

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Denis Cmunt

Úloha transportérů draselných iontů v programované buněčné smrti kvasinek

Bakalářská práce

Konzultantka: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2016

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Sychrové, DrSc. a vedoucího práce prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.“

Praha, 15. 8. 2016

.....

Denis Cmund

Poděkování

Především děkuji své školitelce RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za možnost vypracování této bakalářské práce na Oddělení membránového transportu ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i., dále děkuji za její vedení, cenné rady, čas a trpělivost se mnou.

Také děkuji prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za podnětné připomínky ke zpracování této bakalářské práce.

Kolektivu pracovníků Oddělení membránového transportu děkuji za příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Abstract

The programmed cell death was originally connected only to ontogenesis of metazoan. It was later shown that it plays an important role in physiological processes too. An insufficiency or an increased rate of the programmed cell death lead to many pathologies. The term apoptosis was taken as synonym for the term programmed cell death but it designates one of its types. Other types of the programmed cell death are not explored so far as apoptosis. The original classification was based on morphological features, however, there is an approach to distinguish them based on biochemical features. The programmed cell death was found in plants too, where its roles are similar to roles in metazoan and, surprisingly, it occurs in unicellular organisms. The prokaryotic mechanism is different but many common features with metazoan apoptosis exist in unicellular eukaryotes. Nevertheless, certain differences lead to use of the term “apoptosis-like programmed cell death”. One of the most studied unicellular eukaryotes is a yeast species *Saccharomyces cerevisiae*. There was found a range of metazoan homologues proteins and thus it can be used as a model organism to deepen our knowledge on metazoan apoptosis and to understand the occurrence of such a process in unicellular organisms. The experimental part of this work is focused on the study of the role of potassium ion membrane transporters during glucose induced cell death of the yeast *S. cerevisiae*. Potassium exporters Trk1 and Trk2 play a principal role in this process. Proton ATPase Pma1 participates in its regulation too.

(In Czech)

Keywords: programmed cell death, apoptosis, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, caspases, Trk1, Trk2

Abstrakt

Programovaná buněčná smrt byla původně spojována pouze s ontogenezí živočichů. Později se ukázalo, že hraje důležitou roli také ve fyziologických procesech. Jak nedostatečná programovaná buněčná smrt, tak její zvýšená míra vedou k patologickým projevům. Termín apoptóza, původně synonymně zaměňován za termín programovaná buněčná smrt, představuje jeden z jejích typů. Ostatní typy programované buněčné smrti nejsou zdaleka probádané tak jako apoptóza. Jejich původní dělení bylo založeno na morfologických znacích, nicméně se přistupuje také k rozlišování na základě biochemických znaků. Programovaná buněčná smrt byla nalezena i v rostlinách, kde plní obdobné funkce jako u živočichů, a překvapivě se vyskytuje i u jednobuněčných organismů. V prokaryotech probíhá jiným mechanismem, ale v jednobuněčných eukaryotech byly objeveny mnohé společné znaky s živočišnou apoptózou. Nicméně jisté rozdíly vedou k používání termínu „apoptóze podobná buněčná smrt“. Jedním z nejprostudovanějších jednobuněčných organismů je v tomto ohledu kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Obsahuje řadu proteinů homologních s živočišnými proteiny a může sloužit jako modelový organismus k prohloubení znalostí o živočišné apoptóze a k porozumění výskytu takového procesu v jednobuněčných organismech. Tato práce se ve své experimentální části zaměřuje na studium vlivu membránových transportérů draselných iontů na průběh glukosou indukované buněčné smrti v kvasince *S. cerevisiae*. Transportéry pro výstup draselných iontů z buňky Trk1 a Trk2 hrají zásadní roli v tomto procesu. Na jeho regulaci se také podílí protonová ATPasa Pma1.

Klíčová slova: programovaná buněčná smrt, apoptóza, kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, kaspasy, Trk1, Trk2

Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	10
1.1 Programovaná buněčná smrt v mnohobuněčných organismech.....	10
1.1.1 Historie, klasifikace a nomenklatura	10
1.1.2 Molekulární mechanismy apoptózy	14
1.1.3 Role apoptózy ve fyziologických a patologických podmínkách	16
1.1.4 Programovaná buněčná smrt v rostlinách	17
1.2 Programovaná buněčná smrt v jednobuněčných organismech	18
1.2.1 Programovaná buněčná smrt v prokaryotech.....	19
1.2.2 Programovaná buněčná smrt v jednobuněčných eukaryotech.....	20
1.3 Programovaná buněčná smrt v kvasince <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	21
1.3.1 Molekulární regulace AL-PCD.....	22
1.3.2 Role reaktivních forem kyslíku a mitochondrií v AL-PCD.....	26
1.3.3 Vnitrobuněčné procesy vedoucí k AL-PCD	27
1.3.4 Vnější stimulace AL-PCD	29
1.4 Charakterizace kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.4.1 Zařazení, ekologie, metabolismus a rozmnožování.....	30
1.4.2 Využití kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	30
1.4.3 Ionty alkalických kovů a jejich homeostáze	31
1.4.4 Předpokládaná úloha transportérů Trk1 a Trk2 v AL-PCD u kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	32
2. Cíl práce	34
3. Materiál a metody	34
3.1 Přístrojové vybavení.....	34
3.2 Chemikálie	34

3.3 Příprava médií a roztoků, sterilizace.....	35
3.4 Kmeny kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	35
3.5 Oživování a kultivace kvasinkových kultur	36
3.6 Test přežívání	36
4. Výsledky	36
4.1 Vliv transportérů draselných iontů na GICD	36
4.2 Vliv aktivace Pma1 na rychlost buněčné smrti	37
4.3 Rozdíl přežívání GICD mutantních kmenů BYT1 a BYT2	38
5. Diskuze.....	39
6. Souhrn.....	40
7. Přehled použité literatury	41

Seznam zkratek

ABC	ATP binding cassette
AIF	apoptózu indukující faktor, živočišný homolog kvasinkového Aif
Aif	apoptózu indukující faktor, kvasinkový homolog živočišného AIF
AL-PCD	apoptóze podobná buněčná smrt
ALD	apoptóze podobná smrt
AMID	apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated inducer of death
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	adenosintrifosfát
BAK	BCL-2 homologous killer
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2 protein
BCL-X _L	B-cell lymphoma-extra large protein
BI-1	BAX-inhibitor 1
BID	BH3 interacting-domain death agonist
Bir1	baculoviral IAP repeat-containing protein
Bxi1	BAX-inhibitor 1
<i>CDC48</i>	gen kódující kvasinkový protein Cdc48
Cdc48	protein 48 kontrolující buněčné dělení, cell division control protein 48
cDNA	komplementární DNA
cfu	kolonie tvořící jednotky, colony-forming unit
CYC	cytochrom c
DD	doména smrti, death domain
DISC	signální komplex indukující smrt, death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>ENA</i>	exit of Na ⁺
EndoG	endonukleasa G
ER	endoplazmatické retikulum
ESF	extracelulární smrtící faktor
Esp1	extra spindle pole bodies
EUROSCARF	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> archive for functional analysis
FAS	receptor smrti fatty acid synthetase
FASL	ligand FAS
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GICD	glukosou indukovaná buněčná smrt, glucose induced cell death

<i>GSH1</i>	gen kódující γ -glutamylcysteinsynthetasu
HTRA2	HtrA serine peptidase 2
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
Kex1	killer expression defective protein
Kha1	K^+/H^+ antiporter
<i>MCA1</i>	gen kódující protein Mca1 (též <i>YCA1</i>)
Mca1	kvasinková metakaspasa 1
Mcd1	mitotic chromosome determinant
mRNA	„messenger“ RNA, mediátorová RNA
NCCD	Názvoslovná komise pro buněčnou smrt, Nomenclature Committee on cell death
Ndi1	NADH dehydrogenase internal
Nha1	Na^+/H^+ antiporter
Nhx1	Na^+/H^+ exchanger
Nma111	nukleární mediátor apoptózy
Nuc1	nukleasa 1
PCD	programovaná buněčná smrt, programmed cell death
Pep4	kvasinková vakuolární peptidasa
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
Pma1	plasma membrane H^+ -ATPase
ppGpp	guanosin-3',5'-bispyrofosfát
PS	fosfatidylserin
PTPC	permeability transition pore complex
ROS	reaktivní formy kyslíku, reactive oxygen species
rpm	otáčky za minutu
<i>skfA-H</i>	sporulation killing factor A-H (operon)
Spo0A	stage 0 sporulation protein A
tBID	fragment BID
TbMCA1-5	metakaspasy 1 až 5 z prvoka <i>Trypanosoma brucei</i>
TbMCA4	metakaspasy 4 z prvoka <i>Trypanosoma brucei</i>
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TNF- α	tumor necrosis factor α
Tok1	transportní kanál pro draslík
<i>TP53</i>	tumor protein p53 (gen)
Trk1,2	transport of potassium protein
UV	ultrafialová část spektra elektromagnetického záření
Vma1	vakuolární membránová ATPasa

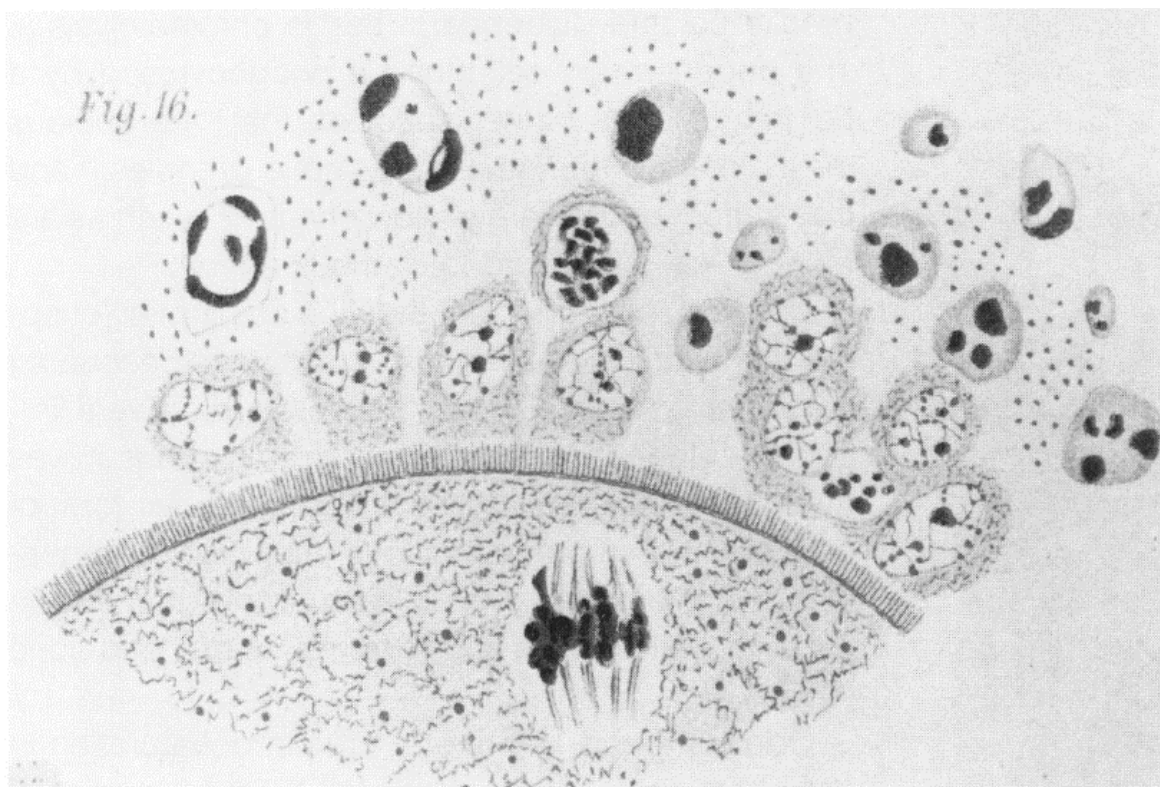
Vnx1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ exchanger
w/v	poměr hmotnost/objem
Yap1	yeast AP-1
Ybh3	kvasinkový „BH3-only“ protein, yeast BH3-only protein
<i>YCA1</i>	gen kódující kvasinkovou metakaspasu, yeast caspase 1 (též <i>MCA1</i>)
YPD	směs kvasničného extraktu, peptonu a glukosy k přípravě kultivačního média

1. Úvod

1.1 Programovaná buněčná smrt v mnohobuněčných organismech

1.1.1 Historie, klasifikace a nomenklatura

Programovaná buněčná smrt (PCD z anglického „programmed cell death“) je druh buněčné smrti zprostředkovaný vnitrobuněčným kontrolovaným procesem [1]. První popis buněčné smrti a její fyziologické role přichází krátce po postulování buněčné teorie Schleidenem a Schwannem na konci 40. let 19. století. Autorem tohoto popisu z roku 1842 je ve Švýcarsku působící německý vědec Carl Vogt, který studoval náhradu struny hřbetní páteří během vývoje žab. V dalších letech najdeme zmínky o buněčné smrti ve spisech patologů popisujících degeneraci tkáně (např. německý lékař Rudolf Virchow), biologů studujících metamorfózu žab či hmyzu nebo histologů, kteří sledovali vývoj tkání [2]. Za zmínku stojí pozorování německého biologa a zakladatele cytogenetiky Walthera Flemminga publikované v roce 1885. Flemming studoval savčí ovariální folikuly a všiml si, že u buněk epitelové výstelky atretických folikulů dochází k degradaci jader, což pozoroval jako tvorbu tzv. „půlměsíčků“ (v anglické literatuře „half-moons“, obr. 1 na straně 11). Tyto útvary jsou tvořeny kondenzovaným, neboli pyknotickým chromatinem v jádře a jedná se o charakteristický znak apoptózy, jednoho z typů PCD. Flemming tento proces nazval chromatolýza. Německý anatom Ludwig Gräper uveřejnil v článku vydaném v roce 1914 myšlenku, že Flemmingem pozorovaná chromatolýza je mechanismus, jímž je v organismu vyvažována mitóza. Vzhledem k pohnuté době ovšem zůstal tento článek bez většího povšimnutí [2, 3]. V 1. polovině 20. století zájem o buněčnou smrt spíše upadal. Tématu se věnovali někteří embryologové, ale zejména kvůli limitujícím technickým možnostem doby nedošlo k žádným významným objevům, které by vedly k porozumění příčin a mechanismů buněčné smrti. V roce 1951 vychází oceňovaný článek Alfreda Glücksmanna, v němž ukazuje, že buněčná smrt je zcela přirozený aspekt v embryogenezi obratlovců [4]. Termín „programovaná buněčná smrt“ se poprvé objevuje v roce 1964 v článku, který se zabýval vývojem kukel motýlů z čeledi martináčovití, a označuje místně i časově určenou buněčnou smrt, což implikuje, že se jedná o geneticky kontrolovaný proces [5].



Obrázek 1: Chromatolýza, jak ji v roce 1885 pozoroval a pomocí *camery lucidy* zakreslil Walther Flemming. Detail vajíčka a epitelové výstelky atretického folikulu, epiteliální buňky podléhající chromatolýze se nacházejí dál od vajíčka a obsahují kondenzovaný chromatin v podobě pŕlměsíček typických pro apoptózu. Pŕevzato a upraveno z [3].

Díky pokroku techniky ve 2. polovině 20. století bylo možné zkoumat mechanismus buněčné smrti. Milníkem v dalším výzkumu byl článek s názvem „Apoptóza: základní biologický jev s širokým rozsahem důsledků pro tkáňovou kinetiku“ J. F. R. Kerr, A. H. Wyllieho a A. R. Currieho publikovaný roku 1972 [6]. V tomto článku jsou shrnuty dřívější Kerrovy výsledky, ve kterých pozoroval zvláštní druh buněčné smrti odlišné od nekrózy v elektronovém mikroskopu, s výsledky dalších vědců, kteří pozorovali stejný jev v odlišných podmínkách. Pro tento programovaný buněčný fenomén, který byl doposud doceněn jen embryology, navrhuji termín apoptóza. Uvědomují si její fyziologickou roli v ontogenezi a v udržování homeostáze buněčné populace v dospělých jedincích, kdy se vzájemně vyvažují apoptóza a mitóza, ale také zmiňují její funkci v patologických podmínkách, ať už se jedná o spontánní jev v neléčených maligních neoplazmách, léčbou vyvolaný proces v maligních nádorech nebo jev způsobený jedy z okolí buňky. Apoptóza zůstává nadále popsána morfologickými znaky, kterými odlišují dvě fáze jejího průběhu. V první fázi dochází ke kondenzaci chromatinu (pyknóza) a cytoplazmy, smrštění buňky a jejímu rozpadu na membránou ohraničené fragmenty, pro něž navrhuji název apoptotická

tělíska. V druhé fázi jsou tato tělíska pohlcena makrofágy či sousedními buňkami a ve fagolysosomu degradována [6].

Ačkoliv Kerrův, Wyllieho a Currieho článek z roku 1972 poukazuje na podceněný význam apoptózy, velký zájem o problematiku nastává až v 90. letech (tabulka 1), což má několik příčin. Jednak je důležitý rozvoj metod umožňujících apoptózu detekovat. Např. jednou z prvních metod široce aplikovatelnou v laboratořích je vizualizace specifických fragmentů DNA vzniklých během apoptózy pomocí gelové elektroforézy [7, 8]. Další příčinou je postupný objev genů, které jsou zodpovědné za kontrolu spuštění i průběhu PCD. Nejprve byly mechanismy její genetické regulace zkoumány v modelovém organismu *Caenorhabditis elegans* [9-12]. Za dosažené výsledky byli S. Brenner, H. R. Horvitz a J. E. Sulston oceněni v roce 2002 Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství. Později se ukázalo, že jsou objevené geny *C. elegans* homologní se savčími geny, které se účastní PCD, a tedy že je celý proces evolučně konzervovaný [13-15]. Posledním důležitým faktorem, který pozitivně ovlivnil zájem o tuto oblast, je objev spojitostí mezi PCD a některými chorobami, zvláště těmi neurodegenerativními a onkologickými (kap. 1.1.3).

Tabulka 1: Četnost výskytu výrazu buněčná smrt („cell death“) ve vědeckých publikacích ve vybraných letech dle „Web of Science“

Rok publikování	Četnost výskytu
1964	11
1972	31
1977	48
1982	80
1987	101
1990	249
1991	1815
1996	5578
2001	9691
2006	12187
2011	16213
2015	20091
2016 k 28.7.	10057

V devadesátých letech a následně ve 21. století se studium programované buněčné smrti stává módním tématem, což ilustruje nárůst článků ve vybraných letech v tabulce 1. Došlo k objevení molekulární podstaty apoptózy a biochemických drah, které ji regulují a

uskutečňují. Zároveň je objasňována její role v různých fyziologických i patologických podmínkách. K těmto objevům se navíc přidávají důkazy o nových typech PCD, které nemohou být popsány jako apoptóza. S tím vyvstávají otázky terminologické. Někteří autoři používali pojmy „programovaná buněčná smrt“ a „apoptóza“ synonymně [16], jiní apelovali na jejich používání tak, jak byly svými autory ve své době definovány [3], nicméně nyní převládá pojetí takové, že programovaná buněčná smrt je zastřešující termín definovaný tak, jak je napsáno v úvodu této kapitoly, a apoptóza označuje jeden z jejích typů. [1, 17]. Přestože se dařilo identifikovat biochemickou podstatu různých typů buněčné smrti, převládala jejich klasifikace na základě morfologických znaků. V roce 2012 zasedla Názvoslovná komise pro buněčnou smrt (NCCD z anglického „Nomenclature Committee on Cell Death“), která vydala nová doporučení pro systematickou klasifikaci regulovaných buněčných smrtí založenou na biochemických aspektech. Apoptóza, jakožto nejprobádanější oblast, je členěna na několik subtypů: na kaspasách závislou a nezávislou apoptózu vyvolanou vnitřně a 2 subtypy apoptózy vyvolaných z vnějšku. Dalšími typy buněčných smrtí například jsou: mitotická katastrofa, která hraje úlohu v případě abnormálně probíhající mitózy; anoikis, spojená s uvolněním buňky od extracelulární matrix; autofágní buněčná smrt, která je spojená s uzavřením organel a částí cytoplazmy do dvojítmembránou obalených váčků – autofagosomů určených k degradaci v lyzozomu či vakuole [18].

Zde je nutné zmínit nekrózu, která je s buněčnou smrtí spjata od počátku jejího výzkumu [3, 6]. Je uváděna jako neplánovaná a nekontrolovaná buněčná smrt v kontrastu k apoptóze. Nekrózu, pro níž Majno a Joris [3] navrhuje lepší termín onkóza, doprovází jiné morfologické znaky – jádro není pyknotické, ale dochází k jeho lýze (karyolýza), poškozeny jsou i jiné organely (mitochondrie, lyzozom), buňka v důsledku ztráty energie, a tedy selhávání iontových pump bobtná, až dojde k cytolýze, čímž se do jejího okolí vylíje buněčný obsah včetně lytických enzymů, které poškozují okolní tkáň. Dochází k zánětlivé reakci [1, 3]. Ovšem s prohlubujícími se znalostmi se ukazuje, že problematika nekrózy není stále zcela probádaná. Z nedávné doby pochází články, které zavádí označení programovaná nebo regulovaná nekróza pro jistý druh PCD a tento termín přijala v roce 2012 i NCCD [18, 19].

1.1.2 Molekulární mechanismy apoptózy

Apoptóza je nejprostudovanějším typem programované buněčné smrti. Účastní se řady fyziologických i patologických pochodů v organismu, kvůli tomu existuje variabilita spouštěcích biochemických drah, jež ale vedou ke stejnému konci. Můžeme shrnout několik obecných poznatků: 1) apoptóza je energii vyžadující proces; 2) proteiny spojené s apoptózou jsou v buňce stále přítomné (některé mají i další fyziologické funkce); 3) tyto proteiny mohou apoptózu aktivovat (proapoptotické), nebo ji inhibovat (antiapoptotické); 4) poslední krok signalizační kaskády je spojen s kaspasami, což jsou cysteinové proteasy štěpící bílkoviny za aspartylovým zbytkem (v rozpoznávané tetrapeptidové sekvenci X-E-X-D [20]). V buňce existují ve formě neaktivních prokaspas. Iniciační kaspasy (kaspasa-2, 8, 9, 10) aktivovány různými proapoptotickými signály následně aktivují kaspasy výkonné (kaspasa-3, 6, 7), které štěpí cílové molekuly. Těmi jsou např. cytokeratiny, poly(ADP-ribosa)polymerasa či inhibitor DNasy aktivované kaspasou [1, 17].

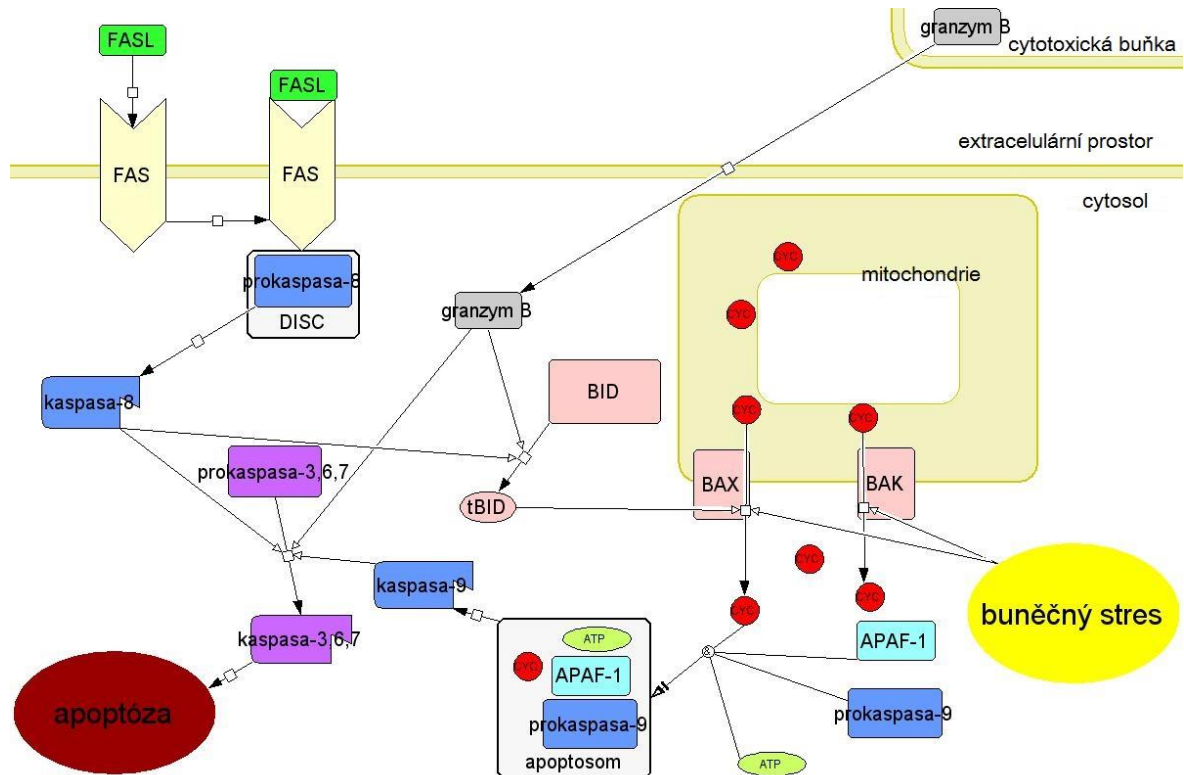
Apoptózu vyvolává vnitrobuněčný stres, který zahrnuje mj. poškození DNA, zvýšenou koncentraci vápenatých iontů v cytosolu, excitotoxicitu, akumulaci špatně sbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu (ER), oxidativní stres nebo hypoxii. Vzhledem k velké variabilitě faktorů, jež mohou apoptózu vyvolat, existuje mnoho iniciačních signálních drah. Tyto dráhy se ale sbíhají v kontrolním mechanismu zahrnujícího mitochondrie. Antiapoptotické mechanismy dávají buňce prostor vyrovnat se se stresem. Pokud to buňka nezvládne, převládnu proapoptotické signály, které vedou k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány otevřením specifického póru PTPC (z angl. „permeability transition pore complex“) nebo vytvořením pórů pomocí proapoptotických proteinů BAK (z angl. „BCL-2 homologous killer“) nebo BAX (z angl. „BCL-2-associated X protein“). Tyto dva proteiny patří do rodiny BCL-2 (z angl. „B-cell lymphoma 2 protein“). Některé bílkoviny z této rodiny mají funkci proapoptotickou, jiné antiapoptotickou a jsou důležitými regulátory propustnosti vnější mitochondriální membrány. Její permeabilizace vede zaprvé k uvolnění proapoptotických molekul z mezimembránového prostoru do cytosolu (mj. cytochromu c) a zadruhé k vymizení protonového gradientu na vnitřní membráně. Dochází tedy k zastavení dýchacího řetězce a zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. „reactive oxygen species“), což amplifikuje proapoptotický signál. Uvolněný cytochrom c asociuje s cytosolárním proteinem APAF-1 (z angl. „apoptotic protease activating factor“) a adenosintrifosfátem (ATP). Vzniklý komplex, zvaný apoptosom,

aktivuje iniciační kaspasu-9, která následně štěpí prokaspasy-3, 6 a 7 na jejich aktivní výkonné formy. Z mitochondriálního mezimembránového prostoru se do cytosolu dostávají mj. také endonukleasa G (EndoG) a apoptózu indukující faktor (AIF), které jsou translokovány do jádra, kde působí fragmentaci DNA bez zprostředkování kaspasami [17, 18].

Apoptóza může být též vyvolána tzv. vnější cestou. V tomto případě hrají úlohu transmembránové receptory zprostředkovávající signál z okolí dovnitř buňky. Mezi nejprostudovanější receptory patří receptory smrti (v angl. lit. „death receptors“) FAS (z angl. „fatty acid synthetase“), na který se váže FAS ligand (FASL), a TNFR1 (z angl. „tumor necrosis factor receptor 1“), na který se váže TNF- α (z angl. „tumor necrosis factor α “). Navázání příslušného ligandu na receptor z extracelulární strany vyvolá konformační změnu v asi 80 aminokyselinových zbytků dlouhé domény smrti (DD z angl. „death domain“) ve vnitrobuněčné části receptoru. To vede k navázání celé řady cytosolárních proteinů včetně prokaspasy 8 na DD a vzniku supramolekulárního komplexu označovaného DISC (z angl. „death-inducing signaling complex“), ve kterém dochází k aktivaci kaspasy 8. Ta v některých typech buněk štěpí protein BID (z angl. „BH3 interacting-domain death agonist“) z rodiny BCL-2 za vzniku fragmentu tBID, který zprostředkovává permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, v jiných typech buněk katalyzuje aktivaci výkonných prokaspas. Zatím ne zcela prostudovaný zůstává mechanismus apoptózy zprostředkované transmembránovými receptory závislosti (v angl. lit. „dependence receptors“), které vedou k buněčné smrti v případě, že koncentrace jejich ligandu klesne pod kritickou hodnotu. Apoptózu zprostředkovanou systémem FAS/FASL využívají např. cytotoxické buňky imunitního systému, mimoto mohou tyto buňky vyvolat apoptózu sekrecí perforinu, proteinu, který v plazmatické membráně cílové buňky vytváří póry, a granzymů A a B, což jsou serinové proteasy. Granzym A působí buněčnou smrt nezávisle na kaspasách aktivací specifické DNasy, zatímco granzym B štěpí prokaspasu-3 a BID [17, 18]. Mechanismy apoptózy vyvolané vnitřně a zvnějšku spojené s kaspasami schematicky znázorňuje obrázek 2 na straně 16.

Jedním z důležitých brzkých znaků apoptózy je převrácení molekul fosfatidylserinu (PS, z angl. „phosphatidylserine“) z vnitřní vrstvy plazmatické membrány, kde se tyto fosfolipidy běžně vyskytují, do její vnější vrstvy. Takto externalizovaný PS je rozpoznávací signál pro fagocytující buňky k pohlcení apoptotických tělísek. Annexin V je protein s velkou afinitou

k PS, proto se jeho fluorescein-5-isothiokyanátem značená forma využívá ke značení apoptotických buněk. Ty tak mohou být detekovány pomocí průtokové cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie již v brzké fázi apoptózy [21], což je důležité, protože apoptóza je relativně rychlý proces (2-3 hodiny od iniciace apoptózy po její kompletní dokončení [17]).



Obrázek 2: Schematické znázornění mechanismů apoptózy spojených s kaspasami. Vnitřním spouštěčem je buněčný stres, který aktivuje proapoptotické signály, mj. proapoptotické proteiny BAK a BAX z rodiny BCL-2, jež zprostředkovávají uvolnění cytochromu c (CYC, na obr. červený) z mitochondrie. CYC vytváří s APAF-1, ATP a prokaspasou-9 komplex (apoptosom), který aktivuje iniciační kaspasu-9. Ta následně štěpí výkonné prokaspasy-3, 6, a 7 na jejich aktivní formy, jež štěpí cílové molekuly. Tato jejich aktivita vede k apoptóze. Vnější spouštěčem apoptózy je ligand FAS (FASL), který svou vazbou na receptor smrti FAS způsobí jeho konformační změnu, jež vede k vytvoření multiproteinového komplexu DISC na jeho cytosolární straně. Součástí DISC je i prokaspasa-8, která je tímto komplexem štěpena na iniciační kaspasu-8. Ta dále aktivuje výkonné kaspasy a z proteinu BID odštěpuje fragment tBID, jenž zprostředkovává permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění CYC. Cytotoxické buňky imunitního systému mohou vyvolat apoptózu pomocí proteasy granzym B, která v cílové buňce aktivuje kaspasu-3 a tBID. Obrázek sestaven dle [17,18].

1.1.3 Role apoptózy ve fyziologických a patologických podmínkách

Úloha buněčné smrti v embryonálním vývoji byla známá vědcům již v 1. polovině minulého století [4]. Později se ukázalo, že tato buněčná smrt probíhá mechanismem apoptózy a je důležitá při vývoji mnoha tkání, příkladem je vznik nervové soustavy nebo prstů [22].

Apoptóza v dospělých organismech vyvažuje mitózu a podílí se na remodelaci tkání, kdy dochází k odstranění nežádoucích struktur, jako je například involuce mléčné žlázy po ukončení laktace [23]. Pomocí apoptózy jsou odstraňovány buňky abnormální, poškozené, dysfunkční nebo škodlivé svému okolí např. při napadení patogenem [1, 17]. Z těchto funkcí je zřejmé, že případné poškození procesu apoptózy může vést k řadě patologických projevů.

Nadměrná apoptóza je spojena s neurodegenerativními onemocněními (např. Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza), autoimunitními nemocemi (např. syndrom získané imunitní nedostatečnosti) nebo ischemickými chorobami. Nádory jsou naopak spojeny s nedostatečností apoptózy, která je způsobena mutací genů podílejících se na její regulaci. Tyto mutace mohou způsobit nízkou expresi nebo expresi nefunkčních proapoptotických genů, naopak ale také mohou vést k nadprodukci antiapoptotických proteinů. Příkladem je mutace lidského tumorsupresorového genu *TP53*, která je přítomna ve více jak 50 % lidských nádorů. Produktem tohoto genu je transkripční faktor p53 účastnící se kontroly buněčného cyklu v přechodu mezi G₁ a S fází, kdy v případě nevratného poškození DNA spouští apoptózu. Snižená funkce apoptózy se projevuje i u některých autoimunitních onemocnění, jako je například autoimunitní lymfoproliferativní syndrom [17].

1.1.4 Programovaná buněčná smrt v rostlinách

Vzhledem k historickému vývoji výzkumu programované buněčné smrti není překvapivé, že je tato oblast nejprobádanější v živočišné říši a o PCD probíhající v rostlinách se toho ví relativně málo [24]. Její funkce zůstávají stejné. Hraje úlohu ve formování rostlinného těla ať už v embryogenezi, tak také v pozdějším vývoji. Příkladem je tvorba perforací v listech, odumírání buněk vedoucí k tvorbě xylému, který sestává ze zbylých buněčných stěn, nebo odstraňování periferních buněk kořenové čepičky. Odumírání představuje nedílnou součást rostlinného vývoje a je spojené právě s PCD. Typickou ukázkou tohoto je opadávání listů ze stromů na podzim. Ke spuštění buněčné smrti může dojít v reakci na prostředí, kdy například hypoxie působí tvorbu provzdušňovacího pletiva v kukuřici programovaným a kontrolovaným mechanismem. PCD se účastní, stejně jako u živočichů, obrany před patogenem. V případě napadení dochází u rostlin k tzv. hypersenzitivní odpovědi, jež zahrnuje odumírání a rychlou dehydrataci napadeného místa s cílem zamezit dostupnosti živin pro patogen. Zajímavostí je, že tento proces, který je geneticky kontrolován a řízen, vykazuje některé znaky živočišné apoptózy [25, 26].

Pro tento druh rostlinné buněčné smrti byl navrhnout termín apoptóze podobná programovaná buněčná smrt (AL-PCD z angl. „apoptosis-like PCD“). Vedle toho existuje v rostlinách ještě autofágní buněčná smrt a nekróza [27]. Mezi morfologické znaky společné apoptóze a AL-PCD patří kondenzace cytoplazmy a smrštění protoplastu [28] a kondenzace chromatinu [29]. Na molekulární úrovni hraje roli v AL-PCD uvolnění cytochromu c z mitochondrie [30], aktivita proteas podobná aktivitě kaspas [31], permeabilizace vnější mitochondriální membrány spojená se ztrátou membránového napětí [28] a specifická degradace DNA [29]. Nicméně vzhledem k přítomnosti buněčné stěny nemůže u rostlin dojít k pohlcení případných apoptotických tělísek sousedními buňkami. I proto, avšak nejen z toho důvodu, zůstává klasifikace typů PCD v rostlinách nejasná. Někteří autoři zcela odmítají koncept AL-PCD a za hlavní mechanismus odstraňování buněk z rostlinného těla považují autofágní buněčnou smrt, která se projevuje zejména výskytem autofagosomů, autolysosomů a lytických vakuol v umírající buňce. Případné morfologické a molekulární znaky shodné s apoptózou jsou považovány za znaky příslušející autofágní buněčné smrti [24, 32].

Zjištění o jisté podobnosti buněčné smrti mezi rostlinami a živočichy vedou k hypotézám, že některé aspekty PCD jsou evolučně konzervované a základní molekulární mechanismy se vyskytovaly už u společného jednobuněčného eukaryotického předka vyšších organismů [27].

1.2 Programovaná buněčná smrt v jednobuněčných organismech

Procesy obdobné PCD mnohobuněčných organismů (včetně shody některých morfologických a biochemických znaků) byly objeveny krátce po nárůstu zájmu o tuto problematiku také v jednobuněčných eukaryotech (např. v zelené řase *Chlamydomonas reinhardtii* [33], v prvoku *Trypanosoma brucei* [34] nebo kvasince *Saccharomyces cerevisiae* [35]). Překvapivě určitý druh programované buněčné smrti, třebaže mechanismem nepodobný eukaryotním, byl popsán také v prokaryotech [36]. Evoluční role PCD v mnohobuněčném organismu se zdá být zřejmá: altruistické chování nepotřebné nebo pro organismus potenciálně nebezpečné buňky přispívá k přežití celého jedince. Ovšem účel vnitřně programované buněčné smrti jednobuněčného organismu, při níž zemře buňka jako jedinec, není zcela jasný. Nejčastěji uváděnou hypotézou, která zakládá na určité podobnosti chování populací jednobuněčných organismů (např. v koloniích, biofilmech) se spoluprací buněk v mnohobuněčném organismu, je, že ze smrti jedince v kolonii plynou výhody pro zbytek přeživší kolonie [37].

1.2.1 Programovaná buněčná smrt v prokaryotech

Jeden z mechanismů prokaryotického procesu podobného programované buněčné smrti je založen na systému páru genů, které kódují stabilní toxin, jenž je schopný způsobit smrt buňky, a nestabilní antitoxin, který letální funkci toxinu inhibuje. Tyto geny byly objeveny jako součást plazmidů. V případě, že daný plazmid buňka ztratila, antitoxin byl degradován dříve než toxin, který následně způsobil buněčnou smrt. Proto tyto páry genů byly nazvány moduly závislosti (v angl. literatuře „addiction modules“). Nejsou nacházeny jen v extrachromosomálních elementech, ale jsou též součástí prokaryotického chromosomu. Bylo objeveno již několik modulů závislosti, které nemusí být homologní, jejich produkty nevykazují podobnost ve struktuře ani v aktivitě, přesto mají několik vlastností společných: 1) gen kódující antitoxin předchází genu kódujícího toxin; 2) dochází ke koexpresi obou genů; 3) antitoxin je produkován v nadbytku a 4) je degradován specifickou bakteriální proteasou; 5) exprese obou genů je zpětnovazebně transkripčně regulována a 6) produkty jsou malé proteiny (toxin je velký 100 – 130 aminokyselin, antitoxin 70 – 85 aminokyselin) [36].

Jedním z nejprostudovanějších modulů závislosti je genetický modul *mazEF*, který se nachází v chromosomu *Escherichia coli*, v němž gen *mazE* kóduje antitoxin a *mazF* kóduje toxin. Tento modul je pod kontrolou promotoru P_2 . Účinek systému *mazEF*, kterým je buněčná smrt, je aktivován několika stresovými podmínkami, jež vedou k zastavení exprese *mazEF*, a tedy k zastavení syntézy zejména proteinu MazE, čímž se projeví toxický efekt neinhibovaného proteinu MazF. Mezi takové stresové podmínky patří: nedostatečná aminokyselinová výživa buňky, která vede k produkci signální molekuly ppGpp (guanosin-3',5'-bispyrofosfát), jež negativně reguluje promotor P_2 [38]; dále inhibice transkripce či translace způsobená antibiotiky; oxidativní stres nebo poškození DNA způsobené různými příčinami (hladovění s nedostatkem thyminu, UV radiace, antibiotika) [39, 40]. Toxický efekt MazF spočívá v jeho endonukleasové aktivitě specifické pro ACA sekvenci mRNA. V případě jeho aktivace dochází ke snížení translace proteinů potřebných pro buňku a zároveň dochází k translaci nových specifických proteinů, což vede ke smrti buňky [41, 42]. Ukázalo se, že buněčnou smrt spuštěnou výše popsaným mechanismem může vyvolat napadení buňky fágem. V takovém případě PCD jedince zabraňuje šíření patogenu v populaci [43]. Z výše popsaného je vidět, že některé faktory vyvolávající PCD v prokaryotech a v mnohobuněčných organismech jsou stejné.

Existují i jiné mechanismy PCD v prokaryotech, které nejsou založené na modulech závislosti. Například v hladovějících populacích bakterie *Bacillus subtilis* dochází v některých buňkách k produkci regulačního proteinu Spo0A (z angl. „stage 0 sporulation protein A“), který pozitivně reguluje operon *skfA-H*. Jeho expresí vzniká protein označovaný jako extracelulární smrtící faktor (ESF) a proteiny SkfE a SkfF, které v plazmatické membráně tvoří ABC transportér poskytující buňce ochranu před ESF tím, že tento toxin exportuje ven. Ve zbylých buňkách populace není protein Spo0A tvořen, tudíž tyto buňky neexprimují *skfA-H* operon a nejsou rezistentní vůči ESF, který působí jejich smrt. Výhodou takového chování může být fakt, že z usmrcených buněk jsou uvolněny živiny, které pomohou zbývajícím buňkám překlenout období jejich nedostatku, a předejít tak sporulaci, což je energeticky náročný proces, který je krátce po svém spuštění nevratný [40]. Z nedávné doby pochází pozorování, že vedle buněčné smrti vyvolané genetickým modulem *mazEF*, se v *E. coli* vyskytuje další mechanismus vedoucí k PCD, který byl nazván apoptóze podobná smrt (ALD z angl. „apoptosis-like death“), jelikož při ní dochází k depolarizaci membrány a fragmentaci DNA, což může být detekováno specifickou metodou používanou pro apoptózu. ALD je (na rozdíl od PCD zprostředkované modulem *mazEF*) vyvolána pouze v případě poškození DNA a je inhibována, pokud dojde ke spuštění dráhy *mazEF* [42].

1.2.2 Programovaná buněčná smrt v jednobuněčných eukaryotech

Jak je výše uvedeno, určitá morfologická a biochemická podobnost programovaných buněčných smrtí u vyšších eukaryot poukazuje na dávný evoluční původ těchto procesů. Tuto hypotézu podporují objevy jistých druhů PCD, které vykazují znaky živočišné apoptózy, napříč fylogeneticky poměrně vzdálenými skupinami nižších eukaryot [44]. V tomto ohledu patří mezi nejprostudovanější organismy kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, hlenka *Dictyostelium discoideum* a několik parazitických prvoků, jako jsou rody *Plasmodium*, *Leishmania* a *Trypanosoma* [44, 45]. Programované buněčné smrti kvasinky *S. cerevisiae* jsou věnovány následující kapitoly, proto je zde uvedeno několik hlavních poznatků o PCD v ostatních jednobuněčných eukaryotech (protistech).

V případech PCD jednobuněčných eukaryot je pozorováno několik morfologických znaků spojených s apoptózou či jinými typy PCD u mnohobuněčných eukaryot. Dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA, v některých případech je pozorována kondenzace cytoplazmy a smrštění buňky, vakuolizace buňky spojená s autofágní buněčnou smrtí nebo vznik mnoha vyboulení plazmatické membrány (v angl. literatuře „blebbing“,

proces je spojen s apoptózou a předchází vzniku apoptotických tělísek). I biochemické znaky, jako je externalizace PS, ztráta membránového potenciálu na mitochondriích, uvolnění cytochromu c nebo zvýšená produkce ROS, jsou společné apoptóze a PCD v jednobuněčných eukaryotech [44].

V některých protistech byly nalezeny kaspasám funkčně podobné proteasy a byly nazvány metakaspasy nebo parakaspasy. U většiny studovaných organismů ovšem doposud nebyly zcela charakterizovány a jejich role v přenosu signálu vedoucího k buněčné smrti je zatím nejasná. Například v parazitickém prvoku *Trypanosoma brucei* bylo nalezeno několik takových proteinů označovaných TbMCA1-5. Bylo ukázáno, že metakaspasa TbMCA4 má cysteinovou peptidasovou aktivitu, ovšem její cílová molekula v dráze vedoucí k buněčné smrti je neznámá [45].

Ať už jsou nebo nejsou v jednobuněčných eukaryotech meta/parakaspasy přítomné, existuje v těchto organismech programovaná buněčná smrt, která je na těchto proteasách nezávislá. Některé výzkumy ukazují, že by se na tomto typu PCD mohli podílet z mitochondrie uvolňované proteiny homologní živočišným proapoptotickým proteinům EndoG a AIF. Homolog AIF byl například objeven v hlence *D. discoideum*, zatímco homolog EndoG v prvoku *T. brucei* [44, 45].

1.3 Programovaná buněčná smrt v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Apoptotické znaky v kvasinkách (fragmentace DNA a kondenzace chromatinu, externalizace PS) byly prvně pozorovány v roce 1997 v buňkách *S. cerevisiae* nesoucích mutaci v genu *CDC48*, jehož normální produkt protein Cdc48 (z angl. „cell division control protein 48“) je AAA-ATPasa, která hraje úlohu v buněčném dělení, ve fúzi membrán ER a translokaci ubikvitinovaných proteinů z ER do proteasomu [35, 46]. Ukázalo se, že také mutace savčího genu homologního *CDC48*, vede k apoptóze v savčích buňkách [47]. V dalších letech byly popsány některé molekulární znaky a biochemické dráhy společné PCD v kvasinkách a apoptóze, došlo k objevu dalších proteinů homologních živočišným apoptotickým proteinům a podařilo se objasnit řadu vnějších i vnitřních příčin vyvolávajících programovanou buněčnou smrt podobnou apoptóze (AL-PCD) v kvasinkách [48]. To napomáhá najít vysvětlení, proč v jednobuněčných organismech takový proces existuje [49]. Z nedávné doby pochází zmínky také o programované nekróze jako dalším

typu PCD vyskytujícího se v kvasinkách [50], avšak existence autofágní buněčné smrti je sporná [51].

Apoptóze podobná PCD v kvasinkách bývá mnohými autory označována, na rozdíl od PCD v rostlinách a protistech, apoptóza. Nicméně vzhledem k tomu, že NCCD definovala apoptózu na základě biochemických znaků a drah v živočišných buňkách, je v této práci používán termín AL-PCD také pro označení apoptóze podobné PCD v kvasinkách.

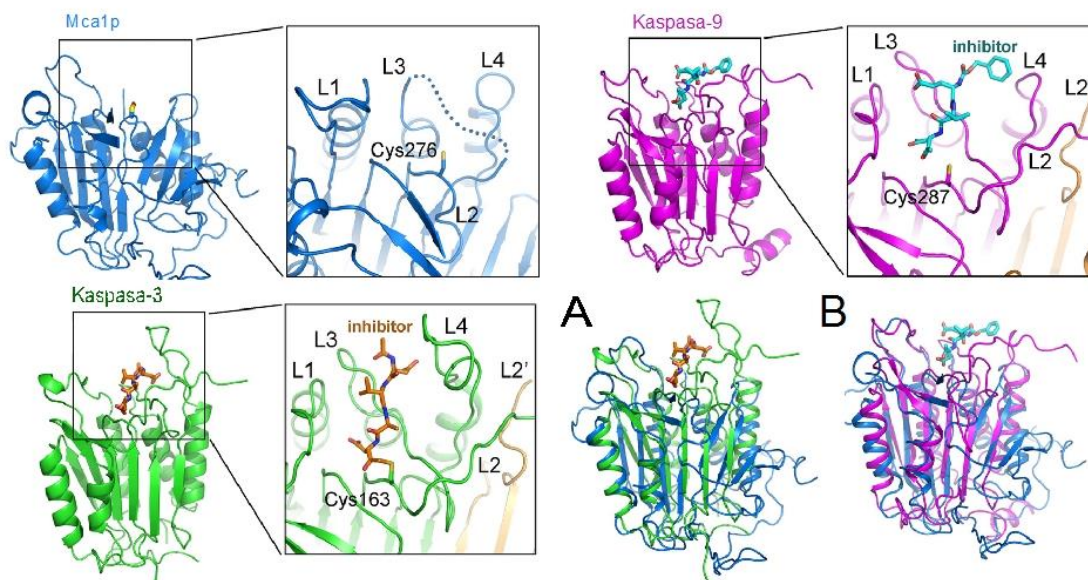
1.3.1 Molekulární regulace AL-PCD

Heterologní exprese savčího proapoptotického genu *BAX* v divokém kmenu kvasinky *S. cerevisiae* vedla k buněčné smrti doprovázené uvolněním cytochromu c z mitochondrie, externalizací PS a kondenzací chromatinu. Dalším členem rodiny BCL-2 (kap. 1.1.2) je savčí antiapoptotický protein BCL-X_L (z angl. „B-cell lymphoma-extra large“), antagonist proteinu BAX. V případě koexprese těchto dvou proteinů byly buňky před AL-PCD chráněny. Tyto výsledky poukazují na možné společné mechanismy regulace PCD v kvasinkách a živočiších [52, 53] a na možnost studia živočišných apoptotických genů v kvasinkovém modelu. Například byla provedena screeningová studie s kmenem kvasinky *S. cerevisiae*, který nesl plazmid pro expresi myšího genu *BAX* a jenž byl zároveň transformován lidskou genomovou cDNA knihovnou. Následně byly vybrány transformanty, u kterých nedošlo k PCD, a tedy u nichž musel existovat nějaký antiapoptotický signál neutralizující účinek BAX. Na základě této studie byl objeven protein BAX-inhibitor 1 (BI-1), u něžž bylo prokázáno, že dokáže inhibovat apoptózu zprostředkovanou proteinem BAX také v savčích buňkách [54]. Dalším příkladem studia savčích apoptotických pochodů v kvasinkách je heterologní exprese lidských apoptotických genů spojených se vznikem nádorů. Jeden z přístupů se zakládá na podobnosti represe oxidativního metabolismu kvasinky v případě utilizace glukosy, kdy je tento sacharid zpracováván alkoholovým kvašením (Crabtreeho efekt), a metabolického přeprogramování proliferujících nádorových buněk, kdy je glukosa metabolizována mléčným kvašením namísto oxidativní degradace (Warburgův efekt). Heterologní exprese genu *TP53*, který nemá v kvasinkách homologní gen a jeho produkt, protein p53 v nich zároveň působí jako transkripční faktor, měla proapoptotický efekt. Ukázalo se, že AL-PCD vyvolaná proteinem p53 je zprostředkovaná kvasinkovou mitochondriální nukleasou 1 (Nuc1), která je homologem živočišného proteinu EndoG, což mimo jiné poukazuje na úlohu mitochondrií v tomto typu PCD [55].

V kvasince *S. cerevisiae* byl objeven protein se strukturní podobností savčím kaspasám, který stejně jako ony vykazoval autolytickou funkci vedoucí k jeho aktivaci a u nějž byl za určitých podmínek prokázán proapoptotický efekt. Také krystalostrukturní studie ukázala jistou podobnost s kaspasami a přítomnost cysteinu důležitého pro enzymatickou aktivitu (obr. 3, str. 23). Gen kódující tento protein byl pojmenován *MCAI* (z angl. „metacaspase 1“), respektive *YCAI* (z angl. „yeast caspase 1“) [56, 57]. Na rozdíl od kaspas, jež rozpoznávají sekvenci obsahující aspartyl, kvasinková metakaspasa Mca1 vykazuje endopeptidasovou aktivitu rozpoznávající argininový či lysinový zbytek. Její cílové molekuly nejsou prozatím známy s jednou výjimkou. Tou je glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je touto proteasou štěpena v případě AL-PCD vyvolané H₂O₂, přičemž v signalizaci tohoto procesu hraje zřejmě úlohu oxid dusnatý, který působí S-nitrosaci GAPDH. [58]. Mimo této proapoptotické funkce vykazuje Mca1 také ochrannou úlohu. Mnohé výsledky ukazují, že se účastní pochodů spojených s degradací poškozených proteinů a jejich agregátů, a to hned několika mechanismy zahrnujícími proteasom, chaperony a protein Cdc48. Pro autolytickou aktivaci Mca1 vedoucí k AL-PCD jsou nezbytné vápenaté ionty, které tak zastávají úlohu molekulárního spínače apoptotická funkce [59]. PCD závislá na Mca1 je taková buněčná smrt, které může být alespoň částečně předejito delecí genu *MCAI*. Dle hrubých odhadů představuje 40 % případů pozorovaných AL-PCD [60]. To znamená, že existují jiné mechanismy, ve kterých tato metakaspasa nehraje roli, a přesto vedou k buněčné smrti se znaky apoptózy.

Další kaspasám podobnou proteasou, která se účastní AL-PCD, je Esp1 (z angl. „extra spindle pole bodies“). Tato cysteinová proteasa štěpí kvasinkový kohesin Mcd1 (z angl. „mitotic chromosome determinant“) v anafázi buněčného dělení nebo jako odpověď na stres vyvolaný H₂O₂. V druhém případě je C-terminální štěp proteinu Mcd1 translokován z jádra do mitochondrie, kde působí uvolnění cytochromu c z mitochondrie a zároveň snížení jejího membránového potenciálu [61]. Mutantní kmeny *S. cerevisiae*, které mají narušený proces N-glykosylace, vykazují známky AL-PCD včetně proteasové aktivity, jež je podobná aktivitě kaspas. Tato aktivita nemizí ani po delecí genu *MCAI*, což svědčí o přítomnosti jiné proteasy zodpovědné za pozorovanou kaspasovou aktivitu. Identifikována byla serinová

proteasa Kex1 (z angl. „killer expression defective“), která se účastní také AL-PCD vyvolané kyselinou octovou, tunikamycinem a AL-PCD související se stárnutím buněk [62].



Obrázek 3: Strukturní srovnání metakaspasy Mca1 z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s kaspasou-3 a kaspasou-9. V rámečcích zvětšeno aktivní místo proteas s označením katalycky důležitého cysteinu. V aktivním centru **Mca1 vykazují smyčky L1, L2 a L4 pevně definovanou konformaci, zatímco velká část smyčky L3 (zvýrazněná tečkovaně) je neuspořádaná (flexibilní pravděpodobně kvůli chybějícímu vázanému substrátu). U detailu aktivního centra **kaspas-3 a -9** jsou označeny strukturní smyčky odpovídající smyčkám Mca1. V aktivním centru kaspas je znázorněna vazba jejich inhibitoru. **A** Strukturní překryv Mca1 a kaspasy-3. **B** Strukturní překryv Mca1 a kaspasy-9. Převzato a upraveno z [57].**

V roce 2004 bylo zjištěno, že v kvasinkách objevený protein Aif vykazuje 22% identitu a 41% podobnost s lidským AIF. V případě apoptotického podnětu (jakým je například buněčný stres způsobený H_2O_2 nebo kyselinou octovou) vyvolává tento protein AL-PCD spojenou s jeho translokací z mitochondrie do jádra, kde působí kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA [63]. Tento objev podpořil myšlenku, že apoptóza a AL-PCD v kvasinkách mají společné evoluční kořeny, a tedy i podobné molekulární mechanismy jejich regulace. Objevy dalších homologních proteinů na sebe nenechaly dlouho čekat. Například kvasinková NADH:ubichinon oxidoreduktasa Ndi1 (z angl. „NADH dehydrogenase internal“) lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně je homolog živočišného proapoptotického proteinu AMID (z angl. „apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated inducer of death“), který je příbuzný AIF. Ukázalo se, že také Ndi1 má proapoptotický efekt spojený se zvýšenou produkcí ROS, přičemž ale byl tento efekt snížen v případě, že buňky měly spuštěný oxidativní metabolismus [64].

Mezi dalšími homologními proteiny najdeme například nukleární mediátor apoptózy (Nma111). Jedná se o serinovou proteasu, jejíž aktivace buněčným stresem vede k AL-PCD. Na rozdíl od lidské homologní serinové proteasy HTRA2 (z angl. „HtrA serine peptidase 2“), která se nachází v mitochondriích, odkud je v případě apoptózy uvolněna, najdeme protein Nma111 v jádře [65]. Cílovými molekulami proteasy HTRA2 jsou proteiny inhibující apoptózu (IAPs z angl. „inhibitor of apoptosis proteins“), v kvasince byl doposud objeven jeden jejich homolog Bir1 (z angl. „baculoviral IAP repeat-containing protein“), který byl původně identifikován jako protein účastnící se segregace chromosomů a cytokineze. Pro tyto procesy je důležitá C-terminální doména proteinu, zatímco pro jeho antiapoptotickou funkci je nezbytná jiná doména, která se vyskytuje také v IAPs. Protein Bir1 je lokalizován v jádře i cytoplazmě a představuje substrát pro proteasu Nma111, což ukazuje na podobný regulační mechanismus apoptózy a AL-PCD kvasinek zprostředkovaných proteasou HTRA2/Nma111 a proteinem IAP/Bir1. Nicméně následné mechanismy, kterými Bir1 projevuje svůj antiapoptotický účinek, nejsou doposud přesně popsány [66].

Dalším objeveným homologním proteinem je již zmíněný Nuc1 s nukleasovou aktivitou, který vykazuje ještě větší míru identity (42 %) a podobnosti (62 %) se svým lidským homologem EndoG, než je tomu u Aif a AIF. Protein Nuc1 má N-koncovou signální sekvenci pro lokalizaci do mitochondrie, kde se také za normálních podmínek vyskytuje. Ovšem v buňkách vystavených H_2O_2 dochází k jeho přemístění do jádra, přičemž se objevují brzké i pozdní znaky apoptózy. Překvapivě mutantní kmen *S. cerevisiae*, v němž byl gen *NUC1* deletován, vykazoval dva různé fenotypy v závislosti na metabolismu. Jelikož je protein Nuc1 proapoptotický, předpokládalo se, že delece kódujícího genu povede k vyšší míře přežívání buněk. Ovšem v případě prvního fenotypu při růstu s glukosou jako zdrojem uhlíku, tedy v případě fermentačního metabolismu, byla míra buněčné smrti zvýšená, nevykazovala však známky apoptózy, ale spíše nekrózy. U druhého fenotypu k inhibici apoptózy došlo v případě, kdy byl zdrojem uhlíku glycerol, a v buňkách byl tedy spuštěn oxidativní metabolismus. Tento výsledek poukazuje na ochrannou roli Nuc1 během fermentačního typu metabolismu, ovšem bližší mechanismus tohoto jevu není známý. AL-PCD zprostředkovaná proteinem Nuc1 není závislá na Aif a Mca1 [67]. Další ochranná role Nuc1 byla ukázána v případě tetraploidních buněk, kdy delece genu *NUC1* vedla k jejich eliminaci, zatímco diploidní buňky zůstaly nedotčeny. Stejný efekt delece homologního

genu kódujícího EndoG se projevil v případě lidské buněčné linie HCT116 karcinomu tlustého střeva [68].

Další kvasinková proteasa Pep4, která je lokalizovaná ve vakuole, kde se podílí na aktivaci dalších proteas a degradaci oxidativně poškozených proteinů [69], vykazuje ve své aktivní formě antiapoptotické vlastnosti, zatímco jako zymogen poskytuje buňkám ochranu před nekrotickou buněčnou smrtí, přičemž tato jeho funkce je spojena s biosyntézou polyaminů [50]. Savčím homologem proteinu Pep4 je lyzozomální endoproteasa kathepsin D, u které bylo prokázáno, že chrání buňky karcinomu tlustého střeva před apoptózou vyvolanou kyselinou octovou [70].

Kvasinkový model byl používán pro studium důležitých živočišných regulačních proteinů apoptózy z rodiny BCL-2 v domnění, že tento model představuje prostředí postrádající endogenní proteiny této rodiny. Avšak v genomu kvasinky *S. cerevisiae* byl objeven otevřený čtecí rámec *YNLC305C*, kódující protein homologní některým proteinům rodiny BCL-2. Protein Ynl305 byl charakterizován dvěma skupinami, ovšem závěry o jeho roli v AL-PCD byly protichůdné [71, 72]. První skupina jej nazvala kvasinkový „BH3-only“ protein (Ybh3 z angl. „yeast BH3-only protein“; proteiny „BH3-only“ jsou podrodinou rodiny BCL-2) a ukázali jeho proapoptotickou funkci v AL-PCD vyvolané kyselinou octovou či H₂O₂ [71]. Druhá skupina produkt genu *YNLC305C* označila Bxi1, přičemž poukázala na jeho homologii s proteiny BI-1 schopnými inhibovat BAX, tudíž majícími antiapoptotickou funkci. Skutečně i v případě Bxi1 byla jeho role v AL-PCD antiapoptotická. Rozdíl těchto výsledků může být způsoben použitím jiných apoptotických stimulů druhou skupinou. Buněčnou smrt indukovali teplotou, ethanolem a glukosou [72].

Samozřejmě výčet známých proteinů účastnících se AL-PCD není kompletní a ani pro rozsah této práce nemůže být. Jsou zde uvedeny jen nejdůležitější či z hlediska funkce nejprostudovanější proteiny, u kterých je často znám jejich savčí homolog. Aktivace různých regulačních proteinů nebo různý projev jejich aktivity v závislosti na způsobu, jakým je AL-PCD vyvolána, ukazuje na několik možných biochemických drah vedoucích ke stejnému konci a na vysokou komplexnost těchto procesů.

1.3.2 Role reaktivních forem kyslíku a mitochondrií v AL-PCD

Výše je zmíněno několik pokusů, ve kterých byl použit peroxid vodíku k indukci AL-PCD. Ve studii z roku 1999 bylo ukázáno, že nejen stimulace buněk peroxidem vodíku v nízkých

koncentracích, ale také delece genu *GSH1*, kódujícího γ -glutamylcysteinsynthetasu důležitou pro tvorbu antioxidantu glutathionu, mutace genu *CDC48* a heterologní exprese genu *BAX* vedla k akumulaci ROS, přičemž tento oxidativní stres následně vyvolal AL-PCD. Na druhou stranu byly buňky exprimující *BAX* a buňky s mutantním proteinem Cdc48 uchráněny před AL-PCD účinkem vychytávačů volných radikálů [73]. Také v dalších pozorovaných případech AL-PCD byla zaznamenána akumulace ROS, ať už buněčnou smrt vyvolaly vnější podněty (např. ionty kovů, kyselina octová, ethanol, kyselina valproová, chlorid sodný, tepelný stres), nebo fyziologické i narušené vnitrobuněčné procesy (např. stárnutí, poškozená replikace DNA, nefunkční N-glykosylace či stabilizace aktinových vláken) [74].

Hlavním zdrojem ROS v buňce jsou mitochondrie, respektive redoxní reakce, které v nich probíhají. Mutantní kmeny kvasinky *S. cerevisiae* postrádající mitochondriální DNA, a tedy neschopné buněčně dýchat, vykazují oproti buňkám, ve kterých je mitochondriální DNA přítomná, zvýšenou míru přežívání v případě AL-PCD vyvolané jednak kyselinou octovou [75] a jednak mutací genu *CDC48* [76]. V prvním případě je stejný fenotyp pozorován i při absenci cytochromu c v buňkách, v druhém případě je detekována také snížená produkce ROS.

Jak je výše uvedeno, nachází se v mitochondriích několik proteinů, které se v případě působení proapoptického stimulu na buňku účastní přenosu signálu vedoucího k AL-PCD. Tento fakt společně s dalšími skutečnostmi uvedenými v této podkapitole poukazují na zásadní úlohu mitochondrií a centrální postavení ROS a s nimi spojeného oxidativního stresu v regulaci AL-PCD způsobené jak vnějšími, tak vnitřními podněty. Nicméně zdrojem ROS jsou v buňce i další organely a procesy (například ER, peroxisom, aktivita oxidoreduktas), které tak mohou přispívat k akumulaci ROS během AL-PCD [77].

1.3.3 Vnitrobuněčné procesy vedoucí k AL-PCD

Jedním z endogenních procesů, které vyvolávají AL-PCD, je buněčné stárnutí. V kvasince existují dva typy stárnutí: replikativní stárnutí/dožití se měří jako počet dceřiných buněk, které mateřská buňka vyprodukuje (tedy počtem jejího dělení); chronologické stárnutí/dožití se měří časem, po který dokážou buňky ve stacionární (G_0) fázi přežít [78].

U umírajících replikativně starých mateřských buněk je pozorována akumulace ROS a oxidovaných molekul za standardních podmínek bez vnějšího stimulu, který by takový

oxidativní stres mohl vyvolat. Také kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a externalizace PS jsou v těchto buňkách přítomné [79]. Na mechanismu, jenž zajišťuje omlazení vznikající dceřiné buňky, se podílí asymetrická cytokineze, kdy oxidativním stresem poškozené proteiny jsou zadržovány v mateřské buňce [80]. Ukázalo se, že v mateřských buňkách zůstávají také poškozené mitochondrie s vyšším obsahem ROS [81], což zřejmě určuje následný apoptotický osud mateřské buňky.

I chronologicky staré buňky vykazují výše uvedené znaky AL-PCD a dokonce je zaznamenána kaspasová aktivita, za níž je zodpovědný protein Mca1, případně další proteasy. Zvýšená produkce transkripčního faktoru Yap1 (z angl. „yeast AP-1“) řídicího obecnou odpověď na buněčný stres prodloužila dobu dožití chronologicky starých buněk a snížila akumulaci ROS. Bylo také pozorováno uvolňování živin ze starých umírajících buněk, což by mohlo zvyšovat šance na přežití ostatních buněk. Ukázalo se, že poškození funkce Mca1 zvýšilo dobu přežívání buněk a snížilo akumulaci ROS, nicméně po přenesení chronologicky starých buněk do čerstvého média nebyl mutantní kmen s nefunkčním Mca1 schopený znovu nastartovat svůj růst. Smrt buněk spojená s uvolňováním živin do okolí v chronologicky starých kulturách tak zřejmě zajišťuje odstranění poškozených buněk nebo buněk neschopných přizpůsobit se novému prostředí, přičemž přežívají buňky, které mohou být replikativně mladší či v lepší kondici [82].

AL-PCD hraje důležitou roli v dlouhodobém vývoji a přežívání kolonií kvasinek při růstu na pevném podkladu. V případě kvasinkových kolonií dochází k nerovnoměrnému rozmístění buněk podle stáří: starší buňky jsou lokalizovány ve středu, zatímco mladší na okraji kolonií, přičemž apoptotické znaky byly pozorovány jen u buněk v jejich středu. Specifická lokalizace AL-PCD v koloniích je závislá na signalizaci amoniakem a probíhá bez účasti Aif a Mca1. Přesto je během tohoto procesu zaznamenána kaspasová aktivita, za kterou ale musí být zodpovědná jiná proteasa [83].

Mezi další vnitrobuněčné stimuly AL-PCD patří narušené procesy spojené s nukleovými kyselinami. Příkladem je replikace DNA představující přísně regulovaný proces během buněčného cyklu. Poškození její iniciace a s replikací spojených kontrolních bodů buněčného cyklu vede k buněčné smrti, při níž dochází k produkci ROS a aktivaci proapoptotické funkce Mca1 [84]. Proces odstranění 5'-čepičky mRNA je důležitý pro její degradaci, a tedy pro udržení ideálního množství mRNA v buňce a pro regulaci proteosyntézy. Dle studie z roku 2003 vede případné poškození proteinů spojených s tímto

procesem k AL-PCD [85]. V jiné studii z roku 2015 bylo ukázáno, že také další defekty v procesech degradace mRNA (nefunkční cytoplazmatický exosom a deadenylace) vedou k AL-PCD, která je závislá na Mca1 [86].

Zjistilo se také, že apoptóza je regulována modifikacemi histonů [87]. I v kvasince *S. cerevisiae* je průběh AL-PCD ovlivněn epigeneticky. Například ztráta methylace lysinu 4 histonu 3 v důsledku nefunkčnosti příslušné methylasy zvyšuje míru buněčné smrti závislé na Mca1 během chronologického stárnutí. Delece genu pro endonukleasu Nuc1 má v takovém případě antiapoptotický účinek [88].

Dalšími studovanými vnitrobuněčnými procesy vedoucími k AL-PCD jsou např. poruchy N-glykosylace [62] a zvýšená aktivita RAS/cAMP signální dráhy, která může být způsobena stabilizací aktinových vláken [89].

1.3.4 Vnější stimulace AL-PCD

Již výše bylo zmíněno několik sloučenin používaných v jednotlivých pokusech k indukci AL-PCD. Nejčastěji používané stimulanty jsou kyselina octová a peroxid vodíku. Mezi dalšími faktory, které jsou schopné vyvolat AL-PCD, najdeme například teplotní šok, UV záření, ethanol, kyselinu chlornou nebo chlorid sodný, dále pak látky, jež jsou v normálních koncentracích bezpečné či nezbytné pro buňku, ale ve vysokých koncentracích působí AL-PCD. Patří sem glukosa a sorbitol, které působí osmotický stres, a kationty kovů, jako jsou kationty železa, mědi, vápníku a hořčíku. Existují rostlinné toxiny s antimykotickým efektem založeným na vyvolání AL-PCD v patogenu a stejně působí některá farmaceutika (valproová kyselina, aspirin aj.) [48].

Programovanou buněčnou smrt se znaky apoptózy také působí dlouhodobé vystavení haploidních buněk pohlavnímu feromonu, které ale nevede k úspěšné konjugaci. Tento jev zřejmě zvyšuje kondici populace, jelikož ta se tímto mechanismem může zbavit poškozených jedinců neschopných konjugace [90].

AL-PCD je také pozorována při interakci mezi různými konkurujícími si kmeny kvasinky *S. cerevisiae*. Kmen schopný produkce tzv. „killer toxinů“, vůči kterým je sám rezistentní, je produkuje do okolí a tyto toxiny v nízkých koncentracích vyvolávají u citlivých kmenů AL-PCD [91].

Dále narušení homeostáze draselných iontů jejich uvolněním z buňky do okolí bylo dáno do souvislosti s AL-PCD v případě toxického působení lidského laktoferrinu na patogenní kvasinku *Candida albicans*. Vzhledem k tomu, že při pokusu nebyla narušena integrita plazmatické membrány, za výstup draselných iontů musely být zodpovědné jeho přenašeče. Ukázalo se, že vystavení buněk inhibitorům těchto přenašečů před vlastním působením laktoferrinu ochránilo buňky před AL-PCD. Tyto výsledky naznačují, že uvolnění draselných iontů z buňky představuje první kontrolní mechanismus spuštění laktoferrinem vyvolané PCD [92].

Glukosou indukovaná buněčná smrt (GICD z angl. „glucose induced cell death“) je jev, kdy v případě vystavení buněk glukose bez ostatních živin dochází k jejich umírání, přičemž je pozorována degradace DNA, smrštění buněk a zvýšená produkce ROS [93]. Pro vyvolání GICD je nezbytná fosforylace glukosy nebo její následný metabolismus [94].

1.4 Charakterizace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

1.4.1 Zařazení, ekologie, metabolismus a rozmnožování

Rod *Saccharomyces* patří do oddělení vřeckovýtrusých hub, řádu kvasinkotvaré. Druh *S. cerevisiae* můžeme v přírodě najít na bohatých zdrojích cukrů, jako jsou květy rostlin či ovoce, mezi kterými je přenášen hmyzem. Nicméně izolace z přírodních stanovišť není častá, tato kvasinka spíše kolonizuje umělá fermentační prostředí, jelikož ve svém metabolismu upřednostňuje fermentační zpracování sacharidů, což ji znevýhodňuje v přírodním konkurenčním prostředí s nízkým obsahem cukrů. Ukázalo se také, že může být patogenem imunokompromitovaných pacientů [95, 96]. Existuje řada kmenů tohoto druhu, které se vzájemně liší genotypem i fenotypem v závislosti na tom, zda se jedná o kmen laboratorní, o kmen z přírody nebo o kmen využívaný v technologiích [97]. *S. cerevisiae* se vyskytuje v haploidním i diploidním stadiu a může se rozmnožovat nepohlavně pučením, nebo pohlavně splynutím dvou haploidních buněk odlišných párovacích typů (*MATa* a *MAT α*).

1.4.2 Využití kvasinky *S. cerevisiae*

Archeologické nálezy dokládají, že fermentační schopnost kvasinek k produkci alkoholických nápojů a kvašeného jídla člověk využíval už v neolitu, kdy se z lovce a sběrače stal zemědělcem. Bez hlubší znalosti principu kvašení se postupně technologický proces vylepšoval a předával se z generace na generaci. V průběhu 19. století se přišlo na to,

že za fermentaci jsou zodpovědné kvasinky, respektive látky, které produkují. Tak se objevil termín enzym, doslova znamenající „v kvasince“. První čistou kulturu *S. cerevisiae* izoloval Emil Christian Hansen v roce 1888. Výzkum spojený se jmény Louise Pasteura, Emila Fischera a Eduarda Büchnera stály na počátku dlouhé řady objevů, které vedly k porozumění mnoha procesů, které neprobíhají jen v kvasinkách, ale představují základní poznatky biochemie a buněčné biologie. Díky těmto znalostem se kvasinky (nejen *S. cerevisiae*) staly široce použitelné v řadě biotechnologických aplikací (např. v potravinářství, environmentálních vědách, farmacii či biomedicíně), na druhou stranu některé druhy kvasinek představují škůdce v podobě patogenů nebo kontaminantů v potravinářské výrobě [97].

Kvasinka *S. cerevisiae* se také stala důležitým modelovým organismem v základním výzkumu, a to díky mnoha přednostem. Jedná se o eukaryotní organismus s rychlým růstem, jehož kultivace je levná. Existuje jak v diploidní, tak v haploidní formě a v roce 1996 se stala prvním eukaryotním organismem, u nějž byl kompletně sekvenován genom, jenž dodnes zůstává nejprobádanějším. Další výhody představuje jednak široká škála molekulárně biologických metod pro manipulaci s genetickou informací a jednak to, že mnohé fyziologické procesy sdílí s živočišnými buňkami. Tak se *S. cerevisiae* stala oblíbeným nástrojem základního výzkumu pro studium procesů spojených s vyššími eukaryoty [97].

1.4.3 Ionty alkalických kovů a jejich homeostáze

Draselné ionty jsou důležité pro mnoho fyziologických funkcí, jako je regulace buněčného objemu, udržení membránového potenciálu, regulace vnitrobuněčného pH, kompenzování náboje makromolekul, syntéza proteinů a aktivita enzymů. Na druhou stranu sodné ionty jsou pro buňku toxické, v nižších koncentracích sice dokáží částečně nahradit draselné ionty, ale vyšší koncentrace mají pro buňku letální efekt. Aby udržely ideální vnitrobuněčnou koncentraci iontů alkalických kovů (200 – 300 mM pro draselné kationty), disponují několika membránovými transportéry, které zajišťují jejich homeostázi. Zprostředkovaný transport nutný pro nabitě molekuly, které nemohou přes membránu volně difundovat, zajišťují jednak iontové kanály usnadněnou difuzí po elektrochemickém spádu, jednak aktivní transportéry, jež jsou schopné přenášet ionty proti elektrochemickému gradientu. Najdeme mezi nimi primárně aktivní transportéry, které k transportu využívají energii štěpení ATP, a sekundárně aktivní transportéry, jež využívají uniportu po elektrickém gradientu nebo symportu či antiportu s protonem, který je transportován po

elektrochemickém spádu, jenž bývá nazývána protonmotorická síla, z vnějšku dovnitř buňky. Protonmotorickou sílu zajišťuje membránová ATPasa Pma1 (za angl. „plasma membrane H⁺-ATPase“), která exportuje protony z buňky, a vytváří tak membránový potenciál se záporným nábojem na vnitřní straně membrány. Na důležitost její funkce poukazuje fakt, že se jedná o nejhojnější protein v plazmatické membráně a spotřebovává nejméně 20 % buněčného ATP. Její aktivita je stimulována nízkým vnitrobuněčným pH a glukosou [98, 99].

Nejdůležitější transportéry zajišťující vstup draselných iontů do buňky *S. cerevisiae* jsou vysokoafinitní uniportery Trk1 a Trk2 (z angl. „transport of potassium“). Mutantní kmeny, jež mají deletovány geny kódující tyto dva přenašeče, vyžadují pro svůj růst zvýšené množství draselných iontů [98]. Zatímco Trk1 zajišťuje import draselných iontů během exponenciální fáze růstu, ve stacionární fázi hraje hlavní roli Trk2 [98, 100]. Tok1 je napěťově řízený kanál pro ionty draslíku, který se otevírá v případě depolarizace plazmatické membrány. Hraje tak úlohu v opětovném ustanovení membránového potenciálu uvolněním nadbytečných draselných iontů ven z buňky. Na jejich výstupu se také podílí ATPasa, jejíž primární funkce je detoxikace buňky od sodných a lithných iontů. Gen *ENA* (exit of Na⁺) kódující tuto ATPasu se v kvasince *S. cerevisiae* vyskytuje v tandemových opakováních, přičemž jejich počet závisí na konkrétním kmenu. Dalším transportérem, který se podílí na exportu sodných, lithných i draselných iontů, je Na⁺/H⁺ antiporter Nha1, který ke své funkci využívá elektrochemický gradient protonů [98].

Na homeostázi iontů alkalických kovů v cytosolu se také podílí přenašeče v membránách organel. Transport jak draselných, tak sodných iontů do vakuoly zajišťuje antiporter Vnx1 (z angl. „vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger“), jenž využívá protonmotorické síly tvořené vakuolární membránovou ATPasou Vma1. Dalšími transportními systémy jsou K⁺/H⁺ antiporter Kha1, přenášející ionty do Golgiho aparátu, a Na⁺/H⁺ antiporter Nhx1, který detoxikuje cytosol od sodných a lithných iontů a snižuje nadměrnou cytosolární koncentraci draselných iontů jejich transportem do pozdního endosomu a vakuoly [98].

1.4.4 Předpokládaná úloha transportérů Trk1 a Trk2 v GICD u kvasinky *S. cerevisiae*

Glukosa mimo jiné aktivuje Pma1, která zvýší export protonů ven z buňky, což by vedlo k hyperpolarizaci plazmatické membrány, kdyby zároveň nedošlo ke glukosou aktivovanému specifickému transportu draselných iontů do buňky, aby bylo vyrovnáno

množství kladných nábojů [99, 101]. V roce 2010 byl publikován článek o roli draselných transportérů v glukosou indukované buněčné smrti (GICD) v kvasince *S. cerevisiae*. Zjistilo se, že přidáním draselných kationtů do roztoku glukosy lze částečně předejít buněčné smrti. Také byl proveden pokus s mutantním kmenem postrádajícím transportéry Trk1 a Trk2. Ukázalo se, že ochrana buněk před GICD je v nízkých koncentracích (10 mM) vnějších draselných kationtů závislá na těchto dvou transportních systémech, kdy kmen bez transportérů Trk1 a Trk2 vykazoval nižší míru přežití než kmen se všemi transportéry. Ve vysokých koncentracích (100 mM) byl tento rozdíl minimální, jelikož vstup draselných iontů za těchto podmínek zřejmě zprostředkoval nízkoafinitní transportní systém. GICD vede k hyperpolarizaci plazmatické membrány v důsledku zvýšené aktivace Pma1 a produkci ROS. Oba tyto jevy byly zmírněny přítomností KCl v 10 mM koncentraci. Na roli Pma1 v GICD poukazuje též fakt, že snížení její aktivity vedlo ke zvýšení míry přežívání buněk. GICD je doprovázena únikem draselných iontů z buňky. Delece genů všech transportérů pro výstup draselných iontů z buňky (Tok1, Nha1, Ena1-4) způsobila vyšší míru přežívání buněk, o něco menší zlepšení vykazoval mutantní kmen bez transportérů Nha1 a Ena1-4. Delece pouze genu *TOK1* či pouze genu *NHA1* nemělo na GICD vliv. Z uvedených výsledků vyplývá, že transport draselných iontů přes membránu se podílí na regulaci GICD a to tak, že jejich výtok z buňky vede k buněčné smrti, zatímco jejich vstup do buňky zprostředkovaný vysokoafinitními transportéry Trk1 a Trk2 pomáhá buněčné smrti předejít. Mechanismus tohoto účinku je spojen s ATPasou Pma1, která svou aktivitou zvyšuje polarizaci membrány. Ovšem vstupem draselných iontů, za něž jsou zodpovědné přenašeče Trk1 a Trk2 je naopak membránový potenciál snižován [102].

2. Cíl práce

Cílem této práce je zjistit, jak aktivita transportérů draselných iontů ovlivňuje glukosou indukovanou buněčnou smrt kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Materiál a metody

3.1 Přístrojové vybavení

Sada pipet GILSON Pipetman Ultra

Laboratorní váhy KERN EG

Autokláv Schoeller Tuttnauer 2540 EL

Termostat Schoeller GALLENKAMP size L

Orbitální třepačka HT INFORS Minitron

Horizontální třepačka Heidolph PROMAX 1020

Spektrofotometr Eppendorf BioPhotometer

Centrifuga Eppendorf 5810 R s výkyvným rotorem A-4-62

Přístroj pro přípravu deionizované vody Fistreem CYCLON

3.2 Chemikálie

YPD (kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, glukosa 20 g/l, od společnosti Formedium)

YPD agar (YPD s přidaným agarem v množství 20 g/l, Formedium)

KCl (PENTA)

D.glukosa bezvodá (Lach:ner)

D-fruktosa bezvodá (Sigma-Aldrich)

D-galaktosa bezvodá (Sigma-Aldrich)

D-maltosa monohydrát (Sigma-Aldrich)

Deionizovaná voda

3.3 Příprava médií a roztoků, sterilizace

Tekuté kultivační médium YPD, případně YPD se 100 mM KCl: Navážené množství YPD, případně KCl bylo rozpuštěno v odměřeném objemu deionizované vody v uzavíratelné lahvi. Po promíchání bylo médium sterilizováno autoklávováním a poté uchováváno při laboratorní teplotě.

Tuhé kultivační médium YPD agar, případně YPD agar se 100 mM KCl: Navážené množství YPD agar, případně KCl bylo rozpuštěno v odměřeném objemu deionizované vody v uzavíratelné lahvi. Po promíchání bylo médium sterilizováno autoklávováním a ještě za tepla nalito na Petriho misky. Po zatuhnutí a vyschnutí byly Petriho misky uchovávány ve 4 °C.

2% (w/v) roztoky sacharidů: Příslušné navážené množství sacharidu bylo rozpuštěno v odměřeném množství deionizované vody. Po úplném rozpuštění byl roztok sterilizován mikrofiltrací. Roztoky byly uchovávány při 4 °C.

Deionizovaná voda byla sterilizovaná autoklávováním.

3.4 Kmeny kvasinky *S. cerevisiae*

K pokusům byl použit laboratorní kmen BY4741 a od něj odvozené mutantní kmeny s deletovanými geny pro transportéry draselných iontů, jejichž souhrn uvádí tabulka 2.

Tabulka 2: Použitý kmen *S. cerevisiae* a odvozené mutantní kmeny

Označení	Deletované geny	Reference
BY4741	-	EUROSCARF
BYT3	<i>TOK1</i>	[103]
BYT45	<i>NHA1 ENA1-5</i>	[104]
BYT12	<i>TRK1 TRK2</i>	[105]
BYT12345	<i>TRK1 TRK2 TOK1 NHA1 ENA1-5</i>	[104]
BYT1	<i>TRK1</i>	[106]
BYT2	<i>TRK2</i>	[106]

EUROSCARF – Evropský archiv kvasinky *S. cerevisiae*, zkratka z angl. „European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis“

3.5 Oživování a kultivace kvasinkových kultur

Kmeny jsou dlouhodobě uchovávány ve 30% roztoku glycerolu při -80 °C. Pro oživení se zamražená buněčná suspenze přenáší sterilně na Petriho misky s YPD agarem (BY4741, BYT3, BYT45) nebo s YPD agarem se 100 mM KCl (BYT12, BYT12345, BYT1 a BYT2). Buňky se kultivují v termostatu 2 dny při 30 °C. Poté jsou krátkodobě uchovávány při 4 °C.

3.6 Test přežívání

K testu přežívání indukované buněčné smrti byla použita metoda popsána v [102]. Příslušné kultury byly zaočkovány do 10 ml tekutého YPD média (BY4741, BYT3, BYT45) nebo YPD média se 100mM KCl (BYT12, BYT12345, BYT1, BYT2) a inkubovány na orbitální třepačce HT INFORS Minitron při 30 °C a 160 otáčkách za minutu (rpm) do doby, kdy buňky dosáhly stacionární fáze růstu. Ta byla stanovena měřením optické denzity při 600 nm. Následně byly buňky třikrát promyty sterilní vodou (třikrát opakovaným centrifugováním při $3\,000 \times g$ po dobu 5 min, slitím supernatantu a následovaným resuspendováním v 10 ml sterilní vody) a nakonec resuspendovány v 10 ml sterilní vody. Buněčná suspenze (200 μ l) byla přidána do plastové zkumavky s víčkem obsahující 1,8 ml sterilní vody či 1,8 ml sterilního 2% roztoku sacharidu (čas 0). Zkumavky byly inkubovány na horizontální třepačce Heidolph PROMAX 1020 při 37 °C a 130 rpm.

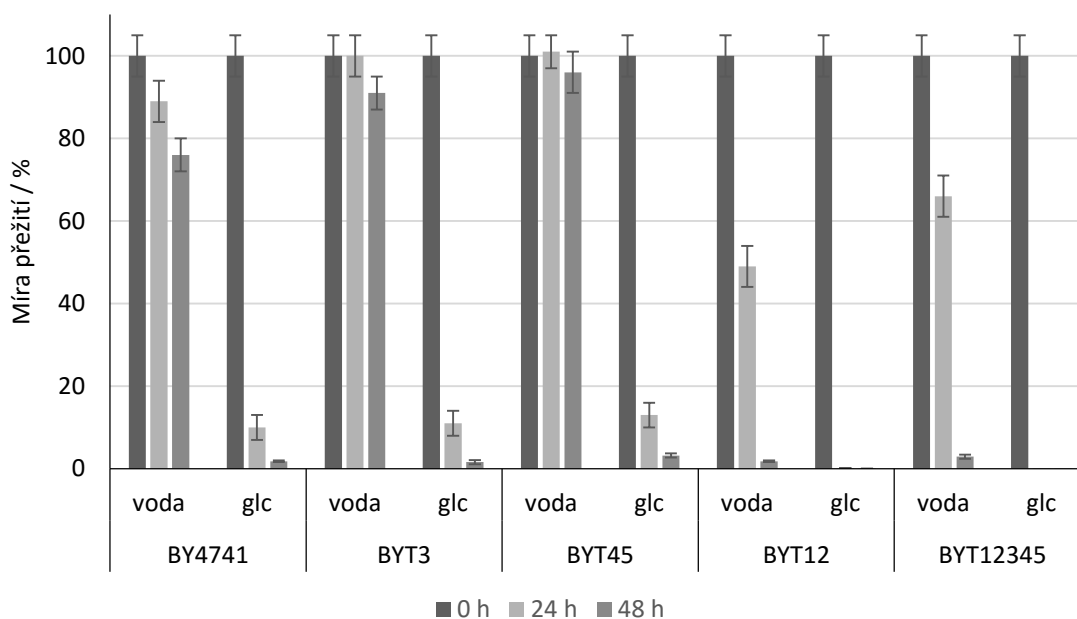
V čase 0 a dalších příslušných časech (24 h a 48 h, respektive 12 h a 18 h) byl odebrán vzorek, který byl naředěn a buňky byly vysety na 3 Petriho misky s YPD agarem. Po dvou dnech ve 30 °C byly spočítány kolonie vyrostlé na miskách a výsledky ze 3 misek zprůměrovány. Průměry byly přepočítány na cfu (kolonie tvořící jednotky z angl. „colony-forming unit“)/ml. Hodnota cfu/ml v čase nula představuje 100% přežití a k této hodnotě je vztažena procentuální míra přežití buněk v ostatních časech. Každý pokus byl proveden třikrát. Reprezentativní výsledky představují průměr 3 misek z 1 pokusu, ostatní výsledky jsou průměrem 3 pokusů.

4. Výsledky

4.1 Vliv transportérů draselných iontů na GICD

V prvním pokusu byla porovnávána role jednotlivých transportních systémů v glukosou indukované buněčné smrti (GICD). Všechny studované kmeny *S. cerevisiae* byly po promytí a resuspendování jejich stacionárních kultur přidány do vody nebo 2% roztoku glukosy.

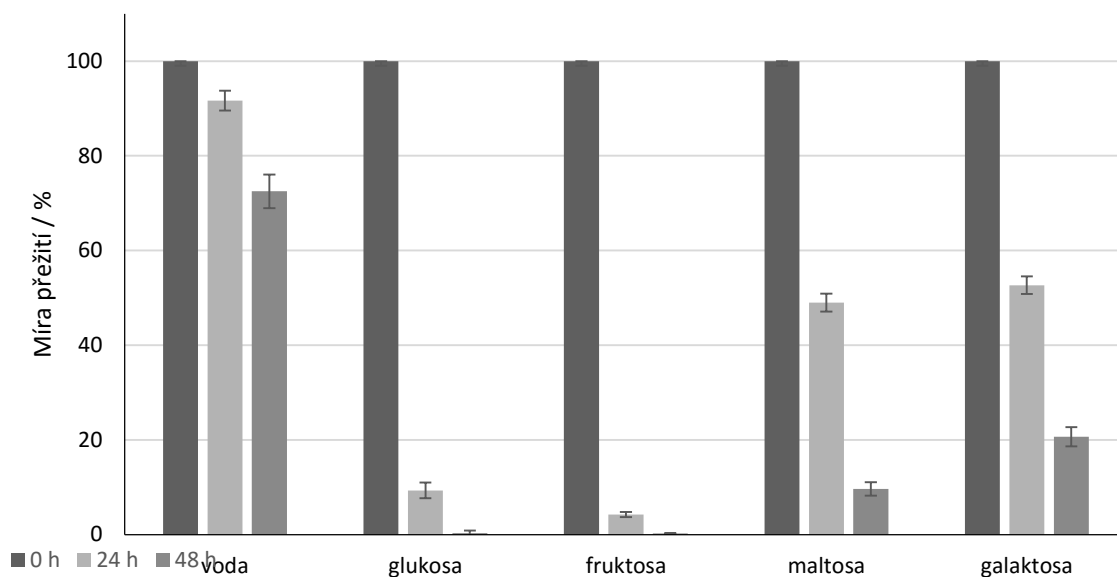
Výsledky (obr. 4) ukazují, že všechny kmeny přežívají hůře v roztoku 2% glukosy než ve vodě. Kmeny BYT3 a BYT45 postrádající přenašeč transportující draselné ionty z buňky přežívají ve 2% roztoku glukosy obdobně jako kmen BY4741, po 48 h přežívají necelá 2 % buněk, respektive 3 % u kmene BYT45. Naproti tomu míry přežití kmene BYT12, který nemá přenašeče pro vstup draselných iontů do buňky, a kmene BYT12345, jenž postrádá všechny transportní systémy, jsou nulové již po 24 h. Přítomnost transportérů pro vstup draselných iontů je tedy zásadní pro částečnou ochranu buněk před GICD.



Obr. 4: Vliv transportérů draselných iontů na GICD. Kmeny byly vystaveny působení vody a 2% roztoku glukosy. V čase 0 h, 24 h a 48 h byly odebrané vzorky naředěny a vysety na Petriho misky. Průměr počtu kolonií ze 3 misek byl přepočítán na hodnotu cfu/ml, tato hodnota byla následně vyjádřena jako procentuální míra přežití. Pokus byl proveden třikrát a toto jsou reprezentativní výsledky jednoho pokusu. Chybové úsečky představují standardní chybu.

4.2 Vliv aktivace Pma1 na rychlost buněčné smrti

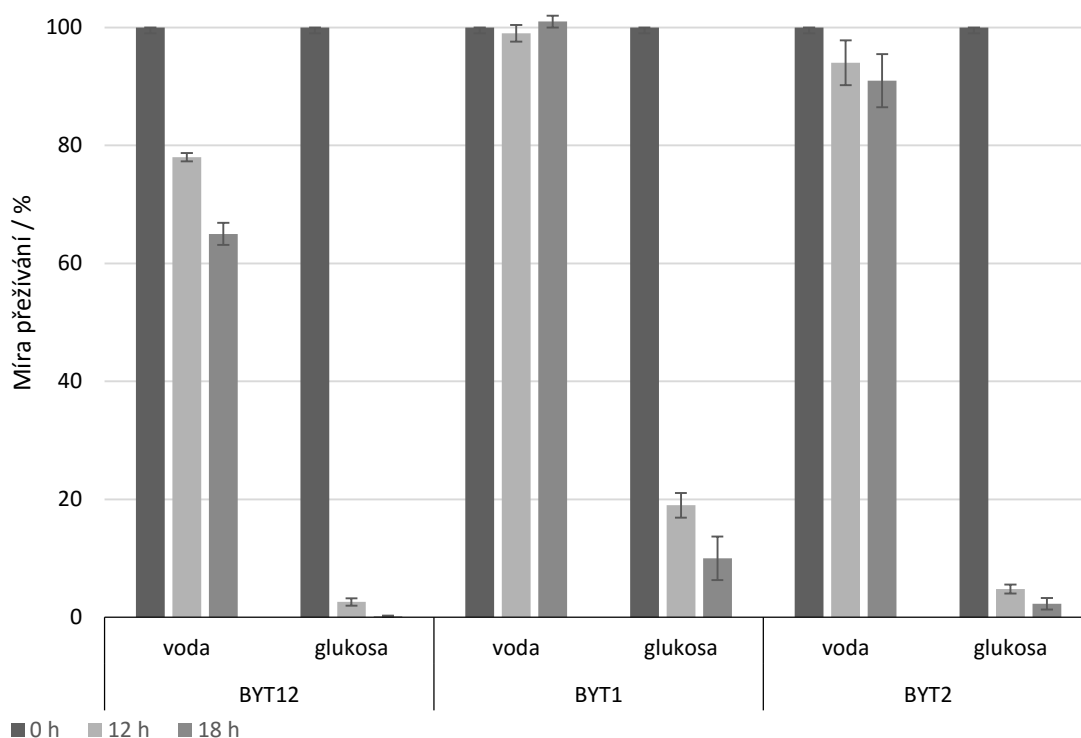
Ke studiu vlivu aktivace ATPasy Pma1 na indukovanou buněčnou smrt byly použity vybrané sacharidy. Glukosa a fruktosa aktivují Pma1, zatímco maltosa a galaktosa představují sacharidy, které tuto ATPasu neaktivují [107]. Jejich vliv na buněčnou smrt byl studován na kmenu BY4741. Jak ukazuje graf na obrázku 5 na straně 38, vystavení 2% roztokům sacharidů vede k nižší míře přežití oproti vodě. Buňky ale umírají rychleji v přítomnosti glukosy a fruktosy (9 %, respektive 4 % po 24 h, téměř 0 % po 48 h) než je tomu v přítomnosti maltosy a galaktosy, kdy i po 48 h zůstává 10 %, respektive 20 % buněk živých. Zvýšená aktivace Pma1 tedy urychluje buněčnou smrt.



Obrázek 5: Míra přežívání buněk BY4741 ve 2% roztocích sacharidů. V čase 0 h, 24 h a 48 h byly odebrané vzorky naředěny a vysety na Petriho misky. Průměr počtu kolonií ze 3 misek byl přepočítán na hodnotu cfu/ml, tato hodnota byla následně vyjádřena jako procentuální míra přežití. Výsledky představují průměr 3 nezávislých pokusů, chybové úsečky pak střední chybu průměru.

4.3 Rozdíl přežívání GICD mutantních kmenů BYT1 a BYT2

GICD kmene BYT12 je poměrně rychlý proces. Proto byl pokus pro testování přežívání kmenů BYT1 a BYT2 po vystavení 2% roztoku glukosy zkrácen a vzorky byly odebírány v časech 0, 12 a 18 h. Výsledky (obr. 6, str. 39) ukazují, že po 12 h přežilo cca 1,5 % buněk kmene BYT12, 18 % buněk kmene BYT1 a 4 % buněk kmene BYT2. Po 18 h byla míra přežití buněk BYT12 takřka nulová, zatímco stále přežívalo 10 %, respektive 2 % buněk BYT1 a BYT2.



Obrázek 6: Rozdíl přežívání GICD mutantních kmenů BYT12, BYT1 a BYT2. Kmeny byly vystaveny působení vody nebo 2% roztoku glukosy. V čase 0 h, 12 h a 18 h byly odebrané vzorky naředěny a vysety na Petriho misky. Průměr počtu kolonií ze 3 misek byl přepočítán na hodnotu cfu/ml, tato hodnota byla následně vyjádřena jako procentuální míra přežití. Výsledky jsou průměrem 3 nezávislých opakování a chybové úsečky představují střední chybu průměru.

5. Diskuze

GICD vede v kvasince *S. cerevisiae* k aktivaci ATPasy Pma1 a uvolnění draselných iontů ven z buňky [102]. To má za následek hyperpolarizaci plazmatické membrány. Výtok pozitivního náboje by mohla buňka zčásti nahradit aktivním transportem uvolněných draselných iontů do buňky. Ukázali jsme, že nejen kmen BYT12 postrádající transportní systémy pro vstup draselných iontů Trk1 a Trk2, ale i kmen BYT12345, který postrádá všechny transportní systémy pro draselné ionty, vykazují nižší míru přežívání oproti kmenům, které transportéry pro vstup draselných iontů mají. To vede k hypotéze, že v případě těchto kmenů je hyperpolarizace plazmatické membrány vyšší, jelikož nejsou schopny výtok náboje zčásti kompenzovat. Otázkou pak zůstává, zda není hyperpolarizace plazmatické membrány kmene BYT12, případně BYT12345 tak velká, že dochází k masivnímu poškození buňky, které nevede k AL-PCD, ale spíše k nekrotické smrti. K té by také mohla přispět glukosou způsobená zvýšená aktivita ATPasy Pma1, jejíž značná spotřeba molekul ATP by mohla způsobit vyčerpání jejich zásob. Proto v následujících

pokusech navrhujeme změřit změny membránového potenciálu kmenů BY4741 a BYT12 a množství ATP v buňkách v průběhu GICD. Případné měření apoptotických znaků by pak napovědělo o povaze buněčné smrti kmene BYT12.

V citované publikaci věnující se roli draselných transportérů v GICD [102] autoři uveřejňují pozorování mírného nárůstu přežívání kmene BYT45 postrádajícího výstupní systémy Nha1 a Ena1-5 pro draselné ionty oproti kmenu se všemi transportéry. My jsme takový rozdíl nepozorovali, respektive mírný nárůst míry přežívání kmene BYT45 nebyl signifikantní.

Porovnání vlivu delece genu *TRK1* a *TRK2* ukázalo, že nepřítomnost přenašeče Trk2 působí vyšší míru buněčné smrti. To zřejmě souvisí s použitím buněk ze stacionární fáze růstu, ve kterých přenašeč Trk2 hraje hlavní úlohu v transportu draselných iontů do buňky [100]. Kmen BYT1, který má pouze přenašeč Trk2, je tak ve výhodě oproti kmenu BYT2, který má pouze přenašeč Trk1.

6. Souhrn

Pomocí delečních mutantních kmenů *S. cerevisiae* byl testován vliv 5 různých transportérů draselných iontů na GICD. V pokusech bylo prokázáno, že míra přežívání buněk kvasinky *S. cerevisiae* nezávisí na přítomnosti a aktivitě přenašečů pro výstup draselných iontů Tok1, Nha1 a Ena1-5. Aktivita transportérů draselných kationtů Trk1 a Trk2 má zásadní vliv na průběh buněčné smrti vyvolané glukosou v kvasince *S. cerevisiae*. Vliv aktivity ATPasy Pma1 na buněčnou smrt jsme testovali použitím sacharidů, které tuto ATPasu aktivují, a sacharidů, které ji neaktivují. Dle našich výsledků vede její zvýšená aktivita k rychlejší buněčné smrti. Dále jsme pozorovali, že pro vyšší míru přežívání buněk je významnější přítomnost transportéru Trk2 než přítomnost transportéru Trk1. Dosažené výsledky otevírají další možnost studia této problematiky.

7. Přehled použité literatury

1. Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development, *Cell*. **88**, 347-354.
2. Clarke, P. G. & Clarke, S. (2012) Nineteenth century research on cell death, *Exp. Oncol.* **34**, 139-145.
3. Majno, G. & Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am. J. Pathol.* **146**, 3-15.
4. Glucksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **26**, 59-86.
5. Lockshin, R. A. & Williams, C. M. (1964) Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths, *Journal of Insect Physiology*. **10**, 643-649.
6. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*. **26**, 239-257.
7. Wyllie, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*. **284**, 555-556.
8. Arends, M. J., Morris, R. G. & Wyllie, A. H. (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease, *Am. J. Pathol.* **136**, 593-608.
9. Hedgecock, E. M., Sulston, J. E. & Thomson, J. N. (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Science*. **220**, 1277-1279.
10. Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell*. **44**, 817-829.
11. Yuan, J. Y. & Horvitz, H. R. (1990) The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death, *Dev. Biol.* **138**, 33-41.
12. Hengartner, M. O., Ellis, R. E. & Horvitz, H. R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death, *Nature*. **356**, 494-499.
13. Vaux, D. L., Weissman, I. L. & Kim, S. K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*, *Science*. **258**, 1955-1957.
14. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell*. **75**, 641-652.
15. Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*, *Cell*. **76**, 665-676.
16. Stehbens, W. E. (2000) The significance of programmed cell death or apoptosis and matrix vesicles in atherogenesis, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **46**, 99-110.
17. Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516.

18. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death Differ.* **19**, 107-120.
19. Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M. & Chan, F. K. (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation, *Cell.* **137**, 1112-1123.
20. Lavrik, I. N., Golks, A. & Krammer, P. H. (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *J. Clin. Invest.* **115**, 2665-2672.
21. Bossy-Wetzel, E. & Green, D. R. (2000) Detection of apoptosis by annexin V labeling, *Methods Enzymol.* **322**, 15-18.
22. Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W. & Schwartz, L. M. (1995) Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro, *Neuron.* **15**, 385-393.
23. Lund, L. R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M. J., Dano, K. & Werb, Z. (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways, *Development.* **122**, 181-193.
24. van Doorn, W. G. (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals, *J. Exp. Bot.* **62**, 4749-4761.
25. Greenberg, J. T. (1996) Programmed cell death: a way of life for plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12094-12097.
26. Pennell, R. I. & Lamb, C. (1997) Programmed Cell Death in Plants, *Plant Cell.* **9**, 1157-1168.
27. Reape, T. J., Molony, E. M. & McCabe, P. F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes, *J. Exp. Bot.* **59**, 435-444.
28. Curtis, M. J. & Wolpert, T. J. (2004) The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity, *Plant J.* **38**, 244-259.
29. Balk, J., Chew, S. K., Leaver, C. J. & McCabe, P. F. (2003) The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death, *Plant J.* **34**, 573-583.
30. Balk, J., Leaver, C. J. & McCabe, P. F. (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants, *FEBS Lett.* **463**, 151-154.
31. Chichkova, N. V., Kim, S. H., Titova, E. S., Kalkum, M., Morozov, V. S., Rubtsov, Y. P., Kalinina, N. O., Taliany, M. E. & Vartapetian, A. B. (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response, *Plant Cell.* **16**, 157-171.

32. van Doorn, W. G. & Woltering, E. J. (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants, *Trends Plant Sci.* **10**, 117-122.
33. Moharikar, S., D'Souza, J. S., Kulkarni, A. B. & Rao, B. J. (2006) Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: Detection and functional analyses, *Journal of Phycology.* **42**, 423-433.
34. Welburn, S. C., Dale, C., Ellis, D., Beecroft, R. & Pearson, T. W. (1996) Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro, *Cell Death Differ.* **3**, 229-236.
35. Madeo, F., Frohlich, E. & Frohlich, K. U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis, *J. Cell Biol.* **139**, 729-734.
36. Engelberg-Kulka, H. & Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures, *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 43-70.
37. Nedelcu, A. M., Driscoll, W. W., Durand, P. M., Herron, M. D. & Rashidi, A. (2011) On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world, *Evolution.* **65**, 3-20.
38. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. & Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6059-6063.
39. Hazan, R., Sat, B. & Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions, *J. Bacteriol.* **186**, 3663-3669.
40. Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. & Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria, *PLoS Genet.* **2**, e135.
41. Ramisetty, B. C., Natarajan, B. & Santhosh, R. S. (2015) mazEF-mediated programmed cell death in bacteria: "what is this?", *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 89-100.
42. Erental, A., Sharon, I. & Engelberg-Kulka, H. (2012) Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway, *PLoS Biol.* **10**, e1001281.
43. Hazan, R. & Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1, *Mol. Genet. Genomics.* **272**, 227-234.
44. Deponte, M. (2008) Programmed cell death in protists, *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 1396-1405.
45. Shemarova, I. V. (2010) Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **155**, 341-353.
46. Falcone, C. & Mazzoni, C. (2016) External and internal triggers of cell death in yeast, *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2237-2250.
47. Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M., Shima, D. T., Hibi, M. & Hirano, T. (1999) Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis, *Immunity.* **11**, 709-719.
48. Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Buttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G. & Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines, *Cell Death Differ.* **17**, 763-773.

49. Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kraemer, G. & Madeo, F. (2006) Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war, *J. Cell Biol.* **175**, 521-525.
50. Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M. A., Ring, J., Knauer, H., Eisenberg, T., Buttner, S., Ruckstuhl, C., Reisenbichler, A., Magnes, C., Rechberger, G. N., Birner-Gruenberger, R., Jungwirth, H., Frohlich, K. U., Sinner, F., Kroemer, G. & Madeo, F. (2011) The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis, *Cell Death Dis.* **2**, e161.
51. Dziejczak, S. A. & Caplan, A. B. (2012) Autophagy proteins play cytoprotective and cytotoxic roles in leucine starvation-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Autophagy*. **8**, 731-738.
52. Manon, S., Chaudhuri, B. & Guerin, M. (1997) Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL, *FEBS Lett.* **415**, 29-32.
53. Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K. U. & Wolf, D. H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast, *FEBS Lett.* **438**, 61-65.
54. Xu, Q. & Reed, J. C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast, *Mol. Cell.* **1**, 337-346.
55. Guaragnella, N., Palermo, V., Galli, A., Moro, L., Mazzoni, C. & Giannattasio, S. (2014) The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2, *FEMS Yeast Res.* **14**, 2-16.
56. Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S. & Frohlich, K. U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, *Mol. Cell.* **9**, 911-917.
57. Wong, A. H., Yan, C. & Shi, Y. (2012) Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1, *J. Biol. Chem.* **287**, 29251-29259.
58. Silva, A., Almeida, B., Sampaio-Marques, B., Reis, M. I., Ohlmeier, S., Rodrigues, F., Vale, A. & Ludovico, P. (2011) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase, *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 2044-2049.
59. Hill, S. M. & Nystrom, T. (2015) The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger, *Bioessays.* **37**, 525-531.
60. Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Buttner, S., Eisenberg, T. & Kroemer, G. (2009) Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 227-231.
61. Yang, H., Ren, Q. & Zhang, Z. (2008) Cleavage of Mcd1 by caspase-like protease Esp1 promotes apoptosis in budding yeast, *Mol. Biol. Cell.* **19**, 2127-2134.
62. Hauptmann, P. & Lehle, L. (2008) Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid, and chronological aging, *J. Biol. Chem.* **283**, 19151-19163.
63. Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S. M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K. U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S. J., Kroemer, G. & Madeo, F. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.* **166**, 969-974.

64. Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W. & Zhou, B. (2006) Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging, *Mol. Biol. Cell.* **17**, 1802-1811.
65. Fahrenkrog, B., Sauder, U. & Aebi, U. (2004) The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis, *J. Cell Sci.* **117**, 115-126.
66. Walter, D., Wissing, S., Madeo, F. & Fahrenkrog, B. (2006) The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2, *J. Cell Sci.* **119**, 1843-1851.
67. Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Frohlich, K. U., Sigrist, S. & Madeo, F. (2007) Endonuclease G regulates budding yeast life and death, *Mol. Cell.* **25**, 233-246.
68. Buttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Vitale, I., Castedo, M., Ruli, D., Eisenberg, T., Kroemer, G. & Madeo, F. (2007) Depletion of endonuclease G selectively kills polyploid cells, *Cell Cycle.* **6**, 1072-1076.
69. Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M. A., Almeida, T., Hohmann, S., Moradas-Ferreira, P. & Costa, V. (2006) The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology.* **152**, 3595-3605.
70. Oliveira, C. S., Pereira, H., Alves, S., Castro, L., Baltazar, F., Chaves, S. R., Preto, A. & Corte-Real, M. (2015) Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria, *Cell Death Dis.* **6**, e1788.
71. Buttner, S., Ruli, D., Vogtle, F. N., Galluzzi, L., Moitzi, B., Eisenberg, T., Kepp, O., Habernig, L., Carmona-Gutierrez, D., Rockenfeller, P., Laun, P., Breitenbach, M., Khoury, C., Frohlich, K. U., Rechberger, G., Meisinger, C., Kroemer, G. & Madeo, F. (2011) A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis, *EMBO J.* **30**, 2779-2792.
72. Cebulski, J., Malouin, J., Pinches, N., Cascio, V. & Austriaco, N. (2011) Yeast Bax inhibitor, Bxi1p, is an ER-localized protein that links the unfolded protein response and programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One.* **6**, e20882.
73. Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. & Frohlich, K. U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.* **145**, 757-767.
74. Farrugia, G. & Balzan, R. (2012) Oxidative stress and programmed cell death in yeast, *Front. Oncol.* **2**, 64.
75. Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A. & Corte-Real, M. (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2598-2606.
76. Braun, R. J., Zischka, H., Madeo, F., Eisenberg, T., Wissing, S., Buttner, S., Engelhardt, S. M., Buringer, D. & Ueffing, M. (2006) Crucial mitochondrial impairment upon CDC48 mutation in apoptotic yeast, *J. Biol. Chem.* **281**, 25757-25767.
77. Perrone, G. G., Tan, S. X. & Dawes, I. W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1783**, 1354-1368.

78. Piper, P. W. (2006) Long-lived yeast as a model for ageing research, *Yeast*. **23**, 215-226.
79. Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K. U. & Breitenbach, M. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis, *Mol. Microbiol.* **39**, 1166-1173.
80. Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J. & Nystrom, T. (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p, *Genes Dev.* **21**, 2410-2421.
81. McFaline-Figueroa, J. R., Vevea, J., Swayne, T. C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I. R. & Pon, L. A. (2011) Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast, *Aging Cell*. **10**, 885-895.
82. Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K. U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S. & Madeo, F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.* **164**, 501-507.
83. Vachova, L. & Palkova, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia, *J. Cell Biol.* **169**, 711-717.
84. Weinberger, M., Ramachandran, L., Feng, L., Sharma, K., Sun, X., Marchetti, M., Huberman, J. A. & Burhans, W. C. (2005) Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication, *J. Cell Sci.* **118**, 3543-3553.
85. Mazzoni, C., Mancini, P., Verdone, L., Madeo, F., Serafini, A., Herker, E. & Falcone, C. (2003) A truncated form of KILsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeast, *Mol. Biol. Cell.* **14**, 721-729.
86. Raju, K. K., Natarajan, S., Kumar, N. S., Kumar, D. A. & N, M. R. (2015) Role of cytoplasmic deadenylation and mRNA decay factors in yeast apoptosis, *FEMS Yeast Res.* **15** (2).
87. Fullgrabe, J., Hajji, N. & Joseph, B. (2010) Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications, *Cell Death Differ.* **17**, 1238-1243.
88. Walter, D., Matter, A. & Fahrenkrog, B. (2014) Loss of histone H3 methylation at lysine 4 triggers apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genet.* **10**, e1004095.
89. Gourlay, C. W. & Ayscough, K. R. (2006) Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.* **26**, 6487-6501.
90. Severin, F. F. & Hyman, A. A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*, *Curr. Biol.* **12**, R233-5.
91. Reiter, J., Herker, E., Madeo, F. & Schmitt, M. J. (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.* **168**, 353-358.
92. Andres, M. T., Viejo-Diaz, M. & Fierro, J. F. (2008) Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K⁺-channel-mediated K⁺ efflux, *Antimicrob Agents Chemother.* **52**, 4081-4088.
93. Granot, D., Levine, A. & Dor-Hefetz, E. (2003) Sugar-induced apoptosis in yeast cells, *FEMS Yeast Res.* **4**, 7-13.

94. Granot, D. & Dai, N. (1997) Sugar induced cell death in yeast is dependent on the rate of sugar phosphorylation as determined by *Arabidopsis thaliana* hexokinase, *Cell Death Differ.* **4**, 555-559.
95. Vaughan-Martini, A. & Martini, A. (2011) Chapter 61 - *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) in *The Yeasts (Fifth Edition)* (Fell, J. W. & Boekhout, T., eds) pp. 733-746, Elsevier, London.
96. Mortimer, R. & Polsinelli, M. (1999) On the origins of wine yeast, *Res. Microbiol.* **150**, 199-204.
97. Johnson, E. A. & Echavarri-Erasun, C. (2011) Chapter 3 - Yeast Biotechnology in *The Yeasts (Fifth Edition)* (Fell, J. W. & Boekhout, T., eds) pp. 21-44, Elsevier, London.
98. Arino, J., Ramos, J. & Sychrova, H. (2010) Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **74**, 95-120.
99. Serrano, R. (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase, *FEBS Lett.* **156**, 11-14.
100. Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A. & Sychrova, H. (2014) Potassium uptake system Trk2 is crucial for yeast cell viability during anhydrobiosis, *FEMS Microbiol. Lett.* **350**, 28-33.
101. Ramos, J., Haro, R., Alijo, R. & Rodriguez-Navarro, A. (1992) Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **174**, 2025-2027.
102. Hoerberichts, F. A., Perez-Valle, J., Montesinos, C., Mulet, J. M., Planes, M. D., Hueso, G., Yenush, L., Sharma, S. C. & Serrano, R. (2010) The role of K⁺ and H⁺ transport systems during glucose- and H₂O₂-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* **27**, 713-725.
103. Zahradka, J. & Sychrova, H. (2012) Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions, *FEMS Yeast Res.* **12**, 439-446.
104. Navarrete, C., Petrezselyova, S., Barreto, L., Martinez, J. L., Zahradka, J., Arino, J., Sychrova, H. & Ramos, J. (2010) Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions, *FEMS Yeast Research.* **10**, 508-517.
105. Petrezselyova, S., Zahradka, J. & Sychrova, H. (2010) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance, *Fungal Biol.* **114**, 144-150.
106. Petrezselyova, S., Ramos, J. & Sychrova, H. (2011) Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia Microbiol. (Praha).* **56**, 23-28.
107. Kotyk, A. & Georghiou, G. (1994) Both glucose-type monosaccharides and one of their metabolites are required for activation of yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase, *Cell Biol. Int.* **18**, 813-817.

