

Dávam zvoľenie k zapožičaniu svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný náležite odciťovať.

Univerzita Karlova v Prahe

Prírodovedecká fakulta

Štúdijný program: Biológia

Štúdijský obor: Mikrobiológia



Bc. Veronika Očková

Kompetícia buniek v populáciách kvasinkových kolónií

Competition of cells within the population of yeast colony

Diplomová práca

Vedúci záverečnej práce: RNDr. Libuše Váchová 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. 08. 2014

Podpis

Pod'akovanie

Táto práca bola vypracovaná pod vedením RNDr. Libuše Váchovej, CSc., ktorej by som týmto chcela pod'akovať za odborné rady, pripomienky a prívetivý prístup po celú dobu mojej práce. Pod'akovanie patrí aj Prof. RNDr. Zdene Palkovej, CSc. za pomoc pri riešení mnohých problémov.

Ďalej sa chcem pod'akovať všetkým kolegom z Laboratória bunkovej biológie za ochotu a vytvorenie príjemného pracovného prostredia. Menovite RNDr. Stanislave Rešetárovej PhD., Ing. Otakarovi Hlaváčkovi PhD., Mgr. Marcele Hejlovej a Alexandre Pokornej za praktické rady a pomoc pri zvládaní metodík použitých v tejto práci.

Nakoniec by som rada pod'akovala mojej rodine a Tomášovi, za ich podporu počas celej doby môjho štúdia.

Táto práca bola finančne krytá grantovým projektom GAČR 13-08605S.

Abstrakt

Kompetícia je veľmi významný prírodný jav, pri ktorom dochádza k súpereniu organizmov v prípadoch, ako je obmedzenie priestoru či nedostatok živín. Nastáva hlavne v prípadoch keď organizmy, vrátane mikroorganizmov žijú v početných populáciách. K takýmto populáciám sa radia aj mnohobunkové kvasinkové kolónie, ktoré vytvára *Saccharomyces cerevisiae*. V okamihu, keď populácia kvasinkových buniek vyčerpá živiny z okolia, sú bunky v kolóniách schopné reagovať na tieto zmeny produkciou signálnych molekúl amoniaku. Vďaka jeho produkcii sú bunky schopné zmeniť svoju morfológiu a metabolizmus a v závislosti na umiestnení v kolónii vytvoriť subpopuláciu buniek so špecifickými vlastnosťami a rozdielnou funkciou.

Je pravdepodobné, že v prípade zmiešaných kolónií tvorených dvoma kmeňmi, môže medzi bunkami týchto kmeňov dochádzať ku kompetičnej rivalite, a tým môže dôjsť k zmene pomeru buniek oboch kmeňov v populácii kolónie, takže nakoniec počet buniek jedného kmeňa preváži nad druhým.

V tejto práci som porovnávala rast a vývoj gigantických kolónií a kompetíciu medzi bunkami vybraných dvojíc kmeňov tvoriacich takúto zmiešanú kolóniu. Vychádzala som z rodičovského kmeňa kvasinky *S. cerevisiae* BY a jeho variant značených fluorescenčnými proteínmi. Pre štúdium kompetície medzi rodičovským kmeňom a kmeňom neschopným produkovať transkripčný faktor Sok2p, ktorý výrazne ovplyvňuje vývoj a diferenciáciu kolónie, boli deléciou génu *SOK2* v značených rodičovských kmeňoch vytvorené nové kmene sok2Δ. Ako marker pre odlišenie buniek dvoch kmeňov tvoriacich zmiešanú kolóniu som použila ich rozdielnu citlivosť voči antibiotikám nourseothricínu a kanamycínu. Potvrdila som, že neschopnosť buniek syntetizovať Sok2p tieto bunky znevýhodnila, v prípade, že vytvárali gigantickú kolóniu s rodičovským kmeňom, ktorý Sok2p produkuje. Podľa predpokladu, pokiaľ zmiešanú kolóniu tvorili dve skutočne izogénne varianty rodičovského kmeňa, ku kompetícii nedochádzalo. Ukázalo sa, že niektoré výsledky týkajúce sa kompetície buniek v populácii kolónie ovplyvnila nehomogenita buniek v konzervách používaných kmeňov.

Kľúčové slová: *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolónia, signalizácia amoniakom, diferenciácia a kompetícia buniek v kolónii, rast, fluorescenčný proteín, rezistencia k antibiotikám

Abstract

Competition is a very important natural phenomenon, which causes the rivalry of organisms, in cases such as space limitation or lack of nutrients. It occurs mainly in situations where organisms, including microorganisms live in large populations. Multicellular yeast colonies represent an example of such a population. After the population of yeast cells spends nutrients from the environment, the cells in colonies are able to respond to these changes by production of ammonia functioning as a signaling molecule. Subsequently, the cells are able to change their morphology and metabolism and, dependently on their location within the colony, to create a subpopulation of cells with specific characteristics and functions.

It is likely that in the case of mixed colonies formed by the two different strains, a competition between the cells of these two strains could exist. Such rivalry can result in changes in the ratio of cells of the two strains within the colony population, so that the cells of one strain outweigh the other.

In this diploma thesis, I compared the growth and development of giant colonies and competition between the cells of selected pairs of strains forming mixed colonies. I focused on the parental strain *Saccharomyces cerevisiae* BY and its variants labeled with fluorescent proteins. For the study of competition between the parental strain and the strain deficient in Sok2p transcription factor (i.e., the factor that significantly influences the development and differentiation of colonies), new strains sok2 Δ were prepared by *SOK2* gene deletion in labeled parental strains. As markers distinguishing two strains forming a mixed colony, I used different sensitivity of these strains to antibiotics kanamycin and nourseothricin. I confirmed that the inability of cells to synthesize Sok2p is a disadvantage for these cells when forming mixed giant colonies together with the parental strain producing Sok2p. As supposed, when mixed colony consisted of the two isogenic labeled variants of the parental strain, no competition occurred. Some of the results showed that competition of cells within populations can be affected by inhomogeneity of cell strains in stocks.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, a yeast colony, ammonia signaling, cell differentiation and competition in the colony, growth, fluorescent protein, antibiotic resistance

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CIELE PRÁCE	11
3	LITERÁRNY PREHĽAD	12
3.1	Mnohobunkové spoločenstvá mikroorganizmov	12
3.1.1	Biofilmy.....	13
3.1.2	Kvasinkové kolónie	14
3.1.2.1	Signalizácia v populáciách kvasiniek Quorum sensing.....	15
3.1.2.2	Signalizácia buniek v kolóniách amoniakom.....	16
3.1.2.3	Prestavba metabolizmu.....	17
3.1.2.4	Ato transportéry.....	18
3.1.2.5	Sok2 transkripčný faktor	19
3.1.2.6	Horizontálna diferenciácia buniek v kolóniách.....	20
3.1.2.7	Vertikálna diferenciácia buniek v kolóniách.....	21
3.1.2.8	Sporulácia.....	23
3.2	Kompetícia mikroorganizmov.....	23
3.2.1	Rozdelenie kompetície	24
3.2.2	Produkcia antibiotík ako druh stresovej odpovede.....	25
4	MATERIÁL A METÓDY.....	26
4.1	Materiál	26
4.1.1	Použité mikroorganizmy:	26
4.1.2	Použité médiá	27
4.1.3	Pufry a roztoky	28
4.1.4	Inhibitory proteáz	30
4.1.5	Gély	30
4.1.6	Antibiotiká.....	31
4.1.7	Materiál pre prácu s DNA	31
4.1.8	Prístroje.....	34
4.2	Metódy	35
4.2.1	Sterilizácia	35
4.2.2	Gigantické kolónie.....	35
4.2.3	Výsevy a selekcia buniek	36
4.2.4	Stanovenie počtu kolónií na miske.....	36

4.2.5	Pozorovanie a fotografovanie mikroskopických preparátov	37
4.2.6	Príprava lyzátov buniek a stanovenie bielkovín	37
4.2.7	SDS PAGE Elektroforéza	38
4.2.8	Western blot	38
4.2.9	Imunodekcia GFP	38
4.2.10	Transformácia	38
5	VÝSLEDKY	41
5.1	Vývoj zmiešaných gigantických kolónií – 1. časť - Kompetícia 2 vybraných kmeňov	41
5.1.1	Spôsob detekcie podielu jednotlivých kmeňov v zmiešanej kolónii	41
5.1.2	Vývoj gigantických kolónií a kompetícia buniek v zmiešaných kolóniách BY a sok2Δ	44
5.1.3	Výber vhodného rodičovského kmeňa pre štúdium kompetície s delečnými kmeňmi	50
5.1.4	Porovnanie samostatného rastu kmeňov BY, BY-P _{TEF1} -GFP a BY- P _{TEF1} -dsRED	53
5.2	Vývoj zmiešaných gigantických kolónií – 2. časť	55
5.2.1	Príprava nových klonov kvasinkových kmeňov značených fluorescenčným proteínom	55
5.2.2	Overenie vlastností nových klonov a porovnanie s rodičom BY ^{new}	61
5.2.3	Vývoj kontrolných gigantických kolónií tvorených zmesou buniek BY ^{new} a nových klonov BY-P _{TEF1} -GFP ^{his} a BY-P _{TEF1} -dsRED ^{his}	64
5.2.4	Príprava nových klonov kvasinkových kmeňov s deletovaným génom <i>SOK2</i>	68
5.2.5	Vývoj zmiešaných kolónií tvorených zmesou buniek BY ^{new} a nových klonov kmeňov s deléciou génu <i>SOK2</i>	71
6	DISKUSIA	75
7	ZÁVER.....	80
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	81

Zoznam použitých skratiek:

BKP - brómkrezolová purpur

DsRed - červený fluorescenčný proteín

FP - fluorescenčný proteín

G418 - geneticín (kanamycín)

GFP - zelený fluorescenčný proteín

GM - glycerolové médium

MES - 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

PBS - Phosphate buffered saline

PCR - polymerazová reťazová reakcia

ROS - reaktívne formy kyslíka

ssDNA - jednoreťazcová DNA

SDS-PAGE - polyakrylamidová gélová elektroforéza v prítomnosti dodecylsulfátu sodného

TBE - Tris-borát-EDTA

TEMED - tetramethyl-ethylen-diamin

TGM - Tris-glycin-methanol

YEPG - kvasničný autolyzát - peptón - glukóza

YPD - kvasničný autolyzát - peptón - glukóza

1 Úvod

Jednobunkový mikroorganizmus kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* sa stala vďaka svojím vlastnostiam výborným modelom pre štúdium základných bunkových procesov prebiehajúcich v eukaryotických bunkách vrátane cicavčích buniek, ako sú napr. priebeh a regulácia bunkového cyklu, autofágia a pod.

Napriek tomu, že sú jednobunkové organizmy, v prírode mikroorganizmy vrátane kvasiniek dávajú prednosť mnohobunkovému spôsobu života. Získavajú tým mnohé unikátne vlastnosti, ktoré pri jednobunkovom spôsobe života postrádajú, a ktoré im zabezpečujú väčšiu šancu na prežitie v neustále sa meniacom ekosystéme. Medzi mnohobunkové štruktúry tvorené kvasinkami sa radia biofilmy a kolónie. Kvasinkové biofilmy sú častým zdrojom problémov v zdravotníckych zariadeniach. Ako príklady môžu byť uvedené biofilmy tvorené patogénnymi kvasinkami *Candida albicans* či *Cryptococcus neoformans*, ktoré bývajú častými zdrojmi pretrvávajúcich infekcií, nakoľko sa vyznačujú vysokou rezistenciou voči antimikrobiálnym látkam. Kvasinkové bunky sú v kolóniách rovnako ako v biofilmoch zložito usporiadané, komunikujú spolu a vzájomne sa ovplyvňujú, čo z nich robí významný model pre štúdium procesov prebiehajúcich vo vyšších mnohobunkových organizmoch.

Naše laboratórium sa zaoberá štúdiom fyziológie a molekulárnej biológie mnohobunkových kvasinkových spoločenstiev (kolónií a biofilmov), a v rámci toho aj výskumom regulačných a signálnych mechanizmov zúčastňujúcich sa diferenciácie mnohobunečnej komunity v priebehu vývoja a starnutia. Medzi signálne mechanizmy slúžiace na medzibunkovú komunikáciu patrí okrem iných aj signalizácia plynou molekulu – amoniakom, vďaka ktorej sú bunky v kolónii schopné zosynchronizovať svoj vývoj a podľa potreby diferencovať a meniť metabolizmus. Procesov spojených s vývojom a diferenciáciou kolónie sa zúčastňuje mnoho génov. V prípade delécie niektorého z nich dochádza u buniek k problémom s adaptáciou na zmeny prostredia a s bunečnou diferenciáciou, a znižuje sa tým schopnosť ich prežívania. Medzi gény potrebné pre diferenciáciu buniek v kvasinkových kolóniách, zmenu ich metabolizmu a produkciu signálnych molekúl patrí aj gén *SOK2*.

V tejto práci som sa snažila zistiť, aký dopad môže mať delécia génu *SOK2* na bunky kmeňa pri jeho spoločnom raste v kolónii s rodičovským kmeňom, ktorého prechod do adaptívneho metabolizmu nie je obmedzený žiadnou deléciou.

2 Ciele práce

1. Vypracovanie a optimalizácia metódy pre sledovanie kompetície medzi jednotlivými bunkami behom vývoja a diferenciacie gigantickej kolónie
2. Príprava fluorescenčne značených kmeňov odvodených od nového rodičovského kmeňa BY^{new} a príprava delečného kmeňa sok2 Δ
3. Sledovanie vývoja gigantických kolónií a kompetície medzi bunkami v ich populácii v kontrolných kolóniách tvorených len variantami rodičovského kmeňa a delečného mutanta sok2 Δ

3 Literárny prehľad

3.1 Mnohobunkové spoločenstvá mikroorganizmov

Mnohé druhy mikroorganizmov eukaryotických aj prokaryotických sa používajú vo výskumoch ako laboratórne modely. V laboratórnych experimentoch bývajú kvasinky a ďalšie mikroorganizmy väčšinou kultivované vzdušné kultúry v bohatých tekutých médiách. V takýchto podmienkach však často nedochádza k aktivácii génov, ktoré sú potrebné pre prežitie v prírodných podmienkach, ktoré sa diametrálne odlišujú od tých laboratórnych (Palková, 2004).

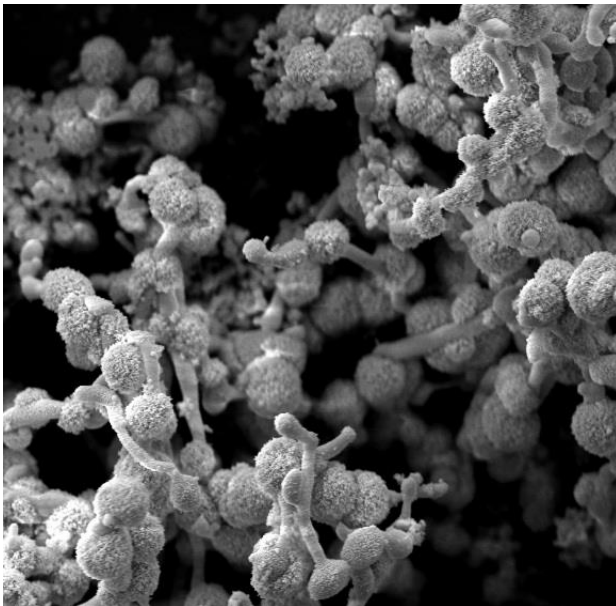
V prirodzených ekosystémoch sú mikroorganizmy neustále vystavené meniacim sa podmienkam. Bunky žijúce v tomto prostredí vykazujú pozoruhodnú flexibilitu expresie génov, ktorá je nevyhnutná pre prežitie v rôznych podmienkach. Hlavnou úlohou zapínania/vypínania funkcie rôznych génov v závislosti od podmienok je adaptácia buniek na dlhotrvajúce či krátkotrvajúce zmeny v prostredí. Regulácia sa vyskytuje ako na transkripčnej tak na post-transkripčnej úrovni. Signály z prostredia sú pomocou bunkových signálnych dráh prevedené do špecifických intracelulárnych a extracelulárnych odpovedí. Medzi ne patrí napríklad produkcia extracelulárnych enzýmov, zmena metabolizmu alebo zmena rastových funkcií (López-Maury *et al.*, 2008).

Z vyššie uvedených dôvodov dávajú mikroorganizmy, vrátane kvasiniek, prednosť združovaniu sa do mnohobunkových útvarov, ktoré im poskytujú množstvo výhod pred individuálnym rastom buniek. Bunky rastúce spoločne v mnohobunkových štruktúrach disponujú vlastnosťami absentujúcimi u jednobunkových organizmov. Medzi tieto vlastnosti patrí napríklad schopnosť buniek dorozumievať sa medzi sebou, ako v rámci populácie, tak aj medzi jednotlivými populáciami pomocou signálnych molekúl. Vďaka tomu dokážu interagovať a synchronizovať svoj vývoj. Ďalšou vlastnosťou typickou pre mnohobunkové populácie je vytváranie špecializovaných buniek, ktoré fungujú v prospech celku (Čáp *et al.*, 2012; Váchová *et al.*, 2013). Mnohobunkové populácie taktiež dokážu vytvárať ochranné štruktúry, ktoré dokážu ochrániť populáciu a zvýšiť tak jej šancu na prežitie. Medzi typické mnohobunkové štruktúry sa zaraďujú povlaky, biofilmy a kolónie (Palková, 2004; Váchová *et al.*, 2009).

3.1.1 Biofilmy

Pojmom biofilm sa označuje spoločenstvo mikroorganizmov, ktoré je charakteristické bunkami ireverzibilne prichytenými k povrchu, alebo navzájom medzi sebou (Donlan & Costerton, 2002). V porovnaní s voľne sa vyskytujúcimi bunkami biofilm poskytuje organizmom výhodu tým, že udržuje určitý stupeň homeostázy prostredia. Ide o najčastejšie sa vyskytujúcu formu mikroorganizmov v prírode. Biofilmy osídľujú povrchy a rozhrania rôznych prostredí. Vyskytujú vo vodnom prostredí, na povrchoch pôd, umelých povrchoch, telách rastlín ale aj na rôznych častiach živočíšnych tiel.

Biofilm (príklad je visieť na Obr. 1) je tvorený bunkami a nimi produkovanou mimobunkovou hmotou nazývanou extracelulárny matrix, ktorá je zložená z vysoko hydratovaných polysacharidov. Matrix vytvára účinný systém na zachytenie a koncentrovanie esenciálnych minerálnych látok a živín z okolia (Costerton *et al.*, 1978). Takto vytvorená vrstva biofilmu predstavuje i bariéru, ktorá chráni bunky v biofilme od vplyvu okolia.



Obr. 1 Biofilm kvasinky *Candida albicans* vytvorený na medicínskom polyméri (<http://www.insight.mrc.ac.uk/2012/10/16/breathing-new-life-into-medical-devices/>)

Vznik biofilmu prebieha vďaka expresii génov, ktorých produkty sú nevyhnutné pre adhéziu buniek k povrchu, na ktorom biofilm vzniká a pre formovanie samotného biofilmu. Tieto gény sú transkribované počas skorej fázy prichytenia buniek k povrchom (Donlan & Costerton, 2002). Biofilm nie je štruktúrne homogénna monovrstva buniek prichytených k povrchu, ale naopak, architektúra biofilmu je heterogénna v priestore a čase a neustále sa mení kvôli procesom prebiehajúcim vo vnútornom aj vonkajšom prostredí (Donlan, 2002). Formovanie biofilmu možno rozdeliť do troch fáz: skorej, strednej a fázy maturácie. U kvasiniek sa v skorej fáze bunky vyskytujú vo forme blastomérov, ktoré

adherujú k povrchu. Stredná fáza vývoja biofilmu je charakterizovaná tvorbou nebunkového materiálu. V maturačnej fáze sa množstvo mimobunkového materiálu zvyšuje, až kým nepokryje všetky bunky. Výsledkom je komplexná trojdimenzionálna štruktúra (Stoodley *et al.*, 2002).

Tvorba biofilmu je pod kontrolou chemických signálov - molekúl, ktoré vyvolávajú tzv. quorum sensing, t.j. zvláštny spôsob regulácie génovej expzie, ktorý bol popísaný u baktérií (Fuqua *et al.*, 1994). Tieto regulačné molekuly indukujú vytváranie útvarov ako sú mikrokolonie a vodné kanály. Vodné kanály pripomínajú primitívny cirkulačný systém umožňujúci efektívnu výmenu živín, metabolitov a odstraňovanie škodlivých látok (Costerton *et al.*, 2003).

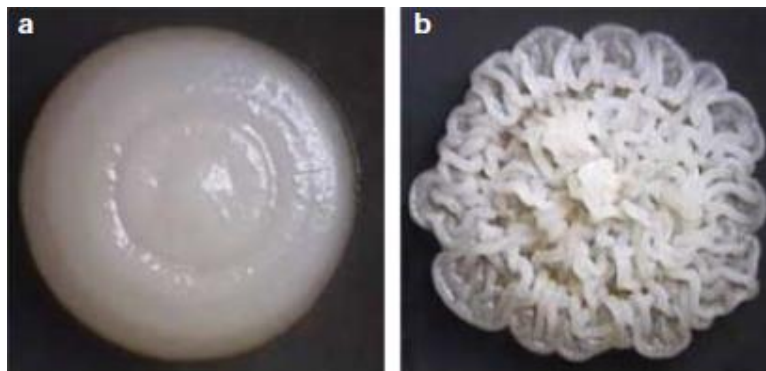
Či už hovoríme o biofilmoch tvorených bunkami jedného druhu mikroorganizmov, alebo o viac druhových komunitách, ich štruktúra je univerzálna, až na niektoré malé výnimky (Tolker-Nielsen & Molin, 2000). Biofilmy sú veľmi rôznorodé, v prírodných ekosystémoch sú väčšinou tvorené viac ako jedným druhom mikroorganizmov (Yang *et al.*, 2011). Základnou vnútornou štruktúrnou jednotkou biofilmu sú mikrokolonie buniek. Vzdialenosť buniek v rámci mikrokolonie, alebo medzi jednotlivými mikrokoloniami poskytuje ideálne podmienky pre vytvorenie nutričného gradientu, výmenu génov a quorum sensing. Prostredníctvom redoxných reakcií môže dochádzať medzi bunkami k cirkulácii rôznych živín, akými sú napríklad dusík, síra a uhlík (Donlan, 2002).

Medzi organizmy rastúce vo forme biofilmu patria aj patogénne baktérie a kvasinky. Ich typickou vlastnosťou je vysoká rezistencia na pôsobenie antibiotík pri liečbe, čo sa z hľadiska klinickej mikrobiológie považuje za dôležitý faktor virulencie. Biofilmy tak môžu vytvoriť zdroj pretrvávajúcej infekcie orgánov a orgánových sústav, odolnej tiež voči imunitnému systému hostiteľa. Znáмым prípadom je patogénna kvasinka *Candida albicans*, ktorá vytvára povlaky na povrchoch implantovaných chirurgických náhrad a zariadení. Výskum objasňujúci rezistenciu biofilmov je však veľmi náročný, vzhľadom k ich obtiažnej kultivácii v laboratórnych podmienkach (Donlan & Costerton, 2002).

3.1.2 Kvasinkové kolónie

Rovnako ako pri tvorbe biofilmu, aj u mikroorganizmov tvoriacich kolónie môžeme pozorovať značné rozdiely medzi bunkami žijúcimi v rámci tohto spoločenstva a medzi samostatne existujúcimi bunkami. Život kvasiniek v kolóniách poskytuje ich bunkám možnosť efektívneho rastu v nepriaznivých podmienkach, ktorým sú v prírodnom prostredí

neustále vystavené (Palková, 2004). Patrí sem napríklad pôsobenie rôznych chemických látok, zmeny teploty a nedostatok živín. Bunky v kolónii sú schopné diferenciacie na špecializované typy buniek, ktoré majú konkrétnu úlohu v závislosti na pozícii daných buniek v rámci populácie. V kolóniách je prežitie populácie dôležitejšie než prežitie individuálnych buniek. Pri diferenciacii bunky menia svoje vlastnosti ako sú metabolizmus a fyziológia, a sú schopné prežiť po dlhú dobu bez toho aby sa delili, poprípade len s veľmi nízkou frekvenciou delenia (Palková, 2004, Palková *et al.*, 2014, Váchová *et al.*, 2009). Príklady kolónii tvorených *S. cerevisiae* sú uvedené na Obr. 2.



Obr. 2 Gigantické kolónie tvorené kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*.
a) laboratórny kmeň b) prírodný kmeň (Palková, 2004)

3.1.2.1 Signalizácia v populáciách kvasiniek Quorum sensing

Ako bolo vyššie uvedené mikroorganizmy dokážu medzi sebou komunikovať pomocou signálnych molekúl. Majú schopnosť vysielat' a prijímat' signály, ktoré majú vplyv na ich správanie na rôzne dlhú vzdialenosť. Tieto signály môžu koordinovať vývoj u jednotlivých mikroorganizmov ale rovnako aj u celých populácií. Jedna z metód, ktorou sa medzi sebou mikroorganizmy dorozumievajú je quorum sensing. Týmto pojmom sa označuje spôsob regulácie génovej expresie baktérií, ale aj kvasiniek. Tento typ regulácie je špecifický tým, že nie je reakciou na meniace sa podmienky okolia, ale zaznamenáva stav populácie ako celku. Signály umožňujú mikroorganizmom odpovedať na rastúcu hustota buniek v rámci populácie. Quorum sensing umožňuje mikroorganizmom monitorovať ich hustotu, a v dôsledku toho viesť k špecifickej odpovedi celej bakteriálnej populácie. Ide o reguláciu, ktorá dáva baktériám a kvasinkám možnosť chovať sa koordinovane. Patria sem rozmanité fyziologické procesy ako je bioluminiscencia, vytváranie zhlukov, syntéza antibiotík a produkcia determinantov virulencie typických pre

patogénne organizmy a formovanie biofilmov (Palková, 2004; Štěpánek, 2006). Ako signálne molekuly pri quorum sensing slúžia obvykle rôzne nízkomolekulárne látky ako je napr. derivát mastnej kyseliny *N*(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserínlaktón u *Vibrio fischeri* (Kaplan *et al.*, 1985), alebo farnezol, ktorý produkuje *Candida albicans* (Hornby *et al.*, 2001).

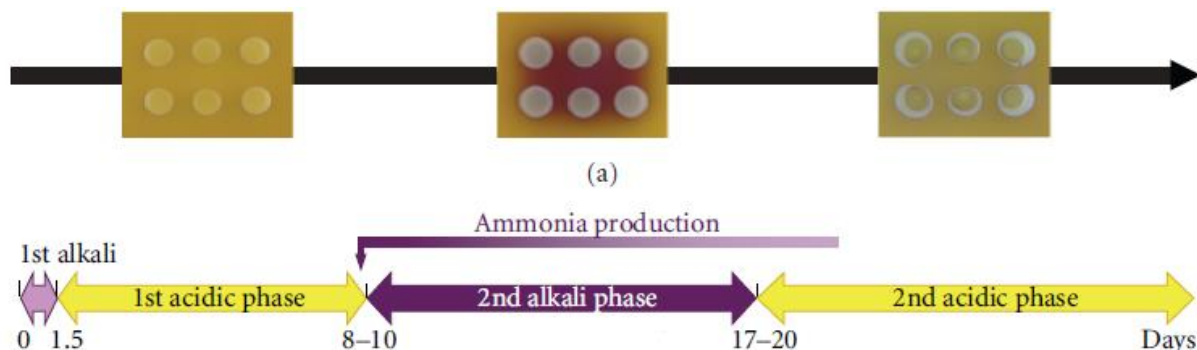
3.1.2.2 Signalizácia buniek v kolóniách amoniakom

Iným typom komunikácie ktorý bol preukázaný u mnohobunkových kvasinkových kolónií je produkcia plynnej signálnej molekuly amoniaku, ktorý je tiež istým typom quorum sensing molekuly (Palková *et al.*, 1997; Palková & Forstová, 2000). Táto signálna molekula je šírená vzduchom, je produkovaná kolóniami príbuzných aj nepříbuzných kvasiniek a je dôležitá pre ich rozvoj a prežitie (Palková, 2004). Slúži ako regulátor rastu kvasinkových kolónií pôsobiaci na dlhé vzdialenosti (Palková *et al.* 2002).

V prípade že na jednom mieste rastie viac kolónií, amoniak začne produkovať tá z nich, ktorá zaregistruje pokles živín, či inú zmenu v prostredí ako prvá. Plynny amoniak sa rýchlo šíri nezávisle na rôznych bariérach a ovplyvňuje susedné kolónie, ktoré ho následne začnú produkovať tiež (Palková & Forstová, 2000). Tento signál vyvolá zmeny metabolizmu, ktoré umožňujú efektívne využitie zvyšok živín v prostredí vrátane už vyprodukovaných odpadových látok (Palková *et al.*, 2002). Preprogramovaný metabolizmus umožní časti populácie uniknúť stresu, ktorý je vyvolaný znížením dostupných živín v prostredí a pokračovať v normálnom vývoji. U kolónií vzniknutých z kmeňov defektných v produkcii amoniaku a v aktivácii ich adaptívneho metabolizmu bola preukázaná nižšia životaschopnosť v neskorších fázach vývoja ich kolónií (Váchová *et al.*, 2004; Váchová & Palková, 2005; Čáp *et al.*, 2009).

Čoskoro po začiatku rastu gigantických kolónií začína prvá alkalická fáza, trvajúca iba krátku dobu, 24 až 35 hodín, čo približne koreluje s exponenciálnou rastovou fázou buniek. Po skončení tejto fázy bunky vstupujú do prvej acidickéj fázy (Obr. 3). Tá je charakteristická pomalým lineárnym rastom buniek v kolónii a intenzívnym okysľovaním prostredia. Druhá alkalická fáza je charakteristická produkciou prchavého amoniaku, ktorý má signálnu funkciu a vplýva na zmeny metabolizmu a bunkovú diferenciáciu. V tomto štádiu vývoja množstvo biomasy stále narastá lineárne. Túto fázu môžeme pozorovať od 8. až 10. dňa vývoja kolónie a trvá približne do 17. až 20.dňa (Váchová *et al.*, 2009). Od týchto dní je prírastok biomasy redukovaný, avšak nie je úplne zastavený. Táto skutočnosť je spôsobená tým, že sa delí len malá časť z celkovej populácie buniek a to prevažne bunky

lokalizované na okrajoch. Tie majú k dispozícii potrebný priestor a živiny v koncentrácii potrebnej pre ich rast a delenie. Poslednou fázou rastu pri ktorej dochádza k zmene pH, je druhá acidická fáza (Obr.3). Je charakteristická postupným znižovaním prírastku biomasy kolónie a znižovaním pH okolia (Váchová et al., 2012).



Obr. 3 Signalizácia amoniakom kmeňa BY kvasinky *S. cerevisiae* (Váchová et al., 2012)

3.1.2.3 Prestavba metabolizmu

Z hľadiska aktivácie a represie expresie niektorých génov pri prestavbe v metabolizme buniek, spôsobených zmenami externého prostredia sa prechod z acidického do alkalického fázy môže rozdeliť na 6 fáz.

Prvé dve fázy, v ktorých dochádza ku zmenám v génovej expresii sa radia do acidického fázy rastu. Dochádza tu k aktivácii génov, ktorých produkty sa zúčastňujú rôznych biosyntetických a degradačných dráh aminokyselín. Jedným z týchto enzýmov je glycín dekarboxyláza, ktorá sa podieľa na uvoľňovaní NH_3 z glycínu, a pravdepodobne zastáva úlohu pri iniciácii produkcie amoniaku. Medzi ďalšie gény exprimované v skorej fáze prechodu kolónie do alkalického fázy patria gény kódujúce transportéry síranu a zinku. Na konci acidického fázy dochádza tiež k aktivácii transportérov fosfátu, a deaktivácii génov podieľajúcich sa na mitochondriálnej oxidatívnej fosforylácii a s ňou spojenej tvorbe energie. Táto deaktivácia pretrváva až do konca alkalického fázy.

V druhých dvoch fázach sa začína prejavovať alkalizácia prostredia. Tretia fáza je charakterizovaná ako neutrálna, a dochádza v nej k počiatku prechodu do alkalického fázy rastu kolónií. V štvrtej fáze vývoja kolónie je indukovaná produkcia génov kódujúcich membránové transportéry amoniaku. Tiež dochádza k poklesu expresie génov kódujúcich H^+ ATPázu plazmatickej membrány. Tým sa zabráni v extrudácii protónov a znižovaniu extracelulárneho pH. Dochádza tu tiež k poklesu expresie génov pre citrátový cyklus a tým k zníženiu mitochondriálnej aktivity (Palková et al., 2002). Jediný gén citrátového cyklu

exprimovaný v tejto fáze kóduje mitochondriálny transportér, zabezpečujúci prenos oxalacetátu z cytoplazmy do mitochondrií (Palmieri *et al.*, 1999). Spolu s ním sú silne exprimované aj gény citrátového cyklu kódujúce citrát syntázu a 2-metyl isocitrát lyázu. Pomocou týchto enzýmov môže byť oxalacetát z cytoplazmy efektívne využitý pre syntézu aminokyselín. V tejto fáze sú exprimované tiež gény zabezpečujúce regeneráciu NADH oxidáciou acetaldehydu na acetát. Exprimované sú aj gény, produkty ktorých sa podieľajú na biogenéze peroxizómov, β -oxidácii mastných kyselín a produkcii acetylCoA v peroxizómoch, v transporte mastných kyselín cez ich membránu.

Posledné dve fázy, piata a šiesta, sú charakterizované ako neskoršia alkalická fáza. V tejto fáze dochádza k represii génov kódujúcich niektoré enzýmy zapojené do degradácie aminokyselín, ako napríklad serín/treonínovej deaminázy. Tieto enzýmy sú zapojené do produkcie amoniaku, ich represiou teda dochádza k opätovnému zvyšovaniu koncentrácie vnútrobunkových zásob aminokyselín. V tejto fáze tiež pokračuje intenzívna represia génov začínajúca už v prvých dvoch fázach vývoja. Patria sem gény kódujúce enzýmy pre elektrónový transport, ATP syntázu, fosfátové transportéry mitochondriálnej membrány, vonkajšie mitochondriálne membránové poríny a enzýmy pre import proteínov mitochondriálneho matrix. V alkalickej fáze sú tiež aktivované gény *ATO1* a *ATO3* pre membránové transportéry, niekoľko génov pre metabolizmus mastných kyselín a gény zabezpečujúce biosyntézu peroxizómov (Palková *et al.*, 2002).

3.1.2.4 Ato transportéry

Do skupiny *ATO* génov patria tri gény *ATO1*, *ATO2* a *ATO3*. Ich produkty, Ato proteíny sa nachádzajú na plazmatickej membráne. Tieto proteíny patria do rodiny vysoko konzervovaných Gpr1/Fun34/YaaH proteínov, ktorých presná funkcia zatiaľ nie je celkom známa. Výsledky doposiaľ ukončených štúdií naznačujú, že Ato proteíny zohrávajú významnú úlohu pri transporte signálnych molekúl amoniaku. Načasovanie produkcie týchto proteínov totiž presne koreluje s iniciáciou uvoľňovania amoniaku, ktorý pravdepodobne indukuje ich expresiu (Strachotová *et al.*, 2012).

Aj keď sú tieto proteíny homologické, nedokážu sa navzájom funkčne nahradiť. Delécia každého z týchto troch génov totiž preukázala pokles produkcie tejto signálnej molekuly v rámci kolónií (Palková *et al.*, 2002). Niektoré z Ato proteínov môžu spolu formovať funkčný komplex. Tieto komplexy vznikajú medzi proteínmi Ato1p a Ato2p v prípade ich spoločnej lokalizácie na membráne. Komplexy vznikajú aj navzájom medzi

proteínmi Ato1p-Ato1p a Ato3p-Ato3p; sú patrne schopné navzájom vytvárať homodiméry a homooligoméry. Proteín Ato2p, ktorý je rovnomerne rozmiestnený v membráne, homooligoméne komplexy nevytvára. Aj keď sa všetky tri proteíny nachádzajú v plazmatickej membráne, každý z nich je inak distribuovaný. Toto zoskupenie sa navzájom odlišuje v stabilite pri zmene pH. Viditeľné komplexy proteínu Ato1p sa vyskytujú hlavne v alkalickojej fáze rastu, čiže od 7.dňa. Prítomnosť proteínu Ato1p nie je priamo závislá na prítomnosti amoniaku, ale na hodnote pH prostredia, ktoré sa mení práve prítomnosťou NH₃. Distribúcia ďalších dvoch transportérov Ato2p a Ato3p v membráne nie je ovplyvnená hodnotou pH. Aj tieto dva transportéry sú zodpovedné za udržiavanie extracelulárnej hladiny amoniaku na určitej úrovni (Řičicová *et al.*, 2007; Strachotová *et al.*, 2012).

3.1.2.5 Sok2 transkripčný faktor

Ako už bolo spomenuté, kvasinkové kolónie majú schopnosť produkcie amoniaku ako signálnej molekuly, vďaka ktorému sú bunky schopné prispôbiť svoj metabolizmus meniacim sa podmienkam okolia. Jedným z faktorov, zodpovedných za efektívne prepínanie génov adaptívneho metabolizmu je Sok2p. Bunky kvasinkových kolónií defektné v expresii génu pre tento transkripčný faktor nie sú schopné uvoľňovať dostatočné množstvo amoniaku. Tým sa u nich prejavuje neschopnosť adaptácie a následného prežívania v podmienkach hladovania. Množstvo amoniaku uvoľňované do prostredia v 12. dni rastu kolónií je u kolónií s deléciou v *SOK2* géne o polovicu menšie než u rodičovských kolónií. Celkové množstvo amoniaku uvoľneného v kolóniách s deletovaným génom *SOK2* je len 10% oproti množstvu produkovaného v kolóniách produkujúcich Sok2p (Váchová *et al.*, 2004).

Sok2p faktor je kľúčovým regulátorom zapojeným do rozličných procesov spojených s rastom buniek a ich adaptáciou na zmeny okolia, vrátane vystavenia buniek nedostatku živín. Jeho správna funkcia je nevyhnutná už pri začiatočnom raste kolónií a rovnako aj pre ich neskorší vývoj. Rovnako je nevyhnutný pre prepis asi 500 génov, u ktorých v prípade odstránenia Sok2p dochádzalo k zmenám v expresii u jednotlivých vývojových fáz kolónie. Medzi gény, ktoré sú ovplyvňované Sok2p transkripčným regulátorom patria transportéry pre fosfát, sulfát, kyselinu karboxylovú (Palková *et al.*, 2002). Znížená expresia sa v neprítomnosti Sok2p dá pozorovať aj u všetkých troch Ato transportérov, dôležitých pre produkciu prchavého amoniaku (Váchová *et al.*, 2004). Sok2p ďalej ovplyvňuje gény pre biosyntézu peroxizómov a β – oxidáciu mastných

kyselín, gény dôležité pre Krebsov a metylglyoxalový cyklus. Práve prepínanie z citrátového do metylglyoxylového cyklu umožňuje výhodnejšie využívanie živín a mobilizáciu bunkových rezerv prostredníctvom β - oxidácie mastných kyselín v peroxizómoch. Rovnako sa znižuje expresia génov kódujúcich rôzne dehydrogenázy cytosolu a mitochondrií, ktoré sa zúčastňujú v regenerácii NADH počas úniku buniek pred oxidatívnym stresom. Bez tohto transkripčného faktora teda bunky nie sú schopné efektívne sa prispôbiť hladovaniu na esenciálne živiny (Palková *et al.*, 2002; Palková & Váchová, 2003).

Sok2p je ďalej negatívnym regulátorom sporulácie. Pôsobí ako transkripčný represor multikopiových supresorov mutácií v cAMP-dependentnej proteínkinázovej dráhe. Táto dráha je dôležitá pre ovplyvňovanie pseudohyfálneho rastu. Sok2p indukuje metabolické zmeny vedúce k prepínaniu génov pre mitotické delenie a génov pre meiózu a sporuláciu. Okrem toho pôsobí ako negatívny regulátor génov potrebných pre pozitívnu reguláciu pseudohyfálneho rastu (Ward & Garrett, 1994; Shenhar & Kassir, 2001).

3.1.2.6 Horizontálna diferenciácia buniek v kolóniách

Prechod z acidického do alkalického prostredia je sprevádzaný, ako už bolo spomenuté rozsiahlymi metabolickými zmenami v kvasinkových kolóniách laboratórných kmeňov. Bolo preukázané, že populácia buniek v kolónii nie je homogénna, ale naopak, bunky umiestnené v rôznych lokalitách kolónie sa líšia svojimi vlastnosťami (Váchová *et al.*, 2009; Čáp *et al.*, 2010). K tejto diverzifikácii nedochádza na samotnom počiatku vývoja kvasinkovej kolónie, ale až v neskoršej fáze rastu pri prechode buniek do alkalického fázy rastu (Váchová *et al.*, 2009).

Pri horizontálnej diferenciácii buniek rozlišujeme tie bunky, ktoré rastú v centrálnej časti kolónie a bunky rastúce na jej okrajoch. Deliace sa bunky sú v tomto prípade z veľkej časti lokalizované v okrajových častiach kolónie. Tieto mladé bunky sa vyznačujú nízkou hladinou ROS a tiež enzýmov, zodpovedných za ochranu voči stresu. Sú schopné aktivovať gény adaptívneho metabolizmu, čo im umožňuje dlhodobé prežívanie v rámci kolónie (Váchová *et al.*, 2009). Naopak, u buniek lokalizovaných v centrálnych častiach kolónie je hladina ROS vysoká a spolu s ním aj hladina stresových enzýmov. Bunky v centrálnych častiach navyše vykazujú vysokú hladinu apoptických znakov, ako napríklad poškodenie chromatinu (Váchová & Palková, 2005).

S prechodom buniek do alkalickéj fázy rastu je produkcia amoniaku sústredená prevažne v okrajových častiach kolónie, menej v stredových. Tomu odpovedá aj lokalizácia Ato transportérov, ktoré sa nachádzajú vo vyššom počte rovnako v okrajových častiach. Medzi ďalšie proteíny nachádzajúce sa vo vyšších koncentráciách práve v okrajových bunkách sa zaraďujú proteíny peroxizómov a uhlíkového metabolizmu prebiehajúcim v mitochondriách. K proteínom, ktoré majú naopak vyššiu koncentráciu v centrálnej časti kolónie, patrí napríklad aj H⁺ ATPáza plazmatickej membrány. V druhej acidickéj fáze dochádza k zvýšeniu produkcie amoniakového transportéru Ato2p v stredových bunkách, avšak jeho koncentrácia neprekračuje množstvo produkované okrajovými bunkami (Váchová *et al.*, 2009).

3.1.2.7 Vertikálna diferenciácia buniek v kolóniách

U buniek dochádza prechodom z prvej acidickéj do alkalickéj fázy aj k vertikálnej diverzifikácii pôvodných buniek na dve nové subpopulácie, vyznačujúce sa odlišnými fyziologickými a morfológickými vlastnosťami a odlišnou lokalizáciou v rámci kolónie (Čáp *et al.*, 2012).

Kvasinkové bunky lokalizované v horných vrstvách kolónie sú označované ako U bunky. Je pre nich charakteristická zvýšená odolnosť voči stresovým podmienkam. Vyznačujú sa tiež dlhou životnosťou, nebola u nich zaznamenaná produkcia ROS a sú schopné akumulácie zásobných látok, akými sú glykogén a tukové kvapôčky. Ich bunkové steny sú hrubé a rezistentné voči lytickému enzýmu zymolyáze. Obsahujú niekoľko malých vakuol a malé množstvo veľkých mitochondrií bez mitochondriálnych krist. Napriek ich rastu v časti kolónie nachádzajúcej sa v oblasti obsahujúcej kyslík majú U bunky nízku respiračnú kapacitu a prevláda u nich skôr fermentačný metabolizmus (Čáp *et al.*, 2012).

Druhou skupinou buniek sú L bunky, nachádzajúce sa v spodnej časti kolónie pod U bunkami. Tieto bunky sú náchylnejšie k stresovým podmienkam oproti U bunkám, produkujú ROS a ich životaschopnosť sa časom znižuje. Nižšia životaschopnosť sa u nich prejavuje aj napriek tomu, že sa nachádzajú na spodnej časti kolónie, kde majú bunky lepší prístup k živinám. Tento jav je spôsobený doposiaľ nepopísaným signálnym mechanizmom, ktorý blokuje rast L buniek, zatiaľ čo časť U buniek sa pomaly delí.

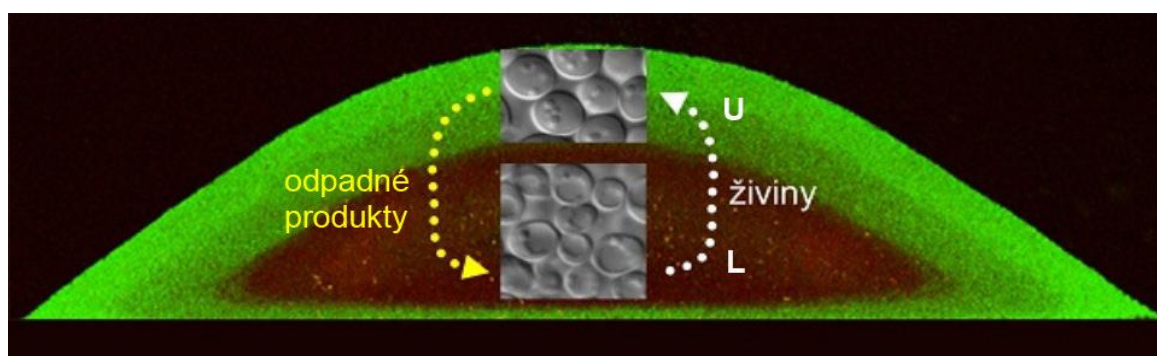
L bunky majú tenkú bunkovú stenu a neakumulujú zásobné látky, okrem jednej malej lipidovej kvapôčky. Na rozdiel od U buniek majú jednu veľkú vakuolu a niekoľko menších mitochondrií s dokonale vyvinutými kristami, čo im umožňuje naplno využívať

respiračný metabolizmus. Ďalším rozdielom medzi týmito dvoma typmi buniek je schopnosť autofágie, ktorá je aktívna len u U buniek. Ďalšie výskumy poukazujú na možnosť, že L bunky poskytujú zdroj živín práve pre ďalší vývoj U buniek.

Medzi týmito dvoma subpopuláciami sú badateľné rozdiely aj v expresii génov. Bunky lokalizované v horných častiach kolónie exprimujú iné gény než bunky v spodných častiach. Génová expresia je okrem toho u týchto dvoch typov buniek závislá aj na fázy vývoja v ktorom sa kolónia práve nachádza.

U vrchných U buniek bola preukázaná účasť proteínov plazmatickej membrány (Ato3p), peroxizómov (Pox1p) a mitochondrií (Icl2p), prítomnosť ktorých absentovala u spodných buniek. V L bunkách boli nájdené proteíny cytosolu (Met17p, Ino1p) a endoplazmatického retikula (Ole1p), ktoré naopak neboli prítomné u U buniek (Čáp et al., 2012).

U horných buniek dochádza prevažne k expresii génov zapojených do translácie, génov pre metabolické enzýmy, gény pre transportéry živín a iónov. Sú u nich indukované gény pre ribozomálne proteíny, glykolýzu, pentózofosfátový cyklus, biosyntézu a transport nukleotidov, biosyntézu a transport vitamínov a gény pre mitochondriálny a peroxizomálny metabolizmus mastných kyselín. Spodné bunky sa zas vyznačujú indukciou expresie génov zapojených v biogenéze a oxidatívnej fosforylácii, génov kódujúcich chaperóny, komponenty vakuol, ubikvitín-proteazómový systém, proteíny bunkovej steny. Ďalej sem patria gény pre lipidový metabolizmus, hexózové transportéry, či gény zúčastňujúce sa odpovede na limitáciu živinami (Čáp et al., 2012). Na Obr. 4 je znázornená predstava výmeny živín a odpadových látok u vyvinutej kvasinkovej kolónie.



Obr. 4 Prierezný rez kolóniou kvasinky *S. cerevisiae* zobrazujúci usporiadanie subpopulácií U a L buniek. (<https://www.prirodovedci.cz/aktuality/kvasinky-novi-spojenci-v-boji-s-rakovinou>)

3.1.2.8 Sporulácia

Okrem spomínaných U a L buniek sa kvasinkové bunky dokážu diferencovať a vytvárať aj tretí typ – spóry. Sporujú len diploidné kvasinky, ktoré sú schopné aktivovať alternatívny program pri ktorom dochádza k prepnutiu génov zodpovedných za bunkové delenie. U buniek dochádza k meiotickému deleniu a následnej tvorbe rezistentných spór schopných prekonať aj veľmi nepriaznivé rastové podmienky. Pri kvasinkách rastúcich v rámci kolónie majú schopnosť tvoriť spóry len bunky na určitých pozíciách v kolónii. Sporujúce bunky a spóry sa prevažne vyskytujú v hornej vrstve hladkej kolónie približne v oblasti, kde sa u haploidných kvasiniek nachádzajú U bunky. Prvá pozícia týchto buniek je v dolnej časti kolónie, druhá sa nachádza na vonkajšej časti kolónie (Lindegren & Hamilton, 1944, citované podľa Palková *et al.* 2014; Piccirillo *et al.*, 2012).

3.2 Kompetícia mikroorganizmov

Vo väčšine prírodných prostredí sa nachádza rozmanité množstvo mikrobiálnych druhov. V týchto komunitách kvasinky a ostatné mikroorganizmy súťažia medzi sebou o priestor a zdroje. Tento boj o prežitie a odovzdávanie génov ďalším generáciám je často tvrdý a nemilosrdný. Vedie však k prirodzenému výberu, ktorý poskytuje hnaciu silu pre inováciu a diverzifikáciu medzi konkurenčnými organizmami. Z toho vyplýva, že druhy lepšie prispôbené kompetícii o zdroje majú vyššiu pravdepodobnosť ďalej predávať svoje gény, a budú dominovať v populácii. Väčšina z nich disponuje mnohými mechanizmami, ktorými dokážu poškodzovať ostatné mikroorganizmy v populácii. Bolo preukázané, že interakcie v populáciách mikroorganizmov v rámci jedného či viacerých druhov môžu hlboko ovplyvniť výsledok kompetície v prírode (Hibbing *et al.*, 2010).

Ako už bolo spomínané, mikroorganizmy sa v prírode nevyskytujú ako samostatné jedince disponujúce obmedzenými schopnosťami pre vlastné prežitie. Naopak, ak sú vystavené drsným podmienkam, ako je hladovanie, extrémne teplo či nebezpečné chemikálie, sú mikroorganizmy schopné spoločne vyvíjať sofistikované stratégie pre prispôbenie sa a prežitie. Jedným z aspektov tohto kooperatívneho správania je tvorba komplexných kolónií pre účinnú reakciu na podmienky prostredia. Pre koordináciu spolupráce jednotlivých buniek v rámci takéhoto mnohobunkového spoločenstva boli vyvinuté rôzne komunikačné metódy vrátane priamej fyzickej interakcie pomocou membránových polymérov, sekréciou extracelulárnych materiálov, biochemickou komunikáciou quorum sensing a signalizáciou pomocou chemických látok. Tým môže

dochádzať k zmene morfológie kolónií, koordinovanej expresii génov či regulovanej diferenciácii buniek pre lepšie rozdelenie úloh v rámci populácie (Be'er *et al.*, 2008).

Ústredným bodom mikrobiálnej kompetície sú nutričné zdroje. Dostupnosť, individuálny dopyt a miera spotreby živín určuje prevahu rôznych taxónov organizmov. V podmienkach dostatočnej koncentrácie živín môžu kompetujúce mikroorganizmy existovať stabilne vedľa seba, zatiaľ čo za iných podmienok môžu byť niektoré druhy vytlačané z prostredia z dôvodu akútneho obmedzenia živín. Postupom času nastane situácia, kedy spotreba limitujúcich živín ovplyvní priebeh kompetície (Hibbing *et al.*, 2010; Cornforth & Foster, 2013).

Významným faktorom, ktorý ovplyvňuje kompetíciu medzi organizmami sú mutácie, ktoré môžu pozitívne alebo negatívne vplyvať na fitness jednotlivých druhov. K ich tvorbe dochádza vplyvom zmien prostredia pôsobením prírodnej selekcie. Mutácie poskytujú základ pre populačnú diverzitu a adaptáciu. V rámci jednej populácie tak môžu vzniknúť viaceré subpopulácie s novými alelami, ktoré eliminujú iné alely v populácii. Tieto novo vzniknuté vlastnosti môžu jednotlivým subpopuláciám poskytovať výhody, zabezpečujúce lepší fitness organizmov, vplyvom čoho môže dochádzať k lepšiemu rastu tejto subpopulácie a úplnej alebo čiastočnej eliminácii iných subpopulácií (Conrad *et al.*, 2011).

3.2.1 Rozdelenie kompetície

Pod pojmom ekologická kompetícia sa označuje proces, kedy jeden organizmus znižuje schopnosť prežívania alebo rozmnožovania iného organizmu. Tento proces môže byť rozdelený na dva základné typy, a to vykorisťovaciú a ovplyvňovaciú. Prvá z nich je nepriama a nastáva vo chvíli, keď jeden z organizmov spotrebováva živiny toho druhého. Je významným javom v komunitách mikroorganizmov, a to hlavne v prípadoch, keď dochádza k vytváraniu hustých populácií ako napríklad pri formovaní biofilmov. V takýchto prípadoch bežne dochádza k obmedzeniu množstva živín, čo má za následok výrazné súperenie medzi mikroorganizmami rôznych, ale aj rovnakých druhov. Ak dochádza pri tomto type kompetície k súpereniu rovnakých mikroorganizmov nejedná sa o pravú evolučnú kompetíciu, keďže všetky bunky majú v takomto prípade rovnaké evolučné záujmy. Druhým hlavným typom je kompetícia pri ktorej sa mikroorganizmy priamo ovplyvňujú. Spravidla nastáva medzi organizmami rôznych genotypov, a dochádza pri nej k priamemu poškodzovaniu jedného z organizmov. Deje sa to zvyčajne produkciou rôznych druhov látok akými sú napríklad antibiotiká alebo polyméry. Oba typy kompetície

sú bežné v komunite baktérií či kvasiniek a výrazne ovplyvňujú výsledok prirodzeného výberu (Cornforth & Foster, 2013).

3.2.2 Produkcia antibiotík ako druh stresovej odpovede

Mikroorganizmy majú vyvinuté rôzne spôsoby pre detekciu a odpoveď na ekologickú kompetíciu, ktoré sa nazývajú stresové odpovede. Často bývajú asociované s uvoľňovaním toxínov zneškodňujúcich iné organizmy. Najštudovanejším mechanizmom kompetície mikroorganizmov je produkcia malých antimikrobiálnych zložiek, ktoré môžu sprostredkovať kompetíciu medzi rôznymi druhmi, medzi príbuznými kmeňmi jedného druhu a tiež medzi geneticky rovnakými jedincami v populácii. V poslednom spomenutom prípade hovoríme o tzv. baktériocínoch. Sú definované ako úzkospektrálne antibiotiká, toxické iba pre mikroorganizmy rovnakého druhu ako je producentský kmeň, alebo pre blízko príbuzné druhy a sú typické pre „kanibalistické“ mikroorganizmy, ktoré zabijajú bunky rovnakého kmeňa pre získanie zdrojov živín (Storz & Hengge, 2011; Cornforth & Foster, 2013)

Produkcia antimikrobiálnych látok je ovplyvnená prostredím, v ktorom sa bunka práve nachádza. Pre efektívnu inhibíciu konkurujúcich buniek musí byť antibiotikum produkované v dostatočnom množstve, čo vyžaduje spoločné úsilie celej populácie. Produkcia antibiotika býva zvyčajne regulovaná quorum sensing mechanizmom. Tieto toxické látky sú produkované ako odpoveď na stres vyvolaný inými organizmami a len zriedkavo ich bunky produkujú ako odpoveď na stres spôsobený fyzikálnymi faktormi, ako sú osmotický tlak či tepelný šok (Cornforth & Foster, 2013).

4 Materiál a metódy

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganizmy:

Kmene boli uchovávané v 30% glycerole pri teplote – 80 °C.

Saccharomyces cerevisiae

kmeň	Genotyp	referencia
BY4742	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742 ^{new}	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Ladislava Hatáková Laboratórium bunkovej biológie kvasinkových kolónií, PĽF, UK
kmene odvodené od BY4742		
BY-P _{TEF1} -GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, NAT1,</i> P _{TEF1} -GFP	Váchová <i>et al.</i> , 2013
BY- P _{TEF1} - dsRED	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0,</i> KanMX, P _{TEF1} -dsRED	Vratislav Štoviček, Laboratórium bunkovej biológie kvasinkových kolónií, PĽF, UK
sok2 Δ	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0,</i> <i>sok2Δ, KanMX</i>	Euroscarf
BY-Ato1-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0,</i> KanMX, P _{TEF1} -GFP	Řičicová <i>et al.</i> , 2007
sok2 Δ - P _{TEF1} - GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2Δ,</i> KanMX, NAT1, P _{TEF1} -GFP	Dita Strachotová Laboratórium bunkovej biológie kvasinkových kolónií, PĽF, UK
kmene odvodené od BY4742^{new}		
BY-P _{TEF1} -GFP ^{his}	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, NAT1,</i> P _{TEF1} -GFP	Táto práca

BY-P _{TEF1} -GFP ^{lys}	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i> , NAT1, P _{TEF1} -GFP	Táto práca
BY-P _{TEF1} - dsRED ^{his}	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i> , KanMX, P _{TEF1} -dsRED	Táto práca
BY-P _{TEF1} - dsRED ^{lys}	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i> , KanMX, P _{TEF1} -dsRED	Táto práca
sok2Δ-P _{TEF1} - GFP ^{his}	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2Δ</i> , KanMX, NAT1, P _{TEF1} -GFP	Táto práca
sok2Δ-P _{TEF1} - dsRED ^{his}	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2Δ</i> , NAT1, KanMX, P _{TEF1} -dsRED	Táto práca

Tab. 1 Kmene použité v tejto práci

4.1.2 Použité médiá

Pre médiá a roztoky bola použitá deionizovaná voda z prístroja od firmy Wartex (Rowapur – kvalita destilovanej vody, Ultrapur – ultračistá voda).

Pevné médium

GM

3% glycerol (Lach:Ner)

2% agar (Dr. KulichPharma)

_____ sterilizovať _____

1% kvasničný autolyzát š. 41 (Imuna)

Upraviť pH na 5,0

_____ sterilizovať _____

Po sterilizácii zmiešať a pridať jednotlivé položky

0,05% glukóza

10mM CaCl₂ (Lachema)

0,002% uracil

0,96% etanol

GM s pridaním BKP

Ku GM médiu sa pridá 0,01% BKP (Sigma) rozpustené v etanole.

YEPG

1% kvasničný autolyzát (Chemos)

2% baktopepton (Biotech)

2% glukóza (Lach:Ner)

2% agar (Dr. KulichPharma)

YEPG s pridanými antibiotikami

YEPG s Nourseothricínom – 100 µg/1 ml média

YEPG s G418 – 8 µl/1 ml média, zo zásobného roztoku (50mg/ml)

Antibiotiká sú sterilizované filtráciou cez filtry Rotilabo (ROTH) a pridávajú sa po vychladnutí média približne na 50 °C.

Tekuté médium

2 x YPD

2% kvasničný autolyzát

4% baktopepton

4% glukóza

4.1.3 Pufry a roztoky

Elektródový pufor

25mM Tris báza

192mM glycín (Serva)

_____ upraviť pH na 8,8 _____

Pridať 0,1% SDS (17,3mM)

TGM pufor

25 mM Tris báza

192 mM glycín

15% metanol (lach:ner)

MES pufor pH 6,0

10 mM MES (Sigma)

5 x Vzorkový denaturačný pufor

0,131 M TRIS, pH 6,8

50% glycerol

0,05% Bromfenolová modrá

10% SDS (Serva)

_____ doliat' do 10 ml destilovanú vodu_____

5x TBE pufor

5,4 % TRIS báza (Sigma)

2,75 % kyselina boritá (Sigma)

10mM EDTA, pH 8,0

Používame 10x riedený.

PBS pufor pH 7,4

10 mM PBS

0,9% NaCl

Farbiaci roztok

40% metanol

10% kyselina octová

0,1% Coomassie Blue R250

Odfarbovací roztok

40% metanol

10% kyselina octová

Separáčny pufor pH 8,8

1,5 M TRIS

0,4% SDS

Zaostrovací pufor pH 6,8

0,5 M TRIS

0,4% SDS

4.1.4 Inhibítory proteáz

PIC (Rocha)

1 tableta/1 ml destilovanej vody

AEBSF (Sigma)

24 mg/1 ml destilovanej vody

4.1.5 Gély

1% Agarózový gél

Agaróza (TopBio) rozpustená v 0,5 x TBE

Polyakrylamidový gél (uvedené množstvá na 2 gély)

12% Separáčny gél

4 ml Akrylamid (30 %)
2,5 ml Separačný pufor pH 8,8
3,5 ml deion. H₂O
10 µl TEMED (tetramethyl-elthylen diamin)
25 µl Persíran (10%)(Roth)

4% Zaostrovací gél

0,65 ml Akrylamid (30%)
1,25 ml Zaostrovací pufor pH 6,8
3,05 ml deion. H₂O
3 µl TEMED (Sigma)
25 µl Persíran 10%

4.1.6 Antibiotiká

G418 (InvivoGen)

Nourseothricin (WERNER BioAgens)

4.1.7 Materiál pre prácu s DNA

ssDNA: Salmon Sperm (Invitrogen)

Polymerázy: Combi PPP Master Mix (Top-Bio)

-štandardný mix s Taq polymerázou

Emerald MAX (TaKaRa)

-polymerázový mix s „proof-reading“ aktivitou

SaphireAmp Fast PCR (TaKaRa)

-mix s ultrarýchlou polymerázou

Primery (Sigma, IDT):

OVEROVACIE PRIMERY	
názov primeru	sekvencia
LYS2-verif-R	GCGGTGTTGCTTTGAATC
dsRED-link-F	CATGGCACCGGCAGCAC
dsRED-link-R	GTGCTGCCGGTGCCATG
eGFP-verif-R	AGCATCACCTTCACCTTCAC
KAN-verif-F	GGGTAAGGAAAAGACTCACG
KAN-verif-R	CGTGAGTCTTTTCCTTACCC
NAT1-verif-F	TCTTGACGACACGGCTTACC
NAT1-verif-R	GTAAGCCGTGTCGTCGAAGAG
TEFprom-verif-F	CGATGACCTCCCATTGATAT
TEF-verif-F	ACACCCAAGCACAGCATACT
HIS3-ext-over-F	CTGCCAGGTATCGTTTGAAC
HIS3-ext-over-R	GTTGCTAAAGAAGCTGCCAC
sok2-del-over-F	CGTGTGTAAGCCTTCTAGTA
sok2-del-over-R	CATGAGTCCACCTCATGCAT
sok2-over-int-F	GCACAATGCCTAACTCTAAC
PRIMERY NA PRÍPRAVU TRANSFORMAČNÝCH KAZIET	
názov primeru	sekvencia
LYS2-del-F	CTATTTACACTTCCTGGTTGATGGTCACTTGCTGCCT GAAGGTGACACTATAGAACGC
LYS2-del-R	ACAATAAACCAAGATGAAGCTGCCATTAGCAGACTAA CGCCATAGGCCACTAGTGGATCTG
pYM-N21::HIS3-F	AAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACG AAGGCAAAGATGCGTACGCTGCAGGTTCGAC
pYM-N21::HIS3-R	ACATGTATATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATC GGTGTCACTATTTGTACAATTCATCCATACCATG
sok2-del-F	CAGTACAAAATCATCCTTATATAACCCTGGTAAGGTCC TTTTGTC CAGCTGAAGCTTCGTACGC
sok2-del-R	GTTTTGATTAAAGTAACATAATTATCCAAGGAATTCAT AGTTGTT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG

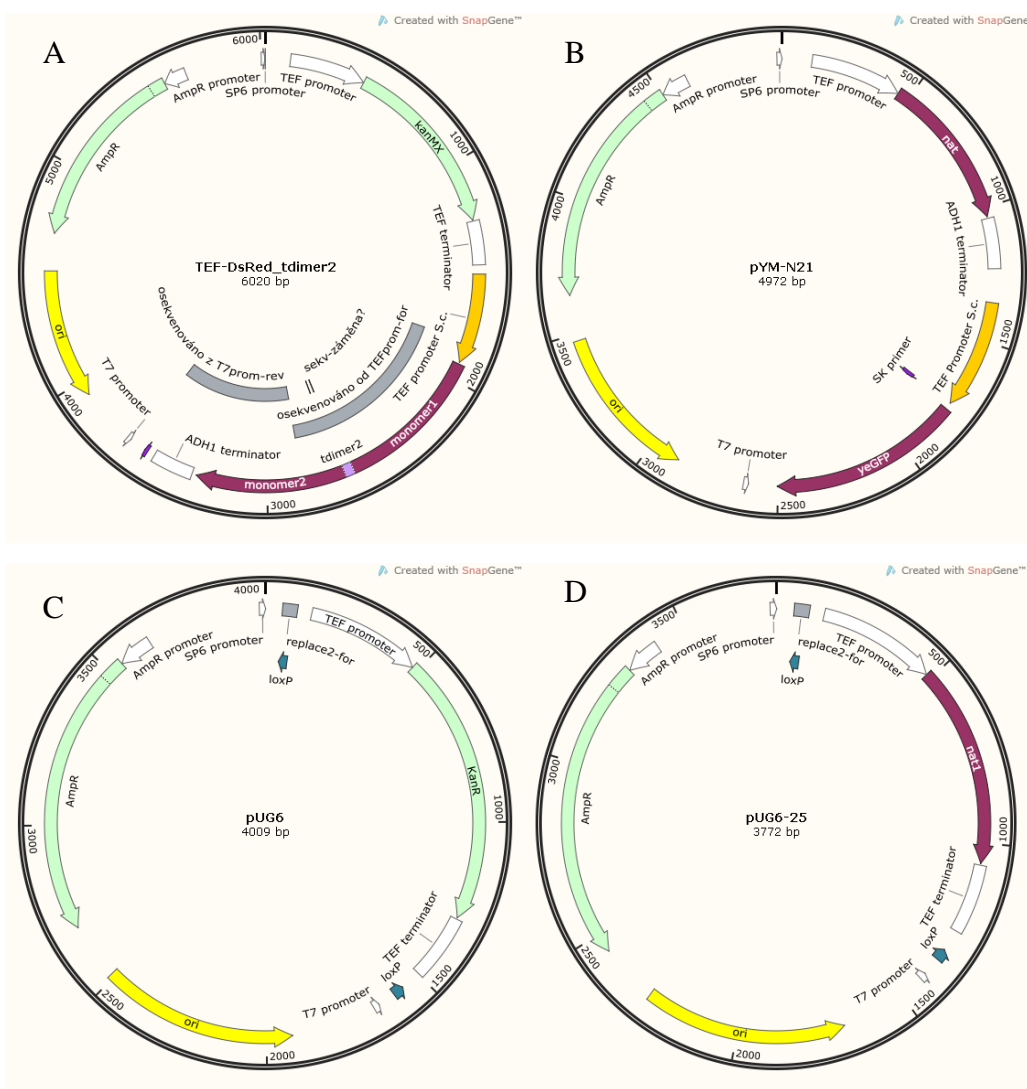
Tab. 2 Primery použité pri príprave transformačných kaziet a pri overovacích PCR

Plazmidy

Pre prípravu transformačných kaziet som ako templát použila plazmidy uvedené v tabuľke 3.

Názov	Genotyp	Referencia
pYM-N21	NAT1, yEGFP	Euroscarf
TEF-dsRED-tdimer2	KanMX, dsRED	Otakar Hlaváček, Laboratórium bunkovej biológie, MBÚ, AV ČR
pUG6	KanMX	Euroscarf
pUG6-25	NAT1	Otakar Hlaváček, Laboratórium bunkovej biológie, MBÚ, AV ČR

Tab. 3 Plazmidy použité na prípravu transformačných kaziet



Obr. 5 Mapy použitých plazmidov: A TEF-dsRED_tdimer2; B pYM-N21; C pUG6; D pUG6-25

4.1.8 Prístroje

Centrifúgy: Mikrocentrifúga (Hettich)
Centrifúga (32R Hettich)
Centrifúga (TC6 Sorvall)

Elektroforéza: Zariadenie pre horizontálnu elektroforézu (BioRad)
Zariadenie pre vertikálnu elektroforézu (BioRad)

Fluorescenčná lupa (Leica)

Fotoaparát (Nikon)

Kamera (JenoptikProgRes CT3)

Konfokálny mikroskop (Nikon Eclipse 801)

Miešadlo (RH Basic 2 IKA)

PCR cykler (Bioer)

pH meter (SevenMultiMettlerToledo)

Spektrometer (HeliosAlphaThermoScientific)

Termoblok (CHB-202 Bioer)

Termostat

Trepačka (GFL)

Trepačka (UnitronInforms)

Váhy (Kern)

Vodný kúpeľ (Thermomix)

Vortex (Genie 2 ScientificIndustries)

Počítačové programy a internetové databázy

NIS – Elements AR 3.0

SnapGene

BioEdit

Pubmed medline - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Saccharomyces Genome Database (SGD) - <http://www.yeastgenome.org/>

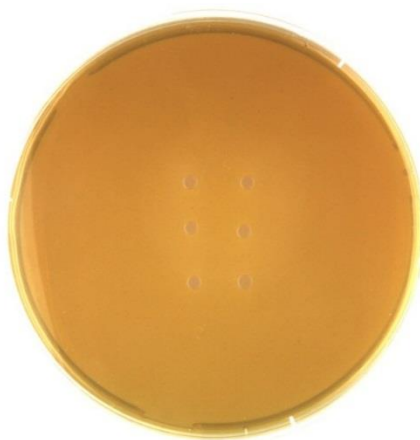
4.2 Metódy

4.2.1 Sterilizácia

Používané roztoky, mikroskúmavky, špičky na pipety, špáradlá, zamaty a chemické sklo boli sterilizované autoklávovaním 20 minút pri tlaku 120 kPa a teplote 120 °C. Drobné predmety boli sterilizované nad plameňom.

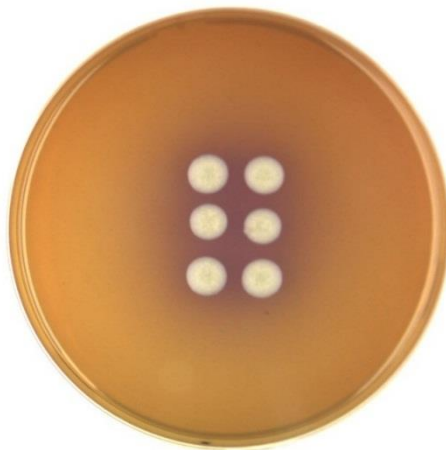
4.2.2 Gigantické kolónie

Gigantické kolónie boli zaočkované zo suspenzie buniek konkrétneho kmeňa, resp. z buniek dvoch kmeňov v pomere 1:1 (12mg buniek/1ml sterilnej deionizovanej vody). Na sledovanie vývoja a morfológie gigantických kolónií sa použili misky s GM –BKP médiom so šiestimi 1µl kvapkami suspenzie vo vzdialenosti 1,5 cm, ktoré sa inkubovali na 28°C (Obr.6). Produkciu amoniaku bolo možné sledovať ako zmenu zafarbenia média v okolí kolónií, vďaka farebnému pH indikátoru BKP (Obr.7).



Obr. 6 Gigantické kolónie na GM-BKP 24h od zaočkovania.

Vývoj gigantických kolónií a signalizácia amoniakom boli dokumentované vo vybraných dňoch inkubácie kamerou ProgRes CT3.



Obr. 7 Signalizácia amoniakom gigantických kolónií na GM-BKP 15. deň inkubácie pri 28 °C.

4.2.3 Výsevy a selekcia buniek

Výsevy boli robené s použitím dvoch kmeňov, pričom jeden alebo obidva mali gén pre fluorescenčný proteín a rezistenciu proti antibiotiku. Pripravila som si suspenziu 12 mg/ml z každého kmeňa a zmiešala v pomere 1:1. Následne som spravila riedenie 10^{-5} naniesla a rozotrela 100 μ l. Misky sa inkubovali v termostate pri 28 °C približne 4 dni. Po náraste kolónií boli bunky selektované metódou razítkovania. Miska s narastenými kolóniami bola odtláčená na razítko so zamatom a následne kolónie na zamate boli pretlačené na misky s GM, YEPG bez a s pridaným antibiotikom. Na miske s antibiotikom narástli len kolónie kmeňa obsahujúceho gén pre rezistenciu.

4.2.4 Stanovenie počtu kolónií na miske

Misky s kolóniami som fotila kamerou ProgRes CT3 a v uloženom obrázku následne spočítala počet kolónií pomocou programu NIS –Elements (Obr. 8).



Obr. 8 Nárast kolónií na miske s YEPG médiom, kolónie boli spočítané pomocou počítačového programu NIS – Elements.

4.2.5 Pozorovanie a fotografovanie mikroskopických preparátov

Pre tento účel bol použitý konfokálny mikroskop Nikon Eclipse 801 a objektívy so zväčšením 100x, 20x, a 10x. Pre sledovanie svetelnej emisie boli použité fluorescenčné filtry pre GFP a RED.

4.2.6 Príprava lyzátov buniek a stanovenie bielkovín

Pri príprave lyzátov aj stanovení množstva bielkovín boli vzorky celý čas uchovávané na ľade.. Vzorky pozostávali z čerstvo zozbieranej biomasy a z buniek uložených na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. K bunkám v mikroskúmavkách sa podľa hmotnosti mokrej váhy pridal pufr MES pH 6,0 s inhibítormi proteáz PIC a AEBSF (150 μl pufru/50mg mokrej váhy). K rozsuspendovaným bunkám sa pridali balotíny v množstve 2 mm pod okraj hladiny vzorky. K príprave lyzátov z buniek sa použil desintegrátor FastPrep : 4x po 20s, medzi každým cyklom boli vzorky 2min chladené na ľade. Následne prebehla dvojkroková sedimentácia.

1. stupeň $t = 3\text{ min.}$, $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{RCF} = 1000\text{g}$

2. stupeň $t = 5\text{ min.}$, $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{RCF} = 3000\text{g}$

Po prvej centrifugácii bol supernatant odobratý do novej mikroskúmavky a balotíny premyté pufrom. K tomuto supernatantu bol potom pridaný aj supernatant z druhej centrifugácie.

Množstvo proteínov v lyzátach sa následne stanovilo použitím Bradfordovho činidla (BioRad). Bradfordove činidlo bolo pridané k riedenému lyzátu v pomere 1:5. Po 10 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola zmeraná OD pri A_{595} .

Koncentrácia bielkovín sa vypočítala podľa vzorca (odvodený od Bradford, 1976):

$$A_{\text{vzorku}} \times 16,7 = \text{mg bielkovín/ml}$$

16,7: koeficient používaný pri stanovení bielkovín z 50 μl 50 x riedenej vzorky.

4.2.7 SDS PAGE Elektroforéza

Na SDS PAGE elektroforézu sa používal 12% polyakrylamidový gél. Vzorky proteínov s denaturačným pufrom boli denaturované 2,5 minúty na 95°C. Nanáška na gél bola 5 µg proteínov. Veľkosti proteínov boli odčítané na základe proteínového štandardu (BioRad). Parametre elektroforézy boli $U = 200 \text{ V}$, $I = 0,06 \text{ A}$, $t = 65 \text{ min}$.

4.2.8 Western blot

Na blotovanie sa používala PVDF membrána, ktorá sa pred samotným prenosom aktivovala v metanole a premyla deionizovanou vodou a 5min TGM pufrom .

Blotovanie prebiehalo za stáleho chladenia pri parametroch $U = 120 \text{ V}$, $I = 0,2 \text{ A}$, $t = 1 \text{ hod. } 20 \text{ min}$.

Po ukončení blotovania sa membrána premyla v PBS pufre 3x 5minút, následne vo farbiacom a v odfarbovacom roztoku.

4.2.9 Imunodekcia GFP

Membrána bola inkubovaná v 1% kaseíne (Sigma) v PBS pufri s 0,05% Tween 20.

Následne bola inkubovaná 1 hodinu v roztoku 1% kaseínu s protilátkou proti GFP konjugovanou s chrenovou peroxidázou (GFP 9996 HRP - riedenie 1:1000) a potom 5x 2min premytá v PBS pufre. Na mokrú membránu boli na 10 minút nanesené roztoky ECL v pomere 1:1. Signál bol detegovaný na filmoch (MedialX-Ray film 100 NIF, Fomei) pomocou vývojky a ustaľovača (Foma) po rôznych časoch exponovania.

4.2.10 Transformácia

Príprava transformačnej PCR kazety

PCR kazety na transformáciu boli pripravené nasledovne:

1µl riedeného plazmidu (~5-10ng/µl)

0,5 µl primer forward (20 pmol/µl)

0,5 µl primer reverse (20 pmol/µl)

10,5 µl PCR H₂O

12,5 µl Emerald Max polymeráza

Pre amplifikáciu transformačnej kazety som použila nasledovný PCR teplotný program:

1. 98 °C – 15 s
2. 98 °C – 10 s
3. 60 °C – 30 s
4. 72 °C – 1 min/kb

Kroky 2 – 4 opakovať 30x

5. 72 °C – 5 min
6. 4 °C - ∞

Transformácia *S. cerevisiae* (Gietz & Woods, 2002)

Do 5 ml tekutého 2x YPD média sa inokulovali bunky východzieho kmeňa, ktoré rástli 24 h na YEPG a následne sa inkubovali cez noc na trepačke pri teplote 30 °C a RPM 200. Na druhý deň bolo z nočnej kultúry začkované do 15ml tekutého 2x YPD na koncentráciu 5×10^6 buniek/ml. Bunky boli ďalej inkubované na trepačke po dobu 4 hodín, čo odpovedá približne 2 generačným dobám. Po dosiahnutí koncentrácie 2×10^7 buniek/ml sa bunky centrifugovali 5 minút na 3000 g (Centrifúga TC6 Sorvall). Po premytí sterilnou vodou sa bunky rozsuspendovali v 80 μ l sterilnej H₂O. Následne sa k 100 μ l buniek pridalo 25 μ l PCR kazety, 50 μ l ssDNA (pred použitím denaturovaná 5 minút na 95°C a schladená na ľade) a 276 μ l transformačnej zmesi (240 μ l 1 M octanu lithného, 36 μ l 50% PEG3500). Po 40 minútach inkubácie na 42 °C sa zmes centrifugovala 1 min na 14 000 RPM. Po odsatí supernatantu sa pridal 1ml 2xYPD a zmes bola inkubovaná 4 až 5 hodín pri 30 °C a 200 RPM. Následne sa vzorky centrifugovali 1min na 14000 RPM a resuspendovali v 200 μ l sterilnej H₂O. Transformanty boli selektované na médiu s prídavkom konkrétneho antibiotika v termostate pri 30 °C 3 až 5 dní.

Izolácia DNA

Vybrané transformanty boli prenesené na čerstvú miskú s antibiotikom a inkubované cez noc na 28 °C. Následne boli bunky rozsuspendované v 20 μ l 0,25% SDS, 3 minúty denaturované na 95 °C, a 2 minúty vortexované. Potom sa pridalo 20 μ l H₂O a centrifugovalo 1 minútu pri 14 000 RPM. Supernatant bol použitý ako templát pre overováciu PCR.

Overenie transformácie pomocou PCR a horizontálnej elektroforézy

Transformanty boli overované pomocou PCR:

1 μ l supernatantu

0,5 μ l primer forward (20 pmol/ μ l)

0,5 μ l primer reverse (20 pmol/ μ l)

10,5 μ l PCR H₂O

12,5 μ l PPP Master Mix alebo SapphireAmp Fast PCR polymerázy

Pre overenie som použila nasledovné tepelné programy:

pre PPP Master Mix: 1. 95 °C – 1 min

2. 94 °C – 1 min

3. 55 °C – 30 s

4. 72 °C – 30s

Kroky 2 – 4 opakovať 30x

5. 72 °C – 2 min

6. 4 °C - ∞

pre SapphireAmp Fast PCR: 1. 94 °C – 1 min

2. 98 °C – 5 s

3. 55 °C – 5 s

4. 72 °C – 10 s/kb

Kroky 2 – 4 opakovať 30x

5. 4 °C - ∞

Výsledky amplifikácie boli vizualizované po elektroforéze v 1% agarózovom géli pomocou UV transiluminátora. Parametre horizontálnej elektroforézy boli: t = 30 min U = 95 V. Veľkosti úsekov DNA boli odčítané pomocou DNA štandardu (Invitrogen).

5 Výsledky

5.1 Vývoj zmiešaných gigantických kolónií – 1. časť - Kompetícia 2 vybraných kmeňov

Cieľom mojej diplomovej práce bolo zistiť, ako sa vyvíja gigantická kolónia vznikajúca z jednej kvapky suspenzie zmesi buniek dvoch rôznych kmeňov. Skúmala som, či v rámci tejto kolónie dochádza ku kompetícii medzi bunkami jednotlivých kmeňov a ako táto kompetícia ovplyvňuje vývoj kolónie vrátane situácie, keď je táto kolónia vytvorená zo zmesi rodičovského kmeňa a vybraného delečného mutanta. Vzhľadom na to, že získané výsledky by mali byť základom pre štúdium vývoja štruktúry zmiešaných gigantických kolónií pomocou konfokálnej mikroskopie, bolo potrebné aby vždy jeden z dvojice kmeňov tvoriacich kolóniu bol označený fluorescenčným proteínom.

Ďalšou podmienkou je, že tento proteín by mali bunky obsahovať v približne konštantnom množstve bez ohľadu na polohu v gigantickej kolónii a jej vývojovú fázu. Pre toto štúdium som zvolila kmeň BY- P_{TEF1} -GFP, pripravený v Laboratóriu biológie kvasinkových kolónií, ktorý by mal spĺňať moje požiadavky. Expresia GFP je v tomto kmeni pod kontrolou silného konštitutívneho promotora TEF. Vďaka tomu obsahuje cytosol buniek dostatočné množstvo proteínu GFP, ktorý zaistuje konštantnú intenzitu fluorescencie, aby bunky mohli byť pozorované konfokálnym mikroskopom.

5.1.1 Spôsob detekcie podielu jednotlivých kmeňov v zmiešanej kolónii

Ako prvé bolo treba zistiť podmienky, ako detegovať a odlíšiť bunky oboch kmeňov tvoriacich gigantickú kolóniu. K tomuto účelu som použila zmes buniek pozostávajúcu z východzieho rodičovského kmeňa BY a jeho fluorescenčne značeného variantu BY- P_{TEF1} -GFP. K odlíšeniu oboch typov buniek som využila to, že kmeň BY- P_{TEF1} -GFP je vďaka prítomnosti génu *NAT1* rezistentný k nourseothricínu, zatiaľ čo BY túto rezistenciu nemá. Prvým testovaným bolo médium GM, teda komplexné glycerolové médium podobné médiu, na ktorom budú rásť gigantické kolónie, neobsahovalo však BKP. Druhé bolo komplexné médium YEPG s glukózou, ako zdrojom uhlíka. Pre test som použila suspenznú

zmes oboch kmeňov používanú pre inokuláciu gigantických kolónií. Pre rozlíšenie buniek jednotlivých kmeňov som zvolila metódu razítkovania na selekčné médium s antibiotikom nourseothricín. Týmto postupom je možné určiť podiel buniek jednotlivých kmeňov v biomase, avšak len tých, ktoré sú schopné vytvoriť kolóniu.

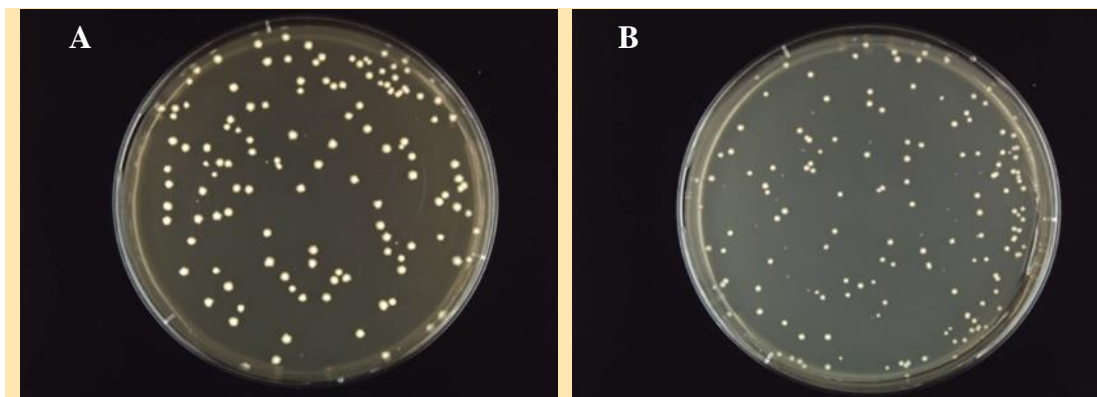
Postup

Pre test som pripravila suspenziu z buniek oboch kmeňov z kultúr rastúcich cez noc na YEPG médiu. Oba kmene v boli v tejto suspenzii obsiahnuté v pomere 1:1 mokrej hmotnosti biomasy, bola to teda rovnaká zmes akú som používala pri zaočkovaní gigantických kolónií na GM-BKP. Suspenziu som ďalej vhodne nariedila a vysiala na misky s pevnými agarovými médiami GM a YEPG. Po náraste buniek som misky razítkovala na médium rovnakého druhu, ale s pridaným selekčným markerom, v tomto prípade nourseothricínom. Pre kontrolu účinnosti som bunky razítkovala aj na rovnaké misky bez selekčného nourseothricínu. Cieľom bolo zistiť, či kolónie ktoré nenarástli patrili do kmeňa citlivého na antibiotikum, alebo šlo o chybu pri razítkovaní. V druhom prípade by daná kolónia nevyrástla ani na kontrolnej miske. Z pôvodnej neriedenej suspenzie som si na médium GM s pridaným BKP zaočkovala šesť kvapiek, z ktorých vyrástli gigantické kolónie. Tie som používala ako zdroj biomasy v ďalších dňoch pokusu. Výsevy som robila v dňoch 0, 4, 7 a 15.

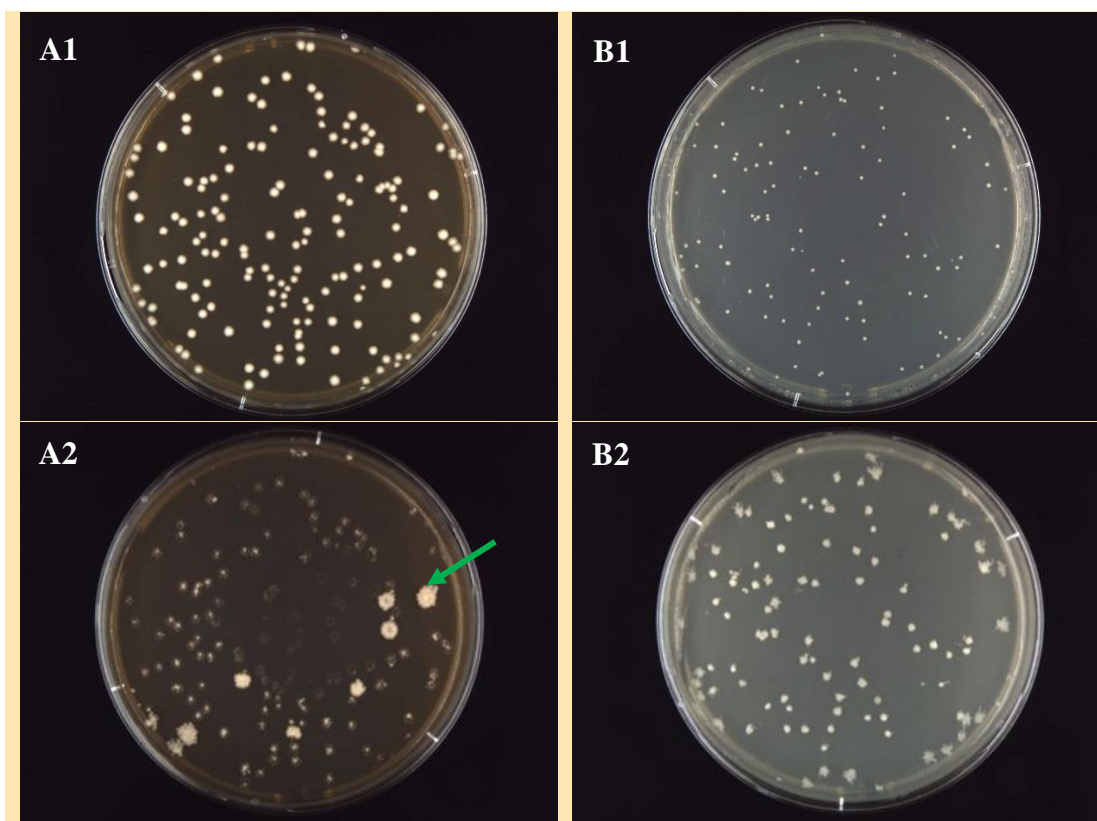
Výsledky

Pri výsevoch sa podľa predpokladu ukázalo, že kolónie, ktoré rástli po výseve zmiešanej suspenzie na YEPG médiu mali dvojnásobnú veľkosť oproti kolóniám rastúcich na GM, keďže glukóza je pre *S. cerevisiae* lepším zdrojom uhlíku než glycerol (Obr. 10). Po razítkovaní na selekčné médium som zistila, že na GM s pridaným antibiotikom narástli všetky kolónie z pôvodného výsevu, a teda selekcia buniek na prítomnosť antibiotika na GM nefungovala (Obr. 11). Pri razítkovaní na misky s YEPG sa tento problém nevyskytoval, selekcia bola účinná. Pri výsevoch na GM médium som na základe tohto výsledku v ďalších pokusoch použila na zistenie podielu buniek rezistentného a citlivého kmeňa razítkovanie na médium YEPG s antibiotikom, na ktorom selekcia dobre funguje.

Pri prvom výseve robenom v dni 0 sa ukázalo, že kolónie dvoch použitých kmeňov nerástli v presnom pomere 1:1, čo bolo pravdepodobne spôsobené rozdielnym obsahom vody v biomase, použitej na prípravu východzej suspenzie.



Obr. 10 Porovnanie veľkosti kolónií u výsevov na YEPG (A) a GM (B) médiu.



Obr. 11 Porovnanie selekcie na médiách YEPG a GM s nourseothricínom. (A1) Výsev na YEPG. (B1) Výsev na GM. (A2) Razítko z výsevu na miske YEPG s nourseothricínom, zelená šípka označuje kolóniu buniek rezistentných voči nourseothricínu. (B2) Razítko z výsevu na miske GM s nourseothricínom.

5.1.2 Vývoj gigantických kolónií a kompetícia buniek v zmiešaných kolóniách BY a sok2Δ

V tejto časti práce som sledovala vývoj gigantických kolónií tvorených zmesou rodičovského kmeňa a kmeňa s deléciou génu *SOK2*, ktorý kóduje transkripčný faktor Sok2p s veľmi pleiotropným efektom (Váchová *et al.*, 2004). Zisťovala som, či má niektorý z kmeňov výhodu v priebehu vývoja zmiešanej kolónie, teda či dochádza ku kompetícii oboch typov buniek. Bolo treba tiež zistiť, či dochádza k vzájomnej kompetícii buniek v kontrolných zmiešaných kolóniách rodičovského kmeňa, teda zmesi pôvodného rodičovského kmeňa a jeho variantu značeného GFP, z ktorých ani jeden nepostráda žiadny gén.

Pre testovanie som použila nasledovné dvojice kmeňov:

kontrolná zmiešaná kolónia:

neznačený kmeň - BY + značený kmeň - BY-P_{TEF1}-GFP

zmiešané kolónie: BY + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP

BY-P_{TEF1}-GFP + sok2Δ

Jeden z dvojice kmeňov bol vždy označený GFP a obsahoval súčasne gén pre selekčný marker, v tomto prípade *nourseothricin*.

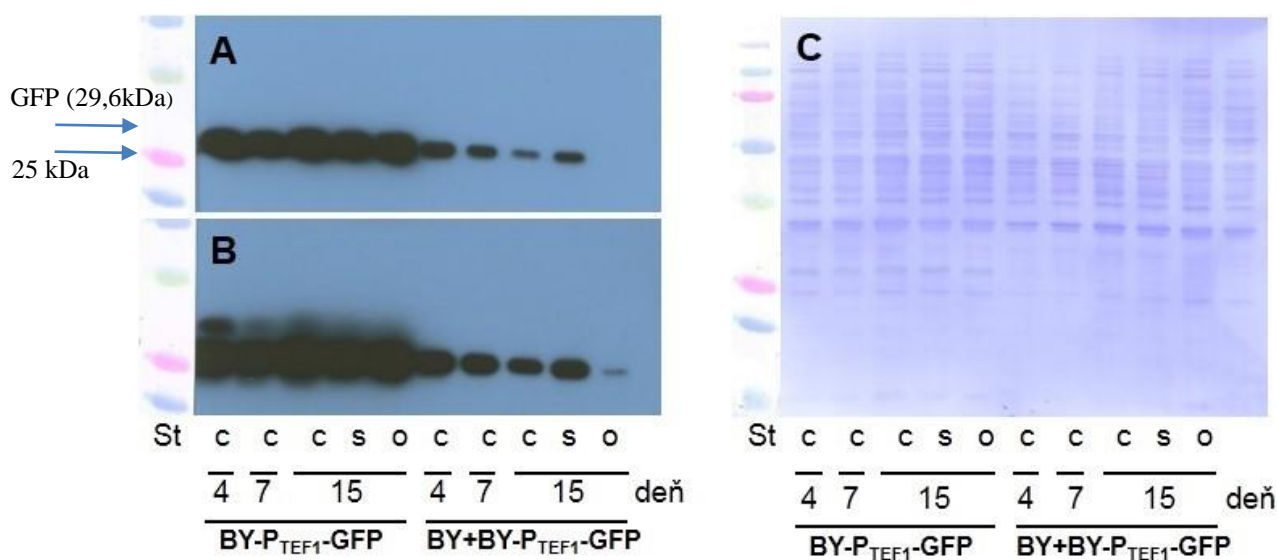
Podiel buniek jednotlivých kmeňov prítomných v gigantickej kolónii môže byť skreslený tým, že nie všetky bunky určitého kmeňa dokážu vytvoriť kolóniu po tom, ako boli vyňaté z štruktúry kolónie. Preto som použila pre porovnávanie podielu buniek v zmiešaných gigantických kolóniách BY + BY-P_{TEF1}-GFP stanovenie množstva GFP proteínu prítomného v bunkových lyzátoch získaných z celej biomasy kolónií metódou SDS-PAGE s následnou imunodetekciou. Množstvo proteínu GFP, ktoré v zmiešanej kolónii produkuje iba časť kolónie - bunky kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP, som porovnávala s rovnako starými kolóniami tvorenými iba kmeňom BY-P_{TEF1}-GFP. Pretože bunky oboch kmeňov môžu byť v zmiešanej kolónii rozložené nerovnomerne, použila som z plne vyvinutých a diferencovaných kolónií z 15. dňa nielen vzorky pripravené z celej kolónie, ale tiež vzorky paralelne odobrané zo strednej a okrajovej oblasti kolónie.

Postup

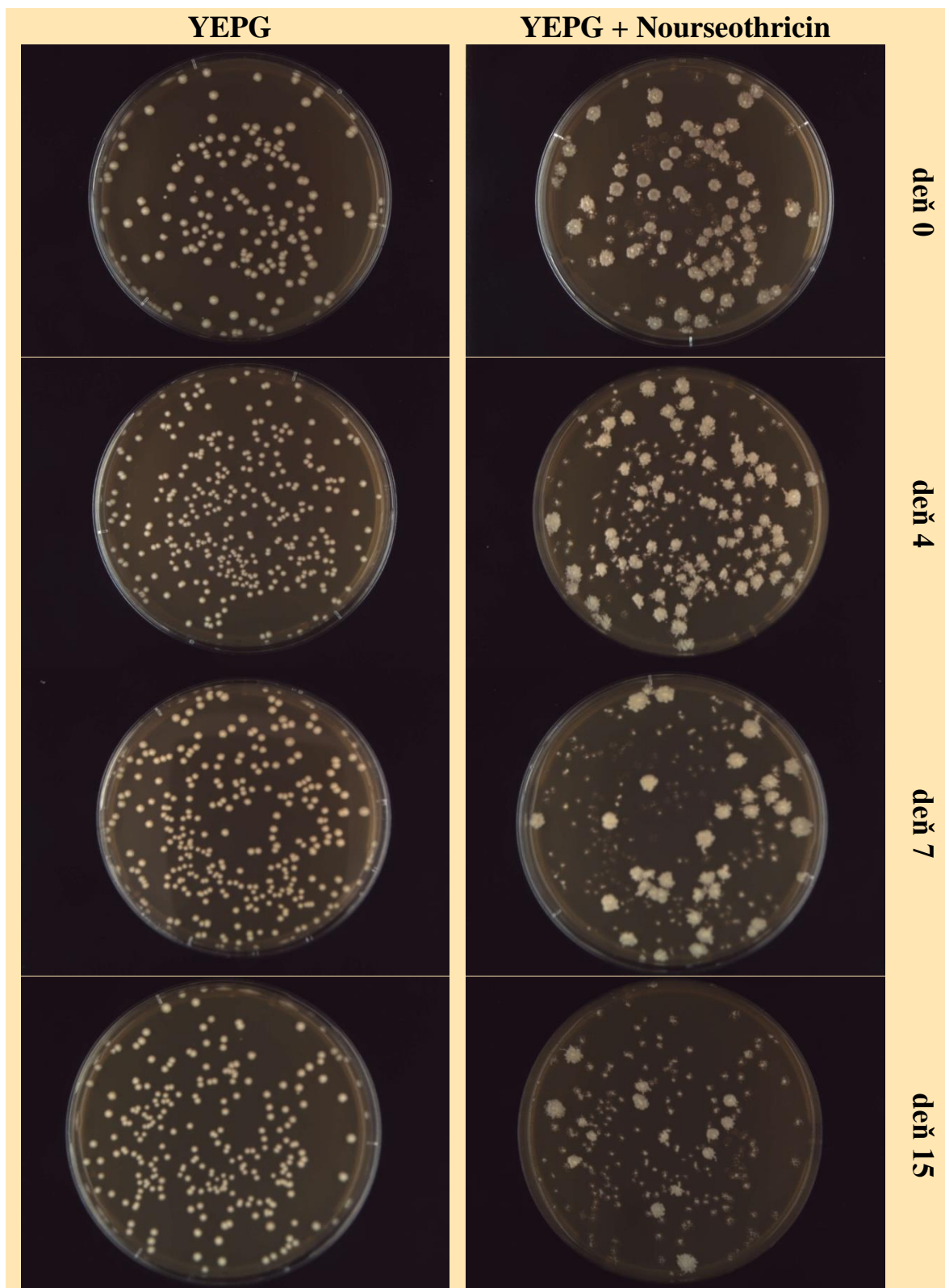
Gigantické kolónie (6 kolónií na miskú) boli zaočkované na GM-BKP po 1 μl suspenzie buniek oboch kmeňov z kultúr rastúcich cez noc na YEFG médiu v pomere 1:1 mokrej hmotnosti biomasy. Gigantické kolónie som kultivovala na paralelných miskách pri

28°C 4, 7 a 15 dní. Biomasa som odobrala z celých kolónií, pripravila suspenziu buniek a vysiala na GM a YEPG. Po náraste kolónií som razítkovaním na YEPG s nourseothricínom určila celkový počet buniek a pomer buniek oboch kmeňov. Podobne som stanovila i pomer buniek vo východzej suspenzii, teda pomer v čase t_0 vývoja kolónie. Týmto postupom som určila podiel buniek jednotlivých kmeňov v biomase, ale len tých, ktoré boli schopné vytvoriť kolóniu.

Pri stanovovaní množstva GFP proteínu som použila biomasu z gigantických kolónií, ktorú som zozbierala v dňoch 4, 7 a 15 z celých kolónií a v 15. dni paralelne i z biomasy odobranej zo strednej a okrajovej oblasti gigantických kolónií. Biomasa som týmto spôsobom odobrala z kolónií BY + BY- P_{TEF1} -GFP, a z kolónií tvorených len BY- P_{TEF1} -GFP. Z biomasy som pripravila bunkový lyzát a množstvo GFP proteínu detegovala metódou Western blotu pomocou anti-GFP protilátky (Obr. 12).



Obr. 12 Produkcia GFP v kmeňoch BY- P_{TEF1} -GFP a BY + BY- P_{TEF1} -GFP. (A) Film exponovaný 17 s. (B) Film exponovaný 5 min. C – celá kolónia, O – okraj kolónie, S – stred kolónie. Čísla označujú dni, v ktorých bola biomasa odobraná. (C) PVDF membrána s 5 μ g nanáškou proteínov. Pre porovnanie veľkosti proteínov bol použitý proteínový štandard (Bio-Rad) (St).



Obr. 13 Podiel buniek kmeňov BY a BY- P_{TEF1} -GFP. Vľavo sú výsevy zo suspenzie pripravenej z biomasy gigantických kolónií obsahujúcich bunky oboch kmeňov. Misky vpravo sú razítka zhotovené z týchto výsevov, na ktorých narástli len kolónie BY- P_{TEF1} -GFP kmeňa.

Výsledky

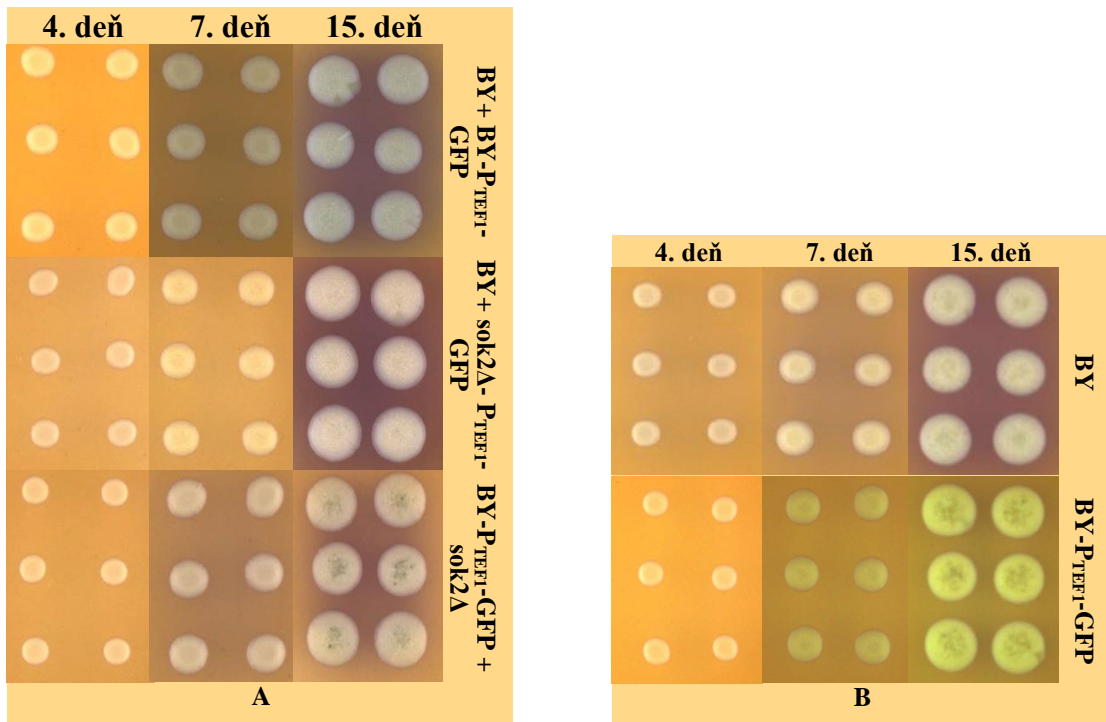
Priebeh vývoja zmiešaných kolónií a ich morfológia sú znázornené na Obr. 14. a 15. Počas vývoja kontrolnej zmiešanej gigantických kolónie BY + BY-P_{TEF1}-GFP sa výrazne nelíši celkové množstvo buniek v jednotke biomasy, mení sa však podiel zastúpenia buniek oboch kmeňov (Obr. 13, Obr. 16). Výsledky ukazujú, že bunky kmeňa BY lepšie prežívajú v konkurencii s BY-P_{TEF1}-GFP, a v 15. dni vývoja gigantických kolónií predstavujú 94 % z celkového počtu buniek (Obr. 16).

Kolónie tvorené BY + BY-P_{TEF1}-GFP by mali obsahovať polovičné množstvo GFP než kolónie tvorené len BY-P_{TEF1}-GFP kmeňom, pokiaľ kolónie obsahujú rovnaké množstvo buniek značených a neznačených GFP. Zmiešané kolónie obsahujú už od 4. dňa menej než polovicu proteínu GFP a toto množstvo ďalej postupne klesá. V 15. dni je GFP v kolónii nerovnomerne rozdelený – jeho koncentrácia je vyššia v stredovej časti kolónie, v okrajových častiach je koncentrácia nepatrná. Stredová časť teda v 15. dni obsahuje výrazne menej než polovicu buniek BY-P_{TEF1}-GFP, krajové časti však takmer žiadne (Obr. 12). Za horším prežívaním buniek GFP značeného variantu BY teda nie je nižšia schopnosť buniek vytvoriť kolóniu na novom médiu.

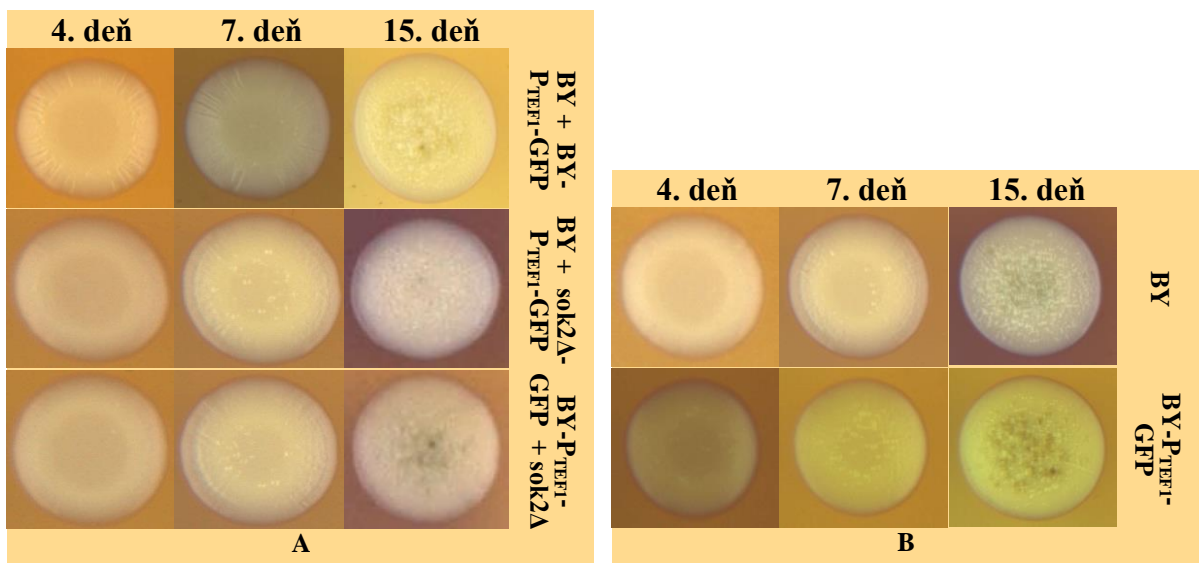
Z pozorovania rastu kolónií tvorených samostatne BY a BY-P_{TEF1}-GFP sa tiež ukázalo, že kmeň BY-P_{TEF1}-GFP neprechádza do alkalického fázy vývoja kolónie, spojenej s produkciou amoniaku tak, ako je tomu u rodičovského kmeňa BY (Obr. 14B). Táto skutočnosť môže následne ovplyvniť aj vývoj zmiešaných kolónií, v ktorých je v zmesi prítomný tento kmeň.

Pri dvojici kmeňov BY + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP bol prvý z nich v značnej výhode a takmer úplne dominoval (Obr. 17). U kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP + sok2Δ som pozorovala značnú prevahu kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP nad sok2Δ (Obr. 18). V oboch prípadoch vznikla chyba pri kultivácii výsevov robených v 4. dni rastu gigantických kolónií. Napriek tomu sa dali vyhodnotiť výsledky pokusu, keďže v ostatných meraniach ku chybe nedošlo.

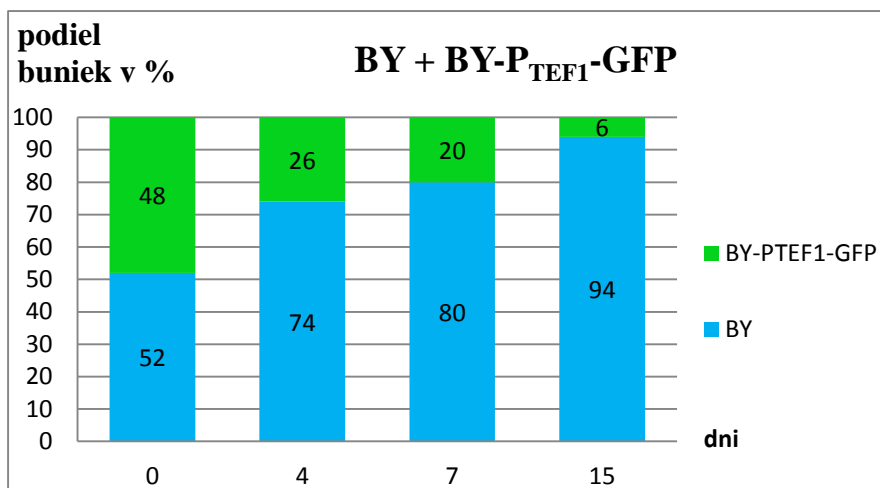
Z výsledkov som mohla vyvodit' záver, že bunky rodičovského kmeňa, značeného aj neznačeného, majú kompetičnú výhodu pri spoločnom raste s kmeňom obsahujúcim deléciu v *SOK2* géne.



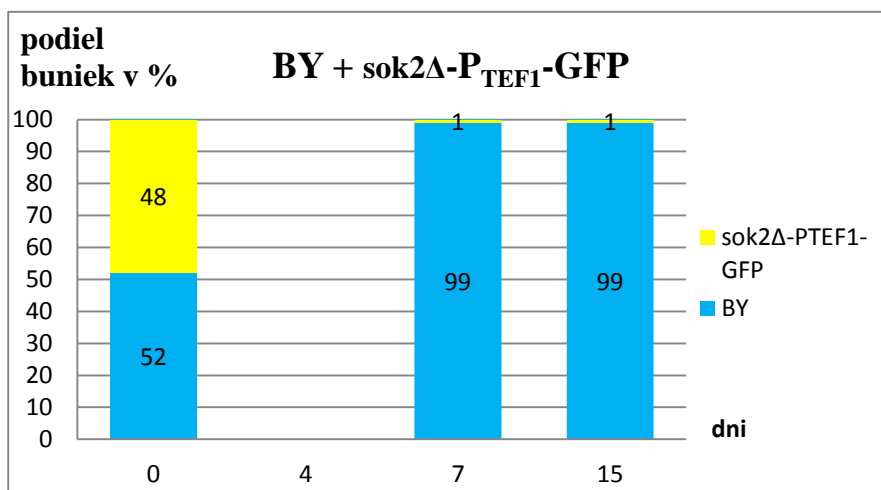
Obr. 14 Porovnanie vývoja a signalizácie gigantických kolónií tvorených (A) dvojicou kmeňov BY + BY-P_{TEF1}-GFP, BY + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-GFP + sok2Δ (B) samostatnými kmeňmi BY a BY-P_{TEF1}-GFP vo vybraných dňoch rastu.



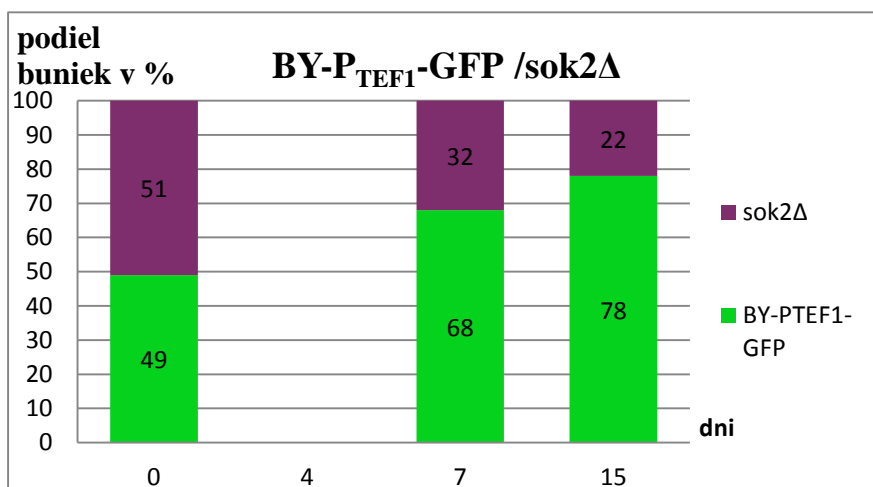
Obr. 15 Porovnanie morfológie gigantických kolónií tvorených (A) dvojicou kmeňov BY + BY-P_{TEF1}-GFP, BY + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-GFP + sok2Δ (B) samostatnými kmeňmi BY a BY-P_{TEF1}-GFP vo vybraných dňoch rastu.



Obr. 16 Podiel buniek dvoch kmeňov BY a BY-P_{TEF1}-GFP v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu zmiešanej kolónie



Obr. 17 Podiel buniek dvoch kmeňov BY a sok2Δ-P_{TEF1}-GFP v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



Obr. 18 Podiel buniek dvoch kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP a sok2Δ v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.

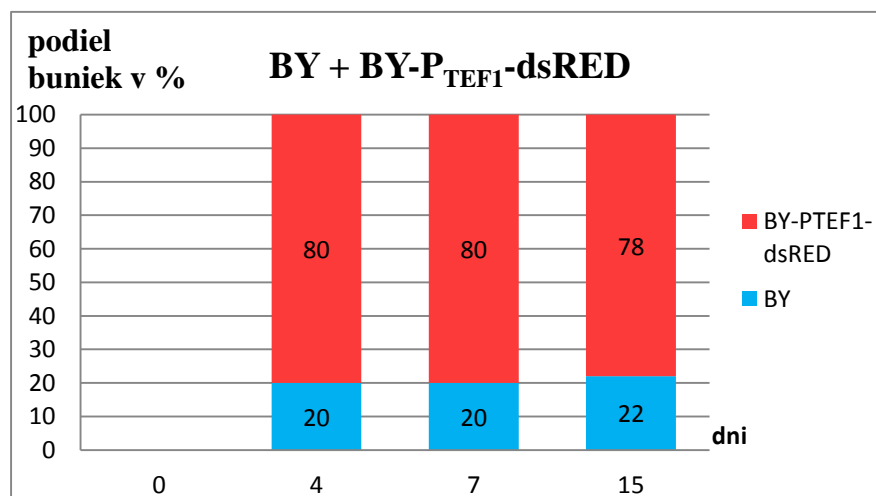
5.1.3 Výber vhodného rodičovského kmeňa pre štúdium kompetície s delečnými kmeňmi

Vzhľadom na zistenie, že má kmeň BY- P_{TEF1} -GFP pri spoločnom raste s kmeňom BY nevýhodu, aj keď je od neho priamo odvodený, otestovala som ďalšie kmene odvodené od BY, ktoré rovnako produkujú fluorescenčný proteín a mohli by spolu s BY slúžiť ako súčasť kontrolnej zmiešanej kolónie.

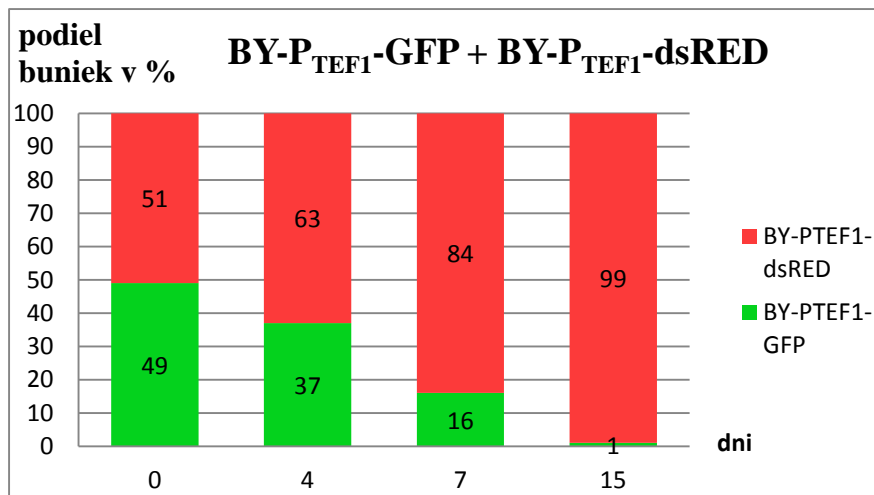
Cieľom tejto časti práce bolo porovnať vývoj zmiešanej kolónie, ktorá obsahovala rodičovský kmeň BY a jeho značený variant BY-Ato1-GFP. Gén *ATO1* je exprimovaný len v určitej fáze rastu (Řičicová *et al.*, 2007), a teda GFP nie je konštitutívne produkovaný po celú dobu vývoja ako pri kmeni BY- P_{TEF1} -GFP. Porovnávala som aj kompetíciu rodičovského kmeňa pri spoločnom raste s jeho značeným variantom BY- P_{TEF1} -dsRED. Tento kmeň je značený fluorescenčným proteínom dsRED, ako marker slúži rezistencia proti kanamycínu. Poslednou dvojicou kmeňov ktoré som porovnávala boli BY- P_{TEF1} -GFP a BY- P_{TEF1} -dsRED. Oba kmene obsahujú gény pre fluorescenčný proteín a každý z nich odlišný selekčný marker, gén pre rezistenciu k nourseothricínu alebo ku kanamycínu.

Postup

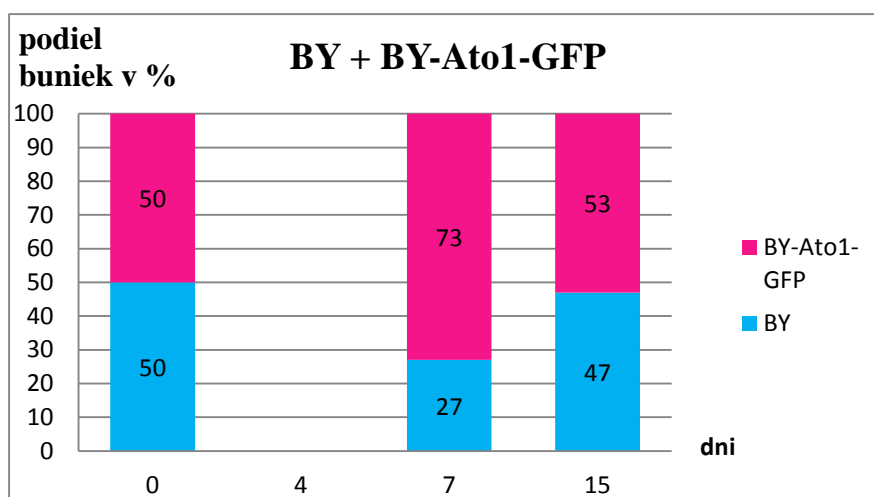
Postup je podobný ako u predchádzajúceho pokusu. Pri skúmaní vývoja zmiešaných kolónií dvojice kmeňov BY + BY- P_{TEF1} -dsRED a BY + BY-Ato1-GFP a zastúpení buniek jednotlivých kmeňov som použila ako selekčné médium YEPG s geneticínom, u BY- P_{TEF1} -GFP + BY- P_{TEF1} -dsRED som použila YEPG s nourseothricínom.



Obr. 19 Podiel buniek dvoch kmeňov BY a BY- P_{TEF1} -dsRED v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



Obr. 20 Podiel buniek dvoch kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



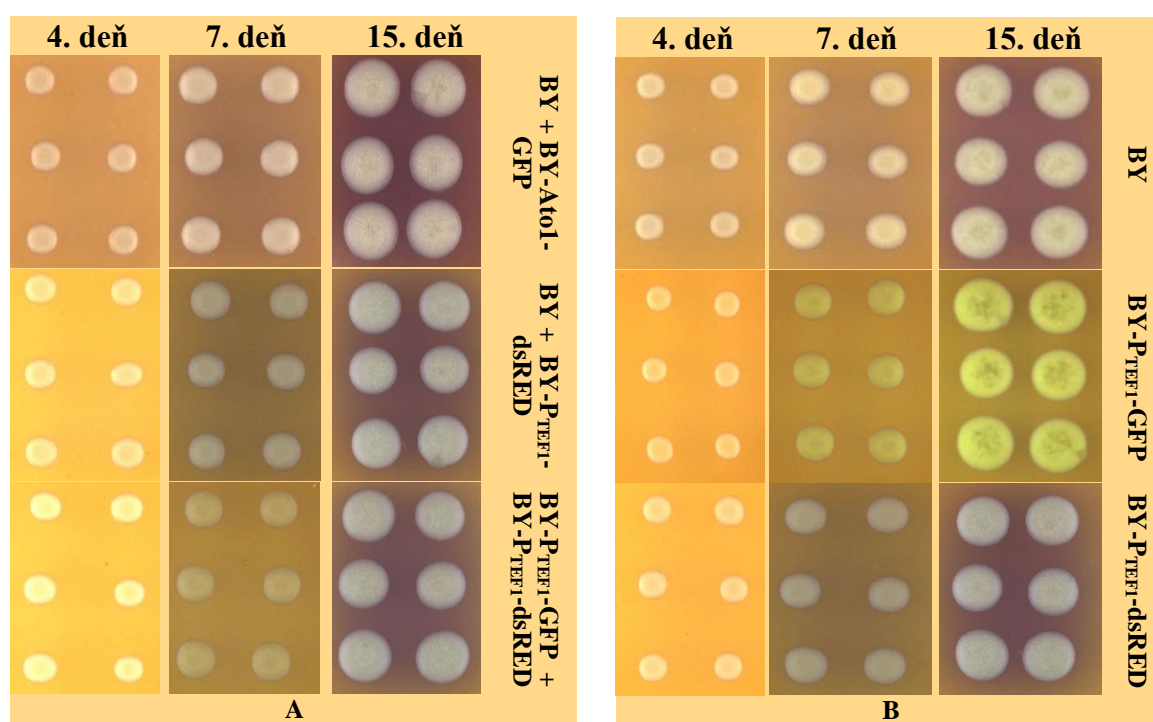
Obr. 21 Podiel buniek dvoch kmeňov BY a BY-Ato1-GFP v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.

Výsledky

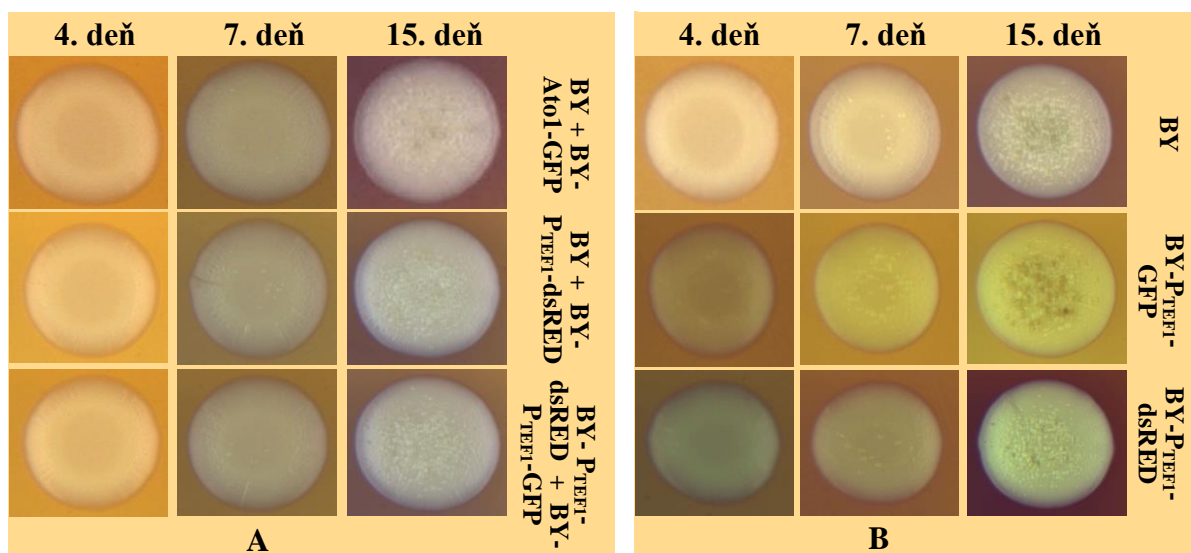
V zmiešaných kolóniách obsahujúcich kmene BY a BY-Ato1-GFP nemá žiadny z nich výraznú výhodu (Obr. 21). V 4. dni vznikla chyba pri kultivácii výsevov robených v 4. dni rastu gigantických kolónií. V 7. dni je vidieť prevahu kmeňa BY-Ato1-GFP, v tomto dni sa však môže jednať o chybu v meraní, pretože nárast buniek bol nízky (menej než 40 kolónií) (Obr. 21). V 15. dni je však vidieť, že podiel buniek oboch kmeňov je porovnateľný s východným pomerom v dni 0. Z toho možno usúdiť, že bol podiel buniek oboch kmeňov v kolónii vyrovnaný počas celej doby vývoja. V kolónii zloženej z kmeňov BY + BY-P_{TEF1}-dsRED mal výraznú prevahu kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED (Obr. 19). Vo

výsevoch robených v 0. deň kultivácie gigantických kolónií nebol stanovený podiel buniek kmeňov BY a BY-P_{TEF1}-dsRED, takže nebol známy východzí pomer buniek v kolónií. Kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED prevažoval tiež pri spoločnom raste s kmeňom BY-P_{TEF1}-GFP (Obr. 20). Vývoj všetkých zmiešaných kolónií, ich prechod do alkalickéj fázy rastu (Obr. 22) a morfológia (Obr. 23) sa výrazne nelíšili.

Z uvedeného vyplýva, že len kmeň BY-Ato1-GFP by mohol byť vhodný ako značený variant do kontrolnej zmiešanej kolónie s kmeňom BY. Jeho výraznou nevýhodou je, že tento proteín plazmatickej membrány produkujú len horné bunky kolónie až v alkalickéj fáze vývoja kolónie po siedmych dňoch rastu (Řičicová *et al.*, 2007). Nie je teda vhodný pre štúdium vývoja kolónií pomocou konfokálnej mikroskopie.



Obr. 22 Porovnanie vývoja a signalizácie gigantických kolónií tvorených (A) dvojicou kmeňov BY + BY-Ato1-GFP, BY + BY- P_{TEF1}-dsRED a BY- P_{TEF1}-dsRED + BY-P_{TEF1}-GFP. (B) samostatnými kmeňmi BY, BY-P_{TEF1}-GFP a BY- P_{TEF1}-dsRED vo vybraných dňoch rastu.



Obr. 23 Porovnanie morfológie gigantických kolónií tvorených (A) dvojicou kmeňov BY + BY-Ato1-GFP, BY + BY-P_{TEF1}-dsRED a BY-P_{TEF1}-dsRED + BY-P_{TEF1}-GFP. (B) samostatnými kmeňmi BY, BY-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED vo vybraných dňoch rastu.

5.1.4 Porovnanie samostatného rastu kmeňov BY, BY-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED

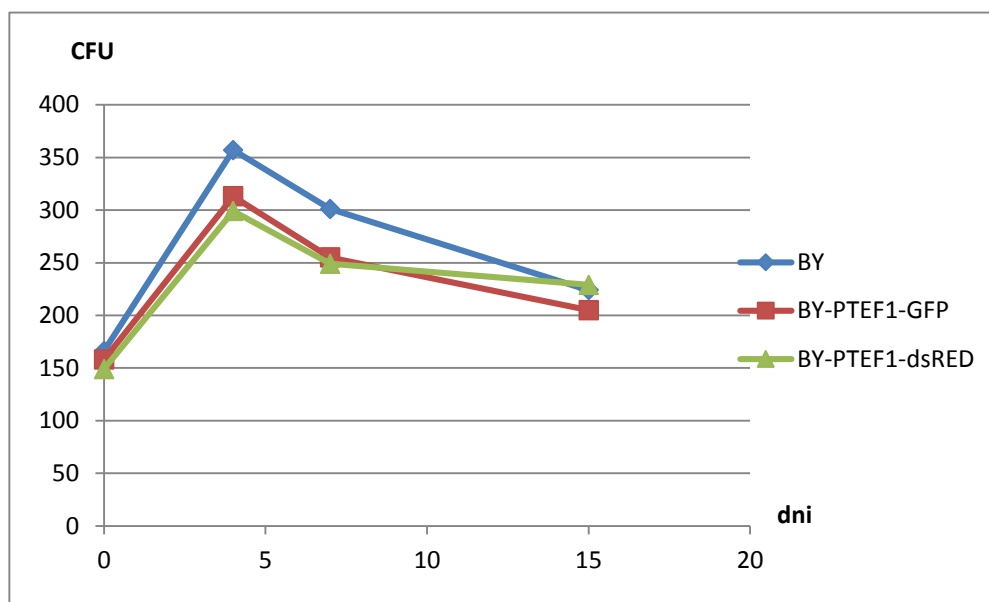
Nakoľko sa ukázalo, že medzi bunkami v gigantickej kolónii tvorenej rodičovským kmeňom a jeho značeným variantom dochádza počas vývoja kolónie k nerovnomernému rastu kmeňov a prevládaniu buniek len jedného z nich, položila som si otázku či bunky týchto kmeňov nemajú problém aj pri samostatnom raste a či majú rovnakú schopnosť vytvoriť kolóniu. Za týmto účelom som porovnávala počty buniek týchto troch kmeňov po výsevoch na YEPG vo vybrané dni. Počet kolónií po výsevoch bol u všetkých porovnávaných kmeňoch zhruba rovnaký, čo naznačuje že ani jeden z kmeňov nemal pri samostatnom raste nevýhodu (Obr. 24).

Postup

Z gigantických kolónií som v dňoch 4, 7 a 15 odobrala biomasu, ktorú som použila pri výsevoch na YEPG. Výsev som urobila aj v dni 0 z pôvodnej suspenzie, ktorá bola východným zdrojom buniek pri príprave gigantických kolónií.

Výsledky

Všetky tri testované kmene mali porovnateľný rastový profil (Obr. 24).



Obr. 24 Rastový profil jednotlivých kmeňov vo vybrané dni rastu na YEPG bol meraný ako počet buniek schopných vytvoriť kolóniu (tzv. CFU: colony forming unit).

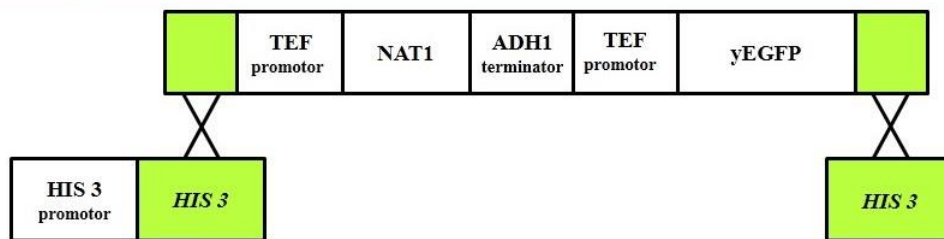
5.2 Vývoj zmiešaných gigantických kolónií – 2. časť

5.2.1 Príprava nových klonov kvasinkových kmeňov značených fluorescenčným proteínom

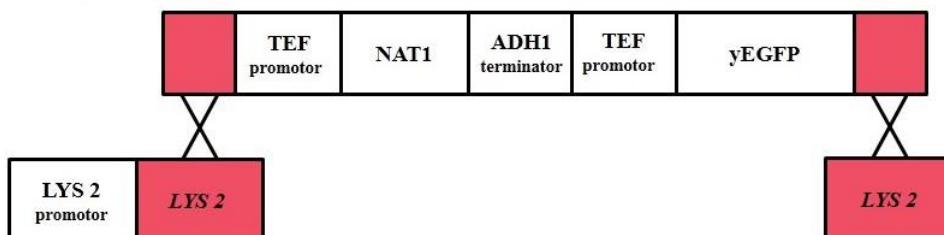
Výsledky ukázali, že značené varianty BY-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED sa chovali odlišne od rodičovského kmeňa BY, z ktorého boli kedysi pripravené, a mali výraznú nevýhodu/výhodu oproti BY. Bolo preto treba vytvoriť nové klony týchto kmeňov, pretože vlastnosti vzniknutých klonov môžu byť výrazne ovplyvnené tým, že bunky kultúry BY použité pri klonovaní nie sú úplne homogénne. Ako východzí kmeň som použila nový homogénny kmeň BY^{new}, získaný z kolónie vzniknutej z jednej bunky. Tento kmeň bol pripravený v Laboratóriu bunkovej biológie kvasinkových kolónií a bol uskladnený v konzerve pri – 80 °C. Cieľovými miestami pre transformáciu boli miesta po deletovaných génoch *LYS2* a *HIS3*.

Postup

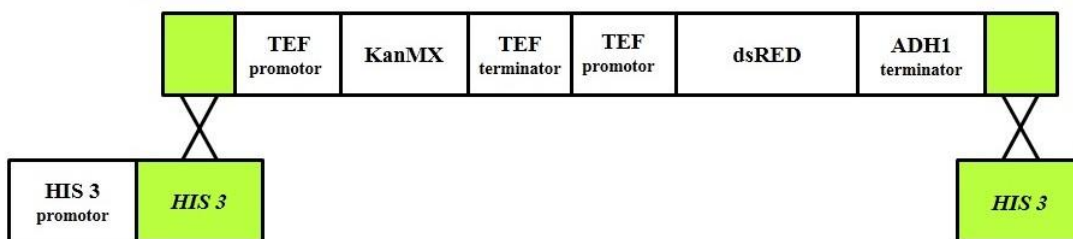
Nové kmene boli pripravené integráciou transformačnej PCR kazety po homologickej rekombinácii do chromozómu kmeňa BY^{new}. Transformačnú integračnú kazetu pre prípravu kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP^{his} som pripravila pomocou PCR s plazmidom pYM-N21 ako templátom. Tento plazmid obsahuje gén pre *yEGFP* pod kontrolou konštitutívneho promótoru TEF a gén *NATI*, kódujúci rezistenciu voči nourseothricínu. Pre prípravu boli použité primery LYS2-del-F a LYS2-del-R, vhodné pre integráciu kazety s génmi priamo do chromozómu do miesta po géne *LYS2* (Obr. 26) a primery HIS3pYM-N-F a HIS3pYM-N-R pre integráciu do miesta po géne *HIS3* (Obr. 25). Rovnaké primery som použila aj pri príprave kazety pre kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{lys}, ako plazmid som zvolila TEF-DsRED-tdimer2 s génom pre dsRED pod kontrolou TEF promótoru a s génom *KanMX* pre rezistenciu proti kanamycínu (Obr. 27, Obr. 28).



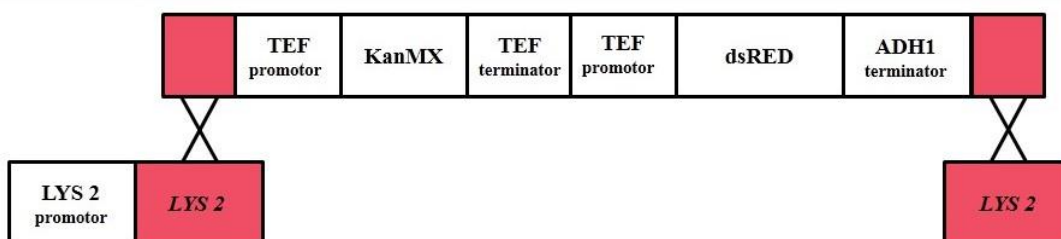
Obr. 25 Schéma integrácie transformačnej kazety obsahujúcej gény *NAT1* a *yEGFP* do miesta po *HIS3* géne.



Obr. 26 Schéma integrácie transformačnej kazety obsahujúcej gény *NAT1* a *yEGFP* do miesta po *LYS2* géne.



Obr. 27 Schéma integrácie transformačnej kazety obsahujúcej gény *KanMX* a *dsRED* do miesta po *HIS3* géne.

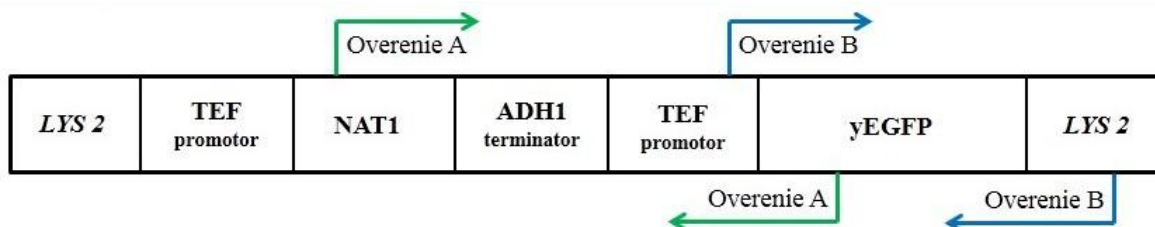


Obr. 28 Schéma integrácie transformačnej kazety obsahujúcej gény *KanMX* a *dsRED* do miesta po *LYS2* géne.

Získané transformanty som overovala na prítomnosť správneho vloženia kazety pomocou PCR. Pre overovanie kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP^{lys} som použila nasledovné dvojice primerov:

NAT1-verif-F + eGFP-verif-R – overenie A (overenie vnútra kazety od génu *NAT1* po gén *yEGFP*) (Obr. 33B, 1-4)

TEF-verif-F + LYS2-verif-R – overenie B (overenie správneho vloženia kazety od zvyšku génu *LYS2* promótor génu *yEGFP*) (Obr. 33D, 1-3)



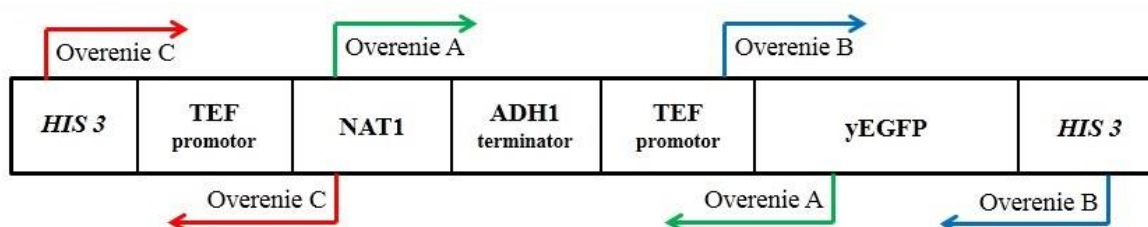
Obr. 29 Schéma overovacích PCR pre kmeň BY-P_{TEF1}-GFP^{lys}.

Dvojice primerov použitých pri overovaní BY-P_{TEF1}-GFP^{his}:

NAT1-verif-F + eGFP-verif-R – overenie A (overenie vnútra kazety od génu *NAT1* po gén *yEGFP*) (Obr. 33B, 5-7)

TEFprom-verif-F + HIS3-ext-verif-R – overenie B (overenie správneho vloženia kazety od promótoru génu *yEGFP* po zvyšok génu *HIS3*) (Obr. 33C, 5-8)

HIS3-ext-verif-F + NAT1-verif-R – overenie C (overenie správneho vloženia kazety od zvyšku génu *HIS3* po gén *NAT1*) (Obr. 33C, 1-4)

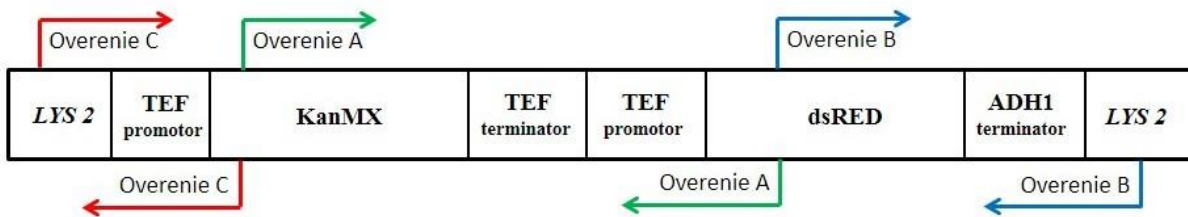


Obr. 30 Schéma overovacích PCR pre kmeň BY-P_{TEF1}-GFP^{his}.

Dvojice primerov použitých pri overovaní BY-P_{TEF1}-dsRED^{lys}:

KAN-verif-F + DsRED-link-R – overenie A (overenie vnútra kazety od génu *KanMX* po gén *dsRED*) (Obr. 33A, 6-7)

DsRED-link-F + LYS2-verif-R – overenie B (overenie správneho vloženia kazety od génu *dsRED* po zvyšok génu *LYS2*) (Obr. 33A, 1-3)



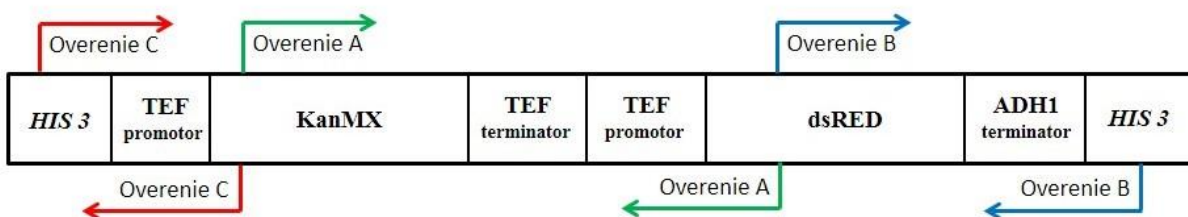
Obr. 31 Schéma overovacích PCR pre kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED^{lys}

Dvojice primerov použitých pri overovaní BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}:

KAN-verif-F + DsRED-link-R – overenie A (overenie vnútra kazety od génu *KanMX* po gén *dsRED*) (Obr. 33A, 4-5)

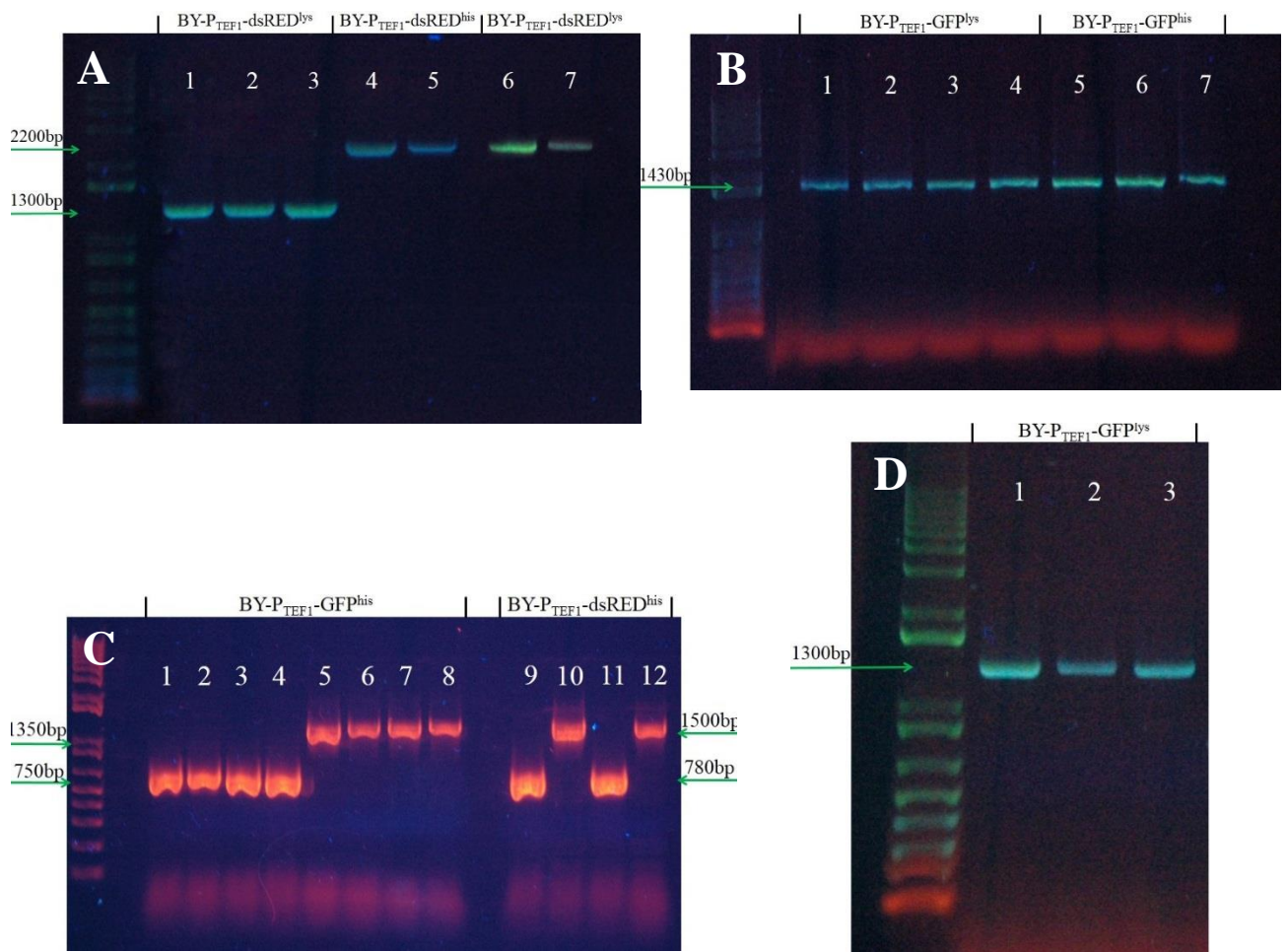
HIS3-ext-verif-F + KAN-verif-R – overenie C (overenie správneho vloženia kazety od zvyšku génu *HIS3* po gén *dsRED*) (Obr. 33C, 9,11)

DsRED-link-F + HIS3-ext-verif-R – overenie B (overenie správneho vloženia kazety od génu *dsRED* po zvyšok génu *HIS3*) (Obr. 33C, 10,12)



Obr. 32 Schéma overovacích PCR pre kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}

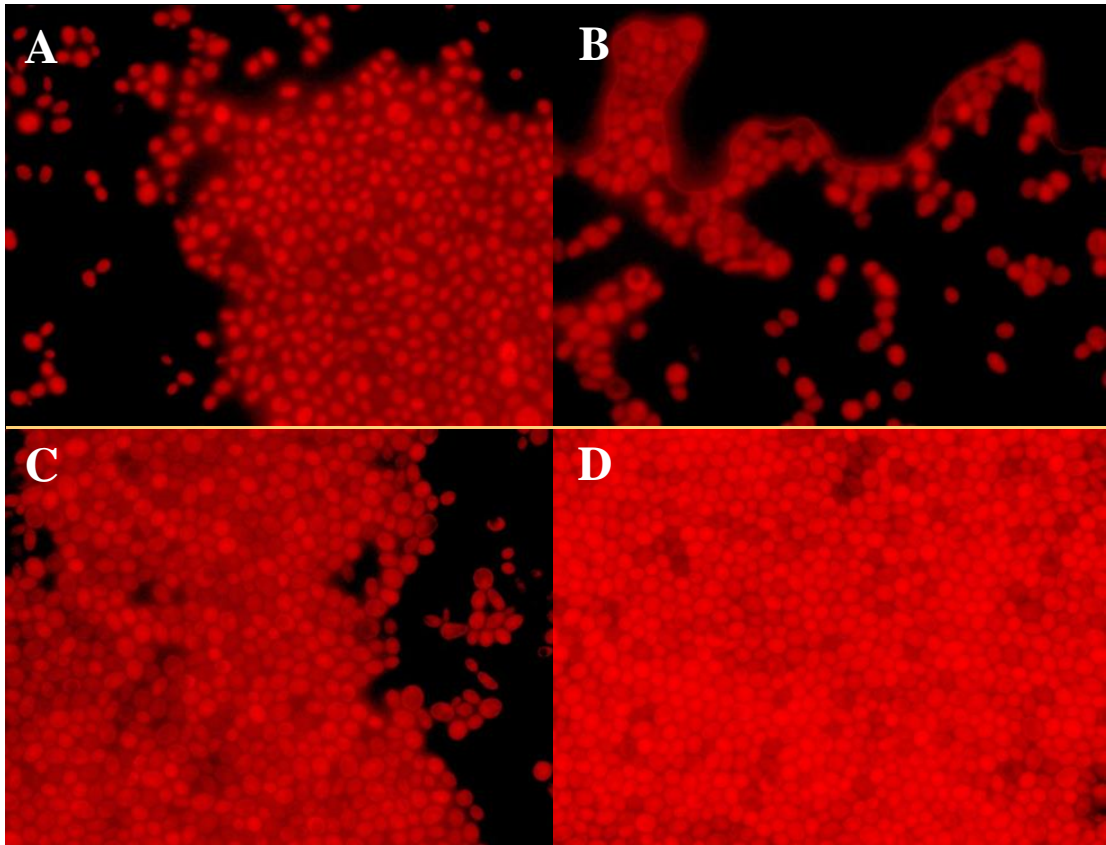
U klonov overených PCR som kontrolovala produkciu jednotlivých fluorescenčných proteínov pozorovaním buniek pomocou fluorescenčného mikroskopu (Obr. 34, Obr. 35).



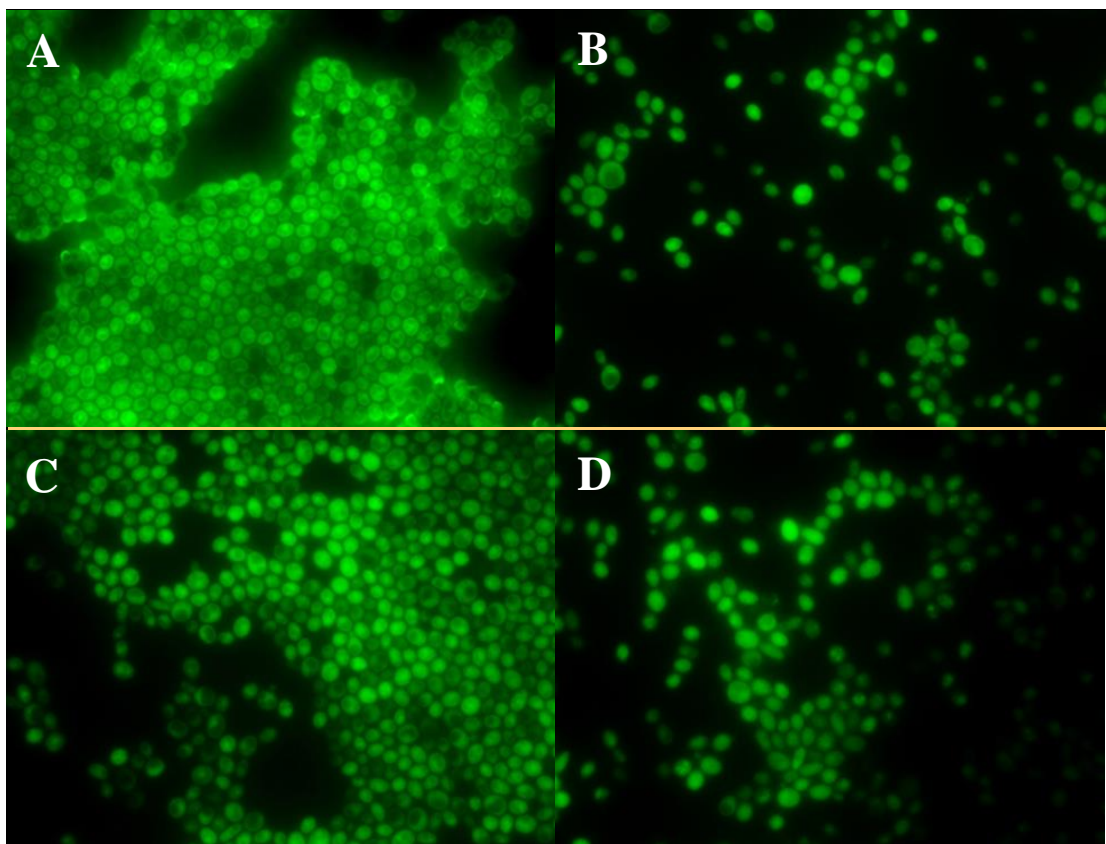
Obr. 33 Overenie správneho vloženia transformačnej kazety do kmeňa BY- P_{TEF1} -dsRED^{lys}, BY- P_{TEF1} -dsRED^{his}, BY- P_{TEF1} -GFP^{lys} a BY- P_{TEF1} -GFP^{his}.

Výsledky

Podarilo sa mi pripraviť kmene BY- P_{TEF1} -GFP^{his}, BY- P_{TEF1} -GFP^{lys} a BY- P_{TEF1} -dsRED^{his}, BY- P_{TEF1} -dsRED^{lys}. Obr. 33 ukazuje výsledok overovacích PCR zobrazujúcich, že kazeta bola vložená do správneho miesta. U všetkých získaných klonov vznikli produkty o správnej veľkosti. Správne vloženie kazety som overila aj pomocou sekvenácie. Bunky všetkých získaných klonov produkovali podľa predpokladu do cytosolu patričný fluorescenčný proteín, ako je vidieť na Obr. 34 a 35.



Obr. 34 Fluorescencia proteínu dsRED v cytosole nových kmeňov. (A,B) Bunky kmeňa BY- P_{TEF1} -dsRED^{his}. (C,D) Bunky kmeňa BY- P_{TEF1} -dsRED^{lys}.



Obr. 35 Fluorescencia proteínu GFP v cytosole nových kmeňov. (A,B) Bunky kmeňa BY- P_{TEF1} -GFP^{his}. (C,D) Bunky kmeňa BY- P_{TEF1} -GFP^{lys}.

5.2.2 Overenie vlastností nových klonov a porovnanie s rodičom BY^{new}

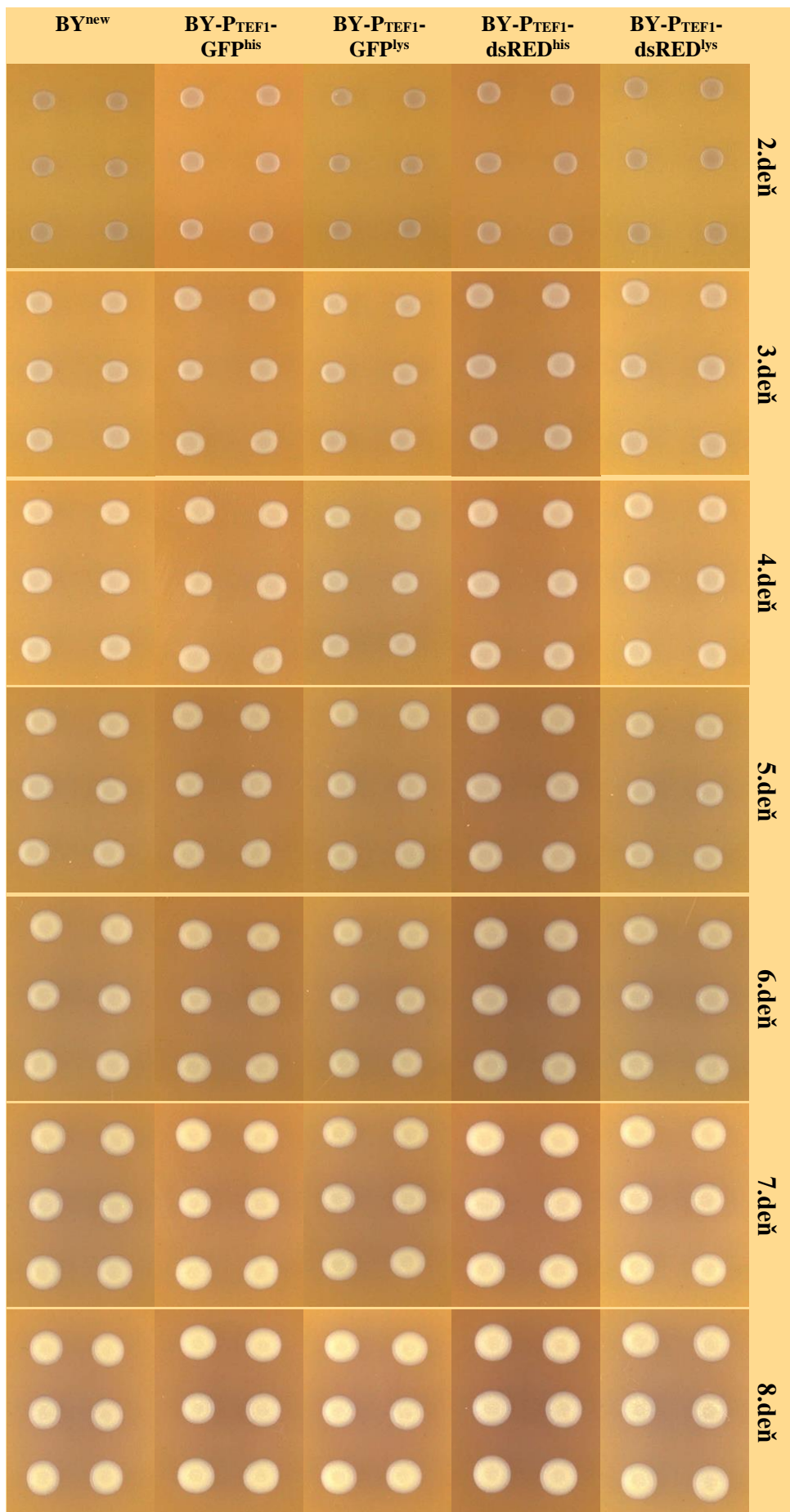
Aby som mohla z pripravených klonov vybrať najvhodnejší pre ďalšiu prácu so zmiešanými kultúrami, porovнала som vývoj ich gigantických kolónií pri raste na GM-BKP médiu s kolóniami tvorenými rodičovským kmeňom BY^{new}.

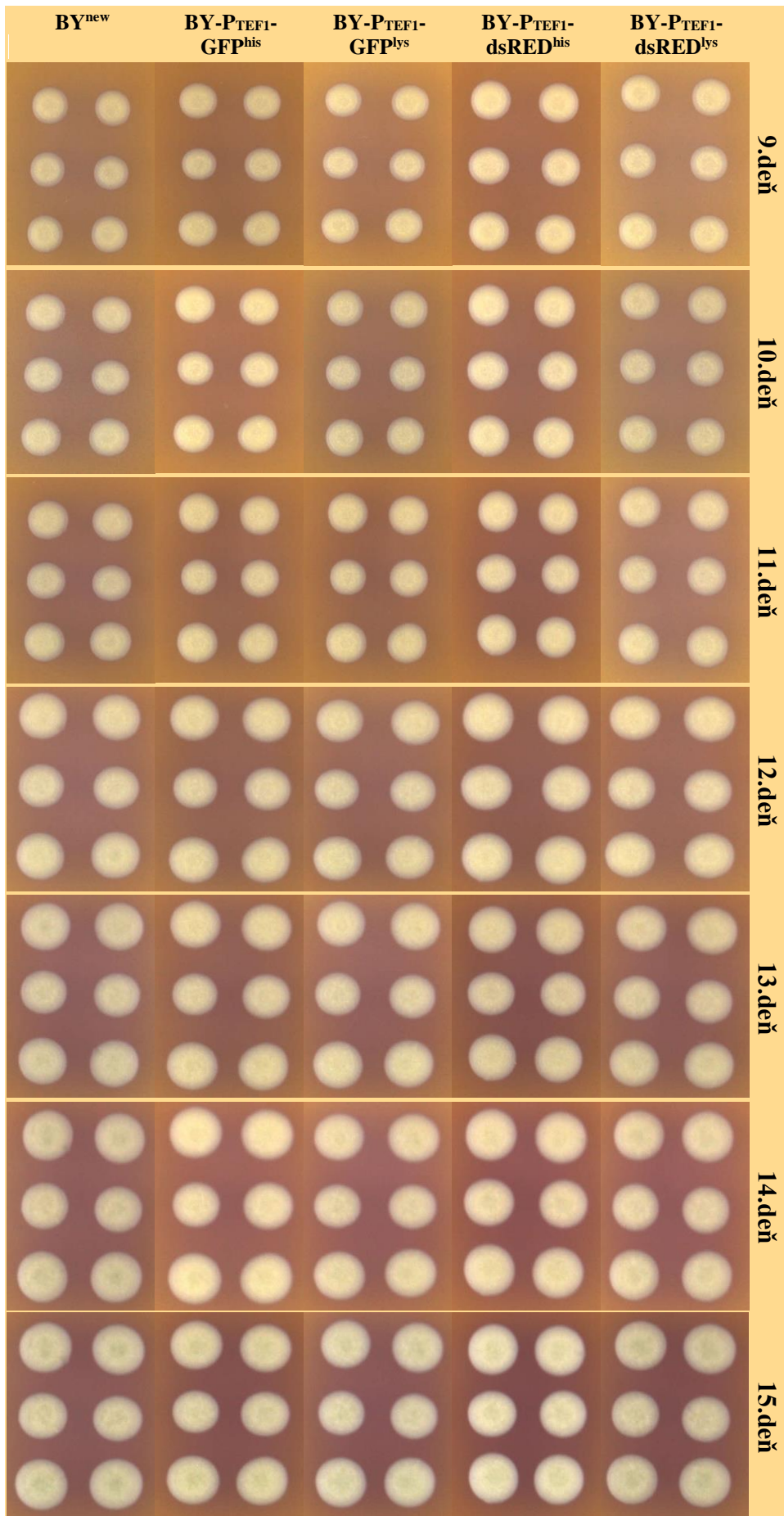
Postup

Na pevné médium GM-BKP bolo štandardne zaočkovaných 6 gigantických kolónií všetkých získaných klonov. Kolónie boli zaočkované 1 μ l suspenzie buniek jednotlivých klonov, ktoré predtým rástli 24 hodín na YEPG. Bol pozorovaný rast kolónií, nástup alkalickéj fázy ich vývoja a ich morfológia.

Výsledky

Z Obr. 36 je vidieť, že kolónie porovnávaných kmeňov rastú a vstupujú do alkalickéj fázy porovnateľne s východným kmeňom BY^{new}; a aj morfológia kolónií je podobná. Pre nasledujúce pokusy som používala kmene s transformačnou kazetou vloženou v his mieste.





Obr. 36 Vývoj kolónií novo pripravených kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP^{lys}, BY-P_{TEF1}-GFP^{his}, BY-P_{TEF1}-dsRED^{lys} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} v porovnaní s rodičovským neznačeným kmeňom BY^{new}, na miskách s médiom GM-BKP počas 15. dní rastu.

5.2.3 Vývoj kontrolných gigantických kolónií tvorených zmesou buniek BY^{new} a nových klonov BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}

Po vytvorení nových klonov bolo treba porovnať rast kolónií vznikajúcich zo zmesi novovytvorených kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP^{his} alebo BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} s rodičovským kmeňom BY^{new} a zistiť, či sa v priebehu vývoja mení pomer buniek oboch kmeňov tvoriacich zmiešanú kolóniu. Okrem toho som testovala aj rast a vlastnosti zmiešanej kolónie tvorenej oboma označenými kmeňmi odvodenými od rodičovského kmeňa, teda kmeňmi BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}. V prípade všetkých troch zmiešaných kolónií som pozorovala rozmiestnenie buniek jednotlivých kmeňov pomocou fluorescenčnej lupy a konfokálneho mikroskopu.

Postup

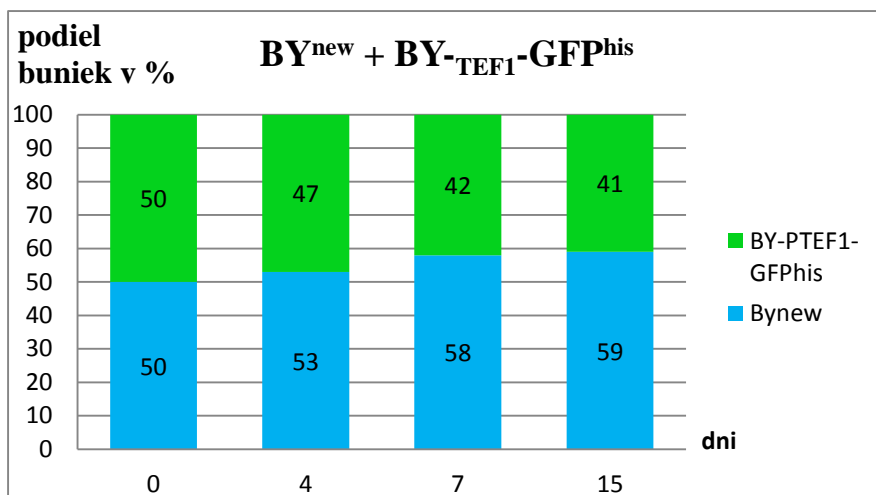
Test rastu kmeňov bol rovnaký ako v predchádzajúcich pokusoch. Vychádzala som z gigantických kolónií, ktoré narástli z 1 µl kvapky suspenzie vytvorenej zmiešaním dvoch kmeňov v pomere 1:1 ich mokrej hmotnosti. Suspenzie obsahovali nasledovné dvojice kmeňov:

BY^{new} + BY-P_{TEF1}-GFP^{his}

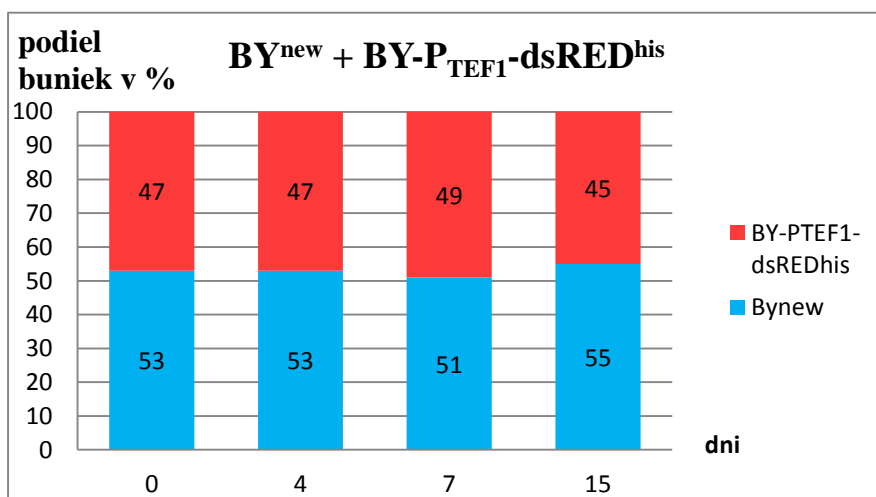
BY^{new} + BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}

BY-P_{TEF1}-GFP^{his} + BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}

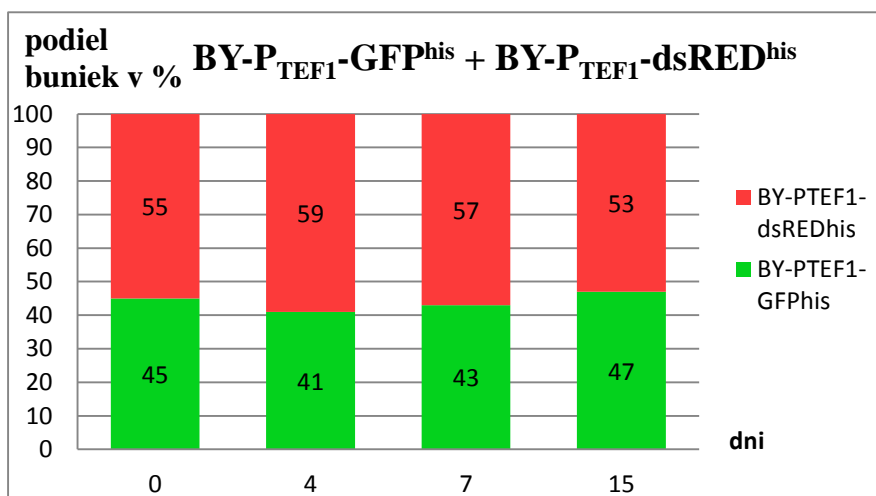
V 4., 7. a 15. dni kultivácie som odobranú biomasu z týchto zmiešaných kolónií použila pri výsevoch na YEPG, ktorými som zisťovala pomer buniek konkrétnych kmeňov v biomase patričných kolónií. Ako selekčné médium som použila YEPG s nourseothricínom, alebo s geneticínom. Usporiadanie buniek oboch kmeňov som pozorovala pod fluorescenčným mikroskopom ihneď po zaočkovaní gigantickej kolónie na misku s GM-BKP médiom. Ďalšie pozorovanie som robila fluorescenčnou lupou v 15. dni vývoja kolónie.



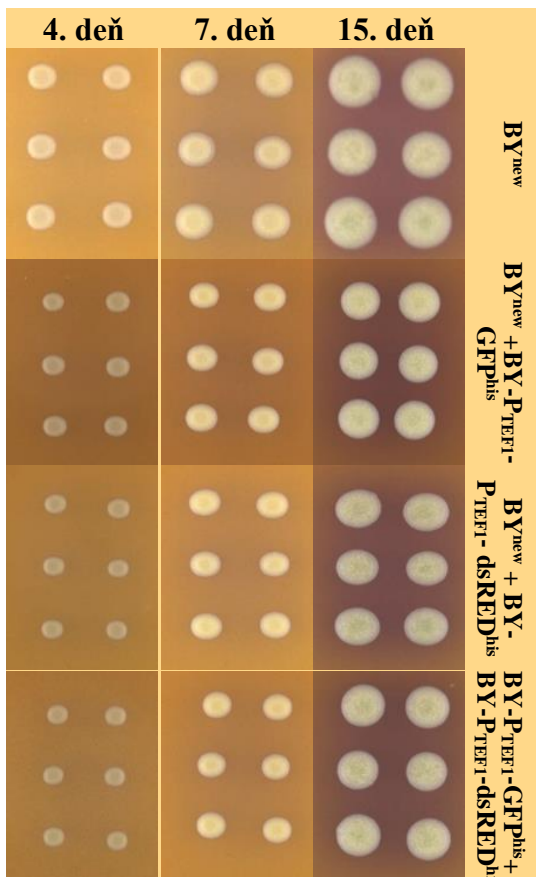
Obr. 37 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY^{new} a BY-P_{TEF1}-GFP^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



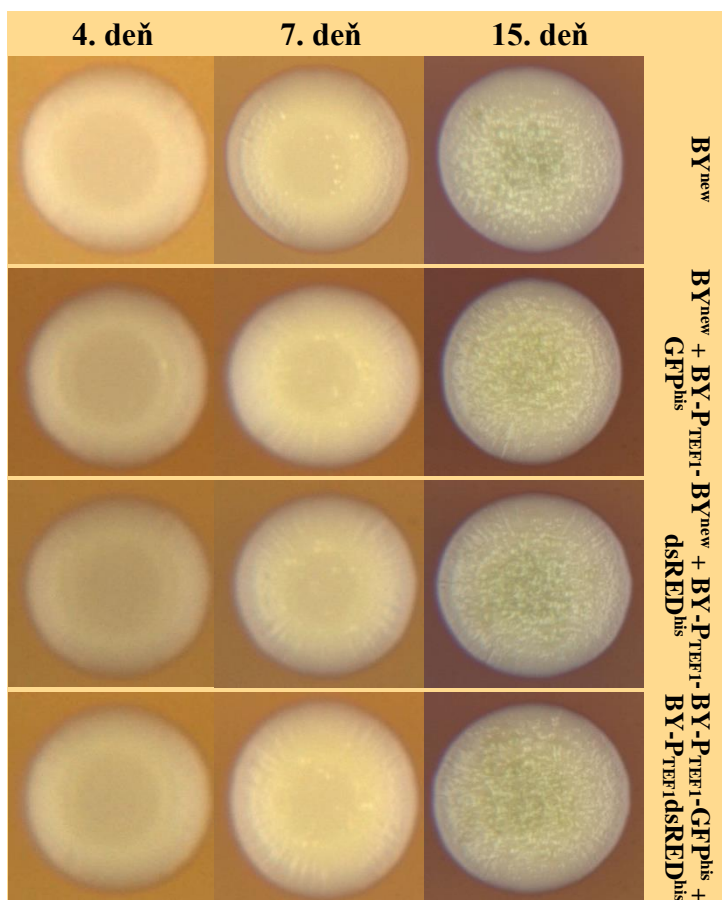
Obr. 38 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY^{new} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



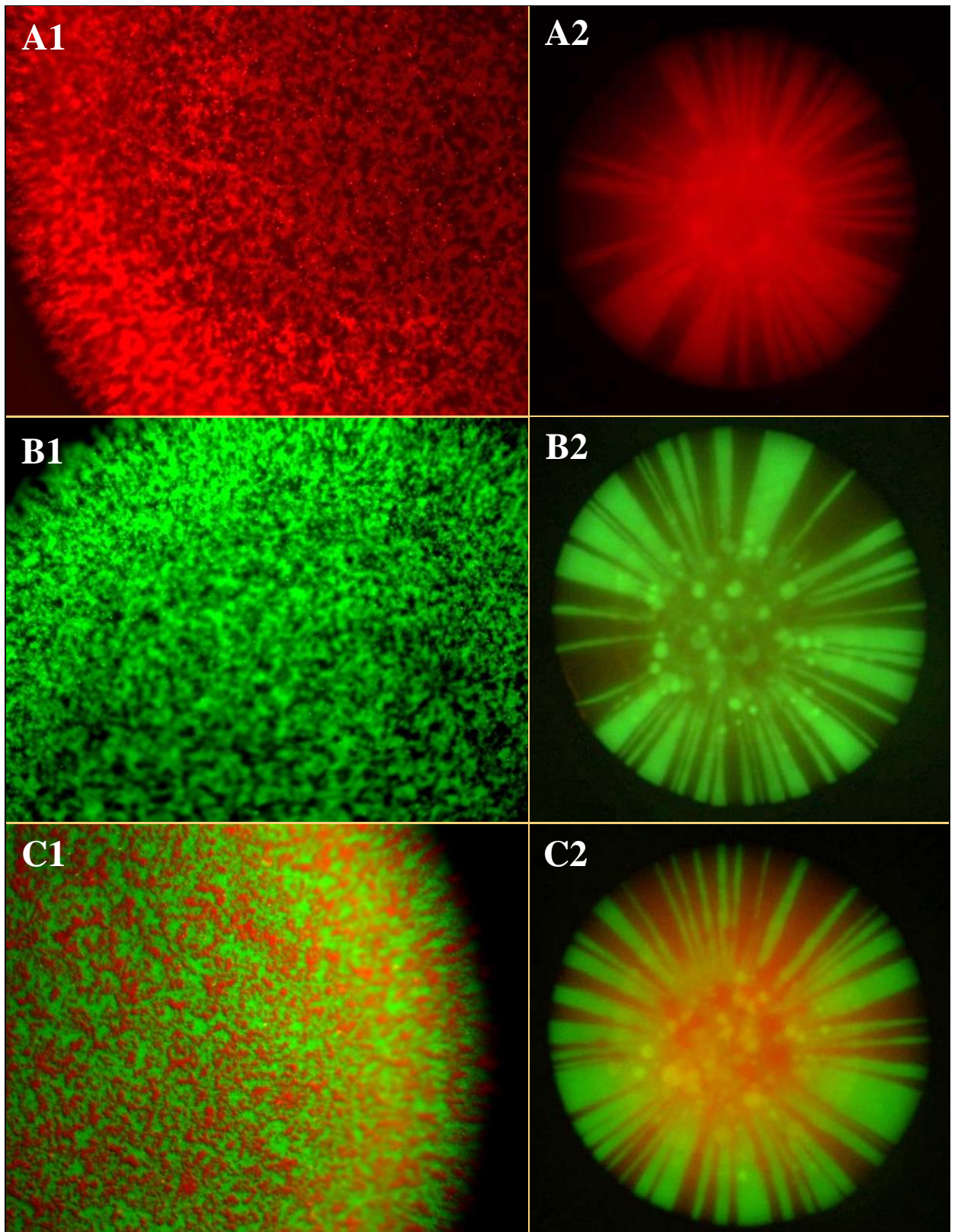
Obr. 39 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



Obr. 40 Porovnanie amoniakovej signalizácie zmiešaných kolónií v konkrétnych dňoch ich vývoja s východným rodičovským kmeňom BY^{new}.



Obr. 41 Porovnanie morfológie zmiešaných kolónií v konkrétnych dňoch ich vývoja s východným rodičovským kmeňom BY^{new}.



Obr. 42 Usporiadanie buniek jednotlivých kmeňov v gigantických kolóniách.

- (A) Gigantická zmiešaná kolónia tvorená kmeňmi BY^{new} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} v 2. (1) a 15. (2) dni.
 (B) Gigantická zmiešaná kolónia tvorená kmeňmi BY^{new} a BY-P_{TEF1}-GFP^{his} v 2. (1) a 15. (2) dni.
 (C) Gigantická zmiešaná kolónia tvorená kmeňmi BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} a BY-P_{TEF1}-GFP^{his} v 2. (1) a 15. (2) dni.

Výsledky

Z obr. 40 a 41 sa dá pozorovať, že novo pripravené kmene majú podobnú morfológiu a prechod do alkalickéj fázy rastu ako východzí rodičovský kmeň.

Vo všetkých variantoch zmiešaných kolónií zostáva nastavený východzí pomer buniek oboch kmeňov rovnaký vo všetkých analyzovaných časoch (Obr. 37, 38, 39). Je viditeľný len nevýrazný nárast v prospech buniek kmeňa BY^{new} u kolónií BY^{new} + BY-P_{TEF1}-GFP^{his} (Obr. 37).

Rozmiestnenie buniek jednotlivých kmeňov sa zdá byť vo všetkých troch typoch zmiešaných kolónií rovnomerné (Obr. 42).

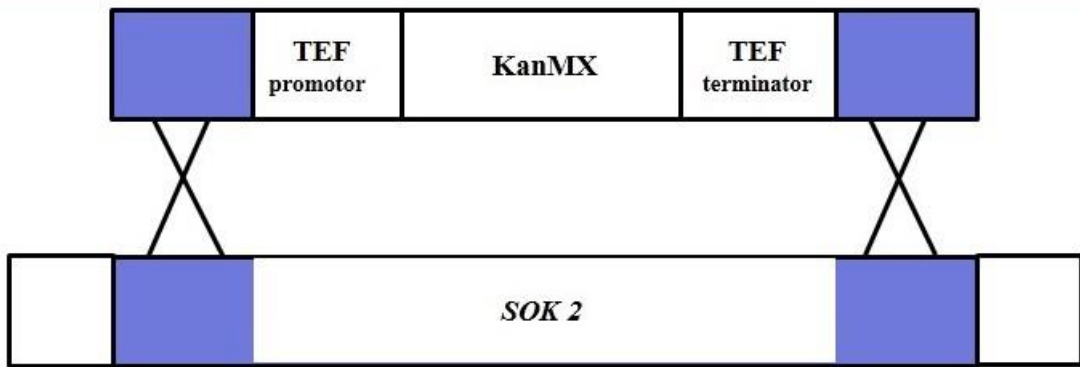
Z uvedených výsledkov vyplýva, že vedľa rodičovského kmeňa BY^{new} je možné pre štúdium zmiešaných kolónií použiť oba pripravené kmene.

5.2.4 Príprava nových klonov kvasinkových kmeňov s deletovaným génom *SOK2*

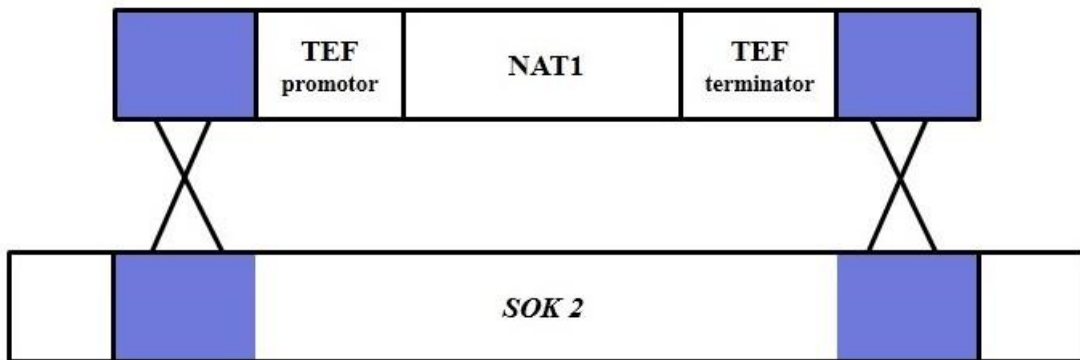
Pretože sa ukázalo, že predchádzajúce varianty kmeňa BY^{new} sa líšili od pôvodného neznačeného kmeňa, aj keď z neho boli odvodené, rozhodla som sa pre ďalšiu prácu pripraviť aj nové klony kmeňov s deléciou génu *SOK2*. Pôvodné kmene s deléciou v tomto géne boli získané zo zbierky Euroscarf, takže sa mohli výrazne líšiť od novo používaného kmeňa BY^{new}. Ako východzie kmene pre deléciu som použila BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}, ktoré som vytvorila v predchádzajúcom pokuse, pretože sa ukázalo, že vnesenie génov GFP alebo dsRED spolu s génmi pre rezistenciu nezmenili vlastnosti buniek tak, aby tieto kmene znevýhodnili v porovnaní s rodičovským kmeňom.

Postup

Ako templát pre prípravu transformačnej delečnej kazety som použila časť plazmidu pUG6 s génom *KanMX* pre kmeň BY-P_{TEF1}-GFP^{his} (Obr. 43) a plazmid pUG6-25 s génom *NAT1* pre kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} (Obr. 44). V oboch prípadoch boli použité primery sok2-del-F a sok2-del-R.



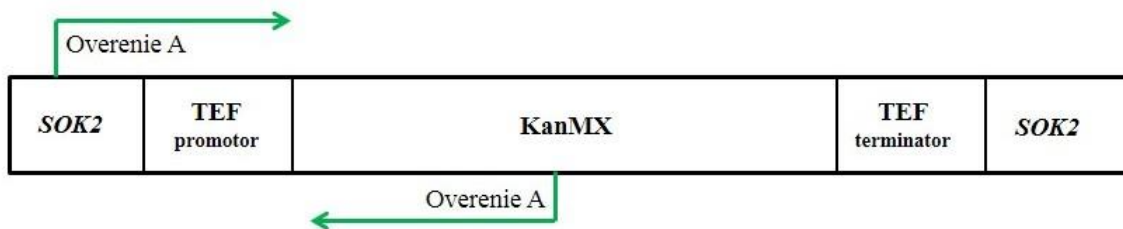
Obr. 43 Schéma delécie génu *SOK2* pomocou vloženia transformačnej kazety obsahujúcej gén *KanMX*.



Obr. 44 Schéma delécie génu *SOK2* pomocou vloženia transformačnej kazety obsahujúcej gén *NAT1*.

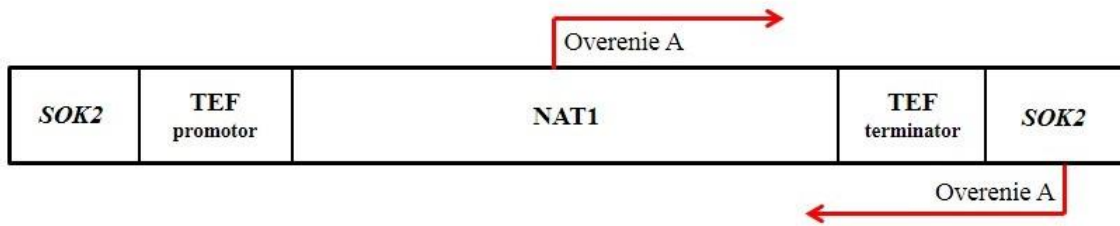
Správnosť vloženia kazety do genómu som overila pomocou PCR s nasledujúcimi dvojicami primerov:

sok2-del-over-F + KAN-verif-R – overenie A pre kmeň $sok2\Delta$ -P_{TEF1}-GFP^{his} (overenie od zvyšku génu *SOK2* po gén *KanMX*) (Obr. 47A, 1-6)



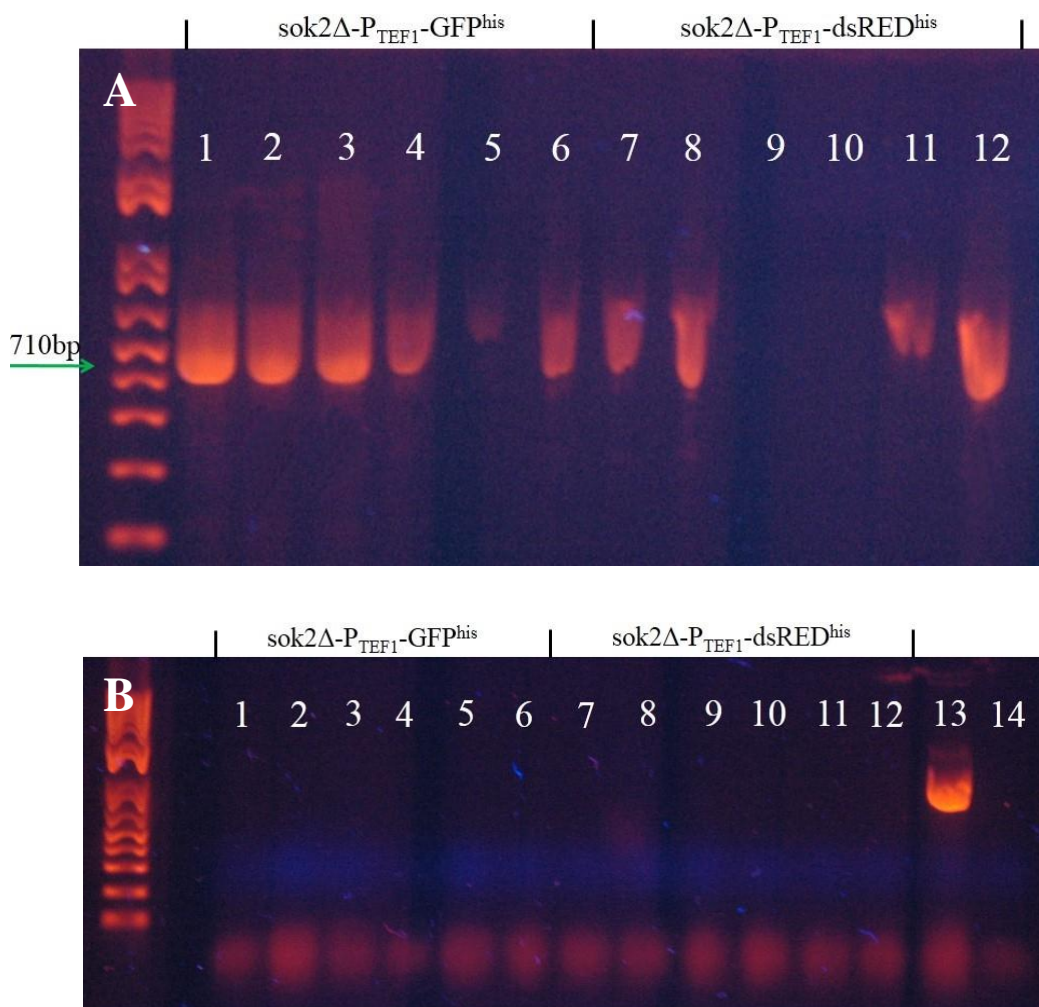
Obr. 45 Schéma overovacích PCR pre kmeň $sok2\Delta$ -P_{TEF1}-GFP^{his}

NAT1-verif-F + sok2-del-over-R – overenie A pre kmeň $sok2\Delta$ -P_{TEF1}-dsRED^{his} (overenie od génu *NAT1* po zvyšok génu *SOK2*) (Obr. 47A, 7-12)



Obr. 46 Schéma overovacích PCR pre kmeň $sok2\Delta$ -P_{TEF1}- dsRED^{his}

Pre negatívnu kontrolu som použila primery: **sok2-over-int-F** + **sok2-del-over-R**. Prvý primer je z génu *SOK2*, ktorý by mal byť deletovaný. V prípade, že transformácia bola úspešná, produkt nevznikne. Správnosť negatívnej kontroly som overila pomocou PCR vzorky, u ktorej som vedela, že produkt vznikne (Obr. 47B, 13). Tretím typom kontroly bola PCR zmesi, ktorá obsahovala len primery a polymerázu (Obr. 47B, 14).



Obr. 47 Overenie správnej integrácie PCR kazety do genómu.

Výsledky

Podarilo sa mi pripraviť požadované kmene $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - GFP^{his} a $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - $dsRED^{his}$. Výsledky overenia delécie génu *SOK2* u získaných klonov pomocou PCR sú na Obr. 47. Tieto kmene som použila v nasledujúcich pokusoch.

5.2.5 Vývoj zmiešaných kolónií tvorených zmesou buniek BY^{new} a nových klonov kmeňov s deléciou génu *SOK2*

Tak ako pri porovnávaní rastu zmiešaných kolónií obsahujúcich predchádzajúci kmeň $sok2\Delta$, aj v tomto prípade som zisťovala mieru kompetície buniek medzi novými kmeňmi s deléciou v géne *SOK2* a rodičovským kmeňom BY^{new} pri spoločnom raste v gigantických kolóniách. *Sok2* delečné mutanty som porovnávala aj s ich rodičovskými kmeňmi BY - P_{TEF1} - GFP^{his} a BY - P_{TEF1} - $dsRED^{his}$.

Postup

Postup je rovnaký ako pri predošlých porovnávaníach rastu kmeňov v zmiešaných kolóniách. Z východzej suspenzie s pomerom oboch kmeňov 1:1 som zaočkovoala zmiešané kolónie na GM médium s BKP. Následne som z kolónií, ktoré vyrástli odobrala biomasu v 4., 7. a 15. dni, z ktorej som robila výsevy na YEPG médium. Selekčným médium pre zistenie zastúpenia buniek jednotlivých kmeňov bolo YEPG s antibiotikami.

Gigantické kolónie som zaočkovoala zmesou nasledujúcich dvojíc kmeňov:

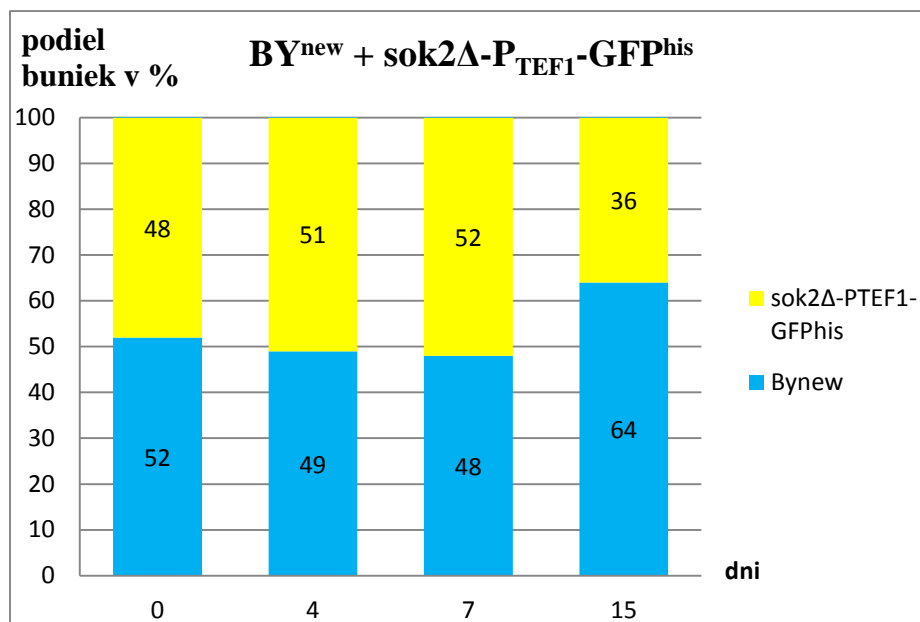
BY^{new} + $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - GFP^{his}

BY^{new} + $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - $dsRED^{his}$

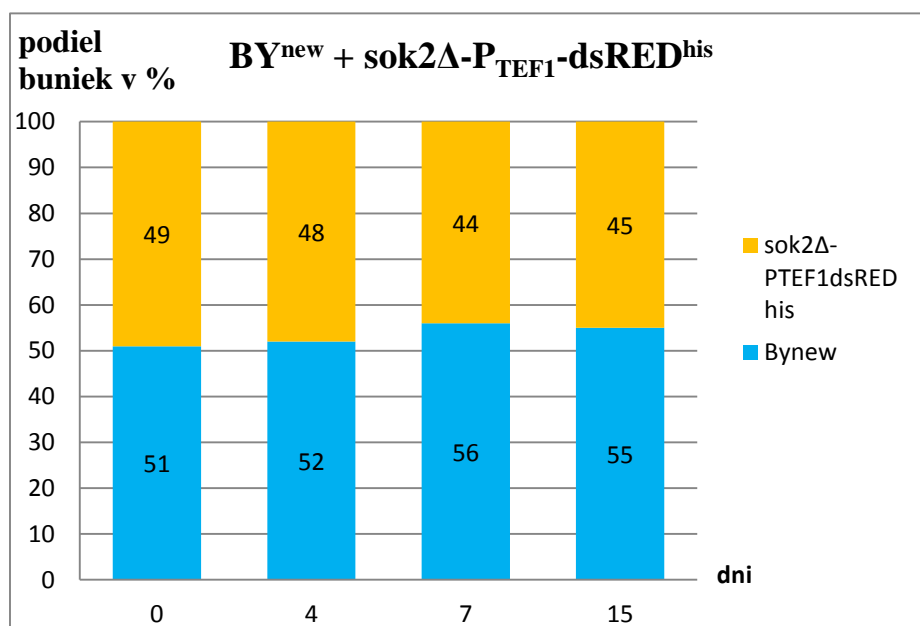
BY - P_{TEF1} - $dsRED^{his}$ + $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - $dsRED^{his}$

BY - P_{TEF1} - GFP^{his} + $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - GFP^{his}

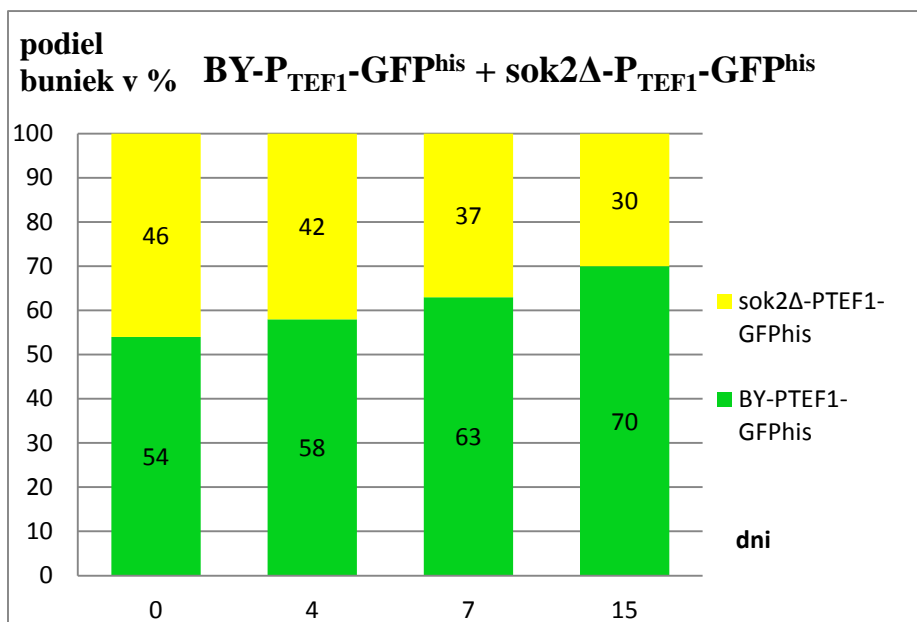
Pri výsevoch som použila ako selekčné médium YEPG s nourseothricínom, u BY - P_{TEF1} - GFP^{his} + $sok2\Delta$ - P_{TEF1} - GFP^{his} som použila geneticín.



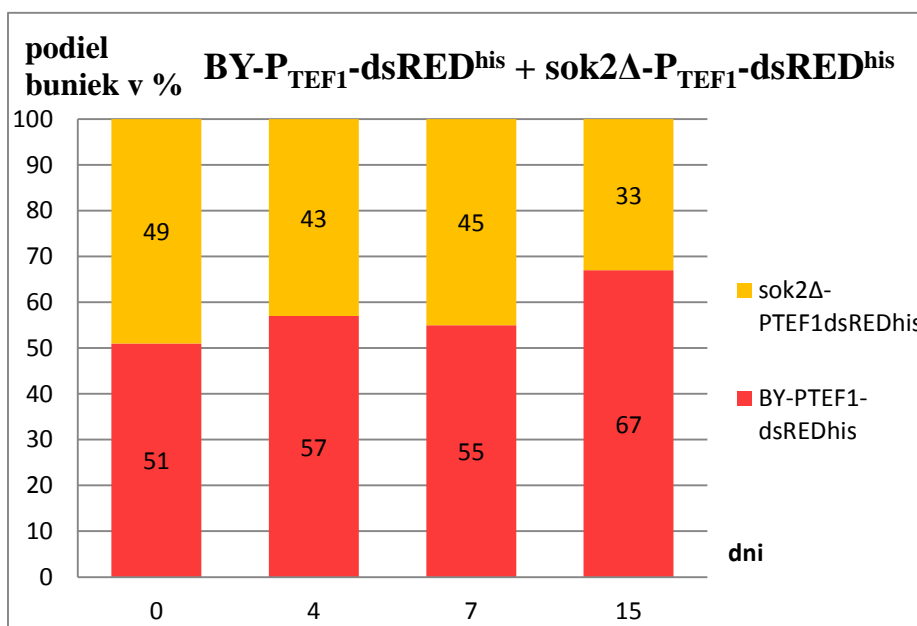
Obr. 48 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY^{new} a sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



Obr. 49 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY^{new} a sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



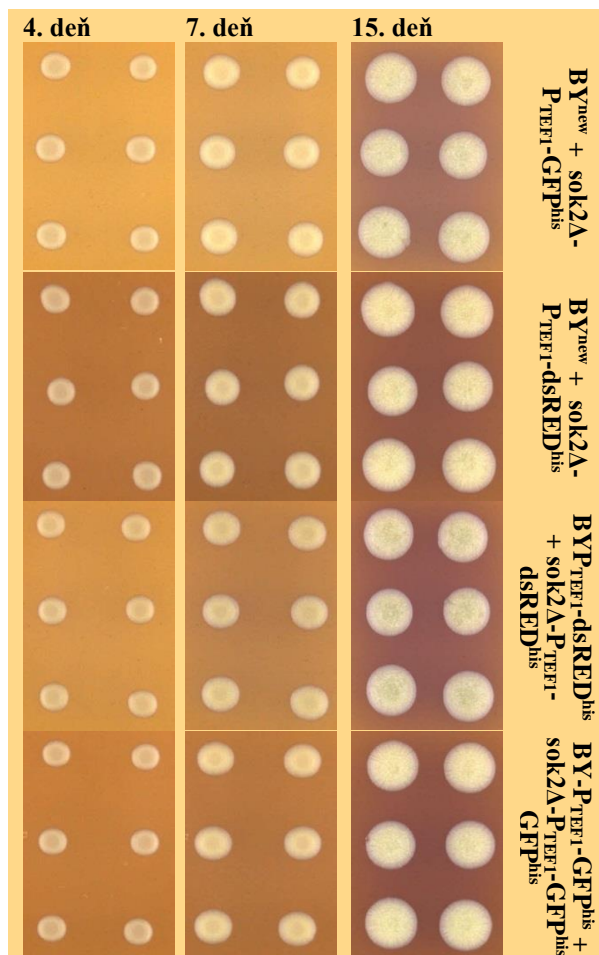
Obr. 50 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.



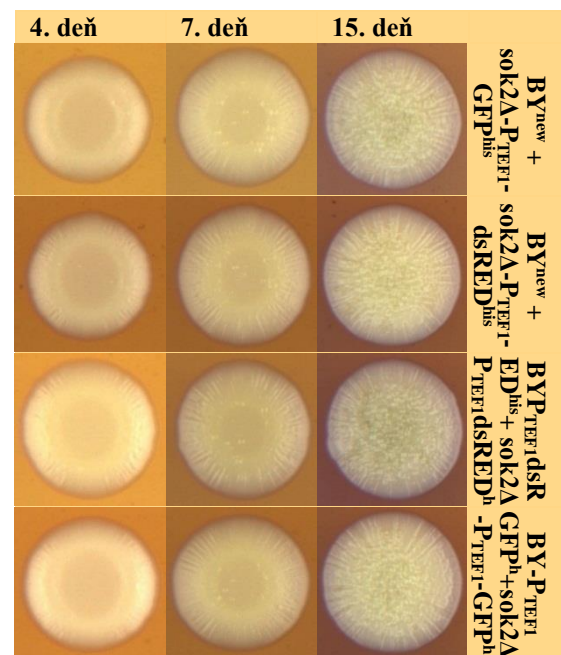
Obr. 51 Podiel buniek dvoch nových kmeňov BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} a sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} v gigantických kolóniách vo vybraných dňoch rastu kolónie.

Výsledky

Pri porovnaní rastu zmiešaných kolónií pozostávajúcich z deletantov a BY^{new} kmeňa na Obr. 48, 49, 50 a 51 sa ukázalo nasledovné. Pri kombinácii BY^{new} + sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} som po celú dobu kultivácie pozorovala vyrovnaný rast oboch kmeňov. Podobne vyrovnaný podiel buniek som pozorovala aj pri kombinácii buniek BY^{new} + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his}; v 15. dni však v oboch prípadoch začali prevládať bunky rodičovského kmeňa. Pri kombinácii BY-P_{TEF1}-GFP^{his} + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} aj BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} + sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} bola viditeľná prevaha rodičovského kmeňa, v tomto prípade BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} počas celého vývoja zmiešanej kolónie. Všetky zmiešané kolónie mali porovnateľný priebeh vývoja, signalizáciu (Obr. 52) a morfológiu (Obr. 53)



Obr. 52 Porovnanie amoniakovej signalizácie zmiešaných kolónií v konkrétnych dňoch ich vývoja



Obr. 53 Porovnanie morfológie zmiešaných kolónií v konkrétnych dňoch ich vývoja

6 Diskusia

Kvasinky väčšinou poznáme zo štúdií mikrobiálnych kultúr rastúcich v tekutých médiách ako jednobunkové organizmy. V prírode, pri raste na pevných povrchoch vytvárajú mnohobunkové spoločenstvá pripevnené na pevné povrchy (Palková, 2004; Stoodley *et al.*, 2002), rysmi podobnými mnohobunkovým organizmom. Bunky v týchto spoločenstvách, teda aj v kolóniách, diferencujú v závislosti na svojom umiestnení v kolónii do subpopulácií, ktoré synchronizujú svoj nasledujúci vývoj a majú charakteristické vlastnosti. To im poskytuje výhodu pri raste v nepriaznivých prírodných podmienkach (Čáp *et al.*, 2012; Váchová *et al.*, 2013). V prírodných ekosystémoch sa vyskytuje veľké množstvo rôznych druhov mikroorganizmov. V takýchto podmienkach jednotlivé druhy navzájom súťažia o živiny a priestor. Táto kompetícia neprebíha len medzi nepríbuznými organizmami, ale aj medzi bunkami populácie rovnakého druhu. Výhodu pri prežití majú tie bunky, ktoré sa dokážu lepšie prispôbiť podmienkam, napríklad zmenou metabolizmu (Hibbing *et al.*, 2010).

V tejto práci bolo cieľom pripraviť vhodný systém, umožňujúci študovať vývoj vnútornej štruktúry gigantickej kolónie až na úroveň jednotlivých buniek, pomocou konfokálnej mikroskopie a zistiť, ako môže byť tento vývoj ovplyvnený skutočnosťou, že gigantickú kolóniu vytvára okrem buniek normálneho rodičovského kmeňa aj bunky kmeňa defektného v gène dôležitom pre adaptívny metabolizmus. Pre odlišenie buniek dvoch rôznych kmeňov vytvárajúcich gigantickú kolóniu sa využilo značenie jedného z nich pomocou produkcie fluorescenčného proteínu (FP) vnesením génu kódujúceho tento proteín, čo by malo umožniť pozorovanie buniek pod konfokálnym mikroskopom (Sheff & Thorn, 2004). Spolu s génom pre FP tento kmeň obsahoval tiež gén zaisťujúci rezistenciu na antibiotikum, čo malo umožniť určiť podiel buniek oboch kmeňov výsevom populácie kolónií na misky so selekčným médiom s patričným antibiotikom. Oba gény vnesené priamo do genómu sa nachádzali pod kontrolou promotora TEF, ktorý zabezpečoval ich vysokú konštitutívnu produkciu za akýchkoľvek podmienok, ktoré sa môžu výrazne meniť behom vývoja kolónie. Fluorescenčný proteín bol produkovaný do cytosolu buniek, čo je najvhodnejší spôsob detekcie buniek pod konfokálnym mikroskopom.

Pre každé nasledujúce štúdium je potrebné zaistiť, aby systém správne fungoval u kontrolnej zmiešanej kolónie, ktorá pozostáva len z neupraveného rodičovského kmeňa BY a jeho značenej varianty, kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP značeného GFP proteínom a rezistentného k nourseothricínu. V správne fungujúcom systéme by sa nemal meniť pomer buniek značeného a neznačeného variantu rodičovského kmeňa v priebehu vývoja

ich zmiešanej kolónie. Ukázalo sa ale, že pri raste a vývoji kolónie bol kmeň BY zvýhodnený, a jeho bunky postupom času tvorili väčšiu časť populácie kolónie (merané pomocou rezistencie kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP), a to napriek tomu, že u BY-P_{TEF1}-GFP nebola obmedzená expresia žiadneho génu, zodpovedného za rast a vývoj kolónie. Jedna z možností, prečo bol zistený nižší podiel buniek kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP bolo, že v skutočnosti je v gigantickej kolónii prítomných v neskorších časoch vývoja kolónie viac BY-P_{TEF1}-GFP buniek (tzn., že sa pomer značených a neznačených buniek v zmiešanej kolónii v skutočnosti nemení), ale bunky BY-P_{TEF1}-GFP majú po ich odobraní z gigantickej kolónie zhoršenú schopnosť vytvoriť kolóniu na novom médiu. To by skresľovalo výsledky, ktoré boli získané pomocou výsevov kolónií a ich následnou selekciou na rezistenciu. Jednou z možností, ako to spoľahlivo overiť, bolo stanoviť priamo množstvo GFP v biomase gigantických kolónií a porovnať ho s množstvom v biomase gigantickej kolónie tvorenej len kmeňom BY-P_{TEF1}-GFP. To poskytlo presný údaj o pomere buniek produkujúcich tento fluorescenčný proteín (BY-P_{TEF1}-GFP) a buniek, ktoré ho produkovať nedokázali (BY) (Obr.12). Produkcia GFP proteínu korelovala s výsledkami získanými pri výsevoch. Nižší podiel buniek kmeňa teda nebol spôsobený zhoršením schopnosti vytvoriť kolóniu. Druhou z možností mohol byť negatívny vplyv produkcie proteínu GFP a/alebo ďalšieho proteínu zaisťujúceho rezistenciu k antibiotiku u kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP, zaťažujúceho jeho bunkový metabolizmus natoľko, že by spôsobil výhodu neznačeného kmeňa BY v rámci zmiešanej gigantickej kolónie.

Navrhla som teda ďalšie možné kombinácie kmeňov, ktoré by mohli poslúžiť pre vznik kontrolnej gigantickej kolónie. Neznačený rodičovský kmeň BY som kombinovala s ďalšími značenými kmeňmi rodičovského kmeňa, a to kmeňmi BY-Ato1-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED. Pripravila som aj kontrolné kolónie z dvoch rôzne značených rodičovských kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP (zelený) a BY-P_{TEF1}-dsRED (červený). Oba tieto kmene totiž obsahovali ako gény pre fluorescenčné proteíny, tak gény pre rezistenciu k antibiotiku. Dalo sa tak predpokladať, že ich spoločný rast bude vyvážený. Pri porovnaní podielu buniek v kolónii tvorenej BY a BY-Ato1-GFP kmeňom, bolo počas celého vývoja kolónie pozorované približne rovnaké percentuálne zastúpenie oboch kmeňov. To čiastočne narušuje teóriu, že by produkcia proteínu GFP mohla pôsobiť negatívne na fitness buniek. Bunky však produkujú proteín Ato1p až po prechode do alkalickéj fázy rastu kolónie, kedy už produkcia GFP môže prípadne bunky menej zaťažovať. U zmiešaných kolónií tvorených dvojicou BY-P_{TEF1}-GFP a BY-P_{TEF1}-dsRED však BY-P_{TEF1}-dsRED kmeň rástol výrazne lepšie než BY-P_{TEF1}-GFP a postupom času tvoril prevažnú časť buniek v kolónii. Nezdá sa teda, že by obecné produkcia fluorescenčného proteínu a/alebo proteínu

nevyhnutného pre rezistenciu k antibiotiku mohla mať negatívny dopad na rast buniek. Kmeň BY-P_{TEF1}-dsRED však tvoril prevažný podiel buniek v kolónii aj pri raste s kmeňom BY, a to napriek konštitutívnej expresii génu pre kanamycínovú rezistenciu a dsRED proteín. Jedinou dvojicou kmeňov v zmiešanej kolónii, ktorá by ukazovala na možnosť použitia navrhovaného systému a jeho správnosť bola preto kombinácia BY + BY-Ato1-GFP. Tá však nie je vhodná, keďže Ato1p membránový proteín, a teda aj jeho fluorescenčne značenú variantu BY-Ato1-GFP bunky produkujú až v neskorších fázach vývoja kolónie, čo by znemožnilo rozlíšenie značených a neznačených buniek v ranných fázach vývoja kolónie. Bunky ostatných zvolených dvojíc kmeňov nerástli počas vývoja kolónie rovnakou rýchlosťou.

Ďalším dôvodom nevyrovnaného rastu buniek jedného z kmeňov v zmiešanej kolónii s iným rodičovským kmeňom by mohla byť aj skutočnosť, že kolónie niektorých kmeňov rastú horšie aj vtedy, pokiaľ sú jediným kmeňom tvoriacim kolóniu. Vývoj kolónie, ich veľkosť, prechod do alkalickéj rastovej fázy a množstvo životaschopných buniek (buniek schopných vytvoriť kolóniu po výseve na nové médium) v biomase kolónie všetkých jednotlivých kmeňov bolo však porovnateľné. O bunkách kvasinky *S. cerevisiae* je známe, že ľahko mení svoje vlastnosti behom rastu a delenia populácie, vďaka vysokej pravdepodobnosti vzniku mutácií, ktorá bola určená na 10⁷ mutácií behom 30 generácií (Teng *et al.*, 2013). Ďalšie zmeny môžu byť spôsobené zmenami štruktúry chromozómov, ku ktorým môže dôjsť v jednotlivých bunkách (Conrad *et al.*, 2011). Tieto zmeny sú dedičné a bunka, ktorá získa takúto mutáciu ju ďalej predáva na potomstvo. Táto skutočnosť mohla ľahko spôsobiť, že je kultúra buniek určitého kmeňa heterogénna. Miera heterogenity potom bude závisieť na histórii určitého kmeňa a na počte delení, ku ktorým došlo od izolácie tohto kmeňa. Táto heterogenita by mohla byť skutočným dôvodom odlišného chovania rôznych značených kmeňov, odvodených od rodičovského kmeňa, ktoré by prípadne vznikli práve zo subpopulácie zmenených buniek.

Preto som sa rozhodla pripraviť nové fluorescenčne značené varianty kmeňa BY. Aby bolo zaistené, že populácia východzieho rodičovského kmeňa bude čo najhomogénnejšia, bol pripravený monoklonálny izolát z pôvodného BY kmeňa. Vznikol teda z jedinej bunky, bol kultivovaný najkratšiu nevyhnutnú dobu a následne uchovaný v konzervách pri – 80 °C, aby nedochádzalo k ďalším zmenám jeho buniek. Preto možno nový rodičovský kmeň BY^{new} považovať za celkom homogénny. Tým bolo zaistené, že aj geneticky modifikované značené varianty budú odvodené od jednotného genotypu.

Podarilo sa vyizolovať niekoľko klonov značených rodičovských kmeňov BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} odvodených od BY^{new} (Kapitola 5.2.1). Kolónie všetkých

klonov všetkých novo pripravených kmeňov sa vyvíjali porovnateľne s kolóniami rodičovského kmeňa BY^{new}. Nezдалo sa teda, že by produkcia fluorescenčného proteínu či proteínu zodpovedného za rezistenciu spôsobovali bunkám problémy pri raste.

Preukázala som, že pri vývoji zmiešanej kolónie ktorejkoľvek dvojice značeného a neznačeného variantu nového rodičovského kmeňa sa pomer buniek oboch kmeňov nezmenil. Podobným spôsobom sa chovali aj zmiešané kolónie tvorené dvoma značenými variantmi rodičovského kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP^{his} + BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} (Kapitola 5.2.3). Znamená to, že vlastnosti pôvodne používaných značených kmeňov boli nejakým spôsobom ovplyvnené buď heterogenitou buniek v kmeni, z ktorého boli genetickou manipuláciou odvodené, alebo veľkým počtom pasážovania v priebehu ich skladovania.

Behom rastu a vývoja kvasinkových kolónií dochádza k zmenám vo fyziológii a morfológii buniek v kolónii, spôsobených zmenami vonkajších podmienok, predovšetkým spojených s postupným vyčerpaním dostupných živín (Palková *et al.*, 2002). Tieto zmeny spôsobujú aktiváciu/deaktiváciu určitých skupín génov, a tým zmeny v metabolizme. Dochádza k diferenciácii buniek, či už sa jedná o horizontálne alebo vertikálne usporiadanie v kolónii (Váchová *et al.*, 2009; Čáp *et al.*, 2012; Váchová *et al.*, 2012, Váchová *et al.*, 2013). Diferencované bunky majú odlišný fenotyp a zastávajú rôzne funkcie pri prežívaní kolónie ako celku. Táto diferenciácia nevzniká náhodne, ale je regulovaná signálnymi molekulami. Jednou takou molekulou je plynný amoniak. Táto poplašná molekula je produkovaná pri nedostatku živín v prostredí (Čáp *et al.*, 2010). Jedným z génov zodpovedným za zmeny metabolizmu a bunkovú diferenciáciu je gén *SOK2*. Produkt tohto génu, Sok2p, je transkripčný faktor s pleiotrofným efektom (Ward *et al.*, 1995; Shenhar & Kassir, 2001; Pan & Heitman, 2000). Kolónie tvorené kmeňom s chýbajúcim *SOK2* génom sa nedokážu adaptovať na zmeny prostredia a mávajú problémy pri dlhodobom prežívaní buniek (Váchová *et al.*, 2004), neprebíha v nich horizontálna ani vertikálna diferenciácia buniek (Váchová & Palková, 2005; Čáp *et al.*, 2012). Preto bol pre štúdium vplyvu straty určitého génu na vývoj zmiešanej gigantickej kolónie vybraný práve kmeň sok2Δ. Bol sledovaný vývoj kolónie tvorenej bunkami kmeňa sok2Δ (delécia génu *SOK2*) a rodičovského kmeňa s plne funkčným Sok2p transkripčným faktorom, a tiež kompetícia oboch kmeňov pri raste v jednej mnohobunkovej kolónii. Výsledky získané s kmeňom sok2Δ a sok2Δ-P_{TEF1}-GFP ukázali, že delécia *SOK2* výrazne znevýhodní bunky tohto kmeňa oproti rodičovskému (Obr. 17, 18). V 15. dni tvorili bunky sok2Δ kmeňa len 22% buniek v kolónii s rodičovským kmeňom BY-P_{TEF1}-GFP; bunky kmeňa sok2Δ-P_{TEF1}-GFP z populácie zmiešanej kolónie s kmeňom BY takmer zmizli. Výrazné znevýhodnenie kmeňa sok2Δ-P_{TEF1}-GFP môže byť spôsobené tým, že tento kmeň produkuje 2 proteíny

zaist'ujúce rezistenciu – ku kanamycínu a k nourseothricínu, na rozdiel od rodičovského kmeňa BY-P_{TEF1}-GFP, ktorý produkuje len proteín proti rezistencii na nourseothricín. Miera kompetície aj výrazné zhoršenie šancí kmeňa sok2Δ-P_{TEF1}-GFP môže byť veľmi pravdepodobne spôsobená heterogenitou buniek v populácii kmeňa sok2Δ-P_{TEF1}-GFP podobne, ako to bolo zistené u značných variant rodičovského kmeňa aj u pôvodného neznačeného rodičovského kmeňa. Bolo teda potrebné pripraviť aj nové kmene s deletovaným *SOK2* génom, nakoľko pôvodný kmeň sok2Δ pochádzajúci zo zbierky Euroscarf by nemusel byť homogénny ku novo pripraveným kmeňom. Okrem toho u kmeňov získaných z tejto zbierky nevieme, aká bola história kmeňov, napr. nevieme koľko pasážovaní prebehlo než sa dostali do zbierky, ani ako boli uchovávané. Ďalej je tiež známe, že delečné kmene pri častom pasážovaní ľahšie získavajú ďalšie mutácie, ktoré potláčajú efekt vplyvu delécie (Cheng *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2013).

Ako východzie kmene pre prípravu som použila otestované nové kmene BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}, ktorých vlastnosti, zhodné s BY^{new} boli overené aj ich chovaním sa v zmiešanej kolónii (Kapitola 5.2.3). Zo získaných výsledkov vyplýva, že neschopnosť produkovať Sok2p proteín skutočne znevýhodní bunky s deletovaným génom *SOK2* oproti rodičovským bunkám, ale miera znevýhodnenia pri tejto kompetícii je ďaleko nižšia, než bola zistená pri použití pôvodných kmeňov, a prejavuje sa viac až v neskorších fázach vývoja kolónie (Obr. 48-51, 15. deň). Tieto výsledky by bolo treba ešte overiť na väčšom počte experimentov, prípadne overiť i chovanie zmiešaných kolónií, tvorených bunkami dvoch odlišných variant kmeňa sok2Δ.

Na záver je treba zdôrazniť, že zo získaných dát jasne vyplýva, že pri práci s rôznymi kmeňmi *S. cerevisiae* je treba zaistiť, aby sa pri experimentálnej práci pred vlastnými pokusmi nepasážovali a pre pokusy sa používali kultúry čerstvo získané z konzerv. Tento postup je nevyhnutný, aby sa kmene pokus od pokusu nemenili. Inak hrozí rôzna miera skreslenia získaných dát.

7 Záver

Vo svojej diplomovej práci som sa zaoberala štúdiom kompetície medzi bunkami dvoch rozdielnych laboratórnych kmeňov kvasinky *S. cerevisiae*, obsiahnutých v zmiešanej gigantickej kolónii a podarilo sa mi zistiť nasledovné:

U kontrolných zmiešaných gigantických kolónií vznikajúcich zo značeného a neznačeného variantu rodičovského kmeňa som oproti očakávaniu pozorovala výrazné zmeny v podiely buniek oboch kmeňov. Za tento jav mohla heterogenita buniek kvasinkových kmeňov, čo sa neskôr potvrdilo prípravou nových kmeňov.

Pokiaľ zmiešanú gigantickú kolóniu tvoril variant rodičovského kmeňa a variant mutantného kmeňa sok2Δ, podiel buniek kmeňa sok2Δ v priebehu vývoja kolónie výrazne klesal. Strata génu *SOK2* vedie u buniek k zhoršenému prežívaniu v prípade spoločného rastu s bunkami kmeňa, ktorým tento gén nechýba.

Pripravila som fluorescenčne značené varianty nového homogénneho rodičovského kmeňa BY^{new}, a to BY-P_{TEF1}-GFP^{his}, BY-P_{TEF1}-GFP^{lys} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his}, BY-P_{TEF1}-dsRED^{lys}. Každý z kmeňov obsahoval FP a selekčný marker – rezistenciu proti antibiotiku.

Kmene BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} som použila pre prípravu kontrolnej zmiešanej kolónie vo vzájomnej kombinácii, a tiež v kombinácii s neznačeným variantom BY^{new}. Vo všetkých kontrolných kolóniách sa behom ich vývoja nemenil vzájomný podiel buniek oboch prítomných kmeňov. Potvrdil sa tak predpoklad, že za nevyváženým rastom kmeňov použitých v prvej časti tejto práce môže heterogenita kmeňov.

Kmene BY-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} som použila ako rodičovské kmene na prípravu kmeňov s deletovaným génom *SOK2* – sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} a sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his}.

V zmiešaných gigantických kolóniách tvorených bunkami BY^{new} a sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} alebo kombináciou buniek BY^{new} a sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} bola pozorovaná čiastočná kompetícia v prospech BY^{new} až v 15. dni vývoja kolónie. Pri zmiešaných kolóniách tvorených kmeňmi BY-P_{TEF1}-GFP^{his} + sok2Δ-P_{TEF1}-GFP^{his} a BY-P_{TEF1}-dsRED^{his} + sok2Δ-P_{TEF1}-dsRED^{his} som v oboch prípadoch pozorovala pri ich vývoji postupný mierny pokles podielu buniek kmeňov s deletovaným *SOK2* génom.

8 Zoznam použitej literatúry

Be'er, A., Zhang, H.P., Florin, E.L., Payne, S.M., Ben-Jacob, E., Swinney, H.L. (2009): Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(2):428-33.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Cornforth, D.M., Foster, K.R. (2013): Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat Rev Microbiol*. 11(4):285-93.

Conrad, T.M., Lewis, N.E., Palsson, B.Ø. (2011): Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol Syst Biol*. 7:509.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978): How bacteria stick. *Sci Am*. 238(1):86-95.

Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003): The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 112(10):1466-77.

Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., Palková, Z. (2012): Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol Cell*. 46(4):436-48.

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2010): How to survive within a yeast colony?: Change metabolism or cope with stress?. *Commun Integr Biol*. 3(2):198-200.

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2009): Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem*. 284(47):32572-81

- Donlan, R. M., (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8(9):881-90.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15(2):167-93.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg E.P. (1994): Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176(2):269-75.
- Gietz, R.D., Woods, R.A. (2002): Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87-96.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010): Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 8(1):15-25.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W. (2001): Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2982-92.
- Cheng, W.C., Teng, X., Park, H.K., Tucker, C.M., Dunham, M.J., Hardwick, J.M. (2008): Fis1 deficiency selects for compensatory mutations responsible for cell death and growth control defects. *Cell Death Differ.* 2008 Dec;15(12):1838-46. doi: 10.1038/cdd.2008.117. Epub 2008 Aug 29.
- Kaplan, H.B., Greenberg E.P. (1985): Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol.* 163(3):1210-4.
- Lindegren, C.,C., Hamilton, E. (1944): Autolysis and sporulation in the yeast colony. *Bot Gaz* 105: 316–321. citované podľa Palková, Z., Wilkinson, D., Váchová, L. (2014): Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Res.* 14:96-108.
- López-Maury, L., Marguerat, S., Bähler, J. (2008): Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet.* 9(8):583-93.

- Palková, Z. (2004): Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* 5(5):470-6.
- Palková, Z., Devaux, F., Icíková, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C. (2002): Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell.* 13(11):3901-14.
- Palková, Z., Forstová, J. (2000): Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci.* 113 (Pt 11):1923-8.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature.* 1997 390(6659):532-6.
- Palková, Z., Váchová, L. (2003): Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol.* 225:229-72.
- Palková, Z., Wilkinson, D., Váchová, L. (2014): Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Res.* 14:96-108.
- Palmieri, L., Voza, A., Agrimi, G., De Marco, V., Runswick, M.J., Palmieri, F., Walker, J.E. (1999): Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J Biol Chem.* 274(32):22184-90.
- Pan, X., Heitman, J. (2000): Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol.* 20(22):8364-72.
- Piccirillo, S., White, M.G., Murphy, J.C., Law, D.J., Honigberg, S.M.. (2010): The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics.* 184(3):707-16.
- Řičicová, M., Kučerová, H., Váchová, L., Palková, Z. (2007): Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta.* 1768(5):1170-8.

- Sheff, M.A., Thorn, K.S. (2004): Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 21(8):661-70.
- Shenhar, G., Kassir, Y. (2001): A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 21(5):1603-12.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I. (2002): Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 29(6):361-7.
- Storz, G., Hengge, R. (eds) *Bacterial Stress Responses* 2nd edn (American Society for Microbiology Press, 2011).
- Strachotová, D., Holoubek, A., Kučerová, H., Benda, A., Humpolíčková, J., Váchová, L., Palková, Z. (2012): Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM). *Biochim Biophys Acta*. 1818(9):2126-34.
- Štěpánek, L. (2006): Analýza struktury kvasinkové kolonie: peroxizómy a autofágie. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Teng, X., Dayhoff-Brannigan, M., Cheng, W.C., Gilbert, C.E., Sing, C.N., Diny, N.L., Wheelan, S.J., Dunham, M.J., Boeke, J.D., Pineda, F.J., Hardwick, J.M. (2013): Genome-wide consequences of deleting any single gene. *Mol Cell*. 52(4):485-94.
- Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000): Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol*. 40(2):75-84.
- Váchová, L., Čáp, M., Palková, Z. (2012): Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012:601836.
- Váchová, L., Devaux, F., Kučerová, H., Řičicová, M., Jacq, C., Palková, Z. (2004): Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem*. 279(36):37973-81.

Váchová, L., Hatáková, L., Čáp, M., Pokorná, M., Palková, Z. (2013): Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:102485.

Váchová, L., Kučerová, H., Devaux, F., Ulehlová, M., Palková, Z. (2009): Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol.* 11(2):494-504.

Váchová, L., Palková, Z. (2005): Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol.* 169(5):711-7.

Ward, M.P., Garrett, S. (1994): Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of SOK1, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Mol Cell Biol.* 14(9):5619-27.

Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., Garrett, S. (1995): SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol.* 15(12):6854-63.

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S., Song, Z.J. (2011): Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci.* 3(2):74-81.