

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Martina Pavlíčková

Metabolismus fosfolipidů při tvorbě strukturovaných kolonií kvasinek

Phospholipid metabolism in the formation of structured yeast
colonies

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze, 26. 04. 2017

Podpis

Výzkum vedoucí k těmto výsledkům byl financován z Norského finančního mechanismu 2009-2014 projekt č. 7F14083 ve smlouvě č. MSMT-28477/2014. Tato práce byla vypracována také za podpory grantu GAČR 13-08605S „Biofilmové kolonie divokých kvasinek: Vývoj, obranné strategie a regulační dráhy“. Dále byla práce podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci Národního programu udržitelnosti II (Projekt BIOCEV-FAR) LQ1604 a projektem „BIOCEV“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

Poděkování

Velmi děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za vedení mé práce. Vážím si její podpory v podobě trpělivosti, ochoty a rychlé odezvy, která mnohdy sahala nad rámec jejích povinností.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře biologie kvasinkových kolonií za rady a příjemné pracovní prostředí.

Děkuji také svým rodičům, kteří mi umožnili studium a podporovali mě ve všech ohledech. Poděkování patří i mému příteli za trpělivost, pochopení a duševní oporu.

Abstrakt

Kvasinky ve svém přirozeném prostředí tvoří strukturované kolonie. To jim umožňuje lépe se přizpůsobit okolním podmínkám, ale také snáze odolávat různým typům inhibitorů kvasinkové infekce. S morfologií kolonií úzce souvisí metabolismus fosfolipidů. Důležitým genem metabolismu fosfolipidů je *INO1*, který kóduje inositol-3-fosfátsyntázu. Exprese genu *INO1* je regulovaná negativním transkripčním faktorem Opi1p, který ovlivňuje i řadu dalších genů pro enzymy metabolismu fosfolipidů, je nezbytný i pro expresi genu *FLO11*, jehož produkt Flo11p je esenciální pro tvorbu strukturované kolonie. Hlavním cílem mé práce bylo pozorovat souvislosti mezi morfologií kolonií přírodního kmene *Saccharomyces cerevisiae* a metabolismem fosfolipidů. Zjistila jsem, že exprese genu *INO1* i morfologie kolonií se mění vlivem zdroje uhlíku i působením selenanu či inhibitoru β -oxidace mastných kyselin 2-bromooktanové kyseliny. I když gen *INO1* pro buňku není esenciální, jeho delece nebo nadměrná exprese způsobuje změny v metabolismu fosfolipidů a morfologii kolonie. Vlivem selenanu a 2-bromooktanové kyseliny se také mění exprese genu *FLO11*, což se odráží na strukturovanosti kolonie. Kyselina 2-bromooktanová je proto perspektivním agens proti kvasinkovým infekcím.

Klíčová slova: strukturované kolonie, northern analýza, imunodetekce, 2-bromooktanová kyselina, *INO1*, *OPI1*, *FLO11*

Abstract

Yeasts in their natural environment form structured colonies. This allows them to better adapt to environmental conditions, but also to more easily resist various types of yeast infection inhibitors. The metabolism of phospholipids is closely related to the morphology of colonies. An important gene involved in phospholipid metabolism is *INO1*, which encodes inositol-3-phosphate synthase. Expression of the *INO1* gene is regulated by the Opi1p negative transcription factor, which also affects a number of other genes for phospholipid metabolism enzymes, is also necessary for the expression of the *FLO11* gene, encoding Flo11p, which is essential to the formation of a structured colony. The main aim of my work was to investigate the correlation between colony morphology of a natural strain of *Saccharomyces cerevisiae* and phospholipid metabolism. I have found that changes in *INO1* gene expression and colony morphology are influenced by carbon source, selenate activity and the inhibitor of β -oxidation, 2-bromooctanoic acid. Although the *INO1* gene is not essential for cell viability, its deletion or overexpression causes changes in phospholipid metabolism and colony morphology. Selenate and 2-bromooctanoic acid also alter expression of the *FLO11* gene, which is reflected in colony structure. Thus, 2-bromooctanoic acid is a promising agent against yeast infections.

Keywords: structured colonies, northern analysis, immunodetection, 2-bromooctanoic acid, *INO1*, *OPI1*, *FLO11*

Obsah

Abstrakt.....	i
Abstract.....	ii
Obsah.....	iii
Seznam použitých zkratek.....	v
1 Úvod.....	9
2 Přehled literatury.....	10
2.1 Kvasinkové kolonie.....	10
2.2 Mezibuněčný kontakt a kontakt buněk s okolním prostředím.....	11
2.2.1 Pseudohyfální růst	11
2.2.2 Flo proteiny	12
2.2.3 Protein Flo11p a jeho význam pro kvasinkovou kolonii.....	12
2.2.4 Adheze k povrchu a invazivní růst jako virulenční faktor	14
2.3 Strukturální gen <i>INO1</i> a enzym Ino1p.....	14
2.3.1 Struktura proteinu Ino1p.....	15
2.3.2 Regulace exprese genu <i>INO1</i>	16
2.3.3 Význam inositolu pro buňku.....	20
2.4 Inhibitory metabolismu fosfolipidů.....	22
2.5 Vliv Selenu na kvasinky a tvorbu kolonií.....	24
3 Cíle práce	26
4 Materiál a metody.....	27
4.1 Materiál.....	27
4.1.1 Použitý mikroorganismus.....	27
4.1.2 Použité kvasinkové kmeny	27
4.1.3 Použité plazmidy.....	27
4.1.4 Použité primery.....	30
4.1.5 Chemikálie a enzymy.....	32
4.1.6 Antibiotika	33
4.1.7 Ostatní materiál.....	33
4.1.8 Média pro kultivaci kvasinek	34
4.1.9 Standardy molekulových hmotností.....	35
4.2 Metody	35
4.2.1 Sterilizace.....	35
4.2.2 Práce s DNA.....	36
4.2.3 Práce s kvasinkami.....	38
4.2.4 Charakterizace připravených kmenů	43
4.2.5 Western blot a imunodetekce.....	44
4.2.6 Northern blot a hybridizace	49
4.2.7 Statistické metody	53

4.2.8	Software.....	53
5	Výsledky.....	55
5.1	Příprava kmenů.....	55
5.2	Vliv zdroje uhlíku, selenanu a kys. 2-bromooktanové na morfologii kolonií a produkci Ino1p-GFP	60
5.2.1	Kmeny PORT, Ino1p-GFP, <i>opi1Δ</i> a <i>opi1Δ</i> , Ino1p-GFP.....	60
5.2.2	Morfologie kolonií kmenů TEF-INO1 a <i>ino1Δ</i>	68
5.3	Northern analýza.....	78
5.3.1	Biomasa.....	78
5.3.2	Detekované geny.....	79
5.3.3	Výsledky northern analýzy	80
6	Diskuze.....	85
6.1	Příprava kmenů.....	85
6.2	Vliv zdroje uhlíku na morfologii kolonií	85
6.3	Vliv zdroje uhlíku na produkci Ino1p.....	86
6.4	Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na morfologii kolonií kmene PORT.....	87
6.5	Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na morfologii kolonií kmenů TEF-INO1 a <i>ino1Δ</i>	88
6.6	Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na produkci Ino1p.....	88
6.7	Northern analýza.....	89
6.8	Faktory ovlivňující výsledky.....	90
7	Souhrn.....	91
8	Použitá literatura	93

Seznam použitých zkratek

Δ	označuje kmen s delecí daného genu	gene deletion
<i>AGA1</i>	gen kódující podjednotku a-agglutininu Aga1p	gene encoding subunit of a-agglutinin
AK	aminokyselina	amino acid
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
BOA	2-bromooktanová kys.	2-bromooctanoic acid
bp	páry bazí	base pair
C	komplementární vlákno DNA	complementary strand of DNA
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát	cyclic adenosine monophosphate
CreA	CreA rekombináza (bakteriofág P1)	CreA recombinase
CWI-MAPK	proteinkinázová dráha integrity buněčné stěny aktivovaná mitogenem	cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway
č.	číslo	number
Da	dalton - atomová hmotnostní jednotka	atomic mass unit
<i>DBP5</i>	gen kódující RNA helikázu Dbp5p	gene encoding RNA helicase
demi H ₂ O	demineralizovaná voda	demineralized water
dest. H ₂ O	destilovaná voda	distilled water
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
DNA zip code	sekvence umožňující přemístění genu v rámci jádra	sequences required for localization of gene to the nuclear periphery
dsDNA	dvouvláknová DNA	double-stranded DNA
<i>EAP1</i>	gen kódující adhezín (<i>Candida albicans</i>)	gene encoding adhesin (<i>Candida albicans</i>)
ECM	extracelulární matrix	extracellular matrix
Edi	edicin	edicin
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = a kolektiv	and others
<i>FAS2</i>	gen kódující podjednotku enzymu katalyzujícího syntézu mastných kyselin	gene encoding fatty acid synthetase
<i>FIG2</i>	gen kódující adhezín Fig2p	gene encoding adhesin
Flo proteiny	souhrnné označení flokulínů	flocculins
<i>FLO1</i>	gen kódující flokulín Flo1p	gene encoding flocculin
<i>FLO10</i>	gen kódující flokulín Flo10p	gene encoding flocculin
<i>FLO11</i> (= <i>MUC1</i>)	gen kódující flokulín Flo11p	gene encoding flocculin
<i>FLO5</i>	gen kódující flokulín Flo5p	gene encoding flocculin
<i>FLO8</i>	gen kódující transkripční faktor Flo8p	gene encoding transcriptional factor
<i>FLO9</i>	gen kódující flokulín Flo9p	gene encoding flocculin
FRE element	vazebné místo pro Ste12p a Tec1p	filamentation response element
G418	geneticin	geneticin
G6P	glukóza-6-fosfát	glucose 6-phosphate
GAL1	promotor genu <i>GAL1</i> , indukovatelný přítomností galaktózy	promotor of GAL1 gene
GFP	zelený fluorescenční protein	green fluorescent protein
<i>GLE1</i>	gen kódující protein Gle1p pro export mRNA z jádra	gene encoding nucleoporin

GM	glycerolové médium	glycerol medium
GMi	glycerolové médium s inhibítozem	glycerol medium with inhibitor
GM-Se	glycerolové médium se selenanem	glycerol medium with selenate
GM-Sei	glycerolové médium se selenanem a inhibítozem	glycerol medium with selenate and inhibitor
GPI kotva	glykosylfosfatidylinositol kovalentně vázající protein k membráně	glycosylphosphatidylinositol anchor
GRS	DNA zip code sekvence	gene recruitment sequence
GS-Se-SG	selenodiglutathion	selenodiglutathione
<i>HAC1</i>	gen kódující transkripční faktor Hac1p dráhy UPR	gene encoding transcription factor
hph	gen rezistence k hygromycinu B	hygromycin B resistance gene
Hyg	hygromycin B	hygromycin B
<i>CHO2</i> (= <i>PEM1</i>)	gen kódující enzym Cho2p pro syntézu PC	gene encoding PE methyltransferase
IAA	indolactová kyselina	indole acetic acid
<i>ICR1</i>	nekódující RNA	noncoding RNA
ICRE element	vazebné místo pro aktivační komplex Ino2p-Ino4p	inositol/choline responsive element
<i>INM1</i>	gen kódující enzym Inm1p pro syntézu inositolu	gene encoding inositol monophosphatase
<i>INO1</i>	gen kódující enzym Ino1p (inositol-3-fosfátsyntáza)	gene encoding inositol-3-phosphate synthase
<i>INO2</i>	gen kódující pozitivní transkripční faktor Ino2p	gene encoding transcriptional activator
<i>INO4</i>	gen kódující pozitivní transkripční faktor Ino4p	gene encoding transcriptional activator
Ins	inositol	inositol
Ins3P	inositol-3-fosfát	inositol 3-phosphate
IP ₃	inositoltrisfosfát	inositol trisphosphate
IP ₆	inositolhexakisfosfát	inositol hexakisphosphate
<i>ITR1</i>	gen kódující přenašeč pro inositol Itr1p	gene encoding inositol transporter
<i>ITR2</i>	gen kódující přenašeč pro inositol Itr2p	gene encoding inositol transporter
K	lysin	lysine
<i>kanMX</i>	gen rezistence ke geneticinu	geneticin resistance gene
kap.	kapitola	chapter
<i>KHD1</i>	gen kódující RNA vazebný protein Khd1p	gene encoding RNA binding protein
kys.	kyselina	acid
<i>loxP</i>	sekvence v genomu bakteriofága P1 rozeznávané rekombinázou	sequence derived from bacteriophage P1
LT	laboratorní teplota	laboratory temperature
MAPkináza	proteinkináza aktivovaná mitogenem	mitogen-activated protein kinase
<i>MATa</i>	párovací typ a haploidních buněk <i>S. cerevisiae</i>	mating type a
<i>MATα</i>	párovací typ α haploidních buněk <i>S. cerevisiae</i>	mating type α
MEL	mannosylerythriol lipid	mannosylerythriol lipid
mCherry	červený fluorescenční protein	red fluorescent protein
MK	mastná kyselina	fatty acid
mRNA	informační ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
MRS	DNA zip code sekvence	memory recruitment sequence
NAD	nikotinamidadenindinukleotid	nicotinamide adenine dinucleotide

NAT	nourseothricin	nourseothricin
<i>nat1</i>	gen rezistence k nourseothricinu	nourseothricin resistance gene
ncRNA	nekódující RNA	noncoding RNA
NF-κB	transkripční faktor	transcriptional factor
obr.	obrázek	figure
OD	optická denzita	optical density
<i>OPI1</i>	gen kódující negativní transkripční faktor Opi1p	gene encoding transcriptional repressor
<i>OPI3 (= PEM2)</i>	gen kódující enzym Opi3p pro syntézu PC	gene encoding phospholipid methyltransferase
PA	fosfatidová kyselina	phosphatidic acid
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
PHA	polyhydroxyalkanoát	polyhydroxyalkanoate
<i>PHAG</i>	Gen u <i>Pseudomonas fluorescens</i> kódující transacylázu PhaG	gene encoding transacylase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
PI	fosfatidylinositol	phosphatidylinositol
PI3,5P ₂	fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát	phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
<i>PIS1</i>	gen kódující enzym Pis1p pro syntézu PI	gene encoding PI synthase
PKA	proteinkináza A	protein kinase A
PKC	proteinkináza C	protein kinase C
<i>PKC1</i>	gen kódující Pkc1p (proteinkináza C)	gene encoding protein kinase C
PORT	přírodní diploidní kmen <i>S. cerevisiae</i>	diploid wild strain of <i>S. cerevisiae</i>
primer F	forward primer	forward primer
primer R	reverse primer	reverse primer
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy	Faculty of Science Charles University
<i>PWR1</i>	nekódující RNA	noncoding RNA
<i>RAS2</i>	gen kódující GTP vazebný protein Ras2p	gene encoding GTP-binding protein
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
ROS	volné kyslíkové radikály	reactive oxygen species
<i>RPL3</i>	gen kódující ribozomální protein Rpl3p	gene encoding ribosomal protein
<i>RPS26</i>	gen kódující ribozomální protein Rps26p	gene encoding ribosomal protein
S	serin	serine
<i>SCS2</i>	gen kódující protein Scs2p určující lokalizaci Opi1p na membráně ER	gene encoding ER transmembrane protein
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	Polyacrylamide gel electrophoresis
<i>SFL1</i>	gen kódující transkripční faktor Sfl1p	gene encoding transcriptional activator and repressor
<i>SLT2 (= MPK1)</i>	gen kódující MAPkinázu Slt2p	gene encoding MAP kinase
<i>STE11</i>	gen kódující MAPkinázu Ste11p	gene encoding MAP kinase
<i>STE12</i>	gen kódující transkripční faktor Ste12p	gene encoding transcriptional factor
<i>STE20</i>	gen kódující MAPkinázu Ste20p	gene encoding MAP kinase
<i>STE7</i>	gen kódující MAPkinázu Ste7p	gene encoding MAP kinase
<i>TEC1</i>	gen kódující transkripční faktor Tec1p	gene encoding transcriptional factor
TEF	promotor translačního elongačního faktoru 1α (<i>Ashbya gossypii</i>)	promotor of translational elongation factor 1α (<i>Ashbya gossypii</i>)

TFIIIA	transkripční faktor	transcriptional factor
THO	komplex proteinů nezbytný pro transkripci repetitivních sekvencí	protein complex required for transcription of genes with internal repeats
<i>TP11</i>	gen kódující enzym triosafosfátizomerázu Tpi1p	gene encoding triose phosphate isomerase
<i>TPK2</i>	gen kódující katalytickou podjednotku PAK	gene encoding cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit
UPR	reakce na nesbalené proteiny v ER	unfolded protein response
UPRE	vazebné místo pro Hac1p u genů UPR	unfolded protein response element
UV	ultrafialové záření	ultraviolet light
v/v	objem/objem	volume/volume
w/v	hmotnost/objem	weight/volume
wt	divoký kmen	wild type
YD	glukózové médium	glucose medium
YD01	glukózové médium	glucose medium
YDi	glukózové médium s inhibitorem	glucose medium with inhibitor
YD-Se	glukózové médium se selenanem	glucose medium with selenate
YD-Sei	glukózové médium se selenanem a inhibitorem	glucose medium with selenate and inhibitor
yEGFP	protein GFP optimalizovaný pro kvasinky	yeast enhanced green fluorescent protein

1 Úvod

Svoji diplomovou práci jsem vypracovala v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií, která se pod vedením prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc. zabývá studiem kvasinek (především *Saccharomyces cerevisiae*) v jejich přirozeném mnohobuněčném uspořádání. Tvorba strukturovaných kolonií a diferenciacie buněk kvasinkám umožňuje lépe se přizpůsobit okolním podmínkám. Studium těchto dějů a komunikace mezi jednotlivými buňkami i mezi koloniemi nám pomáhá pochopit principy fungující v tkáních mnohobuněčných organismů včetně člověka (Palková & Váchová, 2006).

V diplomové práci jsem se blíže zabývala metabolismem fosfolipidů a jeho souvislostí s tvorbou strukturovaných kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae*. Fosfolipidy jsou hlavní strukturální složkou všech buněčných membrán. Složení i množství membrán se mění podle aktuálních potřeb buňky, tj. podle intenzity sekrece, oxidativní fosforylace, dostupnosti živin, teploty a podle dalších faktorů. Fosfolipidy slouží i k modifikaci proteinů, jako zdroj druhých posílů a mohou se stát i prekurzory pro syntézu jiných látek.

Studiem lipidů a dějů s nimi souvisejících se nyní zabývá řada laboratoří. Přesto však zůstává mnoho otázek nezodpovězených a toto téma je aktuální nejen u kvasinek, ale i u jiných organismů (Santos & Riezman, 2012; Sethi & Brietzke, 2017).

Velmi důležitým genem metabolismu fosfolipidů je *INO1*, který kóduje inositol-3-fosfátsyntázu. Ta katalyzuje první krok sledu reakcí vedoucích ke vzniku fosfatidylinositolu (PI). PI spolu s fosfatidylcholinem, fosfatidylethanolaminem a fosfatidylserinem tvoří základní buněčné fosfolipidy a od jejich poměru a složení se odvíjí vlastnosti buněčných membrán. PI také slouží jako prekurzor pro syntézu GPI kotvy proteinů. Ty jsou velmi důležité pro tvorbu strukturovaných kolonií. Expresi genu *INO1* je regulovaná negativním transkripčním faktorem Opi1p, který kromě Ino1p ovlivňuje i řadu dalších genů pro enzymy metabolismu fosfolipidů. Je také nezbytný pro expresi genu *FLO11*, jehož produkt Flo11p je esenciální pro tvorbu strukturované kolonie.

Na morfologii kolonie má vliv také zdroj uhlíku, který zásadně ovlivňuje celý metabolismus i metabolismus fosfolipidů. Kvasinky preferují fermentovatelné zdroje (např. glukózu) a v jejich přítomnosti rostou rychleji (Gancedo, 1998).

Cílem mé práce bylo zjistit, jak je metabolismus fosfolipidů a struktura kolonie *S. cerevisiae* kmene PORT ovlivněna různými zdroji uhlíku či působením inhibitoru metabolismu mastných kyselin 2-bromooktanové kyseliny. Pro zdůraznění vlivu na strukturovanost kolonie byla použita i média s obsahem nízké koncentrace selenanu (Na_2SeO_4), který podporuje vrásčitost kolonie (RNDr. Michaela Schierová, Ph.D., nepublikovaná data).

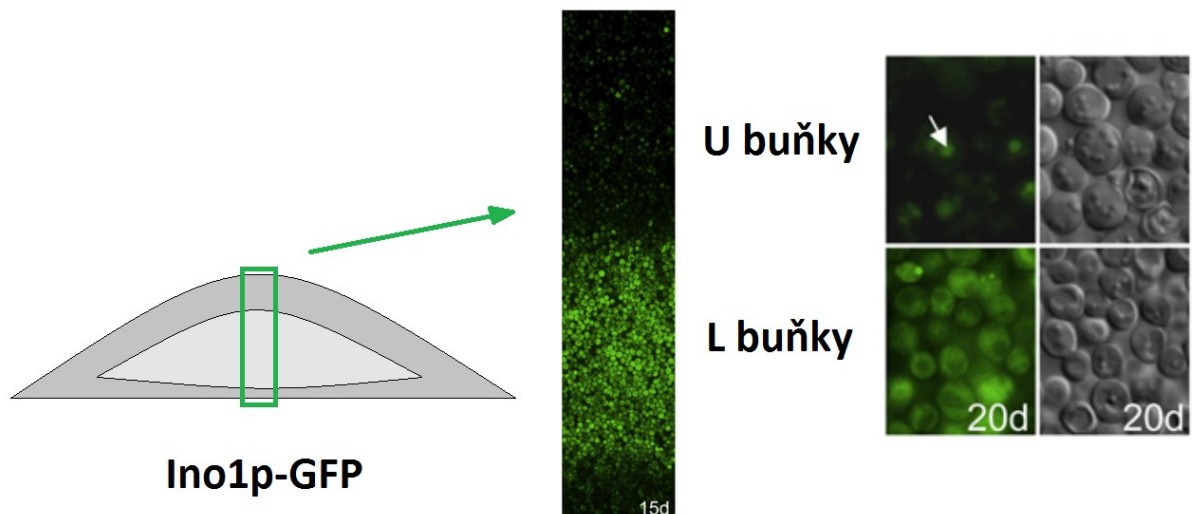
2 Přehled literatury

2.1 Kvasinkové kolonie

V přírodě se kvasinky vyskytují spíše v mnohobuněčných koloniích než jako jednotlivé buňky. Přírodní kmeny mohou tvořit složitě strukturované vrásčité kolonie, zatímco laboratorní kmeny dlouhodobě rostoucí v optimálních podmínkách tvoří kolonie hladké. Ukazuje se, že ztráta vrásčité morfologie u laboratorních kmenů nemusí být způsobena nahromaděním mutací, ale je výsledkem změny exprese genů v rámci adaptace na dané podmínky (Kuthan *et al.*, 2003).

Na morfologii kolonie nemá vliv tvar buněk a způsob pučení (Šťovíček *et al.*, 2010), ale je způsobena především přítomností extracelulární matrix (ECM) složenou z polysacharidů a proteinů, která je uvolňována buňkami v kolonii (Baillie & Douglas, 2000; Kuthan *et al.*, 2003). Vrásčité kolonie obsahují mnohem více ECM než kolonie hladké. ECM poskytuje buňkám mechanickou ochranu a slouží jako rezervoár vody. To způsobuje, že mokrá váha strukturované kolonie je až třikrát vyšší než váha hladké kolonie, přestože hladká kolonie je tvořena větším množstvím buněk (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček *et al.*, 2010).

Buňky uvnitř kolonie se liší svým metabolismem a genovou expresí podle toho, kde se nacházejí v rámci kolonie (Váchová *et al.*, 2009). Během vývoje kolonie dochází i k regulovanému úmrtí buněk ve středu kolonie, které má mnoho společných znaků s apoptózou mnohobuněčných organismů. Živiny uvolněné z těchto buněk zlepšují podmínky pro růst mladších buněk (Váchová & Palková, 2005). Buňky v kolonii jsou diferencované i vertikálně, na řezu kolonií jsou vidět dvě vrstvy morfologicky různých buněk (U – *upper* a L – *lower*), které se liší i genovou expresí (obr.1)(Čáp *et al.*, 2012).



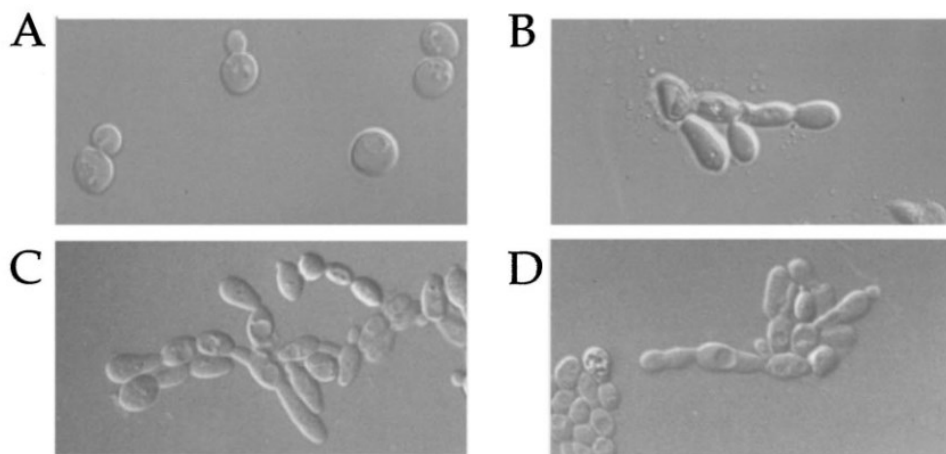
Obrázek 1: Vertikální řez kolonií. Pomocí fluorescenčního proteinu Ino1p-GFP znázorněn rozdíl v expresi horních (U – *upper*) a spodních (L – *lower*) buněk (stáří kolonie 15 dní). Detail buněk ukazuje rozdíl v morfologii buněk, bílá šipka označuje vakuolu (stáří kolonie 20 dní)(Čáp *et al.*, 2012).

V tvorbě kolonií hraje roli také metabolismus fosfolipidů. Delece genu kódujícího hlavní negativní regulátor exprese genů pro enzymy metabolismu fosfolipidů Opi1p způsobuje výrazné změny v morfologii kolonií (Reynolds, 2006). Dalším příkladem je fosfolipid fosfatidylinositol (PI) sloužící jako součást GPI kotvy (Pittet & Conzelmann, 2007). Ta je nezbytná pro funkci Flo proteinů umožňujících kontakt s ostatními buňkami nebo s povrchem (Hamada *et al.*, 1998; Groot *et al.*, 2003).

2.2 Mezibuněčný kontakt a kontakt buněk s okolním prostředím

2.2.1 Pseudohyální růst

Kvasinka *S. cerevisiae* je schopna dimorfního růstu. Kromě samostatně fungujících buněk tvoří i pseudohyfy. U diploidních kmenů dochází k pseudohyálnímu růstu v případě, že buňky trpí nedostatkem dusíku (obr.2)(Gimeno *et al.*, 1992). Buňky změny způsob pučení z převážně náhodného na unipolární a nově vznikající buňky jsou protáhlé a zůstávají v kontaktu s mateřskou buňkou. Pseudohyfy zarůstají mírně do agaru a rozšiřují se z okrajů kolonie po povrchu média. U haploidních kmenů dochází k tvorbě filament naopak při růstu na médiu bohatém na živiny. Buňky haploidních kmenů přepínají z axiálního způsobu pučení na bipolární, aby byly schopné tvořit vlákna. Filamenta zarůstají do agaru více než u diploidních kmenů, ale jsou pouze v oblasti pod kolonií. Haploidní buňky tvořící filamenta nejsou tolik protáhlé jako buňky diploidní (Roberts & Fink, 1994).



Obrázek 2: Kvasinky *S. cerevisiae* rostoucí jako jednotlivé buňky (A) a tvořící pseudohyfy (B-D). (Gancedo, 2001)

Pseudohyální a invazivní růst je regulován především MAPkinázovou a cAMP signální dráhou. MAPkinázová signální dráha využívá kinázy Ste7p, Ste11p a Ste20p a transkripční faktor Ste12p, tyto proteiny jsou zároveň součástí MAPkinázové dráhy pro odpověď na přítomnost feromonu. Transkripce genů specifických pro páření však není aktivována zároveň s invazivním růstem (Roberts & Fink, 1994). Ste12p vytváří komplex s dalším proteinem Tec1p a společně se váží do oblasti elementu FRE (filamentation response element)(Madhani & Fink, 1997), který se

nachází v promotoru genu *FLO11*. Tento gen kóduje protein Flo11p nezbytný pro pseudohyální růst, podrobněji je popsán v kapitole 2.2.3 (Lo & Dranginis, 1998).

Pseudohyální a invazivní růst je indukován rovněž při aktivaci proteinu Ras2p, která způsobí zvýšenou hladinu cAMP (Gimeno et al., 1992). Pomocí cAMP je aktivována proteinkináza A (PKA). Její katalytická podjednotka kódovaná genem *TPK2* interaguje s transkripčním represorem Sfl1p, a tím mu brání v inhibici transkripce genu *FLO11* (Robertson & Fink, 1998). Pro expresi genu *FLO11* v závislosti na cAMP dráze je nezbytný i protein Flo8p (Rupp et al., 1999).

2.2.2 Flo proteiny

Mezibuněčný kontakt a schopnost buněk držet u sebe jsou zprostředkovány proteiny označovanými zkratkou Flo (odvozeno od flokulace, tvorba shluků buněk v tekutém médiu) (Stratford, 1994). Tyto proteiny (především Flo11p) se podílejí i na morfologii vrásčitých kolonií (Šťovíček et al., 2010) a jsou nezbytné pro adhezi buněk k povrchu média i schopnost invazivního růstu (Lo & Dranginis, 1998).

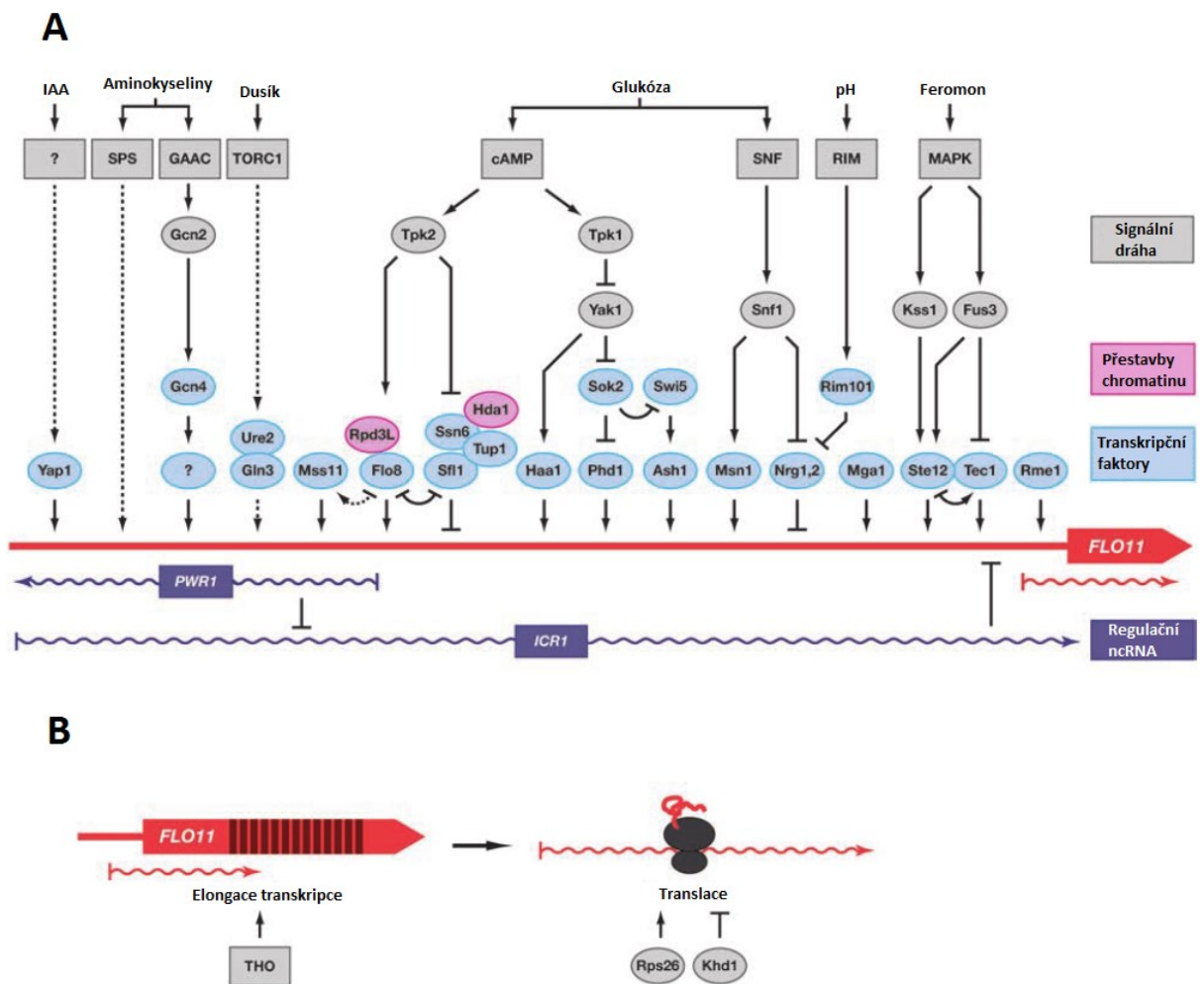
Existují dva typy Flo proteinů. Do první skupiny patří flokuliny Flo1p, Flo5p, Flo9p a Flo10p. Jsou to proteiny vázané GPI kotvou přímo do buněčné stěny interagující se sacharidy buněčných stěn sousedních buněk (Stratford, 1989; Caro et al., 1997). Tato interakce způsobí shlukování buněk v tekutém médiu a následnou sedimentaci. Tento děj je významný zvláště v pivovarnictví (Rainbow, 1966). Do druhé skupiny patří Flo11p, Fig2p a Aga1p. Geny *FIG2* a *AGA1* jsou exprimovány při konjugaci (Roy et al., 1991; Erdman et al., 1998). Protein Flo11p je velmi významný pro strukturu kolonie, adhezi k povrchu i invazivní růst (Lo & Dranginis, 1998; Reynolds & Fink, 2001).

2.2.3 Protein Flo11p a jeho význam pro kvasinkovou kolonii

Flo11p je protein kódovaný genem *FLO11*, původně nazývaným *MUC1*. Je složen z 1367 aminokyselinových zbytků. Centrální část proteinu je hydrofilní, N- i C-terminální části jsou hydrofobní. Na N-konci proteinu se nachází specifická signální sekvence pro sekretované proteiny (Lambrechts et al., 1996), na C- konci se nachází sekvence specifická pro proteiny vázané GPI kotvou na povrchu buňky (Lo & Dranginis, 1996). Flo11p je protein, který je částečně vylučován buňkou do extracelulárního prostoru a částečně zůstává vázán na povrchu buňky pomocí GPI kotvy (Karunanithi et al., 2010).

Expresí genu *FLO11* je složitě regulována pomocí mnoha různých signálních drah. Některé příklady jsou uvedeny v kapitole 2.2.1. Na obr.3 jsou schematicky znázorněny i další způsoby regulace exprese. Promotor genu *FLO11* je jeden z nejdelších v kvasinkovém genomu (má více než 3 000 bp) a obsahuje mnoho vazebných míst pro různé transkripční faktory (Lo & Dranginis, 1996; Rupp et al., 1999). Expresí genu *FLO11* je regulována i dvěma nekódujícími RNA (ncRNA)

ICR1 a *PWR1* (obr.3A)(Brückner & Mösch, 2012). Přes 3 000 bp dlouhá *ICR1* je kódována v oblasti promotoru *FLO11* a její transkripce brání expresi genu *FLO11*. *PWR1* je kódována komplementárním řetězcem k *ICR1* a aktivuje expresi genu *FLO11* interakcí s *ICR1*. Transkripce těchto ncRNA je regulována transkripčními faktory Flo8p a Sfl1p (Bumgarner *et al.*, 2009). Dále je exprese regulována během transkripce. V genu *FLO11* se nachází repetitivní sekvence a pro jejich transkripci je nezbytný komplex proteinů THO (Voynov *et al.*, 2006). Poslední příklad regulace, který zmíním, souvisí s proteiny Rps26p a Khd1p. Ty regulují translaci Flo11p (obr.3B)(Strittmatter *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2010).



Obrázek 3: A: Schéma regulace exprese genu *FLO11*. Znázorněny jsou různé signální dráhy vedoucí k transkripčním faktorům, které přímo nasedají do oblasti promotoru genu *FLO11* (znázorněno pouze schematicky, vazebná místa neodpovídají skutečnosti). Tmavě modře je znázorněna regulační (nekódující) ncRNA. IAA – indoloctová kyselina, ? – neznámá signální dráha/neznámý transkripční faktor. B: Regulace exprese genu *FLO11* během transkripce a translace. Tmavé pruhy znázorňují repetitivní sekvence. (Brückner & Mösch, 2012)

Protein Flo11p je nezbytný pro invazivní a pseudohyfální růst. Nadměrná exprese genu *FLO11* významně indukuje invazivní růst i u diploidního kmene (Lo & Dranginis, 1998). Flo11p je nezbytný i pro morfologii kolonie. Kmen s delecí genu *FLO11* vytváří kolonie pouze hladké

(Šťovíček *et al.*, 2010). Některé kmeny kvasinek jsou schopny tvořit biofilm na povrchu tekutého média. I tento děj je závislý na Flo11p (Ishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005). Delece genu *FLO11* významně ovlivňuje transkriptom buňky. Změněná je exprese např. u genů souvisejících s mezibuněčným kontaktem, pářením, homeostází iontů a redoxními ději (Voordeckers *et al.*, 2012).

Protože se ve své práci zabývám metabolismem fosfolipidů, stojí za zmínku také vztah proteinů Flo11p a Opi1p. Opi1p je transkripční represor genů pro enzymy biosyntézy fosfolipidů a více informací je o něm popsáno v kapitole 2.3.2. Je také dalším proteinem nezbytným pro expresi genu *FLO11*. Kmen s delecí genu *OPI1* není schopen invazivního růstu a vytváří hladké kolonie (Reynolds, 2006).

2.2.4 Adheze k povrchu a invazivní růst jako virulenční faktor

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, invazivní růst a adheze buněk k povrchu jsou velmi důležité děje pro funkci a tvorbu kolonií nebo biofilmů. Patogenní mikroorganismy v rámci biofilmu jsou však odolnější k aplikovaným fungicidům (Palmer & White, 1997). U známých patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. glabrata* bylo nalezeno mnoho proteinů zodpovědných za adhezi k hostitelským tkáním (Sundstrom, 2002). Např. u *C. albicans* je pro adhezi buněk k povrchu a schopnost invazivního růstu nezbytný gen *EAP1*. Hraje stejnou roli jako geny *FLO8* a *FLO11* u *S. cerevisiae* (Lo & Dranginis, 1998; Liu *et al.*, 1996; Li & Palecek, 2003). Kmeny *S. cerevisiae* s delecí genů *FLO8* nebo *FLO11*, ve kterých je exprimován gen *EAP1*, jsou schopny invazivního růstu. Expresí genu *EAP1* podporuje také adhezi buněk *S. cerevisiae* k lidským buňkám (Li & Palecek, 2003).

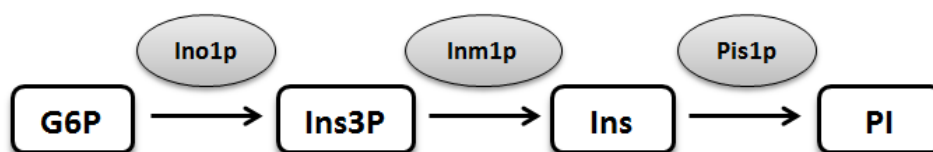
Tvorba biofilmu u *C. albicans* souvisí také s genem *INO1*, který kóduje enzym důležitý pro syntézu proteinů a glykolipidů s GPI kotvou podstatných pro virulenci (Mille *et al.*, 2004). V kmeni *C. albicans* rezistentnímu k léčivům (azolům) je exprese *INO1* zvýšena (Rogers & Barker, 2003). U buněk vystavených látkám, které brání tvorbě biofilmu (farnesol, kaprinová kyselina), byla naopak exprese *INO1* snížena (Cao *et al.*, 2005). *INO1* je nejvíce regulovaným genem metabolismu fosfolipidů *S. cerevisiae*. Kóduje protein Ino1p, na který jsem se zaměřila v praktické části své diplomové práce.

2.3 Strukturní gen *INO1* a enzym Ino1p

Klíčovým genem metabolismu fosfolipidů je strukturní gen *INO1* (Donahue & Henry, 1981). Kódující sekvence je dlouhá 1 602 bp (Dean-Johnson & Henry, 1989) a podle transkriptu je syntetizována jedna podjednotka homotetrameru Ino1p, jehož celková molekulová hmotnost je 240 kDa (Donahue & Henry, 1981).

Ino1p je enzym inositol-3-fosfátsyntáza (ve starších publikacích označována názvem inositol-1-fosfátsyntáza podle staršího systému názvosloví)(Donahue & Henry, 1981)

a optimální pH pro jeho funkci je 7 (Culbertson *et al.*, 1976). Tento enzym katalyzuje první krok ve sledu reakcí vedoucích k syntéze PI (obr.4). Jedná se o přeměnu glukózy-6-fosfát (G6P) na inositol-3-fosfát (Ins3P), reakce vyžaduje přítomnost kofaktoru NAD a probíhá v cytoplazmě (Culbertson *et al.*, 1976; Donahue & Henry, 1981; Dean-Johnson & Henry, 1989). Ins3P je dále defosforylován pomocí inositol-3-fosfátfosfatázy (Inm1p) za vzniku inositolu (Murray & Greenberg, 2000). Význam inositolu pro buňku je popsán v kapitole 2.3.3. Přeměna G6P na Ins3P je krokem limitujícím rychlost reakce, jak u kvasinek (Donahue & Henry, 1981), tak u ostatních eukaryot, mnoha archeí a některých bakterií (Majumder *et al.* 1997; Michell, 2007).



Obrázek 4: Schéma syntézy fosfatidylinositolu. G6P – glukóza-6-fosfát, Ins3P – inositol-3-fosfát, Ins – inositol, PI – fosfatidylinositol.

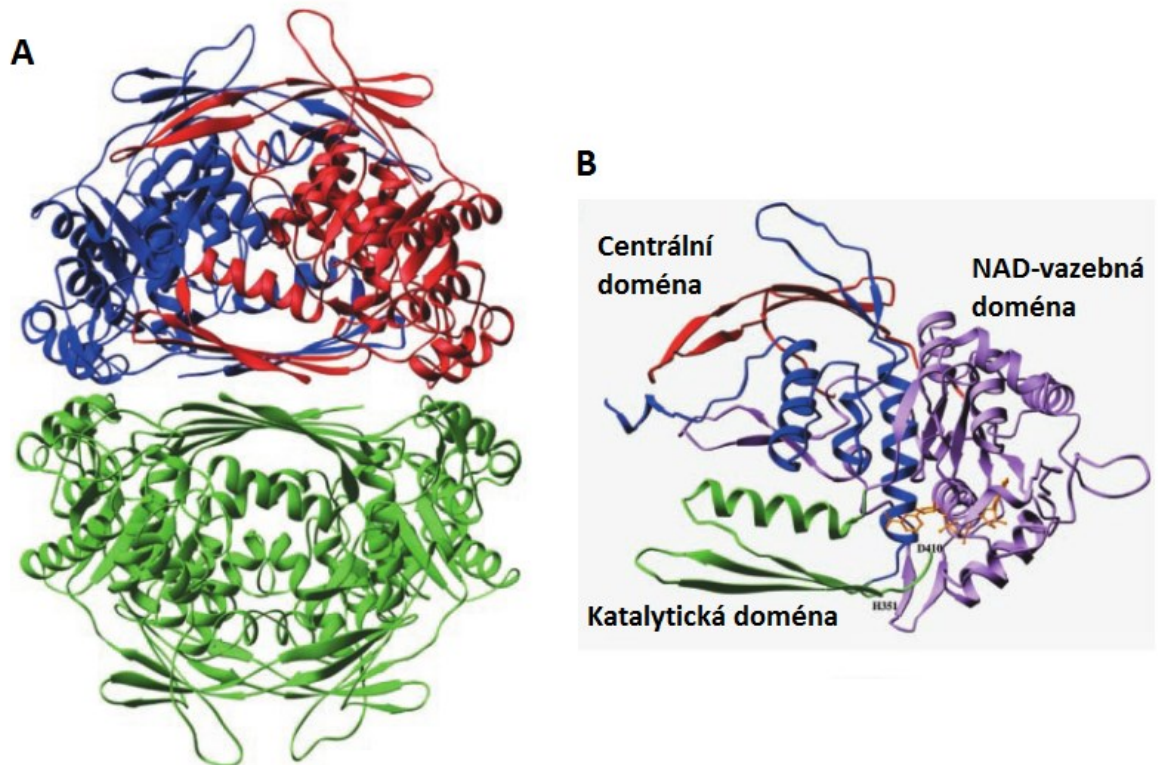
2.3.1 Struktura proteinu Ino1p

Gen *INO1* kóduje jednu podjednotku tetramerního proteinu Ino1p (obr.5A). Monomer obsahuje 3 domény (obr.5B): NAD-vazebná doména (AK 66-326, pořadí aminokyselinových zbytků proteinu), katalytická a tetramerizační doména (AK 327-441) a centrální doména (ta je složená z C- a N-terminální části proteinu a úseku aminokyselinových zbytků 93-140 uvnitř NAD-vazebné domény). Funkcí centrální domény je především stabilizace kvarterní struktury (Stein & Geiger, 2002). Protein je poměrně stabilní, jeho poločas rozpadu je 24,5 h (Christiano *et al.*, 2014).

Sekvence aktivního místa enzymu je velmi konzervována, především u eukaryot včetně člověka. Pomocí krystalografie bylo nalezeno pravděpodobné aktivní místo enzymu u *S. cerevisiae* v úseku 351-409. Stejnou metodou bylo odhaleno aktivní místo o délce 26 aminokyselinových zbytků i u bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Tyto sekvence byly porovnány se sekvencemi z dalších organismů (obr.6). Mezi sekvencemi aktivních míst těchto organismů byla nalezena shoda přibližně 73 %. Odhaleno bylo i několik klíčových aminokyselin (označeny na obr.6 hvězdičkou), u kterých se předpokládá, že jsou esenciální pro vazbu substrátu. (Majumder *et al.*, 2003).

Ino1p je regulován na posttranslační úrovni pomocí fosforylace. Aktivita enzymu může být ovlivněna fosforylací na třech místech: S184, S296 a S374. Seriny S184 a S296 se nachází v NAD-vazebné doméně, S374 se nachází v doméně katalytické (obr.7). Enzymatická aktivita klesla, když byly tyto seriny nahrazeny jinou fosforylovatelnou aminokyselinou – aspartátem. V případě, že byly nahrazeny alaninem, poklesla aktivita enzymu jen u S296, toto fosforylační místo je tedy nezbytné pro aktivitu enzymu. Stejná fosforylační místa byla nalezena i u lidské

inositol-3-fosfátsyntázy (obr.7)(Deranieh *et al.*, 2013). Které kinázy a za jakých podmínek Ino1p fosforylují, zatím nebylo publikováno.



Obrázek 5: (A) 3D model znázorňující strukturu homotetrameru Ino1p. (B) Model monomeru Ino1p s vyznačenými doménami: fialově NAD-vazebná doména, zeleně katalytická doména, červeně N-terminální část proteinu, modře C-terminální část proteinu. Žlutě je vyznačena molekula NAD (Stein & Geiger, 2002).

Další možnou posttranslační modifikací je pravděpodobně ubiquitylace. V rámci globální analýzy byla objevena ubiquitylační místa na lysinech K13, K101 a K208 (obr.7)(Swaney *et al.*, 2013).

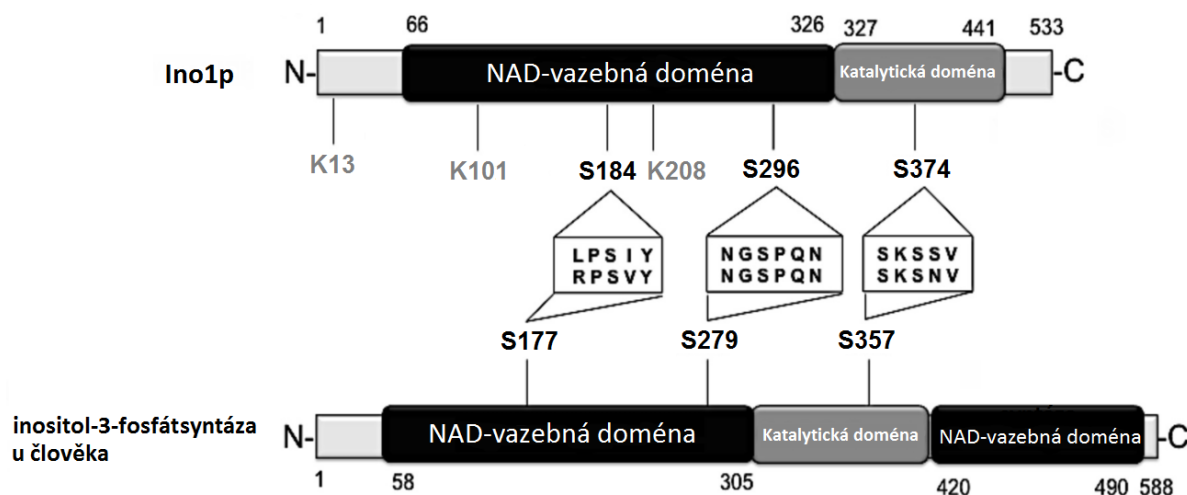
Aktivita Ino1p může být také inhibována meziproduktem přeměny G6P na Ins3P a jeho analogy, mezi které patří i dihydroxyacetonfosfát, meziproduct glykolýzy (Migaud & Frost, 1996). Metabolismus fosfolipidů tedy může být touto cestou ovlivňován metabolismem glukózy.

2.3.2 Regulace exprese genu *INO1*

Na regulaci exprese genu *INO1* se podílí řada proteinů a je ovlivněna mnoha buněčnými ději. Hlavní principy regulace jsou popsány v mé bakalářské práci (Pavličková, 2014), a proto je zde zmíním pouze stručně a podrobněji se budu věnovat tématům, která se v bakalářské práci nevyskytují.

	195					*	*			264
Mycobacter	GDDIKSQVGA	TITHRVLAKL	FEDRGVQLDR	TMQLNVGQNM	DFLNMLERER	LESKKISKQ	AVTSNLKREF			
Pyroc-abys	GDD-GATGAT	PLTADILGHL	AQRNRHVLVLD-	IAQFNIGGNT	DFLALTDKER	NKSKEYTKSS	VVEDILGYDA			
Streptomyc	GSDBGKT--GE	TLVKSVLAPM	FARRALRVRS	WSGTNLLGGG	DGATLADPER	VVSKNASKGL	VLEAELG---			
Archaeoglo	GNDGKT--GE	TLVKTTLAPM	FAYRNMVVG	WMSYNILGDY	DGKVLARDN	KESKVLSKDK	VLEKMLG---			
Entamoeba	GDDFKT--GQ	TKIKSVLADF	LVSSGLKLS	IVSYNHLGNN	DGKNLSSPSQ	FRSKEISKSN	VVSDVVKSN			
Arabidopsi	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPTS	IVSYNHLGNN	DGMNLSAPQT	FRSKEISKSN	VVDDMVASNG			
Mesembryan	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPTS	IVSYNHLGNN	DGMNLSAPQT	FRSKEISKSN	VVDDMVASNG			
Sesamum-In	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPTS	IVSYNHLGNN	DGMNLSAPQT	FRSKEISKSN	VVDDMVASNG			
Glycine-ma	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPTS	IVSYNHLGNN	DGMNLSAPQT	FRSKEISKSN	VVDDMVASNG			
Oryzasativ	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPTS	IVSYNHLGNN	DGMNLSAPQT	FRSKEISKSN	VVDDMVASNG			
Drosophila	GDDFKS--GQ	TKIKSVLVDF	LVGAGIKPVS	IASYNHLGNN	DGKNLSAPQ	FRSKEISKSN	VVDDMVASNR			
HomoSapient	GDDFKS--GQ	TKVKSVLVDF	LIGSGLKTM	IVSYNHLGNN	DGENLSAPLQ	FRSKEISKSN	VVDDMVQSNP			
Leishmanim	GDDFKS--GQ	TKMKSVLVDF	LVGAGIKPVS	IASYNHLGNN	DGYNLSAPQ	FRSKEISKSN	VVDDMIKSNQ			
Pichia-pas	GDDFKS--GQ	TKLKSVAQF	LVDAGIRPVS	IASYNHLGNN	DGYNLSAPQ	FRSKEISKSN	VVDDMIESNE			
Saccharomc	GDDLKS--GQ	TKLKSVAQF	LVDAGIKPVS	IASYNHLGNN	DGYNLSAPQ	FRSKEISKSS	VIDDIASND			
	318				*	*	*	*	*	385
	265			*		**				327
Mycobacter	K-----TK	DVHIGPSDHV	GWLDDRKWAY	VRLEGRAFGD	VPLNLEYKLE	VWDSPPNSAGV	IIDAVRAAKI			
Pyroc-abys	P-----H-	--YIKPTGYL	EPLGDKKFFIA	MHIEYVSFNG	AHDELIITGR	INDSPALAGL	LVDLARIKGI			
Streptomyc	-----HA	VEGGVHIHVV	PDLGEWKTAW	DHVTFEGFLG	ARMTLQFTWQ	GCDSSLAAPL	VLDLARFMAI			
Archaeoglo	-----YS	PYSITEIQYF	PSLVNKTAF	DFVHFKGFLG	KLMKFYFIWD	AIDAIVAAPL	ILDIARFLLF			
Entamoeba	IMY-KAG-EH	PDHVIVITVY	PYVGD SHRAM	DDYTSHFIFLR	GHNTIALHNT	CEDSLLAAPL	MIDLAVLMEF			
Arabidopsi	ILF-EPG-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIFMG	GKNTIVMHNT	CEDSLLAAPL	ILDLVLLAEL			
Mesembryan	ILY-EPG-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIFMG	GTNTIVMHNT	CEDSLLAAPI	ILDLVLLAEL			
Sesamum-In	ILY-EPG-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIFMG	GKSTIVLHNT	CEDSLLAAPI	ILDLVLLAEL			
Glycine-ma	ILY-EPG-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIFMG	GKSTIVLHNT	CEDSLLAAPI	ILDLVLLAEL			
Oryzasativ	ILY-ELG-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIFMG	GKSTIVLHNT	CEDSLLAAPI	ILDLVLLAEL			
Drosophila	LLY-GPD-EH	PDHVIVIKYV	PYVADSKRAM	DEYTSEIMMG	GHNTLVIHNT	CEDSLLATPL	ILDLVILGEL			
HomoSapient	VLV-TPG-EE	PDHCVVIKYV	PYVADSKRAL	DEYTSELMLG	GTNTLVLHNT	CEDSLLAAPI	MIDLALLTEL			
Leishmanim	VLV-PEGARK	PDHCIVIKYI	PYVADSKRAL	DEYTSEIFMG	GQQTIVLHNT	CEDSLLAAPL	IIDLIVLTEL			
Pichia-pas	ILYNEKNGNT	IDHCIVIKYM	KAVGDDKQAM	DEYHSELMLG	GHNTISIHNI	CEDSLLATPL	IIDLIVMAEF			
Saccharomc	ILYNDKLGKK	VDHCVIKYM	KPVGDSKVAM	DEYSELMLG	GHNRIHNV	CEDSLLATPL	IIDLIVMTEF			
	386	*	*	*	*	*	*	*	*	455
	328			*						351
Mycobacter	AKDRGIG---	-----	---GPVIPAS	AYLMKSPPEQ						
Pyroc-abys	AVEKK----	-----	-AFGTVYEVN	AFYMKNPGPR						
Streptomyc	AHRAGVAG--	-----	---PVPEL	GFFFKDPVGS						
Archaeoglo	AKKKGKVKG--	-----	---VVKEM	AFFFKSPMDT						
Entamoeba	MTRVTYSIDG	K-----EF	KNFNSVMSMI	SYLLKAPVVP						
Arabidopsi	STRIQFKSEG	E-----GKF	HSFHPVATIL	SYLTKAPLVP						
Mesembryan	STRIQLKAE	EDK-----F	HSFHPVATIL	SYLTKAPLVP						
Sesamum-In	STRIQLKAE	EGK-----F	HSFHPVATIL	SYLTKAPLVP						
Glycine-ma	STRIEKAEN	EGK-----F	HSFHPVATIL	SYLTKAPLVP						
Oryzasativ	STRIQLKAE	EEK-----F	HSFHPVATIL	SYLTKAPLVP						
Drosophila	STRIQLRNAE	K---E-SAPW	VFFKPVLSLL	SYLCKAPLVP						
HomoSapient	CQRVSFCTDM	-----DPEP	QTFHPVLSLL	SFLFKAPLVP						
Leishmanim	MERVVISASD	DTQTPPPASF	EHMETVLSIL	SYLLKAPAVP						
Pichia-pas	LSRVSYKK--	--K-GDA-EY	ESLHVSLSFL	SYWLKAPLTR						
Saccharomc	CTRVSYKKVD	PVK-EDAGKF	ENFYVLTFL	SYWLKAPLTR						
	456			*						494

Obrázek 6: Porovnání sekvencí aktivních míst inositol-3-fosfát syntáz z různých organismů (*Mycobacterium tuberculosis*, *Pyrococcus abyssi*, *Streptomyces coelicolor*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Entamoeba histolytica*, *Arabidopsis thaliana*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Sesamum indicum*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Leishmania major*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*). Čísla označující pořadí aminokyselinových zbytků jsou uvedena pro *Mycobacterium tuberculosis* (nahore) a *S. cerevisiae* (dole). Hvězdičky označují předpokládané klíčové aminokyseliny pro vazbu substrátu (Majumder *et al.*, 2003).

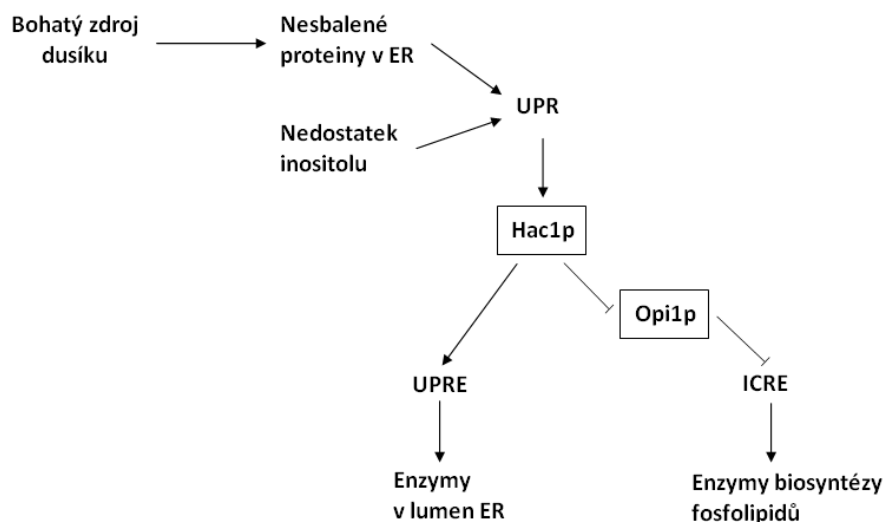


Obrázek 7: Schéma inositol-3-fosfátsyntázy u kvasinek (Ino1p) a u člověka. Vyznačena konzervovaná fosforylační místa. U Ino1p vyznačena i místa ubiquitylace. Podle (Deranieh *et al.*, 2013).

Expresí genu *INO1* je regulována především v závislosti na hladině inositolu v buňce (Donahue & Henry, 1981). Je aktivována heterodimerem Ino2p-Ino4p (Ambroziak & Henry, 1994), který se konstitutivně váže v promotoru na sekvenci nazvanou ICRE element (inositol/choline responsive element) (Schüller *et al.*, 1992a; Schüller *et al.*, 1992b; J. H. Brickner & Walter, 2004). Negativním regulátorem je transkripční faktor Opi1p (Greenberg *et al.*, 1982a), delece genu *OPI1* způsobuje nadměrnou produkci inositolu, který buňky uvolňují do média (Greenberg *et al.*, 1982b). Opi1p je vázán na membránu ER pomocí transmembránového proteinu Scs2p (Loewen *et al.*, 2003) a kys. fosfatidové (PA). V přítomnosti inositolu je PA spotřebována na syntézu PI a Opi1p se uvolní do cytoplazmy a přemístí se do jádra (Loewen *et al.*, 2004), kde se váže na Ino2p a tím zabraňuje remodelaci chromatinu a aktivaci exprese genu *INO1* (Ford *et al.*, 2008). V případě, že je v růstovém médiu kromě inositolu přítomen ještě cholin, represe je silnější. Samotný cholin na expresi genu *INO1* nemá vliv (Hirsch & Henry, 1986).

Expresí genu *INO1* byla sledována také v přítomnosti různých zdrojů dusíku. Po přenosu buněk z média s bohatým zdrojem dusíku (sulfát amonný) do média s chudým zdrojem dusíku (dusíkaté báze) se zpomalila rychlost jejich růstu a také byla přechodně reprimována exprese *INO1*. Na svou původní úroveň se dostala po sedmi hodinách, tato doba je pravděpodobně potřebná pro adaptaci na méně preferovaný zdroj dusíku. Při přenosu buněk do média bez zdroje dusíku se růst buněk zastavil, exprese *INO1* byla reprimována a už se neobnovila. U kmene s delecí genu pro transkripční faktor Opi1p represe genu *INO1* nenastala, je tedy regulována stejným mechanismem jako inositolem řízená regulace exprese. V těchto pokusech byly buňky pěstovány v prostředí bez inositolu a k přenosu mezi médii došlo vždy v brzké exponenciální fázi růstu. (Griac & Henry, 1999).

Mechanismus, kterým je proteinem Opi1p řízena exprese genu *INO1* v závislosti na nedostatku dusíku, by mohl souviset s UPR dráhou (Unfolded protein response pathway). Tato dráha je spuštěna při hromadění nesbalených proteinů v ER a jejím výsledkem je aktivace transkripčního faktoru Hac1p (Shamu & Walter, 1996; Sidrauski & Walter, 1997). Ten se váže na UPRE element (unfolded protein response element), vyskytující se v promotorech genů, které kódují enzymy usnadňující správné skládání proteinů v ER (Cox & Walter, 1996; Mori *et al.*, 1992). UPR dráha je aktivována také při nedostatku inositolu. Protein Hac1p dosud neznámým způsobem podporuje uvolnění Opi1p z oblasti ICRE elementu a tím dochází k nepřímé aktivaci biosyntézy lipidů (obr.8)(Cox *et al.*, 1997; Brickner & Walter, 2004). To umožňuje koordinovat syntézu fosfolipidů a membránových proteinů. K aktivaci UPR dráhy dochází také v přítomnosti bohatého zdroje dusíku, pravděpodobně kvůli velkému množství translatovaných proteinů. Naopak při nedostatku dusíku je UPR dráha deaktivována včetně proteinu Hac1p (Schröder *et al.*, 2000).



Obrázek 8: Způsoby regulace UPR a propojení s biosyntézou fosfolipidů. UPRE – aktivační element genů UPR dráhy, ICRE – aktivační element genů biosyntézy fosfolipidů. (Cox *et al.*, 1997; Schröder *et al.*, 2000)

Expresse genu *INO1* je ovlivněna také zdrojem uhlíku. Nejvíce studovanými zdroji uhlíku jsou hexózy (glukóza, fruktóza, galaktóza a manóza) a potom disacharidy (maltóza a sacharóza). Dále potom dvouuhlíkaté sloučeniny ethanol a acétát. Metabolické dráhy pro zpracování hexóz a disacharidů jsou velmi podobné, liší se pouze v prvních krocích. Také metabolismus ethanolu a acétátu se liší pouze prvními reakcemi. Avšak mezi těmito dvěma skupinami jsou rozdíly významné, každá podporuje spuštění jiných metabolických drah. Gen *INO1* je exprimován především v přítomnosti ethanolu a acétátu, zatímco v přítomnosti glukózy nebo maltózy je spíše reprimován (Daran-Lapujade *et al.*, 2004). To potvrzuje i další studie, kde bylo množství proteinu Ino1p sledováno v buňkách rostoucích ve dvou různých médiích. První obsahovalo 1% (w/v) glycerol a 10% (v/v) ethanol, druhé médium obsahovalo jako zdroj uhlíku 17% glukózu.

Buňky rostoucí v médiu s ethanolem obsahovaly 5× více proteinu Ino1p než buňky rostoucí v médiu s glukózou. To pravděpodobně souvisí s tím, že podmínky prvního média podporují tvorbu biofilmu (Moreno-García *et al.*, 2015). Inositol je pro tvorbu biofilmu potřeba kvůli syntéze GPI kotvy nezbytné pro Flo proteiny.

Pro expresi genu *INO1* je významná také růstová fáze. Nejvíce je exprimován v nepřítomnosti inositolu v průběhu exponenciální fáze růstu, se vstupem buněk do stacionární fáze je exprese reprimována. V buňkách pěstovaných v přítomnosti inositolu byla úroveň exprese nízká ve všech růstových fázích (Jiranek *et al.*, 1998).

Expresi genu *INO1* ovlivňuje také jeho lokalizace v rámci jádra. Když je gen *INO1* aktivován, přesune se k jaderné membráně (Brickner & Walter, 2004; Ahmed *et al.*, 2010). Pro změnu lokalizace po aktivaci genu jsou nezbytné dva cis-elementy DNA, které fungují jako *DNA zip code* (sekvence umožňující přemístění genu v rámci jádra). Nacházejí se v promotorové oblasti genu *INO1*, nazývají se GRS I a GRS II (gene recruitment sequence). Pro maximální aktivaci genu *INO1* je nezbytná přítomnost alespoň jednoho z nich. Tyto elementy umožňují interakci promotoru *INO1* s proteiny jaderného póru. Sekvence GRS I byla nalezena v promotorech dalších genů, především genů souvisejících se stresem v ER. (Ahmed *et al.*, 2010).

Gen *INO1* zůstává v kontaktu s jadernou membránou, i když je gen následně reprimován. To umožňuje rychlejší reaktivaci exprese. Tento způsob transkripční paměti je umožněn díky epigenetické změně, inkorporaci varianty histonu H2A.Z do nukleozomů v oblasti promotoru *INO1*. Přítomnost histonu H2A.Z je charakteristická výhradně pro nedávno reprimovaný gen (Brickner *et al.*, 2007). Změnu ve složení nukleozomu zajišťuje další typ *DNA zip code* sekvence, tzv. MRS (memory recruitment sequence), který je zároveň zodpovědný za asociaci promotoru *INO1* s RNA polymerázou II, což umožňuje rychlou reaktivaci transkripce. Oba mechanismy (řízené pomocí GRS a MRS), způsobující vazbu genu *INO1* k jadernému póru, jsou nezávislé (Light *et al.*, 2010).

Lokalizace aktivního genu *INO1* je také závislá na fázi buněčného cyklu. Během S-fáze po zahájení replikace DNA dochází k přesunu genu od jaderné membrány do nukleoplazmy, přibližně po 20ti-30ti min se vrací zpět. To však neplatí pro nedávno reprimovaný gen, který zůstává u jaderné membrány po celý buněčný cyklus (Brickner & Brickner, 2010).

2.3.3 Význam inositolu pro buňku

Inositol přímo či nepřímo souvisí s mnoha buněčnými ději, a proto je pro buňky esenciální (Culbertson & Henry, 1975). Kvasinky získávají inositol třemi různými způsoby. Kromě již popsané syntézy *de novo* mohou inositol získat z extracelulárního prostředí pomocí transportních proteinů kódovaných geny *ITR1* a *ITR2* (Nikawa *et al.*, 1991). Třetí cesta je

recyklace inositol-1,4-bisfosfátu, ze kterého vznikne inositol dvojitou defosforylací (Berridge & Irvine, 1984).

Největší roli hraje inositol v metabolismu fosfolipidů. Vedle genu *INO1* jsou při nedostatku inositolu aktivovány i další geny kódující enzymy biosyntézy fosfolipidů (Schüller *et al.* 1995). Mutace v genech pro některé z nich vede k ovlivnění regulace exprese genu *INO1*. Jedná se například o geny *CHO2* a *OPI3*, kódující enzymy katalyzující přeměnu fosfatidylethanolaminu na fosfatidylcholin (Kodaki & Yamashita, 1987). Jejich delece vede ke konstitutivní expresi *INO1* (Greenberg *et al.*, 1983; Summers *et al.*, 1988).

Inositol je jedním ze substrátů pro syntézu PI (fosfatidylinositol), který je významnou složkou buněčných membrán. Na rozdíl od ostatních fosfolipidů může být PI fosforylován a stát se tak součástí řady regulačních drah jako signální molekula či zdroj druhých posílů. Zasahuje tak do signální transdukce (Divecha & Irvine, 1995) nebo regulace transportu váčků a výstavby cytoskeletu (Martin, 2001). Další důležitou roli hraje PI jako součást GPI kotvy extracelulárních proteinů (Pittet & Conzelmann, 2007).

Derivát inositolu, inositolhexakisfosfát (IP_6), se účastní regulace exportu mRNA z jádra. Na syntéze IP_6 se podílí mimo jiné také fosfolipáza C. Její aktivita zvyšuje množství inositoltrisfosfátu (IP_3), který je dále fosforylován pomocí dalších enzymů až na IP_6 (York *et al.*, 1999). Ten se pak váže na protein Gle1p a společně aktivují protein Dbp5p (Alcázar-Román *et al.*, 2006). Dbp5p je helikáza nezbytná pro export mRNA z jádra (Tseng *et al.*, 1998). IP_6 v lidských buňkách se účastní i editace RNA (Macbeth *et al.*, 2005). Inositoldifosfát hraje roli také v regulaci délky telomer (York *et al.*, 2005).

Při nedostatku inositolu je aktivována PKC (proteinkináza C) signální dráha (známá také jako proteinkinázová dráha integrity buněčné stěny aktivovaná mitogenem; CWI-MAPK), která je esenciální pro homeostázi lipidů a životaschopnost buněk (Nunez *et al.*, 2008). U savčích buněk dochází k aktivaci dráhy pomocí diacylglycerolu, u *S. cerevisiae* to prokázáno nebylo a nejsou k dispozici žádné výsledky, které by přesvědčivě stanovily nějakou jinou aktivační molekulu (Antonsson *et al.*, 1994). Proteiny PKC dráhy pak ovlivňují řadu dějů souvisejících s metabolismem lipidů např. kontrolu buněčného cyklu, organizaci cytoskeletu a sekrece, morfologické změny a spájení (*mating*) (Heinisch *et al.*, 1999). Delece genu *PKC1* a dalších genů kódujících proteiny této dráhy vede k auxotrofii na inositol. Mezi ně patří i delece genu *SLT2* (= *MPK1*, kódující MAP kinázu), která však neovlivňuje expresi genu *INO1*. Auxotrofie na inositol je způsobená jiným, dosud neznámým, mechanismem (Nunez *et al.*, 2008).

Nedostatek inositolu také významně ovlivňuje membránu vakuoly a její vnitřní pH. Způsobuje nedostatek $PI3,5P_2$ (fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát), který je klíčovým fosfolipidem vakuolárních membrán (Rudge *et al.*, 2004). V-ATPáza je regulována v závislosti na tomto fosfolipidu a při jeho nedostatku se její aktivita snižuje (Li *et al.*, 2014; Deranieh *et al.*, 2015).

Jak již bylo zmíněno, hladina inositolu také ovlivňuje proteiny související se stresem v endoplazmatickém retikulu, jde především o dráhu UPR (Unfolded protein response pathway)(Cox *et al.*, 1997).

Změny a poruchy v dějích zahrnujících inositol nebo PI v lidských nervových buňkách jsou spojovány s mnoha nemocemi. Jedná se např. o rakovinu, diabetes druhého typu a neurologická onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, bipolární afektivní porucha)(Shi *et al.*, 2006). Velmi významnou roli hraje v neuronech signální dráha zahrnující vazbu IP₃ (inositoltrisfosfát) na IP₃ receptory, která způsobuje prudký nárůst koncentrace iontů Ca²⁺ v cytoplazmě (Berridge, 2009). V nervových tkáních mozku pacientů s Alzheimerovou, Parkinsonovou i Huntingtonovou chorobou je snižené množství těchto receptorů (Kitamura *et al.*, 1989; Warsh *et al.*, 1991; Garlind *et al.*, 1995). Poškození genu pro tento receptor je u myšího modelu ve většině případů letální (Matsumoto *et al.*, 1996).

U Léčiv používaných na bipolární afektivní poruchu (lithium a valproát) bylo prokázáno, že snižují obsah inositolu v buňkách *S. cerevisiae* stejně jako v buňkách mozku potkanů (O'Donnell *et al.*, 2000; Vaden *et al.*, 2001). Valproát snižuje hladinu inositolu v buňkách *S. cerevisiae* a potlačuje aktivitu enzymu Ino1p. V důsledku nedostatku inositolu je exprese genu *INO1* zvýšená ve všech růstových fázích, valproát tedy působí inhibičně až na posttranslační úrovni (Ju *et al.*, 2004). Jaký je mechanismus účinku těchto léků, zatím není známo. Zvýšená hladina inositolu však byla nalezena i v buňkách mozku pacientů s Downovým syndromem nebo u sebevrahů (Shetty *et al.*, 1995; Shimon *et al.*, 1997).

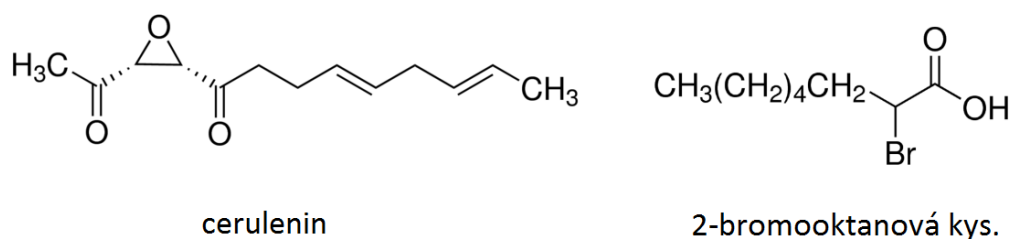
2.4 Inhibitory metabolismu fosfolipidů

Jedním z inhibitorů metabolismu fosfolipidů je cerulenin [(2R,3S,E,E)-2,3-epoxy-4-oxo-7,10-dodekadienamid](obr.9). Je to látka inhibující aktivitu multienzymového komplexu syntetázy mastných kyselin. Tím blokuje syntézu mastných kyselin *de novo* u mnoha organismů (např. *Corynebacterium diphtheriae*, *S. cerevisiae*, *Euglena gracilis*, jaterní buňky potkanů)(Vance *et al.*, 1972). Zároveň inhibuje buněčný růst (Matsumae *et al.*, 1964, podle Vance & Goldberg, 1972).

U *S. cerevisiae* byl zkoumán vliv ceruleninu na tvorbu biofilmu na povrchu tekutého média. V přítomnosti ceruleninu je tvorba biofilmu silně inhibována, zároveň je velmi snížena exprese genu *FLO11*. Když byly do média přidány k ceruleninu ještě mastné kyseliny, nebyly pozorovány změny ve schopnosti tvořit biofilm ani v expresi genu *FLO11*, buněčný růst byl však stále omezen (G. Zara *et al.*, 2012).

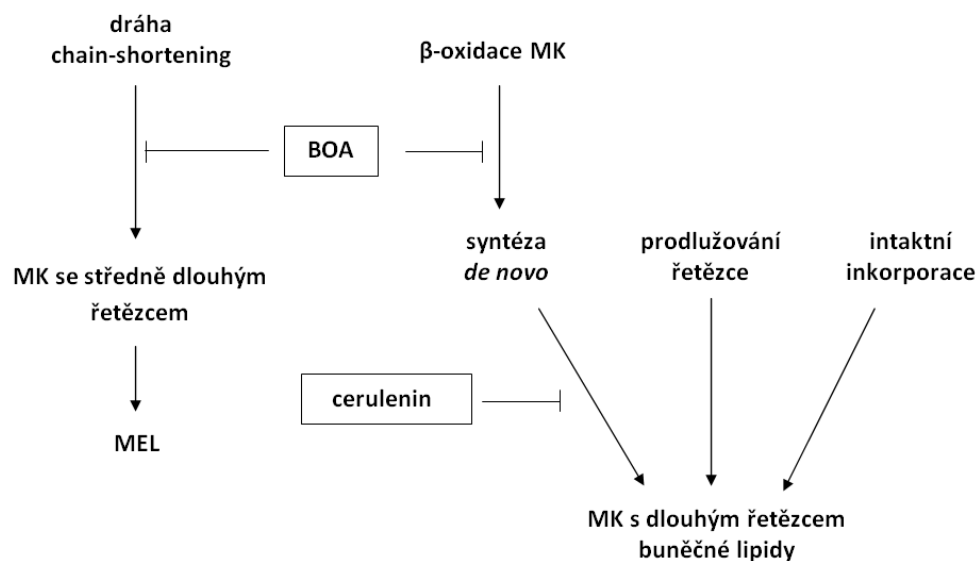
Bakterie *Pseudomonas fluorescens* tvoří zásobní polymer polyhydroxyalkanoát (PHA)(Huisman *et al.*, 1989). Prekurzory pro syntézu PHA jsou buď produkty β-oxidace mastných kyselin (v případě, že zdrojem uhlíku jsou mastné kyseliny, např. oktanoát), nebo produkty syntézy mastných kyselin *de novo* (v přítomnosti jiného zdroje uhlíku, např.

fruktózy)(Huijberts *et al.*, 1994). Lee *et. al* potřebovali pro svůj výzkum inhibovat syntézu PHA, ale cerulenin nebyl vhodný kvůli negativnímu vlivu na buněčný růst. Objevili alternativní inhibitor syntézy PHA, 2-bromooktanovou kyselinu (BOA, obr.9), která méně inhibuje buněčný růst a zároveň je levnější. V případě, že zdrojem uhlíku byla fruktóza, BOA inhibovala syntézu PHA z 50 % už při 60 μM koncentraci a při 2 mM koncentraci byla syntéza PHA inhibována zcela. Na oktanoátu, jako zdroji uhlíku, BOA inhibovala syntézu PHA slabě a zároveň inhibovala buněčný růst. Z toho lze usuzovat, že BOA je slabý inhibitor β -oxidace, ale velmi silný inhibitor dráhy vedoucí k syntéze PHA z fruktózy (Lee *et al.*, 2001). Syntéza mastných kyselin a syntéza PHA je propojena enzymem kódovaným genem *PHAG* (Rehm *et al.*, 1998). Cílem 2-bromooktanové kys. je pravděpodobně enzym PhaG (transacyláza) spojující syntézu mastných kyselin se syntézou PHA (Lee *et al.*, 2001).



Obrázek 9: Chemické vzorce ceruleninu [(2R,3S,E,E)-2,3-epoxy-4-oxo-7,10-dodekadienamid] a kyseliny 2-bromooktanové.

Cerulenin a BOA byly použity i u *Candidy antarctica* a to k inhibici syntézy biosurfaktantu MEL (mannosylerythriol lipid). Předpokládaným zdrojem substrátu (mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, 7-12 uhlíků) pro jeho syntézu je částečná β -oxidace označovaná jako chain-shortening dráha (Kitamoto *et al.*, 1998). U savců je tato dráha známá pod názvem peroxizomální β -oxidace (Hiltunen *et al.*, 1996), zatímco u kvasinek probíhá β -oxidace pouze v peroxizomech (Kunau *et al.*, 1995). U *C. antarctica* má cerulenin vliv na syntézu mastných kyselin *de novo*. Inhibice této dráhy má však pouze malý vliv na syntézu MEL (Kitamoto *et al.*, 1995). BOA působí inhibičně na β -oxidaci i na chain-shortening dráhu a tím inhibuje syntézu MEL velmi efektivně (obr. 10). Zároveň jen málo ovlivňuje růst buněk (Kitamoto *et al.*, 1998).



Obrázek 10: Schéma metabolismu mastných kyselin (MK) u *C. antarctica*. MEL - mannosylerythriol lipid, BOA – 2-bromooktanová kyselina. Podle (Kitamoto *et al.*, 1998).

2.5 Vliv Selenu na kvasinky a tvorbu kolonií

Vliv selenu na buňku či organismus je z různých hledisek zkoumán v mnoha laboratořích. U člověka selen působí jako prevence proti některým typům rakoviny. Je zkoumána i možnost léčby rakoviny pomocí různých sloučenin selenu (Clark *et al.*, 1998; Wallenberg *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015). Ve vyšších dávkách (nad 750-850 μg denně) je však selen toxický a způsobuje oxidativní stres a mutace (Yang *et al.*, 1989; Biswas *et al.*, 2000; Wycherly *et al.*, 2004).

Pro studium toxicity selenu jsou jako modelový organismus využívány kvasinky. Jejich výhodou je, že postrádají selenoproteiny. Na rozdíl od jiných organismů lze tedy sledovat změny v organismu způsobené selenem odděleně od změn souvisejících s funkcí selenoproteinů (Kryukov *et al.*, 2003).

Jak se selen dostává do buněk, záleží na jeho formě. Selenit (SeO_3^{2-}) je přenášen fosfátovými přenašeči (Lazard *et al.*, 2010), zatímco selenan (SeO_4^{2-}) využívá přenašeče pro síranový aniont (Cherest *et al.*, 1997). V buňce jsou v přítomnosti glutathionu sloučeniny selenu redukovány na sloučeniny selenodiglutathion (GS-Se-SG), elementární selen nebo selan (H_2Se) (Ganther, 1968; Ganther, 1971; Kice *et al.*, 1980). Selen samotný ani selenodiglutathion nejsou příliš toxické látky, na rozdíl od selanu (Tarze *et al.*, 2007). Ten působí toxicky mnoha způsoby. Může vstoupit do metabolických drah pro síru, což vede např. k produkci selenomethioninu, který se v buňce hromadí. Existují i kmeny kvasinek k selenu tolerantní, obohacené selenomethioninem jsou využívány při výrobě doplňků stravy (Schrauzer, 2000; Schrauzer, 2001). Selan a volné kyslíkové radikály (ROS) vznikající při reakci selanu s kyslíkem také způsobují oxidaci glutathionu, čímž mohou ovlivňovat rovnováhu mezi redukovanou a oxidovanou formou glutathionu a tím indukovat oxidativní stres v buňce (Ganther, 1971; Seko & Imura, 1997). Selan

také reaguje s ionty kovů, které jsou součástí proteinů. Interaguje s iontem železa v aktivním místě savčího enzymu lipoxygenázy a tím inhibuje jeho aktivitu (Björnstedt *et al.*, 1996). V literatuře byla popsána i interakce sloučenin selenu se zinkem. Selen ve formě ebselenu nebo selenitu inhibuje transkripční faktory obsahující zinc-finger doménu, jedná se např. o TFIIIA a NF- κ B (Larabee *et al.*, 2002; Larabee *et al.*, 2009).

Toxicita způsobená selenem byla pozorována i u jiných druhů kvasinek. U *C. utilis* způsobuje selen změny ve velikosti buněk a struktuře vakuoly (Kieliszek *et al.*, 2016), zatímco u *C. albicans* inhibuje růst a tvorbu biofilmu. To je pravděpodobně způsobeno vznikem většího množství ROS, což vede k poškození buněčných struktur (Rosseti *et al.*, 2015).

Přítomnost selenu ovlivňuje také množství a složení mastných kyselin v buňce i poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin (Dilsiz *et al.*, 1997).

Laboratoř biologie kvasinkových kolonií PřF UK se zabývá morfologií kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae*. Selen je zde zkoumán z hlediska jeho účinku na morfologii kolonií. RNDr. Michaela Schierová, Ph.D. zjistila, že nízká koncentrace (0,05 mM) selenanu (Na_2SeO_4) indukuje větší vrásnění. U kmene s delecí genu *OPI1* však vrásčité kolonie v přítomnosti selenanu nevznikají (nepublikovaná data). Na základě těchto výsledků byly navrhovány experimenty mé diplomové práce.

3 Cíle práce

- Zjistit, zda úroveň metabolismu fosfolipidů závisí na morfologii kvasinkové kolonie.
- Zjistit, zda v přítomnosti selenanu dochází ke změně metabolismu fosfolipidů.

Dílčí úkoly:

- Připravit kmeny exprimující fúzní proteiny Ino1p-GFP, Opi1p-GFP, ev. GFP-Opi1p od kmene PORT a kmene s delecí genu *OPI1*, který ovlivňuje expresi genu *INO1*.
- Připravit kmen s delecí genu *INO1* a kmen s expresí genu *INO1* řízené promotorem TEF.
- Pomocí fluorescenční mikroskopie, imunodetekce a měření na spektrofluorometru charakterizovat produkci GFP- fúzních proteinů v závislosti na stáří kolonie, zdroji uhlíku a přítomnosti selenanu.
- Charakterizovat morfologii kolonií u rodičovského kmene, u kmenů s delecí genů *INO1* a *OPI1* a kmene *TEF-INO1* v přítomnosti inhibitoru β -oxidace mastných kyselin (2-bromooktanové kyseliny), včetně optimalizace podmínek.
- U těchto kmenů porovnat expresi genů *INO1*, *OPI1* a *FLO11* pomocí northern analýzy a sledovat vliv 2-bromooktanové kyseliny na produkci Ino1p-GFP (zejména imunodetekce).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použitý mikroorganismus

Kmen *Saccharomyces cerevisiae* PORT byl získán ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Jedná se o monoklonální izolát přírodního vinařského kmene WY63 získaného od Dorit Schuller z Universidade do Minho, Braga (Portugalsko). Kmen je diploidní ($MATa/MAT\alpha$) a prototrofní.

4.1.2 Použité kvasinkové kmeny

Seznam všech použitých kmenů je uveden v tabulce 1. Autorem kmene PORT-*opi1* je RNDr. Michaela Schierová, Ph.D., ostatní kmeny jsem připravila v rámci diplomové práce.

Tabulka 1: Seznam kmenů použitých pro účely této práce.

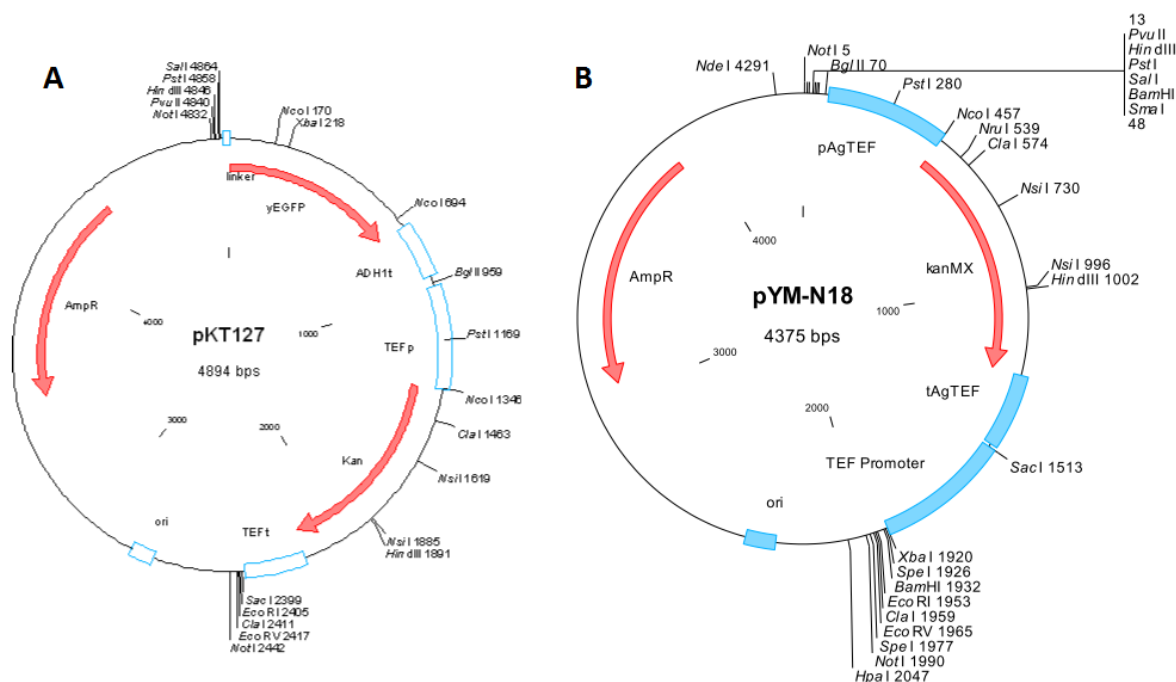
Název	Genotyp
PORT- <i>ino1</i>	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>ino1</i> Δ :: <i>kanMX/ino1</i> Δ :: <i>hph</i>
PORT- <i>opi1</i>	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>opi1</i> Δ :: <i>nat1/opi1</i> Δ
PORT- <i>opi1</i> /Ino1p-GFP	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>opi1</i> Δ :: <i>nat1/opi1</i> Δ <i>INO1</i> -EGFP- <i>kanMX/INO1</i>
PORT-Ino1p-GFP	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>INO1</i> -EGFP- <i>kanMX/INO1</i>
PORT-Opi1p-GFP	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>OPI1</i> -EGFP- <i>kanMX/OPI1</i>
PORT-GFP-Opi1p	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>OPI1</i> -EGFP/ <i>OPI1</i>
PORT- <i>TEF-INO1</i>	PORT, $MATa/MAT\alpha$ <i>TEF-INO1</i> - <i>kanMX/INO1</i>

4.1.3 Použité plazmidy

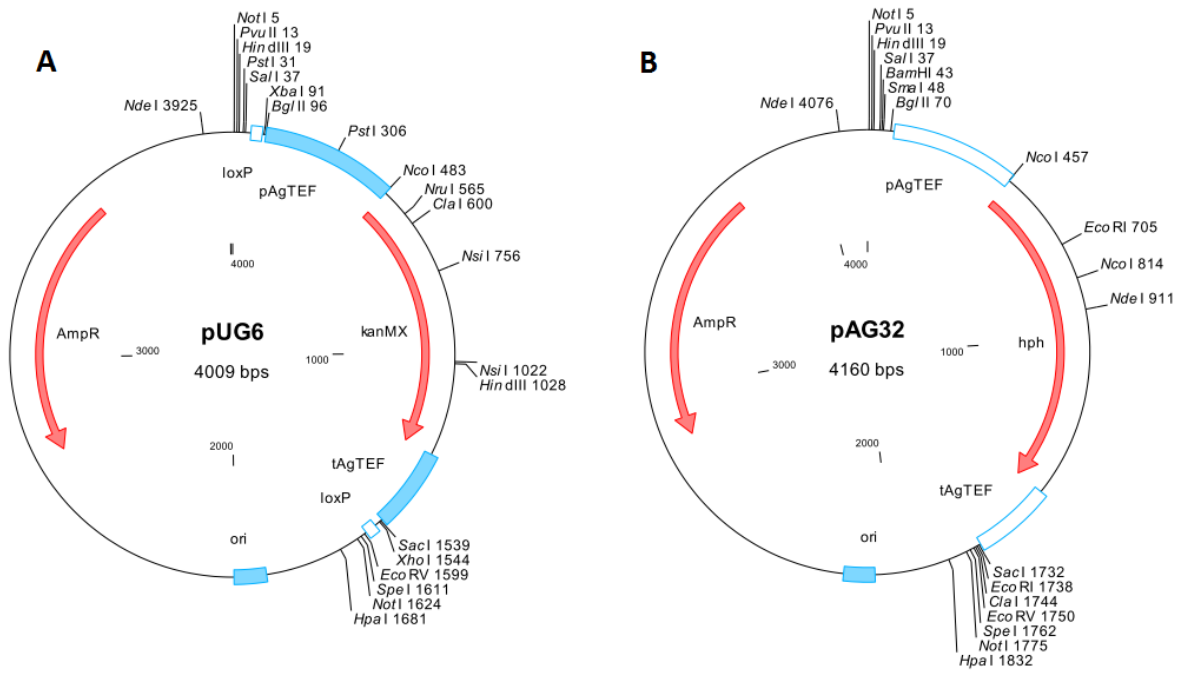
Plazmid pSH66 byl použit na odstranění genu *kanMX* pomocí CreA rekombinázy při přípravě kmene exprimujícího protein GFP-Opi1p (značený na N-konci). Ostatní použité plazmidy sloužily jako PCR templát pro přípravu transformačních kazet. Jejich podrobná charakteristika a kmeny, na jejichž přípravu byly plazmidy použity, jsou uvedeny v tabulce 2. Plazmidy byly získané ze sbírky Euroscarf (European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis).

Tabulka 2: Seznam použitých plazmidů s příslušnými kmeny, na jejichž přípravu byly plazmidy použity.

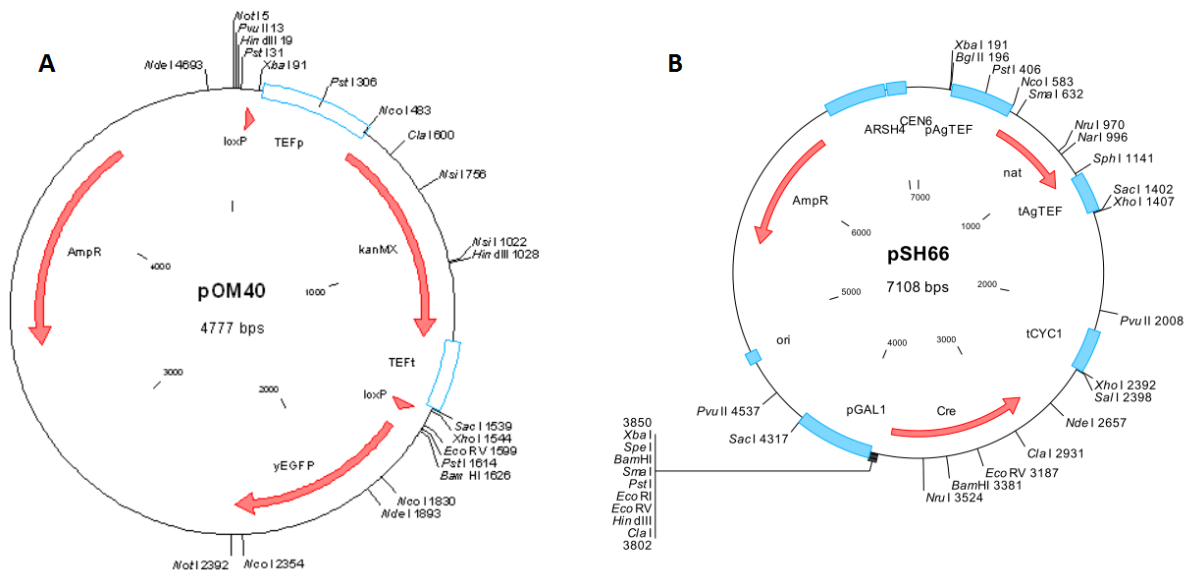
Plazmid	Připravené kmeny	Charakteristika plazmidu
pKT127	PORT-Ino1p-GFP PORT- <i>opi1</i> /Ino1p-GFP PORT-Opi1p-GFP	Plazmid slouží pro přípravu kazet na C-koncové značení proteinů pomocí GFP. Nese geny <i>yEGFP</i> (yeast enhanced green fluorescent protein) a <i>KanMX</i> (produkt způsobuje rezistenci ke geneticinu, slouží jako selekční marker). Velikost plazmidu je 4894 bp (obr. 11).
pUG6	PORT- <i>ino1</i>	Plazmid slouží pro přípravu delečních kazet. Nese gen <i>kanMX</i> (produkt způsobuje rezistenci ke geneticinu, slouží jako selekční marker) ohraničený <i>loxP</i> místy. To umožňuje v případě potřeby rezistenci odstranit pomocí CreA rekombinázy. Velikost plazmidu je 4009 bp (obr. 12).
pAG32	PORT- <i>ino1</i>	Plazmid slouží pro přípravu delečních kazet. Nese gen <i>hph</i> (produkt způsobuje rezistenci k hygromycinu B, slouží jako selekční marker). Velikost plazmidu je 14160 bp (obr. 12).
pYM-N18	PORT- <i>TEF-INO1</i>	Plazmid slouží pro přípravu kazet, které umožňují vložit před námi vybraný gen silný konstitutivní promotor <i>TEF</i> . Nese sekvenci kódující promotor <i>TEF</i> (pochází z vláknité houby <i>Ashbya gossypii</i> , kde je promotorem genu <i>TEF</i> kódujícího translační elongační faktor 1 α ; Steiner & Philippsen, 1994) a gen <i>kanMX</i> (produkt způsobuje rezistenci ke geneticinu, slouží jako selekční marker). Velikost plazmidu je 4375 bp (obr. 11).
pOM40	PORT-GFP-Opi1p	Plazmid slouží pro přípravu kazet ke značení proteinů pomocí GFP na N-konci. Nese geny <i>yEGFP</i> (yeast enhanced green fluorescent protein) a <i>KanMX</i> (produkt způsobuje rezistenci ke geneticinu, slouží jako selekční marker) ohraničený <i>loxP</i> místy. To umožňuje gen <i>KanMX</i> odstranit pomocí CreA rekombinázy. Velikost plazmidu je 4777 bp (obr. 13).
pSH66	PORT-GFP-Opi1p	Plazmid slouží pro expresi CreA rekombinázy. Nese geny <i>nat</i> (produkt způsobuje rezistenci k nourseothricinu) a <i>Cre</i> (rekombináza bakteriofága P1). Gen <i>Cre</i> je pod kontrolou promotoru <i>GAL1</i> (exprese je aktivována přítomností galaktózy). Velikost plazmidu je 7108 bp (obr. 13).



Obrázek 11: Mapy plazmidů pKT127 (A) a pYM-N18 (B). Obrázky jsou převzaty z <http://www.euroscarf.de> (European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis).



Obrázek 12: Mapy plazmidů pUG6 (A) a pAG32 (B). Obrázky jsou převzaty z <http://www.euroscarf.de> (European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis).



Obrázek 13: Mapy plazmidů pOM40 (A) a pSH66 (B). Obrázky jsou převzaty z <http://www.euroscarf.de> (European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis).

4.1.4 Použité primery

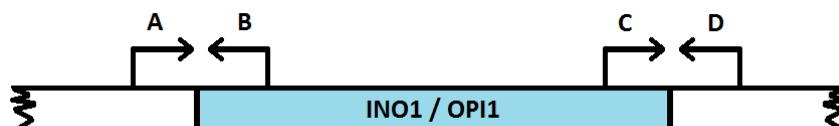
Primery byly navrhovány na základě kódující sekvence daného genu, ke které byly připojeny nekódující sekvence v těsné blízkosti před a za genem, každá o délce 1000 bp. Pro výběr optimálních sekvencí byl použit program Primer z balíčku CLONE. Primery byly objednány u společnosti Sigma-Aldrich. V tabulce 3 jsou uvedeny cílené geny, v tabulce 4 jsou uvedeny všechny použité primery. Přímé primery jsou značeny písmenem F a reverzní primery písmenem R. Primery pro ověření správného vložení transformační kazety do genomu jsou značeny písmeny A, B, C nebo D a jejich umístění v rámci genu je schematicky znázorněno na obrázku 14. Primery sloužící na přípravu sond jsou označeny písmenem S, s jejich pomocí lze naamplifikovat úsek uvnitř kódující sekvence daného genu. Sekvence primerů jsou v rámci genomu unikátní.

Tabulka 3: Seznam cílených genů.

Gen	Délka kódující sekvence a přilehlých oblastí (každá o délce 1000 bp)
<i>INO1</i>	3602
<i>OPI1</i>	3215
<i>OPI3</i>	2621
<i>FLO11</i>	6104
<i>FAS2</i>	7664
<i>RPL3</i>	3164
<i>TPI1</i>	2747

Tabulka 4: Seznam všech použitých primerů. C – komplementární vlákno.

Název primeru	Sekvence ve směru 5' → 3'	Poloha primeru
INO1 GFP F	TGATTGGATTGCCTTCTCAAACGAACTAAGATTCGAAGAGAGATTGTTGGGTGACGGTGCTGGTTTA	2550
INO1 GFP R	GTTTTTTTATAGGTAGGCGGAAAAAGAAAAAGAGAGTCGTTGAAATGAGATCGATGAATTGGAGCTCG	2652 C
INO1 DEL F	AGTAACAATGACAGAAGATAATATTTGCTCCAATCACCTCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	994
INO1 DEL R	GAGTCGTTGAAATGAGATTACAACAATCTCTCTTTCGAATCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	2619 C
INO1 TEF F	TATTCTGTTTCATTCCCTTTTTTTTTCCAGTGAAAAAGAAGTAACACGTACGCTGCAGGTGAC	956
INO1 TEF R	AACTACTTTAACGGAGGTGATTGGAGCAATATTATCTTCTGTGCATCATCGATGAATTCTCTGTCG	1045 C
INO1 A	TGCAGAGGAATCTCAAGCAC	454
INO1 B	AGAGGCTTCACCAAGGACAT	1545 C
INO1 C	AAAGTGGCAATGGACGAG	2234
INO1 D	TTCTGGTGAGTCCGCATA	3022 C
INO1 SF	CGGTATTGGCGAATAAGCAC	1251
INO1 SR	CCTGGTCTTGTTAATGGAGC	2487 C
OPI1 GFP F	GATGGCAATTACGTAAAGCCCTCTCAGGACAACGTGGATAGCAAGGACGGTGACGGTGCTGGTTTA	2165
OPI1 GFP R	TAATATTACTGTTGGTAAATGCATGAAAGACCTCAATCTGTCTCGGTGATGAATTTCGAGCTCG	2263 C
OPI1 NGFP F	GCGTGTGTATCAGGACAGTGTTTTTAACGAAGATACTAGTCATTGATGTGCAGGTGACACACCTTAAT	956
OPI1 NGFP R	CTACCTCTTCTCTGATAATCCTAAACGTTGATTTTCAGAGCGGCCGCATAGGCCACT	1043 C
OPI1 A	GCATCCATGGTGGCAGAGTT	403
OPI1 B	TCGTCGTCGTCTTCGTCTGA	1593 C
OPI1 C	TCAACGCCAGCGAGCAGTCT	1623
OPI1 D	AACCGGCTTGCTGGACTCCT	2777 C
OPI1 SF	AGACGATGACGATGACGAGC	1264
OPI1 SR	CATTCGCAGTTACGGAGGAG	1988 C
FAS2 SF	TCCAACCTCCAGCTGCTAGTG	1330
FAS2 SR	TTCTTCCAGAGCGCCAGCAT	1990 C
FLO11 SF	TACAACCGAAACTACCATTGT	3748
FLO11 SR	TTAGAATACAACCTGGAAGAGC	5084 C
OPI3 SF	CAAGTCAAGCGATGAAGGAG	990
OPI3 SR	GTTAGCGTAGATCATGGCAG	1594 C
RPL3 SF	CTGCCTCCATCAGAGCTAGA	1065
RPL3 SR	CCGAACCTAGAAGCAGTGTC	2097 C
TPI1 SF	TGTCTCCAGCTACCTACTT	1121
TPI1 SR	GAGCATCTTCTGGAGTAGCA	1544 C
GFP F	TTGGTGATGGTCCAGTCTTG	-
GFP MID F	AAGACCAGAGCTGAAGTC	-
GFP 89 R	CGGAGACAGAAAATTTGTGAC	-
GFP 589 R	TAACAAGACTGGACCATC	-
GFP END R	ACCATGGGTAATACCAGC	-
Hph R	GAAATCACGCCATGTAGTGT	-
KanMX F	GATACCAGGATCTTGCCATC	-
KanMX R	CTGATTGCCGACATTATCG	-



Obrázek 14: Schéma umístění ověřovacích primerů vzhledem ke kódující sekvenci genů *INO1* a *OPI1*.

4.1.5 Chemikálie a enzymy

Název	Zkratka/chemický vzorec	Výrobce
4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluorid, hydrochlorid	AEBSF	Fluka
6× DNA Loading Dye		MBI Fermentas
agar		Dr. Kulich Pharma
agaróza (for routine use)		Sigma-Aldrich
akrylamid	C ₃ H ₅ NO	MP Biomedicals
bromfenolová modř	BFM	Bio-Rad
citrát trisodný, dihydrát	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O	Lachema
Coomassie Brilliant Blue R250	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	Serva
deoxynukleotidy	dNTP	Top-Bio
D-glukóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Spofa
dihydrogenfosforečnan sodný	NaH ₂ PO ₄	Penta
dimethyl sulfoxid	DMSO	Top-Bio
DL-dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich
dodecylsulfát sodný	SDS	Sigma-Aldrich
ethanol 96% (v/v)	EtOH	Penta, Lach-Ner
ethidium bromid	EtBr	Serva
Ethylendiamintetraacetát	EDTA	Serva
fenol	C ₆ H ₆ O	Sigma-Aldrich
fenylmethansulfonyl fluorid	PMSF	Fluka
formaldehyd	CH ₂ O	Lach-Ner
fosforečnan disodný	Na ₂ HPO ₄	Lach-Ner
galaktóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich
glycerol bezvodý	C ₃ H ₈ O ₃	Lach-Ner
glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	Serva
hovězí sérový albumin	BSA	Invitrogen™
hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Penta
hydroxid sodný	NaOH	Lachema, Lach-Ner
chlorid hořečnatý	MgCl ₂	Top-Bio
chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
chloroform	CHCl ₃	Lachema
igepal CA-630 (nonidet P-40)	NP40	Fluka
inhibitor proteáz mix FY	PIC	Serva
izopropanol	C ₃ H ₈ O	Penta, Lachema
kasein z hovězího mléka		Sigma-Aldrich
kvasničný autolyzát (šarže č. 83)	YE 83	IMUNA PHARM
kys. 2-(N-morfolino)ethansulfonová	MES	Sigma-Aldrich
kys. 2-bromooktanová	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(Br)COOH	Sigma-Aldrich

kys. 3-(N-morfolino)propansulfonová	MOPS	Sigma-Aldrich
kys. boritá	H ₃ BO ₃	Lachema
kys. chlorovodíková	HCl	Penta
kys. octová	CH ₃ COOH	Penta
kys. orto-fosforečná	H ₃ PO ₄	Lachema
kys. peroctová (35%) Persteril®36	C ₂ H ₄ O ₃	OVERLACK
LA DNA polymerázový mix	LA DNA pol. mix	Top-Bio
LA pufr		Top-Bio
methanol	CH ₃ OH	Merck KGaA
N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin	TEMED	Serva
N, N'-methylen-bis-akrylamid		Serva
octan amonný	NH ₄ Ac	Lachema
octan lithný	LiAc	Serva
octan sodný	NaAc	Sigma-Aldrich
OneTaq®		New England Biolabs
pepton		IMUNA PHARM
peroxid vodíku	H ₂ O ₂	Lach-Ner
persíran amonný	APS	Serva
polyethylenglykol	PEG	Serva, Sigma-Aldrich
PPP PCR Master Mix		Top-Bio
radioaktivně značený deoxycytrin trifosfát	dCTP	MGP
Salmon Sperm DNA	ssDNA	BioLabs
selenan sodný	Na ₂ SeO ₄	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Sigma-Aldrich
Tween® 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich

4.1.6 Antibiotika

Název	Zkratka	Výrobce
Edicin	Edi	SANDOZ
Geneticin	G418	MP Biochemicals
Hygromycin B	Hyg	Sigma-Aldrich
Nourseothricin	NAT	WERNER BioAgents

4.1.7 Ostatní materiál

Stanovení koncentrace proteinů:

Bradfordovo reagens (Bio-Rad)

Protilátka na imunodetekci:

GFP(B-2)HRP – myší monoklonální protilátka IgG2a (Santa Cruz Biotechnology)

Detekční substráty určené na imunodetekci:

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

Materiál na vyvolání filmů:

fotografické filmy (Fomei a.s.)

vývojka Röntgen Rapid Entwickler (Adefo-chemie, GmbH)

práškový RTG rychloustalovač (Adefo-chemie, GmbH)

Pro radioaktivní značení sond:

Random Primer DNA Labeling Kit (Takara)

4.1.8 Média pro kultivaci kvasinek

Tekutá média

- YD: 2% (w/v) glukóza
1% (w/v) kvasničný autolyzát
- Galaktózové médium: 2% (w/v) galaktóza
1% (w/v) kvasničný autolyzát
- Skladovací médium: 60% (v/v) glycerol
10% (w/v) glukóza
2% (w/v) pepton
1% (w/v) kvasničný autolyzát

Pevná média

- GM: 3% (w/v) glycerol
1% (w/v) kvasničný autolyzát
2% (w/v) agar
- GM-Se: GM médium s 0,05 mM Na₂SeO₄
- GMi: GM médium s inhibítozem (kys. 2-bromooktanová, koncentrace je uvedena u jednotlivých experimentů), inhibitor byl rozpuštěn v 0,5 ml EtOH/100 ml média. Do kontrolních médií bez inhibitoru byl EtOH přidáván ve stejném množství.
- GM-Sei: GMi médium s 0,05 mM Na₂SeO₄ a s inhibítozem (podobně jako GMi)
- YD: 2% (w/v) glukóza
1% (w/v) kvasničný autolyzát
2% (w/v) agar
- YD01: 0,1% (w/v) glukóza
1% (w/v) kvasničný autolyzát
2% (w/v) agar

- YD-Se: YD médium s 0,05 mM Na₂SeO₄
- YDi: YD médium s inhibitorem (podobně jako GMi)
- YD-Sei: YDi médium s 0,05 mM Na₂SeO₄ a s inhibitorem (podobně jako GMi)

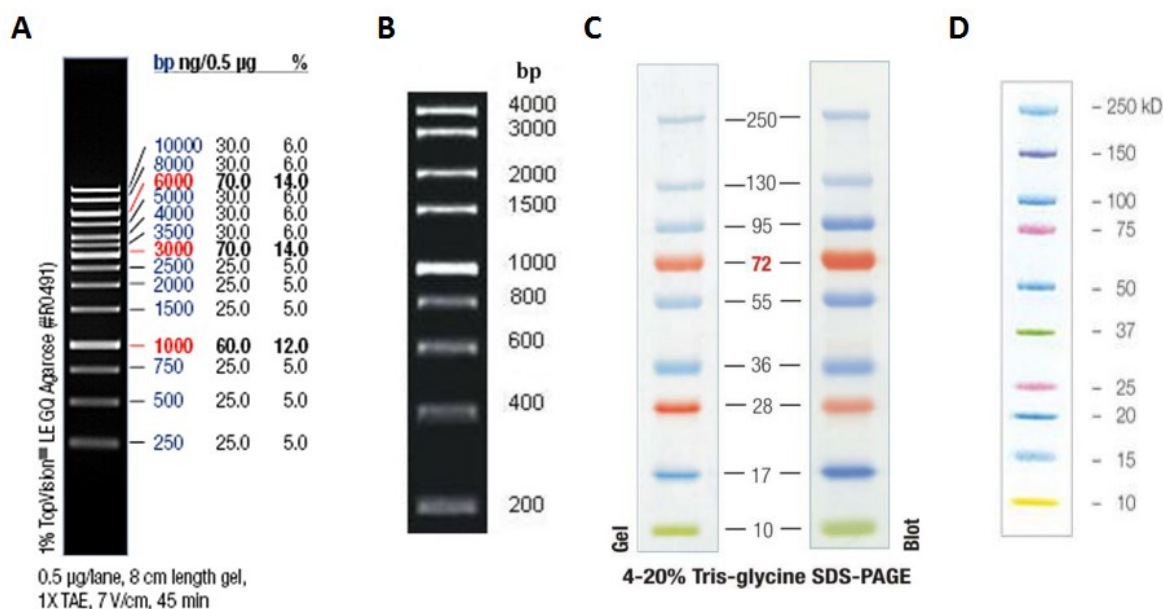
Média s antibiotikem

- GM nebo YD, pevná nebo tekutá s příslušným antibiotikem

0,002% (w/v)	edycin
0,02% (w/v)	geneticin
0,04% (w/v)	hygromycin B
0,01% (w/v)	nourseothricin

4.1.9 Standardy molekulových hmotností

Standardy použité v rámci této práce na elektroforetickou analýzu DNA, RNA a proteinů jsou uvedeny na obrázku 15.



Obrázek 15: Standard molekulových hmotností fragmentů DNA použitý pro elektroforetickou analýzu DNA: GeneRuler™ DNA Ladder, Thermo Scientific (A). Standard molekulových hmotností fragmentů RNA použitý pro elektroforetickou analýzu RNA: 1 kb RNA Ladder, Norgen Biotek (B). Standardy molekulových hmotností proteinů použité pro SDS-PAGE: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific (C) a Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, MBI Fermentas (D).

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Dest. a demi H₂O, roztoky, média, špičky k mikropipetám, mikrozkumavky, párátko a samet pro replica plating byly sterilizovány v autoklávu při tlaku 120 kPa po dobu 20 minut. Plastový materiál a roztoky používané pro práci s RNA byly sterilizovány dvakrát. Chemické sklo bylo sterilizováno suchým teplem při teplotě 180 °C po dobu 3 hodin. Skleněné kličky používané na

mikrobiologický výsev byly sterilizovány namočením v ethanolu a žháním v plameni. Plastové centrifugační zkumavky o objemu 10 ml a 50 ml byly sterilizovány parami kyseliny peroctové v uzavřeném polyethylenovém sáčku po dobu nejméně 24 hodin.

4.2.2 Práce s DNA

4.2.2.1 Mikroizolace genomové DNA pro PCR

Malé množství biomasy (stáří 1 den) bylo resuspendováno ve 40 μ l NaOH (20 mM). Směs byla promíchána (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a v tenkostěnných PCR zkumavkách denaturována 15 min při 95 °C (v cykléru PCR termocyklér BIOER GenePRO nebo PCR termocyklér MiniCycler™, MJ Research). Poté byla směs centrifugována 1 min při 2 000 g (mikrocentrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International) a supernatant obsahující DNA byl použit pro PCR reakce. DNA byla uchovávána při -20 °C. Genomová DNA v této kvalitě je vhodná pro ověřovací PCR reakce.

4.2.2.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) byla využita pro ověřování transformovaných kmenů a při přípravě transformačních kazet, vzorků na sekvenaci a sond pro northern blot. Použity byly PCR cykléry: gradientový PCR termocyklér BIOER XP, PCR termocyklér BIOER GenePRO a PCR termocyklér MiniCycler™, MJ Research. Složení reakční směsi a podmínky pro ověření transformace a přípravu vzorků na sekvenování jsou uvedeny v tabulce 5. Složení reakční směsi a podmínky pro přípravu transformačních kazet jsou uvedeny v tabulce 7 (kap. 4.2.3.3.1) a pro přípravu sond jsou uvedeny v tabulce 14 (kap. 4.2.6.4).

Tabulka 5: Složení reakční směsi a podmínky pro ověření transformace a přípravu vzorků na sekvenování. Primery jsou rozepsány v tabulkách 6, 9 a 10. Kroky denaturace dsDNA, nasedání primerů a syntéza se cyklicky opakovaly 35 \times . ¹Teplota nasedání primerů se lišila v závislosti na vlastnostech daných primerů. ²Teplota syntézy se lišila v závislosti na použitém PCR mixu. ³Doba syntézy se lišila v závislosti na délce amplifikované DNA (1 min/1 kbp).

PCR pro ověření transformace a přípravu vzorků na sekvenaci			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
templátová DNA	1,5 μ l	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 2-3 min
OneTaq®/PPP PCR Master Mix	5 μ l	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
primer F	1 μ l	nasedání primerů	50-70 °C ¹ 20 s
primer R	1 μ l	syntéza	68/72 °C ² ³
demi H ₂ O	3 μ l	poslední syntéza	68/72 °C ² 6 min
		ukončení reakce	4 °C ∞

4.2.2.3 Srážení DNA

PCR produkty určené na sekvenování (a některé transformační kazety) byly přesráženy pro přečištění a zakoncentrování DNA. Nejprve byl vzorek zředěn na poloviční koncentraci pomocí demi H₂O. Poté byl přidán 2,5 násobek objemu 96% EtOH a 1/10 objemu 3M NaAc. Směs byla ponechána přes noc při -20 °C. Poté byla centrifugována (19 800 g, 15 min, 4 °C; Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet byl resuspendován v původním objemu 80% EtOH

a směs byla znovu centrifugována (19 800 g, 10 min, 4 °C). Po odebrání supernatantu byl pelet obsahující DNA vysušen a následně byl resuspendován v malém množství demí H₂O. Koncentrace vzorku byla změřena pomocí mikrokapilárního spektrofotometru NANODROP 1000 (Thermo Scientific).

4.2.2.4 Elektroforetická analýza DNA

TBE pufr:

0,2 M	Tris
10 mM	EDTA
0,45 M	kys. boritá

Množství a kvalita PCR produktů byla určena pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu. Agaróza byla rozpuštěna v TBE pufru v množství potřebném pro přípravu 0,7% (w/v) gelu a rozvařena. Po ochlazení byl přidán roztok EtBr (1 µg/1 ml gelu) a po promíchání byl gel nalit do vaničky z plexiskla. Pro vytvoření jamek na vzorky byl ke kraji gelu zasazen hřeben. Po zatumnutí gelu byla vanička přenesena do elektroforetické nádoby s TBE puftrem. Do jamek byly nanесeny vzorky a standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix). V případě vzorků připravených pomocí LA DNA pol. mixu byl ke každému nanášenému vzorku přidán 1 µl 6× DNA Loading Dye pro obarvení. Elektroforetická soustava (OWL EASYCAST™ B1/B2, Bio-Rad) byla napojena ke zdroji stejnosměrného napětí (Power Station 300, Labnet International; 96 nebo 110 V, podle velikosti gelu) po dobu 1 h. Poté byl gel vyfotografován na transiluminátoru (Electronic Dual light™, Ultra Lum) pod UV světlem, které excituje EtBr barvicí DNA.

4.2.2.5 Sekvenování DNA

Templát (PCR produkt) byl připraven stejným způsobem, jako probíhaly PCR reakce pro ověření transformace (kap. 4.2.2.2). Použité dvojice primerů jsou uvedeny v tabulce 6. Produkt PCR byl před sekvenací přesrážen pomocí EtOH a NaAc a jeho koncentrace a čistota byla měřena mikrokapilárním spektrofotometrem NANODROP 1000 (Thermo Scientific). Reakce na sekvenaci byla namíchána v celkovém objemu 8 µl tak, aby koncentrace templátu byla 5-10 ng/100 bp. Součástí směsi byl 1 µl příslušného primeru. Sekvenaci prováděla Laboratoř sekvenace DNA, PŘF UK. Sekvence byly kontrolovány pomocí programů CLONE a Chromas Lite 2.1.

Tabulka 6: Dvojice primerů použitých na přípravu PCR produktů určených na sekvenaci.

Kmen	Primer F	Primer R
Ino1p-GFP, <i>opi1Δ</i> Ino1p-GFP	INO1 C GFP F	GFP 589 R INO1 D
Opi1p-GFP	GFP MID F OPI1 C OPI1 SF	KanMX R GFP END R GFP 89 R
GFP-Opi1p	GFP F OPI1 A OPI1 A OPI1 A	OPI1 B OPI1 B GFP 89 R GFP 589 R
TEF-INO1	INO1 A	KanMX R
<i>ino1Δ</i>	INO1 A	Hph R

4.2.3 Práce s kvasinkami

4.2.3.1 Skladování a kultivace kvasinkových kmenů

Kvasinkové kmeny byly uchovávány v mikrozkuřkách ve skladovacím médiu při -80 °C.

Pro práci s příslušným kmenem bylo přeneseno malé množství biomasy na pevné GM médium s edicinem a kultivováno 1-2 dny při teplotě 28 °C. Následně byla biomasa použita pro zaočkování kultury na média potřebná pro daný experiment. Kultury kvasinek byly pěstovány na pevných médiích v Petriho miskách v termostatu při 28 °C nebo v tekutých médiích v Erlenmeyerových baňkách na rotační třepačce (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) při 28 °C.

4.2.3.2 Stanovení počtu buněk a měření optické denzity (OD) kultury

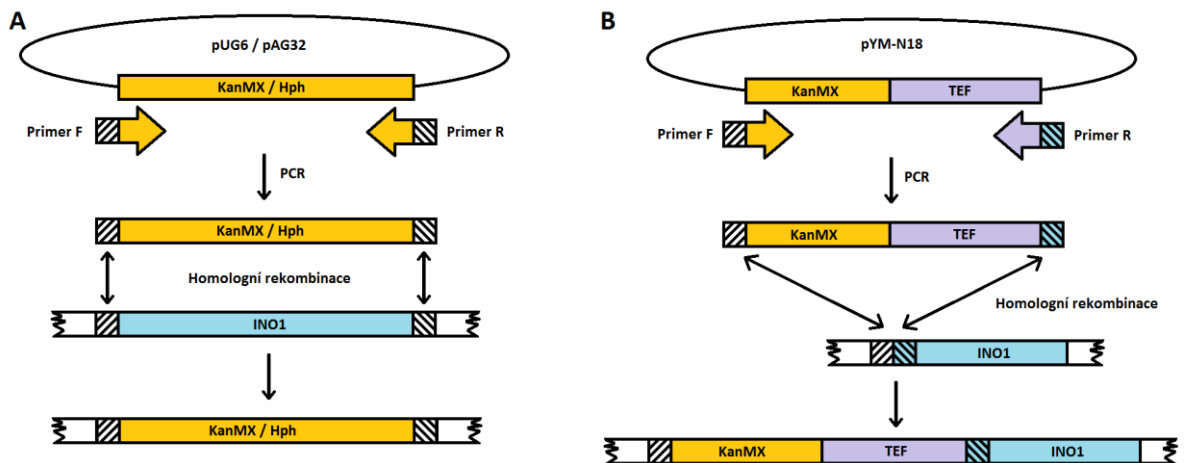
Počet buněk v buněčné suspenzi byl stanoven pomocí Bürkerovy počítací komůrky ve světelném mikroskopu (Meopta Praha) při zvětšení 10 × 20. Koncentrace buněčné suspenze byla měřena také pomocí spektrometru (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) při vlnové délce 600 nm. Optická denzita byla měřena v plastových kyvetách s optickou dráhou 1 cm. Pro OD v oblasti 0,2-0,5 platí, že hodnota 0,1 odpovídá přibližně 1×10^6 buněk/ml. Jako blank byla použita dest. voda.

4.2.3.3 Princip přípravy nových kmenů

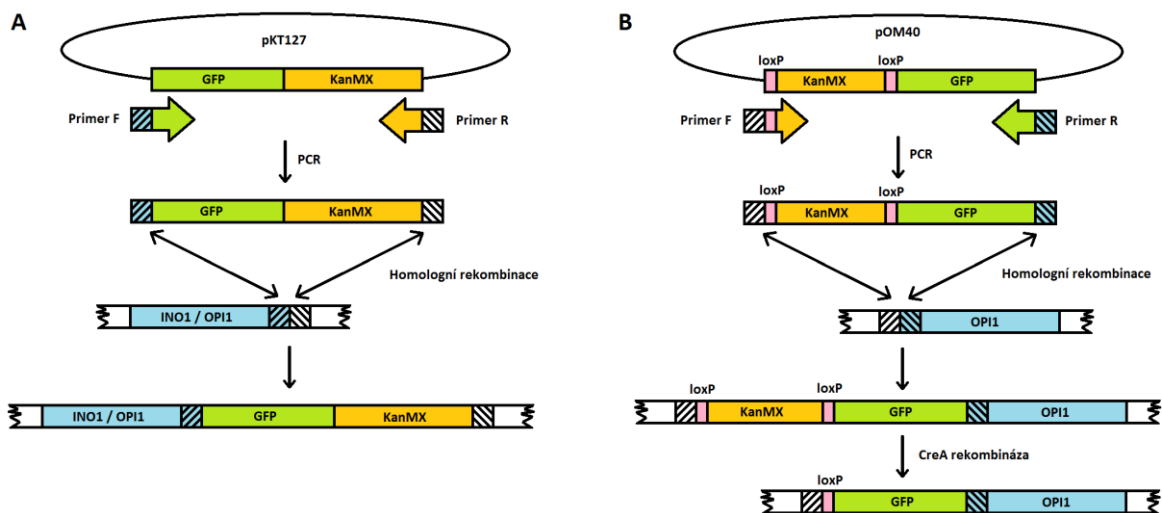
Příprava nových kmenů probíhala pomocí transformace LiAc/ssDNA/PEG metodou využívající vysoké účinnosti homologní rekombinace u kvasinek (Gietz & Woods, 2002).

Do buněk byla vložena transformační kazeta obsahující gen pro rezistenci k některému antibiotiku. Kromě přípravy delečního kmene kazeta obsahovala i gen GFP nebo promotor TEF. Na obou koncích obsahovala kazeta sekvence homologní k cílenému místu v genomu. Následně byly pomocí kultivace na médiu s příslušným antibiotikem vybrány klony, u kterých došlo k homologní rekombinaci a začlenění genu pro rezistenci do genomu. Zda byla kazeta vložena správně, bylo ověřeno pomocí PCR a sekvenace.

Princip přípravy jednotlivých kmenů je znázorněn na obrázcích 16 a 17.



Obrázek 16: Schéma přípravy delečního kmene *ino1Δ* (A) a kmene TEF-INO1 (B).



Obrázek 17: Schéma přípravy kmenů Ino1p-GFP, *opi1Δ* Ino1p-GFP, Opi1p-GFP (A) a kmene GFP-Opi1p (B).

4.2.3.3.1 Příprava transformačních kazet

Všechny transformační kazety byly připraveny pomocí PCR reakce. Do tenkostěnných PCR zkusavek byla namíchána reakční směs o celkovém objemu 100 μ l za použití LA DNA polymerázového mixu (použito pro amplifikaci delších úseků – transformační kazety pro značení pomocí GFP) nebo 50 μ l za použití PPP PCR Master Mixu. Amplifikace DNA probíhala za pomoci PCR cykléru (BIOER GenePRO nebo BIOER XP). Složení reakční směsi a podmínky reakce pro jednotlivé kazety jsou uvedeny v tabulce 7. Kvalita kazety byla poté ověřena DNA elektroforézou.

Tabulka 7: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro jednotlivé transformační kazety. Kroky denaturace dsDNA, nasedání primerů a syntéza se cyklicky opakovaly 35×.

N-koncové značení proteinu Ino1p pomocí GFP			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pKT127	2 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 3 min
LA DNA pol. mix	1 µl	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
LA pufr	10 µl	nasedání primerů	51,2-64,5 °C* 20 s
dNTP	5 µl	syntéza	68 °C 2 min 30 s
primer INO1 GFP F	3 µl	poslední syntéza	68 °C 5 min
primer INO1 GFP R	3 µl	ukončení reakce	4 °C ∞
DMSO	4 µl	*pro nalezení optimální teploty reakce probíhala za šesti různých teplot v rozmezí 51,2-64,5 °C	
25 mM MgCl ₂	10 µl		
demi H ₂ O	62 µl		
N-koncové značení proteinu Opi1p pomocí GFP			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pKT127	2 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 3 min
LA DNA pol. mix	1 µl	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
LA pufr	10 µl	nasedání primerů	62,7 °C 20 s
dNTP	5 µl	syntéza	68 °C 2 min 30 s
primer OPI1 GFP F	2 µl	poslední syntéza	68 °C 5 min
primer OPI1 GFP R	2 µl	ukončení reakce	4 °C ∞
DMSO	8 µl		
25 mM MgCl ₂	20 µl		
demi H ₂ O	50 µl		
C-koncové značení proteinu Opi1p pomocí GFP			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pOM40	1 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 3 min
LA DNA pol. mix	1 µl	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
LA pufr	10 µl	nasedání primerů	51-66,3 °C* 20 s
dNTP	5 µl	syntéza	68 °C 2 min 30 s
primer OPI1 NGFP F	10 µl	poslední syntéza	68 °C 5 min
primer OPI1 NGFP R	10 µl	ukončení reakce	4 °C ∞
DMSO	8 µl	*pro nalezení optimální teploty reakce probíhala za pěti různých teplot v rozmezí 51-66,3 °C	
25 mM MgCl ₂	10 µl		
demi H ₂ O	45 µl		
Delece první alely genu INO1			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pUG6	2 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 5 min
PPP PCR Master Mix	25 µl	denaturace dsDNA	94 °C 40 s
primer INO1 DEL F	5 µl	nasedání primerů	54 °C 45 s
primer INO1 DEL R	5 µl	syntéza	72 °C 1 min 40 s
demi H ₂ O	13 µl	poslední syntéza	72 °C 5 min
		ukončení reakce	4 °C ∞
Delece druhé alely genu INO1			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pAG32	1,25 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 2 min
PPP PCR Master Mix	25 µl	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
primer INO1 DEL F	1 µl	nasedání primerů	55 °C 20 s
primer INO1 DEL R	1 µl	syntéza	72 °C 1 min 30 s
demi H ₂ O	21,75 µl	poslední syntéza	72 °C 5 min
		ukončení reakce	4 °C ∞
Vložení promotoru TEF před gen INO1			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
plazmid pYM-N18	1 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 5 min
PPP PCR Master Mix	25 µl	denaturace dsDNA	94 °C 40 s
primer INO1 TEF F	5 µl	nasedání primerů	54 °C 45 s
primer INO1 TEF R	5 µl	syntéza	72 °C 1 min 30 s
demi H ₂ O	14 µl	poslední syntéza	72 °C 5 min
		ukončení reakce	4 °C ∞

4.2.3.3.2 Transformace buněk LiAc/ssDNA/PEG metodou

Transformace byla provedena podle (Gietz & Woods, 2002).

Z 1-2 denní kultury bylo odebráno množství biomasy odpovídající velikosti špendlíkové hlavičky. Buňky byly resuspendovány v 1 ml dest. vody, následně bylo 200 µl této suspenze přeneseno do 10 ml tekutého YD média s edicinem. Kultura byla inkubována na třepače (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) při 28 °C přes noc.

Druhý den byl 1 ml této kultury přenesen do 35 ml tekutého YD média s edicinem. Kultura byla inkubována na třepače při 28 °C přibližně 4 hodiny, čas byl určen tak, aby proběhla alespoň dvě buněčná dělení. Množství buněk bylo určeno na základě OD kultury změřené pomocí spektrometru (Novaspec Plus, Amersham Biosciences). Kultura byla centrifugována (3 000 g, 5 min, LT; Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet byl promyt v 35 ml dest. vody a znovu centrifugován stejným způsobem. Následně byl resuspendován v 1 ml dest. vody a krátce centrifugován (11 500 g, 30 s, LT; Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Poté byly buňky resuspendovány v takovém množství dest. vody, aby bylo dosaženo koncentrace 10⁹ buněk/ml. Z této suspenze bylo odebráno 100 µl. Po krátké centrifugaci (11 500 g, 30 s, LT) byl odebrán supernatant a k buňkám byla přidána transformační kazeta (v objemu 5-10 µl, podle koncentrace) a 350 µl transformační směsi (složení je uvedeno v tabulce 8).

Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (42 °C) po dobu 40 minut (ve vodní lázni Barnstead International, Lab-Line nebo v termobločku Torrey Pines Scientific). Směs byla centrifugována a pelet byl resuspendován v 1 ml tekutého YD média s edicinem. Kultura byla inkubována na třepače při 28 °C 3 hodiny. Následně byla směs přenesena na misky s pevným GM médiem a s příslušným antibiotikem pro selekci transformovaných buněk a kultivována při 28 °C.

Tabulka 8: Složení transformační směsi o celkovém objemu 350 µl (odpovídající jedné transformaci). ssDNA (Salmon Sperm ssDNA) byla před použitím denaturována 5 minut při 95 °C.

Složky	Objem v µl
1 M LiAc	36
ssDNA (10 mg/ml)	12,5
50% (w/v) PEG 3500	240
dest. voda	61,5
celkem	350

4.2.3.3.3 Ověření transformovaných kmenů s modifikací jedné alely

Z výsevu po transformaci byly po 3-7 dnech kultivace přeneseny narostlé kolonie na nové GM médium s příslušným antibiotikem a kultivovány 1-2 dny. Z těchto klonů byla izolována DNA a pomocí PCR a následné DNA elektroforézy bylo ověřeno správné vložení kazety. Použité primery pro jednotlivé kmeny jsou vypsány v tabulce 9. Pozitivní klony byly purifikovány výsevem na GM médium (přečištění od netransformovaných buněk) a kultivovány 3-5 dní. Poté byly narostlé kolonie přeneseny na GM médium s příslušným antibiotikem pro ověření

rezistence. Po 1-2 dnech kultivace bylo znovu ověřeno správné vložení kazety pomocí PCR a DNA elektroforézy. Pomocí primerů uvedených v tabulce 10 bylo také ověřeno, že došlo k transformaci pouze jedné alely. Správné vložení kazety bylo ověřeno i pomocí sekvenace. Pozitivní klony byly přeneseny do skladovacího média a uchovávány při -80 °C.

Tabulka 9: Primery použité u jednotlivých kmenů pro ověření správného vložení transformační kazety do genomu.

Kmen	Primer F	Primer R
Ino1p-GFP	INO1 C INO1 C	GFP 89 R GFP 589 R
Opi1p-GFP	OPI1 C OPI1 C KanMX F	GFP 89 R GFP 589 R OPI1 D
GFP-Opi1p (po 1. transformaci)	OPI1 A GFP F	KanMX R OPI1 B
GFP-Opi1p (po 2. transformaci)	GFP F OPI1 A	OPI1 B GFP 89 R
<i>ino1Δ</i> (po 1. transformaci)	INO1 A	KanMX R
<i>ino1Δ</i> (po 2. transformaci)	INO1 A	Hph R
TEF-INO1	INO1 A	KanMX R

Tabulka 10: Primery použité u jednotlivých kmenů pro ověření počtu transformovaných alel.

Kmen	Primer F	Primer R
Ino1p-GFP	INO1 C	INO1 D
Opi1p-GFP	OPI1 C	OPI1 D
GFP-Opi1p	OPI1 A	OPI1 B
<i>ino1Δ</i>	INO1 A	INO1 B
TEF-INO1	INO1 A	INO1 B

4.2.3.3.4 Ověření transformovaných kmenů s modifikací obou alel

V případě delečního kmene *ino1Δ* byla potřeba odstranit obě alely. Při první transformaci byla použita kazeta připravená pomocí plazmidu pUG6 obsahující gen pro rezistenci ke geneticinu. Transformace byla ověřena způsobem popsáným v kapitole 4.2.3.3.3. Kmen byl dále transformován za použití kazety připravené pomocí plazmidu pAG32 obsahující gen pro rezistenci k hygromycinu. Ověřování transformace a purifikace klonů probíhala podobně jako po 1. transformaci. Klony byly testovány na rezistenci k oběma antibiotikům a pomocí PCR bylo ověřeno správné vložení obou kazet (primery jsou uvedeny v tabulce 9). Pomocí primerů INO1 A a INO1 B bylo také ověřeno, že nezůstala zachována žádná původní alela. Správné vložení kazety bylo ověřeno i pomocí sekvenace. Pozitivní klony byly přeneseny do skladovacího média a uchovávány při -80 °C.

4.2.3.3.5 Odstranění genu pro rezistenci u kmene s N-koncově značeným proteinem

U kmene GFP-Opi1p byla potřeba odstranit gen pro rezistenci, aby byla zajištěna správná exprese fúzního proteinu. Za tímto účelem byl kmen transformován postupem popsáným v kapitole 4.2.3.3.2, pouze místo transformační kazety byl použit plazmid pSH66. Ten kóduje gen pro rezistenci k nourseothricinu a gen pro CreA rekombinázu pod kontrolou promotoru GAL1 umožňující řízenou expresi CreA rekombinázy na základě přítomnosti galaktózy v médiu. CreA

rekombináza pak vyštěpí z genomu sekvenci nacházející se mezi loxP místy. V tomto případě byl loxP místy ohraničen gen pro rezistenci ke geneticinu.

Po transformaci byly buňky vysety na pevné YD médium s antibiotiky NAT a G418 a kultivovány 2 dny. Následně byla biomasa přenesena do tekutého YD média se stejnými antibiotiky a kultivována přes noc. Druhý den byly buňky promyty v dest. vodě a přeneseny do tekutého média s galaktózou s antibiotikem NAT a kultivovány 3 hodiny. Poté byla kultura vyseta na pevné YD médium bez antibiotik. Po třech dnech kultivace byly narostlé kolonie obtisknuty pomocí sametu na pevné YD médium bez antibiotik a zároveň na YD médium s G418. Druhý den byly na základě negativní selekce vybrány klony, které díky působení CreA rekombinázy ztratily rezistenci ke G418. Následně byly přeneseny na pevné YD médium a zároveň i na YD médium s NAT. Po kultivaci přes noc byly opět na základě negativní selekce vybrány klony, které ztratily plazmid pSH66 a s ním i rezistenci k NAT. Vybrané klony byly otestovány pomocí PCR (primery jsou uvedeny v tabulkách 9 a 10) a vysety na pevné YD médium kvůli přečištění od netransformovaných buněk. Purifikované klony byly znovu ověřeny pomocí PCR a také pomocí sekvenace a uloženy ve skladovacím médiu při -80 °C.

4.2.4 Charakterizace připravených kmenů

4.2.4.1 Sledování morfologie kolonií

Morfologie kolonií (způsob a intenzita vrásnění) byla sledována na monokoloniích různého stáří a fotografována pomocí přístrojů: barevná kamera JENOPTIK Progress® MF^{cool}, objektiv Cosmocar, osvětlovací systém Kaiser RS1 a binokulární lupa Leica MZ 16 F, kamera Nikon Digital Sight DS-U1, osvětlovací systém Leica CLS 150X. Počet kolonií na misce a plocha kolonií byly stanoveny pomocí programu ColonyCounter nebo ImageJ.

4.2.4.2 Sledování schopnosti invazivního růstu do média

Barvicí roztok:

0,025% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
2,5% (v/v)	kys. octová
10% (v/v)	methanol

Některé kmeny netvoří kolonie pouze na povrchu pevného média, ale zarůstají také do agaru. Schopnost invazivního růstu byla sledována barvením misek, ze kterých byla předem odstraněna biomasa z povrchu média. Misky byly omyty dest. vodou, aby byly odstraněny zbytky biomasy na povrchu. Poté se nechal působit barvicí roztok po dobu 20 min při promíchávání na třepačce. Obarvené stopy byly fotografovány pomocí barevné kamery JENOPTIK Progress® MF^{cool} (objektiv Cosmocar, osvětlovací systém Kaiser RS1).

4.2.4.3 Sledování fluorescence kolonií

Fluorescence kolonií byla sledována na monokoloniích různého stáří a fotografována pomocí binokulární lupy Leica MZ 16 F, kamery Nikon Digital Sight DS-U1 a zdroje excitačního světla Leistungselektronik Jena ebq 100.

4.2.4.4 Spektrofluorometrické stanovení intenzity fluorescence

Intenzita fluorescence buněk u kmenů produkujících fúzní protein Ino1p-GFP byla měřena pomocí externí sondy spektrofluorometru FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon). Excitační světelný paprsek o vlnové délce 475 nm byl zaměřen na střed monokolonie či makrokolonie a emisní světlo bylo měřeno v rozsahu vlnové délky 499-531 nm.

Paralelně byla měřena i intenzita fluorescence rodičovských kmenů pro stanovení pozadí a případné autofluorescence. Tyto hodnoty byly následně odečteny od hodnot naměřených u kmenů produkujících fúzní protein Ino1p-GFP. Data byla zpracována pomocí programu Microsoft Office Excel.

4.2.4.5 Mikroskopické pozorování

Buňky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DMR při zvětšení 10 × 100 a fotografovány pomocí kamery JENOPTIK Progres® Mf^{cool}. Preparát byl nejprve vyfotografován ve viditelném světle při Nomarského kontrastu, pro zachycení fluorescence proteinu GFP byl použit filtr 513852 a excitační filtr 470/40 bez Nomarského kontrastu.

4.2.5 Western blot a imunodetekce

4.2.5.1 Sběr biomasy pro western blot analýzu

Biomasa byla setřena z povrchu pevného média pomocí kovové špachtle očištěné ethanolem. Buňky byly přeneseny do mikrokumavky, zváženy a ihned zamrazeny v tekutém dusíku. Poté byla biomasa uchovávána při -80 °C.

4.2.5.2 Izolace proteinů

MES pufr s inhibitory proteáz:

10 mM	MES pH 6,8
1/50 objemu	2× koncentrovaný PIC
8 mM	DTT
4 mM	PMSF
2 mM	AEBSF
0,5% (v/v)	NP40

Biomasa a buněčné lyzáty byly po celou dobu manipulace chlazeny na ledu. Biomasa byla resuspendována v MES pufru s inhibitory proteáz (300 µl pufru/100 mg biomasy) a přenesena do mikrozkušavek se skleněnými kuličkami (přibližně 200 µl kuliček). Buňky byly rozbíjeny pomocí homogenizátoru FASTPREP 5 × 20 s s dvouminutovými přestávkami na chlazení. Následně byla odebrána směs nad kuličkami a přenesena do nových mikrozkušavek a centrifugována (1 000 g, 5 min, 4 °C; Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Supernatant byl přenesen do mikrozkušavek, ze kterých bylo odebráno 50 µl na stanovení koncentrace proteinů, zbytek byl ihned zamražen v tekutém dusíku a uchováván při -80 °C.

4.2.5.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradforda pomocí spektrofotometru Novaspec Plus, Amersham Biosciences. K 800 µl ředěného vzorku bylo přidáno 200 µl Bradfordovo reagens, které se nechalo působit 10 min. Poté byla měřena absorbance v kyvetách s optickou dráhou 1 cm při vlnové délce 595 nm. Vzorek byl naředěn demi H₂O tak, aby se hodnoty absorbance pohybovaly v rozmezí 0,2-0,5. Jako blank bylo použito 800 µl demi H₂O s 200 µl Bradfordovo reagens. Jako standard bylo použito 800 µl BSA o koncentraci 5 µg/ml s 200 µl Bradfordovo reagens. Každý vzorek byl měřen nejméně 2×, hodnoty se nesměly lišit více než o 10 %.

4.2.5.4 Elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)

30% (w/v) akrylamid:

29% (w/v) akrylamid

1% (w/v) N, N'-metylen-bis-akrylamid

Separáční pufr (pH 8,8):

1,5 M Tris

0,4% (w/v) SDS

pH upraveno pomocí 1M HCl

Zaostřovací pufr (pH 6,8):

0,5 M Tris

0,4% (w/v) SDS

pH upraveno pomocí 1M HCl

SDS elektrodo  pufr:

0,05 M Tris (pH 8,3)

0,384 M glycin

0,1% (w/v) SDS

vzorkový denaturační pufr:

2,5 M	Tris (pH 6,8)
50% (v/v)	glycerol
0,02% (w/v)	BFM
10% (w/v)	SDS

Pro analýzu proteinů byla využita vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu probíhající v denaturačním prostředí (SDS-PAGE). Gely byly připraveny v aparatuře Bio-Rad. Skla byla očištěna pomocí demi H₂O a ethanolu a upevněna do stojanu. Mezi skla bylo nanášeno 5 ml separačního gelu (složení uvedeno v tabulce 11) a překryto izopropanolem (800 µl). Po zatuhnutí gelu byl izopropanol odmyt pomocí demi H₂O a prostor mezi skly byl doplněn zaostřovacím gelem (tab. 11), do něhož byl vložen hřeben pro vytvoření jamek na vzorky. Po zatuhnutí gelu byl hřeben vyjmut a jamky byly naplněny SDS elektrodoým pufrém. Dvojice gelů ve sklech byla umístěna do elektroforetické aparatury Bio-Rad. Mezi skla i okolo skel byl nalit SDS elektrodoým pufr o teplotě 4 °C.

Vzorky byly naředěny pomocí MES (10 mM, pH 6,8) na požadovanou koncentraci (obvykle 0,5 µg/µl), smíchány s dalšími složkami podle tabulky 12 a denaturovány 5 min při teplotě 95 °C. Po ochlazení na ledu byly nanášeny na gel. Zároveň s nimi byl nanášen i standard molekulových hmotností (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific nebo Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, MBI Fermentas).

Elektroforetická aparatura byla napojena na zdroj stejnosměrného proudu (nastaveno 50 mA konstantně, maximální napětí 250 V; ENDURO™, Labnet International) po dobu 1 h. Aparatura byla chlazená ledem.

Tabulka 11: Složení separačního a zaostřovacího gelu. Množství odpovídá objemu potřebnému na přípravu dvou gelů.

	separační gel (9%)	zaostřovací gel
30% akrylamid	3,6 ml	780 µl
separační pufr	3 ml	-
zaostřovací pufr	-	1,5 ml
TEMED	24 µl	24 µl
10% persíran amonný	30 µl	30 µl
demi H ₂ O	5,4 ml	3,66 ml

Tabulka 12: Příprava vzorků na SDS-PAGE. *Vzorky proteinů naředěné pomocí MES (10 mM, pH 6,8) na požadovanou koncentraci (obvykle 0,5 µg/µl).

vzorek*	30 µl
vzorkový denaturační pufr	12,5 µl
0,4 M DTT	5 µl
2× koncentrovaný PIC	1 µl
0,1 M PMSF	1 µl

4.2.5.5 Western blot

TGM (western blot) pufr:

0,025 M Tris
0,192 M glycin
15% (v/v) methanol

Barvicí roztok:

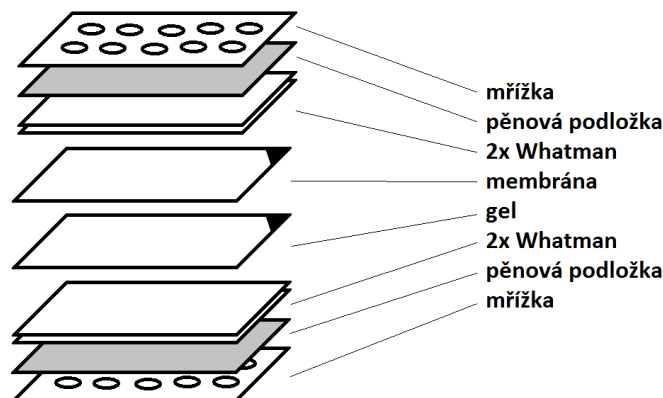
40% (v/v) methanol
10% (v/v) kys. octová
0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Odbarvovací roztok:

40% (v/v) methanol
10% (v/v) kys. octová

Membrána (PVDF membrána, Immobilon-P, Millipore) byla aktivována 5 min methanolem, poté omyta demi H₂O a namočena do TGM pufru. Filtrační papíry Whatman byly upraveny na požadovanou velikost a spolu s pěnovými podložkami také namočeny do TGM pufru. Na mřížce držáku (Bio-Rad) byly na sebe poskládány všechny potřebné vrstvy tak, jak je schematicky znázorněno na obrázku 18. Gel po SDS-PAGE byl vyjmut ze skel, byl odstraněn zaostřovací gel a jeden roh pro snadné určení orientace gelu. Během skládání bylo vše namáčené do TGM pufru a pomocí skleněné zkumavky byly vyháněny bubliny. Držák byl uzavřen tak, aby všechny vrstvy byly pevně drženy u sebe a spolu s chladicí vaničkou vložen do aparatury pro přenos. Ta byla naplněna TGM pufrem o teplotě 4 °C a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí (nastaveno 120 V konstantně, maximální proud 250 mA; ENDURO™, Labnet International) po dobu 1,5 h. Aparatura byla chlazená ledem a pufr uvnitř byl míchán pomocí magnetického míchadla.

Po přenosu byla z držáku vyjmuta membrána a byl odstřižen standard. Membrána byla vložena na 20 s do barvicího roztoku a poté byla omyta v odbarvovacím roztoku. Po zaschnutí byla vyfotografována s přiloženým ustříhnutým standardem.



Obrázek 18: Schéma sestavy všech vrstev na western blot.

4.2.5.6 Imunodetekce

PBS pufr (pH 7,4) + Tween 20:

10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,15 M NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

pH upraveno pomocí 0,2 M H_3PO_4 (pro přípravu 1% kaseinu nebylo pH upravováno)

Detekční substráty:

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

Membrána s proteiny byla na třepačce 3 min odbarvována v methanolu, poté omývána 3 min v demi H_2O a 5 min v PBS pufru. Poté byla blokována v 1% kaseinu (rozpuštěném v PBS pufru) po dobu 20 min. Následně byla membrána inkubována 60 min s protilátkou (GFP (B-2) HRP – myší monoklonální protilátka IgG_{2a} , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Santa Cruz Biotechnology) naředěnou v poměru 1 : 1 500 (při použití substrátu Pico) nebo 1 : 15 000 (při použití substrátu Femto). Protilátka byla rozpuštěna v PBS pufru s 1% kaseinem. Po inkubaci s protilátkou byla membrána omyta v PBS pufru po dobu 2×5 min.

Membrána byla 5 min inkubována ve fólii s detekčním substrátem a poté přenesena do vyvíjecí kazety. Ve fotokomoře byl k membráně přiložen film, podle síly signálu byla expozice 30 s-20 h. Po vyvolání byl film vyfotografován.

4.2.6 Northern blot a hybridizace

4.2.6.1 Izolace RNA horkým fenolem

TES pufr:

10 mM Tris (pH 7,5)

10 mM EDTA

0,5% (w/v) SDS

Biomasa byla sbírána stejným způsobem jako pro western blot analýzu (kap. 4.2.5.1). Do mikrozkuavek bylo nasypáno 200 μ l skleněných kuliček a k nim bylo přidáno 400 μ l fenol : chloroformu (5 : 1, pH = 4,3-4,7). 50 mg biomasy bylo resuspendováno na ledu ve 400 μ l TES pufru a přidáno ke skleněným kuličkám. Směs byla inkubována 30 min ve vodní lázni (Barnstead International, Lab-Line) při 65 °C. Každých 5 min byla míchána po dobu 30 s (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Poté byla směs inkubována 30 min při -80 °C. Po rozmrznutí byly mikrozkuavky centrifugovány (20 000 g, 15 min, LT; Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Do nových mikrozkuavek byla odebrána horní vodná fáze a k ní bylo přidáno 400 μ l fenol : chloroformu (5 : 1, pH = 4,3-4,7). Směs byla 3 \times 30 s míchána (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a centrifugována (20 000 g, 15 min, LT). K vodné fázi bylo přidáno 300 μ l chloroformu, směs byla míchána 3 \times 20 s a centrifugována (20 000 g, 2 min, LT). Vodná fáze byla odebrána a přesrážena přidáním dvojnásobku objemu EtOH (96% v/v) a 1/10 objemu 3 M NaAc. Vzorky byly inkubovány minimálně 60 min při -20 °C.

Před použitím byly vzorky centrifugovány (20 000 g, 30 min, 4 °C), pelet byl promyt v 80% (v/v) EtOH a znovu centrifugován (20 000 g, 10 min, 4 °C). Po vyschnutí byl pelet rozpuštěn v demi H₂O (40 μ l/50 mg původní biomasy), koncentrace a kvalita RNA byly ověřeny pomocí mikrokapilárního spektrofotometru NANODROP 1000 (Thermo Scientific) a elektroforetické analýzy RNA.

4.2.6.2 RNA elektroforéza

TBE pufr:

0,2 M Tris

10 mM EDTA

0,45 M kys. boritá

2× nanášecí pufr

66,6%	formamid
23,4%	formaldehyd
1/10	15× MOPS pufr
0,36 mM	BFM
0,13 mM	EtBr
0,1 mM	EDTA

15× MOPS pufr (pH 7,0)

6,27% (w/v)	MOPS
1,02% (w/v)	NaAc
0,57% (w/v)	EDTA

pH upraveno pomocí 10 M NaOH

Kvalita RNA byla určena pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu. Agaróza (v kvalitě pro RNA) byla rozpuštěna v TBE pufru v množství potřebném pro přípravu 1,5% (w/v) gelu a rozvařena. Aparatura na elektroforézu (OWL EASYCAST™ B1/B2, Bio-Rad) byla omyta 4× ředěným H₂O₂. Gel byl nalit do vaničky z plexiskla a pro vytvoření jamek na vzorky byl ke kraji gelu zasazen hřeben. Po zatuhnutí gelu byla vanička přenesena do elektroforetické nádoby s TBE pufrém.

Vzorky byly naředěny pomocí demi H₂O na koncentraci 2 µg/µl a smíchány se stejným objemem nanášecího pufru. Pomocí cykléru (PCR termocyklér BIOER GenePRO) byly denaturovány 10 min při teplotě 80 °C. Poté byly chlazeny na ledu až do nanesení na gel.

Do jamek byly naneseny vzorky a standard (1 kb RNA Ladder, Norgen Biotek). Elektroforetická soustava byla napojena ke zdroji stejnosměrného napětí (5 V/cm; ENDURO™, Labnet International) po dobu 90 min. Poté byl gel vyfotografován na transiluminátoru (Electronic Dual light™, Ultra Lum) pod UV světlem, které excituje EtBr barvící RNA.

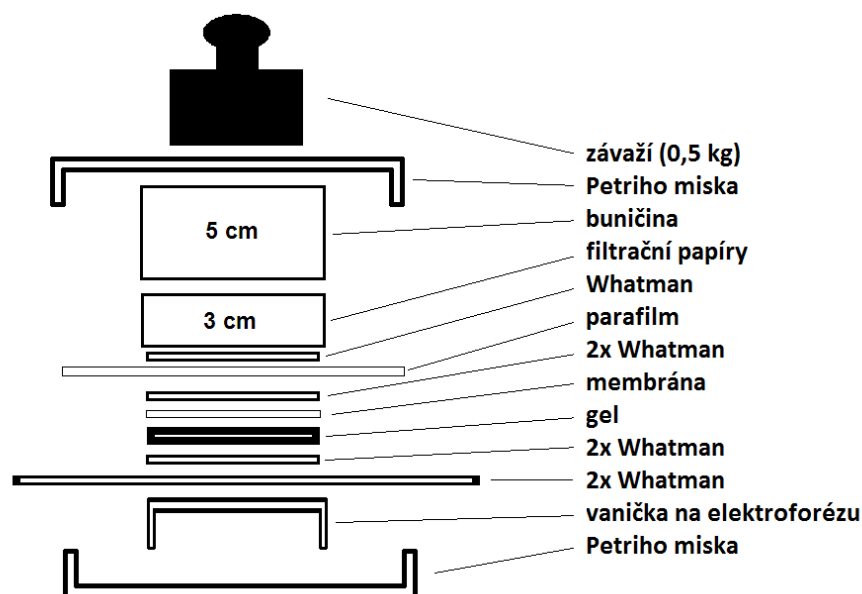
4.2.6.3 Northern blot

5× SSC

0,75 M	NaCl
85 mM	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2 H ₂ O

Vanička z plexiskla a všechny skleněné Petriho misky byly omyty 4× ředěným H₂O₂. Agarózový gel po vyfotografování, filtrační papíry Whatman a membrána (Hybond N+, GE Biosciences) byly namočený na 15 min do 5× SSC. V Petriho misce (o průměru 20 cm) byla

poskládána soustava pro přenos RNA z gelu na membránu (schematicky znázorněno na obrázku 19). Do misky byl nalit 5× SSC + 10 mM NaOH a spodní Whatmany byly přes vaničku přehnuty tak, aby mohl pufr vzlínat. Parafilm byl položen pouze na okraje sloupce. Průběžně při sestavování byly vyháněny bubliny pomocí skleněné zkumavky. Soustava byla ponechána přes noc, poté byla membrána vyfotografována na transiluminátoru (Electronic Dual light™, Ultra Lum) pod UV světlem. Následně byla inkubována 5 min v 1 M NH₄Ac a potom 5 min v 2× SSC. Vlhká membrána byla vystavena UV záření pro zafixování RNA na membráně (120 000 μJ/cm², UV Stratalinker 1 800, Stratagene).



Obrázek 19: Schéma sestavy všech vrstev pro northern blot.

4.2.6.4 Příprava radioaktivně značené DNA sondy

Jako templát pro přípravu sondy sloužil PCR produkt připravený pomocí primerů uvedených v tabulce 13. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 14. DNA byla přesrážena, jak je uvedeno v kapitole 4.2.2.3, a po změření koncentrace podle potřeby naředěna.

Pro radioaktivní značení byl použit Random Primer DNA Labeling Kit (Takara). K 50-80 ng templátu v celkovém objemu 12 μl byly přidány 2 μl náhodných primerů. Směs byla denaturována 3 min při teplotě 95 °C a poté ochlazená na ledu. K této směsi bylo přidáno 2,5 μl H₂O, 2,5 μl 10× pufru, 2,5 μl dNTP, 1 μl Klenowova fragmentu (enzymová aktivita 5 U/μl) a 2,5 μl radioaktivně značeného dCTP (370 MBq/ml, specifická aktivita ≥ 111 TBq). Reakční směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Poté byly přidány 2 μl 0,5 M EDTA a 25 μl H₂O, vše bylo promícháno a přeneseno na kolonku připravenou podle návodu (NucAway™ Spin Columns, Invitrogen) pro přečištění od zbylých radioaktivních dCTP. Směs byla centrifugována (2 min, 1 100 g; Hettich Mikro 20, Hettich Zentrifugen) a promytá sonda byla přenesena do nové mikrozkušavky a v ochranném obalu uchovávána při -20 °C.

Těsně před použitím byla sonda denaturována 3 min při 100 °C a pak ochlazena na ledu.

Tabulka 13: Seznam primerů použitých na přípravu templátů pro radioaktivní značení sond s příslušnou teplotou pro jejich nasedání na DNA při PCR reakci.

Primery	Teplota (°C)
FAS2 SF – FAS2 SR	63,4
FLO11 SF – FLO11 SR	55,5
INO1 SF – INO1 SR	59,4
OPI1 SF – OPI1 SR	64,3
OPI3 SF – OPI3 SR	50,9
RPL3 SF – RPL3 SR	50,9
TPI1 SF – TPI1 SR	59,4

Tabulka 14: Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce pro přípravu templátů pro radioaktivní značení sond.

PCR pro ověření transformace a přípravu vzorků na sekvenaci			
Složení reakční směsi		Podmínky PCR reakce	
templátová DNA	3 µl	počáteční denaturace dsDNA	94 °C 2 min
PPP PCR Master Mix	15 µl	denaturace dsDNA	94 °C 30 s
primer F	3 µl (FLO11 2 µl)	nasedání primerů	tab. 13 30 s
primer R	3 µl (FLO11 2 µl)	syntéza	72 °C 1 min 30 s
demi H ₂ O	9 µl	poslední syntéza	72 °C 6 min
		ukončení reakce	4 °C ∞

4.2.6.5 Hybridizace sondy s RNA a detekce signálu

0,5 M fosfátový pufr

0,235 M Na₂HPO₄

0,265 M NaH₂PO₄

Prehybridizační pufr

0,45 M fosfátový pufr

1% (w/v) BSA

1 mM EDTA

7% (w/v) SDS

Promývací roztok W1

40 mM fosfátový pufr

0,5% (w/v) BSA

1 mM EDTA

5% (w/v) SDS

Promývací roztok W2

80 mM fosfátový pufr

1 mM EDTA

1% (w/v) SDS

Membrána se zafixovanou RNA byla vložena do hybridizačního válce (Labnet) s 20-30 ml prehybridizačního pufru (65 °C) a inkubována 1-2 h při 65 °C při pozvolném promíchávání v hybridizačním inkubátoru (Labnet ProBlot). Hybridizační pufr byl připraven smícháním denaturované radioaktivní sondy s 20-30 ml prehybridizačního pufru (65 °C), s hybridizačním pufrům byla membrána inkubována při 65 °C přes noc.

Druhý den byl hybridizační pufr uschován v centrifugační zkumavce při -20 °C pro případné další použití. Membrána byla omyta 2× pomocí 50 ml promývacího roztoku W1 (65 °C) po dobu 10 min v hybridizačním inkubátoru při 65 °C. Poté byla stejným způsobem omyta promývacím roztokem W2.

Membrána byla vložena ve fólii do vyvíjecí kazety, k ní byl přiložen film a po dobu expozice (1 h-5 dní) byla kazeta uložena v -80 °C. Po vyvolání byl film vyfotografován.

V některých případech byla membrána po detekci signálu omyta v 50 ml 0,5% (w/v) SDS při 65 °C po dobu 60 min a poté hybridizována s jinou sondou (velikost cílených mRNA se lišila nejméně o 400 b).

4.2.7 Statistické metody

Data získaná pomocí spektrofotometru a údaje o ploše kolonií vypočítané pomocí programu ImageJ (Colony Counter) byly zpracovány pomocí statistické analýzy. Nejprve byla testována normalita dat (Shapiro-Wilk test)(Shapiro & Wilk, 1965). V případě že normalita byla potvrzena, byla otestována i stabilita rozptylu (Levene's test)(Levene, 1961). Tím byly splněny předpoklady pro využití One-Way Anova testu pro analýzu rozptylu (Howell, 2002). V případě, že data neměla normální rozložení, byl pro analýzu rozptylu využit Kruskal-Wallis test (Kruskal & Wallis, 1952). Vzhledem k povaze dat byl zvolen test One-Way Anova pro data ze spektrofotometru a Kruskal-Wallis test pro údaje o ploše kolonií. Všechny testy měly nastavenou kritickou hladinu statistické významnosti na 0,05. Na statistickou analýzu byl použit program R (verze 3.3.3).

4.2.8 Software

Práce se sekvencemi a tvorba primerů:

Clone Manager 3.11

Chromas Lite 2.1

MEGA 7.0.18

Zpracování dat a obrazu:

NIS-Elements AR 3.1

ImageJ 1.50i

ACDSee 17

MS Excel 2010

Colony Counter (Schier a Kovář, 2013)

Statistické zpracování dat:

R 3.3.3

Databáze:

Saccharomyces Genome Database (SGD) – www.yeastgenome.org

National Center for Biotechnology Information (NCBI) – www.ncbi.nlm.nih.gov

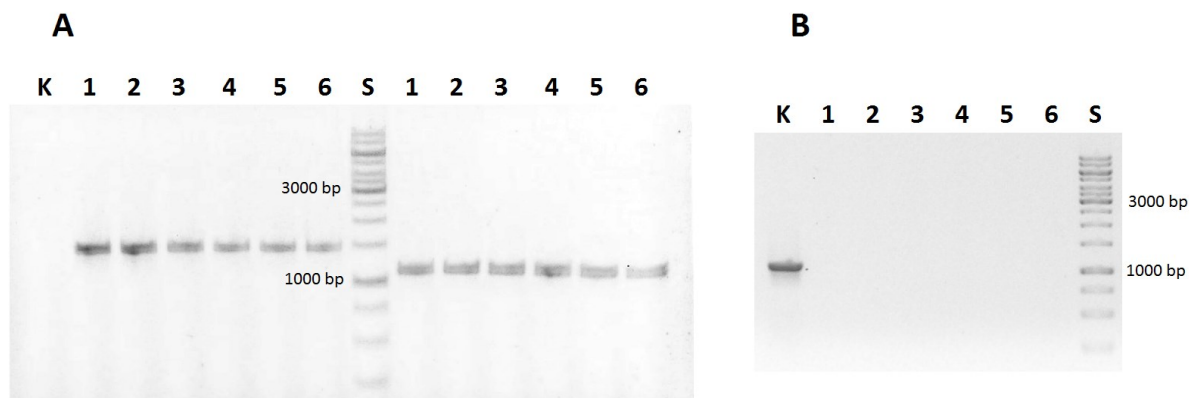
5 Výsledky

5.1 Příprava kmenů

Cíl: Připravit kmeny potřebné pro analýzu metabolismu fosfolipidů.

Všechny připravené kmeny byly odvozeny od přírodního kmene *S. cerevisiae* PORT. Byl připraven kmen s delecí genu *INO1*, kmen s expresí genu *INO1* pod kontrolou promotoru TEF a kmeny exprimující fúzní proteiny s GFP (Ino1p-GFP, Opi1p-GFP, GFP-Opi1p). Schéma přípravy konstruktů je znázorněno na obr. 16 a 17 (kap. 4.2.3.3). Seznam použitých plazmidů je uveden v kapitole 4.1.3, seznam použitých primerů v kapitole 4.1.4. Podrobný postup transformace a následné selekce transformovaných kmenů je popsán v kapitole 4.2.3.3. Kromě kmene *ino1Δ* byla transformována vždy pouze jedna alela. Všechny transformované kmeny byly ověřeny pomocí PCR (kap. 4.2.2.2) a sekvenace (kap. 4.2.2.5). Příklady výsledků ověřování jsou uvedeny na obrázcích 20-24.

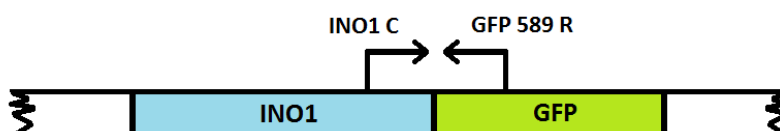
Při přípravě kmene *ino1Δ* bylo potřeba odstranit obě alely, protože rodičovský kmen je diploidní. Pro každou alelu byla vytvořena deleční kazeta pomocí jiného plazmidu (pUG6 a pAG32) a na základě homologní rekombinace byly alely postupně odstraněny ve dvou po sobě jdoucích transformacích. Pomocí PCR bylo ověřeno, že nezůstala zachována žádná původní alela (obr. 20).



Obrázek 20: Ověření transformace (delece genu *INO1*) pomocí PCR a elektroforetické analýzy produktů. A: vlevo od standardu reakce na ověření vložení kazety s rezistencí k hygromycinu, vpravo od standardu reakce na ověření vložení kazety s rezistencí ke kanamycinu. B: Reakce ověřující, že v genomu nezbyla žádná nenatransformovaná alela. K – kontrola, S – standard, 1-6 – různé klony izolované po purifikaci.

Kromě delece genu *INO1* nás zajímal také vliv nadměrné exprese tohoto genu. Původní promotor genu byl nahrazen silným konstitutivním promotorem TEF, který pochází z vláknité houby *Ashbya gossypii*. Je promotorem genu *TEF* kódujícího translační elongační faktor 1α (Steiner & Philippsen, 1994). Transformační kazeta byla připravena pomocí plazmidu pYM-N18.

Při přípravě kmenů exprimujících fúzní protein Ino1p-GFP byla transformační kazeta připravena pomocí plazmidu pKT127. Transformovány byly dva kmeny: kmen PORT a kmen PORT *opi1Δ*, u kterého byla odstraněna rezistence ke kanamycinu (již dříve připravený RNDr. Michaelou Schierovou, Ph.D.). Kódující sekvence pro zelený fluorescenční protein GFP byla vložena za kódující sekvenci genu *INO1*. Pomocí sekvenace bylo ověřeno, že nedošlo k posunu čtecí fáze (obr. 20-24). Výsledkem je produkce fúzního proteinu Ino1p-GFP, kde je protein GFP připojen na C-konec Ino1p.



Obrázek 21: Schéma znázorňující umístění primerů pro amplifikaci úseku na sekvenaci pro ověření správného vložení transformační kazety u kmene Ino1p-GFP.

```

                2280      2290      2300      2310      2320
INO1           ATAACCGGATTTCCATTACAATGTTTGCGAAGATTCTTTACTGGCTACG
                .....
INO1-GFP       ATAACCGGATTTCCATTACAATGTTTGCGAAGATTCTTTACTGGCTACG
                20          30          40          50          60

                2330      2340      2350      2360      2370      2380
INO1           CCCTTGATCATCGATCTTTTAGTCATGACTGAGTTTTGTACAAGAGTGTCTATAAGAAG
                .....
INO1-GFP       CCCTTGATCATCGATCTTTTAGTCATGACTGAGTTTTGTACAAGAGTGTCTATAAGAAG
                70          80          90          100         110         120

                2390      2400      2410      2420      2430      2440
INO1           GTGGACCCAGTTAAAGAAGATGCTGGCAAATTCGAGAACTTTTATCCAGTTTAAACCTTC
                .....
INO1-GFP       GTGGACCCAGTTAAAGAAGATGCTGGCAAATTTGAGAACTTTTATCCAGTTTAAACCTTC
                130         140         150         160         170         180

                2450      2460      2470      2480      2490      2500
INO1           TTGAGTTACTGGTTAAAAGCTCCATTAACAAGACCAGGATTTACCCGGTGAATGGCTTA
                .....
INO1-GFP       TTGAGTTACTGGTTAAAAGCTCCATTAACAAGACCAGGATTTACCCGGTGAATGGCTTA
                190         200         210         220         230         240

                2510      2520      2530      2540      2550      2560
INO1           AACCAAGCAAAGAACC GCCTTAGAAAATTTTTTAAGATTGTTGATTGGATTGCCTTCTCAA
                .....
INO1-GFP       AACCAAGCAAAGAACC GCCTTAGAAAATTTTTTAAGATTGTTGATTGGATTGCCTTCTCAA
                250         260         270         280         290         300

                2570      2580      2590      2600      2610      2620
INO1           AACGAACTAAGATTCGAAGAGAGATTGTTGTAATCTCATTTCACGACTCTCTTTTTCTT
                .....
INO1-GFP       AACGAACTAAGATTCGAAGAGAGATTGTTGGGTG-----ACGGTGCTGGTTTAATT
                310         320         330         340         350         360

                2630      2640      2650      2660      2670      2680
INO1           TTTCCCCGCCTACCTATAAAAAACAAGACATTCACCATTATCCTATTATCCC----TTCCA
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
INO1-GFP       AACATGTCTAAAGGTGAAGAATTA-----TTCAC-----TGGTGTGTCCCAATTTGGT
                370         380         390         400         410

```

Obrázek 22: Porovnání sekvencí pro ověření správného vložení transformační kazety za gen *INO1*. INO1-GFP je sekvence mezi primery INO1 C a GFP 589 R u kmene Ino1p-GFP. Od sekvence genu *INO1* se liší v jedné bázi (červeně vyznačeno). Modrá oblast odpovídá sekvenci na plasmidu pKT 127 těsně před kódující sekvencí pro GFP, která je znázorněna zeleně.

```

                10          20          30          40          50          60
pKT127   GGTGACGGTGCTGGTTTAATTAACATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTC
         .....
INO1-GFP GGTGACGGTGCTGGTTTAATTAACATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTC
      340      350      360      370      380      390

                70          80          90          100         110         120
pKT127   CCAATTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAA
         .....
INO1-GFP CCAATTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAA
      400      410      420      430      440      450

                130         140         150         160         170         180
pKT127   GGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTTACTACTGGTAAA
         .....
INO1-GFP GGTGAAGGTGATGCTGCTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTTACTACTGGTAAA
      460      470      480      490      500      510

                190         200         210         220         230         240
pKT127   TTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTTCT
         .....
INO1-GFP TTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTTCTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTTCT
      520      530      540      550      560      570

                250         260         270         280         290         300
pKT127   AGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTAT
         .....
INO1-GFP AGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTAT
      580      590      600      610      620      630

                310         320         330         340         350         360
pKT127   GTTCAAGAAAGAACTATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTC
         .....
INO1-GFP GTTCAAGAAAGAACTATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTC
      640      650      660      670      680      690

                370         380         390         400
pKT127   AAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAA
         .....
INO1-GFP AAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAA

```

Obrázek 23: Porovnání sekvencí pro ověření správného vložení transformační kazety za gen *INO1*. INO1-GFP je sekvence mezi primery INO1 C a GFP 589 R u kmene *Ino1p-GFP*. Od sekvence plazmidu pKT127 se liší v dvou bázích (červeně vyznačeno). Modrá oblast odpovídá sekvenci na plazmidu pKT 127 těsně před kódující sekvencí pro GFP.

INO1-GFP

```

NRI SIHNVCEDSL LATPLIIDLL VMTEFCTRVV YKKVDPVKED AGKFENFYVPV
LTFLSYWLKA PLTRPGFHPV NGLNKQRTAL ENFLRLLIGL PSQNELRFEE RLLGDGAGLI
NMSKGEELFT GVVPILEVEL GDVNGHKFSV SGEGEGDAAY GKLTCLKFICT TGKLPVPWPPT
LVTSLTYGVQ CFSRYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELK

```

INO1

```

MTEDNIAPIT SVKVVTDKCT YKDNELLTKY SYENAVVTKT ASGRFDVTPPT VQDYVFKLDDL
KKPEKLGIML IGLGGNNGST LVA SVLANKH NVEFQTKGV KQPNYFGSMT QCSTLKLIGD
AEGNDVYAPF NSLLPMVSPN DFVVSVDIN NADLYEAMQR SQVLEYDLQQ RLKAKMSLVK
PLPSIYYPDF IAANQDERAN NCINLDEKGN VTTRGKWHL QRIRRDIQNF KEENALDKVI
VLWTANTERY VEVSPGVNDT MENLLQSIKN DHEEIAPSTI FAAAASILEGV PYINGSPQNT
FVPGVLQLAE HEGTFIAGDD LKSGQTKLKS VLAQFLVDAG IKPVSIASYN HLGNNDDGYNL
SAPKQFRSKE ISKSSVIDDI IASNDILYND KLGKKVDHCI VIKYMKPVG D SKVAMDEYYS
ELMLGGHNRI SIHNVCEDSL LATPLIIDLL VMTEFCTRVV YKKVDPVKED AGKFENFYVPV
LTFLSYWLKA PLTRPGFHPV NGLNKQRTAL ENFLRLLIGL PSQNELRFEE RLL*

```

GFP

```

MSKGEELFT GVVPILEVEL GDVNGHKFSV SGEGEGDATY GKLTCLKFICT TGKLPVPWPPT
LVTSLTYGVQ CFSRYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELK...

```

Obrázek 24: INO1-GFP je aminokyselinová sekvence odpovídající DNA sekvenci mezi primery INO1 C a GFP 589 R u kmene Ino1p-GFP. Hnědá barvy vyznačuje část shodnou se sekvencí proteinu Ino1p. Bodová mutace v DNA sekvenci INO-GFP nezpůsobila změnu aminokyseliny. Modrá oblast odpovídá sekvenci na plazmidu pKT 127 těsně před kódující sekvencí pro GFP. Zeleně je vyznačená shodná oblast s proteinem GFP. 2 bodové mutace způsobily změnu aminokyseliny. Funkce proteinu GFP však byla ověřena pomocí fluorescenční mikroskopie.

Dále byl připraven kmen s hybridním genem *OPI1-GFP*. Postup byl stejný jako u přípravy kmenů exprimujících Ino1p-GFP. Přestože byl kmen ověřen pomocí PCR a sekvenace, nepodařilo se detekovat signál pomocí fluorescenčního mikroskopu ani pomocí imunodetekce. Pro případ, že by C-koncová fúze proteinu Opi1p s GFP byla důvodem nefunkční exprese tohoto fúzního proteinu, byl připraven i kmen, kde je Opi1p značen pomocí GFP na N-konci. Nejprve byla transformována kazeta připravená pomocí plazmidu pOM40. Poté byly pozitivní buňky inkubovány s plazmidem pSH66, který obsahuje gen pro CreA rekombinázu. Její aktivita způsobila odstranění genu pro rezistenci z oblasti před genem pro fúzní protein GFP-Opi1p. Poté byl kmen ověřen pomocí PCR a sekvenace. Přestože transformace proběhla v pořádku, nebyl ani u tohoto kmene detekován žádný signál pomocí fluorescenčního mikroskopu.

5.2 Vliv zdroje uhlíku, selenanu a kys. 2-bromooktanové na morfologii kolonií a produkci Ino1p-GFP

Cíle:

- Zjistit, jaký je vztah mezi morfologií kolonie a hladinou Ino1p-GFP.
- Zjistit, zda se hladina Ino1p-GFP mění v přítomnosti selenanu nebo kys. 2-bromooktanové.
- Zjistit, jak se liší hladina Ino1p-GFP u rodičovského kmene a kmene s delecí genu *OPI1*.
- Zjistit, zda absence Ino1p nebo jeho zvýšená produkce ovlivňuje morfologii kolonií nebo reakci kmenů na přítomnost selenanu či kys. 2-bromooktanové.

Připravené kmeny byly zkoumány za různých podmínek, které mohou ovlivnit morfologii kolonií a expresi genu *INO1*. Zkoumány byly především vlivy různých zdrojů uhlíku, přítomnosti selenanu nebo inhibitoru kys. 2-bromooktanové (BOA) a jejich kombinace. Výsledky pozorování nám pomohou porozumět dějům, které propojují metabolismus fosfolipidů a tvorbu morfologie kolonií. V následujícím textu jsou média popisována zkratkami uvedenými v tabulce 15.

Tabulka 15: Složení a zkratky použitých médií. Koncentrace inhibitoru kys. 2-bromooktanové je uvedena u jednotlivých experimentů.

zkratka média	zdroj uhlíku	
YD	2% (w/v) glukóza	
YD01	0,1% (w/v) glukóza	
GM	3% (v/v) glycerol	
YD-Se	2% (w/v) glukóza	0,05 mM Na ₂ SeO ₄
YDi	2% (w/v) glukóza	kys. 2-bromooktanová
YD-Sei	2% (w/v) glukóza	0,05 mM Na ₂ SeO ₄ kys. 2-bromooktanová
GM-Se	3% (v/v) glycerol	0,05 mM Na ₂ SeO ₄
GMi	3% (v/v) glycerol	kys. 2-bromooktanová
GM-Sei	3% (v/v) glycerol	0,05 mM Na ₂ SeO ₄ kys. 2-bromooktanová

5.2.1 Kmeny PORT, Ino1p-GFP, *opi1Δ* a *opi1Δ*, Ino1p-GFP

5.2.1.1 Morfologie kolonií a invazivní růst na různých zdrojích uhlíku

Zkoumanými zdroji uhlíku byly 2% (w/v) a 0,1% (w/v) glukóza a 3% (v/v) glycerol. Zatímco kvasinky rostoucí na 0,1% glukóze či 3% glycerolu získávají energii především respirací, při vysoké koncentraci glukózy (2%) kvasinky fermentují a aktivují katabolickou represi (utlumení metabolických drah pro zpracování jiných zdrojů uhlíku, represe mitochondriálních funkcí)(Polakis *et al.*, 1965; Nevoigt & Stahl, 1997; Gancedo, 1998). Zdroj uhlíku také souvisí

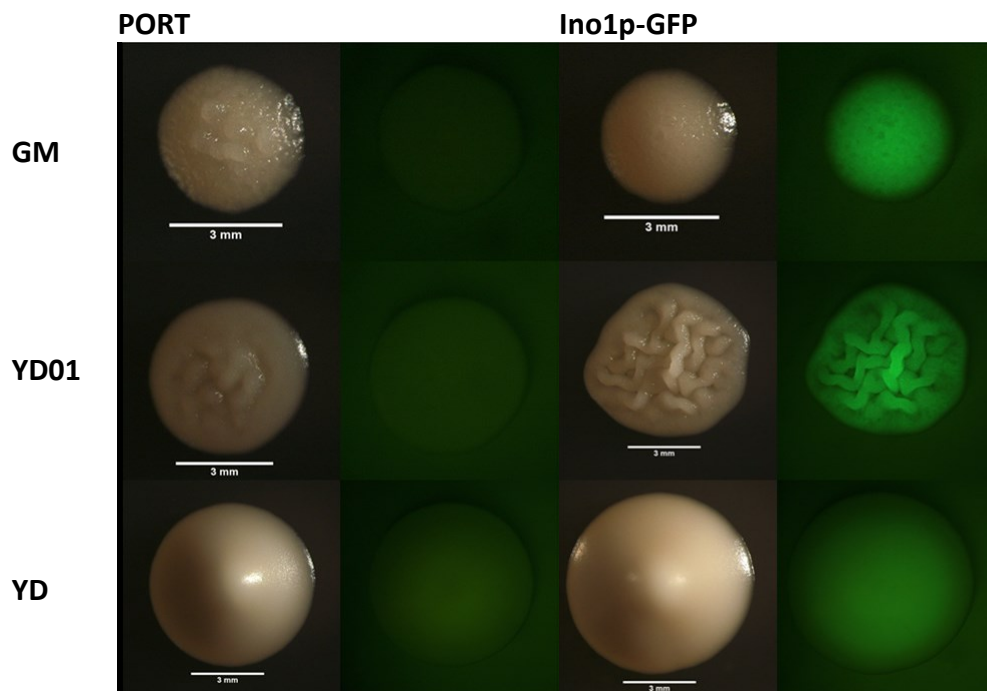
s morfologií kolonií. Glukóza negativně ovlivňuje expresi genu *FLO11*, který je významný pro morfologii kolonie (obr.3, kap. 2.2.3).

Kmen PORT vytváří na GM médiu mírně vrásčité kolonie (obr. 25), zatímco na YD médiu tvoří kolonie zcela hladké. Na YD01 médiu tvoří kolonie vrásčité s hladkým okrajem. Kmen *opi1Δ* tvoří na všech médiích kolonie hladké (obr. 26) a také menší než kmen PORT.

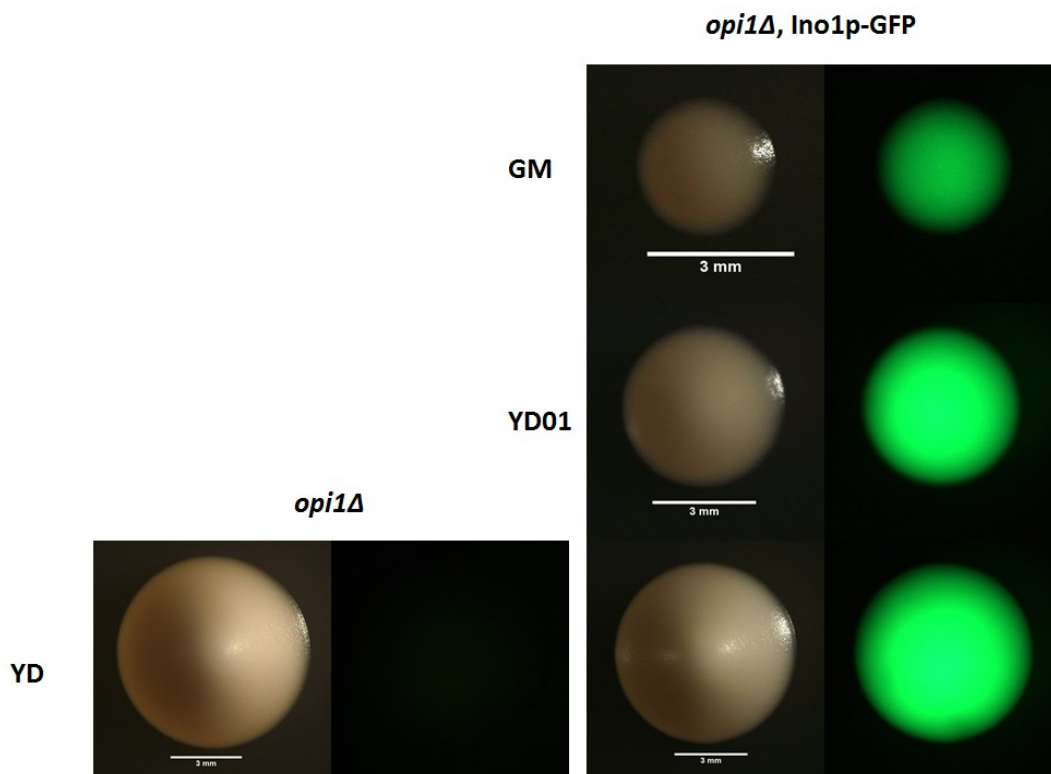
Po čtyřech dnech růstu se kolonie na různých médiích viditelně liší velikostí, u obou kmenů stejným způsobem. Největší jsou kolonie rostoucí na YD, kolonie rostoucí na YD01 dosahují průměrně 70 % jejich velikosti a kolonie rostoucí na GM 40 % jejich velikosti.

Invazivní růst byl sledován u 4-5 dní starých kolonií (nevyobrazeno). Buňky kmene PORT zarůstají do GM média po celé ploše rovnoměrně, pouze ve středu kolonie je výraznější bod. Na YD01 médiu vytváří stopu v podobě bodu, ze kterého vychází střapaté paprsky. Do YD média zarůstají buňky rovnoměrně po celé ploše kolonie uprostřed s kořenem zarůstajícím do větší hloubky, při pohledu shora ve tvaru písmene I nebo Y. Buňky kmene *opi1Δ* nezarůstají do GM a YD01 médií vůbec, na YD médiu tvoří velmi slabou stopu.

Kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ*, Ino1p-GFP se od svých rodičovských kmenů morfologicky nijak neliší (rozdíly viditelné na obrázku 25 jsou způsobeny odlišnou hustotou výsevu), produkce fúzního proteinu tedy neovlivňuje morfologii kolonií.



Obrázek 25: Monokolonie (4 dny staré) kmene PORT a kmene Ino1p-GFP rostoucí na médiích GM, YD01 a YD. GFP: expozice 0,2 s. Měřítka: 3 mm.

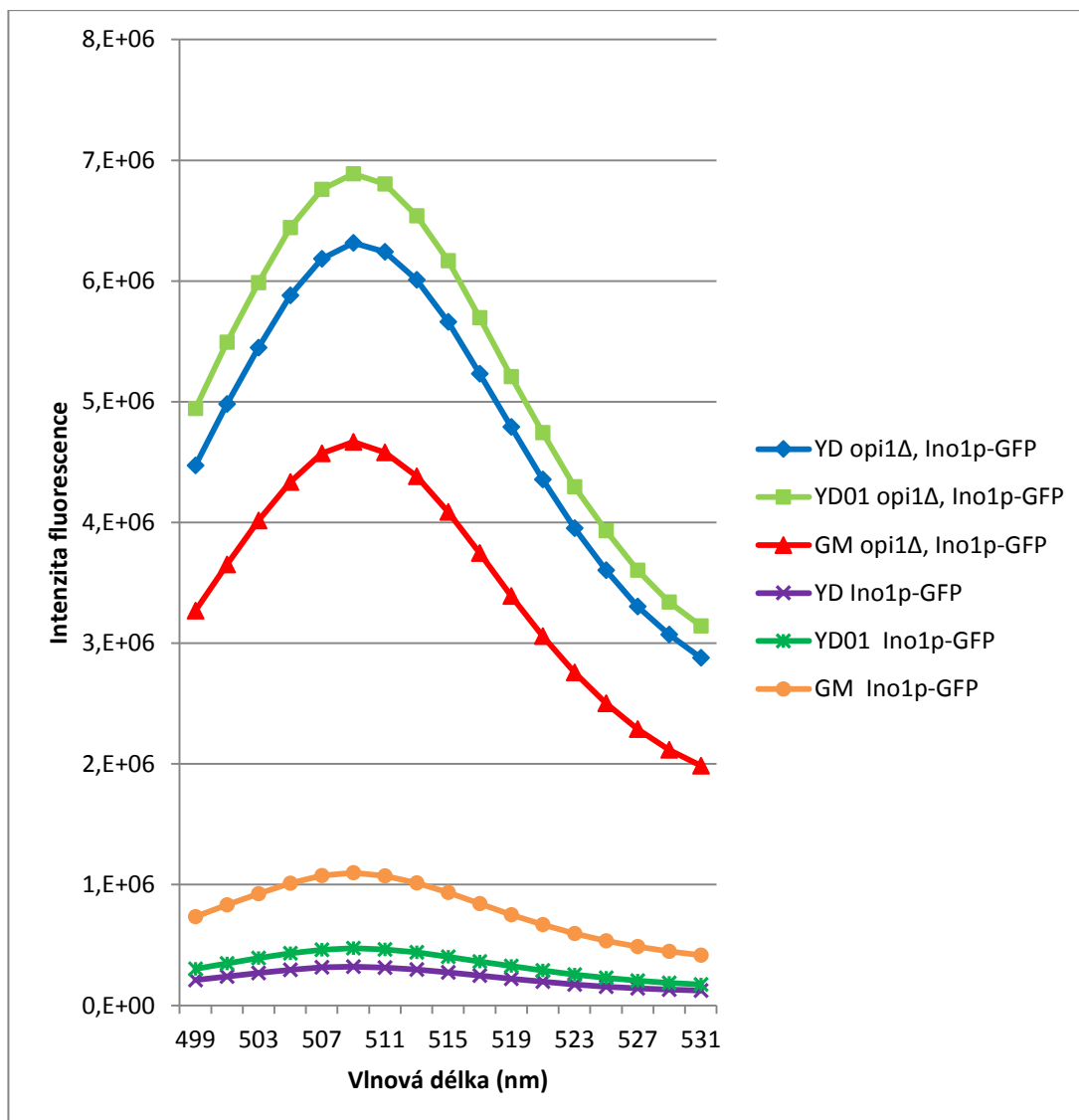


Obrázek 26: Monokolonie (4 dny staré) kmene *opi1Δ* a kmene *opi1Δ, Ino1p-GFP* rostoucí na médiích GM, YD01 a YD. GFP: expozice 0,03 s. Měřítko: 3 mm.

5.2.1.2 Analýza produkce Ino1p-GFP

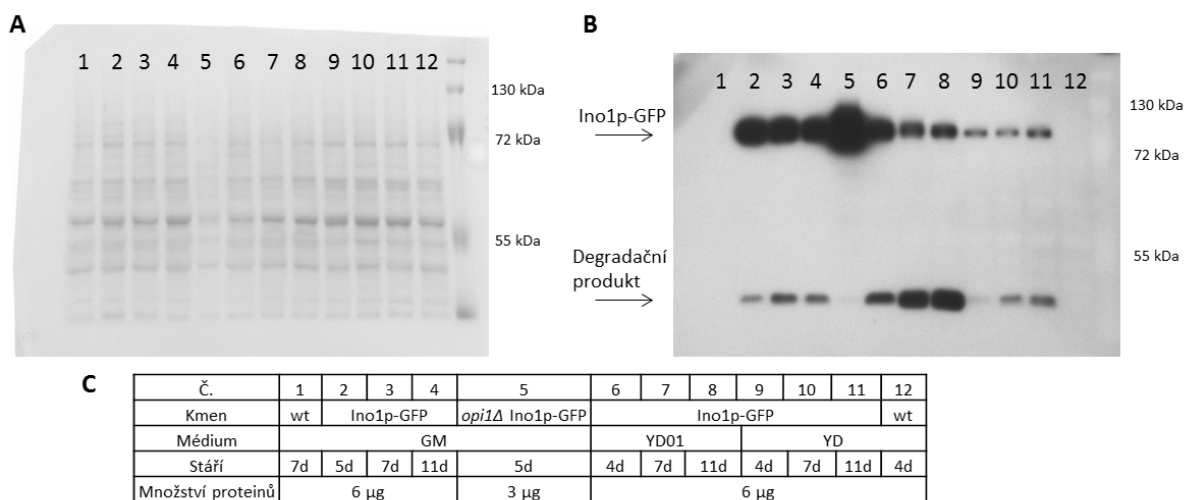
Množství proteinu Ino1p bylo sledováno pomocí fúze s fluorescenčním proteinem GFP. Sledována byla přímo fluorescence proteinu pomocí fluorescenční lupy a spektrofluorometru nebo bylo množství proteinu stanoveno pomocí imunodetekce.

Fluorescence kolonií je zachycena na obrázcích 25 a 26. Intenzita fluorescence kolonií změřená pomocí spektrofluorometru FluoroMax-P se řádově liší mezi kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ, Ino1p-GFP* (obr. 27). Pomocí Shapiro-Wilkova testu normálního rozdělení a Levenova testu shody rozptylu byla ověřena platnost podmínek pro analýzu rozptylu typu – One-Way Anova (normální rozdělení se shodnými rozptyly). Z výsledku testu vyplývá, že mezi kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ, Ino1p-GFP* je signifikantní rozdíl. Delece genu *OPI1* způsobuje nadměrnou expresi genu *INO1*. Fluorescenční signál vzorků kmene Ino1p-GFP se mezi sebou výrazně neliší. Signifikantní rozdíl je mezi koloniemi kmene *opi1Δ, Ino1p-GFP* rostoucími na GM médiu a koloniemi téhož kmene rostoucími na YD nebo YD01.

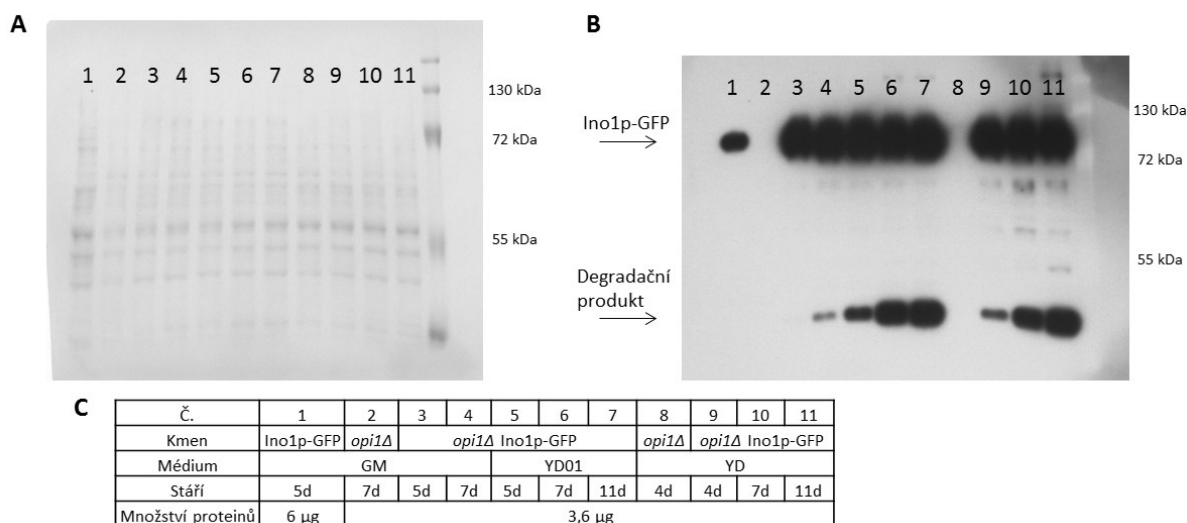


Obrázek 27: Graf znázorňující intenzitu fluorescence kmenů *Ino1p-GFP* a *opi1Δ*, *Ino1p-GFP* rostoucích na médiích YD, YD01 a GM. Fluorescence byla měřena u monoklonií po šesti dnech kultivace, od každého kmene celkem 4 kolonie ze dvou různých misek. Od průměrných hodnot fluorescence byly odečteny průměrné hodnoty naměřené u rodičovských kmenů (bez GFP).

Imunodetekce potvrdila řádový rozdíl v množství proteinu *Ino1p* mezi kmeny *Ino1p-GFP* a *opi1Δ*, *Ino1p-GFP* (obr. 28 vzorky 2 a 5, obr. 29 vzorky 1 a 3). Dále byl u kmene *Ino1p-GFP* detekován rozdíl v množství proteinu *Ino1p* při růstu na různých zdrojích uhlíku (obr. 28). Nejvíce proteinu obsahovaly buňky rostoucí na GM, méně buňky rostoucí na YD01 a nejméně buňky rostoucí na YD. Mezi buňkami různého stáří (5, 7 a 11 dní) nebyly nalezeny výrazné rozdíly na žádném z testovaných zdrojů uhlíku. U kmene *opi1Δ*, *Ino1p-GFP* byl signál stejně silný na všech testovaných zdrojích uhlíku i u buněk různého stáří (5, 7 a 11 dní; obr. 29).



Obrázek 28: A – Membrána po western blotu s obarvenými proteiny. B – Film zachycující signál Ino1p-GFP u jednotlivých vzorků. C – Popis vzorků na membráně a filmu (wt – kmen PORT).



Obrázek 29: A – Membrána po western blotu s obarvenými proteiny. B – Film zachycující signál Ino1p-GFP u jednotlivých vzorků. C – Popis vzorků na membráně a filmu.

5.2.1.3 Vliv kys. 2-bromooktanové a selenanu na morfologii kolonií

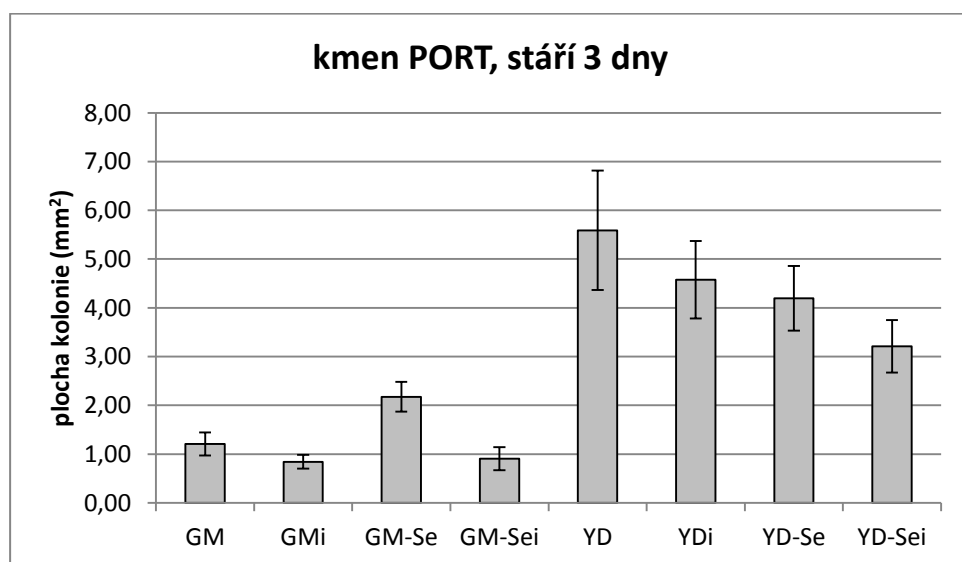
Dále byl sledován vliv inhibitoru metabolismu fosfolipidů kys. 2-bromooktanové (BOA, koncentrace 0,7 mM) a selenanu. Sledována byla morfologie kolonií rostoucích na médiích YD i GM. Na obrázcích 36-40 je vyobrazen vývoj kolonií kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. Morfologie kmene Ino1p-GFP je stejná jako u rodičovského kmene na všech použitých médiích.

Na GM médiu jsou kolonie prvních 5 dní lehce vrásčité a poté se struktura ztrácí a kolonie jsou spíše hladké. V přítomnosti selenanu jsou kolonie větší a velmi vrásčité po celou dobu růstu. BOA růst zpomaluje v přítomnosti selenanu i bez něj a kolonie mají méně výrazné vrásnění.

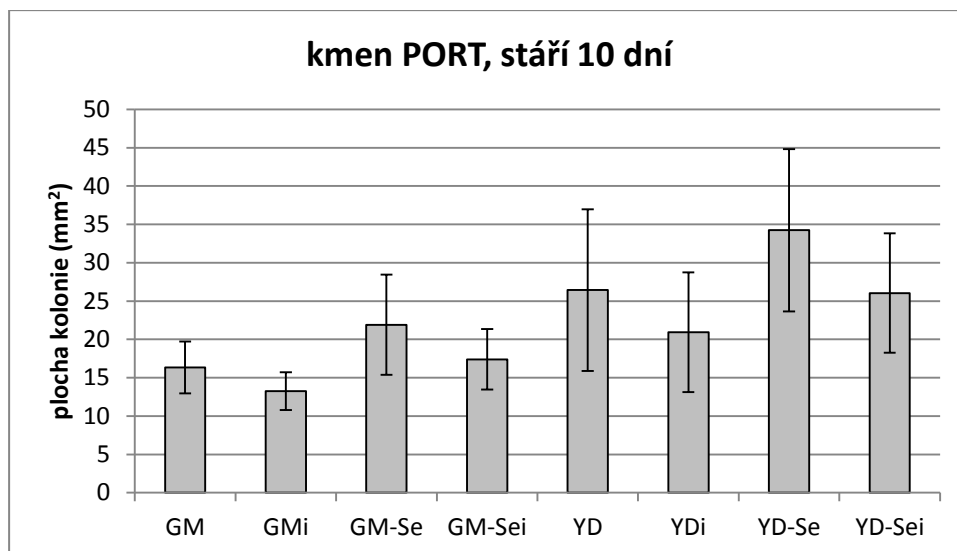
Na YD médiích kolonie dosahují větších rozměrů než na GM a kolonie jsou hladké. U 10 dní starých kolonií na YD je vidět na okrajích kolonie jemná chloupková struktura. Kolonie

v přítomnosti selenanu jsou v prvních dnech menší, ale poté rychle přirůstají a kolem 7. dne už jsou větší než při růstu bez selenanu. Ten způsobuje také vroubkovaný povrch kolonií. BOA i na YD zpomaluje růst, na morfologii má pouze slabý vliv, chybí chloupková struktura a v přítomnosti selenanu na morfologii vliv nemá.

Velikosti kolonií na obrázcích neodpovídají průměrné velikosti kolonie, týká se především kolonií rostoucích na YD od 5. dne. Pro focení jsem vybírala záměrně menší kolonie, abych zachytila morfologii celé kolonie při stejném nastavení binokulární lupy. Skutečná plocha kolonie kmene PORT je znázorněna v grafech na obrázcích 30 a 31. Jedná se o průměrnou plochu všech kolonií nejméně ze čtyř misek. Protože data neměla normální rozdělení, použila jsem Kruskal-Wallis test. Zda jsou rozdíly ve velikosti kolonií na různých médiích statisticky významné, je uvedeno v tabulce 16. Z tabulky je zřejmé, že rozdíly v ploše kolonií způsobené vlivem složení média znázorněné pomocí grafů (obr. 30 a 31) jsou signifikantní. Pouze u 3 dny starých kolonií není významný rozdíl mezi koloniemi rostoucími na GMi a GM-Sei a u 10 dní starých kolonií už nejsou významné rozdíly v ploše kolonií rostoucích na médiích s glukózou.



Obrázek 30: Průměrná plocha kolonií kmene PORT (stáří 3 dny) na různých médiích. Plocha kolonie byla určena z průměrné plochy kolonií na nejméně 4 miskách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



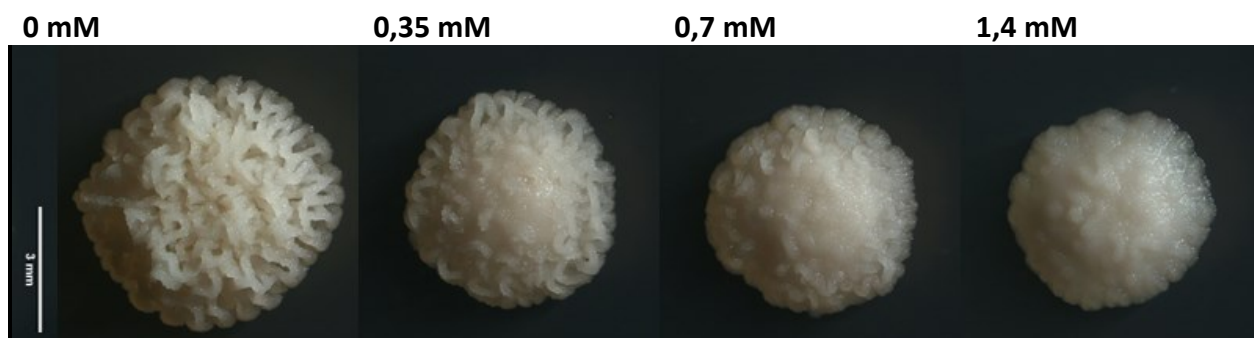
Obrázek 31: Průměrná plocha kolonií kmene PORT (stáří 10 dní) na různých médiích. Plocha kolonie byla určena z průměrné plochy kolonií na nejméně 4 miskách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Tabulka 16: Výsledky statistické analýzy rozdílů (Kruskall-Wallis test) u 3 dny a 10 dní starých kolonií rostoucích na různých médiích. Kritická hladina statistické významnosti: 0,05. Znaménko + znázorňuje statisticky významný rozdíl mezi uvedenými médii, znaménko - znamená nevýznamný rozdíl.

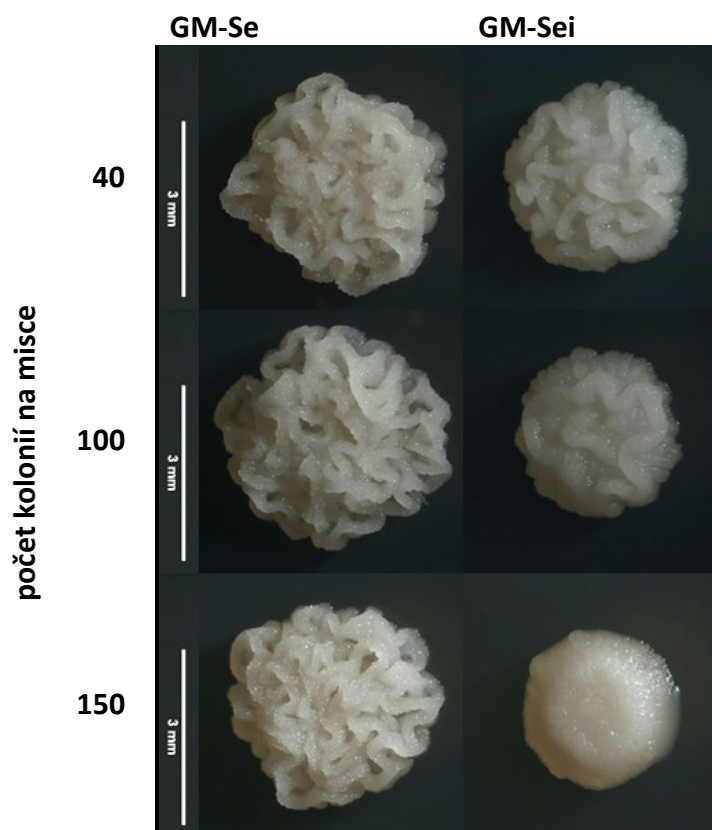
média	kolonie staré 3 dny	kolonie staré 10 dní
GM/GM-Se	+	+
GMi/GM-Sei	-	+
GM/GMi	+	+
GM-Se/GM-Sei	+	+
YD/YD-Se	+	+
YDi/YD-Sei	+	-
YD/YDi	+	-
YD-Se/YD-Sei	+	-
GM/YD	+	+
GMi/YDi	+	+
GM-Se/YD-Se	+	+
GM-Sei/YD-Sei	+	+

5.2.1.4 Faktory ovlivňující působení kys. 2-bromooktanové

Intenzita působení BOA je závislá pravděpodobně na mnoha faktorech. Dva nejdůležitější pro mé experimenty jsou koncentrace BOA v médiu a hustota kolonií na misce. Čím je koncentrace BOA v médiu vyšší, tím je ztráta morfologie výraznější (obr. 32). Při nižší hustotě výsevu je morfologie kolonií ovlivněna přítomností BOA (1,4 mM) méně než při vyšší hustotě (obr. 33).



Obrázek 32: Vliv koncentrace BOA na morfologii kolonií (stáří 9 dní, médium GM-Se). Měřítka 3 mm.



Obrázek 33: Vliv počtu kolonií na působení BOA (1,4 mM). Čísla vlevo odpovídají přibližnému počtu kolonií na misce. Měřítka 3 mm.

5.2.1.5 Vliv selenanu a kys. 2-bromooktanové na invazivní růst

Invazivní růst byl sledován po odstranění biomasy z povrchu agarů a obarvení buněk, které zarostly dovnitř. Během 20 min barvení pronikla barva pouze těsně pod povrch agarů a kořínky zarůstající hlouběji zůstaly neobarveny. Stopy byly fotografovány zespoda misky, aby byly kořínky dobře vidět (obr. 41).

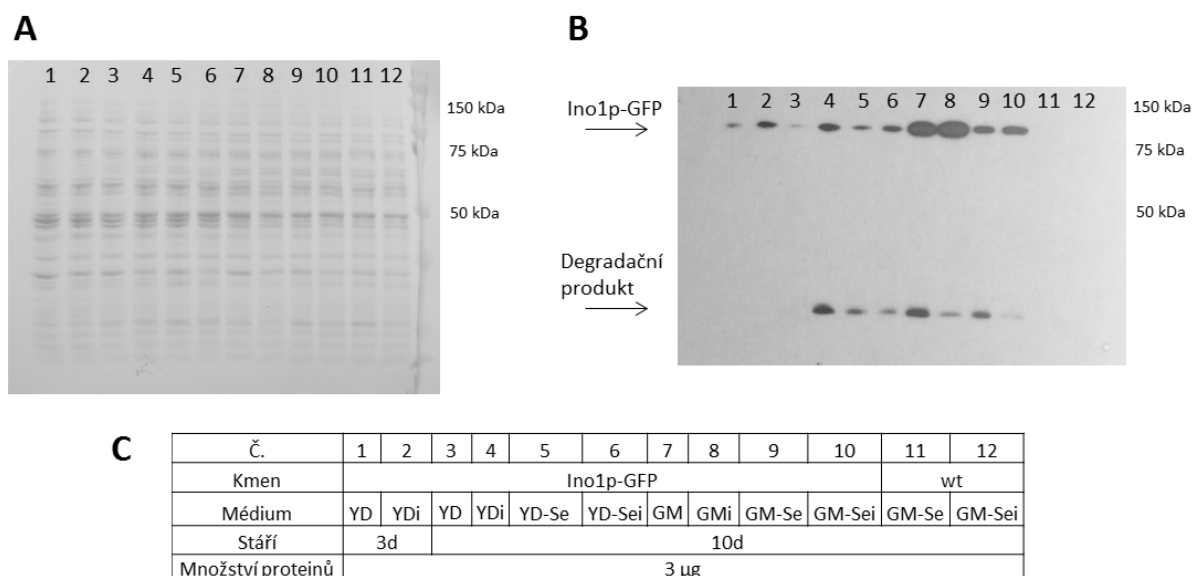
Na GM zarůstají buňky pouze těsně pod povrch agarů a v přítomnosti selenanu jsou stopy výraznější. Na YD kolonie také zarůstají těsně pod povrch, ale vytváří i kořen ve tvaru písmene I nebo Y zarůstající hluboko do agarů, v přítomnosti selenanu jsou kořínky rozvětvenější.

BOA (0,7 mM) neměla na invazivní růst vliv na žádném z médií.

5.2.1.6 Vliv selenanu a kys. 2-bromooktanové na množství proteinu Ino1p

Sledovala jsem vliv BOA a selenanu na množství proteinu Ino1p. Na obrázcích 36-40 jsou vyobrazeny kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem pomocí fluorescenční binokulární lupy. Výsledky byly potvrzeny i pomocí imunodetekce (obr. 34). Intenzita fluorescence odpovídající množství proteinu Ino1p je na GM médiích vyšší než na YD (při stejném stáří kolonie). V přítomnosti BOA (0,7 mM) je protein Ino1p exprimován více (na GM i na YD), avšak při porovnání kolonií rostoucích v přítomnosti selenanu (médiá GM-Se/GM-Sei a YD-Se/YD-Sei) BOA tak významný rozdíl v produkci Ino1p nezpůsobuje (obr. 39). Selenan samotný způsobuje na YD médiu mírné zvýšení produkce Ino1p (porovnání YD/YD-Se), zatímco

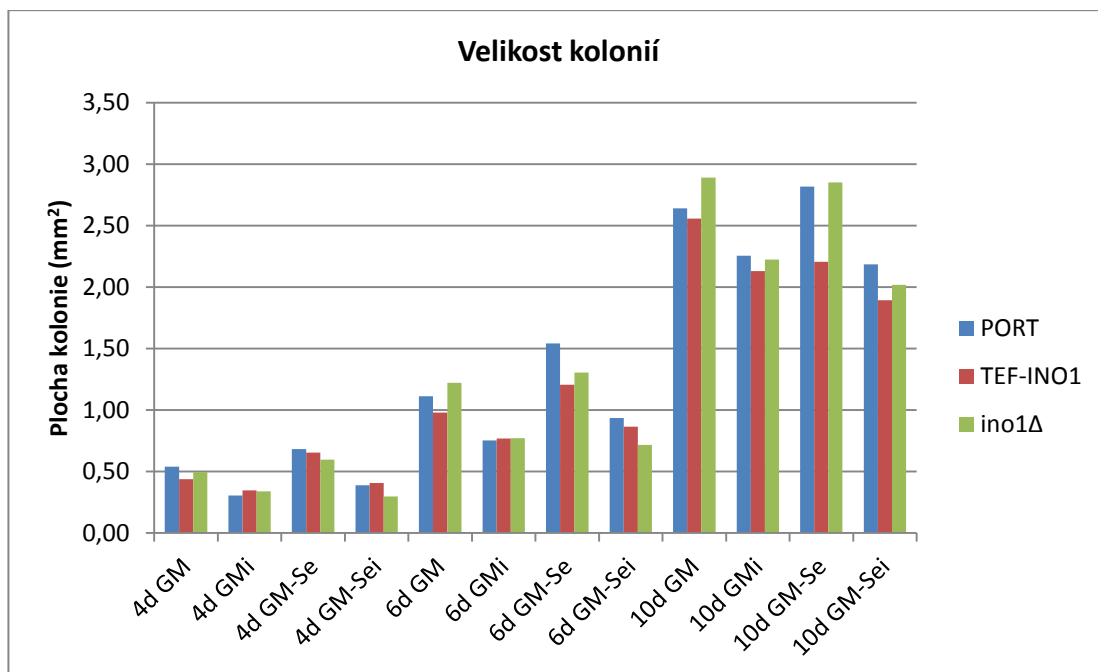
na GM selenan způsobuje naopak pokles v produkci Ino1p. Při porovnání kolonií rostoucích v přítomnosti BOA (médiá GMi/GM-Sei) selenan způsobuje stejně významný pokles v produkci Ino1p. Mezi médii YDi a YD-Sei žádný významný rozdíl pozorován nebyl.



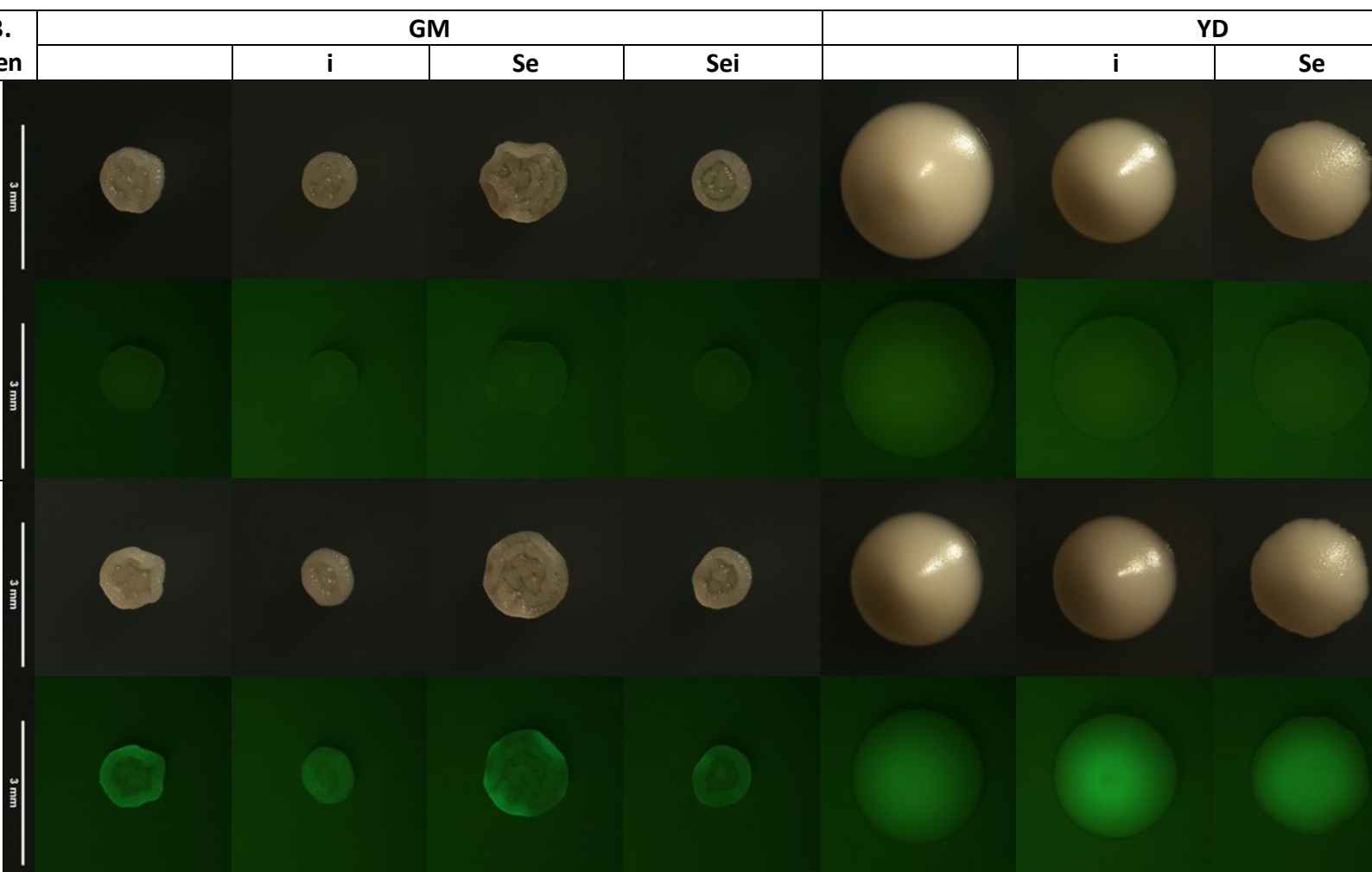
Obrázek 34: Příklad výsledků imunodetekce. A – Membrána po western blotu s obarvenými proteiny. B – Film zachycující signál Ino1p-GFP u jednotlivých vzorků. C – Popis vzorků na membráně a filmu (wt – kmen PORT).

5.2.2 Morfologie kolonií kmenů TEF-INO1 a *ino1Δ*

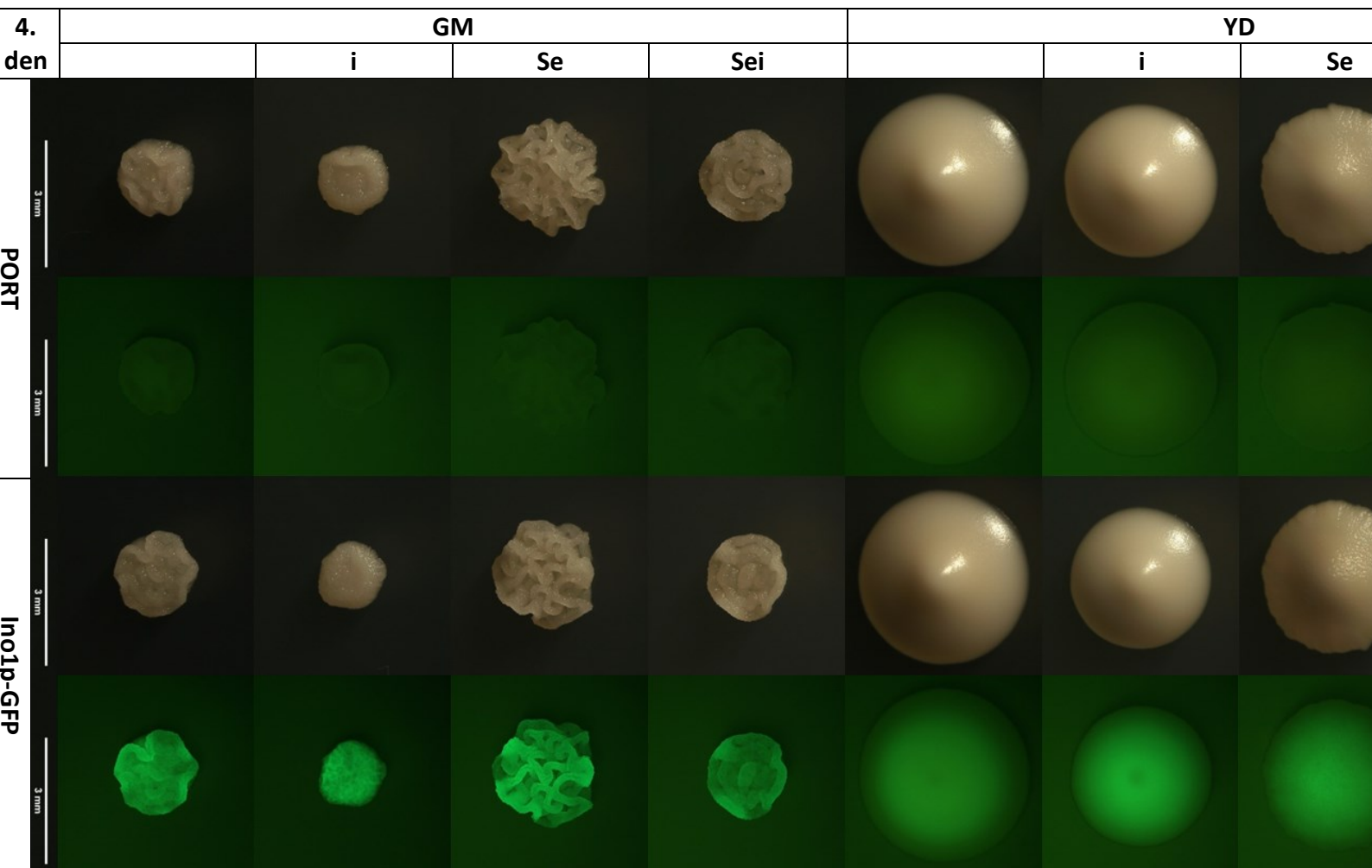
Kmeny TEF-INO1 a *ino1Δ* byly vysety na GM médium a jejich morfologie byla porovnána s rodičovským kmenem (obr. 43). U kmene TEF-INO1 byla pozorována mírně výraznější vrásčitost v přítomnosti selenanu a BOA (0,7 mM). Naopak u kmene *ino1Δ* byla pozorována méně výrazná vrásčitost. Vliv BOA a selenanu na velikost kolonií je u všech kmenů podobný (obr. 35). Kolonie rostoucí na GMi a GM-Sei jsou stejně velké a jsou menší než kolonie na GM. Kolonie rostoucí na GM-Se jsou naopak větší než kolonie na GM. Počty kolonií na misce byly u rodičovského kmene a kmene *ino1Δ* stejné (26), u kmene TEF-INO1 jich bylo více (40). Rozdíly v morfologii tedy nejsou způsobeny odlišnou hustotou výsevu.



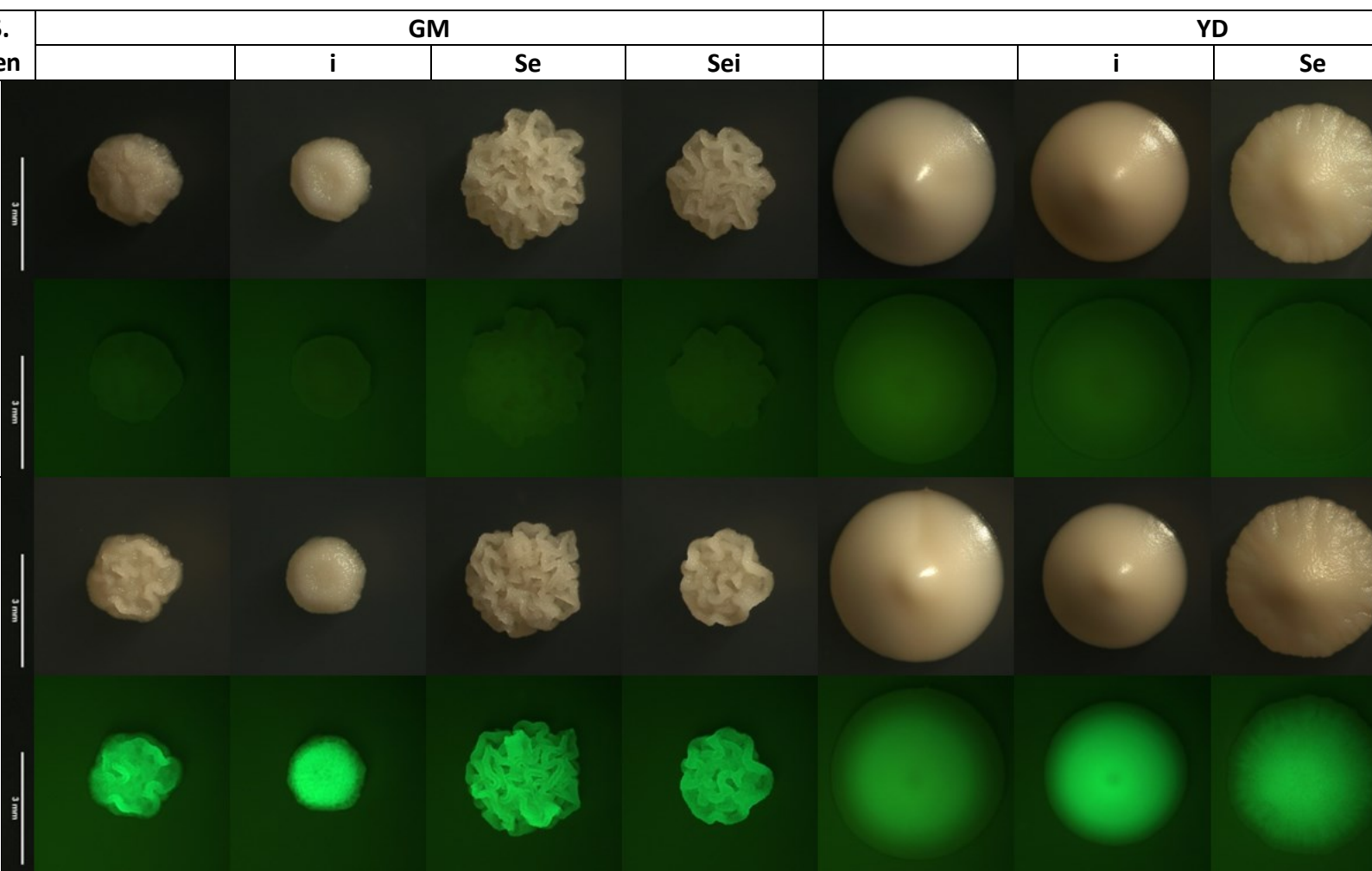
Obrázek 35: Vliv BOA a selenanu na velikost kolonií kmenů PORT, TEF-INO1 a *ino1Δ*



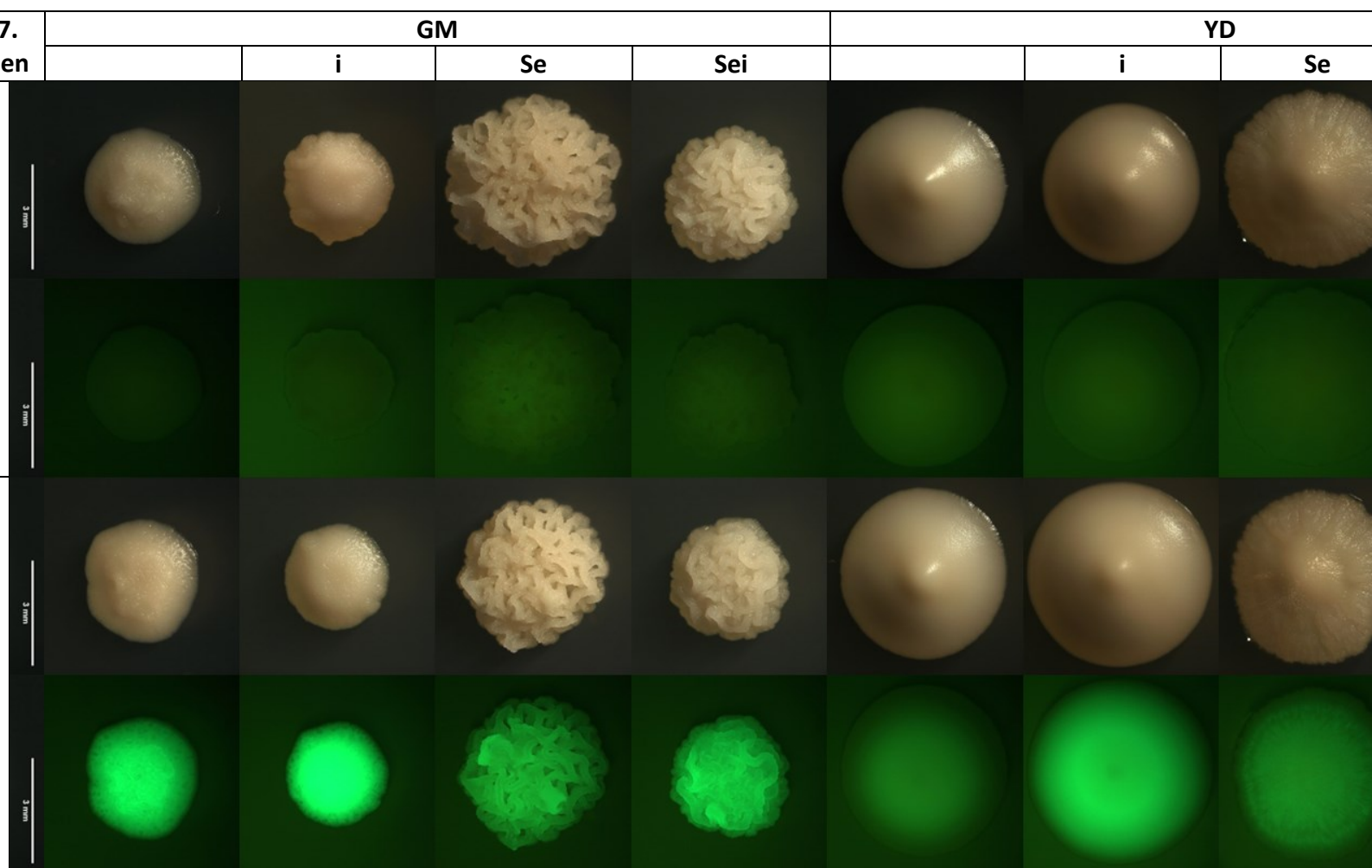
obrazek 36: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 3 dny staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byla snímána i intenzita fluorescence. Měřítka 3 mm.



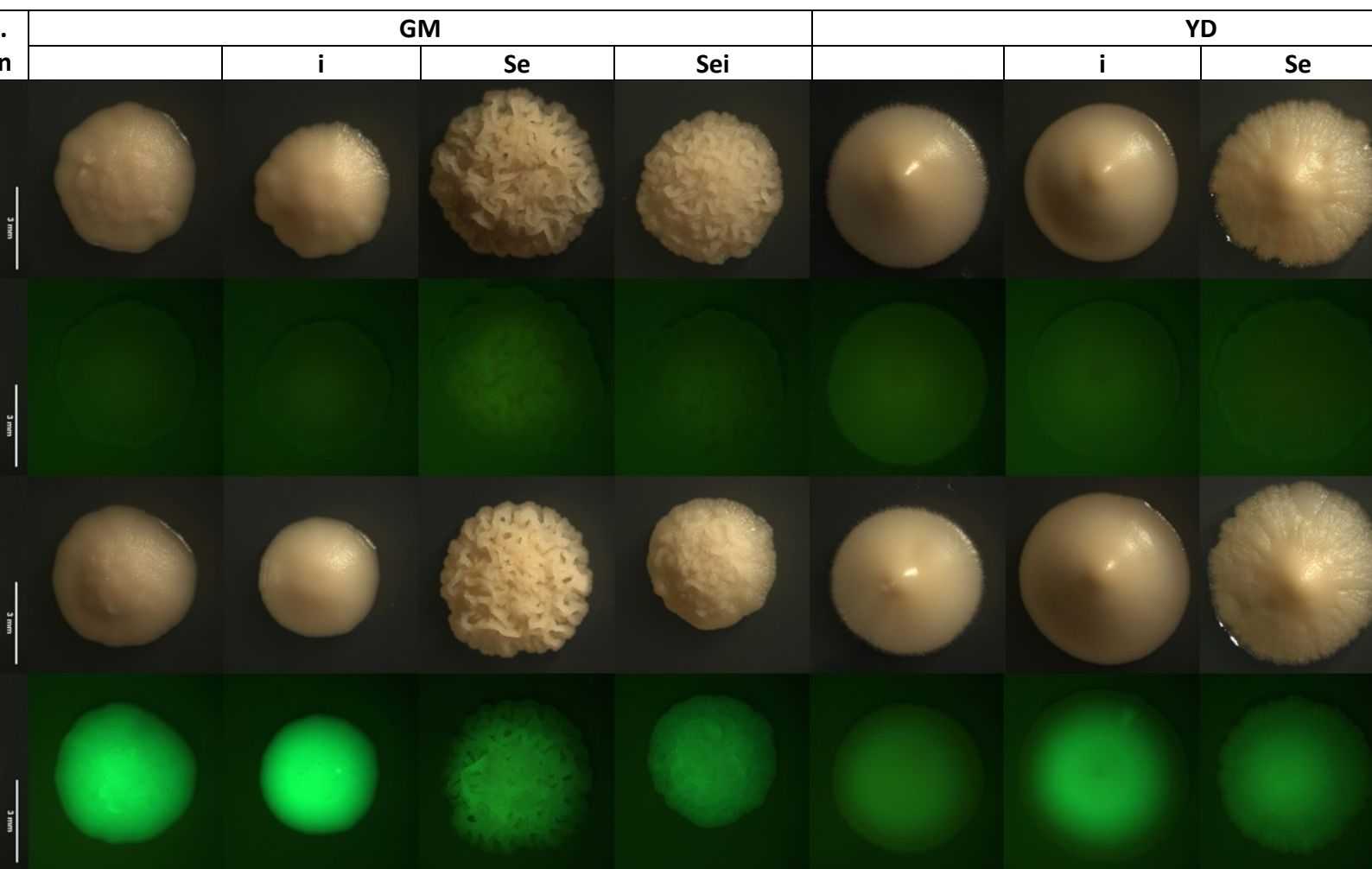
obrázek 37: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 4 dny staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) a v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byla snímána i intenzita fluorescence. Měřítka 3 mm



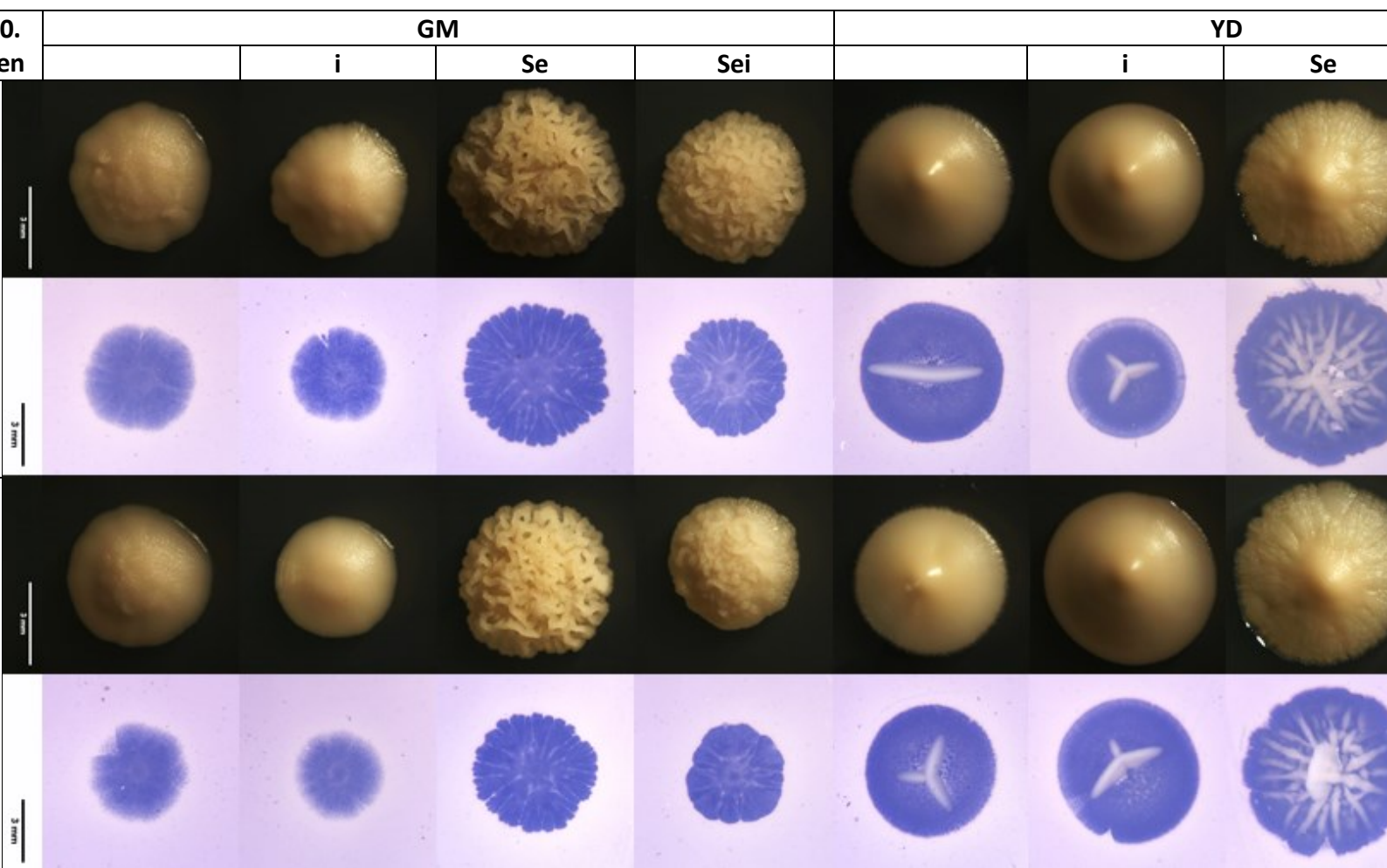
obrazek 38: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 5 dní staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byla snímána i intenzita fluorescence. Měřítka 3 mm.




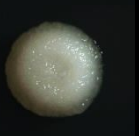



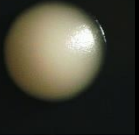

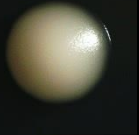
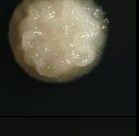
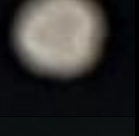






obrazek 39: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 7 dní staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byla snímána i intenzita fluorescence. Měřítko 3 mm



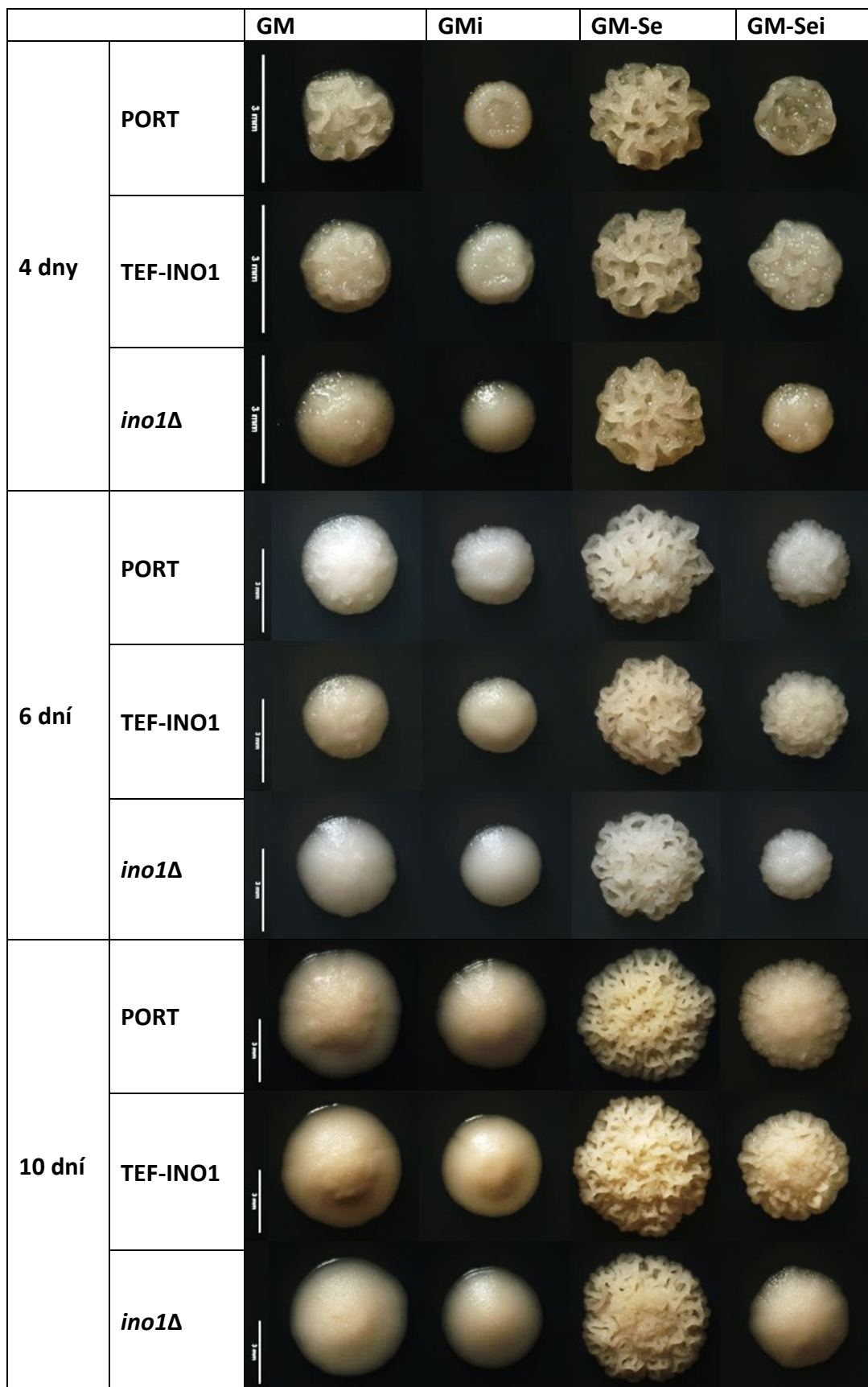
obrazek 40: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 10 dní staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byla snímána i intenzita fluorescence. Měřítka 3 mm.



obrazek 41: Kolonie kmene Ino1p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem. 10 dní staré kolonie rostoucí na GM a YD médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Kolonie byly snímány za viditelného světla a poté byly snímány stopy v agaru po koloniích. Stopy jsou odfarbeny vlivem UV záření. Měřítka 3 mm.

m	GM			GMi			GM-Se			GM-Sei	
	morfologie	plocha (mm ²)	stáří	morfologie	plocha (mm ²)	stáří	morfologie	plocha (mm ²)	stáří	morfologie	plocha (mm ²)
r		0,54	4 dny		0,47	5 dní		0,68	4 dny		0,58
A		0,60	5 dní		0,51	6 dní		0,52	5 dní		0,46
D1		0,44	4 dny		0,51	5 dní		0,65	4 dny		0,62
A		0,50	4 dny		0,48	5 dní		0,60	4 dny		0,42

obrázek 42: Vzhled, plocha a stáří kolonií odebíraných na izolaci RNA pro northern analýzu.



Obrázek 43: Kolonie kmenů TEF-INO1 a *ino1Δ* v porovnání s rodičovským kmenem. 4-10 dní staré kolonie rostoucí na GM médiu v přítomnosti inhibitoru BOA (i) nebo selenanu (Se) nebo v přítomnosti kombinace inhibitoru BOA a selenanu (Sei). Měřítka 3 mm.

5.3 Northern analýza

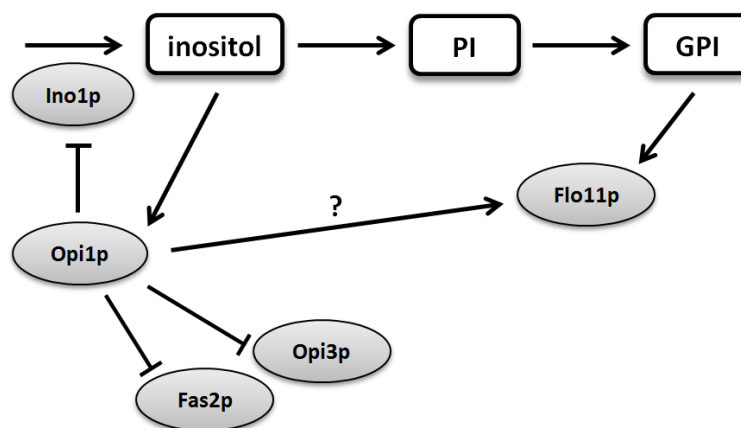
Cíl: Zjistit vliv BOA a selenanu na hladinu mRNA vybraných genů u kmenů PORT, TEF-INO1, *ino1Δ* a *opi1Δ* při kultivaci na pevném médiu s glycerolem.

5.3.1 Biomasa

Na northern analýzu byla použita biomasa 4-6 dní starých kolonií. Kmeny PORT, TEF-INO1, *ino1Δ* a *opi1Δ* byly pěstovány na médiích GM, GMi, GM-Se a GM-Sei (koncentrace BOA: 0,7 mM). Protože BOA a delece genu *OPI1* zpomalují růst, odebírala jsem biomasu tak, aby byly kolonie stejně velké. Stáří, velikost a morfologie kolonií jednotlivých kmenů v době sběru biomasy je na obr. 42.

5.3.2 Detekované geny

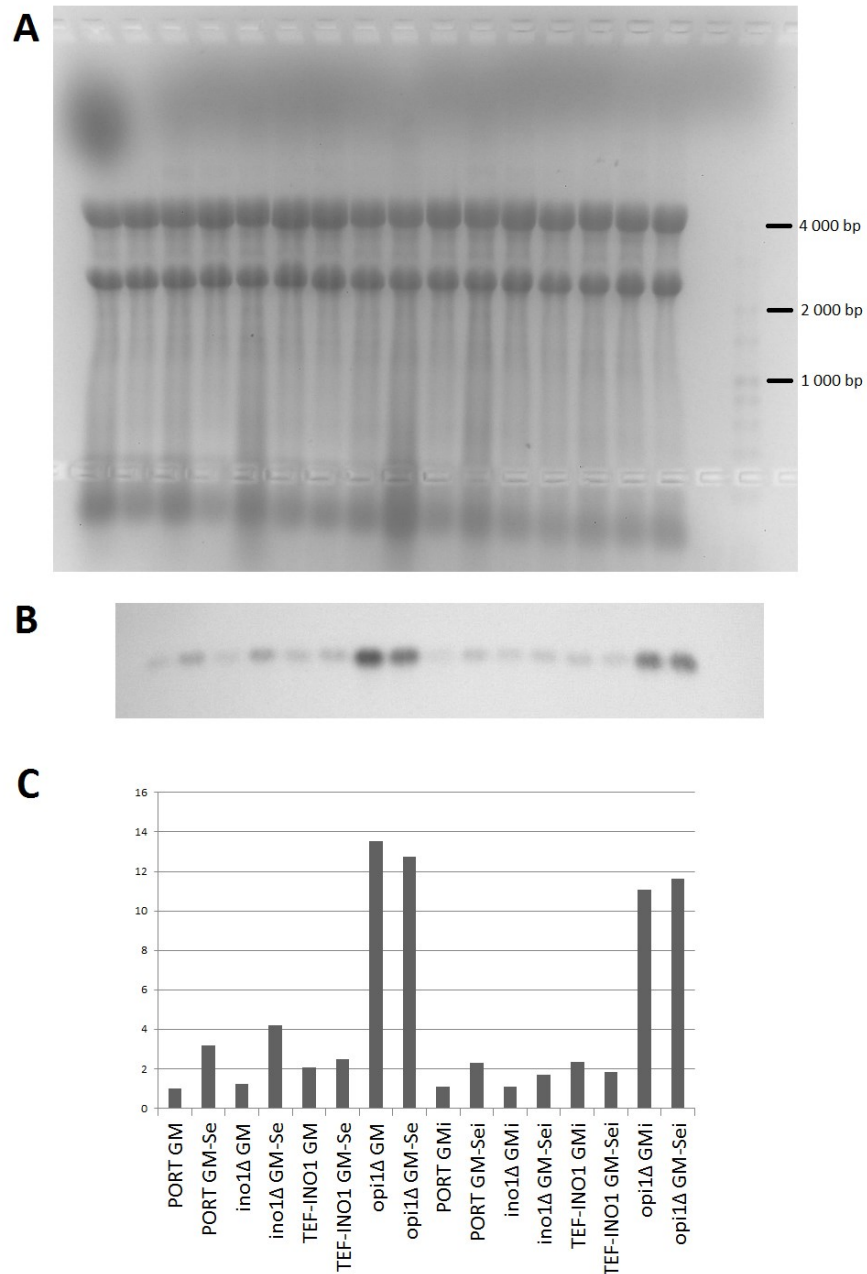
V celkové RNA bylo detekováno 7 různých mRNA pomocí radioaktivně značených DNA sond (příprava je popsána v kap. 4.2.6.4). Zajímala nás hladina mRNA pro proteiny Ino1p, Opi1p, Opi3p, Fas2p a Flo11p. Jako referenční mRNA byly detekovány mRNA pro Tpi1p a Rpl3p. Dále popsané vztahy mezi těmito proteiny jsou znázorněny na obr. 44. Gen *INO1* kóduje inositol-3-fosfátsyntázu, enzym katalyzující první krok ve sledu reakcí vedoucích k syntéze fosfatidylinositolu (Donahue & Henry, 1981). Gen *OPI3* kóduje enzym katalyzující přeměnu fosfatidylethanolaminu na fosfatidylcholin (Kodaki & Yamashita, 1987). Na rozdíl od Ino1p je specifitější pro stacionární fázi růstu (McGraw & Henry, 1989). Fas2p je součástí enzymu katalyzujícího syntézu mastných kyselin (Mohamed *et al.*, 1988). Protein Flo11p je nezbytný pro invazivní a pseudohyální růst (Lo & Dranginis, 1998). Jeho struktura obsahuje GPI kotvu, která je syntetizována z fosfatidylinositolu (Lo & Dranginis, 1996). Transkripční faktor Opi1p je negativním regulátorem genů *INO1*, *OPI3* i *FAS2* (Greenberg *et al.*, 1982a; Schüller *et al.*, 1992a; Santiago & Mamoun, 2003). Je také nezbytný pro expresi genu *FLO11* (Reynolds, 2006). Geny *TPI1* a *RPL3* jsou na regulaci pomocí Opi1p nezávislé. Tpi1p je enzym glykolýzy (triosafosfátizomeráza) a je exprimován stabilně během celého růstu (Alber & Kawasaki, 1982; Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012). Rpl3p je ribozomální protein, jeho exprese koreluje s mírou translace v buňce (Wickner *et al.*, 1982; Lund *et al.*, 2008).



Obrázek 44: Vztahy mezi proteiny, jejichž exprese byla sledována pomocí northern analýzy. PI – fosfatidylinositol, GPI – glykofosfatidylinositol, ? – neznámý způsob interakce.

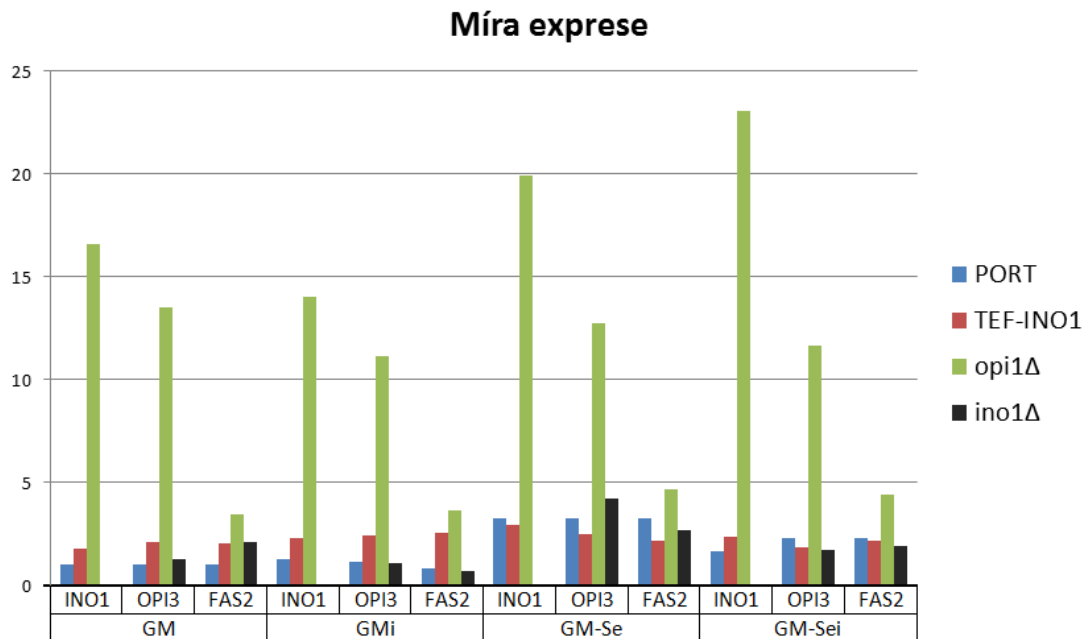
5.3.3 Výsledky northern analýzy

Radioaktivní signály sond detekované pomocí filmu byly kvantifikovány pomocí programů ImageJ a Microsoft Excel a znázorněny pomocí grafů (příklad zpracování dat na obr. 45). Rozdíl mezi hodnotami signálu byl považován za signifikantní v případě, že vyšší ze dvou porovnávaných hodnot byla alespoň dvojnásobná.



Obrázek 45: Příklad zpracování výsledků northern analýzy. A: elektroforetický gel se vzorky RNA. B: Radioaktivní signál vyzářovaný DNA sondou pro gen *OPI3* zachycený na filmu. C: detekované signály kvantifikovány pomocí programů ImageJ a Microsoft Excel a znázorněny pomocí grafu. Signálu pro kmen PORT z GM média byla přiřazena hodnota 1.

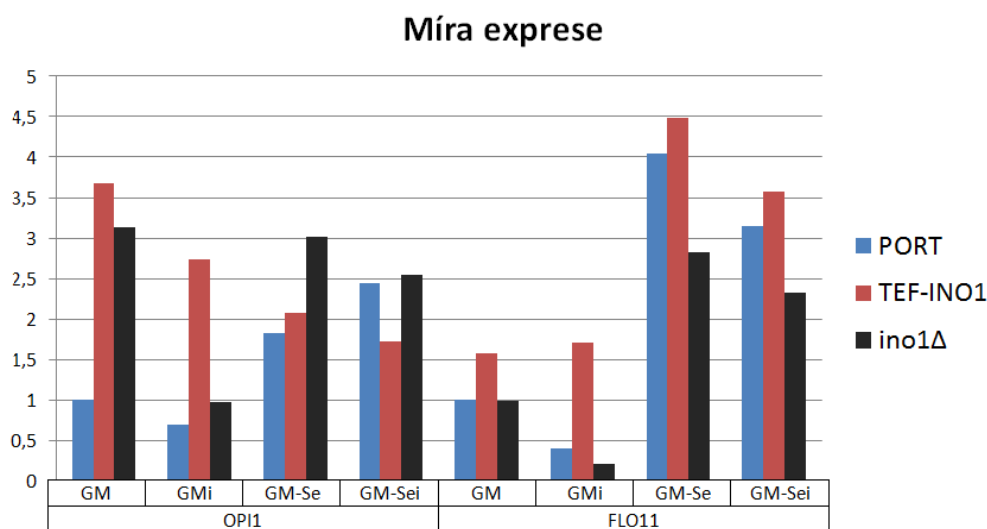
Nejprve byla porovnána míra exprese genů regulovaných pomocí *Opi1p* (*INO1*, *OPI3*, *FAS2*) u jednotlivých kmenů (obr. 46). U kmene TEF-*INO1* je míra exprese u kolonií rostoucích na GM a GMi vyšší než u kmene PORT, ale v přítomnosti selenanu (GM-Se a GM-Sei) je exprese vybraných genů srovnatelná. Výrazně vyšší exprese vybraných genů je u kmene *opi1Δ* na všech médiích. Míra exprese u kmene *ino1Δ* je srovnatelná s expresí u kmene PORT, pouze u kolonií rostoucích na GM médiu je exprese genu *FAS2* dvojnásobná u kmene *ino1Δ* v porovnání s kmenem PORT.



Obrázek 46: Porovnání míry exprese genů *INO1*, *OPI3* a *FAS2* u kmenů PORT, TEF-*INO1*, *opi1Δ* a *ino1Δ* na různých médiích. Signálu pro kmen PORT z GM média byla přiřazena hodnota 1.

Dále byla porovnána exprese genu *OPI1* u kmenů PORT, TEF-INO1 a *ino1Δ* (obr. 47). U kmene TEF-INO1 je exprese *OPI1* více než trojnásobná ve srovnání s kmenem PORT u kolonií rostoucích na médiích GM a GMi. V přítomnosti selenanu nebo selenanu i BOA už rozdíl v expresi není výrazný. U kmene *ino1Δ* je hladina exprese *OPI1* srovnatelná s kmenem PORT na všech médiích kromě GM, kde je u kmene *ino1Δ* exprese mnohem vyšší.

U kmenů PORT, TEF-INO1 a *ino1Δ* byla porovnána i exprese genu *FLO11* (obr. 47). U kmene TEF-INO1 v porovnání s kmenem PORT je velký rozdíl na médiu GMi, kde u kmene TEF-INO1 je exprese genu *FLO11* více než 4× vyšší. Na médiích GM, GM-Se a GM-Sei výrazné rozdíly mezi kmeny PORT a TEF-INO1 nejsou. U kmene *ino1Δ* je hladina exprese *FLO11* u kolonií rostoucích na všech médiích srovnatelná s kmenem PORT. Pouze na médiu GMi je exprese *FLO11* u kmene PORT dvojnásobná v porovnání s kmenem *ino1Δ*.



Obrázek 47: Porovnání míry exprese genů *OPI1* a *FLO11* u kmenů PORT, TEF-INO1 a *ino1Δ* na různých médiích. Signálu pro kmen PORT z GM média byla přiřazena hodnota 1.

Hodnoty signálu jednotlivých vzorků získané kvantifikací pomocí programů ImageJ a Microsoft Excel byly vzájemně porovnány a zaznamenány do tabulek (tab. 17-20), kde znaménko + znázorňuje alespoň dvojnásobnou hodnotu signálu, ++ alespoň čtyřnásobnou hodnotu, - alespoň poloviční hodnotu signálu, -- alespoň čtvrtinovou hodnotu signálu, 0 znamená méně výrazný nebo žádný rozdíl a X znamená absenci signálu. Kladná znaménka jsou zvýrazněna zeleně, záporná červeně.

Tabulka 17 znázorňuje analýzu vlivu složení média na expresi vybraných genů u kmene PORT. U kolonií rostoucích na médiu se selenanem je zvýšená exprese všech genů, kromě *OPI1* (GM → GM-Se). Podle *RPL3* a *TPI1* je obecně na selenanu vyšší hladina transkriptů. Přítomnost BOA i selenanu nemá vliv na expresi *INO1* v porovnání se samotnou BOA (GMi → GM-Sei), zároveň je zvýšená exprese *OPI1*. Výrazně zvýšená je v přítomnosti selenanu exprese *FLO11* (GM → GM-Se i GMi → GM-Sei). To koreluje s výraznější morfolofií kolonií. Při porovnání médií GM

a GMi je zvýšená exprese *INO1* v přítomnosti BOA, regulace může být ale nezávislá na *Opi1p*, protože není zvýšená exprese *OPI3* ani *FAS2*. Exprese *FLO11* je v koloniích rostoucích na GMi snižena oproti GM. Při porovnání genové exprese v koloniích na GM-Se a GM-Sei nebyly zjištěny výrazné rozdíly.

Tabulka 18 znázorňuje analýzu vlivu složení média na expresi vybraných genů u kmene TEF-*INO1*. Zvýšená exprese *INO1* zmenšuje všechny rozdíly v expresi vybraných genů pozorované u kmene PORT. Významný zůstává pouze rozdíl v expresi genu *FLO11* způsobený selenanem (GM → GM-Se, GMi → GM-Sei).

Tabulka 19 znázorňuje analýzu vlivu složení média na expresi vybraných genů u kmene *opi1Δ*. Absence signálu pro gen *OPI1* potvrzuje delecí genu. Zároveň je vidět silnou závislost exprese *FLO11* na přítomnosti *Opi1p*. To se odráží na morfologii kolonií, neboť kolonie jsou hladké na všech médiích (obr. 42). U tohoto kmene nemá selenan ani BOA vliv na expresi vybraných genů. Pouze exprese genu *INO1* je v koloniích rostoucích na médiu s inhibitorem i selenanem vyšší než pouze v přítomnosti BOA (GMi → GM-Sei), přestože kolonie kmene *opi1Δ* trpí nadměrnou expresí *INO1*.

Tabulka 20 znázorňuje analýzu vlivu složení média na expresi vybraných genů u kmene *ino1Δ*. Absence signálu pro gen *INO1* potvrzuje delecí genu. U kolonií rostoucích na médiu se selenanem je v porovnání s kmenem PORT menší rozdíl v expresi *FLO11* a nevýznamný rozdíl v expresi *FAS2* (GM → GM-Se). Přítomnost BOA i selenanu v porovnání s přítomností samotné BOA (GMi → GM-Sei) způsobuje, na rozdíl od výsledků pozorovaných u kmene PORT, větší rozdíl v expresi *FAS2*, exprese *OPI3* je naopak srovnatelná na obou médiích. V nepřítomnosti selenanu má BOA velký vliv na expresi genů *FAS2* a *FLO11* (GM → GMi), oba geny mají expresi velmi sníženou. Snížená je exprese i u genu *OPI1*. Přítomnost selenanu i BOA v porovnání se samotným selenanem (GM-Se → GM-Sei) má vliv pouze na expresi *OPI3*, která je snížená.

Tabulka 17: Porovnání hodnot signálů detekovaných pomocí northern analýzy u kmene PORT. Znaménko + znázorňuje alespoň dvojnásobnou hodnotu signálu, ++ alespoň čtyřnásobnou hodnotu, - alespoň poloviční hodnotu signálu a 0 znamená méně výrazný nebo žádný rozdíl. Kladná znaménka jsou zvýrazněna zeleně, záporná červeně.

PORT	GM → GM-Se	GMi → GM-Sei	GM → GMi	GM-Se → GM-Sei
<i>INO1</i>	+	0	+	0
<i>OPI1</i>	0	+	0	0
<i>OPI3</i>	+	+	0	0
<i>FAS2</i>	+	+	0	0
<i>FLO11</i>	++	++	-	0
<i>RPL3</i>	+	+	0	0
<i>TPI1</i>	+	0	0	0

Tabulka 18: Porovnání hodnot signálů detekovaných pomocí northern analýzy u kmene TEF-INO1. Znaménko + znázorňuje alespoň dvojnásobnou hodnotu signálu a 0 znamená méně výrazný nebo žádný rozdíl. Kladná znaménka jsou zvýrazněna zeleně.

TEF-INO1	GM → GM-Se	GMi → GM-Sei	GM → GMi	GM-Se → GM-Sei
<i>INO1</i>	0	0	0	0
<i>OPI1</i>	0	0	0	0
<i>OPI3</i>	0	0	0	0
<i>FAS2</i>	0	0	0	0
<i>FLO11</i>	+	+	0	0
<i>RPL3</i>	0	0	0	0
<i>TPI1</i>	+	0	0	0

Tabulka 19: Porovnání hodnot signálů detekovaných pomocí northern analýzy u kmene *opi1Δ*. Znaménko + znázorňuje alespoň dvojnásobnou hodnotu signálu, 0 znamená méně výrazný nebo žádný rozdíl a X znamená absenci signálu. Kladná znaménka jsou zvýrazněna zeleně.

<i>opi1Δ</i>	GM → GM-Se	GMi → GM-Sei	GM → GMi	GM-Se → GM-Sei
<i>INO1</i>	0	+	0	0
<i>OPI1</i>	X	X	X	X
<i>OPI3</i>	0	0	0	0
<i>FAS2</i>	0	0	0	0
<i>FLO11</i>	X	X	X	X
<i>RPL3</i>	0	0	0	0
<i>TPI1</i>	0	0	0	0

Tabulka 20: Porovnání hodnot signálů detekovaných pomocí northern analýzy u kmene *ino1Δ*. Znaménko + znázorňuje alespoň dvojnásobnou hodnotu signálu, ++ alespoň čtyřnásobnou hodnotu, - alespoň poloviční hodnotu signálu, -- alespoň čtvrtinovou hodnotu signálu, 0 znamená méně výrazný nebo žádný rozdíl a X znamená absenci signálu. Kladná znaménka jsou zvýrazněna zeleně, záporná červeně.

<i>ino1Δ</i>	GM → GM-Se	GMi → GM-Sei	GM → GMi	GM-Se → GM-Sei
<i>INO1</i>	X	X	X	X
<i>OPI1</i>	0	+	-	0
<i>OPI3</i>	+	0	0	-
<i>FAS2</i>	0	++	--	0
<i>FLO11</i>	+	++	--	0
<i>RPL3</i>	0	+	-	0
<i>TPI1</i>	+	0	0	0

6 Diskuze

6.1 Příprava kmenů

Cílem této práce bylo prozkoumat souvislosti mezi metabolismem fosfolipidů a morfologií kvasinkové kolonie. Za tímto účelem byly připravené nové kmeny kvasinky *S. cerevisiae* odvozené od kmene PORT. Kmen PORT je monokoloniální izolát přírodního vinařského kmene WY63 a na rozdíl od laboratorních kmenů *S. cerevisiae* tvoří strukturované kolonie. Nové kmeny byly navrhovány tak, abychom mohli odvodit funkce vybraných proteinů souvisejících s metabolismem fosfolipidů a tvorbou strukturované kolonie a pozorovat provázání těchto dějů. Připraveny byly kmeny *ino1Δ*, Ino1p-GFP, TEF-INO1 a *opi1Δ*, Ino1p-GFP. Pro experimenty byl použit i kmen *opi1Δ* již dříve připravený RNDr. Michaelou Schierovou, Ph.D. Kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ*, Ino1p-GFP se od svých rodičovských kmenů morfologicky nijak neliší, produkce fúzního proteinu tedy neovlivňuje morfologii kolonií.

Dále byl připraven kmen s hybridním genem *OPI1-GFP*. Přestože byl kmen ověřen pomocí PCR a sekvenace, nepodařilo se detekovat signál pomocí fluorescenčního mikroskopu ani pomocí imunodetekce. Pro případ, že by C-koncová fúze proteinu Opi1p s GFP byla důvodem nefunkční transkripce nebo špatného skládání proteinu do nativní konformace, byl připraven i kmen, kde je Opi1p značen pomocí GFP na N-konci. Ani u tohoto kmene však při imunodetekci nebyl detekován signál. Z northern analýzy vyplývá, že hladina mRNA pro Opi1p je v buňce velmi nízká. Radioaktivní signál byl detekován při expozici v řádu dní, zatímco u ostatních detekovaných genů byla expozice v řádu hodin. Je tedy pravděpodobné, že množství proteinu Opi1p je v buňce velmi malé. Problém s expresí tohoto fúzního proteinu je možná specifický pro kmen PORT, protože v literatuře byla popsána úspěšná exprese proteinu Opi1p značeného pomocí GFP i pomocí dalšího fluorescenčního proteinu mCherry (Han *et al.*, 2015).

6.2 Vliv zdroje uhlíku na morfologii kolonií

Zdroj uhlíku zásadně ovlivňuje metabolismus kvasinek. Na něm závisí, zda bude kvasinka pro získání energie využívat fermentaci či respiraci. Fermentace je pro kvasinky výhodnější, a proto na fermentovatelných zdrojích uhlíku (např. 2% w/v glukóza) dochází ke katabolické represi (utlumení metabolických drah pro zpracování jiných zdrojů uhlíku, represe mitochondriálních funkcí)(Gancedo, 1998). Při nižších koncentracích glukózy (0,1% w/v) nebo při růstu na glycerolu (3% v/v) získávají kvasinky energii především respirací (Polakis *et al.*, 1965; Nevoigt & Stahl, 1997).

Zdrojem uhlíku je ovlivněna velikost i morfologie kolonií. Kmen PORT rostoucí na 3% (v/v) glycerolu (GM médium) vytváří mírně vrásčité kolonie, zatímco na 2% (w/v) glukóze (YD médium) tvoří kolonie zcela hladké. Na 0,1% (w/v) glukóze (YD01 médium) tvoří kolonie

vrásčité s hladkým okrajem. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně výsledkem negativního vlivu glukózy na expresi genu *FLO11* (Kuchin *et al.*, 2002). Po čtyřech dnech růstu jsou kolonie rostoucí na YD médiu největší. Kolonie rostoucí na YD01 dosahují průměrně 70 % jejich velikosti a kolonie rostoucí na GM 40 % jejich velikosti. To odpovídá faktu, že kvasinky snáze zpracovávají glukózu než glycerol a na glukóze rostou rychleji (Gancedo, 1998).

Kmen *opi1Δ* tvoří kolonie hladké na všech médiích (GM, YD01, YD) a postrádá invazivní růst. To je způsobeno absencí proteinu Flo11p, protože exprese genu *FLO11* je závislá na přítomnosti Opi1p (Reynolds, 2006). Delece genu *OPI1* také zpomaluje růst na všech médiích v porovnání s kmenem PORT, nejspíše kvůli nadměrné expresi genů (především genu *INO1*) regulovaných pomocí Opi1p.

6.3 Vliv zdroje uhlíku na produkci Ino1p

Ve své práci jsem se zaměřila na sledování exprese genu *INO1* a produkci Ino1p, protože gen *INO1* je nejvíce regulovaným genem metabolismu fosfolipidů *S. cerevisiae* (Greenberg & Lopes, 1996; Carman & Henry, 1999). Množství proteinu Ino1p bylo sledováno pomocí fúze s fluorescenčním proteinem GFP.

Na různých zdrojích uhlíku byly zkoumány kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ*, Ino1p-GFP. Delece genu *OPI1* způsobuje nadměrnou expresi genu *INO1* (Greenberg *et al.*, 1982b), což bylo potvrzeno pomocí fluorescenční lupy, spektrofotometru a imunodetekce. Rozdíl v produkci Ino1p mezi těmito kmeny je řádový.

U kmene Ino1p-GFP byl zaznamenán vliv zdroje uhlíku na produkci Ino1p pomocí imunodetekce. Nejvíce proteinu obsahovaly buňky rostoucí na GM, méně buňky rostoucí na YD01 a nejméně buňky rostoucí na YD. To odpovídá i naměřeným hodnotám pomocí spektrofotometru. Rozdíly by mohla vysvětlovat odlišná fáze růstu (Jiranek *et al.*, 1998), ale pomocí imunodetekce bylo zjištěno, že produkce Ino1p se ve sledovaném čase nemění na žádném z médií. Odlišnosti v produkci Ino1p jsou tedy způsobeny zdrojem uhlíku. Výsledek, že růst na glukóze tlumí expresi *INO1* se shoduje s literaturou (Daran-Lapujade *et al.*, 2004; Moreno-García *et al.*, 2015). To pravděpodobně souvisí s tím, že růst kolonií na GM médiu podporuje tvorbu strukturované kolonie, pro niž je potřeba inositol kvůli syntéze GPI kotvy nezbytné pro Flo proteiny. Kolonie rostoucí na médiu s glycerolem pro získání energie využívají respiraci, potřebují více fosfolipidů na tvorbu membrán mitochondrií.

Z dat získaných pomocí spektrofotometru a fluorescenční lupy také vyplývá, že u kolonií kmene *opi1Δ*, Ino1p-GFP rostoucích na GM médiu je produkce Ino1p nižší než u kolonií rostoucích na YD nebo YD01. Imunodetekce tento rozdíl nepotvrdila, což může být způsobeno příliš silným signálem. Avšak síla signálu degradačních produktů (samotné GFP) se u kolonií rostoucích na GM médiu oproti YD a YD01 liší. Slabší signál pro samotné GFP u kolonií

rostoucích na GM médiu může odpovídat nižší produkci Ino1p-GFP. Vzhledem k absenci Opi1p je produkce Ino1p neregulovaná a větší množství Ino1p na YD a YD01 médiu může odrážet rychlejší metabolismus a vyšší hladinu proteosyntézy na výhodnějším zdroji uhlíku.

6.4 Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na morfologii kolonií kmene PORT

Pro pozorování změn v metabolismu fosfolipidů byla použita 2-bromooktanová kys. (BOA), která ovlivňuje β -oxidaci mastných kyselin (Kitamoto *et al.*, 1998). Změny v morfologii kolonií byly indukovány pomocí selenanu. Působení těchto dvou látek zvláště i dohromady vedlo k zajímavým výsledkům.

Pro testování BOA za subletálních podmínek bylo nejprve nutné optimalizovat podmínky. Pro lepší rozpustnost BOA v růstovém médiu bylo příslušné množství rozpuštěno v malém množství ethanolu. Ethanol byl přidáván i do kontrolních médií bez BOA. Dále byl testován vliv koncentrace BOA a na základě těchto výsledků byla zvolena koncentrace 0,7 mM pro následující experimenty.

Na GM médiu BOA nejen zpomaluje růst kolonií, ale zároveň má vliv na morfologii kolonií, ty jsou v její přítomnosti méně strukturované. To dokazuje, že metabolismus lipidů souvisí s morfologií kolonií. Na YD médiu jsou kolonie hladké, a proto zde nemůže být vliv na morfologii výrazný, ale kolonie jsou prokazatelně menší v přítomnosti BOA. V literatuře zatím nebyly popsány účinky BOA na *S. cerevisiae*. U *C. antarctica* BOA také zpomaluje růst a navíc inhibuje syntézu extracelulárních glykolipidů, sloužících jako surfaktant (Kitamoto *et al.*, 1998). U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* BOA také inhibuje produkci surfaktantu (rhamnolipidů) a tím narušuje i tvorbu biofilmu (Gutierrez *et al.*, 2013). Je možné, že i u *S. cerevisiae* dochází vlivem BOA k inhibici produkce extracelulárních glykolipidů potřebných pro tvorbu strukturované kolonie.

Selenan indukuje u kolonií vrásnění, jak již bylo dříve zjištěno v rámci Laboratoře biologie kvasinkových kolonií RNDr. Michaelou Schierovou, Ph.D. (nepublikovaná data). Na GM médiu jsou kolonie výrazně strukturované, ale i na YD médiu selenan způsobuje vroubkovanou strukturu kolonie. Selenan ovlivňuje i velikost kolonií. Na GM médiu jsou kolonie v přítomnosti selenanu větší. To je pravděpodobně způsobeno výraznou morfologií a vznikem volných prostor ve struktuře kolonie díky extracelulární matrix (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček *et al.*, 2010). Na YD médiu jsou kolonie v prvních dnech růstu v přítomnosti selenanu menší, ale po sedmi dnech růstu už dosahují větších rozměrů než kolonie selenanem neovlivněné. Zde struktura kolonie způsobená selenanem není tak výrazná a větší velikost kolonie je způsobena spíše rychlejším růstem. Proč je však v prvních dnech růstu kolonie rostoucí na selenanu znevýhodněna, zatím není jasné.

Jakým mechanismem zasahuje selenan do tvorby strukturovaných kolonií, není známé. Použitá koncentrace je pravděpodobně příliš nízká na to, aby byly změny v morfologii výsledkem toxického působení selenanu nebo dalších látek, které vznikají jeho přeměnou (Tarze *et al.*, 2007). Možná, že toxicita selenanu ovlivňuje kolonii jen v prvních dnech růstu na YD médiu a způsobuje tím pomalejší růst. Selen také díky podobné velikosti a vlastnostem může vstupovat do metabolických drah síry, což může vést ke vzniku modifikovaných látek (např. selenomethionin) s novými vlastnostmi (Cherest *et al.*, 1997). Sloučeniny selenu také interagují s kovovými ionty a mohou tak ovlivňovat funkci proteinů včetně transkripčních faktorů (Björnstedt *et al.*, 1996; Larabee *et al.*, 2009).

Zajímavá je také kombinace BOA a selenanu. Zatímco na GM médiu BOA snižuje strukturovanost kolonie způsobenou selenanem, na YD médiu jsou kolonie na selenanu strukturované stejně v přítomnosti BOA i bez ní. Selenan také způsobuje intenzivnější invazivní růst, zatímco BOA nemá na invazivní růst vliv na žádném ze sledovaných médií.

6.5 Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na morfologii kolonií kmenů TEF-INO1 a *ino1Δ*

Kmeny TEF-INO1 a *ino1Δ* byly vysety na GM médium a jejich morfologie byla porovnána s rodičovským kmenem PORT. U kmene TEF-INO1 nebyl pozorován vliv samotné BOA ani selenanu na morfologii, ale jejich kombinace (GM-Sei) způsobila mírně výraznější vrásčitost kolonií než u kmene PORT. Naopak u kmene *ino1Δ* byla pozorována méně výrazná vrásčitost na médiu GMi i GM-Sei v porovnání s kmenem PORT. Množství proteinu Ino1p má tedy vliv na morfologii kolonie, větší množství Ino1p částečně ruší efekt BOA.

6.6 Vliv 2-bromooktanové kys. a selenanu na produkci Ino1p

Dále byl sledován vliv BOA a selenanu na množství fúzního proteinu Ino1p-GFP pomocí fluorescenční lupy a imunodetekce. V přítomnosti BOA je protein Ino1p exprimován více (na GM i na YD). To může být ovlivněno narušením metabolismu mastných kyselin, který způsobí nedostatek fosfolipidů, na který buňka reaguje zvýšením exprese genů pro enzymy metabolismu fosfolipidů. Avšak při porovnání kolonií rostoucích v přítomnosti selenanu (médiá GM-Se/GM-Sei a YD-Se/YD-Sei) BOA tak významný rozdíl v produkci Ino1p nezpůsobuje. U GM média se to dá vysvětlit tím, že samotný selenan produkci Ino1p snižuje. Na YD médiu selenan na produkci Ino1p nemá významný vliv. Pro vysvětlení těchto pozorování je třeba provést další experimenty, které nám pomohou porozumět, jakým způsobem selenan zasahuje do metabolismu kvasinek.

Na GM médiu byla zvýšená exprese *INO1* v přítomnosti BOA potvrzena i pomocí northern analýzy, stejně tak i nevýznamný rozdíl mezi médii GM-Se a GM-Sei. Výsledky northern analýzy jsou však odlišné v souvislosti s působením selenanu. U kolonií rostoucích na GM-Se byla

exprese *INO1* vyšší než u kolonií rostoucích na GM (exprese na médiích GMi a GM-Sei byl srovnatelný). Tento výsledek však může být způsoben odlišným stářím kolonií. Zatímco při imunodetekci byly testované kolonie staré 10 dní, na northern analýzu byla odebrána biomasa z kolonií starých 4-5 dní. Je pravděpodobné, že 10. den růstu kolonie rostoucí na GM-Se již dosáhly stacionární fáze růstu a exprese genu *INO1* byla potlačena (Jiranek *et al.*, 1998). Pro potvrzení této teorie by bylo vhodné doplnit imunodetekci u kolonií kmene Ino1p-GFP starých 4-5 dní.

6.7 Northern analýza

Z výsledků northern analýzy vyplývá mnoho zajímavých poznatků, které potvrzují či doplňují data získaná jinými metodami. Přesto z těchto výsledků nelze vyvozovat žádné pevné závěry, protože northern analýza byla provedena pouze jednou, a je potřeba experiment zopakovat, či výsledky potvrdit nebo vyvrátit jinou metodou. Přesto si však myslím, že tyto výsledky stojí za zmínku a zamyšlení.

U kmene PORT dochází vlivem selenanu k velmi výraznému zvýšení exprese genu *FLO11*. BOA naopak snižuje expresi *FLO11*. To odpovídá morfologii kolonií, čím více je gen *FLO11* exprimován, tím vrásčitější jsou kolonie.

U kmene TEF-INO1 byla předpokládána zvýšená hladina exprese *INO1* a to se také potvrdilo. Díky většímu množství Ino1p byla zvýšena u tohoto kmene i exprese *OPI1*. Transkripční faktor Opi1p zřejmě ovlivňuje expresi *INO1* i s vloženým promotorem TEF, jelikož hladina mRNA *INO1* je u kmene *opi1Δ* mnohem vyšší než u kmene TEF-INO1. Pravděpodobně díky vyšší hladině mRNA *OPI1* a funkci Opi1p nejsou u tohoto kmene významné rozdíly mezi médii u genů regulovaných pomocí Opi1p (*OPI3*, *FAS2*). V porovnání s kmenem PORT selenan nezpůsobuje tak velký rozdíl v expresi *FLO11*. To je pravděpodobně tím, že u kolonií kmene TEF-INO1 rostoucích na médiích bez selenanu je vyšší exprese *FLO11* než u kmene PORT. To by se dalo ověřit přípravou kmene TEF-INO1, Flo11p-GFP.

U kmene *opi1Δ* chybí regulace exprese pomocí Opi1p, a to se projevuje velmi vysokou expresí genů *INO1* a *OPI3* a zvýšenou expresí genu *FAS2* srovnatelně v koloniích rostoucích na všech médiích. Jediná výrazná změna je v expresi *INO1* u kolonií rostoucích na GMi a GM-Sei. Zde selenan způsobuje zvýšení exprese i přesto, že je hladina mRNA *INO1* řádově vyšší než u kmene PORT. Selenan tedy ovlivňuje expresi *INO1* mechanismem nezávislým na Opi1p.

U kmene *ino1Δ* jsou rozdíly v expresi vybraných genů u kolonií rostoucích na různých médiích podobné jako u kmene PORT. Selenan zvyšuje expresi *FLO11* a BOA ji naopak snižuje. Ovšem velikost rozdílů příliš neodpovídá morfologii kolonií, které jsou vrásčité pouze na GM-Se a na ostatních médiích jsou hladké. Je možné, že množství proteinu Flo11p nekoreluje s množstvím mRNA *FLO11*. Absence genu *INO1* může způsobit změny v metabolismu vedoucí ke

kotranslační nebo posttranslační regulaci Flo11p. I když gen *INO1* pro buňku není esenciální, nepochybně jeho absence způsobuje změny v metabolismu. Zatímco u kmene PORT, TEF-INO1 i *opi1Δ* je exprese genů *OPI3* a *FAS2* regulována stejně, u kmene *ino1Δ* jsou mezi těmito geny zásadní rozdíly. U genu *FAS2* jsou nečekaně velké rozdíly v expresi, které korelují s expresí genu *FLO11*. Jaké principy a mechanismy regulace se zde uplatňují, zatím nedokáží posoudit. Obzvláště kvůli výsledkům u kmene *ino1Δ* je potřeba experiment zopakovat nebo potvrdit jinými metodami.

6.8 Faktory ovlivňující výsledky

Velkým problémem při nastavování experimentů je výběr způsobu, jak porovnávat kolonie mezi sebou. Já nejčastěji volila jako srovnávací znak stejné stáří kolonií. Je však jasné, že stejně staré kolonie se nemusí nacházet ve stejné růstové fázi. Např. kolonie rostoucí na glukóze rostou mnohem rychleji než kolonie rostoucí na glycerolu. Při sběru biomasy na izolaci RNA pro northern analýzu jsem se pokusila odebírat kolonie o stejné velikosti. To se však špatně odhaduje a velikosti kolonií jsou stejné jen přibližně, navíc velikost kolonie nekoreluje s množstvím buněk v kolonii. Strukturovaná kolonie zabírající stejnou plochu jako hladká kolonie obsahuje mnohem méně buněk, protože jsou zde velké mezibuněčné prostory (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček *et al.*, 2010). Další komplikací při experimentech je vliv hustoty výsevu na misce. Je možné biomasu zvážit a naředit na požadovanou koncentraci buněk. Výsevy těchto suspenzí však nemusí být vždy stejně husté, protože různé kmeny se mohou lišit velikostí buněk nebo životaschopností buněk. U přírodních kmenů také nastává komplikace v tom, že buňky tvoří shluky buněk držících pevně u sebe, které při výsevu vytvoří jen jednu kolonii.

Z výsledků všech experimentů vyplývá, že metabolismus fosfolipidů souvisí s tvorbou strukturované kolonie a změny v expresi enzymů katalyzujících syntézu fosfolipidů se odráží ve změnách morfologie kolonií. Selenan, který indukuje vrásčitost kolonií, způsobuje také změny v expresi genů souvisejících s metabolismem fosfolipidů. Naopak inhibitor β -oxidace mastných kyselin 2-bromooktanová kys. způsobuje také změny v morfologii kolonií. Je možné navázat experimenty, které by se zabývaly možností využít 2-bromooktanovou kys. k potlačení kvasinkové infekce. Strukturované kolonie jsou lépe chráněny proti vnějším podmínkám a lépe odolávají vůči působení inhibitorů. Narušení této struktury a zpomalení růstu kvasinek by mohlo být přínosem pro léčbu.

7 Souhrn

- Pro účely této práce byly připraveny kmeny *ino1Δ*, Ino1p-GFP, TEF-INO1 a *opi1Δ*, Ino1p-GFP odvozené od přírodního kmene *S. cerevisiae* PORT.
- Morfologie kolonií kmene PORT je ovlivněna zdrojem uhlíku. Na nefermentovatelných zdrojích uhlíku (3% v/v glycerol) jsou kolonie strukturovanější než na fermentovatelných zdrojích uhlíku (2% w/v glukóza), kde rostou kolonie hladké. Při nízké koncentraci fermentovatelného zdroje uhlíku (0,1% w/v glukóza) jsou kolonie lehce strukturované.
- Kmen *opi1Δ* tvoří kolonie hladké na všech zkoumaných zdrojích uhlíku (3% v/v glycerol, 2% a 0,1% w/v glukóza) a postrádá invazivní růst. Delece genu *OPI1* také zpomaluje růst na všech médiích v porovnání s kmenem PORT.
- Delece genu *OPI1* způsobuje nadměrnou expresi genu *INO1*, což bylo potvrzeno pomocí fluorescenční lupy, spektrofluorometru a imunodetekce. Rozdíl v produkci Ino1p mezi kmeny Ino1p-GFP a *opi1Δ*, Ino1p-GFP je řádový.
- U kmene Ino1p-GFP byl zaznamenán vliv zdroje uhlíku na produkci Ino1p pomocí imunodetekce. Nejvíce proteinu obsahovaly buňky rostoucí na 3% (v/v) glycerolu, méně buňky rostoucí na 0,1% (w/v) glukóze a nejméně buňky rostoucí na 2% (w/v) glukóze. To odpovídá i naměřeným hodnotám pomocí spektrofluorometru.
- Z dat získaných pomocí spektrofluorometru a fluorescenční lupy také vyplývá, že u kolonií kmene *opi1Δ*, Ino1p-GFP rostoucích na 3% (v/v) glycerolu je produkce Ino1p nižší než u kolonií rostoucích na 0,1% nebo 2% (w/v) glukóze. Imunodetekce tento rozdíl nepotvrdila, což může být způsobeno příliš silným signálem.
- Byly optimalizovány podmínky pro testování inhibitoru β -oxidace mastných kyselin 2-bromooktanové kys. za subletálních podmínek.
- 2-bromooktanová kys. na médiích s 3% (v/v) glycerolem i 2% (w/v) glukózou zpomaluje růst kolonií kmene PORT a zvyšuje expresi genu *INO1*. Na glycerolovém médiu s inhibitorem jsou kolonie méně strukturované.
- Selenan indukuje u kolonií vrásnění. Na médiu s 3% (v/v) glycerolem jsou kolonie výrazně strukturované, na médiu s 2% (w/v) glukózou selenan způsobuje vroubkovanou strukturu kolonie. Kolonie rostoucí v přítomnosti selenanu jsou větší. Na médiu s 3% (v/v) glycerolem byla pozorována také zvýšená exprese genu *INO1* u kmene PORT, selenan má tedy vliv na metabolismus fosfolipidů.
- U kmene PORT dochází vlivem selenanu k velmi výraznému zvýšení exprese genu *FLO11*. 2-bromooktanová kys. naopak snižuje expresi *FLO11*. To odpovídá morfologii kolonií, čím více je gen *FLO11* exprimován, tím vrásčitéjší jsou kolonie.

- Na médiu s 3% (v/v) glycerolem 2-bromooktanová kys. snižuje strukturovanost kolonie kmene PORT způsobenou selenanem.
- Selenan způsobuje intenzivnější invazivní růst kmene PORT, zatímco 2-bromooktanová kys. nemá na invazivní růst vliv na žádném ze sledovaných médií.
- U kmene TEF-INO1 působila 2-bromooktanová kys. a selenan na morfologii kolonií stejným způsobem jako u kmene PORT, ale kombinace obou látek způsobila mírně výraznější vrásčitost kolonií než u kmene PORT. Naopak u kolonií kmene *ino1Δ* rostoucích na stejném médiu byla pozorována méně výrazná vrásčitost v porovnání s kmenem PORT. Množství proteinu Ino1p má tedy vliv na morfologii kolonie.
- U kmene TEF-INO1, pravděpodobně díky zvýšené hladině mRNA *OPI1* a funkci Opi1p, nejsou významné rozdíly mezi pozorovanými médii u genů regulovaných pomocí Opi1p (*OPI3*, *FAS2*) v porovnání s kmenem PORT.
- U kmene *opi1Δ* chybí regulace exprese pomocí Opi1p, a to se projevuje velmi vysokou expresí genů *INO1* a *OPI3* a zvýšenou expresí genu *FAS2* srovnatelně v koloniích rostoucích na všech testovaných médiích. Pouze v přítomnosti selenanu i 2-bromooktanové kys. je zvýšená exprese genu *INO1* v porovnání s koloniemi rostoucími pouze v přítomnosti 2-bromooktanové kys. Selenan tedy ovlivňuje expresi *INO1* mechanismem nezávislým na Opi1p.
- Hladina mRNA *INO1* je u kmene *opi1Δ* mnohem vyšší než u kmene TEF-INO1.
- I když gen *INO1* pro buňku není esenciální, nepochybně jeho absence způsobuje změny v metabolismu. U kmene *ino1Δ* jsou geny *OPI3* a *FAS2* regulovány odlišně v porovnání s kmenem PORT.
- Je možné navázat experimenty testující působení 2-bromooktanové kys. jako možného léčiva proti kvasinkovým infekcím.

8 Použitá literatura

- Ahmed, S., Brickner, D. G., Light, W. H., Cajigas, I., McDonough *et al.* (2010). DNA zip codes control an ancient mechanism for gene targeting to the nuclear periphery. *Nature Cell Biology*, 12 (2), 111–120.
- Alber, T., Kawasaki, G. (1982). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1 (5), 419–434.
- Alcázar-Román, A. R., Tran, E. J., Guo, S., Wentz, S. R. (2006). Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nature Cell Biology*, 8 (7), 711–716.
- Ambroziak, J., Henry, S. A. (1994). *INO2* and *INO4* gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the *INO1* promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (21), 15344–15349.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M. A., Paravicini, G. (1994). Protein Kinase C in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (24), 16821–16828.
- Baillie, G. S., Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 397–403.
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *BBA - Molecular Cell Research*, 1793 (6), 933–940.
- Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312 (22), 315–321.
- Biswas, S., Talukder, G., Sharma, A. (2000). Chromosome damage induced by selenium salts in human peripheral lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 14, 405–408.
- Björnstedt, M., Odlander, B., Kuprin, S., Claesson, H.-E., & Holmgren, A. (1996). Selenite incubated with NADPH and mammalian thioredoxin reductase yields selenide, which inhibits lipoxygenase and changes the electron spin resonance spectrum of the active site iron. *Biochemistry*, 35 (26), 8511–8516.
- Brickner, D. G., Brickner, J. H. (2010). Cdk phosphorylation of a nucleoporin controls localization of active genes through the cell cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 3421–3432.
- Brickner, D. G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee *et al.* (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biology*, 5 (4), 704–716.
- Brickner, J. H., Walter, P. (2004). Gene recruitment of the activated *INO1* locus to the nuclear membrane. *PLoS Biology*, 2 (11), 1843–1853.
- Brückner, S., Mösch, H.-U. (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 25–58.
- Bumgarner, S. L., Dowell, R. D., Grisafi, P., Gifford, D. K., Fink, G. R. (2009). Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *PNAS*, 106 (43), 18321–18326.
- Cankorur-Cetinkaya, A., Dereli, E., Eraslan, S., Karabekmez, E., Dikicioglu, D., Kirdar, B. (2012). A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. *PLoS One*, 7(6), e38351.
- Cao, Y., Cao, Y., Xu, Z., Ying, K., Li, Y. *et al.* (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), 584–589.
- Carman, G. M., Henry, S. A. (1999). Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Progress in Lipid Research*, 38, 361–399.

- Caro, L. H. P., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F. J., van den Ende, H., Klis, F. M. (1997). In silico identification of plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *13*, 1477–1489.
- Clark, L. C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs Jr, G. F., Turnbull, B. W. *et al.* (1998). Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: Results of a double-blind cancer prevention trial. *British Journal of Urology*, *81*, 730–734.
- Cox, J. S., Chapman, R. E., Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *8*, 1805–1814.
- Cox, J. S., Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, *87*, 391–404.
- Culbertson, M. R., Donahue, T. F., Henry, S. A. (1976). Control of inositol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Properties of a repressible enzyme system in extracts of wild-type (Ino⁺) cells. *Journal of Bacteriology*, *126* (1), 232–242.
- Culbertson, M. R., Henry, S. A. (1975). Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *80*, 23–40.
- Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., Palková, Z. (2012). Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Molecular Cell*, *46*, 436–448.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M. L. A., Daran, J.-M., van Gulik, W., de Winde, J. H., Pronk, J. T. (2004). Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *279* (10), 9125–9138.
- Dean-Johnson, M., Henry, S. A. (1989). Biosynthesis of inositol in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *264* (2), 1274–1283.
- Deranieh, R. M., He, Q., Caruso, J. A., Greenberg, M. L. (2013). Phosphorylation regulates myo-inositol-3-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, *288* (37), 26822–26833.
- Deranieh, R. M., Shi, Y., Tarsio, M., Chen, Y., Michael, J., *et al.* (2015). Perturbation of the vacuolar-ATPase: A novel consequence of inositol depletion. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*, 27460–27472.
- Dilsiz, N., Celik, S., Yilmaz, Ö., Digrak, M. (1997). The effects of selenium, vitamin E and their combination on the composition of fatty acids and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Function*, *15*, 265–269.
- Divecha, N., Irvine, R. F. (1995). Phospholipid Signaling. *Cell*, *80*, 269–278.
- Donahue, T. F., Henry, S. A. (1981). myo-inositol-1-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, *256* (13), 7077–7085.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M., Snyder, M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *The Journal of Cell Biology*, *140* (3), 461–483.
- Ford, J., Odeyale, O., Shen, C.-H. (2008). Activator-dependent recruitment of SWI/SNF and INO80 during *INO1* activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *373*, 602–606.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62* (2), 334–361.
- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 107–123.
- Ganther, H. E. (1968). Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, *7* (8), 2898–2905.

- Ganther, H. E. (1971). Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry*, *10* (22), 4089–4098.
- Garlind, A., Cowburn, R. F., Forsell, C., Ravid, R., Winblad, B., Fowler, C. J. (1995). Diminished [³H]inositol(1,4,5)P₃ but not [³H]inositol(1,3,4,5)P₄ binding in Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, *681*, 160–166.
- Gietz, R. D., Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, *350*, 87–96.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*, *68*, 1077–1090.
- Greenberg, M. L., Goldwasser, P., Henry, S. A. (1982a). Characterization of a yeast regulatory mutant constitutive for synthesis of inositol-1-phosphate synthase. *Molecular and General Genetics*, *186*, 157–163.
- Greenberg, M. L., Klig, L. S., Letts, V. A., Loewy, B. S., Henry, S. A. (1983). Yeast mutant defective in phosphatidylcholine synthesis. *Journal of Bacteriology*, *153* (2), 791–799.
- Greenberg, M. L., Lopes, J. M. (1996). Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, *60* (1), 1–20.
- Greenberg, M. L., Reiner, B., Henry, S. A. (1982b). Regulatory mutations of inositol biosynthesis in yeast: Isolation of inositol-excreting mutants. *Genetics*, *100*, 19–33.
- Griac, P., Henry, S. A. (1999). The yeast inositol-sensitive upstream activating sequence, UAS_{INO}, responds to nitrogen availability. *Nucleic Acids Research*, *27* (9), 2043–2050.
- Groot, P. W. J. De, Hellingwerf, K. J., Klis, F. M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*, *20*, 781–796.
- Guo, C., Hsia, S., Shih, M., Hsieh, F., Chen, P. (2015). Effects of selenium yeast on oxidative stress, growth inhibition, and apoptosis in human breast cancer cells. *International Journal of Medical Sciences*, *12* (9), 748–758.
- Gutierrez, M., Choi, M. H., Tian, B., Xu, J., Rho, J. K. *et al.* (2013). Simultaneous inhibition of rhamnolipid and polyhydroxyalkanoic acid synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by 2- bromoalkanoic acids: effect of inhibitor alkyl-chain-length. *PLoS One*, *8* (9), e73986.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., Kitada, K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, *258*, 53–59.
- Han, S., Binns, D. D., Chang, Y., Goodman, J. M. (2015). Dissecting seipin function: the localized accumulation of phosphatidic acid at ER/LD junctions in the absence of seipin is suppressed by Sei1p^{ΔNterm} only in combination with Ldb16p. *BMC Cell Biology*, *16* (29), 1–13.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H.-P., Jacoby, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, *32* (4), 671–680.
- Hiltunen, J. K., Filppula, S. A., Koivuranta, K. T., Siivari, K., Qin, Y.-M., Häyrinen, H. M. (1996). Peroxisomal β-oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Annals New York Academy of Sciences*, *804* (1), 116–128.
- Hirsch, J. P., Henry, S. A. (1986). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (*INO1*) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, *6* (10), 3320–3328.
- Howell, D. C. (2002). *Statistical methods for psychology*. Cengage Learning.
- Huijberts, G. N. M., de Rijk, T. C., de Waard, P., Eggink, G. (1994). ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *Journal of Bacteriology*, *176* (6), 1661–1666.

- Huisman, G. W., de Leeuw, O., Eggink, G., Witholt, B. (1989). Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (8), 1949–1954.
- Cherest, H., Davidian, J.-C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W., Surdin-Kerjan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 145, 627–635.
- Christiano, R., Nagaraj, N., Fröhlich, F., Walther, T. C. (2014). Global proteome turnover analyses of the yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Cell Reports*, 9, 1959–1965.
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Imura, Y. (2004). *FLO11* is essential for floer formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 425–430.
- Jiranek, V., Graves, J. A., Henry, S. A. (1998). Pleiotropic effects of the *opi1* regulatory mutation of yeast: its effects on growth and on phospholipid and inositol metabolism. *Microbiology*, 144, 2739–2748.
- Ju, S., Shaltiel, G., Shamir, A., Agam, G., Greenberg, M. L. (2004). Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (21), 21759–21765.
- Karunanithi, S., Vadaie, N., Chavel, C. A., Birkaya, B., Joshi, J. *et al.* (2010). Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Current Biology*, 20, 1389–1395.
- Kice, J. L., Lee, T. W. S., Pan, S. (1980). Mechanism of the reaction of thiols with selenite. *Journal of American Chemical Society*, 102 (13), 4448–4455.
- Kieliszek, M., Blazejak, S., Bzducha-Wróbel, A., & Kurcz, A. (2016). Effects of selenium on morphological changes in *Candida utilis* ATCC 9950 yeast cells. *Biological Trace Element Research*, 169, 387–393.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Haraya, K., Kitamoto, H. K. (1995). Effect of cerulenin on the production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 17 (1), 25–30.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Haraya, K., Kitamoto, H. K. (1998). Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica*: Effect of β -oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. *Biotechnology Letters*, 20 (9), 813–818.
- Kitamura, N., Hashimoto, T., Nishino, N., Tanaka, C. (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites in the brain: Regional distribution, characterization, and alterations in brains of patients with Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 1, 181–187.
- Kodaki, T., Yamashita, S. (1987). Yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (32), 15428–15435.
- Kruskal, W. H., Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47 (260), 583–621.
- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O. *et al.* (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300, 1439–1443.
- Kuchin, S., Vyas, V. K., Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (12), 3994–4000.
- Kunau, W.-H., Dommes, V., Schulz, H. (1995). β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in Lipid Research*, 34 (4), 267–342.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology*, 47 (3), 745–754.

- Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J., Pretorius, I. S. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 8419–8424.
- Larabee, J. L., Hocker, J. R., Hanas, J. S. (2009). Mechanisms of inhibition of zinc-finger transcription factors by selenium compounds ebselen and selenite. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 419–426.
- Larabee, J. L., Hocker, J. R., Hanas, R. J., Kahn, F. M., Hanas, J. S. (2002). Inhibition of zinc finger protein-DNA interactions by sodium selenite. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1757–1765.
- Lazard, M., Blanquet, S., Fisicaro, P., Labarraque, G., Plateau, P. (2010). Uptake of selenite by *Saccharomyces cerevisiae* involves the high and low affinity orthophosphate transporters. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (42), 32029–32037.
- Lee, H., Choi, M. H., Kim, T., Yoon, S. C. (2001). Accumulation of polyhydroxyalkanoic acid containing large amounts of unsaturated monomers in *Pseudomonas fluorescens* BM07 utilizing saccharides and its inhibition by 2-bromooctanoic acid. *Applied an Enviromental Microbiology*, 67 (11), 4963–4974.
- Levene, H. (1961). Robust tests for equality of variances. *Contributions to Probability and Statistics. Essays in Honor of Harold Hotelling*, 279–292.
- Li, F., Palecek, S. P. (2003). *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryotic Cell*, 2 (6), 1266–1273.
- Li, S. C., Diakov, T. T., Xu, T., Tarsio, M., Zhu, W., et al. (2014). The signaling lipid PI(3,5)P₂ stabilizes V₁-V₀ sector interactions and activates the V-ATPase. *Molecular Biology of the Cell*, 25 (8), 1251–1262.
- Light, W. H., Brickner, D. G., Brand, V. R., Brickner, J. H. (2010). Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and *INO1* transcriptional memory. *Molecular Cell*, 40, 112–125.
- Liu, H., Styles, C. A., Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 144, 967–978.
- Lo, W. S., Dranginis, A. M. (1996). *FLO11*, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *Journal of Bacteriology*, 178 (24), 7144–7151.
- Lo, W. S., Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 161–171.
- Loewen, C. J. R., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis et al. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*, 304, 1644–1647.
- Loewen, C. J. R., Roy, A., Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal*, 22 (9), 2025–2035.
- Lund, M. K., Kress, T. L., Guthrie, C. (2008). Autoregulation of Npl3, a yeast SR protein, requires a novel downstream region and serine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 28 (11), 3873–3881.
- Macbeth, M. R., Schubert, H. L., VanDemark, A. P., Lingam, A. T., Hill, C. P., Bass, B. L. (2005). Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*, 309, 1534–1539.
- Madhani, H. D., Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science*, 275, 1314–1317.
- Majumder, A. L., Chatterjee, A., Dastidar, K. G., Majee, M. (2003). Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase. *FEBS Letters*, 553, 3–10.
- Majumder, A. L., Johnson, M. D., Henry, S. A. (1997). 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1348, 245–256.

- Martin, T. F. J. (2001). PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 493–499.
- Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., *et al.* (1996). Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*, 379, 168–171.
- McGraw, P., Henry, S. A. (1989). Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae opi3* gene: Effects on phospholipid methylation, growth and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics*, 122, 317–330.
- Migaud, M. E., Frost, J. W. (1996). Elaboration of a general strategy for inhibition of myo-inositol 1-phosphate synthase: active site interactions of analogues possessing oxidized reaction centers. *Journal of American Chemical Society*, 118 (3), 495–501.
- Michell, R. H. (2007). Evolution of the diverse biological roles of inositols. *Biochemical Society Symposia*, 74, 223–246.
- Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibatá-Ombetta, S., Gaillardin, C. *et al.* (2004). Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan β -mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein β -mannosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (46), 47952–47960.
- Mohamed, A. H., Chirala, S. S., Mody, N. H., Huang, W.-Y., Wakil, S. J. (1988). Primary structure of the multifunctional α subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from *FAS2* gene sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (25), 12315–12325.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C. (2015). Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiology*, 46, 25–33.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.-J., Sambrook, J. F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO Journal*, 11 (7), 2583–2593.
- Murray, M., Greenberg, M. L. (2000). Expression of yeast *INM1* encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Molecular Microbiology*, 36 (3), 651–661.
- Nevoigt, E., Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 231–241.
- Nikawa, J.-I., Tsukagoshi, Y., Yamashita, S. (1991). Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (17), 11184–11191.
- Nunez, L. R., Jesch, S. a, Gaspar, M. L., Almaguer, C., Villa-Garcia, M. *et al.* (2008). Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (49), 34204–17.
- O'Donnell, T., Rotzinger, S., Nakashima, T. T., Hanstock, C. C., Ulrich, M., Silverstone, P. H. (2000). Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Brain Research*, 880, 84–91.
- Palková, Z., Váchová, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 806–824.
- Palmer, R. J., White, D. C. (1997). Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology*, 5 (11), 435–440.
- Pavličková, M. (2014). Pleiotropní účinky transkripčního faktoru Opi1 u *Saccharomyces cerevisiae*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha.
- Pittet, M., Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771 (3), 405–420.
- Polakis, E. S., Bartley, W., Meek, G. A. (1965). Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. *The Biochemical Journal*, 97 (1), 298–302.

- Rainbow, C. (1966). Flocculation of brewer's yeast. *Process Biochem.*, 1, 489–492.
- Rehm, B. H. A., Krüger, N., Steinbüchel, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (37), 24044–24051.
- Reynolds, T. B. (2006). The Opi1p transcription factor affects expression of *FLO11*, mat formation, and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5 (8), 1266–1275.
- Reynolds, T. B., Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291, 878–881.
- Roberts, R. L., Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development*, 8, 2974–2985.
- Robertson, L. S., Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13783–13787.
- Rogers, P. D., Barker, K. S. (2003). Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (4), 1220–1227.
- Rossetti, I. B., Rocha, J. B. T., Costa, M. S. (2015). Diphenyl diselenide (PhSe)₂ inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 289–295.
- Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N., Kurjan, J. (1991). The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular and Cellular Biology*, 11 (8), 4196–4206.
- Rudge, S. A., Anderson, D. M., Emr, S. D. (2004). Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P₂ levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P₂-specific phosphatase. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 24–36.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H., Madhani, H., Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *The EMBO Journal*, 18 (5), 1257–1269.
- Santiago, T. C., Mamoun, C. Ben. (2003). Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (40), 38723–38730.
- Santos, A. X. S., Riezman, H. (2012). Yeast as a model system for studying lipid homeostasis and function. *FEBS Letters*, 586, 2858–2867.
- Seko, Y., Imura, N. (1997). Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. *Biomedical and Environmental Sciences : BES*, 10 (2-3), 333–339.
- Sethi, S., Brietzke, E. (2017). Recent advances in lipidomics: analytical and clinical perspectives. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 128-129, 8–16.
- Shamu, C. E., Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal*, 15 (12), 3028–3039.
- Shapiro, S. S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52 (3), 591–611.
- Shetty, H. U., Schapiro, M. B., Holloway, H. W., Rapoport, S. I. (1995). Polyol profiles in Down syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 542–546.
- Shi, Y., Azab, A. N., Thompson, M. N., Greenberg, M. L. (2006). Inositol phosphates and phosphoinositides in health and disease. *Biology of Inositols and Phosphoinositides*, 263–290.

- Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R. H., Hyde, T. M., Kleinman, J. E. (1997). Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 154 (8), 1148–1150.
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The Journal of Nutrition*, 130 (7), 1653–1656.
- Schrauzer, G. N. (2001). Nutritional selenium supplements: Product types, quality, and safety. *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (1), 1–4.
- Schröder, M., Chang, J. S., Kaufman, R. J. (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes & Development*, 14, 2962–2975.
- Schüller, H. J., Hahn, A., Tröster, F., Schütz, A., Schweizer, E. (1992a). Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *The EMBO Journal*, 11 (1), 107–114.
- Schüller, H. J., Richter, K., Hoffmann, B., Ebbert, R., Schweizer, E. (1995). DNA binding site of the yeast heteromeric Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix transcription factor: structural requirements as defined by saturation mutagenesis. *FEBS Letters*, 370, 149–152.
- Schüller, H. J., Schorr, R., Hoffmann, B., Schweizer, E. (1992b). Regulatory gene *INO4* of yeast phospholipid biosynthesis is positively autoregulated and functions as a trans-activator of fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 20 (22), 5955–5961.
- Sidrauski, C., Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90, 1031–1039.
- Stein, A. J., Geiger, J. H. (2002). The crystal structure and mechanism of 1-L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (11), 9484–9491.
- Steiner, S., Philippson, P. (1994). Sequence and promoter analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular and General Genetics*, 242 (3), 263–271.
- Stratford, M. (1989). Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast biochemistry*, 441–445.
- Stratford, M. (1994). Genetic aspects of yeast flocculation: in particular, the role of *FLO* genes in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 151–158.
- Strittmatter, A. W., Fischer, C., Kleinschmidt, M., Braus, G. H. (2006). *FLO11* mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal *RPS26* genes. *Molecular & General Genetics*, 276, 113–125.
- Summers, E. F., Letts, V. A., McGraw, P., Henry, S. A. (1988). *Saccharomyces cerevisiae cho2* mutants are deficient in phospholipid methylation and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics*, 120, 909–922.
- Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cellular Microbiology*, 4 (8), 461–469.
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J. et al. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 10, 676–682.
- Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., Palková, Z. (2010). General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 1012–1022.
- Tarze, A., Dauplais, M., Grigoras, I., Lazard, M., Ha-Duong, N.-T. et al. (2007). Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (12), 8759–8767.

- Tseng, S. S.-I., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M., Chang, T. (1998). Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. *The EMBO Journal*, 17 (9), 2651–2662.
- Vaden, D. L., Ding, D., Peterson, B., Greenberg, M. L. (2001). Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast *INO1* and *INO2* genes for inositol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (18), 15466–15471.
- Váchová, L., Kučerová, H., Devaux, F., Úlehlová, M., Palková, Z. (2009). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental Biology*, 11 (2), 494–504.
- Váchová, L., Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *The Journal of Cell Biology*, 169 (5), 711–717.
- Vance, D., Goldberg, I., Mitsuhashi, O., Bloch, K. (1972). Inhibition of fatty acid synthetases by the antibiotic cerulenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48 (3), 649–656.
- Voordeckers, K., de Maeyer, D., van der Zande, E., Vinces, M. D., Meert, W. *et al.* (2012). Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Molecular Microbiology*, 86 (1), 225–239.
- Voynov, V., Verstrepen, K. J., Jansen, A., Runner, V. M., Buratowski, S., Fink, G. R. (2006). Genes with internal repeats require the THO complex for transcription. *PNAS*, 103 (39), 14423–14428.
- Wallenberg, M., Misra, S., Björnstedt, M. (2014). Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114, 377–386.
- Warsh, J. J., Politsky, J. M., Li, P. P., Kish, S. J., Hornykiewicz, O. (1991). Reduced striatal [³H]inositol 1,4,5-trisphosphate binding in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 56 (4), 1417–1422.
- Wickner, R. B., Ridley, S. P., Fried, H. M., Ball, S. G. (1982). Ribosomal protein L3 is involved in replication or maintenance of the killer double-stranded RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 4706–4708.
- Wolf, J. J., Dowell, R. D., Mahony, S., Rabani, M., Gifford, D. K., Fink, G. R. (2010). Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics*, 185, 513–522.
- Wycherly, B. J., Moak, M. A., Christensen, M. J. (2004). High dietary intake of sodium selenite induces oxidative DNA damage in rat liver. *Nutrition and Cancer*, 48 (1), 78–83.
- Yang, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B. *et al.* (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 3 (3), 123–130.
- York, J. D., Odom, A. R., Murphy, R., Ives, E. B., Wenthe, S. R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science*, 285, 96–100.
- York, S. J., Armbruster, B. N., Greenwell, P., Petes, T. D., York, J. D. (2005). Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (6), 4264–4269.
- Zara, G., Goffrini, P., Lodi, T., Zara, S., Mannazzu, I., Budroni, M. (2012). *FLO11* expression and lipid biosynthesis are required for air-liquid biofilm formation in a *Saccharomyces cerevisiae* flor strain. *FEMS Yeast Research*, 12, 864–866.
- Zara, S., Bakalinsky, A. T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M. A., Budroni, M. (2005). *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 2934–2939.