

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Tereza Putalová

Malé signální molekuly u kvasinek
Small signaling molecules in yeast

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Libuše Váchová, CSc.

Praha, 2012

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce paní RNDr. Libuši Váchové, CSc. za její nekonečnou trpělivost a vstřícnost.

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 5. 2012

Podpis

Seznam použitých zkratk.....	2
1. Abstrakt.....	3
2. Úvod.....	4
3. Amoniak.....	5
3.1. Mechanismus produkce amoniaku.....	6
3.2. Detekce signálu.....	8
3.3. Změna buněčného metabolismu a diferenciacce způsobená amoniakem.....	8
4. Alkoholy, estery a těkavé kyseliny.....	9
4.1 Farnesol.....	11
4.2 Další alkoholy.....	13
4.3 Estery.....	17
4.4 Kyseliny.....	19
5.CO₂.....	22
6. Závěr.....	25
7. Seznam použité literatury.....	26

Seznam použitých zkratk

ATP		adenosin trifosfát
cAMP		cyklický adenosin monofosfát
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
MAP	mitogen-activated protein kinase	
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
NADH		redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
PKA		proteinkináza a
SPS		senzor pro aminokyseliny
TOR	target of rapamycin	proteinkináza, která je cílem inhibitoru rapamycinu

1. ABSTRAKT

Kvasinky vylučují do prostředí metabolity, z nichž některé mohou mít signální funkci. Mezi malé signální molekuly patří kromě jiných molekul amoniak, alkoholy, estery, kyseliny a CO₂. Tyto látky mohou vznikat jako odpadní produkty metabolismu, např. některé alkoholy při katabolismu aminokyselin. Po vyloučení ovlivňují další/okolní buňky vazbou na receptory nebo působí na svůj cíl přímo v buňce a nebo mohou vytvářet koncentrační gradient případně gradient pH. Nové poznatky ukazují, že pomocí amoniaku se mohou kvasinky dorozumívat a diferenciovat v rámci kolonií. Farnesol, tyrosol a další molekuly používají kvasinky ke quorum sensing. Kvasinky rovněž sekretují vonné estery a mastné kyseliny. Vysoké koncentrace CO₂ spouštějí přepnutí z kvasinkových buněk na hyfální formu. Tato práce shrnuje dosavadní informace o vzniku a působení vybraných molekul (amoniak, alkoholy, estery, kyseliny a CO₂) v signalizaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, signalizace, amoniak, quorum sensing, CO₂

1. ABSTRACT

Yeasts excrete metabolites into the environment some of which may have a signal function. The small signalling molecules include ammonia, alcohols, esters, acids and CO₂ beside other molecules. These substances may be formed as waste products of metabolism, such as some alcohols in the catabolism of amino acids. After exclusion they influence other / surrounding cells by binding to receptors or they affect their target in the cell or may form a concentration gradient or a pH gradient. New findings show that using ammonia yeasts can communicate and may diversify within colonies. Farnesol, tyrosol and other molecules use the yeasts to quorum sensing. Yeasts also secrete aromatic esters and fatty acids. High concentrations of CO₂ trigger switch from yeasts to hypha. This paper summarizes existing information on the occurrence and impact of selected molecules (ammonia, alcohols, esters, acids and CO₂) signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, signaling, ammonia, quorum sensing, CO₂

2. ÚVOD

Kvasinky *Saccharomyces* a další taxony, které tvoří kvasinkovitá stadia, produkují množství metabolitů, z nichž některé jsou sekretované do média a mají signální funkce. Tato práce se zaměřuje na vybrané malé signální molekuly, které sekretuje modelový organismus kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a patogenní kvasinka *Candida albicans*.

Jako malé molekuly jsou označovány organické molekuly s nízkou molekulovou hmotností, nepatří tedy mezi ně polymerní molekuly. Mezi malé molekuly patří extracelulární signální molekuly, které jsou detekovány receptory, často pronikají membránou, váží se na biopolymery a mění tak jejich funkci. Tyto molekuly často vytváří dynamický koncentrační gradient nebo gradient pH a tak ovlivňují buňky nebo buněčné organely. Následkem působení těchto molekul může buňka změnit svůj metabolismus, vývoj a funkci. Nakonec je signál odstraněn a je ukončena buněčná odpověď.

Buňky kvasinkových kolonií vylučují amoniak za účelem komunikace, tato signální látka vyvolává změny, které jsou důležité pro dlouhodobé přežívání populace buněk v kolonii, pro jejich diferenciaci a odlišný osud v rámci kolonie (Palková et al., 1997; Váchová a Palková, 2005; Váchová et al., 2009). Farnesol a další alkoholy jsou kontinuálně uvolňovány do média během růstu populace a jejich množství je přímo úměrně buněčné hustotě. Po překročení prahové koncentrace vyvolají změnu genové exprese, se kterou je nejčastěji spojená změna morfologie (Hornby et al., 2001). Kvasinky vylučují také široké spektrum vonných látek s dosud ne zcela objasněnou funkcí, které jsou důležité pro chuť alkoholických nápojů (Saerens et al., 2010). Vysoká koncentrace CO₂ spouští přepnutí z kvasinkových buněk na hyfální formu (Klengel et al., 2005).

Tato práce shrnuje současné znalosti o signálních molekulách kvasinek sekretovaných do okolí, se zaměřením na nejznámější signální molekuly kvasinek – amoniak, alkoholy, estery, kyseliny a CO₂.

Cíle této práce jsou:

- A. Zpracovat dostupnou literaturu a informace týkající se vybranných látek sekretovaných kvasinkami do prostředí, které slouží k signalizaci.
- B. Na základě dostupné literatury popsat jak tyto látky vznikají a podílí se na signalizaci.

3. Amoniak

Jednou z molekul, které mohou produkovat kvasinky, konkrétně kolonie různých druhů a rodů, je plynný amoniak (Palkova et al., 1997). Amoniak NH_3 je bezbarvý plyn dobře rozpustný ve vodě. Ve vodném roztoku může přijmout protony podle reakce $\text{H}^+ + \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_4^+$ za vzniku amonných iontů, kde je koncentrace jednotlivých látek v rovnováze. Tato rovnováha je popsána rovnicí $([\text{H}^+][\text{NH}_3])/[\text{NH}_4^+]=K_a$; disociační konstanta $K_a \approx 10^{-9,25}$. Vodný roztok má proto zásaditou reakci (Palková a Váchová., 2003). Amoniak fungující mezi koloniemi jako signál na dlouhou vzdálenost je koloniemi produkován v pulsech. Tato signální látka vyvolává v kolonii změny, které jsou důležité pro dlouhodobé přežívání populace v kolonii, pro diferenciaci buněk v rámci kolonie a nestejný osud buněk (Palková et al., 1997; Váchová a Palková, 2005; Váchová et al., 2009). Během růstu kolonií na agarovém médiu se mění pH okolí kolonie z kyselého na lehce zásadité a obráceně (Palková et al., 1997). Ihned po zaočkování kolonií je pozorován první krátký puls amoniaku, který je rychle následován acidifikací média (první acidickou fází). Následuje druhý výrazný puls amoniaku provázený alkalizací média (alkalická fáze), který je směřován k sousedním koloniím. Amoniaková signalizace vede k přechodné inhibici růstu kolonií na okrajích přiléhajících k sousední kolonii, což vede k asymetrickému růstu kolonií do volného prostoru. Později kolonie začínají opět růst, produkce amoniaku se postupně sníží, kolonie následně vstoupí do další acidické fáze (druhé acidické fáze). Počet pulsů amoniaku závisí na dostupnosti živin. (Palková et al., 1997; Palková et al., 2000). Mladá kolonie v první acidické fázi vystavená amoniaku (produkovanému sousední kolonií či z umělého zdroje) reaguje na tento signál vlastní produkcí amoniaku, což nakonec vede k přepnutí celé populace v kolonii v určitém teritoriu do fáze produkce amoniaku (Palková et al., 2000). Popsané chování se zdá být univerzální a široce rozšířené mezi odlišnými druhy kvasinek včetně rodů *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* (Palková et al., 1997).

Kromě popsané signalizace má amoniak další signální vlastnosti. Přírodní kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (dále jen *S. cerevisiae*) jsou schopny regulovaného dimorfního přechodu z kvasinkové formy na hyfální formy. Tento přechod na počátku vývoje mikrokolonie je indukován plynným amoniakem (nebo dalšími plynnými aminy), což vyústí v orientovaný růst hyf na okraji kolonie a následnému spojení protilehlých mladých mikrokolonií. Tímto způsobem se vytvoří větší komunita, která má proti menším mikrokoloniím výhodu (Vopálenská et al., 2010).

3.1. Mechanismus produkce amoniaku

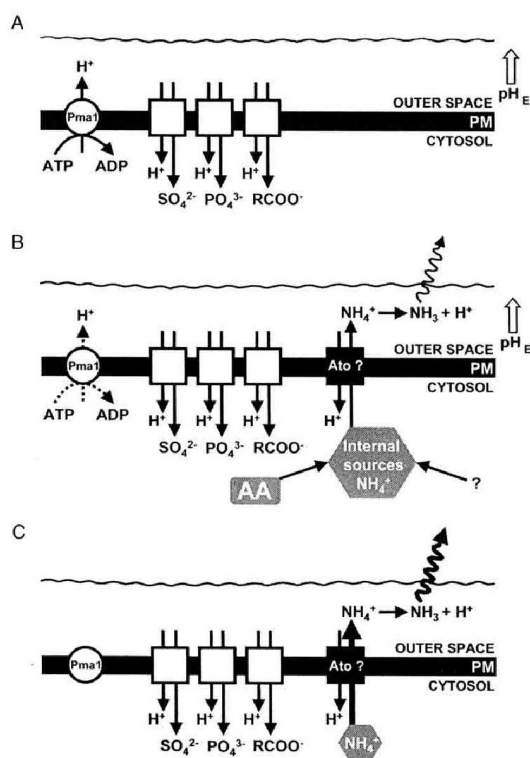
Jako zdroj amoniaku neslouží amonné ionty z vnějšího média, ale aminokyseliny z média (Palková et al., 1997, Zikánová et al., 2002). V raných fázích produkce amoniaku jsou uvolňovány aminokyseliny přítomné ve vakuolách a jsou metabolizovány jako první zdroj amoniaku. V pozdějších fázích produkce amoniaku vnitrobuněčná koncentrace aminokyselin opět stoupá a aminokyseliny se opět hromadí ve vakuolách (Palková et al., 2002).

Kolonie SH3 mutant neprodukuje amoniak a nejsou indukovány amoniakem přicházejícím z wild type kolonií (Palková et al., 1997). *SH3* gen kóduje protein lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu, který je zodpovědný za správnou lokalizaci několika kvasinkových permeáz pro aminokyseliny (Ljungdahl et al., 1999). Vedle permeáz specifických pro jednotlivé aminokyseliny je pro produkci amoniaku důležitá vysokokapacitní permeáza Gap1p importující aminokyseliny (Zikánová et al., 2002). Gap1p funguje jako senzor pro aminokyseliny (Cain et al., 2011). Když je aminokyselin nedostatek, ubiquitínované Gap1p původně určené do vakuoly směřují z multivezikulárního endosomu zpět na plasmatickou membránu (Roberg et al., 1997; Rubio-Teixeira et al., 2006). Dále senzor aminokyselin Sps (tvořený třemi proteiny Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p) v odpovědi na vnitrobuněčné nebo vnější aminokyseliny zahájí vnitrobuněčné signály regulující expresi genů několika enzymů metabolismu aminokyselin a permeáz pro aminokyseliny (Forsberg et al., 2001). Kolonie defektní buď v Ssy1 nebo Ptr3p nemají v době druhého pulsu žádnou produkci amoniaku (Zikánová et al. 2002).

Přehled vybraných reakcí, při kterých vzniká v buňce amoniak, je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: U kvasinek je produkce amoniaku spojovaná s vychytáváním, degradací aminokyselin (Palková et al., 1997), v tabulce jsou uvedeny některé reakce, při kterých může v buňkách vznikat amoniak nebo amonné ionty. Rovnice byly převzaty z internetových databází SGD, KEGG.

gen	Reakce, při kterých v buňkách vzniká amoniak, jsou katalyzovány enzymy kódovanými těmito geny. Rovnice reakcí:	zdroj
<i>GCVI</i>	glycin + tetrahydrofolát + NAD ⁺ <=> 5,10-methylentetrahydrofolát + NH ₃ + CO ₂ + NADH + H ⁺	Palková et al., 2002, KEGG
	S-aminomethyl-dihydrolipoylprotein + tetrahydrofolát <=> dihydrolipoylprotein + 5,10-methylentetrahydrofolát + NH ₃	
<i>SRYI</i>	(3S)-3-hydroxy-L-aspartát = NH ₄ ⁺ + oxaloacetát	Palková et al., 2002
<i>CHA1</i>	L-serin = pyruvát + NH ₃	Palková et al., 2002
	L-threonin = 2-oxobutanoát + NH ₃	
<i>GDH1-3</i>	L-glutamát + NAD ⁺ + H ₂ O <=> 2-oxoglutarát + NH ₃ + NADH + H ⁺	KEGG
<i>DUR1</i>	urea-1-carboxylate + 3 H ⁺ + H ₂ O <=> 2 CO ₂ + 2 NH ₄ ⁺	SGD
<i>DAL3</i>	(S)-ureidoglycolate + H ₂ O + 2 H ⁺ = CO ₂ + glyoxylát + 2 NH ₄ ⁺	SGD
<i>AMD1</i>	AMP + H ₂ O <=> IMP + NH ₃	KEGG



Obr. 1: Model produkce amoniaku v kvasinkových koloniích. Posloupnost kroků vedoucích k uvolnění amoniaku v koloniích. (A) H⁺-ATPáza stále exportuje protony z buňky, ale současný symport protonů spolu s SO₄²⁻, PO₄²⁻ a RCOO⁻ do cytosolu vede k počátečnímu zvýšení pH_E. (B) Díky postupnému vypnutí Pma1p a zapnutí NH₄⁺/H⁺ antiportu Ato transportéry pH_E dále stoupá. Vysoké vnější pH podporuje uvolňování plynného NH₃. (C) Zvyšující se export NH₄⁺ vede nakonec k vyčerpání vnitřních zdrojů NH₄⁺. PM, plasmatická membrána; Pma1, H⁺-ATPáza plasmatické membrány; Ato, domnělý NH₄⁺/H⁺ antiportéry (Palková et al., 2002); AA, aminokyseliny; pH_E, vnější pH. Převzato z Palková a Váchová (2003)

Děje, které se odehrávají na membráně kolonií během přechodu z acidické do alkalické fáze, vedou k importu protonů do buněk, a tím k následnému zvýšení vnějšího pH.

Tyto děje zahrnují postupnou represi exprese genu *PMA1* kódujícího membránovou H^+ -ATPázu (Palková et al., 2002) a snížení její aktivity (Palková et al., 2009), což vede ke snížení exportu protonů z buňky a zvýšení vnějšího pH. Takovéto snížení protonového gradientu může vést k částečné depolarizaci membrány. Později jsou aktivovány 3 homologní proteiny Ato1p, Ato2p, Ato3p, které zajišťují export amonných iontů z buňky u kolonií kvasinky *S. cerevisiae*. Skutečnost, že produkce NH_4^+/NH_3 je závislá na vnějším pH, naznačuje, že Ato proteiny mohou fungovat jako NH_4^+/H^+ antiportéry. Aktivace Ato proteinů a export NH_4^+ , vede tedy k dalšímu zvyšování extracelulárního pH, které pak dovolí účinnou přeměnu NH_4^+ na nenabitý plynný NH_3 , který se šíří do okolí (Palková et al., 2002). Exprese *ATO* genů je indukována amoniakem (Řiřicová et al., 2007). Lokalizace a shlukování Ato1p v membránách závisí na pH (Řiřicová et al., 2007). Před obdobím, kdy je detekovatelná produkce NH_3 , jsou indukovány některé geny kódující transportéry pro sulfan, fosfát, karboxylové kyseliny a jejich indukce pokračuje během fáze produkce NH_3 (Palková et al., 2002).

Změny provázející produkci amoniaku jsou znázorněny na Obr. 1.

3.2. Detekce signálu

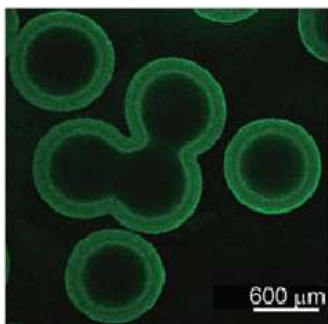
Amoniak vytváří dynamický koncentrační gradient a gradient pH. Amoniak není pravděpodobně detekován prostřednictvím buněčného receptoru na plasmatické membráně, ale spíše nenabitá molekula NH_3 , která proniká difúzí přímo do buněk, ovlivňuje vnitřní dráhy (vnitrobuněčné receptory a buněčné kompartmenty). Díky vysoké hodnotě pKa (9,25) je za většiny fyziologických podmínek hlavní formou NH_4^+ . Pokud však dojde k akumulaci vysoké koncentrace NH_3/NH_4^+ ve vodní vrstvičce na povrchu buněk, může dojít k průniku NH_3 do buňky. Množství NH_3 , které pronikne, záleží na extracelulárním i intracelulárním pH, které se projeví v poměru NH_3/NH_4^+ na obou stranách membrány (Palková a Váchová 2003).

3.3. Změna buněčného metabolismu a diferenciací způsobená amoniakem

Produkce NH_3 je doprovázena výraznými změnami genové exprese (Palková et al., 2002), včetně metabolického přeprogramování, které zahrnuje represi mitochondriální oxidativní fosforylace a části Krebsova cyklu, dále aktivaci metabolismu aminokyselin a nukleotidů a některých málo známých větví Krebsova cyklu (např. geny *ICL2*, *CIT3*, *FPH1*), aktivaci transportérů (geny *ATO1*, *ATO2*, *ATO3*, *JEN1*). Současně během vývoje kolonie klesá exprese genů spojených se stresem včetně obranných enzymů proti oxidativnímu stresu (Čáp, Váchová a Palková, 2010).

Signalizace amoniakem způsobuje u stárnoucích kolonií metabolické změny, které vedou k buněčné diferenciaci v rámci kolonie a které způsobí, že programovaná buněčná smrt podobná apoptóze proběhne pouze v centru kolonie (Váchová a Palková, 2005).

Podobně je specificky lokalizována i produkce Ato1p, exportéru amonných iontů, jehož produkce souvisí s amoniakovou signalizací, jak již bylo zmíněno. Toto bylo zjištěno na základě pozorování umístění buněk produkujících Ato1p označený GFP (viz Obr. 2). Jeho produkce je započata, když kolonie přepínají do alkalické vývojové fáze, a to synchronně pouze ve vnější povrchové vrstvě v celé mikrokolonii, to znamená, že je regulovaná podle přesného umístění buněk v kolonii. Tato vrstva má jednotnou tloušťku po celém povrchu kolonie nezávisle na průměru kolonie (u kolonií 650-100 μm) (Váchová et al., 2009).



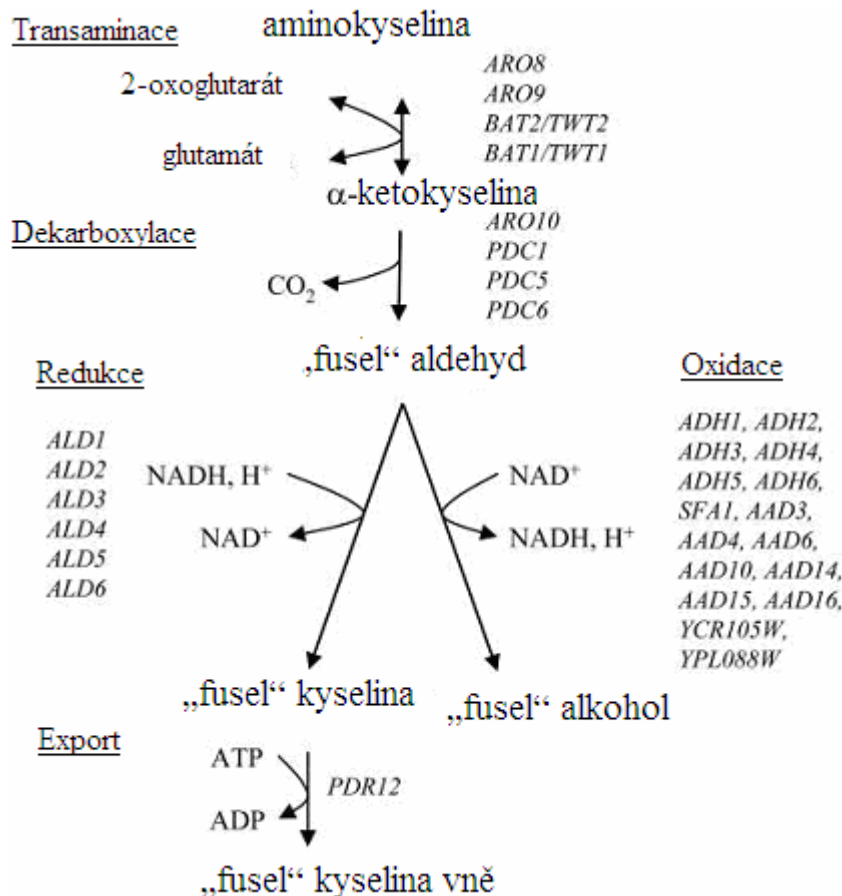
Obr. 2: Struktura Ato1p-GFP vrstev v různých skupinách mikrokolonií. Pohled ze spodu na skupinu kolonií starých 4 dny, objective 10 x. Převzato z Váchová et al., (2009)

Podobně se mezi buňkami na okraji nebo ve středu kolonie liší se i exprese některých dalších genů (*ICL2*, *CIT3*, *CTT1*, *PEX11*, *ATO2*, *ATO3*), jak bylo zjištěno pomocí změn koncentrace a aktivity proteinů kódovaných těmito geny. Chronologicky stárnoucí buňky ve středu kolonie si udržují vyšší hladinu různých obranných enzymů proti stresu (Váchová et al. 2009).

4. Alkoholy, estery a těkavé kyseliny

Dalšími látkami, které jsou schopny kvasinky produkovat, jsou různé alkoholy a od nich odvozené sloučeniny. Při výrobě alkoholických nápojů je převážně produkován ethanol, který je produkován z cukrů během fermentace. Nejdůležitějšími látkami tvořenými z aminokyselin, které ovlivňují vůni a chuť alkoholických nápojů, jsou další alkoholy a s nimi asociované estery a těkavé kyseliny (Styger et al., 2011). Více než dvouuhlíkaté alkoholy mohou vznikat z aminokyselin Ehrlichovou dráhou viz Obr. 3. V této dráze *S. cerevisiae* využívá jako zdroj uhlíku větvené aminokyseliny (valin, leucin, isoleucin) a aromatické aminokyseliny (tyrosin, tryptofan, fenylalanin) – jejich degradací vznikají odpovídající alkoholy („fusel alcohol“): isobutanol, isoamyl alkohol (=isopentanol), 2-methyl butanol,

tyrosol, tryptofol, fenylethanol (Dickinson et al., 2000; Saccharomyces genome database). Ehrlichova dráha se skládá ze tří kroků: 1. deaminace aminokyseliny na ketokyselinu. 2. dekarboxylace ketokyseliny na aldehyd. 3. redukce aldehydu na odpovídající „fusel“ alkohol (Dickinson et al., 2000).



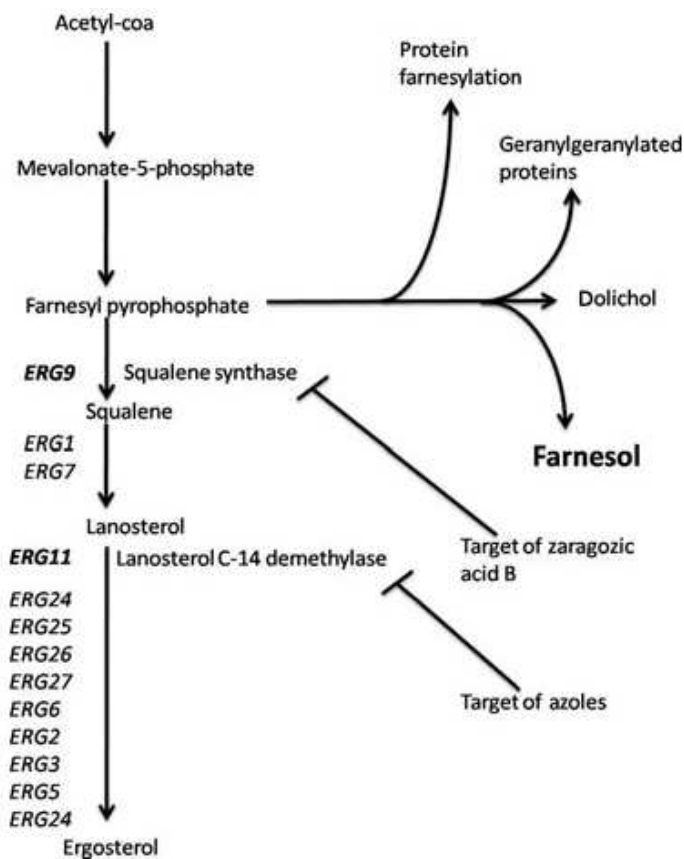
Obr. 3: Ehrlichova dráha. Katabolismus větvených aminokyselin (leucin, valin, a isoleucin), aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) a aminokyselin obsahujících síru (methionin) vede ke vzniku těkavých kyselin („fusel acids“) a alkoholů („fusel alcohols“). Geny kódující enzymy jednotlivých kroků jsou vyznačeny. Převzato Hazelwood et al., 2008

Místo redukce aldehydu na alkoholy za přítomnosti NADH může být aldehyd oxidován NAD⁺-dependentní reakcí za vzniku těkavých karboxylových kyselin (Vuralhan et al., 2003). Těkavé mastné kyseliny se tvoří také z acetyl-CoA při biosyntéze mastných kyselin. (Nykanin et al., 1986 - převzato z Styger et al., 2011). Všechny alkoholy vznikající Ehrlichovou dráhou v nízké koncentraci vyvolávají tvorbu hyf nebo pseudohyf u různých druhů kvasinek (Dickinson, 1996). Ke skupině látek popisovaných v této kapitole patří i signální molekuly známé z quorum sensing: tyrosol, tryptofol, fenylethanol.

Quorum sensing je regulace genové exprese v závislosti na hustotě populace. Mikroorganismy uvolňují chemické látky - quorum sensing molekuly, které jsou syntetizované ve fixním množství, které je úměrné koncentraci mikroorganismů v tekuté kultuře. Po dosažení prahové koncentrace tyto autoindukční molekuly aktivují nebo reprimují určité geny (Fuqua et al., 1994; Miller a Bassler, 2001), což má za následek indukci komplexní změny chování jako je například morfologické přepnutí z kvasinkovité na filamentární formu buněk (Hornby et al., 2001). U kvasinek se mluví o quorum sensing většinou ve spojení se změnami morfologie buněk (Chen et al., 2004; Hornby et al., 2001; Chen a Fink, 2006), přičemž signální dráhy jsou málo známé. Richard et al. (1996) popsal acetaldehyd, který slouží jako signální molekula při vysokých koncentracích buněk. Hornby et al. (2001) a Chen et al. (2004) popsali u *Candida albicans* (dále jen *C. albicans*) quorum sensing molekuly farnesol a tyrosol. Další quorum sensing molekuly *C. albicans* jsou MARS (Morphogenic autoregulatory substance – dosud neidentifikovaná látka) (Hazen et al., 1983) a farnesolová kyselina (Oh et al., 2001). U *S. cerevisiae* byly jako quorum sensing molekuly, které spouští změnu morfologie buněk při vysokých hustotách populace, identifikovány aromatické alkoholy fenylethanol a tryptofol (Chen a Fink, 2006).

4.1 Farnesol

Seskviterpenický alkohol farnesol vzniká z acetylCoA ergosterolovou biosyntetickou dráhou (Hornby et al., 2003) (viz Obr. 4). Farnesol je nejlépe charakterizovanou quorum sensing molekulou u *C. albicans*. Je kontinuálně uvolňován do média během růstu populace a přímo úměrný buněčné hustotě. Je známo, že při vysokých hustotách buněk v populaci blokuje přepnutí buněk z kvasinkovité na filamentární formu (Hornby et al., 2001).

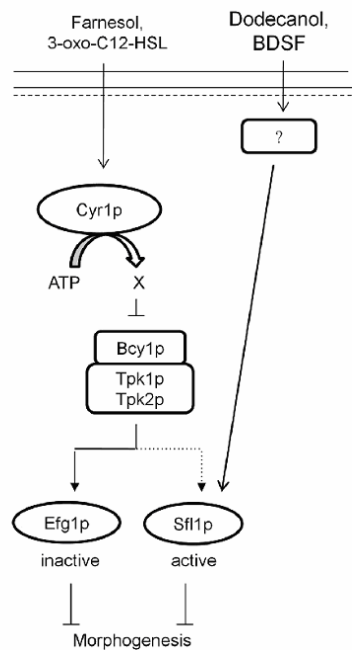


Obr. 4: Biosyntetická dráha ergosterolu. Cíle pro inhibitory zaragozovou kyseliny B (*ERG9*) a azoly (*ERG11*), při jejich působení vzroste produkce farnesolu. Převzato z Kruppa et al., 2009.

Han et al. (2011) předpokládá, že po dosažení určité koncentrace v médiu farnesol proniká přímo do buněk pasivní difúzí a ovlivňuje expresi genů nebo aktivuje specifické enzymy účastnící se v morfogenezi. U *C. albicans* by mohl jako senzor pro farnesol fungovat protein Chk1p (homolog histidin kinázy) (Kruppa et al., 2004).

Farnesol zřejmě inhibuje morfogenezi *C. albicans* potlačením jak MAP kinázové dráhy (Sato et al., 2004) tak cAMP-PKA dráhy (Davis-Hanna et al., 2008) a indukcí exprese genů potlačujících tvorbu hyf jako *TUP1* (Kebaara et al., 2008; Cao et al., 2005). Farnesol zřejmě přímo inhibuje adenylátcyklázu Cyr1p vazbou na katalytickou doménu, což vyvolává pokles cytoplasmatického cAMP (Hall et al. 2011) viz Obr. 5. Inaktivace cAMP-PKA dráhy vede krom jiného i k inhibici degradace DNA vazebného proteinu Nrg1p, a tím ke stabilizaci jeho funkce jako inhibitoru tvorby hyf (Lu et al. 2011).

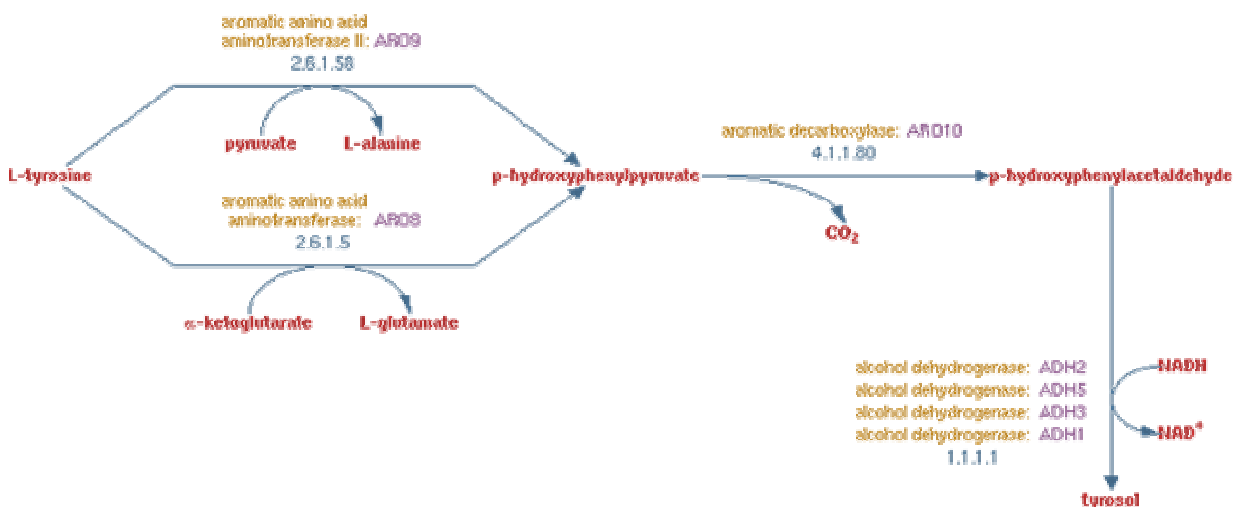
Změny metabolismu způsobené farnesolem vedou k tvorbě chlamydospor (Martin et al., 2005), zvyšuje se přepis genů spojený s obranou proti oxidačnímu stresu (Westwater et al., 2005). Vysoká koncentrace farnesolu inhibuje rozvoj mycelia a kvasinkové formy se lépe šíří do okolí (Alem et al., 2006).



Obr. 5: Schematické znázornění jak quorum-sensing molekuly ovlivňují *C. albicans* cAMP/PKA-dependentní signální kaskádu. (Převzato z Hall et al., 2011)

4.2 Další alkoholy

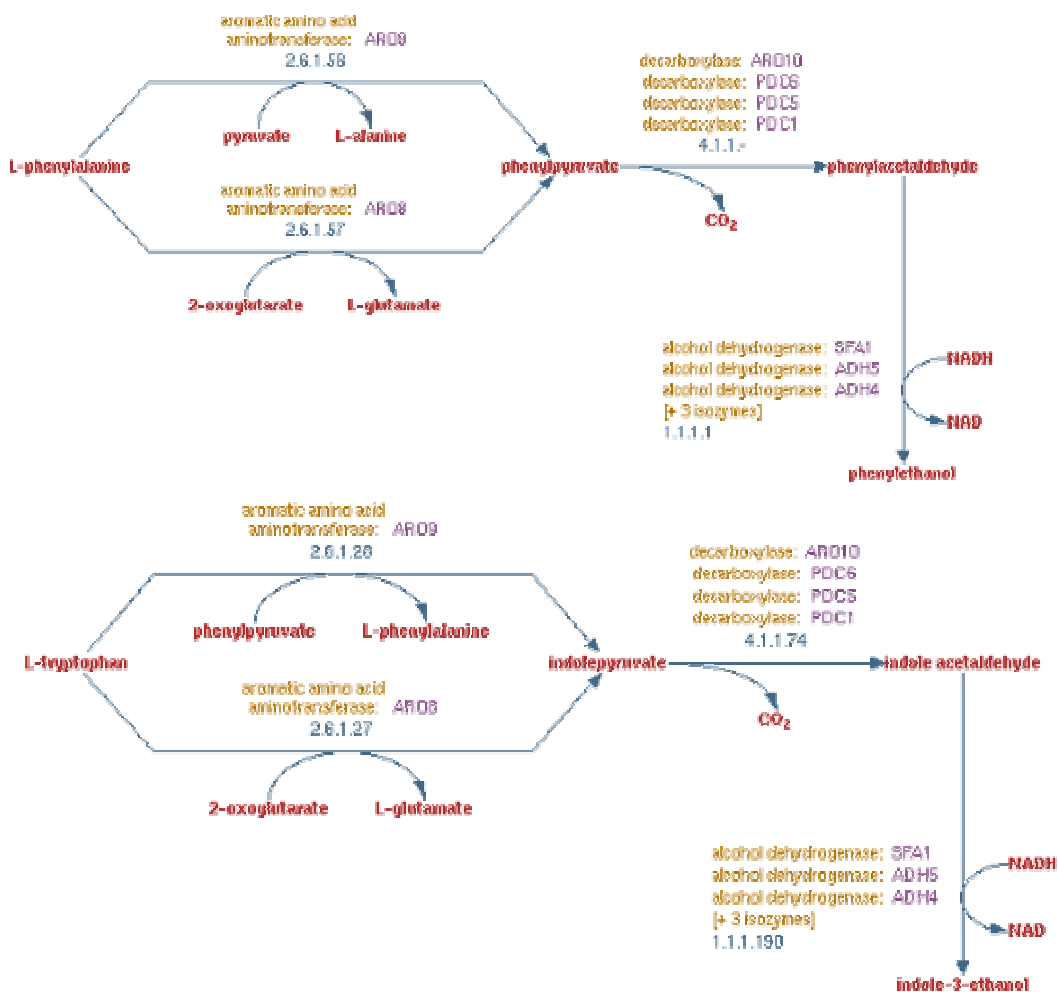
Další jev spojený s quorum sensing je prodloužení lag fáze po zředění kultury čerstvým médiem. Buňky začnou růst exponenciálně až po dosažení dostatečné koncentrace autostimulační látky. Chen et al. (2004) u *Candida albicans* zjistili, že toto zpoždění růstu po naředění nenastane, když se přidá kondicionované médium. Aktivní látkou v kondicionovaném médiu je tyrosol, uvolňovaný do média průběžně během růstu. V naředěných kulturách tyrosol urychluje tvorbu klíčnicích hyf za podmínek příznivých pro vláknitý růst. Tyrosol je 2-(4-hydroxyfenyl)ethanol odvozený z tyrosinu (Narayanan et al., 1976) pomocí Ehrlichovy dráhy (viz Obr. 6).



Obr. 6: Schéma vzniku tyrosolu u *C. albicans*, převzato z internetové databáze Candida genome database.

Chen et al. (2004) identifikovali mRNA, jejichž množství se snižovalo po naředění kultury, ale nesnižovalo se v případě, kdy byl současně přidán tyrosol. Mezi tyto mRNA patřily mRNA kódující proteiny účastníci se syntézy DNA a regulace buněčného cyklu.

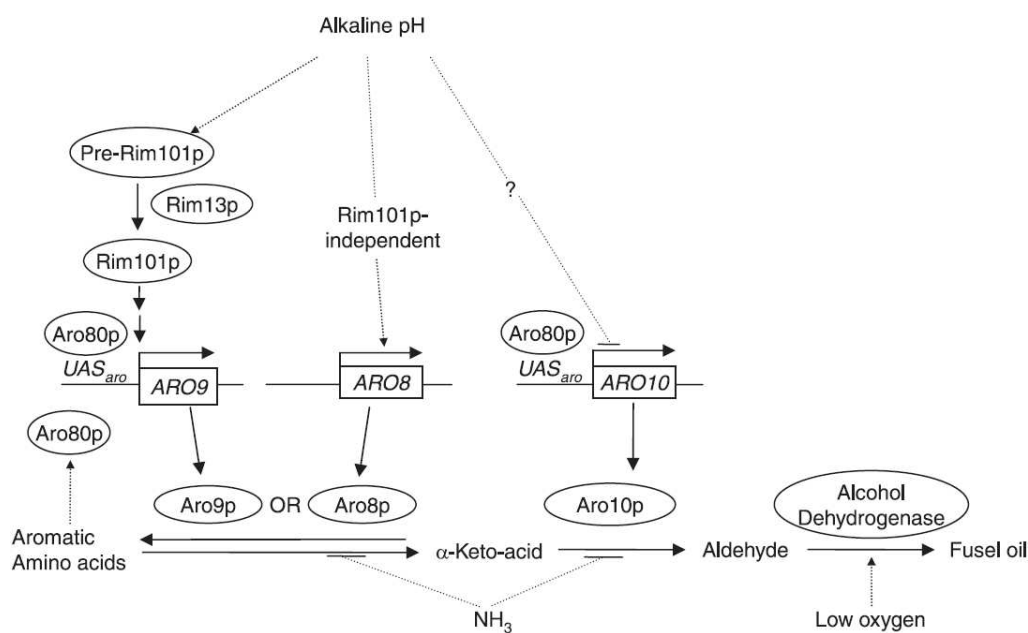
U *S. cerevisiae* Chen and Fink (2006) identifikovali jako quorum sensing molekuly - aromatické alkoholy fenylethanol, tryptofol, tyrosol, které stimulují morfogenetické přepnutí (přechod buněk z kvasinkovité na filamentární formu) jako odpověď na nedostatek dusíku. Fenylethanol je odvozený z fenylalaninu a tryptofol z tryptofanu (Sentheshanmuganathan a Elsdén, 1958, Dickinson et al. 2003) viz Obr. 7 pomocí Ehrlichovy dráhy, viz Obr. 3.



Obr. 7: Syntéza fenylethanolu a tryptofolu. Převzato z internetové databáze Saccharomyces genome database.

Do buněk se aromatické aminokyseliny dostávají prostřednictvím permeázy pro aminokyseliny Gap1p a indukibilní permeázy pro aminokyseliny s širokou substrátovou specifitou Wap1p (Ycl025p) (Iraqi et al., 1999). Biosyntéza aromatických alkoholů se zvyšuje za anaerobních podmínek (Ghosh et al., 2008). Produkce tyrosolu je zvýšená v biofilmech ve srovnání s tekutou kulturou (Alem et al., 2006). Produkce těchto

autostimulačních alkoholů závisí na obsahu dusíku v médiu (viz Obr. 8): je-li dusíku přebytek, je potlačena exprese genů *ARO9*, *ARO10* účastnících se syntézy aromatických alkoholů. Podobně je za vysoké koncentrace amoniaku reprimován gen *ARO8*. Za nedostatku dusíku je produkce autostimulačních alkoholů aktivována. Vysoká hustota buněk stimuluje produkci aromatických alkoholů zvýšením exprese *ARO9* a *ARO10*. Exprese *ARO9*, *ARO10* je regulována pomocí transkripčního faktoru Aro80p. Přidání tryptofolu, ale ne tyrosolu a fenylethanolu, dramaticky indukuje expresi *ARO9*, *ARO10* pokud je funkční Aro80p. Tímto způsobem je produkce alkoholů kontrolována pozitivní zpětnou vazbou. Aromatické alkoholy ovlivňují transkripci řady genů (Chen and Fink, 2006).



Obr. 8: Schéma regulace produkce aromatických alkoholů (tryptofol, fenylethanol a tyrosol) z aromatických aminokyselin (tryptofan, fenylalanin a tyrosin - jako zdroj dusíku) u *C. albicans*. Tvorba alkoholů („fusel“ alkoholů) závisí na podmínkách prostředí, včetně dostupnosti aromatických aminokyselin, přítomnosti amoniaku a kyslíku a na zásaditém pH (označeno přerušovanou čarou). Aromatické aminokyseliny stimulují Aro80p, transkripční aktivátor genů *ARO8* a *ARO9* (kódující aminotransferázy aromatických aminokyselin) a *ARO10* (kódující dekarboxylázu aromatických sloučenin). UAS, upstream aktivační sekvence – regulační sekvence před. Schéma vytvořili Ghosh et al., (2008) s využitím poznatků pro *S. cerevisiae* (Boer et al., 2007; Dickinson et al., 2003; Ehrlich, 1907; Iraqui et al., 1999) a *C. albicans* (Davis et al., 2003; Davis et al., 2000; Ramon et al., 1999). Převzato z Ghosh et al. 2008.

Fenylethanol a tryptofol podporují pseudohyální růst u diploidních kmenů *S. cerevisiae*. Fenylethanol rovněž zvyšuje invazivní růst haploidních kmenů *S. cerevisiae*, jestliže je přidán společně s tryptofolem. Přidání samotného tryptofolu invazivní růst

nevyvolává (Chen and Fink, 2006). Aromatické alkoholy tryptofol a fenylethanol způsobují změnu morfologie buněk zvýšením exprese *FLO11* (Flo11p je kvasinkový adhesin lokalizovaný na buněčném povrchu, který je nezbytný pro vláknitý růst) (Chen a Fink, 2006; Rupp et al., 1999). Pro indukci exprese *FLO11* je důležitý protein Tpk2p, katalytická podjednotka signální dráhy PKA esenciální pro vláknitý růst *S. cerevisiae* (Robertson a Fink 1998, Pan a Heitman 1999) a transkripční faktor Flo8p (Pan a Heitman, 2002).

Wuster et al. (2010) předpokládají, že změny exprese genů vyvolané aromatickými alkoholy zprostředkovává pouze několik transkripčních faktorů. K dříve uváděným Flo8p a Aro80p (Chen a Fink, 2006) identifikovali další transkripční faktory Msn2p, Mig1p, Rgm1p, Sip4p a Cat8p, které regulují geny, jejichž exprese se mění po přidání fenylethanolu. Cat8p reguluje geny glukoneogeneze a většinu enzymů glyoxylátového cyklu (Biddick et al., 2008). Mig1p reguluje enzymy, které se účastní odpovědi na glukózovou represi (Schüler 2003).

Alkoholy (např. isoamyl alkohol - 3-methyl-1-butanol) tvořené Ehrlichovou dráhou se hromadí za nedostatku živin a indukují tvorbu hyf a pseudohyf u kvasinek (Dickinson, 1996). V pokusech Dickinson (1996) zjistil, že tyto alkoholy vedly k tvorbě hyf i u buněk *S. cerevisiae* rostoucích na bohatých komplexních médiích. Vliv isoamyl alkoholu na tvorbu hyf a pseudohyf byl zkoumán u druhů: *S. cerevisiae*, *Brettanomyces anomalus*, *C. albicans*, *Candida boidinii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbreukii* a *Zygosaccharomyces kombuchaensis* (Dickinson, 2008). Když kvasinky vyčerpají své preferované zdroje dusíku (amoniak, glutamin, asparagin), začnou katabolizovat větvené aminokyseliny (leucine, isoleucine, valine) nebo aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan a tyrosin). Konečným produktem jejich katabolismu jsou alkoholy, které následně slouží kvasinkám jako signální molekuly, které vyvolají další změny metabolismu (Dickinson, 1996; Chen a Fin, 2006). Tyto změny provází zvýšení aktivity sukcinát dehydrogenázy a obsahu chitinu (Kern et al., 2004). Mezi geny, jejichž exprese se zvyšuje po přidání 3-methyl-1-butanolu, patří geny *DLD3*, *GRE2*, *PDR5* (Hauser et al., 2007). Dickinson (2008) uvádí, že 3-methyl-1-butanol buňce slouží jako indikátor rychlosti růstu a rychlosti metabolismu, neboť je syntetizován úměrně s rychlostí metabolismu a buňka se tak může rozhodnout, kdy dojde k jejímu reprogramování. Dickinson (2008) to uvádí v souladu s pozorováním, že inhibice růstu buněk pomocí hydroxykarbamidu vedla k hyfálnímu růstu (Jiang a Kang, 2003). 3-methyl-1-butanol (a propanol) se váže na protein Gcd1p, (který tvoří část translačního iniciačního faktoru eIF2B), a tak zabrání nebo omezí syntézu proteinů tím,

že způsobí rozpad polysomů (Ashe et al., 2001), což vede ke zpomalení růstu (Martinez-Anaya et al., 2003; Kern et al., 2004).

4.3. Estery

Těkavé estery, které mají aromatickou vůni, vytvářejí kvasinky pouze v stopovém množství. Mnohé z nich vytváří žádoucí buket vín. Estery, přítomné v kvašených nápojích, můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin (Saerens et al., 2010):

a) estery kyseliny octové

Mezi estery kyseliny octové patří: ethyl-ethanoát (ethyl-acetát), 3-methylbut-1-yl-ethanoát (isoamyl-acetát), 2-methylpropyl-ethanoát a fenylethyl-acetát. Nejzásadnější pro aroma piva a vín a většiny sáček je isoamyl-acetát s nezaměnitelnou banánovou vůní.

b) ethyl estery monokarboxylových kyselin

-OH skupina monokarboxylové kyseliny se středně dlouhým řetězcem je nahrazena $-OCH_3$ zbytkem ethanolu. Do této skupiny patří ethyl hexanoát (anýz, jablečné aroma) a ethyl octanoát (kyselé jablko) (Saerens et al., 2010).

Estery jsou tvořeny reakcemi katalyzovanými acyl transferázami nebo ester syntázami (Nordström et al., 1962 – převzato ze Saerens et al., 2010). V buňce se udržuje rovnováha mezi syntézou a hydrolýzou esterů, která určuje rychlost hromadění esterů (Fukuda et al., 1998).

Ethyl estery monokarboxylových kyselin se tvoří reakcí: $acylCoA + ethanol \rightleftharpoons ester + Coenzyme\ A$. Tvorba většiny těchto esterů je v kvasinkách katalyzovaná acyl-coA: ethanol O-acyltransferásami (AEAT), a to Eeb1p a Eht1p (Saerens et al., 2006). Energií pro reakci poskytuje štěpení thioesterové vazby acyl-CoA. Odlišně od Eeb1p, Eht1 hraje pouze minoritní roli v syntéze ethyl esterů. Rychlost jejich tvorby závisí na koncentraci substrátů a celkové aktivitě enzymů syntézy a hydrolýzy. Limitující je hlavně dostupnost prekurzorů syntézy (Saerens et al., 2008). Syntézu esterů kyseliny octové ($acetyl-CoA + alkohol \rightleftharpoons ester\ kyseliny\ octové + CoA$) katalyzují především alkohol acetyl transferázy 1 a 2 kodované geny *ATF1* a *ATF2* (Vestrepn et al., 2003). Estery díky rozpustnosti v tucích mohou pronikat přes cytoplasmatickou membránu do média (Suomalainen, 1981 – převzato z Fredlund, 2004).

Saerens et al., (2010) shrnuje čtyři možné biologické funkce těchto esterů:

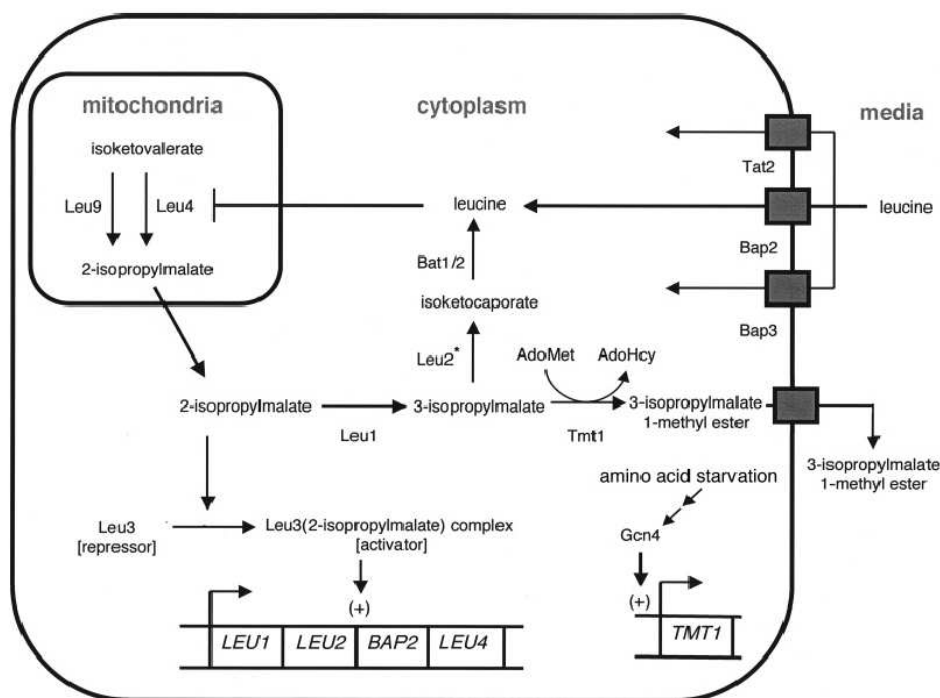
a) Regenerace volného CoA: syntéza esterů může být pro buňky jednou z cest pro regeneraci CoA bez uvolnění vysokých (toxických) koncentrací kyseliny octové a mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem.

b) Estery jako analogy nenasycených mastných kyselin: po částečném vyčerpání kyslíku, tedy při semi-anaerobní fermentaci se přestanou syntetizovat nenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí fosfolipidů a sfingolipidů v membránách. Aby nedošlo k omezení fluidity membrán, mohou se estery s delším řetězcem využít místo nenasycených mastných kyselin (Mason a Dufour, 2000).

c) Detoxifikační mechanismus: Ethyl estery jsou pro buňku méně toxické než jim odpovídající kyseliny. Mohou opustit buňku difúzí, a tak předejít hromadění kyselin ve škodlivé koncentraci (Nordström, 1964 – převzato z Saerens et al., 2010). Tvorba ethyl acetátu je také alternativní možností, jak se buňka může zbavit acetátu jinou cestou než za spotřeby ATP, jehož má v semianaerobním prostředí nedostatek (Fredlund, 2004).

d) Těkavé vonné estery mohou mít ekologickou funkci - přitahují hmyz. Např. na kvasící ovoce jsou vonnými estery nalákány *Drosophily*. *Drosophilám* pak kvasinky ulpí na těle a rozšiřují se v přírodě (Asahina et al., 2009; Saerens et al., 2010).

Dalším esterem, který Dumlao et al. (2008) popsali jako autoindukční molekulu u kvasinek, je 3-isopropylmalát methyl ester (meziprodukt biosyntézy leucinu), který vzniká při nedostatku aminokyselin a vede ke změně růstu. Methylace 3-isopropylmalátu funguje jako extracelulární signál – po jeho působení začnou haploidní vegetativní buňky *S. cerevisiae* růst invazivně. Methylaci katalyzuje u této kvasinky methyltransferáza kódovaná genem *TMT1*. Po methylaci je 3-isopropylmalátmethyl ester sekretován do média. Tmt1p methyltransferáza je indukována při nedostatku aminokyselin. Největší indukce byla pozorována, když se z média odstranil leucin. Reakci na stres způsobený nedostatkem aminokyselin kontroluje transkripční aktivátor Gcn4p, který reguluje také expresi *TMT1* (Dumlao et al., 2008). Schéma syntézy 3-isopropylmalát methyl esteru a regulace jeho syntézy je znázorněna na Obr. 9.



Obr. 9: Biosyntéza 3-Isopropylmalát methyl esteru a leucinu a regulace u *Saccharomyces cerevisiae*. Isoketovalerát je přeměněn na leucin ve 4 krocích katalyzovaných Leu4p/Leu9p, Leu1p, Leu2p, a Bat1p/Bat2p (Kohlhaw et al., 2003). Meziprodukt 3-isopropylmalát je esterifikován v pozici 1 enzymem Tmt1p a vzniklý methylester je sekretován do média. Leucin transportovaný do buněk z média inhibuje aktivitu Leu4p snížením koncentrace 2-isopropylmalátu, pozitivního regulátoru transkripčního korepresoru/aktivátoru Leu3p (Kohlhaw et al., 2003). V nepřítomnosti 2-isopropylmalátu Leu3p reprimuje transkripci genů biosyntézy *LEU1*, *LEU2*, *LEU4* (Kohlhaw et al., 2003). Dumlaio ve své práci dokázal, že exprese genu *TMT1* je kontrolována transkripčním aktivátorem Gcn4p v odpovědi na nedostatek aminokyselin. Většina kvasinkových kmenů defektních v genu *LEU2* (tedy auxotrofních na leucin) akumulovala 3-isopropylmalát - substrát pro Tmt1p. Převzato z Dumlaio et al., 2008.

4.4. Kyseliny

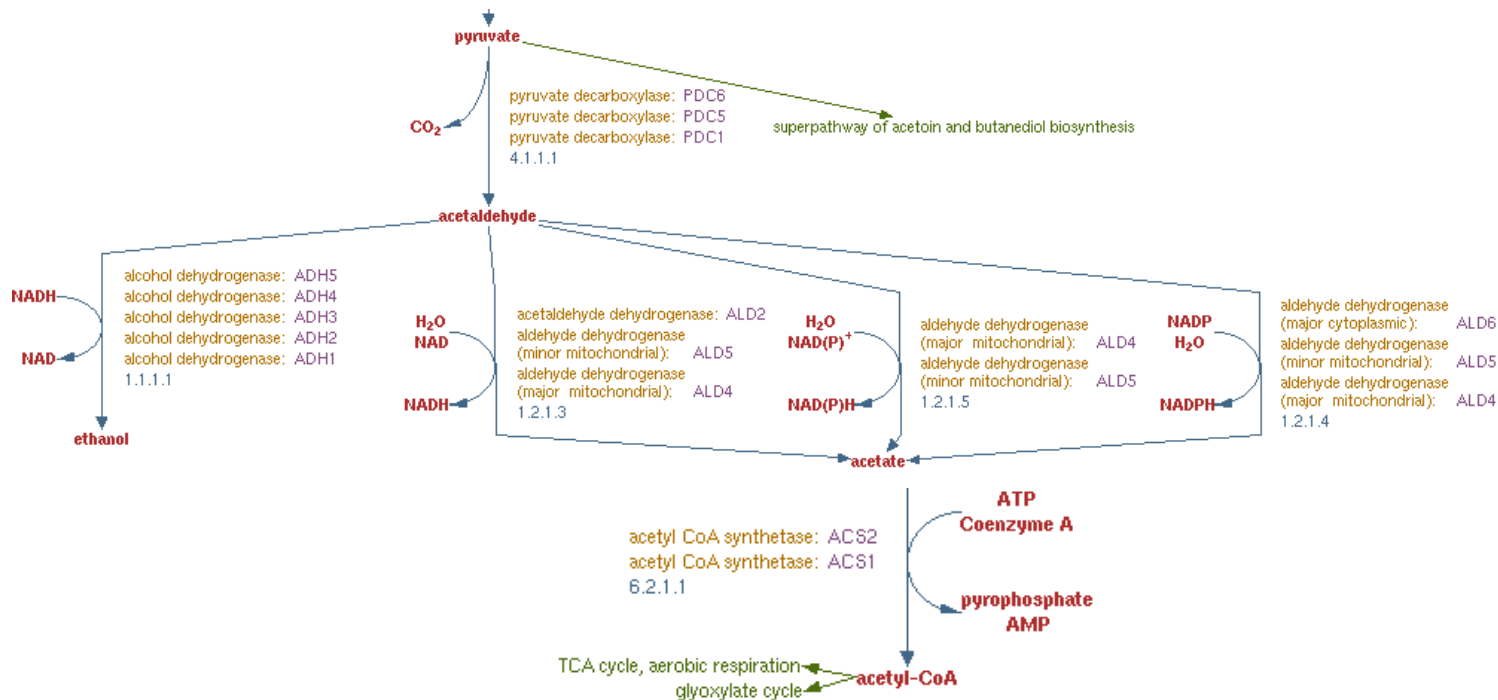
Při produkci alkoholických nápojů a potravin byla pozorována hlavně produkce těžkých mastných kyselin a kyseliny octové (Styger et al., 2011). Mezi kyseliny („fusel acid“) patří: kyselina isomáselná (= kyselina 2-methylpropanová, vznikající z valinu), kyselina 3-methylbutanová (= kyselina isovalerová, vzniká z leucinu), kyselina 2-methylbutanová (vzniká z isoleucinu) viz Obr. 3. Další mastné kyseliny s aromatickou vůní jsou kyselina propionová (vzniká z threoninu), kyselina hexanová (kyselina kapronová), kyselina oktanová (kyselina kaprylová), kyselina dekanová (kyselina kaprinová) (Jain et al., 2012).

Jako signální látka pro mezibuněčnou signalizaci je známý prekurzor acetátu acetaldehyd (Richard et al., 1996). Acetaldehyd synchronizuje kolísání glykolýzy *S.*

cerevisiae v populacích, kdy pravidelně kolísá koncentrace metabolitů při neměnném přísunu cukrů (Richard et al., 1996).

V přírodě je často ve vysokých koncentracích acetát v tlejících rostlinných materiálech, díky činnosti hub a bakterií (např. *Acetobacter spp.*) (Pretorius, 2000; Steels et al., 2002). Slabé organické kyseliny mohou používat mikroorganismy jako zdroj uhlíku, ve vysokých koncentracích inhibují růst (Piper et al., 2001; Mollapour a Piper, 2006, Sousa et al., 1998).

Syntéza acetátu z produktu glykolýzy je zobrazena na Obr. 10.



Obr. 10: Schéma vzniku acetátu a jeho přeměny na acetyl- CoA. Převzato z internetové databáze Saccharomyces genome database.

Acetát může u *S. cerevisiae* vznikat i následující reakcí: acyl-CoA + acetát = acyl + acetyl-CoA.

$\text{acetyl-CoA} + \text{H}_2\text{O} = \text{acetát} + \text{CoA} + \text{H}^+$, která je katalyzována acetyl-CoA hydrolázou kódovanou genem *ACHI* (Buu et al., 2003; SGD)

Kyselina octová je slabá kyselina (pK_a 4,75). Ve vodě disociuje na acetátový iont (octanový aniont)



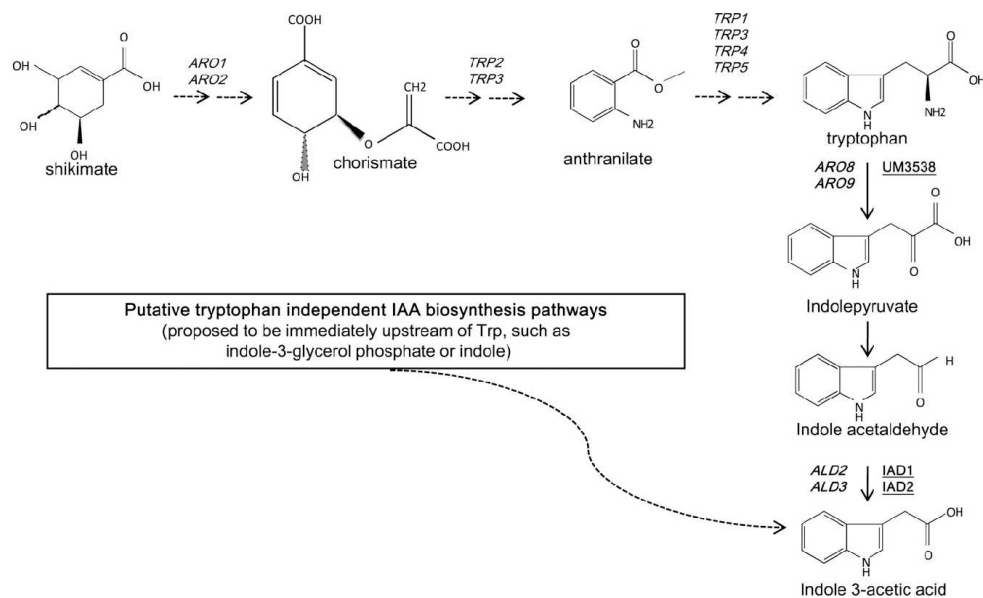
Kyselina octová je nedisociovaná v pH 4,5 a téměř kompletně disociuje v pH 6,8. Nedisociovaná, nenabitá kyselina octová proniká difúzí přes membránu buněk na rozdíl od nabitého acetátu. V buňce v důsledku změny pH disociuje a nabité ionty se hůře dostávají

ven, hromadí se v buňce, mohou ovlivnit produkci volných radikálů (Piper et al., 2001). Burtner et al. (2009) předpokládá, že zvýšené množství kyseliny octové v médiu a snížení pH média ve stacionární fázi pučících kvasinkových kultur může být primárním mechanismem chronologického stárnutí kvasinek. Hromadění kyseliny octové v stacionární fázi indukuje oxidativní stres a zvýší frekvenci, se kterou se buňky po vstupu do stacionární fáze zastaví v G₁ fázi (Burhans a Weinberger, 2009).

Z. bailii a *S. cerevisiae* mohou podstoupit programovanou buněčnou smrt (apoptózu), když jsou vystaveny smrtelné dávce kyseliny octové v médiu (Ludovico et al., 2001, 2003).

Množství mikroorganismů žijících v asociaci s rostlinami produkuje rostlinný hormon auxin – kyselinu indol-3-octovou (Rao et al., 2010). Auxin je syntetizován za účasti aldehyd dehydrogenázy z tryptofanu (Trp) u *Ustilago maydis* (Reneke et al. 1988). Jeho produkce byla pospána také u kvasinek *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*) (Shin et al., 1991) a *S. cerevisiae* – Jeho syntéza je znázorněna na Obr. 11 (Rao et al., 2010).

Mutantní kvasinky *S. cerevisiae* s deletovanými *ALD* geny nebyly schopné přeměňovat radioaktivně značený tryptofan na auxin, přesto produkovaly auxin i v nepřítomnosti vnějšího tryptofanu a v hodnotách vyšších než původní kmen. Tyto kvasinky mají tedy patrně další dráhu pro syntézu auxinu, nezávislou na tryptofanu (Rao et al., 2010).



Obr. 11: Dráha biosyntézy kyseliny indole-3-octové u *S. cerevisiae* a analogická dráha *U. maydis* (vpravo, podtrženo). Převzato z Rao et al., 2010.

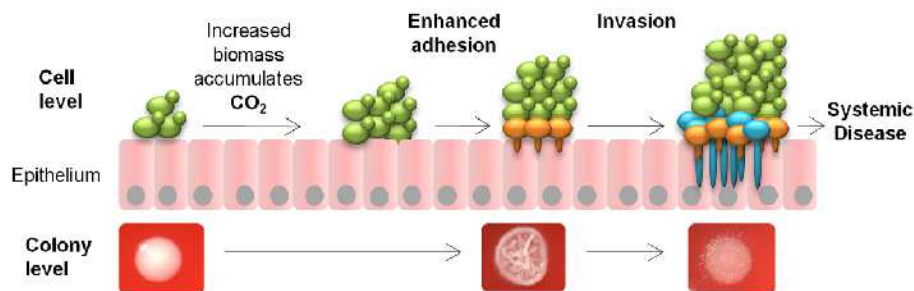
Saccharomyces cerevisiae odpovídá na přítomnost auxinu tvorbou pseudohyf (Prusty et al. 2004). Rao et al. (2010) popsali, že auxin vyvolává tvorbu hyf i u lidského patogenu

Candida albicans. Tento sekundární metabolit může tedy fungovat jako signál, který reguluje některé znaky virulence, přeměnu v hyfy u patogenních hub. Tvorba hyf navozená auxinem u *C. albicans* je nezávislá na Efg1p a Cph1p (Rao et al., 2010).

5. CO₂

Jako další signální molekula může fungovat i CO₂. CO₂ vzniká jako produkt buněčného metabolismu, především při různých dekarboxylačních reakcích a v Krebsově cyklu. Koncentrace CO₂ ve vzduchu v atmosféře je 0,03%, prostředí hostitele obsahuje 4,5% až 30% CO₂ (Stenni et al., 2001; Levitt et al., 1970; Canan et al., 2002; Guyton et al., 2000 – převzato Huang 2008). CO₂ z okolí proniká do buněk difúzí. Buňka CO₂ hydratuje na HCO₃⁻ enzymem anhydrázou kyseliny uhličitě, a tak ho udržuje v buňce (Klengel et al., 2005).

Patogenní kvasinka *Candida albicans* může měnit svůj vzhled. Jedním ze signálů, který reguluje tuto změnu, je CO₂ (Sims, 1986, Klengel et al., 2005). Vedle kvasinkových jednobuněčných forem, které se dobře šíří vzduchem a kolonizují nová prostředí, může vytvořit vláknité pseudohyfy nebo hyfy, které snáze pronikají tkáněmi hostitele. Tato schopnost kvasinek měnit morfologii buněk je důležitá pro virulenci kvasinek (Cutler et al., 1991). Kromě hodnoty CO₂ v okolí mají na změnu vzhledu buněk vliv ještě teplota těla hostitele, pH prostředí, sérum, hladina kyslíku v okolí (Klengel et al., 2005; Buffo et al., 1984).



Obr. 12: Signalizace metabolicky vytvářeným CO₂ u patogenních hub. Jak se buňky kvasinky množí na povrchu epitelu, vytváří se ve spodní části biomasy kvasinky ohniska s vyšší koncentrací CO₂. Kvasinkové buňky, které se ocitnou v rostoucí koncentraci CO₂, změni morfologii, začnou tvořit hyfy, a tím zvýší adhezi k epitelu. Prorůstající hyfy jsou vystaveny signálům z hostitelského prostředí jako sérum, pH a další nárůst CO₂, které ještě více posílí vývoj hyf a tak zvýší příležitost k invazi tkání. Převzato z Hall et al., 2010.

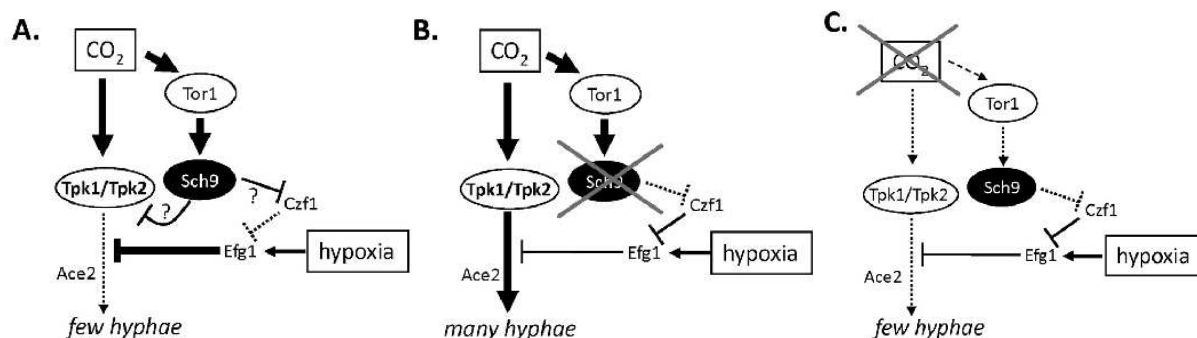
Kvasinky mají schopnost rozpoznat gradienty metabolicky vytvářeného CO₂ v okolí a následně na ně reagovat, což je důležité hlavně na začátku choroby při povrchové infekci, kdy je koncentrace CO₂ v prostředí nízká (Hall et al., 2010). V okolí expandující kvasinkové

biomasy se postupně hromadí CO₂ vytvářené metabolismem kvasinky. Za nízké koncentrace CO₂ pouze plní metabolickou poptávku, ale až CO₂ přesáhne kritickou hodnotu, způsobí přeměnu buněk kvasinkovitého tvaru na hyfy a pseudohyfy a následně umožní povrchovou invazi, průnik epitelem (Hall et al., 2010). Model průběhu osídlení epitelu kvasinkou je znázorněn na Obr. 12.

Na změně buněčné morfologie kvasinky se podílejí následující signální dráhy přímo ovlivněné přítomností CO₂. První popsany senzor CO₂ u hub je adenylátcykláza Cyr1p, enzym odpovědný za tvorbu cAMP.

CO₂/ HCO₃⁻ aktivuje C-terminální katalytickou podjednotku Cyr1p (Klengel et al., 2005). Receptorové místo pro vazbu CO₂/ HCO₃⁻ je lysinový zbytek 1373 (Hall et al., 2010). Nárůst hladiny cAMP spustí odpovídající signální dráhy, které ovlivňují změnu vzhledu *C. albicans* (Klengel et al., 2005) viz Obr. 5.

CO₂ může ovlivňovat tvorbu hyf i jiným způsobem. Stichternoth et al. (2011) popsali, že kináza Sch9p specificky reprimuje tvorbu hyf pouze za podmínek vysoké koncentrace CO₂ a hypoxie (viz Obr. 13). Na změnu morfologie má vliv protein Czf1p. Czf1p interaguje s Efg1p. Efg1p má negativní vliv na tvorbu hyf a Czf1p funguje jako jeho protihrač a podporuje filamentaci (Giusani et al., 2002). Podobně se doplňují i v regulaci přeměny buněk z white na opaque – zvýšená exprese Czf1p vede k přeměně na opaque buňky (Vinces a Kumamoto, 2007).



Obr. 13: Schéma regulace vláknitého růstu pomocí Sch9p. (A) Buňky kmene prostého genetických manipulací vystavené hypoxii a vysoké koncentraci CO₂. Při hypoxii Efg1p brání vláknitému růstu (Giusani et al., 2002, Setiadi et al., 2006, Sonneborn et al., 1999), ale Czf1p omezuje jeho aktivitu jako represoru (Brown et al., 1999, Giusani et al., 2002). Při vysoké koncentraci CO₂ jsou aktivovány dvě izoformy PKA (katalytické podjednotky PKA: Tpk1p a Tpk2p), pravděpodobně pomocí uhličitanelem řízené adenylát cyklázy (Klengel et al., 2005). Je navrhováno, že PKA je ovlivňovaná vnějšími podmínkami (povrchový růst, 37°C) pomocí Tor1-Sch9 dráhy, aby se předešlo tvorbě hyf. Je stále nejasné zda Sch9p zvýší aktivitu represoru Efg1p aktivací Czf1p, jak je ukázáno nebo jinak - např. zabráněním aktivitu PKA. Ace2p je důležitý pro vláknitý růst za hypoxie (Mulhern et al., 2006) z neznámého důvodu.

(B) Nefunkční Sch9p nebo Tor1p za hypoxie a vysoké koncentrace CO₂ nedokáží tlumit nárůst aktivity PKA řízené CO₂, což vede k abnormálně vláknitému růstu.

(C) Střední úroveň aktivity represoru Efg1p za hypoxie a nízké koncentrace CO₂ postačuje k zabránění tvorby vláken při nízké aktivitě PKA. Převzato z Stichernoeth et al. 2011.

CO₂ ovlivňuje kromě výše popsané signalizace i anhydrázu kyseliny uhličitě. V závislosti na dostupnosti CO₂ je regulována exprese genů pro anhydrázu kyseliny uhličitě pomocí bZIP transkripčního faktoru Rca1p. Rca1p zvýšil expresi anhydrázy kyseliny uhličitě během kontaktu se savčími fagocyty, nebo za nízkých hodnot CO₂ v okolí. Pro signalizaci prostřednictvím CO₂ je klíčový serinový zbytek 124 proteinu Rca1p. Rca1p se váže na promotor anhydrázy kyseliny uhličitě a dalších 84 genů (Cottier et al., 2012). Regulace exprese anhydrázy kyseliny uhličitě pomocí CO₂ byla popsána kromě u *C. albicans* také u *S. cerevisiae*, *S. macrospora*, *A. fumigatus* a *A. nidulans* (Elleuche et al., 2009; Han et al., 2010; Aguilera et al., 2005; Amoroso et al., 2005).

U patogenní kvasinky *C. albicans* vysoké hladiny CO₂ řídí nejen vláknitý růst, ale i změnu z white na opaque buňky nezbytnou pro párování (Huang et al., 2009; Klengel et al., 2005). Při nárůstu obsahu CO₂ na 5% koncentraci CO₂ ve vzduchu se zvýšil podíl opaque buněk (prodloužené buňky schopné párování) oproti white (kvasinkové buňky). Také se změnila genová exprese, byly více exprimované geny pro opaque fenotyp *OP4* a *WOR1* (*TOS9*) a zanedbatelně exprimované geny specifické pro white - *WH11* a *EFG1*. V prostředí s 0,03% CO₂ tomu bylo obráceně, byly vysoce exprimované geny white na rozdíl od opaque. CO₂ ovlivňuje přepnutí na opaque buňky zřejmě stejným mechanismem účinku jako je popsán výše u přepnutí z kvasinkové formy na hyfální formu: pro přepnutí na opaque buňky způsobené CO₂ v celkové koncentraci 1% jsou nezbytné anhydráza kyseliny uhličitě, adenylát cykláza a Ras1p a transkripční faktor Czf1 viz Obr. 13 (Huang et al., 2009).

CO₂ vylučovaný kvasinkami podmiňuje sporulaci a meiosu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jeho množství koreluje s hustotou populace (Ohkuni et al., 1998).

6. ZÁVĚR

Tato práce poskytuje přehled malých signálních molekul vylučovaných kvasinkami do okolí a nastiňuje způsob přenosu signálu a vliv těchto molekul na buňky.

Vědci stále objevují nové molekuly hrající roli v mezibuněčné signalizaci u mikroorganismů (včetně kvasinek) nebo u mnohobuněčných organismů (včetně savců). Funkce i molekulární mechanismy působení těchto molekul zůstávají mnohdy neznámé. Přitom některé signálních molekuly hrají významné role v medicíně. Příkladem jsou některé signálních molekuly kvasinky *Candida albicans*, které jsou obecně více prozkoumané než signální molekuly kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Mezi málo prozkoumané signální molekuly patří např. estery a organické kyseliny.

Detailní studium vzniku a funkce malých signálních molekul by mohlo v budoucnu pomoci při vyhledávání možných léčiv proti onemocněním patogenními druhy kvasinek. Rovněž by mohlo přispět k vylepšení průmyslových kmenů kvasinek pro výrobu piva a vína s vysokou produkcí látek s vonným aroma. Z hlediska pochopení základních biologických procesů pak může přispět k pochopení vzniku mnohobuněčnosti a metabolických pochodů uvnitř buněk.

7. Seznam použité literatury

- Alem MAS, Oteef MDY, Flowers TH, Douglas LJ. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*. 5: 1770–1779
- Amoroso G, Morell-Avrahov L, Muller D, Klug K, Sultemeyer D. (2005) The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol Microbiol*. 56:549–558
- Aguilera J, Petit T, de Winde JH, Pronk JT. (2005) Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res*. 5:579–593
- Asahina K, Louis M, Piccinotti S, Vosshall LB. (2009) A circuit supporting concentration-invariant odor perception in *Drosophila*. *J Biol*. 8:9
- Ashe MP, Slaven JW, De Long SK, Ibrahim S, Sachs AB. (2001) A novel eIF2B-dependent mechanism of translational control in yeast as a response to fusel alcohols. *EMBO J*. 20: 6464–74
- Biddick RK, Law GL, Young ET. (2008) Adr1 and Cat8 mediate coactivator recruitment and chromatin remodeling at glucose-regulated genes. *PLoS One*. 3: e1436
- Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MD, de Winde JH, Pronk JT, Daran JM. (2007) Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res*. 7: 604–620
- Brown DH Jr, Giusani AD, Chen X, Kumamoto CA. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues, and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol. Microbiol*. 34:651–662
- Buffo J, Herman MA, Soll DR. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 85: 21-30
- Burhans WC, Weinberger M. (2009) Acetic acid effects on aging in budding yeast: are they relevant to aging in higher eukaryotes? *Cell Cycle*. 8: 2300-2
- Burtner CR, Murakami CJ, Kennedy BK, Kaerberlein M. (2009) A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*. 8: 1256–1270
- Buu LM, Chen YC, Lee FJ. (2003) Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278: 17203-9
- Cain NE, Kaiser CA. (2011) Transport activity-dependent intracellular sorting of the yeast general amino acid permease. *Mol Biol Cell*. 22: 1919-29
- Canan Avunduk. (2002) *Manual of Gastroenterology: Diagnosis and Therapy*. 3. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2002
- CGD: *Candida* genome database. The Board of Trustees, Leland Stanford Junior University. [12.5.2012]. <http://www.candidagenome.org/> Updated 2012
- Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. (2005) CDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 584–589
- Chen H, Fink GR. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development*. 20: 1150–1161
- Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, and Fink GR. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101: 5048–5052

- Cottier F, Raymond M, Kurzai O, Bolstad M, Leewattanapasuk W, Jiménez-López C, Lorenz MC, Sanglard D, Váchová L, Pavelka N, Palková Z, Mühlischlegel FA. (2012) The bZIP transcription factor Rca1p is a central regulator of a novel CO₂ sensing pathway in yeast. *PLoS Pathog.* 8: e1002485
- Cutler JE. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 45:187-218
- Čáp M, Váchová L, Palková Z. (2010) How to survive within a yeast colony?: Change metabolism or cope with stress? *Commun Integr Biol.* 3: 198-200
- Davis-Hanna A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA. (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular Microbiology.* 67: 47–62
- Davis D. (2003) Adaptation to environmental pH in *C. albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* 44:1–7
- Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. (2000) RIM101-dependent and -independent pathways govern pH responses in *C. albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 971–978
- Dickinson JR. (1996) 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology.* 142: 1391-7
- Dickinson JR. (2008) Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Folia Microbiol (Praha).* 53: 3-14
- Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, Hewlins MJ. (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active Amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275: 10937-42
- Dickinson JR, Salgado LE, Hewlins MJ. (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278: 8028–8034
- Dumlao DS, Hertz N, Clarke S. (2008) Secreted 3-Isopropylmalate Methyl Ester Signals Invasive Growth during Amino Acid Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 47: 698-709
- Ehrlich F. (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40: 1027–1047.
- Elleuche S, Poggeler S. (2009) Beta-carbonic anhydrases play a role in fruiting body development and ascospore germination in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *PLoS One.* 4: e5177
- Forsberg H, Gilstring CF, Zargari A, Martínez P, Ljungdahl PO. (2001) The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol.* 42: 215-28
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y, Kimura A. (1998) Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4076-8
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology.* 176: 269–275
- Fredlund E. (2004) Central carbon metabolism in the biocontrol yeast *Pichia anomala*, influence of oxygen limitation. Doctoral thesis. *Acta universitatis agriculturae sueciae. Agraria* 488.
- Ghosh S, Kebaaram BW, Atkin AL, Nickerson KW. (2008) Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol.* 74: 7211-8
- Giusani AD, Vinces M, Kumamoto CA. (2002) Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics.* 160: 1749–1753
- Guyton AC, Hall JE. (2002) *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2000.

- Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L, Sanglard D, Levin LR, Buck J, Fritz A, Mühlischlegel FA. (2011) The Quorum-Sensing Molecules Farnesol/Homoserine Lactone and Dodecanol Operate via Distinct Modes of Action in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 10: 1034–1042
- Hall RA, De Sordi L, Maccallum DM, Topal H, Eaton R, Bloor JW, Robinson GK, Levin LR, Buck J, Wang Y, Gow NA, Steegborn C, Mühlischlegel FA. (2010) CO₂ Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 6:e1001193
- Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. (2011) The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*. 48: 747-63
- Han KH, Chun YH, Figueiredo Bde C, Soriani FM, Savoldi M, Almeida A, Rodrigues F, Cairns CT, Bignell E, Tobal JM, Goldman MH, Kim JH, Bahn YS, Goldman GH, Ferreira ME. (2010) The conserved and divergent roles of carbonic anhydrases in the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 75:1372–1388
- Hauser M, Horn P, Tournu H, Hauser NC, Hoheisel JD, Brown AJ, Dickinson JR. (2006) A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res*. 7: 84-92
- Hazelwood LA, Daran J-M, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 2259–2266
- Hazen KC, Cutler JE. (1983) Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *J Biochem*. 94: 777-83
- Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2982–2992
- Hornby JM, Kebaara BW, Nickerson KW. (2003) Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 2366-9
- Huang G, Srikantha T, Sahni N, Yi S, Soll DR. (2009) CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Current Biology*. 19: 330–334
- Iraqi I, Vissers S, André B, Urrestarazu A. (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 19: 3360-71
- Jain VK, Divol B, Prior BA, Bauer FF. (2012) Effect of alternative NAD⁺-regenerating pathways on the formation of primary and secondary aroma compounds in a *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-defective mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93:131–141
- Jiang YW, Kang CM. (2003) Induction of *S. cerevisiae* filamentous differentiation by slowed DNA synthesis involves Mec1, Rad53 and Swe1 checkpoint proteins. *Mol Biol Cell*. 14: 5116-24
- Kebaara BW, Langford ML, Navarathna DH, Dumitru R, Nickerson KW, Atkin AL. (2008) *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell*. 7: 980-7
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kanehisa Laboratories Web site. [12.5.2012]. <http://www.genome.jp/kegg/> Updated February 1, 2012.
- Kern K, Nunn CD, Pichova A, Dickinson JR. (2004) Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content. *FEMS Yeast Res*. 5: 43–49
- Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schröppel K, Naglik JR, Eckert SE, Mogensen EG, Haynes K, Tuite MF, Levin LR, Buck J, Mühlischlegel FA. (2005) Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*. 15: 2021-6

- Kohlhaw GB. (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 1-15
- Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambach AV, Cihlar RL, Calderone RA. (2004) The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 3: 1062–1065
- Kruppa M. (2009) Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 52:1-10.
- Levitt MD, Bond JH., Jr. (1970) Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology*. 59:921–929
- Ljungdahl PO, Gilstring CF, Melin-Larsson M. (1999) Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol Biol Cell*. 10: 3549-65
- Lu Y, Su C, Wang A, Liu H. (2011) Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biol*. 9: e1001105
- Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leão C, Côrte-Real M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*. 147: 2409–2415
- Ludovico P, Sansonetty F, Silva MT, Côrte-Real M. (2003) Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Res*. 3:91–96
- Martin SW, Douglas LM, Konopka JB. (2005) Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell*. 4: 1191-202
- Martinez-Anaya C, Dickinson JR, Sudbery PE. (2003) In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. *J Cell Sci*. 116: 3423-31
- Mason AB, Dufour JP. (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*. 16: 1287-98
- Miller MB, Bassler BL. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 55: 165-99
- Mollapour M, Piper PW. (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 6: 1274-80.
- Mulhern SM, Logue ME, Butler G. (2006) *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot. Cell* 5: 2001–2013
- Narayanan TK, Rao GR. (1976) Production of beta-(4-hydroxyphenyl)ethanol and beta-(4-hydroxyphenyl)lactic acid by *Candida* species. *Can J Microbiol*. 22: 384-389
- Nordström K. (1962) Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast III. Participation of coenzyme A. *J Insr Brew*. 68: 398-407
- Nordström, K. (1964) Formation of esters from acids by brewer's yeast IV. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. *J inst brew* 70: 233-238
- Nykanin L. (1986) Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic*. 37: 84–96
- Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. (2001) Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating morphological transition in *Candida albicans*. *PNAS*. 98: 4664-4668
- Ohkuni K, Hayashi M, Yamashita I. (1998) Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14: 623-31
- Palková Z, Janderová B, Gabriel J, Zikánová B, Pospíšek M, Forstová J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*. 390: 532-6

- Palková Z, Váchová L. (2003) Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol.* 225: 229-72
- Palková Z, Forstová J. (2000) Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci.* Jun. 113: 1923-8
- Palková Z, Devaux F, Řičicová M, Mináriková L, Le Crom S, Jacq C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell.* 13: 3901-14
- Palková Z, Váchová L, Gásková D, Kučerová H. (2009) Synchronous plasma membrane electrochemical potential oscillations during yeast colony development and aging. *Mol Membr Biol.* 26: 228-35
- Pan X, Heitman J. (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4874–4887
- Pan X, Heitman J. (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3981–3993
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology.* 147: 2635-42
- Pretorius IS. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675–729
- Prusty R, Grisafi P, Fink GR. (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 4153–4157
- Ramon AM, Porta A, Fonzi WA. (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* 181: 7524– 7530.
- Rao RP, Hunter A, Kashpur O, Normanly J. (2010) Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics.* 185: 211-20
- Richard P, Bakker BM, Teusink B, Van Dam K, Westerhoff HV. (1996) Acetaldehyde mediates the synchronization of sustained glycolytic oscillations in populations of yeast cells. *Eur. J. Biochem.* 23: 238-241
- Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW. (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol.* 9: 339-55
- Roberg KJ, Rowley N, Kaiser CA. (1997) Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 137: 1469-82
- Robertson LS, Fink GR. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13783–13787
- Rubio-Teixeira M, Kaiser CA. (2006) Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Mol Biol Cell.* 17: 3031-50
- Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18: 1257–1269
- Řičicová M, Kučerová H, Váchová L, Palková Z. (2007) Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 1170-8
- Saerens SM, Delvaux FR, Verstrepen KJ, Thevelein JM. (2010) Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol.* 3: 165-77
- Saerens SM, Verstrepen KJ, Van Laere SD, Voet AR, Van Dijck P, Delvaux FR, Thevelein JM. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem.* 281: 4446-56

- Saerens SM, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR. (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 74: 454-61
- Sato T, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull.* 27: 751-2
- Schüller HJ. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43: 139-60
- Sentheshanmuganathan S, Elsdén SR. (1958) The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 69: 210-218
- Setiadi ER, Doedt T, Cottier F, Noffz C, Ernst JF. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen-sensing- and Efg1p-regulatory networks. *J. Mol. Biol.* 361: 399-411
- SGD: *Saccharomyces* genome database. The Board of Trustees of Leland Stanford Junior University. [12.5.2012]. <http://www.yeastgenome.org/> Updated 2012
- Shin M, Sano K, Umezawa C. (1991) Metabolism of tryptophan to niacin in *Saccharomyces uvarum*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 37: 269-83
- Sims W. (1986) Effect of carbon dioxide on the growth and form of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 22: 203-8
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Ernst JF. (1999) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67: 5514-5517
- Suomalainen H. (1981) Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing* 87: 296-300
- Sousa MJ, Rodrigues F, Côrte-Real M, Leão C. (1998) Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology.* 144: 665-70
- Steels H, James SA, Bond CJ, Roberts IN, Stratford M. (2002) *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Res.* 2: 113-121
- Stenni B, Masson-Delmotte V, Johnsen S, Jouzel J, Longinelli A, Monnin E, Rothlisberger R, Selmo E. (2001) An oceanic cold reversal during the last deglaciation. *Science.* 293: 2074-2077
- Stichternoth C, Fraund A, Setiadi E, Giasson L, Vecchiarelli A, Ernst JF. (2011) Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 10: 502-11
- Styger G, Prior B, Bauer FF. (2011) Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38: 1145-1159
- Váchová L, Palková Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol.* 169: 711-7
- 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
- Váchová L, Chernyavskiy O, Strachotová D, Bianchini P, Burdík Z, Fercíková I, Kubínová L, Palková Z. (2009) Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ Microbiol.* 11: 1866-77
- Verstrepen KJ, Van Laere SD, Vanderhaegen BM, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS, Winderickx J, Thevelein JM, Delvaux FR. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5228-37

- Vinces MD, Kumamoto CA. 2007 The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology*. 153: 2877-84
- Vopálenská I, Šťovíček V, Janderová B, Váchová L, Palková Z. (2010) Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol*. 12: 264-77
- Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper MD, Pronk JT. (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 69: 4534–4541
- Westwater C, Balish E, Schofield DA. (2005) *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell*. 4: 1654-61
- Wuster A, Babu MM. (2010) Transcriptional control of the quorum sensing response un yeast. *Mol. BioSyst*. 6: 134-141
- Zikánová B, Kuthan M, Řičicová M, Forstová J, Palková Z. (2002) Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun*. 294: 962-7