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner, PENTA
Chlorid horečnatý	MgCl <sub>2</sub>	Top-Bio
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner

<b>Chlorid vápenatý (dihdrát)</b>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Inhibítor proteáz mix FY</b>	PIC	Serva
<b>Izopropanol</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Penta, Lachema
<b>Kazeín z hovädzieho mlieka</b>		Sigma-Aldrich
<b>Kvasničný autolyzát (pre mikrobiológiu)</b>		Imuna
<b>Kvasničný autolyzát (šarža 41)</b>		IMUNA PHARM
<b>Kyselina 2-(N-morfolino)etánsulfónová</b>	MES	Sigma-Aldrich
<b>Kyselina chlorovodíková (35 %)</b>	HCl	PENTA
<b>Kyselina octová</b>	CH <sub>3</sub> COOH	Penta
<b>LA DNA polymerázový mix</b>		Top-Bio
<b>LA pufor</b>		Top-Bio
<b>Metanol</b>	CH <sub>3</sub> OH, MetOH	Merck KGaA
<b>Myšia monoklonálna protilátka IgG2a</b>	GFP(B-2)HRP	Santa Cruz Biotechnology
<b>N, N'-metylén-bis-akrylamid</b>		Serva
<b>N, N, N', N'-tetrametyletyléndiamín</b>	TEMED	Serva
<b>Octan litný</b>	LiAc	Serva
<b>Peptón (pre baktériológiu)</b>		Eurex Medica
<b>Persíran amónny</b>	APS	Serva
<b>Polyetylén glykol</b>	PEG	Sigma-Aldrich
<b>Práškový RTG rýchlostuľovač</b>		Adefo-chemie, GmbH
<b>Síran horečnatý</b>	MgSO <sub>4</sub>	HiChem, s.r.o.
<b>SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate</b>		ThermoScientific
<b>SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate</b>		ThermoScientific
<b>Tris(hydroxymetyl)aminometán</b>	Tris	Sigma-Aldrich
<b>Tween® 20</b>	C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Vývojka Röntgen Rapid Entwickler</b>		Adefo-chemie, GmbH
<b>Uracil</b>	URA	Sigma-Aldrich

**Tab. 2:** Chemikálie, enzýmy a antibiotiká použité v tejto diplomovej práci.

#### 4.1.6. Roztoky

Pre vypracovanie tejto diplomovej práce boli použité roztoky uvedené v nasledujúcej tabuľke (tab. 3).

Názov roztoku	Zloženie
0,8 % agarózový gél	Agaróza pre elektroforézu, 0,5x TBE
1 M LiAc	CH <sub>3</sub> COOLi, dH <sub>2</sub> O
1000x EtBr	100 mg/ml EtBr, dH <sub>2</sub> O
2 M zásobný roztok NaOH	NaOH, dH <sub>2</sub> O
20 mM roztok NaOH	NaOH, dH <sub>2</sub> O
50 % PEG 3500	PEG, dH <sub>2</sub> O
BKP	10 mg/ml BKP, 96 % EtOH
0,5x TBE	5x TBE, dH <sub>2</sub> O
5x TBE	53 g TRIS, 22,5 g kyseliny boritej, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

**Tab. 3:** Roztoky použité v tejto diplomovej práci.

#### 4.1.7. Médiá pre kultiváciu kvasiniek

Kultivácia kvasiniek v tejto práci prebiehala v tekutých aj v pevných médiách. Pre prípravu každého z nich bola použitá destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O), výroba ktorej prebiehala v aparátúre Wartex Rowapur. Chemikálie pre prípravu týchto médií pochádzali od firmy Lach-Ner, výnimky sú uvedené v zátvorkách.

##### 4.1.7.1. Pevné médiá

###### GM:

- 3 % glycerol
- 2 % agar (Dr. Kulich Pharma, WVR, 1:1)
- 1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)
- dH<sub>2</sub>O

Po sterilizácii do 1 litra pridať:

- 10 ml CaCl<sub>2</sub> (1 M)
- 10 ml D-glukóza (0,25 M)
- 10 ml uracil (2 mg/ml)

10 ml 96% EtOH alebo 10 ml BKP

Jednotlivé zložky boli samostatne sterilizované a následne zmiešané. EtOH a BKP sterilizované neboli. Zložka BKP slúžila ako indikátor pH (kap. 5.1.3).

###### YEG:

- 2 % glukóza
- 2 % agar (Dr. Kulich Pharma)
- 1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)

dH<sub>2</sub>O

Glukóza bola klávovaná zvlášť.

**YEPG:**

2 % glukóza

2 % agar (Dr. Kulich Pharma)

1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)

1 % peptón (Biolife)

dH<sub>2</sub>O

20 µg/ml edicín (Edi) alebo 200 µg/ml geneticín (G418)

Glukóza bola klávovaná zvlášť. Edicín bol pridávaný pre inhibíciu rastu baktérií, geneticín slúžil k selekcii kmeňov po transformácii. Do médií boli antibiotiká pridávané po sterilizácii, následne boli tieto misky skladované v chladničke.

**4.1.7.2. Tekuté médiá**

**GM:**

3 % glycerol

1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)

dH<sub>2</sub>O

Po sterilizácii do 1 litra pridať:

10 ml CaCl<sub>2</sub> (1 M)

10 ml D-glukóza (0,25 M)

10 ml uracil (2 mg/ml)

10 ml 96 % EtOH

Jednotlivé zložky boli samostatne sterilizované a následne zmiešané. EtOH sterilizovaný nebol.

**YEG:**

2 % glukóza

1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)

dH<sub>2</sub>O

Glukóza bola klávaná zvlášť.

#### **Skladovacie médium pro uchovanie buniek v - 80 °C:**

- 60 % glycerol
- 10 % glukóza
- 2 % pepton (Biolife)
- 1 % kvasničný autolyzát (Imuna °41)
- dH<sub>2</sub>O

#### **4.1.8. Laboratórne prístroje**

Pre vypracovanie tejto práce boli použité nasledujúce laboratórne prístroje:

- farebná kamera JENOPTIK ProgRes CT3 CMOS
- magnetické miešadlo s ohrevom IKARA basic 2
- mikrocentrifúga a centrifúga s výkyvným rotorom Boeco Germany UNIVERSAL 32R
- mikrocentrifúga Mikro20 (Hettich)
- mikrocentrifúga Spectrafuge 24D (Labnet International)
- NANODROP1000 spektrofotometer (ThermoScientific)
- osvetľovací systém Kaiser
- PCR termocycler BioER GenePro
- pH-meter (Mettler Toledo)
- predvážky KERN PCB
- predvážky Scout
- spektrofotometer OptiZen
- termostaty TERMOBOX LBT 168
- vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- vyhrievaný bloček (Torrey Pines Scientific INC)
- zdroj pre fluorescenciu EBQ 100 Isolated
- zdroj pre elektroforézu (E-C Apparatus Corporation)
- fluorescenčný mikroskop Leica DMR

## **4.2. Metódy**

### **4.2.1. Sterilizácia**

Roztoky, médiá, špáradlá, špičky k mikropipetám a mikroskúmavky boli sterilizované v autokláve 20 min pri tlaku 120 kPa. Plastové centrifugačné skúmavky s objemom 15 ml a 50 ml a kvety boli sterilizované minimálne 24 hodín parami kyseliny peroctovej v uzavretom

igelitovom vrecúšku. Chemické sklo bolo sterilizované suchým teplom pri teplote 180 °C, predmety ako sklenené mikrobiologické kľučky namočením v etanole a následným žihaním v plameni.

#### **4.2.2. Práca s kvasinkami**

##### **4.2.2.1. Skladovanie kvasinkových kmeňov**

Kvasinkové kmene boli dlhodobo uchovávané v kvasinkových konzervách so skladovacím médiom pri teplote – 80 °C.

##### **4.2.2.2. Kultivácia kvasinkových kmeňov**

Pred prácou s vybraným kvasinkovým kmeňom bolo sterilným špáradlom nanosené malé množstvo kvasinkovej biomasy z konzervy v hlbokomraziacom boxe na pevné YEPG médium s edicínom. Následne bol kmeň kultivovaný 1 deň pri teplote 28 °C. Biomasa bola následne použitá pre zaočkovanie kultúry na pevné alebo tekuté médium, podľa experimentu.

Kultivácia kvasinkových kmeňov v tekutom médiu prebiehala v Erlenmeyerových bankách na rotačnej trepačke pri teplote 28 °C a 150 RPM.

Kultivácia kvasinkových kmeňov na pevnom agarovom médiu v Petriho miskách prebiehala v termostate pri teplote 28 °C.

##### **4.2.2.3. Očkovanie tekutých kultúr**

Sterilná mikroskúmavka bola odvážená na analytických váhach. Následne bolo do tejto mikroskúmavky sterilným špáradlom prenesené malé množstvo biomasy kultivovanej cez noc pri teplote 28 °C v termostate na pevnom YEPG médiu s pridaným edicínom. Biomasa bola odvážená a nariedená dH<sub>2</sub>O na koncentráciu 12 mg biomasy na 1 ml dH<sub>2</sub>O, čo zodpovedá množstvu cca 100 – 150 x 10<sup>6</sup> buniek. Nariedená suspenzia buniek bola v ďalšom kroku použitá pre zaočkovanie ceznočnej kultivácie na požadovanú optickú densitu (OD) pre určené množstvo vybraného tekutého média a ponechaná cez noc v rotačnej trepačke pri 150 RPM a 28 °C. Na druhý deň bola odmeraná optická densita ceznočnej kultivácie oproti blanku vybraného média v 1 ml kyvete. Podľa nameranej OD bola kultivácia následne preočkovaná do čerstvých médií na požadované OD v určenom objeme vybraného tekutého média.

##### **4.2.2.4. Meranie optickej denzity a tvorba rastovej krivky**

Po nameraní optickej denzity ceznočnej kultivácie vybraného kmeňa zaočkovaného v určenom médiu (GM/YEG) bola kultivácia preočkovaná do 3 Erlenmeyerových baniek s 20 – 25 ml zhodného čerstvého média na 3 optické denzity (OD<sub>0</sub>): 0,01; 0,05; 0,1. Následne bol každú 1 – 2 hodiny odobratý 1 ml tejto kultúry a pomocou spektrofotometra Optizen bola odmeraná



jeho optická denzita v plastovej kyvete pri vlnovej dĺžke 600 nm. Blank pre toto meranie predstavoval 1 ml čistého média danej kultivácie. Počas 2. až 3. dňa boli odobrané vzorky nariadené dH<sub>2</sub>O do 1 ml tak, aby nameraná optická denzita neprekročila hodnotu 1,8, pri ktorej meranie OD nebolo lineárne. Použité riedenie bolo v 2. deň 10x (100 µl vzorky/900 µl dH<sub>2</sub>O) alebo 20x (50 µl vzorky/950 µl dH<sub>2</sub>O), v 3. deň 50x (20 µl vzorky/ 980 µl dH<sub>2</sub>O). Rovnako bolo v tomto prípade riedené aj médium predstavujúce blank.

Po odmeraní bola hodnota OD zaznamenaná a prostredníctvom tabuliek bola vytvorená rastová krivka pre každú kultúru zvlášť pomocou programu MS Excel.

#### **4.2.2.5. Výsev mikrokolónií**

V prvom kroku prípravy bola odvážená sterilná mikroskúmavka, do ktorej bolo následne špáradlom prenesené malé množstvo biomasy kultivovanej cez noc pri teplote 28 °C v termostate na pevnom YEPG médiu s pridaným edicínom. Biomasa bola odvážená a nariadená dH<sub>2</sub>O na koncentráciu 12 mg biomasy na 1 ml dH<sub>2</sub>O, čo zodpovedá množstvu cca 100 – 150 x 10<sup>6</sup> buniek. Táto suspenzia bola v ďalšom kroku nariadená dH<sub>2</sub>O riediacou radou na 10<sup>-4</sup>. Na Petriho misku s vybraným pevným médiom bolo nanesených 50 µl suspenzie príslušného riedenia a sterilnou hokejkou rozotrených do sucha. Misky s mikrokolóniami boli kultivované 11 dní v termostate pri teplote 28 °C. Morfológia a veľkosť mikrokolónií bola fotená pomocou kamery. Fluorescencia mikrokolónií bola pozorovaná fluorescenčným mikroskopom (Leica) a nafotená.

#### **4.2.2.6. Sledovanie alkalizácie**

U kvasinkových populácií laboratórnych kmeňov BY4742 je možné pozorovať zmeny medzi jednotlivými vývojovými fázami na základe zmeny okolitého pH. Tieto fázy potom delíme na acidickú a alkalickú, po ktorej je viditeľný prechod späť do fázy acidickej. Zmeny pH je možné pozorovať na médiu po pridaní bromkresolového purpuru (BKP), ktorý slúži ako pH indikátor. Pri nízkom pH pozorujeme žltú farbu (acidická fáza), ktorá s vysokým pH (nad 6,8) prechádza do sýteho fialového sfarbenia (alkalická fáza) (Palková a kol., 1997).

Pre kontrolu správneho rastu pripravených kmeňov boli pozorované zmeny pH u jednotlivých konštruktov. Pripravené kmene boli zaočkované vo forme obrích kolónií (10 µl bunkovej suspenzie nariadenej na koncentráciu 12 mg/ml) na pevné GM médium s pridaným BKP a kultivované v termostate pri teplote 28 °C po dobu 21 dní. Súbežne bol zaočkovaný aj materský kmeň BY4742. Kolónie boli fotografované na lupe každých 7 dní.

#### 4.2.2.7. Príprava kmeňov s GFP fúziou pomocou transformácie

##### 4.2.2.7.1 Príprava transformačných kaziet

Súčasťou tejto práce bola príprava kmeňov s vybranými génmi značenými C-terminálnou GFP fúzou. Prostredníctvom transformácie bola do kompetentných buniek vložená transformačná kazeta nesúca gén pre GFP značenie a selekčný marker, ktorým bol v tomto prípade gén pre rezistenciu k antibiotiku G418.

Zloženie	Objem (μl)
PPP master mix	25 μl
ddH <sub>2</sub> O	19 μl
Primer F riedený 20x (5 pmol/μl)	1,5 μl
Primer R riedený 20x (5 pmol/μl)	1,5 μl
Plazmid pKT127 riedený 100x (1 ng/μl)	1,5 μl

**Tab. 4:** Zloženie reakčnej zmesi pre PCR na objem 50 μl s použitím PPP master mixu obsahujúcim Taq polymerázu. Použitá bola redestilovaná voda. Použité primery mali koncentráciu 5 pmol/μl.

Transformačné kazety boli pripravené metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Pre prácu s DNA bola používaná sterilná redestilovaná voda ddH<sub>2</sub>O pripravená prístrojom Wartex Ultrapur, ktorá bola následne sterilizovaná v autokláve. Kazety boli pripravené s využitím plazmidu pKT127 a špecifických primerov (tab. 1). Pripravené kazety niesli na oboch koncoch 42 alebo 50 nt dlhé sekvencie s homológiou k cieľnému miestu v genóme (obr. 7). Amplifikáciu DNA vykonávala vysokoprocésivná Taq polymeráza bez 3'-5' exonukleázovej aktivity. Samotný proces amplifikácie prebiehal v PCR cykloch. Výsledná veľkosť jednotlivých kaziet bola 2535 bp a štandardný objem zmesi pre jej prípravu bol 50 μl. Zloženie tejto zmesi je uvedené v tabuľke 4. Nastavený program danej PCR reakcie je uvedený v tabuľke 5. Princíp vloženia kazety do genómu kvasinky je zobrazený na obrázku 9.

Fáza cyklu	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
<b>1. Denaturácia DNA</b>	94	2 min	1x
<b>Denaturácia DNA</b>	94	15 s	35x
<b>Nasadanie primerov</b>	58	15 s	
<b>Elongácia</b>	72	2:30 min	
<b>Dodatočná elongácia</b>	72	7 min	1x
<b>Ukončenie reakcie</b>	4	--	--

**Tab. 5:** Priebeh PCR reakcie s pridaným PPP mastermixom obsahujúcim Taq polymerázu.

#### 4.2.2.7.2. Transformácia buniek metódou LiAc/ssDNA/PEG

Samotná príprava požadovaných kvasinkových kmeňov prebiehala metódou transformácie LiAc/ssDNA/PEG, ktorá využíva vysokú účinnosť homológnej rekombinácie u kvasiniek (Gietz a Woods, 2002).

Materský kvasinkový kmeň bol najprv kultivovaný 1 – 2 dni na pevnom YEPG médiu s pridaným edicínom pri teplote 28 °C. Z tejto kultivácie bolo následne odobrané množstvo zodpovedajúce približne veľkosti špendlíkovej hlavičky, ktoré bolo prenesené do 10 ml tekutého YEPG média a kultivované v Erlenmeyerovej banke cez noc na horizontálnej trepačke pri 150 RPM a teplote 28 °C.

Po ceznočnej kultivácii bola odmeraná optická denzita (OD) kultúry pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 600 nm v plastovej kyvete s optickou dráhou 1 cm. Suspenzia buniek bola pred odberom premiešaná a následne z nej bol automatickou pipetou odobraný 1 ml. Ako blank slúžilo čisté YEPG médium. Pre OD v oblasti 0,2 – 0,5 platí, že hodnota 0,1 zodpovedá približne  $1 \times 10^6$  buniek/ml. Podľa tohto vzťahu bol vypočítaný približný počet buniek vo vzorke.

Kultúra bola v ďalšom kroku preočkovaná do Erlenmeyerovej banky obsahujúcej 50 ml čerstvého YEPG média na hustotu OD = 0,5 a kultivovaná 4 hodiny na horizontálnej trepačke pri 150 RPM a teplote 28 °C do hustoty suspenzie OD = 2 (bunky prešli aspoň 2 generačnými dobami).

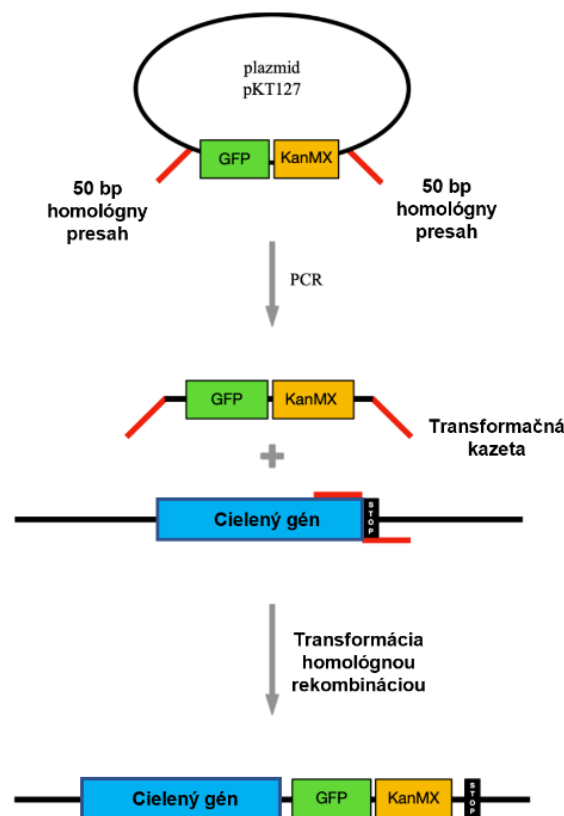
Nasledovalo prenesenie kultúry do sterilnej 50 ml centrifugačnej skúmavky a centrifugácia suspenzie po dobu 5 minút pri 4500 RPM a teplote 22 °C. Získaný pelet buniek bol premytý 25 ml dH<sub>2</sub>O, po čom bola zopakovaná centrifugácia pri rovnakých podmienkach. Supernatant bol z centrifugačnej skúmavky odstránený a pelet bol resuspendovaný v 1 ml dH<sub>2</sub>O, prenesený do 1,5 ml mikroskúmavky a stočený na mikrocentrifúge po dobu 1 min pri 6000 RPM. Supernatant bol znova odobraný a bunky nariadené dH<sub>2</sub>O na koncentráciu  $10^9$  buniek/ml. Z takto získanej suspenzie boli odobrané alikvóty buniek po 100 µl. Posledným krokom pred vlastnou transformáciou bola krátka centrifugácia v mikrocentrifúge po dobu 1 min pri 6000 RPM a odobranie supernatantu.

Pre vlastnú transformáciu bola k peletu buniek pridaná transformačná zmes s celkovým objemom 360 µl, ktorej zloženie je uvedené v tabuľke 6. Jednovláknová ssDNA (Salmon sperm DNA) bola najprv denaturovaná 5 minút pri teplote 95 °C, hneď rýchlo schladená a držaná na ľade, čím bolo zabránené jej opätovnej renaturácii. Transformačná zmes s bunkami bola dôkladne, ale opatrne premiešaná automatickou pipetou a inkubovaná 40 minút v termobločku za stáleho trepania pri teplote 42 °C. Po inkubácii bola suspenzia stočená po dobu 30 s pri 6000 RPM v mikrocentrifúge, supernatant s transformačnou zmesou bol odobraný a pelet buniek znova resuspendovaný v 1 ml tekutého YEPG média. Následne boli bunky opätovne kultivované pri teplote 28 °C na horizontálnej trepačke počas 2 hodín.

Po tejto kultivácii bola suspenzia znovu stočená pri 6000 RPM a čase 30 s, pelet bol potom resuspendovaný v 300 µl dH<sub>2</sub>O, suspenzia bola vysiatá a sterilnou hokejkou rozotretá na Petriho misky s pevným YEPG médiom s antibiotikom G418 v objeme 5 µl, 30 µl a zvyšný objem suspenzie. Takto vysiate Petriho misky boli kultivované v termostate pri teplote 28 °C po dobu 3-4 dní, počas ktorých na miske narástli len klony, u ktorých došlo k homológnej rekombinácii, čím sa začlenila transformačná kazeta s génom pre rezistenciu do genómu.

Zloženie	Objem (µl)
PEG	240
LiAc	36
ssDNA	10
ddH <sub>2</sub> O	40
DNA	34

**Tab. 6:** Zloženie transformačnej zmesi s celkovým objemom 360 µl pre 1 transformáciu.



**Obr. 9:** Princíp vloženia kazety do cieľného miesta v genóme kvasinky pomocou homológnej rekombinácie. Kazeta Pre GFP C-terminálnu fúzu génu bola amplifikovaná z plazmidu pKT127. Červene značené úseky sú 50 bp dlhé sekvencie s homológiou k sekvencii cieľového génu, GFP značí gén pre fluorescenčné značenie, KanMX je gén pre rezistenciu k antibiotiku G418, STOP úsek označuje stop kodón cieľného génu.

#### 4.2.2.7.3. Overenie úspešnosti transformácie

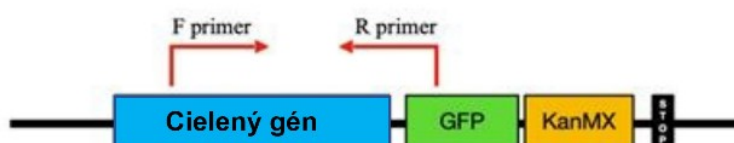
Selekcia buniek, u ktorých prebehla homológna rekombinácia a vloženie transformačnej kazety do genómu prebehla prostredníctvom kultivácie kvasiniek na médiu s antibiotikom geneticínom (G418). Kolónie, ktoré narástli, boli pomocou sterilného špáradla prenesené na čerstvé pevné YEPG médium na Petriho miskách a znova kultivované 1 – 2 dni.

Overenie úspešnosti transformácie a správnosti vloženia kazety do genómu bolo prevedené PCR metódou s následnou elektroforézou. Princíp overenia správneho vloženia kazety do genómu je zobrazený na obrázku 9.

##### 4.2.2.7.3.1. Izolácia DNA z jednotlivých kolónií

Izolácia DNA bola súčasťou prípravy kvasinkovej genómovej DNA pre overenie transformovaných klonov. Na začiatku bolo sterilnou špičkou odobrané malé množstvo biomasy transformovaných klonov kultivovaných 1 deň na pevnom YEPG médiu. Táto biomasa bola resuspendovaná v 15  $\mu$ l 20 mM NaOH a v tenkostenných PCR skúmavkách denaturovaná v cyklére pri teplote 95 °C po dobu 15 min. Zmes bola po denaturácii centrifugovaná 1 min pri 2000 RPM v minicentrifúge, čím došlo k usadeniu bunkovej debris na dne skúmavky. Denaturovaná DNA ostala voľne v supernatante, z ktorého bolo opatrne (bez bunkovej debris, ktorá by mohla inhibovať reakciu) odobraných 0,5  $\mu$ l pre overovaciu PCR reakciu.

PCR zmes obsahovala špecifické overovacie primery (tab. 1), vďaka ktorým došlo k overeniu správneho vloženia transformačnej kazety do kvasinkového genómu, konkrétne za zvolený gén, pričom ostal zachovaný otvorený čítací rámec. Umiestnenie týchto overovacích primerov zobrazuje obrázok 10. Primery boli od seba vzdialené 500 – 1000 bp. Pre amplifikáciu DNA bol znova použitý PPP mastermix obsahujúci vysokoprocívnu Taq polymerázu, ktorá nemá 3'-5' exonukleázovú aktivitu. Objem reakčnej zmesi bol 10  $\mu$ l a jej zloženie je uvedené v tabuľke 7. Program tejto reakcie je uvedený v tabuľke 8. Použité primery mali koncentráciu 10 pmol/ $\mu$ l.



**Obr. 10:** Princíp overovacej PCR. Primer F leží v kódujúcej oblasti génu, primer R je umiestnený 111 bp od začiatku kódujúcej sekvencie pre GFP. Výsledný PCR produkt je dlhý 500 – 1000 bp a jeho prítomnosť svedčí o správnom vložení kazety do genómu kvasinky. Negatívna reakcia je pozorovaná u materského kmeňa.

Zloženie	Objem (μl)
ddH <sub>2</sub> O	4
PPP master mix	5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Templátová (izolovaná) DNA	0,5

**Tab. 7:** Zloženie reakčnej zmesi PCR pre objem 10 μl.

Fáza cyklu	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
<b>1. Denaturácia DNA</b>	95	5 min	1x
<b>Denaturácia DNA</b>	95	30 s	35x
<b>Nasadanie primerov</b>	52	30 s	
<b>Elongácia</b>	72	1 min	
<b>Dodatočná elongácia</b>	72	5 min	1x
<b>Ukončenie reakcie</b>	4	--	--

**Tab. 8:** Program overovacej PCR reakcie s PPP mastermixom.

Po PCR reakcii bola prítomnosť fragmentov a ich veľkosť overená pomocou elektroforézy v agarózovom géle. Pozitívne overené klony boli následne prenesené v čo najväčšom množstve do kryoskúmaviek so skladovacím médiom a uchovávané pri teplote – 80 °C v hlbokomraziacom boxe. Signál GFP pozitívnych kmeňov bol skontrolovaný pomocou fluorescenčnej lupy a fluorescenčného mikroskopu.

#### 4.2.2.7.3.2. Elektroforéza DNA v agarózovom géle

Elektroforézou DNA v agarózovom géle bolo v tejto práci overené množstvo a kvalita produktov vznikajúcich v procese PCR (transformačné kazety, DNA transformovaných kmeňov). Použitý bol 0,8 %-ný agarózový gél, ktorý vznikol rozpustením agarózy v 0,5x TBE pufre a následným ochladením na cca 50 °C. Následne bol k tomuto roztoku pridaný 1000x EtBr v množstve 1 μl na 1 ml gélu. Samotná separácia DNA molekúl podľa ich veľkosti prebiehala pri jednosmernom napätí 5 V/cm vzdialenosti elektród po dobu 30 – 60 minút. Počas elektroforézy došlo k naviazaniu EtBr na DNA, čo umožnilo detekciu DNA pomocou transluminátora pod UV svetlom, ktoré EtBr excituje. Použitý bol štandard GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (kap. 4.1.4., obr. 8A).

#### 4.2.2.8. Mikroskopické pozorovanie a zachytenie fluorescencie

Pre pozorovanie natívnych preparátov kultúr a kolónií bol použitý fluorescenčný mikroskop Leica s objektívom s olejovou imerziou (Leica HVX PL FLUOTAR 100x/1.30 oil) a s monochromatickou kamerou Jenoptik ProgResMF.

Jednotlivé vzorky boli odfotené vo viditeľnom svetle pomocou Nomarského kontrastu, pre fotenie fluorescence GFP bol použitý excitačný filter 450 – 490 nm a emisný filter 500 – 550 nm. Snímky vznikli pomocou programov NIS-Elements pre fluorescenčný mikroskop Leica a následne upravené v programe IrfanView.

#### **4.2.2.9. Western blot**

##### **4.2.2.9.1. Odber buniek pre Western blot**

Vybraný kvasinkový kmeň bol zaočkovaný do určeného tekutého média (GM/YEG) na  $OD_0 = 0,1$ . Následná kultivácia prebiehala pri 28 °C a 150 RPM v rotačnej trepačke. Vo vopred určenom čase kultivácie bola nameraná momentálna OD kultúry a na jej základe bol odobratý objem kultúry obsahujúci približne 50 mg biomasy. Tento objem bol stočený po dobu 3 min pri 4500 RPM, médium bolo odobraté a lyzát buniek premytý 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Následne bola suspenzia prenesená do predváženej skúmavky, stočená 2 min pri 6000 RPM a tekutá fáza bola odobratá. Lyzát bol odvážený a okamžite zmrazený v tekutom dusíku. Vzorky boli následne uložené do hlbokomraziaceho boxu s teplotou – 80 °C.

##### **4.2.2.9.2. Príprava kvasinkových lyzátov – rozbíjanie buniek**

- **MES pufo s inhibítormi proteáz**

10 mM MES, pH = 6,8 (pH upravené roztokom NaOH)

1/50 objemu 2xPIC

(aliquót od výrobcu rozpustený v 50% objeme DMSO, bol použitý 2×koncentrovaný)

8 mM DTT

4 mM PMSF

2 mM AEBSF

0,5% (v/v) NP40

Vzorky, ktoré boli uložené v hlbokomraziacom boxe pri teplote – 80 °C boli prenesené na ľad a podľa ich mokrej váhy k nim bolo pridaných 200 – 300 µl MES pufru s pridanými inhibítormi proteáz. Zmes bola rozsuspendovaná, následne k nej boli pridané sklenené guľičky cca 2 – 3 mm pod hladinu zmesi. Mechanické rozbíjanie buniek prebiehalo v dezintegrátore FASTPREP po dobu 5 x 20 s, medzi každým cyklom sa chladili 2 min na ľade. Po premiešaní bol lyzát centrifugovaný pri 680 x g, 2 min, 4 °C. Supernatant bol následne centrifugovaný pri 680xg, 2 min, 4 °C. Supernatant slúžil v ďalšom kroku na stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou. Vzorky boli celý čas udržiavané na ľade.

#### 4.2.2.9.3. Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovej metódy

Táto metóda je založená na posune absorpčného maxima po väzbe činidla Coomassie Brilliant Blue R 250 na molekulu proteínu a umožňuje kolorimetricky stanoviť koncentráciu proteínov.

Postup prípravy jednotlivých zložiek:

- Blank:  
800  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
200  $\mu$ l Bradfordovo činidlo
- Vzorka proteínu:  
800  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l 10x riedeného lyzátu  
200  $\mu$ l Bradfordovo činidlo

Jednotlivé zmesi boli premiešané a inkubované 10 min pri laboratórnej teplote. Meranie koncentrácie proteínov prebiehalo pomocou spektrofotometra (Optizen) pri A<sub>595</sub>. Každá vzorka bola meraná v triplikátoch, z ktorých bol vypočítaný priemer. Koncentrácia vzoriek bola vypočítaná z absorbancie štandardu (A<sub>595</sub> = 0,3; pri koncentrácii 5  $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>). Namerané hodnoty boli spracované v programe MS Excel.

#### 4.2.2.9.4. Vertikálna elektroforéza v polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE)

- **30 % (w/v) akrylamid**  
29 % (w/v) akrylamid  
1 % (w/v) N, N'- metylén-bis-akrylamid
- **separačný pufo (pH = 8,8)**  
1,5 M Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
upraviť pH na 8,8 pomocou 1 M HCl
- **zaostrovací pufo (pH = 6,8)**  
0,5 M Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
upraviť pH na 6,8 pomocou 1 M HCl
- **SDS elektródový pufo**  
0,05 M Tris, pH = 8,3  
0,384 M glycín  
0,1 % (w/v) SDS



Všetky vyššie uvedené alikvóty je možné uchovávať pri 4 °C.

- **vzorkový (denaturačný) pufor**

2,5 M Tris, pH = 6,8

50 % (v/v) glycerol

0,02 % (w/v) BFM

10 % (w/v) SDS

Vzorkový pufor je možné uchovávať pri – 20 °C.

Vertikálna elektroforéza v polyakrylamidovom géli slúžila na elektroforetickú analýzu proteínov v denaturačnom prostredí SDS (SDS-PAGE), pričom dochádzalo k deleniu proteínov migrujúcich v elektrickom poli podľa ich molekulovej hmotnosti. Použitý bol štandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, MBI Fermentas (kap. 4.1.4., obr. 8B).

Sklá pre elektroforézu boli prečistené liehom, zafixované v upínači skiel a umiestnené do nalievacieho stojanu (Bio-Rad). Medzi sklá bolo nanosených 4,5 ml roztoku separačného gélu (tab. 9) a prevrstvených 300 µl izopropanolu. Následne prebiehala cca 1 hod polymerizácia, po ktorej bol gél premytý od izopropanolu ddH<sub>2</sub>O, ktorá bola odsatá filtračným papierom. Po stuhnutí separačného gélu bol nanosený roztok zaostrovacieho gélu (tab. 10), do ktorého bol ihneď zasunutý hrebeň. Následne prebiehala cca 15 – 20 min polymerizácia, po ktorej bol z gélu vytiahnutý hrebeň, jamky boli naplnené SDS elektródovým pufrom a sklá s polyakrylamidovým gélom boli vložené do elektroforetickej aparatury (Bio-Rad), do ktorej bolo naliate dostatočné množstvo SDS elektródového pufru. K lyzátu vzoriek bol pridaný denaturačný pufor v objeme 25 µl a MES do celkového objemu 120 µl, množstvo lyzátu bolo do tohto objemu vypočítané na požadovú koncentráciu proteínov. Pripravené vzorky boli inkubované pri 95 °C po dobu 2,5 min a následne ochladené a nanosené na gél.

Pripravená aparatura bola pripojená k zdroju jednosmerného prúdu, napätie bolo nastavené na hodnotu 200 V, prúd na konštantnú hodnotu 50 mA (uvedené pre 2 gély). Elektroforéza prebiehala 50 – 60 min.

Zloženie / Koncentrácia gélu	9 %	11 %
30 % akrylamid	3 ml	3,7 ml
separačný pufor (pH = 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,5 ml	3,8 ml
10 % persíran amónny	30 µl	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl

**Tab. 9:** Zloženie roztoku separačného gélu (uvedené pre 2 gély). Po pridaní 10% persíranu amónneho a TEMEDU bol roztok premiešaný a okamžite aplikovaný medzi sklá. 10% persíran amónny sa pripravil tesne pred použitím.

Zloženie/koncentrácia gélu	4 %
30 % akrylamid	650 $\mu$ l
zaostrovací pufor (pH = 6,8)	1,25 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,05 ml
10 % persíran amónny	30 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

**Tab. 10:** Zloženie roztoku zaostrovacieho gélu (uvedené pre 2 gély). Po pridaní 10% persíranu amónneho a TEMEDU bol roztok premiešaný a okamžite aplikovaný medzi sklá. 10% persíran amónny sa pripravil tesne pred použitím.

#### 4.2.2.9.5. Western blot

- PVDF membrána (Immobilon-P, Millipore)
  
- **Western blot pufor**
  - 0,025 M Tris
  - 0,192 M glycín
  - 10 % (v/v) metanol
  
- **farbiaci roztok**
  - 40 % (v/v) metanol
  - 10 % (v/v) kyselina octová
  - 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
  - po namiešaní a rozpustení zložiek roztok prefiltrovať
  
- **odfarbovací roztok**
  - 40 % (v/v) metanol
  - 10 % (v/v) kyselina octová

Po skončení elektroforézy bola elektroforetická aparátúra rozobraná, zaostrovací gél bol odstránený a pre orientáciu sa odrezal ľavý horný roh separačného polyakrylamidového gélu. Pred prenosom PVDF membrány bola táto membrána aktivovaná 5 min v metanole a následne premývaná 5 min v ddH<sub>2</sub>O a 15 min vo Western blot pufri. Na držiak (Bio-Rad) sa naskladal koberček, 2 filtračné papiere Whatmann, polyakrylamidový gél, PVDF membrána, 2 filtračné papiere Whatmann, koberček, pričom všetky vrstvy boli najprv namočené vo Western blot pufri. Zdroj bol nastavený na 120 V a konštantný prúd 200 mA po dobu 1 hod a 20 min (uvedené pre 2 PVDF membrány). Po ukončení prenosu sa z membrány odstrihol proteínový štandard a membrána sa vložila na 40 s do farbiaceho roztoku, prepláchla v odfarbovacom roztoku 4 – 5

min, inkubovala v čistom odfarbovacom roztoku a po uschnutí sa membrána vyfotila aj s proteínovým štandardom.

#### 4.2.2.9.6. Imunodetekcia

- **PBS, pH = 7,4**  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
0,15 M NaCl  
upraviť pH pomocou 0,2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
(PBS pre prípravu 1% kazeínu sa neupravuje)
- **GFP (B-2) HRP**, myšia monoklonálna protilátka IgG2a, 200 µg.ml<sup>-1</sup> (Santa Cruz Biotechnology)

Membrána bola inkubovaná 1 hod s anti-GFP protilátkou nariadenou v PBS–1% kazeíne a Tweene 20 riedenom v pomere 1:1500 (na 1 membránu aplikovaných 10 ml). Membrána sa po inkubácii s protilátkou premývala v 20 – 40 ml PBS s Tweenom riedenom v pomere 1:4000 po dobu 5 x 5 min. Takto inkubovaná membrána bola 9 min inkubovaná v priehľadnej fólii s 2 ml roztoku detekčných substrátov a následne okapaná o buničinu. Membrána bola vložená do suchej priehľadnej fólie, vložená do kazety a v tmavej komore vyvolaná na fotografický film (Fomei a.s.) v rôznej expozícii podľa sily signálu. Každý film bol premývaný vo vývojke, dH<sub>2</sub>O, ustaľovači a znova opláchnutý vodou.

#### 4.3. Použitý softvér

Práca so sekvenciami a návrh primerov:

- SnapGene
- Sequence Manipulation Suite – <http://www.bioinformatics.org/sms2/>
- NCBI Blast – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Oligo Calculator – <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

#### Spracovanie dát a obrazu:

- NIS-Elements
- IrfanView
- MS Excel

#### Databázy:

- *Saccharomyces* Genome Database (SGD) – [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)

- PubMed line – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

## 5. Výsledky

### 5.1. Konštrukcia a overenie kmeňov *S. cerevisiae* s vybranými proteínmi značenými pomocou GFP

*Ciel: Pomocou transformácie vytvoriť kmene *S. cerevisiae* odvodené od materského kmeňa BY4742 nesúce vybrané proteíny exprimované v rôznych rastových fázach označené zeleným fluorescenčným proteínom GFP. Pripravené kmene overiť prevedením PCR, kontrolou ich fluorescencie a priebehu vývoja ich kolónií z hľadiska morfológie a alkalizácie v porovnaní s rodičovským kmeňom BY4742.*

V rámci tejto diplomovej práce bolo skonštruovaných 8 kmeňov, ktoré boli odvodené od rodičovského laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* BY4742. Analyzovaný bol tiež kmeň BY-Eht1p-GFP, ktorého transformáciu aj overenie uskutočnila Mgr. Jana Maršíková, ktorá mi zároveň pomohla s transformáciou kmeňov BY-Nop2p-GFP, BY-Tef4p-GFP, BY-Sah1p-GFP, BY-Cyc1p-GFP. Overenie týchto a aj ostatných kmeňov, ako aj ich transformáciu, som uskutočnila ja. Vytvorené konštrukty nesú C-koncové značenie vybraných proteínov pomocou GFP. Princíp prípravy transformačných kaziet, pre ktoré bol použitý plazmid pKT127 je zobrazený na obrázku 6 (kap. 4.1.2). Zoznam použitých primerov je uvedený v tabuľke 1 (kap. 4.1.3). Samotná transformácia prebiehala prostredníctvom lítium-acetátovej metódy (kap. 4.2.2.7.2) a využívala lineárne transformačné kazety umožňujúce homológnu rekombináciu do kvasinkového genómu. Konštrukty transformácie boli následne overené prostredníctvom PCR a DNA elektroforézy (kap. 4.2.2.7.3).

Názov kmeňa	Proteín	Genotyp	Príprava + overenie
<b>BY-Nop2p-GFP</b>	Nop2p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, NOP2-eGFP</i>	VF, JM
<b>BY-Tef4p-GFP</b>	Tef4p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, TEF4-eGFP</i>	VF, JM
<b>BY-Imd2p-GFP</b>	Imd2p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, IMD2-eGFP</i>	VF
<b>BY-Sah1p-GFP</b>	Sah1p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, SAH1-eGFP</i>	VF, JM
<b>BY-Ssa3p-GFP</b>	Ssa3p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, SSA3-eGFP</i>	VF
<b>BY-Hsp12p-GFP</b>	Hsp12p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, HSP12-eGFP</i>	VF
<b>BY-Hsp104p-GFP</b>	Hsp104p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, HSP104-eGFP</i>	VF
<b>BY-Cyc1p-GFP</b>	Cyc1p	<i>MATa, his3Δ, ura3Δ, leu2Δ, lys2Δ, KanMX, CYC1-eGFP</i>	VF, JM

**Tab. 11:** Zoznam kmeňov pripravených v diplomovej práci. VF – Viktória Fedorová, JM – Mgr. Jana Maršíková.

Z každého pripraveného kmeňa boli prostredníctvom PCR a DNA elektroforézy otestované aspoň 4 klony. Následné overenie prostredníctvom kontroly vývoja kolónií prebiehalo z každého kmeňa u 4 klonov a prostredníctvom mikroskopického pozorovania fluorescenčného signálu u vybraného reprezentatívneho kmeňa. Na základe týchto overovacích procesov bol vybraný jeden reprezentatívny klon, ktorý bol využívaný v ďalších experimentoch. Tabuľka 11 uvádza zoznam všetkých pripravených kmeňov pre účely tejto diplomovej práce.

### **5.1.1. Overenie úspešnosti transformácie pomocou PCR a DNA elektroforézy**

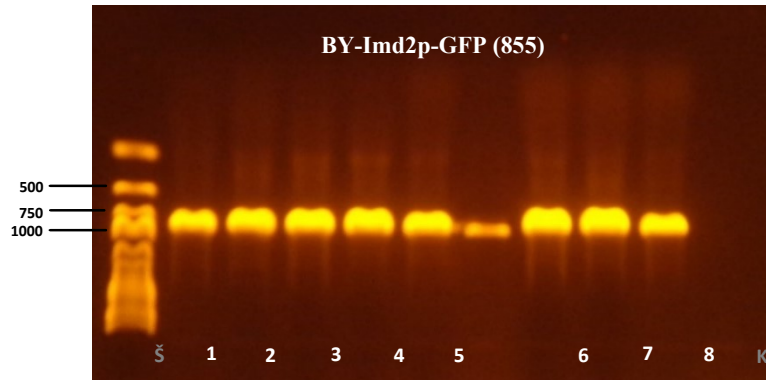
Príprava kmeňov prostredníctvom transformácie (kap. 4.2.2.7.2) bola nasledovaná kultiváciou kolónií na pevnom selekčnom YEPG médiu obsahujúcom antibiotikum geneticín (G418). Po 3 – 4 dňoch boli na miskách pozorovateľné kolónie, u ktorých sa očakávala úspešná homológna rekombinácia, teda vloženie transformačnej kazety do genómu kvasiniek. Samotný rast kolónií nepredstavoval stopercentnú istotu, že došlo k správne vloženie transformačnej kazety do požadovaného miesta v genóme, aj keď došlo k vloženiu génu KanMX pre rezistenciu voči antibiotiku geneticín alebo mohlo napríklad počas rastu kolónií, prípadne počas PCR, dôjsť k vzniku mutácií v kódujúcej sekvencii pre fluorescenčný proteín GFP. Práve kvôli tomuto faktoru boli z každého transformovaného kmeňa overené aspoň 4 klony.

Kolónie, u ktorých bola predpokladaná úspešnosť homológnej rekombinácie boli preočkované na čerstvé YEPG médium s pridaným geneticínom (selekčný marker) a ponechané rásť do ďalšieho dňa. DNA týchto kolónií bola následne vyizolovaná reakciou s 20 mM hydroxidom sodným (NaOH) a použitá pre overovaciu PCR reakciu (kap. 4.2.2.7.3.). Pre PCR reakciu bol použitý PPP master mix obsahujúci Taq polymerázu, reakčný pufor, aditíva pre zvýšenie účinnosti reakcie a tiež farbivo, vďaka ktorému sú následne vzorky po elektroforéze viditeľné pod UV žiarením. Tabuľka 8 (kap. 4.2.2.7.3.1) uvádza zloženie PCR zmesi, tabuľka 9 (kap. 4.2.2.7.3.1) uvádza popis PCR programu, tabuľka 1 uvádza špecifické overovacie primery (kap. 4.1.3).

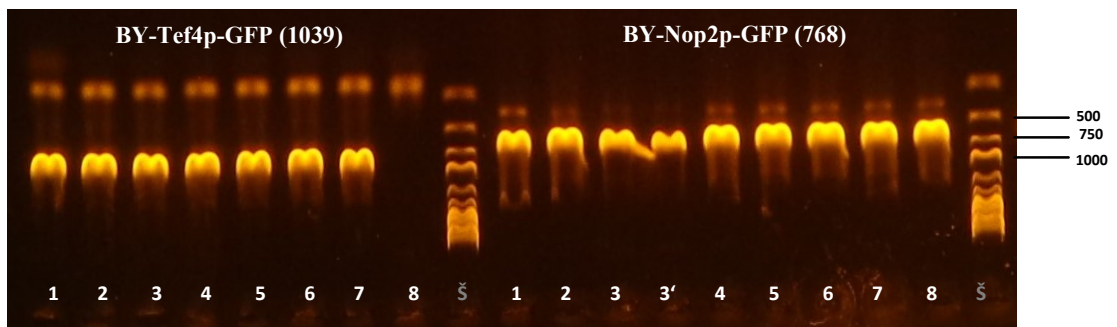
Po PCR reakcii nasledovala vizualizácia produktov prostredníctvom DNA elektroforézy v 0,8 % agarózovom géle (kap. 4.2.2.7.3.2). Negatívnu kontrolu predstavovala DNA izolovaná z materského kmeňa BY4742 s použitím rovnakých špecifických overovacích primerov. Nepítomnosť PCR fragmentu u negatívnej kontroly potvrdila, že primery z transformačnej kazety sa v genóme kvasinky nenaviazali na iné než požadované miesto. Výsledky elektroforetického overenia transformácie a veľkosti získaných fragmentov zobrazujú obrázky 11 – 13 uvedené v tejto kapitole.

Z každého kmeňa boli aspoň 4 klony vykazujúce pozitívny signál prenesené sterilným špáradlom do kryoskúmaviek, ktoré obsahovali skladovacie médium a následne uchovávané v hlbokomraziacom boxe pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Takto uchované klony slúžili v ďalších

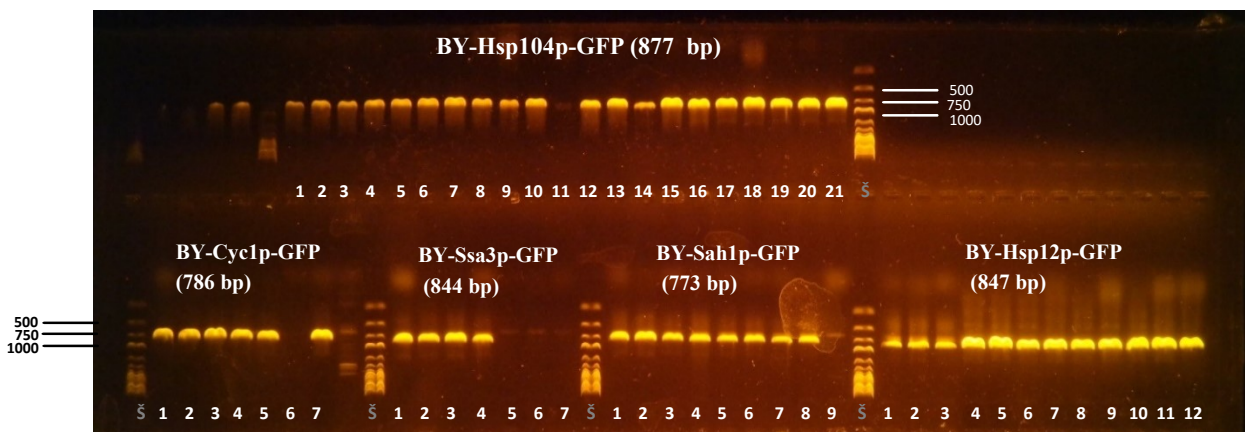
experimentoch ako zásobné kultúry pre zisk čerstvej biomasy. Uvedený postup overenia aj uskladnenia konštruktov bol rovnaký pre všetky kmene pripravené v tejto práci. Pri overení väčšiny klonov bol pozorovaný pozitívny signál.



**Obr. 11:** Elektroforetické overenie prítomnosti fragmentov a ich veľkosti v agarózovom géle u transformovaného kmeňa BY-Imd2p-GFP, čísla 1 – 8 označujú jednotlivé overované klonov. Medzi klonom 5 a 6 je pozostatok nesprávne nanoseného klonu 5. Pozitívne pásy reprezentujú produkty s dĺžkou 855 bp, čím potvrdzujú správne vloženie GFP za kódujúcu sekvenciu génu *IMD2*. Š – štandard, K – negatívna kontrola (genómová DNA izolovaná z materského kmeňa BY4742).



**Obr. 12:** Elektroforetické overenie prítomnosti fragmentov a ich veľkosti v agarózovom géle kmeňov BY-Tef4p-GFP a BY-Nop2p-GFP, čísla označujú jednotlivé overované klonov transformovaných kmeňov. Klon č. 3 kmeňa BY-Nop2p-GFP bol preliaty do 2 jamôk. Pozitívne pásy reprezentujú produkty BY-Tef4p-GFP s dĺžkou 1039 bp a produkty BY-Nop2p-GFP s dĺžkou 768 bp, čím potvrdzujú správne vloženie GFP za kódujúcu sekvenciu vybraných génov. Š – štandard.



**Obr. 13:** Elektroforetické overenie prítomnosti fragmentov a ich veľkosti v agarózovom géle kmeňov BY-Hsp104p-GFP, BY-Cyc1p-GFP, BY-Ssa3p-GFP, BY-Sah1p-GFP a BY-Hsp12p-GFP, čísla označujú jednotlivé overované klony transformovaných kmeňov. Pozitívne pásy reprezentujú produkty BY-Hsp104p-GFP s dĺžkou 877 bp, BY-Cyc1p-GFP s dĺžkou 786 bp, BY-Ssa3p-GFP s dĺžkou 844 bp, BY-Sah1p-GFP s dĺžkou 773 bp a BY-Hsp12p-GFP s dĺžkou 847 bp, čím potvrdzujú správne vloženie GFP za kódujúcu sekvenciu vybraných génov. Jednotlivé kmene sú od seba oddelené štandardom. Š – štandard.

### 5.1.2. Sledovanie alkalizácie a morfológie obrích kolónií

Z každého transformovaného kmeňa boli vybraté 4 klony, ktoré boli pozitívne overené prostredníctvom PCR a DNA elektroforézy, teda niesli fragment správnej veľkosti a GFP mal u nich správnu lokalizáciu zodpovedajúcu označovanému proteínu. U týchto klonov bola overená ich schopnosť tvorby kolónií na pevnom médiu, pričom bola pozorovaná morfológia kolónií, vývoj kolónií a ich životaschopnosť (kap. 4.2.2.6).

Počas transformácie môže dôjsť k vzniku náhodných mutácií, čím sú poškodené bunkové dráhy (napr. regulačné alebo metabolické) ústiace do zmien vo vývoji kolónie. Pozorovať tieto zmeny umožňujú obrie kolónie rastúce na pevnom GM médiu s obsahom BKP.

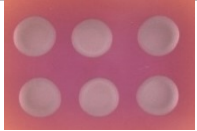
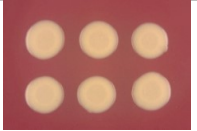
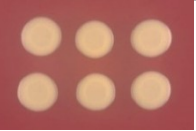
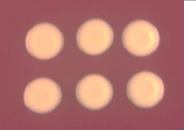











Vybrané klony boli vysiate a v čase porovnávané medzi sebou aj s materským kmeňom BY4742, čo umožnilo vylúčiť klony, u ktorých došlo k náhodným mutáciám.

U väčšiny klonov kontrolovaných týmto spôsobom bola pozorovaná správna morfológia aj miera alkalizácie v porovnaní s materským kmeňom BY4742. U klonu 3 kmeňa BY-Cyc1p-GFP (obr. 21) bola pozorovaná netypická morfológia obrích kolónií, pre ďalšie experimenty preto nebol použitý.





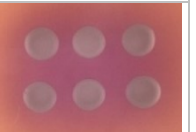

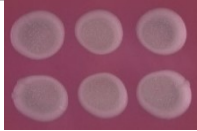
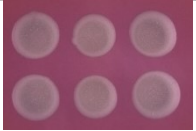

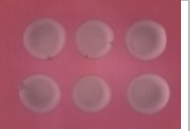

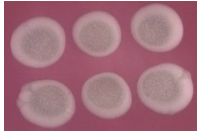
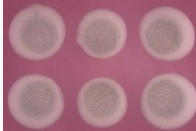


Kontrola alkalizácie jednotlivých kmeňov neprebehla v tom istom čase a s použitím rovnako starých misiek kvôli nedostatku času, plynulosti experimentu a odlišnému času transformácie. Primárne boli takto overené klony 1, klony 2-4 boli overované s použitím čerstvejšieho média. Materský kmeň BY4742 bol vysiaty len v 1. kontrole po prvých transformáciách, preto sa pri niektorých kmeňoch líšia veľkosť kolónií a miera acidifikácie, ktoré mohli byť znova spôsobené čerstvosťou použitého média. U týchto problémových kmeňov prebehli prvotné experimenty v tekutých médiách u viacerých klonov, čím bola overená lokalizácia aj miera expresie daných génov. V každom prípade bola pozorovaná postupná zmena alkalizácie v rovnakom čase v porovnaní s ostatnými kmeňmi a samotnými klonmi.

Výsledky tohto overenia zobrazujú obrázky 14 – 21.

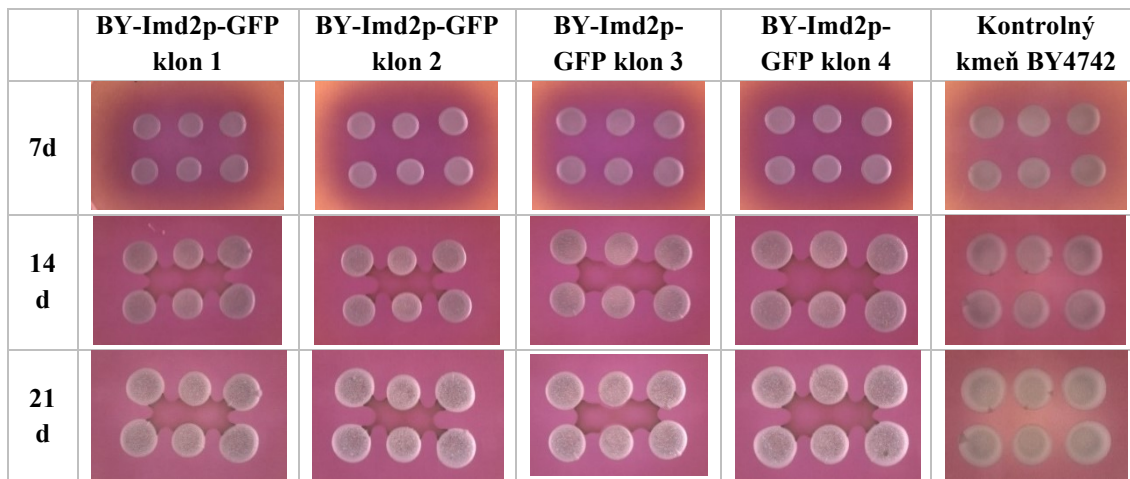


	BY-Nop2p-GFP klon 1	BY-Nop2p-GFP klon 2	BY-Nop2p-GFP klon 3	BY-Nop2p-GFP klon 4	Kontrolný kmeň BY4742
7d					
14 d					
21 d					

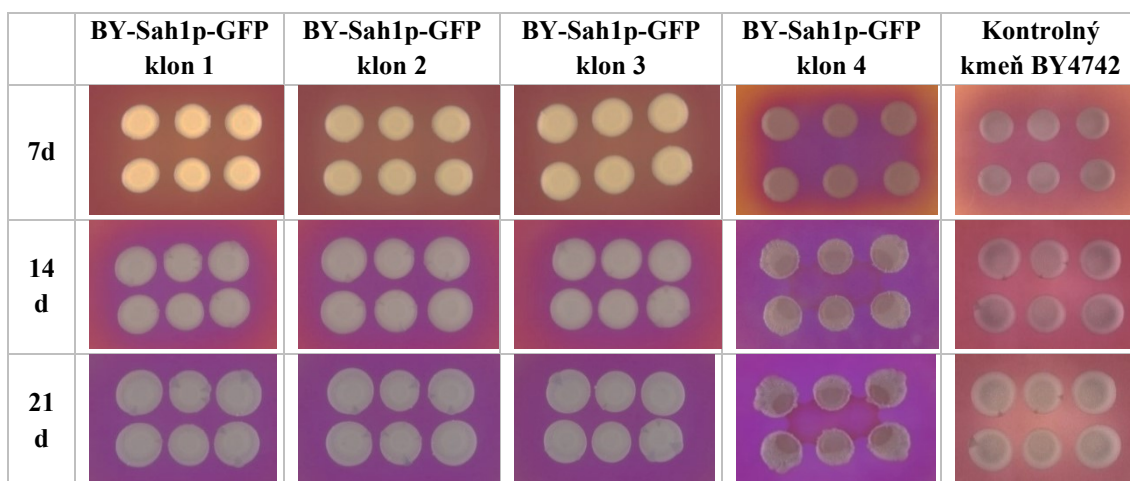
**Obr. 14:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Nop2p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Klony 2-4 boli touto metódou overené kvôli nedostatku času neskôr na čerstvom médiu, preto sú kolónie trochu väčšie a priebeh alkalizácie je výraznejší než pri 1. klone a kontrole. Pre ďalšie experimenty bol použitý klon 1.

	BY-Tef4p-GFP klon 1	BY-Tef4p-GFP klon 2	BY-Tef4p-GFP klon 3	BY-Tef4p-GFP klon 4	Kontrolný kmeň BY4742
7d					
14 d					
21 d					

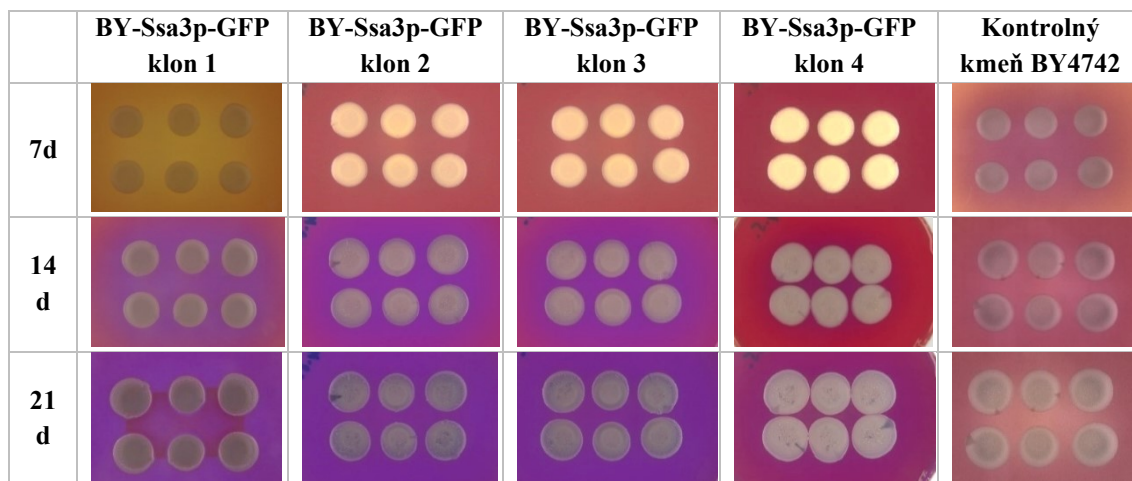
**Obr. 15:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Tef4p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Pre ďalšie experimenty bol použitý klon 1.



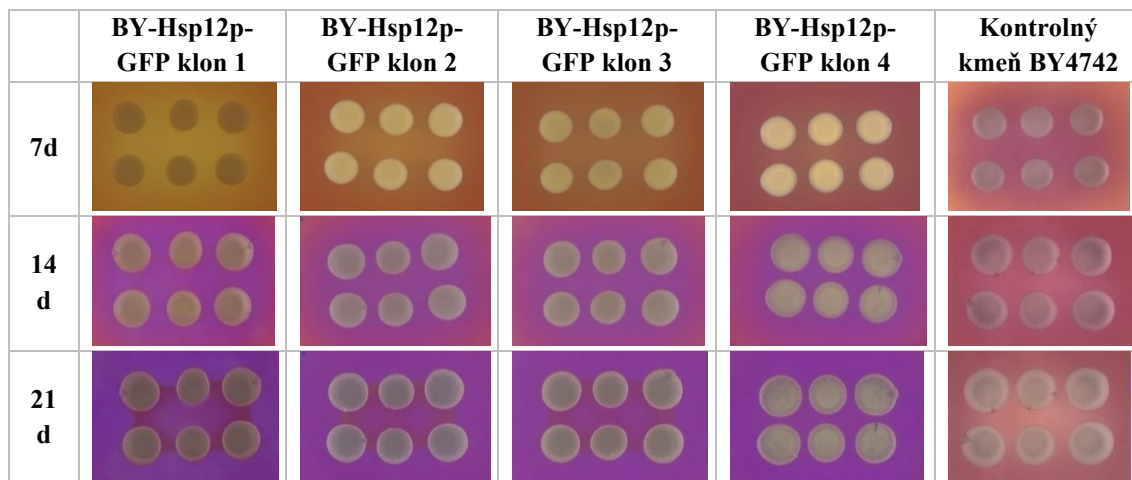
**Obr. 16:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Imd2p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Jednotlivé klony vykazovali o niečo vyššiu mieru alkalizácie, morfológicky sa od materského kmeňa nelíšili. Rozdiely v alkalizácii by mohli byť spôsobené aj odlišným časom prípravy média. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 1.



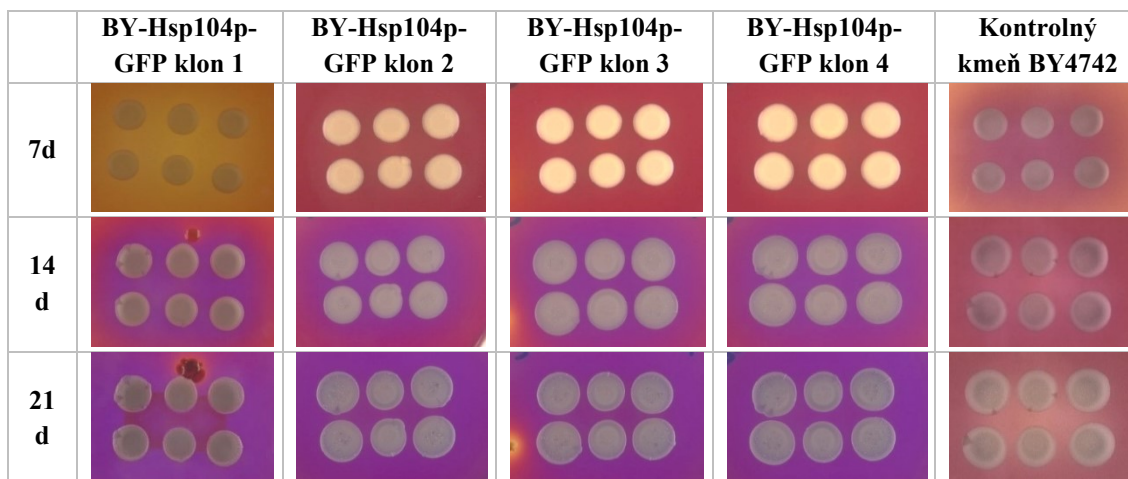
**Obr. 17:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Sah1p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Rozdiely v alkalizácii medzi kmeňmi 1 – 3 a kontrolným kmeňom môžu byť spôsobené použitím odlišne starého média. Pre ďalšie experimenty bol použitý klon 1.



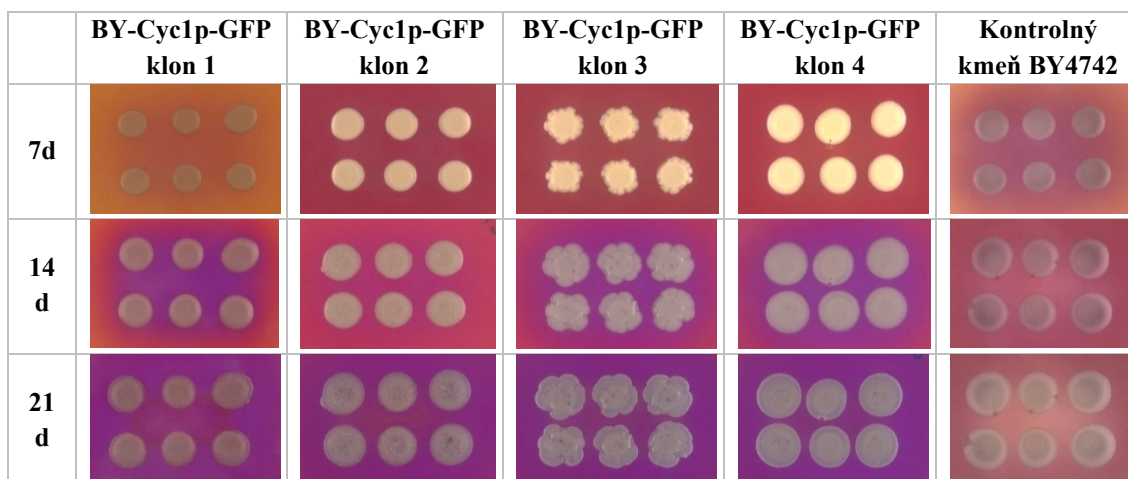
**Obr. 18:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Ssa3p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Jednotlivé klony vykazovali o niečo vyššiu mieru alkalizácie, morfológicky sa od materského kmeňa nelíšili. Rozdiely v alkalizácii medzi klonom 1, klonmi 2-4 a materským kmeňom sú pravdepodobne spôsobené odlišne starým médiom. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 1.



**Obr. 19:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Hsp12p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Jednotlivé klony vykazovali o niečo vyššiu mieru alkalizácie, morfológicky sa od materského kmeňa nelíšili. Rozdiely v alkalizácii sú pravdepodobne spôsobené odlišne starým médiom. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 1.



**Obr. 20:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-Hsp104p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Jednotlivé klony vykazovali o niečo vyššiu mieru alkalizácie, morfológicky sa od materského kmeňa nelíšili. Rozdiely v alkalizácii sú pravdepodobne spôsobené odlišne starým médiom. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 1.



**Obr. 21:** Priebeh alkalizácie a morfológie obrích kolónií jednotlivých klonov (1-4) BY-HspCyc1p-GFP. Jednotlivé klony boli porovnané medzi sebou a tiež s materským kmeňom BY4742. V riadkoch je uvedený deň kultivácie, v stĺpcoch sú znázornené jednotlivé klony. Jednotlivé klony vykazovali o niečo vyššiu mieru alkalizácie, morfológicky sa od materského kmeňa nelíšili. Rozdiely v alkalizácii sú pravdepodobne spôsobené odlišne starým médiom. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 1.

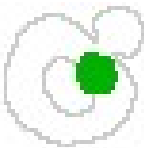
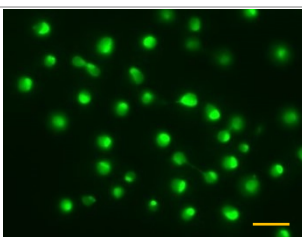
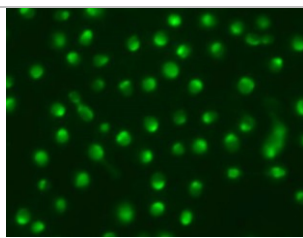
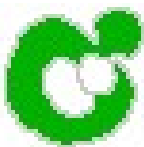
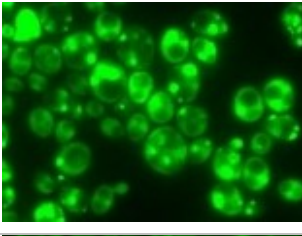
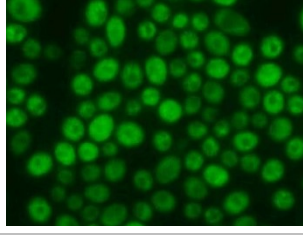

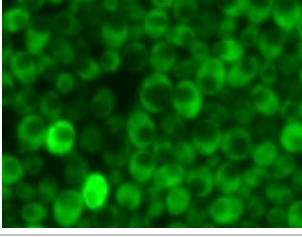
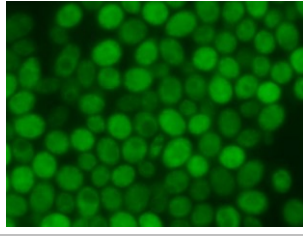
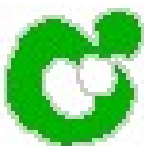
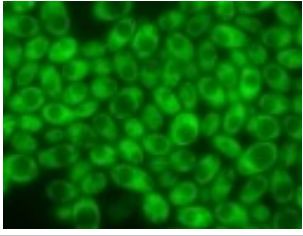
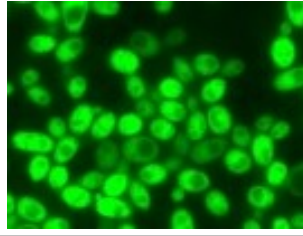
### 5.1.3. Overenie fluorescencie GFP proteínu

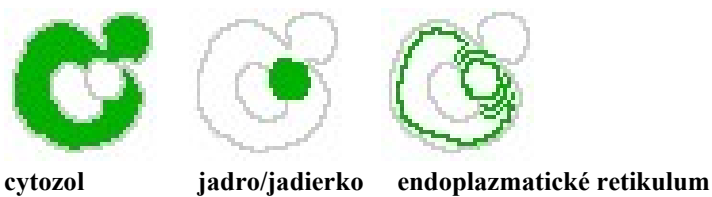
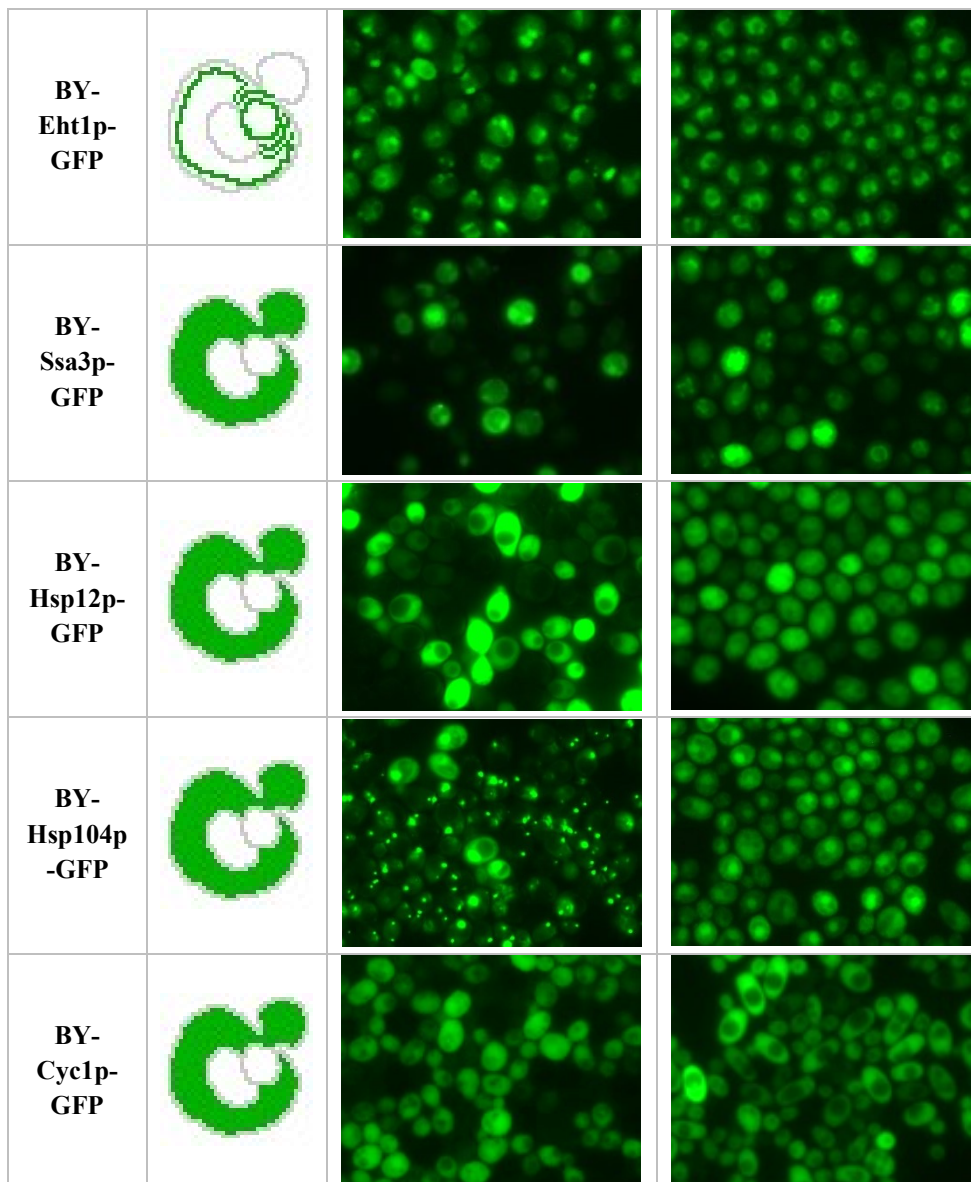
Po overení správneho vloženia a veľkosti špecifických vložených fragmentov pomocou PCR a DNA elektroforézy bola expresia génov s C-koncovým značením pomocou fluorescenčného GFP proteínu u vybraných klonov skontrolovaná pod fluorescenčným mikroskopom (kap. 4.2.2.8). V prípade, že došlo k správne vloženiu génu pre GFP do

požadovaného miesta genómu, bol zachovaný čítací rámeček fúzneho proteínu a súčasne nedošlo k mutáciám v sekvencii pre GFP proteín, bolo možné pozorovať zelený fluorescenčný signál a overiť tak tiež očakávanú lokalizáciu vybraného proteínu a fázu expresie vybraného génu. Očakávaná lokalizácia bola určená na základe dát získaných z databázy SGD (Saccharomyces Genome Database – [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

Keďže cieľom tejto práce bolo sledovať expresiu vybraných génov a porovnať ju s očakávanou fázou rastu kvasinkových populácií a tiež s predpokladanou lokalizáciou počas 3 dní, overenie fluorescence u každého klonu bolo z časového hľadiska nepraktické a prebiehalo primárne u vybraných reprezentatívnych klonov (klony 1), pričom všetky pozorovania budú uvedené a opísané v nasledujúcej kapitole.

Očakávané lokalizácie podľa SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) a pozorované lokalizácie sú zobrazené na obrázku 22.

Kmeň	SGD	GFP (YEG médium)	GFP (GM médium)
BY-Nop2p-GFP			
BY-Tef4p-GFP			
BY-Imd2p-GFP			
BY-Sah1p-GFP			



**Obr. 22:** Porovnanie očakávanej lokalizácie daných proteínov podľa SGD databázy a reálnej lokalizácie pozorovanej na odlišných médiách. 1. stĺpec označuje daný kmeň, 2. stĺpec zobrazuje lokalizáciu uvedenú v databáze SGD ([www.yeastgenome.com](http://www.yeastgenome.com)), 3. stĺpec reálnu lokalizáciu v glukózovom (YEG) médiu a 4. stĺpec reálnu lokalizáciu v glycerolovom (GM médiu). Žltá priamka v pravom dolnom rohu obrázka BY-Nop2p-GFP v YEG médiu zodpovedá 10 µm, zväčšenie je v každom obrázku rovnaké.

## 5.2. Analýza chovania konštruktov v tekutých kultúrach

*Cieľ: Pomocou merania optickej denzity spektrofotometrom vytvoriť rastovú krivku pripravených kmeňov počas rastu vo forme tekutých kultúr a súčasne pomocou fluorescenčného mikroskopu analyzovať expresiu vybraných značených proteínov v dvoch typoch tekutých médií.*

Pre analýzu expresie vybraných génov v tekutých kultúrach bol z každého pripraveného kmeňa vybraný jeden reprezentatívny klon (spravidla uložený ako klon 1), ktorý bol pred pozorovaním vybraný z hlbokomraziaceho boxu, nanesený na pevné YEPG médium na Petriho miskách a kultivovaný 1 deň v termostate pri teplote 28 °C.

Po tejto kultivácii bol daný klon zaočkovaný na ceznočnú kultiváciu (približne 20 hodín) do Erlenmeyerovej banky s tekutým GM médium na optickú denzitu 0,005 a s tekutým YEG médium na optickú denzitu 0,0001. Optická denzita ceznočnej kultivácie bola nastavená tak, aby po kultivácii nebola optická denzita vyššia než 1,5, čo zaručilo, že kultúra bude v exponenciálnej fáze rastu.

Ceznočná kultivácia prebiehala na rotačnej trepačke pri teplote 28 °C a 150 RPM. Približne po 20 hodinách bola optická denzita jednotlivých kultivácií odmeraná spektrofotometrom (kap. 4.2.2.4). Na základe tohto merania boli ceznočné kultivácie preočkované do Erlenmeyerových baniek s čerstvým totožným médium na optické denzity 0,01, 0,05 a 0,1.

Pozorovanie vývoja rastu kvasinkových populácií a expresie vybraných génov prebiehalo každú hodinu pri prvotných meraniach až každé dve hodiny po optimalizácii, vždy po dobu troch dní, čo umožnilo pozorovať expresiu vybraných génov počas rôznych rastových fáz. Odoberaný bol 1 ml vzorky z tekutej kultivácie, pričom v neskorších fázach rastu, kedy optická denzita kultúry presiahla predom stanovenú hraničnú hodnotu, pri ktorej je meranie ešte lineárne, boli vzorky riedené podľa potreby 10 – 50x pridaním dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 1 ml. Ako blank bolo použité čisté médium daných kultivácií (GM alebo YEG), ktoré bolo v neskorších fázach riedené rovnako ako vzorky. Pri každom odobraní vzorky bola spektrofotometrom odmeraná a zaznamenaná jej optická denzita. Pred samotným meraním boli vzorky v mikroskúmavkách zvortexované a optická denzita bola meraná v plastových kyvetách.

Po odmeraní a zaznamenaní optickej denzity boli jednotlivé vzorky centrifugované 2 minúty pri 6000 RPM a médium bolo odobraté. Následne boli bunky pozorované a GFP fluorescencia exprimovaných génov bola zachytená pomocou fluorescenčného mikroskopu Leica (kap. 4.2.2.8) pri zväčšení 1000x.

Okrem fluorescenčného signálu bola morfológia vzoriek zachytená tiež na Nomarského kontraste pri 100 ms, a to u najmladších buniek (1. deň meraní v kultúre zaočkovanej na optickú

denzitu 0,01) a u najstarších buniek (3. deň meraní v kultúre zaočkovanej na optickú denzitu 0,01).

Fluorescenčný signál bol zachytený primárne pri expozícii 3 s, v prípade silného signálu bol podľa potreby znížený. Jednotlivé získané fotografie boli následne upravené v programe IrfanView.

Obrázky 23 – 76 zobrazujú postupné zmeny v expresii vybraných génov spolu s príslušnou nameranou optickou denzitou a časom, ktoré prislúchajú danej vzorke, porovnanie morfológie najmladších buniek a najstarších buniek kultúry zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 zaznamenané Nomarského kontrastom pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x a detailné porovnanie fluorescencie a lokalizácie daného proteínu. Grafy 1 – 18 zobrazujú logaritmické vynesenie nameraných optických denzít a príslušný čas. Takéto spracovanie umožňuje približne určiť rastovú fázu, v ktorej sa bunky v tekutej kultúre pri meraní nachádzali. V tabuľkách a grafoch sú farebne odlišené jednotlivé fázy, v ktorých sa pravdepodobne v danom čase nachádzali jednotlivé kultúry. Žltá farba predstavuje lag fázu, zelená exponenciálnu fázu, červená diauxický a postdiauxický posun, sivá farba zobrazuje stacionárnu fázu. Jednotlivé fázy boli určené podľa nárastu optickej denzity, času a logaritmického vynesenia rastovej krivky.

### **5.2.1. BY-Nop2p-GFP**

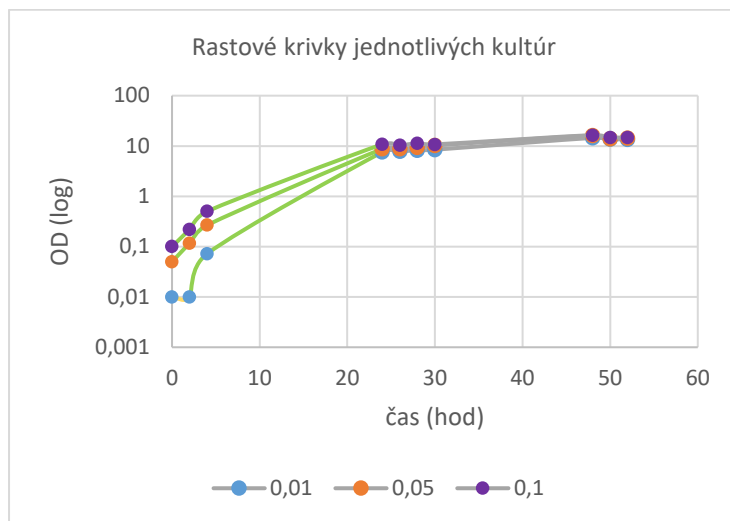
Pre tento kmeň bola očakávaná najvyššia expresia v skorých fázach rastu, približne pri prechode populácie z lag fázy do exponenciálnej fázy a v začiatku exponenciálnej fázy. Očakávaná bola lokalizácia proteínu Nop2p do jadra, respektíve jadierkovej štruktúry. V priebehu rastu nebola predpokladaná zmena lokalizácie tohto proteínu, pri expresii bolo predpokladané zníženie intenzity fluorescenčného signálu s narastajúcou dĺžkou kultivácie (de Beus a kol., 1994, [www.yeastgenome.com](http://www.yeastgenome.com)). Tieto predpoklady vychádzajú z experimentálnych dát získaných z glukózových médií.



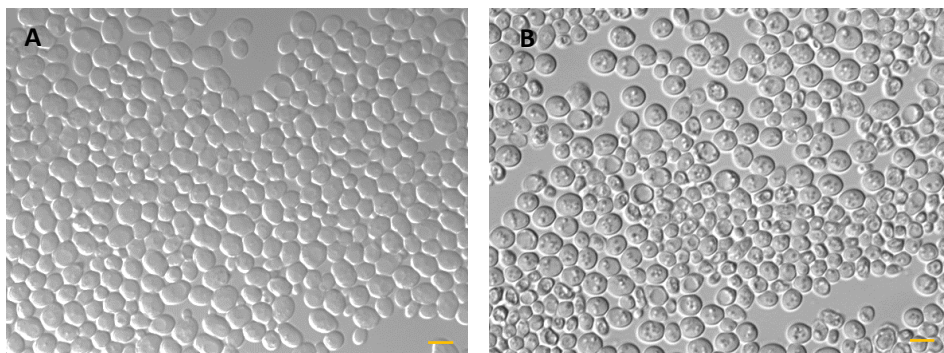
### 5.2.1.1. Kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	2	4	24	26	28	47	49
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené	nefotené					
$OD_{0,01}$	0,01	0,072	7,58	7,84	8,2	14,5	13,74
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,117	0,267	8,76	8,86	9,34	16,15	13,9
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,22	0,502	10,8	10,4	11,28	16,45	14,82

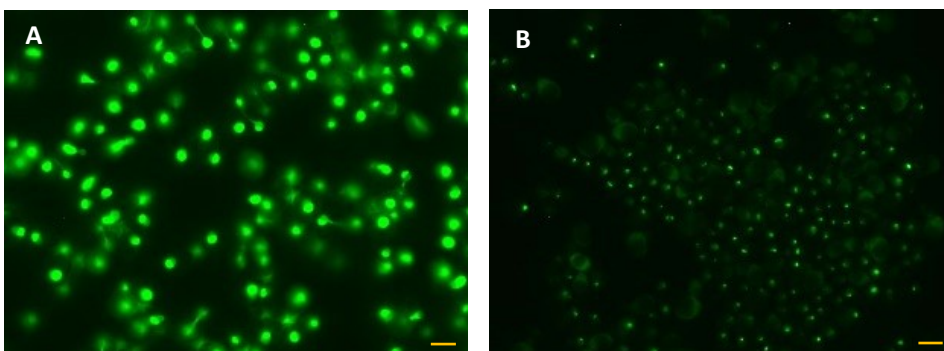
**Obr. 23:** Fluorescencia kmeňa BY-Nop2p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúr. Žltá – lag fáza, zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu prvej snímky zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 1:** Logaritmické vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Nop2p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatkovou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Žltá krivka – lag fáza, zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 24:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 25:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Nop2p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 2 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 49 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 23 zobrazuje zmeny v expresii génu *NOP2* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 49 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatočnou optickou denzitou (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescencie vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Nop2 je počas celého rastu kultúry lokalizovaný v jadre/jadierku. V počiatočných fázach je však pozorovateľná jeho výraznejšia polmesiačikovitá morfológia a proteín sa javí rozpustený rovnomerne po celom jeho objeme. Pri delení jadra/jadierka dochádza pravdepodobne k jeho rovnomernému rozdeleniu medzi dcérskou a materskou bunkou (v detaile na obr. 25A). S postupným startnutím buniek dochádza k jeho koncentrovaniu v menšom objeme jadierkovej štruktúry (obr. 25B).

Paralelne s veľkosťou jadierka dochádza k výraznej zmene intenzity fluorescenčného signálu. Počas 1. dňa kultivácie, vo fáze lag a v počiatku exponenciálnej fázy, je viditeľný najsilnejší signál.

So zmenšovaním jadierkovej štruktúry a zároveň so starnutím bunkovej kultúry dochádza k výraznému zníženiu intenzity fluorescenčného signálu, ktorý je počas 2. a 3. dňa viac-menej konštantný vo všetkých troch kultiváciách.

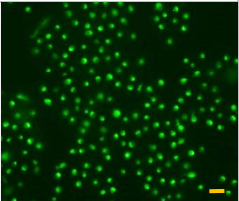
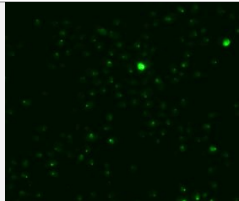
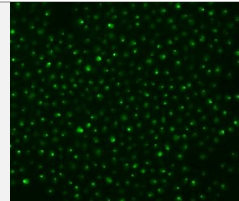
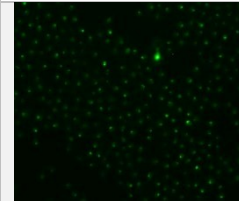
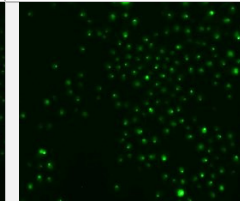
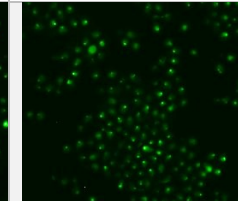
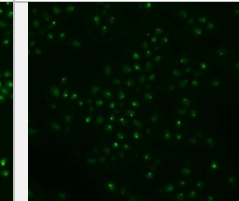
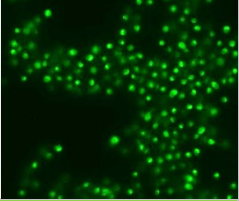
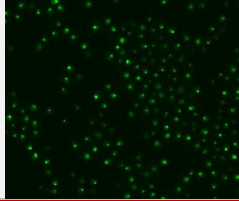
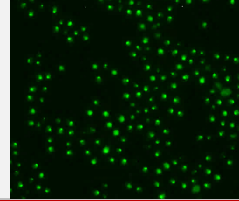
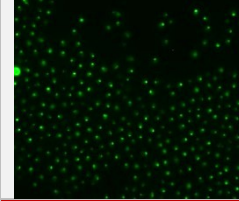
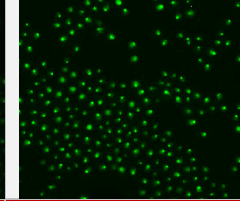
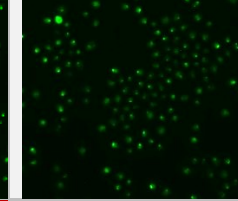
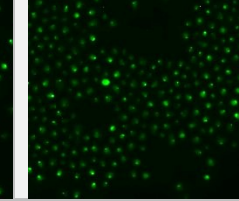
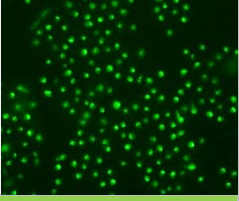
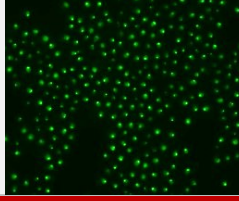
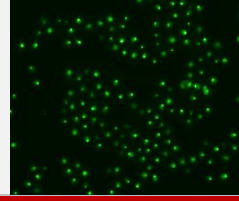
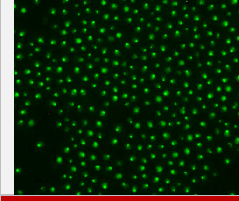
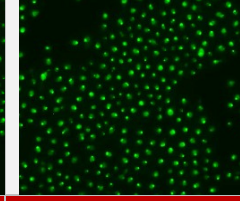
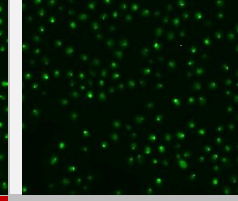
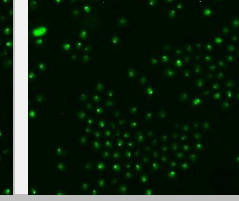
Graf 1 znázorňuje logaritmické vynesenie rastovej krivky jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas meraní a pozorovaní v 1. deň v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou rastu, kedy dochádzalo k ich aktívnemu deleniu a rýchlemu zvyšovaniu optickej denzity. Počas druhého dňa sa všetky 3 kultivácie dostali na približne rovnakú optickú denzitu, ktorá sa s časom zvyšovala len minimálne a dá sa predpokladať, že bunky sa nachádzali v skorej stacionárnej fáze. Počas tretieho dňa sa všetky tri kultivácie dostali do neskorej stacionárnej fázy a ich optické denzity boli na jednej úrovni s len minimálnymi rozdielmi.

Obrázok 24A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Nop2p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň meraní v kultúre zaočkovanej na počiatočnú optickú denzitu 0,01. Tieto bunky majú prevažne hladký povrch a minimum jaziev, sú však pozorovateľné väčšie rozdiely vo veľkosti jednotlivých buniek, čo svedčí o prítomnosti väčšieho počtu dcérskych buniek.

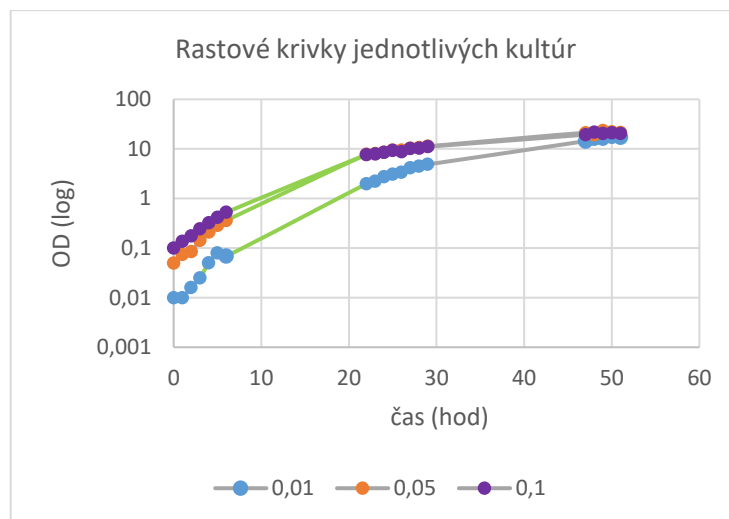
Obrázok 24B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Nop2p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň meraní v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky sa medzi sebou výrazne líšia vo veľkosti, väčšina z nich obsahuje veľké množstvo jaziev a sú tiež pozorované bunky s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 25 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v čase, kedy bol najvyšší (obr. 25A) a najnižší (obr. 25B) a zároveň odlišnú proteínovú lokalizáciu.

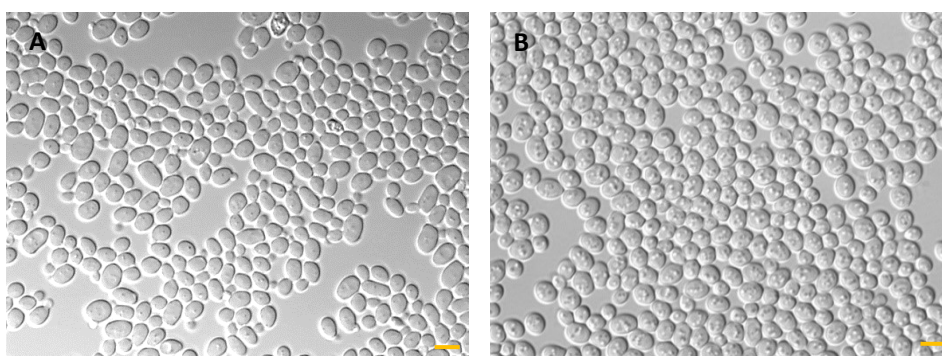
### 5.2.1.2. Kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	3	22	24	26	28	47	49
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,01							
OD <sub>0,01</sub>	0,025	1,98	2,72	3,35	4,45	14,35	15,65
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,05							
OD <sub>0,05</sub>	0,144	7,76	8,54	9,48	10,67	21,2	23,4
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,1							
OD <sub>0,1</sub>	0,243	7,63	8,53	8,84	10,32	19,4	20,5

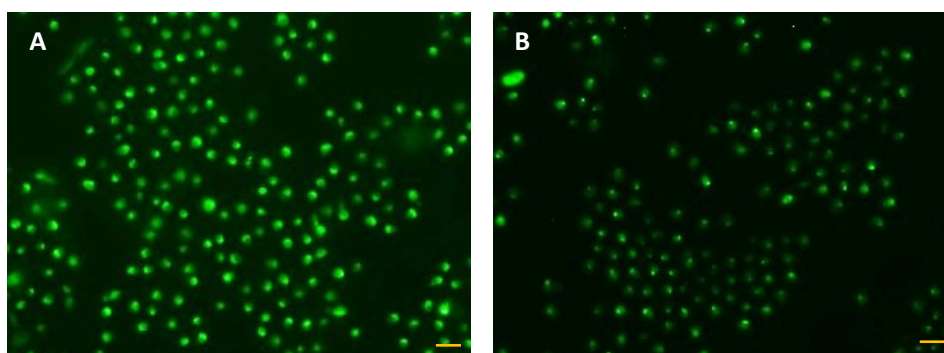
**Obr. 26:** Fluorescencia kmeňa BY-Nop2p-GFP v tekutom GM v čase. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. V prvom riadku je uvedený čas, v ktorom boli vzorky odoberané, súčasne v tomto čase bola meraná optická denzita kultúry a pozorovaná GFP fluorescencia. Zmeny v expresii spolu s príslušnou optickou denzitou kultúry sú uvedené v riadkoch. Žltá – lag fáza, zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 μm. Jas a kontrast snímok boli upravené.



**Graf 2:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Nop2p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 27:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Nop2p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 28:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Nop2p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 3 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 49 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas a kontrast snímok boli upravené.

Obrázok 26 zobrazuje zmenu expresie génu *NOP2* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 49 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatočnou optickou denzitou (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Nop2 je v bunkách počas celého rastu lokalizovaný v jadre/jadierku.

Najvyššia miera fluorescence, teda aj najväčšie množstvo proteínu v bunke bolo pozorovateľné počas prvého dňa kultivácie u všetkých troch kultúr, kedy sú bunky jednotlivých kultúr v lag fáze a prechádzajú do exponenciálnej fázy.

Počas 2. dňa kultivácie, tzn. počas exponenciálnej fázy rastu, bolo pozorované postupné znižovanie miery expresie proteínu Nop2.

Počas 3. dňa kultivácie, kedy optická denzita kultúr presiahla hodnotu približne 14 v prípade kultúry zaočkovanej na počiatočnú optickú denzitu 0,01, až približne 19 a viac v prípade kultúr zaočkovaných na počiatočnú optickú denzitu 0,05 a 0,1, kedy vo všetkých 3 prípadoch dochádzalo k výraznému spomaľovaniu delenia a teda vstupu do tzv. stacionárnej fázy rastu, bola intenzita fluorescenčného signálu v prípade všetkých 3 kultivácií výrazne nižšia, než v 1. deň kultivácií.

Graf 2 znázorňuje logaritmické zobrazenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas meraní a pozorovaní vo fáze lag, resp. na začiatku exponenciálnej fázy počas 1. dňa, v exponenciálnej fáze počas 2. dňa kultivácie a v stacionárnej fáze počas 3. dňa kultivácie.

Obrázok 27A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Nop2p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu na začiatku meraní v kultúre zaočkovanej na počiatočnú optickú denzitu 0,01, teda najmladšie bunky. Tieto bunky sú približne rovnako veľké a majú maximálne 2 jazvy po pučaní. Viditeľné sú tiež pupene práve sa deliacich buniek.

Obrázok 27B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Nop2p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie, teda na konci experimentu v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Bunky majú znova rovnakú veľkosť, avšak oproti bunkám z 1. dňa majú viacero jaziev po pučaní a nie sú pozorovateľné deliace sa bunky. Všetky bunky boli v tomto čase pravdepodobne v stacionárnej fáze a prebiehalo u nich chronologické starnutie.

Obrázok 28 porovnáva intenzitu fluorescenčného žiarenia na začiatku kultivácie (obr. 28A) a na jej konci (obr. 28B).

### **5.2.2. BY-Tef4p-GFP**

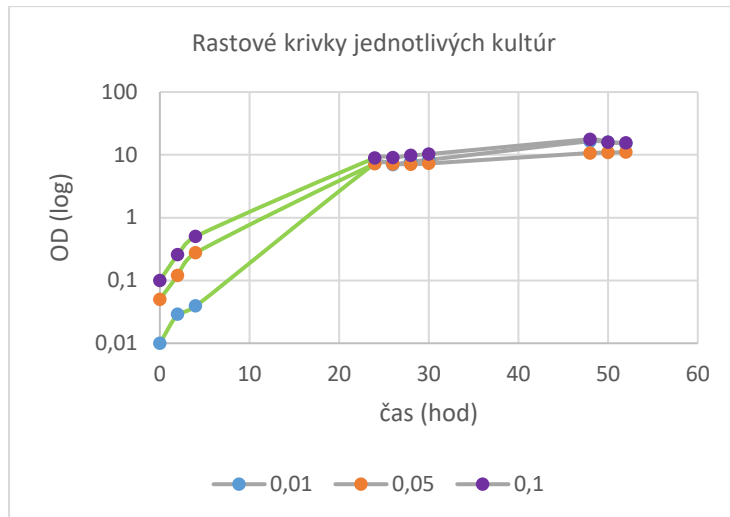
U tohto kmeňa bola na základe experimentov s glukózou ako zdrojom uhlíka očakávaná zvýšená expresia najmä v počiatočných fázach rastu, počas lag či exponenciálnej fázy, kedy sa kvasinkové bunky aktívne delia a dochádza u nich k zvýšenej produkcii proteínov. Podľa funkcie

Tef4p v procese translácie bola očakávaná jeho cytoplazmatická lokalizácia (Kinzy a kol., 1994, www.yeastgenome.com).

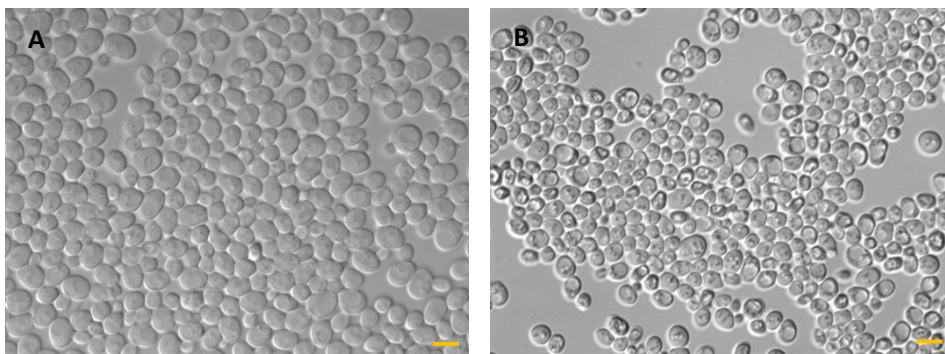
### 5.2.2.1. Kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	4	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,039	7,27	6,99	7,85	8,33	16,5	15,8
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,275	7,2	7,17	7,06	7,28	10,7	10,85
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,502	8,9	9,04	9,8	10,27	17,65	15,95

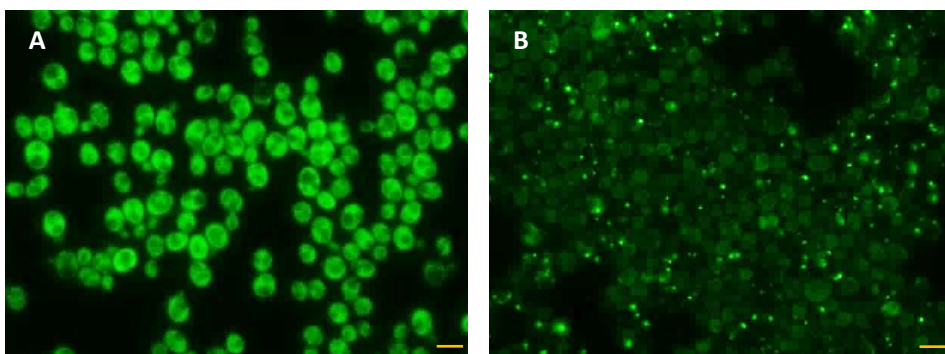
**Obr. 29:** Fluorescencia kmeňa BY-Tef4p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúr. Zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 3:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzit kultúr BY-Tef4p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 30:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 31:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Tef4p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 4 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 30 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Jas a kontrast snímok boli upravené. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



Obrázok 29 zobrazuje zmeny v expresii génu *TEF4* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatkovou optickou denzitou (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený, aby lepšie zodpovedal realite a bola lepšie rozoznateľná lokalizácia proteínu Tef4.

Proteín Tef4 bol počas celého rastu lokalizovaný v cytoplazme. V priebehu času bola u niektorých buniek pozorovateľná tvorba zhlukov proteínu Tef4, pričom bol stále pozorovateľný aj slabší signál v celej cytoplazme.

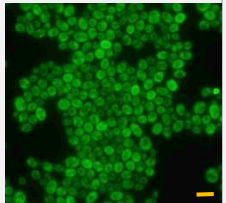
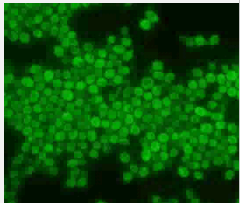
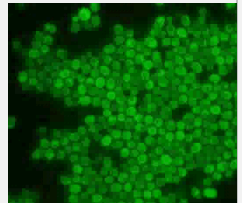
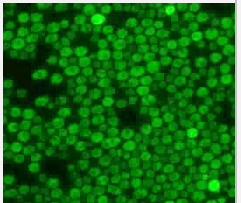
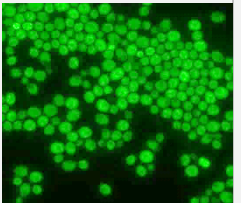
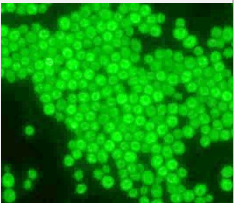
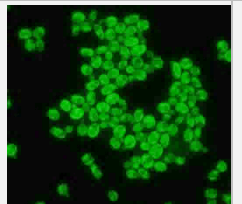
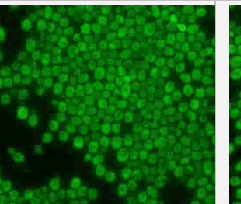
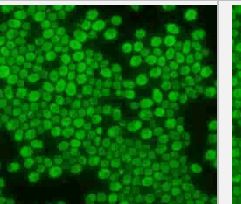
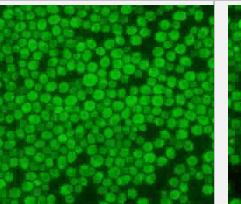
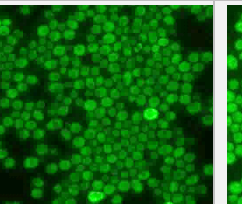
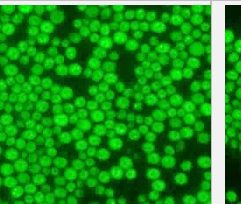
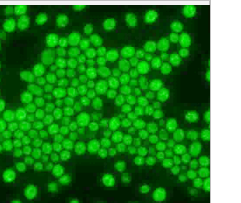
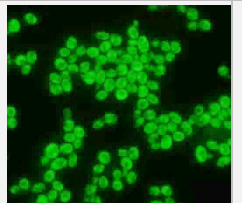
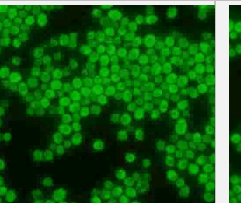
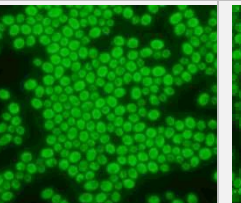
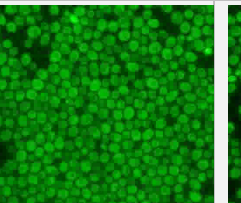
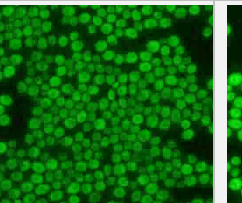
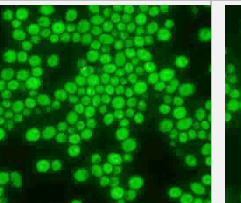
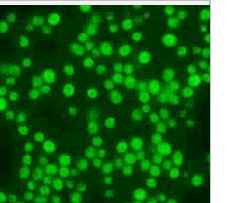
Graf 3 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas meraní a pozorovaní v 1. deň v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou, v ktorej dochádzalo k ich aktívnemu deleniu. Počas druhého dňa sa všetky 3 kultivácie dostali na približne rovnakú optickú denzitu, ktorá sa s časom zvyšovala len minimálne a bunky sa nachádzali v skorej stacionárnej fáze. Počas 3. dňa sa všetky 3 kultivácie dostali do neskorej stacionárnej fázy a ich optické denzity boli na jednej úrovni s len minimálnymi rozdielmi.

Obrázok 30A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Tef4p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň meraní v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch a maximálne 2 jazvy po pučaní. Viditeľné sú rozdiely vo veľkosti buniek, čo svedčí o prítomnosti menších dcérskych buniek a aktívne sa deliace bunky.

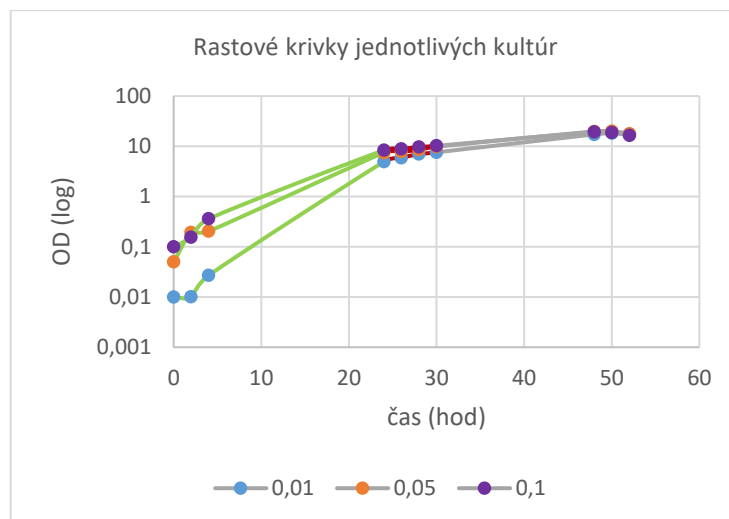
Obrázok 30B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Tef4p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň meraní v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01. Tieto bunky sa medzi sebou líšia veľkosťou, väčšina z nich obsahuje väčšie množstvo jaziev po pučaní a sú tiež pozorované bunky s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 31 zobrazuje rozdielnu mieru fluorescenčného signálu a lokalizáciu Tef4p počas kultivácie po 4 hodinách (obr. 31A) a po 30 hodinách (obr. 31B).

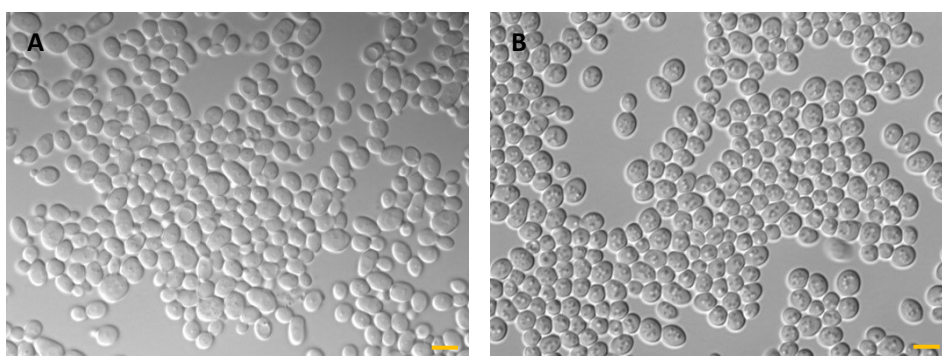
### 5.2.2.2. Kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	4	24	26	28	30	48	50
Kultúr a s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,027	4,94	5,91	6,99	7,58	17,25	18,3
Kultúr a s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,204	7,46	7,82	8,53	9,82	19,75	19,95
Kultúr a s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,36	8,36	8,81	9,69	10,18	19,35	18,8

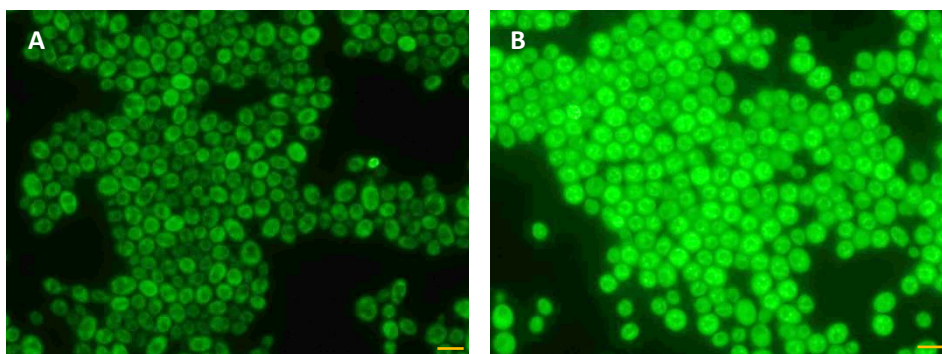
**Obr. 32:** Fluorescencia kmeňa BY-Tef4p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Jas snímok bol upravený, aby viac zodpovedal skutočnému obrazu. Žltá – lag fáza, zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ .



**Graf 4:** Logaritmické vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Tef4p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, červená krivka – diauxický a postdiauxický posun, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 33:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Tef4p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 34:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Tef4p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 24 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 32 zobrazuje zmeny v expresii génu *TEF4* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní v priebehu 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatkovou OD (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 300 ms a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený, aby viac zodpovedal realite a bola lepšie rozoznateľná lokalizácia proteínu Tef4.

Proteín Tef4 bol počas celého pozorovania prítomný v rozpustenej forme v cytoplazme. Jeho rozloženie sa javí rovnomerné po celom objeme jednotlivých buniek.

GFP fluorescenčný signál proteínu Tef4 bol výrazný po celú dobu pozorovania v každej kultivácii. Intenzita fluorescenčného signálu sa s časom mierne zvyšovala.

Graf 4 znázorňuje logaritmické vynesenie rastovej krivky jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas meraní a pozorovaní v 1. deň v lag fáze a na začiatku exponenciálnej fázy, počas 2. dňa sa kultúry javia na konci exponenciálnej fázy a pri vstupe do stacionárnej fázy, v 3. deň pozorovaní boli všetky 3 kultivácie v stacionárnej fáze rastu a ich optické denzity sa líšili len minimálne.

Obrázok 33A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Tef4p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň experimentu v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch s minimom jaziev po pučaní, sú viditeľné rozdiely vo veľkosti buniek, čo svedčí o prítomnosti dcérskych buniek.

Obrázok 33B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Tef4p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň experimentu v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01. Tieto bunky majú konštantnú veľkosť a väčšie množstvo jaziev po pučaní, nie sú však pozorované mladé dcérske bunky ani aktívne sa deliace bunky.

Obrázok 34 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,01 počas odlišných rastových fáz.

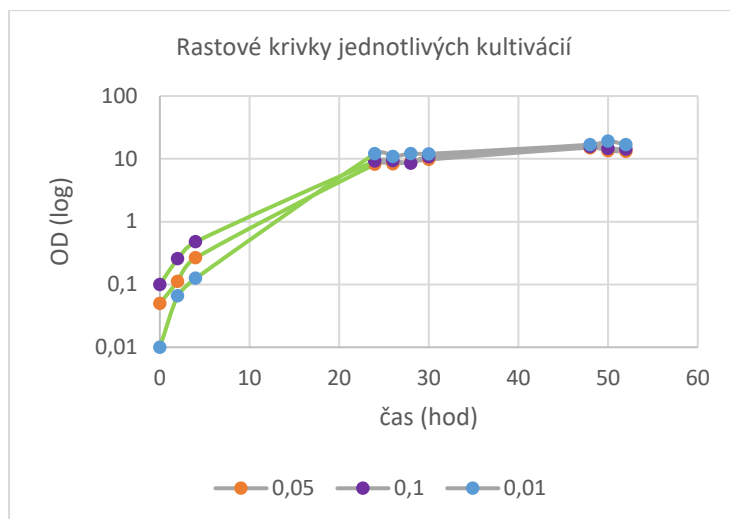
### **5.2.3. BY-Imd2p-GFP**

Pre kmeň BY-Imd2p-GFP bola na základe experimentov z glukózového média očakávaná cytoplazmatická lokalizácia a zvýšená expresia najmä v počiatkových fázach rastu. Znižovanie expresie bolo očakávané v závislosti na množstve nutričov v médiu, teda s rastom populácie (DeRisi a kol., 1997; Huh a kol., 2003, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

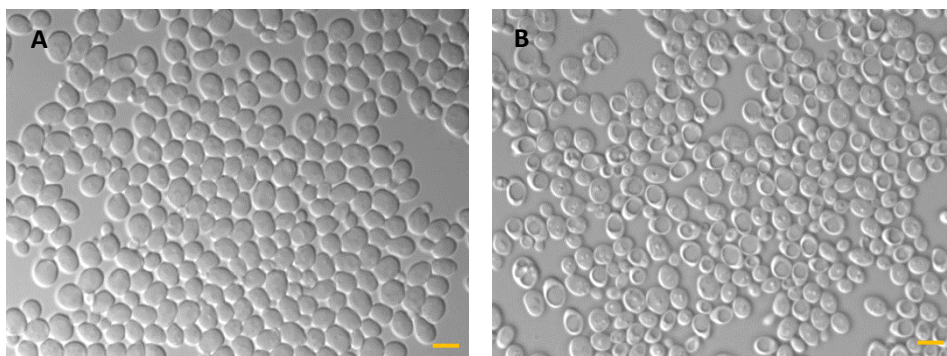
### 5.2.3.2. Kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	4	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,125	12,05	10,92	12,16	12,04	16,8	19,05
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,265	8,18	8,28	9,02	9,76	15,05	13,44
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,478	9,16	9,32	8,54	10,82	15,7	14,64

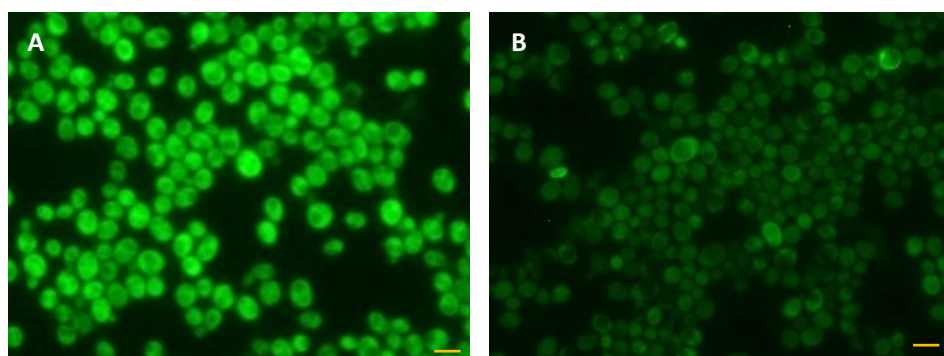
**Obr. 35:** Fluorescencia kmeňa BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ . Jas snímok bol upravený.



**Graf 5:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzit kultúr BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 36:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 37:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Imd2p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 4 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas snímok bol upravený.

Obrázok 35 zobrazuje zmeny v expresii génu *IMD2* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatkovou OD (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Imd2 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme. V niekoľkých prípadoch individuálnych buniek bola pozorovaná jeho výraznejšia lokalizácia na jednom z pólov bunky.

Intenzita GFP fluorescenčného signálu bola najvýraznejšia v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,05 a OD = 0,1. V 2. deň pozorovaní bola intenzita GFP fluorescence viac-menej konštatná u oboch týchto kultivácií, s rozdielmi medzi individuálnymi bunkami. V kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01 nebol pozorovaný výraznejší fluorescenčný signál.

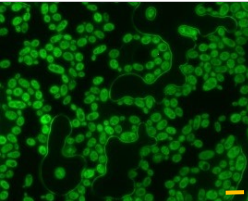
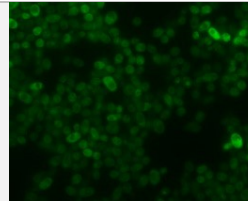
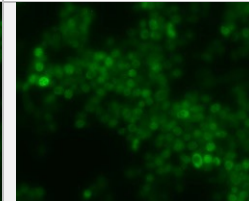
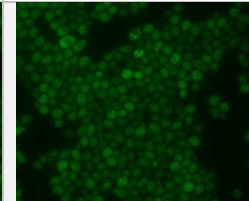
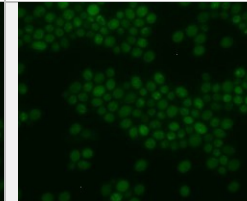
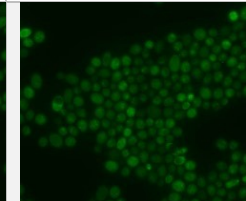
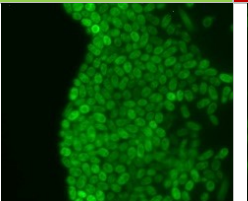
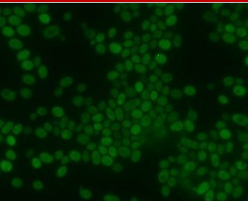
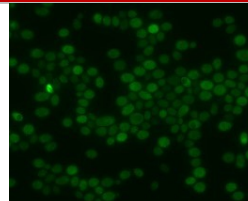
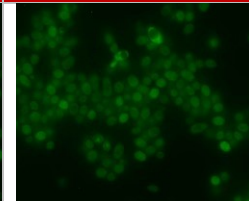
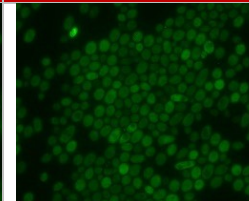
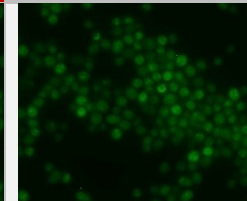
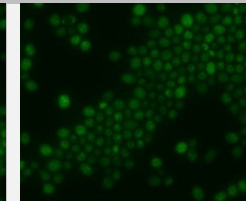
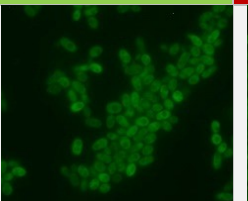
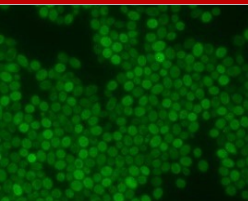
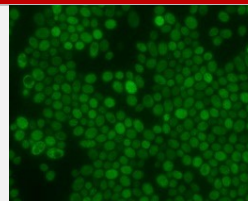
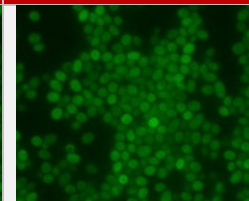
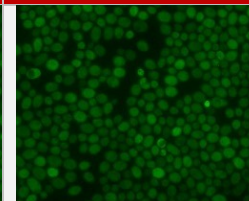
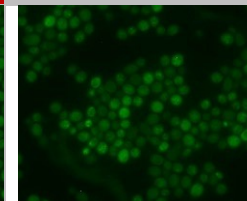
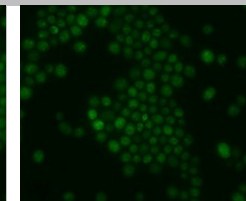
Graf 5 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou. Počas 2. dňa prešli všetky 3 kultivácie do skorej stacionárnej fázy a ich optické denzity sa ustálili na jednej úrovni, okrem kultivácie zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01, ktorá ostatné kultúry mierne prerástla. V 3. deň kultivácie sa všetky 3 kultivácie dostali do neskorej stacionárnej fázy a ich optické denzity sa líšili len minimálne.

Obrázok 36A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Imd2p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, nemajú jazvy po pučaní a sú medzi nimi pozorovateľné práve pučiace bunky.

Obrázok 36B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Imd2p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01. Tieto bunky sa výrazne líšia svojou veľkosťou, majú viacero jaziev po pučaní a mnoho buniek obsahuje 1 veľkú vakuolu.

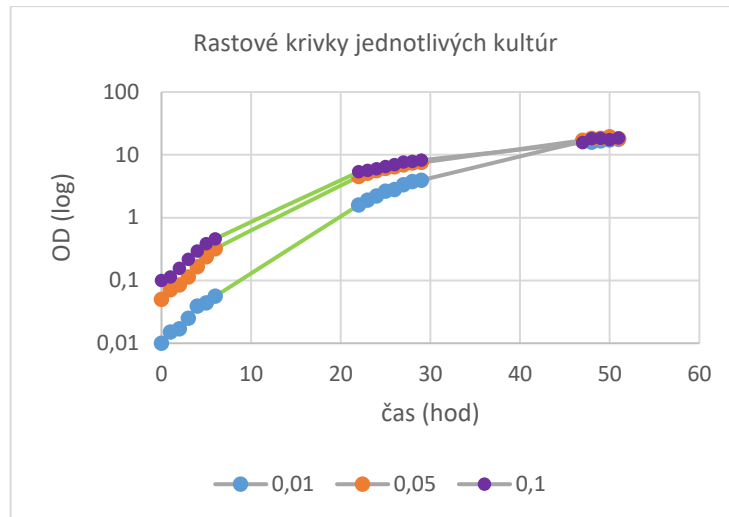
Obrázok 37 zobrazuje intenzity fluorescenčného signálu v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 na začiatku kultivácie po 4 hodinách (obr. 37A) a na jej konci po 50 hodinách (obr. 37B).

### 5.2.3.2. Kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom GM médiu

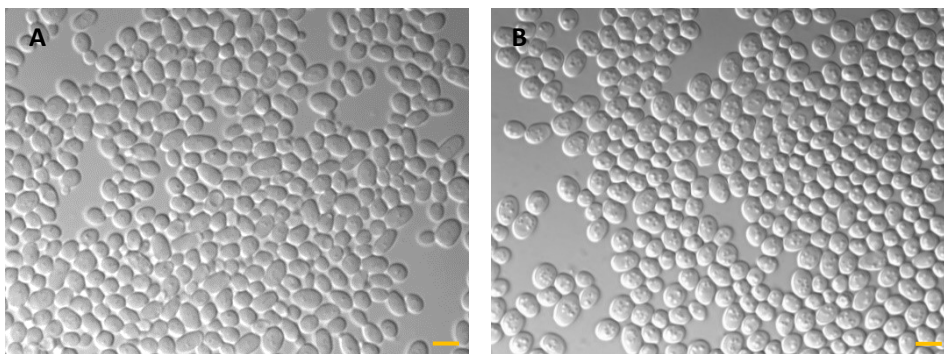
Čas (hod)	5	22	24	26	28	47	51
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,01	nefotené						
OD <sub>0,01</sub>	0,044	1,59	2,2	2,8	3,73	16,3	17,7
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,05							
OD <sub>0,05</sub>	0,237	4,5	5,56	6,4	7,37	17,05	18,15
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,1							
OD <sub>0,1</sub>	0,384	5,34	6,01	6,99	7,89	15,7	18,4

**Obr. 38:** Fluorescencia kmeňa BY-Imd2p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 μm. Jas snímok bol upravený.

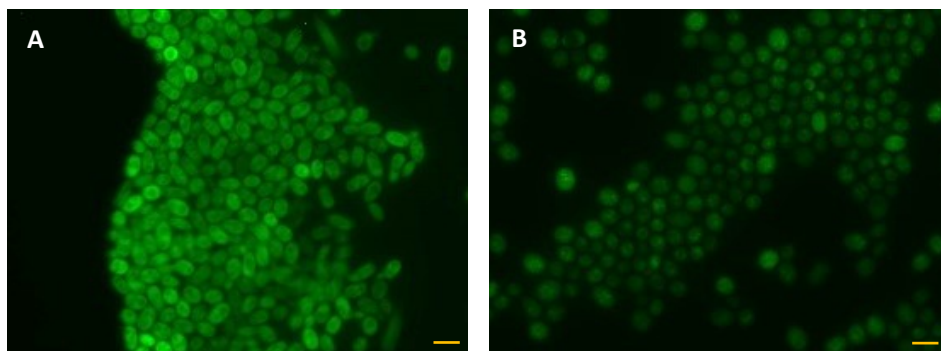




**Graf 6:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Imd2p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 39:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Imd2p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 40:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Imd2p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,05$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 5 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 51 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas snímok bol upravený.

Obrázok 38 zobrazuje zmeny v expresii génu *IMD2* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatočnou optickou denzitou (0,01, 0,05, 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Imd2 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustenej forme v cytoplazme.

Intenzita fluorescenčného signálu bola najvýraznejšia v 1. deň pozorovania u kultivácií zaočkovaných na optickú denzitu 0,01 a 0,05. V priebehu 2. dňa bola intenzita slabšia, ale viac-menej konštatná u všetkých 3 kultivácií. V 3. deň pozorovania bola intenzita GFP fluorescence najslabšia, výraznejší signál vykazovalo len menej individuálnych buniek.

Graf 6 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovaní v 1. deň v lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou, v 2. deň bol viditeľný prechod z exponenciálnej fázy do stacionárnej fázy, v 3. deň sa všetky tri kultivácie dostali do stacionárnej fázy a ich optické denzity boli na jednej úrovni s len minimálnymi rozdielmi.

Obrázok 39A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Imd2p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch s maximálne 2 jazvami po pučaní, líšia sa medzi sebou svojou veľkosťou a sú pozorovateľné aj deliace sa bunky.

Obrázok 39B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Imd2p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky sú približne rovnako veľké, majú väčší počet jaziev po pučaní a nie sú pozorované deliace sa bunky.

Obrázok 40 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 na začiatku kultivácie po 5 hodinách (obr. 40A) a na jej konci po 51 hodinách (obr. 40B).

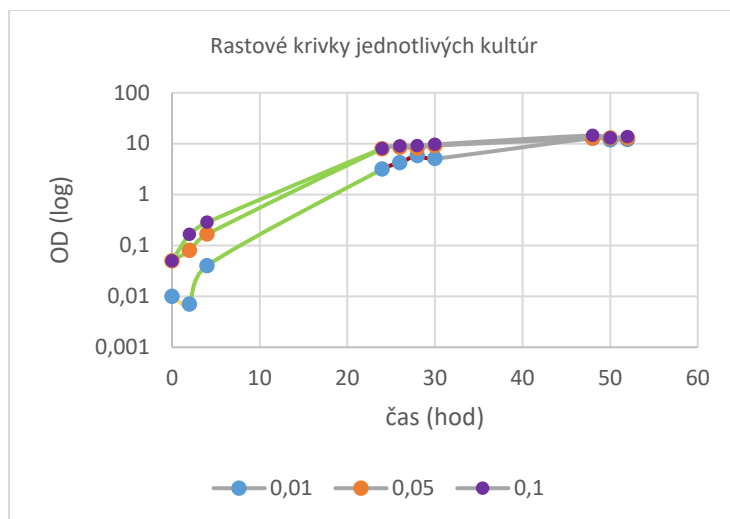
#### **5.2.4. BY-Sah1p-GFP**

Proteín Sah1p by mal byť s najväčšou pravdepodobnosťou lokalizovaný v cytoplazme, podľa jeho funkcie v lipidových metabolizmoch a hromadení lipidov je tiež možná jeho lokalizácia v lipidových telieskach. Najvyššia expresia by mala nastať počas aktívneho rastu populácie a delenia buniek, následne bolo očakávané znižovanie expresie. (Pitarch a kol., 2004; Tehlivets a kol., 2004, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Tieto dáta pochádzajú z experimentov s glukózou ako zdrojom uhlíka.

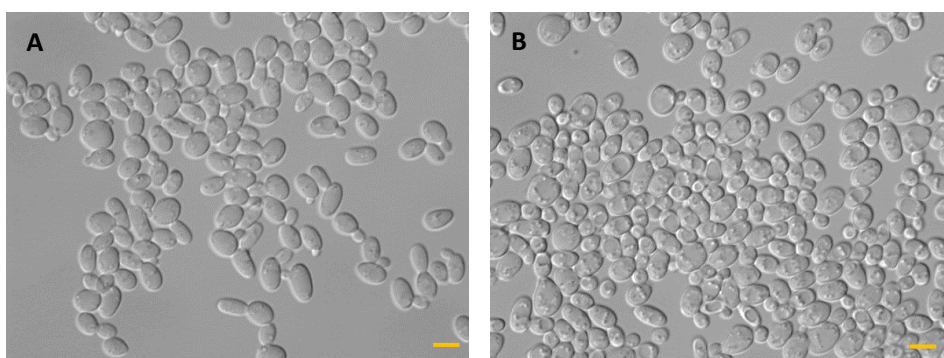
### 5.2.4.1. Kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	4	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,04	3,16	4,22	5,84	5,08	12,85	11,92
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,166	7,02	8,48	8,22	9,18	12,75	13,06
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,284	8,04	9,08	9,16	9,68	14,55	12,92

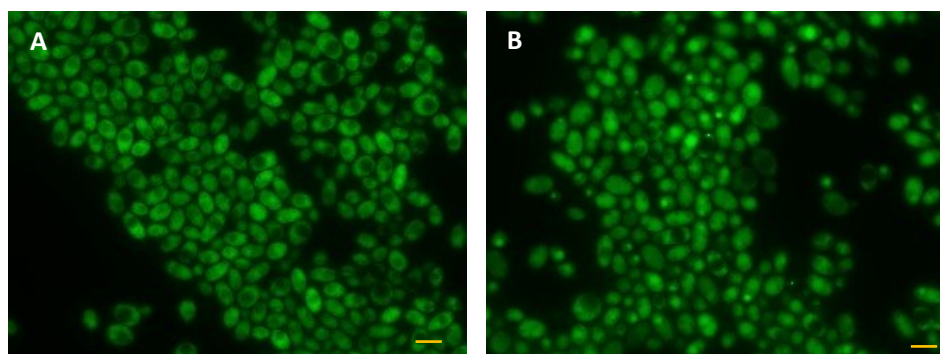
**Obr. 41:** Fluorescencia kmeňa BY-Sah1p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozičii 500 ms a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 7:** Logaritmické vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Sah1p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, červená krivka – diauxický a postdiauxický posun, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 42:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 43:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Sah1p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 4 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas snímok bol upravený.

Obrázok 41 zobrazuje zmeny v expresii génu *SAHI* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatčnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescencie vznikli pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x.

Proteín Sah1 bol počas celého rastu lokalizovaný v cytoplazme v rozpustnej forme. U starších buniek je pozorovateľné zvýšenie koncentrácie zdanlivo na jednom z pólov bunky.

Intenzita fluorescenčného signálu bola vysoká počas celého pozorovania, k miernemu zvýšeniu dochádza zdanlivo u starších buniek približne po 30 hodinách kultivácie.

Graf 7 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň kultivácie bol viditeľný prechod z exponenciálnej fázy do skorej stacionárnej fázy. V 3. deň kultivácie boli všetky 3 kultúry v neskorej stacionárnej fáze a ich optické denzity sa vyrovnali s minimálnymi rozdielmi.

Obrázok 42A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Sah1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň pozorovania v kultúre zaočkovanej na počiatčnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní a sú pozorovateľné práve sa deliace bunky.

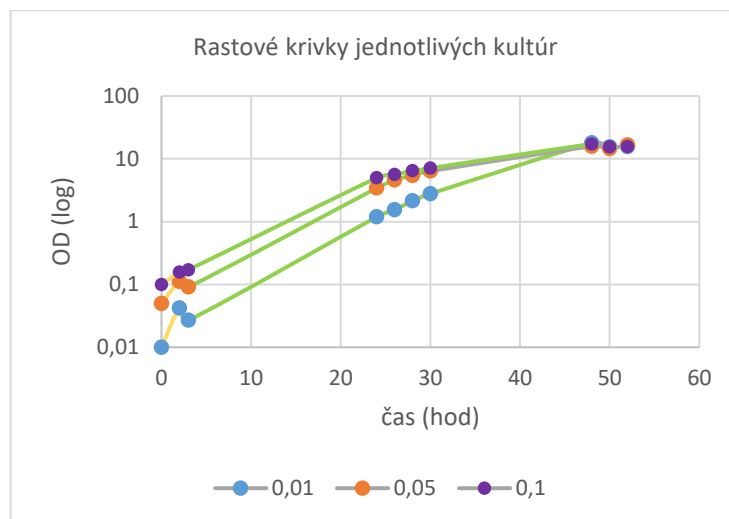
Obrázok 42B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Sah1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň pozorovania v kultúre zaočkovanej na počiatčnú OD = 0,01. Tieto bunky sa medzi sebou líšia vo veľkosti, majú viacero jaziev po pučaní a sú tiež pozorovateľné bunky s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 43 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 na začiatku kultivácie po 4 hodinách (obr. 43A) a na jej konci po 50 hodinách (obr. 43B).

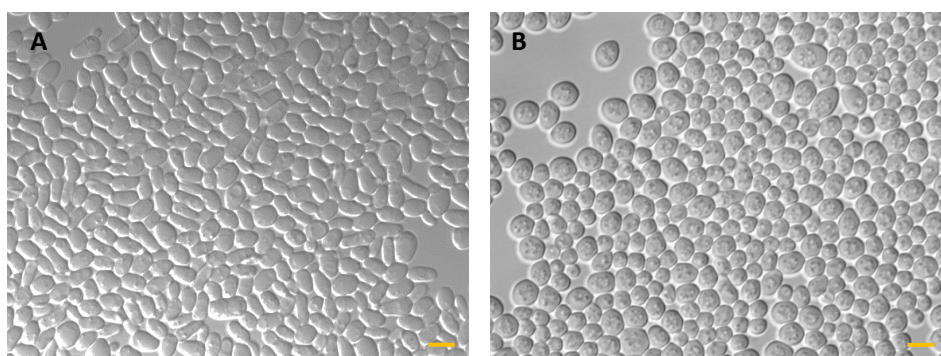
### 5.2.4.2. Kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	3	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,027	1,19	1,55	2,14	2,78	17,9	15,55
Kultúra s $OD_0 = 0,05$	nefotené						
$OD_{0,05}$	0,091	3,42	4,62	5,41	6,37	15,8	14,6
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,171	4,97	5,62	6,44	7,1	17,1	15,45

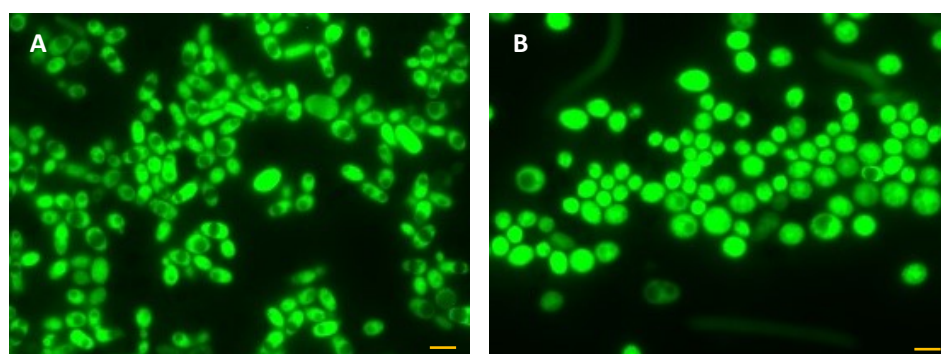
**Obr. 44:** Fluorescencia kmeňa BY-Sah1p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozičii 3s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Žltá – lag fáza, zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 8:** Logaritmicke vyobrazenie nameraných optických denzít kultúr BY-Sah1p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Žltá krivka – lag fáza, zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 45:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Sah1p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 46:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Sah1p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 3 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 44 zobrazuje zmeny v expresii génu *SAH1* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Sah1 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme, pri nižšej intenzite je v individuálnych bunkách možné vidieť jeho hromadenie na jednom z pólov bunky.

Intenzita GFP fluorescence bola výrazný počas celého rastu kultúr, zdanlivo najvýraznejšia bola počas 2. dňa kultivácie najmä u kultúr zaočkovaných na počiatocnú OD = 0,05 a OD = 0,1. Slabšia intenzita je pozorovaná u starších buniek s 1 veľkou vakuolou, kde je v individuálnych prípadoch pozorované aj hromadenie proteínu Sah1 na jednom z pólov týchto buniek.

Graf 8 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v lag fáze nasledovanej pomalým prechodom do exponenciálnej fázy rastu. V 2. deň kultivácie bol viditeľný prechod medzi exponenciálnou fázou a stacionárnou fázou. V 3. deň boli všetky kultivácie v stacionárnej fáze, pričom aj ich optické denzity sa vyrovnali a boli medzi nimi len minimálne rozdiely.

Obrázok 45A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Sah1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní a prevažne pretiahnutý tvar.

Obrázok 45B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Sah1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú okrúhly tvar, viacero jaziev po pučaní a konštantnú veľkosť.

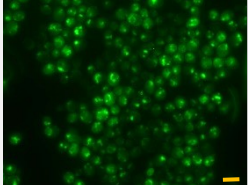
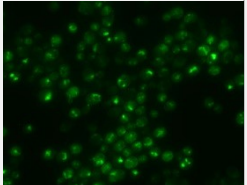
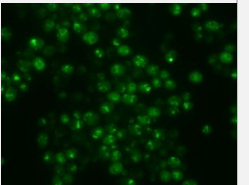
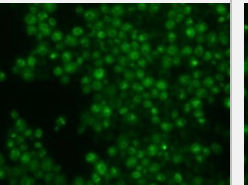
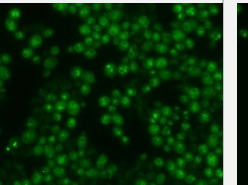
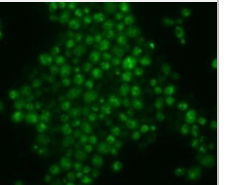
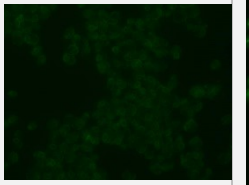
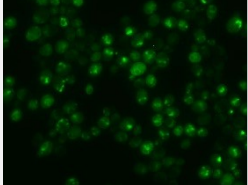
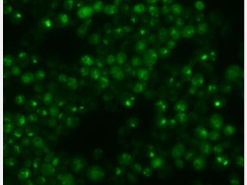
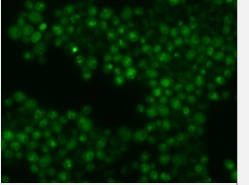
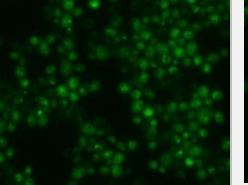
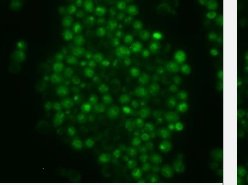
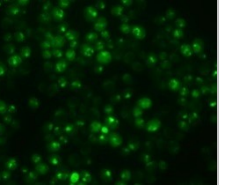
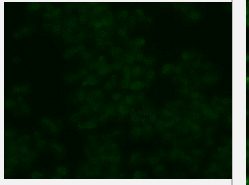
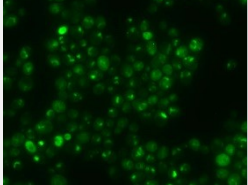
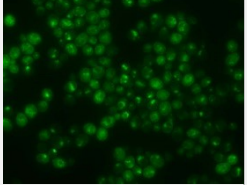
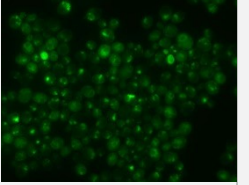
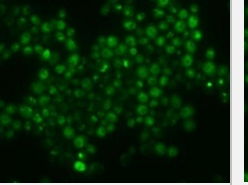
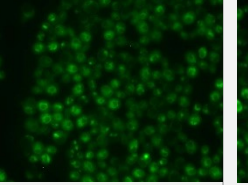
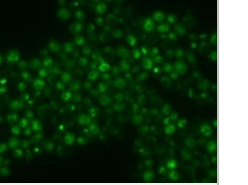
Obrázok 46 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 na začiatku kultivácie po 3 hodinách (obr. 46A) a na jej konci po 50 hodinách (obr. 46B).

### 5.2.5. BY-Eht1p-GFP

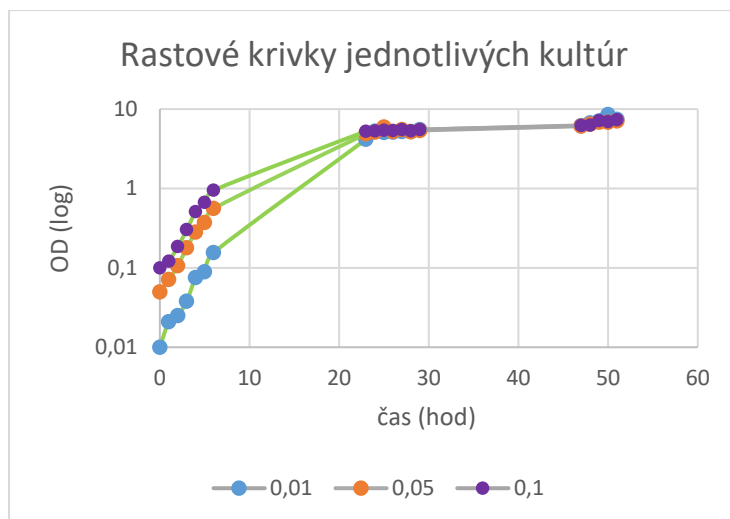
Pre kmeň BY-Eht1p-GFP bola očakávaná organelová lokalizácia. Literatúra uvádza niekoľko možností – mitochondrie, endoplazmatické retikulum, ale aj lipidové kvapôčky. Gén *EHT1* by mal byť exprimovaný v diauxickom posune a na začiatku stacionárnej fázy. Očakávaná teda bola primárne lokalizácia v endoplazmatickom retikule a expresia zvyšujúca sa s časom (Athenstaedt a kol., 1999; Sickmann a kol., 2003; Zhu a kol., 2019, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).



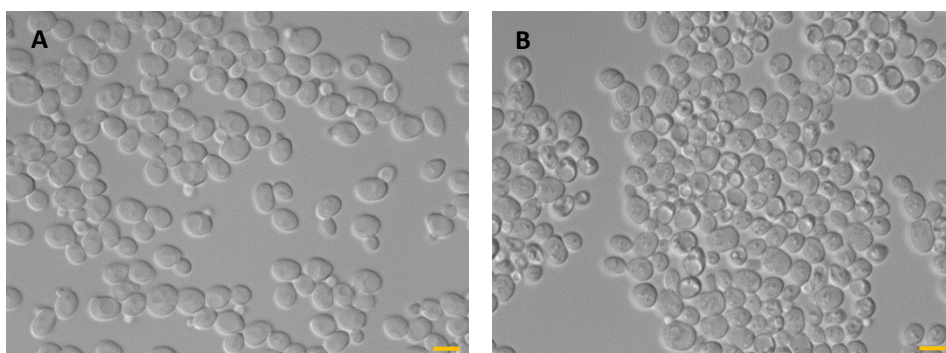
### 5.2.5.1. Kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	5	25	27	29	47	49	51
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,01	nefotené						
OD <sub>0,01</sub>	0,075	5,08	5,24	5,5	6,18	7,1	7,4
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,05							
OD <sub>0,05</sub>	0,371	5,95	5,52	5,38	6,1	6,84	7,12
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,1							
OD <sub>0,1</sub>	0,669	5,42	5,51	5,51	6,22	7,14	7,34

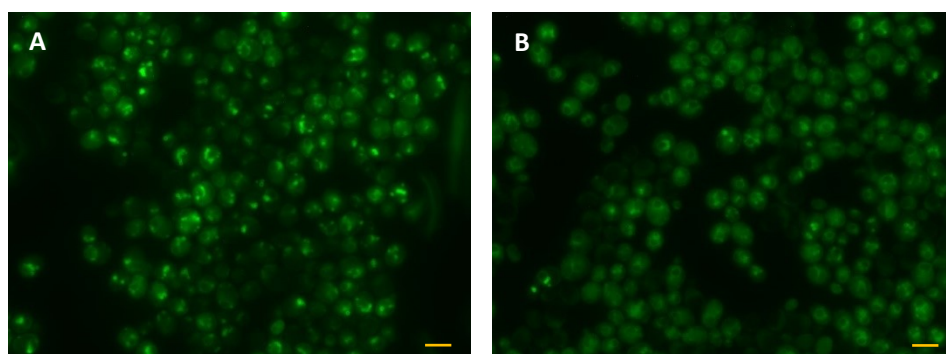
**Obr. 47:** Fluorescencia kmeňa BY-Eht1p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas snímok bol upravený.



**Graf 9:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Eht1p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 48:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Obr. 49:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Eht1p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 25 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 51 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 47 zobrazuje zmeny v expresii génu *EHT1* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Eht1 bol počas celého rastu lokalizovaný primárne v okolí jadra, v endoplazmatickom retikule, boli však viditeľné väčšie rozdiely v jeho lokalizácii medzi jednotlivými bunkami. Signál bol pozorovateľný v cytoplazme, s vyššou intenzitou bol u niekoľkých buniek tvoril zhluky nachádzajúce sa v cytoplazme.

Intenzita fluorescenčného signálu bola v 1. deň rastu kultúry veľmi nízka, až nulová. So zvyšujúcou sa hustotou kultúry a s časom bol pozorovateľný jasný nárast fluorescenčného signálu, ktorý sa od 2. dňa kultivácie výraznejšie nemenil a dochádzalo len k vzniku rozdielov medzi jednotlivými bunkami.

Graf 9 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v krátkej lag fáze s rýchlym nárastom hustoty buniek v nasledujúcej exponenciálnej fáze. V 2. deň sa optická denzita všetkých 3 kultivácií vyrovnala a bunky sa nachádzali v skorej stacionárnej fáze. V 3. deň bol nárast bunkovej hustoty len minimálny a bunky sa nachádzali v neskorej stacionárnej fáze.

Obrázok 48A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Eht1p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní a viditeľné sú aj práve sa deliace bunky s výraznými pupeňmi. U niektorých buniek je pozorovateľný aj vznik 1 veľkej vakuoly.

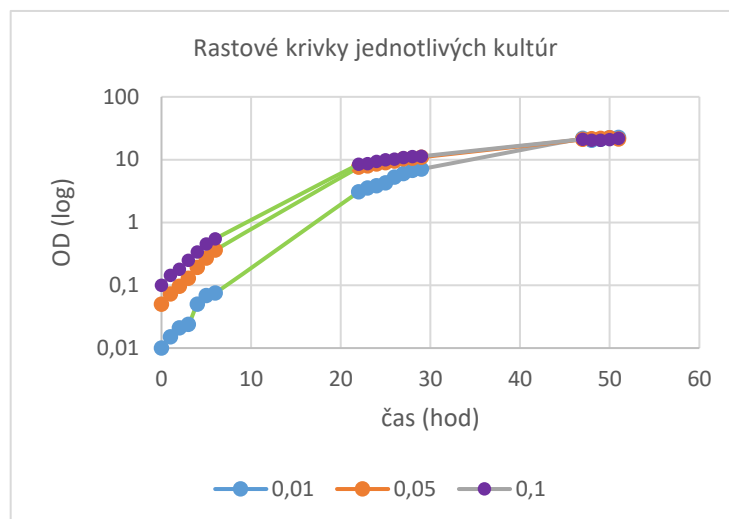
Obrázok 48B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Eht1p-GFP odfočené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky sa medzi sebou líšia vo veľkosti, majú viacero jaziev po pučaní a sú tiež pozorovateľné bunky s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 49 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Eht1p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,01 po 25 hodinách kultivácie (obr. 49A) a po 51 hodinách (obr. 49B).

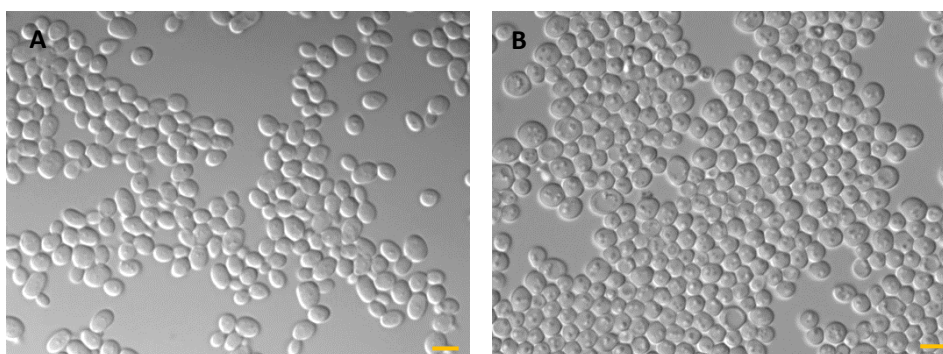
### 5.2.5.2. Kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	5	24	26	28	47	49	51
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené						
$OD_{0,01}$	0,069	3,07	3,85	5,26	21,7	21,1	22,75
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	0,271	7,52	8,51	9,52	21	21,9	21,35
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,455	8,43	9,37	10,24	21,2	20,45	21,95

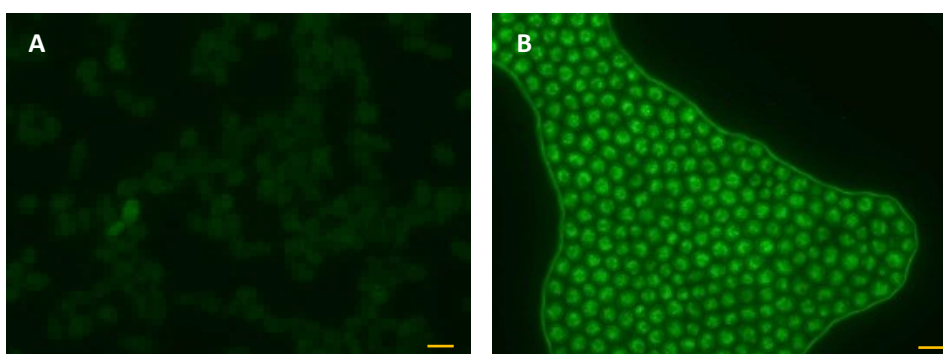
**Obr. 50:** Fluorescencia kmeňa BY-Eht1p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ .



**Graf 10:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Eht1p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 51:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Eht1p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 52:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Eht1p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 5 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 51 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 50 zobrazuje zmeny v expresii génu *EHT1* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatočnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Eht1 bol počas celého rastu lokalizovaný primárne v okolí jadra, v endoplazmatickom retikule. Slabší signál bol však pozorovateľný aj v cytoplazme.

Intenzita fluorescenčného signálu bola v prvých fázach rastu kultúry veľmi nízka, bunky boli takmer bez signálu. So zvyšujúcou sa hustotou kultúry a s časom bol pozorovateľný jasný nárast fluorescenčného signálu, pričom maximum v nastavenom experimente dosiahol v 3. deň kultivácie, kedy došlo k ustáleniu množstva buniek v kultúre.

Graf 10 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň prechádzali bunky z exponenciálnej fázy do stacionárnej fázy, pričom v kultúrach s  $OD = 0,05$  a  $OD = 0,1$  došlo k vyrovnaniu hustoty buniek. Počas 3. dňa sa hustota všetkých troch kultúr vyrovnala, pričom medzi nimi boli len minimálne rozdiely a všetky 3 kultúry sa dostali do stacionárnej fázy rastu.

Obrázok 51A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Eht1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú  $OD = 0,01$ . Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní a viditeľné sú aj práve sa deliace bunky so vznikajúcimi dcérskymi pupeňmi.

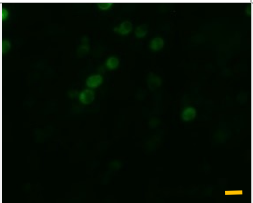
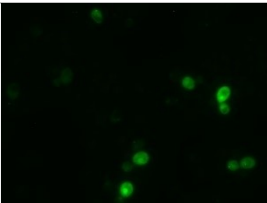
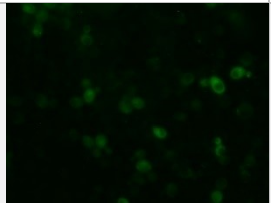
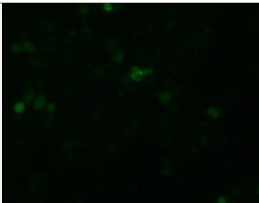
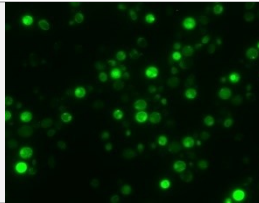
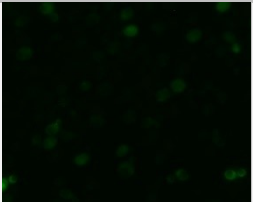
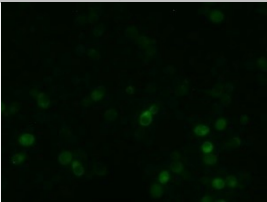
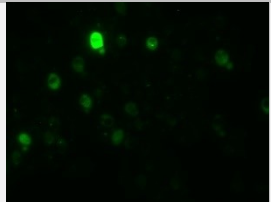
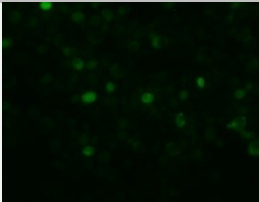
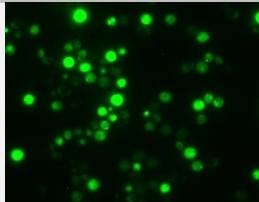
Obrázok 51B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Eht1p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú  $OD = 0,01$ . Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, konštantnú veľkosť, oválny tvar a objavujú sa aj bunky s jednou veľkou vakuolou.

Obrázok 52 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Eht1p v kultivácii zaočkovanej na  $OD = 0,1$  po 5 hodinách kultivácie (obr. 52A) a po 51 hodinách (obr. 52B).

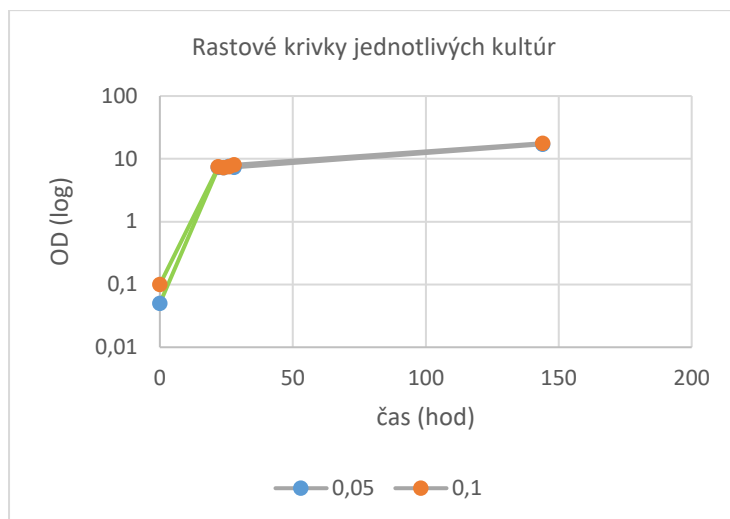
### **5.2.6. BY-Ssa3p-GFP**

Ssa3p patrí k stresovým proteínom, u ktorého bola predpokladaná nízka expresia v neskorej stacionárnej fáze. Tento proteín by mal byť lokalizovaný v cytoplazme (Fuge a kol., 1994; Werner-Washburne a kol., 1987, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

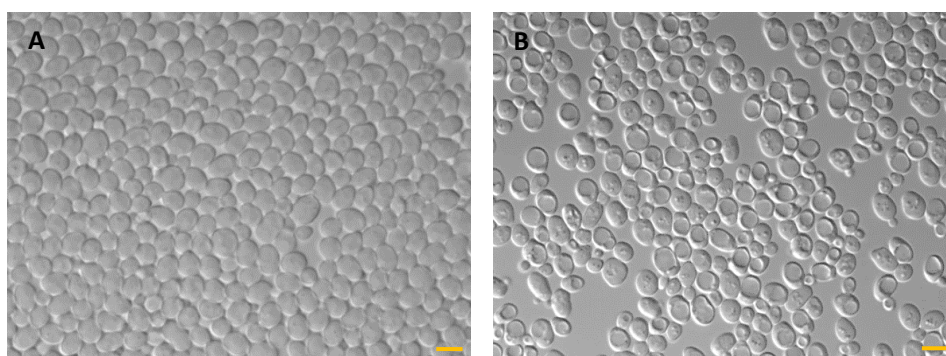
### 5.2.6.1. Kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	24	26	28	48	240 (6.deň)
Kultúr a s $OD_0 = 0,05$					
$OD_{0,05}$	7,25	7,24	7,59	7,31	17,05
Kultúr a s $OD_0 = 0,1$					
$OD_{0,1}$	7,45	7,23	7,51	8,08	17,75

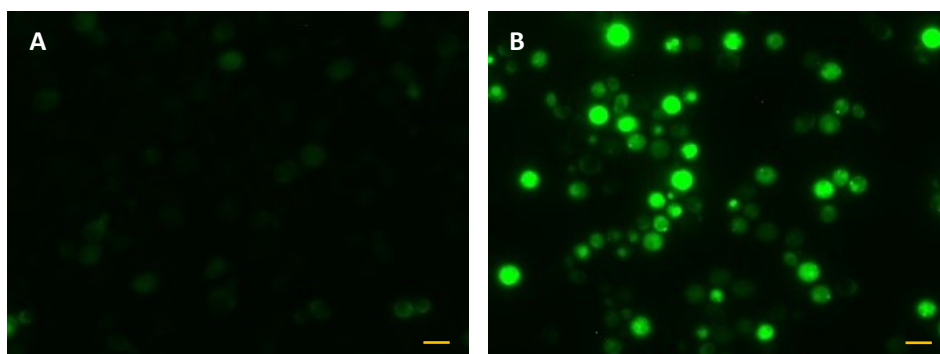
**Obr. 53:** Fluorescencia kmeňa BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Kultúra zaočkovaná na optickú densitu 0,01 nevykazovala počas meraní žiadnu fluorescenciu ani v opakovaných meraniach, preto údaje nie sú uvedené. Sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ .



**Graf 11:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzit kultúr BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 54:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Obr. 55:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Ssa3p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 24 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 240 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



Obrázok 53 zobrazuje zmeny v expresii génu *Ssa3* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 48 hodín s dodatočným pozorovaním v 6. deň od začiatku pozorovania v 2 kultiváciách s odlišnou počiatočnou OD (0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescencie vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Ssa3 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme.

GFP fluorescenčný signál bol počas prvého dňa pozorovania prakticky nulový. Pozorovateľný signál sa začal objavovať až počas 2. dňa kultivácie pri prechode z exponenciálnej do stacionárnej fázy rastu, avšak len s veľmi slabou intenzitou a v niekoľkých individuálnych bunkách. Signál sa objavoval postupne len v niekoľkých individuálnych bunkách a v žiadnej fáze nebol pozorovateľný rovnomerne v celej kultúre. Pozorovanie kultúry prebiehalo poslednýkrát s odstupom 2 dní (v 6. deň kultivácie) a signál počas neho vykazovalo najväčšie množstvo buniek. Zároveň bol v tomto čase signál najvýraznejší.

Graf 11 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovanie prakticky neprebiehало, počas 2. dňa sa optická denzita jednotlivých kultúr vyrovnala, bunky sa dostali do skorej stacionárnej fázy. V 3. deň pozorovania boli bunky v neskorej stacionárnej fáze a k nárastu biomasy dochádzalo len minimálne. Hodnoty namerané v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01 nie sú uvedené, pretože kultúra počas svojho rastu nevykazovala prakticky žiadny fluorescenčný signál.

Obrázok 54A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Ssa3p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, bunky majú medzi sebou minimálne rozdiely vo veľkosti, avšak sú viditeľné aj malé dcérske bunky.

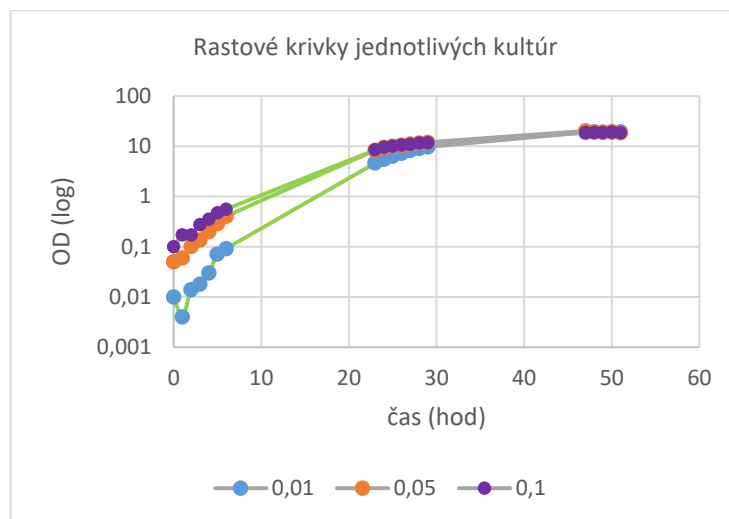
Obrázok 54B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Ssa3p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza medzi nimi k aktívnemu deleniu, líšia sa vo veľkosti a viditeľné je väčšie množstvo buniek s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 55 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Ssa3p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 po 24 hodinách kultivácie (obr. 55A) a po 240 hodinách (obr. 55B).

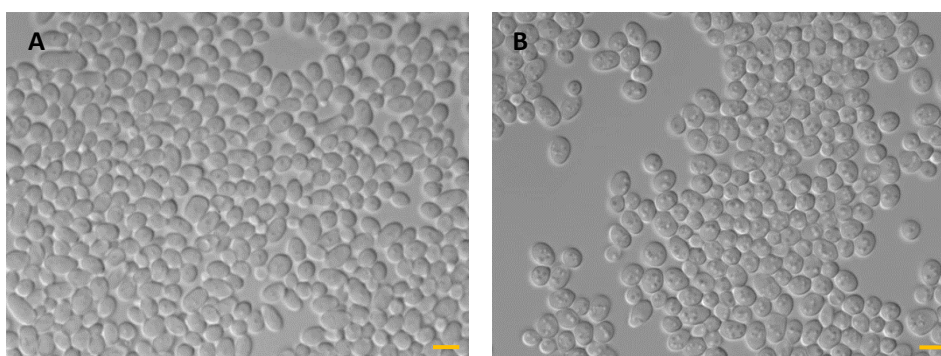
### 5.2.6.1. Kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	23	25	27	29	47	49	51
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené	nefotené					
$OD_{0,01}$	4,61	6,38	8,25	9,73	18,88	18,78	19,32
Kultúra s $OD_0 = 0,05$							
$OD_{0,05}$	8,28	10,07	11,18	11,97	20,2	19,02	18,66
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	8,42	10,06	11,01	11,77	18,72	18,9	18,54

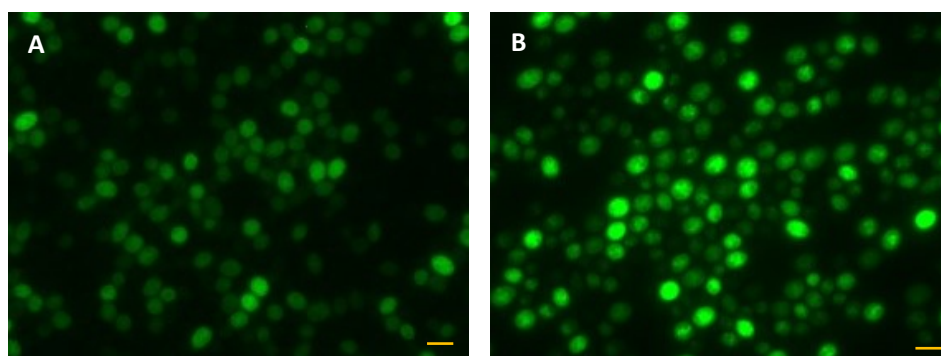
**Obr. 56:** Fluorescencia kmeňa BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli slabému signálu fluorescence. Červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ .



**Graf 12:** Logaritmické vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 57:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Ssa3p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 58:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Ssa3p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 23 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 51 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 56 zobrazuje zmeny v expresii génu *SSA3* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatkovou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Ssa3 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme.

GFP fluorescenčný signál bol počas prvého dňa pozorovania prakticky nulový. Pozorovateľný signál sa začal objavovať až počas 2. dňa kultivácie pri prechode z exponenciálnej do stacionárnej fázy rastu. Signál sa objavoval postupne v individuálnych bunkách a v žiadnej fáze nebol pozorovateľný rovnomerne v celej kultúre.

Graf 12 znázorňuje logaritmicke vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. Podľa tohto vynesenia boli jednotlivé kultúry počas pozorovania v 1. deň v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň sa optická denzita všetkých 3 kultivácií vyrovnala, pričom boli medzi jednotlivými kultiváciami pozorovateľné len malé rozdiely v optickej denzite a kultúry prechádzali z exponenciálnej do stacionárnej fázy. V 3. deň sa delenie buniek prakticky zastavilo a kultúry sa nachádzali v stacionárnej fáze rastu.

Obrázok 57A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Ssa3p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní a viditeľné sú aj práve sa deliace bunky.

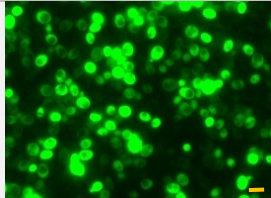
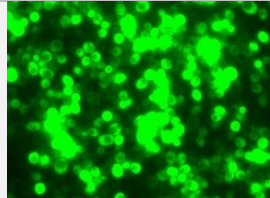
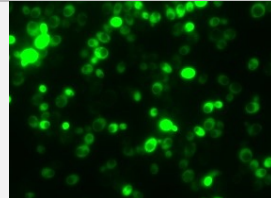
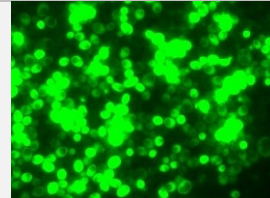
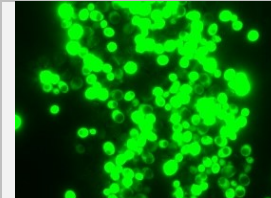
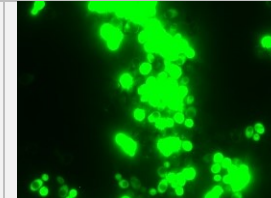
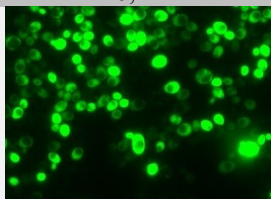
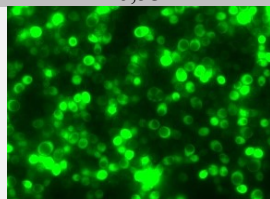
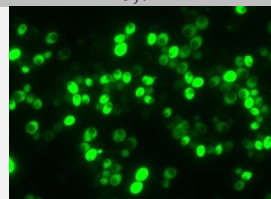
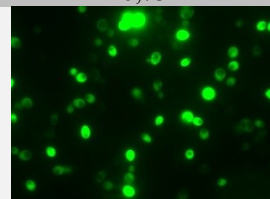
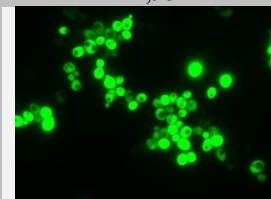
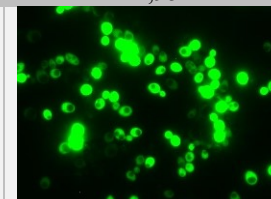
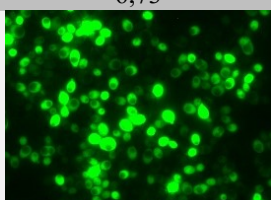
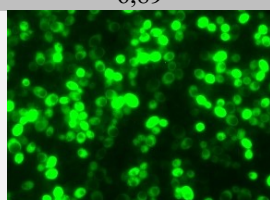
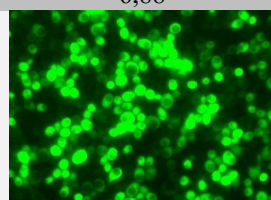
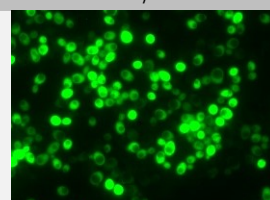
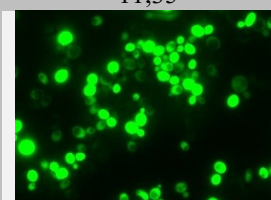
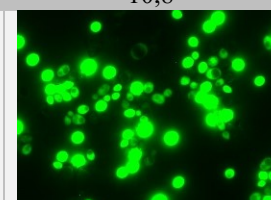
Obrázok 57B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Ssa3p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatkovú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza medzi nimi k aktívnemu deleniu a veľkostne sa od seba výrazne nelíšia.

Obrázok 58 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Ssa3p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 po 23 hodinách kultivácie (obr. 58A) a po 51 hodinách (obr. 58B).

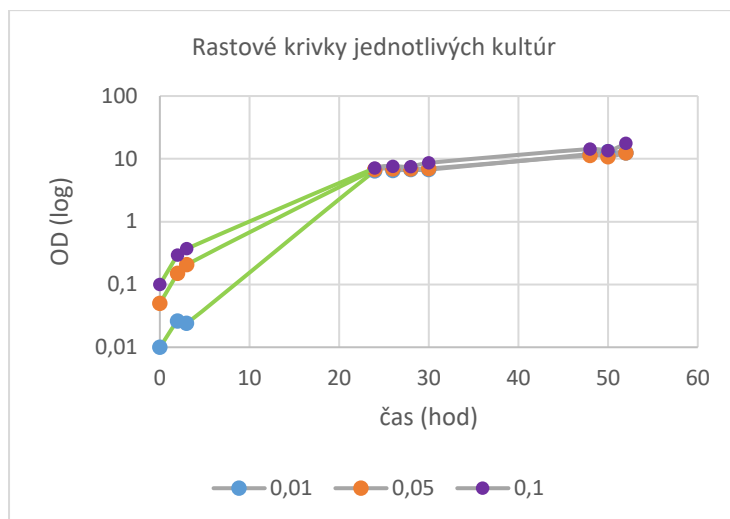
### **5.2.7. BY-Hsp12p-GFP**

Gén *HSP12* by mal byť lokalizovaný v cytoplazme, avšak možná je aj jeho relokalizácia do vakuol či endozómov. Zvýšená expresia bola očakávaná počas stacionárnej fázy (Praekelt a Meacock, 1990; Garay-Arroyo a kol., 2000; Welker a kol., 2010, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

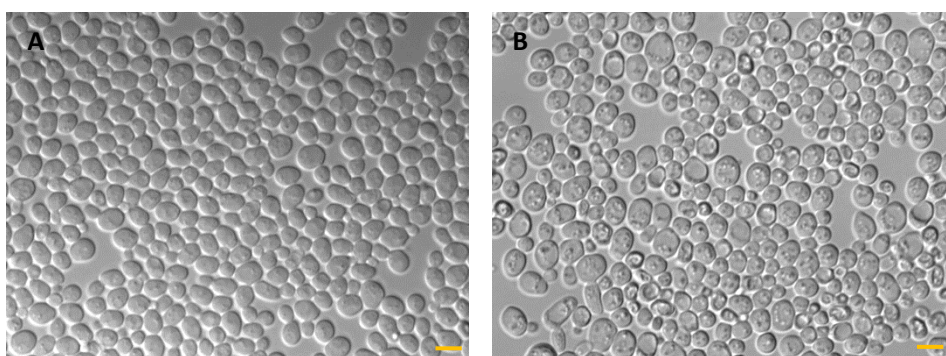
### 5.2.7.1. Kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$						
$OD_{0,01}$	6,42	6,53	6,71	6,73	11,95	12,95
Kultúra s $OD_0 = 0,05$						
$OD_{0,05}$	6,73	6,89	6,88	7	11,35	10,8
Kultúra s $OD_0 = 0,1$						
$OD_{0,1}$	7,12	7,61	7,48	8,62	14,35	13,45

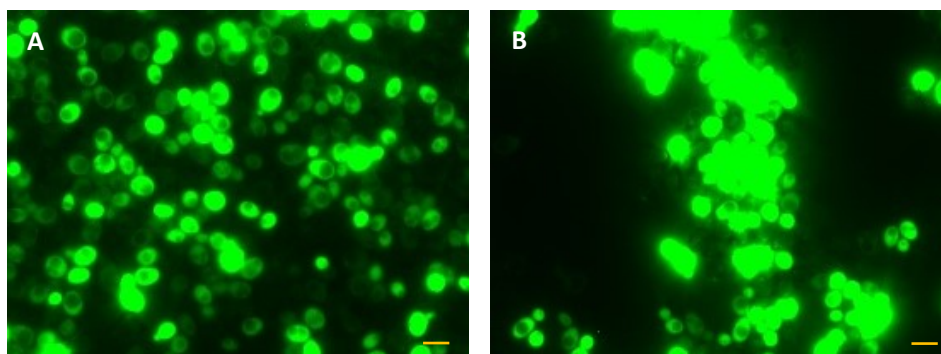
**Obr. 59:** Fluorescencia kmeňa BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 13:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 60:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfované v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 61:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp12p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 24 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 59 zobrazuje zmeny v expresii génu *HSP12* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatočnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Hsp12 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme.

Intenzita GFP fluorescenčného signálu bola počas celého pozorovania veľmi vysoká, so zvyšujúcou sa optickou denzitou sa zvyšovala v individuálnych bunkách, nerovnomerne v celej bunkovej kultúre. Bunky s najvyššou intenzitou fluorescence začali byť pozorovateľné počas 3. dňa pozorovaní, kedy sa bunky dostali do stacionárnej fázy.

Graf 13 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovania boli jednotlivé kultúry v krátkej lag fáze rastu, nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň sa optické denzity všetkých 3 kultúr vyrovnali a bunky sa nachádzali v skorej stacionárnej fáze. V 3. deň sa optické denzity všetkých kultúr zvyšovali len minimálne a bunky sa nachádzali v neskej stacionárnej fáze rastu.

Obrázok 60A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp12p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, bunky majú medzi sebou minimálne rozdiely vo veľkosti, sú pozorovateľné aj menšie dcérske bunky a niekoľko deliacich sa buniek.

Obrázok 60B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp12p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatočnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza u nich k aktívnemu deleniu, viditeľné sú rozdiely vo veľkosti buniek a väčšie množstvo buniek s 1 veľkou vakuolou.

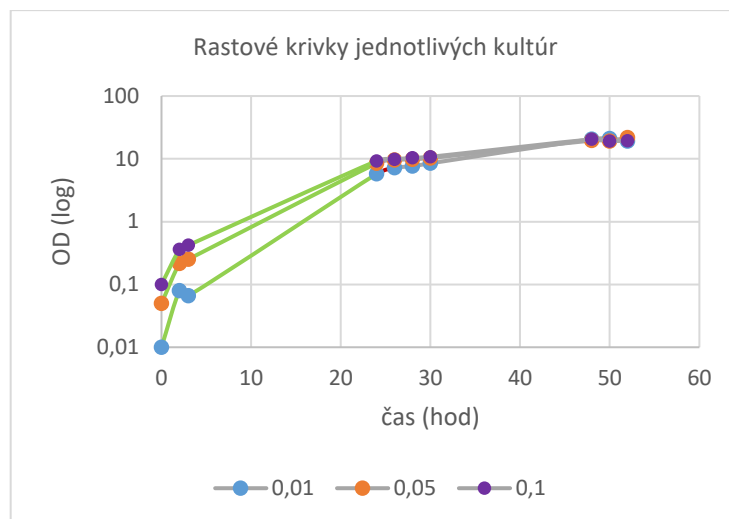
Obrázok 61 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp12p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,01 po 24 hodinách kultivácie (obr. 61A) a po 51 hodinách (obr. 61B).

### 5.2.7.2. Kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom GM médiu

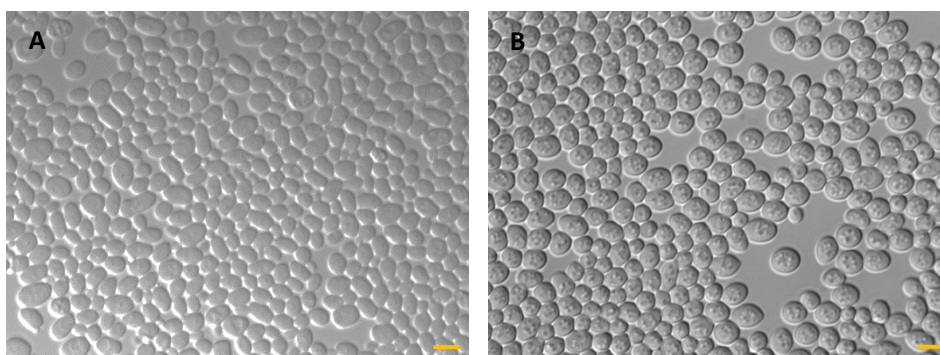
Čas (hod)	3	24	26	28	30	48	50
Kultúra s $OD_0 = 0,01$	nefotené	nefotené					
$OD_{0,01}$	0,066	5,77	7,2	7,63	8,49	20,65	21,1
Kultúra s $OD_0 = 0,05$	nefotené						
$OD_{0,05}$	0,252	8,49	9,53	9,87	10,28	19,55	19,2
Kultúra s $OD_0 = 0,1$							
$OD_{0,1}$	0,421	9,25	9,84	10,37	10,78	20,45	19,25

**Obr. 62:** Fluorescencia kmeňa BY-Hsp12p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1 000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Zelená – exponenciálna fáza, červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

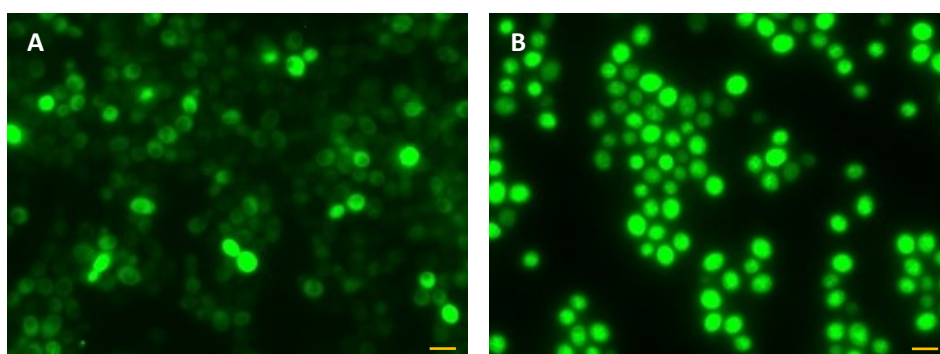




**Graf 14:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Hsp12p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 63:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Hsp12p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 64:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp12p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 3 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 62 zobrazuje zmeny v expresii génu *HSP12* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 51 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Hsp12 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme.

Intenzita GFP fluorescenčného signálu bola počas celého pozorovania veľmi vysoká, so zvyšujúcou sa optickou denzitou sa zvyšovala v individuálnych bunkách, nerovnomerne v celej bunkovej kultúre. Bunky s najvyššou intenzitou fluorescence začali byť pozorovateľné v priebehu 2. dňa u kultúr zaočkovaných na OD = 0,05 a OD = 0,01 pri prechode do stacionárnej fázy a v 3. deň pozorovania u všetkých 3 kultúr.

Graf 14 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovania boli jednotlivé kultúry v lag fáze rastu, nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň bol viditeľný prechod z exponenciálnej fázy do stacionárnej fázy rastu. V 3. deň sa optické denzity všetkých 3 kultúr vyrovnali, k zvýšeniu hustoty populácií dochádzalo len minimálne a všetky 3 kultúry boli v stacionárnej fáze rastu.

Obrázok 63A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp12p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, bunky majú medzi sebou minimálne rozdiely vo veľkosti, avšak sú viditeľné aj malé dcérske bunky.

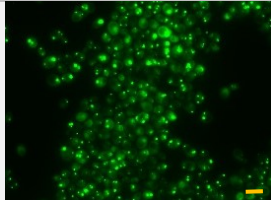
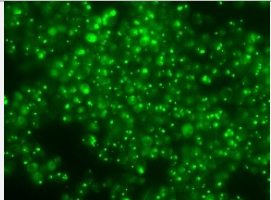
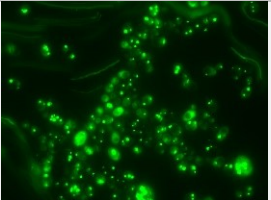
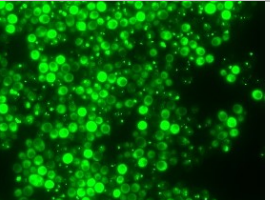
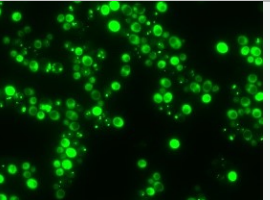
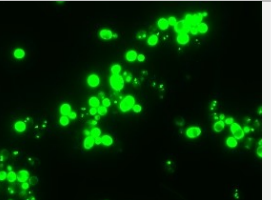
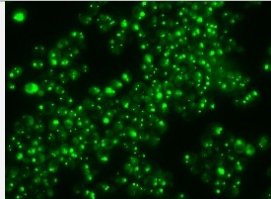
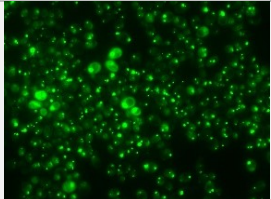
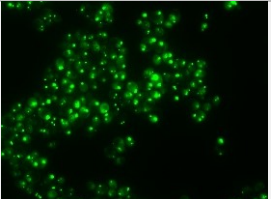
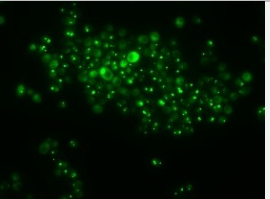
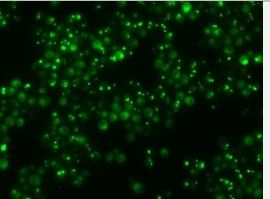
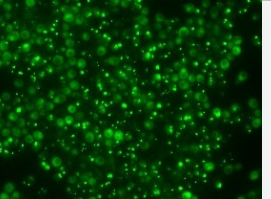
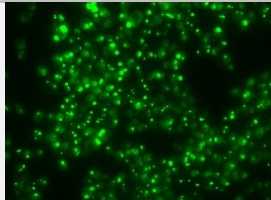
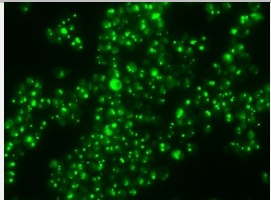
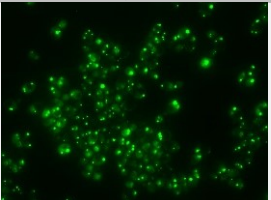
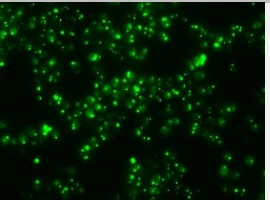
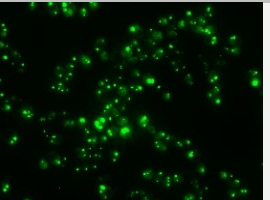
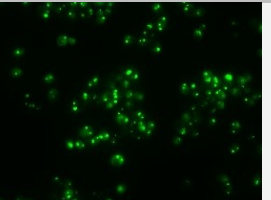
Obrázok 63B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp12p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza u nich k aktívnemu deleniu a majú minimálne rozdiely vo veľkosti.

Obrázok 64 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp12p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,01 po 3 hodinách kultivácie (obr. 64A) a po 50 hodinách (obr. 64B).

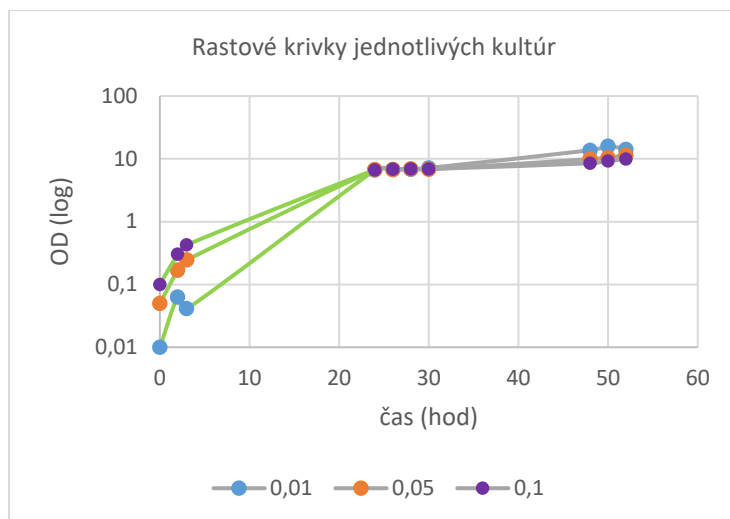
### **5.2.8. BY-Hsp104p-GFP**

Hsp104p je stresový proteín, u ktorého bola predpokladaná expresia najmä v čase stacionárnej fázy. Lokalizácia proteínu by mala byť pozorovateľná v cytoplazme v rozpustnej forme alebo v interakcii s agregovanými proteínmi. Vysoká koncentrácia Hsp104p bola očakávaná v respiračnom GM médiu (Sanchez a kol., 1992; Glover a Lindquist, 1998, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

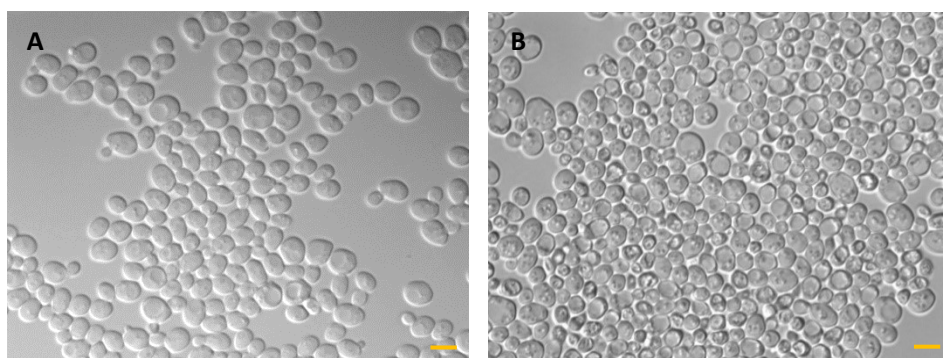
### 5.2.8.1. Kultúry BY-Hsp104p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	24	26	30	48	50	52
Kultúra s $OD_0 = 0,01$						
$OD_{0,01}$	6,61	6,72	7,17	13,7	15,9	14,2
Kultúra s $OD_0 = 0,05$						
$OD_{0,05}$	6,72	6,76	6,81	9,9	10,45	11,45
Kultúra s $OD_0 = 0,1$						
$OD_{0,1}$	6,66	6,78	6,89	8,75	9,25	9,95

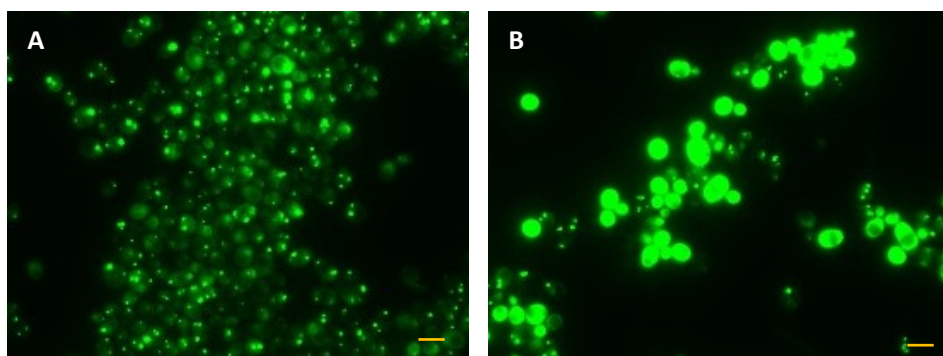
**Ob. 65:** Fluorescencia kmeňa BY-Hsp104p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



**Graf 15:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Hsp12p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 66:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Hsp104p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 67:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp104p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 24 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 52 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 65 zobrazuje zmeny v expresii génu *HSP104* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 52 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescencie vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Hsp104 tvoril takmer počas celého rastu kultúr zhluky s rôznou veľkosťou a s rôznou lokalizáciou v rámci cytoplazmy, u niektorých buniek sa zdá byť lokalizovaný v bunkovom jadre alebo vakuole.

Intenzita GFP fluorescenčného signálu bola počas celého pozorovania vysoká, so zvyšujúcou sa optickou denzitou sa zvyšovala v individuálnych bunkách, zo začiatku nerovnomerne v individuálnych bunkách až do vyrovnania intenzity fluorescenčného signálu v celej kultúre. Počas 1. dňa bola intenzita fluorescenčného signálu zanedbateľná (dáta nie sú uvedené). Od 2. dňa pozorovania sa intenzita javila rovnomerná vo všetkých bunkách aj so zvyšujúcou sa hodnotou. V kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01, ktorá dosiahla najvyššie optické denzity dochádzalo pri vyšších optických denzitách k rozpúšťaniu proteínových zhlukov rovnomerne po celej cytoplazme.

Graf 15 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovania boli jednotlivé kultúry v krátkej lag fáze rastu, nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň sa optické denzity všetkých 3 kultúr vyrovnali a bunky sa nachádzali v skorej stacionárnej fáze. V 3. deň sa objavili rozdiely v raste medzi jednotlivými kultúrami a kultúra zaočkovaná na OD = 0,01 prerástla kultúry s vyššou počiatocnou OD. Napriek tomu sa všetky kultúry nachádzali v stacionárnej fáze rastu.

Obrázok 66A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp104p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, viditeľné sú rozdiely vo veľkosti buniek, menšie dcérske bunky a niekoľko deliacich sa buniek. Prítomných je aj niekoľko buniek s 1 veľkou vakuolou.

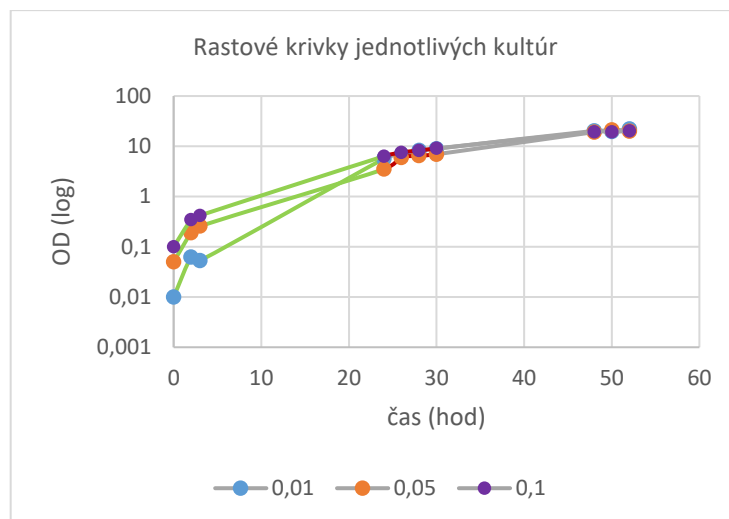
Obrázok 66B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp104p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza u nich k aktívnemu deleniu, viditeľné sú veľké rozdiely vo veľkosti buniek a mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 67 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp104p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,01 po 24 hodinách kultivácie (obr. 67A) a po 52 hodinách (obr. 67B).

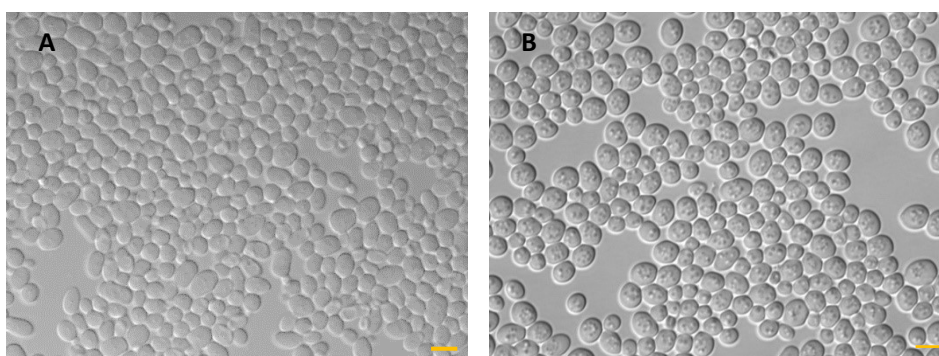
### 5.2.8.2. Kultúry BY-Hsp104-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	24	26	30	48	50	52
Kultúr a s OD <sub>0</sub> = 0,01						
OD <sub>0,01</sub>	5,65	6,96	8,93	20,3	19,65	22,15
Kultúr a s OD <sub>0</sub> = 0,05						
OD <sub>0,05</sub>	3,5	5,98	6,94	19,15	21,25	20,1
Kultúr a s OD <sub>0</sub> = 0,1						
OD <sub>0,1</sub>	6,33	7,57	9,07	19,45	19,35	20,3

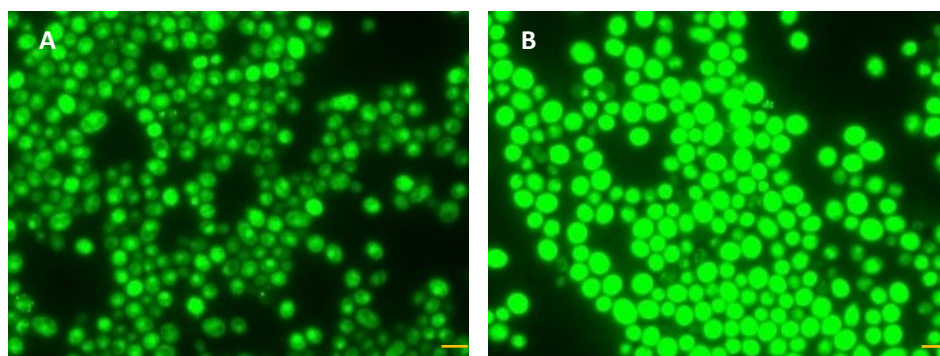
**Obr. 68:** Fluorescencia kmeňa BY-Hsp104p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Červená – diauxický a postdiauxický posun, sivá – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Graf 16:** Logaritmické vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Hsp104p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza.



**Obr. 69:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Hsp104p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 70:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp104p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,01$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 24 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 52 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.

Obrázok 68 zobrazuje zmeny v expresii génu *HSP104* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 52 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Hsp104 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme, u buniek so slabým fluorescenčným signálom bola viditeľná jeho výraznejšia lokalizácia pravdepodobne v bunkovom jadre.

Intenzita GFP fluorescenčného signálu bola počas celého pozorovania veľmi vysoká, so zvyšujúcou sa optickou densitou sa zvyšovala v individuálnych bunkách, zo začiatku nerovnomerne v individuálnych bunkách až do vyrovnania intenzity fluorescenčného signálu v celej kultúre. Počas 1. dňa bola intenzita fluorescenčného signálu zanedbateľná (dáta nie sú uvedené). Najvyššia intenzita bola viditeľná už počas 2. dňa pri prechode z exponenciálnej do stacionárnej fázy rastu.

Graf 16 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovania boli jednotlivé kultúry v lag fáze rastu, nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň sa optické denzity všetkých 3 kultúr vyrovnali a bunky sa nachádzali medzi exponenciálnou a stacionárnou fázou rastu. V 3. deň sa optické denzity všetkých kultúr zvyšovali len minimálne a všetky 3 kultúry sa nachádzali v stacionárnej fáze rastu.

Obrázok 69A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp104p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, viditeľné sú rozdiely vo veľkosti buniek, menšie dcérske bunky a niekoľko deliacich sa buniek.

Obrázok 69B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Hsp104p-GFP odfoťené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza u nich k aktívnemu deleniu, rozdiely vo veľkosti buniek sú minimálne.

Obrázok 70 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Hsp104p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 po 24 hodinách kultivácie (obr. 70A) a po 52 hodinách (obr. 70B).

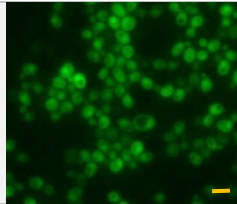
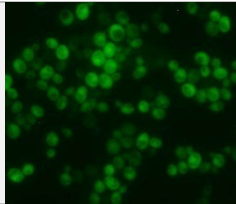
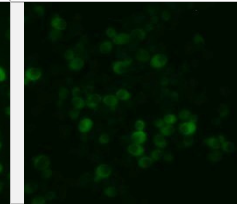
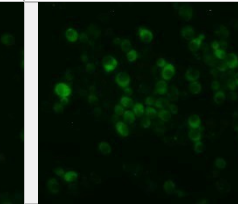
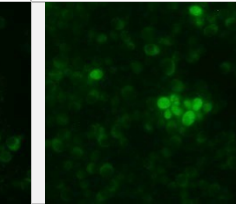
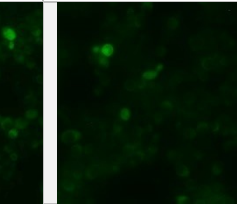
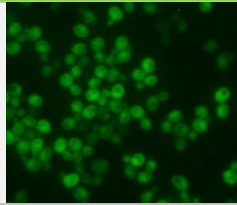
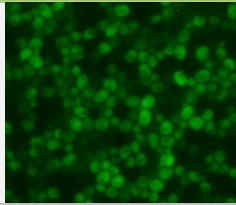
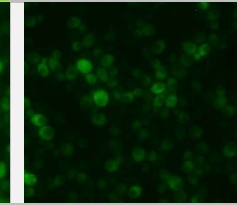
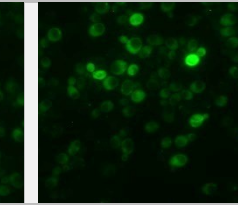
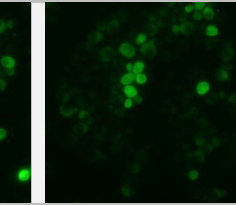
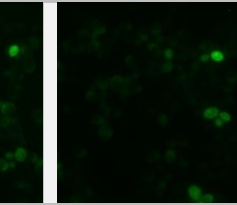
### 5.2.9. BY-Cyc1p-GFP

Expresia génu *CYC1* bola podľa SGD očakávaná počas stacionárnej fázy s lokalizáciou v cytoplazme v rozpustnej forme, aj napriek tomu, že tento gén kóduje mitochondriálny enzým cytochróm c oxidázu. Podľa literatúry však bola očakávaná zvýšená expresia v závislosti na obsahu glukózy (vyššia koncentrácia v prvotných fázach rastu, ktorá sa postupne znižuje). Vyššia

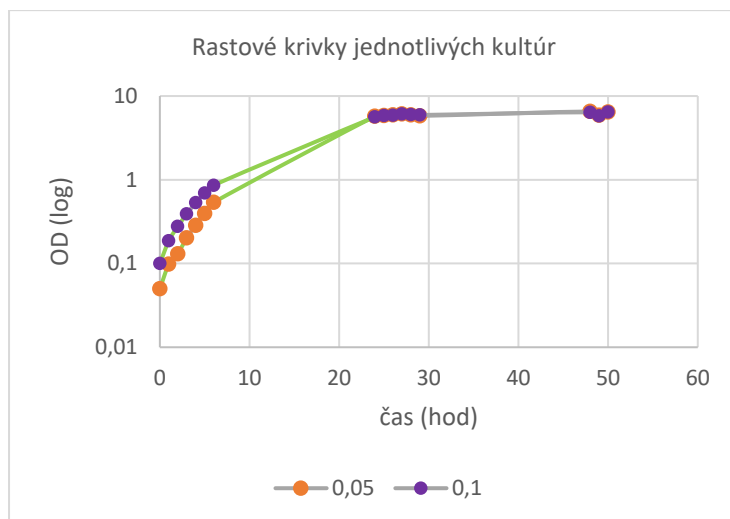


koncentrácia bola tiež očakávaná v kultúrach zaočkovaných na vyššiu počiatočnú optickú denzitu (Sherman a kol., 1965, [www.yeastgenome.com](http://www.yeastgenome.com)).

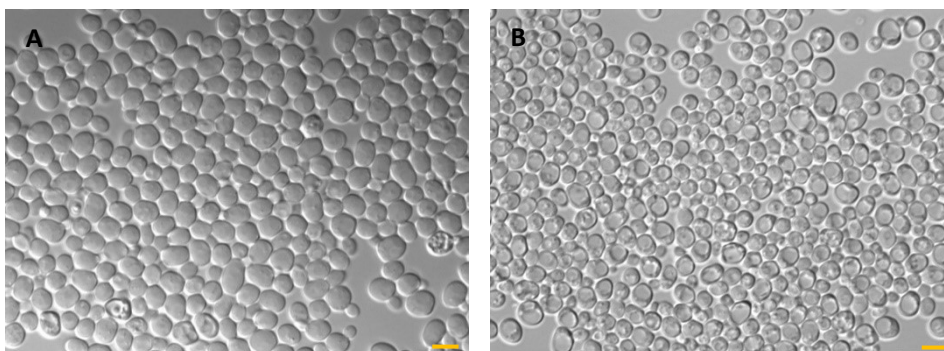
### 5.2.9.1. Kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom YEG médiu

Čas (hod)	3	5	24	28	48	50
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,05						
OD <sub>0,05</sub>	0,202	0,395	5,75	5,97	6,54	6,46
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,1						
OD <sub>0,1</sub>	0,390	0,694	5,63	6	6,4	6,44

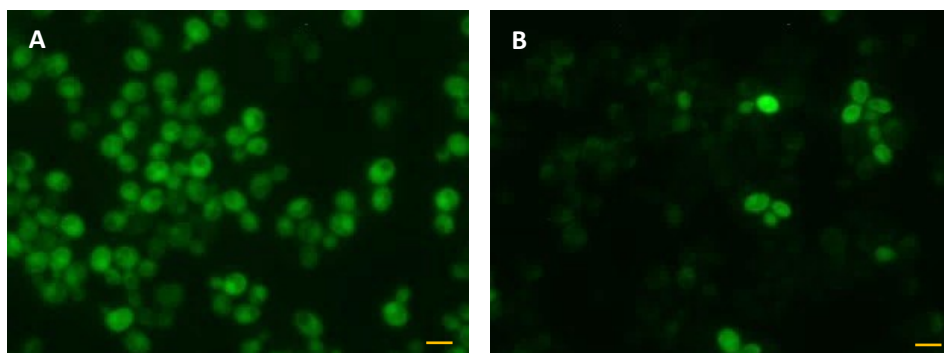
**Obr. 71:** Fluorescencia kmeňa BY-Cyc1p-GFP v tekutom YEG. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3s a zväčšení 1000x. Kultúra zaočkovaná na optickú denzitu 0,01 vykazovala počas meraní zanedbateľnú fluorescenciu ani v opakovaných meraniach, preto údaje nie sú uvedené. Zelená – exponenciálna fáza, sivá – stacionárna fáza. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 μm.



**Graf 17:** Logaritmicke vynesenie nameraných optických denzít kultúr BY-Cyc1p-GFP v tekutom YEG médiu v priebehu času. Oranžové body predstavujú kultúru s  $OD = 0,05$ , fialové predstavujú kultúru s  $OD = 0,1$ . Zelená krivka – exponenciálna fáza, sivá krivka – stacionárna fáza. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá  $10 \mu\text{m}$ .



**Obr. 72:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfotované v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá  $10 \mu\text{m}$ .



**Obr. 73:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Cyc1p v tekutom YEG médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 3 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 50 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá  $10 \mu\text{m}$ .

Obrázok 71 zobrazuje zmeny v expresii génu *CYCI* v tekutom YEG médiu v čase v priebehu 3 dní počas 50 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescencie vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Cyc1 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme, u niektorých buniek s badateľným hromadením na jednom póle buniek.

GFP fluorescenčný signál bol počas prvého dňa pozorovania najvýraznejší, s časom a postupným zvyšovaním hustoty jednotlivých kultúr dochádzalo k znižovaniu intenzity signálu vo väčšine buniek, signál ostal zachovaný alebo slabší len v niekoľkých individuálnych bunkách.

Graf 17 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovanie prakticky neprebiehalo, kultúry zaočkované na počiatocnú OD = 0,05 a OD = 0,1 sa nachádzali v krátkej lag fáze nasledovanej exponenciálnou fázou. Počas 2. dňa sa optická denzita oboch kultúr vyrovnala, bunky sa dostali do skorej stacionárnej fázy. V 3. deň pozorovania boli bunky v neskorej stacionárnej fáze a k nárastu biomasy dochádzalo len minimálne. Hodnoty namerané v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01 nie sú uvedené, pretože kultúra počas svojho rastu nevykazovala prakticky žiadny fluorescenčný signál, zároveň mala počas 1. dňa príliš nízku optickú denzitu na to, aby mohlo byť uskutočnené pozorovanie fluorescencie.

Obrázok 72A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Cyc1p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, takmer žiadne jazvy po pučaní a viditeľných je málo deliacich sa a dcérskych buniek.

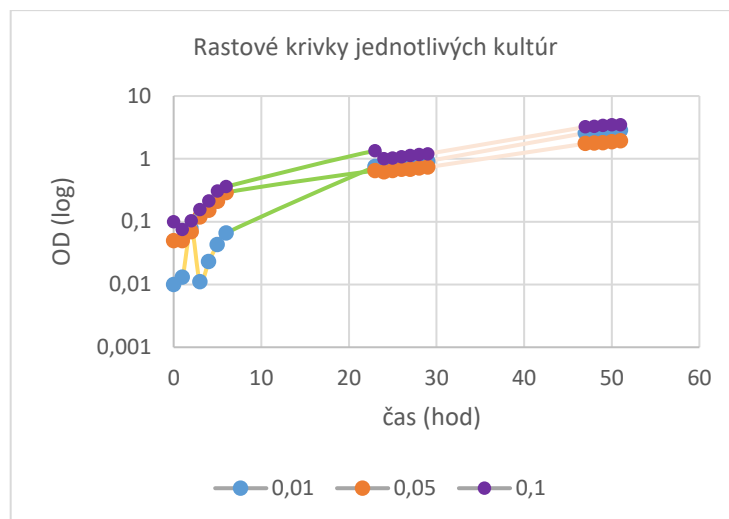
Obrázok 72B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Cyc1p-GFP odfotené pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza medzi nimi k aktívnemu deleniu, líšia sa vo veľkosti a viditeľných je mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 73 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Cyc1p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 po 3 hodinách kultivácie (obr. 73A) a po 50 hodinách (obr. 73B).

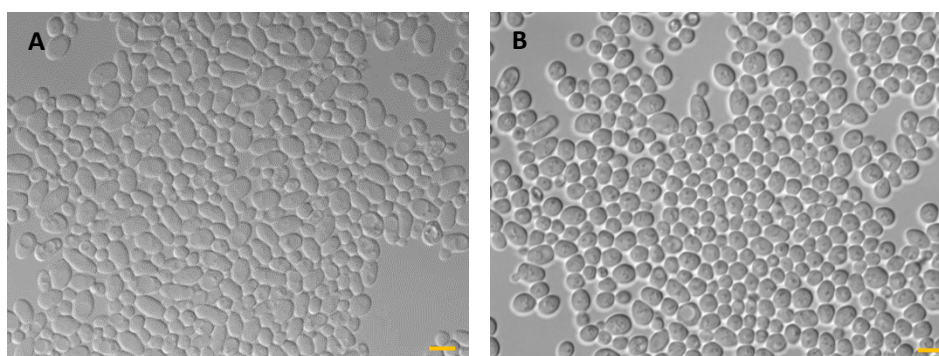
### 5.2.9.2. Kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom GM médiu

Čas (hod)	3	5	25	27	29	47	49
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,01	nefotené	nefotené					
OD <sub>0,01</sub>	0,011	0,043	0,755	0,844	0,919	2,578	2,698
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,05	nefotené						
OD <sub>0,05</sub>	0,119	0,21	0,647	0,682	0,737	1,746	1,806
Kultúra s OD <sub>0</sub> = 0,1							
OD <sub>0,1</sub>	0,155	0,308	1,03	1,124	1,2	3,218	3,386

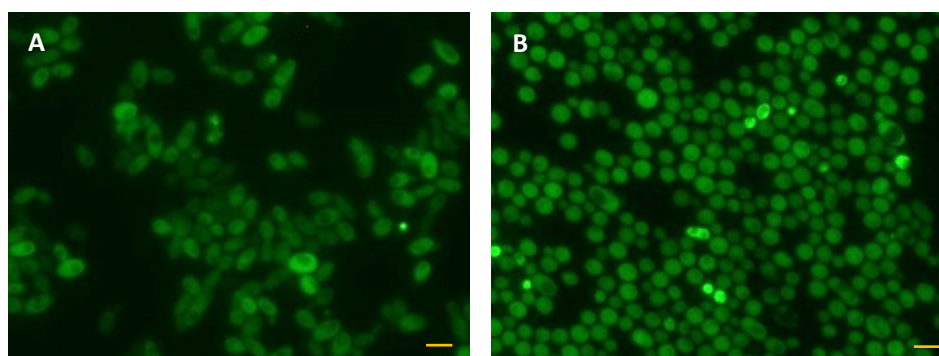
**Obr. 74:** Fluorescencia kmeňa BY-Cyc1p-GFP v tekutom GM. Všetky vzorky boli fotené pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Chýbajúce časy neboli odfotené kvôli nízkej hustote kultúry. Žltá – lag fáza, zelená – exponenciálna fáza, ružová – nie je možné určiť fázu. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 μm.



**Graf 18:** Logaritmicke vynešenie nameraných optických denzít kultúr BY-Cyc1p-GFP v tekutom GM médiu v priebehu času. Modré body predstavujú rastovú krivku kultúry s počiatočnou OD = 0,01, oranžové kultúru s OD = 0,05, fialové predstavujú kultúru s OD = 0,1. Žltá krivka – lag fáza, zelená krivka – exponenciálna fáza, ružová krivka – nie je možné určiť fázu.



**Obr. 75:** Morfológia kvasinkových buniek kultúry BY-Cyc1p-GFP v tekutom GM zaočkovanej na optickú denzitu 0,01 v 1. deň merania (A) a v 3. deň merania (B). Bunky boli odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm.



**Obr. 76:** Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Cyc1p v tekutom GM médiu v čase v kultúre s  $OD_0 = 0,1$ . Obrázok A znázorňuje bunky po 3 hod. od inokulácie, obrázok B znázorňuje bunky tej istej kultúry po 49 hod. od inokulácie. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10 µm. Jas snímok bol upravený.

Obrázok 74 zobrazuje zmeny v expresii génu *CYCI* v tekutom GM médiu v čase v priebehu 3 dní počas 49 hodín v 3 kultiváciách s odlišnou počiatocnou OD (0,01; 0,05; 0,1). Všetky snímky GFP fluorescence vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x.

Proteín Cyc1 bol počas celého rastu lokalizovaný v rozpustnej forme v cytoplazme, zdá sa však, že bol u mladších buniek sústredený primárne v 1 z pólov bunky.

Počas celého rastu bol pozorovateľný približne konštantný fluorescenčný signál, pričom k jeho zvyšovaniu dochádzalo v individuálnych bunkách v rôznych fázach rastu.

Graf 18 znázorňuje logaritmické vynesenie rastových kriviek jednotlivých kultúr v závislosti na čase. V 1. deň pozorovania boli jednotlivé kultúry v lag fáze rastu, nasledovanej exponenciálnou fázou. V 2. deň sa optické denzity všetkých 3 kultúr vyrovnali a bunky sa nachádzali medzi exponenciálnou a stacionárnou fázou. V 3. deň sa všetky kultúry nachádzali v stacionárnej fáze rastu, pričom medzi jednotlivými kultúrami boli viditeľné rozdiely v optickej denzite. Počas celého pozorovania sa optické denzity jednotlivých kultúr zvyšovali len minimálne a dosiahli extrémne nízke hodnoty.

Obrázok 75A zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Cyc1p-GFP odfované pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom GM médiu v 1. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú hladký povrch, maximálne 2 jazvy po pučaní, viditeľné sú rozdiely vo veľkosti buniek, menšie dcérske bunky a niekoľko deliacich sa buniek. Viditeľná je aj tvorba 1 veľkej vakuoly u niekoľkých individuálnych buniek.

Obrázok 75B zachytáva bunky tekutej kultúry BY-Cyc1p-GFP odfované pri expozícii 100 ms v Nomarského kontraste v tekutom YEG médiu v 3. deň kultivácie v kultúre zaočkovanej na počiatocnú OD = 0,01. Tieto bunky majú viacero jaziev po pučaní, nedochádza u nich k aktívnemu deleniu, majú porovnateľnú veľkosť a viditeľných je aj niekoľko buniek s 1 veľkou vakuolou.

Obrázok 76 zobrazuje porovnanie intenzity fluorescenčného signálu a lokalizácie Cyc1p v kultivácii zaočkovanej na OD = 0,1 po 3 hodinách kultivácie (obr. 76A) a po 49 hodinách (obr. 76B).

### 5.3. Analýza expresie vybraných génov pomocou Western blot-u

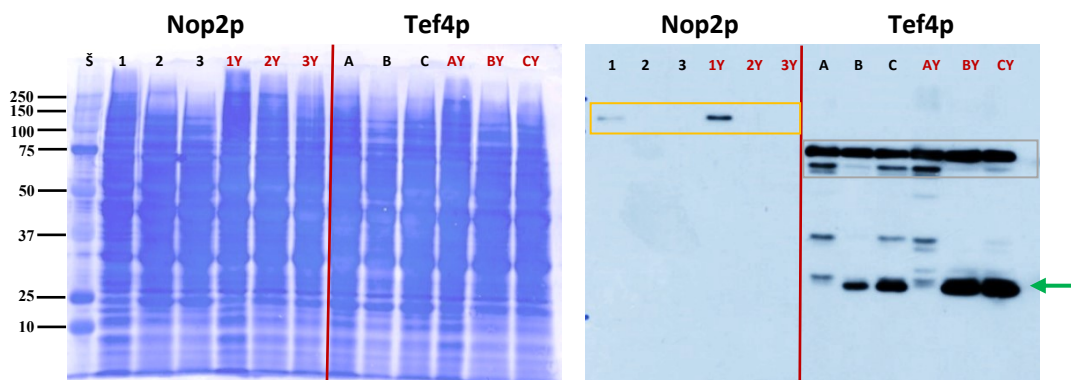
*Cieľ: Pomocou Western blot analýzy proteínov vyhodnotiť expresiu vybraných markerových génov, ktoré vykazovali špecifické rozdiely v lokalizácii či množstve exprimovaného proteínu medzi 2 zdrojmi uhlíka.*

Western blot analýza (kap. 4.2.2.9) prebiehala u kmeňov, ktoré vykazovali špecifické rozdiely v expresii génov či lokalizácii ich produktov medzi 2 médiami – glukózovom (YEG) fermentačnom a glycerolovom (GM) respiračnom. Tieto kmene boli zhodné s kmeňmi vybranými pre analýzu prostredníctvom rastu vo forme mikrokolónii na pevných médiách.

Na základe pozorovaní vo forme tekutých kultúr boli u daných kmeňov určené časy, v ktorých dochádzalo k výraznej zmene expresie. Kmene boli následne zaočkované na ceznočnú kultiváciu do daného média na OD = 0,005 pre GM médium a OD = 0,0001 pre YEG médium. Nasledujúci deň boli kultúry preočkované do čerstvých médií na OD = 0,01 a kultivované v rotačnej trepačke pri 28 °C a 150 RPM. Vo vybranej hodine od zaočkovania bola odmeraná optická denzita kultúry, podľa ktorej bol vypočítaný objem kultúry obsahujúci približne 50 mg biomasy. Tento objem bol odobraný a stočený centrifúgou 3 minúty pri 4500 RPM. Médium bolo odobrané, bunková suspenzia premytá v 1 ml ddH<sub>2</sub>O a prenesená do vopred odváženej mikroskúmavky. Suspenzia bola znova stočená mikrocentrifúgou 2 min pri 6000 RPM, tekutá fáza bola odobraná a skúmavka s biomasou bola odvážená. Biomasa bola okamžite zmrazená v tekutom dusíku, aby sa predišlo mutáciám a následne uložená v hlbokomraziacom boxe pri teplote –80 °C.

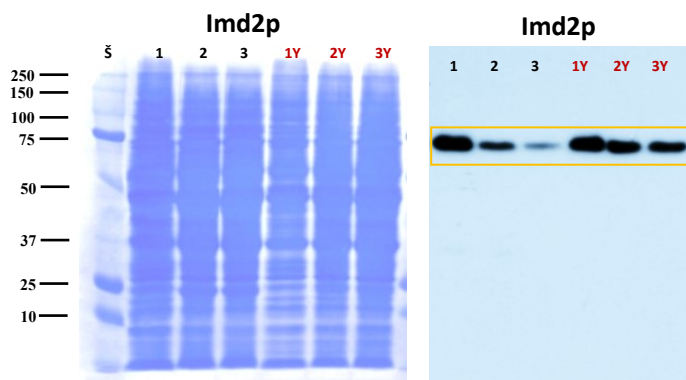
Podľa veľkosti vybraných proteínov bol pre SDS elektroforézu použitý 9 %-ný a 11 %-ný separačný gél (kap. 4.2.2.9.4, tab. 9). Vzorky boli na gél nanášané v koncentrácii 20 µg, 10 µg alebo 5 µg podľa predpokladanej sily signálu. Následná imunodetekcia prebiehala pri rôznych časoch expozície na základe pozorovanej intenzity fluorescenčného signálu.

Výsledky analýzy zobrazujú obrázky 77 – 79.



Čas (hod)	Vzorka (GM)/OD	Vzorka (YEG)/OD	Čas (hod)	Vzorka (GM)/OD	Vzorka (YEG)/OD
5	1 0,415	1Y 0,502	25	A 7,55	AY 9,04
26	2 8,84	2Y 10,4	47	B 16,65	BY 17,65
47	3 19,4	3Y 16,45	51	C 18,4	CY 15,6

**Obr. 77:** Porovnanie množstva proteínu Nop2 a Tef4 medzi 2 médiami a v čase. Obrázok vľavo zobrazuje proteíny po SDS elektroforéze na membráne ofarbenej Coomassie Brilliant Blue. Obrázok vpravo znázorňuje membránu po imunodetekcii a expozícii na film. Číslenie označené sú lyzáty kmeňa BY-Nop2p-GFP, písmená označujú lyzáty kmeňa BY-Tef4p-GFP, pridaný Y v názve vzorky označuje YEG médium, vzorky bez Y boli odobrané z GM média. Žltý obdĺžnik označuje Nop2p s molekulovou hmotnosťou 69,8 kDa, sivý obdĺžnik označuje Tef4p s molekulovou hmotnosťou 46,5 kDa, GFP má molekulovú hmotnosť 26,9 kDa po väzbe anti-GFP protilátky. Zelená šípka označuje voľné GFP. Tabuľka uvádza čas, v ktorom boli jednotlivé vzorky odobrané a optickú denzitu kultúry v danom čase. Použitý bol 11 %-ný separačný gél, vzorky boli nanosené v koncentrácii 20 µg, expozícia filmu trvala 60 minút.

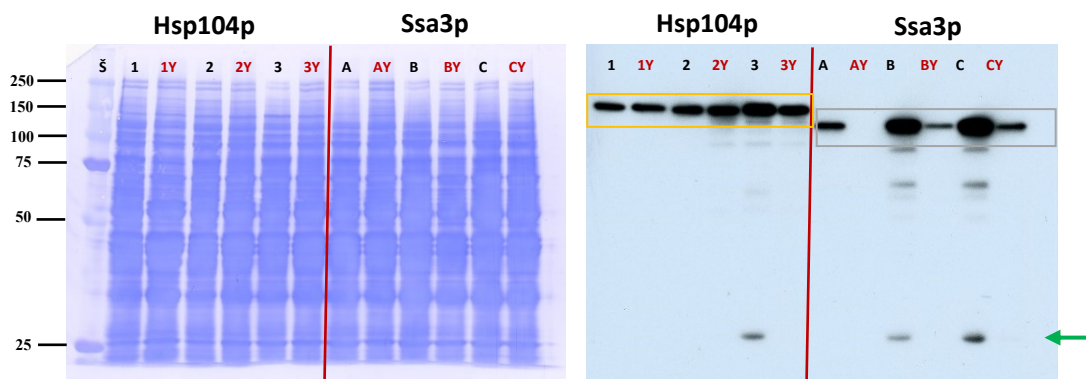


Čas (hod)	Vzorka (GM)/OD	Vzorka (YEG)/OD
5	1 0,384	1Y 0,478
26	2 6,99	2Y 9,32
47	3 15,7	3Y 15,7

**Obr. 78:** Porovnanie množstva proteínu Imd2 medzi 2 médiami a v čase. Obrázok vľavo zobrazuje proteíny po SDS elektroforéze na membráne ofarbenej Coomassie Brilliant Blue. Obrázok vpravo znázorňuje membránu po imunodetekcii a expozícii na film. Číslenie označené sú lyzáty kmeňa BY-Imd2p-GFP, pridaný Y v názve vzorky označuje YEG médium, vzorky bez Y boli odobrané z GM média. Žltý obdĺžnik označuje Imd2p s molekulovou hmotnosťou 56,5 kDa, GFP má molekulovú hmotnosť 26,9 kDa po väzbe anti-GFP protilátky. Tabuľka uvádza čas, v ktorom boli jednotlivé vzorky odobrané a optickú denzitu



kultúry v danom čase. Použitý bol 11 %-ný separačný gél, vzorky boli nanosené v koncentrácii 20 µg, expozícia filmu trvala 60 minút.



Čas (hod)	Vzorka (GM)/OD	Vzorka (YEG)/OD	Čas (hod)	Vzorka (GM)/OD	Vzorka (YEG)/OD
24	1, 6,33	1Y, 6,66	27	A, 11,01	AY, 7,23
30	2, 9,07	2Y, 6,89	47	B, 18,72	BY, 8,08
48	3, 19,45	3Y, 8,5	51	C, 18,54	CY, 9,04

**Obr. 79:** Porovnanie množstva proteínu Hsp104 a Ssa3 medzi 2 médiami a v čase. Obrázok vľavo zobrazuje proteíny po SDS elektroforéze na membráne ofarbenej Coomassie Brilliant Blue. Obrázok vpravo znázorňuje membránu po imunodetekcii a expozícii na film. Číslenie označujú lyzáty kmeňa BY-Hsp104p-GFP, písmená označujú lyzáty kmeňa BY-Ssa3p-GFP, pridaný Y v názve vzorky označuje YEG médium, vzorky bez Y boli odobrané z GM média. Žltý obdĺžnik označuje Hsp104p s molekulovou hmotnosťou 102 kDa, sivý obdĺžnik označuje Ssa3p s molekulovou hmotnosťou 70 kDa, GFP má molekulovú hmotnosť 26,9 kDa po väzbe anti-GFP protilátky. Zelená šípka označuje voľné GFP. Tabuľka uvádza čas, v ktorom boli jednotlivé vzorky odobrané a optickú denzitu kultúry v danom čase. Použitý bol 9 %-ný separačný gél, vzorky boli nanosené v koncentrácii 20 µg, expozícia filmu trvala 10 minút.

Western blot analýza hladiny Nop2p (obr. 77) preukázala najvyššiu hladinu tohto proteínu v prvých hodinách rastu kultivácií (5 hod.) v prípade oboch médií, pričom pri raste na glukóze bol jeho obsah v bunke aspoň dvakrát vyšší než v prípade rastu s glycerolom ako zdrojom uhlíka. Hladina Nop2p v bunke sa s časom znížila a nebola pozorovateľná ani po 60-minútovej expozícii filmu.

Proteín Tef4 vykazoval v oboch médiách vysokú hladinu v každom analyzovanom čase. Jeho obsah sa v prípade GM média s časom zdanlivo mierne znižoval, v prípade YEG média sa zdá, že jeho hladina sa mierne zvyšovala (obr. 77).

Analýza proteínu Imd2 (obr. 78) preukázala, že v prípade oboch médií bola jeho hladina najvyššia v čase aktívneho rastu počas prvého dňa kultivácie (po 5 hodinách) a s časom sa výrazne znižovala. V prípade GM média po 47 hodinách kultivácie došlo k výraznému, takmer úplnému úbytku proteínu v bunkách, v YEG médiu bola jeho hladina relatívne vysoká aj po 47 hodinách.

Stresový proteín Hsp104p v kultúre rastúcej v GM médiu v priebehu 24 hodín postupne pribúdala, najvyššia hladina tohto proteínu bola podľa Western blot analýzy počas 3. dňa kultivácie v odoberanom čase 48 hodín. Pri raste v YEG médiu sa jeho hladina rovnako zvyšovala, avšak približne od 30. hodiny sa jeho obsah v bunke výrazne nemenil (obr. 79).

Analýza proteínu Ssa3 preukázala výrazné rozdiely v čase, ale aj medzi rôznymi zdrojmi uhlíka. Kultúry rastúce v GM médiu obsahovali niekoľkonásobne viac Ssa3p počas 3. dňa kultivácie, pričom aj medzi 47. a 51. hodinou je stále pozorovateľný mierny nárast hladiny Ssa3p v bunkách. V kultúrach rastúcich v YEG médiu dochádzalo k tvorbe Ssa3p až počas 3. dňa kultivácie, pričom medzi 47. a 51. hodinou sa obsah Ssa3p v bunkách zdanlivo zdvojnásobil. Táto kultúra obsahovala počas celej kultivácie viditeľne menej Ssa3p než kultúra rastúca v GM médiu (obr. 79).

#### **5.4. Analýza expresie vybraných markerových génov v kolóniách rastúcich na pevnom médiu**

*Cieľ: Na základe pozorovaní vybraných markerových génov vo forme tekutých kultúr vybrať a analyzovať expresiu markerových génov preukazujúcich rozdiely v expresii medzi dvomi typmi médií počas rastu vo forme mikrokolónií na rovnakých typoch pevných médií pomocou fluorescenčného mikroskopu.*

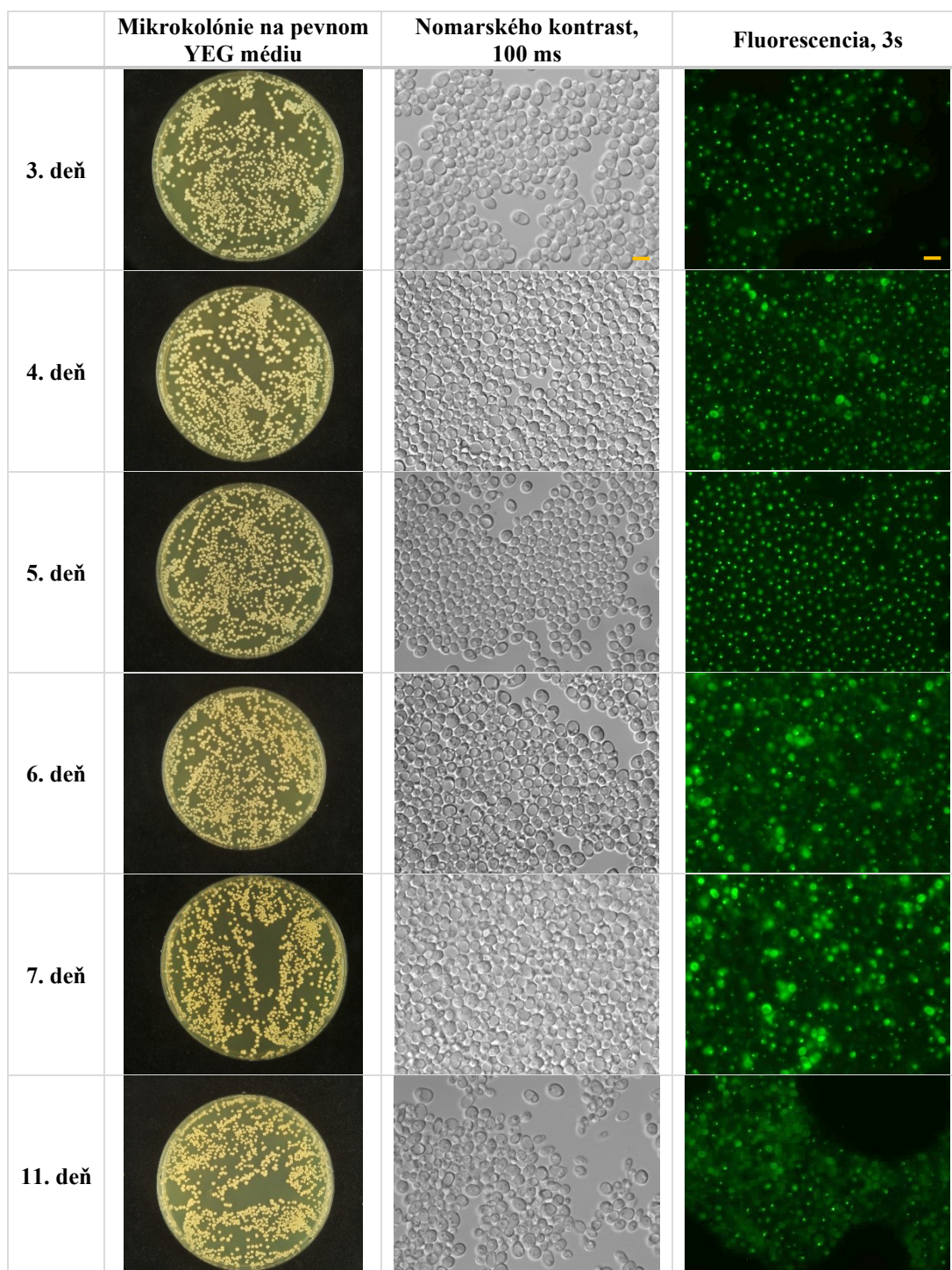
Pre pozorovanie fluorescencie v rámci mikrokolónií na pevnom médiu slúžili rovnaké reprezentatívne klony. Aj pre toto pozorovanie bol daný klon vybraný z hlbokomraziaceho boxu, nanesený na pevné YEPG médium na Petriho miskách a kultivovaný 1 deň v termostate pri teplote 28 °C. Po tejto kultivácii boli klony vysiate na Petriho misky s pevným GM a YEG médium vo forme mikrokolónií v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na 1 ml. Mikrokolónie boli na miskách kultivované 3 dni v termostate pri teplote 28 °C. Každý klon bol následne po dobu 5 dní a dodatkovo v 11. deň pozorovaný pod fluorescenčným mikroskopom (kap. 4.2.2.8). Jednotlivé klony boli zaočkované na 5 Petriho misiek s daným pevným médium (1 miska na 1 deň, posledná miska bola využitá aj pre dodatkové pozorovanie na 11. deň kultivácie), vďaka čomu sa predišlo kontaminácii jednotlivých misiek. Každá miska s mikrokolóniami bola najprv odfotená celá. Pre samotné pozorovanie pod fluorescenčným mikroskopom bola celá mikrokolónia odobraná nesterilným špáradlom a rozotretá na podložné sklíčko. Následne bola mikrokolónia pozorovaná pri zväčšení 1000x a zaznamenaná pri Nomarského kontraste s expozíciou 100 ms a GFP fluorescencia bola zaznamenaná pri expozícii 3 s (prípadne nižšej pri silnom signále).

Na základe predošlých pozorovaní vo forme tekutých kultúr bolo z pôvodných 9 kmeňov vybraných 5, ktoré vykazovali výrazné rozdiely v množstve expresie vybraného génu, prípadne sa líšili svojou lokalizáciou v rámci bunky.

Výsledky pozorovaní vybraných kmeňov vo forme mikrokolónií na pevných médiách zobrazujú obrázky 80 – 89.

### 5.4.1. BY-Nop2p-GFP

#### 5.4.1.1. Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom YEG médiu



**Obr. 80:** Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom YEG médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu\text{m}$ .

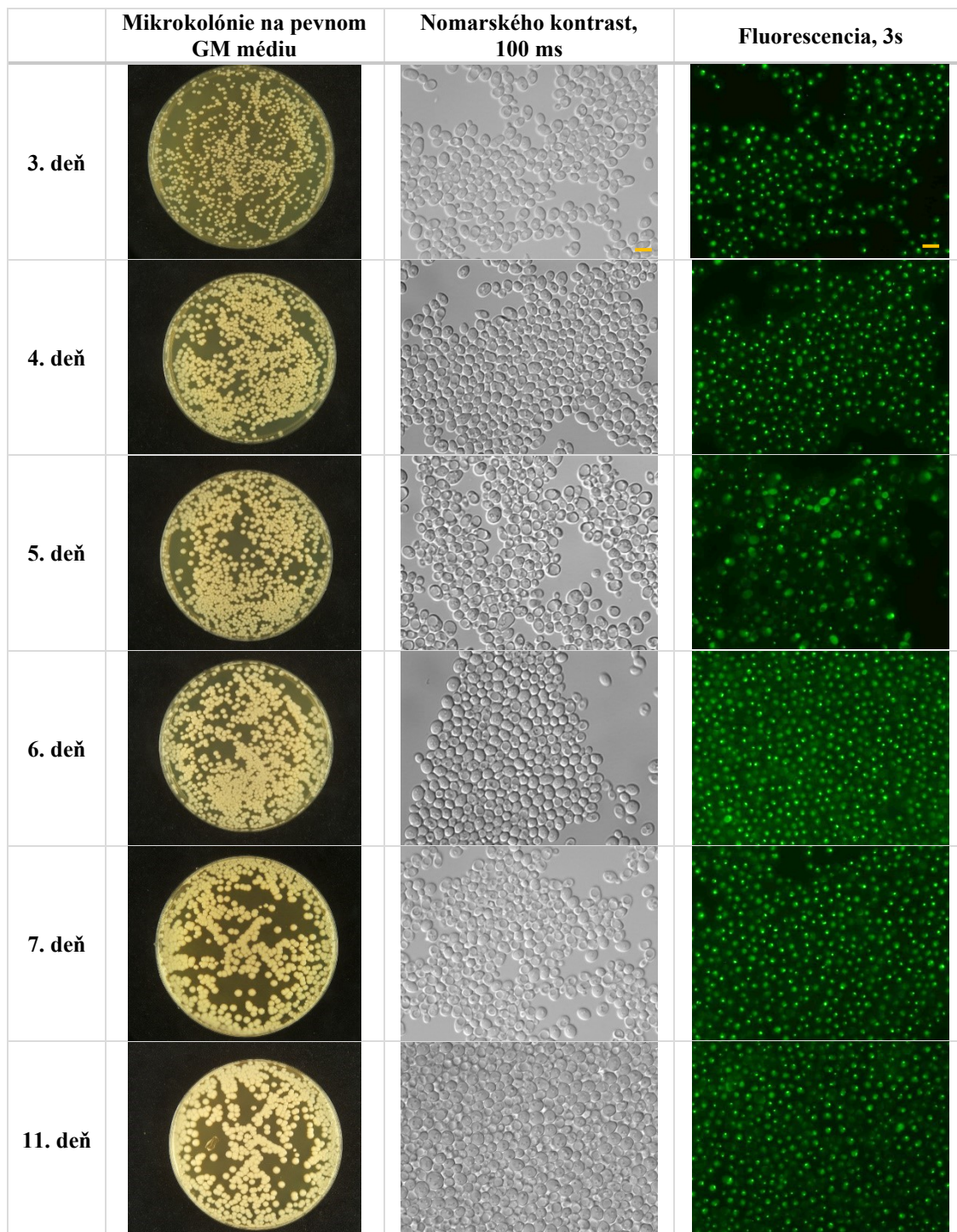
Obrázok 80 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Nop2p-GFP a expresiu génu *NOP2* na pevnom YEG médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní nedochádzalo k výraznému zväčšovaniu jednotlivých mikrokolónií, zachovaná je ich krémová farba a morfológia so zvlínenými okrajmi.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Odobraté mikrokolónie obsahovali už od 3. dňa prevažne staršie bunky s 1 veľkou vakuolou a boli variabilné vo veľkosti buniek. Väčšina buniek mala na svojom povrchu tiež väčšie množstvo jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *NOP2* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Nop2 je v jednotlivých bunkách lokalizovaný v ohraničenej jadierkovej štruktúre, objavujú sa však aj bunky, v ktorých je GFP fluorescenčný signál proteínu Nop2 lokalizovaný po celej cytoplazme bunky (najmä v starších mikrokolóniách, okolo 6. – 7. dňa). Intenzita signálu sa od 3. do 7. výrazne nemenila, v 11. deň bol signál takmer nulový.

### 5.4.1.2. Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom GM médiu



**Obr. 81:** Mikrokolónie BY-Nop2p-GFP na pevnom GM médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 81 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Nop2p-GFP a expresiu génu *NOP2* na pevnom GM médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

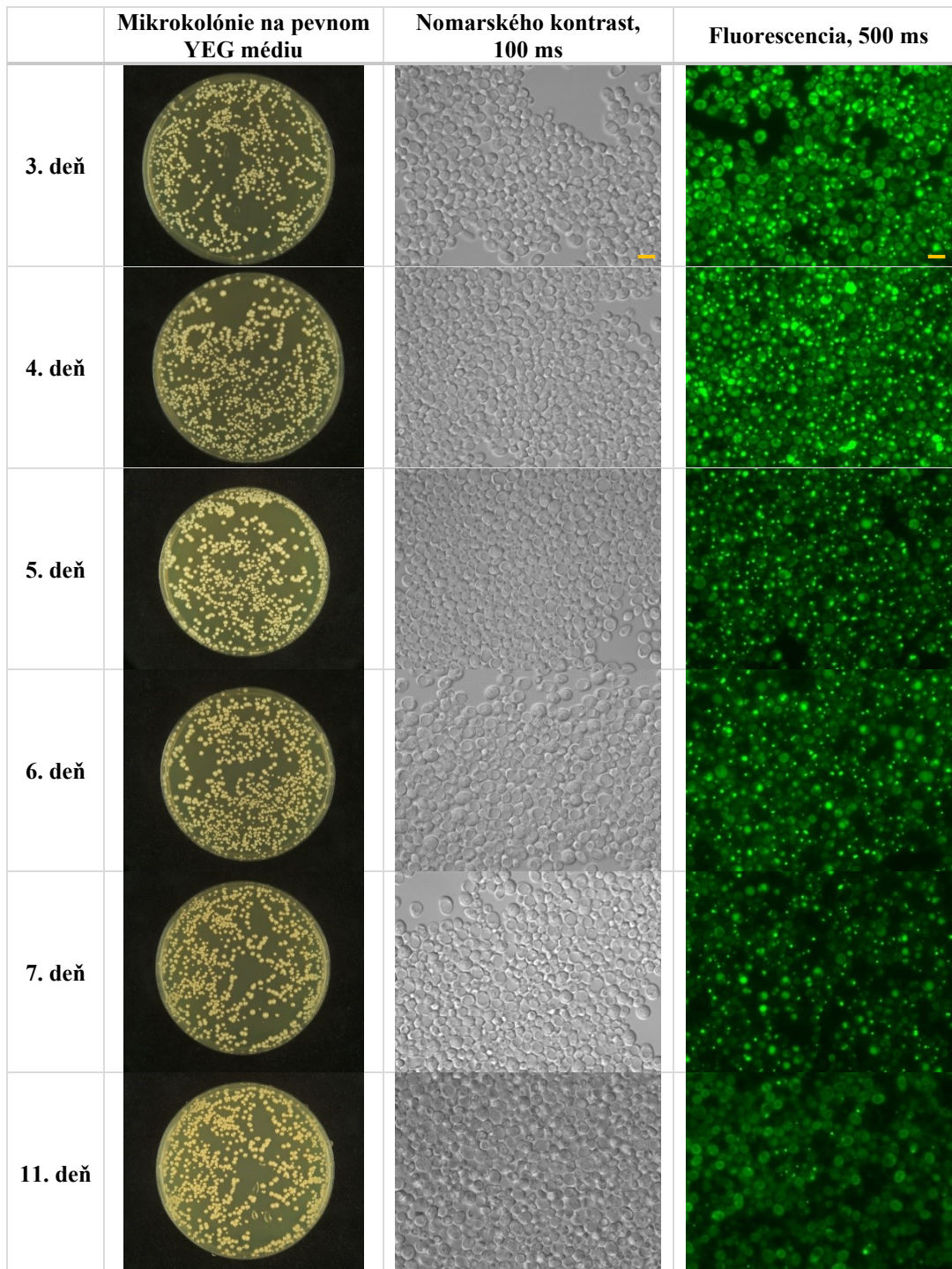
Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní je vidieť konštantné zväčšovanie jednotlivých mikrokolónií, ktoré sa medzi sebou nelíšia veľkosťou, farbou ani morfológiou. Všetky mikrokolónie majú krémovú farbu a hladké okraje, v priebehu času sa mení len ich veľkosť.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Mikrokolónia odobratá v 3. deň obsahovala prevažne bunky s hladkým povrchom a minimálnym počtom jaziev po pučaní, je viditeľných tiež niekoľko pučiacich buniek, ale aj bunky s 1 veľkou vakuolou. V priebehu času v odobratých mikrokolóniách pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní a tiež staršie bunky s 1 veľkou vakuolou.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *NOP2* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Nop2 je v jednotlivých bunkách lokalizovaný v ohraničenej jadierkovej štruktúre. Zdá sa, že jeho intenzita je najvyššia v mladších bunkách jednotlivých mikrokolónií.

## 5.4.2. BY-Tef4p-GFP

### 5.4.2.1. Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom YEG médiu



**Obr. 82:** Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom YEG médiu vysiata v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



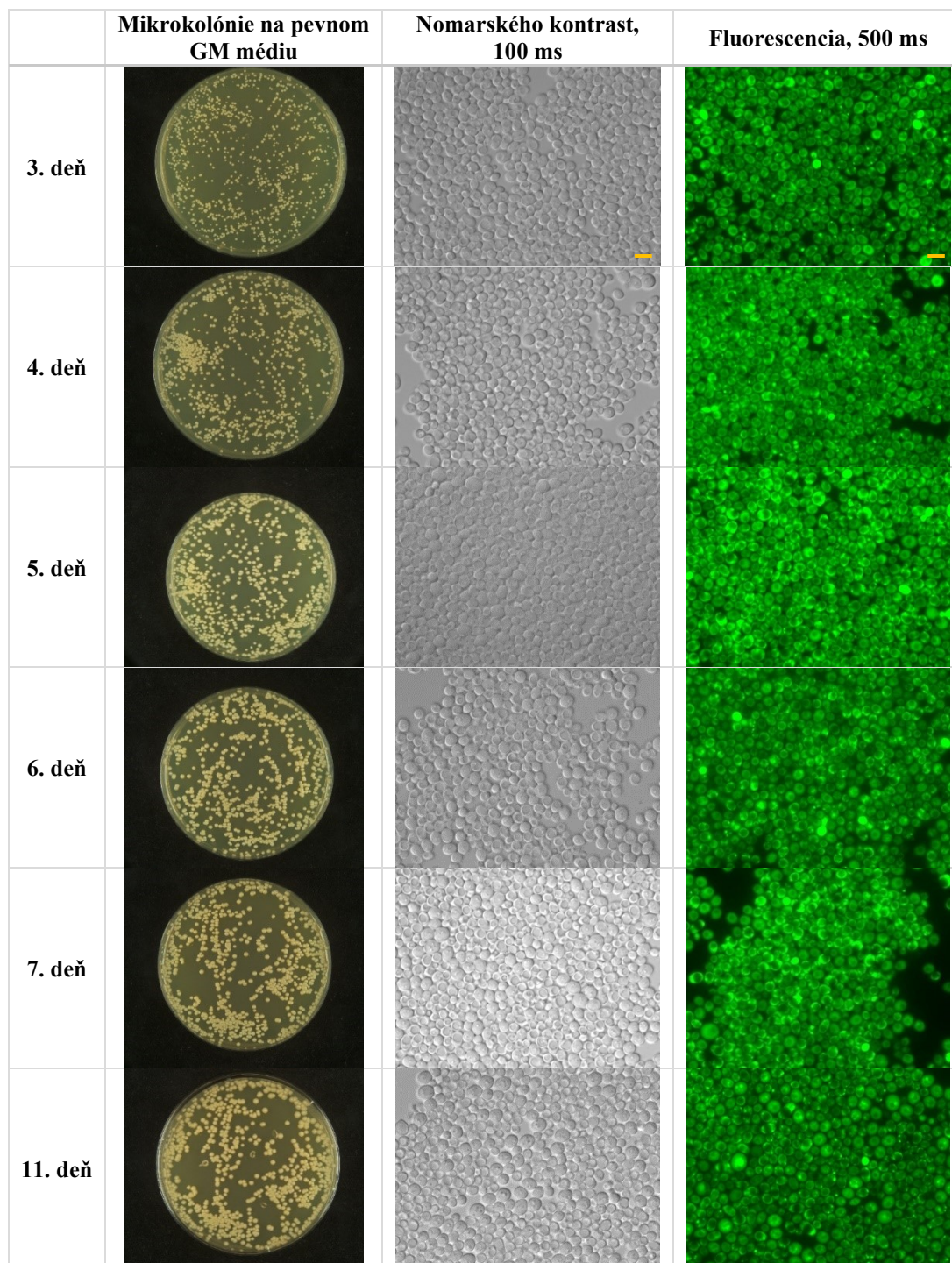
Obrázok 82 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Tef4p-GFP a expresiu génu *TEF4* na pevnom YEG médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní nedochádzalo k výraznému zväčšovaniu jednotlivých mikrokolónií, zachovaná je ich krémová farba a morfológia so zvlnenými okrajmi.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky odobratej kolónie boli variabilné vo veľkosti už od 3. dňa. V 3. deň pozorovania tvorili približne polovicu mikrokolónie bunky s 1 veľkou vakuolou, väčšina mladších buniek mala hladký povrch a málo jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *TEF4* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x. Proteín Tef4 bol počas celého pozorovania lokalizovaný v cytoplazme, avšak približne od 3. dňa tvoril najmä zhluky na rôznych miestach v bunke, intenzita signálu bola najvyššia do 4. dňa. Od 6. dňa bolo pozorované rozpúšťanie zhlukov a proteín Tef4 bol lokalizovaný približne rovnomerne po celej bunke. V 11. deň obsahovalo len minimum buniek zhluky proteínu Tef4.

### 5.4.2.2. Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom GM médiu



**Obr. 83:** Mikrokolónie BY-Tef4p-GFP na pevnom GM médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 83 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Tef4p-GFP a expresiu génu *TEF4* na pevnom GM médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

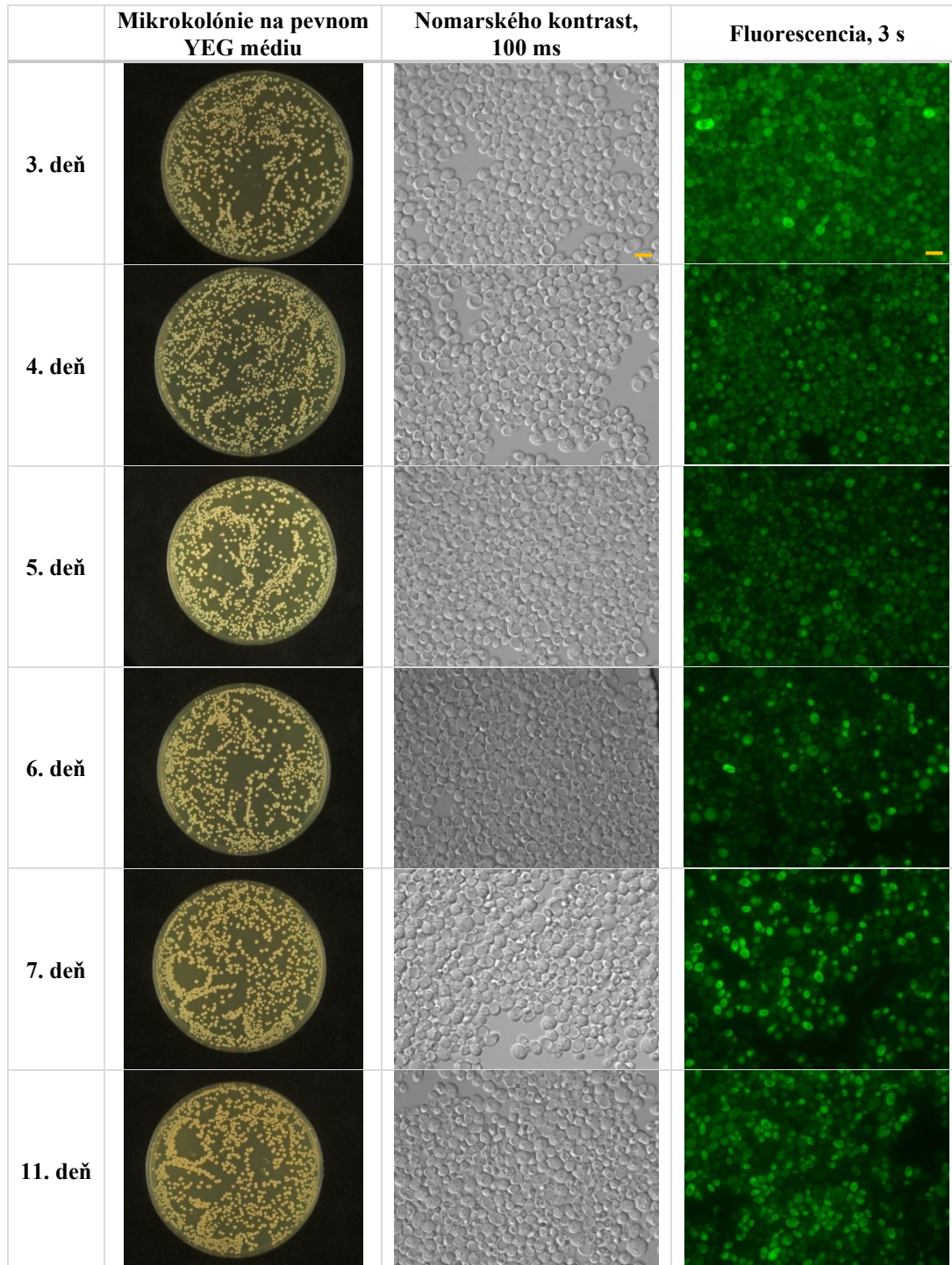
Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní je vidieť konštantné zväčšovanie jednotlivých mikrokolónií, ktoré sa medzi sebou nelíšia veľkosťou, farbou ani morfológiou. Všetky mikrokolónie majú krémovú farbu a hladké okraje, v priebehu času sa mení len ich veľkosť.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Mikrokolónie obsahovali už od 3. dňa po vysiatí bunky líšiace sa svojou veľkosťou a mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *TEF4* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 500 ms a zväčšení 1000x. Proteín Tef4 je u všetkých buniek lokalizovaný v cytoplazme, u starších buniek s 1 veľkou vakuolou je viditeľné jeho hromadenie na 1 z pólou buniek. V mikrokolónii odobratej v 11. deň po vysiatí misiek je u niektorých buniek viditeľná tvorba zhlukov Tef4p v cytoplazme.

### 5.4.3. BY-Imd2p-GFP

#### 5.4.3.1. Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom YEG médiu



**Obr. 84:** Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom YEG médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

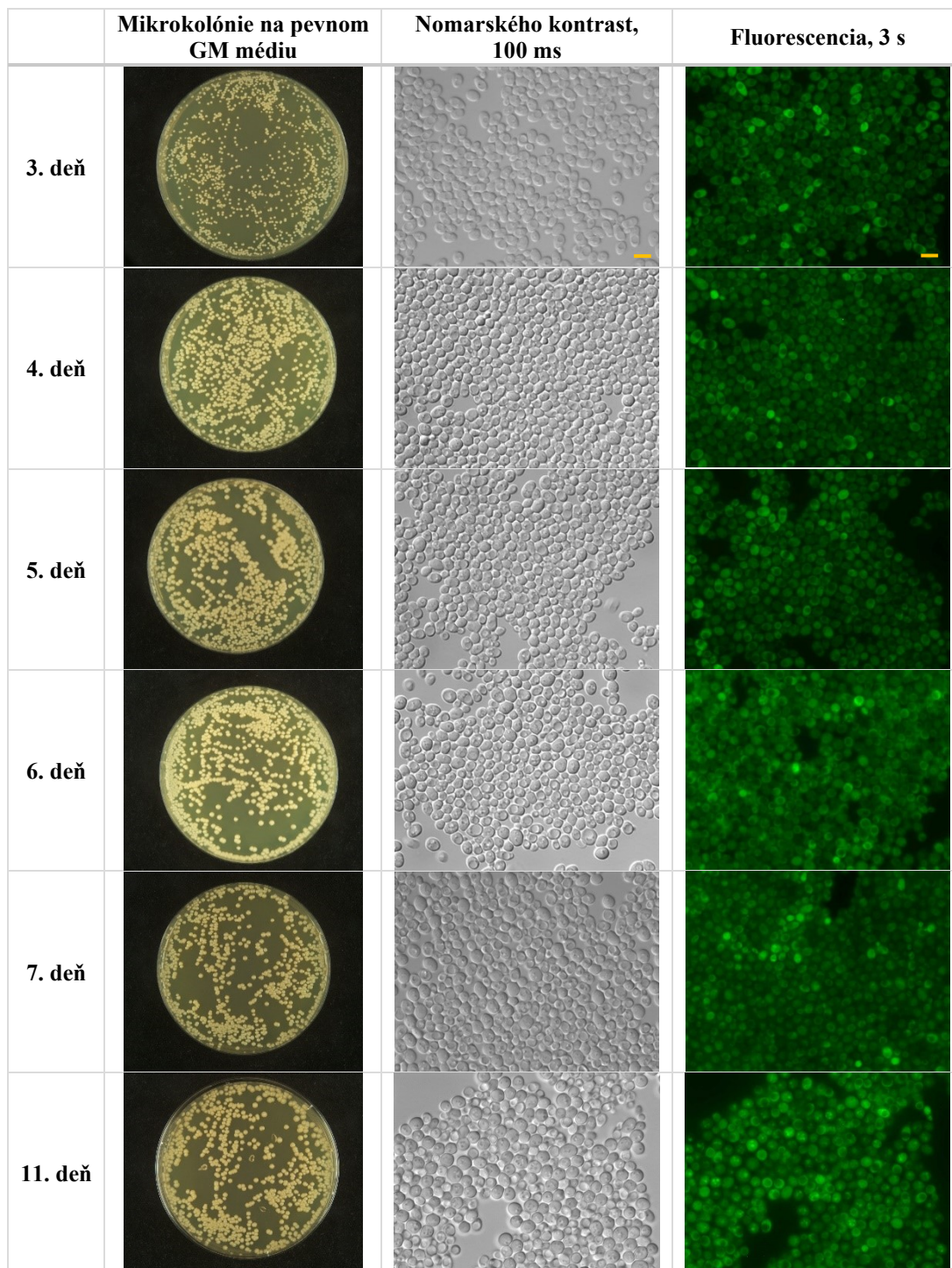
Obrázok 84 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Imd2p-GFP a expresiu génu *IMD2* na pevnom YEG médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní nedochádzalo k výraznému zväčšovaniu jednotlivých mikrokolónií, zachovaná je ich krémová farba a morfológia so zvlínenými okrajmi.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky odobratej kolónie boli variabilné vo veľkosti už od 3. dňa. Kolónia obsahovala už od 3. dňa mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *IMD2* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Imd2 bol počas celého pozorovania lokalizovaný v cytoplazme. V 3. deň bola intenzita GFP fluorescenčného signálu pomerne vysoká a rovnomerná medzi jednotlivými bunkami mikrokolónie a postupne sa znižovala. Približne od 5. dňa sa začala intenzita GFP fluorescencie znova zvyšovať, avšak nerovnomerne medzi jednotlivými bunkami, zvýšená intenzita bola v rámci mikrokolónie najmä u starších buniek s 1 veľkou vakuolou.

### 5.4.3.2. Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom GM médiu



**Obr. 85:** Mikrokolónie BY-Imd2p-GFP na pevnom GM médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Jas snímok bol upravený. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 85 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Imd2p-GFP a expresiu génu *IMD2* na pevnom GM médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

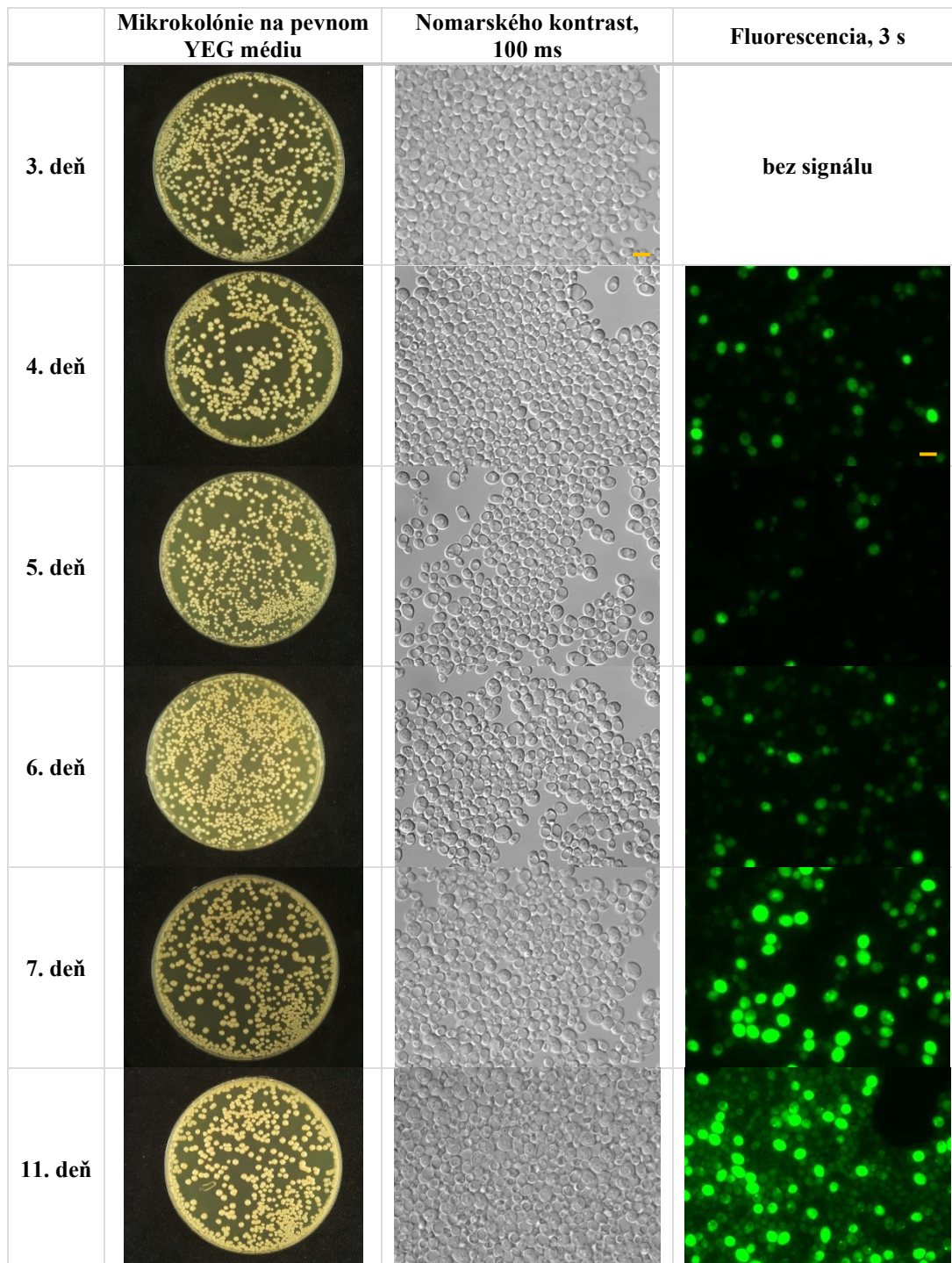
Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. Počas 3. dňa boli kolónie najmenšie, od 2. dňa sa ich veľkosť výrazne nemenila. Zachovaná je počas celého pozorovania krémová farba a hladké okraje jednotlivých mikrokolónií.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky mikrokolónií v 3. deň pozorovania mali hladký povrch a najmenej jaziev po pučaní. Mikrokolónie obsahovali už od 3. dňa po vysiatí bunky líšiace sa svojou veľkosťou a mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *IMD2* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Imd2 je u všetkých buniek lokalizovaný v cytoplazme. Intenzita GFP fluorescencie bola u mladších buniek približne rovnaká v celej mikrokolónií, u individuálnych buniek s 1 vakuolou bola pozorovateľná zvýšená intenzita GFP fluorescencie. Signál GFP fluorescencie bol počas 11 dní viac-menej konštantný, mierne zvýšenie intenzity nastalo v 11. deň pozorovania.

### 5.4.4. BY-Ssa3p-GFP

#### 5.4.4.1. Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom YEG médiu



**Obr. 86:** Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom YEG médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.



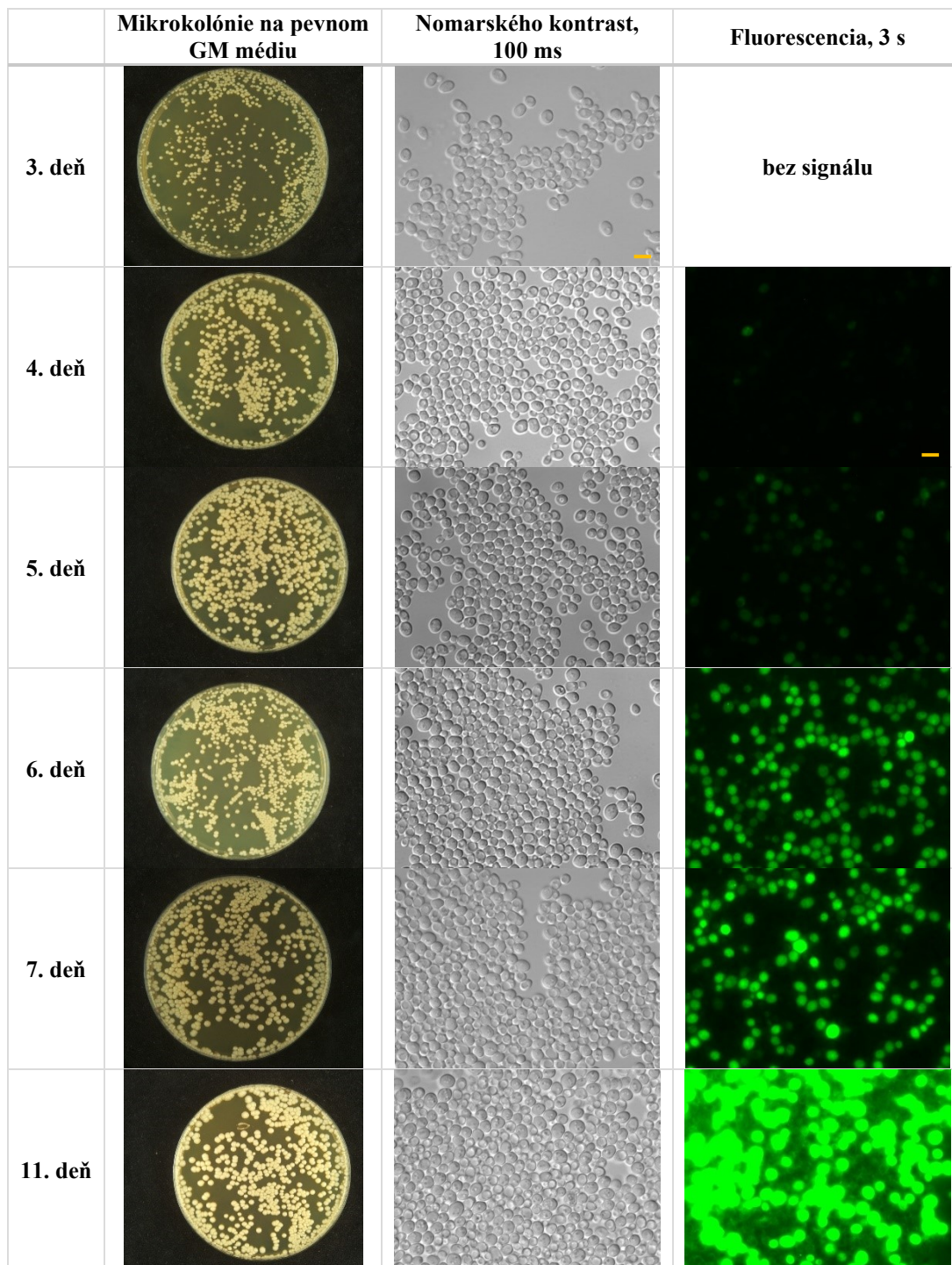
Obrázok 86 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií BY-Ssa3p-GFP a expresiu génu *SSA3* na pevnom YEG médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní nedochádzalo k výraznému zväčšovaniu jednotlivých mikrokolónií, zachovaná je ich krémová farba a morfológia so zvlnenými okrajmi.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky odobratej kolónie boli variabilné vo veľkosti už od 3. dňa. Kolónia obsahovala už od 3. dňa mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *SSA3* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Ssa3 je u všetkých buniek lokalizovaný v cytoplazme. Intenzita GFP fluorescencie bola v 3. deň po vysiatí nulová, postupne pribúdali individuálne bunky, ktoré vykazovali rovnomerný signál po celom svojom objeme. Najväčšie množstvo buniek vykazujúcich GFP fluorescenčný signál pribudlo medzi 7. a 11. dňom.

#### 5.4.4.2. Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom GM médiu



**Obr. 87:** Mikrokolónie BY-Ssa3p-GFP na pevnom GM médiu vysiate v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú miskú, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 87 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Ssa3p-GFP a expresiu génu *SSA3* na pevnom GM médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

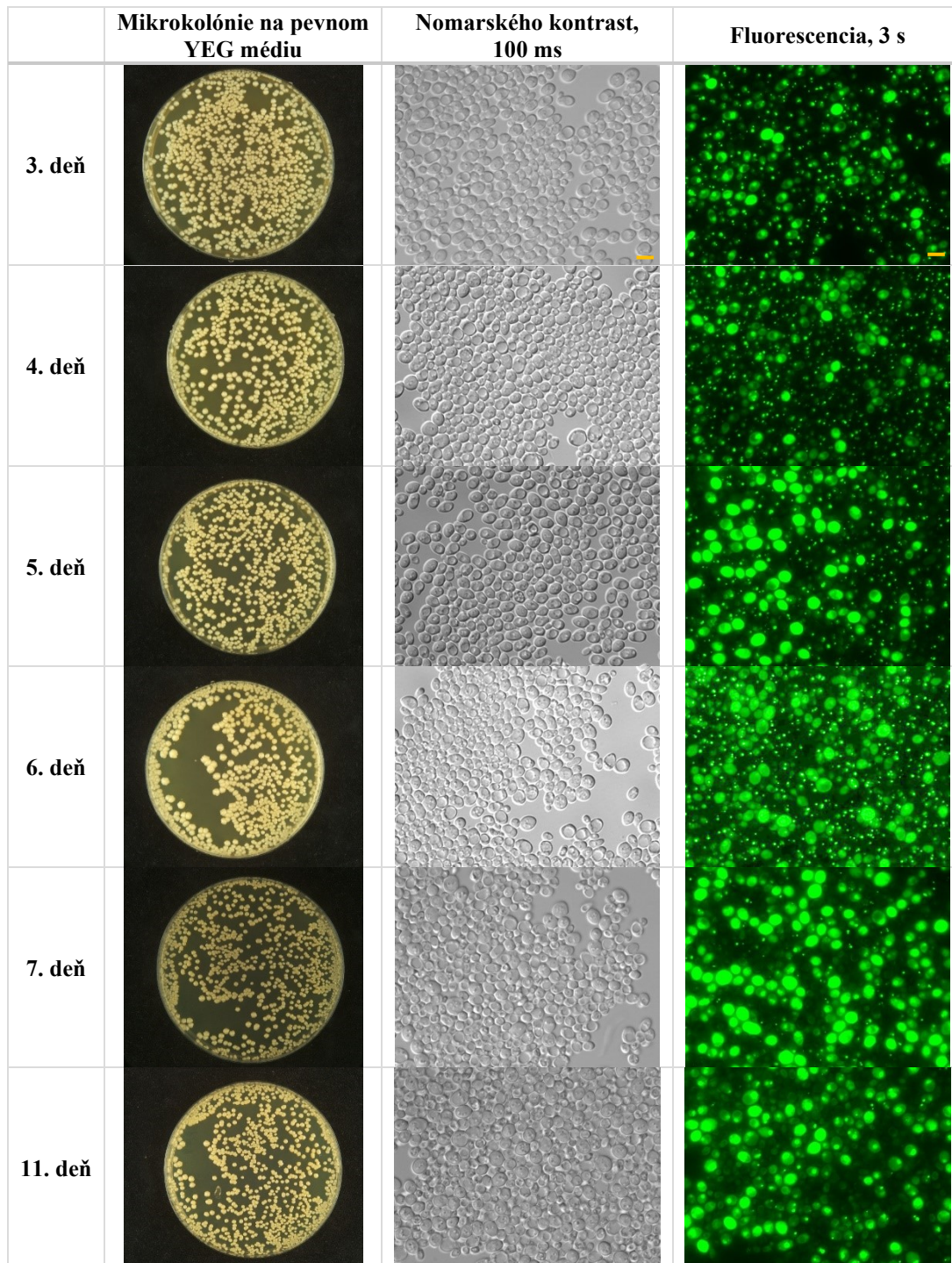
Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V 3. deň boli mikrokolónie najmenšie, postupne je viditeľný ich konštantný rast.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky mikrokolónií v 3. deň pozorovania mali hladký povrch a najmenej jaziev po pučaní. Mikrokolónie obsahovali už od 3. dňa po vysiatí bunky líšiace sa svojou veľkosťou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní aj s 1 veľkou vakuolou.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *SSA3* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Ssa3 je u všetkých buniek lokalizovaný v cytoplazme. Intenzita GFP fluorescencie bola v 3. deň po vysiatí nulová, postupne pribúdali individuálne bunky, ktoré vykazovali rovnomerný signál po celom objeme bunky. Intenzita signálu u týchto buniek bola každým dňom výraznejšia, v 11. deň bola táto intenzita najvyššia.

### 5.4.5. BY-Hsp104p-GFP

#### 5.4.5.1. Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom YEG médiu



**Obr. 88:** Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom YEG médiu vysiata v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfoťenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfoťenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

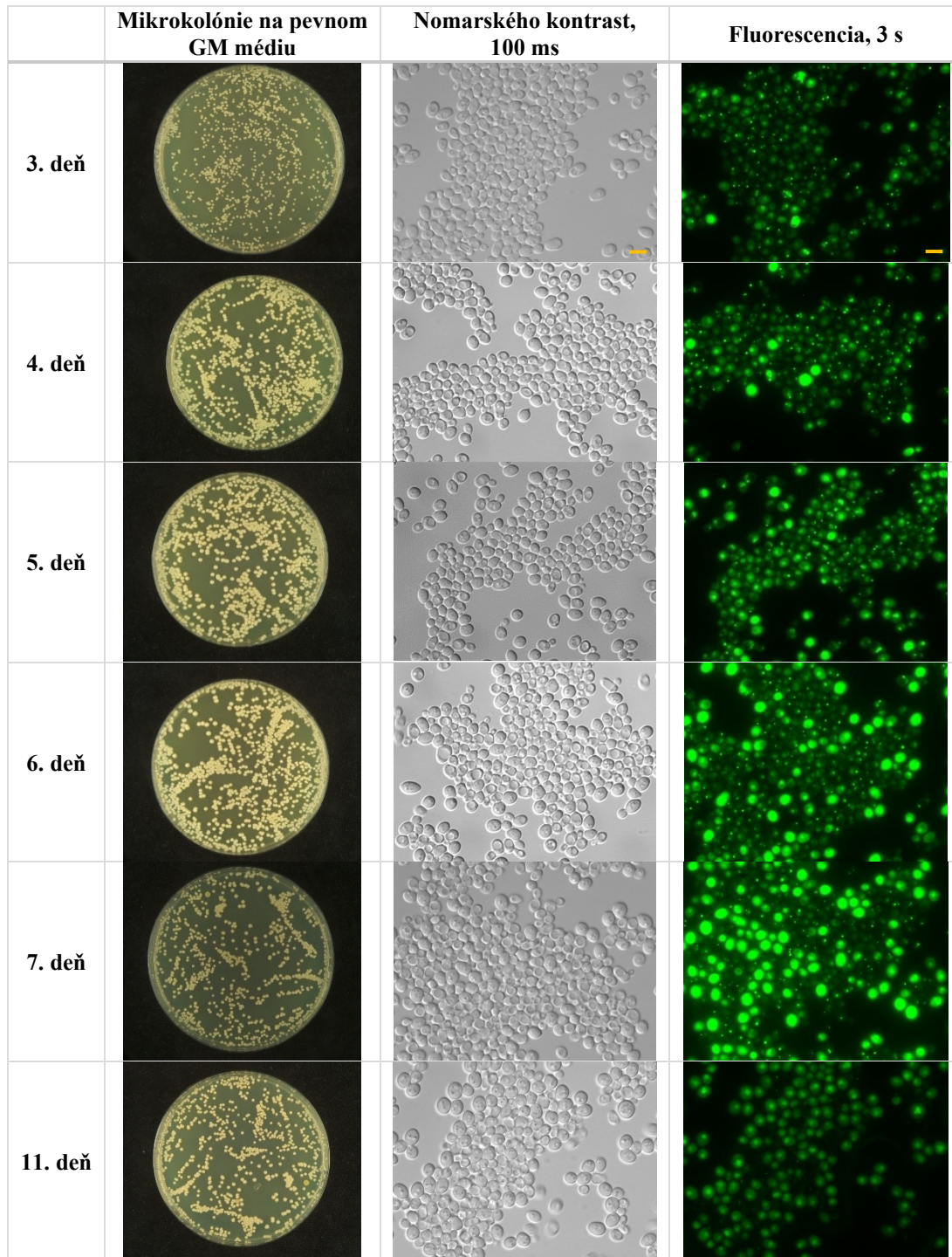
Obrázok 88 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Hsp104p-GFP a expresiu génu *HSP104* na pevnom YEG médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú misku s vysiatými mikrokolóniami. V priebehu 11 dní nedochádzalo k výraznému zväčšovaniu jednotlivých mikrokolónií, zachovaná je ich krémová farba a morfológia so zvlnenými okrajmi.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfoťené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky odobratej kolónie boli variabilné vo veľkosti už od 3. dňa. Kolónia obsahovala už od 3. dňa mnoho buniek s 1 veľkou vakuolou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *HSP104* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Hsp104 tvoril v mladších mikrokolóniách najmä zhluky lokalizované v cytoplazme, od 5. dňa je pozorované jeho aktívnejšie rozpúšťanie v cytoplazme a zároveň zvyšovanie intenzity GFP fluorescenčného signálu. Medzi 7. a 11. dňom dochádzalo k miernemu zníženiu intenzity GFP fluorescencie a takmer žiadne bunky neobsahovali zhluky proteínu Hsp104.

### 5.4.5.2. Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom GM médiu



**Obr. 89:** Mikrokolónie BY-Hsp104p-GFP na pevnom GM médiu vysiata v koncentrácii  $10^{-4}$  buniek na ml v priebehu 11 dní. Prvý stĺpec zobrazuje odfotenú celú misku, viditeľná je morfológia a veľkosť mikrokolónií. Druhý stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie na Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Tretí stĺpec zobrazuje časť mikrokolónie odfotenú pod fluorescenčným mikroskopom Leica pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Žltá mierka v pravom dolnom rohu zodpovedá 10  $\mu$ m.

Obrázok 89 zobrazuje veľkosť a morfológiu mikrokolónií kmeňa BY-Hsp104p-GFP a expresiu génu *HSP104* na pevnom GM médiu. Pozorovanie prebiehalo počas 7 dní s dodatkovým pozorovaním v 11. deň od vysiatia mikrokolónií.

Prvý stĺpec zobrazuje celú miskú s vysiatými mikrokolóniami. V 3. deň pozorovania boli mikrokolónie najmenšie, od 4. dňa sa ich veľkosť výrazne nemenila. Zachovaná ostala ich krémová farba a hladké okraje.

Druhý stĺpec zobrazuje bunky odobratej mikrokolónie odfotené v Nomarského kontraste pri expozícii 100 ms a zväčšení 1000x. Bunky mikrokolónií v 3. deň pozorovania mali hladký povrch a najmenej jaziev po pučaní. Mikrokolónie obsahovali už od 3. dňa po vysiatí bunky líšiace sa svojou veľkosťou, postupne pribúdali bunky s väčším počtom jaziev po pučaní aj s 1 veľkou vakuolou.

Tretí stĺpec zobrazuje expresiu génu *HSP104* reprezentovanú GFP fluorescenčným signálom. Snímky vznikli pri expozícii 3 s a zväčšení 1000x. Proteín Hsp104 tvoril medzi 3.-5. dňom zhluky lokalizované v cytoplazme, od 6. dňa je pozorované jeho rozpúšťanie v cytoplazme a zároveň zvyšovanie intenzity GFP fluorescenčného signálu. V 11. deň bola intenzita GFP fluorescenčného signálu znova slabšia, avšak proteín netvoril zhluky a zdá sa, že sa hromadil najmä v bunkovom jadre alebo vakuole.

## 6. Diskusia

Počas rastu kvasinkových mnohobunkových populácií vo forme tekutých kultúr či kolónií na pevnom povrchu sú pozorovateľné 4 hlavné rastové fázy. Prechody medzi týmito fázami nastávajú v momente, kedy populácia spotrebuje dostupný zdroj uhlíka a prispôsobuje svoj metabolizmus na využitie alternatívneho zdroja, ktorým môže byť napr. etanol vznikajúci ako vedľajší produkt respirácie, pokiaľ kvasinky rastú na glukóze (\*Matmati a Hannun, 2008).

Medzi jednotlivými fázami dochádza u kvasinkových buniek k fyziologickým a metabolickým zmenám, pričom v poslednej a najdlhšej fáze, stacionárnej fáze, môžeme v populácii kvasiniek rozoznať 2 subpopulácie buniek, líšiace sa z celkového hľadiska najmä svojou životaschopnosťou. U tekutých kultúr rozdeľujeme tieto subpopulácie na tzv. neaktívne Q bunky a aktívne NQ bunky. V kolóniách rastúcich na pevnom respiračnom médiu sú tieto subpopulácie popisované ako vyššie U bunky a nižšie L bunky (Allen a kol., 2006; Wei a kol., 2009; \*Palková a kol., 2014).

Analýza expresie génov počas rastu kvasinkových populácií a zároveň na rôznych zdrojoch uhlíka môže načrtnúť rastovú fázu, v ktorej sa daná populácia nachádza. Rast bunkovej kultúry je možné pozorovať tiež meraním hustoty bunkovej kultúry (meraním optickej denzity), jej zaznamenaním a následnou analýzou, ktorá umožňuje určiť momentálnu rastovú fázu kultúry. Tieto analýzy umožňujú súčasne popísať životaschopnosť jednotlivých buniek či to, aké procesy sú u danej bunky aktívne.

V rámci tejto diplomovej práce bolo pripravených 8 nových kmeňov odvodených od materského laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* BY4742, ktoré niesli markerové proteíny exprimované v rôznych rastových fázach značené zeleným fluorescenčným proteínom GFP. Súčasne bol analyzovaný kmeň BY-Eht1p-GFP pripravený a overený Mgr. Janou Maršíkovou. Takto pripravené kmene umožnili analýzu lokalizácie a tiež množstva exprimovaného proteínu a ich porovnanie pri raste na médiách s rôznymi zdrojmi uhlíka. Prvé analýzy prebehli u kultivácií pripravených kmeňov v tekutom médiu s glycerolom/etanolom (GM) alebo s glukózou (YEG) počas 3 dní prostredníctvom merania ich optickej denzity a pozorovania fluorescencie značených proteínov. Získané dáta z mikroskopických pozorovaní boli následne využité pre výber špecificky exprimovaných génov, ktoré vykazovali počas kultivácie v tekutom médiu viditeľné rozdiely alebo boli exprimované v inej než očakávanej rastovej fáze. U týchto vybraných kmeňov boli získané dáta overené proteínovou analýzou Western blot a následne u nich prebehla analýza rastových fáz kultiváciou vo forme mikrokolónií na zhodných pevných médiách.

Rastové krivky jednotlivých kultivácií boli získané pravidelným meraním ich optickej denzity (každú hodinu, resp. dve po optimalizácii a prvotných pokusoch) po dobu troch dní. Pre sledovanie a zachytenie priebehu rastu v každej fáze a v čo najširšom zábere bol každý kmeň zaočkovaný do daného tekutého média na 3 odlišné optické denzity – 0,01; 0,05 a 0,1. Dané



inokulum pochádzalo z ceznočnej kultivácie, čím bolo dosiahnuté, že všetky bunky sa nachádzali v exponenciálnej fáze, teda prevažovali mladé dcérske bunky.

Takto zaočkované kultúry umožnili pozorovať kvasinkové populácie v rozličných fázach rastu v rozličnom čase a dĺžke a zároveň prechody medzi týmito fázami, pričom v istom momente došlo k viditeľnému vyrovnaniu optických denzít jednotlivých kultúr a všetky kultúry sa v rovnakom čase dostali do stacionárnej fázy a chronologického starnutia.

Pri opakovaní experimentu by som ale navrhla úpravu počiatočných optických denzít na hodnoty 0,01; 0,03 a 0,1 a to z dôvodu, že pri použitej optimalizácii (0,01; 0,05; 0,1) bola viditeľná a potvrdená závislosť medzi hustotou inokula a dĺžkou lag fázy. Štúdie tejto závislosti uvádzajú, že čím vyššia je hustota inokula, tým skôr a ľahšie nastáva prechod kultúry do exponenciálnej fázy rastu (Ding a kol., 2009). V súlade s touto štúdiou bol u kultúry zaočkovanej na optickú denzitu 0,05 pozorovaný rýchlejší prechod do exponenciálnej fázy a optické denzity kultúr zaočkovaných na OD = 0,05 a OD = 0,1 sa vyrovnali približne 2x rýchlejšie, ako optické denzity kultúr zaočkovaných na OD = 0,01 a OD = 0,05. V dôsledku toho u niektorých kmeňov chýbala fáza, v ktorej došlo u týchto dvoch kultúr k prechodu do rovnakého stavu populácie.

Vybraným zdrojom uhlíka pre analýzu exprese génov bola glukóza, ktorá je pre kvasinky základným zdrojom uhlíka. Glukóza patrí medzi fermentatívne zdroje uhlíka, pričom v jej prítomnosti dochádza k vzniku tzv. Crabtree efektu (z angl. Crabtree effect), kedy kvasinky uprednostňujú fermentáciu pred respiráciou aj napriek tomu, že fermentácia poskytuje menší energetický výťažok (menej ATP) (Pfeiffer a Morley, 2014). Rast kvasinkových populácií je však na glukózovom zdroji uhlíka rýchlejší, až kým nedôjde k jej vyčerpaniu a kvasinky prepínajú svoj metabolizmus na respiráciu, v ktorej spracovávajú vedľajšie produkty, ako sú nefermentatívne zdroje uhlíka – etanol či glycerol (Otterstedt a kol., 2004). Pri raste na glukóze vykazujú kvasinkové bunky tiež zvýšenú expresiu génov podporujúcich rezistenciu voči stresu či tvorbu zásobných karbohydrátov, čím umožňujú dlhšie prežitie kvasinkových buniek na glukózovom zdroji uhlíka (\*Rolland a kol., 2002).

Pre porovnanie bol ako druhý zdroj uhlíka vybraný glycerol/etanol, ktorý kvasinky spracovávajú prostredníctvom respirácie. Glycerol/etanol sú nefermentatívne zdroje uhlíka, ktorých katabolizmus prebieha v mitochondriách. Bunky, pre ktoré predstavuje zdroj uhlíka glycerol/etanol, majú „downregulované“ procesy, ako sú napr. ribozomálna biogenéza či metabolizmus membránových lipidov, čo svedčí o pomalšom raste populácie v týchto podmienkach (\*Xiberras a kol., 2019)

## 6.1. BY-Nop2p-GFP

Prvou fázou, pre ktorú boli pripravené kmene so značenými markerovými génmi, bola exponenciálna fáza. Pre túto fázu je typické aktívne delenie buniek a vysoká metabolická aktivita,

ktorá sa však prejavuje najmä v procesoch nutných pre delenie (\*“What are the Stages of the Bacterial Growth Curve?,” 2021).

Jedným z procesov so zvýšenou aktivitou v exponenciálnej fáze je translácia, pre ktorú je nutná tvorba ribozómov v jadierkovej štruktúre. Vybraným markerovým génom exponenciálnej fázy zapojeným do tohto procesu bol *NOP2* (výsledky v kap. 5.2.1). Jeho produkt, proteín Nop2, bol v oboch sledovaných prípadoch tekutých médií lokalizovaný v jadre/jadierku počas celej doby pozorovania, čo súhlasí s poznatkami literatúry a tiež z SGD databázy (de Beus a kol., 1994, www.yeastgenome.org). Podľa súhlasiacej očakávanej lokalizácie Nop2p v jadre sa dá predpokladať aj jeho súhlasná funkcia – tento proteín bunka využíva zrejme ako metyltransferázu zúčastňujúcu sa biogenézy ribozómov (Hong a kol., 1997). Analýza chovania kmeňa BY-Nop2p-GFP v tekutom médiu však preukázala výrazný rozdiel v množstve proteínu v bunke na začiatku kultivácie oproti jej koncu. V respiračnom médiu s obsahom glycerolu bol fluorescenčný signál Nop2p o niečo výraznejší v počiatočných hodinách, avšak výrazne sa neznižoval. V druhý deň pozorovania bolo viditeľné zníženie fluorescenčného signálu, ktorý následne ostával zdanlivo konštantný až do ukončenia experimentu. V médiu s obsahom glukózy bol fluorescenčný signál Nop2p takisto najvýraznejší v 1. deň pozorovania, a to už po 2 hodinách od inokulácie. V porovnaní s GM médiom bol tento signál násobne silnejší, čo je v súlade s očakávaním rýchleho nárastu bunkovej populácie. Ako bolo vyššie spomenuté, kvasinky na glukózovom zdroji uhlíka vykazujú rýchlejší rast, pre ktorý sú nutné procesy proteosyntézy prebiehajúce na ribozómoch, preto sú získané poznatky v zhode s literárnymi zdrojmi (Hong a kol., 1997; \*Xiberras a kol., 2019). Tento fakt potvrdzuje tiež výskyt deliacich sa buniek pozorovaných 2 – 4 hodiny po inokulácii buniek do YEG média, u ktorých viditeľne dochádza k deleniu jadier aj s obsahom Nop2p na pravdepodobne 2 identické dcérske bunky s identickým obsahom tohto proteínu (kap. 5.2.1.1., obr. 25).

Na základe pozorovaní expresie génu *NOP2* v tekutých kultúrach boli vybrané časy, v ktorých bola intenzita fluorescenčného žiarenia výrazne odlišná. V týchto časoch boli z tekutých kultúr odobrané vzorky biomasy, ktoré boli následne využité pre Western blot analýzu (kap. 5.3., obr. 77). Vzorky kmeňa BY-Nop2p-GFP boli z oboch médií odobrané v časoch 5, 26 a 47 hodín od začiatku kultivácie. Následná Western blot analýza potvrdila pozorované zmeny v množstve proteínu v bunkách, pričom preukázala, že najvyššia hladina proteínu bola práve v prvých hodinách rastu, kedy dochádzalo k aktívnemu deleniu buniek, teda po 5 hodinách kultivácie. Zároveň potvrdila, že k zvýšenej tvorbe Nop2p dochádza pri raste na glukóze, čo súhlasí s poznatkami získanými z literatúry, ako už bolo opísané vyššie. Signál zo vzoriek odobratých po 26 a 47 hodinách však viditeľný nebol, čo svedčí o príliš nízkej hladine proteínu.

Vďaka výrazným rozdielom v prvých hodinách rastu bol kmeň BY-Nop2p-GFP analyzovaný tiež počas rastu vo forme mikrokolónií na pevných médiách GM a YEG (kap. 5.4.1).

V prípade GM média boli výsledky zhodné s analýzou rastu v tekutom médiu, teda intenzita fluorescenčného signálu a množstvo proteínu sa výrazne nemenilo počas 11 dní pozorovania. Kolónie na tomto médiu postupne zväčšovali svoju veľkosť a nedochádzalo u nich k morfológickým zmenám. V prípade pevného YEG média bola veľkosť kolónií nemenná po dosiahnutí hraničnej veľkosti a nebola tiež pozorovaná výrazná fluorescencia Nop2p. Na rozdiel od tekutého YEG však medzi 6. a 11. dňom bol Nop2p v niekoľkých individuálnych bunkách lokalizovaný v cytoplazme, pričom v 11. deň bol fluorescenčný signál Nop2p takmer najslabší. Pravdepodobným dôvodom, pre ktorý nebol pozorovaný výrazný signál v prvých dňoch pozorovania je fakt, že podľa literatúry je Nop2p v kvasinkových bunkách produkovaný približne 30 minút pred začiatkom delenia buniek (de Beus a kol., 1994). Prvé pozorovanie fluorescencie v prípade mikrokolónií však prebehlo v tretí deň po vysiatí, od ktorého kolónie už výrazne nemenili svoju veľkosť. Mikrokolónie na pevnom médiu prechádzajú bifázovým rastom, počas ktorého je exponenciálna fáza veľmi krátka (približne 42 hodín), preto znížená intenzita fluorescenčného žiarenia, teda množstva Nop2p v bunkách, zodpovedá očakávaným výsledkom (Meunier a Choder, 1999)

## 6.2. BY-Tef4p-GFP

V nadväznosti na ribozomálne procesy bol v tejto práci vybraný ako markerový gén exponenciálnej fázy *TEF4* kódujúci translačný elongačný faktor. Pre jeho produkt, Tef4p, bola očakávaná cytoplazmatická lokalizácia v súvislosti s jeho funkciou, ktorá vedie k väzbe aminoacyl-tRNA k ribozómu (Kinzy a kol., 1994; Grousl a kol., 2013). Očakávať sa dá znova výraznejšia expresia v čase aktívneho delenia v súvislosti s produkciou proteínov. Analýza chovania kmeňa BY-Tef4p-GFP (kap. 5.2.2.) v tekutom GM médiu preukázala očakávanú rovnomernú cytoplazmatickú lokalizáciu. Fluorescenčný signál bol výrazný počas celého pozorovania, s postupom času sa zdá, že sa mierne zvyšoval. Vysvetlením môže byť predpoklad, že elongačný faktor kódovaný *TEF4* by mohol mať funkciu pri zvládaní oxidačného stresu. Podľa dostupnej literatúry obsahuje elongačný faktor eEF1B $\gamma$  glutatión viažucu sekvenciu a môže tak pomôcť bunke predísť poškodeniu oxidačným stresom (Olareswaju a kol., 2004).

V prípade teplotného šoku dochádza v kvasinkových bunkách rastúcich na glukóze k hromadeniu Tef4p do stresových granúl (Grousl a kol., 2013). Tvorba stresových granúl však bola v tejto práci pozorovaná pri raste na glukóze aj pri konštantnej teplote 28 °C a to v priebehu takmer celého rastu nerovnomerne medzi jednotlivými bunkami. Pozorovaná bola prevažne 1 stresová granula na bunku, pričom k najväčšiemu výskytu dochádzalo počas 2. dňa kultivácie v čase, kedy sa kultúry dostali do skorej stacionárnej fázy, pričom počas lag/log fáz bol Tef4p lokalizovaný v rozpustnej forme rovnomerne po celej cytoplazme. V neskorej stacionárnej fáze však znova prevládali bunky, ktoré neobsahovali stresové granule, ale rozpustnú formu Tef4p. To

môže svedčiť o tom, že na expresiu či lokalizáciu Tef4p nemusí mať vplyv len vysoká teplota, ale aj iné stresové podmienky, napr. zmena pH, ku ktorej dochádza pri prechode z acidickej do alkalickéj fázy rastu, pričom toto pH sa následne znova znižuje (Imai a Ohno, 1995). Množstvo Tef4p v bunke sa podľa fluorescenčného signálu v porovnaní s GM médiom zdanlivo znižovala, pričom v 1. deň kultivácie bol signál najsilnejší, čo môže súvisieť hlavne s rýchlejšim rastom na glukóze a potrebe aktívnej translácie.

Pre ďalšiu analýzu (kap. 5.3., obr. 77) boli z tekutých médií odobrané vzorky v časoch 25, 47 a 51 hodín od inokulácie. Intenzita fluorescenčného signálu Tef4p-GFP bola počas celej kultivácie vysoká v oboch médiách, avšak vo vybraných časoch sa kultúry nachádzali podľa všetkého v odlišných fázach a zároveň dochádzalo v YEG médiu k relokizácii proteínu do cytozolických granúl. Western blot analýza potvrdila, že v čase dochádzalo v oboch médiách len k miernej zmene hladiny Tef4p v bunkách. Zdá sa však, že v prípade GM média došlo v 3. deň oproti 1. dňu k veľmi miernemu zníženiu jeho hladiny, pričom v YEG médiu nastal opačný prípad a došlo k nárastu hladiny Tef4p v bunkách aj napriek tomu, že fluorescenčný signál sa javil slabší, čo bolo pravdepodobne spôsobené relokizáciou proteínu do cytozolických granúl.

Na základe uvedených rozdielov bolo chovanie kmeňa BY-Tef4p-GFP analyzované aj pri raste na pevných médiách vo forme mikrokolónií (kap. 5.4.2). Pozorovania sa v tomto prípade zhodovali s chovaním daného kmeňa v tekutých médiách, pričom na YEG médiu približne od 4. dňa kultivácie prevládali bunky, ktoré Tef4p obsahovali v agregovanej forme, naopak v 11. deň prevažovala znova rozpustná forma v cytoplazme súčasne s najnižším signálom.

V prípade Tef4p bol fluorescenčný signál vysoký počas celého pozorovania v prípade tekutých kultúr aj mikrokolónií na pevnom médiu a aj po opakovaných meraniach bolo ťažké nájsť vhodný čas expozície, aby boli rozdiely v intenzite signálu adekvátne pozorovateľné. Pred ďalšími analýzami by som preto experimenty zopakovala.

### **6.3. BY-Imd2p-GFP**

Tretím vybraným génom exponenciálnej fázy bol *IMD2* s funkciou v syntéze guanínových nukleotidov (Shaw a Reines, 2000). Literatúra v prípade expresie *IMD2* uvádza, že aktívna tvorba proteínu Imd2 nastáva najmä v deliacich sa bunkách a znižuje sa pri vstupe do stacionárnej fázy (DeRisi a kol., 1997). Kultivácia BY-Imd2p-GFP (kap. 5.2.3.) v tekutom GM médiu preukázala výsledky zhodné s literatúrou, a teda najviac Imd2p bunky obsahovali v prvotných fázach rastu, kedy u kultúr dochádzalo k aktívnemu zvyšovaniu optickej denzity. Najvyšší fluorescenčný signál bol zaznamenaný počas prvého dňa kultivácie, pričom následne sa so znižujúcimi dostupnými živinami v médiu množstvo Imd2p znižovalo. Toto pozorovanie súhlasí s výsledkami uvedenými v literatúre (Escobar-Henriques a kol., 2003).

Analýza chovania BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG médiu poskytla rovnaké výsledky. Podľa očakávania dochádzalo k tvorbe Imd2p najmä u deliacich sa buniek počas 1. dňa kultivácie, oproti ktorému v 3. deň kultivácie bol fluorescenčný signál minimálny. Oproti GM médiu bol signál počas celého pozorovania približne 2x silnejší, čo súhlasí s faktom, že v glukózovom médiu dochádza k rýchlejšiemu rastu populácie (Otterstedt a kol., 2004). Neočakávaným pozorovaním bol fakt, že v kultúre BY-Imd2p-GFP v tekutom YEG zaočkovanej na počiatočnú  $OD = 0,01$  nebol pozorovaný žiadny výraznejší fluorescenčný signál. Táto kultúra bola pozorovaná dvakrát kvôli bakteriálnej kontaminácii. 2. meranie prebiehalo v čerstvejšom médiu, preto aj optické denzity dosiahli vyššie hodnoty a kultúra sa dostala do stacionárnej fázy rýchlejšie než kultúry zaočkované na  $OD = 0,05$  a  $OD = 0,1$ . Preto v tomto prípade v konečnom dôsledku očakávané a pozorované množstvo proteínu súhlasia.

Pre ďalšie analýzy hladiny Imd2p boli v časoch 5, 26 a 47 hodín po inokulácii do tekutých médií odobrané vzorky pre Western blot (kap. 5.3., obr. 78). Na základe tejto analýzy je možné potvrdiť pozorovania z tekutých kultúr, kedy bola intenzita fluorescenčného signálu vyššia v glukózovom médiu. Podľa získaných výsledkov dochádzalo k znižovaniu hladiny Imd2p v bunkách spolu so znižovaním množstva nutričov v médiách a s rastom populácie. Zároveň je možné tvrdiť, že v každom analyzovanom čase bola hladina Imd2p vyššia v prípade YEG média.

Rozdiel v množstve proteínu v kmeni BY-Imd2p-GFP bol overený tiež pri kultivácii na pevných médiách (kap. 5.4.3). V prípade oboch médií bol signál takmer nemenný oproti tekutým médiám, vzhľadom k tvorbe 2 subpopulácií boli ale pozorované rozdiely medzi jednotlivými bunkami. K deleniu dochádza v U bunkách kolónií, preto sa dá predpokladať, že práve tieto bunky vykazovali silnejší fluorescenčný signál (Čáp a kol., 2012).

Ďalším rozdielom bolo zvýšenie fluorescenčného signálu v 11. deň kultivácie v prípade oboch médií, výraznejšie však v YEG médiu. To by mohlo zodpovedať tomu, že L bunky slúžia ako zdroj živín pre U bunky, preto kolónia mohla obsahovať viac aktívnejšie sa deliacich buniek súčasne so zvýšením množstva potrebných živín.

V každom prípade analýzy chovania kmeňa BY-Imd2p-GFP bola pozorovaná očakávaná lokalizácia tohto proteínu, a to v jeho rozpustnej forme v cytoplazme, ako to uvádza literatúra (Huh a kol., 2003).

#### **6.4. BY-Sah1p-GFP**

Posledným analyzovaným proteínom exponenciálnej fázy bol Sah1p, u ktorého bola očakávaná cytoplazmatická lokalizácia (Pitarch a kol., 2004). Funkciou Sah1p je hydrolýza AdoHcy v súvislosti s tvorbou lipidov, najmä fosfatidylcholínu a ergosterolu. Sah1p je dôležitý pre pohlavné aj vegetatívne rozmnožovanie, samotnú cytokinézu aj lipidové zloženie buniek (Tehlivets a kol., 2004).

Analýzu chovania kmeňa BY-Sah1p-GFP zobrazuje kapitola 5.2.4. V prípade kultivácie na oboch médiách ostala zachovaná cytoplazmatická lokalizácia podľa očakávaní. V tekutom YEG médiu sa však začal v starších kultúrach Sah1p koncentrovať do malých zhlukov v počte 1 na bunku alebo do niektorej z organel, pravdepodobne vakuoly. Kmeň BY-Sah1p-GFP vykazoval problémy s rastom na glukózovom médiu už po zaočkovaní na pevné médium po vybratí z hlbokomraziaceho boxu a následne po zaočkovaní do tekutého YEG média, v ktorom v prípade ceznočnej kultivácie vykazoval dlhú lag fázu a nedosiahol očakávanú optickú denzitu. Pre tento kmeň bolo preto meranie opakované viackrát, pričom bolo nutné optimalizovať čas, počas ktorého rástla bunková suspenzia, aby bolo následne možné pozorovať kultivácie počas stanoveného času.

Výrazným rozdielom oproti iným kmeňom bol tiež tvar buniek kmeňa BY-Sah1p-GFP. V počiatku rastu boli bunky v oboch médiách prevažne predĺženého oválneho tvaru (kap. 5.2.4.1., obr. 42; kap. 5.2.4.2., obr. 45). Ako už bolo vyššie spomenuté, Sah1p je dôležitý pre vegetatívne rozmnožovanie, preto je možné, že pripojením C-koncovej fluorescenčnej GFP značky ku génu *SAHI* došlo k ovplyvneniu jeho produktu a to spôsobilo dlhšiu lag fázu a zmenu tvaru buniek, resp. znížilo ich schopnosť deliť sa.

Markerový gén *SAHI* sa od ostatných génov líšil tým, že bol v o niečo väčšom množstve exprimovaný v GM médiu namiesto YEG média, čo bolo v experimentoch viditeľné aj napriek tomu, že v tejto práci sú uvedené výsledky s odlišnou expozíciou. Glycerol tvorí kosť membránových lipidov, glycerofosfolipidov, medzi ktoré patrí aj fosfatidylcholín. Ten predstavuje pre kvasinkové bunky najabundantnejší membránový lipid esenciálny pre bunkový rast (\*de Kroon a kol., 2013). Keďže Sah1p je dôležitý v procese tvorby fosfatidylcholínu, zvýšená hladina tohto proteínu práve v GM médiu môže svedčiť o jeho zvýšenej aktivite, s čím súhlasí aj dlhšia exponenciálna fáza tekutých kultúr BY-Sah1p-GFP v tomto médiu aj napriek tomu, že nárast biomasy bol v tomto prípade pomalší než v prípade iných kmeňov.

Aj keď expresia *SAHI* sa v odlišných médiách líšila, kvôli zhoršenej schopnosti rastu a tým pádom náročnejšej kultivácii nebol kmeň BY-Sah1p-GFP vybraný pre ďalšie analýzy pre účely tejto práce.

## 6.5. BY-Eht1p-GFP

Počas diauxie bola sledovaná expresia génu *EHT1* zodpovedného za bunkovú detoxifikáciu prostredníctvom esterifikácie etylesterov vznikajúcich ako vedľajšie produkty fermentácie (Saerens a kol., 2006; Knight a kol., 2014). Vzhľadom k jeho funkcii je tento gén exprimovaný v čase, kedy bunka prepína svoj metabolizmus a dochádza k respirácii, teda po vyčerpaní primárneho zdroja uhlíka (napr. glukózy). V tomto čase sa kvasinkové populácie

dostávajú do fázy diauxického a postdiauxického posunu, preto bola očakávaná zvýšená hladina Eht1p v bunkách práve v tejto fáze rastu (\*Matmati a Hannun, 2008).

Kultivácia BY-Eht1p-GFP (kap. 5.2.5.) v tekutých médiách preukázala v oboch prípadoch nárast obsahu Eht1p v bunkách približne po 24 hodinách kultivácie, kedy sa kvasinkové populácie dostali do diauxického posunu, resp. počiatku stacionárnej fázy v prípade YEG média. Tieto pozorovania sú v súlade s vyššie popísanými poznatkami literárnych zdrojov.

V prípade Eht1p bola pozorovaná rôzna lokalizácia. Literatúra uvádza možnú lokalizáciu vo viacerých organelách, vrátane endoplazmatického retikula, mitochondrií, spomínaná je aj jeho agregácia v lipidových kvapôčkach (Zahedi a kol., 2006; Zhu a kol., 2019). V prípade kultúr v GM médiu bola lokalizácia Eht1p počas celého rastu rovnaká, a to pravdepodobne v endoplazmatickom retikule. Kultúry rastúce v YEG médiu vykazovali rôznu, prevažne organelovú lokalizáciu Eht1p, pozorovateľné boli pravdepodobne aj lipidové kvapôčky, najmä v starších bunkách sa však zdalo, že proteín Eht1 by mohol byť lokalizovaný aj v cytoplazme.

Keďže kmeň BY-Eht1p-GFP nevykazoval zjavné rozdiely oproti očakávaným predpokladom, pre ďalšie analýzy nebol použitý.

## 6.6. BY-Ssa3p-GFP

Stacionárna fáza predstavuje pre kvasinky čas, kedy boli z média vyčerpané takmer všetky živiny a populácie prechádzajú do tzv. chronologického starnutia. Typickým je v tomto čase hromadenie zásobných látok, tvorba subpopulácií s odlišnou fyziológiou a metabolizmom a tiež expresia stresových génov (\*Herman, 2002; \*Palková a kol., 2014). Medzi takéto gény patrí aj *SSA3*, kódujúci cytozolický proteín Ssa3, regulujúci iné HSP proteíny. Experimenty v glukózovom médiu tiež uvádzajú, že expresia tohto génu je extrémne nízka (Werner-Washburne a kol., 1987; Becker a kol., 1996).

V súlade s týmito zisteniami bola v tekutých kultúrach (kap. 5.2.6.) v YEG médiu pozorovaná extrémne nízka hladina Ssa3p v bunkách, pričom k jeho tvorbe dochádzalo až v neskorej stacionárnej fáze a len v subpopulácii starších buniek. Podobné výsledky nastávali aj v prípade GM média, kedy však dochádzalo k zvýšenej tvorbe tohto proteínu a to už približne od 24. hodiny kultivácie. Zároveň však rovnako, ako v prípade YEG média, dochádzalo k hromadeniu Ssa3p najmä v subpopulácii starších buniek. Podľa očakávania bol Ssa3p lokalizovaný počas celého experimentu v cytoplazme, a to v prípade oboch zdrojov uhlíka.

Pre následnú Western blot analýzu (kap. 5.3., obr. 79) hladiny Ssa3p v bunkách boli vzorky odobrané z tekutých kultúr v časoch 27, 47 a 51 hodín po inokulácii. Podľa tejto analýzy bol obsah Ssa3p v bunkách rastúcich v GM médiu násobne vyšší než v bunkách rastúcich v YEG médiu, a to v každom analyzovanom čase. V YEG médiu zároveň dochádzalo k tvorbe Ssa3p až

počas 3. dňa kultivácie. Všetky tieto výsledky sú zhodné s pozorovaniami z predošlých experimentov a tiež s publikovanými poznatkami.

Výrazné rozdiely v expresii *SSA3* boli overené tiež vo forme mikrokolónii na pevných médiách, v ktorých dochádzalo k rovnakému vývoju populácií v súvislosti s tvorbou *Ssa3p* a zároveň bola potvrdená tvorba v subpopulácii starších, neaktívnych buniek (kap. 5.4.4.).

Dôvodom aktívnejšej expresie v GM médiu by mohol byť fakt, že v tomto médiu kvasinky nevyužívajú fermentáciu, ktorá je pre nich primárnym zdrojom energie. Glycerol/etanol predstavujú pre kvasinky nefermentatívne zdroje uhlíka spracovávané respiráciou, čím môže rýchlejšie dochádzať k tvorbe stresových podmienok, napr. etylesterov vznikajúcich pri fermentácii etanolu, ktoré sú vo vysokej koncentrácii pre kvasinky toxické (Saerens a kol., 2006; Knight a kol., 2014). Z hľadiska funkcie *Ssa3p* je tiež známa regulácia transkripcie HSP génov či translokácia proteínov do bunkových organel, napr. mitochondrií, preto je možné, že v prípade respiračného média je v týchto procesoch aktívnejší než v YEG médiu (Murakami a kol., 1988; Stone a Craig, 1990). Pozorované rozdiely a ich dôvod sa javí ako vhodná téma ďalších experimentov.

## 6.7. BY-Hsp12p-GFP

Hsp12p je tzv. proteínom teplotného šoku, ktorý sa v bunke hromadí s prechodom do stacionárnej fázy v závislosti na rôznych stresových podmienkach, ktorými môže byť vysoká osmolarita, oxidatívny stres, nedostatok glukózy či zmena teploty (Praekelt a Meacock, 1990; Siderius a kol., 1997). Hsp12p môže mať rôznu bunkovú lokalizáciu. Primárne je hromadený v cytoplazme, pozorovaná bola však aj organelová či membránová lokalizácia, nebola však zistená jeho lokalizácia do mitochondrií a peroxizómov (Garay-Arroyo a kol., 2000; Welker a kol., 2010).

Analýza expresie génu *HSP12* v tekutých médiách vykazovala vysokú koncentráciu tohto proteínu na oboch zdrojoch uhlíka a to počas celého experimentu (kap. 5.2.7.). Približne od 24. hodiny od inokulácie bolo množstvo Hsp12p v bunke zdanlivo nemenné, viditeľné boli však rozdiely v jeho koncentrácii medzi 2 bunkovými subpopuláciami, a to najmä v YEG médiu. Z tohto pozorovania je možné usúdiť, že k tvorbe proteínu Hsp12 dochádza počas stacionárnej fázy najmä v starších, neaktívnych bunkách. Jeho vysoká koncentrácia v oboch prípadoch je v súlade s publikovanými dátami, ktoré opisujú jeho funkciu pri rôznych typoch stresových podmienok.

Z hľadiska lokalizácie proteínu je možné potvrdiť jeho cytoplazmatickú lokalizáciu, možná je tiež jeho organelová lokalizácia, ktorú však kvôli vysokému fluorescenčnému signálu v jednotlivých bunkách nie je možné určiť konkrétne. Oproti literatúre však nebola v žiadnom čase pozorovaná jeho relokalizácia do plazmatickej membrány.



Keďže hladina Hsp12p bola v oboch médiách vysoká, až porovnateľná a neboli pozorované žiadne nesúhlasiace zmeny oproti publikovaným dátam, tento proteín nebol ďalej analyzovaný.

### **6.8. BY-Hsp104p-GFP**

Proteín Hsp104 patrí spolu s Hsp12p do skupiny tzv. proteínov tepelného šoku, k tvorbe ktorého dochádza v bunkách vystavených nepriaznivým podmienkam. Jeho hlavnou funkciou je renaturácia agregovaných proteínov v spolupráci s proteínmi zo skupiny HSP70 (Sathyanarayanan a kol., 2020). Syntetizovaný je najmä v stacionárnej fáze v prípade fermentatívnych podmienok, avšak v prípade respiračných médií bola pozorovaná jeho konštitutívna syntéza (Sanchez a kol., 1992). Z týchto dát bola predpokladaná jeho lokalizácia v cytoplazme či v granulách v interakcii s agregovanými proteínmi.

Analýza vo forme tekutých kultúr potvrdila popisované dáta (kap. 5.2.8.). V tekutom YEG médiu bol Hsp104p lokalizovaný do granúl, čo nasvedčuje jeho interakcii s proteínmi, ktoré počas stacionárnej fázy podstupujú renaturáciu. V neskorších fázach dochádzalo spolu so zvyšovaním hustoty bunkovej populácie k rozpúšťaniu týchto agregátov a postupne bolo pozorované väčšie množstvo buniek, ktoré tento proteín obsahovali v rozpustnej forme, z čoho je možné predpokladať, že dochádzalo k aktivácii stresových proteínov nutných pre prežívanie buniek v stacionárnej fáze. Intenzita fluorescenčného signálu sa výrazne nemenila a bola relatívne vysoká počas celého experimentu. V prípade respiračného GM média bol proteín Hsp104 pozorovaný konštantne vo forme rozpustného cytozolického proteínu, pričom so zvyšujúcou sa optickou denzitou a časom kultivácie bol pozorovateľný mierny nárast jeho koncentrácie.

Výsledky získané analýzou tekutých kultúr boli overené Western blot analýzou (kap. 5.3., obr. 79). Vzorky boli odobrané v časoch 24, 30 a 48 hodín po inokulácii, kedy sa rozdiely medzi médiami, ale aj počas rastu zdali najvyššie. Táto analýza potvrdila, že v glukózovom médiu nedochádzalo k výraznému zvyšovaniu koncentrácie proteínu, oproti tomu v respiračnom médiu s obsahom glycerolu bol zjavný nárast množstva proteínu so zvyšujúcim sa časom a hustotou kultúry.

Rozdiely v lokalizácii a množstve Hsp104p boli následne overené vo forme mikrokolónií na pevných médiách (kap. 5.4.5.), pričom v prípade pevného YEG bol pozorovaný rovnaký trend, ako pri prvých analýzach, teda s vyšším časom kultivácie dochádzalo k rozpúšťaniu proteínu z agregátov do cytoplazmy. V prípade pevného GM bola však intenzita fluorescenčného signálu nižšia a zároveň dochádzalo k aktívnejšej tvorbe proteínových agregátov. V 11. deň bol naopak Hsp104p lokalizovaný v niektorej z organel, pravdepodobne vo vakuole, čo by mohlo byť znakom aktívnej autofágie. Rozličná lokalizácia Hsp104p tiež zodpovedá tvorbe 2 subpopulácií

buniek s rôznou fyziológiou a metabolizmom v kolónii a napovedá, že čím staršie bunky sú, tým pravdepodobnejšia u nich bude cytozolická lokalizácia proteínu Hsp104.

## 6.9. BY-Cyc1p-GFP

Cyc1p je mitochondriálny izo-1-cytochróm c, ktorého úlohou je väzba elektrónu a jeho presun k cytochrómu c (Allen a kol., 1995). Publikované dáta popisujú expresiu *CYCI* v závislosti na prítomnosti glukózy, prísunu kyslíka, ale aj veľkosti inokula. Konečná lokalizácia Cyc1p by mala byť v medzimembránovom priestore mitochondrií, avšak SGD databáza uvádza cytoplazmatickú lokalizáciu (Sherman a kol., 1965, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

Analýza rastu BY-Cyc1p-GFP v tekutých kultúrach (kap. 5.2.9.) v YEG médiu preukázala expresiu zhodnú s literatúrou, teda Cyc1p bol v bunkách produkovaný v prítomnosti glukózy a zároveň v závislosti na veľkosti počiatočného inokula, vzhľadom k tomu, že v kultúre zaočkovanej na OD = 0,01 nebol pozorovaný žiadny zaznamenateľný signál. V ostatných 2 kultúrach bola intenzita signálu zdanlivo zhodná. V GM médiu bol pozorovaný opačný trend, teda dochádzalo k zvyšovaniu intenzity fluorescenčného signálu, avšak kmeň BY-Cyc1p-GFP mal v respiračnom médiu výrazné problémy s rastom a počas 3 dní kultivácie sa hustota kultúry takmer nemenila. Mierne problémy s rastom mal tento kmeň aj na glukózovom médiu, kde optická denzita dosiahla v tretí deň približne polovičnú hodnotu oproti iným kmeňom. Problémy s rastom viedli k opakovaniu experimentu primárne v glukózovom médiu aspoň trikrát, pričom medzi meraniami boli viditeľné aj mierne rozdiely v expresii *CYCI*. Pred ďalšími experimentmi preto navrhujem analýzu v tekutých kultúrach zopakovať.

Problémy s rastom mohli byť spôsobené pripojením GFP k sekvencii génu *CYCI*. Tento kmeň nezodpovedal očakávaniam vo viacerých ohľadoch, avšak jeho lokalizácia súhlasila s údajmi získanými z SGD, ktoré hovorili o cytoplazmatickej lokalizácii. To však nie je v súlade s funkciou Cyc1p v respiračnom reťazci. Kvôli problémom s kultiváciou nebol tento kmeň ďalej analyzovaný. Z tohto dôvodu a tiež kvôli rozdielom v publikovaných dátach je vhodná ďalšia analýza tohto proteínu nielen z hľadiska expresie, ale aj jeho funkcie a bunkovej lokalizácie.

## 7. Záver

1. V literárnom úvode boli stručne spracované súčasné poznatky o raste kvasinkových mnohobunkových populácií, priebehu ich chronologického starnutia a vybraných génov, u ktorých bola predpokladaná špecifická expresia v priebehu rastu.

2. Bolo pripravených a overených 8 kmeňov, u ktorých boli vybrané markerové gény fúzované s fluorescenčnou značkou GFP. Kmene sú odvodené od materského laboratórneho kmeňa BY4742 kvasinky *S. cerevisiae*. Do analýz bol zaradený 9. kmeň BY-Eht1p-GFP pripravený a overený Mgr. Janou Maršíkovou.

3. Rast týchto kmeňov, expresia značených génov a následná lokalizácia ich produktov bola analyzovaná počas 3 dní rastu v tekutých médiách, ktoré obsahovali glukózu alebo glycerol/etanol ako zdroj uhlíka. Výsledky z jednotlivých médií boli porovnané medzi sebou. Viditeľné rozdiely v expresii na rôznych zdrojoch uhlíka preukázali kmene BY-Nop2p-GFP, BY-Tef4p-GFP, BY-Imd2p-GFP, BY-Sah1p-GFP, BY-Ssa3p-GFP, BY-Hsp104p-GFP a BY-Cyc1p-GFP. Gény *NOP2*, *IMD2*, *SSA3* boli exprimované v špecifickej fáze podľa predikcie a mohli by slúžiť ako markerové gény rastových fáz. U kmeňov BY-Tef4p-GFP a BY-Hsp104p-GFP dochádzalo k expresii počas celého rastu, zároveň u nich bola pozorovaná odlišná lokalizácia proteínu v závislosti na zdroji uhlíka. Kmene BY-Sah1p-GFP a BY-Cyc1p-GFP vykazovali problémy s rastom, preto neboli ďalej analyzované. Ostatné kmene boli vybrané na ďalšiu analýzu.

5. Rozdiely v množstve exprimovaných proteínov v čase a pri rozličných zdrojoch uhlíka boli vizualizované Western blot analýzou. Výsledky u každého z vybraných kmeňov potvrdili rozdiely v hladine prítomného proteínu v čase, kmeň BY-Tef4p-GFP vykazoval takmer konštantnú hladinu proteínu počas celého rastu v oboch médiách, aj keď sa výrazne zmenila jeho lokalizácia a fluorescenčný signál sa zdal slabší.

4. Vybrané kmene boli analyzované počas rastu vo forme mikrokolónií na zhodných pevných médiách. Pozorovania sa výrazne nelíšili od pozorovaní v tekutých kultúrach a zároveň priblížili expresiu daných génov v čase v jednotlivých subpopuláciách.

6. V kapitole „Diskusia“ boli nadobudnuté poznatky porovnané a analyzované s využitím dostupnej literatúry. Vyzdvihnuté boli kmene, u ktorých dochádzalo k neočakávanej lokalizácii proteínov alebo k expresii v odlišnej než predpokladanej fáze. U väčšiny kmeňov boli publikované poznatky potvrdené, prípadne rozšírené.

## Bibliografia

- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A.D., Thomas, J.A., Meirelles, O., Jaetao, J.E., Benn, D., Ruby, S.W., Veenhuis, M., Madeo, F., Werner-Washburne, M., 2006. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J. Cell Biol.* 174, 89–100.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200604072>
- Allen, L.A., Zhao, X.J., Caughey, W., Poyton, R.O., 1995. Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c. *J Biol Chem* 270, 110–118.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.110>
- Alsuhaim, H., Vojisavljevic, V., Pirogova, E., 2012. Effects of Non-thermal Microwave Exposures on the Proliferation Rate of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast.
- Aragon, A.D., Rodriguez, A.L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, D., Tapia, P.H., Allen, C., Joe, R., Benn, D., Werner-Washburne, M., 2008. Characterization of Differentiated Quiescent and Nonquiescent Cells in Yeast Stationary-Phase Cultures [WWW Document]. *Molecular biology of the cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-07-0666>
- \*Arlia-Ciommo, A., Leonov, A., Piano, A., Svistkova, V., Titorenko, V.I., 2014. Cell-autonomous mechanisms of chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell* 1, 163–178. <https://doi.org/10.15698/mic2014.06.152>
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D., Daum, G., 1999. Identification and Characterization of Major Lipid Particle Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 6441–6448. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6441-6448.1999>
- Becker, J., Walter, W., Yan, W., Craig, E.A., 1996. Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4378–4386.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.16.8.4378>
- Belandia, B., Parker, M.G., 2000. Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* 275, 30801–30805.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000484200>
- Bonawitz, N.D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., Shadel, G.S., 2007. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab.* 5, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.009>
- \*Bösl, B., Grimminger, V., Walter, S., 2006. The molecular chaperone Hsp104—A molecular machine for protein disaggregation. *Journal of Structural Biology* 156, 139–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.02.004>
- Bourgeois, G., Ney, M., Gaspar, I., Aigueperse, C., Schaefer, M., Kellner, S., Helm, M., Motorin, Y., 2015. Eukaryotic rRNA Modification by Yeast 5-Methylcytosine-Methyltransferases and Human Proliferation-Associated Antigen p120. *PLoS One* 10, e0133321.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133321>
- Brejning, J., Arneborg, N., Jespersen, L., 2005. Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 98, 261–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02472.x>
- Brejning, J., Jespersen, L., Arneborg, N., 2003. Genome-wide transcriptional changes during the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 179, 278–294.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-003-0527-6>
- Burke, P.V., Raitt, D.C., Allen, L.A., Kellogg, E.A., Poyton, R.O., 1997. Effects of Oxygen Concentration on the Expression of Cytochrome c and Cytochrome c Oxidase Genes in Yeast\*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 14705–14712. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14705>
- Burstein, M.T., Kyrjakov, P., Beach, A., Richard, V.R., Koupaki, O., Gomez-Perez, A., Leonov, A., Levy, S., Noohi, F., Titorenko, V.I., 2012. Lithocholic acid extends longevity of chronologically aging yeast only if added at certain critical periods of their lifespan. *Cell Cycle* 11, 3443–3462.  
<https://doi.org/10.4161/cc.21754>

- Burtner, C.R., Murakami, C.J., Kennedy, B.K., Kaerberlein, M., 2009. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle* 8, 1256–1270.
- Butler, A.J., Ordahl, C.P., 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 19, 296–306. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.296>
- Čáp, M., Stěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., Palková, Z., 2012. Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol. Cell* 46, 436–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.001>
- \*Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., 2014. The many ways to age for a single yeast cell. *Yeast* 31, 289–298. <https://doi.org/10.1002/yea.3020>
- \*Dakik, P., Titorenko, V.I., 2016. Communications between Mitochondria, the Nucleus, Vacuoles, Peroxisomes, the Endoplasmic Reticulum, the Plasma Membrane, Lipid Droplets, and the Cytosol during Yeast Chronological Aging. *Front Genet* 7, 177. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00177>
- \*Dawes, I.W., Perrone, G.G., 2020. Stress and ageing in yeast. *FEMS Yeast Research* 20. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz085>
- de Beus, E., Brockenbrough, J.S., Hong, B., Aris, J.P., 1994. Yeast NOP2 encodes an essential nucleolar protein with homology to a human proliferation marker. *Journal of Cell Biology* 127, 1799–1813. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1799>
- \*de Kroon, A.I.P.M., Rijken, P.J., De Smet, C.H., 2013. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Progress in Lipid Research* 52, 374–394. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.006>
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.680>
- Di Bartolomeo, F., Malina, C., Campbell, K., Mormino, M., Fuchs, J., Vorontsov, E., Gustafsson, C.M., Nielsen, J., 2020. Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 7524–7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918216117>
- Ding, M.-Z., Tian, H.-C., Cheng, J.-S., Yuan, Y.-J., 2009. Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. *J Biotechnol* 144, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.09.020>
- Dolz-Edo, L., van der Deen, M., Brul, S., Smits, G.J., 2019. Caloric restriction controls stationary phase survival through Protein Kinase A (PKA) and cytosolic pH. *Aging Cell* 18, e12921. <https://doi.org/10.1111/accel.12921>
- Enriquez-Hesles, E., 2020. A cell-nonautonomous mechanism of yeast chronological aging regulated by caloric restriction and one-carbon metabolism.
- Eraso, P., Cid, A., Serrano, R., 1987. Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage. *FEBS Lett* 224, 193–197. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80446-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80446-5)
- Escobar-Henriques, M., Collart, M.A., Daignan-Fornier, B., 2003. Transcription Initiation of the Yeast IMD2 Gene Is Abolished in Response to Nutrient Limitation through a Sequence in Its Coding Region. *MCB* 23, 6279–6290. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6279-6290.2003>
- Escobar-Henriques, M., Daignan-Fornier, B., 2001. Transcriptional Regulation of the Yeast GMP Synthesis Pathway by Its End Products. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1523–1530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007926200>
- \*Fabrizio, P., Longo, V.D., 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Fuge, E.K., Braun, E.L., Werner-Washburne, M., 1994. Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176, 5802–5813.
- \*Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., Vancura, A., 2010. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS* 14, 629–638. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0069>

- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcíarrubio, A., Covarrubias, A.A., 2000. Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common during Conditions of Water Deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5668–5674. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 350. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)50957-5)
- Ginovart, M., Prats, C., Portell, X., Silbert, M., 2011. Exploring the lag phase and growth initiation of a yeast culture by means of an individual-based model. *Food Microbiology, Predictive Modeling in Foods* 28, 810–817. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.004>
- Glover, J.R., Lindquist, S., 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73–82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81223-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81223-4)
- Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H., Schüller, C., 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* 21, 135–144. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.135>
- \*Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., Werner-Washburne, M., 2004. “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 187–206. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.187-206.2004>
- Grousl, T., Ivanov, P., Malcova, I., Pompach, P., Frydlova, I., Slaba, R., Senohrabkova, L., Novakova, L., Hasek, J., 2013. Heat Shock-Induced Accumulation of Translation Elongation and Termination Factors Precedes Assembly of Stress Granules in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 8, e57083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057083>
- \*Herman, P.K., 2002. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 5, 602–607. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00377-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00377-6)
- Homann, M.J., Poole, M.A., Gaynor, P.M., Ho, C.T., Carman, G.M., 1987. Effect of growth phase on phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 169, 533–539. <https://doi.org/10.1128/jb.169.2.533-539.1987>
- Hong, B., Brockenbrough, J.S., Wu, P., Aris, J.P., 1997. Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 17, 378–388. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.1.378>
- Hosaka, K., Yamashita, S., 1984. Regulatory role of phosphatidate phosphatase in triacylglycerol synthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 796, 110–117.
- Huang, E.L., Orsat, V., Shah, M.B., Hettich, R.L., VerBerkmoes, N.C., Lefsrud, M.G., 2012. The temporal analysis of yeast exponential phase using shotgun proteomics as a fermentation monitoring technique. *J Proteomics* 75, 5206–5214. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.005>
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O’Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691. <https://doi.org/10.1038/nature02026>
- Hyle, J.W., Shaw, R.J., Reines, D., 2003. Functional Distinctions between IMP Dehydrogenase Genes in Providing Mycophenolate Resistance and Guanine Prototrophy to Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 278, 28470–28478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303736200>
- Imai, T., Ohno, T., 1995. Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J Biotechnol* 38, 165–172. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)00130-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)00130-5)
- Jariani, A., Vermeersch, L., Cerulus, B., Perez-Samper, G., Voordeckers, K., Van Brussel, T., Thienpont, B., Lambrechts, D., Verstrepen, K.J., 2020. A new protocol for single-cell RNA-seq reveals stochastic gene expression during lag phase in budding yeast. *eLife* 9, e55320. <https://doi.org/10.7554/eLife.55320>
- Jiménez-Saucedo, T., Berlanga, J.J., Rodríguez-Gabriel, M., 2021. Translational control of gene expression by eIF2 modulates proteostasis and extends lifespan. *Aging (Albany NY)* 13, 10989–11009. <https://doi.org/10.18632/aging.203018>

- Kinzy, T.G., Ripmaster, T.L., Woolford, J.L., 1994. Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 $\lambda$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* 22, 2703–2707. <https://doi.org/10.1093/nar/22.13.2703>
- Knight, M.J., Bull, I.D., Curnow, P., 2014. The yeast enzyme Eht1 is an octanoyl-CoA:ethanol acyltransferase that also functions as a thioesterase. *Yeast* 31, 463–474. <https://doi.org/10.1002/yea.3046>
- Leonov, A., Feldman, R., Piano, A., Arlia-Ciommo, A., Lutchman, V., Ahmadi, M., Elsaser, S., Fakim, H., Heshmati-Moghaddam, M., Hussain, A., Orfali, S., Rajen, H., Roofigari-Esfahani, N., Rosanelli, L., Titorenko, V.I., 2017. Caloric restriction extends yeast chronological lifespan via a mechanism linking cellular aging to cell cycle regulation, maintenance of a quiescent state, entry into a non-quiescent state and survival in the non-quiescent state. *Oncotarget* 8, 69328–69350. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20614>
- Liu, Y., Yang, F., Li, S., Dai, J., Deng, H., 2018. Glutaredoxin Deletion Shortens Chronological Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* via ROS-Mediated Ras/PKA Activation. *J. Proteome Res.* 17, 2318–2327. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00012>
- Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R., Berger, S.L., 2001. Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293, 1142–1146. <https://doi.org/10.1126/science.1062322>
- \*Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaerberlein, M., Kennedy, B., 2012. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* 16, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002>
- Loya, T.J., O'Rourke, T.W., Reines, D., 2012. A genetic screen for terminator function in yeast identifies a role for a new functional domain in termination factor Nab3. *Nucleic Acids Res* 40, 7476–7491. <https://doi.org/10.1093/nar/gks377>
- Ma, P., Gonçalves, T., Marezek, A., Dias, M.C.L., Thevelein, J.M.Y. 1997, 1997. The lag phase rather than the exponential-growth phase on glucose is associated with a higher cAMP level in wild-type and cAPK-attenuated strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 3451–3459. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3451>
- MacLean, M., Harris, N., Piper, P.W., 2001. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* 18, 499–509. <https://doi.org/10.1002/yea.701>
- Malanovic, N., Streith, I., Wolinski, H., Rechberger, G., Kohlwein, S.D., Tehlivets, O., 2008. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, key enzyme of methylation metabolism, regulates phosphatidylcholine synthesis and triacylglycerol homeostasis in yeast: implications for homocysteine as a risk factor of atherosclerosis. *J Biol Chem* 283, 23989–23999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800830200>
- \*Mason, A.B., Dufour, J.P., 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1287–1298. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200010\)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200010)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I)
- \*Matmati, N., Hannun, Y., 2008. Thematic Review Series: Sphingolipids. ISC1 (inositol phosphosphingolipid-phospholipase C), the yeast homologue of neutral sphingomyelinases. *Journal of lipid research* 49, 922–8. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800004-JLR200>
- Meunier, J.-R., Choder, M., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast* 15, 1159–1169. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990915\)15:12<1159::AID-YEA441>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990915)15:12<1159::AID-YEA441>3.0.CO;2-D)
- Murakami, H., Pain, D., Blobel, G., 1988. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 107, 2051–2057. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2051>
- Olarewaju, O., Ortiz, P.A., Chowdhury, W.Q., Chatterjee, I., Kinzy, T.G., 2004. The Translation Elongation Factor eEF1B Plays a Role in the Oxidative Stress Response Pathway. *RNA Biology* 1, 89–94. <https://doi.org/10.4161/rna.1.2.1033>

- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L., 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* 5, 532–537. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400132>
- Palková, Z., Devaux, F., Icíková, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C., 2002. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* 13, 3901–3914. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-12-0149>
- Palková, Z., Forstová, J., 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of Cell Science* 113, 1923–1928. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1923>
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J., 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532–536. <https://doi.org/10.1038/37398>
- \*Palková, Z., Wilkinson, D., Váchová, L., 2014. Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Res.* 14, 96–108. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12103>
- Pan, Y., Shadel, G.S., 2009. Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density. *Aging (Albany NY)* 1, 131–145. <https://doi.org/10.18632/aging.100016>
- Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Barrajón Simancas, N., Bisschops, M.M.M., van den Brink, J., Solis-Escalante, D., Gallone, B., De Maeyer, D., van Bael, E., Wenseleers, T., Michiels, J., Marchal, K., Daran-Lapujade, P., Verstrepen, K.J., 2018. The Crabtree Effect Shapes the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase during the Switch between Different Carbon Sources. *mBio* 9, e01331-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01331-18>
- Pfeiffer, T., Morley, A., 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences* 1.
- Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., Gil, C., 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 4, 3084–3106. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400903>
- Pogoda, E., Tutaj, H., Pirog, A., Tomala, K., Korona, R., 2021. Overexpression of a single ORF can extend chronological lifespan in yeast if retrograde signaling and stress response are stimulated. *Biogerontology* 22, 415–427. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09924-z>
- Porro, D., Brambilla, L., Alberghina, L., 2003. Glucose metabolism and cell size in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 229, 165–171. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00815-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00815-2)
- Portell, X., Ginovart, M., Carbo, R., Gras, A., Vives-Rego, J., 2011. Population analysis of a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast in a batch culture by electric particle analysis, light diffraction and flow cytometry. *FEMS Yeast Res* 11, 18–28. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00682.x>
- Powell, C.D., Quain, D.E., Smart, K.A., 2003. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res* 3, 149–157. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00002-3)
- Praekelt, U.M., Meacock, P.A., 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet* 223, 97–106. <https://doi.org/10.1007/BF00315801>
- \*Rohde, J.R., Bastidas, R., Puria, R., Cardenas, M.E., 2008. Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 11, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.013>
- \*Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M., 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* 2, 183–201. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00084.x>
- Saerens, S.M.G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M., 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel



- Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4446–4456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512028200>
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., Lindquist, S., 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 11, 2357–2364.
- Sathyanarayanan, U., Musa, M., Bou Dib, P., Raimundo, N., Milosevic, I., Krisko, A., 2020. ATP hydrolysis by yeast Hsp104 determines protein aggregate dissolution and size in vivo. *Nat Commun* 11, 5226. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19104-1>
- \*Schüller, H.-J., 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43, 139–160. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0381-8>
- Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K.-D., 2013. Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic Acids Research* 41, 9062–9076. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt679>
- Shaw, R.J., Reines, D., 2000. *Saccharomyces cerevisiae* Transcription Elongation Mutants Are Defective in PUR5 Induction in Response to Nucleotide Depletion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7427–7437. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.20.7427-7437.2000>
- Shaw, R.J., Wilson, J.L., Smith, K.T., Reines, D., 2001. Regulation of an IMP Dehydrogenase Gene and Its Overexpression in Drug-sensitive Transcription Elongation Mutants of Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32905–32916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105075200>
- Sheff, M.A., Thorn, K.S., 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661–670. <https://doi.org/10.1002/yea.1130>
- Sherman, F., Stewart, J.W., Margoliash, E., Parker, J., Campbell, W., 1966. The structural gene for yeast cytochrome C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55, 1498–1504. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.6.1498>
- Sherman, F., Taber, H., Campbell, W., 1965. Genetic determination of iso-cytochromes c in yeast. *J Mol Biol* 13, 21–39. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80077-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80077-8)
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C., 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13207–13212. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100>
- Siderius, M., Rots, E., Mager, W.H., 1997. High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology* 143, 3241–3250. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3241>
- Solmaz, S.R.N., Hunte, C., 2008. Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *J Biol Chem* 283, 17542–17549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710126200>
- Stone, D.E., Craig, E.A., 1990. Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1622–1632. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.4.1622>
- Taylor, F.R., Parks, L.W., 1979. Triacylglycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relation to phospholipid synthesis. *Biochim Biophys Acta* 575, 204–214. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90022-5)
- Tehlivets, O., Hasslacher, M., Kohlwein, S.D., 2004. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS Lett* 577, 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.057>
- \*The Bacterial Growth Curve and the Factors Affecting Microbial Growth [WWW Document], n.d. . ThoughtCo. URL <https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692> (accessed 4.6.22).
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Wigler, M., 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277–287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)
- Traven, A., Jänicke, A., Harrison, P., Swaminathan, A., Seemann, T., Beilharz, T.H., 2012. Transcriptional profiling of a yeast colony provides new insight into the heterogeneity of

- multicellular fungal communities. *PLoS One* 7, e46243.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046243>
- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., Portela, P., 2010. Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *Eur J Cell Biol* 89, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.08.005>
- Váchová, L., Hatáková, L., Cáp, M., Pokorná, M., Palková, Z., 2013. Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 102485. <https://doi.org/10.1155/2013/102485>
- Váchová, L., KucEROVÁ, H., Devaux, F., Ulehlová, M., Palková, Z., 2009. Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* 11, 494–504.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01789.x>
- Váchová, L., Palková, Z., 2005. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* 169, 711–717. <https://doi.org/10.1083/jcb.200410064>
- Valouev, I.A., Fominov, G.V., Sokolova, E.E., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D., 2009. Elongation factor eEF1B modulates functions of the release factors eRF1 and eRF3 and the efficiency of translation termination in yeast. *BMC Mol Biol* 10, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-60>
- van Oevelen, C.J.C., van Teeffelen, H.A.A.M., van Werven, F.J., Timmers, H.T.M., 2006. Snf1p-dependent Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) recruitment and chromatin remodeling activities on the HXT2 and HXT4 promoters. *J Biol Chem* 281, 4523–4531.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M509330200>
- Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J., Zider, A., 1999. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development* 126, 4807–4816. <https://doi.org/10.1242/dev.126.21.4807>
- Vögtle, F.-N., Burkhart, J.M., Rao, S., Gerbeth, C., Hinrichs, J., Martinou, J.-C., Chacinska, A., Sickmann, A., Zahedi, R.P., Meisinger, C., 2012. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 11, 1840–1852. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021105>
- Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L.M., Longo, V.D., 2009. Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet.* 5, e1000467. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000467>
- Welker, S., Rudolph, B., Frenzel, E., Hagn, F., Liebisch, G., Schmitz, G., Scheuring, J., Kerth, A., Blume, A., Weinkauff, S., Haslbeck, M., Kessler, H., Buchner, J., 2010. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. *Mol Cell* 39, 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.001>
- Werner-Washburne, M., Craig, E.A., 1989. Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family. *Genome* 31, 684–689. <https://doi.org/10.1139/g89-125>
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E., Craig, E.A., 1987. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2568–2577. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.7.2568>
- \*What are the Stages of the Bacterial Growth Curve? [WWW Document], 2021. . Scientific Bioprocessing. URL <https://www.scientificbio.com/what-are-the-stages-of-the-bacterial-growth-curve/> (accessed 4.16.22).
- \*Xiberras, J., Klein, M., Nevoigt, E., 2019. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’ carbon source. *Biotechnology Advances, Microbial Engineering Biotechnologies* 37, 107378. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017>
- Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N., Meisinger, C., 2006. Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17, 1436–1450.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0740>
- Zakrajšek, T., Raspor, P., Jamnik, P., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*,

Pharmacoproteomics and Toxicoproteomics 74, 2837–2845.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.026>

Zaman, S., Lippman, S.I., Schnepfer, L., Slonim, N., Broach, J.R., 2009. Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol Syst Biol* 5, 245.

<https://doi.org/10.1038/msb.2009.2>

Zhu, J., Schwartz, C., Wheeldon, I., 2019. Controlled intracellular trafficking alleviates an expression bottleneck in *S. cerevisiae* ester biosynthesis. *Metab Eng Commun* 8, e00085.

<https://doi.org/10.1016/j.mec.2018.e00085>

\* sekundárne zdroje