

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



Disertační práce

**Kvasinkové kolonie jako model
mnohobuněčného chování mikroorganismů**

Martin Kuthan

Školitel: doc. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha 2006

Poděkování

Tato práce vznikla pod vedením mé školitelky Zdeny Palkové, které bych tímto rád poděkoval zejména za optimistický přístup, rady a mnoho času, jenž mi věnovala. Děkuji všem členům laboratoře Yeast Colony Group za skvělé pracovní prostředí, humornou atmosféru a příjemnou společnost jak při práci tak i při degustaci produktů kvasinkového metabolismu.

Velký dík patří mým nejbližším za jejich morální i materiální podporu a hlavně obrovskou trpělivost.

Tato práce byla podporována granty 204/99/1196, 204/02/0650 Grantové agentury ČR, grantem 141/2001/B-BIO/PrF Grantové agentury UK, granty J13/98:113100003 a LC531 MŠMT, grantem IAA500200506 Grantové agentury AVČR, grantem EMBO-YIP, nadací Preciosa a grantem The DuPont Young Faculty Fellowship.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	- 3 -
ÚVOD	- 4 -
PŘEHLED LITERATURY	- 5 -
Dimorfizmus kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 5 -
Signální dráhy účastníci se přepínání na pseudohyfální růst	- 6 -
MAPK signalizace	- 6 -
Vliv genetického pozadí	- 7 -
Společné komponenty MAPK drah	- 8 -
Feromonová dráha a pseudohyfální růst	- 8 -
Amplifikace signálu	- 10 -
Aktivace transpozonů	- 10 -
cAMP-PKA dráha	- 10 -
Cílové geny	- 11 -
Vliv genetického pozadí	- 12 -
Interakce drah	- 12 -
Upstream komponenty	- 14 -
Další regulace filamentárního růstu	- 18 -
Kaskáda transkripčních faktorů	- 19 -
Buněčný cyklus	- 21 -
Nutriční a environmentální vlivy	- 22 -
Fyzické vlivy	- 23 -
Kontrola morfologických změn	- 24 -
Adhezivita a invazivita	- 24 -
Pučení	- 26 -
Morfologie buněk	- 26 -
Filamentální růst: výjimka či pravidlo?	- 26 -
PUBLIKACE	- 28 -
Variabilní genová exprese v buňkách kvasinkových kolonií	- 29 -
Aminokyseliny ovlivňují pulzy amoniaku v kvasinkových koloniích.	- 30 -
Domestikace divokého kmene <i>Saccharomyces cerevisiae</i> je doprovázena změnami genové exprese a morfologie kolonií	- 31 -
ZÁVĚR	- 32 -
SEZNAM LITERATURY	- 33 -

Seznam zkratk

ADP	adenozin difosfát
ATP	adenozin trifosfát
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
FRE	Filamentation and invasive Response Element, sekvence v promotorech genů důležitých pro filamentární růst
GAP	GTPázu aktivující protein
GDP	guanosin difosfát
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor, faktor odstraňující GDP z G-proteinů
GPI	glykozylfosfatidylinozitol
GTP	guanosin trifosfát
MAPK	mitogeny aktivovaná kináza
MAPKK	kináza MAP kinázy
MAPKKK	kináza kinázy MAP kinázy
MAT	expresní lokus nesoucí geny specifické pro párovací typ
ORF	otevřený čtecí rámeček
PKA	protein kináza A

Úvod

V průběhu posledních dvou desetiletí zasahuje výzkum jednobuněčných mikroorganismů stále častěji do jejich ekologie. A právě u těchto studií se ukazuje, že pomyslná hranice mezi mnohobuněčnými a jednobuněčnými organizmy je stále méně a méně zřetelná. Neostrost této hranice bych rád ukázal i čtenářům této práce.

V naší laboratoři se již delší dobu zabýváme studiem mnohobuněčného chování kvasinek v rámci projektu "Studium morfologie a vývoje kvasinkových kolonií a signalizace mezi individuálními koloniemi". Kolonie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vznikají pouhým dělením buněk, analogicky jako tkáně u vyšších organismů. Protože je morfologie kvasinkových kolonií za daných podmínek typická pro daný rod, druh a dokonce kmen, lze kromě vlivu fyzikálních faktorů očekávat i přítomnost mezibuněčných signálů. Modulace rychlosti a orientace dělení buněk prostřednictvím extracelulárních signálů je jednou z obecných strategií diferenciací u živých organismů. Mezibuněčná signalizace může vést ke vzniku nových mezibuněčných kontaktů a třírozměrných struktur a tvarů. Studium mechanismů jejichž prostřednictvím jsou modulovány dělení a růst kvasinkových buněk může přinést odpovědi i na základní vývojové procesy mnohobuněčných organismů.

Publikace, které jsou součástí této disertační práce se týkají problematiky výzkumu kvasinkových kolonií v naší

laboratoři a volně navazují na pilotní práci mé školitelky týkající amoniakové signalizace mezi kvasinkovými koloniemi (PALKOVA *et al.* 1997). První práce, na které jsem se spoluautorsky podílel, se zabývá hledáním genů hrajících roli ve vývoji kvasinkových kolonií (MINARIKOVA *et al.* 2001). Další práce sleduje vliv aminokyselin na amoniakovou signalizaci u kolonií kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida mogii* (ZIKANOVA *et al.* 2002). Třetí publikace je věnována výzkumu kolonií divokých izolátů *S. cerevisiae*, u kterých dochází k přepínání fenotypů a ke ztrátě extracelulární matrix při jejich domestikaci v laboratorních podmínkách (KUTHAN *et al.* 2003). Protože je naše výzkumná problematika poměrně široká, zaměřím se v literárním přehledu mé disertační práce na dimorfismus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, fenomén související s naším aktuálním studiem divokých kmenů této kvasinky.

Přehled literatury

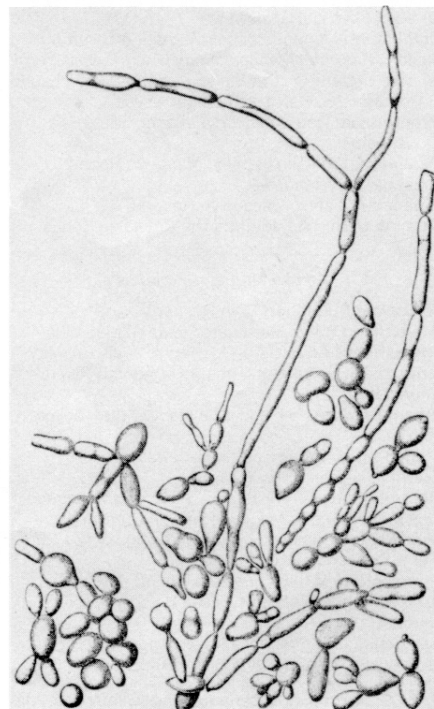
Dimorfismus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Zástupci říše hub si v průběhu evoluce vytvořili důmyslné mechanismy, umožňující těmto organismům reagovat na signály z vnějšího prostředí změnou fyziologie, morfologie a adhezivitu buněk. Jednou z možných reakcí na nedostatek živin a jiné stresové faktory je zastavení růstu a tvorba odolných spor. Druhou možností je dimorfická proměna na filamentární formu, charakteristickou vznikem řetízků elongovaných buněk nebo hyf. Dimorfismus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a hub všeobecně, má velký význam v ekologii těchto organismů. Filamentární růst je důležitá adaptační odpověď kolonií hub při pohlavním rozmnožování, vyhledávání zdrojů živin a obsazování nových nik, kompenzující nepřítomnost pohybového aparátu u této skupiny organismů a minimalizující množství energie investované do biomasy. Výhodný poměr povrch/objem navíc ulehčuje transport živin do buněk.

Dimorfická proměna může být vyvolána širokým spektrem podnětů z okolního prostředí. U patogenních organismů je přísně regulována, takže po kontaktu s hostitelem dochází k elongaci buněk a zvýšení adhezivitu patogena (SANCHEZ-MARTINEZ and PEREZ-MARTIN 2001). Regulovaný dimorfismus je klíčovým virulencním faktorem ovlivňujícím kolonizaci hostitele patogenními organismy jakými jsou *Candida albicans*, *Magnaporthe grisea*

a *Ustilago maydis* (LENGELER *et al.* 2000; SANCHEZ-MARTINEZ and PEREZ-MARTIN 2001).

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se obvykle vyskytuje ve formě pučících kvasinkových buněk, ale již velmi dávno (HANSEN 1886) byly popsány případy vláknitého růstu této kvasinky (obr. 1). Většina laboratorních kmenů však roste téměř výhradně ve formě samostatně pučících buněk. Důvodem je domestikace této kvasinky v laboratořích, takže filamentární růst byl "znovuobjeven" jen poměrně nedávno.



Obr. 1 Hansenovo vyobrazení ukazující filamentární růst *Saccharomyces cerevisiae*. [zdroj (ZOPF 1890), obr. 113, str. 421]

V práci z roku 1992 popisuje Gimeno *et al.*, že hladovění na dusík vyvolá u

diploidů *S. cerevisiae* tvorbu pseudohyfy (GIMENO *et al.* 1992). Pro růst buněk v kvasinkové formě je charakteristický ovální tvar buněk, asymetrické a bipolární pučení buněk a jejich oddělování po mitóze. Při pseudohyfálním růstu se buňky prodlužují, pučí synchronizovaně a unipolárně, dceřiné buňky se po mitóze neoddelují od mateřských a tak vznikají řetízky buněk nazývané pseudohyfy (GIMENO *et al.* 1992; KRON *et al.* 1994). Filamentální růst haploidních buněk je často označován pojmem invazivní růst, protože řetízky buněk pronikají do agaru pod kolonii. Toto označení však neznamená, že by diploidi nebyli schopni penetrovat do agaru nebo že by haploidi netvořili pseudohyfy (BARDWELL *et al.* 1998b; LIU *et al.* 1996; MOSCH and FINK 1997).

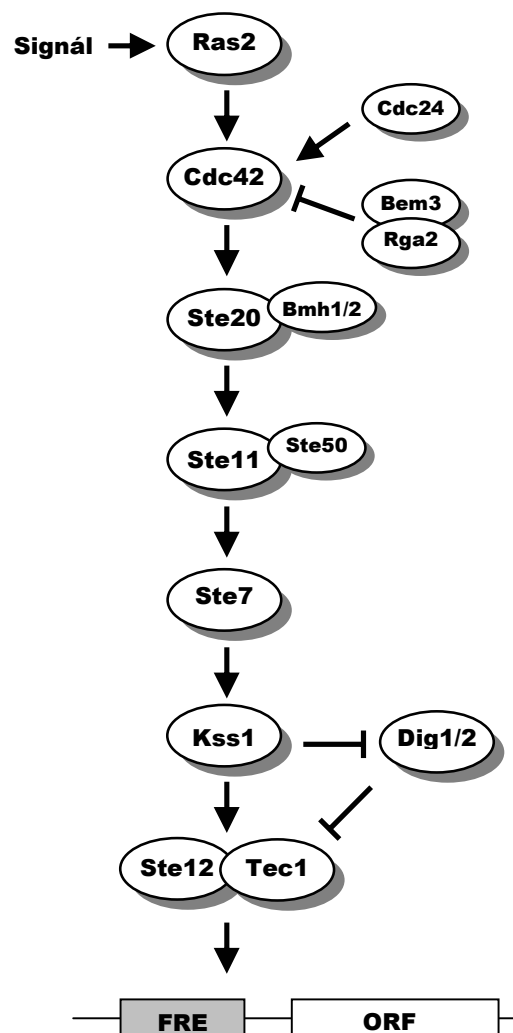
Signální dráhy účastníci se přepínání na pseudohyfální růst

Přepnutí na pseudohyfální růst vyžaduje dvě klasické signální dráhy: MAP kinázovou dráhu, která zároveň funguje i při párování haploidních buněk opačného párovacího typu a cAMP-PKA dráhu monitorující dostupnost živin. Ústřední úlohu při přepnutí na pseudohyfální růst má GTP-vazebný protein Ras2. Permanentně aktivovaná alela *Ras2^{Val19}* způsobující pokles GTPázové aktivity vyvolá zvýšení pseudohyfálního růstu diploidů (GIMENO *et al.* 1992; MOSCH *et al.* 1996) a invazivní růst haploidů (MOSCH *et al.* 1999). Dusíkové hladovění vyvolá u diploidních kmenů genotypu *ras2ras2* pseudohyfální růst, avšak buňky nejsou elongované ale kulaté. Naproti tomu haploidní kmeny

genotypu *ras2* nejsou vůbec schopny růst invazivně (MOSCH *et al.* 1999).

MAPK signalizace

Po přijetí signálu aktivovaný Ras2 aktivuje GEF Cdc24 (obr. 2). Tento faktor umožní tvorbu GTP vázící formy Cdc42 (PETER *et al.* 1996) čímž ji aktivuje. Hydrolýzu GTP na Cdc42 stimuluje GAP proteiny Bem3 a Rga1 (STEVENSON *et al.* 1995; ZHENG *et al.* 1994).



Obr. 2 MAP kinázová dráha vedoucí k filamentárnímu růstu. Cílem signální kaskády jsou geny obsahující v promotorové sekvenci FRE elementy (např. gen *FLO11*).

Aktivovaná forma Cdc42 interaguje s protein kinázou Ste20 (LEBERER *et al.* 1997; PETER *et al.* 1996) a odstraní její negativní regulátor Hsl7 (FUJITA *et al.* 1999). Ste20 předává signál dále přes MAPKK kinázu Ste11, MAPK kinázu Ste7 a MAP kinázu Kss1 (COOK *et al.* 1997; LIU *et al.* 1993; MADHANI *et al.* 1997). MAP kináza Kss1 je schopna aktivovat i inhibovat pseudohyální růst. Nefosforylovaná forma Kss1 váže transkripční faktor Ste12 a jeho represory Dig1 a Dig2 (BARDWELL *et al.* 1998a; COOK *et al.* 1996) Aktivovaná fosforylovaná forma Kss1 fosforyluje Ste12 a jeho represory Dig1 a Dig2 které disociují a umožní aktivaci exprese genů ovlivňovaných Ste12. Protože část této signální kaskády je společná s feromonovou signalizací, je pro specifitu signálu důležitá MAP kináza. U mutantů *fus3Δ*, s deletovanou MAP kinázou pro feromonovou signalizaci, je MAP kináza Kss1 schopna zastoupit funkci Fus3. Tato substituce však odstraní specifitu signálu: feromonová dráha stimuluje současně párování i filamentální růst (MADHANI *et al.* 1997). V kmenu $\Sigma 1278b$ je Dig1 hlavním negativním regulátorem pseudohyálního růstu, deleční mutanti *dig1Δ* mají výrazně zvýšenou invazivitu (BREITKREUTZ *et al.* 2003). U laboratorních kmenů odvozených od W303 a S288C vyvolá delece *dig1Δ* jen mírnou elongaci buněk. Dvojitá delece *dig1Δdig2Δ* vede k výrazné invazivitě u všech kmenů.

Vliv genetického pozadí

Porovnání transkripčních profilů ukázalo, že laboratorní kmen W303 má ve srovnání s kmenem $\Sigma 1278b$

změněnou expresi více než 600 genů (BREITKREUTZ *et al.* 2003). Velká variabilita exprese byla pozorována i při srovnání expresních profilů vinařských izolátů *S. cerevisiae* (CAVALIERI *et al.* 2000) Transkripční profil dvojitého delečního mutanta *dig1Δdig2Δ* v kmenu S288C je velmi podobný feromonem indukovanému transkripčnímu profilu. Ve srovnání s feromonem indukovaným transkripčním profilem vykazuje transkripční profil dvojitého delečního mutanta *dig1Δdig2Δ* odvozeného od kmene $\Sigma 1278b$ vysokou indukci 25 genů (BREITKREUTZ *et al.* 2003). Z této skupiny genů je nejsilněji indukován gen *FLO10*, odpovědný za flokulaci a invazivitu (GUO *et al.* 2000), a gen *PGU1*, kódující pektinázu (MADHANI *et al.* 1999). Dalším zajímavým zjištěním je, že delece *dig1Δdig2Δ* v kmenu $\Sigma 1278b$ indukuje skupiny genů aktivované poškozením DNA nebo replikačním stresem (HUGHES *et al.* 2000). Je proto možné, že transkripční regulátory Dig1 a Dig2 hrají roli při udržování stability genomu. Již před časem bylo popsáno spojení genů regulovaných MAP kinázou Kss1 s transpozicí a transkripcí *Ty* elementů (MORILLON *et al.* 2000). Mobilizace transpozonů *Ty* by mohla být mechanismem umožňujícím adaptivní mutagenezi za stresových podmínek (DUNHAM *et al.* 2002). Protože se pomocí analýz transkriptomu nenašly transkripční profily specifické pro filamentální růst (BREITKREUTZ *et al.* 2003), je velmi pravděpodobné, že těžiště regulace filamentálního růstu leží na posttranskripční úrovni.

Společné komponenty MAPK dráh

Feromony aktivují MAPK dráhu přes Ste20/Ste11/Ste7. Vysoká osmolarita prostředí způsobí aktivaci Ste11 pravděpodobně přes osmoreceptor Sho1 (DAVENPORT *et al.* 1999; O'ROURKE and HERSKOWITZ 1998; POSAS and SAITO 1997). Stejně jako diploidi jsou i haploidi schopni filamentárního růstu, přičemž využívají komponenty MAPK dráhy kontrolující pseudohyální růst diploidů (ROBERTS and FINK 1994). Nízké koncentrace α -feromonu indukují invazivní růst MAT α buněk (ERDMAN and SNYDER 2001; ROBERTS *et al.* 2000). Invazivní růst haploidů vyžaduje Ste12 a Tec1, naproti tomu invazivní růst vyvolaný feromonem je nezávislý na Tec1.

Při pseudohyálním růstu ovlivňují MAPK dráhu kromě Ras2 a Cdc42 ještě další proteiny. S kinázou Ste20 asociují proteiny Bmh1 a Bmh2 patřící do rodiny 14-3-3 proteinů (LEBERER *et al.* 1997). Uplatňují se při elongaci buněk, neovlivňují však samotný invazivní růst (ROBERTS *et al.* 1997). Na Ste11 MAPK kinázu se váže Ste50 a jeho delece vede k poruchám pseudohyálního růstu (RAMEZANI RAD *et al.* 1998). Na úrovni interakcí mezi Ste11 a Ste50 je propojena feromonová MAPK dráha s MAPK dráhou pro filamentární růst a se Sho1-HOG dráhou pro osmosensing (obr. 3). Proteiny Ste50 a Ste11 spolu interagují prostřednictvím N-koncové domény SAM, jejíž mutace vede k "přetečení" signálu z jedné dráhy do druhé (JANSEN *et al.* 2001). Protein Ste50 asociuje svou C-koncovou RA doménou s Cdc42 a funguje jako adaptor umožňující navedení komplexu Ste11-Ste50 na

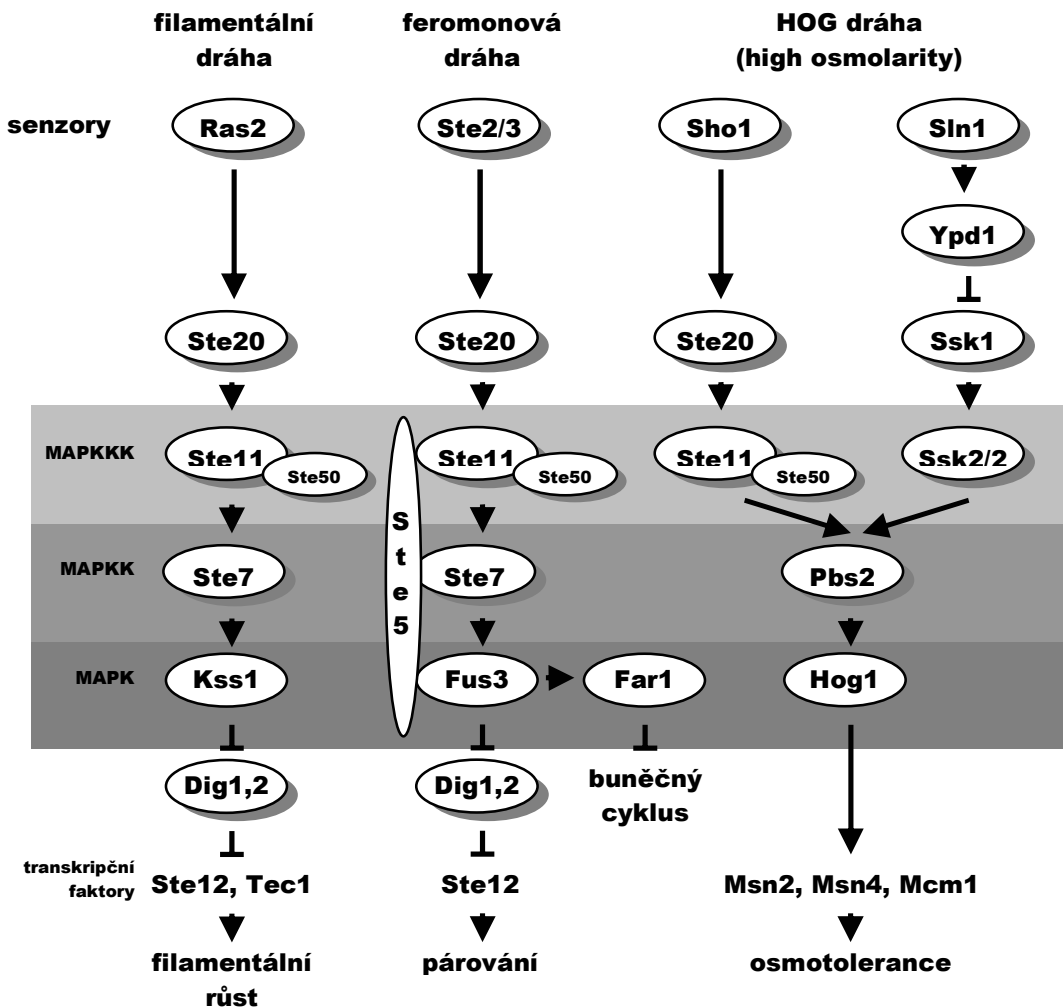
membránu a jeho interakci s aktivovaným Ste20 (TRUCKSES *et al.* 2006).

Feromonová dráha a pseudohyální růst

Pro pseudohyální růst diploidů nejsou vyžadovány žádné z upstream komponentů feromonové dráhy (LIU *et al.* 1993). Avšak samotný feromon je schopen vyvolat filamentární růst haploidů (ERDMAN and SNYDER 2001). Nízké koncentrace feromonu způsobí, že se buňky začnou prodlužovat a počet polárně na distálních koncích za vzniku filamentárních útvarů. Kinetika pučení je ale podobná pučení vegetativních buněk, mateřská buňka pučí před dceřinou buňkou. Pro feromonem indukovaný filamentární růst jsou vyžadovány komponenty jak feromonové tak i filamentární MAPK dráhy. Kromě toho jsou vyžadovány geny *BUD1* a *BUD8*, odpovědné za polaritu pučení a geny *SPA2* a *SLK1*, potřebné pro feromonem indukovanou morfogenezi (ERDMAN and SNYDER 2001). Nedávné výsledky ukázaly, že delece genu *ISW2* a *ITC1* indukují invazivní růst MAT α buněk v kmenu odvozeném od BY (TRACHTULCOVA *et al.* 2004). Produkty genů *ISW2* a *ITC1* jsou součástí komplexu remodelujícího chromatin. Remodelační komplex Isw2-Itc1 ovlivňuje dostupnost chromatinu pro transkripční aparát a tím reguluje expresi širokého spektra genů (FAZZIO *et al.* 2001). Takto indukovaný invazivní růst závisí na MAPK dráze, ale je nezávislý na Tec1 a Flo11 (TRACHTULCOVA *et al.* 2004). Protein Isw2 hraje úlohu v represí a-specifických genů (RUIZ *et al.* 2003). Deleční mutant *isw2 Δ* má zvýšenou

hladinu α -specifických genů *STE6*, *STE2* a *BIR1*. Invazivní růst vyvolaný absencí chromatin remodelujícího komplexu Isw2-Itc1 je proto následkem aktivace feromonové dráhy (TRACHTULCOVA *et al.* 2004). Invazivně rostoucí buňky kmene $\Sigma 1278b$ tvoří shluky složené z řetězků elongovaných buněk. Naproti

tomu buňky s mutacemi *isw2 Δ* a *itc1 Δ* v kmenu odvozeném od BY vrůstají do agaru individuálně nebo ve shlucích bez toho, aby tvořily řetězky. Kromě toho mají tito mutanti často aberantní morfologii buněk.



Obr. 3 Schéma signálních kaskád pro filamentární růst, párování a adaptaci na vysokou osmolaritu prostředí. Každá z těchto drah obsahuje některé společné komponenty MAP kinázového modulu. Signál vstupuje do filamentární MAPK dráhy přes protein Ras2 a osmosenzor Sho1, výsledkem je aktivovaná MAP kináza Kss1 a aktivovaný transkripční komplex Ste12/Tec1. Párovací feromony aktivují při párování receptory Ste2 a Ste3. Poté je uvolněna G $\beta\gamma$ podjednotka (Ste4/Ste18) G-proteinu a aktivována MAPK kaskáda. MAP kináza Fus3 aktivuje jak expresi genů zprostředkovanou transkripčním faktorem Ste12 tak i zastavení buněčného cyklu v G1 fázi zprostředkované fosforylací inhibitoru cyklin dependentní kinázy Far1 (CHANG and HERSKOWITZ 1990; PETER *et al.* 1993). Hypertonický šok aktivuje Sho1 a negativně reguluje Sln1. Tím se aktivuje MAP kinázový modul s MAP kinázou Hog1, která aktivuje transkripční faktory Msn2, Msn4 a Mcm1 (GORNER *et al.* 1998; KUO *et al.* 1997; O'ROURKE and HERSKOWITZ 1998).

Amplifikace signálu

V promotorech více genů důležitých pro pseudohyfální růst se nacházejí sekvence nazývané FRE (Filamentation and invasive Response Element) (MADHANI and FINK 1997) Jsou tvořeny dvojicí sousedících vazebních míst pro transkripční faktory Ste12 a Tec1. I v promotoru samotného genu *TEC1* se nachází FRE element. Prostřednictvím MAPK dráhy je aktivován pozitivní zpětnou vazbou jednak samotný *TEC1* a současně i cílové geny, takže signál pro pseudohyfální růst je amplifikován na transkripční úrovni.

Aktivace transpozonů

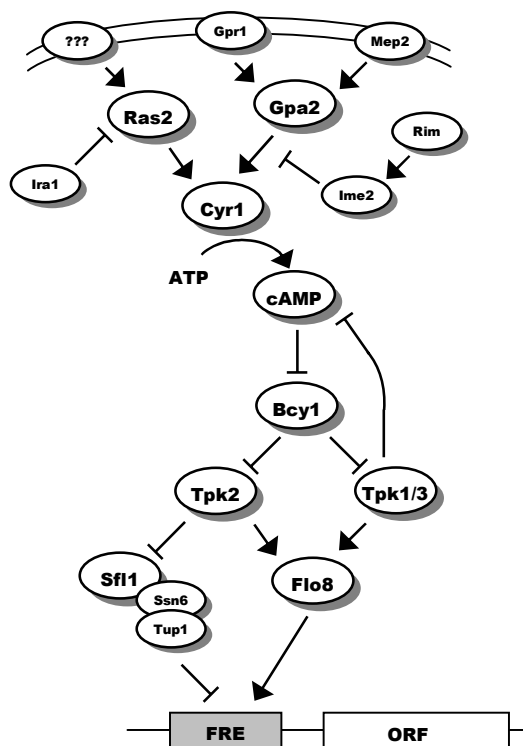
Kvasinkový retrotranspozon *Ty1* obsahuje FRE element, ležící netradičně downstream od TATA boxu v ORF *TY1A*. Tento FRE element působí jako downstream aktivační sekvence pro transkripci *Ty1* (FULTON *et al.* 1988). Transkripce a aktivita *Ty1* retrotranspozonu je regulována feromonovou a pseudohyfální MAPK dráhou. V diploidech hladovějících na dusík aktivuje *Kss1* transkripci a transpozici *Ty1* prostřednictvím Ste12 a Tec1 (MORILLON *et al.* 2000), MAP kináza feromonové dráhy Fus3 inhibuje jak invazivní růst haploidů tak i transpozici *Ty1* (CONTE and CURCIO 2000). To, že je retrotranspozice aktivována environmentálním signálem ovlivňujícím diferenciaci by mohlo znamenat, že jde o adaptační odpověď na stres. Integrace *Ty1* totiž může dostat sousední geny pod kontrolu Tec1 a Ste12, což by mohlo poskytnout buňkám selektivní výhodu. Protože aktivace retrotranspozonů za stresových podmínek byla pozorována i u bakterií

a vyšších eukaryot (EICHENBAUM and LIVNEH 1998; WESSLER 1996), jde zřejmě o všeobecně rozšířený mechanismus evoluce genomů.

cAMP-PKA dráha

Aktivovaný Ras2 interaguje s adenylát cyklázou Cyr1 (MINATO *et al.* 1994), zvýší se intracelulární koncentrace cAMP a tím se aktivuje cAMP-dependentní protein kináza (obr. 4). Je to heterotetramer složený z homodimeru regulační podjednotky Bcy1 a homodimeru katalytické podjednotky kódované geny *TPK1*, *TPK2* nebo *TPK3* (TODA *et al.* 1987). Pro přežití buňky stačí aby byla funkční jedna ze tří cAMP-dependentních kináz. Každá z kináz však má rozdílnou úlohu při regulaci pseudohyfálního růstu (PAN and HEITMAN 1999; ROBERTSON and FINK 1998). *Tpk2* hraje výjimečnou roli, protože stimuluje pseudohyfální růst, *Tpk3* pseudohyfální růst reprimuje. Co se týče *Tpk1*, zde jsou údaje nejednotné: jedna skupina pozorovala inhibiční vliv (PAN and HEITMAN 1999), druhá skupina nepozorovala žádný efekt (ROBERTSON and FINK 1998). Rozdílné funkce podjednotek PKA jsou dány malými odlišnostmi v katalytické oblasti, takže je možné, že každá podjednotka rozeznává jiné substráty. Dvouhybridové testy ukázaly, že *Tpk2* interaguje s proteiny Sfl1 a Mga1 které mají helix-turn-helix DNA vazebný motiv homologický s heat shock transkripčním faktorem Hsf1 (ROBERTSON and FINK 1998). Transkripční faktor Sfl1 reprimuje gen *SUC2* (SONG and CARLSON 1998) a jeho delece vede ke zvýšení pseudohyfálního růstu (ROBERTSON and FINK 1998).

Delece *MGA1* vede k poruchám pseudohyfálního růstu tím, že zvyšuje počet náhodně pučících buněk (LORENZ and HEITMAN 1998a). Delece dalších transkripčních faktorů s výše zmiňovaným helix-turn-helix DNA vazebným motivem (*Skn7* a *Hms2*) vede k poruchám pseudohyfálního růstu. Proto se zdá, že proteiny podobné transkripčnímu faktoru *Sfl1* jsou substrátem kinázy *Tpk2* a hrají jak úlohu represorů (*Sfl1*) tak i úlohu aktivátorů (*Mga1*, *Skn7*, *Hms2*).



Obr. 4 Schéma cAMP-PKA dráhy podílející se na regulaci filamentárního růstu. Aktivovaný Ras2 nebo senzory dusíkatých a uhlíkatých zdrojů živin *Mep2* a *Gpr1* stimulují zvýšení hladiny cAMP vedoucí k aktivaci kináz *Tpk*. Tyto kinázy specificky aktivují a inhibují řadu transkripčních faktorů ovlivňujících expresi cílových genů.

Cílové geny

Cílem těchto regulačních proteinů by mohl být gen *FLO11*, protože mutace *sfl1* zvyšuje hladinu *FLO11* mRNA a dvojitá mutace *sfl1flo11* vede k poruchám pseudohyfálního růstu (ROBERTSON and FINK 1998). Protože však dvojitá mutace *sfl1flo11* nevede k úplnému zastavení pseudohyfálního růstu reprimuje *Sfl1* pravděpodobně i jiné geny důležité pro pseudohyfální růst. Protein *Sfl1* inhibuje transkripci prostřednictvím korepresoru *Ssn6-Tup1* (CONLAN and TZAMARIAS 2001). Transkripční korepresor *Ssn6-Tup1* je v kvasinkových buňkách přítomný konstitutivně a v závislosti na specifických signálech je rekrutován represorovými DNA-vazebnými proteiny. Tímto způsobem je zajištěna integrace různých environmentálních signálů vedoucí k inhibici transkripce celých skupin promotorů (KELEHER *et al.* 1992).

Dalším cílem cAMP-PKA dráhy je produkt genu *FLO8*, hrající úlohu při flokulaci (KOBAYASHI *et al.* 1996) a pseudohyfálním růstu (LIU *et al.* 1996). U mutantu *bcy1* s konstitutivně aktivovanými cAMP dependentními kinázami *TPK*, je zvýšená exprese *FLO11* striktně závislá na *FLO8* (KOBAYASHI *et al.* 1996).

Další úlohou Ras2/cAMP dráhy při stimulaci invazivního růstu by mohla být suprese transkripčních faktorů pro stresovou odpověď *Msn2* a *Msn4*. Haploidi s delecí *ras2Δ* nerostou invazivně, poruchu v invazivním růstu ale nemají mutanty *ras2Δmsn2Δmsn4Δ*, ani *ras2Δyap1Δ* (STANHILL *et al.* 1999) Zdá se, že produkt některého genu

aktivovaného transkripčními faktory Msn2, Msn4 a Yap1 negativně ovlivňuje schopnost invazivního růstu. Význam cAMP-PKA dráhy potvrzuje také fakt, že přidání externího cAMP stimuluje pseudohyfální růst (KUBLER *et al.* 1997; LORENZ and HEITMAN 1997) a naopak overexprese fosfodiesterázy Pde2 pseudohyfální růst blokuje (WARD *et al.* 1995).

Vliv genetického pozadí

Na tomto místě je ještě vhodné zmínit kmen $\Sigma 1278b$ hojně používaný při studiu filamentálního růstu. Má hyperaktivovanou cAMP-PKA dráhu (STANHILL *et al.* 1999) a jeho ochota tvořit pseudohyfy je připisována funkčnímu genu *FLO8*, který je mutovaný u laboratorních kmenů neschopných pseudohyfálního růstu. Laboratorní kmen S288C nerostoucí filamentálně, je po vložení funkčního genu *FLO8* schopen tvořit pseudohyfy (LIU *et al.* 1996). Proti kmenu $\Sigma 1278b$ však má mírnou poruchu v invazivitě. V rozporu s těmito dnes již tradičními údaji je nedávné pozorování invazivity diploidů odvozených od kmene BY, izogenních s kmenem S288C, vyvolané dusíkovým hladověním. Dokonce i deleční mutant *flo11 Δ flo11 Δ* odvozený od kmene BY je schopen růst pseudohyfálně na médiu s nízkým obsahem dusíku (TRACHTULCOVA *et al.* 2004). Další autoři uvádějí, že u kmene BY zřejmě není pro filamentální růst nezbytný funkční gen *FLO8* (WU and JIANG 2005). Tato pozorování nasvědčují tomu, že výlučná závislost pseudohyfálního růstu na funkčním genu *FLO11* je možná typická pouze pro kmeny odvozené od $\Sigma 1278b$. Je

pravděpodobné, že bude potřeba přehodnotit obecné závěry učiněné na základě experimentů na kmenech s tímto genetickým pozadím.

Interakce drah

Signální dráhy aktivované proteinem Ras2 konvergují a regulují expresi genu *FLO11* (LAMBRECHTS *et al.* 1996; LO and DRANGINIS 1998). Exprese genu *FLO11* vyžaduje faktory Tec1, Ste12 a Flo8 (RUPP *et al.* 1999). Flo8 je odpovědný za specifické zvýšení transkripce *FLO11* způsobené zvýšenou hladinou cAMP (RUPP *et al.* 1999). Promotor genu *FLO11* obsahuje FRE element s vazebnými místy pro Ste12 a Tec1, není však jasné zda se transkripční faktor Flo8 váže na promotor genu *FLO11* nebo má nějakou nepřímou regulační funkci.

Dalšími faktory účastnícími se transkripční aktivace *FLO11* jsou Msn1 (známý též jako Mss10 nebo Phd2) a Mss11 (GAGIANO *et al.* 1999; LAMBRECHTS *et al.* 1996). Overexprese Msn1 indukuje transkripci *FLO11* a stimuluje invazivní růst haploidů a pseudohyfální růst diploidů. Zajímavé je, že buňky overexprimující Msn1 mají zvýšenou adhezivitu a není možné jejich odmytí z povrchu agaru (LAMBRECHTS *et al.* 1996). Zdá se, že Mss11 funguje downstream od Ste12. Podle některých autorů funguje Msn1 upstream od Mss11 a je na něm funkčně závislý (GAGIANO *et al.* 1999). Overexprese *MSS11* suprimuje delecí *msn1 Δ* , ale overexprese *MSN1* nesuprimuje defekt ve filamentálním růstu mutantu *mss11 Δ* . Novější práce ale ukazují, že Msn1 funguje jako induktor invazivního růstu a aktivátor exprese *FLO11* nezávisle na Mss11 a Flo8 (VAN DYK *et al.* 2005).

Rozdíly jsou dány nižší bazální hladinou exprese *FLO11* v kmenech ISP (GAGIANO *et al.* 1999) oproti kmenu $\Sigma 1278b$ (VAN DYK *et al.* 2005). Je pravděpodobné, že overexprese *MSN1* v ISP kmenech nezvýší expresi *FLO11* na úroveň potřebnou pro filamentární růst. Přestože *Mss11* má významnou úlohu v regulaci filamentárního růstu, molekulární mechanismus není ještě podrobně prozkoumán. Protein *Mss11* není homologní s žádným kvasinkovým proteinem s výjimkou částečné homologie s transkripčním aktivátorem *Flo8*. Nedávná práce ukázala, že *Mss11* reguluje expresi *FLO11* v závislosti na signálech limitace zdrojů dusíku a glukózy (GAGIANO *et al.* 2003). Delece *FLO8* nebo *MSS1* vede k neschopnosti kmene $\Sigma 1278b$ růst filamentárně. Overexprese *MSS11* suprimuje deleci *flo8 Δ* ale overexprese *FLO8* nesuprimuje deleci *mss11 Δ* . Delece *mss11 Δ* není suprimována ani overexpresí transkripčních aktivátorů *Tec1* a *Phd1*, ani delecemi genů *NRG1*, *NRG2*, *SOK2* a *SFL1* kódujících represory genu *FLO11* (VAN DYK *et al.* 2005). Ze známých aktivátorů transkripce *FLO11*, indukuje jeho expresi u delečního mutantu *mss11 Δ* kromě proteinu *Msn1* také protein *Rme1*. Většina faktorů účastnících se regulace exprese genu *FLO11* působí na úrovni transkripčního komplexu RNA polymerázy II. Účinek *Msn1* a *Rme1* je spojen s remodelací chromatinu (COVITZ *et al.* 1994; SIDOROVA and BREEDEN 1999) a proto je možné, že tyto proteiny aktivují expresi *FLO11* mechanismem ovlivňujícím transkripci pouze nepřímo (např. modifikacemi chromatinu). Nedávno byla popsána epigenetická regulace

genu *FLO11*, ve které hraje hlavní roli transkripční faktor *Sfl1* (HALME *et al.* 2004). Protože *Mss11* suprimuje regulace *FLO11* závislé na *Sfl1* a *Flo8*, je možné, že i protein *Mss11* má úlohu v epigenetické regulaci *FLO11*.

Komplexnost regulačních drah je ještě zvýšena tím, že MAP kinázová dráha a cAMP-PKA dráha regulují odlišné procesy přispívající k pseudohyálnímu růstu. To znamená že každá z drah má několik různých výstupů. Například cAMP-PKA dráha reguluje expresi *FLO11* a zároveň kontroluje přepnutí z bipolárního na unipolární pučení (PAN and HEITMAN 1999). Cílem MAPK filamentární dráhy je kromě genu *FLO11* i řada dalších genů (MADHANI *et al.* 1999). Klíčovým cílem MAPK dráhy je G1 cyklin *Cln1*, nepostradatelný morfogenetický faktor pseudohyálního růstu. Naopak na první pohled postradatelným cílem je gen *PGU1*, kódující sekretovanou polygalakturonidázu, která nemá vliv na samotnou tvorbu pseudohyfy. Má ale zřejmě významnou ekologickou úlohu v přirozeném prostředí kvasinek. Pektinolytická aktivita proteinu *Pgu1* zřejmě ulehčuje obsazení vhodné niky, protože pektin je složkou buněčné stěny rostlin a je jednou z významných látek chránících povrchy rostlinných plodů. Některé novější práce dokonce ukazují na spojitost mezi produkcí polygalakturonidázy a filamentárního růstu s fytopatogenitou *S. cerevisiae* (GOGNIES *et al.* 2006; GOGNIES and BELARBI 2002). Koregulace *PGU1* a genů pro filamentární růst prostřednictvím MAP kinázové dráhy podporuje názor, že filamentární růst využívají kvasinky při vyhledávání zdrojů živin (GIMENO *et*

al. 1992). Exprese reporterových genů regulovaných MAPK dráhou je inhibována cAMP. Mutace *bcy1* nebo přidání exogenního cAMP způsobí, že pseudohyfy jsou tvořeny kulatými a ne oválnými buňkami (LORENZ and HEITMAN 1997; PAN and HEITMAN 1999). Protože za elongaci buněk je odpovědná MAPK signalizace, svědčí uvedená pozorování o tom, že cAMP-PKA dráha působí částečně antagonisticky vůči MAPK dráze. Fyziologický význam downregulace MAPK dráhy cAMP-PKA dráhou je ještě nejasný.

Upstream komponenty

Pseudohyální růst může být vyvolán limitovaným zdrojem dusíku (GIMENO *et al.* 1992), chudým zdrojem uhlíku v médiu (LAMBRECHTS *et al.* 1996; ZARAGOZA and GANCEDO 2000) a některými stresovými faktory (DICKINSON 1996; LAMBRECHTS *et al.* 1996; ZARAGOZA and GANCEDO 2000). Již poměrně dlouho je známo, že nedostatek kyslíku inhibuje pseudohyální růst (WRIGHT *et al.* 1993). Zajímavé je pozorování, že kvasinkové buňky reagují na zalití do agaru filamentálním růstem (LO *et al.* 1997b). Mechanizmy kterými externí podmínky stimulují signální dráhy ještě nejsou detailně známy, ale část komponentů je již poměrně dobře prozkoumána.

Na médiu s nízkým obsahem dusíku je pro pseudohyální růst potřebná vysokoafinitní permeáza amonných iontů Mep2, která funguje i jako senzor hladiny zdrojů dusíku (LORENZ and HEITMAN 1998). Prozatím neexistuje důkaz přímé interakce mezi Mep2 a Gpa2. Je ale známo, že Mep2 funguje

upstream od Gpa2, protože dominantně aktivní alela *GPA2-2* obnoví pseudohyální růst delečního mutantu *mep2Δmep2Δ* (LORENZ and HEITMAN 1998). Výše uvedené komponenty Mep2, Gpa2 a Gpr1 jsou napojeny na cAMP dráhu (obr. 4), o čem svědčí pozorování, že mutace *mep2*, *gpr1* nebo *gpa2* jsou suprimovatelné mutací *Ras2^{Val19}* nebo přidáním externího cAMP (KUBLER *et al.* 1997; LORENZ *et al.* 2000). Také nízkoafinitní permeáza amonných iontů Mep1 hraje úlohu při monitorování hladiny dusíku. Delece *MEP1* umožní, že samotná aktivace downstream komponentů MAPK dráhy stačí pro indukci pseudohyálního růstu u mutantů *mep1Δmep1Δ mep2Δmep2Δ* (LORENZ and HEITMAN 1998a).

Pro pseudohyální růst diploidů na médiu s nízkým obsahem dusíku je vyžadován protein Sho1 (O'ROURKE and HERSKOWITZ 1998). Proto se předpokládá, že by se Sho1 mohl účastnit nejenom odpovědi na vysokou osmolaritu (MAEDA *et al.* 1995) ale i přenosu signálu nízké hladiny dusíku na komponentu MAPK dráhy Ste20 (O'ROURKE and HERSKOWITZ 1998). Defekty v utilizaci manózy a glykozylní proteínů vedou k aktivaci Sho1 a následně komponentů MAPK dráhy pro filamentální růst. Buňky ale nevykazují fyziologické změny jako jsou elongace a polární pučení (CULLEN *et al.* 2000). Novější výzkumy naznačují, jak by mohl vypadat začátek MAPK filamentální dráhy. Při hledání genů důležitých pro filamentální růst se ukázalo, že protein Msb2 funguje jako upstream komponenta této dráhy (CULLEN *et al.* 2004). Protein Msb2 má extracelulární mucinovou doménu a její

ztráta vede k hyperaktivaci filamentárního růstu. Předpokládá se, že protein Msb2 interaguje se Sho1 a Cdc42 a že jeho extracelulární doména interagující se složkami buněčné stěny funguje jako senzor. Není však jasné, co vlastně Msb2 "vnímá". Vzhledem k tomu, že filamentární růst je spojen s pevnými povrchy, mohlo by jít o detekci takového prostředí či vnímání napětí buněčné stěny (CULLEN *et al.* 2004).

Dalším proteinem vyžadovaným pro pseudohyfální růst je G-protein Gpa2 (KUBLER *et al.* 1997; LORENZ and HEITMAN 1997) a s ním spojený receptor Gpr1 (ANSARI *et al.* 1999; LORENZ *et al.* 2000; TAMAKI *et al.* 2000). Hladina *GPR1* mRNA se prudce zvyšuje při hladovění na dusík ale ne při limitaci zdrojem uhlíku (XUE *et al.* 1998). Novější výsledky ale ukazují, že Gpr1 je schopen monitorovat také hladinu glukózy (KRAAKMAN *et al.* 1999; LORENZ *et al.* 2000; YUN *et al.* 1998). Předpokládá se že Gpr1 a Gpa2 fungují jako duální senzor dostupnosti zdroje uhlíku a zároveň nízké hladiny zdroje dusíku. Po přidání glukózy stimuluje protein Gpa2 adenylát cyklázu a následnou akumulaci cAMP v buňce. Gpa2 však není odpovědný za zvýšení hladiny cAMP vyvolané poklesem intracelulárního pH (COLOMBO *et al.* 1998). Intracelulární acidifikace způsobí zvýšení hladiny cAMP, ale signál je na adenylát cyklázu přenášen přes Ras2. Při tomto procesu se uplatňují GTPázu aktivující (GAP) proteiny Ira1 a Ira2 (obr. 4), delece kterých vede k redukcí GTPázové aktivity proteinu Ras2 a stimulaci adenylát cyklázy (TANAKA *et al.* 1990). Intracelulární acidifikace vyvolá prudké zvýšení poměru

GTP/GDP vázaného na Ras2. Deleční mutant *ira1Δira2Δ* není schopen po poklesu intracelulárního pH zvýšit poměr GTP/GDP vázaného na Ras2. Proto je pravděpodobné, že intracelulární acidifikace inhibuje GAP proteiny Ira1 a Ira2 čímž se aktivuje Ras2 a cAMP-PKA dráha (COLOMBO *et al.* 1998).

Pomocí dvouhybridového testu byl identifikován protein Krh1 vážící se na Gpa2. Kmeny s delecí genu *KRH1* a jeho homologu *KRH2* mají vysokou hladinu exprese *FLO11* a rostou hyperinvazivně (BATLLE *et al.* 2003). Proteiny Krh1 a Krh2 pravděpodobně přenášejí signál od Gpa2 na downstream komponenty, protože dvojitá delece *krh1Δkrh2Δ* suprimuje deleci *gpa2Δ* a zároveň zastaví signalizaci konstitutivně aktivní alely *GPA2*. U vyšších eukaryot je adenylát cykláza přímo aktivována Ga podjednotkou Gpa2. Uvažovalo se, že tento mechanismus funguje i u kvasinek. Je však pravděpodobné, že účinek Gpa2 na PKA dráhu je zprostředkován proteiny Krh, protože proteiny Krh1 a Krh2 působí bezprostředně downstream od Gpa2 a vyžadují pro přenos signálu cAMP-dependentní kinázu Tpk2. Kromě toho struktura Krh proteinů napodobuje strukturu β-podjednotek G proteinů (HARASHIMA and HEITMAN 2002). Proteiny Krh zároveň inhibují spojení Gpa2 s receptorem Gpr1 (HARASHIMA and HEITMAN 2005).

Zajímavé je, že deleční mutant *krh1Δkrh2Δ* tvoří na pevném médiu strukturované kolonie (BATLLE *et al.* 2003), připomínající morfologicky kolonie kmenů BR-fluffy (KUTHAN *et al.*

2003) nebo biofilmy kmene $\Sigma 1278b$ (REYNOLDS and FINK 2001).

Senzor Gpr1-Gpa2 kontroluje i meiózu, která je indukována dusíkovým hladověním a přítomností nefermentovatelného zdroje uhlíku. Za podmínek s dostatkem zdrojů inhibuje Gpa2 vstup do meiózy inhibiční interakcí s protein kinázou Ime2 (STANHILL *et al.* 1999). Overexprese *IME2* inhibuje pseudohyfální růst a umožní sporulaci i při dostatečném množství živin. Protein kináza Ime2 spojuje transkripční faktor Rim101 (původně nazývaný Rim1) s pseudohyfálním růstem (obr. 4). Transkripční faktor Rim101, patří do rodiny transkripčních regulátorů PacC hrajících úlohu při pH signalizaci u hub (ESPESO *et al.* 2000). Mutace genů kódujících proteiny Rim dráhy (Rim101, Rim8, Rim9 a Rim13) inhibují invazivní růst haploidů ale neovlivňují pseudohyfální růst diploidů. Rim101 je aktivován proteolytickým odštěpením C-koncové inhibiční domény a toto štěpení je zřejmě regulováno extracelulárním pH. V kyselém prostředí se hromadí neštěpená forma proteinu, v alkalickém prostředí je Rim101 aktivován odštěpením C-koncové domény (LI and MITCHELL 1997).

Fosfolipáza C je důležitá pro pseudohyfální růst vyvolaný dusíkovým hladověním protože je vyžadována při interakci mezi Gpr1 a Gpa2 (ANSARI *et al.* 1999). Funguje ale na rozdíl od Gpr1 a Gpa2 ještě i někde downstream od Ras2 proteinu, protože mutace *Ras2^{Val19}* není je schopna suprimovat defekt pseudohyfálního

růstu v *plc1* mutantech. Fosfolipáza Plc1 hraje zřejmě úlohu v propojení dusíkové a uhlíkové signalizace již na úrovni senzoru.

Koncentrace aminokyselin v médiu také ovlivňuje pseudohyfální růst, jednak prostřednictvím senzorů hladiny dusíku a jednak nezávislými mechanismy. Mutace ovlivňující permeázy aminokyselin (*shr3*, *ssy1*, *ptr3*) vyvolávají pseudohyfální růst (GIMENO *et al.* 1992) anebo indukují invazivní růst haploidů (KLASSON *et al.* 1999). Pseudohyfální růst ovlivňují i komponenty dusíkové katabolické represe. Při růstu na bohatém zdroji dusíku se váže represor Ure2 na transkripční faktor Gln3, čímž je blokována aktivace genů závislých na Gln3. Za podmínek dusíkového hladovění není Gln3 inhibován represorem Ure2. Je zajímavé, že mutace *ure2* vedoucí ke konstitutivní expresi genů dusíkové katabolické represe blokuje pseudohyfální růst stejně jako mutace *gln3* reprimující geny dusíkové katabolické represe (LORENZ and HEITMAN 1998). Overexprese anebo mutace *Mks1*, fungujícího jako inhibitor Ure2, způsobí poruchy v pseudohyfálním růstu (EDSKES *et al.* 1999).

Dalším prvkem signalizujícím dostupnost dusíku je glutamin tRNA_{CUG}. Mutace genu *SUP70*, jediného genu kódujícího tRNA pro glutamin s antikodónem CUG, vyvolá pseudohyfální růst i na bohatém médiu s dostatkem dusíku (MURRAY *et al.* 1998). Výsledky ukázaly, že tRNA_{CUG} nesignalizuje ani ovlivněním translace ani prostřednictvím MAPK dráhy. Zdá

se, že pro signalizaci je důležitá aminoacylace, takže pouze "nabitá forma" glutaminyl-tRNA_{CUG} je schopna interagovat s regulačním proteinem. Protože glutamin je klíčovým metabolitem v dusíkovém metabolismu (MAGASANIK 1992), tak by glutaminyl-tRNA_{CUG} mohla být citlivým detektorem hladiny dusíku v buňce. Zatím jsou známy pouze interakce "nenabitých" tRNA s regulační doménou protein kinázy Gcn2, signalizující dostupnost jednotlivých aminokyselin (WEK *et al.* 1995; ZHU *et al.* 1996). Senzorová kináza Gcn2 při hladovění na aminokyseliny fosforyluje translační iniciační faktor eIF2. Toto vede k efektivní translaci mRNA genu *GCN4*, kódujícího transkripční faktor Gcn4 (HINNEBUSCH 1997; HINNEBUSCH and NATARAJAN 2002). Transkripční faktor Gcn4 je vyžadován pro expresi *FLO11* vyvolanou hladověním na aminokyseliny (BRAUS *et al.* 2003).

Při dusíkové regulaci pseudohyfálního růstu se uplatňuje i signální dráha TOR. Rapamycin, inhibitor Tor kinázy, inhibuje pseudohyfální růst na médiu s nízkým obsahem dusíku (CUTLER *et al.* 2001). Mutanti *tor2* jsou schopni růst pseudohyfálně i v přítomnosti rapamycinu. Tor kináza ovlivňuje pseudohyfální růst prostřednictvím protein fosfatázy Sit4 a asociovaného regulačního proteinu Tap42. Dráha Tor-Tap42-Sit4 hraje úlohu při regulaci translace a při transkripční regulaci genů dusíkové katabolické represe (BARBET *et al.* 1996; DI COMO and ARNDT 1996). Rapamycin zřejmě inhibuje pseudohyfální růst tím, že způsobí konstitutivní expresi genů dusíkové katabolické represe (CUTLER *et al.* 2001).

Nedávno publikované výsledky ukázaly, že i transkripční faktor Ste12 je regulován dostupností živin. Na této regulaci se podílí cyklin-dependentní kináza Srb10, která asociuje s holoenzymem RNA polymerázy II. Na bohatém médiu inhibuje Srb10 pseudohyfální růst tím, že fosforyluje Ste12 čímž snižuje jeho stabilitu. Při nedostatku dusíku je Srb10 downregulovaný, takže Ste12 není fosforylován a je stabilnější. Jeho množství proto postačuje pro indukci FRE-závislých genů (NELSON *et al.* 2003). Aktivita Srb10 musí být zřejmě regulována nezávisle na MAPK dráze v závislosti na dostupnosti dusíku.

Při invazivním růstu haploidů hraje významnou úlohu glukóza. Po vyčerpání glukózy anebo jiného fermentovatelného sacharidu zarůstají haploidní kmeny odvozené od Σ 1278b invazivně do agaru, pučí polárně a mají elongovaný tvar buněk. Za expresi glukózou reprimovaných genů v nepřítomnosti glukózy je odpovědná protein kináza Snf1 a částečně i její regulátor Snf4 (CULLEN and SPRAGUE 2000). Jedním z cílů Snf1 je Sip4 (VINCENT and CARLSON 1999), transkripční faktor vyžadovaný pro diauxický přechod (DERISI *et al.* 1997). Pro samotný invazivní růst však *SIP4* není vyžadován a jeho delece vede k hyperinvazivnímu růstu. Dalším cílem Snf1 je Msn1 hrající roli v pseudohyfálním růstu (ESTRUCH and CARLSON 1990; LAMBRECHTS *et al.* 1996). Overexprese *MSN1* částečně suprimuje poruchy v invazivním růstu způsobené mutací *snf1* (CULLEN and SPRAGUE 2000). S protein kinázou Snf1 fyzicky interagují negativní regulátory Nrg1 a

Nrg2 (VYAS *et al.* 2001), hrající úlohu při glukózové represi invazivního růstu a genů závislých na Snf1, například genu *FLO11* a genů *STA*. Po vyčerpání glukózy uvolňuje protein kináza Snf1 represi genů *FLO11* vyvolanou represory Nrg1 a Nrg2, takže je indukován invazivní růst (KUCHIN *et al.* 2002). Palecek *et al.* však nezaznamenal zvýšenou expresi *FLO11* na médiu neobsahujícím glukózu (PALECEK *et al.* 2002). I přes fyzickou interakci Snf1 s represory Nrg se nedá vyloučit ani ovlivnění represorů na transkripční úrovni. Hladina *NRG1* mRNA je 6x nižší na médiu s glycerolem než na médiu s glukózou (PARK *et al.* 1999). Pseudohyfální růst diploidů vyvolaný dusíkovým hladověním je také pod kontrolou kinázy Snf1. Mutant *snf1snf1* není schopen tvořit pseudohyfy na médiu s nízkou hladinou dusíku, delece *NRG* genů částečně obnoví schopnost mutanta *snf1snf1* růst pseudohyfálně. Kromě toho dvojitý homozygotní mutant *nrg1nrg2* má zvýšený pseudohyfální růst. Proto se zdá, že kináza Snf1 funguje i při dusíkové regulaci filamentárního růstu (KUCHIN *et al.* 2002).

Při sledování ovlivnění filamentárního růstu zdrojem uhlíku se ukázalo, že růst na médiu s neglukózovým zdrojem uhlíku zvyšuje frekvenci polárního pučení (PALECEK *et al.* 2002). Autoři nezaznamenali téměř žádný filamentární růst na médiu s glukózou, fruktózou a manózou. Filamentární růst je indukován galaktózou anebo rafinózou a ještě výrazněji nefermentovatelnými zdroji uhlíku (glycerol, etanol). Již malé množství glukózy přidané do média s jiným

zdrojem uhlíku reprimuje filamentární růst a elongaci buněk. V přítomnosti fermentovatelných monosacharidů, jakými jsou manóza a fruktóza, jsou pro filamentární růst vyžadovány kinázové aktivity Snf1 a Kss1. Na nefermentovatelných nebo méně vhodných zdrojích uhlíku je pro filamentární růst vyžadována kináza Snf1 ale není potřebná MAP kináza Kss1. Neglukózové zdroje uhlíku ale kupodivu neindukují expresi *FLO11*, avšak pro invazivní růst je vyžadována alespoň nízká konstitutivní exprese tohoto genu. Zdroj uhlíku ovlivňuje polaritu pučení: galaktóza, rafinóza anebo nefermentovatelné zdroje uhlíku indukují bipolární pučení haploidních kmenů odvozených od $\Sigma 1278b$. Buňky rostoucí na glukóze, fruktóze či manóze pučí axiálně. Ani delece *snf1 Δ* ani delece *kss1 Δ* nemá vliv na polaritu pučení, takže polární pučení je sice potřebné pro invazivitu ale samo o sobě nestačí na vyvolání invazivního růstu.

Další regulace filamentárního růstu

Pseudohyfální růst ovlivňuje více proteinů (např. Sok2, Phd1, Ash1, Swi5 a další), které nepatří mezi komponenty MAP kinázové ani cAMP-PKA signální dráhy.

Overexprese transkripčního faktoru Phd1 v diploidních kmenech výrazně indukuje pseudohyfální růst a invazivní zarůstání pseudohyf do agaru. U haploidních kmenů overexprimujících *PHD1* nedochází k indukci invazivního růstu ale zvyšuje se počet elongovaných buněk v kolonii (GIMENO and FINK 1994).

Dalším faktorem účastnícím se regulace pseudohyfálního růstu je transkripční faktor Ash1. Původně byl objeven při studiu párování kvasinek, protože se účastní represe *HO* endonukleázy v dceřiných buňkách. Diploidní buňky exprimují *ASH1* asymetricky pouze v dceřiných buňkách úplně stejně jako haploidní buňky (SIL and HERSKOWITZ 1996). Ukázalo se, že i v diploidních buňkách má Ash1 důležitou úlohu. Mutant *ash1Δash1Δ* má poruchu v pseudohyfálním růstu, naopak overexprese *ASH1* způsobí mohutnou tvorbu pseudohyf (CHANDARLAPATY and ERREDE 1998). Ash1 funguje downstream nebo paralelně s MAPK dráhou, protože overexprese *ASH1* obnoví pseudohyfální růst u mutantů *ste7Δ*, *ste12Δ* a částečně i *ste20Δ*. Mutace *ash1Δ* a *ste12Δ* nezpůsobí na rozdíl od dvojité delece těchto genů úplné zastavení pseudohyfálního růstu. Mutant *Ras2^{Val19}* s delecí *ste12Δ* je schopen tvorby pseudohyf na rozdíl od dvojitého mutantu *ash1Δste12Δ*. Zdá se, že signál od Ras2 proteinu je předáván jednak přes MAPK dráhu a jednak nezávisle prostřednictvím Ash1. Overexprese *PHD1* obnoví pseudohyfální defekt u mutantu *ash1Δ* a částečně i u mutantu *ash1Δste12Δ*. Zdá se, že transkripční faktory Ash1, Phd1 a Ste12 mají aditivní efekt při regulaci pseudohyfálního růstu (CHANDARLAPATY and ERREDE 1998).

Transkripční faktor Swi5 je potřebný pro expresi *HO* genu v závislosti na buněčném cyklu (NASMYTH *et al.* 1990; STERN *et al.* 1984). Transkripční faktor Swi5 reguluje kromě jiného geny *ASH1*, *EGT2* a částečně *CTS1*. Endoglukanáza Egt2 a endochitináza Cts1 jsou

vyžadovány pro správné oddělování mateřské a dceřiné buňky po cytokinezi (KURANDA and ROBBINS 1991). Swi5 hraje v regulaci pseudohyfálního růstu duální úlohu. Overexprese *SWI5* indukuje pseudohyfální růst aktivací exprese *ASH1* a *FLO11*. Ale i mutace *swi5* indukuje tvorbu pseudohyf tím, že reprimuje geny *EGT2* a *CTS1* (PAN and HEITMAN 2000). Mutace *Egt2* a *Cts1*, způsobující poruchy v oddělování dceřiných a mateřských buněk, zvýrazňují pseudohyfální růst překvapivě i bez Flo11. Mutanti s dvojitými mutacemi *cts1flo11*, *egt2flo11*, *sok2flo8* nebo *sok2flo11*, jsou schopni růst pseudohyfálně. Pseudohyfy těchto mutantních kmenů však nerostou invazivně ale jenom na povrchu agaru, takže invazivní růst je závislý na proteinu Flo11. Zajímavé je, že zvýšená ploidie buněk negativně ovlivňuje expresi *FLO11* a pozitivně expresi *CTS1*. Se zvyšující se ploidií buněk klesá schopnost invazivního růstu (GALITSKI *et al.* 1999). Mutanti *cts1* tvoří velké shluky buněk (KURANDA and ROBBINS 1991), naopak polyploidní kmeny se zvýšenou expresí *CTS1* tvoří ve srovnání s haploidy výrazně méně shluků buněk (GALITSKI *et al.* 1999). Kvasinkové buňky tedy mohou při pseudohyfálním růstu použít dva mechanismy pro adhezi buněk: adhezi závislou na Flo11 a adhezi nezávislou na Flo11, kontrolovanou proteiny Swi5/Egt2/Cts1.

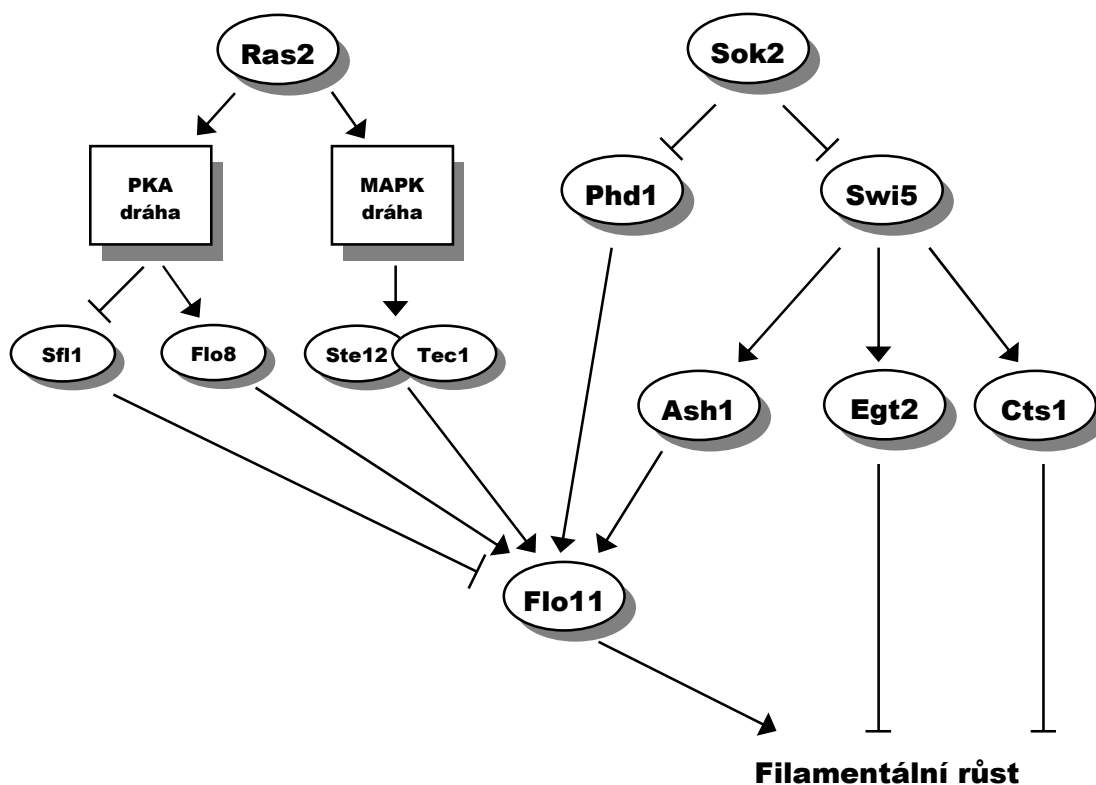
Kaskáda transkripčních faktorů

Transkripční faktory Phd1, Ash1 a Swi5, aktivující expresi *FLO11* a pseudohyfální růst, jsou negativně regulovány transkripčním faktorem

Sok2 (PAN and HEITMAN 2000). Gen pro transkripční faktor SOK2 má vysokou sekvenční homologii s genem PHD1 (GIMENO and FINK 1994). Transkripční faktor Sok2 inhibuje pseudohyální růst: diploidní homozygot *sok2sok2* má výrazně elongované buňky a silně indukovaný pseudohyální růst i na médiu s dostatkem dusíku. Naopak overexprese Tpk2, katalytické podjednotky protein kinázy A, indukuje pseudohyální růst ale buňky nejsou elongované, takže pseudohyfy jsou tvořeny řetízky kulatých buněk (PAN and HEITMAN 2000). Delece *phd1Δ* ruší efekt mutace *sok2*, takže pseudohyální

růst vyvolaný mutací *sok2* je závislý na Phd1 (WARD *et al.* 1995).

Současný model předpokládá, že Sok2 reguluje pseudohyální růst nezávisle na cAMP-PKA dráze a obě dráhy konvergují aby regulovaly expresi FLO11 (obr. 5). Sok2 inhibuje expresi genů kódujících transkripční faktory Phd1, Ash1 a Swi5, čímž reprimuje expresi FLO11. Naopak cAMP-PKA dráha indukuje expresi FLO11 aktivací transkripčního faktoru Flo8 a inaktivací transkripčního faktoru Sfl1 (RUPP *et al.* 1999).



Obr. 5 Kaskáda transkripčních faktorů závislých na Sok2 (pravá část schématu) a propojení na signální dráhy účastníci se regulace filamentárního růstu.

Je popsáno pouze několik mutací, které ovlivňují pseudohyfální růst a zároveň i sporulaci. Kromě mutací v genech *RAS2* a *GPA2* patří do této skupiny také mutace *sok2*, která je zatím jedinou mutací inhibující současně oba procesy (PAN and HEITMAN 2000). Na médiu s dostatkem dusíku, roste mutant *sok2sok2* pseudohyfálně a kmen s genetickým pozadím $\Sigma 1278b$ dokonce za těchto podmínek bohatě sporuluje (PAN and HEITMAN 2000).

Oba G-proteiny Ras2 a Gpa2 aktivují pseudohyfální růst a inhibují sporulaci. Ras2 aktivuje pseudohyfální růst stimulací cAMP-PKA a MAPK dráhy a současně inhibuje sporulaci zvýšením hladiny cAMP v buňce (LORENZ and HEITMAN 1997; MOSCH and FINK 1997). Gpa2 inhibuje sporulaci interakcí s kinázou Ime2 (DONZEAU and BANDLOW 1999) a zároveň stimuluje pseudohyfální růst regulací produkce cAMP. Opačné úlohy G-proteinů Ras2 a Gpa2 vyplývají z jejich vztahu k monitorování hladiny glukózy (KRAAKMAN *et al.* 1999; YUN *et al.* 1998). Přítomnost glukózy aktivuje pseudohyfální růst a inhibuje sporulaci. Bez fermentovatelného zdroje uhlíku jsou Gpa2 a Ras2 neaktivní a je umožněna sporulace.

Poruchy sporulace na sporulačním médiu a indukci pseudohyfálního růstu vyvolává delece genu *BIR1* (UREN *et al.* 1999). Tento gen je homologický s inhibitory apoptózy u vyšších organismů. Zdá se, že u *S. cerevisiae* hraje protein Bir1 úlohu při segregaci chromozomů, protože je lokalizován v blízkosti mitotického vřetenka. U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* vede jeho delece k neschopnosti prodlužovat mitotické vřetenko.

Overexprese genu *PHD1* zvýrazní pseudohyfální růst a suprimuje jeho poruchy v mutantech *tpk2*, *ash1* a *ste12* (CHANDARLAPATY and ERREDE 1998; PAN and HEITMAN 1999). Phd1 aktivuje elongaci buněk a expresi *FLO11*. Ačkoli mutanti *phd1* nemají poruchu v expresi *FLO11*, overexprese *PHD1* obnoví expresi *FLO11* u mutantů *tpk2* a *tec1*. Tyto výsledky naznačují, že Phd1 reguluje expresi *FLO11* nezávisle na cAMP-PKA a MAPK dráze. Poruchy pseudohyfálního růstu mutantů *ash1* jsou suprimovatelné overexpresí *TEC1* a *TPK2*. Overexprese samotného *ASH1* obnoví pseudohyfální růst a expresi *FLO11* u mutantů *Tec1Δ* a *Tpk2Δ*. Takže i protein Ash1 reguluje expresi *FLO11* nezávisle na cAMP-PKA a MAPK dráze. Uvedené výsledky naznačují, že proteiny Sok2, Phd1 a Ash1 jsou součástí třetí dráhy, která reguluje paralelně s cAMP-PKA a MAPK dráhou expresi genu *FLO11* (PAN and HEITMAN 2000). Nedávno byl popsán gen *SFL1* odpovědný za povrchový růst pseudohyf. Overexprese *SFL1* indukuje pseudohyfální růst v mutantech jak MAPK dráhy tak i cAMP-PKA dráhy. Overexprese *PHD1* způsobí u delečního mutantů *sfl1Δsfl1Δ* pouze mírné zvýšení tvorby pseudohyf, takže Sfl1 je potřebný pro plnou indukci pseudohyfálního růstu prostřednictvím Phd1. Oba proteiny proto zřejmě kooperují při regulaci pseudohyfálního růstu (FUJITA *et al.* 2005).

Buněčný cyklus

Dva kvasinkové forkhead transkripční faktory Fkh1 a Fkh2 regulují buněčný cyklus a pseudohyfální růst (ZHU *et al.* 2000). Geny regulované buněčným

cyklem tvoří často skupiny koregulovaných genů. Pod kontrolou transkripčních faktorů Fkh1 a Fkh2 je jedna z těchto skupin, tzv. CLB2 cluster, obsahující geny *CLB1*, *CLB2*, *SWI5*, *ACE2*, *CDC5* a mnoho jiných genů potřebných pro mitózu. Přepnutí z vegetativního na pseudohyfální růst je zřejmě pod kontrolou Fkh1 a Fkh2, protože mutanti *fkh1Δfkh2Δ* vykazují konstitutivní pseudohyfální růst (HOLLENHORST *et al.* 2000; ZHU *et al.* 2000)

Protein kináza Yak1 je negativní regulátor Ras2-cAMP-PKA dráhy, objevený při hledání mutací suprimujících mutovaný gen *RAS2*. Homology Yak1 u vyšších eukaryot hrají úlohu při regulaci buněčného cyklu a diferenciaci. Overexprese *YAK1* indukuje pseudohyfální růst diploidů a disrupční mutanti *yak1Δyak1Δ* vykazují poruchy v pseudohyfálním růstu (ZHANG *et al.* 2001).

Kinázová aktivita Yak1 je stimulována hladověním na dusík (GARRETT *et al.* 1991). Glukóza neovlivňuje samotnou kinázovou aktivitu Yak1, ale reguluje asociaci Yak1 s proteiny Bmh1 a Bmh2 z rodiny 14-3-3 proteinů, které fungují jako jaderné exportéry. V nepřítomnosti glukózy je Yak1 přesunut do jádra a tam fosforyluje Pop2, transkripční regulátor glukózou reprimovaných genů (MORIYA *et al.* 2001). Po přidání glukózy do média je kináza Yak1 exportována z jádra do cytoplazmy. Je možné, že Yak1 je spojovacím článkem mezi pseudohyfálním růstem a monitorováním hladiny glukózy.

Nutriční a environmentální vlivy

Novější práce ukazují, že přítomnost alifatických alkoholů v médiu nebo mírný teplotní stres indukují pseudohyfální růst v kmenech odvozených od $\Sigma 1278b$ (ZARAGOZA and GANCEDO 2000) U haploidů může být pseudohyfální růst indukován kultivací v přítomnosti nízkouhlíkatých alkoholů (DICKINSON 1996; LORENZ *et al.* 2000a). Tyto alkoholy jsou koncovým produktem katabolizmu aminokyselin při růstu na médiu s nízkým obsahem dusíku. Pro alkoholy indukovaný pseudohyfální růst je potřebná MAPK dráha a geny regulující polarizovaný růst a pučení (*BUD8*, *BEM1*, *BEM2* a *FIG1*). Filamentální růst vyvolaný přítomností alkoholů je velmi závislý na genetickém pozadí. Kmeny odvozené od S288C nerostou ani za těchto podmínek filamentálně. U diploidů funguje jako stimulator pseudohyfálního růstu i etanol. Tento fenotyp vyžaduje *TEC1* a stejně jako i u haploidů není závislý na senzorech živin Gpa2, Gpr1 ani Mep2 (LORENZ *et al.* 2000a). Kromě toho, že by buňky mohly nepřímo monitorovat hladinu živin prostřednictvím vedlejších produktů metabolismu, je jistě zajímavá i myšlenka, že by tyto alkoholy mohly sloužit při monitorování hustoty populace.

Nedávno byly publikovány výsledky ukazující, že pseudohyfální růst může být ovlivněn hladověním na přenašeč jednouhlíkatých intermediátů. Delece genu *FOL1* indukuje filamentální růst i v případě, že je v médiu dostatek glukózy a amonických iontů (GULDENER *et al.* 2004). Produkt genu *FOL1* je součástí dráhy syntetizující

tetrahydrofolát (vitamin B9), který je důležitým kofaktorem různých reakcí přenášejících jednouhlíkaté intermediáty. Adhezivita k agaru u mutanta *fol1Δ* je závislá na Ste12 a Flo11, ale nezávislá na Tec1. Filamentální růst mutanta *fol1Δ* ale nevyžaduje ani jeden z proteinů Ste12, Tec1, Phd1 a Flo11. Fenotyp mutanta *fol1Δ* naznačuje, že invazivita a filamentace je vyvolávána odlišnými signály (GULDENER *et al.* 2004).

Pseudohyální růst je reprimován aktivací dráhy UPR (unfolded protein response), indukovanou za stresových podmínek. Dráha UPR je odpovědná za indukci chaperonů endoplazmatického retikula v případě, že se v endoplazmatickém retikulu zvýší množství nesprávně složených proteinů (KAUFMAN 1999). Významnou úlohu má transkripční faktor Hac1, aktivující transkripci chaperonů endoplazmatického retikula. Exprese *HAC1* je stimulována signálem generovaným nesloženými proteiny v endoplazmatickém retikulu. Nesestříhaná *HAC1* mRNA obsahuje dva exony oddělené intronem obsahujícím translační atenuátor. Na sestřihu *HAC1* mRNA se podílí protein Ire1, spojení exonů zabezpečuje tRNA ligáza, takže není použitý spliceozom. Delece *HAC1* anebo *IRE1* indukuje pseudohyální růst, naopak overexprese *HAC1* pseudohyální růst reprimuje (SCHRODER *et al.* 2000). Sestřih *HAC1* mRNA je zastaven při dusíkovém hladovění a naopak stimulován vysokou hladinou dusíku. Při hladovění na dusík je pseudohyální růst stimulován zpomalením translace, inaktivací UPR dráhy a inhibicí sestřihu

HAC1 mRNA (SCHRODER *et al.* 2000). Efektivita skládání proteinů v endoplazmatickém retikulu a následná aktivace UPR dráhy působí jako senzor rychlosti translace, fungující při monitorování hladiny zdrojů dusíku. I translace samotná může ovlivnit filamentální růst. Delece genu *RPS26A* kódujícího jeden z proteinů malé podjednotky ribozomu způsobí poruchy filamentálního růstu. Mutace dramaticky snižuje translaci *FLO11* mRNA, přitom samotná hladina mRNA je stejná jako u rodičovského kmene (STRITTMATTER *et al.* 2006). Nízká exprese izogenu *RPS26B* je dostatečná pro růst buněk v kvasinkové formě, nepostačuje však pro přepnutí na filamentální růst.

Fyzické vlivy

Při hledání mutantních kmenů se zvýšenou invazivitou se našli invazivně rostoucí mutanti nevyžadující zvýšenou expresi *FLO11* (PALECEK *et al.* 2000). Jde především o kmeny s mutacemi ovlivňujícími polaritu pučení (*axl1*, *bem2*, *bud3*, *bud4*, *bud10*, *elm1*, *gnd1*, *pgi1*, *sir2*, *sir4*). Výjimkou jsou mutanti *hsl1*, *hsl7* a *ydj1*, u kterých je pro invazivitu kromě polárního pučení důležitá i zvýšená exprese *FLO11*. Invazivita haploidů, flokulace, invazivita a filamentální růst diploidů jsou geneticky oddělitelné procesy (PALECEK *et al.* 2000). Tyto procesy jsou aktivovány MAPK dráhou, ale každý z nich má ještě i nějakou unikátní signální dráhu. Mutace které polarizují pučení ale neindukují expresi *FLO11* (*axl1*, *bud3*, *bud4*, *bud10*, *sir2*, *sir4*), nezvyšují invazivitu ani filamentální růst diploidů. Tato skupina genů tvoří

haploidně specifickou dráhu pro invazivní růst založený na polaritě pučení. Naopak filamentární růst a invazivitu diploidů zvyšují mutace které zvýrazňují elongaci buněk. Mutace dereprimující expresi *FLO11* ale neovlivňující elongaci buněk a polaritu pučení, indukují hyperinvazivní růst diploidů (*ira1*, *adh1*). Kromě přímého účinku na expresi *FLO11*, elongaci a filamentární růst buněk, regulují některé geny invazivní růst nepřímo. Geny pro stresovou odpověď *HSC82*, *YDJ1* a *ZUO1* fungují jako negativní regulátory MAPK dráhy. Gen *HSC82* kóduje heat shock protein Hsp90, který aktivuje MAPK dráhu prostřednictvím Ste11 (LOUVION *et al.* 1998), čímž indukuje expresi *FLO11*. Chaperon Ydj1 interaguje s Hsp90 (KIMURA *et al.* 1995).

Kontrola morfologických změn

Při pučení kvasinek se dceřiná buňka odděluje po dosažení velikosti mateřské buňky, takže mladá dceřiná buňka musí nějaký čas setrvat v G1 fázi až do dosažení kritické velikosti pro přechod do S fáze buněčného cyklu. Při pseudohyfálním růstu je prodloužena naopak G2/M fáze, takže po vytvoření septa je dceřiná buňka stejně velká jako mateřská a může pučet bez zdržení v G1 fázi. Mateřská a dceřiná buňka tak pučí v následujícím buněčném cyklu synchronizovaně (KRON *et al.* 1994). Přepnutí na pseudohyfální růst je spojeno se změnami buněčného cyklu, změnami adhezivity, invazivity, pučení a morfologie buněk.

Adhezivita a invazivita

Pro filamentární růst je potřebné aby buňky byly navzájem mechanicky

spojeny a mohly tak pronikat prostředím ve svém okolí. Soudržnost buněk je regulována dvěma způsoby: adhezivitou buněk nebo nekompletním oddělováním dceřiných a mateřských buněk při pučení. Adhezivita buněk je zprostředkována flokuliny, vysoce glykozylovanými proteiny s GPI kotvou. Pro filamentární růst je nejdůležitější již zmiňovaný flokulin Flo11, delece kterého vede k poruchám filamentárního růstu a zároveň k poruchám v invazivitě (LO and DRANGINIS 1998). Overexprese flokulinu Flo10 a proteinu Fig2, důležitého pro adhezivitu při párování kvasinek, vyvolá u delečního mutanta *flo11Δflo11Δ* pseudohyfální růst (GUO *et al.* 2000). Delece regulačního genu *SFL1*, kódujícího negativní regulátor, částečně obnoví u mutanta *flo11* filamentární růst. Deleční mutace *sfl1Δ* částečně obnoví filamentární růst mutanta *flo11Δ*. Za filamentární růst tohoto mutanta je odpovědný gen *FLO10*, který je také negativně regulován proteinem Sfl1 (GUO *et al.* 2000).

Geny pro kvasinkové flokuliny leží v subtelomerických oblastech, výjimkou je pouze gen *FLO11*, který neleží ani v subtelomerické oblasti ani v oblasti centromery. Výsledky nedávné studie ukázaly, že gen *FLO11* je regulován také epigenetickým umlčením (HALME *et al.* 2004). Při dusíkovém hladovění se tvoří pseudohyfy, ale pouze část buněk v kolonii začne růst pseudohyfálně a exprimovat *FLO11*. Exprese *FLO11* je umlčena v buňkách nerostoucích filamentárně. Na umlčení exprese se podílí regulátor Sfl1 (PAN and HEITMAN 2002) a histon deacetyláza Hda1, účastníci se deacetylace velkých částí

kvasinkového genomu (ROBYR *et al.* 2002). Deacetyláza Hda1 je navedena ke specifickým promotorům prostřednictvím Tup1 (WU *et al.* 2001). Samotný Tup1 je naveden proteinem Sfl1 k promotoru genu *FLO11* (CONLAN and TZAMARIAS 2001). Exprese *FLO11* je za normálních okolností heterogenní, ztráta umlčení vede k filamentárnímu fenotypu a konstitutivní expresi *FLO11* u mutantů *sfl1* a *hda1* (HALME *et al.* 2004).

Pro filamentární růst má obrovský význam nekompletní oddělování mateřských a dceřiných buněk. Transkripční faktory Ace2 a Swi5 indukují v G1 fázi buněčné cyklu endochitinázu Cts1 a endoglukanázu Egt2, enzymy odpovědné za štěpení septa (DOHRMANN *et al.* 1996; KOVACECH *et al.* 1996). Kmeny rostoucí pseudohyálně mají nižší aktivitu chitinázy než mutantní kmeny s poruchou v pseudohyálním růstu. Mutace *cts1* nebo *ace2* vedou k indukci filamentárního růstu i v kmenech s delecí genu *FLO8* (KING and BUTLER 1998). Zajímavé je, že mutantní se sníženou hladinou chitinázy mají stejné množství chitinu jako divoké kmeny. Chitináza tedy zřejmě chitin pouze zkracuje, ale neovlivňuje jeho celkové množství (KING and BUTLER 1998). Kongo červeň, látka modifikující strukturu glukanu buněčné stěny (KOPECKA and GABRIEL 1992), způsobí po přidání do média invazivní zarůstání buněk do agaru dokonce i u kmenů odvozených od W303, jinak neschopných filamentárního růstu (ZARAGOZA and GANCEDO 2000). Mutace genu *EGT2* vede ke zvýšení pseudohyálního růstu u kmene s

deletovaným genem *FLO11* (PAN and HEITMAN 2000). Pod kontrolou Ace2 a Swi5 je kromě Cts1 a Egt2 ještě mnoho proteinů důležitých pro syntézu buněčné stěny nebo pro separaci buněk. Poruchy v separaci mají mutantní v genech *YHR143W* a *YER124C* (DOOLIN *et al.* 2001). Gen *YHR143W* patří do funkční skupiny s geny *CTS1* a *EGT2* a předpokládá se, že hraje úlohu při udržování buněčné stěny a jeho delece vede ke zvýšení pseudohyálního růstu. Delece *YER124C* nemá na pseudohyální růst žádný vliv (DOOLIN *et al.* 2001). Agregaci buněk nezávislou na Flo11 vyvolá disrupce genu *LRG1*, kódujícího GAP protein regulující syntézu glukanu. Mutace *lrg1* vyvolá u haploidů zvýšenou invazivitu, nezvyšuje však pseudohyální růst diploidů *lrg1/lrg1* (SVAROVSKY and PALECEK 2005). Agregace buněk je způsobena zvýšenou produkcí β -1,3-glukanu v místě pučení, takže ztlustělé septum je hůře degradovatelné.

Poruchy v invazivitě má mutant *dfg16*, nevykazuje ale poruchy v polaritě pučení ani v tvorbě pseudohyf (MOSCH and FINK 1997). Gen *DFG16* kóduje protein se šesti transmembránovými doménami, který zřejmě hraje roli v syntéze buněčné stěny (LUSSIER *et al.* 1997). Mutanti *dfg16* mají v buněčné stěně zvýšený poměr manózy oproti glukóze a jsou citlivější vůči látkám jako je calcoflour white. Invazivitu ovlivňují i některé mutantní alely genu *ACT1* kódujícího aktin. U těchto mutantů je pravděpodobně narušena sekrece hydroláz umožňujících zarůstání do agaru (CALI *et al.* 1998).

Pučení

Haploidní buňky pučí axiálně, takže nová dceřiná buňka pučí v blízkosti jizvy zrodu mateřské buňky. Naproti tomu diploidní buňky pučí bipolárně a toto pučení se změní na unipolární v případě, že buňky začnou tvořit pseudohyfy (GIMENO *et al.* 1992; KRON *et al.* 1994). Axiálně pučící haploidní buňky používají značku, kterou je označeno místo poslední cytokineze aby další pučení bylo směřováno právě do této oblasti. Na označení místa posledního pučení se podílejí proteiny Axl1, Bud3, Bud4, Bud10 a septiny Cdc3, Cdc10, Cdc11 a Cdc12 (MADDEN and SNYDER 1998). Delece nebo mutace některého z těchto genů má za následek polární pučení haploidů a indukcí invazivního růstu nezávislého na aktivaci exprese *FLO11* (PALECEK *et al.* 2000). Delece genů kódujících proteiny Kre9 a Hkr1 účastníci se syntézy buněčné stěny způsobí změnu axiálního pučení na náhodné pučení. Mutace v genech důležitých pro polární pučení (*BUD1*, *BUD5* a *BUD8*) vedou u diploidních kmenů k náhodnému pučení. Tito mutanti nejsou schopni růst pseudohyfálně (LO *et al.* 1997a; MOSCH and FINK 1997).

Morfologie buněk

Postup buněčným cyklem je pod kontrolou protein kinázy Cdc28 asociující v průběhu G1 fáze s cykliny Cln1, Cln2 a Cln3 a s cykliny Clb1 a Clb2 před mitózou (LEW and REED 1993). Při pseudohyfálním růstu je prodloužena G2 fáze (KRON *et al.* 1994). Prodloužení přechodu G2/M je možné indukovat aktivací MAPK dráhy, která inhibuje komplexy Cdc28 s mitotickými

cykliny Clb (AHN *et al.* 1999). Signální dráhy účastníci se signalizace při pseudohyfálním růstu jsou tedy schopné ovlivňovat buněčný cyklus prostřednictvím cyklinů a protein kinázy Cdc28. Přechod z fáze G2 do mitózy je spojen s downregulací G1 cyklinů Cln a upregulací aktivity G2 cyklinů Clb (AMON *et al.* 1993). Přepnutí pučící dceřiné buňky z polarizovaného na izotropický růst je kontrolováno poměrem aktivit cyklinů Cln/Clb (OEHLER and CROSS 1998), a proto regulace cyklinů výrazně ovlivňuje morfologii buněk při pseudohyfálním růstu. Dvojitá delece *cln1Δcln1Δ* anebo *cln2Δcln2Δ* znemožní pseudohyfální růst, delece *cln1Δ* ani delece *cln2Δ* neovlivňuje invazivní růst haploidů (OEHLER and CROSS 1998). Exprese cyklinu Cln1, nepostradatelného pro tvorbu pseudohyf, je aktivována MAPK dráhou prostřednictvím Tec1 a Ste12 (MADHANI *et al.* 1999).

Filamentární růst: výjimka či pravidlo?

Filamentární růst kvasinky *S. cerevisiae* je složitý proces integrující signály o hladinách živin a metabolických meziproductů, vedoucí ke změnám adhezivity buněk, polarity pučení, morfologie a buněčného cyklu. I přes výrazný pokrok v poznání molekulární podstaty těchto procesů však stále chybí mnoho detailních znalostí jak o samotných senzorech tak i o přenosu a integraci signálů uvnitř buněk. Filamentární růst přitom není pouhou okrajovou záležitostí života kvasinek. Vlastnosti přirozeného prostředí ve kterém se kvasinky *S. cerevisiae* vyskytují velmi často podporují jejich

dimorfismus a kooperativní chování. Příkladem mohou být dozrávající plody *Vitis vinifera* obsahující vysokou hladinu glukózy a poměrně málo přístupné zdroje dusíku. Jednou z nejčastěji se vyskytujících aminokyselin v plodech hroznů je prolin, který tvoří spolu s argininem 30 až 65 % z celkového obsahu aminokyselin (DHARMADHIKARI 2001). Ačkoli koncentrace prolinu ve zralých hroznech dosahuje až 2.8 miligramů na gram čerstvé hmotnosti plodů (STINES *et al.* 1999), mohou být kvasinky vystaveny dusíkovému hladovění. Na zpracování prolinu je potřebný kyslík takže při anaerobióze mohou kvasinky trpět nedostatkem dusíku i přes jeho zdánlivý dostatek (DHARMADHIKARI 2001; INGLEDEW and MAGNUS 1987).

Vzhledem ke stále se měnícím podmínkám okolního prostředí je zřejmé, že mnohobuněčné chování kvasinek rozhodně není výjimečné. Naopak exponenciálně rostoucí tekuté kultury, tak často studované v laboratořích, jsou v přirozených podmínkách spíše výjimečné a vázané na sezónní výskyt nadbytku živin.

Publikace

Závěr

Již v úvodu jsem se zmínil, že mnohé laboratorní kmeny kvasinek ztratili vlivem domestikace schopnost filamentárního růstu. Ukázkovým příkladem cílené domestikace je laboratorní kmen S288C. Historie vzniku tohoto kmene je zajímavá a dokumentuje výrazný vliv genetiků na jeho vlastnosti. Velké množství kmenů *S. cerevisiae* používaných v laboratořích má společného předka kterým je kmen EM93. Tento diploidní kmen izoloval v Kalifornii v roce 1938 Emil Mrak z hnijícího fíku (MORTIMER and JOHNSTON 1986). Není však jasné, zda se jednalo o přirozenou mikroflóru fíků, nebo o kontaminaci komerčními pekařskými či kvasnými kmeny. Kmen EM93 je heterotalický a je schopen filamentárního růstu (LIU *et al.* 1996). Pro laboratorní účely ale nebyl úplně "pohodlný". Protože tvorba shluků buněk brání izolaci klonů vzniklých z jediné buňky a ztěžuje přesné určení počtu buněk v tekutých kulturách, snažili se genetici získat prototrofní kmen s neadherujícími, dobře resuspendovatelnými buňkami. Mnohonásobným křížením haploidních segregantů kmene EM93 s dalšími laboratorními kmeny a komerčními pekařskými kmeny vytvořil Robert Mortimer kmen S288C, jehož 90 % genomu pochází z kmene EM93 (MORTIMER and JOHNSTON 1986). Tím, že se snažil selektovat kmeny vhodné pro genetický výzkum však selektoval zároveň proti dimorfizmu. Za neschopnost růst filamentálně je odpovědná záměna jediné báze v genu

FLO8, čímž vzniká stop kodon uprostřed tohoto otevřeného čtecího rámce (LIU *et al.* 1996). Kde však kmen S288C získal tuto mutaci není úplně jasné. Komplementační testy totiž ukázaly, že kmen EM93 je homozygot v genu *FLO8*. Příklad kmene S288C je názornou ukázkou toho, že chování laboratorních kmenů může být velmi vzdálené od chování jejich blízkých příbuzných v přírodě. Přitom faktický rozdíl může být tak nicotný jako záměna jediné báze.

Seznam literatury

- AHN, S. H., A. ACURIO and S. J. KRON, 1999 Regulation of G2/M progression by the STE mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast filamentous growth. *Mol Biol Cell* **10**: 3301-3316.
- AMON, A., M. TYERS, B. FUTCHER and K. NASMYTH, 1993 Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**: 993-1007.
- ANSARI, K., S. MARTIN, M. FARKASOVSKY, I. M. EHBRECHT and H. KUNTZEL, 1999 Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 30052-30058.
- BARBET, N. C., U. SCHNEIDER, S. B. HELLIWELL, I. STANSFIELD, M. F. TUIE *et al.*, 1996 TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* **7**: 25-42.
- BARDWELL, L., J. G. COOK, D. VOORA, D. M. BAGGOTT, A. R. MARTINEZ *et al.*, 1998a Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* **12**: 2887-2898.
- BARDWELL, L., J. G. COOK, J. X. ZHU-SHIMONI, D. VOORA and J. THORNER, 1998b Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15400-15405.
- BATLLE, M., A. LU, D. A. GREEN, Y. XUE and J. P. HIRSCH, 2003 Krh1p and Krh2p act downstream of the Gpa2p G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth. *J Cell Sci* **116**: 701-710.
- BRAUS, G. H., O. GRUNDMANN, S. BRUCKNER and H. U. MOSCH, 2003 Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 4272-4284.
- BREITKREUTZ, A., L. BOUCHER, B. J. BREITKREUTZ, M. SULTAN, I. JURISICA *et al.*, 2003 Phenotypic and transcriptional plasticity directed by a yeast mitogen-activated protein kinase network. *Genetics* **165**: 997-1015.
- CALI, B. M., T. C. DOYLE, D. BOTSTEIN and G. R. FINK, 1998 Multiple functions for actin during filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 1873-1889.
- CAVALIERI, D., J. P. TOWNSEND and D. L. HARTL, 2000 Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12369-12374.
- CHANDARLAPATY, S., and B. ERREDE, 1998 Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**: 2884-2891.
- CHANG, F., and I. HERSKOWITZ, 1990 Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* **63**: 999-1011.
- COLOMBO, S., P. MA, L. CAUWENBERG, J. WINDERICKX, M. CRAUWELS *et al.*, 1998 Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**: 3326-3341.
- CONLAN, R. S., and D. TZAMARIAS, 2001 Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**: 1007-1015.
- CONTE, D., JR., and M. J. CURCIO, 2000 Fus3 controls Ty1 transpositional dormancy through the invasive growth MAPK pathway. *Mol Microbiol* **35**: 415-427.
- COOK, J. G., L. BARDWELL, S. J. KRON and J. THORNER, 1996 Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831-2848.
- COOK, J. G., L. BARDWELL and J. THORNER, 1997 Inhibitory and activating functions for

- MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85-88.
- COVITZ, P. A., W. SONG and A. P. MITCHELL, 1994 Requirement for RGR1 and SIN4 in RME1-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**: 577-586.
- CULLEN, P. J., W. SABBAGH, JR., E. GRAHAM, M. M. IRICK, E. K. VAN OLDEN *et al.*, 2004 A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695-1708.
- CULLEN, P. J., J. SCHULTZ, J. HORECKA, B. J. STEVENSON, Y. JIGAMI *et al.*, 2000 Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- CULLEN, P. J., and G. F. SPRAGUE, JR., 2000 Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13619-13624.
- CUTLER, N. S., X. PAN, J. HEITMAN and M. E. CARDENAS, 2001 The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol Biol Cell* **12**: 4103-4113.
- DAVENPORT, K. D., K. E. WILLIAMS, B. D. ULLMANN and M. C. GUSTIN, 1999 Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**: 1091-1103.
- DERISI, J. L., V. R. IYER and P. O. BROWN, 1997 Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
- DHARMADHIKARI, M., 2001 Nitrogen metabolism during fermentation. *Vineyard and Vintage View* **17**: 5-7.
- DI COMO, C. J., and K. T. ARNDT, 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904-1916.
- DICKINSON, J. R., 1996 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* **142 (Pt 6)**: 1391-1397.
- DOHRMANN, P. R., W. P. VOTH and D. J. STILLMAN, 1996 Role of negative regulation in promoter specificity of the homologous transcriptional activators Ace2p and Swi5p. *Mol Cell Biol* **16**: 1746-1758.
- DONZEAU, M., and W. BANDLOW, 1999 The yeast trimeric guanine nucleotide-binding protein alpha subunit, Gpa2p, controls the meiosis-specific kinase Ime2p activity in response to nutrients. *Mol Cell Biol* **19**: 6110-6119.
- DOOLIN, M. T., A. L. JOHNSON, L. H. JOHNSTON and G. BUTLER, 2001 Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol* **40**: 422-432.
- DUNHAM, M. J., H. BADRANE, T. FEREA, J. ADAMS, P. O. BROWN *et al.*, 2002 Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16144-16149.
- EDSKES, H. K., J. A. HANOVER and R. B. WICKNER, 1999 Mks1p is a regulator of nitrogen catabolism upstream of Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**: 585-594.
- EICHENBAUM, Z., and Z. LIVNEH, 1998 UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics* **149**: 1173-1181.
- ERDMAN, S., and M. SNYDER, 2001 A filamentous growth response mediated by the yeast mating pathway. *Genetics* **159**: 919-928.
- ESPESO, E. A., T. RONCAL, E. DIEZ, L. RAINBOW, E. BIGNELL *et al.*, 2000 On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *Embo J* **19**: 719-728.
- ESTRUCH, F., and M. CARLSON, 1990 Increased dosage of the MSN1 gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the SNF1 protein kinase. *Nucleic Acids Res* **18**: 6959-6964.
- FAZZIO, T. G., C. KOOPERBERG, J. P. GOLDMARK, C. NEAL, R. BASOM *et al.*, 2001 Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **21**: 6450-6460.
- FUJITA, A., T. HIROKO, F. HIROKO and C. OKA, 2005 Enhancement of superficial pseudohyphal growth by overexpression of the SFG1 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **363**: 97-104.

- FUJITA, A., A. TONOUCI, T. HIROKO, F. INOSE, T. NAGASHIMA *et al.*, 1999 Hsl7p, a negative regulator of Ste20p protein kinase in the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8522-8527.
- FULTON, A. M., P. D. RATHJEN, S. M. KINGSMAN and A. J. KINGSMAN, 1988 Upstream and downstream transcriptional control signals in the yeast retrotransposon, TY. *Nucleic Acids Res* **16**: 5439-5458.
- GAGIANO, M., M. BESTER, D. VAN DYK, J. FRANKEN, F. F. BAUER *et al.*, 2003 Mss11p is a transcription factor regulating pseudohyphal differentiation, invasive growth and starch metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* in response to nutrient availability. *Mol Microbiol* **47**: 119-134.
- GAGIANO, M., D. VAN DYK, F. F. BAUER, M. G. LAMBRECHTS and I. S. PRETORIUS, 1999 Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **31**: 103-116.
- GALITSKI, T., A. J. SALDANHA, C. A. STYLES, E. S. LANDER and G. R. FINK, 1999 Ploidy regulation of gene expression. *Science* **285**: 251-254.
- GARRETT, S., M. M. MENOLD and J. R. BROACH, 1991 The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* **11**: 4045-4052.
- GIMENO, C. J., and G. R. FINK, 1994 Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**: 2100-2112.
- GIMENO, C. J., P. O. LJUNGDAHL, C. A. STYLES and G. R. FINK, 1992 Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
- GOGNIES, S., E. A. BARKA, A. GAINVORS-CLAISSE and A. BELARBI, 2006 Interactions between yeasts and grapevines: filamentous growth, endopolygalacturonase and phytopathogenicity of colonizing yeasts. *Microb Ecol* **51**: 109-116.
- GOGNIES, S., and A. BELARBI, 2002 Endopolygalacturonase of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement in pseudohyphae development of haploids and in pathogenicity on *Vitis vinifera*. *Plant Sci* **163**: 759-769.
- GORNER, W., E. DURCHSCHLAG, M. T. MARTINEZ-PASTOR, F. ESTRUCH, G. AMMERER *et al.*, 1998 Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.
- GULDENER, U., G. J. KOEHLER, C. HAUSSMANN, A. BACHER, J. KRICKE *et al.*, 2004 Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Flo1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth. *Mol Biol Cell* **15**: 3811-3828.
- GUO, B., C. A. STYLES, Q. FENG and G. R. FINK, 2000 A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12158-12163.
- HALME, A., S. BUMGARNER, C. STYLES and G. R. FINK, 2004 Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**: 405-415.
- HANSEN, E. C., 1886 Recherches sur la morphologie et la physiologie des ferments alcooliques. VI. Les voiles chez les *Saccharomyces*, pp. 106 in *Résumé du comptes rendues des travaux du laboratoire de Carlsberg*.
- HARASHIMA, T., and J. HEITMAN, 2002 The Galpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic Gbeta subunits. *Mol Cell* **10**: 163-173.
- HARASHIMA, T., and J. HEITMAN, 2005 Galpha subunit Gpa2 recruits kelch repeat subunits that inhibit receptor-G protein coupling during cAMP-induced dimorphic transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 4557-4571.
- HINNEBUSCH, A. G., 1997 Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* **272**: 21661-21664.

- HINNEBUSCH, A. G., and K. NATARAJAN, 2002 Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **1**: 22-32.
- HOLLENHORST, P. C., M. E. BOSE, M. R. MIELKE, U. MULLER and C. A. FOX, 2000 Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for FKH1 and FKH2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1533-1548.
- HUGHES, T. R., M. J. MARTON, A. R. JONES, C. J. ROBERTS, R. STOUGHTON *et al.*, 2000 Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102**: 109-126.
- INGLEDEW, W. M., and C. A. MAGNUS, 1987 Influence of oxygen on proline utilisation during the wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**: 246-248.
- JANSEN, G., F. BUHRING, C. P. HOLLENBERG and M. RAMEZANI RAD, 2001 Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**: 102-117.
- KAUFMAN, R. J., 1999 Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**: 1211-1233.
- KELEHER, C. A., M. J. REDD, J. SCHULTZ, M. CARLSON and A. D. JOHNSON, 1992 Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68**: 709-719.
- KIMURA, Y., I. YAHARA and S. LINDQUIST, 1995 Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways. *Science* **268**: 1362-1365.
- KING, L., and G. BUTLER, 1998 Ace2p, a regulator of CTS1 (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **34**: 183-191.
- KLASSON, H., G. R. FINK and P. O. LJUNGDAHL, 1999 Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **19**: 5405-5416.
- KOBAYASHI, O., H. SUDA, T. OHTANI and H. SONE, 1996 Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **251**: 707-715.
- KOPECKA, M., and M. GABRIEL, 1992 The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126.
- KOVACECH, B., K. NASMYTH and T. SCHUSTER, 1996 EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol Cell Biol* **16**: 3264-3274.
- KRAAKMAN, L., K. LEMAIRE, P. MA, A. W. TEUNISSEN, M. C. DONATON *et al.*, 1999 A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**: 1002-1012.
- KRON, S. J., C. A. STYLES and G. R. FINK, 1994 Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**: 1003-1022.
- KUBLER, E., H. U. MOSCH, S. RUPP and M. P. LISANTI, 1997 Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 20321-20323.
- KUCHIN, S., V. K. VYAS and M. CARLSON, 2002 Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3994-4000.
- KUO, M. H., E. T. NADEAU and E. J. GRAYHACK, 1997 Multiple phosphorylated forms of the *Saccharomyces cerevisiae* Mcm1 protein include an isoform induced in response to high salt concentrations. *Mol Cell Biol* **17**: 819-832.
- KURANDA, M. J., and P. W. ROBBINS, 1991 Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 19758-19767.
- KUTHAN, M., F. DEVAUX, B. JANDEROVA, I. SLANINOVA, C. JACQ *et al.*, 2003 Domestication of wild *Saccharomyces*

- cerevisiae is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* **47**: 745-754.
- LAMBRECHTS, M. G., F. F. BAUER, J. MARMUR and I. S. PRETORIUS, 1996 Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8419-8424.
- LEBERER, E., C. WU, T. LEEUW, A. FOUREST-LIEUVIN, J. E. SEGALL *et al.*, 1997 Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *Embo J* **16**: 83-97.
- LENGELER, K. B., R. C. DAVIDSON, C. D'SOUZA, T. HARASHIMA, W. C. SHEN *et al.*, 2000 Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785.
- LEW, D. J., and S. I. REED, 1993 Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* **120**: 1305-1320.
- LI, W., and A. P. MITCHELL, 1997 Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**: 63-73.
- LIU, H., C. A. STYLES and G. R. FINK, 1993 Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741-1744.
- LIU, H., C. A. STYLES and G. R. FINK, 1996 *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967-978.
- LO, H. J., J. R. KOHLER, B. DiDOMENICO, D. LOEBENBERG, A. CACCIAPUOTI *et al.*, 1997a Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- LO, W. S., and A. M. DRANGINIS, 1998 The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 161-171.
- LO, W. S., E. I. RAITSES and A. M. DRANGINIS, 1997b Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeast. *Curr Genet* **32**: 197-202.
- LORENZ, M. C., N. S. CUTLER and J. HEITMAN, 2000a Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 183-199.
- LORENZ, M. C., and J. HEITMAN, 1997 Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *Embo J* **16**: 7008-7018.
- LORENZ, M. C., and J. HEITMAN, 1998 The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**: 1236-1247.
- LORENZ, M. C., and J. HEITMAN, 1998a Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* **150**: 1443-1457.
- LORENZ, M. C., X. PAN, T. HARASHIMA, M. E. CARDENAS, Y. XUE *et al.*, 2000 The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 609-622.
- LOUVION, J. F., T. ABBAS-TERKI and D. PICARD, 1998 Hsp90 is required for pheromone signaling in yeast. *Mol Biol Cell* **9**: 3071-3083.
- LUSSIER, M., A. M. WHITE, J. SHERATON, T. DI PAOLO, J. TREADWELL *et al.*, 1997 Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435-450.
- MADDEN, K., and M. SNYDER, 1998 Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**: 687-744.
- MADHANI, H. D., and G. R. FINK, 1997 Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317.
- MADHANI, H. D., T. GALITSKI, E. S. LANDER and G. R. FINK, 1999 Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12530-12535.
- MADHANI, H. D., C. A. STYLES and G. R. FINK, 1997 MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673-684.

- MAEDA, T., M. TAKEKAWA and H. SAITO, 1995
Activation of yeast PBS2 MAPKK by
MAPKKs or by binding of an SH3-
containing osmosensor. *Science* **269**:
554-558.
- MAGASANIK, B., 1992 in *The Molecular and
Cellular Biology of the Yeast
Saccharomyces*, eds. Jones, E. W.,
Pringle, J.R., Broach, J. R., pp. 283-317.
Cold Spring Harbor Lab. Press,
Plainview, NY.
- MINARIKOVA, L., M. KUTHAN, M. RICICOVA, J.
FORSTOVA and Z. PALKOVA, 2001
Differentiated gene expression in cells
within yeast colonies. *Exp Cell Res* **271**:
296-304.
- MINATO, T., J. WANG, K. AKASAKA, T. OKADA, N.
SUZUKI *et al.*, 1994 Quantitative analysis
of mutually competitive binding of
human Raf-1 and yeast adenylyl cyclase
to Ras proteins. *J Biol Chem* **269**: 20845-
20851.
- MORILLON, A., M. SPRINGER and P. LESAGE, 2000
Activation of the Kss1 invasive-
filamentous growth pathway induces
Ty1 transcription and retrotransposition
in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell
Biol* **20**: 5766-5776.
- MORIYA, H., Y. SHIMIZU-YOSHIDA, A. OMORI, S.
IWASHITA, M. KATOH *et al.*, 2001 Yak1p, a
DYRK family kinase, translocates to the
nucleus and phosphorylates yeast
Pop2p in response to a glucose signal.
Genes Dev **15**: 1217-1228.
- MORTIMER, R. K., and J. R. JOHNSTON, 1986
Genealogy of principal strains of the
yeast genetic stock center. *Genetics* **113**:
35-43.
- MOSCH, H. U., and G. R. FINK, 1997 Dissection of
filamentous growth by transposon
mutagenesis in *Saccharomyces
cerevisiae*. *Genetics* **145**: 671-684.
- MOSCH, H. U., E. KUBLER, S. KRAPPMANN, G. R.
FINK and G. H. BRAUS, 1999 Crosstalk
between the Ras2p-controlled mitogen-
activated protein kinase and cAMP
pathways during invasive growth of
Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*
10: 1325-1335.
- MOSCH, H. U., R. L. ROBERTS and G. R. FINK, 1996
Ras2 signals via the
Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein
kinase module to induce filamentous
growth in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 5352-5356.
- MURRAY, L. E., N. ROWLEY, I. W. DAWES, G. C.
JOHNSTON and R. A. SINGER, 1998 A yeast
glutamine tRNA signals nitrogen status
for regulation of dimorphic growth and
sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*
95: 8619-8624.
- NASMYTH, K., G. ADOLF, D. LYDALL and A.
SEDDON, 1990 The identification of a
second cell cycle control on the HO
promoter in yeast: cell cycle regulation
of SWI5 nuclear entry. *Cell* **62**: 631-647.
- NELSON, C., S. GOTO, K. LUND, W. HUNG and I.
SADOWSKI, 2003 Srb10/Cdk8 regulates
yeast filamentous growth by
phosphorylating the transcription factor
Ste12. *Nature* **421**: 187-190.
- OEHLEN, L. J., and F. R. CROSS, 1998 Potential
regulation of Ste20 function by the Cln1-
Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-
dependent protein kinases. *J Biol Chem*
273: 25089-25097.
- O'ROURKE, S. M., and I. HERSKOWITZ, 1998 The
Hog1 MAPK prevents cross talk
between the HOG and pheromone
response MAPK pathways in
Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev*
12: 2874-2886.
- PALECEK, S. P., A. S. PARIKH, J. H. HUH and S. J.
KRON, 2002 Depression of
Saccharomyces cerevisiae invasive
growth on non-glucose carbon sources
requires the Snf1 kinase. *Mol Microbiol*
45: 453-469.
- PALECEK, S. P., A. S. PARIKH and S. J. KRON, 2000
Genetic analysis reveals that FLO11
upregulation and cell polarization
independently regulate invasive growth
in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*
156: 1005-1023.
- PALKOVA, Z., and J. FORSTOVA, 2000 Yeast colonies
synchronise their growth and
development. *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**:
1923-1928.
- PALKOVA, Z., B. JANDEROVA, J. GABRIEL, B.
ZIKANOVA, M. POSPISEK *et al.*, 1997
Ammonia mediates communication
between yeast colonies. *Nature* **390**: 532-
536.
- PAN, X., and J. HEITMAN, 1999 Cyclic AMP-
dependent protein kinase regulates
pseudohyphal differentiation in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-4887.
- PAN, X., and J. HEITMAN, 2000 Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* **20**: 8364-8372.
- PAN, X., and J. HEITMAN, 2002 Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3981-3993.
- PARK, S. H., S. S. KOH, J. H. CHUN, H. J. HWANG and H. S. KANG, 1999 Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 2044-2050.
- PETER, M., A. GARTNER, J. HORECKA, G. AMMERER and I. HERSKOWITZ, 1993 FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* **73**: 747-760.
- PETER, M., A. M. NEIMAN, H. O. PARK, M. VAN LOHUIZEN and I. HERSKOWITZ, 1996 Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *Embo J* **15**: 7046-7059.
- POSAS, F., and H. SAITO, 1997 Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- RAMEZANI RAD, M., G. JANSEN, F. BUHRING and C. P. HOLLENBERG, 1998 Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet* **259**: 29-38.
- REYNOLDS, T. B., and G. R. FINK, 2001 Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881.
- ROBERTS, C. J., B. NELSON, M. J. MARTON, R. STOUGHTON, M. R. MEYER *et al.*, 2000 Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**: 873-880.
- ROBERTS, R. L., and G. R. FINK, 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 Dev* **8**: 2974-2985.
- ROBERTS, R. L., H. U. MOSCH and G. R. FINK, 1997 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**: 1055-1065.
- ROBERTSON, L. S., and G. R. FINK, 1998 The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13783-13787.
- ROBYR, D., Y. SUKA, I. XENARIOS, S. K. KURDISTANI, A. WANG *et al.*, 2002 Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**: 437-446.
- RUIZ, C., V. ESCRIBANO, E. MORGADO, M. MOLINA and M. J. MAZON, 2003 Cell-type-dependent repression of yeast a-specific genes requires Itc1p, a subunit of the Isw2p-Itc1p chromatin remodelling complex. *Microbiology* **149**: 341-351.
- RUPP, S., E. SUMMERS, H. J. LO, H. MADHANI and G. FINK, 1999 MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *Embo J* **18**: 1257-1269.
- SANCHEZ-MARTINEZ, C., and J. PEREZ-MARTIN, 2001 Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**: 214-221.
- SCHRODER, M., J. S. CHANG and R. J. KAUFMAN, 2000 The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev* **14**: 2962-2975.
- SIDOROVA, J., and L. BREEDEN, 1999 The MSN1 and NHP6A genes suppress SWI6 defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**: 45-55.
- SIL, A., and I. HERSKOWITZ, 1996 Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**: 711-722.
- SONG, W., and M. CARLSON, 1998 Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *Embo J* **17**: 5757-5765.
- STANHILL, A., N. SCHICK and D. ENGELBERG, 1999 The yeast ras/cyclic AMP pathway

- induces invasive growth by suppressing the cellular stress response. *Mol Cell Biol* **19**: 7529-7538.
- STERN, M., R. JENSEN and I. HERSKOWITZ, 1984 Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol* **178**: 853-868.
- STEVENSON, B. J., B. FERGUSON, C. DE VIRGILIO, E. BI, J. R. PRINGLE *et al.*, 1995 Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **9**: 2949-2963.
- STINES, A. P., D. J. NAYLOR, P. B. HOJ and R. VAN HEESWIJCK, 1999 Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiol* **120**: 923.
- STRITTMATTER, A. W., C. FISCHER, M. KLEINSCHMIDT and G. H. BRAUS, 2006 FLO11 mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal RPS26 genes. *Mol Genet Genomics* **276**: 113-125.
- SVAROVSKY, M. J., and S. P. PALECEK, 2005 Disruption of LRG1 inhibits mother-daughter separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1117-1132.
- TAMAKI, H., T. MIWA, M. SHINOZAKI, M. SAITO, C. W. YUN *et al.*, 2000 GPR1 regulates filamentous growth through FLO11 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 164-168.
- TANAKA, K., M. NAKAFUKU, T. SATOH, M. S. MARSHALL, J. B. GIBBS *et al.*, 1990 *S. cerevisiae* genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell* **60**: 803-807.
- TODA, T., S. CAMERON, P. SASS, M. ZOLLER and M. WIGLER, 1987 Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**: 277-287.
- TRACHTULCOVA, P., I. FRYDLOVA, I. JANATOVA and J. HASEK, 2004 The absence of the Isw2p-Itc1p chromatin-remodelling complex induces mating type-specific and Flo11p-independent invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 389-401.
- TRUCKSES, D. M., J. E. BLOOMEKATZ and J. THORNER, 2006 The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 912-928.
- UREN, A. G., T. BEILHARZ, M. J. O'CONNELL, S. J. BUGG, R. VAN DRIEL *et al.*, 1999 Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10170-10175.
- VAN DYK, D., I. S. PRETORIUS and F. F. BAUER, 2005 Mss11p is a central element of the regulatory network that controls FLO11 expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- VINCENT, O., and M. CARLSON, 1999 Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *Embo J* **18**: 6672-6681.
- VYAS, V. K., S. KUCHIN and M. CARLSON, 2001 Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **158**: 563-572.
- WARD, M. P., C. J. GIMENO, G. R. FINK and S. GARRETT, 1995 SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* **15**: 6854-6863.
- WEK, S. A., S. ZHU and R. C. WEK, 1995 The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol* **15**: 4497-4506.
- WESSLER, S. R., 1996 Turned on by stress. Plant retrotransposons. *Curr Biol* **6**: 959-961.
- WRIGHT, R. M., T. REPINE and J. E. REPINE, 1993 Reversible pseudohyphal growth in haploid *Saccharomyces cerevisiae* is an aerobic process. *Curr Genet* **23**: 388-391.
- WU, J., N. SUKA, M. CARLSON and M. GRUNSTEIN, 2001 TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress

- gene activity in yeast. *Mol Cell* **7**: 117-126.
- WU, X., and Y. W. JIANG, 2005 Genetic/genomic evidence for a key role of polarized endocytosis in filamentous differentiation of *S. cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1143-1153.
- XUE, Y., M. BATLLE and J. P. HIRSCH, 1998 GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *Embo J* **17**: 1996-2007.
- YUN, C. W., H. TAMAKI, R. NAKAYAMA, K. YAMAMOTO and H. KUMAGAI, 1998 Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 29-33.
- ZARAGOZA, O., and J. M. GANCEDO, 2000 Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 187-194.
- ZHANG, Z., M. M. SMITH and J. S. MYMRYK, 2001 Interaction of the E1A oncoprotein with Yak1p, a novel regulator of yeast pseudohyphal differentiation, and related mammalian kinases. *Mol Biol Cell* **12**: 699-710.
- ZHENG, Y., R. CERIONE and A. BENDER, 1994 Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J Biol Chem* **269**: 2369-2372.
- ZHU, G., P. T. SPELLMAN, T. VOLPE, P. O. BROWN, D. BOTSTEIN *et al.*, 2000 Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* **406**: 90-94.
- ZHU, S., A. Y. SOBOLEV and R. C. WEK, 1996 Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J Biol Chem* **271**: 24989-24994.
- ZIKANOVA, B., M. KUTHAN, M. RICOVA, J. FORSTOVA and Z. PALKOVA, 2002 Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 962-967.
- ZOPF, W., 1890, pp. 27 in *Die Pilze*. Trevendt, Breslau.