

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie

Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Pavla Luxová**

*Analýza mutantů Rpg1/eIF3a v Saccharomyces cerevisiae*  
*Analysis of Rpg1/eIF3a mutation in Saccharomyces cerevisiae*

**Diplomová práce**

Školitelka: RNDr. Ivana Malcová, CSc.

Praha, 2014

### **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, 14. 8. 2014

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Ivaně Malcové, CSc. za neúnavné vedení při práci v laboratoři, cenné rady a veškerou pomoc při zpracování mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře reprodukce buňky Mikrobiologického ústavu AV ČR za vytvoření přátelského prostředí, ve kterém byla radost pracovat a učit se novým věcem. Dále bych chtěla poděkovat všem svým blízkým přátelům za psychickou podporu, ochotu a pevné nervy. Nakonec bych chtěla poděkovat svým rodičům nejen za psychickou a materiální podporu, ale také za nekonečnou trpělivost, víru, lásku a péči.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT .....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
1 ÚVOD .....	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	12
3 MATERIÁL A METODY .....	26
3.1 Materiál .....	26
3.1.1 Seznam chemikálií .....	26
3.1.2 Seznam použitých organismů .....	27
3.1.3 Kultivační média a roztoky .....	29
3.1.4 Seznam použitých komerčních kitů .....	31
3.1.5 Seznam plasmidů .....	31
3.1.6 Seznam DNA modifikujících enzymů .....	31
3.1.7 Seznam použitých protilátek .....	31
3.1.8 Standardy určující velikosti DNA fragmentů a molekulové hmotnosti proteinů .....	32
3.2 Metody .....	33
3.2.1 Kultivace mikroorganismů .....	33
3.2.2 Zamražení a výsev glycerolových konzerv <i>Saccharomyes cerevisiae</i> .....	34
3.2.3 Příprava proteinového extraktu .....	34
3.2.4 Stanovení počtu buněk pomocí přístroje The CASY® Cell Counter model DT, (Schärfe system) .....	35
3.2.5 Průtoková cytometrie (FACS) .....	36
3.2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	37
3.2.7 Western blot – přenos proteinů na membránu .....	38
3.2.8 Imunodetekce proteinů na nitrocelulókové membráně .....	38
3.2.9 Příprava vzorků na měření v přístroji Tecan .....	40
3.2.10 Testování kvasinkových kmenů – spot testy .....	40
3.2.11 Příprava vzorků na test citlivosti k benomyly .....	40
3.2.12 Křížení, sporulace a tetrádová analýza spor .....	41
3.2.13 Zjišťování neznámého párovacího typu u haploidních kmenů .....	42

3.2.14	Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii .....	42
3.2.15	Příprava 1,5% agarózy pro mikroskopické preparáty .....	43
3.2.16	Transformace chemicky kompetentních buněk <i>E.coli</i> .....	43
3.2.17	Izolace plasmidové DNA z bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	44
3.2.18	Izolace plasmidové DNA z kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
3.2.19	Transformace kvasinek lithium acetátovou metodou .....	44
3.2.20	Restrikční štěpení pomocí enzymů nukleáz .....	45
3.2.21	Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu.....	46
3.2.22	Purifikace z gelu .....	47
4	CÍLE.....	48
5	VÝSLEDKY .....	49
6	DISKUSE .....	101
7	ZÁVĚR .....	105
8	SEZNAM LITERATURY .....	106

## ABSTRAKT

Rpg1/Tif32/eIF3a je esenciální a největší podjednotkou translačního iniciačního faktoru eIF3 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Vedle jejích interakcí v rámci eIF3 komplexu byla již dříve popsána též její vlastnost interagovat s mikrotubuly. Předběžné výsledky laboratoře s kmeny v genetickém pozadí W303 ukázaly na existenci syntetického fenotypu *rpg1-2* mutanty s mikrotubulárním inhibítorem nokodazolem. Cílem této práce byla analýza „mikrotubulárního fenotypu“ *rpg1-2* mutanty a objasnění možného vlivu odlišného genetického pozadí. Prokázala jsem, že nezávisle na genetickém pozadí kmene (W303, BY, SEY) byly všechny analyzované mutanty *rpg1-1*, *rpg1-2* a *rpg1-3* termosenzitivní. Zjistila jsem však, že tyto mutanty v BY a SEY genetickém pozadí za nepermissivních podmínek (37°C, 4 h) nevykazují terminální fenotyp a nezastaví buněčný cyklus v G1 fázi, tak jak bylo popsáno dříve u kmenů pozadí W303. Tyto mutantní kmeny také nevykazovaly zvýšenou citlivost k benomylu a žádná z testovaných mutací v těchto kmenech neovlivňuje obnovu mikrotubulárního systému po uvolnění z působení nokodazolu. Připravila jsem nové kmeny s kombinací delece genu *BUB1* s jednotlivými testovanými termosenzitivními mutacemi v genu *RPG1*. Podrobná fenotypová analýza těchto dvojitých mutantů ukázala, že disfunkce obou genových produktů vede ke vzniku syntetického defektu. Získané výsledky naznačují, že translační faktor Rpg1/eIF3a v kmenech BY a SEY genetického pozadí je nezbytný také pro zdárné ukončení mitózy.

**Klíčová slova:** Rpg1, iniciace translace, mikrotubuly, *BUB1*

## **ABSTRACT**

Rpg1/Tif32/eIF3a is an essential and the largest subunit of translation initiation factor eIF3 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Besides interactions within the eIF3 complex it has been shown to interact with microtubules. Preliminary data of the laboratory obtained using strains of the W303 genetic background indicated that there is a synthetic phenotype between *rpg1-2* mutant and microtubule inhibitor nocodazole. Aim of this work to elucidate this „microtubule phenotype“ of the *rpg1-2* mutant and its dependency on used genetic background. I confirmed that independently on genetic background (W303, BY, SEY) all mutants *rpg1-1*, *rpg1-2* and *rpg1-3* were temperature-sensitive. I found that in contrast to published data on *rpg1* mutants of the W303 background these mutants of the BY and the SEY backgrounds do not arrest the cell cycle in G1 phase during cultivation at the restrictive temperature (37°C, 4 hours). In addition, all three mutants did not show an increased sensitivity to benomyl and none of them affects microtubule rearrangement after a release of cells from the nocodazole treatment. I constructed new strains with a combination of the *BUB1* gene deletion with the particular *rpg1* mutation. Phenotypic analyses of new double mutants revealed that simultaneous dis-function of Bub1 and Rpg1 results in a synthetic defect. Presented results indicate that translation factor Rpg1/eIF3a is crucial for a successful exit from mitosis in strains of BY and SEY genetic backgrounds.

**Keywords:** Rpg1, initiation of translation, microtubules, *BUB1*

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A – alanin

AA – aminokyselina (z angl. amino acid)

AA/MBA – akrylamid/bis akrylamid

ADP – adenosindifosfát

Amp – ampicilin

APC – anafázi podporující komplex (z angl. anaphase-promoting complex)

ATP – adenosintrifosfát

AUG – START kodón

BFP – modrý fluorescenční protein (z angl. blue fluorescent protein)

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)

CM – kompletní medium (z angl. complete medium)

CSN – COP9-Signalosome

DAPI – fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-phenylindol

ddH<sub>2</sub>O – deionizovaná voda

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTT – dithiothreitol

E – kyselina glutamová

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)

eIF – eukaryotický translační iniciační faktor (z angl. eucaryotic initiation factor)

FACS – průtoková cytometrie (z angl. Fluorescence-activated cell sorting)

G – glycin

G1, G2 – fáze buněčného cyklu (z angl. gap)

GDP- guanosindifosfát

GFP – zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)

GTP – guanosintrifosfát

HS – teplotní šok (z angl. heat shock)

I – izoleucin

IC – iniciační komplex (z angl. initiation complex)

KAc – octan draselný



L – leucin

LB – Luria-Bertani (*LB*) *broth*

LiAc – lithium acetát

M – mitotická fáze buněčného cyklu (z angl. mitosis)

MAPs – proteiny asociující s mikrotubuly (z angl. mikrotubule-associated proteins)

MAP kináza – mitogenem aktivovaná proteinová kináza (z angl. mitogen-activated protein kinase)

MCC – komplex mitotického kontrolního bodu (z angl. mitotic checkpoint complex)

Met – methionin

MFC – multifaktorový komplex (z angl. multi factor complex)

MM – minimální medium

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. acid)

MT– mikrotubuly

OD – optická denzita

ON – přes noc (z angl. overnight)

PCI/PINT doména (Proteasome, COP9, Initiation factor3/Proteasome, Int6, NIP-1, TRIP-15)

PEG – polyethylen glykol

PIC – preiniciační komplex (z angl. preinitiation complex)

R – arginin

RFP – červený fluorescenční protein (z angl. Red fluorescent protein)

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)

rRNA – ribosomální ribonukleová kyselina

S – syntetická fáze buněčného cyklu (z angl. synthesis)

S – serin

SAC – kontrolní bod uspořádání vřeténka (z angl. spindle-assembly checkpoint)

SDS – dodecylsírán sodný (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS – PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)

SOB – super optimální medium (z angl. super optimal broth)

SOC – super optimální medium s katabolickou represí (z angl. super optimal broth with catabolite repression)

SPB – jaderný plak (z angl. spindle pole body)  
ssDNA – jednovláknová deoxyribonukleová kyselina (z angl. single strand)  
T- threonin  
TAE – pufr obsahující Tris-acetate-EDTA  
TBE – pufr obsahující Tris/Borate/EDTA  
TBS – trisový pufr (z angl. Tris-Buffered Saline)  
TC – ternární komplex  
TCA – trichloroctová kyselina  
TEMED – tetramethylethylenediamin  
Tif – translační iniciační faktor (z angl. translation initiation factor)  
tRNA – transferová ribonukleová kyselina  
T-TBS – trisový pufr s Tween 20 (TBS-Tween pufr)  
UV – ultrafialové záření (z angl. ultra violet)  
V – valin  
YPD – růstové medium pro kvasinky (z angl. yeast-peptone-dextrose medium)

# 1 ÚVOD

V průběhu buněčného cyklu dochází k regulaci genové exprese, jejímž klíčovým krokem je proces iniciace translace. Pro správný průběh iniciační fáze je zapotřebí spolupráce mnoha proteinů a proteinových komplexů. Jedním z nich je komplex eIF3, který se skládá z 5 podjednotek (Rpg1/Tif32/eIF3a, Prt1/eIF3b, Nip1/eIF3c, Tif35/eIF3g a Tif34/eIF3i).

V naší laboratoři se zabýváme studiem proteinu Rpg1/Tif32/eIF3a v kvasince *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Tento jednobuněčný, eukaryotický mikroorganismus je vhodným modelem pro studium řady buněčných procesů na molekulární úrovni i pro mikroskopická pozorování řady událostí a změn.

V rámci své diplomové práce charakterizuji doposud nepublikované mutanty proteinu Rpg1 (*rpg1-2* a *rpg1-3*), které jsem porovnávala s již publikovanou mutantou *rpg1-1* (Kovarík et al. 1998). Sledovala jsem rovněž, jak tyto mutanty ovlivňují uspořádání mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Translace

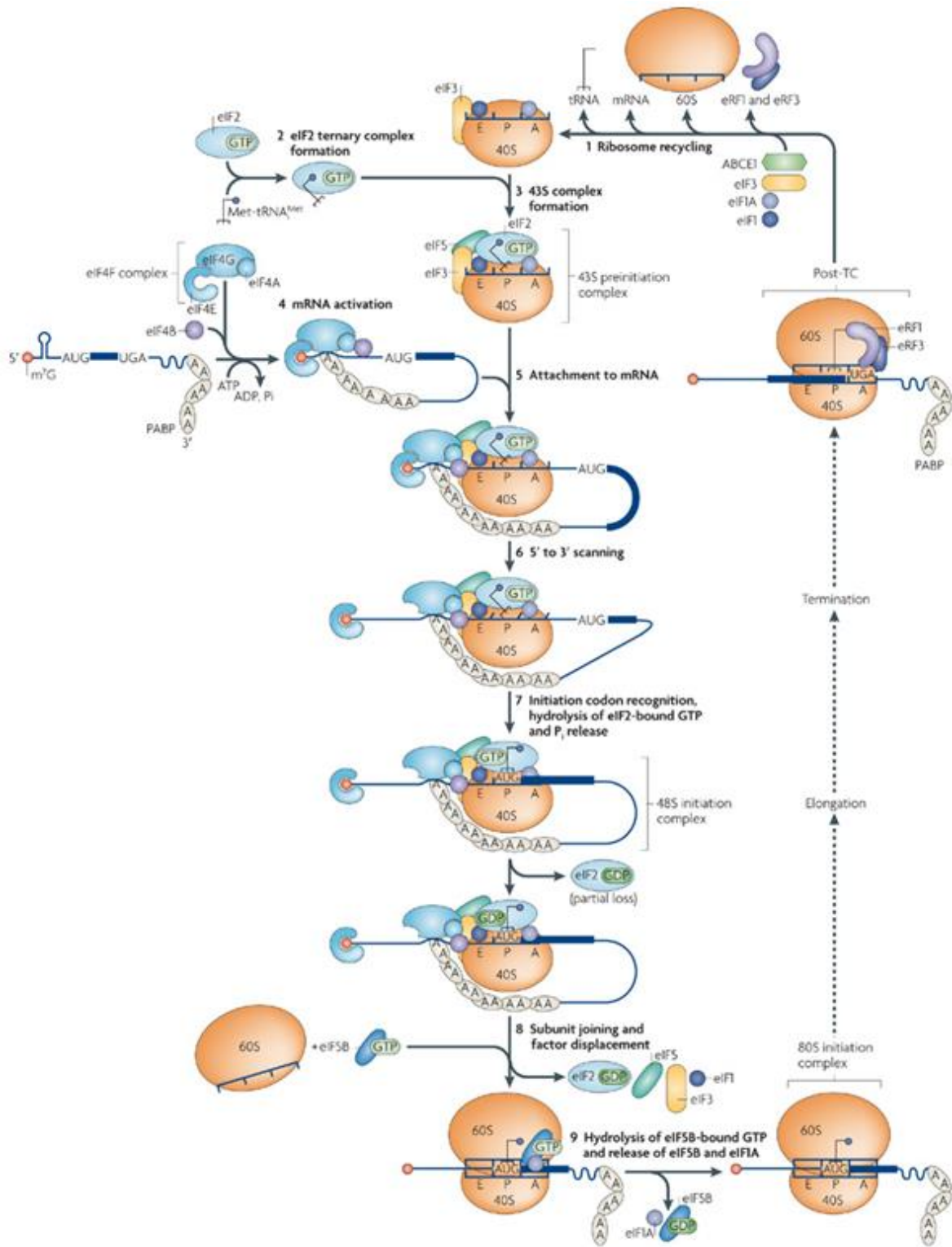
Translace je jedním z esenciálních kroků v procesu genové exprese. V jejím průběhu je „řeč“ sledu nukleotidů v mRNA přeložena do „řeči“ aminokyselin a z nich jsou skládány bílkoviny jako základní stavební kameny buňky. Translace může být kontrolována a regulována na všech úrovních (iniciace, elongace, terminace), ale nejprobádanější jsou regulace na úrovni iniciace translace. V důsledku nesprávné regulace translace může v buňce docházet jak ke změnám v celkové proteinové homeostázi, tak i v jednotlivých buněčných procesech, zahrnujících např. i buněčný cyklus. Tyto nežádoucí změny pak mohou v lidském organismu vyvolávat různé typy onemocnění včetně nádorového bujení a neurodegenerativních chorob.

#### 2.1.1. Průběh iniciace translace

Iniciace translace je velmi komplexní krok, vyžadující součinnost mnoha multifunkčních a multipodjednotkových proteinových komplexů. V eukaryotických buňkách je vyžadována spolupráce 13 různých translačních iniciačních komplexů (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF4G, eIF4H, eIF5, eIF5B) (shrnuto Jackson et al. 2010). U kvasinek je známo pouze 5 komplexů iniciačních faktorů (eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5), z nichž čtyři vykazují homologie k lidským faktorům (eIF1, eIF2, eIF3, eIF5), (Asano et al. 1998).

Jedním z kroků potřebných při iniciaci translace je tvorba ternárního komplexu (TC), který obsahuje eIF2 s navázaným GTP a jím rozpoznanou iniciátorovou tRNA (Met-tRNA<sup>Met</sup>) umístěnou v P místě malé ribosomální podjednotky (Sonenberg & Hinnebusch 2009). Tento důležitý krok iniciace translace zesilují další iniciační komplexy (eIF1, eIF3, eIF5). V kvasinkové buňce dochází k tvorbě tzv. multifaktorového komplexu (MFC), složeného z eIF1, eIF3, eIF5 a ternárního komplexu (Hinnebusch et al. 2004). Kromě kvasinek byl MFC pozorován u rostlin (Dennis et al. 2009) a člověka (Sokabe et al. 2012). Připojením MFC k malé ribosomální podjednotce 40S vzniká 43S preiniciační komplex (43S PIC) (Asano et al. 2000). Takto zformovaný 43S PIC se váže k mRNA, a tím dojde ke vzniku 48S

iniciačního komplexu. Sestavený 48S může začít s hledáním START kodónu (AUG) tzv. skenovacím mechanismem. Po nalezení START kodónu dochází k zastavení 48S IC v místě AUG (Algire et al. 2005) a hydrolýze GTP navázaného na eIF2. Následuje uvolnění iniciačních faktorů z 48S IC, připojení velké ribosomální podjednotky 60S na malou 40S a vzniku 80S iniciačního komplexu připraveného k elongaci.



Obr. 1 *Iniciace translace u eukaryot.* (Převzato z Jackson et al. 2010).

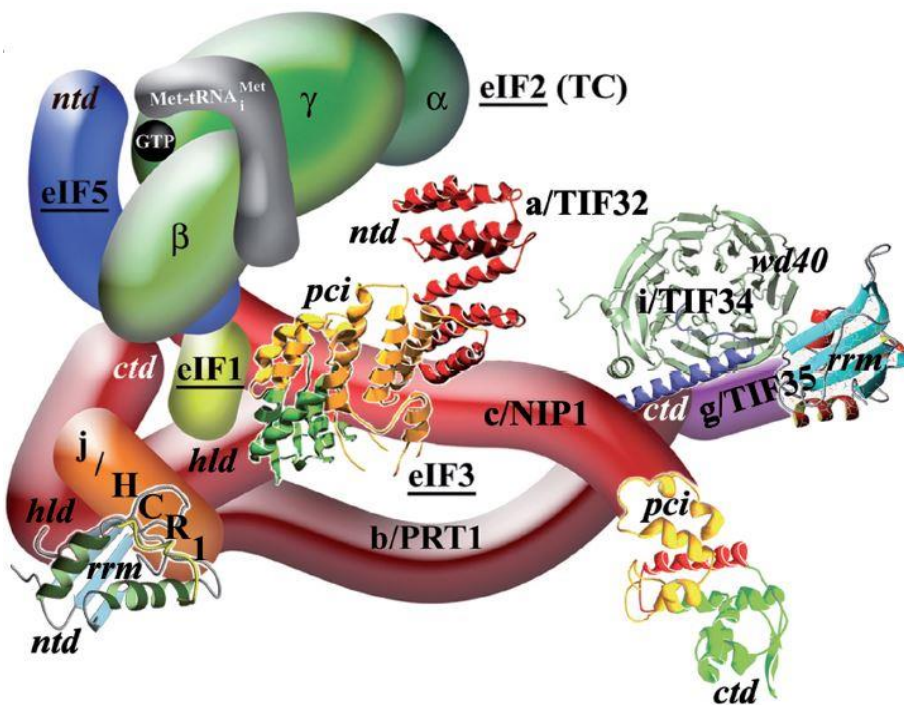
## 2.1.2 eIF3 komplex

Největším z eukaryotických iniciačních faktorů je multiproteinový komplex eIF3 (Obr. 2). Jak již bylo zmíněno, uplatňuje se při tvorbě 43S PIC (Obr. 1) u savců i kvasinek (Majumdar et al. 2003; Valásek et al. 2002), ale jeho funkce je potřebná při hledání START kodónu (Chiu et al. 2010; Nielsen et al. 2004) i při reiniciaci translace. (Valásek, Phan, et al. 2001; Szamecz et al. 2008; Munzarová et al. 2011; Nielsen et al. 2004).

U kvasinky *S. cerevisiae* se jádro proteinového komplexu eIF3 skládá z pěti stochiometricky zastoupených podjednotek (Obr. 2), z nichž každá má svého lidského homologa: Rpg1/Tif32/eIF3a, Prt1/eIF3b, Nip1/eIF3c, Tif35/eIF3g a Tif34/eIF3i (Tabulka 1) (Valasek et al. 1998; Asano et al. 1998; Phan et al. 1998; Hinnebusch 2006). S tímto komplexem volně asociuje neesenciální protein Hcr1/ eIF3j. Hcr1 svou funkcí podporuje vazbu eIF3 k ribosomu, zapojuje se do ribosomální biogeneze a správného výběru START kodónu (Elantak et al. 2010; Valásek, Hasek, et al. 2001). Oproti kvasinkovému eIF3 (Obr. 2) je ten lidský komplexnější a sestává ze 13 podjednotek (eIFa-eIFm) (Phan et al. 1998; Damoc et al. 2007).

název podjednotky <i>S. cerevisiae</i>	Rpg1/Tif32/eIF3a	Prt1/eIF3b	Nip1/eIF3c	Tif35/eIF3g	Tif34/eIF3i
<i>Funkce v S. cerevisiae</i>	součást subkomplexu Prt1-Rpg1-Nip1 podílí se na navázání mRNA a iniciační tRNA k ribosomu; zahrnuta v reiniciaci translace	součást subkomplexu Prt1-Rpg1-Nip1 stimuluje vazbu mRNA a iniciační tRNA k ribosomu	součást subkomplexu Prt1-Rpg1-Nip1 podílí se na uspořádání preiniciačního komplexu a výběru START kodónu	stimuluje opětovné zahájení skenování při reiniciaci translace	stimuluje rychlost skenování při reiniciaci translace
lidský homolog	p180/ eIF3a	hPrt1/ eIF3b	p110/ eIF3c	p44/ eIF3g	p36/ eIF3i

Tabulka 1 Názvy a funkce podjednotek kvasinkového eIF3 komplexu s lidskými homology.



Obr. 2 *Struktura eIF3 komplexu s jeho podjednotkami. (Převzato z Khoshnevis et al. 2014).*

## 2.1 eIF3a/Rpg1/Tif32

### 2.1.1 Struktura proteinu Rpg1

Gen *RPG1* kóduje esenciální protein o molekulové hmotnosti 110 kDa, který se skládá z 964 aminokyselinových zbytků (AA) (Kovarík et al. 1998). Sekvenční analýza proteinu Rpg1 odhalila neobvyklou distribuci nabitých aminokyselin. Vzhledem k tomu, lze molekulu Rpg1 rozdělit do tří domén. N-terminální aminokyselinové zbytky (1-110) tvoří základní, bazický polypeptid a střední oblast (111-650 AA) představuje kyselou část molekuly. C-terminální část (651-964 AA) je podobně jako N-terminální část bazická, navíc je velmi bohatá na prolin a obsahuje několik potenciálních míst (P-X-S/T-P) typických pro fosforylaci MAP kinázou (Gonzalez et al. 1991).

Zmíněná C-terminální oblast Rpg1 obsahuje kromě oblasti bohaté na prolin i HCR-like doménu, která zprostředkovává vazbu s proteinem Hcr1. Interakci s proteinem Prt1 zprostředkovává tzv. RRM motiv, rozpoznávající také RNA (Valásek, Phan, et al. 2001). S C-terminální částí Rpg1 asociují i další iniciační proteinové komplexy, eIF1 a eIF2 (Valásek et al. 2002). Dále byla prokázána vazba ribosomální podjednotky 40S proteinem RPS0A k N-terminální doméně Rpg1, a také



k C-terminální doméně Rpg1, kde se váže helix (16-18) 18S rRNA, (Kouba et al. 2012; Valásek et al. 2003).

Rpg1 kromě zmíněných domén, nese i tzv. PCI/PINT doménu (419-506 AA) (Proteasome, COP9, Initiation factor3/Proteasome, Int6, NIP-1, TRIP-15) (Shalev et al. 2001), která zprostředkovává protein-proteinové interakce. Proteiny s PCI doménou jsou součástí víčka proteasomu, COP9 signalosomu (CNS) a eIF3 komplexu (Maytal-Kivity et al. 2003). Rpg1 a Nip1 jsou jediné dvě podjednotky eIF3 komplexu nesoucí PCI doménu (Khoshnevis et al. 2014a). U Nip1 byla překvapivě prokázána vazba PCI domény s RNA, kde funguje jako můstek mezi eIF3 a 40S podjednotkou ribosomu. (Kouba et al. 2012).

Sekvenční analýzy Rpg1 provedené Kovarikem et al. 1998 také ukázaly podobnost krátkého úseku (926-947 AA) s doménou bohatou na prolin savčích proteinů MAP2 (Lewis et al. 1988) a Tau (Himmler et al. 1989), ale jiné homologie s MAP2 proteinem nebyly nalezeny. MAP2 i Tau patří do rodiny MAPs („*mikrotubule-associated proteins*“) proteinů a významně se podílí na dynamice mikrotubulů. A právě Hasek a spol. popsali Rpg1 jako protein interagující s protilátkou namířenou proti prasečímu MAP2 proteinu a jako protein interagující s mikrotubuly (Hasek et al. 2000; Kovarik et al. 1998). Z tohoto důvodu bylo pozorováno ovlivnění dynamiky mikrotubulů u různých mutantů Rpg1.

### **2.1.2 Funkce proteinu Rpg1 v *S. cerevisiae***

Protein Rpg1/eIF3a je největší podjednotkou kvasinkového eIF3 komplexu. V *S. cerevisiae* je esenciálním proteinem a je známa pouze jeho role v iniciaci v rámci eIF3 komplexu (Valásek et al. 2003; Kovarik et al. 1998). Byly zjištěny interakce Rpg1 s kvasinkovým cytoskeletem. Provázanost nebo spojení Rpg1 s aktinovými filamenti jsou indikovány interakcemi Rpg1 s proteinem asociovaným s aktinem zvaným Sla2 (Palecek et al. 2001). Lokalizace Rpg1 na mikrotubulech byla testována metodou nepřímé imunofluorescence s využitím specifické monoklonální protilátky PK1/1 proti Rpg1 (Vavricková et al. 1998) a asociace Rpg1 s mikrotubuly byla prokázána *in vitro* (Hasek et al. 2000). Bližší propojení Rpg1 s mikrotubuly není dosud více známo a vzhledem k působení Rpg1 v různých buněčných procesech by mohl nabrat

na významu. Vzájemné působení Rpg1 a mikrotubulů by se mohlo spolupodílet na kontrole kvasinkové translace.

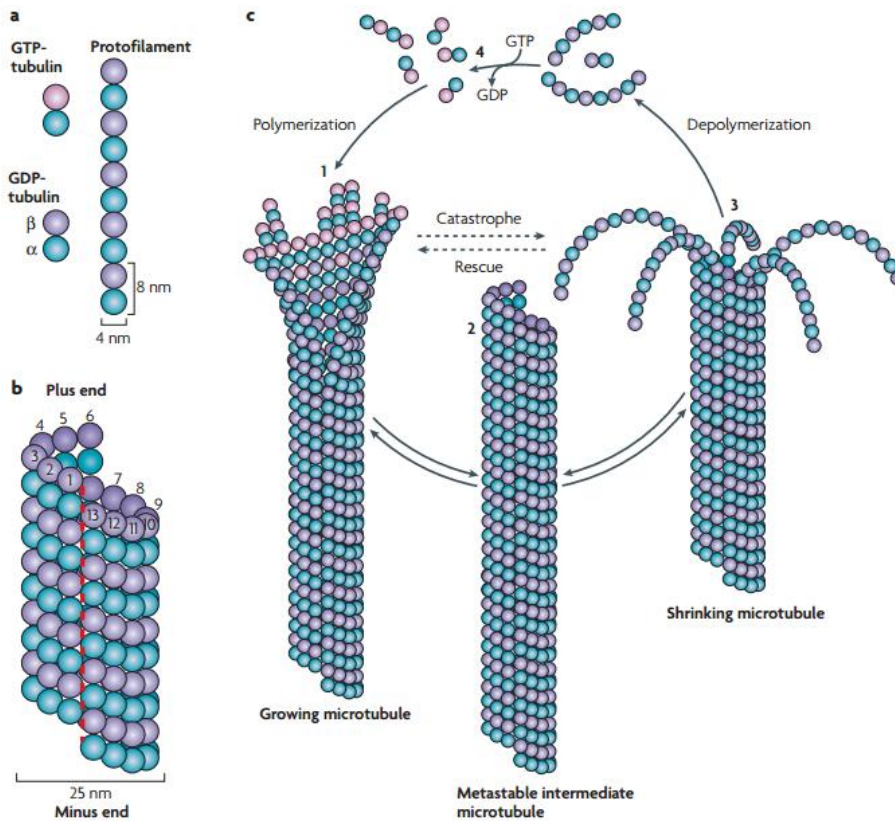
### 2.1.2.1 Mikrotubulární cytoskelet v *S. cerevisiae*

V *S. cerevisiae* existují celkem čtyři geny (*TUB1*, *TUB2*, *TUB3*, *TUB4*) kódující tubuliny.  $\alpha$ -tubulin je kódován dvěma geny, *TUB1* a *TUB3* (Schatz et al. 1986), které jsou funkčně rovnocenné, avšak hladina exprese je mnohonásobně vyšší u esenciálního *TUB1*. Oproti tomu  $\beta$ -tubulin je kódován jediným esenciálním genem, označovaným *TUB2* (Neff et al. 1983). Podobně jako  $\beta$ -tubulin je i  $\gamma$ -tubulin kódován pouze jedním esenciálním genem zvaným *TUB4*.

$\alpha$ -tubulin a  $\beta$ -tubulin společně vytváří heterodimery, které polymerizují a vytváří vlákna zvaná protofilamenta, která se skládají do šroubovice a vytvářejí cytoskeletální strukturu zvanou mikrotubulus (Obr. 3) Mikrotubuly se účastní řady jaderných procesů zahrnujících orientaci mitotického vřeténka, migraci jádra v mitóze či při křížení a segregaci chromosomů v mitóze i meióze (Jacobs et al. 1988). V buňce *S. cerevisiae* všechny mikrotubuly (astrální i cytoplasmatické) vycházejí z centra organizující mikrotubuly označovaného jako SPB („*spindle pole body*“) neboli jaderný plak (u savců obdobné centrosomu), který je zanořen do jaderné membrány (Marschall et al. 1996; Spang et al. 1996; Sobel & Snyder 1995). Zmíněný  $\gamma$ -tubulin je konzervovanou částí SPB, vyskytující se na jeho vnitřní i vnější straně, a je esenciální pro nukleaci mikrotubulů, která je nutná pro vytvoření mitotického vřeténka (Obr. 5) (Marschall et al. 1996; Spang et al. 1996).

Mikrotubuly složené z heterodimerů  $\alpha$ -,  $\beta$ -tubulinů jsou dynamické a neustále dochází ke střídání jejich růstu (polymerace) a destrukce (depolymerace). S mikrotubuly asociují MAPs proteiny, regulující jejich dynamiku tím, že podporují jejich stabilitu, nebo naopak napomáhají jejich destabilizaci. Dynamika mikrotubulů může být narušena působením látek označovaných jako mitotické jedy či inhibitory mikrotubulů. Svým působením brání polymeraci či depolymeraci mikrotubulů a tím i jejich fyziologické funkci. Příkladem inhibitoru se stabilizačním účinkem je taxol neboli paclitaxel, patřící do skupiny taxanů. Taxol se naváže na MT a brání jejich depolymeraci. Příkladem druhé skupiny inhibitorů, vážících se heterodimery a bránících polymeraci MT jsou např. vinblastin, kolchicin, nokodazol, benomyl (Li & Murray 1991; Morris & Fornier 2008).

Dynamické změny v architektuře mikrotubulů a s tím i související změny jejich distribuce jsou v průběhu buněčného cyklu *S. cerevisiae* nezbytné pro jeho správný průběh (Obr. 4).



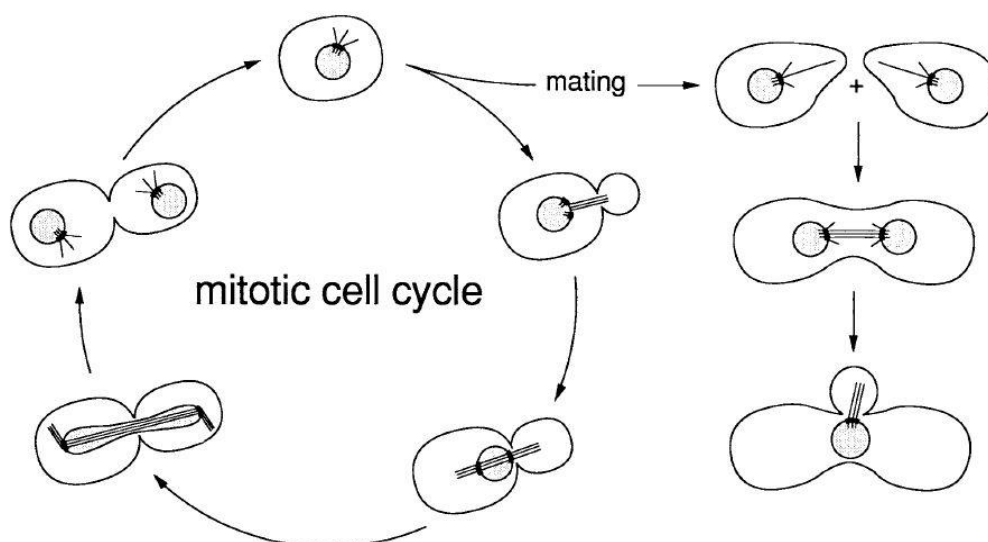
Obr. 3 **Struktura a dynamika mikrotubulů.** a) heterodimery složené z  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu se skládají do protofilament. Růst vlákna je podmíněn vazbou GTP na heterodimer tubulinu. b) Navazování heterodimeru  $\alpha$ -,  $\beta$ -tubulinu na plus konec vlákna vytváří šroubovicovou strukturu v podobě dutého válce. c) Dynamické změny v růstu (polymerace) a zkracování (depolymerace) mikrotubulů (Převzato z

### **Změny v uspořádání mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu *S. cerevisiae***

Buněčným cyklem lze obecně označit sled událostí, jejichž výsledkem je vznik nové buňky. Doba trvání jednoho buněčného cyklu zahrnuje období od vytvoření nové buňky až po její rozdělení, a tedy vznik jedné nové buňky (dceřiné). Buněčný cyklus se skládá ze čtyř na sebe vzájemně navazujících fází v následujícím pořadí: G1 („gap“), S („synthesis“), G2 a M („mitosis“) fáze. V průběhu jednotlivých fází dochází ke změnám v architektuře mikrotubulů (Obr. 4). Buňka bez pupene obsahuje pouze jedno SPB, ale jakmile začne ke konci G1 fáze (tj. na začátku nového cyklu) pučet, dojde ke zdvojení SPB. Před replikací DNA musí dojít k oddělení jaderných plaků a jejich umístění na protilehlé strany jaderného obalu. Zároveň dochází k vytvoření

krátkého mitotického vřeténka, které se prodlužuje ve chvíli, kdy se jádro nachází v oblasti krčku. Takto vystavěné mitotické (dělicí) vřeténko se účastní procesu segregace chromosomů a výstupu z mitózy (Shaw et al. 1997).

Pro správný průběh buněčného cyklu a s tím související růst buňky je zapotřebí přítomnost dvou morfologických kontrolních bodů („*checkpointů*“). První z nich, nazývaný START, se nachází na konci G1 fáze předchozího buněčného cyklu. Jeho hlavním úkolem je kontrolovat velikost buňky a příhodnost vnějších podmínek potřebných pro započetí nového cyklu. Druhý kontrolní bod se objevuje před samotným zahájením mitózy. Tento mitotický „*checkpoint*“, známý jako „*spindle assembly checkpoint*“ (SAC), kontroluje správné připojení všech chromosomů na mikrotubuly dělicího vřeténka a tím pomáhá úspěšnému ukončení mitózy a celého buněčného cyklu.

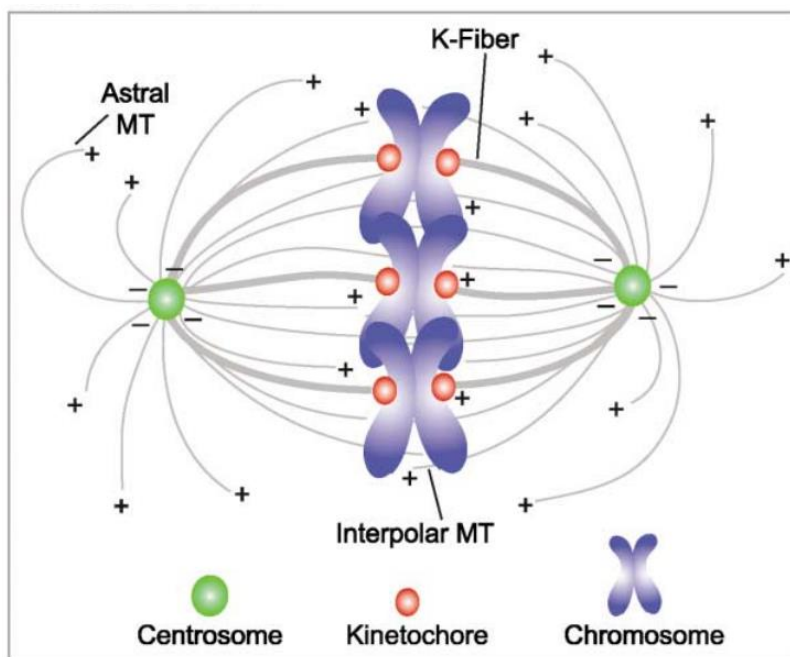


Obr. 4 **Změny v architektuře mikrotubulů během buněčného cyklu a páření kvasinky *S. cerevisiae*.** a) V průběhu buněčného (mitotického) cyklu haploidních buněk dochází před replikací DNA ke zdvojení SPB jejich rozmístění na protilehlé strany jaderného obalu. Zároveň dochází k vytvoření mitotického vřeténka, které se v mitóze prodlužuje a účastní se segregace chromosomů. b) K meiotickému dělení *S. cerevisiae*, dochází při křížení dvou haploidních buněk opačného párovacího typu, jehož výsledkem je vznik diploidní buňky. Ta sporuluje, tzn. prochází dvěma meiotickými děleními, jejichž výsledkem jsou čtyři haploidní buňky (spóry). (Převzato z Stearns 1990).

### Mechanismus mitotického kontrolního bodu

Úspěšné buněčné dělení vyžaduje přesnou segregaci chromosomů v mitóze. Chybná segregace může vést ke vzniku aneuploidií, jež jsou znakem několika druhů rakoviny a poruch při narození. Aby buňka zabránila chybným segregacím vypuštění nového

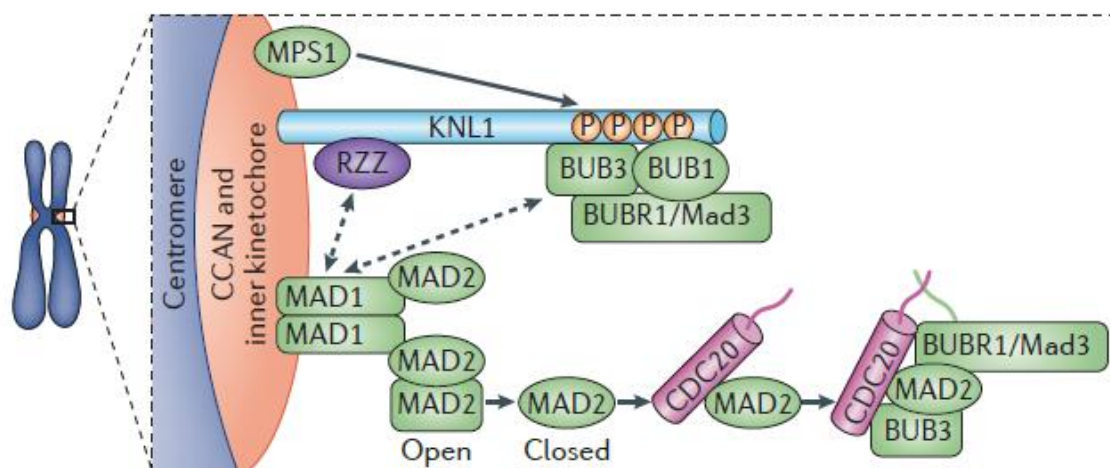
pupene či reiniciaci replikace DNA (Li & Murray 1991; Hoyt et al. 1991), a tím i předčasnému výstupu z mitózy, je potřeba fungování SAC kontrolního bodu. SAC společně s kinetochory kontrolují správné bipolární připojení všech chromosomů k mikrotubulům dělicího vřeténka (Obr. 5) a v případě potřeby pozdrží průběh mitózy, dokud se chromosomy správně nepřipojí (Howell et al. 2004).



Obr. 5 **Dělicí vřeténko a jeho komponenty.** Na obrázku jsou znázorněny komponenty mitotického vřeténka. Šedou barvou jsou zakreslené mikrotubuly, zelenou organizační centra mikrotubulů – u kvasinek zvané jaderné plaky (SPB); červenou barvou jsou označeny kinetochory a modrou chromosomy. Pozice plus a mínus konců je označena jako (+) a (-). (Převzato z Kline-Smith & Walczak 2004).

Signalizace SACu je zprostředkována souhrou subkomplexů, označovaných KMN (Knl1/Spc105/Blinkin, Mis12/Mtw1, Ndc80/Hec1) (Cheeseman et al. 2006), a řadou proteinů kontrolního bodu umístěných na kinetochorech (Mps1, Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3) (Moyle et al. 2014; London & Biggins 2014). Kinetochory fungují jako makromolekulární „mašinérie“, vyskytující se v oblasti centromer chromosomů (Obr. 5), jejichž úlohou je připojit chromosomy na mikrotubuly. Pokud nejsou kinetochory připojené k mikrotubulům dělicího vřeténka, dochází souhrou signálů k aktivaci SACu (Howell et al. 2004). Prvním je fosforylace Knl1, prostřednictvím kinázy Mps1, což způsobí navázání Bub1, Bub3 a Mad3 na fosforylovaný Knl1. Tento krok je signálem pro dimerizaci komplexů Mad1/Mad2 na kinetochorech (Luo et al. 2002; Moyle et al. 2014). Dimerizace způsobí změnu stavu solubilního Mad2 na uzavřený, který interaguje s Cdc20 a společně s Mad3 a Bub3 vytváří komplex

mitotického kontrolního bodu (MCC) (Sudakin et al. 2001). Vytvoření tohoto inhibičního komplexu brání funkci E3 ubiquitin ligázy zvané APC (anaphase promoting complex) (Sudakin et al. 2001) a tím i vstupu do anafáze (Fang et al. 1998). Ve chvíli, kdy dojde k připojení mikrotubulů ke kinetochorům, dojde k vypnutí SACu (Obr. 6) a APC může polyubiquitinací cyklinu b a securinu (drží pohromadě sesterské chromatidy chromosomů) zprostředkovat jejich degradaci v proteasomu a tím zajistit vstup do anafáze a následný výstup z mitózy (Shrnuto Foley & Kapoor, 2013).



Obr. 6 **Schéma aktivace SAC kontrolního bodu na kinetochorech** (Převzato Foley & Kapoor 2013)

### **Role Bub1 kinázy v mitotickém kontrolním bodě**

Kináza Bub1 se účastní mitotického kontrolního bodu, také označovaného SAC, v němž váže a fosforyluje proteiny Bub3, Mad1, Mad2 a také sám sebe. (Roberts et al. 1994). Bylo zjištěno, že protein Bub1 se účastní mitotického „checkpointu“ nejen v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, ale i v dalších organismech, příkladem je kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* (Bernard et al. 1998), myš (Taylor & McKeon 1997) nebo člověk (Ouyang et al. 1998).

Při ztrátě funkce proteinu Bub1 dojde k vynechání mitotického pozastavení, které je součástí kontrolního bodu. Naopak nadprodukce proteinů Bub1-5 vyvolává zpoždění u kvasinkových buněk nacházejících se v tomto kroku mitózy (Farr & Hoyt 1998), tj. před bipolárním připojením chromosomů k dělicímu vřeténku. Charakteristickým znakem buněk, pozastavených v tomto stádiu mitózy, je zvýšená koncentrace mitotického cyklinu Clb2, uvnitř kvasinkové buňky. Důsledkem

nepřetržité nadprodukce Bub1-5 je snížení rychlosti růstu bez letálních následků. (Farr & Hoyt 1998) Zmíněné fenotypy vyžadují nejen změnu konzervovaného aminokyselinového zbytku, nacházejícího se uvnitř kinázové domény Bub1 (G 785), ale zároveň vysokou úroveň exprese tohoto genového produktu. Jednotlivé působení změn bez účasti druhé složky vyvolává pouze nepatrný projev. Opakem je působení obou složek najednou, ty vyvolávají v buňce silnou odpověď. Je nutné podotknout, že studium mutantních buněk *bub1* je obtížné nejen vzhledem k jejich špatnému růstu, ale také k častému vzniku aneuploidií (Farr & Hoyt 1998).

### 2.1.3 Mutanty Rpg1

Mutantní kmen *rpg1-1* vytvořený v genetickém pozadí W303 byl popsán jako termosenzitivní, jednobodový mutant. *rpg1-1* byl vytvořen hydroxylaminovou mutagenézí, při níž došlo k substituci argininu za isoleucin na pozici 731AA v C-terminální části (Kovarik et al. 1998). Pro charakterizaci *rpg1-1* byly použity kmeny s *rpg1-1* na centromerickém plasmidu nebo kmeny s integrovaným plasmidem nesoucím mutantní Rpg1. Kromě *rpg1-1* byl ve stejné skupině v genetickém pozadí W303 vytvořen také jinak nepublikovaný mutant *rpg1-2*, viz na konci kapitoly uvedený komentář. U mutantu *rpg1-1* byl popsán terminální fenotyp, který se projevuje po 4 hodinách v 37°C zastavením růstu v G1 fázi buněčného cyklu. (Kovarik et al. 1998).

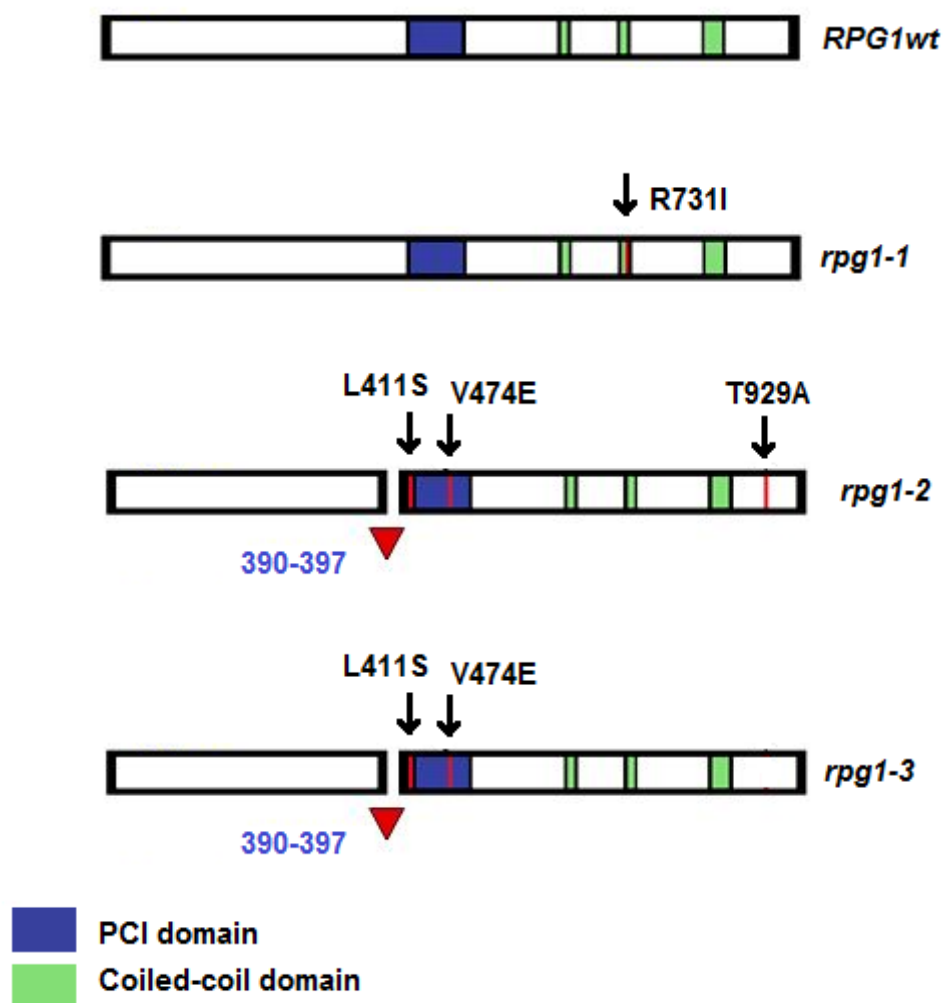
V experimentech prováděných skupinou Kovarika, byli mutanti *rpg1-1* po kultivaci v 25°C přesunuty do předeřhátého YPD média (na 37°C) a inkubováni za nepermissivní teploty, tj. 37°C po dobu čtyř hodin. V publikaci je poznamenáno, že buňky inkubované za uvedených nepermissivních podmínek (37°C) byly po přesunu do permissivních podmínek (25°C) schopné pokračovat v růstu, a to i při delší než čtyřhodinové inkubaci v 37°C (Kovarik et al. 1998). Statistika ukázala, že přes 60% asynchronní populace buněk *rpg1-1*, kultivovaných 4 hodiny v nepermissivních podmínkách, bylo zastaveno v podobně dubletů (dvojic) fyzicky neoddělených buněk (mateřské a dceřiné). V téže populaci nesynchronizovaných buněk bylo kolem 25% jednotlivých nepučících buněk a zbylé procento tvořily buňky s malým pupenem. Dále se ukázalo, že u 99% těchto buněk, obarvených DAPI (barvicí jadernou DNA), bylo v každé buňce jedno jádro. Tento fakt potvrzuje kompletně dokončenou separaci DNA

v těchto zastavených, fyzicky neoddělených buňkách. Neoddělené buňky, vykazující popsaný terminální fenotyp, lze od sebe oddělit prostřednictvím mírné sonikace či působením enzymu zymolyázy, která odbourává buněčnou stěnu kvasinek. (Kovarík et al. 1998)

V naší laboratoři byla na základě uvedených mutantů v genetickém pozadí W303 zkonstruována nová mutace Rpg1 (*rpg1-3*) a všechny tři mutantní verze Rpg1 byly vneseny do dvou různých genetických pozadí – BY genetické pozadí (vytvořeno Ivana Malcová, nepublikováno) a SEY genetické pozadí (vytvořeno Lenka Senohrábková, nepublikováno). Tyto vytvořené mutanty jsou plasmidové verze na rozdíl od mutantů v pozadí W303, které jsou integrované. Mutanta *rpg1-2* obsahuje delecii 7 aminokyselin v oblasti 390-397AA, dvě bodové mutace v PCI doméně (L411S a V474E) a jednobodovou mutaci na C-konci (T929A). *rpg1-3* je stejná jako *rpg1-2*, neobsahuje pouze C-terminální mutaci (T929A).

Tyto mutanty jsou použity v experimentální části této práce. Zajímalo nás, zda se budou dané mutanty (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) chovat stejně ve všech třech genetických pozadích (BY, SEY, W303). Zejména jsme se zaměřili na porovnání mutantů integrovaných do genomu s plasmidovým systémem.





Obr. 7 **Rpg1 a jeho termosenzitivní mutanty.** Zobrazené kmeny obsahují genomovou delecí *RPG1* a plasmid s wt formou nebo příslušnou mutantou Rpg1 značenou na C-konci GFP.

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Seznam chemikálií

AA/MBA 30% (Roth)	L-Leucin (Serva)
Adenin (Serva)	L-Lysin (Serva)
Agaróza (Sigma-Aldrich)	L-Methionin (Serva)
Ampicilin (Biotika Bohemia)	L-Serin (Serva)
APS (Lachema)	L-Threonin (Serva)
Bacto agar (Difco)	L-Tryptofan (Serva)
Bacto pepton (Difco)	L-Tyrosin (Serva)
Bacto trypton (Difco )	L-Valin (Serva)
Bacto Yeast Extract (Difco)	NaCl (P-LAB)
Benomyl (Riedel-de Haen)	Nocodazol (Sigma)
BSA (Serva)	Nourseothricin (Webioage)
Casy clean (Roche)	Octan draselný (Sigma)
Casy ton (Roche)	Octan litný (Sigma)
DAPI (Sigma)	PEG (Sigma)
DTT (Serva)	Ponceau S (Sigma)
EDTA disodná sůl (Sigma)	RNáza A (Sigma)
GelRed (Biotium)	SDS (Serva)
Geneticin (G418 Sulfate) (Gibco)	ssDNA (Clontech)
glukosa (Penta)	TCA (Serva)
Glycerol (Lachema)	TEMED (Serva)
Glycin (P-LAB)	Tris (Serva)
Hygromycin B (Invivogen-Cayla)	Tween 20 (Loba)
Kyselina boritá (P-LAB)	Uracil (Sigma)
L-arginin (Serva)	Ustalovač (Foma Bohemia)
L-Aspartátová kyselina (Sigma)	Vývojka (Adefo)
L-Fenylalanine (Serva)	
L-Glutamová kyselina (Serva)	
L-Histidin (Serva)	

1kb DNA Ladder (New England Biolabs)

1kb DNA Ladder (Biosystems)

proteinový standard Kaleidoskop (Biorad)

Fotografický film - Fomei RF-B Medical X-Ray Film, 13x18/100 (Fomei)

Imerzní olej - 35503 Immersion oil 500CC (Olympus)

Luminogenní substrát - SuperSignal®West Dura Substrate (ThermoScientific)

Nitrocelulózová membrána - Nitrocellulose Membranes Protran (Sigma)

Proteinový standard Kaleidoskop (Biorad)

Whatmanový filtrační papír - western blotting filter paper (Whatman)

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)

### 3.1.2 Seznam použitých organismů

*Escherichia coli*

Použité kmeny:

kmen DH5 $\alpha$  *F. endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG*  
 $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K-m_K+), \lambda-$

*Saccharomyces cerevisiae*

Použité kmeny:

kmen	genotyp	zdroj
CRY75	W303 <i>MATa ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100</i>	R. Rothstein
CRY90	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 trp1 leu2 ura3 sst2-1</i>	J.Konopka, Stony Brook, New York
CRY155	BY4741 <i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
CRY157	BY4743 <i>MATa/MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0/MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
CRY240	YES01, <i>MATa; ura3-52, trp1-63, leu2::tTA, YBR079c (RPG1) (-43, -1)::tetO7-loxP-kanMX-loxP,</i>	S. Kohlwein, Graz
CRY248	W303 <i>MATa ura3::URA3::rpg1-1 trp1-1::TRP1::rpg1-<math>\Delta</math>2 ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15</i>	Kovarik et al.1998
CRY250	W303 <i>MATa leu2-3,112::LEU2::rpg1-1 trp1-1::TRP1::rpg1-<math>\Delta</math>2 ura3 ade2-1 can1-100 his3-11,15</i>	Kovarik et al.1998
CRY278	W303 <i>MATa rpg1-<math>\Delta</math>1::LEU2 ura3::URA3::MET3-RPG1 ade2-1 trp1-1 can1-100 his3-11,15 ura3</i>	Kovarik et al.1998
CRY287	W303 <i>MATa trp1-1::TRP1::rpg1-<math>\Delta</math>2 ura3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112::LEU2::pYAW119</i>	L. Valášek/H. Ruis group, Vídeň

CRY288	W303 MATa trp1-1::TRP1::rpg1-Δ2 ura3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112::LEU2::pYAW119 NIP1-mRFP::kanMx	naše laboratoř
CRY502	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bar1::KanMX4	EUROSCARF
CRY1403	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1	naše laboratoř
CRY1407	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pRPG1-GFP - C (HIS3) RPG1 wt	naše laboratoř
CRY1409	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-GFP (HIS3) rpg1-2	naše laboratoř
CRY1412	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-4M-GFP (HIS3) rpg1-3	naše laboratoř
CRY 1603	SEY MATa leu2-3,112 pRS306-mCherry-TUB1-URA3:ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 WT SEY	naše laboratoř
CRY1677	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) rpg1-2	naše laboratoř
CRY1678	SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-GFP (HIS3) rpg1-2	naše laboratoř
CRY1679	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) rpg1-3	naše laboratoř
CRY1680	SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-4-GFP (HIS3) rpg1-3	naše laboratoř
CRY1681	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1	naše laboratoř
CRY1682	SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1	naše laboratoř
CRY1683	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) RPG1 wt	naše laboratoř
CRY1684	SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pRPG1 -GFP-C (HIS3) RPG1 wt	naše laboratoř
CRY1971	BY4741, MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 bub1Δ::KanMX4	EUROSCARF
CRY1987	SEY MATa leu2-3112 ura3-5::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1 -GFP-C (HIS3) RPG1 wt	vytvořeno v této práci
CRY1988	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1	vytvořeno v této práci
CRY1989	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) rpg1-2	vytvořeno v této práci
CRY1990	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) rpg1-3	vytvořeno v této práci
CRY2204	CRY1971xCRY1680, MAT? leu2- ura3- his3- bub1Δ::KanMX4 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-4-GFP rpg1-3	vytvořeno v této práci
CRY2205	CRY1971xCRY1680, MATa leu2- ura3- his3- trp1-Δ901 lys- bub1Δ::KanMX4 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-4-GFP rpg1-3	vytvořeno v této práci
CRY2206	CRY1971xCRY1678, MATa leu2- ura3- his3- trp1-Δ901 lys- bub1Δ::KanMX4 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-GFP rpg1-2	vytvořeno v této práci
CRY2207	CRY1971xCRY1682, MAT? leu2- ura3- his3- trp1-Δ901 bub1Δ::KanMX4 + pLV14-GFP rpg1-1	vytvořeno v této práci

CRY2208	CRY1971xCRY1682, <i>MAT?</i> <i>leu2- ura3- his3- trp1-Δ901</i> <i>bub1Δ::KanMX4 + pLV14-GFP rpg1-1</i>	vytvořeno v této práci
CRY2209	CRY1971xCRY1684, <i>MATα leu2- ura3- his3- trp1-Δ901</i> <i>rpg1Δ:: natNT2 + pRPG1 -GFP-C BUB1Δ::KanMX4 RPG1 wt</i>	vytvořeno v této práci

### 3.1.3 Kultivační média a roztoky

#### YPD médium

10 g/l Bacto yeast extract

20 g/l Bacto pepton

20 g/l glukosa

**YPD miský:** YPD médium + 2% živný agar (20 g/l Bacto agar)

Dle potřeby lze po zchlazení na 50°C přidat antibiotika – geneticin (G418) - výsledná koncentrace 200 µg/ml; nourseothricin (NTC) – výsledná koncentrace 100 µg/ml.

#### Minimální médium (MM)

100 ml 10x YNB+N

20 g/l glukosa

#### 10x YNB+N

17 g YNB

50 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Doplnit H<sub>2</sub>O do 1000 ml. Sterilizovat filtrací.

#### Kompletní médium (CM)

pozn. Kompletní médium je minimální médium obohacené o směs všech aminokyselin.

100 ml 10x YNB+N

50 ml 20x Complete AA

20 g/l glukosa

V případě MM a CM je nutné nejprve sterilizovat autoklávkem ddH<sub>2</sub>O a po ochlazení na cca 60°C přidat ostatní složky směsi. Rozpis je uveden na celkový objem 1000 ml.

Podle potřeby lze Complete AA nahradit směsí aminokyselin s vynecháním určité složky (drop-out), např. HIS-, URA-, LEU-, LYS- atd.

### **Complete AA**

Adenin 500 mg	L-Fenylalanine 600 mg
L-arginin 240 mg	L-Serin 4500 mg
L-Aspartátová kyselina 1200 mg	L-Threonin 2400 mg
L-Glutamová kyselina 240 mg	L-Tryptofan 480 mg
L-Histidin 240 mg	L-Tyrosin 360 mg
L-Leucin 720 mg	L-Valin 1800 mg
L-Lysin 360 mg	Uracil 240 mg
L-Methionin 240 mg	

### **20x Complete AA**

1,3g / 50ml ddH<sub>2</sub>O

Sterilizovat filtrací.

### **LB médium**

5 g/l Bacto yeasts extract

10 g/l trypton

10 g/l NaCl

### **LB misky:**

Směs pro LB médium + 15 g/l agar. Množství směsi o objemu 25 ml odpovídá dávce na jednu Petriho misku o průměru 90 mm.

Dle potřeby lze po zchlazení na 50°C přidat antibiotikum – ampicilin (Amp) – výsledná koncentrace 100 µg/ml.

### **Fowel misky = sporulační agar**

10 g/l KAc

1 g/l Bacto yeast extract

0,5 g/l glukosa

20 g/l Bacto agar

Rozpisy médií a agarů jsou vztahována na výsledný objem 1000 ml, tudíž je nutné při přípravě všech médií či agarů dopočítat objem vody do celkového objemu 1 litr.

Používat výhradně deionizovanou vodu (ddH<sub>2</sub>O). Média se sterilizují v autoklávu při teplotě 119-121°C po dobu 20 minut. Po ochlazení na 60°C je možné přidat glukózu. Při 50°C je teprve možné přidávat antibiotika, případně další složky.

pozn. U médií do nichž se přidává glukosa až po sterilizaci autoklávem, je potřeba přidávat glukosu sterilizovanou filtrací.

### 3.1.4 Seznam použitých komerčních kitů

- PrepEase Yeast Plasmid Isolation KIT (USB)
- Gen Elute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma)
- NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL)

### 3.1.5 Seznam plasmidů

- pAK011 = pRS306-mCherry-TUB1 (velikost 5-6 kb), selekční marker rezistence k ampicilinu (bakteriální), URA3 (kvasinkový); (Khmelinskii et al. 2007)

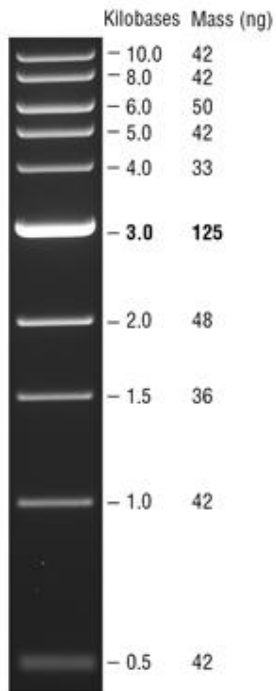
### 3.1.6 Seznam DNA modifikujících enzymů

enzym	pufr	reakční teplota	rozeznávaná sekvence	výrobce
APA1	NEB4	37°C	GGGCC/C	New England Biolabs

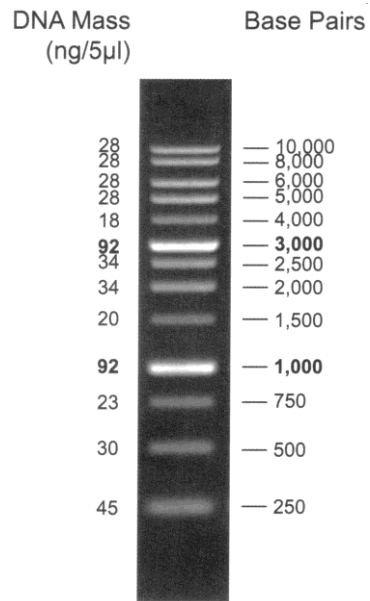
### 3.1.7 Seznam použitých protilátek

- primární protilátka PK1/7 monoklonální proti *RPG1*, zředěná 1:5000, (naše laboratoř)
- sekundární protilátka: Stabilized Goat Anti-Mouse HRP-Conjugated, zředěná 1:600, (Pierce)
- primární protilátka konjugovaná se sekundární protilátkou: anti - GFP – HRP, zředěná 1:2000, (Santa Cruz Biotechnology)

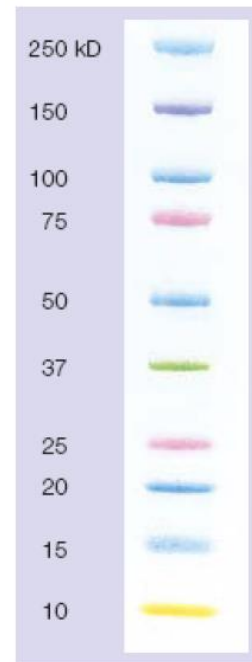
### 3.1.8 Standardy určující velikosti DNA fragmentů a molekulové hmotnosti proteinů



1kb DNA Ladder  
(New England Biolabs)



1 % TAE agarose gel  
1kb DNA Ladder  
(Biosystems)



proteinový standard Kaleidoskop  
(Biorad)



## 3.2 Metody

### 3.2.1 Kultivace mikroorganismů

#### 3.2.1.1 Kultivace na pevném médiu

- Odebrat izolovanou kolonii z pevného média a pomocí bakteriologické kličky či sterilního párátko nanést (pasážovat) na Petriho misku s vhodným živným agarem.
- Při výsevu tekuté kultury nanést pipetou 100-200  $\mu$ l kultury na misku s vhodnou živnou půdou, rozetřít skleněnou hokejkou a počkat až zaschne.
- Misky se zaočkovanou kulturou položit do termostatu. Optimální teplota pro růst kvasinkové kultury je 28-30°C, pro termosenzitivní kvasinkové kmeny 25°C (pokud není uvedeno jinak) a pro bakteriální kultury 37°C.
- Narostlé kultury na miskách lze skladovat v lednici (4°C) po dobu 1-2 měsíců.

#### 3.2.1.2 Kultivace v tekutém médiu

- Na kultivaci kultur v tekutém médiu je možné využít široké spektrum laboratorního nádobí – skleněné baňky typu Erlenmeyer, skleněné zkumavky nebo plastové destičky s jamkami lišící se jejich počtem podle potřebného objemu. Níže je uveden konkrétní příklad s baňkami typu Erlenmeyer. U ostatního nádobí je práce obdobná.
- Do Erlenmeyerovy baňky nalít příslušné sterilní kultivační médium o objemu nejvýše 1/10 celkového objemu nádoby.
- Bakteriologickou kličkou (ohněm sterilizovat) či sterilním párátkem zaočkovat kulturu narostlou na pevném médiu a dobře ji resuspendovat.
- Baňku umístit do třepačky vytemperované na 30°C či 25°C (*ts* kmeny) kvasinkové kmeny při 160-180 rpm; při 37°C, 180 rpm (bakteriální kmeny).

### 3.2.2 Zamražení a výsev glycerolových konzerv *Saccharomyes cerevisiae*

#### Zamražování

- První den: Zaočkovat kulturu do vhodného tekutého média a kultivovat přes noc v optimálních podmínkách.
- Druhý den: Mikroskopicky zkontrolovat, zda není kultura kontaminovaná. Poté sterilně odebrat 800 µl kultury, přidat k 200 µl 100% glycerolu do kryozkumavek a pečlivě promíchat na vortexu.
- Kryozkumavku se vzorkem zamrazit v tekutém dusíku a skladovat ji při -80°C.

#### Výsev zmražených konzerv

- Před samotným výsevem konzerv vysvítit manipulační box UV zářením.
- Pro výsev buněk z konzervy použít sterilní párátka, seškrábnout jím zmraženou kulturu a přenést na Petriho misku s vhodným agarovým médiem. Po zaschnutí vysetých buněk nechat růst v termostatu při optimální teplotě pro daný kmen, cca 2-3 dny.

### 3.2.3 Příprava proteinového extraktu

- První den: Zaočkovat 10 ml kvasinkové kultury, kultivovat přes noc v optimálních podmínkách, aby druhý den byly v exponenciální fázi, případně je ráno přeočkovat. Podle typu analýzy je možné použít i přes noc narostlou kulturu
- Druhý den kulturu stočit (800 g, 5 minut, 25°C), slít supernatant.
- K sedimentu přidat 500 µl 0,2M NaOH, pořádně resuspendovat a inkubovat 10 minut na ledu.
- Přidat 50 µl 50% TCA a inkubovat 10 minut na ledu.
- Zcentrifugovat (13 000 g, 10 minut, 4°C), odstranit supernatant.
- Pelet resuspendovat v 70 µl roztoku obsahující dva díly 4xSDS Laemmlí vzorkového pufru a jeden díl 1M Tris (pH 9,3).
- Suspenzi denaturovat varem (98°C), 5 minut.
- Stočit na centrifuze (13 000 g, 5 minut, 25°C).
- Skladovat při -20°C.

### **Roztoky:**

#### **4x SDS Laemmli vzorkový pufr**

- 100 M Tris-HCl, pH 6,8
- 4% SDS
- 20% glycerol
- 10%  $\beta$ -merkaptoethanol
- 0,005% bromfenolová modř
- 0,005% DTT

### **3.2.4 Stanovení počtu buněk pomocí přístroje The CASY® Cell Counter model DT, (Schärfe system)**

- Před měřením je nutné kulturu naředit 10x (popř. 100x) deionizovanou vodou v 1,5 ml mikrokumavce.
- Do speciálních měřících lahvíček (CASY cups) nalít 10 ml roztoku CASY ton.
- Odebrat 10  $\mu$ l 10x zředěné kultury (max.  $10^7$  buněk/ml) a přidat do lahvičky s CASY ton roztokem, uzavřít víčkem, následně 1-2krát promíchat otočením.
- První měření provést pouze s čistým roztokem CASY ton. Poté lze měřit první vzorek, po jehož změření je nutné přístroj pročistit čistým roztokem CASY ton a s tímto roztokem proměřit hodnoty (pro kontrolu čistoty přístroje). Po pročištění lze obdobným způsobem změřit další vzorky. Není třeba promývat Casy tonem během měření různých vzorků
- Přístroj měří buňky v rozmezí těchto velikostí: 1,4-2  $\mu$ m; 2-15  $\mu$ m; 15-40  $\mu$ m a udává počet buněk na ml.

### **Roztoky:**

CASY ton – roztok pro měření vzorků.

CASY clean – roztok pro údržbu přístroje, čištění se provádí podle přiloženého návodu.

### 3.2.5 Průtoková cytometrie (FACS)

**Příprava buněk pro průtokovou cytometrii** (FACS = Fluorescence-activated cell sorting):

- Do Erlenmeyerovy baňky s 10 ml YPD média zaočkovat kvasinkovou kulturu a třepat přes noc v optimálních podmínkách
- Druhý den ráno kulturu změřit a naředit ji do objemu 10 ml, aby množství buněk po zdvojení bylo cca  $2 \times 10^6$  buněk/ml a nechat rozrůst cca 3 hodiny (odpovídá jedné generační době) při 25°C v třepačce.
- Přesunout do vodní lázně vyhřáté na 37°C a třepat 4 hodiny.
- Po 4 hodinách kultivace v 37°C odebrat do mikrozkušavky 1 ml kultury a zafixovat v 70% ethanolu. (Pokud je to nutné doředit buňky na výslednou koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml).
- Zafixované buňky lze skladovat při -20°C po dobu jednoho dne – týdne.
- Vzorke po vyndání z -20°C stočit na centrifuze (800g, 5 minut, 4°C).
- Promýt 0,5 ml pufru A.
- Stočit (800 g, 5 minut, 4°C).
- Resuspendovat v 0,5 ml pufru A.
- Sonikovat 30-60 sekund (Ultrasonic compact cleaner Teson1, Tesla).
- Přidat RNázu A na finální koncentraci 0,1-0,2 mg/ml.
- Inkubovat v termobločku při 37°C, 2 hodiny
- Stočit (800g, 5 minut, 4°C).
- Resuspendovat v 0,5 ml roztoku obsahující pufr A s propidium jodidem (výsledná koncentrace PI=10-50 µg/ml).
- Vzorke lze skladovat při 4°C po dobu 1 hodiny – 1 týdne.
- Po vyndání z lednice vzorky sonikovat 60 sekund, těsně před samotným měřením na průtokovém cytometru (BD LSR II).
- Odebrat 200 µl vzorku a změřit na průtokovém cytometru (BD LSRII).
- Analýza výsledků prováděná v softwaru FlowJo.

#### **Složení pufru A:**

- 0,2M Tris-HCl (pH 6,8)
- 0,05M EDTA

### 3.2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- Před samotnou přípravou gelu je potřeba sestavit aparaturu pro nalévání polyakrylamidového gelu a ujistit se, zda je správně utěsněna.
- Připravit 10% separační gel (rozpis níže).
- Promíchaný separační gel ihned nalít do připravené aparatury a převrstvit ethanolem, počkat až ztuhne.
- Po ztuhnutí gelu odsát vrstvu ethanolu, např. filtračním papírem.
- Připravit zaostřovací gel, po jeho promíchání ihned nalít na ztuhlý separační gel a vložit do něj hřebínek, nechat ztuhnout.
- Po ztuhnutí zaostřovacího gelu vyjmout hřebínek, vzniklé jamky propláchnout deionizovanou vodou a 1x SDS-PAGE elektrodo­vým pufrem.
- Připravený gel včetně skel přesunout do elektroforetické aparatury a zalít elektrodo­vým pufrem.
- Příprava vzorků před jejich nanesením na gel:  
Proteinové vzorky namíchat do 4x SDS vzorkového pufru a 3 minuty nechat povařit při 98°C.
- Do jedné jamky v gelu nanést proteinový standard a do dalších jamek vzorky.
- Nastavit napětí na 10 mA/1gel, po projetí vzorků zaostřovacím gelem, napětí zvýšit na dvojnásobnou hodnotu (20mA/1gel).

#### 10% separační gel rozpis na 2 gely:

- 3,3 ml 30% akrylamid/MBA
- 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8)
- 4,1 ml ddH<sub>2</sub>O
- 100 µl 10% SDS
- 60 µl 20% APS
- 8 µl TEMED

#### Zaostřovací gel:

- 3,2 ml ddH<sub>2</sub>O
- 1,25 ml 0,5M Tris (pH 6,8)
- 0,7 ml akrylamid/MBA
- 50 µl 10% SDS
- 60 µl 20% APS
- 8 µl TEMED

#### Roztoky:

##### 10× SDS-PAGE elektrodo­vý pufr:

- 30 g Tris (pH 8,5)
- 144 g glycin
- 10 g SDS

Doplnit do 1000 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### **4x SDS Laemmli vzorkový pufr**

- 100 M Tris-HCl, pH 6,8
- 4% SDS
- 20% glycerol
- 10% β-merkaptoethanol
- 0,005% bromfenolová modř
- 0,005% DTT

### **3.2.7 Western blot – přenos proteinů na membránu**

Příprava sendviče:

- Potřebné části sendviče - houba (dva kusy), Whatmanový filtrační papír (dva kusy), a nitrocelulózoová membrána, oba nastříhané na příslušnou velikost - namočit, alespoň na 5 minut do přenosového pufru. Na kostru sendviče položit již namočenou houbu a naskládat ostatní komponenty v následujícím pořadí - houba; Whatmanový filtrační papír; polyakrylamidový gel; nitrocelulózoová membrána, Whatmanový filtrační papír a nakonec houba. Takto složený sendvič uzavřít (případné bubliny lze vytlačit skleněnou tyčinkou nebo pipetou) a vložit ho do připravené elektroforetické aparatury.
- Do aparatury nalít vychlazený transferový pufr, přidat chladicí vložku.
- Zapojit aparaturu a nastavit napětí 110 V, pustit na 1 hodinu.

### **3.2.8 Imunodetekce proteinů na nitrocelulózoové membráně**

- Po přeblování membránu obarvit v roztoku s naředěným roztokem Ponceau S (nespecificky barví proteiny přenesené na membránu, slouží jako kontrola, že došlo k přenosu všech proteinů).
- Po obarvení opláchnout membránu destilovanou vodou a na chvíli ponořit do TBS-T pufru.
- Membránu přenést do plastové zkumavky a do ní přilít 5-10 ml roztoku 5% mléka rozpuštěného v TBS-T pufru a blokovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
- Přidat primární protilátku naředěnou na danou koncentraci a nechat inkubovat buď 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C.

- Po hodině inkubace či druhý den ráno odmýt nenavázanou primární protilátku – promývat pufrém TBS-T, 3krát po 10 minutách.
- Po promytí přidat k membráně 5-10ml 5% mléka v TBS-T pufru se sekundární protilátkou ředěnou na danou koncentraci a nechat inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
- Po hodině inkubace membránu vyjmout a odmýt nenavázanou sekundární protilátku – promývat pufrém TBS-T, 3krát po 10 minutách a poté 1 jednou v TBS pufru po dobu 5minut.
- Po promytí následuje příprava na vyvolávání filmu – membránu umístit do folie a nanést na ni luminogenní substráty smíchané 1:1. Folie společně s membránou umístit do vyvolávací kazety. V temné komoře na membránu položit fotografický film a exponovat. Podle intenzity signálu se odvíjí doba expozice.
- Exponovaný film omýt nejprve v misce s vývojkou, poté s vodou a nakonec s ustalovačem.
- Po ukončení oplachování pořádně promýt ve vodě a usušit.

**Roztoky:**

**TBS:**

20 mM Tris-Cl

500 mM NaCl

pH 7,4

**TBS-T:**

0,5% Tween 20 v TBS

**Barvicí roztok Ponceau S (rozpis na 200 ml):**

0,4 g Ponceau S

12 ml 50% TCA

88 ml H<sub>2</sub>O

### 3.2.9 Příprava vzorků na měření v přístroji Tecan

- Do Erlenmeyerovy baňky s 5 ml příslušného média zaočkovat kvasinkovou kulturu a třepat přes noc v optimálních podmínkách pro daný kmen.
- Druhý den odpoledne kulturu změřit a naředit ji do objemu 2,5 ml média do 6 jamkových kultivačních destiček aby množství buněk odpovídalo cca  $5 \times 10^6$  buněk/ml.
- Destičku se vzorky vložit do přístroje Tecan (Tecan Infinite f200PRO), nastavit příslušný program pro měření optické density při 600 nm a spustit měření.

### 3.2.10 Testování kvasinkových kmenů – spot testy

- Tuto metodu lze využít pro mnoho testů – např. testy termosenzitivity, různých auxotrofií, testů přežívání či citlivosti k chemickým látkám (např. ředící řady a působení benomyly, viz kapitola výsledky).
- Příprava vzorků pro ředící řady:
- Zaočkovat si kulturu do vhodného tekutého média a nechat přes noc třepat při vhodných podmínkách pro daný kmen.
- Přes noc narostlou kulturu změřit na Cell counteru a zjistit počet buněk.
- Kultury si podle aktuálních potřeb naředit v příslušném médiu.
- Následuje tiskání pomocí „ježka“ na příslušné agarové plotny.
- Natiskané plotny inkubovat v termostatu při příslušné teplotě.

### 3.2.11 Příprava vzorků na test citlivosti k benomyly

Přes noc narostlá buněčná kultura.

- Změřit koncentraci buněk a do celkového objemu 200  $\mu$ l napipetovat takové množství buněk, aby odpovídalo počtu  $1 \times 10^7$  buněk/ml.
- Připravit ředící řady buněk od  $1 \times 10^7$  až k  $1 \times 10^2$  buněk (ředění provést v 96jamkové destičce v YPD médiu).
- Následuje tiskání pomocí „ježka“ na agarové plotny s přidaným benomylem\* a kontrolní YPD plotny.
- Růst v termostatu po dobu 3-6 dnů v příslušných teplotách: 16°C, 25°C, 30°C a 37°C.



\* benomylové plotny – základ je totožný s YPD plotnami; po přidání glukosy je nutné přidat množství benomyly na potřebnou finální koncentraci.

### 3.2.12 Křížení, sporulace a tetrádová analýza spor

- Čerstvě narostlé rodičovské kvasinkové kmeny, lišící se svým párovacím typem (párovací typ a a párovací typ alfa), nanést sterilním párátkem do kapky YPD média na YPD misce, aby se kříženci vzájemně překrývaly.
- Nechat růst do druhého dne při příslušné teplotě.
- Druhý den mikroskopicky zkontrolovat přítomnost zygot.
- Do 1 ml deionizované vody (ddH<sub>2</sub>O) pomoci sterilního párátko odebrat biomasu zkřížených kmenů a resuspendovat. Buněčnou suspenzi vysít v množství 100 µl na danou selekční misku.
- Kultivovat při příslušné teplotě cca 2-3 dny.
- Monokolonie diploidních buněk rozočkovat na danou selekční misku a kultivovat při příslušné teplotě cca 2 dny.
- Ze selekční misky přetáhnout biomasu na YPD plotny a nechat kultivovat přes noc při příslušné teplotě.
- Přes noc narostlou biomasu přenést na plotny se sporulačním médiem (Fowel misky) a kultivovat 4-5 dní v 25°C.
- Mikroskopicky zkontrolovat, zda jsou vytvořena vřecka se 4 spory.
- Do mikrozkušavky s 250 µl ddH<sub>2</sub>O přenést sporulující biomasu a přidat 12,5 µl zymolyázy (20x naředit stock o koncentraci 10mg/ml). Nechat působit 10 minut.
- Buňky lehce stočit, odsát supernatant a buňky dvakrát promýt v 1 ml ddH<sub>2</sub>O.
- Promytý pelet resuspendovat v 1 ml ddH<sub>2</sub>O, odebrat 300-500 µl suspenze, přenést do čisté mikrozkušavky obsahující 1 ml ddH<sub>2</sub>O a promíchat.
- Odebrat část suspenze, nanést 2-3 kapky na polovinu YPD misky, rozetřít hokejkou a nechat zaschnout.
- Na mikromanipulátoru od sebe oddělit jednotlivé spory.
- Inkubovat ve vhodných podmínkách pro daný kmen.
- Získané spory otestovat na charakteristické selekční znaky.

### **3.2.13 Zjišťování neznámého párovacího typu u haploidních kmenů**

- Testovací kmeny párovacích typů (a a alfa) nechat přes noc kultivovat ve vhodném tekutém médiu. Zároveň si zaočkovat kmeny, u kterých se bude zjišťovat párovací typ.
- Druhý den narostlou (tekutou) kulturu testovacích kmenů změřit na spektrofotometru a naředit na  $OD_{600} = 0,4$ .
- Na jednu YPD plotnu nakapat cca 100–150  $\mu$ l testovacího kmene s párovacím typem (a), hokejkou rozetřít a nechat zaschnout. Totéž provést s testovacím kmenem párovacího typu alfa na druhé YPD plotně.
- Po zaschnutí natiskat či nakapat kmeny, které je potřeba otestovat.
- Plotny kultivovat při 25°C 2-3 dny.

### **3.2.14 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii**

- Zaočkovat si kulturu do vhodného tekutého média a nechat přes noc třepat při vhodných podmínkách pro daný kmen.
- Přes noc narostlou kulturu změřit na Cell counteru a zjistit počet buněk. Kultury si podle aktuálních potřeb mikroskopie naředit a nechat je rozrůst minimálně jednu generační dobu do exponenciální fáze růstu na koncentraci  $1-2 \times 10^7$  buněk/ml.
- Před samotným pozorováním odebrat do mikrozkuřavky 300-1000  $\mu$ l kultury (podle potřeby) a stočit. Propláchnout v CM médiu a na podloží sklíčko odebrat 3  $\mu$ l suspenze, přikrýt kouskem agarózy.
- Nanést kapku olejové imerze a vzorek pozorovat pod mikroskopem.

K mikroskopii byl využit invertovaný mikroskop Olympus IX-71 s digitální kamerou Hamamatsu Orca/ER, a systém pro analýzu a detekci Olympus Cell R. Pro pozorování byl použit objektiv 100x PlanApochromat objective (NA 1.4). Pro pozorování fluorescence byl použit RFP filtr (RFP filter block U-MWIY2, exc. max. 545-580, em. max. 610).

### **3.2.15 Příprava 1,5% agarózy pro mikroskopické preparáty**

*Rozpis na Petriho misku o průměru 90 mm:*

- Do kádinky navážit potřebné množství agarózy, přilít CM médium do celkového objemu 12,5 ml CM média.
- Agarózu kompletně rozpustit zahříváním (ale nevařit). Nechat chvíli vychladnout, nalít do Petriho misky a nechat ztuhnout. Skladovat při 4°C.

### **3.2.16 Transformace chemicky kompetentních buněk *E.coli***

- 80-100 µl buněk skladovaných v- 80°C nechat roztát na ledu.
- Přidat 0,5 -1 µl DNA a inkubovat 15 minut na ledu, poté přemísit do termobločku vyhřátém na 42°C a inkubovat po dobu 2 minut. Zchladit po dobu 2 minut na ledu a přidat 1 ml LB nebo SOC média.
- Třepat v termobločku (Eppendorf) při 37°C, 60 minut, 1150 rpm.
- Vysít 1/10 a 9/10 objemu na LB misky s ampicilinem.
- Plotny inkubovat přes noc při 37°C .

**Roztoky:**

**SOB médium (rozpis na 10 ml roztoku):**

50 µl 2M MgCl<sub>2</sub>

200 µl 1M MgSO<sub>4</sub>

90 µl 40% glukosy

**SOC médium:**

Do připraveného SOB média přidat:

2M MgCl<sub>2</sub>, na finální koncentraci 10 mM

1M MgSO<sub>4</sub> na finální koncentraci 20 mM

1M glukosu na finální koncentraci 20 mM

### 3.2.17 Izolace plasmidové DNA z bakterie *Escherichia coli*

Použitý kit – GEN ELUTE HP plasmid Miniprep Kit; SIGMA

- První den: do Erlenmeyerovy baňky s 5 ml LB média přidat antibiotikum - Ampicilin (100 µg/ml), promíchat a zaočkovat kulturu *E. coli*.
- Kultivovat přes noc v třepačce při 37°C, 180 rpm.
- Druhý den: kulturu přelít do zkumavky a stočit na 12 000 g, 1 minuta.
- Pečlivě odsát supernatant.
- Dále postupovat podle návodu v kitu.

### 3.2.18 Izolace plasmidové DNA z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Použitý kit – PrepEase Yeast Plasmid Isolation Kit; USB 79220 1KT

- První den zaočkovat kulturu do 10 ml příslušného média v Erlenmeyerově baňce a kultivovat přes noc v třepačce v příslušné teplotě pro daný kmen.
- Druhý den ráno přelít 10 ml kultury z baňky do zkumavky, zcentrifugovat 800 g, 5 minut. Odsát supernatant.
- Přidat 1 ml deionizované vody a přenést do 1,5ml mikrozukavky, Stočit 400 g, 10 minut.
- Odsát supernatant.
- V tuto chvíli je možné pelet zamrazit a skladovat v -20°C.
- Pelet zpracovat podle přiloženého návodu v Kitu.
- Vyizolovanou plasmidovou DNA lze zamrazit a skladovat v -20°C nebo přímo použít k transformaci *E. coli*.

### 3.2.19 Transformace kvasinek lithium acetátovou metodou

- První den zaočkovat kvasinkovou kulturu a přes noc ji kultivovat na třepačce (25°C, 180 rpm).
- Druhý den změřit počet buněk pomocí přístroje Cell counter a přeočkovat kulturu na další den, aby ráno byl počet buněk maximálně  $2 \times 10^7$  buněk/ml.
- Následující den opět proměřit koncentraci buněk.
- Kulturu stočit 800 g, 5 minut, 25°C.
- Resuspendovat v takovém množství roztoku 0,1M LiAc, aby počet buněk odpovídal množství  $1 \times 10^8 / 100 \mu\text{l}$  ( $= 10^9 \text{ ml}^{-1}$ ) a alikvotovat po 100µl do

mikrozkumavek podle počtu transformovaných DNA plus 1 zkumavku jako negativní kontrolu pro výsev.

- Kulturu stočit 800 g, 5 minut, 25°C. Odstranit supernatant a k peletu přidat transformační směs (na celkový objem 360 µl):
  - 240 µl 50% PEG3550
  - 36 µl 1M LiAc
  - 10 µl ssDNA (povařit při 95°C, 5 minut a dát na led)
  - 59 µl vody
- Po přidání směsi o objemu 345 µl na konec přidat 15 µl DNA fragmentu a 1 minutu vortexovat, aby se směs dobře resuspendovala.
- Inkubovat při 30°C po dobu 30 minut, vždy po 10 minutách promíchat směs otočením zkumavky.
- Poté inkubovat ve 42°C, 45 minut, po 10 minutách vždy promíchat otočením zkumavky.
- Stočit 800 g, 5 minut, 25°C .
- Pipetou odebrat směs s PEG.
- Pelet resuspendovat v 1 ml daného média a promýt od zbytků PEGu.
- Výsev 1/10 a 9/10 objemu vzorku na agarovou misku s příslušným selekčním médiem.
- Inkubovat v termostatu za vhodných podmínek po dobu 3-4 dnů.

### 3.2.20 Restrikční štěpení pomocí enzymů nukleáz

- Do mikrozkumavky připravit reakční směs (provádět na ledu):

	reakční směs 50 µl
vzorek štěpené DNA	objem podle potřeby (0,1-4 µg DNA)
10x reakční pufr (NEB4)	5µl
BSA (100mg/ml)	0,5 µl
APA1 (1U na1µg DNA)	1 µl
deionizovaná voda	doplnit do celkového objemu 50 µl

- Reakční směs řádně promíchat a inkubovat minimálně 1,5 hodiny při požadované teplotě.
- Reakční směs inaktivovat zahřátím či přidáním nanášecího pufru pro agarózovou elektroforézu dle dalších manipulací.

### **3.2.21 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu**

- V kádince připravit roztok agarózy v 1x koncentrovaném TAE (popř. TBE) pufru na výslednou koncentraci 0,8%.
- Dokonale rozpustit zahříváním za občasného míchání.
- Po částečném zchladnutí nalít agarózu do vaničky s hřebínkem do výšky cca 8 mm, nechat ztuhnout (20 - 30 minut). Vaničku s gelem přenést do elektroforetické aparatury, nalít 1x TAE (nebo TBE) pufr, aby převrstvil gel
- Před nanáškou vzorků na gel je nutné si vzorky připravit – smíchat je s nanášecím pufrem.
- Nanést standard molekulové hmotnosti DNA fragmentů a následně nanést vzorky. Aparaturu uzavřít víkem s elektrodami, zapojit elektrické pole a na zdroji nastavit potřebné napětí (cca 10-12 V/cm gelu) případně i proud.
- Po rozdělení vzorků vypnout zdroj, odpojit elektrody od aparatury a dát gel barvit do barvicího roztoku GelRed.
- Po obarvení gel vyjmout z barvicího roztoku, opláchnout destilovanou vodou a vyfotit pomocí UV transluminátoru (UVP, San Gabriel, USA) a programu (Scion Image).

#### **Roztoky:**

##### **10x TAE pufr:**

48,4g Tris

7,49g EDTA disodná sůl

11,5 ml kyselina octová

Dolít vodou do výsledného objemu 1 litr.

##### **10x TBE pufr:**

108g Tris

7,49g EDTA disodná sůl

55g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Dolít vodou do výsledného objemu 1 litr.

**6x nanášecí (vzorkovací) pufr:**

10 mM Tris HCl pH7,6

60 mM EDTA

60% glycerol

0,06% bromfenolová modř

**roztok GelRed:**

GelRed Nucleic Acid Stain ředit v destilované vodě 10 000x.

### **3.2.22 Purifikace z gelu**

Při vyřezávání vzorků z gelu za pomoci UV záření (používat preferenčně dlouhovlné UV), je nutné chránit se plastovým štítem, pláštěm a rukavicemi.

- Zvážit prázdnou zkumavku a zapsat její hmotnost.
- Vyříznout vzorek z gelu a vložit do zvážené zkumavky.
- Následně zvážit zkumavku s vyříznutým vzorkem obsahující fragment DNA.
- Dopočítat si hmotnost gelu s DNA.
- Do mikrozkušavky s vyřezaným vzorkem přidat potřebné množství pufru NT1. Inkubovat 5-10 minut při 50°C, po uplynutí 3 minut vždy promíchat.

Dále postupujeme podle návodu v kitu – NucleoSpin extract II (MACHEREY-NAGEL)

## 4 CÍLE

### I. Charakterizace fenotypů doposud nepublikovaných mutantů translačního iniciačního faktoru eIF3a/Rpg1 - *rpg1-2* a *rpg1-3*.

- Porovnat nové mutanty (*rpg1-2* a *rpg1-3*) s již publikovaným mutantem *rpg1-1* v různých genetických pozadích z hlediska jejich růstových vlastností, citlivosti ke zvýšené teplotě - *ts* fenotypu a fáze buněčného cyklu, ve které se zastaví.
- Analyzovat citlivost všech mutantních kmenů Rpg1 na teplotní šok.

### II. Analyzovat vliv Rpg1 a jeho mutantů na uspořádání mikrotubulů.

- Otestovat mutantní kmeny Rpg1 na citlivost k benomylu.
- Pro analýzu vlivu mutací Rpg1 na uspořádání mikrotubulů v živých kvasinkových buňkách připravit nové kmeny v SEY genetickém pozadí s fluorescenčně značeným alfa -tubulinem v kombinaci s mutacemi Rpg1.
- V těchto nových kmenech pozorovat pomocí mikroskopie živých buněk mikrotubulární struktury za různých růstových podmínek a hlavně jejich znovuspořádání po působení nokodazolu.

### III. Připravit nové kmeny nesoucí jednotlivé mutantní formy Rpg1 v kombinaci s delecí genu *BUB1* a otestovat jejich životaschopnost.



## 5 VÝSLEDKY

V první části této kapitoly popisují fenotypovou charakterizaci Rpg1 mutantů (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*), které jsem testovala za různých teplot pomocí ředících řad v podobě spot testů, růstových křivek, průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie.

Druhá část se týká přežití mutantních kmenů Rpg1 v genetických pozadích BY a SEY po působení mírného až robustního tepelného šoku sledovaná na schopnosti tvořit kolonie. Ve třetí části práce se zabývám vlivem mutací Rpg1 na znovu-uspořádání mikrotubulů po působení nokodazolu. K tomuto účelu jsem vytvořila mutantní kmeny (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) v SEY genetickém pozadí s  $\alpha$ -tubulinem (gen *TUB1*) označeným mCherry na jeho N-konci a sledovala je fluorescenční mikroskopii. Mikroskopická pozorování jsem doplnila o test citlivosti k benomyly mutantních kmenů v BY a SEY genetických pozadích.

V poslední části práce jsem připravila a testovala životaschopnost kmenů vzniklých zkřížením mutantů Rpg1 (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) v SEY genetickém pozadí s kmenem nesoucím delecí genu *BUB1* v BY genetickém pozadí.

### 5.1 Charakterizace mutantů Rpg1

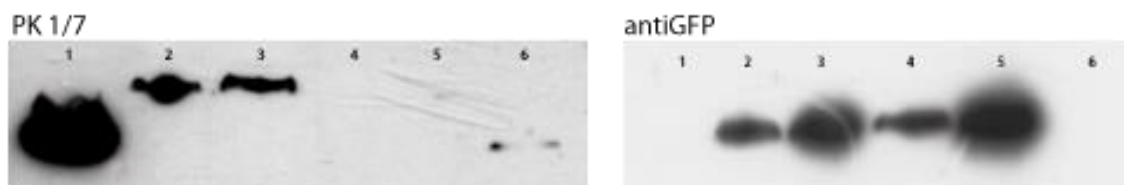
#### 5.1.1 Ověření mutantních kmenů v BY genetickém pozadí

Ověření produkce fúzního proteinu Rpg1-GFP v BY genetickém pozadí.

Kmeny v BY genetickém pozadí, které jsem měla k dispozici pro charakterizaci mutantů Rpg1 a dále jsem je používala ve svých experimentech jsem dostala již vytvořené a ověřené. Pouze jsem testovala, zda dochází k tvorbě fúzního proteinu Rpg1-GFP v těchto kmenech. Kontrolu jsem provedla imunodetekcí fúzního proteinu na membráně pomocí protilátky proti GFP a dále monoklonální protilátkou proti Rpg1 PK1/7. Jako kontrolu jsem zvolila kmeny z laboratorní sbírky s Rpg1 bez GFP fúze:

CRY240	YES01, MATa; ura3-52, trp1-63, leu2::tTA, YBR079c ( <i>RPG1</i> ) (-43, -1)::tetO7-loxP-kanMX-loxP,	YES01
CRY278	W303 MATa <i>rpg1-<math>\Delta</math>1::LEU2 ura3::URA3::MET3-RPG1 ade2-1 trp1-1 can1-100 his3-11,15 ura3</i>	WT(W303)
CRY1403	BY MATa, <i>his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, MET15, ura3<math>\Delta</math>0, <i>rpg1<math>\Delta</math> / pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1</i>

CRY1407	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pRPG1-GFP - C (HIS3)</i> <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1409	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pAW119-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1412	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>MET15</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pAW119-4M-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>



Obr. 8 Imunnodetekce wt a mutantních verzí Rpg1 v kmenech BY s protilátkami anti-GFP a anti-Rpg1. Označení vzorků: 1) YLV041; 2) *RPG1wt*; 3) *rpg1-1*; 4) *rpg1-2*; 5) *rpg1-3*; 6) YES01

Abych mohla provést kontrolu, připravila jsem proteinové extrakty – podle návodu (3.2.3), které jsem nechala rozdělit v polyakrylamidovém gelu (3.2.6). Rozdělené proteiny jsem přenesla na nitrocelulózu membránu (3.2.7) a detekovala protilátkou proti GFP. Výsledek na vyvolaném filmu (Obr. 8) potvrzuje má očekávání, tj. přítomnost GFP fúze v kmenech wt Rpg1, *rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3* a nepřítomnost u kontrol (YLVO41 a YES01). Na přítomnost proteinu Rpg1 s fúzovaným GFP ukazuje signál o správné velikosti (cca 140kDa) u wt Rpg1 i u mutantních kmenů (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) a absence tohoto signálu u kontrolních kmenů (YLVO41 a YES01).

### 5.1.2 Růstové vlastnosti mutantů Rpg1 v různých genetických pozadích

Pro charakterizaci dosud nepopsaných mutantů *rpg1-2* a *rpg1-3* jsem vycházela z informací známých o popsaném mutantu *rpg1-1* (Kovarik et al. 1998). Zaměřila jsem se tedy na analýzy z hlediska jejich růstu v permisivních i nepermisivních podmínkách, abych ověřila termosenzitivitu kmenů. K ověření jsem použila růstové křivky a spot testy. Dále jsem chtěla ověřit popsany terminální fenotyp mutantu *rpg1-1* ve W303 pozadí, který se v populaci buněk kultivovaných po dobu čtyř hodin ve 37°C projevil zastavením buněk v G1 fázi buněčného cyklu (Kovarik et al. 1998). Takto zastavené buňky byly velikostně stejné a měly dokončené jaderné dělení, tzn. že každá buňka (mateřská i dceřiná) obsahovala jedno jádro, ale nedošlo k jejich fyzickému oddělení a vypadaly jako „dvojčata“. Zastavená „dvojčata“ bylo možné oddělit působením enzymu zymolyázy či mírnou sonikací (Kovarik et al. 1998).

Růstové analýzy mutantů a jejich porovnání s *rpg1-1* jsem prováděla ve třech genetických pozadích BY, SEY a W303 těchto kmenů:

CRY75	W303 MATa <i>ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100</i>	WT (W303)
CRY248	W303 MATa <i>ura3::URA3::rpg1-1 trp1-1::TRP1::rpg1-Δ2 ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15</i>	<i>rpg1-1(U)</i>
CRY250	W303 MATa <i>leu2-3,112::LEU2::rpg1-1 trp1-1::TRP1::rpg1-Δ2 ura3 ade2-1 can1-100 his3-11,15</i>	<i>rpg1-1(L)</i>
CRY278	W303 MATa <i>rpg1-Δ1::LEU2 ura3::URA3::MET3-RPG1 ade2-1 trp1-1 can1-100 his3-11,15 ura3</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY287	W303 MATa <i>trp1-1::TRP1::rpg1-Δ2 ura3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112::LEU2::pYAW119</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1403	BY MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1407	BY MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pRPG1-GFP - C (HIS3) RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1409	BY MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-GFP (HIS3) rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1412	BY MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-4M-GFP (HIS3) rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1677	SEY MATa <i>leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY MATa <i>leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY MATa <i>leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1683	SEY MATa <i>leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>

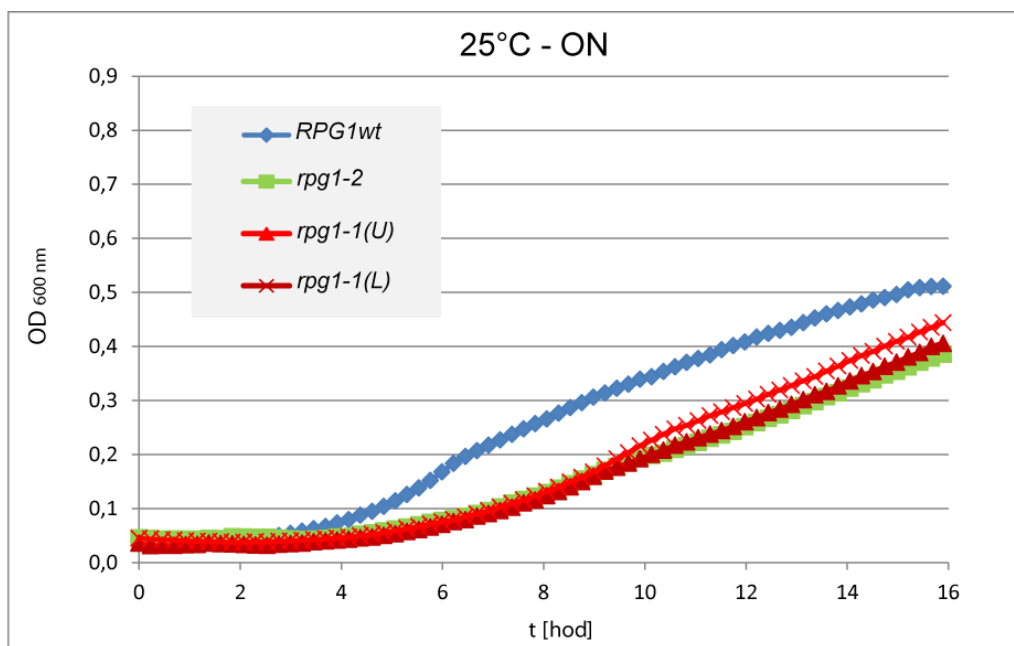
V první části růstových analýz jsem se zaměřila na porovnání růstu *Rpg1* mutantních kmenů ve třech různých genetických pozadích. Kmeny v genetickém pozadí W303 byly vytvořené v rámci spolupráce naší laboratoře a laboratoře H. Ruise ve Vídni publikované v práci (Kovarik et al. 1998) vyjma nepublikovaného mutantu *rpg1-2* (CRY287). Mutanty v BY a SEY genetickém pozadí byly vytvořeny Ivanou Malcovou (BY) a Lenkou Senohrábkovou (SEY), (nepublikováno). Při růstových analýzách jsem používala přístroj Tecan Infinite f200 PRO, který je schopen měřit optickou denzitu v čase a zároveň umožňuje kultivaci buněčných kultur za přednastavené teploty s kontinuálním třepáním. Kmeny na růstovou analýzu jsem připravovala podle návodu uvedeného v metodách (3.2.9). Abych mohla porovnat růst jednotlivých

kmenů za permisivní i nepermisivních podmínek, prováděla jsem experiment ve dvou variantách:

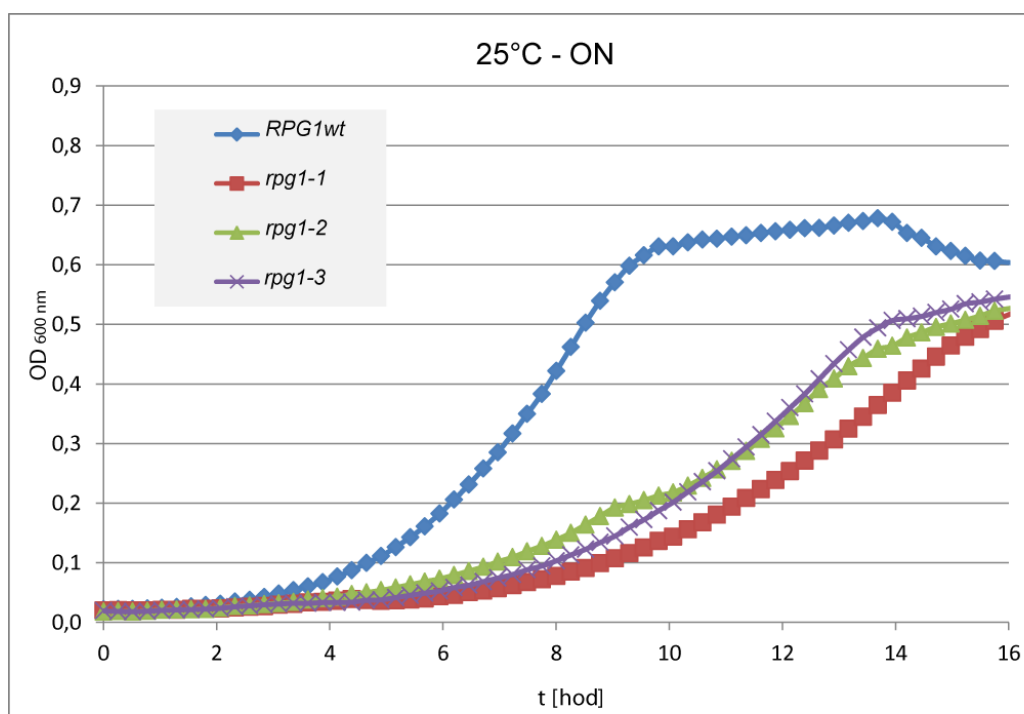
- 1) Noční růst (ON, „overnight“) v permisivní teplotě, 25°C, za stálého třepání ve YPD médiu. Celková doba kultivace byla nastavena na 16 hodin, a každých 15 minut proběhlo změření OD.
- 2) Růst v nepermisivních podmínkách, 37°C, po dobu 4 hodin, za stálého třepání ve YPD médiu. Před přenesením buněk do nepermisivních podmínek byla kultura inkubována v 25°C za stálého třepání do exponenciální fáze růstu.

### 1) Srovnání růstu *ts* mutantních kmenů v permisivní teplotě při nočním růstu.

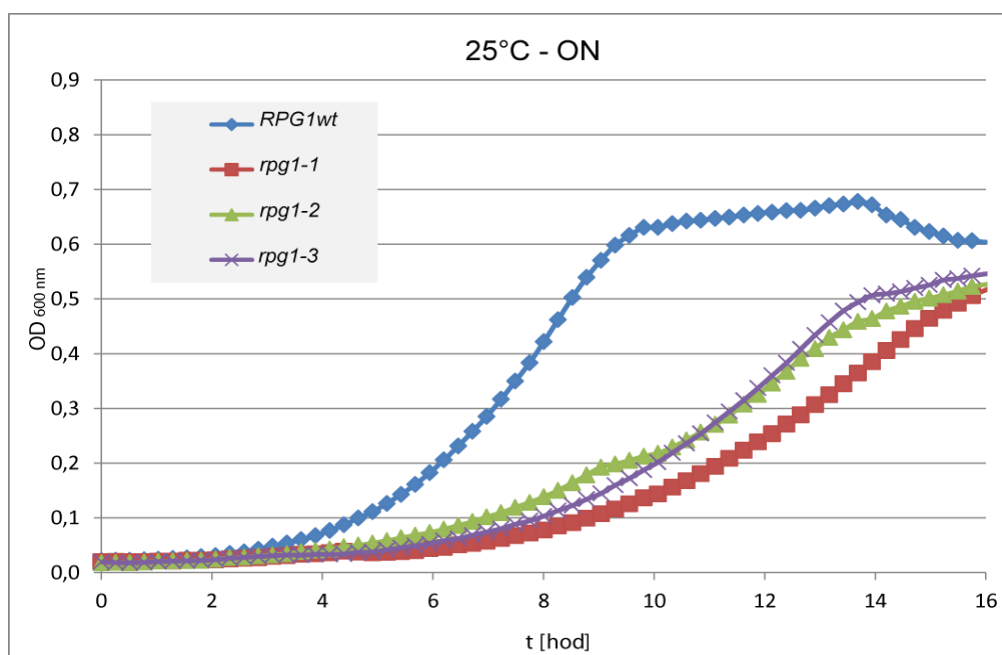
Růstovou analýzou v permisivní teplotě, tj. 25°C jsem chtěla ověřit, že *ts* mutanty (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) v této teplotě rostou, je tedy optimální pro jejich růst. Dále mě zajímalo, zda se od sebe mutanty liší rychlostí růstu, tedy dobou zdvojení a zda genetické pozadí tuto vlastnost nějak ovlivňuje. Pro měření růstu v permisivní teplotě jsem přístroj Tecan Infinite f200 PRO a ze získaných dat jsem zhotovila růstové křivky (viz Graf 1 Graf 2 Graf 3). Přípravu kmenů pro měření jsem provedla podle návodu v metodice (3.2.1.2). Pro noční růstové analýzy jsem v Tecanu nastavila tyto podmínky kultivace: 25°C, stálé třepání, měření každých 15 minut, celková doba měření 16 hodin.



Graf 1 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1 wt* v genetickém pozadí W303. Kultivace ve YPD médiu, ve 25°C, noční růst.



Graf 2 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1 wt* v genetickém pozadí BY. Kultivace ve YPD médiu, ve 25°C, noční růst.



Graf 3 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1 wt* v genetickém pozadí SEY. Kultivace ve YPD médiu, ve 25°C, noční růst.

KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]	KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]	KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]
<i>RPG1wt</i> (W303)	2	<i>RPG1wt</i> (BY)	1,9	<i>RPG1wt</i> (SEY)	1,5
<i>rpg1-2</i> (W303)	2,5	<i>rpg1-1</i> (BY)	2,4	<i>rpg1-</i> (SEY)	2,4
<i>rpg1-1(U)</i> (W303)	2,5	<i>rpg1-2</i> (BY)	2,4	<i>rpg1-2</i> (SEY)	2,4
<i>rpg1-1(L)</i> (W303)	2,5	<i>rpg1-3</i> (BY)	3	<i>rpg1-3</i> (SEY)	2,4

Tabulka 2 Průměrné doby zdvojení mutantních kmenů Rpg1 a wt Rpg1 e třech genetických pozadích (W303, BY, SEY). Data použitá z růstových křivek v 25°C, ON viz (Graf 1-3 ).

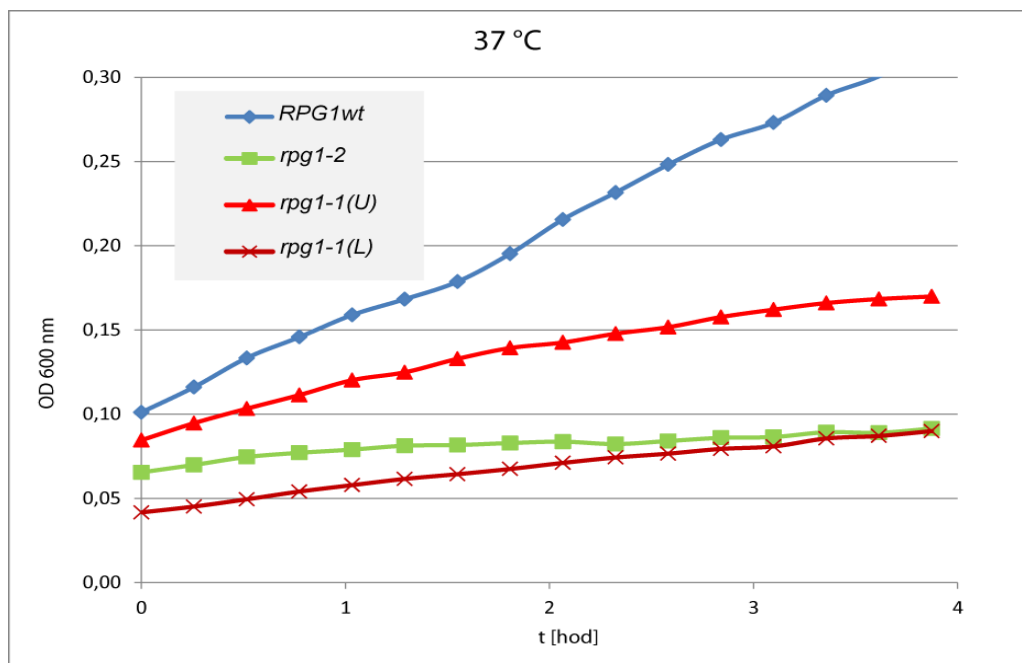
Růstovými analýzami v permisivní teplotě jsem potvrdila, že mutantní kmeny rostou ve 25°C a to ve všech genetických pozadích. Výpočtem doby zdvojení jsem zjistila, že mutantní kmeny rostou podobně ve všech třech genetických pozadích. Kontrolní kmeny *RPG1wt* rostly nejrychleji, což jsem očekávala, jelikož se nejedná o *ts* mutanty. Nejpomalejší růst vykazoval mutant *rpg1-3* a to ve všech pozadích. Zjistila jsem, že mutanty *rpg1-1* a *rpg1-2* rostou srovnatelně ve všech pozadích, jejich průměrná doba zdvojení se pohybuje v rozmezí 2,4-2,5 hodin (Tabulka 2). Doba zdvojení *rpg1-3* v BY pozadí se pohybovala okolo 3 hodin a ve srovnání s mutantou *rpg1-2* (průměrná doba zdvojení 2,5 h) rostla pomaleji, což by mohlo poukazovat na možnou „výhodu“ přítomnosti C-terminální mutace, kterou má *rpg1-2* navíc. Při porovnání růstu kontrolních kmenů *RPG1wt* ve srovnávaných pozadích se doba zdvojení pohybovala od 1,5 h do 2 hodin (Tabulka 2).

## 2) Srovnání růstu *ts* mutantních kmenů v nepermisivní teplotě po dobu 4 hodin.

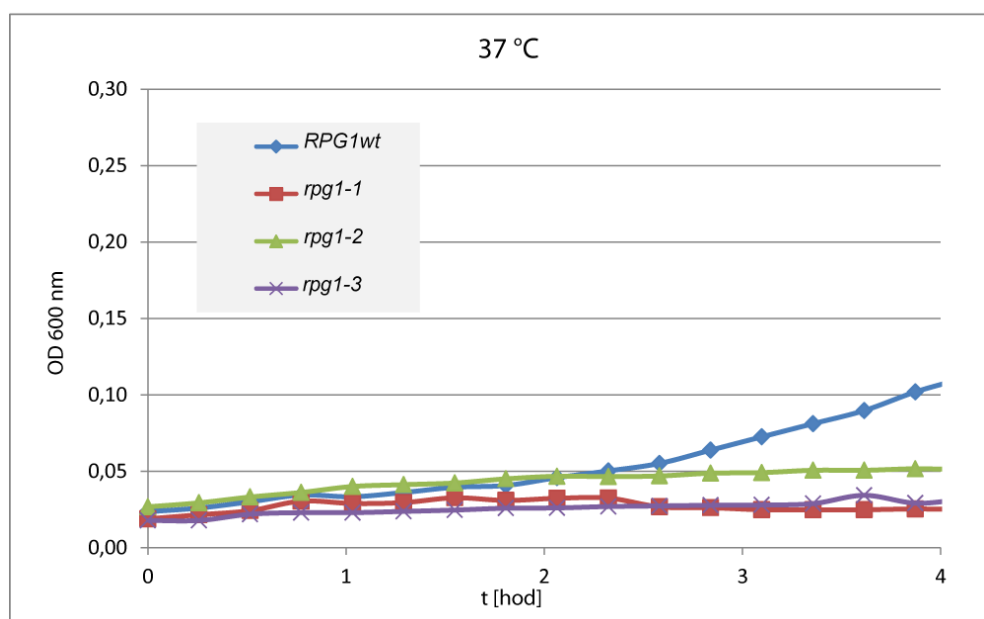
Tímto pokusem jsem chtěla potvrdit, že mutantní kmeny (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) vykazují *ts* fenotyp, tzn, že jsou citlivé ke zvýšené teplotě 37°C. Jako v předchozím pokuse při srovnání růstu v permisivních podmínkách jsem použila pro měření přístroj Tecan a ze získaných dat jsme zhotovila růstové křivky. Kmeny jsem připravila dle návodu přípravy vzorků na Tecan (3.2.9). Noční kulturu jsem druhý den zaočkovala do čerstvého YPD média na daný počet buněk ( $5 \times 10^6$ / ml) a nechala 3 hodiny rozrůst v 25°C a poté jsem je přenesla do Tecanu a nastavila program, pro

měření při 37°C na dobu minimálně 4 hodin, ostatní podmínky odpovídaly předchozímu pokusu v permisivních podmínkách.

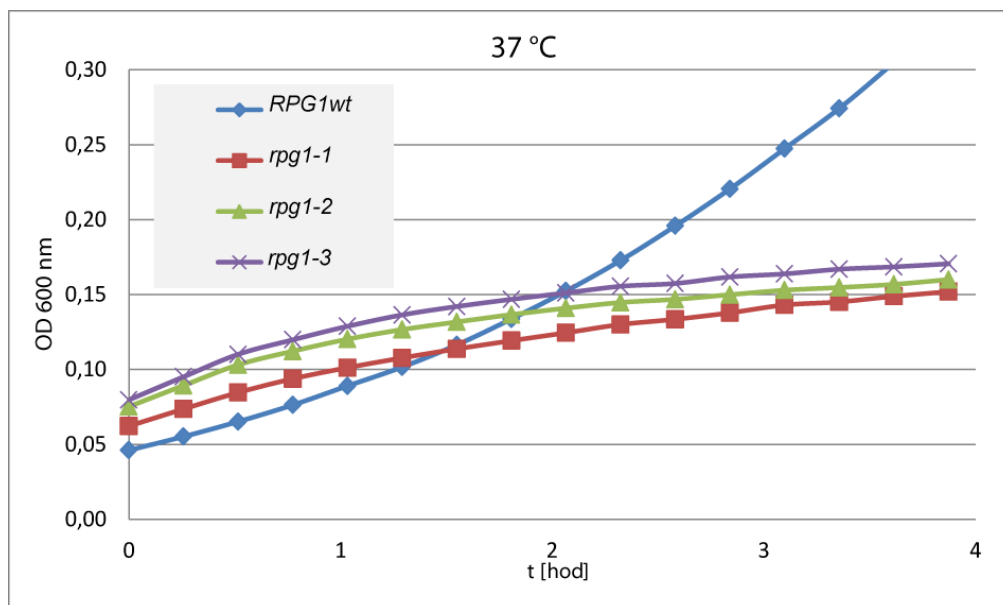
Očekávala jsem, že *ts* mutanty v pozadích BY a SEY nebudou růst ve 37°C a výsledek bude korelovat s mutantou *rpg1-1* ve W303 genetickém pozadí, u které bylo popsáno, že je *ts* mutanta a neroste ve 37°C (Kovarik et al., 1998).



Graf 4 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1wt* v genetickém pozadí W303. Kultivace ve YPD médiu, ve 37°C po dobu 4 hodin.



Graf 5 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1wt* v genetickém pozadí BY. Kultivace ve YPD médiu, ve 37°C po dobu 4 hodin.



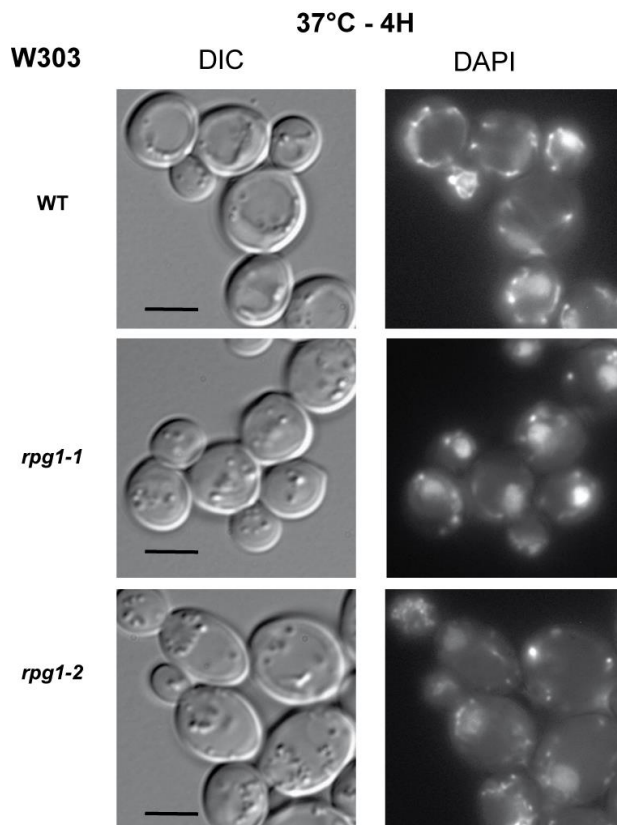
Graf 6 Růstová křivka mutantních kmenů a kontrolního kmene *RPG1wt* v genetickém pozadí SEY. Kultivace ve YPD médiu, ve 37°C po dobu 4 hodin.

Výsledek růstových křivek v nepermissivních podmínkách po dobu 4 hodin potvrdil má očekávání, že mutanty *rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3* všech genetických pozadí (W303, BY, SEY) ve 37°C nerostou, narozdíl od *RPG1wt*, který ve všech pozadích roste při 37°C (Graf 4 Graf 5 Graf 6).

### 5.1.3 Fáze buněčného, ve které se buňky zastaví.

Při charakterizaci kmenů *rpg1-2* a *rpg1-3* jsem se ověřovala, zda se po 4 hodinách v 37°C zastaví v G1 fázi jako tzv. "dvojčata", každé se svým jádrem, jak bylo popsáno u *rpg1-1*. Pro zjišťování terminálního fenotypu jsem využila fluorescenční mikroskopii i metodu FACS, pro ověření obsahu DNA. V pokusech jsem srovnávala kmeny v BY, SEY a W303 genetickém pozadí.

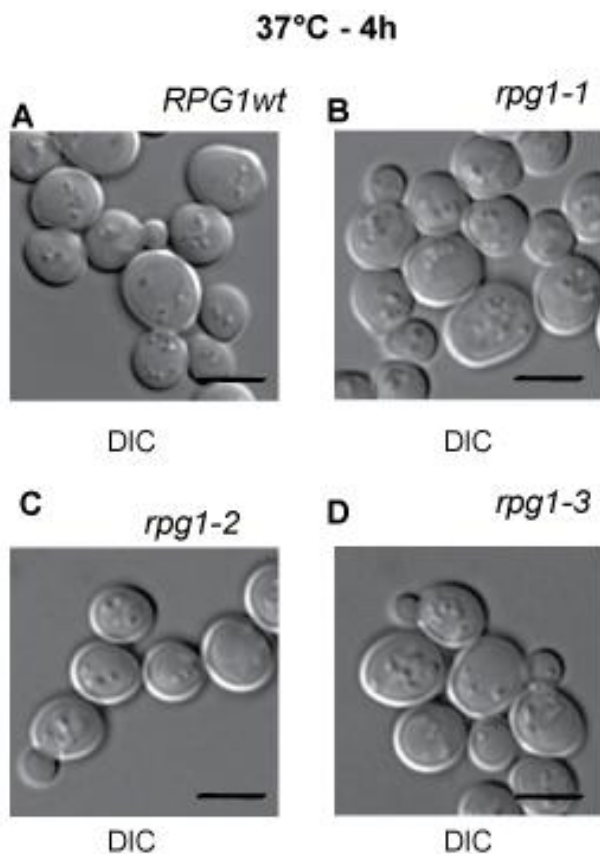




Obr. 9 Buňky nafocené po 4 hodinách inkubace ve 37°C. Jádru obarveno DAPI. Měřítka 4  $\mu$ m.

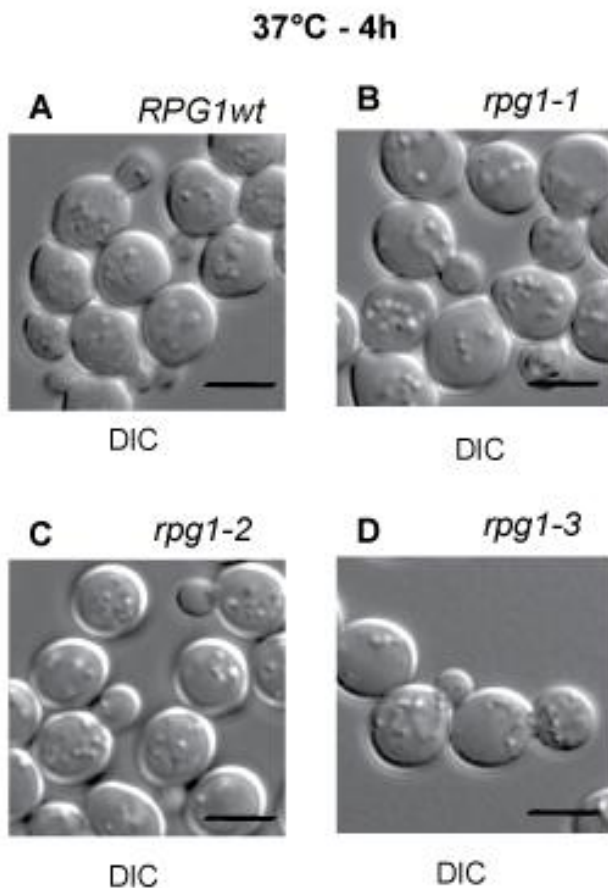
Převážná část populace tvořily buňky stejně velké ještě nerozdělené (Obr. 9), každá obsahovala své jádro (barvení DAPI).

U *rpg1-2* a WT (*W303*) populace buněk nevykazovala terminální fenotyp po 4 hodinách inkubace ve 37°C. U *rpg1-1* asi 3/4 populace tvořila dublety („dvojčata“), zbytek tvořily buňky s malými pupeny či nevypučené buňky a buňky s většími pupeny.



Obr. 10 Mutantní kmeny a wt v BY genetickém pozadí. Buňky nafocené po 4 hodinách inkubace ve 37°C. Měřítko 4  $\mu$ m.

Při pozorování mutant *rpg1-2* a *rpg1-3* ani u *rpg1-1* v BY genetickém pozadí, se buňky nezastavily v G1 fázi buněčného cyklu. Populace buněk se i po 4 hodinách kultivace ve 37°C jevila jako rostoucí populace (Obr. 10), tzn. bylo možné pozorovat buňky s různě velkými pupeny (pučící buňky), ale i buňky bez pupenů, které dokončily buněčný cyklus.

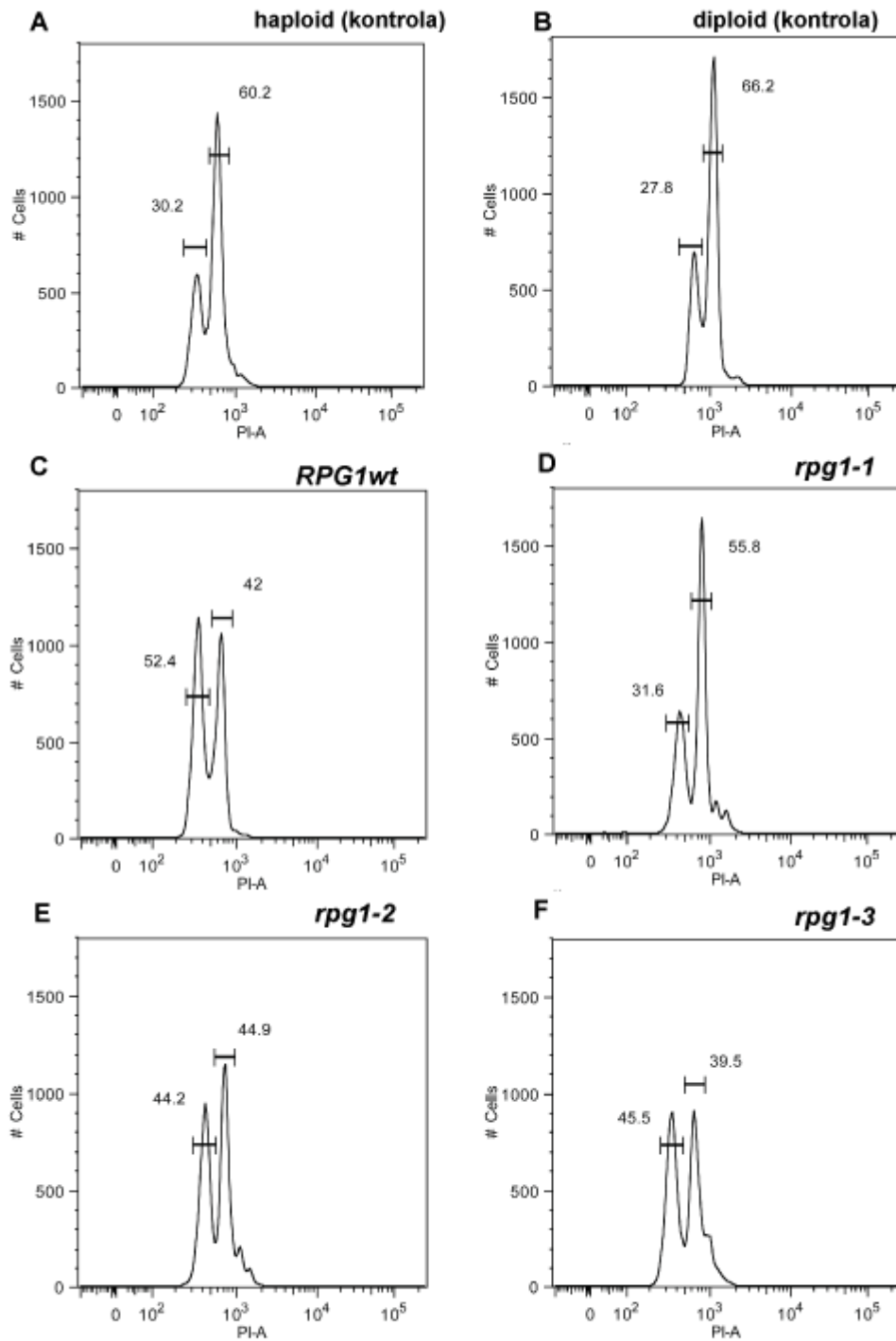


Obr. 11 Mutantní kmeny a wt v SEY genetickém pozadí. Buňky nafocené po 4 hodinách inkubace ve 37°C. Měřítko 4  $\mu$ m.

Ani při pozorování mutant *rpg1-1*, *rpg1-2* a *rpg1-3* v SEY genetickém pozadí buňky nevykazovaly terminální fenotyp, tedy zastavení v G1 fázi buněčného cyklu. Na (Obr. 11) je zřejmé, že populace buněk po 4 hodinách kultivace ve 37°C je různorodá, podobně jako v BY genetickém pozadí.

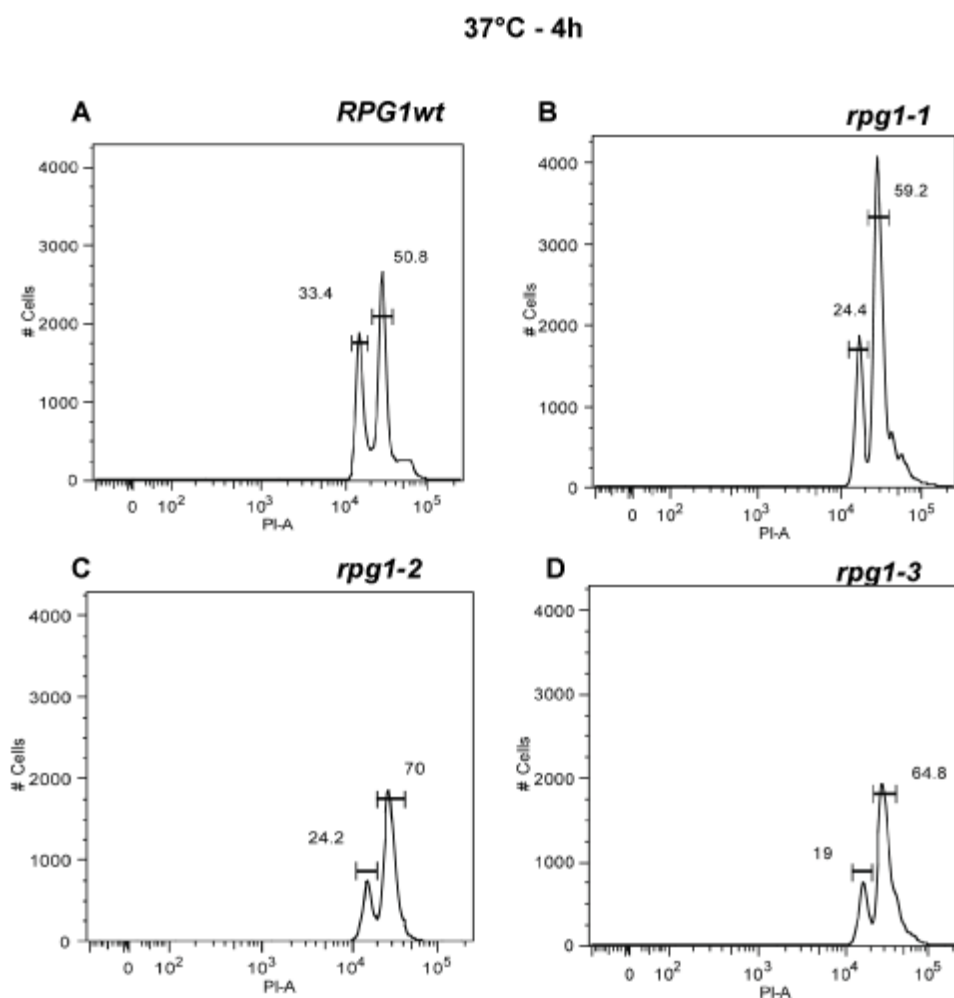
Podle mikroskopických analýz se mi nepodařilo prokázat terminální fenotyp, proto jsem pomocí FACS analýzy chtěla ověřit obsah DNA v buňkách mutantních kmenů Rpg1 a wt Rpg1 v BY a SEY genetickém pozadí. Buňky kultivovala 4 hodiny v 37°C a podle protokolu připravila na FACS analýzu. Fixované buňky jsem mikroskopicky kontrolovala, zda došlo k permeabilizaci membrány ethanolem a inkorporaci propidium jodidu do buněk. Propidium jodid se neinkorporuje do živých buněk.

37°C - 4h



Obr. 12 Grafy z FACS analýzy kmenů v SEY genetickém pozadí.

Pokud by se buňky zastavovaly v G1 fázi měly by se obsahem DNA blížit diploidním buňkám na panelu B (Obr. 12), které jsem použila v tomto prvotním pokuse jako kontrolu. Jako druhou kontrolu pro srovnání jsem použila i haploidní kmen - na panelu A (Obr. 12). Jelikož se mutanty Rpg1 (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) i wt Rpg1 spíše podobaly haploidním buňkám, došla jsem k závěru, že v BY genetickém pozadí nemají mutantní kmeny terminální fenotyp, který byl popsán u *rpg1-1* (W303).



Obr. 13 Grafy z FACS analýzy kmenů v SEY genetickém pozadí.

Výsledky FACS analýz ukázaly u mutantních kmenů Rpg1 v SEY genetickém pozadí se ukázaly být stejné. Neprokázala jsem terminální fenotyp, tzn. že žádný kmeny neměl obsah DNA blížíci se diploidnímu kmeni. Jelikož jsem přes opakování pokusů došla ke stejnému závěru, tedy, že buňky nezastavují v G1 fázi, pro dokumentaci jsem na (Obr. 13) vložila pouze grafy mutantních kmenů a wt Rpg1.

#### 5.1.4 Ověření termosenzitivních vlastností mutantních Rpg1 kmenů v BY a SEY genetickém pozadí

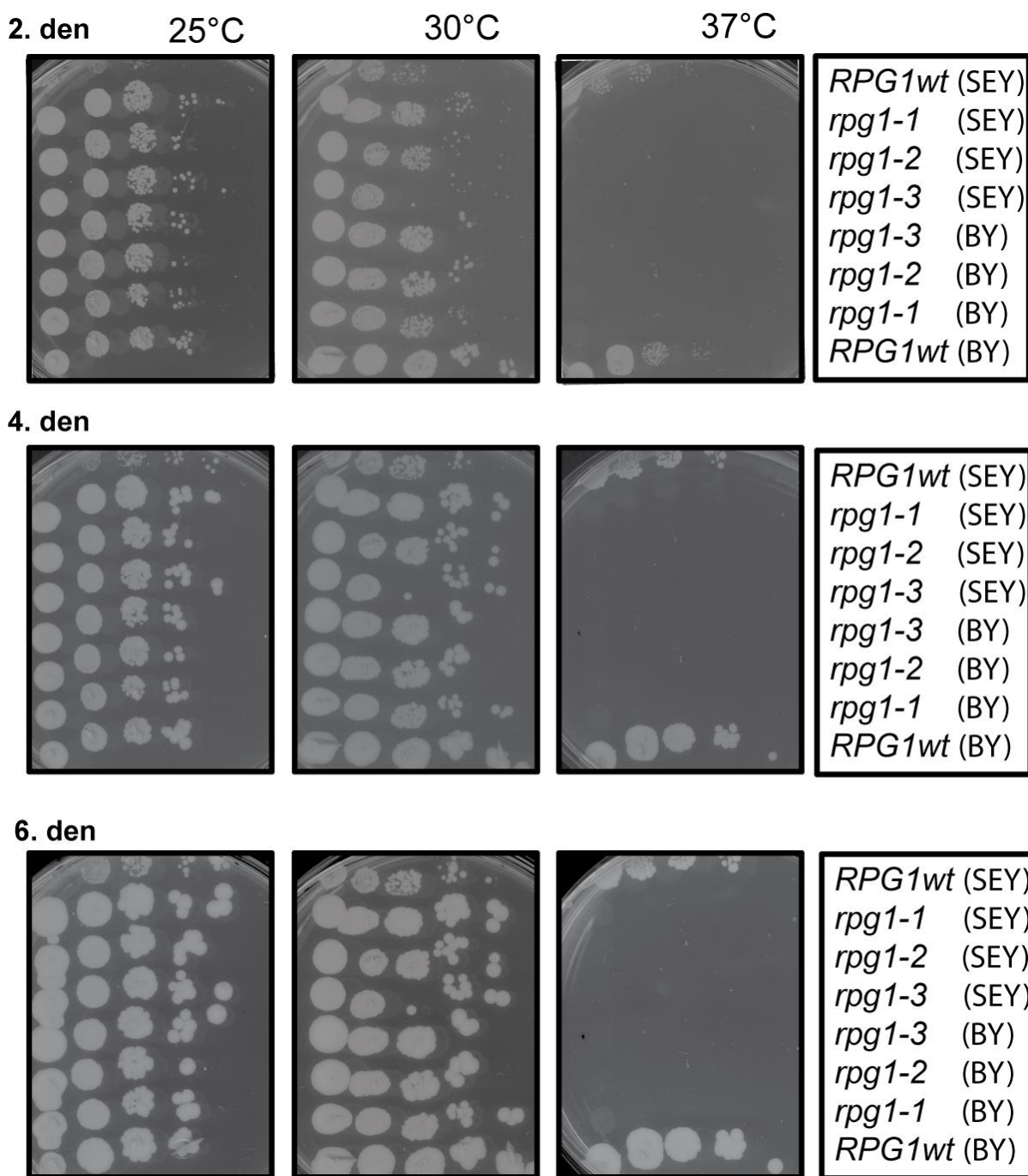
V případě některých termosenzitivních mutantů není jejich růst za nepermissivních podmínek plně zastaven, ale pouze do různé míry zpomalen. Proto jsem ověřovala, zda v případě mutantů Rpg1 jde o pravý termosenzitivní fenotyp nebo pomalý růst (slow-growth).

K otestování termosenzitivity jsem zvolila mutantní kmeny v BY a SEY genetickém pozadí:

CRY1403	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1407	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pRPG1-GFP - C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1409	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1412	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-4M-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1677	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1683	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>

K otestování pomalého růstu, jsem zvolila ředící řady a aplikovala je v podobě spot testů na YPD misky. Kulturu jsem připravila podle protokolu v metodice (3.2.1) ve YPD médiu. Ředění jsem prováděla v 96 jamkové destičce v CM médiu, desítkovou ředící řadou (10<sup>7</sup>-10<sup>2</sup> buněk na ml). Misky jsem inkubovala ve třech rozdílných teplotách – 25°C (permissivní podmínky pro *ts* mutanty), 30°C (permissivní podmínky pro *wt* formu Rpg1) a 37°C (nepermissivní podmínky pro *ts* mutanty) po dobu 6 dnů. Každý druhý den jsem misky nafotila, abych zachytila případné změny v nepermissivních podmínkách v případě mutantů.

Na základě mých výsledků z růstových analýz jsem očekávala růst všech testovaných kmenů inkubovaných v 25°C a 30°C. Růst ve 37°C jsem očekávala pouze u kmenů *RPG1 wt* (BY) a *RPG1 wt* (SEY) nikoli u mutantů. Po 6 dnech ve 37°C narostly pouze kmeny *RPG1 wt* (BY) a *RPG1 wt* (SEY) viz (Obr. 14). Výsledky pokusů s ředícími řadami tak potvrdily má data z růstových křivek ve 37°C a prokázaly, že v případě všech třech mutantů *Rpg1* v obou genetických pozadích se jedná o pravé *ts* mutanty.



Obr. 14 Test termosenzitivity a případného „slow-growth“ fenotypu mutantních kmenů v BY a SEY genetickém pozadí. Ředění začíná vlevo množství  $10^7$  buněk/ml.

### 5.1.5 Srovnání mutantních kmenů v SEY pozadí po působení teplotních šoků

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá vlivem tepelného šoku na tvorbu stresových granulí (Groušl et al., 2009, 2013). Rpg1 je součástí těchto ribonukleoproteinových proteinů vznikajících při odpovědi na stres. Proto nás zajímalo přežívání mutantních forem Rpg1 po působení teplotních šoků jako doplnění experimentů probíhajících v laboratoři, při kterých bylo zjištěno, že tyto tvoří stresové granule již při nižších teplotě než nemutovaná forma Rpg1. Také by to naznačovalo odpověď, zda je pro buňku tvorba stresových granulí prospěšná či ne.

Pro srovnání mutantních kmenů po působení teplotního šoku jsem použila kmeny v SEY genetickém pozadí vytvořené v naší laboratoři Lenkou Senohrábkovou (nepublikováno):

CRY1677	SEY MAT <sub>α</sub> leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY MAT <sub>α</sub> leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY MAT <sub>α</sub> leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1683	SEY MAT <sub>α</sub> leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>

Abych zjistila, jaké procento buněk přežívá, prováděla jsem několikanásobné výsevy kultur po působení různých teplot. Pro výsevy jsem použila desítkové ředící řady, v nichž počáteční množství buněk odpovídalo  $10^7$  ve YPD médiu, na YPD misky jsem vysívala 200 buněk/ml na jednu misku. Ke každé teplotě jsem měla kontrolní misky ve 25°C. Tepelné šoky jsem prováděla ve 3 rozdílných podmínkách: 37°C - 30 minut, 42°C - 30 minut, a 46°C - 10 minut.

Z výsledků shrnutých v (Tabulka 3) je velmi těžké udělat jednoznačný závěr společný pro všechny mutanty, i když experiment byl několikrát opakován. Mutant *rpg1-1* lépe přežívá za teplot 42°C a 37°C, mutant *rpg1-2* za teplot 37°C a u mutantu *rpg1-3* není tendence zřejmá.



Abych zjistila, jaké procento buněk přežívá, prováděla jsem několikanásobné výsevy kultur po působení tepelného šoku. Pro výsevy jsem použila desítkové ředící řady, v nichž počáteční množství buněk odpovídalo  $10^7$  ve YPD médiu, na YPD misky jsem vysévala 200 buněk/ml (množství na jednu misku). Ke každému heat šoku jsem měla kontrolní misky ve 25°C. Heat šoky jsem prováděla ve 3 rozdílných podmínkách: 37°C - 30 minut, 42°C - 30 minut, a 46°C 10 minut.

Misky s vysetými buňkami jsem inkubovala 2-5 dní v 25°C - podle velikosti kolonií.

U kontrolního kmene *RPG1wt* rostly kolonie v 25°C rychleji oproti mutantům.

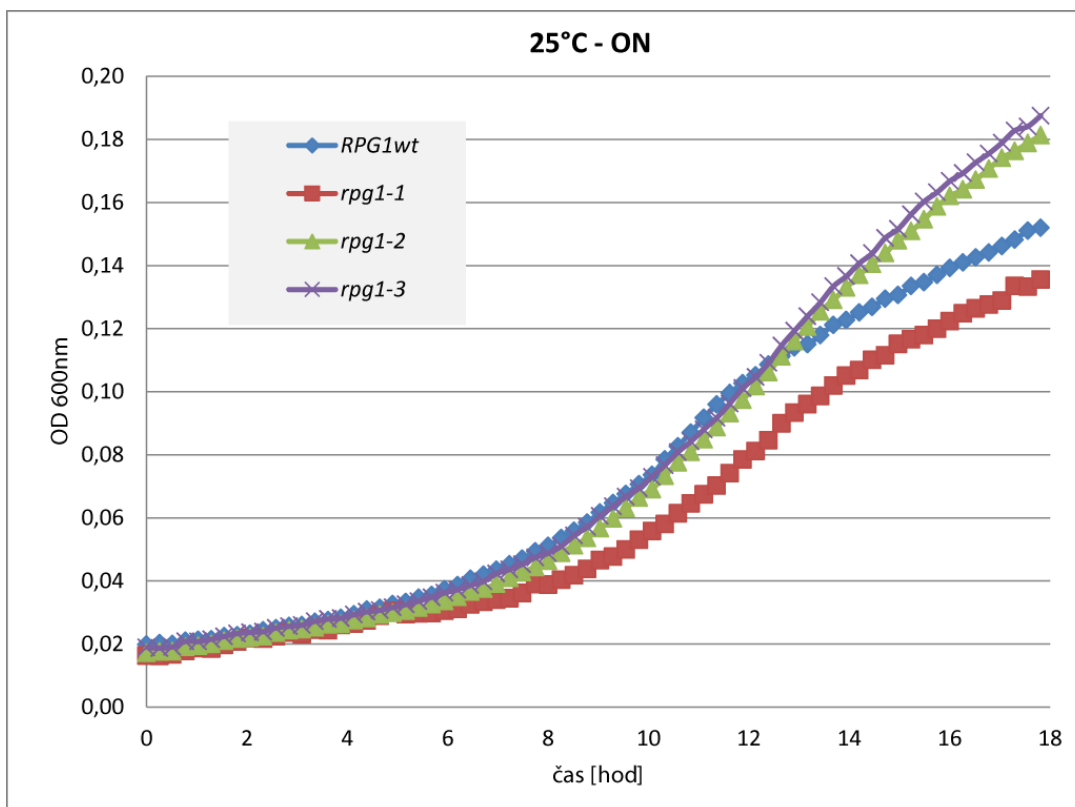
Kmen	HS 46°C	Kontrola k HS 46°C	HS 42°C	Kontrola k HS 42°C	HS 37°C	Kontrola k HS 37°C
<i>RPG1wt</i>	94 %	100 %	91 %	100 %	98 %	100 %
<i>rpg1-1</i>	64 %	100 %	91 %	100 %	87 %	100 %
<i>rpg1-2</i>	63 %	100 %	79 %	100 %	99 %	100 %
<i>rpg1-3</i>	87 %	100 %	97%	100 %	101 %	100 %

Tabulka 3 Výsledky teplotních testů prováděných s mutantními kmeny v SEY genetickém pozadí. K jednotlivým teplotním šokům byla vždy provedena kontrola v 25°C (kontrola k HS).

### 5.1.6 Test funkčnosti mitochondrií mutantních kmenů *Rpg1* v SEY pozadí

V rámci charakterizace *ts* mutantů *rpg1-2* a *rpg1-3* jsem chtěla dále zjistit, zda mají tyto kmeny funkční mitochondrie a zda není ovlivněná mutací či delecemi v PCI doméně. Pro srovnání jsem použila i mutantu *rpg1-1* a *RPG1wt* v SEY genetickém pozadí. Pro zjištění zda mají kmeny funkční mitochondrie, jsem zvolila růstovou analýzu na nezkvasitelném zdroji uhlíku – glycerolu. Pokud by kmeny neměly funkční mitochondrie, nebudou schopné využít glycerol jako alternativní zdroj uhlíku, neporostou a budou umírat. Testované kultury narostlé ve YPD jsem před zaočkováním do destičky s YP médiem s 3% glycerolem promyla, abych odstranila zbytkovou glukosu z média. Pro tento test jsem v přístroji Tecan Infinite f200PRO

nastavila program s teplotou 25°C, po dobu 18 hodin, za stálého třepání a měření každých 15 minut. Získaná data jsem vyhodnotila a vytvořila růstovou křivku zobrazenou v Graf 7.



Graf 7 Růstová křivka *ts* mutantních kmenů (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) v porovnání s *RPG1wt* v SEY genetickém pozadí. Kmeny byly kultivované přes noc (18 hodin) v permissivních podmínkách pro *ts* mutanty (25°C) ve YP médiu s 3% glycerolem.

KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]
<i>RPG1wt</i>	3,7
<i>rpg1-1</i>	3,8
<i>rpg1-2</i>	3,6
<i>rpg1-3</i>	3,8

Tabulka 4 Průměrná doba zdvojení mutantních kmenů *Rpg1* a *wt* v SEY genetickém pozadí. Zdrojová data z růstové křivky viz Graf 7.

Výsledky růstové analýzy v médiu s glycerolem, ukázaly, že testované kmeny po dobu 18 hodin rostly podobným způsobem, pouze kmen s mutantem *rpg1-1* rostl o něco pomaleji než wt a mutanty *rpg1-2* a *rpg1-3*. Tímto pokusem jsem zjistila, že testované *ts* mutanty v SEY genetickém pozadí nemají nijak výrazně ovlivněnou funkci mitochondrií a tudíž předpokládám, že mutace Rpg1 v těchto kmenech nenarušují funkci mitochondrií. Doba zdvojení je u všech kmenů včetně *RPG1wt* je delší ve srovnání s růstem při 25°C ve YPD médiu.

## 5.2 Analýza vlivu mutací Rpg1 na uspořádání mikrotubulů

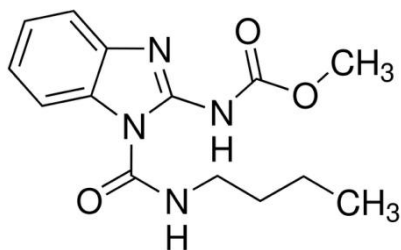
U kvasinky *S. cerevisiae* byla popsána asociace Rpg1 s mikrotubuly in vitro (Hasek et al., 2000), ale o vztahu Rpg1 s mikrotubuly u kvasinek není dosud více známo. Asociace Rpg1 s mikrotubuly by mohla ovlivňovat kontrolu kvasinkové translace nebo naopak dynamiku mikrotubulů.

Proto bylo cílem experimentů v této části práce zjistit, zda a jakým způsobem je ovlivněna struktura mikrotubulů a zda mutace v Rpg1 mají vliv na jejich uspořádání po působení nokodazolu.

Pro studium struktury mikrotubulů se používá řada látek, které stabilizují či destabilizují jejich strukturu. Já jsem ve svých pokusech použila dvě drogy (benomyl a nokodazol), které svým působením na mikrotubuly rozrušují jejich strukturu a depolymerizují je. Benomyl jsem použila ve svých pokusech k otestování citlivosti studovaných kmenů pevném médiu a nokodazol v pokusech využívajících fluorescenční mikroskopii živých buněk. K tomuto účelu jsem také připravila mutantní kmeny (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3* i wt Rpg1) v SEY genetickém pozadí s  $\alpha$ -tubulinem označeným mCherry na N-konci.

### 5.2.1 Test citlivosti Rpg1 mutantů v BY a SEY genetickém pozadí na působení benomyly

Benomyl (benlát) či methyl [1-[(butylamino)karbonyl]-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát je fungicidní látka, která působí na mikrotubuly, tím, že rozrušuje jejich strukturu. V mikrobiologických laboratořích se běžně používá k testování citlivosti kvasinek na jeho různé koncentrace, protože zvýšená citlivost k benomyly je u kvasinkových buněk považována za indikátor poruch mikrotubulárního systému.



Obr. 15 Strukturální vzorec benomyly

Vzhledem k publikovaným datům o asociaci Rpg1 proteinu s mikrotubuly (Hasek et al., 2000) jsme chtěli zjistit, zda mutace v molekule Rpg1 neovlivňují integritu a funkčnost mikrotubulárního cytoskeletu v kvasinkové buňce. Zvýšená citlivost k benomylu je u kvasinkových buněk považována za indikátor poruch tohoto systému, a proto jsme tento test citlivosti zvolili jako první krok. Exponenciálně rostoucí kultury testovaných kmenů byly přivedeny na stejnou koncentraci  $10^7$  buněk/ml a naředěny desítkovou řadou. Všechna ředění byla spotována pomocí ježka na předem připravené agarové misky s YPD agarem doplněným o indikované koncentrace benomylu – 20 a 40  $\mu\text{g/ml}$ . Po zaschnutí byly misky inkubovány po dobu 3 dnů v uvedených teplotách. Výsledné nárůsty jsou uvedeny v Obr. 16.

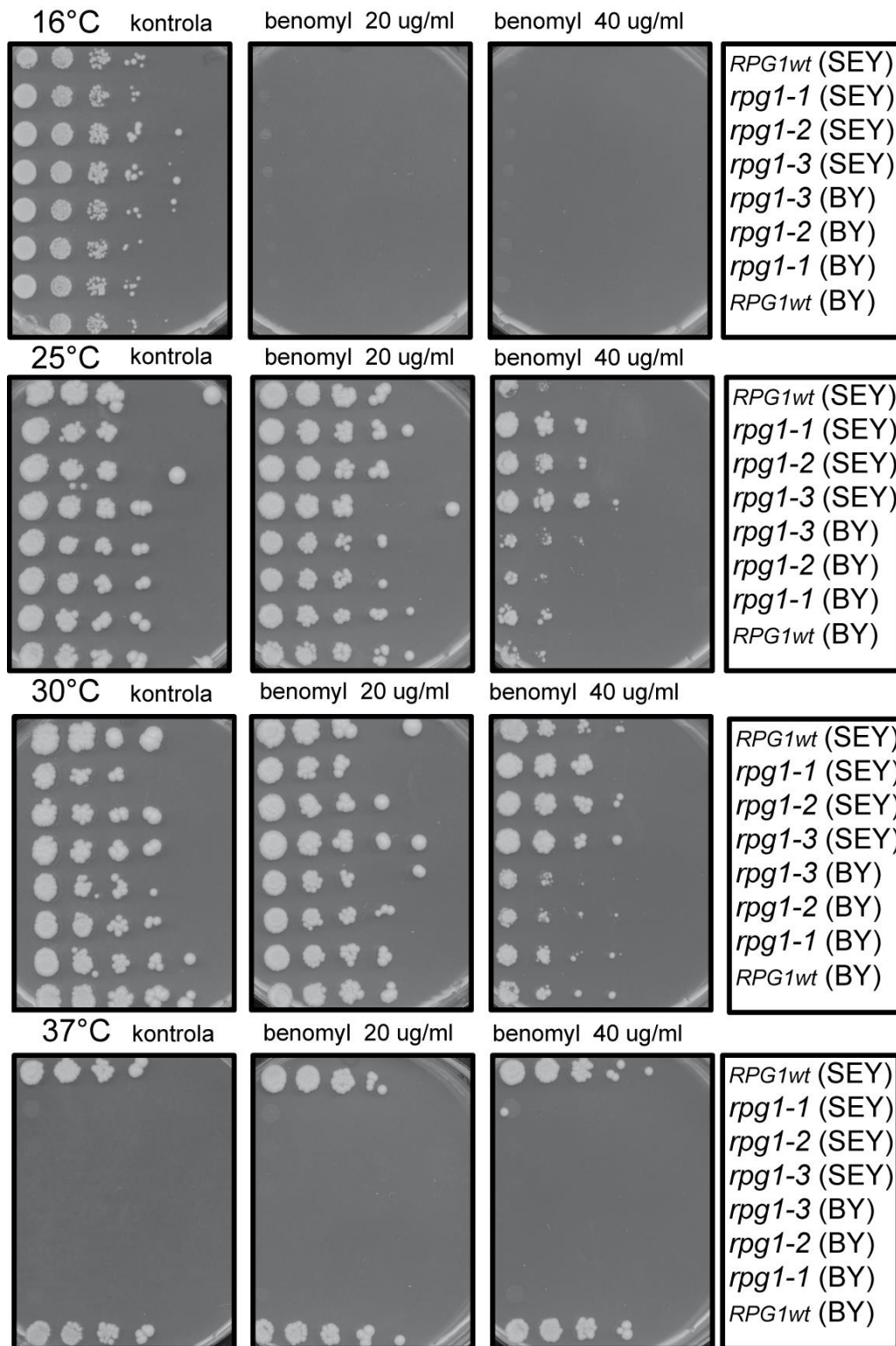
Žádný nárůst ani jednoho z testovaných mutantů ani wt kmene není pozorovatelný v  $16^\circ\text{C}$ . Použité koncentrace benomylu jsou tak zřejmě příliš vysoké pro test při této teplotě. Ve  $37^\circ\text{C}$  rostou pouze kmeny s wt formou Rpg1 u obou pozadí BY a SEY a je opět tak potvrzena citlivost Rpg1 mutantů k této teplotě. U nárůstů v  $25^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$  je rozdíl patrný spíše u  $40\mu\text{g/ml}$  benomylu než  $20\mu\text{g/ml}$ . Zdá se že, BY kmeny s mutovaným i intaktním Rpg1 jsou citlivější k vyšší koncentraci benomylu než kmeny pozadí SEY, ale není patrný nijaký výrazný rozdíl mezi kmeny s wt formou Rpg1 a mutanty u obou genetických pozadí.

Test citlivosti k benomylu tak neprokázal pozorovatelné ovlivnění integrity mikrotubulárního systému mutacemi Rpg1.

Pro testování citlivosti k benomylu jsem zvolila mutantní kmeny v BY a SEY genetickém pozadí.

CRY1403	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>MET15</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pLV14-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1407	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pRPG1-GFP – C (HIS3)</i> <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1409	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pAW119-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1412	BY <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>MET15</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>rpg1Δ</i> / <i>pAW119-4M-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1677	SEY <i>MATa</i> <i>leu2-3112</i> <i>ura3-52</i> <i>his3-Δ200</i> <i>trp1-Δ901</i> <i>suc2-Δ9</i> <i>lys2-801</i> <i>rpg1Δ::natNT2</i> + <i>pAW-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY <i>MATa</i> <i>leu2-3112</i> <i>ura3-52</i> <i>his3-Δ200</i> <i>trp1-Δ901</i> <i>suc2-Δ9</i> <i>lys2-801</i> <i>rpg1Δ:: natNT2+</i> <i>pAW-4-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY <i>MATa</i> <i>leu2-3112</i> <i>ura3-52</i> <i>his3-Δ200</i> <i>trp1-Δ901</i> <i>suc2-Δ9</i> <i>lys2-801</i> <i>rpg1Δ:: natNT2</i> + <i>pLV14-GFP (HIS3)</i> <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>

CRY1683	SEY <i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>leu2-3112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801 rpg1<math>\Delta</math>: natNT2+ pRPG1-GFP-C (<i>HIS3</i>) <i>RPG1 wt</i></i>	<i>RPG1 wt</i>
---------	---	----------------



Obr. 16 Ředící řady mutantních kmenů v genetických pozadích BY a SEY ve 2 rozdílných koncentracích benomylu. Pro kontrolu růstu byly kultury inkubovány na YPD miskách. Test byl proveden ve třech rozdílných teplotách (zleva ředění  $10^7$ - $10^2$ ).

## 5.2.2 Příprava kmenů v SEY genetickém pozadí s fluorescenčně značeným $\alpha$ -tubulinem v kombinaci s mutacemi Rpg1.

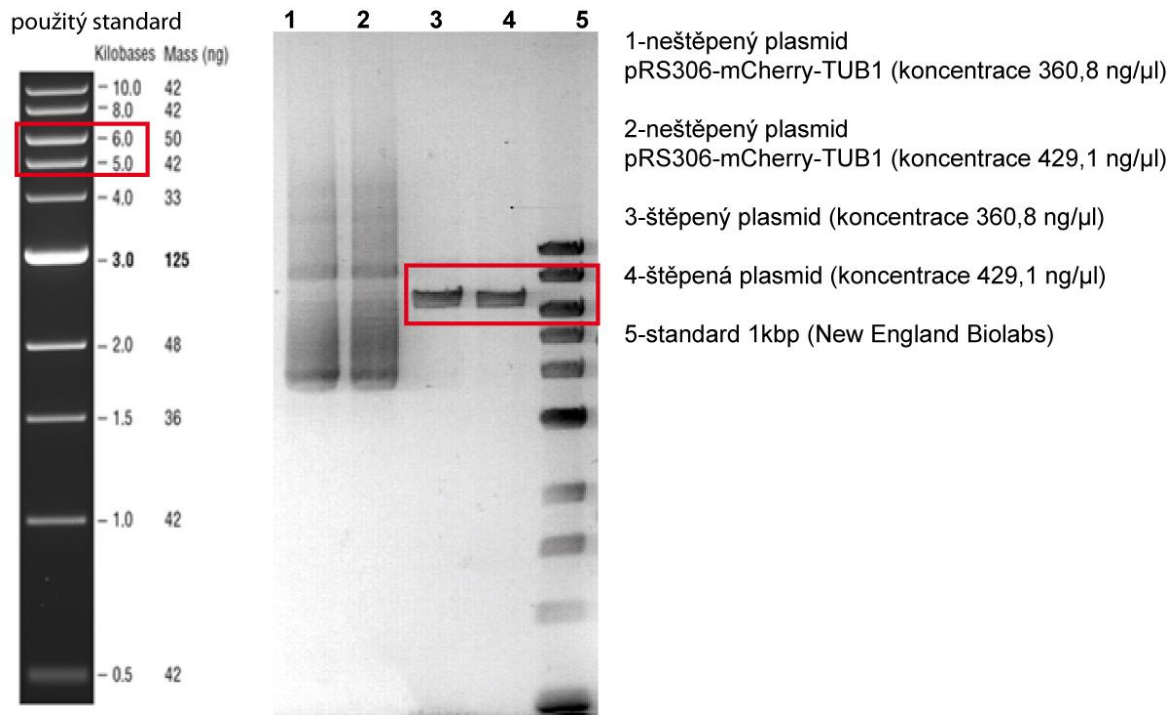
Pro přípravu kmenů nesoucích mutovanou formu Rpg1 a fluorescenčně značený tubulin alpha byly vybrány kmeny genetického pozadí SEY, protože v tomto pozadí je možná integrace do auxotrofních markerů oproti kmenům pozadí BY, kde jsou auxotrofie způsobené delecemi celých genů a ne pouze mutacemi jako je to v SEY pozadí.

Pro vnesení dodatečné kopie genu kódujícího tubulin alpha – TUB1- značené na jejím N-konci červeným fluorescenčním proteinem mCherry byl použit plasmid pRS306-mCherry-TUB1. Tento plasmid byl již dříve použit pro tvorbu kontrolního divokého kmene SEY se značeným tubulinem (Ivana Malcová), který jsem použila pro testování nokodazolu.

Nejprve byla plasmidová DNA naštěpena enzymem ApaI, který linearizuje plasmid v oblasti selekčního genu *URA3* (Obr. 17). Po kontrole linearizace plazmidu elektroforézou v agarosovém gelu byla připravená DNA transformována Li-Ac metodou do čtyř kmenů :

CRY1677	SEY <i>MAT<sub>a</sub></i> <i>leu2-3112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801 rpg1<math>\Delta</math>::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i></i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY <i>MAT<sub>a</sub></i> <i>leu2-3112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i></i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY <i>MAT<sub>a</sub></i> <i>leu2-3112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1683	SEY <i>MAT<sub>a</sub></i> <i>leu2-3112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i></i>	<i>RPG1 wt</i>

Kolonie transformantů vyrostlých na miskách bez uracilu byly odpíchnuty a přeočkovány na čerstvé plotny SC ura-. Po čtyřech koloniích od každého kmene jsem kontrolovala mikroskopicky přítomnost fluorescenčně značených mikrotubulů ve filtru určeném pro RFP.



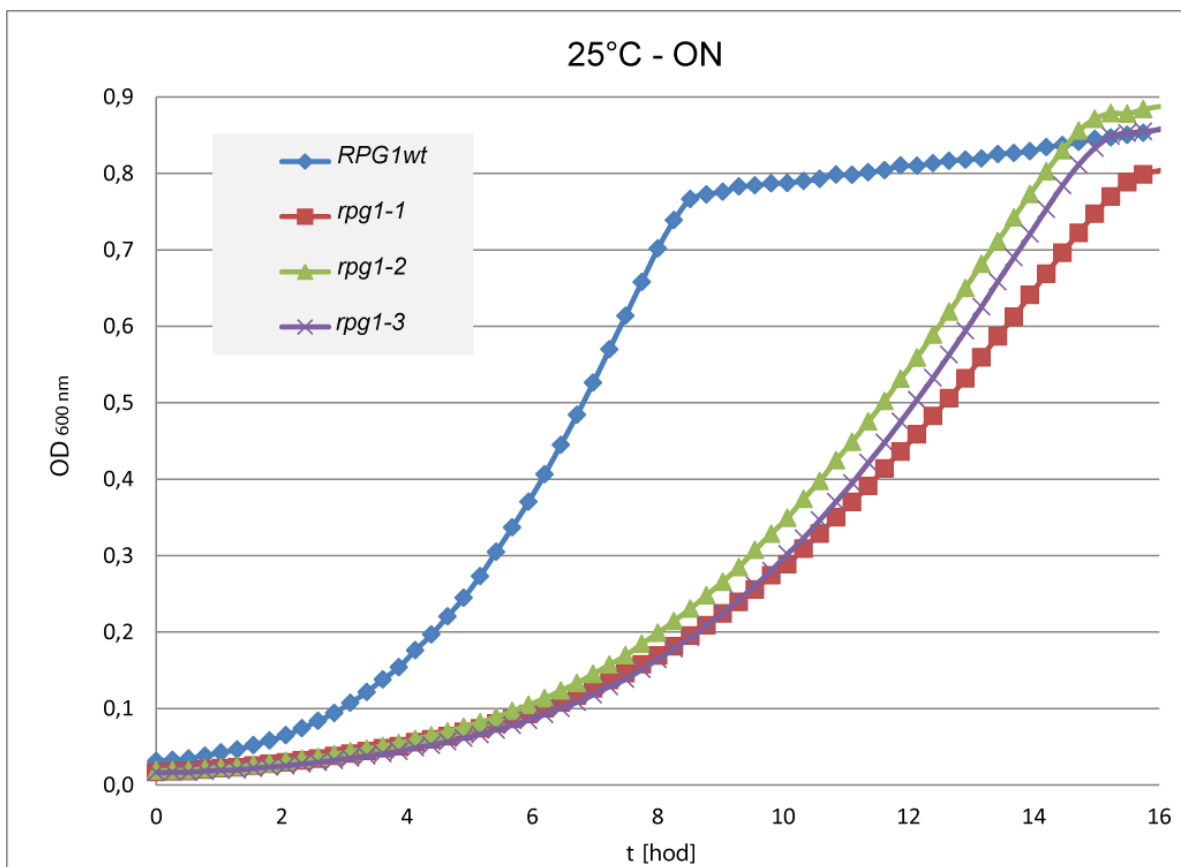
Obr. 17 Kontrola linearizace plasmidu v agarózovém gelu.

Nově vytvořené kmeny jsem zamrazila a uložila do laboratorní sbírky kvasinkových kmenů pod čísla: CRY1987 (*RPG1wt*), CRY1988 (*rpg1-1*), CRY1989 (*rpg1-2*) CRY1990 (*rpg1-3*).

### **Ověření růstových vlastností nově vytvořených kmenů a test termosenzitivity**

Nově vytvořené kmeny jsem otestovala z hlediska jejich růstu, abych si potvrdila, že integrovaný *TUB1* označený mCherry výrazně neovlivňuje růst buněk. Pro ověření růstových vlastností jsem využila opět měření pomocí přístroje Tecan Infinite 200 PRO. Přípravu vzorků na měření jsem provedla dle protokolu v metodice (3.2.9). Program pro noční kultivaci jsem nastavila na 25°C, 17 hodin, za stálého třepání a měření OD<sub>600</sub> každých 15 minut. Z dat jsem vytvořila růstovou křivku (Graf 8). Výsledky této růstové analýzy mi potvrdily, že kmeny rostou stejně dobře jako původní kmeny, do kterých jsem integrovala plasmid a tedy nejsou nijak ovlivněné touto dodatečnou kopií značeného tubulinového genu - viz průměrná doba zdvojení (Tabulka 5).





Graf 8 Růstová křivka mutantních kmenů s označeným  $\alpha$ -tubulinem. Buňky rostly přes noc ve YPD médiu, v permissivní teplotě 25°C, za stálého třepání.

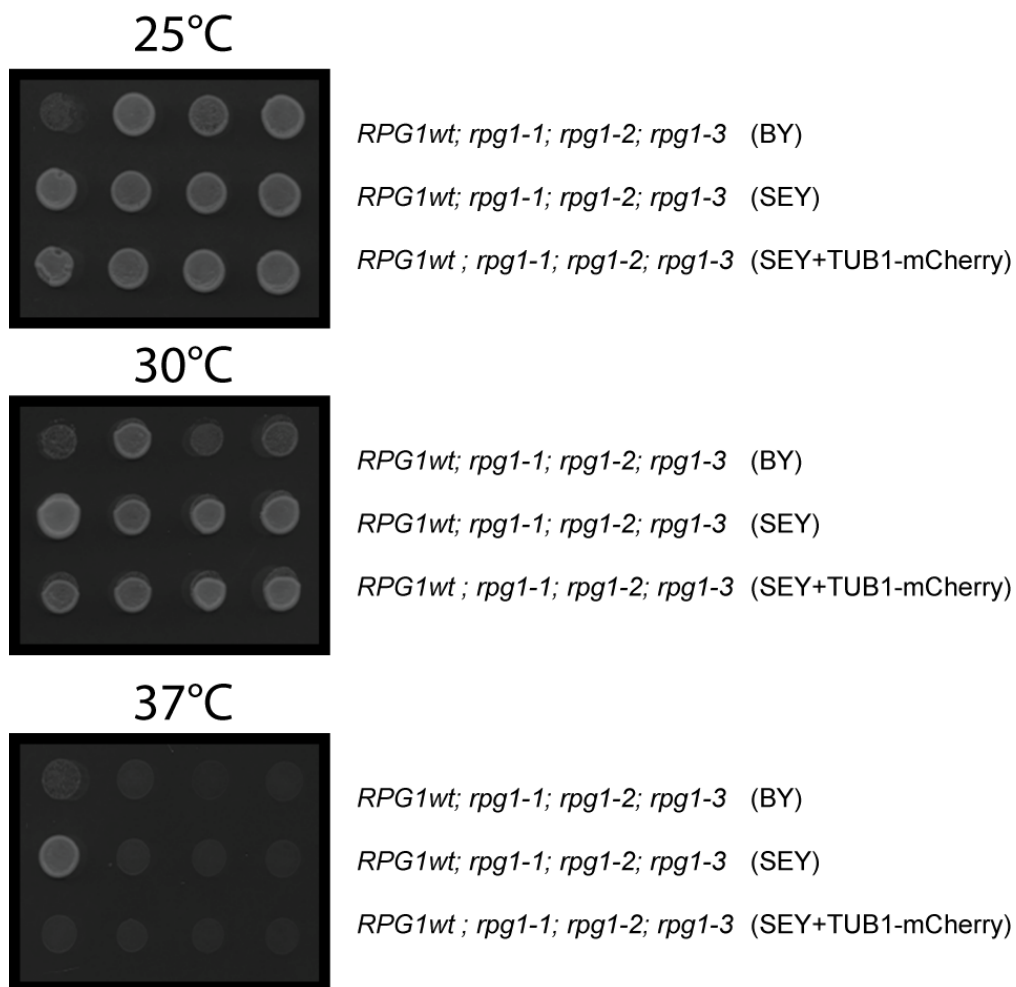
KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]
<i>RPG1wt</i>	1,5
<i>rpg1-1</i>	2,4
<i>rpg1-2</i>	2,3
<i>rpg1-3</i>	2,3

Tabulka 5 Průměrná doba zdvojení mutantních kmenů Rpg1 a wt v SEY genetickém pozadí se značeným  $\alpha$ -tubulinem. Zdrojová data z růstové křivky viz Graf 7.

Dále jsem chtěla potvrdit termosenzitivitu nově vytvořených kmenů, u kterých jsem očekávala růst ve 25°C (permissivních podmínkách pro *ts* mutanty) a ve 30°C. Růst ve 37°C jsem neočekávala, jelikož kmeny použité pro integraci plasmidu jsou *ts* mutanty. K ověření termosenzitivity jsem využila spot testů, kmeny jsem připravila podle protokolu v metodice (403.2.10). Kulturu na tiskání jsem v CM médiu zaočkovala

na stejné množství. Pro srovnání nově ověřených kmenů jsem použila mutanty Rpg1 v BY a SEY genetickém pozadí.

CRY1403	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1407	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pRPG1-GFP - C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1409	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1412	BY MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, rpg1Δ / pAW119-4M-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1677	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1679	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1681	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1683	SEY MATa leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1-GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1 wt</i>
CRY1987	SEY MATa leu2-3112 ura3-5::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pRPG1 -GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	<i>RPG1wt</i>
CRY1988	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1989	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ::natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1990	SEY MATa leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>

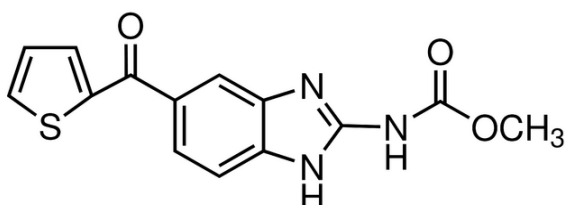


Obr. 18 Test termosenzitivity nově vytvořených kmenů v SEY genetickém se značeným  $\alpha$ -tubulinem v porovnání s mutanty Rpg1 v BY a SEY genetickém pozadí.

Výsledky testů potvrdily má očekávání. Nově vytvořené kmeny jsou termosenzitivní a nerostou v 37°C podobně jako kmeny SEY, do kterých jsem integrovala značený  $\alpha$ -tubulin.

### 5.2.3 Uspořádávání mikrotubulů po působení nokodazolu v pozadí SEY

Nokodazol neboli Methyl [5-(2-thienylkarbonyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát je antimitotická látka, která rozrušuje strukturu mikrotubulů tím, že se váže na  $\beta$ -tubulin. Nokodazol svým působením brání vzniku jedné či dvou disulfidických vazeb, a tím je inhibována dynamika mikrotubulů a dochází k narušení funkce dělicího vřeténka a fragmentaci Golgiho aparátu. Buňky ošetřené nokodazolem se zastavují v G2/M fázi buněčného cyklu (Wang et al. 1995) . Dále brání fosforylaci antigeních receptorů v buňce a zastavuje jejich aktivitu. Aktivuje signální dráhu a indukuje apoptózu v normálních i rakoviných buňkách (Cahill et al. 1998).



Obr. 19 Strukturální vzorec nokodazolu

#### 5.2.3.1 Architektura mikrotubulů a působení nokodazolu v divokém kmeni CRY1603

Cílem pokusu bylo otestovat, zda používaný nokodazol funguje a svým působením depolymeruje mikrotubulární struktury v buňce, které jsou schopné se znovu uspořádat po jeho omytí z média.

Pro testování nokodazolu jsem si pro první pokusy zvolila divoký kmen s označeným  $\alpha$ -tubulinem v SEY genetickém pozadí, který byl vytvořen v naší laboratoři:

CRY 1603	SEY <i>MATa leu2-3,112 pRS306-mCherry-TUB1-URA3:ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 lys2-801 suc2-<math>\Delta</math>9 WT SEY</i>	WT SEY
----------	---	--------

Kulturu jsem připravila podle návodu na přípravu vzorků pro fluorescenční mikroskopii (3.2.14). Divoký kmen jsem po celou dobu pokusu třepala v termobločku (Eppendorf) při teplotě 30°C a 550 rpm, která je optimální pro růst divokého kvasinkového kmene. Pro kultivaci jsme použila YPD médium, které bylo před mikroskopováním vzorku nutné odmyt a vyměnit za CM médium. Důvodem proč jsem

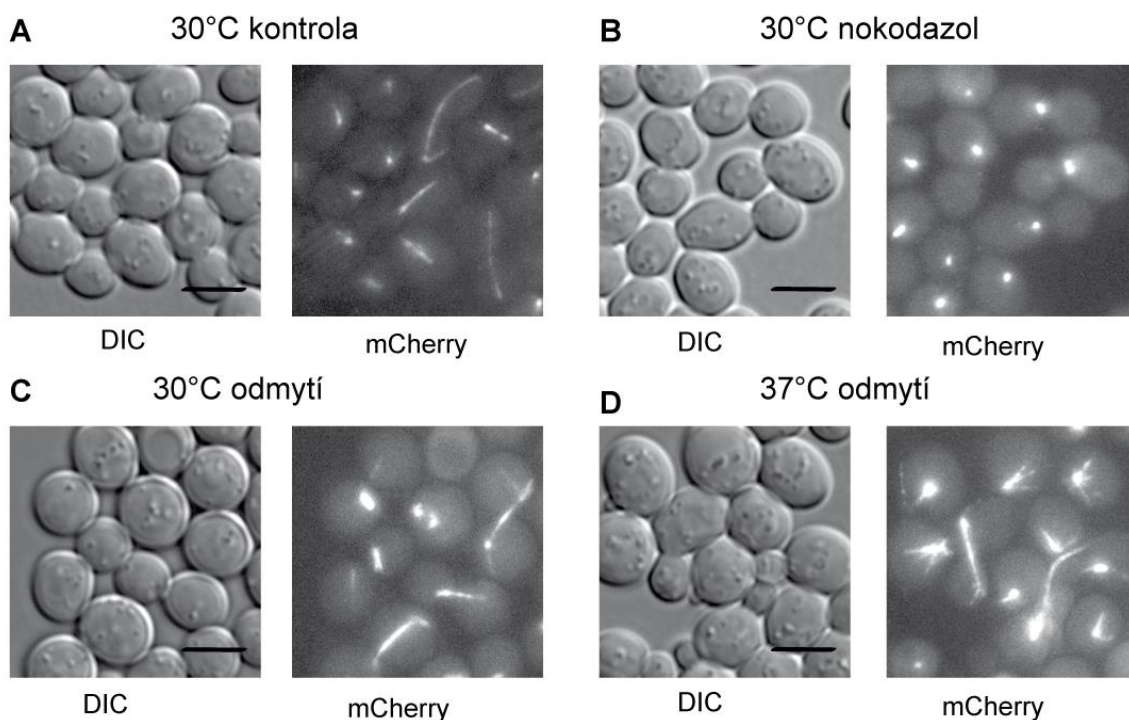
nemohla mikroskopovat vzorky s YPD médiem byla autofluorescence YPD média (vysoké pozadí a nespecifický signál) při sledování fluorescence pod RFP filtrem.

Pokus jsem provedla následovně:

Před přidáním nokodazolu do YPD média jsem buňky pozorovala pod Nomarskiho kondenzorem a mikrotubuly značené mCherry jsem pozorovala pod RFP filtrem. Vyfotila jsem několik snímků, expozice pro RFP filtr (RFP filter block U-MWIY2, exc. max. 545-580, em. max. 610), v němž jsem pozorovala mCherry byla 1500ms. Po nafocení kontrolních buněk, jsem do YPD média přidala nokodazol na finální koncentraci 50 µg/ml a inkubovala při 30°C po dobu 1, 5 hodiny (jedna generační doba divokého kmene). Dále jsem buňky přesunula do 37°C a inkubovala 1,5 hodiny. Po 1,5h ve 37°C s nokodazolem jsem kulturu rozdělila na dvě části. První část kultury jsem odmyla přehřátým YPD médiem (37°C) a inkubovala dále ve 37°C. Druhou část jsem odmyla od nokodazolu a nechala inkubovat ve 25°C. Po uplynutí doby jsem provedla odmytí nokodazolu z YPD média. Očekávala jsem, že se mikrotubuly znovu uspořádají v obou případech – odmytí v 30°C i 37°C.

Při mikroskopických pozorování jsem se snažila identifikovat všechny struktury mikrotubulů, které se v průběhu buněčného cyklu kvasinky *S. cerevisiae* objevují – od zdvojených jaderných plaků (SPB) jevících se jako dvě tečky blízko sebe, přes krátké dělicí vřeténko (spindle), vypadá jako krátká tyčinka a lze pozorovat i krásné prodloužené anafázní dělicí vřeténko (spindle) natažené z buňky mateřské do buňky dceřinné. Tyto struktury jsou patrné i z Obr. 20 a jsou pozorovatelné jak v exponenciálně rostoucích buňkách, tak i v buňkách po uvolnění ze zastavení v nokodazolu. Buňky zastavené v nokodazolu (panel B) mají viditelné pouze jaderné plaky (SPB) a depolymerizace mikrotubulů vede k uvolnění tubulinu do cytoplazmy, což je pozorovatelné jako zvýšený cytolazmatický signál.

## WT SEY (CRY1603)



Obr. 20 Buňky kultivované ve YPD médiu před přidáním nokodazolu (A), s nokodazolem v médiu (B), a po 1 hodině odmytí ve dvou různých teplotách (C,D). Měřítko 4 μm.

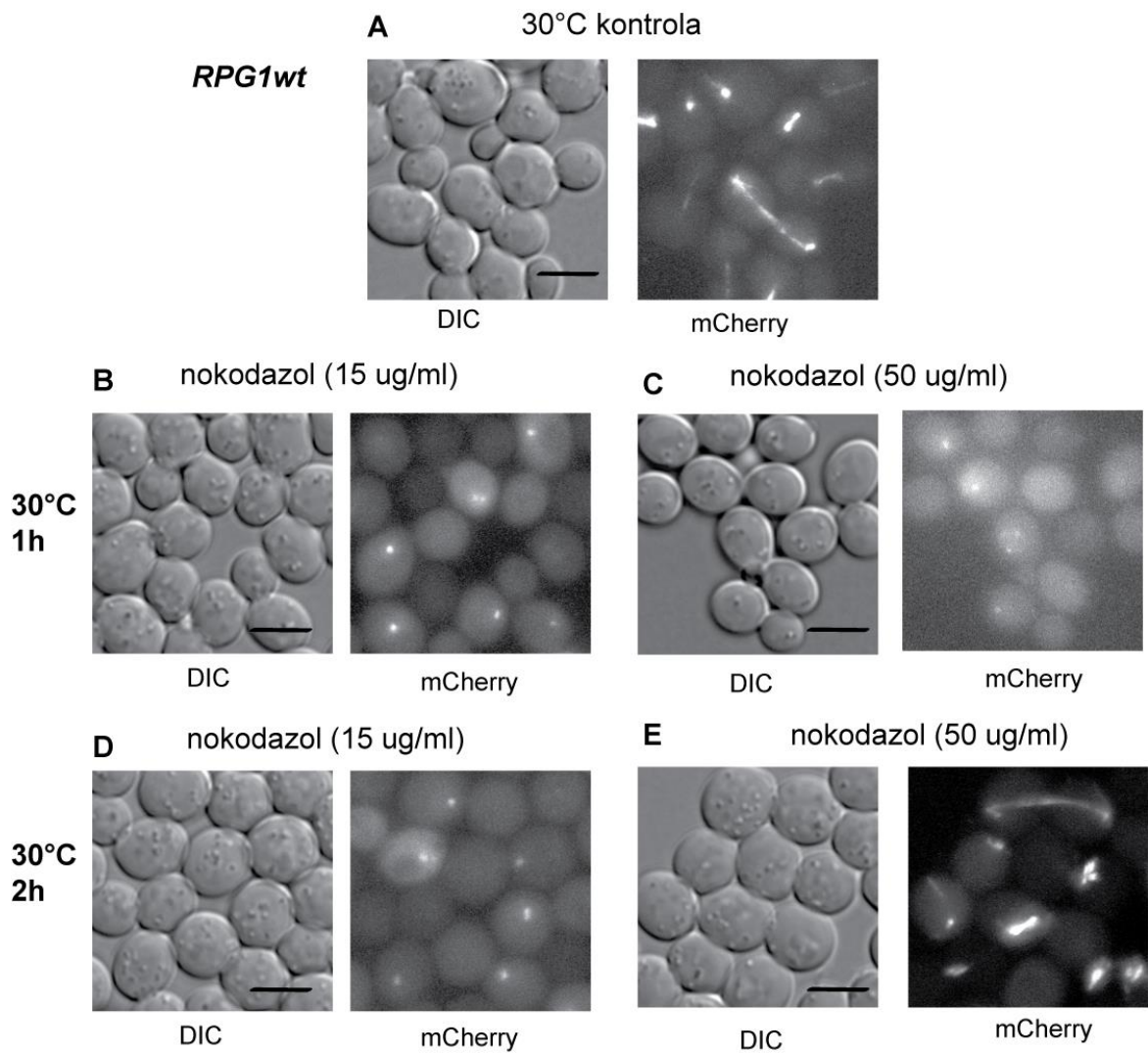
Obr. 20 ukazuje, že inkubace s nokodazolem po dobu 1,5 hodiny je dostačující pro depolymeraci mikrotubulů v celé populaci buněk s nemutovaným Rpg1. Ukazují také, že použitý nokodazol je funkční a je možné ho používat v dalších pokusech s mutantními kmeny. Stejně tak jsem potvrdila, že k repolymeraci mikrotubulů u nemutovaného kmene dojde do jedné hodiny po odmytí nokodazolu nezávisle na inkubační teplotě.

### 5.2.3.2 Vliv koncentrace nokodazolu na architekturu mikrotubulů

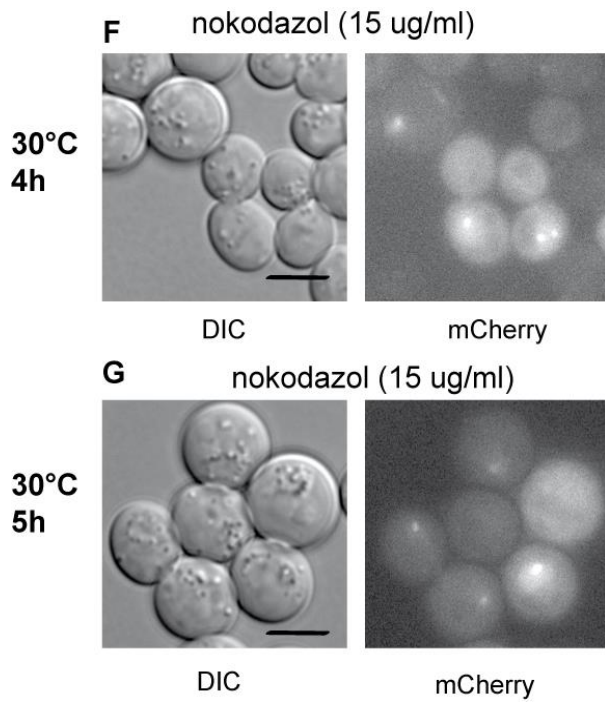
Při dalších pokusech s mutantními kmeny, které jsem inkubovala v nokodazolu delší dobu (3-4h z důvodu delší generační doby) než divokým kmenem se mi bohužel nepodařilo potvrdit výsledky mého pilotního pokusu. Nebyla jsem si jistá, zda se *ts* mutanty nechovají odlišně oproti divokému kmeni, ale ani u něj, při prodloužené inkubaci, se mi opakovaně nepodařilo zopakovat výsledek jako u pilotního pokusu. Podle mého pozorování výsledky ukazovaly spíše, že nokodazol nefunguje, protože mikroskopické obrazy připomínaly spíše rostoucí než zastavené buňky. Proto jsem se rozhodla vyzkoušet působení dvou rozdílných koncentrací. K pozorování jsem si

zvolila kmen s nemutovanou verzí Rpg1, který jsem připravila, jak je popsané v kap. (5.1).

CRY1987	SEY MAT $\alpha$ leu2-3112 ura3-5::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 suc2- $\Delta$ 9 lys2-801 rpg1 $\Delta$ :: natNT2+ pRPG1 -GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	RPG1wt
---------	--	--------

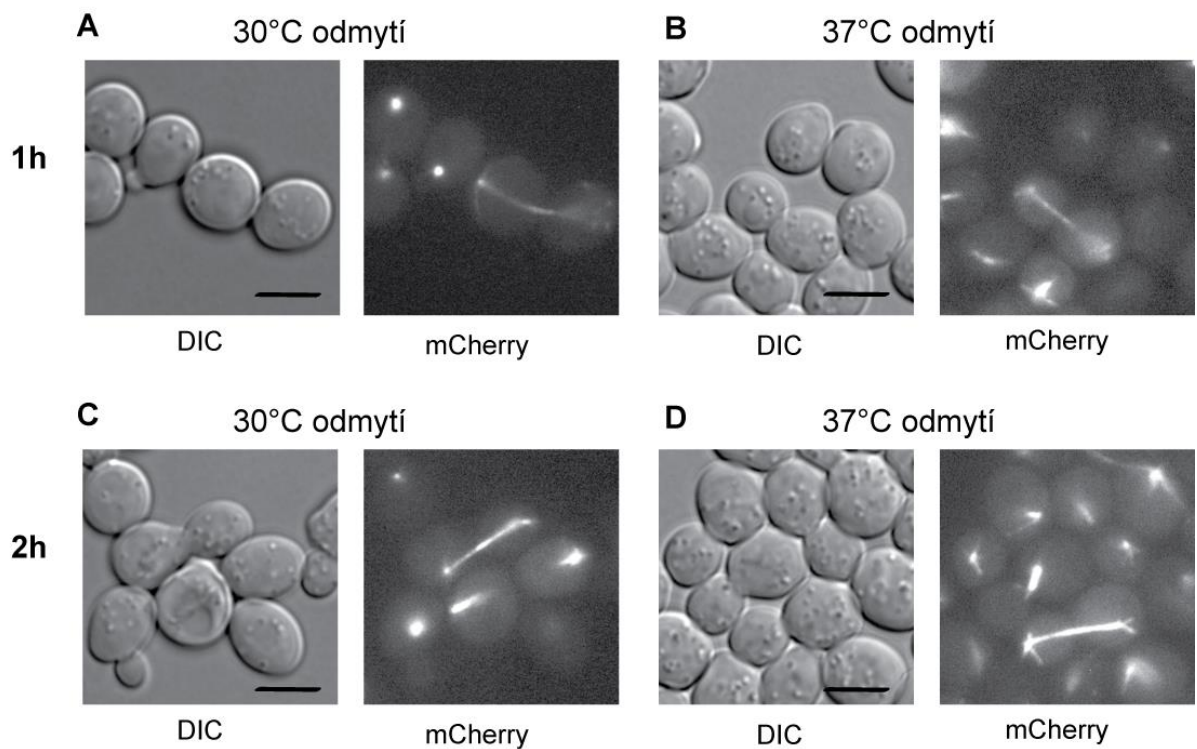






Obr. 21 Test působení nokodazolu na rozrušení struktury mikrotubulů po působení dvou rozdílných koncentrací u divokého kmene s Rpg1(SEY) s integrovaným plasmidem nesoucí fúzi TUB1-mCherry. Měřítka 4  $\mu$ m.

### ***RPG1wt***



Obr. 22 Znovu-uspořádání mikrotubulů 1 hodinu a 2 hodiny po odmytí nokodazolu z média s nižší koncentrací nokodazolu (15  $\mu$ g/ml). Odmytí porovnáno ve dvou teplotách: 30°C a 37°C. Měřítka 4  $\mu$ m.



Při porovnávání dvou rozdílných koncentrací nokodazolu a jejich působení na architekturu mikrotubulů jsem zjistila, že vysoká koncentrace nokodazolu (50 µg/ml) je neúčinná při dlouhodobějších inkubacích. Pokud je doba působení této koncentrace krátká, tj. v rozmezí 30–60 minut, dojde k rozrušení mikrotubulů a k zastavení buněk ve správném terminálním fenotypu, jak jsem zdokumentovala v prvních pokusech s kmenem CRY1603. Pokud však inkubace trvá delší dobu, pak se buňky zastavené v G2/M fázi aktivují a znovu uspořádají mitotické vřeténko. Vypadá to jako že se bunky nokodazolu zbavují a jeho působení na mikrotubuly není účinné. Ale je to „slippage“, tj. ze uniknou nebo obejdou spindle-assembly checkpoint, takže to tady jen nějak naznačit ale podrobnosti dát do diskuse Naopak při použití nízké koncentrace nokodazolu (15 µg/ml) je jeho působení i po 4 i 5 hodinách v médiu účinné, jak je demonstrováno na panelu F a G (obr. 1). I po této delší době působení nízké koncentrace nokodazolu buňky nemají problém repolymerovat mikrotubuly ve 30°C ani ve 37°C.

Po tomto testování jsem v další pokusech s nokodazolem používala pouze nízkou koncentraci (15 µg/ml).

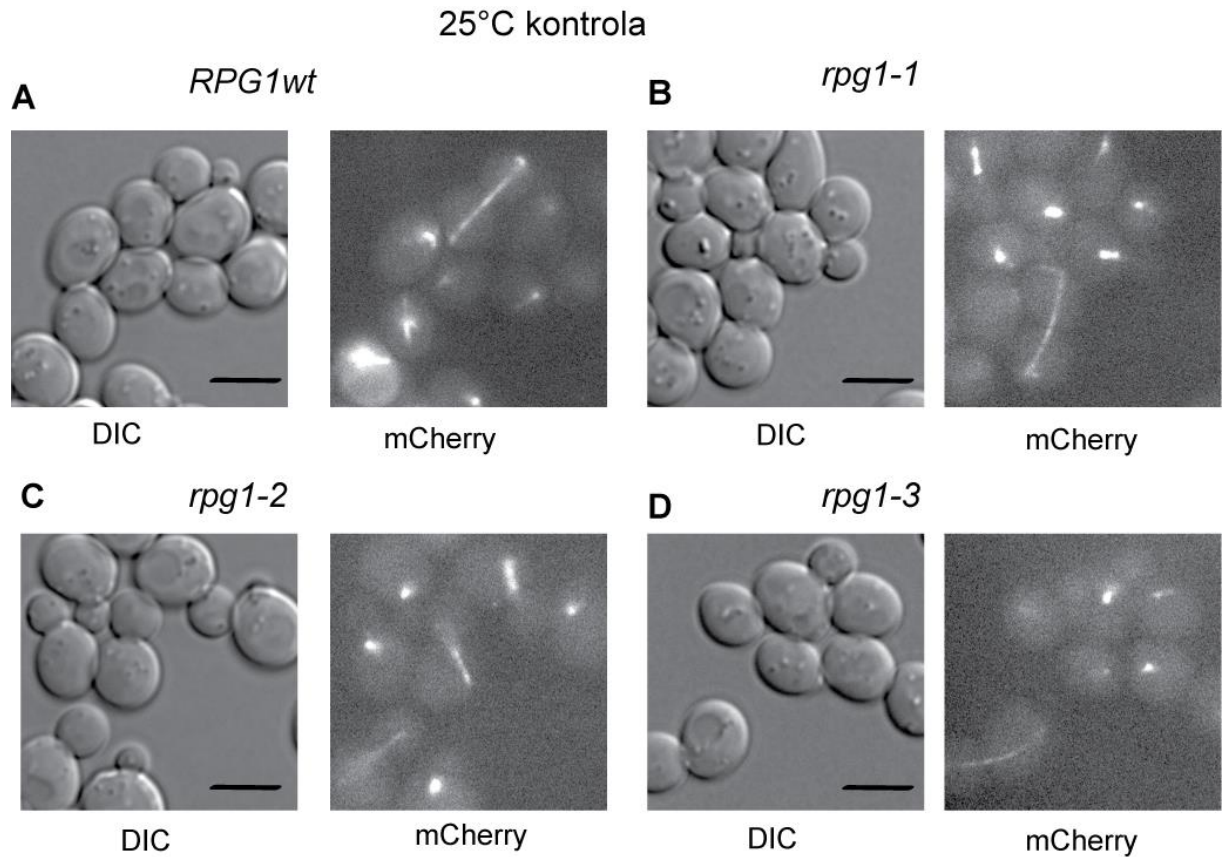
### 5.2.3.3 Působení nokodazolu na uspořádávání mikrotubulů v mutantních kmenech

Pro sledování mikrotubulů a jejich změn v uspořádání po působení nokodazolu jsem použila následující kmeny se značeným  $\alpha$ -tubulinem (mCherry-TUB1).

CRY1987	SEY MAT <sub>q</sub> leu2-3112 ura3-5::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 suc2- $\Delta$ 9 lys2-801 rpg1 $\Delta$ :: natNT2+ pRPG1 -GFP-C (HIS3) <i>RPG1 wt</i>	RPG1wt
CRY1988	SEY MAT <sub>q</sub> leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 suc2- $\Delta$ 9 lys2-801 rpg1 $\Delta$ :: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) <i>rpg1-1</i>	rpg1-1
CRY1989	SEY MAT <sub>q</sub> leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 suc2- $\Delta$ 9 lys2-801 rpg1 $\Delta$ :: natNT2 + pAW-GFP (HIS3) <i>rpg1-2</i>	rpg1-2
CRY1990	SEY MAT <sub>q</sub> leu2-3112 ura3-52::URA3::pRS306-mCherry-TUB1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 suc2- $\Delta$ 9 lys2-801 rpg1 $\Delta$ :: natNT2+ pAW-4-GFP (HIS3) <i>rpg1-3</i>	rpg1-3

Pokusem jsem chtěla zjistit, jak se chovají mutantní kmeny po působení nokodazolu, zda se budou chovat jako divoký kmen či odlišně. Dále mne zajímalo, zda budou

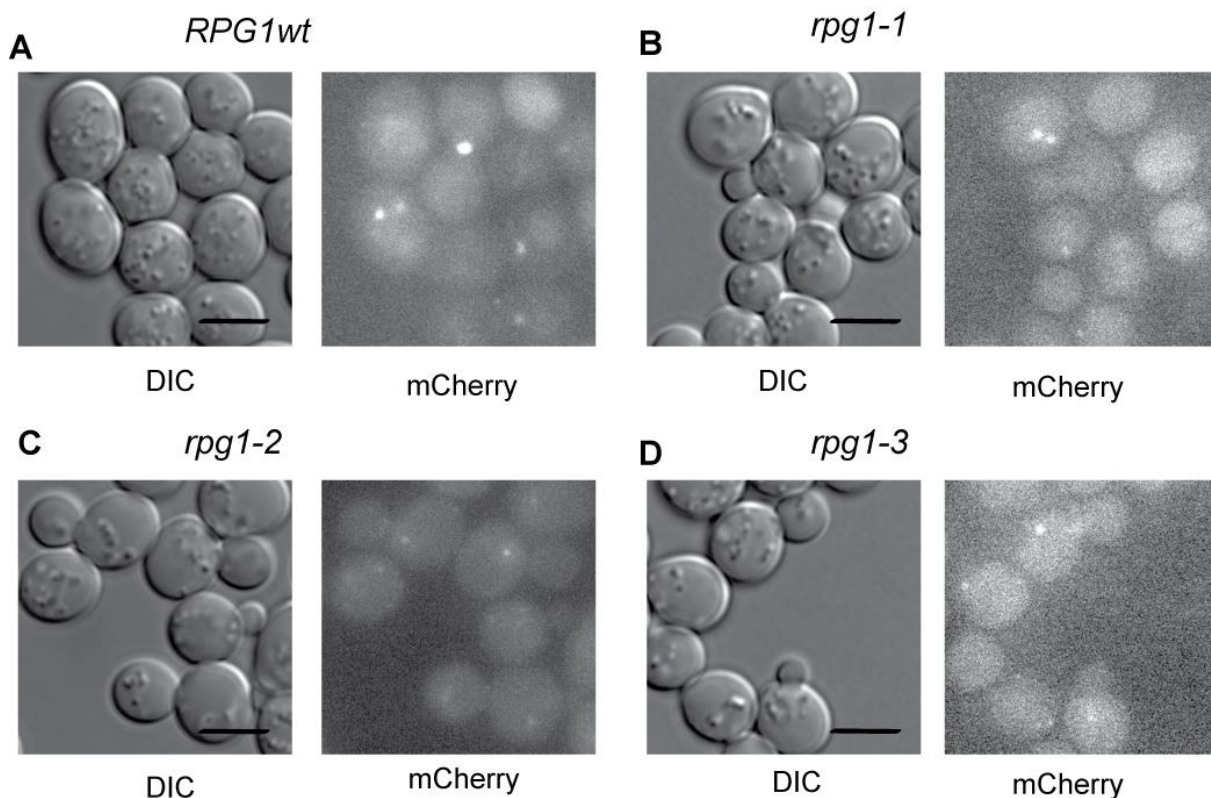
buňky vykazovat, tzv. *ts* terminální fenotyp - zastavení v G1 – pozorovaný u *rpg1-1* mutanta ve W303 pozadí a od kterého byl odvozen název Rpg1 – required for passage through G1 či tzv. nokodazolový fenotyp, tj. zastavení v G2/M fázi buněčného cyklu jako buňky s velkým pupenem, ale jedním jádrem s duplikovanými jadernými plaky.



Obr. 23 Mutantní kmeny v porovnání s divokým kmenem, exponenciálně rostoucí kultury v 25°C před přidáním nokodazolu do média. Měřítka 4  $\mu$ m.

Na panelech A-D (Obr. 23) je možné vidět všechny struktury mikrotubulů, jak již bylo popsáno v pilotním pokuse s nemutovaným Rpg1.

37°C - 4h nokodazol (15 ug/ml)



Obr. 24 Buňky focené po 4 hodinách inkubace v 37°C ve YPD médiu s 15  $\mu$ g/ml nokodazolu. Měřítka 4  $\mu$ m.

Působení nokodazolu způsobí depolymeraci mikrotubulů, která je detekovatelná, ve všech buňkách jsou vidět tečky reprezentující jaderné plaky (SPB): A- u divokého kmene i mutantů B-D.

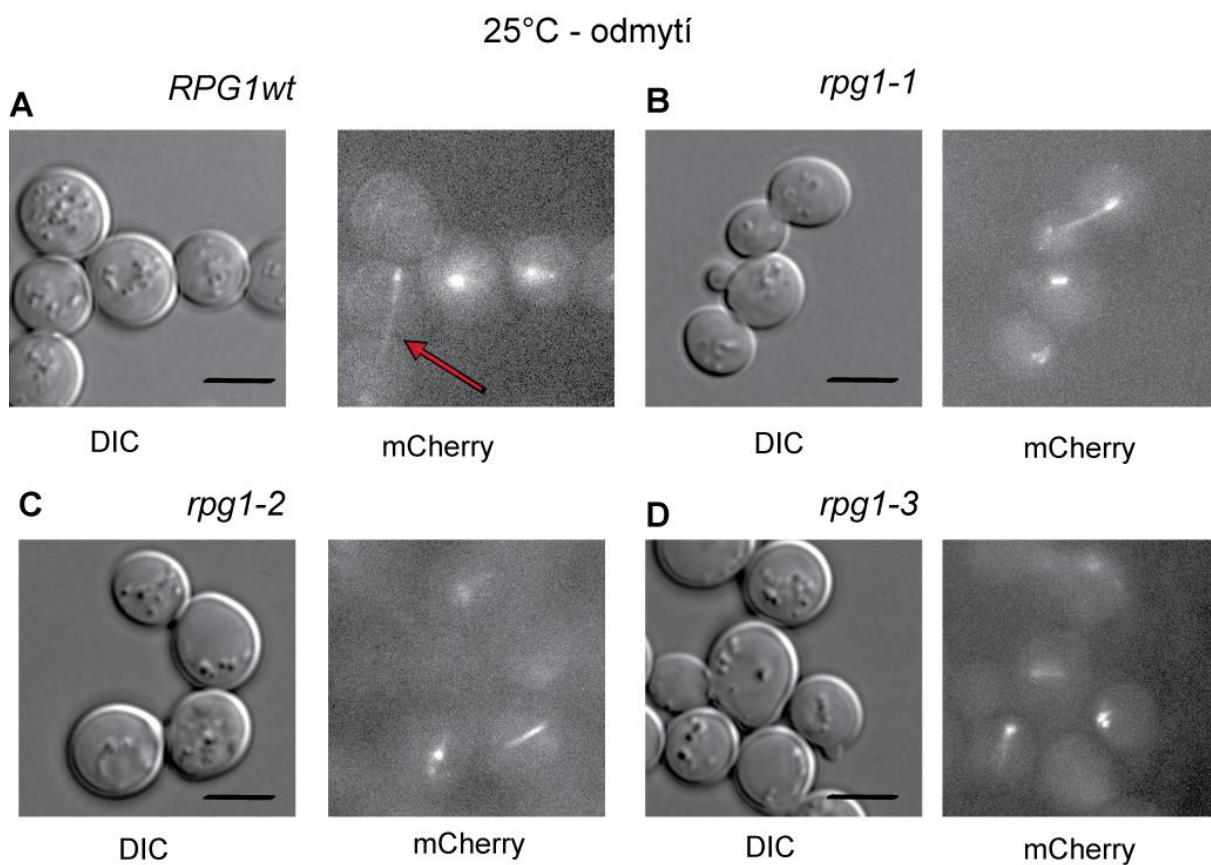
Po 4 hodinách inkubace ve vodní lázni při 37°C, byla část kultury odebrána a nokodazol byl odmyt:

- 1) YPD médiem vyhřátým na 37°C a kultura byla inkubována rovněž při 37°C jak dlouho
- 2) YPD médiem pokojové teploty a inkubace pokračovala při 25°C jak dlouho.

Pro zjednodušení pokusu jsem divoký kmen inkubovala také při 25°C, jelikož jsem měla už z minulých pokusů zjištěno, jak se tento kmen chová za 30°C.

Buňky inkubované v médiu s nokodazolem pod dobu 4 hodin v 37°C mají depolymerizované MT, tzn. že lze pouze pozorovat SPB. K depolymeraci došlo u všech

mutantních kmenů i wt Rpg1. Tímto opět potvrdilo, že koncentrace (15  $\mu\text{g/ml}$ ) je vhodná i pro dlouhodobější kultivace, oproti vyšší koncentraci (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

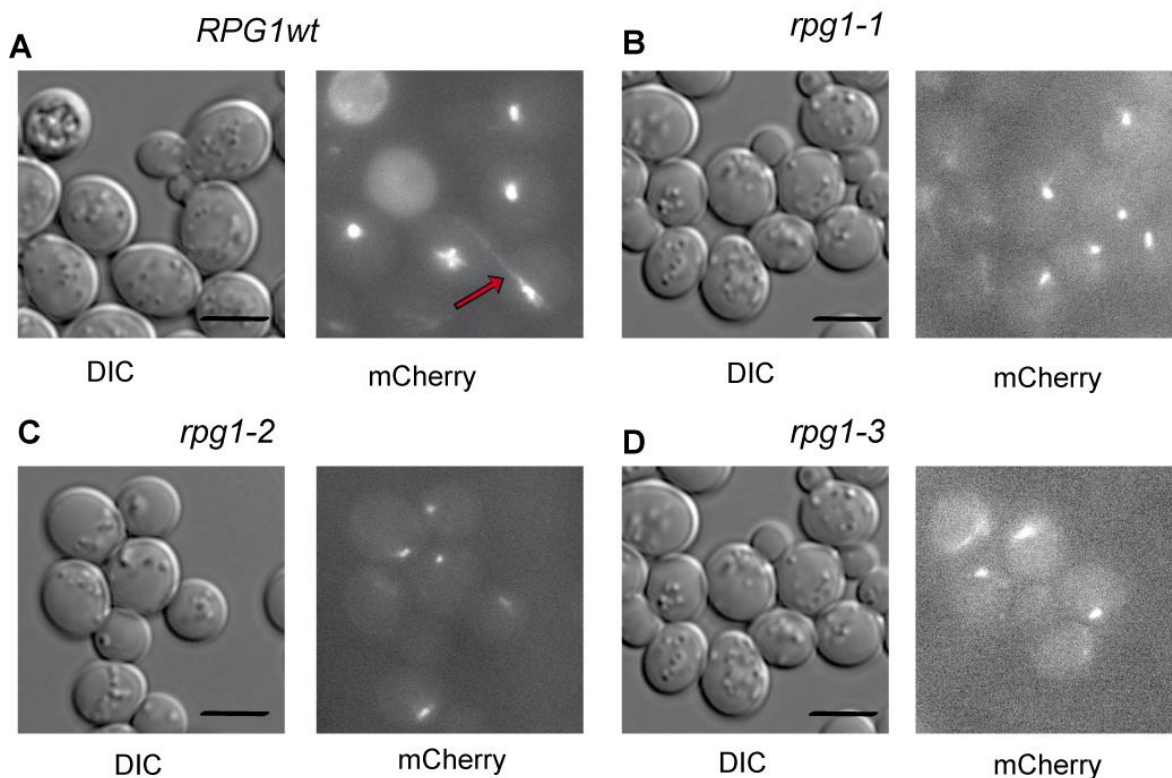


Obr. 25 Buňky foceně po 1 hodině odmytí nokodazolu a inkubace v 25°C ve YPD. Měřítka 4  $\mu\text{m}$ .

Ze snímků shrnutých na obrázcích Obr. 25Obr. 26 je zřejmé, že už po hodině odmytí nokodazolu za permissivní teploty dojde k repolymeraci mikrotubulů u mutantu *rpg1-1* srovnatelně s wt a dříve než u mutantů *rpg1-2* a *rpg1-3*.

Za nepermissivní teploty 37°C je repolymerace mikrotubulů u všech mutantů opožděna oproti wt.

37°C - odmytí



Obr. 26 Buňky focené po 1 hodině odmytí nokodazolu a inkubace v 37°C ve YPD. Měřítka 4  $\mu\text{m}$ .

Inkubace ve 37°C po odmytí nokodazolu ukazuje, že wt Rpg1 znovuospořádává MT, jsou viditelná dlouhá mitotická vřeténka. Naproti tomu u mutantů je náznak tenkých cytoplasmatických miktorubulů směřujících do prostoru buňky z SPB. Buňky mají problém s repolymerací, nepozorovala jsem jiné struktury než na panelech B, C, D (Obr. 26) (žádné dlouhé vřeténko).

#### 5.2.3.4 Podrobnější mikroskopická analýza vlivu nokodazolu na mutantní kmeny v *rpg1-1* a *rpg1-3*.

Po uskutečnění několika dalších pokusů s mutantními kmeny i wt formou Rpg1, které jsem prováděla s nízkou koncentrací nokodazolu (15  $\mu\text{g/ml}$ ) jsem pozorovala stejné chování wt formy Rpg1 jako ve výše zmíněném experimentu. Dále jsem pozorovala obdobné chování u mutantních variant *rpg1-2* a *rpg1-3*, ale pozorovala jsem patrné rozdíly mezi mutanty *rpg1-1* a *rpg1-3* (a tedy i *rpg1-2*). Na základě toho, jsem se rozhodla provést experiment, ve kterém porovnám dva rozdílné mutanty Rpg1 –



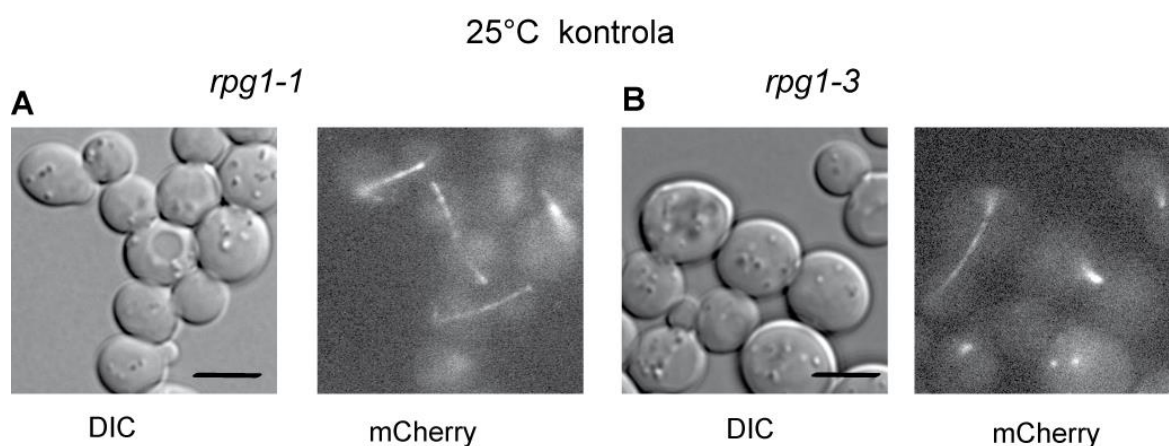
jednobodového *rpg1-1* a vícebodového *rpg1-3*, abych potvrdila pozorované změny. Z tohoto důvodu jsem experiment naplánovala následovně:

a) nejprve jsem nechala růst kulturu 3 hodiny ve YPD médiu s přidaným nokodazolem – tuto kulturu jsem pozorovala mikroskopicky po 1h, 2h a 2,5 h inkubace, abych zdokumentovala depolymeraci mikrotubulů, a v jaké fázi buněčného cyklu se buňky zastaví.

b) Stejnou kulturu jsem přenesla do 37°C a inkubovala po dobu 3 hodin nutných pro vyřazení z funkce mutantních forem Rpg1. Opět jsem prováděla focení ve stejných časových intervalech.

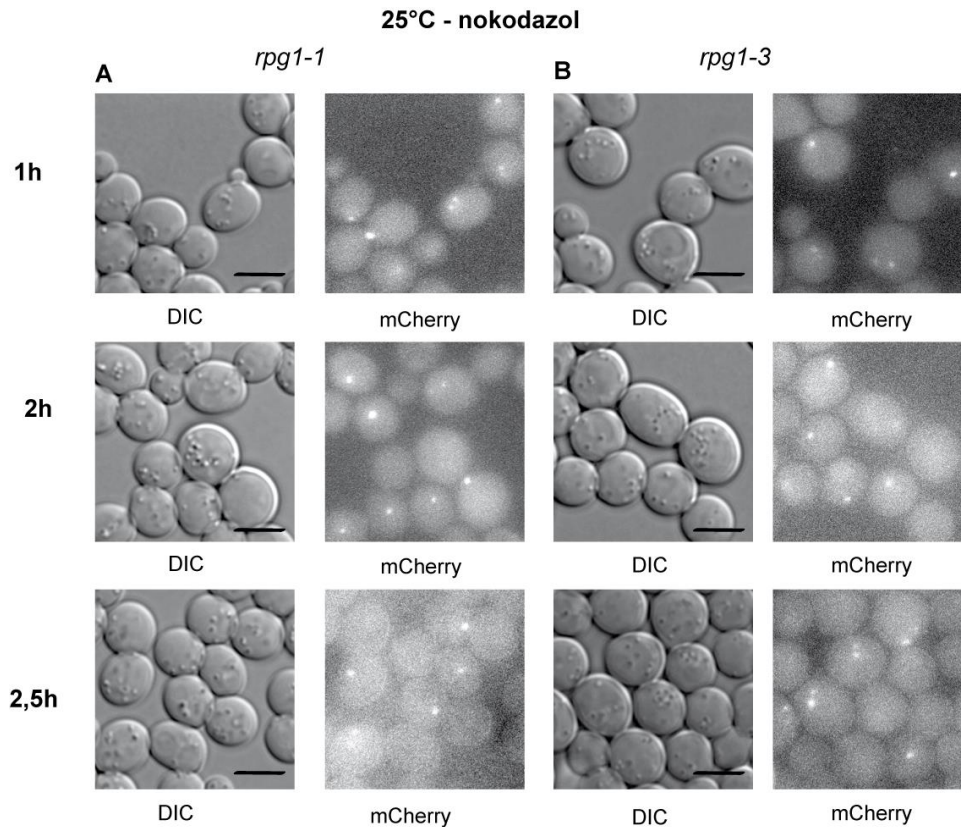
c) Po třech hodinách inkubace s nokodazolem ve 37°C jsem kulturu rozdělila na dvě části. První část kultury jsem odmyla předeřhřátým YPD médiem (37°C) a inkubovala dále ve 37°C. Druhou část jsem odmyla od nokodazolu YPD o pokojové teplotě a nechala růst ve 25°C jako kontrolu repolymerace mikrotubulů.

Po celou dobu experimentu byly buňky ve YPD médiu a byly třepány v termobločku (Eppendorf) při 550 rpm. Vždy pře mikroskopování bylo YPD médium odmyto a vyměněno za CM médium, z důvodu autofluorescence YPD. Fluorescenční protein mCherry, který jsem pozorovala pod RFP filtrem má velmi slabý signál, proto některé obrázky vypadají jako nezaostřené a rozmazané zvláště ty, kdy je většina fluorescenčního signálu difúzní.



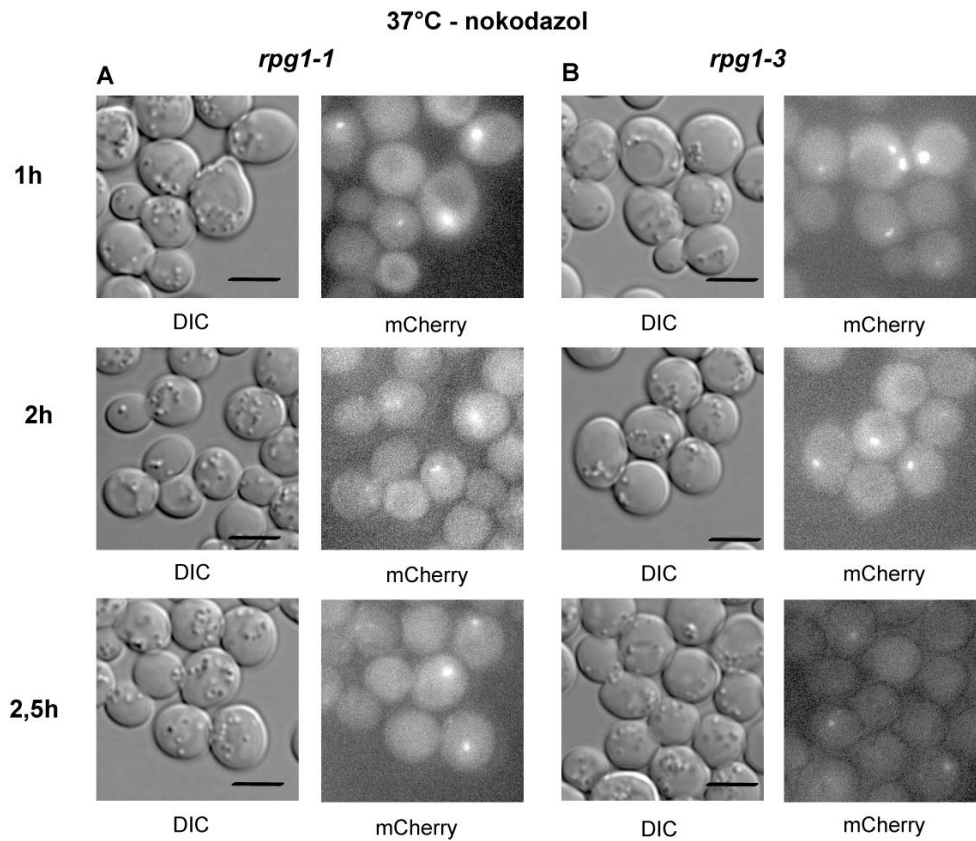
Obr. 27 Kontrolní buňky *rpg1-1* a *rpg1-3* nafocené před přidáním nokodazolu. Měřítka 4 μm.

Jsou vidět dlouhá mitotická vřeténka typická pro dělící se buňky i ostatní struktury MT jako např. jaderné plaky.



Obr. 28 Buňky *rpg1-1* a *rpg1-3* po působení nokodazolu (koncentrace 15  $\mu\text{g/ml}$ ), inkubace ve YPD médiu při 25°C. Měřítka 4  $\mu\text{m}$ .

Na (Obr. 28) je vidět, že po působení nokodazolu se MT rozpadly a jsou vidět pouze jaderné plaky SPB jako tečky a většina fluorescenčního signálu je difúzní v cytoplazmě. Podle tvaru buněk na DIC snímku je možné říct, že buňky jsou zastaveny ve fázi G2/M, jak je pro působení nokodazolu typické.

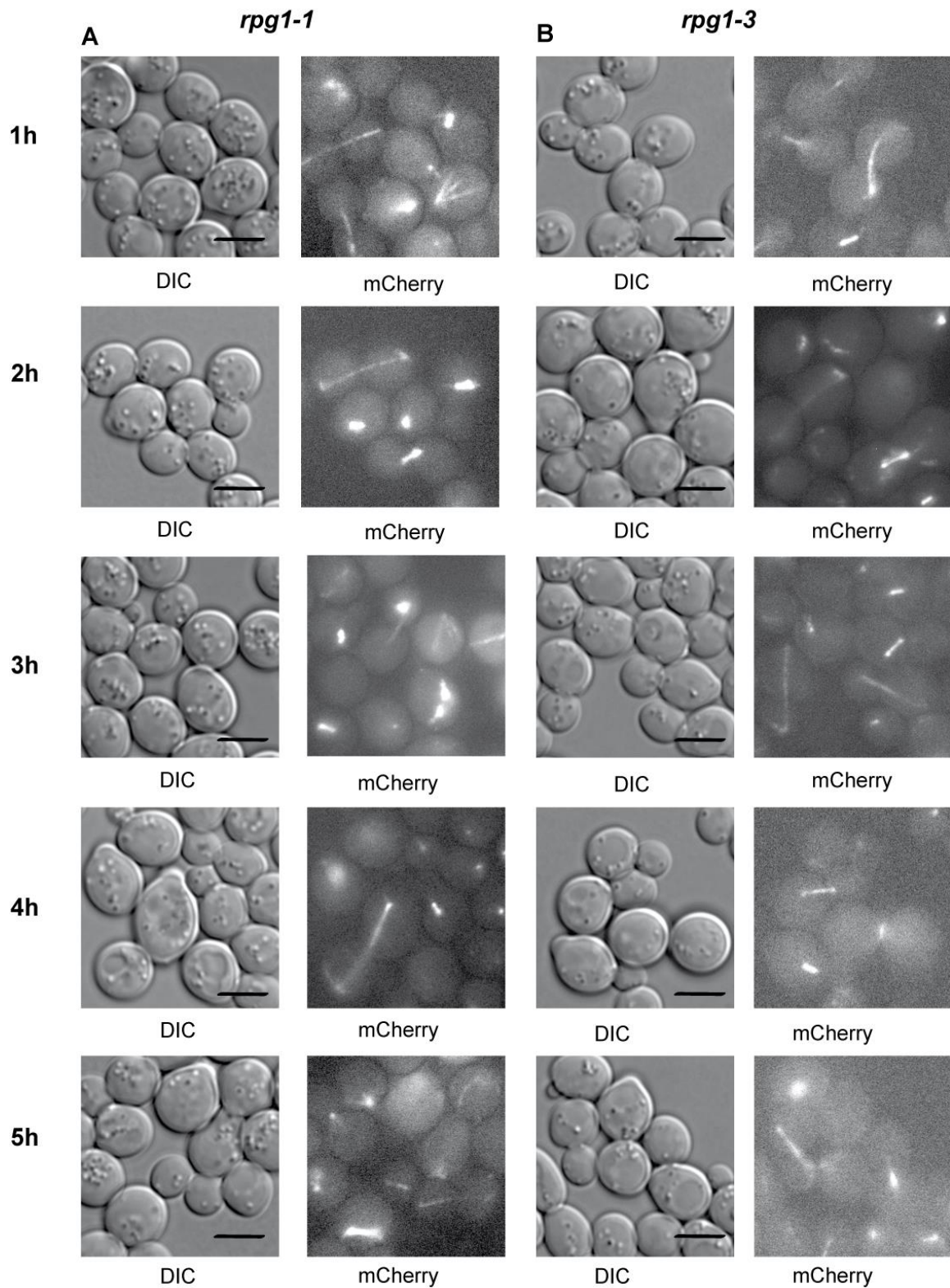


Obr. 29 Buňky *rpg1-1* a *rpg1-3* po působení nokodazolu (koncentrace 15 µg/ml), inkubace ve YPD médiu při 37°C. Měřítka 4 µm.

Nokodazol stále působí, v buňkách na mikrotubuly, které jsou depolymerizované a lze pozorovat pouze SPB (Obr. 28 a Obr. 29 ) a nedochází k uvolnění buněk z nokodazolového arestu.



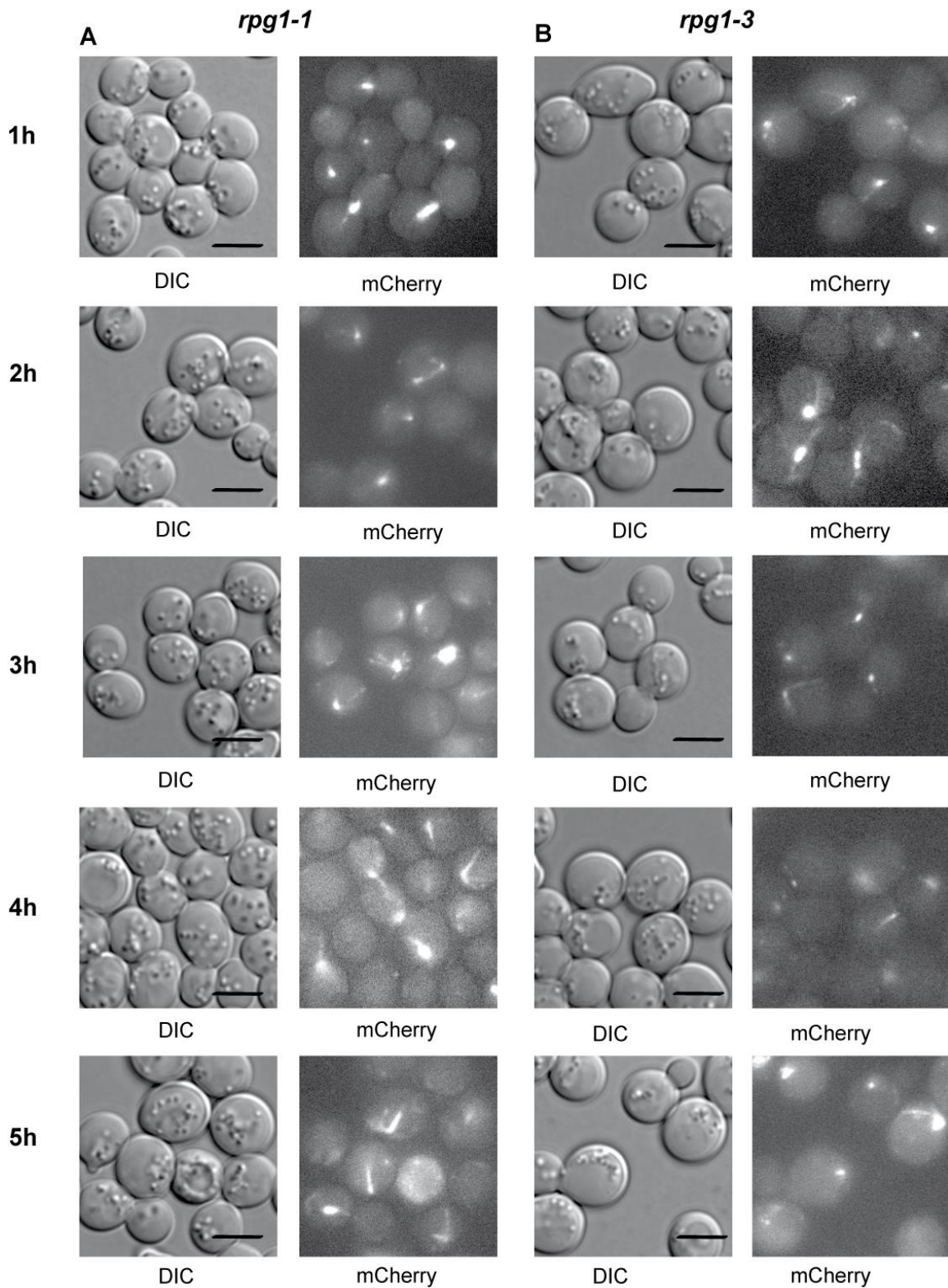
25°C - odmytí nokodazolu



Obr. 30 Buňky *rpg1-1* a *rpg1-3* po odmytí nokodazolu, inkubované ve 25°C ve YPD médiu. Měřítka 4  $\mu$ m.

Na panelech A a B (Obr. 30) je vidět rozdíl v architektuře MT oproti působení nokodazolu. Je vidět, že MT se znovu uspořádávají a lze tudíž opět pozorovat všechny mikrotubulární struktury, podobně jako v 25°C před přidáním nokodazolu. V repolymeraci mikrotubulů v 25°C není výrazný rozdíl mezi analyzovanými mutanty rpg1-1 a rpg1-3, u obou dochází ke spuštění anafáze již do hodiny po odmytí nokodazolu, jak je patrné z přítomnosti dlouhých vřetének (Obr. 30).

37°C - odmytí nokodazolu



Obr. 31 Buňky *rpg1-1* a *rpg1-3* po odmytí nokodazolu, inkubované ve 37°C ve YPD médiu při 25°C. Měřítka 4 μm.

U buněk Rpg1 mutantů uvolněných z nokodazolu do nepermissivních podmínek (Obr. 31) lze pozorovat snahu o uspořádání MT. Je vytvořeno krátké vřetenko, jsou vidět i cytoplasmatické mikrotubuly (malé fousy či tenké čárky), ale nelze pozorovat žádná dlouhá anafázní vřetenka s jako v případě uvolnění do 25°C, kde se dlouhá vřetenka vytvořila. Při srovnání *rpg1-1* a *rpg1-3* lze pozorovat, že mutant *rpg1-1* vytváří kolem SPB jakési paprsky na intenzivně svítící a už po poměrně krátké době po odmytí a téměř ve všech buňkách. Naopak u *rpg1-3* v některých případech, které jsem snažila zachytit je vidět SPB a občas nějaké „nitka“ napojená na něj. V obou dvou případech jsem ani po 5 hodinách po odmytí v těchto nepermissivních podmínkách nepozorovala vytvoření dlouhých vřetének.

### 5.3 Analýza vztahu proteinů Rpg1 a Bub1

Bylo zjištěno, že kombinací delece genu *BUB1* a mutantů *RPG1* vzniká syntetický růstový defekt až syntetická letalita, což zdůrazňuje důležitost translace pro rozhodující fáze buněčného dělení

#### 5.3.1 Křížením mutantů Rpg 1 v SEY genetickém pozadí s delecí Bub1 v BY genetickém pozadí

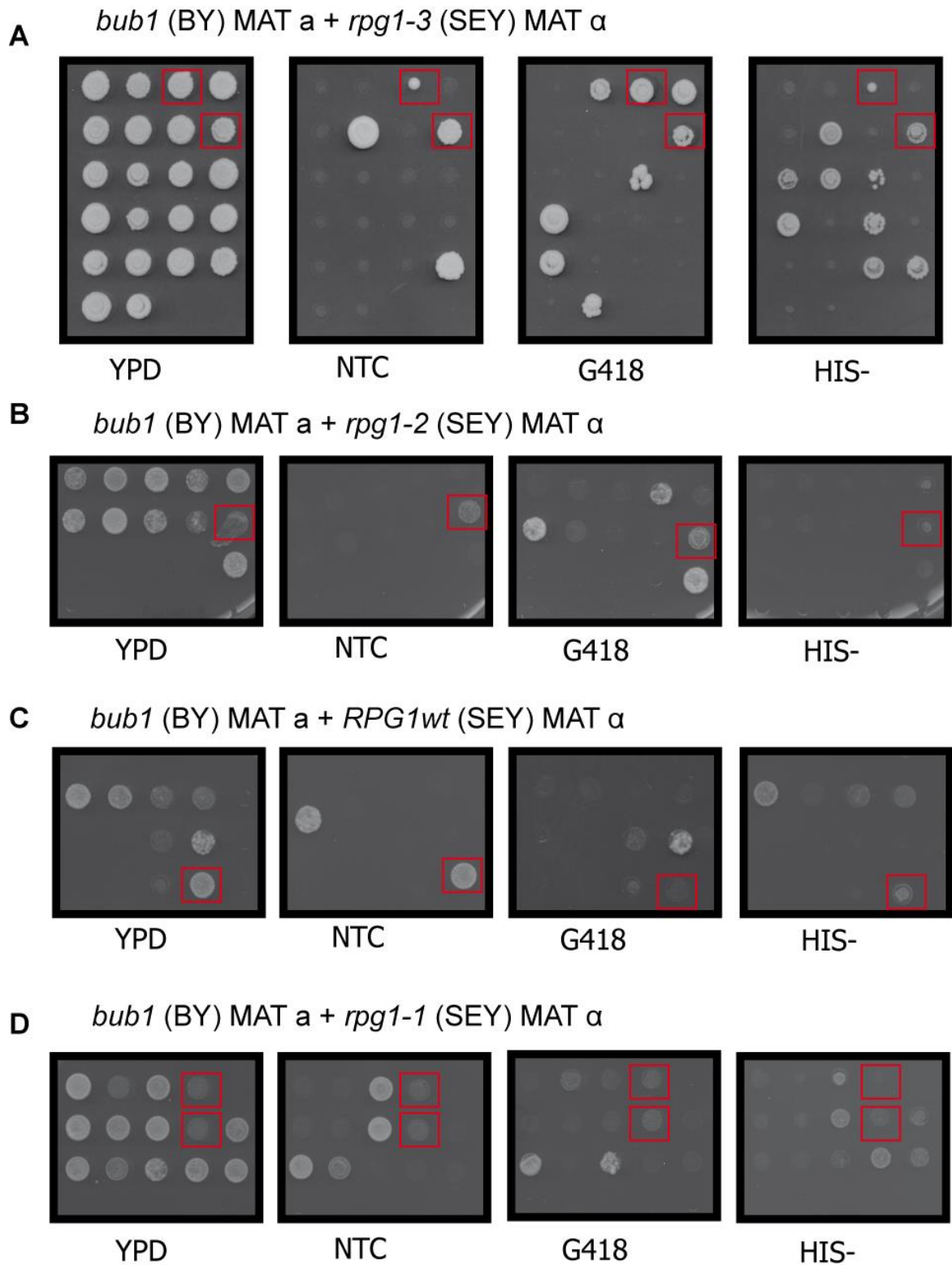
Pro zjištění možného genetického vztahu proteinů Rpg1 a Bub1 v kvasince *S. cerevisiae* jsem chtěla ověřit, zda je spojení mutantů Rpg1 a delece Bub1 letální jak bylo publikováno (van Pel2013). Abych otestovala životaschopnost spor, zkřížila jsem mutantními kmeny Rpg1 (MAT alfa) v genetickém pozadí SEY s kmenem BY4741 nesoucí delecí Bub1. Pokud by se potvrdilo, že se jedná o letální kombinaci, nevznikly by žádné spóry.

Ze sbírky kmenů naší laboratoře jsem pro křížení použila tyto konkrétní kmeny:

CRY1684	<i>SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pRPG1- GFP-C (HIS3) RPG1</i>	<i>RPG1wt</i>
CRY1682	<i>SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pLV14-GFP (HIS3) rpg1-1</i>	<i>rpg1-1</i>
CRY1680	<i>SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-4-GFP (HIS3) rpg1-3</i>	<i>rpg1-3</i>
CRY1678	<i>SEY MATα leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-GFP (HIS3) rpg1-2</i>	<i>rpg1-2</i>
CRY1971	<i>BY MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 bub1Δ::KanMX4</i>	<i>bub1Δ</i>

Křížila jsem wt divoký kmen CRY1684 (*RPG1*) MATα, a mutantní kmeny *rpg1-2* (CRY1678) MATα, (*rpg1-3* (CRY1680) MATα, CRY1682 *rpg1-1* (CRY1682) MATα, v SEY genetickém pozadí (vytvořeno Lenka Senohrábková, nepublikováno) s kmenem opačného párovacího typu *bub1Δ* (CRY1971) MATα, v BY genetickém pozadí. Po zkřížení a sporulaci diploidů jsem provedla tetrádovou analýzu. Jelikož se mi nepodařilo získat kompletní tetrádu, ani u divokého kmene, vzala jsem všechny získané spóry, nechala jsem je růst na vybraných agarových plotnách s danou selekcí

(Obr. 32). Růst spor na selekční misce s agarem bez histidinu a zároveň růst na miskách s antibiotikem nourseothricin (NTC) značil přítomnost *rpg1Δ::natNT2* kazety v genomu a fúze variant *RPG1* s GFP na plasmidu nesoucím selekční gen *HIS3*. K tomu růst na miskách s antibiotikem geneticin (G418) značil přítomnost *bub1Δ::KanMX4* kazety v genomu. Spory rostoucí na všech třech selekčních plotnách byly vybrány k dalšímu testování.



Obr. 32 Test růstu všech získaných spor na selekčních miskách. Panely (A-D) ukazují jednotlivá křížení. Kultury z vybraných spor, jsem zamrazila podle postupu, uvedeném v metodice (3.2.2) a zařadila jsem je do naší sbírky pod čísly (

CRY2204	CRY1971xCRY1680, MAT <sup>?</sup> <i>leu2- ura3- his3- bub1Δ::KanMX4 rpg1Δ:: natNT2 + pAW-4-GFP rpg1-3</i>	<i>rpg1-3 bub1Δ</i>
---------	--	---------------------



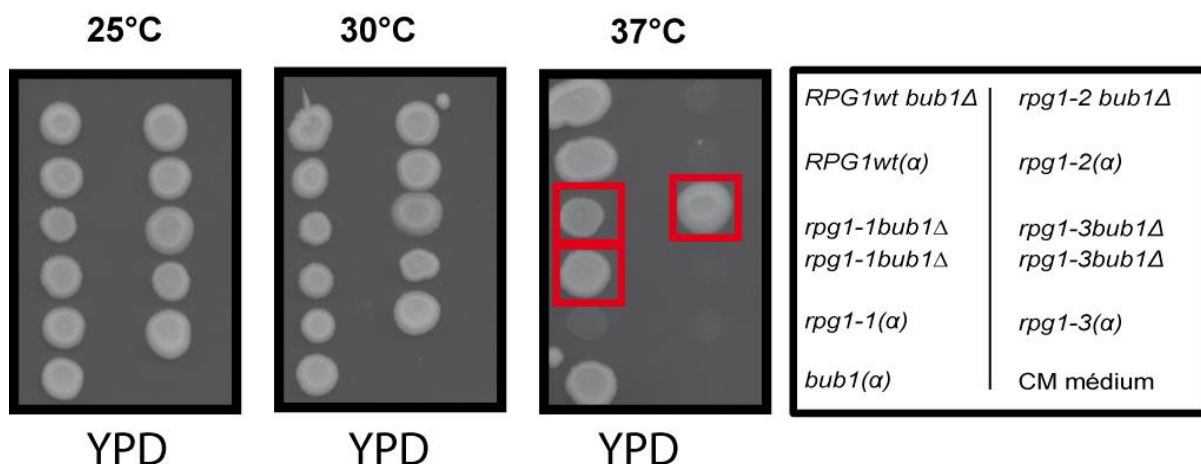
CRY2205	CRY1971xCRY1680, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 lys-bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pAW-4-GFP <i>rpg1-3</i></i>	<i>rpg1-3 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2206	CRY1971xCRY1678, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 lys-bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pAW-GFP <i>rpg1-2</i></i>	<i>rpg1-2 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2207	CRY1971xCRY1682, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 + pLV14-GFP <i>rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2208	CRY1971xCRY1682, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 + pLV14-GFP <i>rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2209	CRY1971xCRY1684, MAT $\Delta$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pRPG1 -GFP-C BUB1<math>\Delta</math>::KanMX4 <i>RPG1 wt</i></i>	<i>RPG1wt bub1<math>\Delta</math></i>

): CRY2204, CRY2205, CRY2206, CRY2207, CRY2208 a CRY 2209.

CRY2204	CRY1971xCRY1680, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pAW-4-GFP <i>rpg1-3</i></i>	<i>rpg1-3 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2205	CRY1971xCRY1680, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 lys-bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pAW-4-GFP <i>rpg1-3</i></i>	<i>rpg1-3 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2206	CRY1971xCRY1678, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 lys-bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pAW-GFP <i>rpg1-2</i></i>	<i>rpg1-2 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2207	CRY1971xCRY1682, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 + pLV14-GFP <i>rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2208	CRY1971xCRY1682, MAT $\alpha$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 bub1<math>\Delta</math>::KanMX4 + pLV14-GFP <i>rpg1-1</i></i>	<i>rpg1-1 bub1<math>\Delta</math></i>
CRY2209	CRY1971xCRY1684, MAT $\Delta$ <i>leu2- ura3- his3- trp1-<math>\Delta</math>901 rpg1<math>\Delta</math>:: natNT2 + pRPG1 -GFP-C BUB1<math>\Delta</math>::KanMX4 <i>RPG1 wt</i></i>	<i>RPG1wt bub1<math>\Delta</math></i>

Pro testování spór jsem použila tzv. spot testy. Abych zjistila, zda jsou získané spóry termosenzitivní, testovala jsem jejich růst ve třech teplotách 25°C, 30°C a 37°C (Obr. 33). Výsledek ukázal, že všechny kmeny rostou v 25°C i 30°C. Na miskách inkubovaných v 37°C narostly kontrolní kmeny – *bub1 $\Delta$*  MAT $\alpha$ , *RPG1wt* MAT $\alpha$ , dále *RPG1wt bub1 $\Delta$*  (CRY2209) a *rpg1-1 bub1 $\Delta$*  (CRY2207), *rpg1-1 bub1 $\Delta$*  (CRY2208) a *rpg1-3 bub1 $\Delta$*  (CRY2204), u kterých jsem neočekávala růst. Tyto kmeny by měly být *ts* mutanty stejně jako spóry *rpg1-3 bub1 $\Delta$*  (CRY2205), *rpg1-2 bub1 $\Delta$*  (CRY2206), což potvrzují kontrolní kmeny (*rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3*) varianty MAT $\alpha$ , u kterých jsem testem potvrdila jejich *ts* fenotyp, tzn. že nerostou v 37°C.





Obr. 33 Test termosenzitivity vybraných spór.

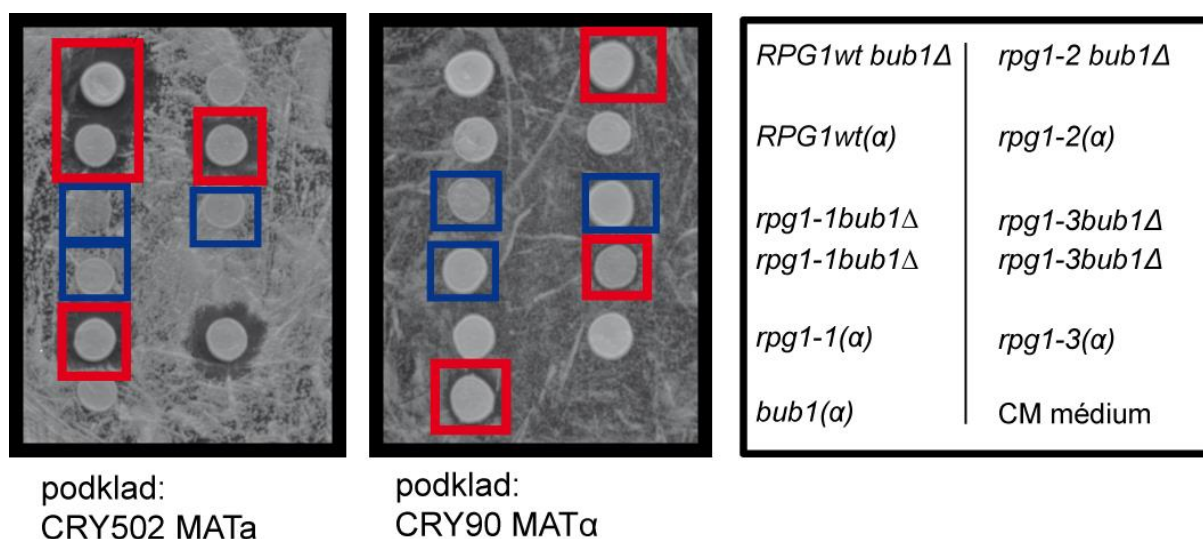
V návaznosti na test termosenzitivity, který u třech kmenů nedopadl podle očekávání, jsem chtěla určit jejich párovací typ. Ke zjištění párovacího typu jsem použila testovací kmeny párovacího typu, ve sbírce naší laboratoře označené čísly: CRY90 MAT $\alpha$ , CRY502 MAT $\alpha$ . Testování párovacího typu bylo provedeno podle protokolu uvedeného v kapitole (3.2.13).

Výsledek testu párovacích typů byl překvapivý (viz Obr. 34). Zjistila jsem, že u některých spór nebylo možné určit párovací typ. Analýzou 5 tetrád vzniklých po zkřížení *rpg1-1 a bub1Δ* jsem získala 3 spóry od každé tetrády, tzn. celkem 15 spór, z nichž 2 vyhovující. Právě u těchto spór se mi nepodařilo určit párovací typ. Při analýze 12 tetrád vzniklých zkřížením *rpg1-3 a bub1Δ* jsem získala celkem 22 spór, po 2 spórách z jedné tetrády a ve dvou případech dokonce po jedné spóře. Z nichž pouze právě tyto jednotlivé spóry (každá z jiné tetrády) použila na další testy, přičemž se u testu párovacího typu ukázalo, že u jedné nebylo možné určit párovací typ.

Z celkového počtu 4 analyzovaných tetrád vzniklých zkřížením *RPG1wt a bub1Δ* jsem získala celkem 7 spór, které jsem dále testovala. Z této tetrádové analýzy jsem nezískala ani jednu kompletní tetrádu, tzn. celkem 4 spóry. U jedné tetrády jsem získala 3 spóry, ale u ostatních 2 a méně. Po analýze 5 tetrád vzniklých zkřížením *rpg1-2 a bub1Δ* jsem získala celkem 11 spór, z toho tetrády po dvou spórách a opět jednu tetrádu se 3 spórami, z nichž jedna byla vyhovující.

Ze souhrnu výsledků jednotlivých tetrádových analýz, při kterých jsem nezískala ani jednu kompletní tetrádu, ale maximálně 3 spóry z jedné tetrády, a z výsledků určování párovacího typu se zdá, že by mohla existovat nějaká genetická interakce

mezi Rpg1 a Bub1. K ověření by bylo potřeba provést ředící řady v 25°C a ve 30°C, aby se prokázalo, zda vybrané spóry jsou schopné růst nebo ne.

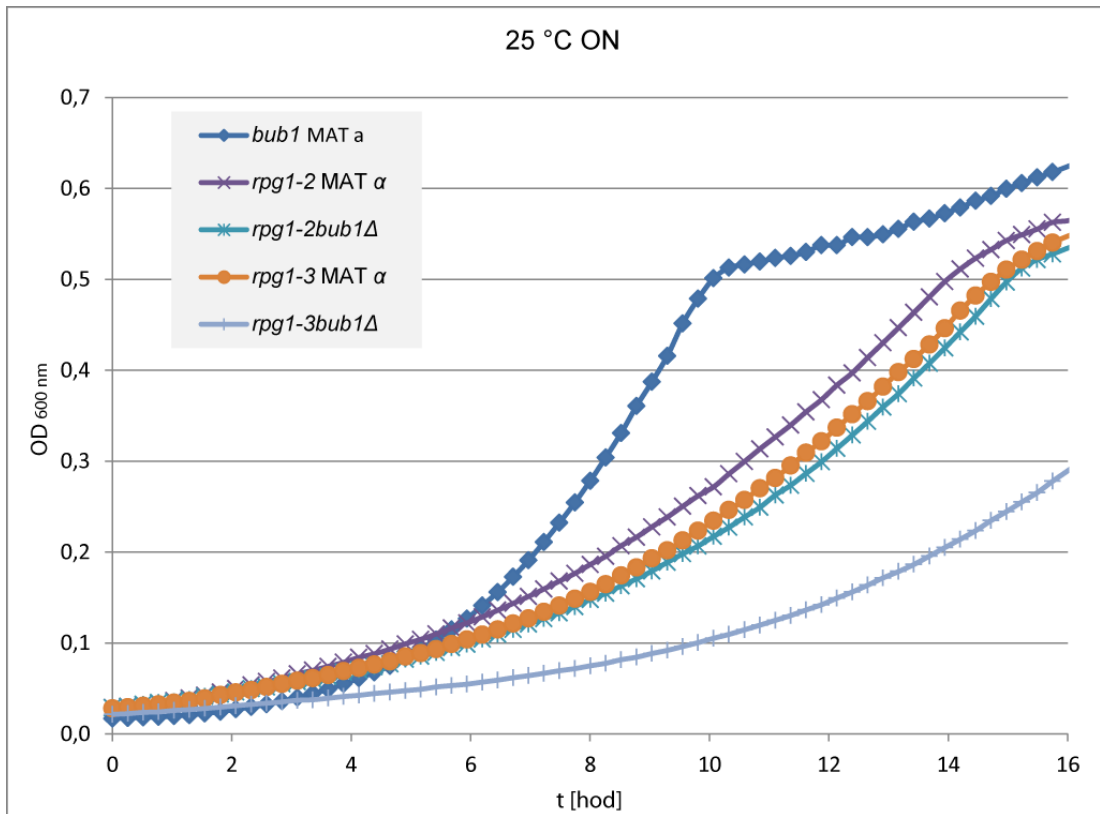


Obr. 34 Test zjišťování párovacího typu získaných spor.

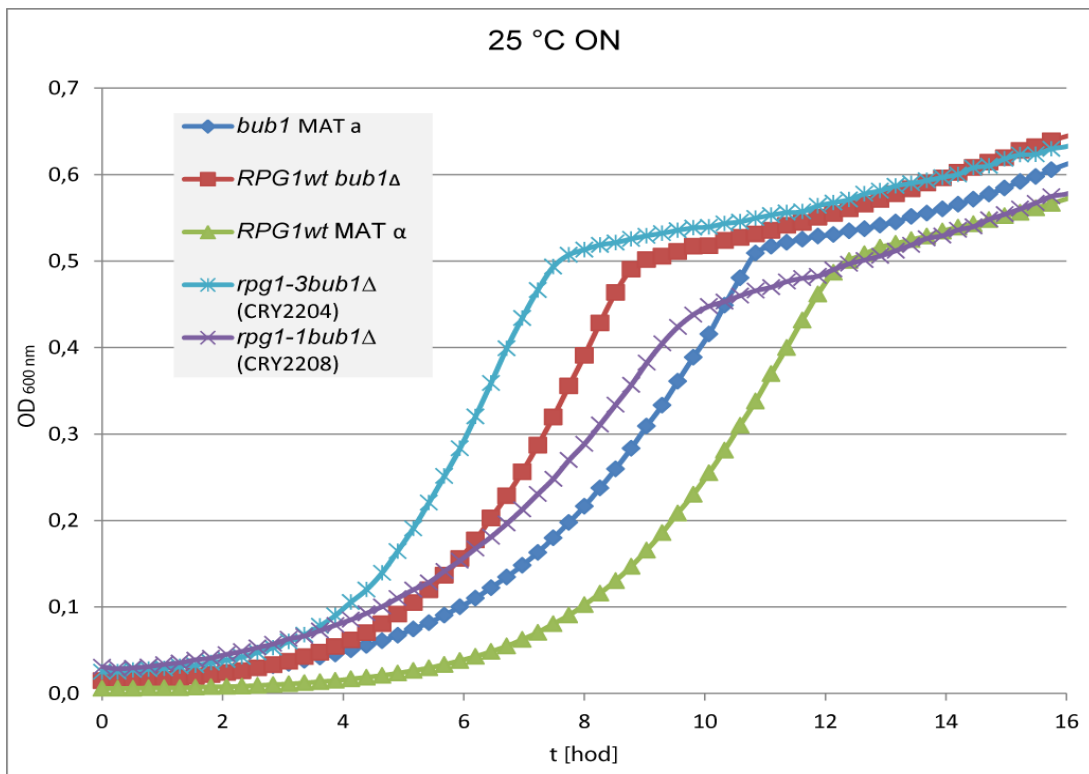
Poslední experiment, který jsem se získanými spórami stihla provést, byla analýza růstu s využitím přístroje Tecan Infinite f200PRO. Data získaná z více pokusů jsem zpracovala a vytvořila růstové křivky

Do těchto pokusů jsem zahrнула kmeny, u kterých jsem určila párovací typ a pro srovnání i kmeny *rpg1-1 bub1Δ* (CRY2208) a *rpg1-3 bub1Δ* (CRY2204), tzn. vždy jednoho zástupce bez párovacího typu vzniklého rozdílným křížením. Kmeny jsem nechala růst přes noc při teplotě 25°C.

Kolonie tvořící ve svém okolí zónu (Obr. 34) se projevují opačným párovacím typem (vylučují feromon a zastavují růst buňky opačného párovacího typu – vznik tzv. inhibiční zóny podle gradientu feromonu). Pokud na podkladu MATa (v případě CRY2209) roste kolonie a kolem sebe má zónu, její párovací typ je MATα. Stejná kolonie by neměla vytvářet zónu na podkladu se stejným párovacím typem. Naopak je tomu v případě *bub1Δ* s párovacím typem MATa. Na obrázku jsou červeně vyznačené kolonie vytvořily zóny, a tudíž byl u nich určen párovací typ. Modře jsou vyznačené kmeny, u kterých nebylo možné určit párovací typ.



Graf 9 Růstová křivka získaných spór u nichž byl zjištěn párovací typ. Jako kontrola byl použit kmen BY *bub1*Δ a mutantní kmeny SEY varianty alfa.



Graf 10 Růstová křivka získaných spór, zahrnuje kmeny u nichž nebyl zjištěn párovací typ (CRY2204) a CRY2208)

KMEN	PRŮMĚRNÁ DOBA ZDVOJENÍ [hod]
<i>bub1Δ</i>	1,8
<i>RPG1wt bub1Δ</i>	1,4
<i>rpg1-2 bub1Δ</i>	3,8
<i>rpg1-3bub1Δ</i>	4,0
<i>rpg1-3bub1Δ CRY2204</i>	1,2
<i>rpg1-1 bub1Δ CRY2208</i>	2,2
<i>RPG1wtα</i>	1,4
<i>rpg1-2 MAT α</i>	3,9
<i>rpg1-3 MAT α</i>	3,7

Tabulka 6 Průměrná doba zdvojení kříženců a rodičovských kmenů. mutantních kmenů Rpg1 a wt v SEY genetickém pozadí se značeným *TUB1*. Zdrojová data z růstové křivky viz Graf 7.

Analýza růstu získaných spór koreluje s růstem testovaných kmenů v SEY pozadí, které jsem uvedla v první části experimentální části. Jak je z grafu zřejmé, nejpomalější růst vykazuje kmen *rpg1-3 bub1Δ* (CRY2205), což potvrzuje i předchozí výsledky, kde se ukázalo, že mutant *rpg1-3* roste velmi pomalu. Kontrola *rpg1-3* v alfa variantě tento fakt jen potvrzuje. Také *rpg1-2* potvrzuje svým pomalým růstem předchozí výsledky a pomalý růst. *RPG1 wt* i jeho kříženec ukazují rychlejší růst. Výsledky získané výše uvedenými experimenty zabývající se analýzou získaných spór po zkřížení Rpg1 mutantů v SEY pozadí a v BY genetickém pozadí *bub1Δ* poukazuje na možný genetický vztah mezi Rpg1 a Bub1. Jelikož se mi nepodařilo získat ani jednu haploidní spóru zkřížením *rpg1-1* a *bub1Δ* je možné, že je tato kombinace neživotaschopná. Do budoucna by bylo dobré otestovat spóry, u nichž nebylo možné zjistit párovací typ, zda se jedná o diploidy nebo ne a zopakovat křížení *rpg1-1* a *bub1Δ*. Tyto pokusy by mohly přinést odpovědi na stále nezodpovězenou otázku.

## 6 DISKUSE

V nedávné době bylo publikováno, že kombinace delecí genů *RPG1* a *BUB1* je letální (van Pel et al. 2013). V naší laboratoři pracujeme se mutanty *Rpg1* v různých genetických pozadích (SEY, BY, W303). Zkoumali jsme, zda bude letální i kombinace jednotlivých mutantů *Rpg1* v SEY genetickém pozadí s delecí genu *BUB1*. Pro ověření životaschopnosti jsem proto připravila kmeny, které vznikly zkřížením kmenů s wt formou *Rpg1* či jednotlivými mutanty *rpg1-1*, *rpg1-2*, *rpg1-3* v SEY genetickém pozadí s kmenem nesoucím delecí genu *BUB1* v BY genetickém pozadí. Ze souhrnu výsledků jednotlivých tetradových analýz, při kterých jsem nezískala ani jednu kompletní tetradu a to ani u wt formy *Rpg1* lze usuzovat, že se jedná o syntetický defekt mutace v genu *RPG1* a delece genu *BUB1*.

Další nejasným faktem byl vznik kříženců, u kterých nebylo možné určit párovací typ. Nevykazovaly žádný párovací typ, tedy nebylo jej možné určit. Zjistila jsem, že u některých spór (*rpg1-1 bub1Δ*) a (*rpg1-3 bub1Δ*) nebylo možné určit párovací typ. Tento fakt by mohly ozřejmit dvě hypotézy:

- 1) Spóra, u níž nebylo možné určit párovací typ, by mohla být diploidní buňkou.
- 2) Při sporulaci mohlo dojít k chybné segregaci chromosomů nebo vzniku aneuploidií. Pokud by tedy chyběl nebo byl poškozený chromosom, na kterém je gen kódující feromony, může být taková spóra haploidní, avšak nebude vykazovat párovací typ (kolonie tvořící ve svém okolí zóny se projevují opačným párovacím typem, tj. vylučují vlastní feromon a zastavují růst buňky opačného párovacího typu – vznik tzv. inhibiční zóny podle gradientu feromonu). Jelikož testování párovacího typu je založeno na gradientu feromonu, nelze v případě buněk bez feromonů určit párovací typ. Růstové analýzy ukázaly neobvykle rychlý růst při 25°C u spór, u nichž nebylo možné určit párovací typ. Jejich doba zdvojení byla mnohem kratší (1,2-2,2h) než ostatních kříženců (3,8-4 h) a dokonce rostly srovnatelně či rychleji než wt forma *Rpg1*. Tento fakt, by mohl být přispět k hypotéze č. 2, která se přiklání ke vzniku diploidů. Ovšem pro to, abychom si byli jistí, zda je tato hypotéza možná, bylo by nutno provést FACS analýzy, které by ukázaly, zda obsah DNA v těchto buňkách odpovídá diploidním buňkám či ne. Jelikož se mi nepodařilo získat ani jednu kompletní tetradu ani u křížení wt *Rpg1*, je tedy zřejmé, že dochází k nějaké interakci

mezi Bub1 a Rpg1. Pro potvrzení syntetického defektu v růstu či syntetické letality by bylo dále zapotřebí provést analýzy růstu v ředících řadách ve 25°C a ve 30°C, aby bylo možné vidět snížený růst potvrzující syntetický růstový defekt či letalitu.

Při charakterizaci *rpg1-2* a *rpg1-3* mutantů jsem chtěla ověřit, že i tyto mutanti vykazují terminální fenotyp po inkubaci v nepermissivních podmínkách (37°C, 4 hodiny), který byl popsán u *rpg1-1* ve W303 genetickém pozadí jako zastavení buněk v G1 fázi buněčného cyklu (Kovarik et al. 1998). Takto zastavené buňky byly velikostně stejné a měly dokončené jaderné dělení, tzn. že každá buňka (mateřská i dceřiná) obsahovala jedno jádro, avšak nebyly od sebe fyzicky oddělené. Neoddělené dvojice buněk (dublety) bylo od sebe možné oddělit až po působení enzymu zymolyázy (štěpí buněčnou stěnu kvasinky) či mírnou sonikací (Kovarik et al., 1998). Výsledky obou analýz byly překvapivé a ukázaly, že mutantní kmeny *rpg1-2* a *rpg1-3*, ale ani kmen *rpg1-1* buď v SEY či v BY genetickém pozadí, nevykazují terminální fenotyp ani po čtyřhodinové inkubaci v 37°C. Tento fakt je možné vysvětlit různě: jedním z vysvětlení by mohlo být, že Rpg1 mutantní kmeny SEY a BY jsou do W303 genetického pozadí jinak vytvořené. V BY a SEY genetickém pozadí jsou plasmidové verze na rozdíl od mutantů v pozadí W303, do kterých byl mutovaný gen *RPG1* integrován. Kromě tohoto bylo v naší laboratoři zjištěno, že v případě dříve zveřejněného mutantu *rpg1-1* v genetickém pozadí W303, který byl vytvořen náhodnou hydroxylaminovou mutagenezí v C – terminální části molekuly genu *RPG1* (podrobněji uvedeno na začátku kapitoly) nedošlo k úplnému odstranění původního genu *RPG1* jeho část *RPG1* tam zůstala (osobní sdělení Ivana Malcová, nepublikováno), což naznačuje vysvětlení odlišného chování tohoto mutantu v porovnání s ostatními v různých genetických pozadích. Mé výsledky ale potvrdily, že mutanti *rpg1-1*, *rpg1-2* a *rpg1-3* v genetických pozadích SEY a BY jsou skutečně teplotně sensitivní a tudíž nerostou ve 37°C (nepermissivních podmínkách) jak bylo dříve publikováno pro *rpg1-1* v genetickém pozadí W303 (Kovarik et al. 1998). Obecně lze říci, že některé teplotně-sensitivní (ts) mohou vykazovat fenotyp pomalého růstu ve 37°C (slow growth phenotype) (Khoshnevis et al. 2014b). V případě mutantů Rpg1 v SEY a BY genetickém pozadí jsem však tento fenotyp nepotvrdila.

Vzhledem k publikovaným datům o asociaci Rpg1 proteinu s mikrotubuly (Hasek et al. 2000) jsem dále plánovala ověřit, zda mutace v molekule Rpg1

neovlivňují integritu a funkčnost mikrotubulů v kvasinkové buňce. V tomto směru jsou zajímavé mé výsledky nokodazolových experimentů, kdy byla použita koncentrace nokodazolu (50 µg/ml). Už po 2 hodinách inkubace bylo vidět, že MT repolymerizují, což by mohlo naznačovat na „slippage“ (obcházení) mitotického kontrolního bodu. V podobném obházení mitotického kontrolního bodu by mohl důležitou roli hrát nespecifický regulátor Cdc5 polo kináza, která iniciuje výstup Cdc14 fosfatázy z jadérka (Visintin et al. 2003). Aktivovaná Cdc14 spouští proteolýzu cyklinu b a výstup z mitózy (Visintin et al. 1998). V kvasinkových buňkách inhibiční fosforylace cyklinu B/Cdks podporuje urychlení adaptace na prodlouženou aktivaci SAC kontrolního bodu (Minshull et al. 1996). U pučící kvasinky byla zjištěna role chromatin remodelujícího komplexu (RSC) v mitotickém exitu a adaptaci k SAC. Rsc2 reguluje funkci Cdc5 polo kinázy za podmínek aktivovaného SACu, ale nezávisle na komponentech SACu. Tento fakt propojuje strukturu chromatinu s regulací mitotického exitu a vysvětluje obejití („slippage“) SACu.

V experimentech, kdy jsem sledovala vliv Rpg1 mutantů na uspořádání mikrotubulů po působení nokodazolu (použitá koncentrace 15 µg/ml) se ukázalo, že Rpg1 mutanti inkubované ve 37°C (nepermissivních podmínkách) po odmytí nokodazolu od buněk mají snahu uspořádat MT, avšak v porovnání s permissivními podmínkami, kde nemají tento problém, lze shrnout, že Rpg1 mutace výrazně neovlivňuje uspořádání mikrotubulů, ale spíše uvolňování do anafáze a ukončení mitózy. Což potvrzují i polysomové profily prováděné v naší laboratoři, které prokázaly, že mutanti *rpg1-1* a *rpg1-3* po 4 hodinové inkubaci ve 37°C mají výrazně sníženou translaci ve srovnání s wt Rpg1 (osobní sdělení Lenka Senohrábková, nepublikováno)

V *S. cerevisiae* bylo prokázáno, že není v průběhu mitózy ani cytokineze vyžadována transkripce (Pringle, konference Frankfurt 2013). Avšak na druhou stranu bylo zjištěno, že buňky ošetřené cykloheximidem (inhibitorem elongace translace) v metafázi či anafázi, nemohly vystoupit z mitózy. Podobný efekt byl pozorován u mutantu translačního iniciačního faktoru eIF3b/Prt1, (*prt1-1*). Tyto fakta naznačují, že dochází k iniciaci translace v průběhu mitózy avšak mechanismem na čepičce-nezávislé translaci, neboť mutace na čepičku vázajícího se proteinu eIF4E nevedla k zastavení mitózy. (Pringle, konference Frankfurt 2013). Naše výsledky

společně s výsledky z laboratoře Dr. Pringla naznačují, že na čepičce nezávislá translace je zřejmě nezbytná pro zdárné ukončení mitózy a cytokineze.



## 7 ZÁVĚR

- Bylo zjištěno, že doposud nepublikované mutanty *rpg1-2* a *rpg1-3* stejně jako již publikovaný mutant *rpg1-1* jsou pravé *ts* mutanty a nerostou ve 37°C ani po delší inkubaci.
- Bylo zjištěno, že na rozdíl od genetického pozadí W303, v pozadí BY a SEY ani *rpg1-1* ani *rpg1-2* a *rpg1-3* nemají v nepermissivních podmínkách tzv. terminální fenotyp - zastavení v G1 fázi buněčného cyklu, ale podle FACS analýzy a mikroskopických pozorování zastaví v jakékoliv fázi cyklu.
- Bylo zjištěno, že všechny analyzované mutované kmeny Rpg1 nevykazují zvýšenou citlivost k benomylu ve srovnání s nemutovaným kmenem, což naznačuje, že pozorovatelně neovlivňují funkčnost mikrotubulárního systému.
- Bylo zjištěno, že mutantní formy Rpg1 výrazně neovlivňují znovuspořádání mikrotubulů po jejich depolymeraci nokodazolem, ale spíše uvolnění do anafáze a ukončení mitózy. To ukazuje na nezbytnost fungování Rpg1 a potažmo translace pro zdárný průběh ukončení mitózy v kvasinkové buňce.
- Bylo zjištěno, že kombinací delece genu *BUB1* a mutantů *RPG1* vzniká syntetický růstový defekt až syntetická letalita, což zdůrazňuje důležitost translace pro rozhodující fáze buněčného dělení.

## 8 SEZNAM LITERATURY

- Algire, M.A., Maag, D. & Lorsch, J.R., 2005. Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Molecular cell*, 20(2), pp.251–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246727> [Accessed May 27, 2014].
- Asano, K. et al., 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & development*, 14(19), pp.2534–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316978&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Asano, K. et al., 1998. Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(29), pp.18573–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660829> [Accessed May 27, 2014].
- Bernard, P., Hardwick, K. & Javerzat, J.P., 1998. Fission yeast *bub1* is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *The Journal of cell biology*, 143(7), pp.1775–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2175213&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 24, 2014].
- Cahill, D.P. et al., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392(6673), pp.300–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521327> [Accessed July 19, 2014].
- Damoc, E. et al., 2007. Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6(7), pp.1135–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322308> [Accessed May 27, 2014].

- Dennis, M.D., Person, M.D. & Browning, K.S., 2009. Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components. *The Journal of biological chemistry*, 284(31), pp.20615–28. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2742826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Elantak, L. et al., 2010. The indispensable N-terminal half of eIF3j/HCR1 cooperates with its structurally conserved binding partner eIF3b/PRT1-RRM and with eIF1A in stringent AUG selection. *Journal of molecular biology*, 396(4), pp.1097–116. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2824034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M.W., 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Molecular cell*, 2(2), pp.163–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734353> [Accessed August 13, 2014].
- Farr, K.A. & Hoyt, M.A., 1998. Bub1p kinase activates the *Saccharomyces cerevisiae* spindle assembly checkpoint. *Molecular and cellular biology*, 18(5), pp.2738–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 5, 2014].
- Foley, E. a & Kapoor, T.M., 2013. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(1), pp.25–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3762224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 13, 2014].
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L. & Davis, R.J., 1991. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *The Journal of*

- biological chemistry*, 266(33), pp.22159–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939237> [Accessed August 13, 2014].
- Hasek, J. et al., 2000. Rpg1p, the subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* eIF3 core complex, is a microtubule-interacting protein. *Cell motility and the cytoskeleton*, 45(3), pp.235–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706778> [Accessed July 14, 2014].
- Himmler, A. et al., 1989. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Molecular and cellular biology*, 9(4), pp.1381–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=362554&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 25, 2014].
- Hinnebusch, A.G., 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in biochemical sciences*, 31(10), pp.553–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920360> [Accessed May 26, 2014].
- Hinnebusch, A.G. et al., 2004. Study of translational control of eukaryotic gene expression using yeast. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038, pp.60–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838098> [Accessed August 13, 2014].
- Howell, B.J. et al., 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Current biology: CB*, 14(11), pp.953–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182668> [Accessed August 13, 2014].
- Hoyt, M.A., Totis, L. & Roberts, B.T., 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 66(3), pp.507–517. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867481900143> [Accessed July 5, 2014].

- Cheeseman, I.M. et al., 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, 127(5), pp.983–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129783> [Accessed July 16, 2014].
- Chiu, W.-L. et al., 2010. The C-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) promotes mRNA recruitment, scanning, and, together with eIF3j and the eIF3b RNA recognition motif, selection of AUG start codons. *Molecular and cellular biology*, 30(18), pp.4415–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2014].
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. & Pestova, T. V, 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), pp.113–27. Available at: <http://d360prx.biomed.cas.cz:2062/nrm/journal/v11/n2/full/nrm2838.html> [Accessed May 26, 2014].
- Jacobs, C.W. et al., 1988. *Saccharomyces cerevisiae*. , 107(October), pp.1409–1426.
- Khoshnevis, S. et al., 2014a. Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes. *Nucleic acids research*, 42(6), pp.4123–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2014].
- Khoshnevis, S. et al., 2014b. Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes. *Nucleic acids research*, 42(6), pp.4123–39. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/42/6/4123> [Accessed July 15, 2014].
- Kline-Smith, S.L. & Walczak, C.E., 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular cell*, 15(3), pp.317–27. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276504004186> [Accessed July 10, 2014].

- Kouba, T. et al., 2012. The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic acids research*, 40(6), pp.2683–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3315329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2014].
- Kovarik, P. et al., 1998. RPG1: an essential gene of *saccharomyces cerevisiae* encoding a 110-kDa protein required for passage through the G1 phase. *Current genetics*, 33(2), pp.100–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506897>.
- Lewis, S.A., Wang, D.H. & Cowan, N.J., 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4880), pp.936–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3142041> [Accessed August 13, 2014].
- Li, R. & Murray, A.W., 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, 66(3), pp.519–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651172> [Accessed August 13, 2014].
- London, N. & Biggins, S., 2014. Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes & development*, 28(2), pp.140–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402315> [Accessed July 15, 2014].
- Luo, X. et al., 2002. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Molecular cell*, 9(1), pp.59–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804586> [Accessed August 13, 2014].
- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A. & Maitra, U., 2003. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), pp.6580–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493757> [Accessed August 13, 2014].

- Marschall, L.G. et al., 1996. Analysis of Tub4p, a yeast gamma-tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function. *The Journal of cell biology*, 134(2), pp.443–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2014].
- Maytal-Kivity, V. et al., 2003. The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(5), pp.706–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672462> [Accessed July 23, 2014].
- Minshull, J. et al., 1996. Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast. *Current biology: CB*, 6(12), pp.1609–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994825> [Accessed August 14, 2014].
- Morris, P.G. & Fornier, M.N., 2008. Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(22), pp.7167–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010832> [Accessed August 13, 2014].
- Moyle, M.W. et al., 2014. A Bub1-Mad1 interaction targets the Mad1-Mad2 complex to unattached kinetochores to initiate the spindle checkpoint. *The Journal of cell biology*, 204(5), pp.647–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567362> [Accessed July 15, 2014].
- Munzarová, V. et al., 2011. Translation reinitiation relies on the interaction between eIF3a/TIF32 and progressively folded cis-acting mRNA elements preceding short uORFs. *PLoS genetics*, 7(7), p.e1002137. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2014].
- Neff, N.F. et al., 1983. Isolation of the beta-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. *Cell*, 33(1), pp.211–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6380751> [Accessed July 25, 2014].

- Nielsen, K.H. et al., 2004. Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *The EMBO journal*, 23(5), pp.1166–77. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=380973&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2014].
- Ouyang, B. et al., 1998. Human Bub1: a putative spindle checkpoint kinase closely linked to cell proliferation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 9(10), pp.877–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790499> [Accessed July 24, 2014].
- Palecek, J., Hasek, J. & Ruis, H., 2001. Rpg1p/Tif32p, a subunit of translation initiation factor 3, interacts with actin-associated protein Sla2p. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(5), pp.1244–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11302750> [Accessed July 14, 2014].
- Van Pel, D.M. et al., 2013. *Saccharomyces cerevisiae* genetics predicts candidate therapeutic genetic interactions at the mammalian replication fork. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(2), pp.273–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3564987&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2014].
- Phan, L. et al., 1998. Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Molecular and cellular biology*, 18(8), pp.4935–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109077&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Roberts, B.T., Farr, K.A. & Hoyt, M.A., 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 14(12), pp.8282–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=359367&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 24, 2014].



- Shalev, A. et al., 2001. Saccharomyces cerevisiae protein Pci8p and human protein eIF3e/Int-6 interact with the eIF3 core complex by binding to cognate eIF3b subunits. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), pp.34948–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457827> [Accessed August 13, 2014].
- Shaw, S.L. et al., 1997. Astral microtubule dynamics in yeast: a microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud. *The Journal of cell biology*, 139(4), pp.985–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2139970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schatz, P.J., Solomon, F. & Botstein, D., 1986. Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Molecular and cellular biology*, 6(11), pp.3722–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=367133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 25, 2014].
- Sobel, S.G. & Snyder, M., 1995. A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of cell biology*, 131(6 Pt 2), pp.1775–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2014].
- Sokabe, M., Fraser, C.S. & Hershey, J.W.B., 2012. The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNA<sub>i</sub> binding to the 40S ribosomal subunit. *Nucleic acids research*, 40(2), pp.905–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3258154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), pp.731–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3610329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 23, 2014].

- Spang, A. et al., 1996. gamma-Tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *The Journal of cell biology*, 134(2), pp.429–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2014].
- Stearns, T., 1990. The yeast microtubule cytoskeleton: genetic approaches to structure and function. *Cell motility and the cytoskeleton*, 15(1), pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2403845> [Accessed July 10, 2014].
- Sudakin, V., Chan, G.K. & Yen, T.J., 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*, 154(5), pp.925–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2196190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2014].
- Szamecz, B. et al., 2008. eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA. *Genes & development*, 22(17), pp.2414–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2532924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 4, 2014].
- Taylor, S.S. & McKeon, F., 1997. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, 89(5), pp.727–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182760> [Accessed July 24, 2014].
- Valasek, L. et al., 1998. Rpg1, the *Saccharomyces cerevisiae* Homologue of the Largest Subunit of Mammalian Translation Initiation Factor 3, Is Required for Translational Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), pp.21253–21260. Available at: <http://www.jbc.org/content/273/33/21253> [Accessed July 14, 2014].

- Valásek, L., Hasek, J., et al., 2001. Dual function of eIF3j/Hcr1p in processing 20 S pre-rRNA and translation initiation. *The Journal of biological chemistry*, 276(46), pp.43351–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560931> [Accessed July 23, 2014].
- Valásek, L., Phan, L., et al., 2001. Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding. *The EMBO journal*, 20(4), pp.891–904. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145407&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2014].
- Valásek, L. et al., 2003. The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes & development*, 17(6), pp.786–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=196014&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2014].
- Valásek, L., Nielsen, K.H. & Hinnebusch, A.G., 2002. Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5886–98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=131060&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2014].
- Vavricková, P. et al., 1998. A new monoclonal antibody against p34 CDC28. *Folia biologica*, 44(1), pp.33–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10730873> [Accessed July 22, 2014].
- Visintin, R. et al., 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular cell*, 2(6), pp.709–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885559> [Accessed August 14, 2014].
- Visintin, R., Stegmeier, F. & Amon, A., 2003. The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Molecular biology of the cell*, 14(11), pp.4486–98. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=266767&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed August 14, 2014].

Wang, Y et al., 1995. Checkpoint genes required to delay cell division in response to nocodazole respond to impaired kinetochore function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Checkpoint Genes Required To Delay Cell Division in Response to Nocodazole Respond to Impaired Kine.