

## 6. Souhrn

V této dizertační práci jsme se pokusili přispět k lepšímu porozumění vlastnostem osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii*.

Prvotním úkolem bylo připravit pro kvasinku *Z. rouxii* soubor metod genového inženýrství, které byly dosud velmi limitované, a neumožňovaly tak studium specifických vlastností *Z. rouxii*, k nimž patří právě vysoká osmotolerance.

Podářilo se nám vytvořit protokol pro účinnou transformaci *Z. rouxii* elektroporací. Připravili jsme auxotrofní mutantní kmeny odvozené od typového kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> obsahující různé kombinace mutací *ura3*, *leu2* nebo *ade2*. Izolovali jsme a funkčně charakterizovali centromery *Z. rouxii* a připravili první centromerové vektory pro *Z. rouxii* obsahující různé auxotrofní selekční geny (*ScURA3*, *ZrLEU2*, *ZrADE2*) a polylinker. Vyhledali jsme dostupné informace o přirozeném plasmidu *Z. rouxii* pSR1, a na jejich základě využili část jeho sekvence pro konstrukci episomálních plasmidů *Z. rouxii*, obsahujících různé auxotrofní selekční geny (*ScURA3*, *ZrLEU2*, *ZrADE2*) a polylinker. Vytvořili jsme systém pro vícenásobnou delecí genů v *Z. rouxii* prostřednictvím deleční kazety *loxP-kanMX-loxP* namnožené PCR a plasmidu exprimujícího recombinasu *cre*. Ověřili jsme využití GFP pro lokalizaci proteinů v *Z. rouxii*, a pro tento účel připravili plasmid pZGFP. Zjistili jsme, že v *Z. rouxii* je možno použít gen *MPR1* *S. cerevisiae* jako pomocný selekční gen, a dále že v *Z. rouxii* nelze využít promotor *ScGAL1* pro regulovanou expresi genů, protože při růstu buněk na glukose není reprimován. Poznatky jsem publikovali či odeslali k publikování (viz publikace č. 1 - 4).

Připravili jsme tak soubor nástrojů umožňující v *Z. rouxii* expresi genů z různých plasmidů za pomoci různých druhů selekce, přípravu vícenásobných delečních mutantů a určení lokalizace proteinů v buňkách. Tento soubor byl vytvářen ve kmeni s genetickým pozadím CBS 732<sup>T</sup>, což je typový kmen *Z. rouxii*, jehož kompletní sekvence genomu bude v brzké době veřejně přístupná.

Typový kmen CBS 732<sup>T</sup> patří spolu s kmenem ATCC 42981 k nejčastěji studovaným kmenům *Z. rouxii*. Při optimalizaci transformačního protokolu pro *Z. rouxii* jsme zjistili, že deriváty těchto dvou divokých kmenů vyžadují odlišné podmínky pro rozvolnění jejich buněčných povrchů, což naznačovalo odlišné složení či strukturu buněčných stěn. Fakt, že k

úspěšné elektroporaci kmenů bylo zapotřebí buňky kultivovat za mírného solného stresu, naznačoval, že se budou vlastnosti osmotolerantní a vlastnosti buněčné stěny *Z. rouxii* navzájem ovlivňovat. Tyto dva divoké kmeny jsme proto porovnali z hlediska jejich vlastností týkajících se osmotolerance a složení a struktury buněčných stěn. Zjistili jsme, že kmen ATCC 42981 je osmotolerantnější než CBS 732<sup>T</sup>, produkuje více glycerolu, který je používán v kvasinkách jako osmoregulační látka, a, na rozdíl od kmene CBS 732<sup>T</sup>, je schopen glycerol asimilovat. Buňky méně osmotolerantního kmene CBS 732<sup>T</sup> měly rigidnější buněčnou stěnu než buňky osmotolerantnějšího ATCC 42981. Elasticitější stěna ATCC 42981 může pravděpodobně flexibilněji reagovat na změny osmotického tlaku, a tak přispívat k vyšší osmotoleranci tohoto kmene. ATCC také obsahoval více chromosomů (8) než CBS 732<sup>T</sup> (7), a jeho genom byl celkově větší. Námi zjištěné skutečnosti byly v souladu s nedávno publikovanou hypotézou, že kmen ATCC 42981 je ve skutečnosti kmenem hybridním (James *et al.*, 2005). Rozdíly nalezené ve vlastnostech dvou nejčastěji studovaných kmenů *Z. rouxii* jsme zpracovali do dvou publikací (viz publikace č. 5 a 6).

K osmotoleranci kvasinek výrazně přispívají udržováním iontové homeostáze proteiny s funkcí přenašečů alkalických kovů jako jsou Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry. Část dizertační práce byla proto věnována studiu těchto přenašečů kvasinek, zvláště pak *Z. rouxii*.

Pro zjištění významu konkrétních oblastí Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek pro jejich funkci jsme porovnali sekvence Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů patnácti různých druhů kvasinek homologních k proteinům Nha1p, Nhx1p a Kha1p *S. cerevisiae* z hlediska jejich fylogenetické konzervovanosti. Identifikovali jsme konzervované aminokyselinové zbytky či celé motivy (zvláště na úrovni transmembránových domén), které vypovídají o významu těchto oblastí pro funkci přenašečů. Fylogenetická analýza ukázala, že proteiny Nhx1p jsou příbuzné savcím a rostlinným přenašečům, proteiny Kha1p jsou podobné bakteriálním přenašečům a proteiny Nha1p tvořili samostatnou skupinu. Recentní výsledky naznačují, že homology Nha1p se nacházejí i v lidském genomu (Brett *et al.*, 2005). Výsledky analýzy jsme publikovali (viz publikace č. 7).

Při vyhledávání genů kódujících Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry v dostupných databázích obsahujících sekvenované genomy kvasinek jsme u dvou druhů, *S. pombe* a *Y. lipolytica*, zjistili přítomnost dvou genů kódujících tyto proteiny. Kolegyně Mgr. Klára Papoušková zjistila, že tyto kmeny obsahují každý vždy jeden přenašeč transportující pouze Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>, a

druhý transportující i  $K^+$ . Tyto přenašeče tak patrně hrají rozdílné role v buněčné fyziologii. V *Z. rouxii* byl dosud identifikován pouze přenašeč  $Na^+$  a  $Li^+$  (*ZrSod2-22p*), a proto bylo důvodné předpokládat, že i kvasinka *Z. rouxii* bude obsahovat  $Na^+/H^+$ -antiportér rozeznávající  $K^+$  jako svůj substrát. Využili jsme proto přístupu do zatím neveřejné databáze Génolevures 3 obsahující kompletní sekvenci genomu *Z. rouxii* pro vyhledání možných dalších genů kódujících  $Na^+/H^+$ -antiportéry. Identifikovali jsme nový  $Na^+/H^+$ -transportní protein *Z. rouxii*, který jsme nazvali *ZrNha1p*, a ten funkčně charakterizovali heterologní expresí v *S. cerevisiae*. Zjistili jsme, že má schopnost eliminovat z buněk jak sodné a lithné, tak i draselné kationty. Jelikož přenašeč *ZrSod2-22* byl dosud studován také pouze heterologní expresí v *S. cerevisiae*, sledovali jsme prostřednictvím nástrojů genového inženýrství vytvořených v této práci funkci obou transportérů přímo v *Z. rouxii*, abychom potvrdili jejich transportní specifitu zjištěnou v buňkách *S. cerevisiae*.

Potvrdili jsme, že přenašeč *ZrSod2-22p* je důležitý pro růst *Z. rouxii* v přítomnosti zvýšené koncentrace  $Na^+$  či  $Li^+$ , ale nikoli  $K^+$ , a naopak *ZrNha1p* je důležitý hlavně pro toleranci vysoké vnější koncentrace iontů  $K^+$ . Sledování fenotypu mutantů *Z. rouxii* s delecí těchto antiportérů ukázalo, že oba přenašeče *Z. rouxii* mohou částečně komplementovat své funkce v eliminaci sodných nebo lithných kationtů z buněk. Kvasinka *Z. rouxii* tak obsahuje kromě přenašeče s úzkou substrátovou specifitou (*ZrSod2-22p*), který zřejmě slouží hlavně k eliminaci toxických kationtů z buněk, též přenašeč se širokou substrátovou specifitou (*ZrNha1p*), jenž vzhledem ke své kapacitě exportovat draselné kationty hraje důležitou roli též v udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu nebo pH cytoplasmy. Analýzou synteny genů (tj. pořadí genů na chromosomu) jsme zjistili, že gen *ZrSOD2-22* vznikl patrně duplikací předka genu *ZrNHAI* a inzercí kopie do jiného místa genomu.

Poslední kapitola výsledkové a diskuzní části dizertační práce je věnována podílu autorky na průběhu sekvenace a anotace genomu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> v projektu Génolevures 3, který se v rámci studia evoluce eukaryotního genomu zabývá sekvenací a anotací genomů čtyř kvasinkových druhů patřících do *Kluyveromyces spp.* nebo tomuto rodu blízkce příbuzných. Předci těchto druhů kvasinek se vši pravděpodobností neprodělali duplikaci celého genomu tak, jak tomu bylo u předka *S. cerevisiae* nebo *C. glabrata*, a z toho důvodu jsou evolučně

zajímavé. Data získaná během anotací budou veřejně přístupná a budou sloužit k analýze, jež má za cíl objasnit mechanismy mikroevoluce eukaryotického genomu.

Stanovené cíle práce (viz kap. 3) se podařilo splnit. Připravené nástroje genomového inženýrství budou sloužit k dalšímu studiu vlastností kvasinky *Z. rouxii* týkajících se osmotolerance, v případě oddělení Membránového transportu konkrétně antiportérů *ZrSod2-22* a *ZrNha1*, jejichž funkci v buňkách *Z. rouxii* bychom v budoucnu rádi podrobněji ozřejmili (např. sledováním regulace exprese příslušných genů či biogeneze/degradace jejich produktů za různých podmínek).

V brzké době dostupná celková sekvence genomu a v této práci vytvořený soubor nástrojů genomového inženýrství činí z kvasinky *Z. rouxii* ideální organismus pro studium osmotolerance, a z hlediska toho, že se jedná o kvasinku, která ve své evoluční historii neprodělala celkovou duplikaci genomu, i zajímavý model pro studium evoluce kvasinkového genomu.