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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

ANALÝZA STRUKTURY KVASINKOVÉ KOLONIE: PEROXIZÓMY A AUTOFÁGIE

Luděk Štěpánek

Praha 2006

vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce, pouze s použitím citované literatury.

Tato práce vznikla pod vedením doc. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěl poděkovat za trpělivé a odborné vedení, konzultace a interpretace výsledků a cenné rady. Můj dík patří i RNDr. Libuši Váchové, která se ochotně podílela na řešení mnoha problémů.

Celému kolektivu naší laboratoře vděčím za rady a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Rád bych poděkoval především Mgr. Michalu Čápovi za pomoc v začátcích mé laboratorní práce a Vladimíře Haislové za technickou podporu v celém jejím průběhu.

Zvláštní poděkování patří všem zaměstnancům Laboratoře elektronové mikroskopie pod vedením Ing. Jany Nebesářové, CSc. za čas i námahu, které věnovali mojí výuce.

Bez zázemí a motivace, které mi poskytovala po celou dobu studia rodina a Zita by tato práce nemohla vzniknout, závěrečné poděkování proto patří jim.

Tato práce byla kryta grantovými projekty GAČR 204-05-0294 a 525-05-0297, Centrum základního výzkumu LC531.

Analysis of yeast colony structure: peroxisomes and autophagy

Abstract

This study is a part of the project „Molecular biology and physiology of yeast communities". Yeast colonies grown on solid complex medium communicate by periodical release of volatile ammonia (PALKOVÁ et al. 1997), which is accompanied by periodical alkalization of colonies and growth substrate. Transition of colonies to the ammonia producing period of their life is accompanied by global changes of gene expression, as was shown using DNA microarrays (PALKOVÁ et al. 2002). Changes in many metabolic genes were observed, indicating activation of peroxisomal fatty acids β-oxidation, activation of glyoxylate cycle enzymes and inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation. These data suggest a significant switch of cellular metabolism during early alkali phase, based on peroxisomal induction and mitochondrial decline. This switch could be facilitated by autophagy, the process which can selectively or non-selectively remove unnecessary cellular components, providing the cell with energy and removing parts interfering with the new metabolism.

Saccharomyces cerevisiae strain expressing peroxisomal GFP was constructed in order to visualise peroxisomes and strain containing GFP-tagged autophagic protein Atg8p was prepared to monitor autophagy. Using the new approach of microscopic analysis of colony structure, at least two distinct horizontal cell layers, which differentiate during early alkali phase, were characterised. Induction of peroxisomes and autophagy was observed exclusively in the upper one. The ultrastructure of cells located at these two layers was analysed using electron microscopy in more detail.

This pilot study contributed to our knowledge of yeast colony structure and development. However, more investigation will be required to comprehend mechanisms involved in cell differentiation within yeast colonies.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, ammonia signalling, communication, autophagy, peroxisomes

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, amoniaková signalizace, komunikace, autofágie, peroxizómy

1 Úvod 15

2 Literární úvod 16

2.1 Mnohobuněčné chování u mikroorganizmů 16

2.1.1 Quorum sensing 17

2.1.1.1 Úvod 17

2.1.1.2 QS regulace byla poprvé pozorována u *Vibrio fischeri* 18

2.1.1.3 Základní mechanizmy quorum sensing 18

2.1.1.4 Autoinduktor 2 a mezidruhová komunikace 20

2.1.1.5 Komunikační sítě mohou být cílem ovlivňování, ... 20

2.1.1.6 Quorum sensing u kvasinek 21

2.1.1.6.1 Farnesol inhibuje myceliální růst 21

2.1.1.6.2 Tyrosol zkracuje lag fázi zaočkované kultury 22

2.1.2 Role amoniakové signalizace při růstu kolonie *S. cerevisiae* 24

2.1.2.1 Vlastnosti amoniakové signalizace 24

2.1.2.2 Změny exprese genů 26

2.1.2.2.1 Změny metabolizmu 26

2.1.2.2.2 Geny stresové odpovědi 27

2.1.2.2.3 Programovaná buněčná smrt 28

2.2 Autofágie 29

2.2.1 Úvod 29

2.2.2 Molekulární mechanizmy autofágie 34

2.2.2.1 Regulace autofágie 35

2.2.2.1.1 Tor kináza 35

2.2.2.1.2 Fosfatidylinositol-3-kinázové komplexy 35

2.2.2.2 Preautofagozomální struktura *PAS* 36

2.2.2.3 Zahájení tvorby autofagozómu 37

2.2.2.3.1 Pro tvorbu membrány autofagozómu jsou vyžadovány dva konjugační systémy, Atg12p-Atg5p a Atg8p 38

2.2.2.4 Doprava autofagozómu k vakuole a fúze s její membránou 40

2.2.3 Biologické funkce autofágie 40

2.2.3.1 V kvasinkách 40

2.2.3.2 V mnohobuněčných organizmech 41

2.2.3.2.1 Autofágie a přežití buněk 41

2.2.3.2.2 Autofágie a buněčná smrt ... *42*
2.2.3.2.3 Autofágie a vývoj organizmu ... *43*
2.2.4 Metody detekce autofágie ... 44
2.2.4.1 Mikroskopické metody : ... 44
2.2.4.1.1 Elektronová mikroskopie ... *44*
2.2.4.1.2 Barvení monodansylkadaverinem ... *44*
2.2.4.1.3 Sledování proteinu Atg8p ... *44*
2.2.4.2 Biochemické metody ... 45
2.2.4.2.1 Stanovení koncentrace volných aminokyselin ... *45*
2.2.4.2.2 Měření aktivity alkalické fosfatázy ... *45*
2.2.4.2.3 Měření maturace aminopeptidázy I ... *45*
2.3 Peroxizómy v kvasinkách ... 46
2.3.1 Úvod ... 46
2.3.2 Biogeneze peroxizómů ... 47
2.3.2.1 Import proteinů do peroxizómů ... 47
2.3.2.2 Dělení peroxizómů ... 48
2.3.2.3 Růst peroxizomální membrány ... 48
2.3.2.4 Degradace peroxizómů ... 49
2.3.3 Peroxizómy a β-oxidace mastných kyselin ... 49
2.3.3.1 Klasická dráha β-oxidace ... 49
2.3.3.2 Pomocné enzymy β-oxidace ... 50
2.3.3.3 Export peroxizomálního acetyl-KoA ... 51
3 Materiál a metody ... 53
3.1 Materiál..... ... 53
3.1.1 Použité mikroorganizmy ... 53
3.1.2 Materiál pro práci s DNA ... 53
3.1.3 Přístroje ... 54
3.1.4 Internetové databáze a počítačové programy ... 54
3.1.5 Kultivační média ... 55
3.1.6 Roztoky ... 57
Jednoduché roztoky ... 57
Složené roztoky ... 58
3.1.7 Materiál pro elektronovou mikroskopii. ... 60
3.1.7.1 Sloučeniny ... 60

3.1.7.2 Roztoky 60
3.1.7.3 Přístroje 62
3.2 Metody 63
3.2.1 Sterilizace 63
3.2.2 Kultivace 63
3.2.3 Uchování zásobních kultur 63
3.2.4 Nanášení obřích kolonií 63
3.2.4.1 Měření produkce amoniaku 64
3.2.4.2 Stanovení koncentrace amoniaku 64
3.2.5 Stanovení počtu buněk 64
3.2.6 Elektroforéza v agarózovém gelu 64
3.2.7 Srážení DNA etanolem 65
3.2.8 Transformace *E.coli* elektroporací 65
3.2.8.1 Příprava kompetentních buněk 65
3.2.8.2 Elektroporace 65
3.2.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií 66
3.2.10 Transformace kvasinek LiAc/ssDNA/PEG metodou 66
3.2.10.1 Příprava buněk 66
3.2.10.2 Transformace buněk 67
3.2.11 PCR 67
3.2.12 Izolace DNA z gelu 68
3.2.13 Zalévání makrokolonií pro přípravu řezů 68
3.2.14 Práce s fluorescenčním mikroskopem 69
3.2.15 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii 69
3.2.15.1 Fixace manganistanem draselným 69
3.2.15.2 Fixace glutaraldehydem 70
3.2.15.3 Fixace glutaraldehydem a manganistanem draselným 70
3.2.15.4 Fixace glutaraldehydem a oxidem osmičelým 70
3.2.15.5 Postfixace octanem uranylu 70
3.2.15.6 Dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou 70
3.2.15.7 Prosycování pryskyřicí POLY/BED812 70
3.2.15.8 Příprava skleněných nožů 71
3.2.15.9 Příprava ultratenkých řezů 71
3.2.15.10 Kontrastování octanem uranylu 71

3.2.15.11 Kontrastování citronanem olovnatým 71
3.2.15.12 Práce s elektronovým mikroskopem 71
3.2.16 Přístroje 71
4 Výsledky a diskuze 72
4.1 Zavedení metod pro analýzu struktury kolonie 72
4.2 Příprava kmene nesoucího v genomu peroxizomální GFP 74
4.2.1 Příprava kmene *TRP1*::GFP-SKL 74
4.2.2 Vlastnosti kmene *S. cerevisiae GFP*-SKL 77
4.3 Příprava kmene nesoucího v genomu *ATG8* – GFP 79
4.3.1 Konstrukce kmene *TRP1::ATG8*-GFP 79
4.3.2 Vlastnosti kmene *S. cerevisiae ATG8*-GFP. 81
4.4 Zavedení metod elektronové mikroskopie 83
4.4.1 Srovnání dostupných fixačních protokolů 83
4.4.1.1 Fixace glutaraldehydem. 84
4.4.1.2 Fixace oxidem osmičelým 84
4.4.1.3 Fixace manganistanem draselným 84
4.4.1.4 Fixace octanem uranylu 84
4.4.2 Výsledky různých fixačních protokolů při analýze kolonie 85
4.5 Autofagická aktivita ve vývoji kvasinkové kolonie 87
4.5.1 Vliv autofágie na schopnost kolonií produkovat amoniak 87
4.5.2 Mikroskopická pozorování autofágie 90
4.6 Peroxizómy ve vývoji kvasinkové kolonie 102
4.7 Analýza struktury kolonie pomocí elektronové mikroskopie 110
4.8 Úloha vrstev při vývoji kolonie 118
4.9 Závěr 123
4.10 Shrnutí 124
5 Literatura 125

Seznam zkratek použitých v této práci

A-HSL	acylovaný homoserin lakton
AI-2	autoinduktor 2
BFM	bromfenolová modř
BKP	bromkresolový purpur
CCD	digitální snímací prvek, Coupled Charge Device
CVT	cílený transport z cytosolu do vakuoly, Cytosole to Vacuole Targeting
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DDSA	anhydrid kyseliny dodecylsukcinové
DMP30	(dimethylaminomethyl)fenol
EDTA	etylendiamintetraacetát
EM	elektronový mikroskop
ER	endoplazmatické retikulum
ESR	obecná stresová odpověď, Environmental Stress Response
EtBr	etidium bromid
GFP	zelený fluorescenční protein, Green Fluorescent Protein
GM	glycerolové médium
IM	izolační membrána
KoA	koenzym A
MA	minimální médium s agarem
MAP	mitogenem aktivovaný protein
MM	minimální médium (tekuté)
MVB	víceváčková tělíska, MultiVesicular Bodies
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (rekukovaná forma)
ORF	otevřený čtecí rámec, Open Reading Frame
PAS	preautofagozomální struktura
pb	pár bazí
PCDI, II	programovaná buněčná smrt typu I, II, Programmed Cell Death type I, II
PCR	polymerázová řetězová reakce, Polymerase Chain Reaction
PE	fosfatidyletanolamin
PEG	polyetylen glykol
PI	fosfatidylinositol
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PI-3-P	fosfatidylinositol-3-fosfát
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethanosulfonová kyselina)
PTSI,II	signální sekvence pro transport do peroxizómů typu I, II Peroxisomal Targeting Sequence type I, II
QS	quorum sensing
RNÁZA	ribonukleáza
ROS	kyslíkový radikál, Reactive Oxygen Species
SAM	S-adenosyl metionin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	transmisní elektronový mikroskop

TPN	živné médium pro bakterie, Total Parental Nutrition
UAc	octan uranylu
VID	vakuolární import a degradace
YEPG	komplexní glukózové médium (Yeast Extract Peptone Glukose)
ŽA	živný agar
ŽB	živný bujón

Seznam genů uvedených v této práci

Gen	Protein	Funkce
AAT1	mitochondriální aspartát aminotransferáza	mitochondriální metabolizmus
ALD6	acetaldehyd dehydrogenáza	metabolizmus aldehydů
AMS1	α-manosidáza	vakuolární hydrolýza
ANT1	ATP/ADP/AMP/H^+ antiporter	udržování peroxizomálního pH a hladiny ATP
APE1	aminopeptidáza	vakuolární degradace a maturace proteinů
ATG1	protein kináza	regulace autofágie
ATG2	periferní membránový protein	růst autofagozómu
ATG3	molekulární funkce neznámá	růst autofagozómu
ATG4	proteáza	růst autofagozómu
ATG5	molekulární funkce neznámá	růst autofagozómu
ATG6	součást PI-3 kinázového komplexu	regulace autofágie
ATG7	ATPáza	růst autofagozómu
ATG8	ubikvitinu podobný protein	růst autofagozómu
ATG9	transmembránový protein	růst autofagozómu
ATG10	konjugační enzym	růst autofagozómu
ATG11	membránový protein, receptor	receptor pro specifickou autofagickou dopravu
ATG12	ubikvitinu podobný protein	růst autofagozómu
ATG13	součást kinázového komplexu	regulace autofágie
ATG14	součást PI-3 kinázového komplexu	regulace autofágie
ATG15	lipáza	degradace autofagických tělísek ve vakuole
ATG16	molekulární funkce neznámá	růst autofagozómu
ATG17	součást Atg1-kinázového	regulace velikosti autofagozómu

	komplexu	
ATG18	PI-3-P vazebný protein	růst autofagozómu
ATG19	membránový protein	receptor pro specifickou CVT dopravu
ATG20	PI-3-P vazebný protein	CVT dráha
ATG21	PI-3-P vazebný protein	CVT dráha
ATG22	vakuolární membránový protein	degradace autofagozómu
ATG22	periferní membránový protein	růst autofagozómu
ATG24	molekulární funkce neznámá	regulace membránové dopravy
ATO1-3	transmembránové přenašeče	pravděpodobně export amoniaku
CAT2	mitochondriální přenašeč acetyl-KoA	mitochondriální metabolizmus
CAT2	kataláza	ochrana před oxidativním stresem
CCZ1	součást SNARE komplexu	fúze autofagozómu s vakuolou
CIT2	citrát syntáza	glyoxylátový cyklus
CIT3	citrát syntáza	glyoxylátový cyklus
CTA1	karnitin acetyl transferáza	syntéza acetylkarnitinu
CTT1	cytosolická kataláza	ochrana před oxidativním stresem
DCI1	acyl-KoA izomeráza	β-oxidace mastných kyselin
ECI1	acyl-KoA izomeráza	β-oxidace mastných kyselin
FAA1-4	acyl-KoA syntetázy	aktivace mastných kyselin
GCV1	T podjednotka mitochondriální glycin dekarboxylázy	degradace glycinu
GFP	fluorescenční protein	luminiscence
CHK1	protein kináza	regulace buněčného cyklu
ICL2	methylizocitrát lyáza	glyoxylátový cyklus
IDH1-2	podjednotky izocitrát dehydrogenázy	citrátový cyklus
KGD1	2-oxoglutarát dehydrogenáza	citrátový cyklus
LUXI	homoserin lakton syntetáza	syntéza acyl- homoserinu

LUXR	cytosolický receptor	receptor pro acylovaný homoserin lakton
MEP1-3	permeázy amonných iontů	import amonných iontů
MFE2	multifunkční enzym	β-oxidace mastných kyselin
MLS1	malát syntáza	glyoxylátový cyklus
MON1	součást SNARE komplexu	fúze autofagozómu s vakuolou
NIK1	serin-threonin kináza	regulace buněčného cyklu
OAC1	mitochondriální přenašeč oxalacetátu	mitochondriální metabolizmus
PEP4	vakuolární proteáza A	vakuolární degradace
PEX1	ATPáza	biogeneze peroxizómů
PEX3	transmembránový protein	biogeneze peroxizómů
PEX4	konjugační enzym	biogeneze peroxizómů a import proteinů
PEX5	cytosolický receptor	biogeneze peroxizómů
PEX7	cytosolický receptor	biogeneze peroxizómů
PEX8	protein peroxizomální matrix	biogeneze peroxizómů
PEX10	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX11	transmembránový protein	transport mastných kyselin a proliferace peroxizómů
PEX13	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX14	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX16	molekulární funkce neznámá	biogeneze peroxizómů
PEX17	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX18	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX19	cytosolický protein	biogeneze peroxizómů
PEX21	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PEX22	transmembránový protein	import proteinů do peroxizómů
PMA1	H+ ATPáza	regulace buněčného pH
POT1	ketoacyl-KoA thioláza	β-oxidace mastných kyselin
POX1	oxidáza	β-oxidace mastných kyselin
PRB1	vakuolární proteáza B	vakuolární degradace

PXA2,1	membránové přenašeče	import aktivovaných mastných kyselin do peroxizómu
PHO8	alkalická fosfatáta	matabolizmus
SDH1	sukcinát dehydrogenáza	citrátový cyklus
SHR3	chaperon	sekrece permeáz aminokyselin
SIT4	protein fosfatáza	TOR1 signální dráhy
SLN1	histidin kináza	regulace MAP kináz
SOD1	cytosolická superoxid dismutáza	ochrana před oxidativním stresem
SOK2	transkripční faktor	regulace transkripce
SPS19	acyl-KoA reduktáza	β-oxidace mastných kyselin
SSK21	MAP kináza	regulace buněčného cyklu
TAP42	součást fosfatázového komplexu	TOR1 signální dráhy
TOR1	proteinkináza	regulace autofágie a dalších buněčných funkcí
TRP1	fosforibosylanthranilát izomeráza	biosyntéza tryptofanu
URA3	orotidin-5'-fosfát dekarboxyláza	biosyntéza uracilu
VAC8	vakuolární membránový protein	degradace autofagozómu
VAM3	součást SNARE komplexu	fúze autofagozómu s vakuolou
VAM7	součást SNARE komplexu	fúze autofagozómu s vakuolou
VPS1	cytoskeletární protein	dělení peroxizómů
VPS15	součást kinázového komplexu	regulace autofágie
VPS34	součást kinázového komplexu	regulace autofágie
VPS38	součást kinázového komplexu	regulace autofágie
VTI1	součást SNARE komplexu	fúze autofagozómu s vakuolou

1 Úvod

Tato studie byla vypracována v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. V těsné spolupráci s Laboratoří buněčné biologie Mikrobiologického ústavu AVČR se toto pracoviště zabývá dvěma příbuznými tématy. Jedním je analýza morfologie kolonií kmenů *Saccharomyces cerevisiae* izolovaných z přírody. V rámci druhého tématu jsou využívány laboratorní kmeny *S. cerevisiae* ke studiu mechanizmů vývoje kvasinkových kolonií a amoniakové signalizace mezi nimi. Moje práce byla součástí tohoto druhého tématu.

Při růstu na pevném médiu tvoří kvasinky ohraničené mnohobuněčné útvary – kolonie. V naší laboratoři byla popsána komunikace mezi koloniemi na dlouhé vzdálenosti prostřednictvím amoniaku (PALKOVÁ *et al.* 1997). Tato signální molekula je produkována v pulzech, které se projevují alkalizací růstového média. Globální analýza genové exprese při přechodu do fáze produkce amoniaku ukázala změny v transkripci některých skupin genů (PALKOVÁ *et al.* 2002). Mezi jinými to byla inaktivace genů oxidativní fosforylace a aktivace genů specifických pro biogenezi a metabolizmus peroxizómů. Jedním cílem mé práce proto bylo analyzovat výskyt peroxizómů v kvasinkové kolonii.

Protože je zřejmé, že buňky v kolonii procházejí při vstupu do fáze produkce amoniaku celkovou přeměnou metabolizmu, bylo mým dalším úkolem sledovat aktivitu procesu autofágie. O tom je známo, že hraje významnou roli při změnách metabolizmu během vývoje „tradičních" mnohobuněčných organizmů, navíc je důležitým faktorem při dlouhodobém přežívání buněk.

Jednou z metod, které mohou přinést cenné informace o struktuře kvasinkové kolonie i jednotlivých buněk je elektronová mikroskopie. Mým posledním experimentální úkolem bylo proto zavedení tohoto přístupu do naší laboratoře a výběr nejvhodnější techniky, která by umožnila analýzu ultrastruktury buněk *in situ*, tj. na řezech kvasinkovými koloniemi.

Teoretická část mojí práce shrnuje současné poznatky o mechanizmech a funkcích autofágie, biogenezi a metabolizmu peroxizómů, mnohobuněčném chování mikroorganizmů a amoniakové signalizaci ve vývoji kvasinkových kolonií

2 Literární úvod

2.1 Mnohobuněčné chování u mikroorganizmů

Populace jednobuněčných organizmů jsou tradičně považovány za neuspořádané množiny buněk, jejichž počet a fyziologický stav závisí jen na objemu poskytnutého prostoru a koncentraci živin. Je to důsledek laboratorní praxe, která pro maximální účinnost studia dílčích biologických jevů využívá mikroorganizmů kultivovaných v optimalizovaných podmínkách. Teprve stresové situace, připomínající částečně boj o přežití v přírodě, dávají mkroorganizmům důvod rozvinout kooperativní mechanizmy jimiž byly v průběhu evoluce vybaveny. Známé jsou například plodnice hlenek a myxobakterií, formované za podmínek hladovění. Mnoho mikroorganizmů dokáže stanovit hustotu své vlastní populace i celého přítomného mikrobiálního společenství procesem zvaným quorum sensing.

Quorum sensing a další pochody umožňují řadě jednobuněčných tvorbu biofilmů, dobře strukturovaných útvarů s hojným extracelulárním materiálem. Způsob života v rámci biofilmu pomáhá mikroorganizmům osídlovat stanoviště s nepřátelskými podmínkami a lépe vzdorovat nepříznivým situacím. Tvorba biofilmů byla popsána jak u bakterií, tak u kvasinek. V určité fázi tvorby biofilmu mořskou bakterií *Pseudoalteromonas tunicata* část buněk podstoupí programovanou buněčnou smrt, čímž dojde ke vzniku pórů v biofilmu a také k oddělení části biofilmu od substrátu. Podobné umírání bylo pozorováno i při vývoji biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (WEBB *et al.* 2003). Programovaná buněčná smrt byla popsána také jako reakce na infekci buňky fágem nebo jako odpověď na přítomnost antibiotika u *Staphylococcus aureus* a *S. pneumoniae* (LEWIS 2000).

Kvasinkové kolonie mohou být složitě strukturované, jak je tomu u vrásčitých kolonií rodu *Candida, Kluyveromyces* nebo i u nelaboratorních, přírodních izolátů *S. cerevisiae* (KUTHAN *et al.* 2002). Že kolonie není pouhé nakupení buněk, ale existuje tam určitá uspořádanost a vývoj v čase, dokazují i experimenty s reportérovým genem LacZ vloženým za promotorovou knihovnu z genomu daného mikroorganizmu. U kolonií *E. coli*, *B. subtilis* i *S. cerevisiae* byla z některých promotorů pozorována rozdílná exprese reportérového genu v různých místech kolonie a bylo tak pozorováno vytvoření jakéhosi vzorku s centrálním kruhem nebo paprsčitého vzorku, což potvrzuje, že kolonie není složena z homogenní populace buněk (MINÁRIKOVÁ *et al.* 2001). Kultivace mikroorganizmů v čistých tekutých kulturách může způsobit, že tyto mikroorganizmy

ztratí své sociální chování. Např. kultura myxobakterie *Myxococcus xanthus* již po několika generacích růstu v bohatém tekutém médiu za laboratorních podmínek ztrácí schopnost tvořit plodnice. Laboratorní kmeny klasických mikrobiologických modelů jako *S. cerevisiae* nebo *B. subtilis* mohly během let laboratorní kultivace ztratit některé své mnohobuněčné vlastnosti. U divokých kmenů *S. cerevisiae* byla popsána strukturovanost kolonií a tvorba extracelulární hmoty (KUTHAN *et al.* 2002), u přírodních izolátů *B. subtilis* zase tvorba jednoduchých plodnic ve kterých probíhá sporulace v rámci strukturované kolonie (BRANDA *et al.* 2001).

Přibývající poznatky o mnohobuněčném chování mikroorganizmů naznačují, že tyto nemusí být modelem vhodným pouze pro studium biologie na úrovni molekul a jednotlivých buněk. Mohou být cenným zdrojem poznatků o vývoji a diferenciaci na mnohem komplexnější úrovni celých buněčných populací.

2.1.1 Quorum sensing

2.1.1.1 Úvod

Termín quorum sensing byl zaveden roku 1994 (FUQUA *et al.* 1994) jako označení zvláštního způsobu regulace genové exprese bakterií. Tato regulace není odezvou na fyziologický stav jednotlivé buňky nebo na změnu abiotických podmínek okolí, ale vyjadřuje do jisté míry stav populace jako celku. Ke změnám exprese dochází v důsledku nahromadění signální molekuly v prostředí, zpravidla v okamžiku dosažení určité hraniční hustoty populace. Jedná se tedy o druh komunikace mezi mikroorganizmy na téma „je nás tu dost? (nebo moc?)“. Odpověď na tuto otázku pak dává bakteriím možnost chovat se koordinovaně v některých směrech (jako je virulence, tvorba kolonií apod.). Objev quorum sensing proto změnil původní pohled na bakterie jako na jednotlivé, izolované organizmy, které se pouze snaží bez ohledu na ostatní získat maximum potravy a maximálně se namnožit. V dnešní době, kdy už jsou mikroorganizmy běžně vnímány jako organizované populace a ne jen množiny individuí, přicházejí na řadu další objevy, prokazující schopnost bakterií (i jiných mikroorganizmů) komunikovat v rámci celých společenství nezávisle na kmeni či druhu, dokonce interagují i s vyššími eukaryotickými organizmy. Tato zjištění posouvají pohled na jednobuněčné organizmy o úroveň výš a znovu ukazují, že ani prokaryota, nejjednodušší z buněčných organizmů, nelze uspokojivě studovat bez znalosti souvislostí v celém ekosystému.

Quorum sensing už navíc přestává být výlučným fenoménem bakterií, schopnost jednat koordinovaně v závislosti na buněčné hustotě je již známa i u jiných mikroorganizmů, například kvasinek.

2.1.1.2 QS regulace byla poprvé pozorována u *Vibrio fischeri*

Bakterie *V. fischeri* žije jako symbiont ve světélkujících orgánech mořských ryb a olihní. Rovněž v laboratorních podmínkách při kultivaci v dostatečné buněčné hustotě (10^{10-11} buněk/ml) zelenomodře světélkuje. Žádnou luminiscenční aktivitu však nelze pozorovat u *V. fischeri* které volně žijí v mořské vodě nebo v méně koncentrovaných laboratorních kulturách.

Většina studií bioluminiscence *V. fischeri* byla prováděna v souvislosti s jejím symbiotickým vztahem k druhu *Euprymna scolopes*. Tato malá oliheň, žijící na mělčinách a korálových útesech Havajských ostrovů, je aktivní převážně v noci. Specializované světelné orgány používá k zamaskování svého stínu vrženého v měsíčním světle, tedy poněkud překvapivě k ochraně před predátory. Výměnou za zabezpečení světelné aktivity poskytuje bakteriím živiny a relativní bezpečí svého světelného orgánu.

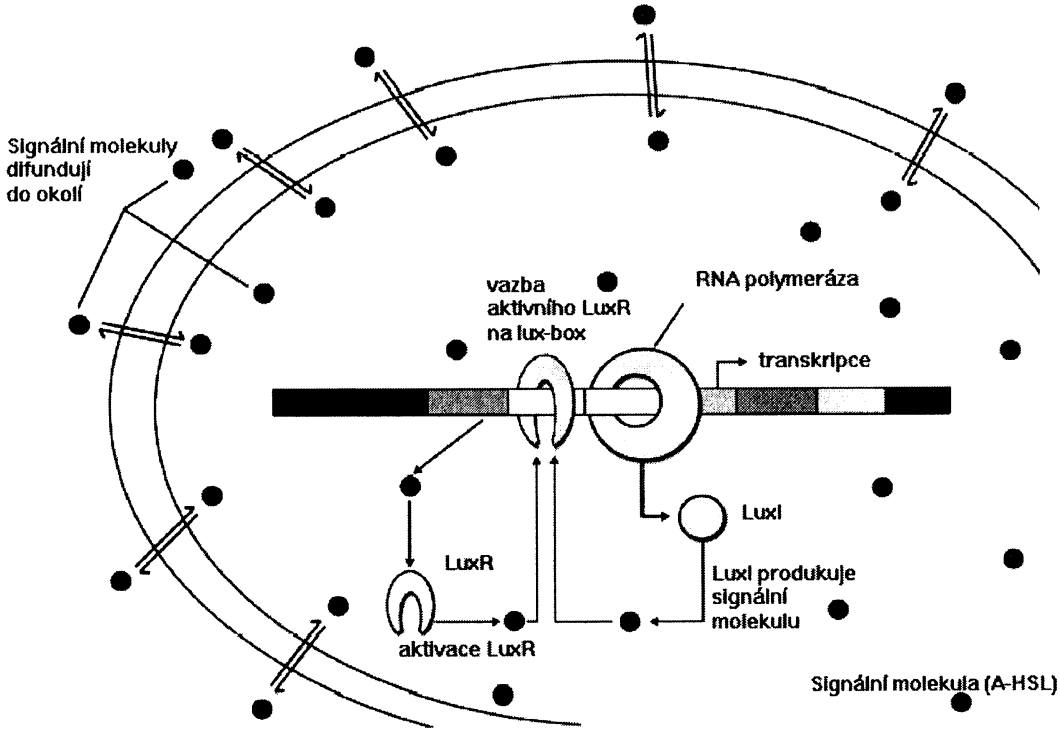
2.1.1.3 Základní mechanizmy quorum sensing (WHITEHEAD 2001, MILLER a BASSLER 2001)

Genů přímo odpovědných za bioluminiscenci je osm; jsou rozloženy ve dvou protisměrně přepisovaných operonech, *luxR* a *luxICDABEG*. Regulaci luminiscenční aktivity zajišťují produkty genů *LUXI* a *LUXR*, ostatní jsou komponenty biochemické dráhy vedoucí k emisi světla.

Buňky rostoucí v tekuté kultuře nezačnou bez ohledu na počáteční hustotu světélkovat ihned. Aktivace signální dráhy LuxIR nastává v okamžiku dosažení kritické koncentrace příslušné signální molekuly. NEALSON *et al.* popsali roku 1970 tento jev jako autoindukci (indukce genů podmíněná změnou složení růstového média samotnou bakteriální populací), signální molekulu jako autoinduktor. Pozdější výzkumy ukázaly, že autoinduktorem je v případě *V. fischeri* derivát mastné kyseliny, *N*(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserinlakton (zkr. 3-oxo-C6-HSL, A-HSL). Podrobnější experimenty ukázaly, že tato poměrně malá molekula volně prostupuje cytosolem, buněčnou membránou i vnějším vodným prostředím a je schopna navodit luminiscenci už při koncentracích 10 nM/l.

Autoinduktor 3-oxo-C6-HSL je neustále v malém množství produkován enzymem LuxI, volně difunduje z buňky a pomalu se tak v rostoucí kultuře hromadí jeho koncentrace vně i uvnitř buněk (KAPLAN *et al.* 1985) Po dosažení kritické koncentrace (odpovídá určité buněčné hustotě - odtud „quorum", často i určité růstové fázi) se autoinduktor začne efektivně vázat na inaktivní transkripční faktor LuxR, přítomný neustále v cytoplazmě. Vazba autoinduktoru způsobí konformační změnu LuxR, v některých případech i jeho dimerizaci. Takto aktivovaný LuxR nasedá na *lux-box*, asi 20 pb dlouhou DNA sekvenci, vzdálenou asi 40 pb před počátkem transkripce operonu *luxICDABEG*. Zde protein výrazně zvýší intenzitu transkripce genů bioluminiscence i syntézy 3-oxo-C6-HSL (obr. 1). Tato pozitivní zpětná vazba vede k silnější a rychlejší odezvě na dosažení „kvora" u celé bakteriální populace.

Aktivovaná LuxR molekula pravděpodobně začne posléze působit jako ochrana buňky před příliš intenzivním rozběhnutím luminiscenční reakce, protože oslabuje přepis svého vlastního operonu *luxR*.



Obr. 1 Základní schéma LuxIR quorum sensing

Uvedený systém QS je ve své základní podobě platný téměř pro všechny gramnegativní bakterie, u kterých bylo quorum sensing pozorováno. Jako druhá skupina s analogickým principem, ale odlišnými mechanizmy QS se vyčlenily grampozitivní

bakterie, užívající jako signální molekuly krátké peptidové řetězce. Pozdější studie přisoudily schopnost komunikace pomocí autoinduktorů i kvasinkám (KUGLER *et al.* 2000; HORNBY *et al.* 2001).

2.1.1.4 Autoinduktor 2 a mezidruhová komunikace

Bakterie *Vibrio harveyi* reguluje svoji luminiscenci dvěma paralelními QS drahami. Jedna z nich je blízce příbuzná systému *V. fischeri*, druhá přenáší signál látkou odlišné chemické povahy, nazvanou autoinduktor 2 (AI-2). Účel tohoto druhého, zdánlivě nadbytečného systému byl vysvětlen až zjištěním, že AI-2 jsou schopny syntetizovat a vyhodnocovat další druhy bakterií (BASSLER *et al.* 1997). *V. harveyi* a další druhy tak mají možnost mnohem komplexnější a univerzálnější komunikace.

Gen *LUXS*, kódující klíčový enzym v syntéze autoinduktoru 2, obsahuje na šedesát gamnegativních i grampozitivních bakterií. (FEDERLE a BASSLER, 2003). Není pravda, že by všechny tyto druhy produkovaly molekuly identické s AI-2 *V. harveyi* a bylo by tedy lépe hovořit ne o jednou určitém autoinduktoru 2, ale o celé rodině autoinduktorů 2. I přesto se pravděpodobně jedná o prvek sjednocující celé rozsáhlé skupiny bakteriální říše a umožňující existenci pestrých společenstev mikroorganizmů v relativně rovnovážném stavu.

AI-2 navíc vzhledem k charakteru své biosyntetické dráhy pravděpodobně nabízí bakteriím možnost vnímat víc, než jen momentální buněčnou denzitu V prvním kroku reakce totiž dochází k demethylaci S-adenosyl methioninu (SAM) Protože takto uvolněná methylová skupina je významnou surovinou pro řadu biosyntetických drah, může tato reakce odrážet aktuální poptávku po methylové skupině a nepřímo tak i globální metabolickou aktivitu buňky. V případě správnosti tohoto předpokladu tak musí produkce AI-2 korelovat i s růstovým potenciálem a dosaženou růstovou fází buněk. (XAVIER a BASSLER, 2003).

2.1.1.5 Komunikační sítě mohou být cílem ovlivňování, které se neomezuje jen na bakterie

Vzhledem k tomu, jak důležitou úlohu hraje QS v ekologii mnoha mikroorganizmů, je zřejmé, že i další, možná i mnohobuněčné organizmy mohou mít zájem na interferenci s QS signály, případně na jejich úplném vyrušení. Lze uvést například červenou řasu

Delisea pulchra, vylučující do okolí látky určené speciálně k napadání A-HSL signalizace bakterie, jak bylo ukázáno na příkladu *Serratia liquefaciens*, které je v přítomnosti těchto látek znemožněno seskupování v bezprostřední blízkosti rostliny (na jejích listech) (MANEFIELD *et al.* 1999, RICE *et al.* 1999). Jedná se ovšem spíše o ilustrační příklad, protože v přírodě *S. liquefaciens* s *D. pulchra* do styku nepřichází.

V přírodním prostředí byla pozorována interakce půdních bakterií *Bacillus subtilis* a *Erwinia carotovora*. *B. subtilis* činí *E. carotovora* prakticky avirulentní produkcí enzymu AiiA, inaktivujícího její A-HSL. Není proto vyloučeno, že jde o ukázku konkurenčního boje mezi bakteriemi.

2.1.1.6 Quorum sensing u kvasinek

Současné znalosti obdoby QS systémů u eukaryot jsou zatím nedokonalé a neúplné; jejich výzkumy však pokračují a s vysokou pravděpodobností prokáží, že se u nich uplatňuje QS v míře ne menší, než je tomu u prokaryot. Byly zveřejněny první výsledky týkající se kontroly pučení a tvorby hyf u kvasinky *Candida albicans*.

C. albicans je důležitým modelem pro základní výzkum v biologii a pro svou příležitostnou patogenicitu je zároveň předmětem výzkumu medicínského. V kultuře se mohou vyskytovat její samostatné buňky, dělící se pučením, případně tvořící hyfy. Poměr obou forem je pravděpodobně určen vnějšími podmínkami a koncentrací buněk v kultuře. Při zkoumání autoregulačních signálů byly identifikovány dvě účinné molekuly: farnesol, potlačující tvorbu hyf (HORNBY *et al.* 2001) a tyrosol, který naopak tvorbu hyf podporuje (CHEN *et al.* 2004)

2.1.1.6.1 Farnesol inhibuje myceliální růst

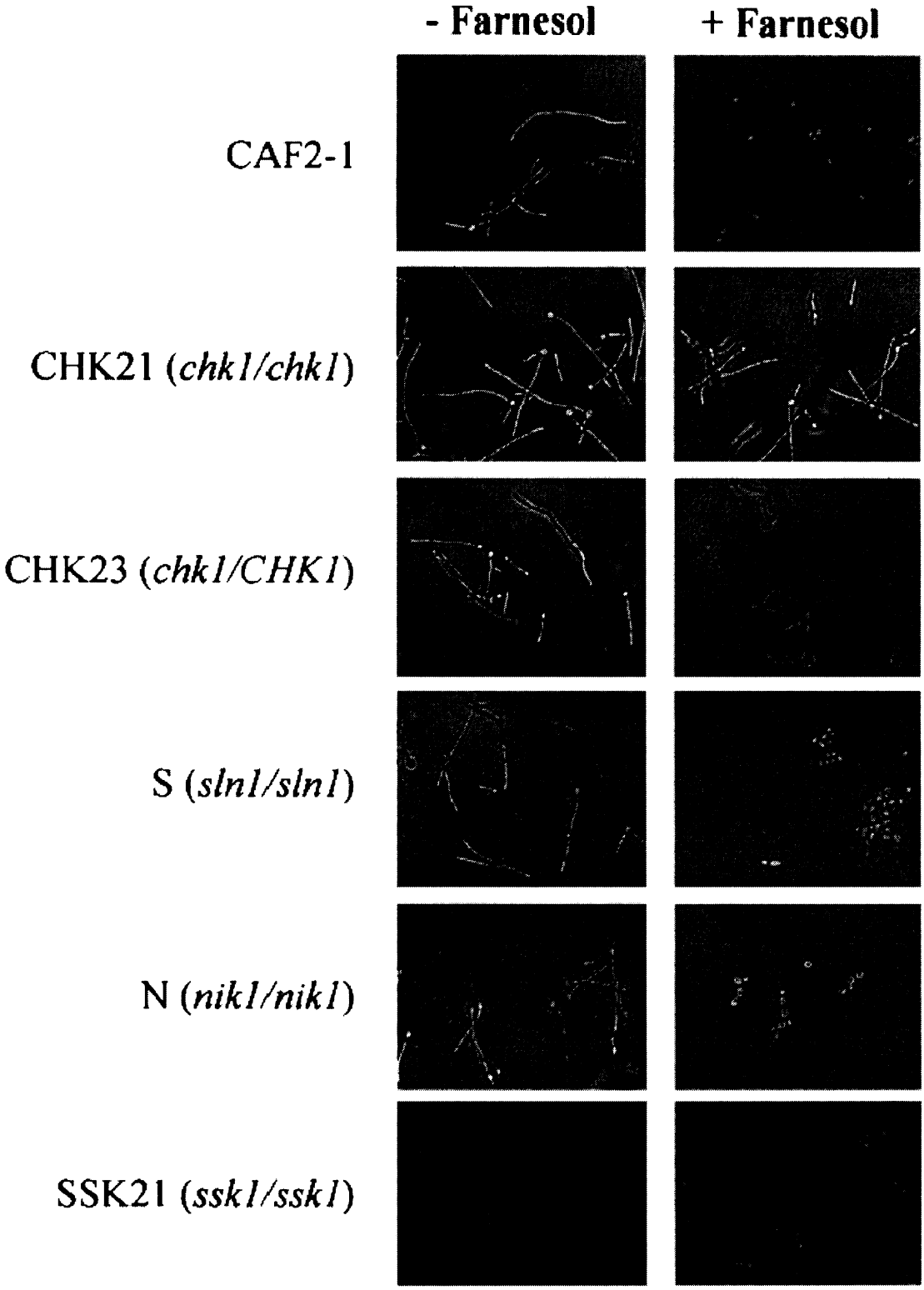
Hornby a spolupracovníci (2001) určili farnesol jako QS molekulu při studiu příčin závislosti morfologie kvasinkových buněk na počáteční hustotě kultury v tekutém médiu (tzv. „inoculum size effect"). Dosahovala-li hustota kultury hodnoty 10^6 buněk/ml nebo vyšší, převažovaly později v rostoucí kultuře samostatné buňky dělící se pučením. Nižší hustoty naproti tomu vedly k rozvoji myceliálního morfotypu. Po zjištění, že i na nízkou denzitu naočkovaná kultura vykazuje významné množství pučících buněk, přidá-li se živné médium ze starší kultury (zbavené buněk), započala práce na identifikaci zodpovědné látky, případně směsi látek. Ta posléze vedla k identifikaci jediné molekuly,

farnesolu (1-hydroxy-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodekatrien). Účinnou inhibici vykazuje i uměle připravený a přidaný farnesol. (HORNBY *et al.* 2001)

Relativně nedávná studie (KRUPPA *et al.* 2004) prezentuje histidin-kinázu Chk1p jako součást signální dráhy farnesolu. Práce vychází ze závěrů o účincích farnesolu jako QS molekuly (HORNBY *et al.* 2001) a z předpokladu, že by se přenosu signálu, podobně jako u grampozitivních bakterií, mohl účastnit receptor spojený s His-kinázou. U *C. albicans* jsou známy tři takové kinázy, Sln1p, Nik1p a Chk1p. Jednotlivé mutanty postrádající funkční gen *SLN1*, resp. *NIK1*, resp. *CHK1* byly porovnány s izogenním rodičovským kmenem CAF2-1 v prostředí bez farnesolu a s farnesolem v dostatečné koncentraci (Obr. 2). V nepřítomnosti farnesolu tvořily všechny mutanty hyfy srovnatelnou měrou, po jeho přídavku však klesla tvorba hyf na 15-30 % u všech kmenů vyjma *chk1* mutanty. Toto zjištění vedlo k závěru, že Chk1p je nezbytnou složkou farnesolové signální kaskády. Protože se však jedná o cytosolický protein a ani se nezdá, že by obsahoval nějakou doménu vhodnou k vazbě farnesolu, je patrně zapotřebí jiného proteinu, který by tuto přímou vazbu farnesolu zprostředkovával.

2.1.1.6.2 Tyrosol zkracuje lag fázi zaočkované kultury a podporuje myceliální růst

Buňky *C. albicans* zaočkované na densitu nižší než 10^7 b/ml vykazují podle CHENA a kolegů (2004) zřetelnou lag fázi; která se při snižující se denzitě inokula výrazně prodlužuje. V rostoucí kultuře je přitom po překročení hranice 10^7 b/ml detekovatelná látka tyrosol. Lag fáze inokula o nízké densitě je přitom zkrácena i po přídavku uměle vyrobeného tyrosolu. Toto zkrácení je však méně výrazné než u kultur s vysokou počáteční hustotou, a to i při použití stejných nebo vyšších koncentrací tyrosolu. Zdá se proto, že tyrosol je jen jedním z faktorů ve složitější regulační síti. (CHEN *et al.* 2004) . Tato výsledky rovněž naznačují možnou funkci tyrosolu jako antagonisty farnesolu při kontrole morfologické diferenciace kvasinkových buněk v hyfy. Tyrosol za vhodných podmínek myceliální růst urychluje. Jeho přítomnost v médiu zkracuje dobu nezbytnou pro diferenciaci prvních hyf, rovněž podíl hyf v mladé kultuře je po přídavku tyrosolu výrazně vyšší oproti kontrole.



Obr. 2 Mikrofotografie *C. albicans* v přítomnosti a nepřítomnosti farnesolu. Kmen CHK21 neobsahuje žádný gen *CHK1*, CHK23 právě jeden. KRUPPA *et al.* 2004

2.1.2 Role amoniakové signalizace při růstu kolonie *S. cerevisiae*

Kolonie různých kvasinkových druhů při růstu na pevném komplexním médiu periodicky okyselují a alkalizují okolní médium. Bylo zjištěno, že alkalizace média je způsobená uvolňováním plynného amoniaku z kolonií. Produkce amoniaku a alkalizace média probíhají v pulsech oddělených okyselením média (PALKOVÁ *et al.* 1997). První puls produkce amoniaku nastává hned po inokulaci obří kolonie na médium (obří kolonie vzniká inokulací kapky buněčné suspenze na médium; vzniká tedy z velkého počtu buněk na rozdíl od monokolonie, která vzniká z jediné buňky). Tento první amoniakový puls je krátký, slabý a nesměrovaný a je rychle následován acidifikací média. Po několika dalších dnech přichází druhý puls produkce amoniaku a s tím spojené alkalizace, který je delší, silnější a zesílený směrem proti sousední kolonii. Pak následuje opět acidifikace a poté další amoniakový puls. Takto se střídají acidická a alkalická fáze dokud nedojde k vyčerpání živin a zastavení růstu kolonie. Amoniak způsobuje přechodné zastavení růstu té části kolonie, která je nejblíže k sousední kolonii produkující amoniakový signál. Změny pH spojené s produkcí amoniaku byly pozorovány u mnoha druhů kvasinek z rodů *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* a dalších (PALKOVÁ *et al.* 1997). U různých druhů, různých kmenů a na různých médiích trvají alkalická a acidická fáze různě dlouhou dobu a jsou specifické pro daný druh nebo kmen.

2.1.2.1 Vlastnosti amoniakové signalizace

Kolonie dokáží na amoniakový signál odpovědět tím, že samy začnou produkovat amoniak (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Kolonie v jakékoli vývojové fázi (alkalické nebo acidické) dokáží odpovědět na amoniakový signál pocházející buď z kolonie v alkalické fázi nebo z umělého zdroje. Odpovědí je již zmíněná zástava růstu směrem ke zdroji amoniaku a také produkce dalšího amoniaku. Amoniakový signál tedy iniciuje produkci sebe sama a představuje tak pozitivní zpětnovazebnou smyčku. Tím, že kolonie může být amoniakovým signálem naindukovaná k tvorbě amoniaku, dochází k synchronizaci vývoje kolonií, které rostou v blízkosti u sebe. U kolonií *Candida mogii* je přechod mezi alkalickou a acidickou fází doprovázen výraznou změnou morfologie kolonií. Kolonie v acidické fázi růstu jsou téměř hladké, složené z pseudohyfálních a hyfálních buněk, zatímco amoniak indukuje výrazně vrásčitou morfologii kolonií, ve kterých převládají nedělící se kvasinkové buňky (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000).

Amoniak (NH_3) je malá, nenabitá, mírně zásaditá molekula za běžných teplot plynná. Ve vodném roztoku je v rovnováze s protonovanou formou, amonným iontem (NH_4^+).

Poměr obou forem je závislý na pH; při nízkém pH převládá NH_4^+, při vyšším se zvyšuje podíl neprotonované formy. Při fyziologických hodnotách pH množství NH_4^+ výrazně převyšuje množství NH_3. Rozdíl ve vlastnostech NH_3 a NH_4^+ je velký. Nejdůležitější je, že nenabitý NH_3 může procházet membránami bez pomoci jakéhokoli transportéru pouhou difuzí, zatímco nabitý NH_4^+ potřebuje k průchodu membránou činnost nějakého transportéru.

Produkce amoniaku nezávisí na koncentraci vnějšího amoniaku nebo amonných iontů v médiu ani není závislá na činnosti skupiny Mep transportérů přenášejících amonné ionty do buňky, protože mutanta s delecí ve všech genech pro tyto přenašeče (mutanta *mep1/mep2/mep3*) je schopná stejné produkce amoniaku jako nemutovaný rodičovský kmen (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Proto bylo třeba hledat nějaký vnitrobuněčný zdroj. Pravděpodobným zdrojem amoniaku jsou deaminační reakce aminokyselin uvnitř buňky, protože amoniakové pulsy jsou závislé na přítomnosti aminokyselin v médiu (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Na minimálním médiu, na rozdíl od komplexního média, k detekovatelné produkci amoniaku nedochází a tato produkce může být obnovena přidáním směsi aminokyselin do minimálního média. Různé aminokyseliny mají různý vliv na množství vyprodukovaného amoniaku. O úloze vnějších aminokyselin svědčí i fakt, že mutanta v genu *SHR3*, která má defekt v lokalizaci některých permeáz aminokyselin, neprodukuje amoniak a ani není schopna odpovídat na amoniakový puls. Během přechodu mezi acidickou a alkalickou fází dochází ke změnám v koncentraci a ve vnitrobuněčném rozložení aminokyselin mezi vakuolou a cytoplazmou. Během fáze produkce amoniaku dochází k uvolňování aminokyselin z vakuoly do cytoplazmy (PALKOVÁ *et al.* 2002). Během přechodu z acidické do alkalické fáze se také mění exprese některých metabolických enzymů, které by mohly z aminokyselin amoniak uvolňovat (například gen *GCV1* kódující glycin dekarboxylázu uvolňující amoniak). Všechny tyto výsledky naznačují, že aminokyseliny jsou zdrojem amoniaku produkovaného během vývoje kolonie.

Velmi málo je známo o způsobu, jakým se amoniak dostává z buňky. Může to být pasivní difuzí neprotonovaného amoniaku přes plazmatickou membránu, nebo přenosem buď amoniaku nebo jeho protonované formy (amonného iontu) za účasti nějakého membránového transportéru. Kandidáty na tyto transportéry jsou tři Ato proteiny (Ato1p, Ato2p, Ato3p). Syntéza těchto transportérů je silně zvýšená při vstupu do alkalické fáze a mutanty s delecemi v jednotlivých *ATO* genech mají výrazně nižší produkci amoniaku než rodičovský kmen (PALKOVÁ *et al.* 2002). Není zcela jasné, zda transportují

amoniak nebo amonné ionty a jestli jde o prostý transport nebo například o antiport s protony. Při přechodu do alkalické fáze se zvyšuje také exprese řady genů pro transportéry , které pracují jako symportery s protony (např. transportéry fosfátu a sulfátu). Spolu se snížením exprese genu *PMA1* pro plazmatickou H^+-ATPázu by tyto změny představovaly mechanizmus, jak zvýšit importem protonů do buněk extracelulární pH, ve kterém by bylo více plynného amoniaku v poměru k amonným iontům a mohla by tak účinněji probíhat signalizace (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003).

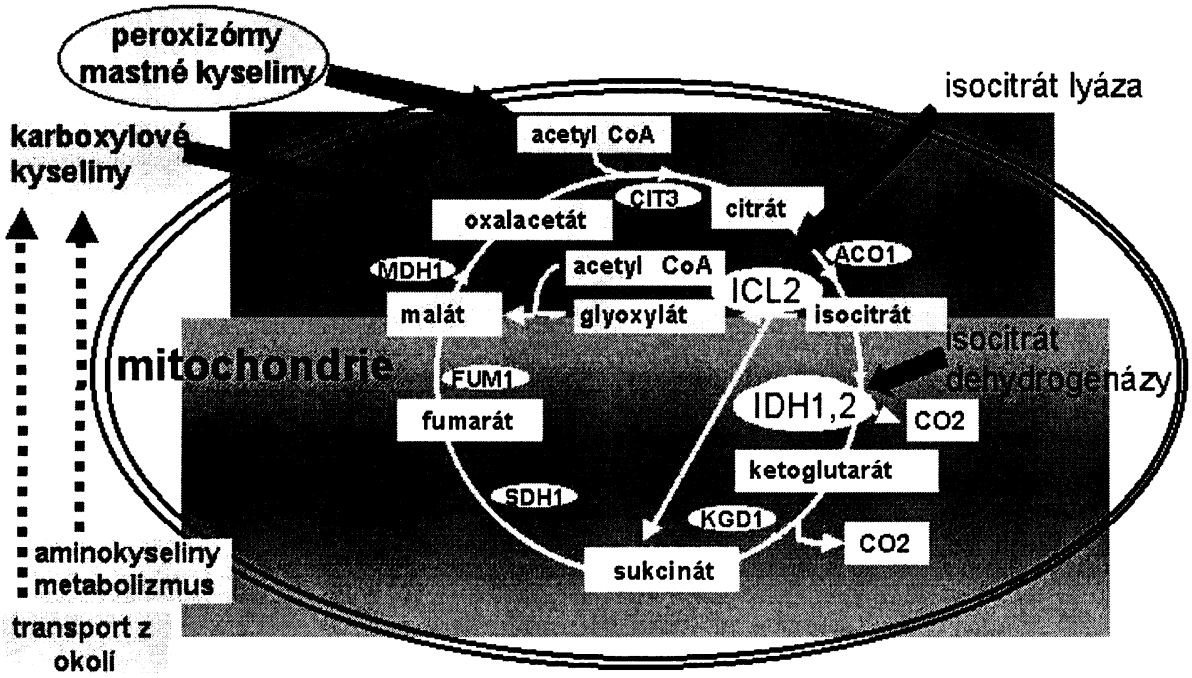
2.1.2.2 Změny exprese genů spojené s přechodem z alkalické do acidické fáze

Přechod z první acidické fáze do druhé alkalické fáze byl rozdělen do šesti odlišitelných stádií podle pH okolního média a některých dalších znaků a byla provedena globální analýza změn genové exprese pomocí genomových čipů (tzv. „microarrays"). Byly zjištěny změny transkripce celých kolonií nacházejících se v jednotlivých fázích alkalizace. Z výsledků vyplývá, že v průběhu přechodu z acidické do alkalické fáze vývoje kolonií dochází ke změně exprese u celé řady genů. Jde především o změnu exprese metabolických genů a genů stresové odpovědi (PALKOVÁ *et al.* 2002).

2.1.2.2.1 Změny metabolizmu

Z metabolických genů se mění exprese genů metabolizmu aminokyselin a dále genů pro mitochondriální a peroxizomální proteiny (PALKOVÁ *et al.* 2002). Význam animokyselin pro produkci amoniaku byl již zmíněn, a změny exprese genů metabolizmu aminokyselin proto nejsou překvapivé. Během přechodu do alkalické fáze se postupně snižuje exprese mitochondriálních genů oxidativní fosforylace a většiny enzymů citrátového cyklu jako například izocitrát dehydrogenázy (*IDH1* a *IDH2*), 2-oxoglutarát dehydrogenázy (*KGD1*) nebo sukcinát dehydrogenázy (*SDH1*). Naopak aktivovaná je exprese genů pro jednu z izoforem citrát syntázy (*CIT3*) a pro methylizocitrát lyázu (*ICL2*), tedy enzymy účastnící se tzv. glyoxylátového cyklu. Indukují se i geny pro mitochondriální přenašeč oxalacetátu (*OAC1*), acetyl-KoA (*CAT2*) nebo přenašeče karboxylových kyselin na plazmatické membráně (PALKOVÁ *et al.* 2002). V souhrnu to znamená, že by mohlo proběhnout přeprogramování metabolizmu podle následujícího modelu (obr. 3): Dojde k inaktivaci oxidativní fosforylace a citrátového cyklu a „vypnutí" mitochondrií. Současně se aktivuje glyoxylátový cyklus, který spotřebovává acetyl-KoA produkovaný v peroxizómech (jejichž biogeneze je pravděpodobně také indukovaná) β-oxidací mastných kyselin. Vzniklý sukcinát a oxalacetát by se mohly

zapojovat do metabolizmu aminokyselin prostřednictvím mitochondriální aspartát aminotransferázy (*AAT1*), která přeměňuje oxalacetát a glutamát na 2-oxoglutamát a aspartát a která je rovněž aktivovaná (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). Tento model je také v souladu s nedávným zjištěním, že mitochondriální dysfunkce (například u *rho*^{0} kmenů) indukuje peroxizomální biogenezi, β-oxidaci mastných kyselin a glyoxylátový cyklus, který se může stát alternativním zdrojem citrátu, sukcinátu a oxalacetátu pro další metabolické dráhy (EPSTEIN *et al.* 2001).



Obr. 3 Metabolické změny indukované amoniakem. Zelená barva značí represi genů nebo určité dráhy, červená indukci. Žlutě je vyznačen glyoxylátový cyklus. Převzato z PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003

.

2.1.2.2.2 Geny stresové odpovědi

Další významnou skupinou genů měnících expresi při přechodu z acidické do alkalické fáze vývoje kolonie jsou geny stresové odpovědi. Dochází ke snížení exprese genů tzv. obecné stresové odpovědi („enviromental stress response", ESR) (PALKOVÁ *et al.* 2002). ESR geny zajišťují obranu proti nejrůznějším druhům stresu (teplotní, oxidativní, nutriční atd.) a jsou společně regulovány v různých stresových situacích (GASCH *et al.* 2000). Při vstupu do alkalické fáze se výrazně snižuje exprese velkého

počtu genů patřících právě do skupiny ESR genů (např. to jsou *SOD1* a *CTT1*). Tyto změny ukazují, že v buňkách se při přechodu do alkalické fáze inaktivují geny stresové odpovědi. Buňky alkalické fáze se tedy adaptovaly oproti stresovaným buňkám v acidické fázi. Stresovým faktorem tu zřejmě je hladovění a oxidativní stres.

2.1.2.2.3 Programovaná buněčná smrt

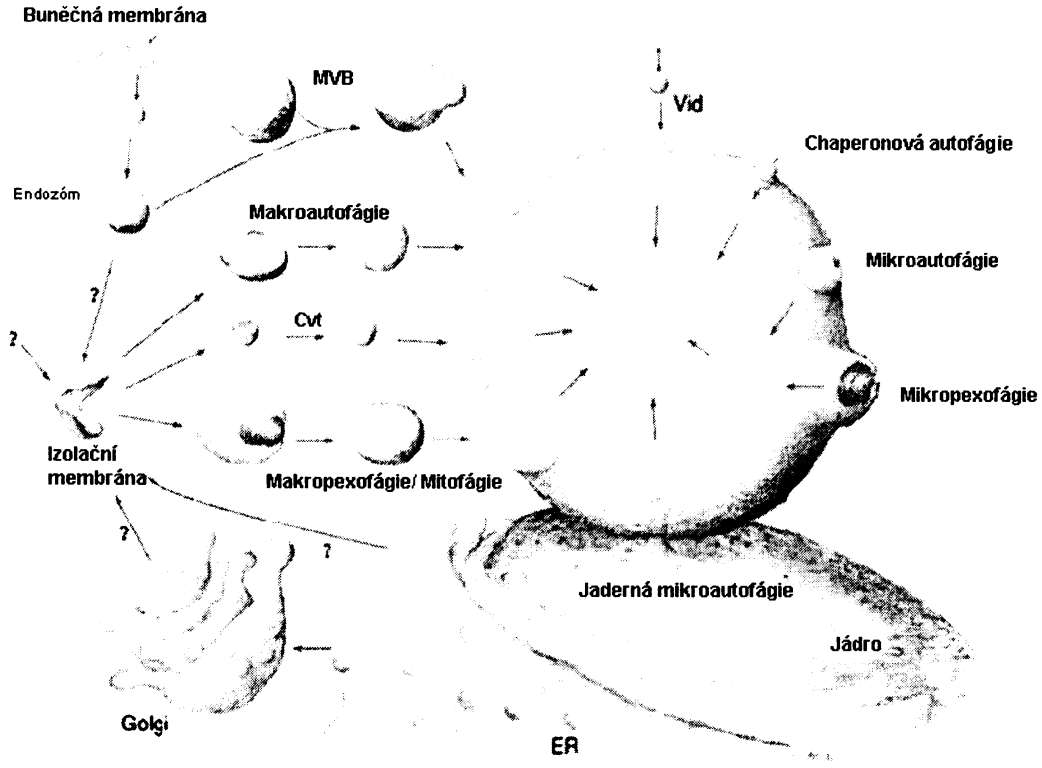
Dalším znakem, společným kvasinkovým koloniím a mnohobuněčným organizmům je výskyt buněk vykazujících proapoptotické znaky (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ, 2005). Jejich lokalizace v kolonii, v prvních dnech náhodná, se mění po vstupu do alkalické fáze. Největší podíl takto umírajících buněk lze pozorovat ve středu kolonie, na nově přirůstajícím okraji je minimální. Protože buňky ve středu kolonie pravděpodobně trpí největším stresem z nedostatku živin a chronologického stárnutí, chrání jejich kontrolovaná smrt ostatní buňky před účinky toxických látek látek, které by se uvolnily jejich pasivním rozpadem. Navíc bylo ukázáno, že se po umělém odstranění středových buněk snižují přírůstky na vnějším okraji. Apoptotické buňky tak zřejmě mohou zásobovat zbytek kolonie živinami.

2.2 Autofágie

2.2.1 Úvod

Buňky všech organizmů často čelí podmínkám vyžadujícím rychlou změnu metabolizmu. Může se jednat o stresové podmínky navozené vnějším prostředím anebo fyziologické podmínky v rámci jednoho organizmu, vyplývající z potřeby diferenciace a udržování stálého vnitřního prostředí. Autofágie, vysoce konzervovaná mezi všemi eukaryotickými organizmy, je jedním z hlavních nástrojů těchto změn. Pod pojmem autofágie v širším slova smyslu se skrývá řada převážně degradativních drah, dopravujících buněčné komponenty v membránových váčcích do vakuoly nebo lyzozómu. Tím se odlišují od druhého hlavního degradačního systému, založeného na ubikvitinaci a proteazómech.

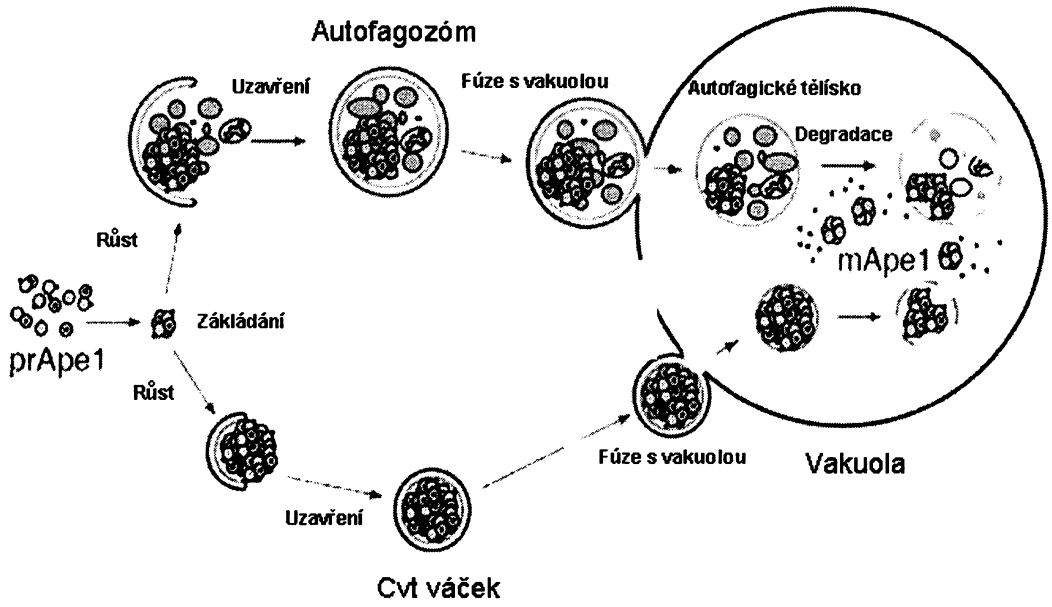
Mezi autofagické dráhy se řadí makroautofágie, cílený transport do vakuoly (Cytosole to Vacuole Targeting, Cvt), makropexofágie a mitofágie. Dráhy s odlišnou membránovou topologií, ale příbuznou funkcí jsou mikroautofágie, mikropexofágie, vakuolární import a degradace (Vid), autofágie zprostředkovaná chaperony, mikroautofágie jádra a doprava pomocí „víceváčkových tělísek“ (MultiVesicular Bodies, MVB) (Obr. 4).



Obr. 4 Přehled autofagických drah (upraveno z KLIONSKY 2003)

1 Makroautofágie hraje při metabolických změnách nejvýznamnější roli. Autofágie v užším slova smyslu je synonymem pro makroautofágii, což bude dále platit i v tomto textu. Za běžných růstových podmínek probíhá makroautofágie s nízkou (živočichové), až nepozorovatelnou intenzitou (kvasinky). Jedná se tedy o dráhu indukovatelnou, přísně regulovanou. V jejím průběhu je v cytoplazmě *de novo* založena membránová vrstva, zvaná izolační membrána nebo fagofor. Ta se zvětšuje, přičemž nabývá miskovitého, později kulovitého tvaru a postupně obaluje část cytoplazmy se vším jejím obsahem. Nakonec dochází ke spojení jejích konců a tedy ke vzniku váčku obaleného dvěma membránami, autofagozómu. Ten je dopraven k lytickému kompartmentu buňky (u rostlin a hub vakuola, u živočichů lyzozóm). Dochází k fúzi vnější autofagozomální a vakuolární/lyzozomální membrány a do lumen lytické organely je uvolněn váček obalený jedinou membránou, zvaný autofagické tělísko (Obr. 5). Jeho membrána je enzymaticky strávena a obsažené cytoplazmatické komponenty vystaveny působení vakoulárních/lyzozomálních hydroláz). Oblast cytoplazmy uzavřená do autofagozómu

zřejmě není předem určena, makroautofágie je tedy neselektivní proces. Typické rozměry kvasinkového autofagozómu jsou 300-900 nm (BABA *et al.* 1994)



Obr. 5 **Schéma autofágie a Cvt dráhy. prApeI – prekurzor aminopeptidázy I, mApeI – maturovaná ApeI (upraveno z NAIR a KLIONSKY 2005)**

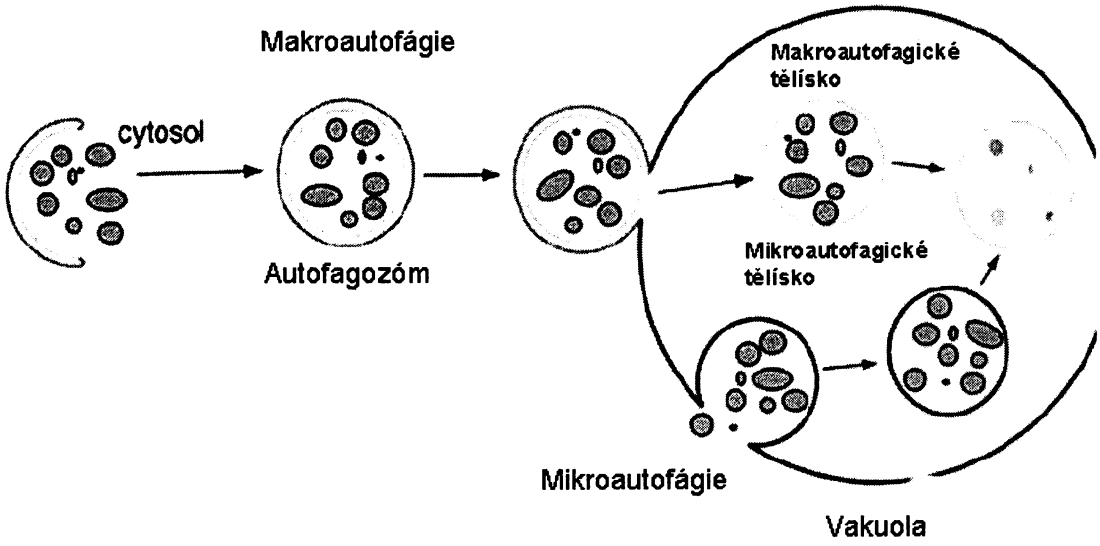
2 Cvt dráha má na rozdíl od ostatních drah příbuzných autofágii syntetickou funkci. Slouží k dopravě prekurzorů enzymů α-manozidázy (Ams1) a aminopeptidázy 1 (Ape1) do vakuoly, kde dochází k jejich maturaci (Obr. 5). Cvt sdílí naprostou většinu molekulárních mechanizmů s autofágií a celý proces je morfologicky odlišitelný jen díky velikosti Cvt organel, která nepřesahuje 150 nm. Oproti autofagozómu obsahuje membrána vznikajícího Cvt váčku navíc receptory pro oligomery prekurzorů prApe1 a prAms1. Cvt byla popsána pouze u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kde probíhá konstitutivně. Zdá se, že indukce autofágie u kvasinek znamená přepnutí Cvt dopravy na nespecifickou a velkoobjemovou makroautofágii.

3 Makropexofágie je vysoce selektivní proces společný všem skupinám eukaryot. Poškozené nebo nadbytečné peroxizómy jsou při něm eliminovány zabalením do

mnohavrstevného membránového váčku, jehož vnější membrána stejně jako při makroautofágii fúzuje s vakuolární membránou a obsah je degradován. Do makropexofagozómu jsou zabaleny výhradně peroxizómy, ale nikdy ne všechny. I při masivní pexofágii jich část unikne a zůstává v buňce pro případnou budoucí replikaci (HUTCHINS *et al.* 1999).

4 Mitofágie selektivně odstraňuje mitochondrie (KISSOVA *et al.* 2004). Je souběžně s makroautofágií indukována hladověním, ale probíhat může i samostatně, je-li nezbytné likvidovat poškozené mitochondrie (PRIAULT *et al.* 2005). Přinejmenším savčí buňky tak chrání před předčasným spuštěním apoptózy.

5 Mikroautofágie nevyžaduje žádný membránový systém dopravy do degradační organely. Místo toho je likvidovaný cytoplazmatický materiál pohlcen přímo membránou ohraničující vakuolu (obr. 6). Celý proces je prostudován podstatně méně než jiné autofagické dráhy. Slouží k odstranění proteinů i organel, není však známo mnoho o podmínkách jeho indukce, ani o jeho případné selektivitě. Minimální jsou i poznatky o molekulárním mechanizmu, který operuje s vakuolární/lyzozomální membránou a který musí rozlišit kompletně uzavřené mikroautofagické tělísko určené k degradaci.



Obr. 6 **Srovnání mikro- a makroautofágie (upraveno z KLIONSKY 2003)**

6 Mikroautofágie jádra je zvláštní forma mikroautofágie, při níž vakuola pohlcuje malé fragmenty jádra (GOLDFARB *in* KLIONSKY 2003). Jejich obsah je zřejmě pečlivě selektován, protože schopnost růstu a dělení buňky není tímto procesem poškozena. Mikroautofágie jádra je indukovatelná hladověním, podobně jako makroautofágie.

Spekuluje se i o jejím možném významu při apoptóze (KLIONSKY 2003). Je známa pouze u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

6 Mikropexofágie byla dosud popsána pouze u kvasinky *Pichia pastoris*. Jedná se selektivní obdobu mikroautofágie. *Pichia pastoris* může spouštět makro- i mikopexofágii a není jasné, zda a jak mezi nimi přepíná.

7 Autofágie zprostředkovaná chaperony byla pozorována pouze v savčích buňkách. Degraduje pouze proteiny nesoucí KFERQ nebo blízce podobný motiv. Tyto proteiny jsou pomocí chaperonů rozvolněny do nesbaleného stavu a translokovány do lyzozómu membránovým kanálem.

9 Vakuolární import a degradace (Vid). Tato poměrně nedávno popsaná dráha slouží k selektivní dopravě nadbytečného enzymu fruktóza-1,6 bisfosfatázy v novém typu membránových váčků do vakuoly *S. cerevisiae* (HUANG a CHIANG 1997). O mechanizmech a případných dalších substrátech této dráhy je k dispozici minimum informací, nicméně v rychlých změnách metabolizmu může hrát významnou roli.

10 MVB vznikají z endozómu vchlipováním částí jeho obalové membrány. Takto vzniklé váčky nacházející se v lumen endozómů a obsahují různé membránové i cytosolické komponenty a vytvářejí z endozómu „tělísko obsahující mnoho váčků". Vnější endozomální membrána poté fúzuje s lyzozómem/vakuolou a malé váčky jsou uvolněny do jejího nitra. Vzhledem ke svému endozomálnímu původu mohou tyto vezikly pomáhat degradovat i povrchové receptory.

2.2.2 Molekulární mechanizmy autofágie

V této podrobnější části se budu zabývat pouze makroautofágií *S. cerevisiae*. Pomocí metod molekulární genetiky bylo dosud identifikováno celkem 29 kvasinkových genů specifických pro tento proces. Názvosloví 27 z nich, objevených před rokem 2003, bylo dlouho nejednotné, v KLIONSKY (2003) bylo upraveno do tvaru ATG#. Provedené změny shrnuje tabulka 1. Následující text diskutuje role některých z těchto proteinů.

TAB 1 Současné názvy autofagických proteinů a jejich synonyma

Současný název	Původní názvy					
ATG	**APG**	**AUT**	**CVT**	**GSA**	**PAZ**	**PDD**
1	1	3	10	10	1	7
2	2	8	—	11	7	—
3	3	1	—	20	—	—
4	4	2	—	—	8	—
5	5	—	—	—	—	—
6	6	—	—	—	—	—
7	7	—	2	7	12	—
8	8	7	5	—	2	—
9	9	9	7	14	9	—
10	10	—	—	—	—	—
11	—	—	9	9	6	18
12	12	—	—	—	—	—
13	13	—	—	—	—	—
14	14	—	12	—	—	—
15	—	5	17	—	—	—
16	16	—	11	—	3	—
17	17	—	—	—	—	—
18	—	10	18	12	—	—
19	—	—	19	—	—	—
20	—	—	20	—	—	—
21	—	—	21	—	—	—
22	—	4	—	—	—	—
23	—	—	23	—	—	—
24	—	—	13	—	16	—
25	—	—	—	—	—	4
26	—	—	—	—	4	—
27	—	—	24	—	—	—

2.2.2.1 Regulace autofágie

Za příznivých podmínek umožňujících růst probíhá autofágie vedle Cvt dráhy s minimální intenzitou, umožňující likvidaci nadbytečných organel a proteinů s nízkou afinitou k ubikvitinu.

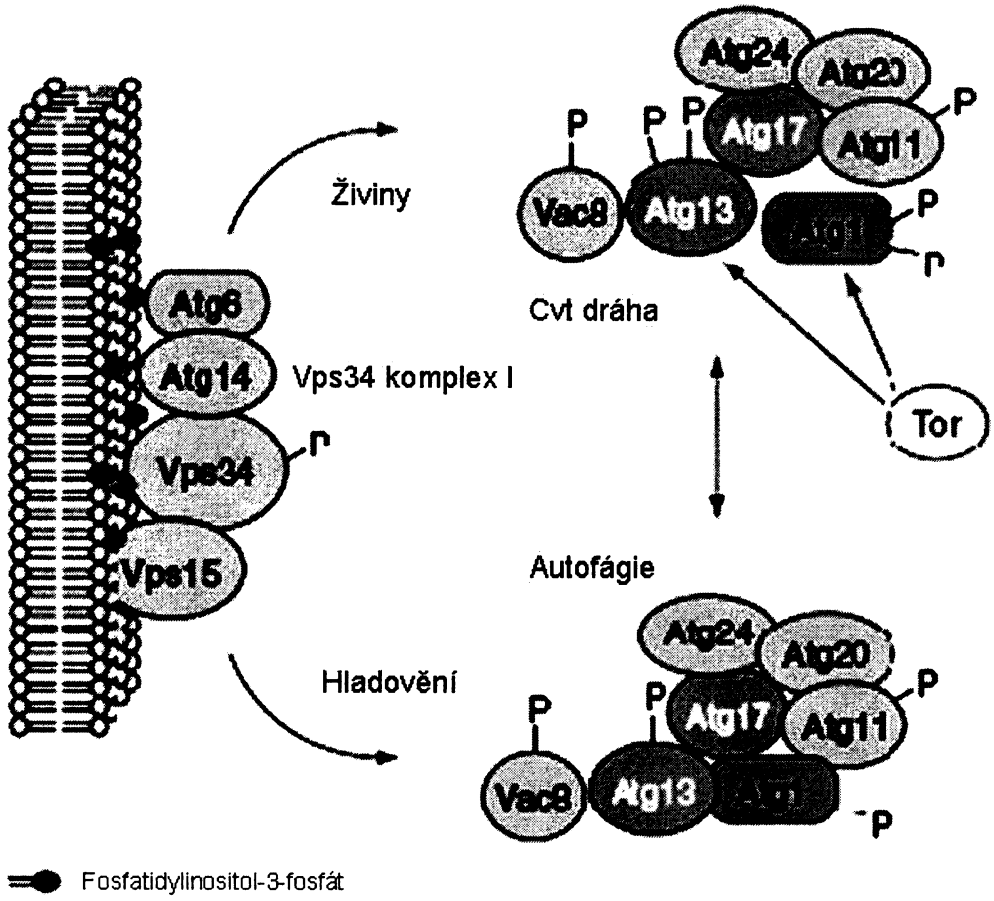
2.2.2.1.1 Tor kináza

Iniciační kroky vedoucí k výraznému zvýšení autofagické aktivity jsou inhibovány proteinkinázou Tor1p („Target of rapamycin"). Produkt genu *TOR1* je v kvasinkových buňkách inaktivován hladověním nebo působením antibiotika rapamycinu. Inaktivace Tor kinázy umožňuje defosforylaci proteinu Atg13p a stabilizaci komplexu Atg13p-Atg1p (KAMADA *et al.* 2000) (Obr. 7). Není známo, zda je Atg13p Tor1p kinázou ovlivňován přímo či nepřímo, nicméně přenos signálu mezi nimi nezávisí na dráze Tap42p/Sit4p, jejímž prostřednictvím ovlivňuje Tor1p řadu jiných buněčných funkcí (KAMADA *et al.* 2000, MARTIN a HALL, 2005). Atg1p je klíčový protein pro autofagii i Cvt dráhu. Strukturou patří do rodiny kináz, jeho kinázová aktivita je však nezbytná spíše pro Cvt, v autofágii hraje především strukturní roli při formaci autofagozómů (ABELIOVICH *et al.* 2003). Po navázání defosforylovaného Atg13p dochází k autofosforylaci a změně aktivity Atg1p, což vede k přepnutí Cvt na autofágii (MATSUURA *et al.* 1997, KAMADA *et al.* 2000). S komplexem Atg1p-Atg13p fyzicky interagují další proteiny – Atg11p, Atg20p, Atg24p, Vac8p a Atg17p (SCOTT *et al.* 2000, KIM *et al.* 2001, KAMADA *et al.* 2000). Pro iniciaci autofágie je důležitý Atg17p, stabilizující interakci Atg1p-Atg13p (KAMADA *et al.* 2000). Na jeho přítomnosti závisí velikost vznikajících autofagozómů a tedy i intenzita autofágie (KABEYA *et al.* 2004, CHEONG *et al.* 2005).

2.2.2.1.2 Fosfatidylinositol-3-kinázové komplexy

Fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) hrají mnoho rolí v buněčné signalizaci. Fosforylují membránový lipid fosfatidylinositol (PI) na třetím uhlíku jeho inositolového cyklu a vzniklý PI-3-fosfát (PI-3-P) se uplatňuje jako tzv. druhý posel signálních sítí. V kvasince *S. cerevisiae* byla dosud identifikována jedna kináza tohoto druhu, Vps34p. Je klíčovou složkou dvou komplexů. Komplex I tvoří spolu membránovým proteinem Vps15p a proteiny Atg14p a Atg6p, v komplexu II je Atg14p nahrazen Vps38p (KIHARA *et al.* 2000). Pro autofágii je nezbytný komplex I (Obr. 7), aktivita komplexu II kontroluje endozomální dráhu Vps (Vacuolar protein sorting). Autofágní proteiny Atg20p a Atg24p

obsahují vazebná místa pro PI-3-P (NICE *et al.* 2002). Oba interagují s se složkami Atg1p-Atg13p komplexu a tvoří tak spojení mezi PI-3-kinázou a zahájením autofágie (NICE *et al.* 2002, YORIMITSU a KLIONSKY 2005).



Obr. 7 Schéma Atg1 komplexu a jeho změn v závislosti na Tor a Vps34 komplexu I (upraveno z KLIONSKY 2005)

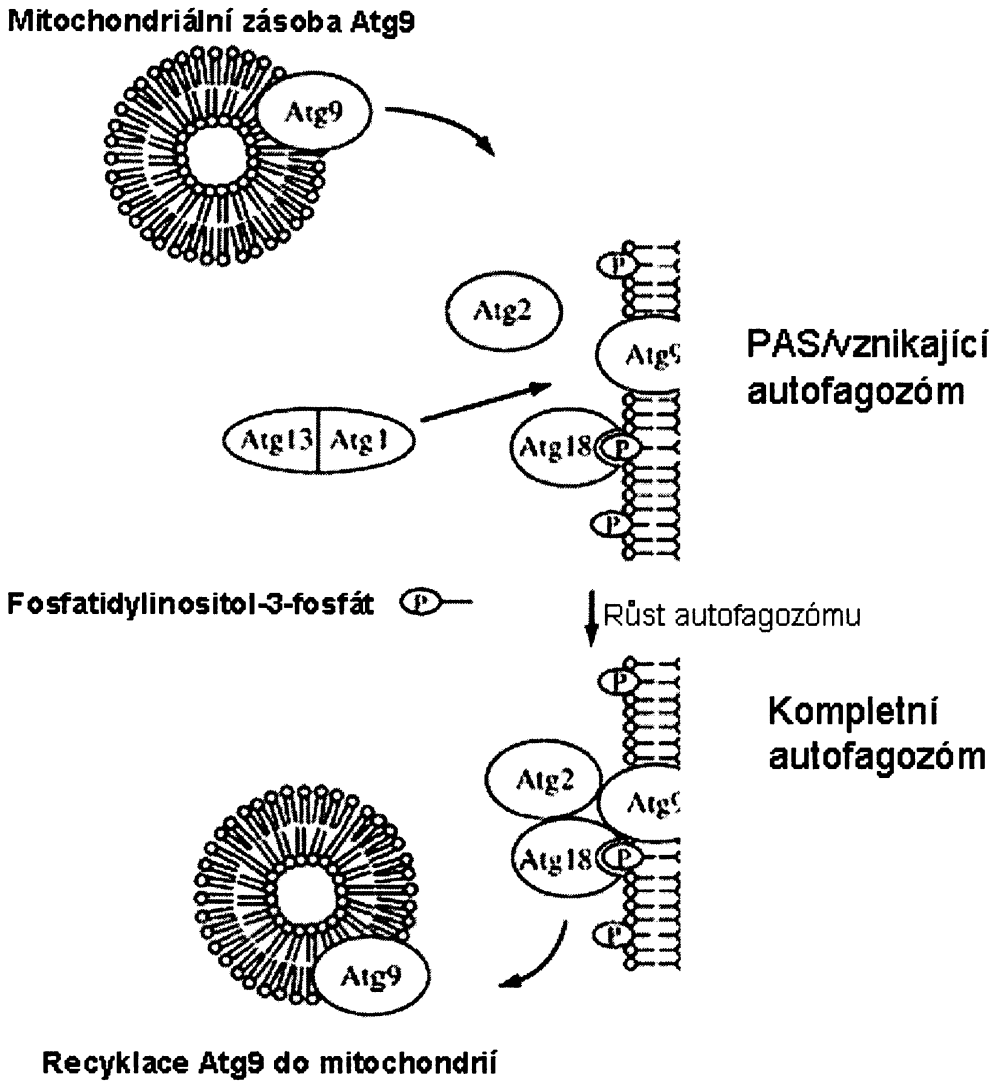
2.2.2.2 Preautofagozomální struktura *PAS*

Komplex Atg1p hraje ústřední roli v koordinaci membránové dopravy v okolí preautofagozomální struktury (PAS). PAS je hypotetický membránový útvar, nacházející se v buňce v jediné kopii v těsné blízkosti vakuoly (KIM *et al.* 2002). Kromě proteinů Atg1p komplexu se v jeho membráně a okolí soustředí i velká část dalších autofagických proteinů (SUZUKI *et al.* 2004). První kroky formace autofagozómů jsou zřejmě spjaty právě s PAS. Zatím o povaze této struktury chybí podrobnější údaje, které by mohlo přinést zejména její pozorování elektronovým mikroskopem.

2.2.2.3 Zahájení tvorby autofagozómu

Jako první pozorovatelný zárodek autofagozómu se v cytoplazmě objevuje membránová dvojvrstva deskovitého, později miskovitého až kulovitého tvaru (DUNN 1990), nazývaná izolační membrána (IM), případně fagofor. Ta se postupně zvětšuje, až dojde ke spojení jejích konců a vzniku kompletního autofagozómu. Původ membránových komponent pro nově vznikající váček není objasněn (JUHASZ, NEUFELD 2006). Podle jedné z teorií mohou být získávány z části hladkého endoplazmatického retikula. Pro tuto cestu hovoří podobnost membrány autofagozómu a endoplazmatického retikula a pozorování, že některé prvky membránového metabolizmu ER jsou pro autofágii nezbytné (ISHIHARA *et al.* 2001, HAMASAKI *et al.* 2003, 2005). Skutčnost, že i přes intenzivní studium autofágie širokým spektrem elektronově mikroskopických technik nebyla prokázána žádná fyzická souvislost ER s autofagozómy či PAS, nasvědčuje spíše alternativní teorii, předpokládající syntézu IM *de novo*. Podrobněji je rozpracována teorie třetí, která považuje za stavební materiál vezikly, pocházející z mitochondrií (NAIR a KLIONSKY 2005)

Počáteční kroky tvorby autofagozómů vyžadují cyklus proteinů Atg9p a Atg23p. Atg9p je jediný známý transmembránový autofagický protein. V buňkách se vyskytuje v PAS, mitochondriích a vznikajících autofagozómech (REGGIORI *et al.* 2005). Iniciační komplex Atg1p-Atg13p spolu s fosfatidylinositol vazebným proteinem Atg18p a Atg2p zajišťuje jeho kolování mezi těmito třemi strukturami (Obr. 8). Protože se jedná o transmembránový protein, může být transportován pouze v předpokládaných veziklech, které putují od mitochondrií k PAS, začleňují se do vznikající izolační membrány a po uzavření autofagozómu vracejí Atg9p do vnější mitochondriální membrány. Jeho návrat z kompletního autofagozómu může zároveň představovat mechanizmus recyklace Atg8p a Atg5p-Atg12p (viz dále).



Obr. 8 Cyklus Atg9p. (překresleno podle REGGIORI *et al.* 2004)

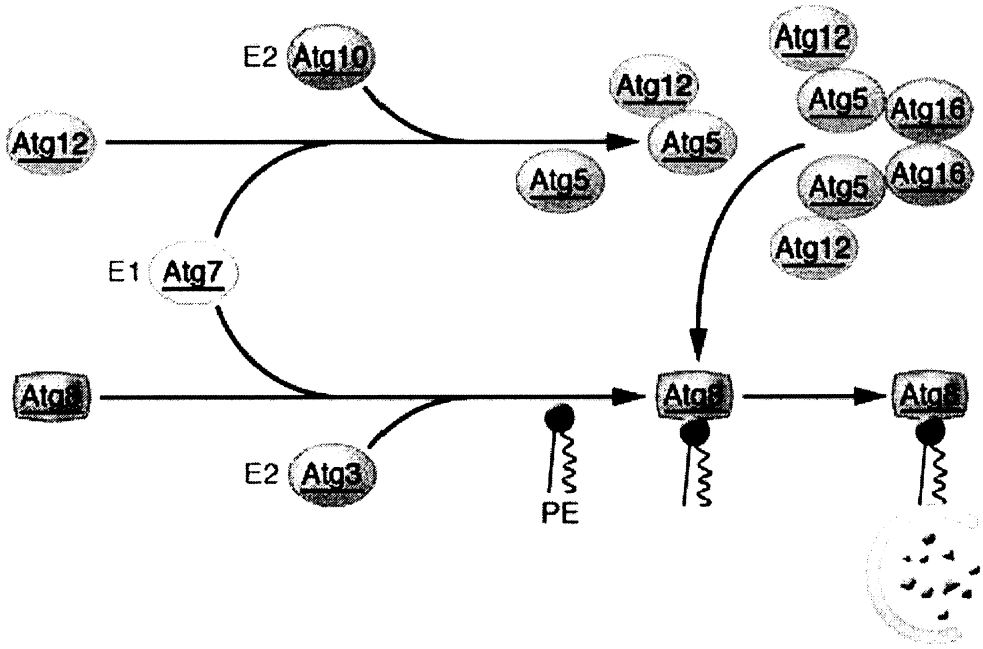
Atg23p je periferální membránový protein, který prochází analogickým koloběhem. Organela, ke které je vázán po dobu své nepřítomnosti v autofagických procesech nebyla identifikována. Jeho funkce je nezbytná především pro Cvt dráhu (FUNAKOSHI *et al.* 1997).

2.2.2.3.1 Pro tvorbu membrány autofagozómu jsou vyžadovány dva konjugační systémy, Atg12p-Atg5p a Atg8p

Tyto systémy jsou analogické ubikvitinační dráze, v jejímž průběhu je ubikvitin připojen na aktivační enzym (E1), převeden na komplex s konjugujícím (E2) enzymem a ligačním enzymem (E3) je navázán na substrát. V Atg12p-Atg5p systému je Atg12p analogem ubikvitinu. ATPázou Atg7p (E1) je aktivován, navázán na enzym Atg10p (E2)

a přímo vázán na substrát Atg5p. Analog E3 enzymu není vyžadován. Komplex Atg12p-Atg5p tvoří v oblasti PAS heteropolymery s proteinem Atg16p. Správný průběh konjugace i tvorba konečného agregátu je nezbytná pro vznik přirozeně velkého a tvarovaného autofagozómu. Není vyloučeno, že právě tyto proteiny způsobují zakřivování rostoucí IM do tvaru výsledného váčku (YORIMITSU a KLIONSKY 2005).

Konjugační Atg12p-Atg5p systém je vyžadován pro správnou funkci proteinu Atg8p (SUZUKI *et al.* 2001). Atg8p je aktivován stejným E1 enzymem (Atg7p), thioesterovou vazbou spojen s E2 enzymem Atg3p a výsledně navázán na substrát fosfatidyletanolamin (PE) a začleněn do izolační membrány (Obr. 9). Po dokončení maturace autofagozómu je z vnější membrány rychle odštěpen peptidázou Atg4p a zůstává navázán pouze na vnitřní membráně autofagozómu a v jeho lumen. Kromě strukturní funkce při tvorbě autofagozómu (ABELIOVICH *et al.* 2000) zřejmě Atg8p brání předčasné fúzi nedokončeného autofagozómu s vakuolou a to díky inhibici SNARE komplexu (LEGESSE-MILLER *et al.* 2000). Mechanizmus rozlišující okamžik uzavření autofagozomální membrány zřejmě pracuje velice přesně, není však prozkoumán. Předpokládá se zapojení iniciačního komplexu Atg1p.



Obr. 9 **Konjugační systémy Atg5p-Atg12p a Atg8p-PE. PE-fosfatidyletanolamin (převzato z LEVINE a YUAN 2005)**

2.2.2.4 Doprava autofagozómu k vakuole a fúze s její membránou.

Specifické autofagické procesy (např. Cvt dráha, pexofágie) vyžadují pro svůj průběh aktinový cytoskelet. Jak se v buňce pohybují vezikly makroautofagické dráhy naproti tomu není známo (REGGIORI *et al.* 2005). Po přiblížení kompletního autofagozómu k vakuole dochází k fúzi jejich membrán za účasti obecného SNARE komplexu, zahrnujícího proteiny Ccz1p, Mon1p, Vam3p, Vti1p, Vam7p a mnoho dalších (WANG *et al.* 2002, WANG a KLIONSKY 2003). Do vakuoly je uvolněn obsah autofagozómu obalený vnitřní autofagozomální membránou, pozorovatelný jako tzv. autofagické tělísko. Účinkem proteáz Prb1p a Pep4p (TAKESHIGE *et al.* 1992) a lipázy Atg15p (TETER *et al.* 2001) je i tento obal odstraněn a obsah autofagozómu je degradován vakuolárními enzymy.

2.2.3 Biologické funkce autofágie

2.2.3.1 V kvasinkách

Velmi nízká úroveň autofágie probíhá v kvasinkách i za optimálních růstových podmínek. Slouží především k odstraňování nepotřebných či poškozených organel a proteinů. Jediným známým specifickým substrátem pro dopravu do vakuoly je zde protein acetaldehyd dehydrogenáza (Ald6p). Životaschopnost kvasinek není v ideálních podmínkách nefunkční autofágií ohrožena (TSUKADA a OHSUMI 1993).

V *S. cerevisiae* je autofágie známa především jako součást stresové odpovědi na hladovění. Nastává za nedostatku zdrojů uhlíku, dusíku i dalších prvků (TAKESHIGE *et al.* 1992, THUMM *et al.* 1994). Její aktivita se zvyšuje po několika hodinách stresu, po delší době (řádově dnech) opět slábne, pravděpodobně aby nedocházelo k nežádoucí degradaci důležitých součástí buňky. Degradace proteinů, sacharidů, lipidů a dalších buněčných komponent poskytuje energii i základní stavební prvky pro katabolické procesy a výrazně prodlužuje dobu přežití buněk za takto nepříznivých podmínek. Zvláště důležitá je autofágie pro udržení vyrovnané hladiny volných aminokyselin (ONODERA a OHSUMI 2005). Tak je umožněno pokračování proteosyntézy a možná dalších vitálních dějů.

Diploidní kvasinky procházejí za stresových podmínek komplexní proměnou vedoucí ke sporulaci. Je-li autofágie inhibována, nejsou schopny tuto diferenciaci podstoupit (ABELIOVICH a KLIONSKY 2001). Další situace, za kterých by kvasinky aktivovaly

makroautofagickou dráhu nebyly dosud popsány. Mnohostranné využití autofágie u mnohobuněčných organizmů však naznačuje, že toto může být jen otázkou zvoleného experimentálního přístupu.

2.2.3.2 V mnohobuněčných organizmech

2.2.3.2.1 Autofágie a přežití buněk

Základní úroveň autofágie v klidovém stavu má podobně jako u kvasinek roli úklidového mechanizmu. Pozornost při jejím výzkumu se v posledních letech zaměřuje zejména na její význam v odstraňování defektních proteinů a proteinových agregátů a na potenciální využití těchto poznatků při léčbě onemocnění jako jsou Alzheimerova a Huntingtonova choroba (ARRASATE *et al.* 2004, KOPITO 2000). Odstraňování poškozených mitochondrií plní kromě ochrany před případnou apoptózou i roli odstraňování ROS („Reactive Oxygen Species").

Rovněž indukce při hladovění je v mnohobuněčných organizmech analogická. Různé buněčné typy jednoho organizmu jsou však na indukující podněty různě citlivé. Například jaterní tkáň je schopna navozením intenzivní autofágie udržovat hladinu glukózy v krvi a zásobovat tak celý organizmus. Naproti tomu v mozkové tkáni se ani za silného hladovění autofágie neobjevuje (MIZUSHIMA *et al.* 2004). Zvláště důležitou roli hraje autofágie v životě savců těsně po porodu. Náhlé přerušení placentální výživy vystavuje novorozená mláďata silnému stresu, který nejsou schopna v případě narušení autofagických procesů překonat (KUMA *et al.* 2004)

Autofágie nachází uplatnění i jako antibakteriální ochrana. V některých případech infekce buňky baktérií nebo pohlcení baktérie makrofágem je patogen rychle a selektivně obalen autofagozómem a dopraven do lyzozómu (KIRKEGAARD *et al.* 2004, GUTIERREZ *et al.* 2004). Pro tento zvláštní případ autofágie byl navržen termín xenofágie.

Zvýšená autofagická aktivita funguje přinejmenším v některých případech jako faktor zmírňující účinky stárnutí. Inaktivace Tor kinázy a některých dalších negativních regulátorů autofágie u háďátka *Caenorhabditis elegans* prodloužila životní cyklus většiny jedinců. Předpokládanými mechanizmy jsou zvýšená ochrana před oxidativním stresem a simulace omezení přísunu živin (VELLAI *et al.* 2003 *in* LEVINE a KLIONSKY 2004).

2.2.3.2.2 Autofágie a buněčná smrt

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je aktivní proces, vedoucí k odstraňování buněk i celých tkání ve fyziologických i patologických situacích. Přítomnost autofagozómů v některých typech umírajících buněk s odlišnou morfologií vedla k předpokladu existence alternativního způsobu programované buněčné smrti, založeného na autofágii. V literatuře je označován jako programovaná buněčná smrt II (Programmed Cell Death II, PCD II) (SCHWEICHEL *et al.* 1973). V buňkách umírajících tímto způsobem není patrná kondenzace chromatinu ani cytoplazmy. Místo toho je buňka naplněna autofagozómy, částečně fúzovanými s lyzozómy. Jádro je zmenšeno, ne však fragmentováno a cytoskelet zůstává až do pozdní fáze zachován. Protože tradiční pojetí chápe autofágii především jako prostředek dlouhodobého přežití, objevují se občas pochybnosti o její úloze v buněčné smrti. Metody sloužící ke studiu této problematiky, především elektronová mikroskopie, neobjasňují kauzalitu pozorovaných dějů: tj. přítomnost autofagozómů v mrtvé buňce nemusí s její smrtí souviset, dokonce může dokladem neúspěšného pokusu o záchranu před apoptózou, například likvidací poškozených mitochondrií. Nicméně YU *et al.* (2004a) ukázali, že autofagická smrt nastává i za umělé inaktivace kaspáz, a že inhibice autofágie za určitých podmínek výrazně zvyšuje podíl přeživších buněk. Po zveřejnění dalších podobných výsledků (YU *et al.* 2004b) je PCD II obecně přijímána jako alternativa k apoptóze.

Faktorem rozhodujícím o změně autofágie ve smrtící mechanizmus může být úroveň exprese genů *ATG5* a *ATG6*. Podněty navozující jejich relativně slabou indukci (například hladovění) ústí v záchrannou formu autofágie, některé cytotoxické látky zvyšují hladinu jejich produktů mnohonásobně více, což končí autofagickou buněčnou smrtí (YU *et al.* 2004a). Byla navržena existence hypotetické signální molekuly odpovídající za vysokou expresi těchto genů (TSUJIMOTO a SHIMIZU 2005).

Otázkou zůstává, jaké výhody má PCD II oproti apoptóze, případně jestli není jen její náhradou v situacích, kdy apoptóza proběhnout nemůže. Zabalení buněčné hmoty do autofagozómů by mohlo usnadnit její utilizaci okolními buňkami, případně ulehčit práci fágovým buňkám imunitního systému.

2.2.3.2.3 Autofágie a vývoj organizmu

Téměř u všech běžných modelových organizmů byly pozorovány vývojové vady u jedinců s poruchou autofágie. Ve složitých proměnách tkání při diferenciaci se uplatní téměř všechny výše popsané role a formy autofágie. Příklady vývojových procesů vyžadujících autofágii shrnuje tabulka 2.

TAB 2

Přítomnost autofágie umožňuje přežití buněk (Mizushima et al. 2005)

Organizmus	**Vývojový proces**
Dictyostelium discoideum	tvorba stélky
Drosophilla melanogaster	zakuklení larvy
Caenorhabditis elegans	larvální vývoj
Mus musculus	časný embryonální vývoj, postnatální přežití

Autofágie jako programovaná buněčná smrt (Levine et Yuan, 2005)

Organizmus	**Vývojový proces**
Drosophilla melanogaster a další druhy hmyzu	metamorfóza
Xenopus laevis	metamorfóza
Gallus gallus	embryonální vývoj
Mus musculus	embryonální vývoj
savci	zmenšení mléčné žlázy po ukončení laktace

2.2.4 Metody detekce autofágie

2.2.4.1 Mikroskopické metody :

2.2.4.1.1 Elektronová mikroskopie

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byla autofágie poprvé pozorována (ASHFORD a PORTER 1962). Dodnes nebyla zavedena spolehlivější metoda detekce autofagozómů. Ve vhodně připraveném preparátu jsou autofagozómy patrné jako dvoumembránové váčky o velikosti 300-900 nm, často obsahující různé cytoplazmatické komponenty. K záměně s jinými membránovými strukturami by mělo docházet jen výjimečně. Problémy mohou nastat u stresovaných a umírajících buněk, kde dochází k bobtnání některých dvoumembránových struktur, jako například endoplazmatického retikula. EM s využitím imunoznačení zvyšuje spolehlivost této metody (KABEYA *et al.* 2000), ve spojení s kryofixací teoreticky umožňuje i kvantifikaci objemu autofagozómů. Nevýhodou EM zůstává časová náročnost přípravy preparátů a nezbytnost zvládnutí technik přesahujících běžnou laboratorní praxi.

2.2.4.1.2 Barvení monodansylkadaverinem (BIEDERBICK et al. 1995)

Jedná se o nenáročný protokol fluorescenčního barvení. Další studie bohužel ukázaly, že citlivost ani specifita tohoto postupu není upokojivá. Používá se výjimečně, spíše pro orientační účely.

2.2.4.1.3 Sledování proteinu Atg8p

Ze všech identifikovaných autofagických proteinů je Atg8p pro detekci autofágie nejvhodnější, alespoň jeho část totiž kolokalizuje s autofagozómem po celou dobu jeho biogeneze, navíc je při indukci autofágie jeho exprese až osmkrát zvýšena (KIRISAKO *et al.* 1999). Používá se pro fluorescenční mikroskopii ve fúzi s fluorescenčním proteinem nebo pro TEM jakou antigen při imunoznačení. Při pokusech o značení fluorescenční protilátkou neposkytuje dostatečný signál pro detekci ve fluorescenčním mikroskopu. Nadprodukce tohoto proteinu autofágii neovlivňuje (KIM *et al.* 2001,

MIZUSHIMA *et al.* 2004), není tedy problém vnášet jej do buňky na plazmidu, případně jeho další kopie do genomu. Nevýhodou tohoto rozšířeného postupu je, že nelze odlišit vznikající a kompletní autofagozómy od jiných struktur, se kterými může Atg8p kolokalizovat. Samotná intenzita jeho exprese také nemusí korelovat s intenzitou autofágie.

2.2.4.2 Biochemické metody

2.2.4.2.1 Stanovení koncentrace volných aminokyselin pocházejících z radioaktivně značených proteinů (MOTIMORE a POSO 1987)

Autofágie je hlavním mechanizmem degradace proteinů s dlouhým poločasem života. Pokud se omezí inkorporace radioaktivně značených aminokyselin do proteinů s rychlým obratem (krátkodobou inkubací buněk v médiu s neznačenými aminokyselinami), lze považovat množství volných radioaktivních aminokyselin v buněčném lyzátu za měřítko intenzity autofágie. Tady metoda se potýká s vysokou hodnotou pozadí, způsobenou tím, že autofágie je sice hlavním, ale ne jediným mechanizmem degradace značených proteinů. Není běžně využívána.

2.2.4.2.2 Měření aktivity alkalické fosfatázy (Noda et al. 1995)

Alkalická fosfatáza 8 (Pho8p) je v cytosolu syntetizována jako prekurzor, sekrečním systémem dopravena do vakuoly a maturována na aktivní enzym. Je-li gen *PHO8* nahrazen alelou *PHO8Δ60*, kódující fosfatázu zkrácenou o 60 N-koncových aminokyselin, nemůže být tato fosfatáza transportována sekreční drahou a jako neaktivní prekuzor se hromadí v cytoplazmě. Do vakuoly se dostane jedině v autofagozómech. Spektrofotometrické měření fosfatázové aktivity v kmeni *pho8::PHO8Δ60* představuje efektivní přístup, umožňující i kvantifikaci autofagické dopravy.

2.2.4.2.3 Měření maturace aminopeptidázy I (KLIONSKY a OHSUMI 1999)

Maturovanou formu ApeIp lze od prekurzoru (prApeIp) odlišit pomocí SDS-PAGE. Autofágie dopraví do vakuoly za jednotku času výrazně větší množství prApeIp než Cvt dráha, nicméně právě pozadí způsobené konstitutivní Cvt je hlavním problémem této metody. Tato metoda nachází uplatnění jen případech, kdy z nějakého důvodu nelze měřit fosfatázovou aktivitu.

2.3 Peroxizómy v kvasinkách

2.3.1 Úvod

Řada specializovaných enzymů, potřebných například pro oxidaci nefermentovatelných zdrojů uhlíku nebo ochranu před oxidativním stresem, se nachází právě v peroxizómech. Jedná se o indukovatelné organely. V buňkách rostoucích na komplexním glukózovém médiu se nachází málo (obvykle 1-5) drobnějších peroxizómů. Jsou-li takové buňky převedeny do média obsahujícího oleovou kyselinu jako jediný zdroj uhlíku, peroxizómy se rychle zvětší a jejich počet vzroste na 10-20. Po zpětném dodání glukózy do média se jejich počet a rozměry rychle vrátí do původního stavu (GUNKEL *et al.* 1999).

Peroxizómy jsou organely s jednoduchou membránou. Neobsahují žádnou vlastní DNA ani proteosyntetický aparát, všechny jejich proteiny jsou tedy kódovány v jádře a do peroxizómů musí být importovány. S množstvím importovaných proteinů stoupá velikost peroxizómu, což zvyšuje pravděpodobnost jeho rozdělení. Druhou, méně obvyklou cestou vzniku peroxizómu je jeho vznik *de novo*. Nadbytečné nebo poškozené peroxizómy jsou selektivně odstraňovány pexofágií. I když momentální podmínky nevyžadují prakticky žádnou peroxizomální aktivitu, pexofágie vždy v cytoplazmě zanechá jeden nebo více menších peroxizómů pro usnadnění jejich případné budoucí indukce.

Výzkumy peroxizómů jsou prováděny na různých kvasinkových modelech, často se volí druhy obsahující obří peroxizómy jako *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* nebo *Yarrowia lipolytica*. Většina získaných poznatků by měla platit i pro *Saccharomyces cerevisiae*, nicméně zdaleka ne u všech je to experimentálně potvrzeno.

2.3.2 Biogeneze peroxizómů

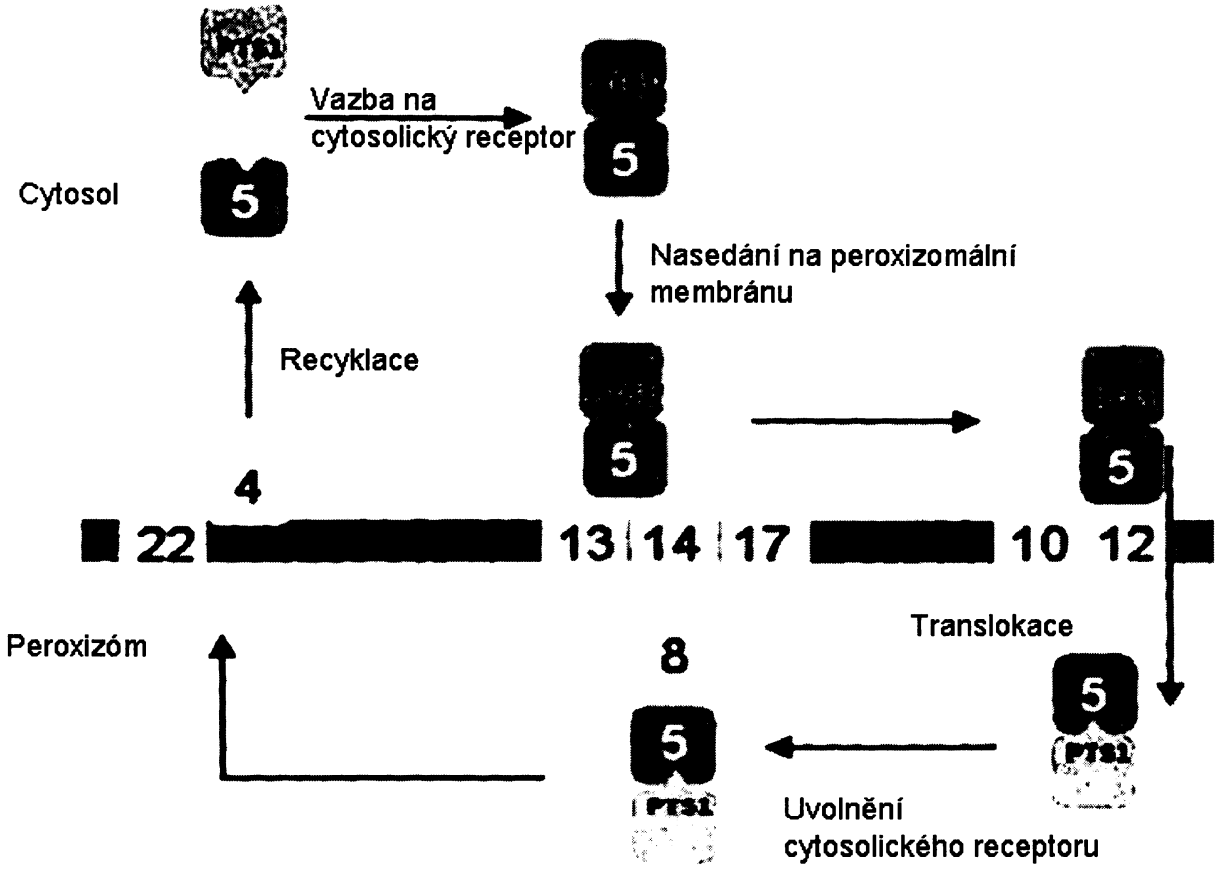
2.3.2.1 Import proteinů do peroxizómů (VEENHUIS *et al.* 2003)

Proteiny určené k transportu do peroxizómů nesou jednu ze signálních sekvencí. Sekvence PTSI (Peroxisomal Targeting Sequence I), je tvořena aminokyselinami -serin-lysin-leucin (-SKL) na COOH konci proteinu. Sekvence PTSII se nachází na NH_3 konci a skládá se z proměnlivého motivu devíti aminokyselin (v jednopísmenném kódu (R/K)-(L/V/I)-X5-(H/Q)-(L/A)). PTSI mezi peroxizomálními proteiny výrazně převládá.

V první fázi transportu je PTSI proteinu rozpoznána cytosolickým peroxinem Pex5p. Spolu s přenášeným proteinem má Pex5p zvýšenou afinitu k cílovému komplexu Pex13p/14p/17p na peroxizomální membráně. Ve spolupráci s peroxiny 10p, 2p a 12p je transportován do peroxizomální matrix. Jediný Pex protein obsažený v lumen peroxizómu, Pex8p, tomuto transpotu napomáhá a/nebo způsobuje oddělení transportovaného proteinu od Pex5p. Ten je následně navrácen do cytoplazmy pomocí proteinů Pex4p a Pex22p (Obr. 10).

U *Saccharomyces cerevisiae* je jediným identifikovaným proteinem nesoucím signální sekvenci typu II 3-ketoacyl koenzym A thioláza. Způsob přepravy tohoto proteinu je pravděpodobně anologický, úlohu cytoplazmatického receptoru zde však plní Pex7p.

Není vyloučeno, že existují ještě další způsoby transportu do peroxizómů, protože Pex8p a některé enzymy se do nich dostávají, aniž by využívaly některou z uvedených drah.



Obr. 10 **Import proteinů s PTSI do peroxizómů (upraveno z VEENHUIS *et al.* 2003)**

2.3.2.2 Dělení peroxizómů

V průběhu "množení" peroxizómů od stávajícího peroxizómu vypučí malý membránový váček, základ nového peroxizómu. Oddělování membrány je řízeno membránovým proteinem Pex11p, roli zde zřejmě hraje i cytoskeletární doprava, je totiž vyžadován homolog dynaminu, Vps1p.

2.3.2.3 Růst peroxizomální membrány

Biogeneze peroxizómů *de novo* i jejich růst po dělení vyžadují cytosolický Pex19p a transmembránové Pex3p a Pex16p. Jejich prostřednictvím je získávána a zabudovávána membrána rostoucí organely. Komplexu těchto proteinů je také připisována zvýšená afinita k inzerci dalších membránových proteinů, kterou se nascentní peroxizómy vyznačují. Za zdroj membrány je považováno endoplazmatické retikulum (LAZAROW 2003, VEENHUIS *et al.* 2003)

2.3.2.4 Degradace peroxizómů

Nadbytečné, nefunkční a poškozené peroxizómy jsou odstraňovány selektivním procesem pexofágie (VEENHUIS *et al.* 1978). Její molekulární podstata není objasněna, většinu proteinů a membránových procesů sdílí s makroautofágií (GUNKEL *et al.* 1999). Analýza mutant naznačuje, že její specifita je narušena delecí genů Atg20p, Atg24p a Atg11p. Předpokládaným povrchovým peroxizomálním signálem pro zabalení do pexofagozómu je Pex14p (BELLU *et al.* 2001).

2.3.3 Peroxizómy a β-oxidace mastných kyselin

2.3.3.1 Klasická dráha β-oxidace

Hlavní a nejlépe prostudovanou metabolickou dráhou v kvasinkových peroxizómech je β-oxidace mastných kyselin. Ta je nezbytná pro utilizaci mastných kyselin jako zdrojů uhlíku a energie. V savčích buňkách se peroxizómy o tuto úlohu dělí s mitochondriemi, v *S. cerevisiae* jsou pro ni jedinou kompetentní organelou.

V krátkosti je mechanizmus β-oxidace následující: mastná kyselina je acyl-koenzym A syntetázou aktivována, tj. její uhlíkový řetězec navázán na molekulu koenzymu A (KoA). Acyl-koenzym A dehydrogenáza jej přidáním dvojné vazby mezi ulíky 2 a 3 přemění na trans-2-enoyl-KoA. Ten slouží jako substrát bifunkčnímu enzymu, který katalyzuje tvorbu 3-ketoacyl-KoA. 3-ketoacyl-KoA thioláza jej nakonec za spotřeby další molekuly KoA rozdělí na acetyl-KoA a acyl-KoA s řetězcem o dva uhlíky kratším. Acetyl-koenzym A vstupuje do dalších reakcí, jako je citrátový cyklus, glyoxylátový cyklus nebo glukoneogeneze.

Tento obecný mechanizmus platí pro β-oxidaci v peroxizómech kvasinek i savců stejně jako pro savčí mitochondrie. Následující část se bude zabývat pouze charakteristickými rysy kvasinkové β-oxidace.

Peroxizomální membrána je nepropustná pro většinu běžných metabolitů, jako jsou NAD^+, NADH, AMP a KoA a mastné kyseliny. Pro tyto všechny a další musí být v peroxizomální membráně kanály, transportéry nebo kyvadlové systémy (VAN ROERMUND *et al.* 1995). Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (nad dvacet uhlíků) jsou aktivovány v cytoplazmě acyl-KoA syntetázami Faa1p a Faa4p. Jako acyl-KoA jsou do peroxizomální matrix transportovány membránovým heterodimerem Pxa1p-Pxa2p.

Středně dlouhé mastné kyseliny se do peroxizómu přemísťují neaktivované. Spekuluje se o peroxinu Pex11p jako transportéru (VAN ROERMUND *et al.* 2000). V matrix je potom aktivuje syntetáza Faa2p. Protože proces acyl-KoA ligace závisí na hydrolýze ATP, vyžaduje funkce Faa2p stálou regeneraci peroxizomálního ATP. Tu zajišťuje membránový antiporter Ant1p, vyměňující cytosolický ATP za ADP/AMP. Tento protein je zároveň zodpovědný za vysoké pH, které se v peroxizómech udržuje při β-oxidaci mastných kyselin (VAN ROERMUND *et al.* 2004).

Dehydrogenaci acyl-KoA provádí oxidáza Pox1p. Protože v peroxizómech není systém oxidativní fosforylace, jsou elektrony odňaté acyl-KoA převedy přímo na molekulu kyslíku za vzniku H_2O_2. Na rozdíl od savčí acyl-KoA oxidázy, jejíž afinita k substrátu s počtem uhlíků menším než 8 rychle klesá, je Pox1p schopna zpracovat i acyl-KoA s krátkým řetězcem. V kvasinkových peroxizómech tak může dojít ke kompletní degradaci acyl-KoA, zatímco ve vyšších organizmech bývá oktanoyl-KoA přepravován do mitochondrií ke konečné oxidaci. Pox1p je u kvasinek jediným acyl-KoA oxidázovým enzymem a reaguje pouze s acylovými zbytky s přímým řetězcem. Případná enzymatická výbava pro oxidaci mastných kyselin s větveným řetězcem nebyla u kvasinek dosud popsána.

Bifunkční enzym Mfe2p nese na COOH konci hydratázovou doménu, katalyzující přeměnu enoyl-KoA na 3-hydroxyacyl-KoA a na NH_3 konci dvě dehydrogenázové domény pro následný vznik 3-ketoacyl-KoA. Duplicita těchto domén je zřejmě důležitá pro rozeznání krátkých i dlouhých uhlíkových řetězců (QUINN *et al.* 1999).

Protein Pot1p zkrátí 3-ketoacyl-KoA o dva uhlíkové zbytky za vzniku acetyl-KoA (Obr. 11). Thioláza Pot1p je jediným známým kvasinkovým proteinem nesoucím signální sekvenci typu 2.

2.3.3.2 Pomocné enzymy β-oxidace

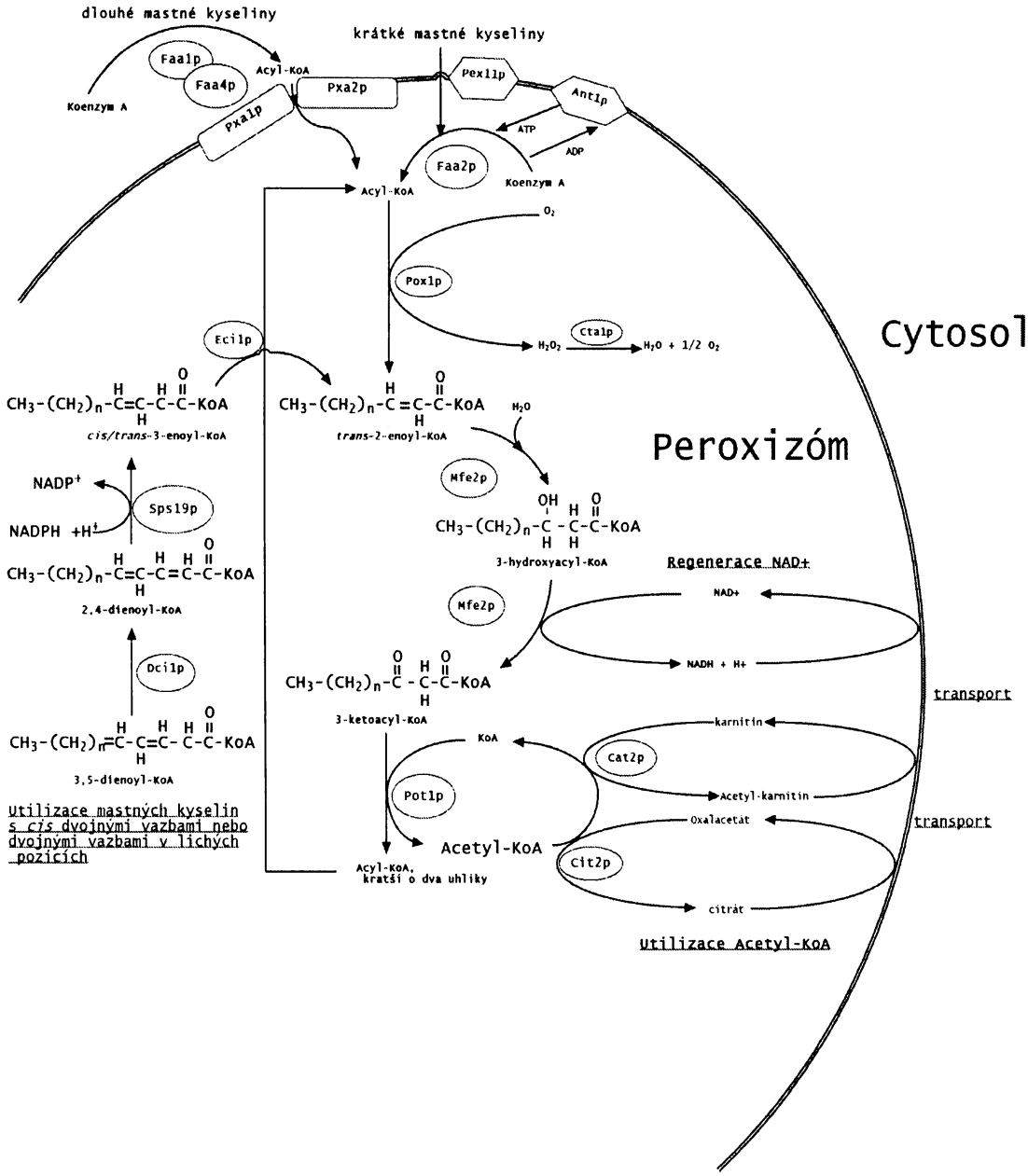
Tato základní enzymatická výbava poslouží k degradaci nasycených mastných kyselin nebo nenasycených, které obsahují trans dvojné vazby v sudých pozicích. Při postupném zkracování ostatních nenasycených mastných kyselin dojde ke vzniku produktů, které nemohou sloužit jako substrát pro enzym Mfe2p. Na dále oxidovatelné kyseliny je přeměňují tzv. pomocné enzymy β-oxidace Například pro kompletní degradaci kyseliny oleové je nezbytná izomeráza Eci1p, pro degradaci kyseliny petroselinové Eci1p a reduktáza Sps19p. Jiné produkty pomáhá zpracovat bifunkční hydratáza/izomeráza Dci1p (Obr. 11).

KNIHOVNA rostlin - mikrobiologie PRAHA 2 Vinicna 5

2.3.3.3 Export peroxizomálního acetyl-KoA

V peroxizómech je přítomna karnitin acetyl transferáza Cat2p. Acetylová skupina přenesená tímto enzymem na karnitin by mohla být exportována z peroxizómů podobným způsobem, jaký byl popsán při transportu acetyl-karnitinu přes vnitřní mitochondriální membránu (PALMIERI *et al.* 1999). Nezbytný membránový přenašeč však dosud v peroxizómech objeven nebyl.

Alternativní cestu umožňuje peroxizomální citrát syntáza Cit2p. Katalyzuje přeměnu oxalacetátu a acetyl-KoA, který potenciálně může pomocí vhodného přenašeče opustit peroxizóm.



Obr. 11 **Schéma peroxizomální β-oxidace**

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 *Použité mikroorganizmy*

Escherichia coli DH5α:

F$^-$, recA1, endA1, gyrA96, thi$^-$, supE44, relA1, hsdR17(r_k^-, m_k), λ^-, Δ(argF-laczya), U169, Φ80 lac ZM15

Saccharomyces cerevisiae BY4742

MATα, his3, ura3, leu2, lys2

Saccharomyces cerevisiae BY4742, *atg1*

MATα, his3, ura3, leu2, lys2, *ATG1::KanMX*

Saccharomyces cerevisiae BY4742, *atg8*

MATα, his3, ura3, leu2, lys2, *ATG8::KanMX*

Saccharomyces cerevisiae BY4742, *atg12*

MATα, his3, ura3, leu2, lys2, *ATG12::KanMX*

Saccharomyces cerevisiae BY4742, *prb1*

MATα, his3, ura3, leu2, lys2, *PRB1::KanMX*

Všechny kmeny *S. cerevisiae* pocházejí ze sbírky EUROSCARF

3.1.2 Materiál pro práci s DNA

Ribonukleáza A (Sigma)

ssDNA – Salmon sperm (New England BioLabs)

PCR: PPP Master Mix (TopBio)

Primery (Invitrogen)

3.1.3 Přístroje

Centrifugy: Centrifuga Boeco

Mikrocentrifuga Hettich

Fluorescenční mikroskop Leica DMR

Kamera Hitachi HV-C20

Elektroforéza – zdroj (E-C Apparatus)

PCR MiniCycler (MJ Research)

PCR Gradient Cycler (Bioer)

UV transluminátor (Ultra Lum)

Elektroporátor (BioRad)

Spektrofotometr (Beckman)

Vodní lázeň (Grant Instruments)

Vortex (Scientific Industries)

Třepačky, termostaty

3.1.4 Internetové databáze a počítačové programy použité pro práci s DNA sekvencemi

Saccharomyces Genome Database (SGD)

http://genome-www.Stanford.edu/Saccharomyces

Biobase Yeast Protein Database

https://www.proteome.com/control/tools/proteome

Nebcutter 2

http://tools.neb.com/NEBcutter2

Oligo Calculator

http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html

NCBI Blast

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

AnnHyb 4.9

http://annhyb.free.fr/

3.1.5 Kultivační média

Všechny roztoky a média byly připravovány z destilované vody upravené na přístroji Ultrapur (Vartex). Na přístroji stejného výrobce byla upravena i demineralizovaná voda (ddH_2O),. Chemikálie jsou od firmy Lachema Brno, není-li v závorce uveden název jiného výrobce. Glukózu jsem vždy sterilizoval zvlášť.

Tekutá média

SOC médium: 2 % baktopepton (Imuna)
0,5 % kvasničný autolyzát (Imuna)
20mM glukóza
10mM NaCl
2,5mM KCl
10mM $MgCl_2$
10mM $MgSO_4$
$MgCl_2$ a $MgSO_4$ se sterilizují zvlášť

ŽB médium s ampicilinem: 2,5 % živný bujón č.2 (Imuna)
Ampicilin (Krka Novo Město) přidán po sterilizaci,
koncentrace 100μg/ml

TPN médium: 2 % baktopepton (Imuna)
0,5 % kvasničný autolyzát (Imuna)
0,5 % NaCl

Skladovací médium pro bakterie:
2,5 % živný bujón č.2 (Imuna)
15 % glycerol

YEPG médium: 1 % baktopepton (Imuna)
1 % kvasničný autolyzát (Imuna)
2 % glukóza

Skladovací médium pro kvasinky:

60 % glycerol
10 % glukóza
2 % baktopepton (Imuna)

Minimální médium (MM) tekuté: stejné jako MA, jen bez agaru

Pevná média

ŽA s ampicilinem: 4 % živný agar č.2 (Imuna)
ampicilin přidán po sterilizaci, koncentrace 70-100 μg/ml

YEPG médium: 2 % agar (Kulich HK)
1 % baktopepton (Imuna)
1 % kvasničný autolyzát (Imuna)
2 % glukóza

GM médium s $CaCl_2$: 2 % agar (Kulich HK)
1 % kvasničný autolyzát (Imuna)
3 % glycerol
30mM $CaCl_2$ (Sigma)
kvasničný autolyzát byl sterilizován zvlášť, před sterilizací upraveno na pH 5,0

GM médium s $CaCl_2$ a s BKP:

GM médium s $CaCl_2$ + 0,01 % BKP (Sigma)

BKP byl rozpuštěn v 1/100 celkového objemu etanolu a do média přidán až po sterilizaci

Minimální médium (MA): 2 % agar (Kulich HK)
2 % glukóza

0,1 % KH_2PO_4

0,5 % $(NH_4)_2SO_4$

0,05 % $MgSO_4$

0,1 % Wickerhamův roztok

0,005 % aminokyseliny (histidin, lysin, leucin) v MA s Trp přidán 0,005 % Trp, v MA s Met 0,005 % Met

0,002 % uracil

všechny soli, aminokyseliny a uracil byly sterilizovány zvlášť, Wickerhamův roztok přidán až po sterilizaci

3.1.6 Roztoky

Jednoduché roztoky

1 M LiAc: 10,2 g CH_3COOLi (Serva)/100 ml H_2O

3 M NaAc: 24,6 g CH_3COONa/100 ml H_2O

0,8 % agarózový gel:

160 mg agarózy rozvařeno v mikrovlnné troubě v 20 ml 0,5x TBE pufru

1000x EtBr: 10 mg ethidium bromidu/1 ml H_2O

0,5 M EDTA-NaOH: 18,6 g Na_3EDTA (Serva)/100 ml H_2O
pH upravit 1M NaOH na 8,0

1 M Tris-HCl: 12,1 g Tris báze (Serva)/100 ml H_2O
pH upravit konc. HCl na 7,5

10 % SDS:	10 g SDS (Serva) /100 ml H_2O
100 mM MES:	1,92 g MES (Serva)/100 ml H_2O upravit pH na 6,0

Složené roztoky

0,5x TBE:	5,4 g Tris-báze 2 ml 0,5 mM EDTA-NaOH 2,75 g kys. borité doplnit H_2O na 1000 ml
TE:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA-NaOH
TE/LiAc:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA-NaOH 100 mM LiAc
PEG/TE/LiAc:	40 % polyethylen glykol (PEG) 3350 (Sigma) 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA-NaOH 100 mM LiAc
Roztok I:	1 % glukóza 25 mM Tris-HCl 10 mM EDTA-NaOH
Roztok II:	0,2 M NaOH 1 % SDS (Serva)
Roztok III:	29,5 g CH_3COOK 11,5 ml ledové CH_3COOH doplnit H_2O do objemu 100 ml

Roztok RNázy: 10 mg RNáza A (Sigma)
10 µl 1 M Tris-HCl
3 µl 5 M NaCl
doplnit H_2O do 1 ml
15 min povařit a skladovat při –20°C

BFM: 50 % glycerol
0,13 M EDTA-NaOH
0,12 % bromfenolová modř (Sigma)

Wickerhamův roztok: 0,2 mg biotinu
200 mg inositolu
20 mg riboflavinu
40 mg thiaminu-HCl
40 mg pyridoxinu-HCl
20 mg p-aminobenzoové kyseliny
40 mg pantotenátu vápenatého
40 mg kyseliny nikotinové
0,2 mg kyseliny listové
100 ml H_2O

Upravený chloroform: 24 ml chloroformu
1 ml izoamylalkoholu

3.1.7 Materiál pro elektronovou mikroskopii.

Všechny látky jsou od společnosti Sigma-Aldrich, není-li uvedeno jinak

3.1.7.1 Sloučeniny

8% glutaraldehyd $CHO(CH_3)_2CHO$

4% oxid osmičelý OsO_4

Piperazin-1,4-bis(2-ethanosulfonová kyselina) (PIPES) $C_8H_{18}N_2O_6S_2$

Propylenoxid C_3H_6O

Manganistan draselný $KMnO_4$

98 %etanol, etanol Absolut

Síran měďnatý bezvodý (Lachema)

Chlorid hořečnatý (Lachema)

Octan uranylu (UAc) $(CH_3COO)_2UO_2$

Citronan olovnatý $(HCOO)_2Pb$

(dimethylaminomethyl)fenol (DMP-30) (Polysciences)

POLY/BED 812(Polysciences)

Anhydrid kyseliny dodecylsukcinové (DDSA) (Polysciences)

Araldit 502(Polysciences)

3.1.7.2 Roztoky

0,4 M PIPES:	6,04g PIPES do 50ml 0,5M NaOH , pH upravit 1M NaOH na 6,8
1M $CaCl_2$:	14,7g $CaCl_2.2H_2O$ do 100ml ddH_2O
1M $MgCl_2$	20,3g $MgCl_2.6H_2O$ do 100ml ddH_2O

Kontrastovací roztok citronanu olovnatého

0,02g $(HCOO)_2Pb$ rozpustit ve 20ml převařené ddH_2O, přidat

0,2 ml 10M NaOH, míchat do úplného rozpuštění, skladovat ve 4°C v temnu

Kontrastovací roztok octanu uranylu

2,6gUAc rozpustit v 50ml 50 % etanolu, skladovat ve 4°C v temnu

Fixační směs s glutaraldehydem

1 ml 0,4M PIPES, 1ml 8 % glutaraldehyd, 2µl 1M $CaCl_2$, 2µl 1M $MgCl_2$

Fixační směs s osmiem

1ml 4% OsO_4, 1ml 0,4M PIPES

100% etanol

Do 50 ml etanolu Absolut přidat 5g bezvodého síranu měďnatého, protřepat, nechat přes noc sedimentovat

Zalévací pryskyřice POLY/BED812/Araldit502

49,12 g POLY/BED812, 27,94g DDSA, 22,96g Araldit 502, 2,3g DMP-30, dokonale promíchat, skladovat při -20°C. Při rozmrazování zabránit styku pryskyřice s kondenzovanou vodou

3.1.7.3 Přístroje

Hybridizační pec ProBlot (Labnet)

Vakuovaná centrifuga DyNA VAP (Labnet)

Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung)

Lamače nožů Leica

Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace

Média, roztoky, špičky k mikropipetám, párátka a mikrozkumavky jsem sterilizoval v autoklávu 20 min při teplotě 120°C a tlaku 120 kPa. Laboratorní sklo jsem sterilizoval suchým teplem 180°C po dobu 120 min. Umělohmotné centrifugační zkumavky a elektroporační kyvety jsem sterilizoval parami kyseliny peroctové 24 hodin uzavřené v igelitovém obalu, respektive krabičce. Mikrobiologickou kličku a další drobné předměty jsem sterilizoval žíháním nad kahanem, případně namočením v etanolu a zapálením.

3.2.2 Kultivace

Tekuté kultury jsem kultivoval v Erlenmayerových baňkách na reciproké třepačce, kultury na pevných médiích v Petriho miskách jsem kultivoval v termostatu. Teplota pro kultivaci bakterií byla 37°C a pro kvasinkové kultury 28°C.

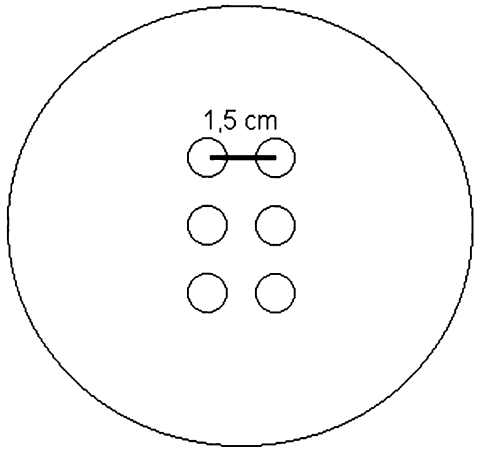
3.2.3 Uchování zásobních kultur

Kvasinkové kultury jsem krátkodobě uchovával na Petriho miskách v lednici, pro dlouhodobé skladování jsem narostlou biomasu kvasinek resuspendoval v mikrozkumavce ve skladovacím médiu pro kvasinky a uchovával v hlubokomrazícím boxu při –80°C.

Bakteriální kultury jsem krátkodobě uchovával na Petriho miskách v lednici, pro dlouhodobé skladování jsem narostlou biomasu bakterií resuspendoval v mikrozkumavce ve skladovacím médiu pro bakterie a uchovával v hlubokomrazícím boxu při –80°C.

3.2.4 Nanášení obřích kolonií

Obří kolonie vznikají z kapky buněčné suspenze nanesené na agar. Sebral jsem párátkem malé množství biomasy (o přibližné velikosti špendlíkové hlavičky) z pevného YEPG média a resuspendoval v mikrozkumavce v 1 ml vody, až se vytvořila zakalená suspenze. 10µl této suspenze jsem kapal na Petriho misku s pevným médiem ve dvou řadách po třech kapkách (obr. 12), pro účely měření amoniaku jsem kapal jen dvě kapky vedle sebe. Vzdálenost vedlejších kapek od sebe je 1,5 cm.



Obr. 12 Nanášení obřích kolonií

3.2.4.1 Měření produkce amoniaku

Na víčko Petriho misky se dvěma makrokoloniemi jsem připevnil dvě mělké nádobky. Do každé jsem odměřil 500µl 10 % kyseliny citrónové, misku umístil tak, aby kolonie byly přesně nad nádobkami a 2-3 dny kultivoval v termostatu. Poté jsem kyselinu citrónovou se zachyceným amoniakem odebral a koncentraci amoniaku stanovil spektrofotometricky reakcí s Nesslerovým činidlem. Získanou hodnotu absorbance jsem přepočítal na kolonii a jednotku času.

3.2.4.2 Stanovení koncentrace amoniaku

Ke 100 µl vzorku jsem přidal 900µl vody a 1000µl Nesslerova činidla. Po 24 minutách jsem stanovil absorbanci roztoku při 430nm.

3.2.5 Stanovení počtu buněk

Počet buněk v kultuře jsem stanovoval počítáním v Thomově počítací komůrce pod mikroskopem při zvětšení 10x15.

3.2.6 Elektroforéza v agarózovém gelu

Odvážené množství agarózy jsem rozvařil v 0,5x TBE pufru, nechal chvíli zchladnout a pak přidal 20µl 1000x EtBr. Protože jsem pracoval s DNA o velikosti několika tisíc bází, volil jsem koncentraci agarózy v gelu 0,8 %. Gel jsem pak nalil do předem připraveného bločku s vhodným hřebenem umístěným asi 1 cm od kraje. Po ztuhnutí gelu (asi 20 min) jsem bloček umístil do elektroforetické vaničky a zalil 0,5x TBE pufrem. Poté jsem opatrně vyjmul z gelu hřeben a nanášel vzorky DNA smíchané s asi 1/10

objemu bromfenolové modři (BFM). Elektrody ve vaničce jsem napojil na zdroj stejnosměrného napětí a napětí nastavil na 5 V/cm vzdálenosti elektrod. Zdroj jsem odpojil po doputování modrého čela (BFM) asi 2 cm od konce gelu (asi 40-60 min). Gel jsem pak prohlédl pod UV světlem na UV transiluminátoru a vyfotografoval.

3.2.7 Srážení DNA etanolem

K roztoku DNA jsem přidal 2,5-3 objemy ledového 96 % etanolu a 1/10 objemu 3M NaAc, promíchal a přes noc nechal srážet při teplotě –20°C. Ráno jsem sraženinu centrifugoval na chlazené centrifuze 30-45 min při 0°C. Slil jsem supernatant, opláchl pelet ledovým 80 % etanolem, supernatant pečlivě odebral, krátce nechal pelet osušit a pak jsem ho resuspendoval buď v demi H_2O nebo v TE pufru.

3.2.8 Transformace *E.coli* elektroporací

3.2.8.1 Příprava kompetentních buněk

Inokulum kultury *E. coli* jsem kultivoval přes noc v třepačce při teplotě 37°C. Tímto inokulem jsem ráno zaočkoval 500 ml TPN média na OD_{560} 0,1-0,2 a nechal aerobně kultivovat 2-3 generační doby do dosažení OD_{560} 0,6-0,8. Poté jsem médium rozdělil do osmi centrifugačních zkumavek po 50 ml a centrifugoval (10 min, 4000 otáček/min, 4°C), resuspendoval pelet v 8x50 ml předchlazené sterilní demi vodě a opět centrifugoval (10 min, 4000 otáček/min, 4°C), pelet opět resuspendoval v 8x20 ml demi vody a centrifugoval (10 min, 4000 otáček/min, 4°C). Buňky jsem potom resuspendoval v 10 ml ledového 10 % glycerolu a centrifugoval (10 min, 4000 otáček/min, 4°C). nakonec jsem pelet resuspendoval v 1 ml 10 % glycerolu a rozpipetoval po 50 µl do mikrozkumavek a uskladnil při –80°C. Po celou dobu přípravy a při všech mezikrocích jsem držel buňky na ledu.

3.2.8.2 Elektroporace

K 50 µl suspenze kompetentních buněk jsem přidal 1µl plazmidové DNA. Buňky s DNA jsem promíchal a nechal asi 1 min inkubovat na ledu. Směs jsem poté přemístil do vychlazené elektroporační kyvety a vložil do elektroporačního přístroje. Spustil jsem pulz stejnosměrného napětí (25 µF, 2,5 kV, 200 Ω) a po projití pulzu jsem rychle do kyvety přidal 1 ml SOC média, přenesl vše do Erlenmeyerovy baňky a nechal 1 hod kultivovat v třepačce při 37°C. Poté jsem bakterie vysel na Petriho mìsky s ŽA s ampicilinem.

3.2.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Kulturu *E. coli* jsem zaočkoval do 50 ml ŽB s ampicilinem a nechal aerobně kultivovat přes noc. Druhý den jsem kulturu přelil do centrifugační zkumavky, centrifugoval (10 min, 5000 ot/min, 4°C), resuspendoval v 2 ml roztoku I a pak přidal 4 ml čerstvě připraveného roztoku II. Směs jsem za občasného opatrného promíchání inkuboval 5 min při laboratorní teplotě a pak přidal 3 ml roztoku III a opět promíchal. Směs jsem umístil na led, 30 min inkuboval a centrifugoval (5000 ot/min, 4°C). Supernatant jsem přefiltroval přes 4-5x přeloženou gázu, přidal 0,8 objemu izopropanolu, zvortexoval a centrifugoval (30 min, 5000 ot/min, 4°C). Pelet jsem propláchl 2 ml 80 % etanolu, centrifugoval (10 min, 5000 ot/min, 4°C) a nechal vysušit při laboratorní teplotě (5-10 min).

Osušený sediment jsem resuspendoval v 300 μl TE, přidal 1/100 objemu RNázy A a inkuboval asi 1 hod v 37°C. Poté jsem roztok převedl do mikrozkumavky, přidal stejný objem upraveného fenolu a centrifugoval (8 min, 13 000 ot/min). Supernatant (vodnou fázi) jsem přemístil do čisté mikrozkumavky a přidal 0,5 objemu fenolu a 0,5 objemu chloroformu, promíchal a centrifugoval (8 min, 13 000 ot/min). Tento krok jsem znovu zopakoval a na závěr jsem vodnou fázi protřepal se stejným objemem chloroformu a centrifugoval (10 min, 13 000 ot/min). Vodnou fázi jsem pak oddělil od chloroformu a přesrážel ji etanolem.

3.2.10 Transformace kvasinek LiAc/ssDNA/PEG metodou

3.2.10.1 Příprava buněk

Inokulum narostlé přes noc jsem zaočkoval do 50 ml YEPG média, aby výsledná hustota byla 2-5x10^6 buněk/ml média. Pak jsem nechal zaočkované médium inkubovat na třepačce při 28°C po dobu dvou generačních dob (2-4 hod) na konečnou koncentraci 1-2x10^7 buněk/ml.

Buňky jsem pak dvakrát promyl 10 ml sterilní destilovanou vodou a centrifugoval (8 min, 3500 ot/min), po druhém promytí jsem pelet resuspendoval v 10 ml TE/LiAc a opět centrifugoval (5 min, 3500 ot/min). Usazené buňky jsem resuspendoval v takovém množství TE/LiAc, aby výsledná koncentrace byla 2x10^9 buněk/ml. Suspenzi buněk jsem nechal inkubovat při 28°C 15 min.

3.2.10.2 Transformace buněk

Do mikrozkumavky jsem namíchal transformační směs (v tomto pořadí):

50 µl buněčné suspenze

5 µl ssDNA (nutno předem 5 min povařit a zchladit na ledu)

1-3 µl plazmidové DNA nebo 30-50 µl přečištěné PCR směsi

300 µl PEG/TE/LiAc

Směs jsem opatrně promíchal. Poté jsem směs inkuboval 30 min ve 28°C a následně 20 min ve 42°C. Poté jsem buňky centrifugoval (asi 15 sekund), resuspendoval ve vodě a vysel na selekční médium.

3.2.11 PCR

Používal jsem PPP Master Mix, který obsahuje namíchaný pufr, polymerázu a další složky nezbytné pro průběh PCR, přidá se pouze templátová DNA a primery. Směs na PCR za použití PPP Master Mixu jsem pro optimalizační reakce míchal takto:

5 µl PPP Master Mixu

1-4 µl templátové DNA

0,5-1 µl 100 pM/µl primeru 1

0,5-1 µl 100 pM/µl primeru 2

0-3 µl sterilní demi H_2O

celkový objem vždy 10µl

Pro preparativní účely jsem připravoval reakci do 100 µl při zachovaném optimalizovaném poměru složek.

Mikrozkumavky s PCR směsí jsem vortexoval, krátce centrifugoval a vložil do PCR cycleru a zvolil jsem program. Základní program pro PCR byl

1. 94°C	5 min	
2. 94°C	1 min	
3. 50-62°C	45 s	35x
4. 72°C	3 min	
5. 72°C	12 min	
6. 4°C		

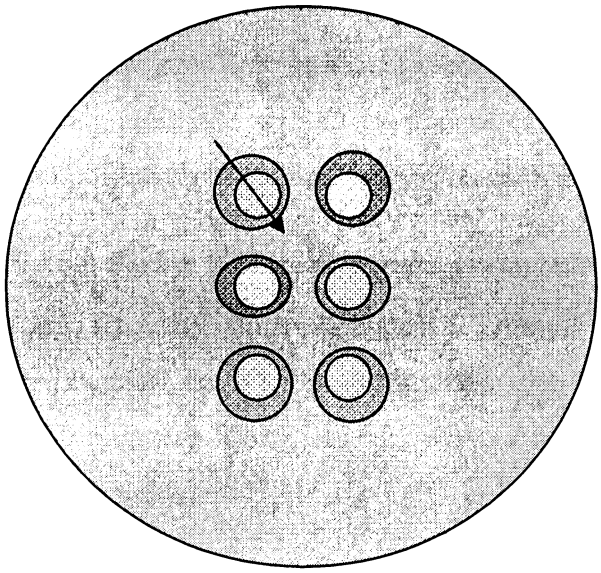
3.2.12 Izolace DNA z gelu

K izolaci DNA z gelu jsem užíval komerční sadu „InViSorb DNA Extraction Kit" (InViTek). Z gelu jsem pod UV transiluminátorem skalpelem přesně vyřízl požadovaný proužek a dále jsem postupoval jsem podle manuálu dodávaného výrobcem. Proužek gelu jsem přemístil do mikrozkumavky a dal na 5 min do vodní lázně vytemperované na 60°C, přidal jsem 7 μl „Carrier suspension" a vortexoval. Poté jsem mikrozkumavky 1 s centrifugoval a pelet 3x promyl 1 ml ledového „Wash buffer". Pelet jsem vysušil ve vodní lázni asi po 2-3 min. K vysušenému peletu jsem přidal 30-50 μl „Elution buffer" vytemperovaného na 60°C a nechal inkubovat 3 min při 60°C. Vzorky jsem pak centrifugoval (3 min, 10 000 ot./min) a supernatant jsem opatrně odebral, aby nedošlo k nabrání části „Carrier suspension" z peletu. DNA v tomto roztoku je použitelná pro transformaci kvasinek.

3.2.13 Zalévání makrokolonií pro přípravu řezů

Jednu ze čtyřech rohových makrokolonií jsem vyřízl i s podkladovým agarem, přemístil do polystyrenové nádobky a zalil asi 5 ml rozehřáté agarózy tak, aby byla kolonie i s agarem zcela převrstvena. Nejvhodnější mechanické vlastnosti měla po ztuhnutí 2% agaróza rozpuštěná v destilované vodě. Její roztok jsem rozvařil v mikrovlnné troubě a před zalitím kolonie nechal vychladnout asi na 50°C. Po ztuhnutí jsem vzniklým bločkem vedl řez v ose souměrnosti kolonie (Obr. 13). Řeznou plochu jsem buď pozoroval stereomikroskopem, nebo dále zpracovával pro přípravu mikroskopického preparátu.

Mikroskopické podložní sklíčko jsem namočil do rozehřáté 3% agarózy a položil na něj řeznou plochou bloček. Po ztuhnutí agarózy jsem jej oddělil od podložního skla a z řezné plochy sloupl vrstvu 3% agarózy obsahující tenkou vrstvu buněk z řezu kolonií. Takto připravený preparát jsem pozoroval mikroskopem.



Obr. 13 Šipka označuje rovinu vedení řezu kolonií. Vždy jsem takto analyzoval jednu ze čtyř rohových kolonií

3.2.14 Práce s fluorescenčním mikroskopem

Pro pozorování preparátů značených fluorescenčními barvami jsem používal fluorescenční mikroskop Leica DMR s filtry na fluorescenci A (excitace UV/emise modrá), N2.1 (zelená/červená), GFP (modrá/zelená). Fotografie jsem snímal integrační monochromatickou kamerou Cohu a obraz zpracovával s pomocí softwaru Lucia 4.52.

Všechny snímky z **fluorescenčního stereomikroskopu** byly pořízeny pod filtrem GFP2 s excitací/emisí modrá/zelená.

3.2.15 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii

Ze středu kolonie zalité v agaróze jsem vyřezával bločky o rozměrech asi 1x1x3 mm, fixoval je, odvodňoval etanolovou řadou a zaléval do pryskyřice

3.2.15.1 Fixace manganistanem draselným

Vzorky jsem inkuboval 20 minut při pokojové teplotě v 1,5% - 5% roztoku $KMnO_4$.

3.2.15.2 Fixace glutaraldehydem

Vzorek jsem přes noc inkuboval v glutaraldehydovém fixačním roztoku při 4°C, ráno 5x 5 minut promýval ddH_2O (v případě postfixace manganistanem draselným) nebo fixačním pufrem a pokračoval dalším fixačním krokem.

3.2.15.3 Fixace glutaraldehydem a manganistanem draselným

Vzorek fixovaný glutaraldehydem a promytý ddH_2O jsem přelil roztokem $KMnO_4$ v koncentraci 2% až 4%. Po 30 minutách jsem roztok $KMnO_4$ vyměnil za čerstvý, po dalších 30 minutách fixace jsem promyl 4x-5x (dokud nebyla patrná žádná růžová barva) a pokračoval dehydratací.

3.2.15.4 Fixace glutaraldehydem a oxidem osmičelým

Vzorek fixovaný glutaraldehydem a promytý pufrem jsem 40 minut inkuboval v roztoku zymolyázy, promyl fixačním pufrem a hodinu inkuboval při pokojové teplotě v osmiovém fixačním roztoku. Poté jsem jej 4x promyl ddH_2O a dehydratoval.

3.2.15.5 Postfixace octanem uranylu

Vzorek předfixovaný některým z předchozích postupů a promytý ddH_2O jsem hodinu fixoval roztokem octanu uranylu. Následně jsem jej 3x promyl ddH_2O a dehydratoval.

3.2.15.6 Dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou

Koncentrace etanolu byly 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 98% a 100%. V každé jsem vzorek ponechal 5 minut, 98% etanol jsem použil dvakrát, 100% čtyřikrát.

3.2.15.7 Prosycování pryskyřicí POLY/BED812

Odvodněný vzorek ve 100% etanolu jsem 2x promyl 100% propylenoxidem, minimálně 1 hodinu prosycoval směsí propylenoxid:POLY/BED812 v poměru 2:1, další hodinu ve směsi 1:1 a minimálně 2 hodiny ve směsi 1:2. Vzorek jsem poté 3x omyl 100% pryskyřicí a nejméně 24 hodin prosycoval 100% prykyřicí při pokojové teplotě. Pro dokonalé prosycení pryskyřicí a odstranění stop propylenoxidu jsem vzorek převedený do čerstvé pryskyřice na 5 hodin umístil do vakuované centrifugy při teplotě 40°C a tlaku $\leq$1 mBar a 1800 otáčkách za minutu. Takto prosycený vzorek jsem upravil do vhodné polohy v jamce zalévací destičky, zalil čerstvou pryskyřicí a nejméně 48 hodin nechal polymerovat při 65°C.

3.2.15.8 Příprava skleněných nožů

Skleněné nože pro předkrajování bločku jsem připravoval na lamači Leica metodou rychlého lámání. Nože pro ultratenké krájení jsem připravoval metodou rovnovážného pomalého lámání na upraveném lamači Leica

3.2.15.9 Příprava ultratenkých řezů

Bloček se vzorkem jsem krájel skleněným nožem na tloušťku 50-70 nm. Řezy, které se ve stereomikroskopu mikrotomu jevily jako kvalitní, jsem nabíral na měděné síťky a nechal 2 hodiny nebo přes noc přisychat.

3.2.15.10 Kontrastování octanem uranylu

Na dno Petriho misky jsem položil kousek parafilmu a na něj nanesl větší kapku (0,5-1 cm v průměru) kontrastovacího roztoku uranylacetátu. Na její hladinu jsem pokládal síťky (stranou s řezy dolů) K okraji misky jsem umístil dva kousky buničité vaty namočené do 96% etanolu, uzavřel jsem misku víčkem a přikryl větší neprůsvitnou miskou. Po 30 minutách jsem síťky intenzivně propláchl ve třech lázních 30% etanolu a nechal 5 minut vyschnout

3.2.15.11 Kontrastování citronanem olovnatým

K okraji Petriho misky s parafilmem jsem nasypal několik peciček hydroxidu sodného a navlhčil asi 2 ml vody. Na parafilm jsem nanesl 20µl kapky roztoku citronanu olovnatého. Na hladinu každé z nich jsem položil jednu síťku, přiklopil misku víčkem a nechal 20 minut kontrastovat. Každou síťku jsem poté intenzivně propláchl ve třech lázních čerstvě převařené ddH_2O.

3.2.15.12 Práce s elektronovým mikroskopem

Kontrastované preparáty jsem prohlížel pod urychlovacím napětím 60-80 kV, snímky jsem pořizoval CCD kamerou ovládanou systémem AnalySIS.

3.2.16 Přístroje

Hybridizační pec ProBlot (Labnet)

Vakuovaná centrifuga DyNA VAP (Labnet)

Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung)

Knifemakery Leica

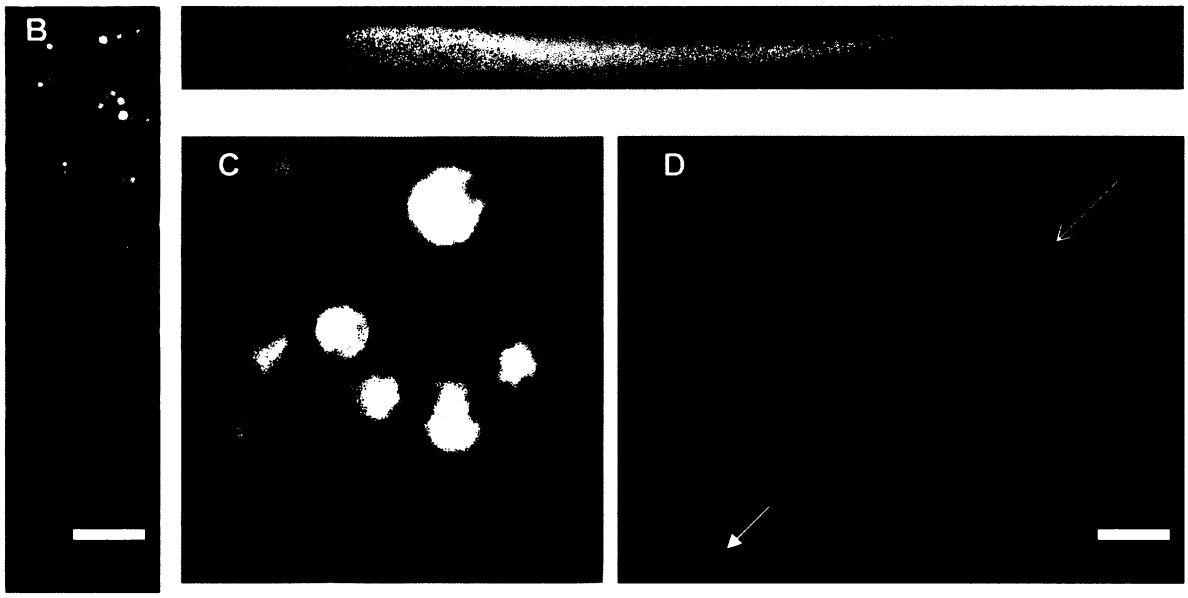
Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011

4 Výsledky a diskuze

4.1 Zavedení metod pro analýzu struktury kolonie pomocí světelného fluorescenčního mikroskopu a stereomikroskopu

Při běžné analýze buněk v kolonii světelným nebo fluorescenčním mikroskopem se ze zvolené části kolonie odebere (zpravidla párátkem) přiměřená část biomasy, resuspenduje se ve vodě nebo pufru a pozoruje pod mikroskopem. Vhodně připravený preparát pak umožňuje vyhodnocení velkého počtu buněk a maximálního využití rozlišovací schopnosti mikroskopu. Informace o rozmístění různých typů buněk v kolonii jsou však pouze orientační, zpravidla se omezují na zjištění rozdílů mezi středem a vnějším okrajem kolonie. Detekce přítomnosti případných různých horizontálních vrstev buněk je prakticky nemožná. Pomocí různých mikromanipulačních technik lze získat o něco přesnější informace o lokalizaci různých buněk v rámci celé kolonie, ale tento přístup je velmi pracný a nemusí být dostatečně přesný. Pro analýzu kolonie jsem se proto pokusil zavést a využít novou metodiku zalévání kolonií do agarózy, tak jak je uvedeno v kapitole 3.2.13. Zalitím do agarózy dojde k dostatečnému zpevnění celé kolonie. Ta pak může být krájena s menším rizikem deformace tvaru kolonie nebo přemístění buněk a pozorována stereomikroskopem. Kolonie zalité do agarózy nicméně nejsou vhodné pro přípravu řezů dostatečně tenkých (5-10μm), aby byly použitelné pro kvalitní analýzu světelným/fluorescenčním mikroskopiem. Zalévacím médiem vhodným pro krájení až 2μm řezů je parafin (Paraplast), široce využívaný v histologii. Jeho zásadní nevýhodou je hydrofóbnost, vzorek je tedy nezbytné před zalitím dokonale odvodnit. Odvodňovat lze ovšem jen nafixovaný vzorek (obvykle se volí aldehydová fixace). Celá procedura přípravy jednoho preparátu tak trvá několik dní a zahrnuje řadu kroků, kterými se může struktura kolonie nebo buněk poškodit. Nabídka zalévacích médií mísitelných s vodou je omezená na pryskyřice Durcupan ACM a Nanoplast. Pryskyřice ovšem musí před krájením dokonale zpolymerovat při 60°C po dobu 24-72 hodin, což celý proces opět komplikuje. Opakované experimenty zalévání kolonií agarózou naštěstí ukázaly, že postupem uvedeným v kapitole 3.2.13. lze z řezné plochy kolonie v agaróze oddělit dostatečně tenkou vrstvu buněk (maximálně 2-3 buňky nad sebou), imobilizovaných v agarózovém plátku. Pod mikroskopem pak lze sledovat jednotlivé buňky při zachování jejich vzájemného umístění v kolonii (Obr. 14). Rychlost přípravy (maximálně 40 min.)

jednoho i více preparátů je rovněž výhodou. Srovnání se vzorky připravenými klasickou cestou neodhalilo žádné poškození buněčné struktury horkou agarózou (podobné výsledky ve WOOD a KLOMPARENS 1993). Nevýhodou je, že celková tloušťka takového preparátu obvykle přesahuje optimální míru a při velkých zvětšeních je proto problémem jemnější zaostření a sledování menších detailů, například peroxizómů. Nomarského diferenciální kontrast je prakticky nepoužitelný. Zajímavou alternativou k tomuto postupu by mohlo být využití histologického kryomikrotomu. To ovšem až po vyřešení otázky dostupnosti přístroje.



Obr. 14 Možnosti mikroskopické analýzy struktury kolonie. Snímky byly pořízeny z osm dní staré kolonie kmene *S. cerevisiae ATG8*-GFP. A. Stereomikroskop, řez po zalití do agarózy, filtr GFP2, délka úsečky 0,7 mm B. Mikroskop, řez po zalití do agarózy, detail centrální oblasti, filtr GFP, délka úsečky 80 μm. C. Mikroskop, suspenze z centrální oblasti, filtr GFP délka úsečky 5 μm D. Stereomikroskop, celkový pohled shora, filtr GFP2 šipky naznačují vedení řezu v A, délka úsečky 3,2 mm. U snímků A a B odpovídá horní okraj obrázku hornímu okraji kolonie.

4.2 Příprava kmene nesoucího v genomu peroxizomální GFP

Jak je zmíněno v kapitole 2.1.2.2.1. Změny metabolizmu, byla při vstupu kolonie do alkalické zjištěna transkripční aktivace genů peroxizomálních enzymů a genů proteinů účastnících se biogeneze těchto organel. Mým cílem bylo doplnit tato data mikroskopickým pozorováním.

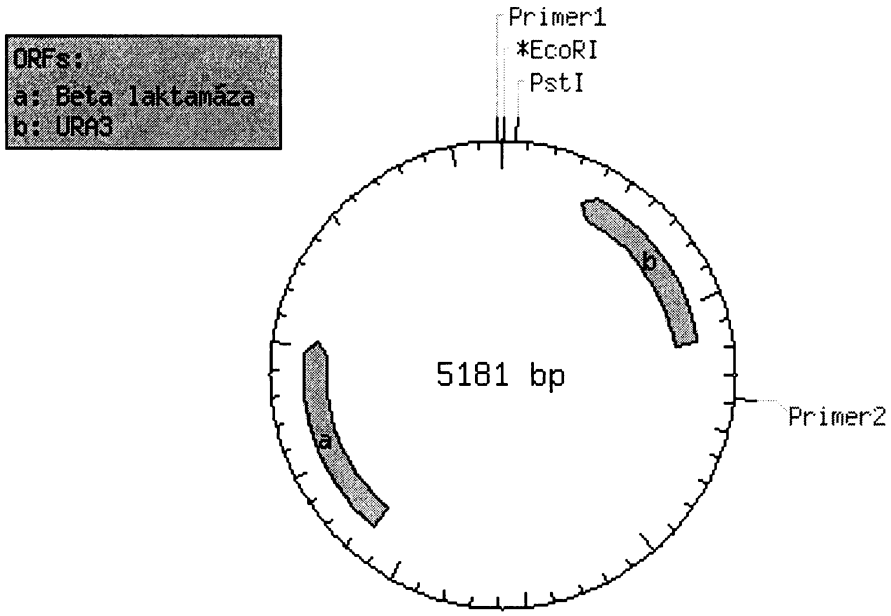
4.2.1 Příprava kmene *TRP1*::GFP-SKL

Exprese GFP směřovaného do peroxizómu je vhodnou metodou pro určení počtu, tvaru a lokalizace peroxizómů v buňce (BROCARD *et al.* 1997). Peroxizómy je možno kdykoli detekovat v celé kolonii nebo její části bez nutnosti barvení, které by mohlo strukturu kolonie změnit, případně neprobarvit všechny buňky rovnoměrně.

Z laboratoře Andrease Hartiga (Vídeňská univerzita) jsem získal plazmid pJR233, nesoucí gen pro GFP protein s aminokyselinovou sekvencí serin-lysin-leucin (SKL) na COOH konci, pod kontrolou konstitutivního promotoru *MLS1* (malát syntáza). SKL je signální sekvence selektivně transportovaná do peroxizómů (Peroxisomal Targeting Sequence type 1, PTSI). Plazmid pJR233 je odvozen od kyvadlového vektoru *E.coli/S.cerevisiae* YEp352, který obsahuje 2μ sekvenci pro udržení a mnohonásobnou replikaci v *S. cerevisiae* a jako selekční marker gen *URA3* pro orotidin-5 fosfát dekarboxylázu. Pro replikaci a selekci v *E.coli* nese pMB1 *ori* a jako selekční marker gen AmpR pro β-laktamázu (Obr. 15). Plazmid pJR233 jsem elektroporací vnesl do bakterie *E. coli* DH5α, transformanty nechal narůst na médiu s ampicilinem a plazmid z nich izoloval maxipreparací. Získaný plasmid pJR233 jsem vnesl do buněk *S. cerevisiae* BY4742. Pět kolonií transformantů narostlých na minimálním selekčním médiu bez uracilu jsem přenesl na pevné glycerolové médium, nechal přes noc narůst a ráno zkontroloval pod mikroskopem. Všechny transformanty měly požadovaný fenotypový projev, tj nesly peroxizómy značené GFP. Takto připravený kvasinkový kmen posloužil pouze k ověření funkčnosti plazmidu. K dlouhodobým pokusům na koloniích se použít nedal, protože z buněk pěstovaných na komplexním médiu by se s vysokou frekvencí (zhruba 5% za generaci) ztrácel. Bylo proto nezbytné pomocí PCR amplifikovat GFP kazetu se selekčním markerem a začlenit ji do genomu studovaného kmene.

Pro snazší selekci transformovaných buněk jsem jako místo integrace zvolil kvasinkový gen *TRP1*. Přímý primer pro amplifikaci kazety odpovídal oblasti 5170..9 (-11..+9) plazmidu, zpětný primer byl komplementární k 1381-1401 oblasti téhož vlákna plazmidu. Nástavce pro homologní rekombinaci do genu *TRP1* odpovídaly jeho 1..40,

respektive 635..675 oblasti (Obr. 16). Délka amplifikovaného úseku by měla být 2640 pb (Obr. 17).



Obr. 15 **Mapa vektoru pYEp352. Plazmid pJR233 byl vytvořen vložením 1228 pb fragmentu obsahujícího MLS1 promotor a GFP-SKL mezi místa EcoRI-PstI (BROCARD *et al.* 1997)**

A.

Primer1

1 TRP1 40 -11 pJR233 +9

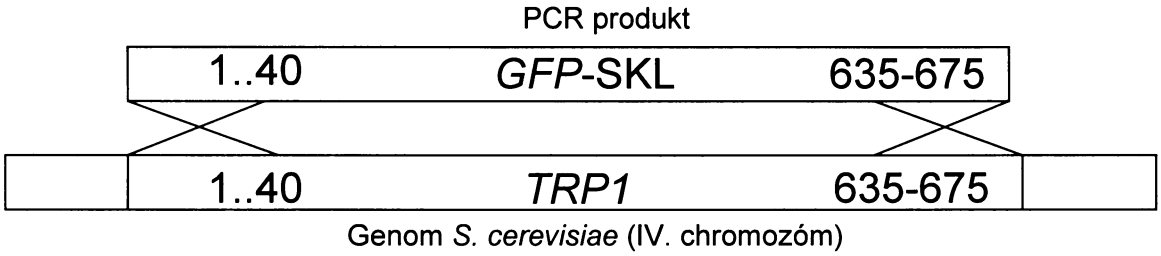
5′-ATGTCTGTTATTAATTTCACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGaggaaacagctatgaccatg-3′

Primer2

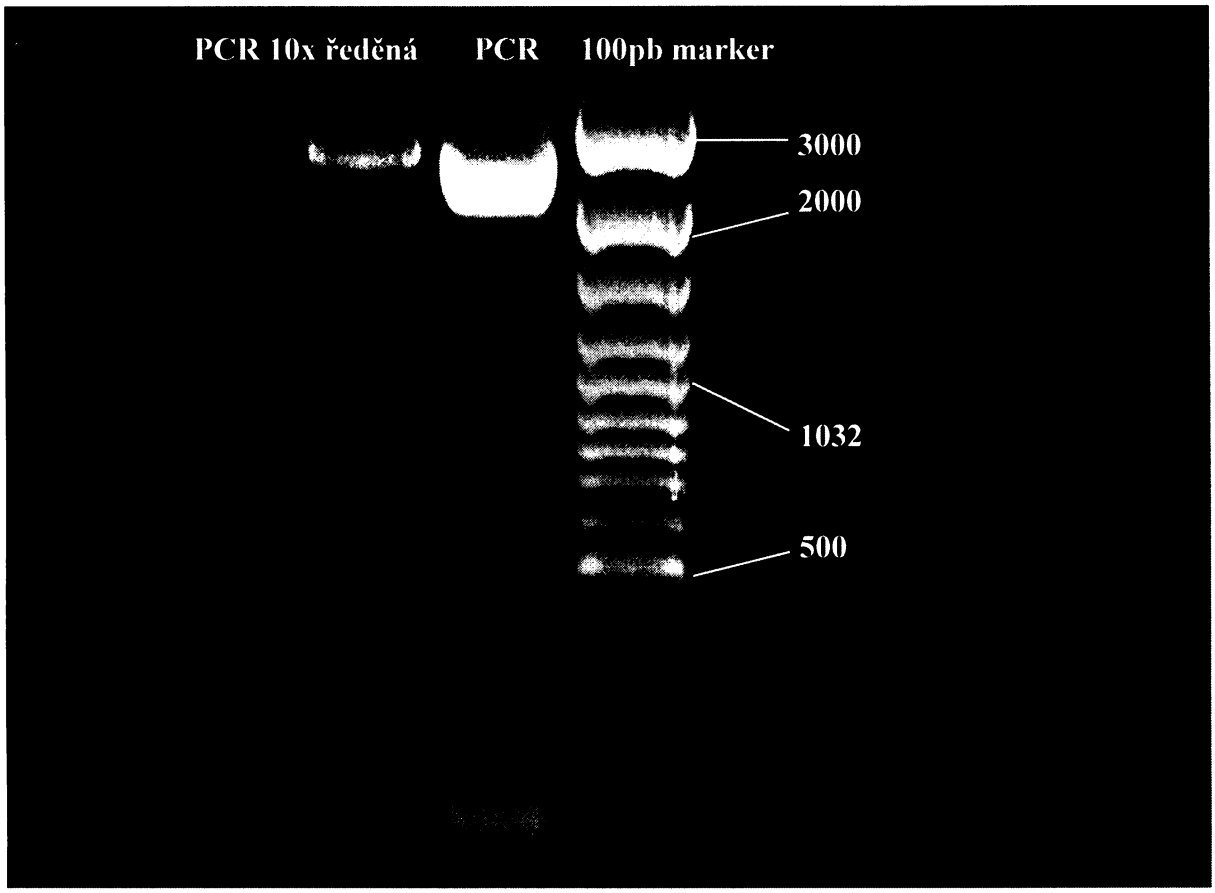
675 TRP1 635 1401 pJR233 1381

5′-CTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTTAcaatgatgggtaacaagagc-3′

B.



Obr. 16 **A. Sekvence oligonukleotidů použitých při PCR GFP-SKL a URA3 markeru z plazmidu pJR233. Šedě jsou značeny nástavce pro homologní rekombinaci, malým písmem sekvence pro nasedání primerů na pJR233 B. Schéma požadované homologní rekombinace**



Obr. 17 **Elektroforetické ověření PCR amplifikace PCR GFP-SKL kazety**

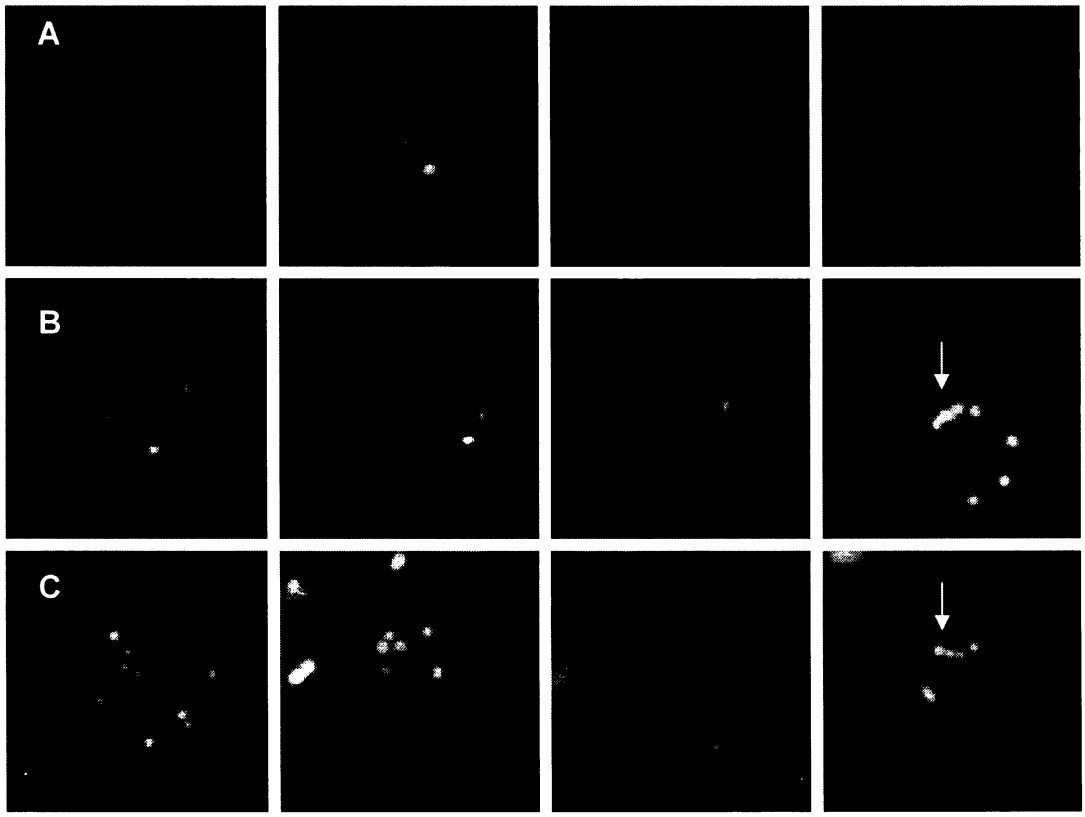
Na elektroforéze jsem ověřil, že produkt získaný PCR má délku 2,6 kpb (Obr. 17). Izoloval jsem jej z gelu a transformoval do buněk *S. cerevisiae* BY4742. Transformační směs jsem vysel na minimální médium obsahující aminokyseliny Lys, Leu, His, Trp. Narostlé kolonie jsem přenesl na minimální médium bez tryptofanu. Přepokládal jsem, že u těch klonů, které na tomto médiu nerostly, došlo k požadované rekombinaci kazety do *TRP1*. U získaných transformantů jsem poté mikroskopicky ověřil produkci a lokalizaci GFP. Získal jsem takto tři klony obsahující GFP-SKL. Při následném ověřování růstu získaných klonů na glycerolovém médiu vykazoval jeden z nich o něco slabší alkalizaci a kolonie dalšího tvořily v pozdějších časech větší množství sektorů. Pro další práci jsem si proto zvolil třetí kmen, jehož vlastnosti byly od rodičovského kmene nerozlišitelné. Kmen jsem pojmenoval *S. cerevisiae* GFP-SKL.

4.2.2 Vlastnosti kmene *S. cerevisiae* GFP-SKL

Při kultivaci na komplexním glukózovém médiu byla v buňkách patrná slabá fluorescence, lokalizovaná v několika málo (0-7) tečkovitých strukturách. Při růstu na médiu s kyselinou oleovou jako jediným zdrojem uhlíku se počet těchto teček zvýšil na 10-20 a intenzita fluorescence zesílila. Na glycerovém médiu byl jejich počet rovněž zvýšen, přestože se jevily o něco menší (Obr. 18). Tato pozorování se shodují s literárními údaji o indukovatelnosti peroxizómů (např. BROCARD *et al.* 1997, VEENHUIS *et al.* 2000). Intenzita fluorescenčního signálu peroxizomů je dostatečná pro detekci pomocí mikroskopu, přestože dokumentace je někdy nesnadná a vyžaduje dlouhé expoziční časy, respektive mnohonásobnou integraci. Pro pozorování fluorescenčním stereomikroskopem se tento kmen nehodí. Při relativně malém zvětšení stereomikroskopu je většinou nemožné odlišit fluorescenční signál peroxizómů od pozadí.

Při prodloužené kultivaci na nefermentovatelných zdrojích uhlíku jsem pozoroval zvýšenou intenzitu fluorescence, ta byla ještě výraznější na minimálních médiích, resp. na médiích bez zdrojů dusíku. Je proto pravděpodobné, že intenzita fluorescence podléhá mnoha vlivům, jako je postupné hromadění GFP v peroxizómu, změny exprese *MLS1* nebo globální změny genové exprese při stresových reakcích a sama o sobě nemusí vypovídat o peroxizomální aktivitě. Při růstu na médiích s nedostatkem živin se v buňkách často objevovaly organely větší než běžně pozorované peroxizómy, ve kterých se GFP fluorescence mísila s nespecifickou autofluorescencí. Mohlo se jednat o vakuoly, do kterých bylo GFP dopraveno např. autofágií.

Na oleátovém médiu jsem často pozoroval těsné seskupování peroxizómů do skupinek nebo řetízků. Někdy takové útvary připomínaly mitochondriální retikulum, u kvasinek dobře pozorovatelné. Přemísťování a seskupování peroxizómů do podobných útvarů zaznamenal u savčích buněk SCHRADER a spolupracovníci (2000). Za mechanizmus přesunu a uskupení peroxizómů považují pohyb po mikrotubulech, jeho možný účel však nenavrhují. Při kratších kultivacích byl tento jev na glycerolu ojedinělý.



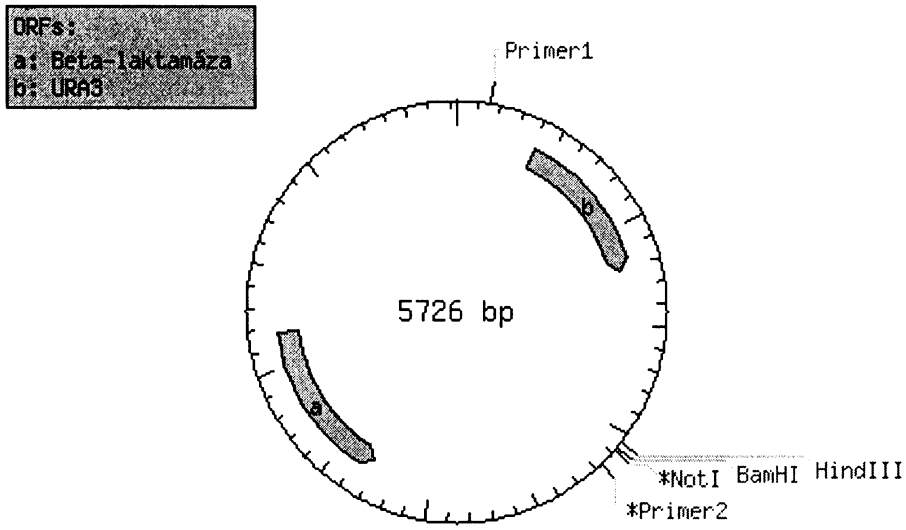
Obr. 18 Kmen *S. cerevisiae GFP*-SKL na různých zdrojích uhlíku. Řada A. glukóza Řada B. glycerol Řada C. kyselina oleová. Doba kultivace 20 hodin. Šipky ukazují shlukování peroxizómů do řetízků.

4.3 Příprava kmene nesoucího v genomu *ATG8* – GFP

Autofágie je jedním z hlavních mechanizmů mnoha metabolických změn. Dá se tedy předpokládat, že se účastní i změn při vývoji kvasinkové kolonie. Některé orientační pokusy změnu její aktivity skutečně naznačují (PALKOVÁ, osobní sdělení). Mým úkolem bylo vybrat vhodný autofagický protein pro fluorescenční značení a jeho sledováním na předběžná pozorování navázat, případně vyzkoušet další metody detekce autofágie.

4.3.1 Konstrukce kmene *TRP1::ATG8*-GFP

ATG8 je jedním z klíčových autofagických genů. Zahájení makroautofágie je provázeno jeho přibližně osminásobnou indukcí na transkripční úrovni (KIRISAKO *et al.* 1999). Je-li současně přepisován protein GFP, je tato indukce dobře patrná jako zvýšení fluorescenční intenzity v buňce. Z laboratoře Daniela J. Klionskeho (University of Michigan) jsem měl k dispozici plazmid s genem *ATG8* fúzovaný s genem GFP (kóduje protein Atg8p s GFP na C-konci), pod kontrolou vlastního promotoru. *ATG8* a GFP jsou transkribovány do jedné mRNA a translatovány jako jediný fúzní protein. Nicméně cytosolická proteáza Atg4p odštěpuje z Atg8p ihned po dokončení syntézy C-koncový arginin, z chiméry Atg8p-GFP tedy odstraní i GFP, které dále neslouží pro sledování lokalizace Atg8p v buňce (KIM *et al.* 2001). Indukce autofágie je tedy pozorována díky souběžnému zvýšení exprese GFP a *ATG8,* což umožňuje sledovat lokalizaci exprese Atg8p v rámci kolonie. Plazmid pCGFP(426) (KIM *et al.* 1999) byl připraven z vektoru pRS426 vložením BamHI/HindIII fragmentu obsahujícího GFP. Plazmid pAUT7GFP(426) (KIM *et al.* 2001), se kterým jsem pracoval já, byl připraven vložením NotI/BamHI fragmentu nesoucího gen ATG8 s vlastním promotorem do plazmidu pCGFP(426) (Obr. 19). Izolaci plazmidu, ověření jeho funkčnosti a homologní rekombinaci do genu *TRP1* jsem uskutečnil ze stejných důvodů a stejným postupem jako u předchozího kmene (sekvence primerů viz obr. 20). PCR produkt měl délku asi 3440 pb (Obr. 21).

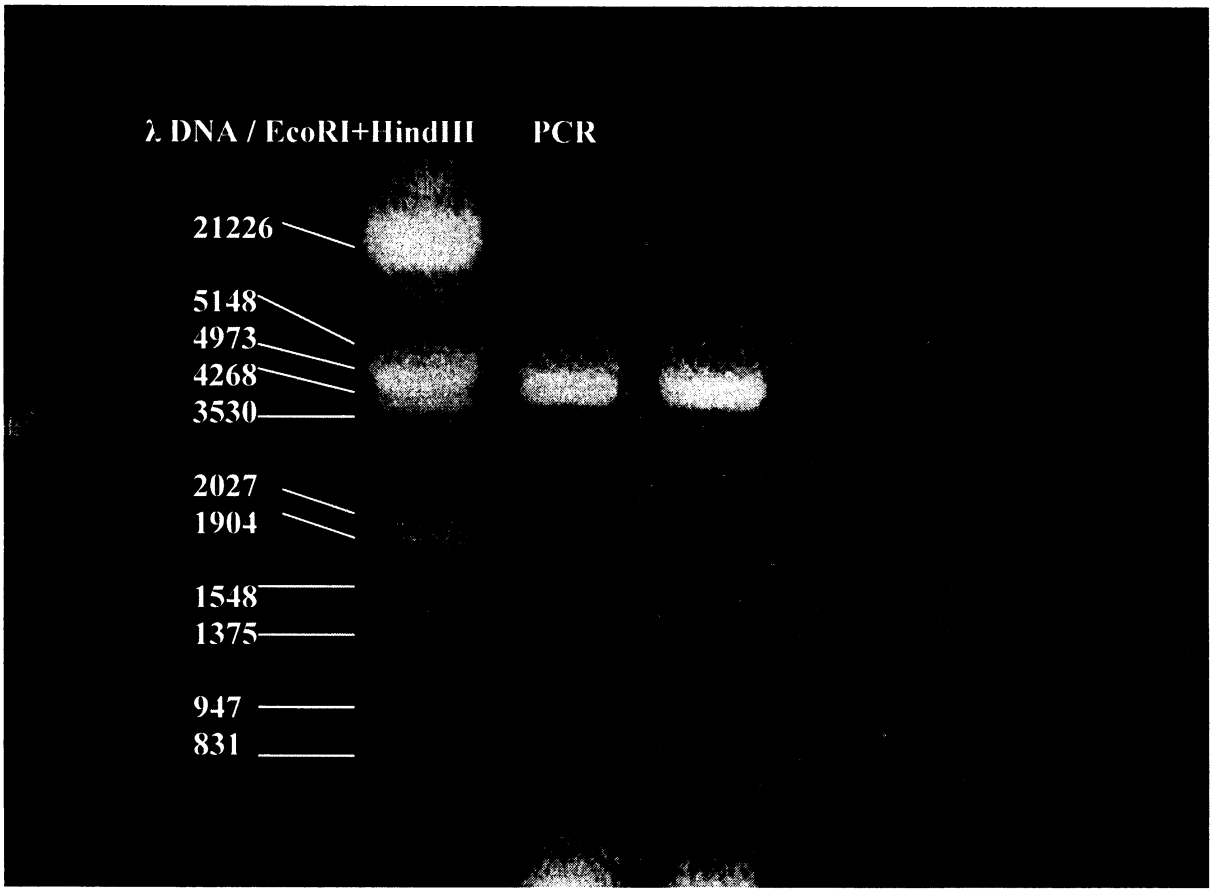


Obr. 19 **Mapa vektoru pRS426. Mezi místa BamHI/HindIII byl vložen 710 pb fragment s GFP (KIM *et al.* 1999), mezi místa NotI/BamHI byl vložen 723pb fragment ATG8 s promotorem (KIM *et al.* 2001).**

Primer1
1 TRP1 40 153 pAUT7GFP 173
5′-ATGTCTGTTATTAATTTCACAGGTAGTTCTGGTCCATTGG gcatcagagcagattgtact-3′

Primer2
675 TRP1 635 2190 pAUT7GFP 2170
5′-CTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTTAagctatgaccatgattacgc-3′

Obr. 20 **Oligonukleotidy pro PCR amplifikaci kazety *ATG8*-GFP. Šedě jsou značeny nástavce pro homologní rekombinaci, malým písmem sekvence pro nasedání primerů na pAUT7GFP(426)**



Obr. 21 **Elektroforetické ověření PCR amplifikace *ATG8*-GFP kazety**

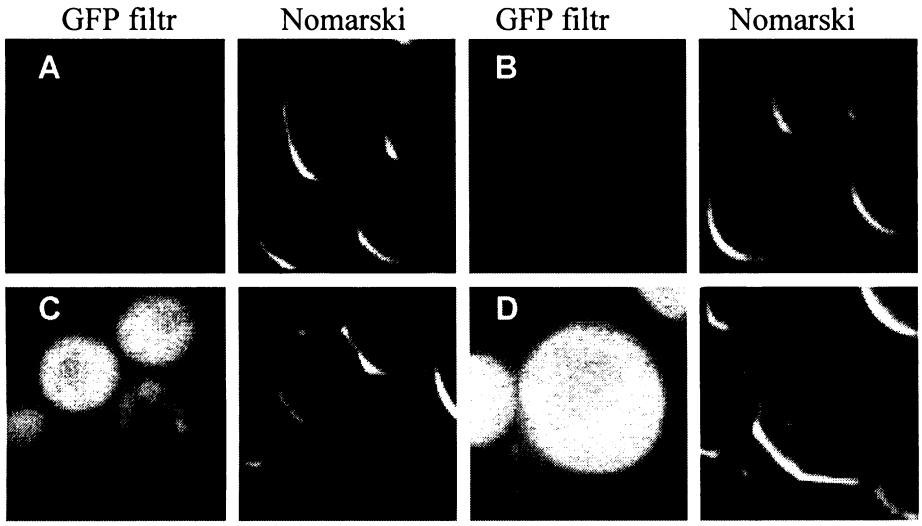
Selekcí správných auxotrofií (URA^+TRP^-) a mikroskopickým ověřením fenotypu jsem získal dva pozitivní klony. Oba tvoří při dlouhodobých pokusech kolonie s více sektory než rodičovský kmen, nicméně základní sledované vlastnosti kolonií (růst, alkalizace) mají zachovány a jsou tedy použitelné pro experimenty na koloniích. Tento kmen jsem pojmenoval *S. cerevisiae ATG8*-GFP.

4.3.2 Vlastnosti kmene *S. cerevisiae ATG8*-GFP.

Při krátkodobém růstu na komplexním glukózovém/glycerolovém médiu je v cytosolu buněk zřetelná slabá fluorescence. Ta se výrazně zvyšuje již při krátkém (1-2 hod) působení rapamycinu (koncentrace 0,2 μg/ml) nebo o něco delším (2-3 hod) pobytu v médiu chudém na živiny (minimální médium, médium bez aminokyselin, médium bez zdrojů uhlíku). (Obr. 22) To odpovídá literárním údajům o indukci autofágie (TAKESHIGE *et al.* 1992, NODA a OHSUMI 1998). Připravený kmen by tedy měl být použitelný pro sledování autofagie na základě změn fluorescence GFP. Přestože by rapamycin měl prostřednictvím inhibice Tor1p kinázy simulovat podmínky nutričního

stresu, Atg8p-GFP fluorescence při podmínkách skutečného hladovění se při shodné době působení zdála být silnější.

Připravený kmen je ideální pro studium lokalizace autofágie v kvasinkové kolonii pomocí fluorescenčního mikroskopu i stereomikroskopu. I zde je však třeba pamatovat na to, že fluorescence vypovídá o zahájení a trvání autofágie, ale málo nebo vůbec o skutečném objemu či povaze cytosolického materiálu dopravovaného do vakuoly. Takové informace by bylo možné získat až zavedením dalších metod, zejména biochemických a elektronmikroskopických.



Obr. 22 **Indukce autofágie. A, B: Kultura pěstovaná na YEPG médiu C, D: buňky pěstované 4 hodiny na médiu bez zdrojů dusíku i uhlíku. V kulturách s nedostatkem živin se vždy vyskytovalo množství zvětšených buněk, jako v D**

4.4 Zavedení metod elektronové mikroskopie

Analýza transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) může odhalit množství detailů nerozlišitelných mikroskopem světelným. Výhodou není jen vyšší rozlišovací schopnost (v řádu nanometrů), ale i odlišný způsob vizualizace buněčných struktur, který není závislý na expresi markerového proteinu nebo na použití molekulárních sond, specifických vždy jen pro úzký okruh komponent buňky. Pozorovaný jev tak lze studovat v širších souvislostech celkové struktury buňky. Získané výsledky je však nezbytné opatrně a zodpovědně interpretovat. Biologické vzorky jsou totiž ve svém přirozeném stavu pro elektronovou mikroskopii nevhodné; jejich struktura je poměrně křehká, udržovaná vysokým obsahem vody. Navíc jsou až na výjimky buněčné komponenty transparentní pro elektrony a bez umělého kontrastování atomy těžkých kovů nemohou být v TEM pozorovány. Základní procedura přípravy biologických vzorků pro TEM tedy vždy představuje podstatný zásah do jejich struktury a riziko vzniku artefaktů. Klasickým příkladem chybné interpretace byl „objev" bakteriální organely mezozómu v padesátých letech minulého století. Teprve v průběhu dalších desetiletí byl tento úkaz zpochybněn (SILVA *et al.* 1976) a vyvrácen. Hlavním vodítkem pro skeptiky v otázce existence mezozómu byla skutečnost, že pro jeho vizualizaci bylo třeba poměrně přesně dodržet určitý fixační protokol, žádným jiným způsobem se ho nedařilo detekovat. Proto je vždy vhodné mít data získaná elektronovým mikroskopem podložená dalšími metodami, zejména jedná-li se výzkum na některém málo probádaném poli biologie.

Hlavní způsoby přípravy vzorků pro TEM jsou dva: chemický a fyzikální. Zatímco pro chemickou přípravu vzorku stačí běžné vybavení biologické laboratoře, pro fyzikální metody (vesměs kryologické) je vyžadováno specializované pracoviště. Pro mojí práci tedy připadaly v úvahu chemické metody.

4.4.1 Srovnání dostupných fixačních protokolů

Aby struktura buňky zůstala maximálně zachována při všech nezbytných manipulacích, je potřeba ji nafixovat. Způsob fixace přitom podstatně ovlivní získanou obrazovou informaci. Do značné míry se jedná o empirickou záležitost, jejíž výsledky závisí na řadě detailů, ovlivněných konkrétním vzorkem, pracovištěm i osobou experimentátora. Nelze se proto spoléhat jen na přesné zopakování protokolů z literatury a je nezbytné provést vlastní optimalizaci fixačního protokolu pro konkrétní účel.

Kvasinky jsou vybaveny silnou buněčnou stěnou, která zhoršuje nebo znemožňuje pronikání fixačních činidel do buňky. Doporučuje se proto pracovat s kulturou

v exponenciální fázi růstu na komplexním glukózovém médiu, kdy jsou buňky obecně permeabilnější (WRIGHT 2000). Toto opatření však není použitelné v případě studia buněk kvasinkových kolonií dlouhodobě rostoucích na pevném médiu. Při snaze o zachování struktury kolonie jsem rovněž nemohl pracovat se suspenzí buněk, což by umožnilo rovnoměrný a rychlý přístup činidel ke všem buňkám.

4.4.1.1 Fixace glutaraldehydem.

Molekula glutaraldehydu obsahuje dvě reaktivní aldehydové skupiny, což jí umožňuje reagovat s buněčnými komponentami za vzniku stabilních sítí a gelů. V těch zůstávají kovalentně vázány proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny a dochází k celkovému zpevnění struktury buňky. Glutaraldehyd nefixuje membrány ani nemá žádné kontrastovací účinky. Je proto často zařazován jako první fixační krok, po němž následují další, vedoucí k fixaci membrán. Do buněk proniká glutaraldehyd přes buněčnou stěnu bez problémů. Pro mechanickou stabilizaci buněk v kolonii však nestačí, před fixací se proto kolonie musí zalít do agarózy.

4.4.1.2 Fixace oxidem osmičelým

Oxid osmičelý je vysoce reaktivní sloučenina, která účinně oxiduje lipidy buněčných membrán. Ty jsou tak stabilizovány a zároveň kontrastovány atomy redukovaného osmia. Reaktivita oxidu osmičelého často vede k jeho vysrážení na buněčné stěně, kterou je proto vhodné předem odstranit, zpravidla enzymaticky.

4.4.1.3 Fixace manganistanem draselným

Jedná se o silné oxidační činidlo, fixující membrány podobným způsobem jako OsO_4, které navíc snáze proniká do buněk. Manganičité sraženiny rovněž zlepšují kontrast membrán. Během manganistanové fixace dochází k extrakci proteinů a části sacharidů z buňky, výsledkem je proto pouze přehled o membránovém uspořádání buňky. Pro většinu účelů je taková informace dostatečná a manganistan je proto k fixaci kvasinek často využíván.

4.4.1.4 Fixace octanem uranylu

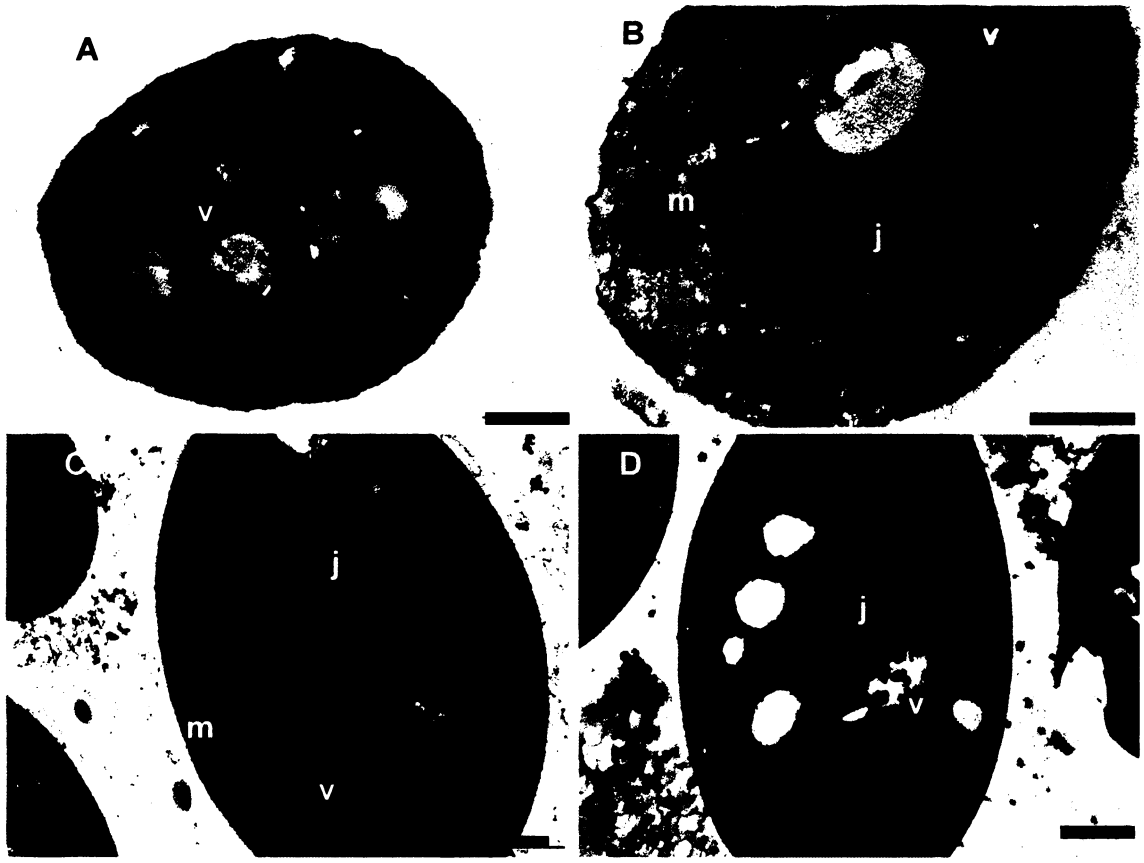
Uranové ionty jsou běžně aplikovány jako kontrastovací činidlo, někteří autoři však uvádějí i jejich fixační účinky (WRIGHT 2000, LOCKE *et al.* 1994). Fixaci uranylem doporučují zařadit místo fixace osmiem či manganistanem, případně jako třetí fixační krok.

4.4.2 Výsledky různých fixačních protokolů při analýze kolonie

Vzhled a charakteristiku výsledků některých fixačních postupů shrnuje obrázek 23. Nejvíce informací by asi bylo možno získat fixací oxidem osmičelým za podmínek, kdy je předem odstraněna buněčná stěna. V žádném preparátu se mi však nepodařilo získat dostatek buněk s odstraněnou stěnou a zachovanou vnitřní strukturou. Tento problém by mohlo v budoucnu vyřešit použití jiných lytických enzymů než zymolyázy, nicméně možnost odstranění buněčné stěny je u buněk kolonií principiálně problematická Především ve starších koloniích (kde dochází k buněčné diferenciaci) se vyskytují buňky nerostoucí nebo pomalu rostoucí, jejichž stěna je obvykle velmi špatně odstranitelná lytickými enzymy.

Pro většinu pozorování jsem použil fixaci glutaraldehydem a manganistanem draselným. Buněčnou stěnu nebylo třeba odstraňovat a struktura byla uspokojivě zachována u všech buněk v preparátu. Z testovaných koncentrací manganistanu se nejlépe osvědčily koncentrace nižší, 1-2 %. Při koncentracích manganistanu 4-5 % nebo době působení prodloužené nad 40 minut docházelo k výraznému tmavnutí nemembránových komponent buňky a ve výsledku ke snížení kontrastu.

Postupy s octanem uranylu jako fixačním či postfixačním činidlem se neosvědčily. Uranyl sám jako fixační činidlo nestačil, struktura buněk byla nedostatečně zachována, buňky se poškozovaly při kontrastování řezů i při pozorování elektronovým mikroskopem. Jako postfixační činidlo po manganistanu nebo osmiu výsledný obraz nezlepšil, spíše se objevilo větší množství nespecifických sraženin.

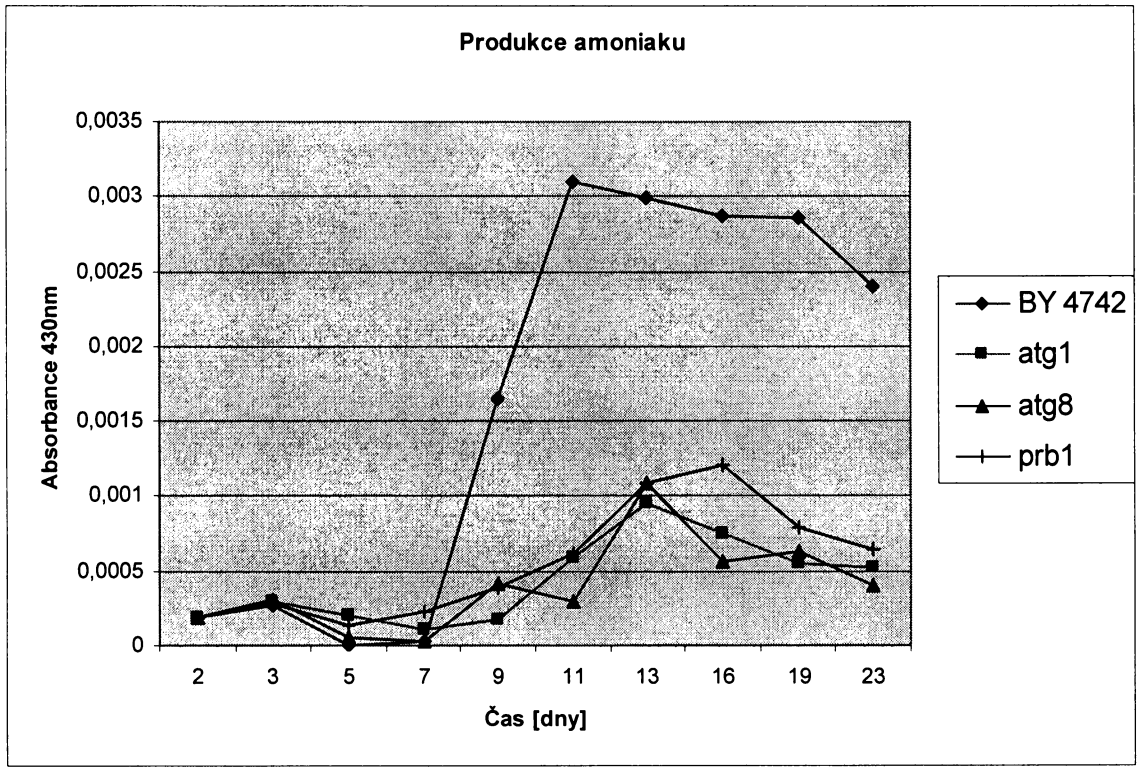


Obr. 23 **Vliv fixace na kvalitu preparátu. A. Glutaraldehyd+OsO_4, buněčná stěna ponechána. Membrány nebyly dostatečně fixovány a jsou patrné pouze jako elektrontransparentní linie na pozadí cytoplazmy. B. Glutaraldehyd+OsO_4, buněčná stěna odstraněna zymolyázou. Membrány jsou zřetelně kontrastní, v celé buňce jsou patrné stopy mnoha dalších struktur. C. Glutaraldehyd+$KMnO_4$. Membrány jsou rovněž patrné, ačkoli méně zřetelně a ostře. D. $KMnO_4$. Kvalita membrán je srovnatelná s předchozím protokolem, celkový vzhled buňky je uniformní, nejsou patrné elektrondenzní vakuoly ani strukturovaná cytoplazma. j-jádro, m-mitochondrie, v-vakuola, úsečka odpovídá 500 nm.**

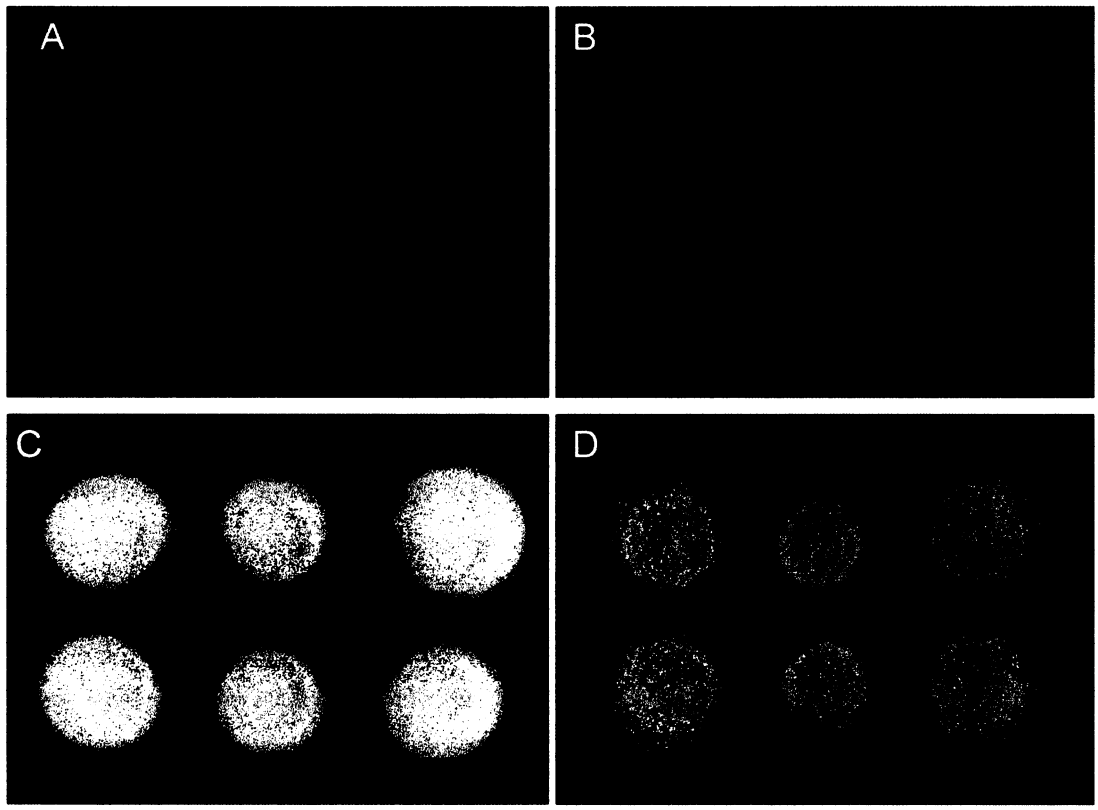
4.5 Autofagická aktivita ve vývoji kvasinkové kolonie

4.5.1 Vliv přítomnosti autofágie na schopnost kolonií produkovat amoniak

S cílem zjistit možný vliv přítomnosti/nepřítomnosti autofagie na schopnost kolonií produkovat amoniak jsem měřil produkci amoniaku v průběhu vývoje kolonií rodičovského kmene BY 4742 (má autofagii nepoškozenou) a kmenů *atg1*, *atg8* a *prb1*, s různým defektem v procesu autofágie. Obr.24a udává hodnoty absorbance zjištěné při měření množství amoniaku zachyceného v nádobce pod kolonií reakcí s Nesslerovým činidlem (kap. 3.2.4.1) v závislosti na době vývoje kolonie. Hodnoty jsou vztaženy na jednu kolonii a jednu hodinu, konkrétní hodnoty v grafu tedy udávají, kolik amoniaku průměrně vyprodukovala jedna kolonie během jedné hodiny v průběhu měřeného časového intervalu (obvykle 2 až 3 dny). Vždy jde o průměrnou hodnotu ze čtyř kolonií. Nárůst produkce amoniaku koloniemi kmene BY4742 okolo osmého dne odpovídal viditelné alkalizaci (Obr. 24b). Kmeny s defektem v autofágii mají tedy produkci amoniaku oproti rodičovskému kmeni výrazně sníženou.

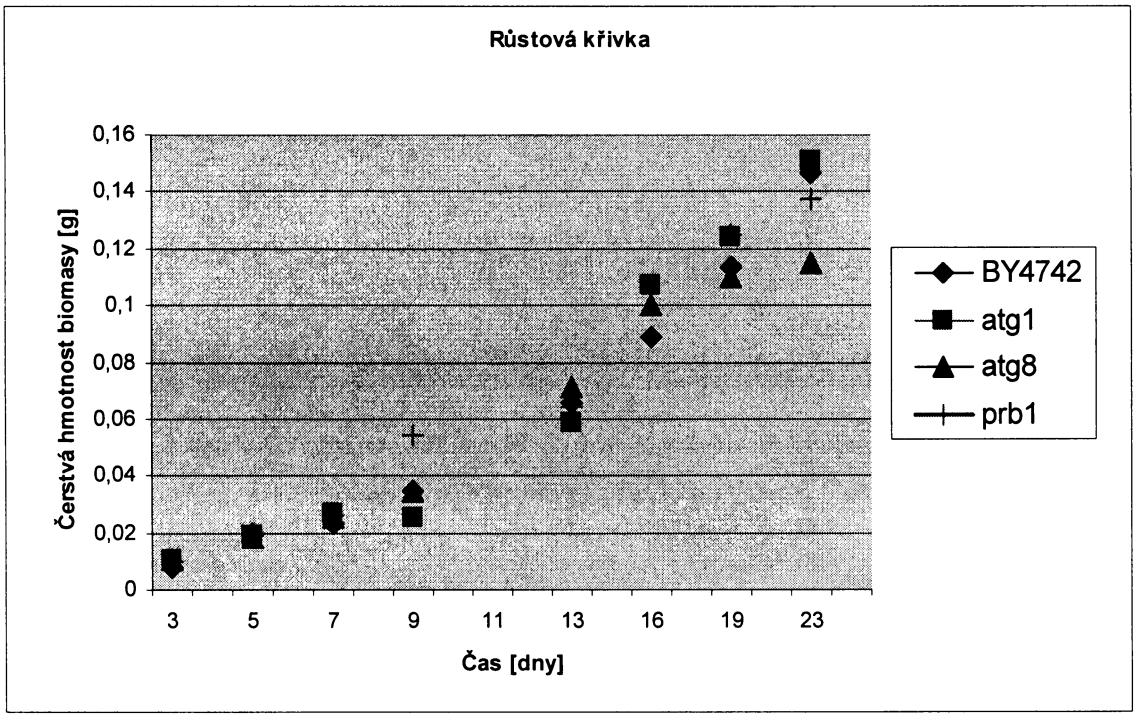


Obr. 24a Srovnání produkce amoniaku rodičovským kmenem BY 4742 a mutantními kmeny.



Obr. 24 b **Alkalizace/acidifikace média kmenem BY 4742 A. 7. den B. 8. den C. 13. den D. 23. den. Fialová barva indikátoru BKP ukazuje alkalizaci.**

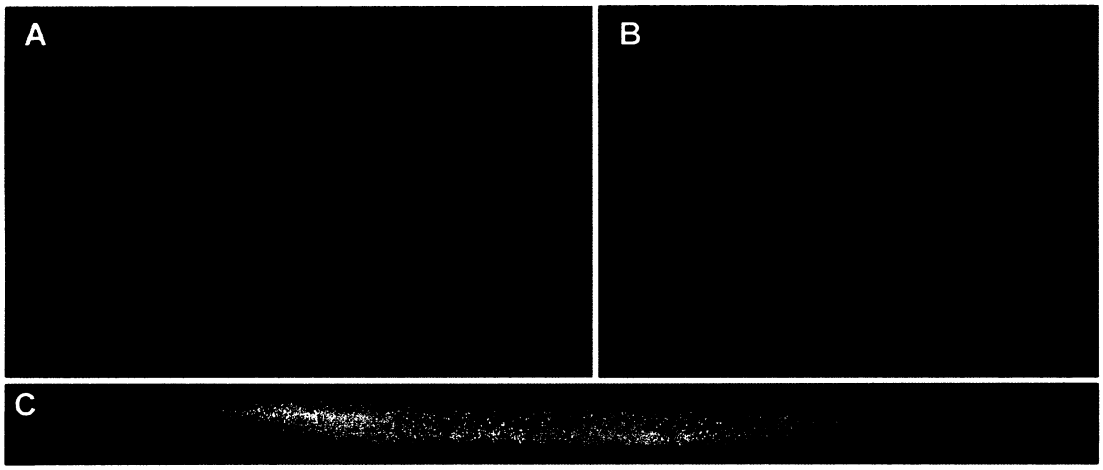
V grafu na Obr.24c jsou vyneseny přírůstky biomasy rodičovského kmene a mutantních kmenů v průběhu vývoje. Je vidět, že během sledovaného intervalu jsou přírůstky u všech kmenů přibližně srovnatelné a celkový nárůst kolonií není tedy u mutantních kmenů výrazně ovlivněn. Snížená produkce amoniaku má tedy pravděpodobně jiné příčiny, než menší počet buněk v kolonii během sledovaného časového intervalu. V dalších experimentech však bude nutné zjistit, jak kolonie mutantních kmenů dlouhodobě přežívají, tj. jaké procento životaschopných buněk obsahují v pozdějších fázích vývoje.



Obr. 24c **Přírůstek biomasy rodičovského kmene a mutantních kmenů**

4.5.2 Mikroskopická pozorování autofágie

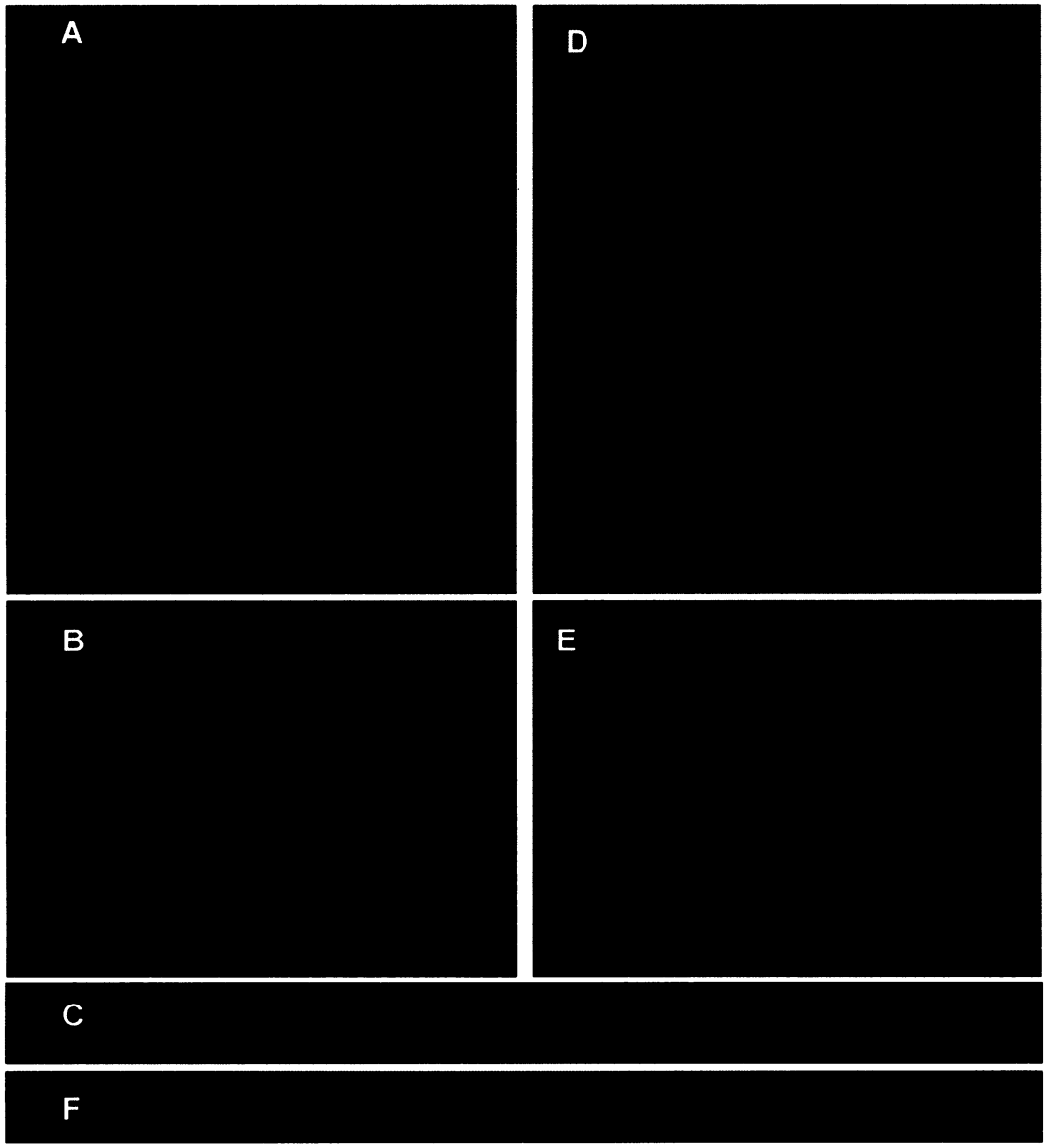
Fluorescence kmene *S. cerevisiae ATG8*-GFP se objevuje už po prvních dnech vývoje kolonie. Je lokalizována pouze ve svrchní vrstvě buněk ve středu kolonie a slaběji v části orientované k ostatním koloniím (Obr. 25). Výskyt autofágie v centrální oblasti kolonie by byl očekávatelný i kdyby se kolonie vyvíjela jako nekoordinovaná masa buněk, protože tato oblast je tvořena nejstaršími buňkami. Ty jsou pravděpodobně už v časných fázích vývoje vystaveny stresu z lokálního nedostatku živin i kumulativnímu oxidativnímu stresu. Autofágie v buňkách bližších k sousedním koloniím by se rovněž dala vysvětlit nižší koncentrací živin, které jsou zde odčerpávány ostatními koloniemi. Otázkou je, proč je autofágie omezena na poměrně slabou horní vrstvu buněk. Je možné, že s klesající koncentrací živin v agaru se zmenšuje vrstva buněk, které jsou na něm schopny bez autofágie přežívat a že jako první registrují nedostatek živin horní buňky.



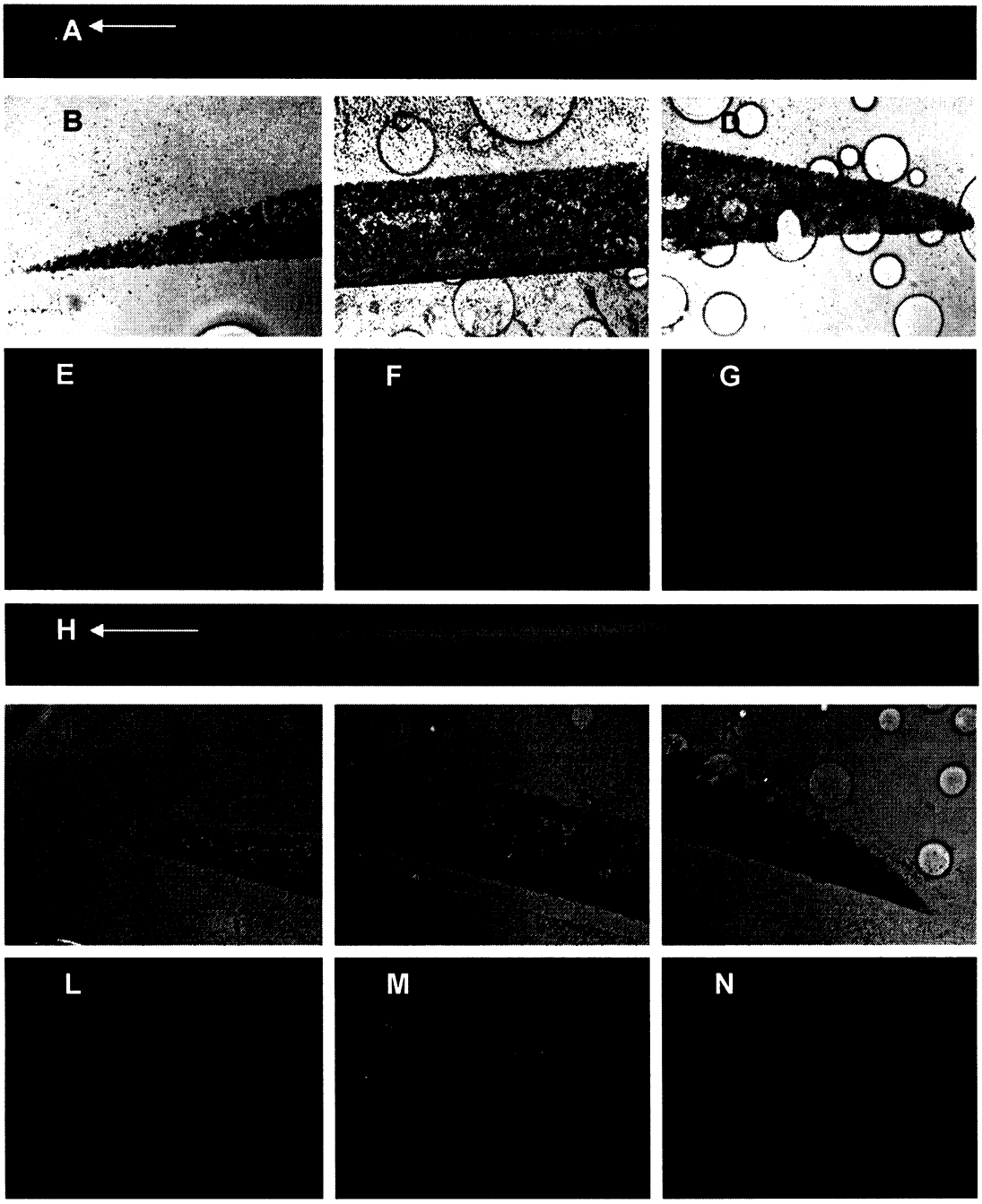
Obr. 25 Kolonie *S. cerevisiae ATG8*-GFP, 7. den. A. kolonie na BKP médiu B. rohová kolonie na BKP médiu pod stereomikroskopem (GFP2 filtr) C. řez touto kolonií. Šipka označuje okraj přilehlý k ostatním koloniím.

Výrazný nástup autofágie jsem pozoroval při zahájení alkalizace (Obr. 26-28). Vrstva fluoreskujících buněk se prohloubila a fluorescence se rozšířila i na dosud nedotčenou vnější část kolonie. Rychlost, s jakou zvýšení autofagické aktivity proběhlo, neodpovídá postupné odpovědi na kumulativní stres, spíše se zdá, že se jednalo o akci koordinovanou

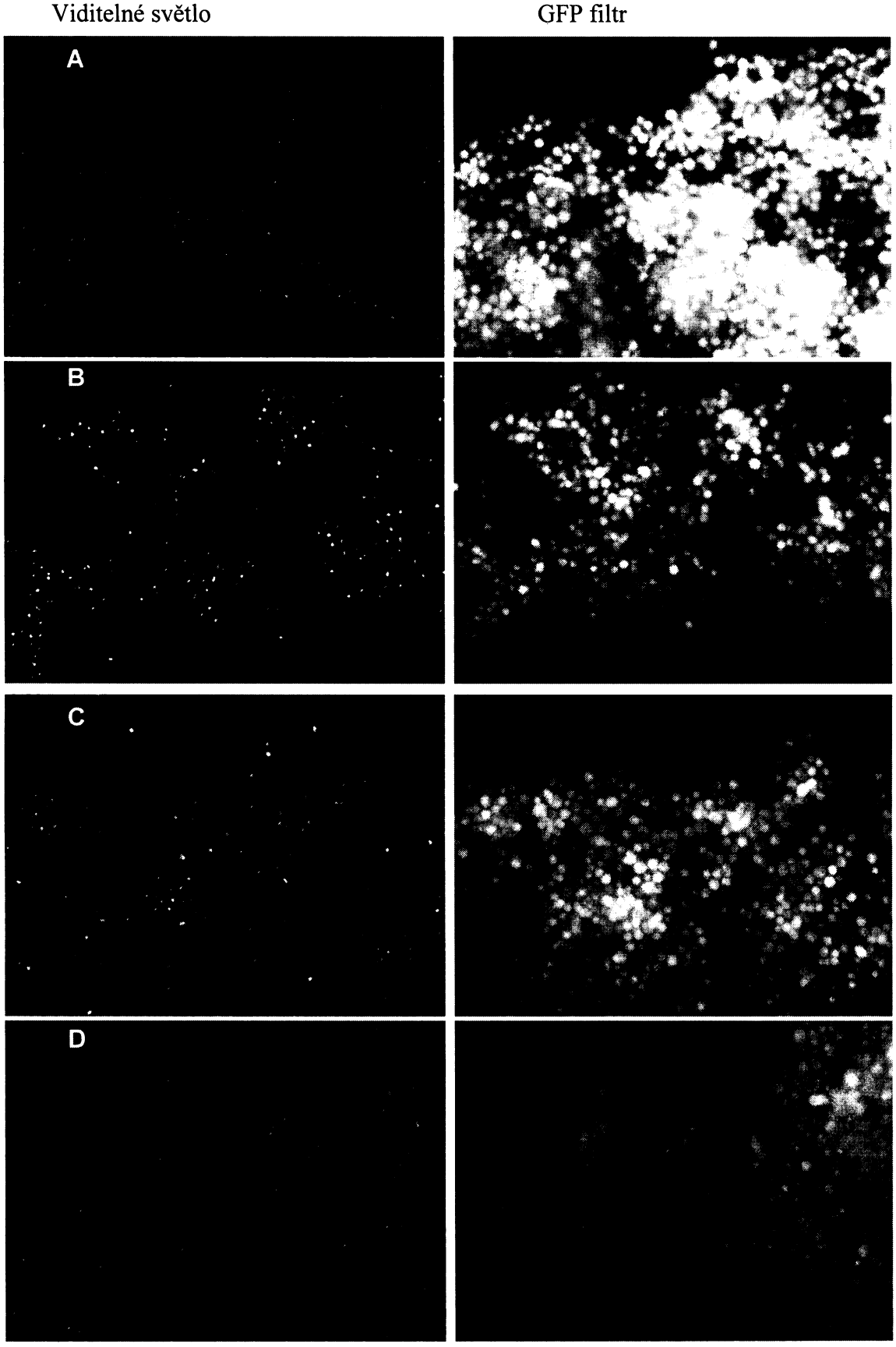
dalším signálem. Měl jsem možnost srovnat kolonie produkující amoniak a stejně staré kolonie, které ještě produkci nezahájily. V těch se autofágie jevila zřetelně slabší, zejména ve vnější části kolonie. V tomto případě tedy není pravděpodobné ovlivnění stavu buněk pouze takovými faktory, jako je chronologické stáří nebo oxidativní stres.



Obr. 26 Srovnání alkalizujících a nealkalizujících kolonií 8. dne A-C. Nealkalizující kolonie na médiu s BKP A. celkový pohled pod viditelným světlem B. celkový pohled pod GFP2 filtrem C. řez pod GFP2 filtrem D-F. Alkalizující kolonie. D. celkový pohled pod viditelným světlem E. celkový pohled pod GFP2 filtrem F. řez pod GFP2 filtrem. Šipky označují okraj přilehlý k ostatním koloniím

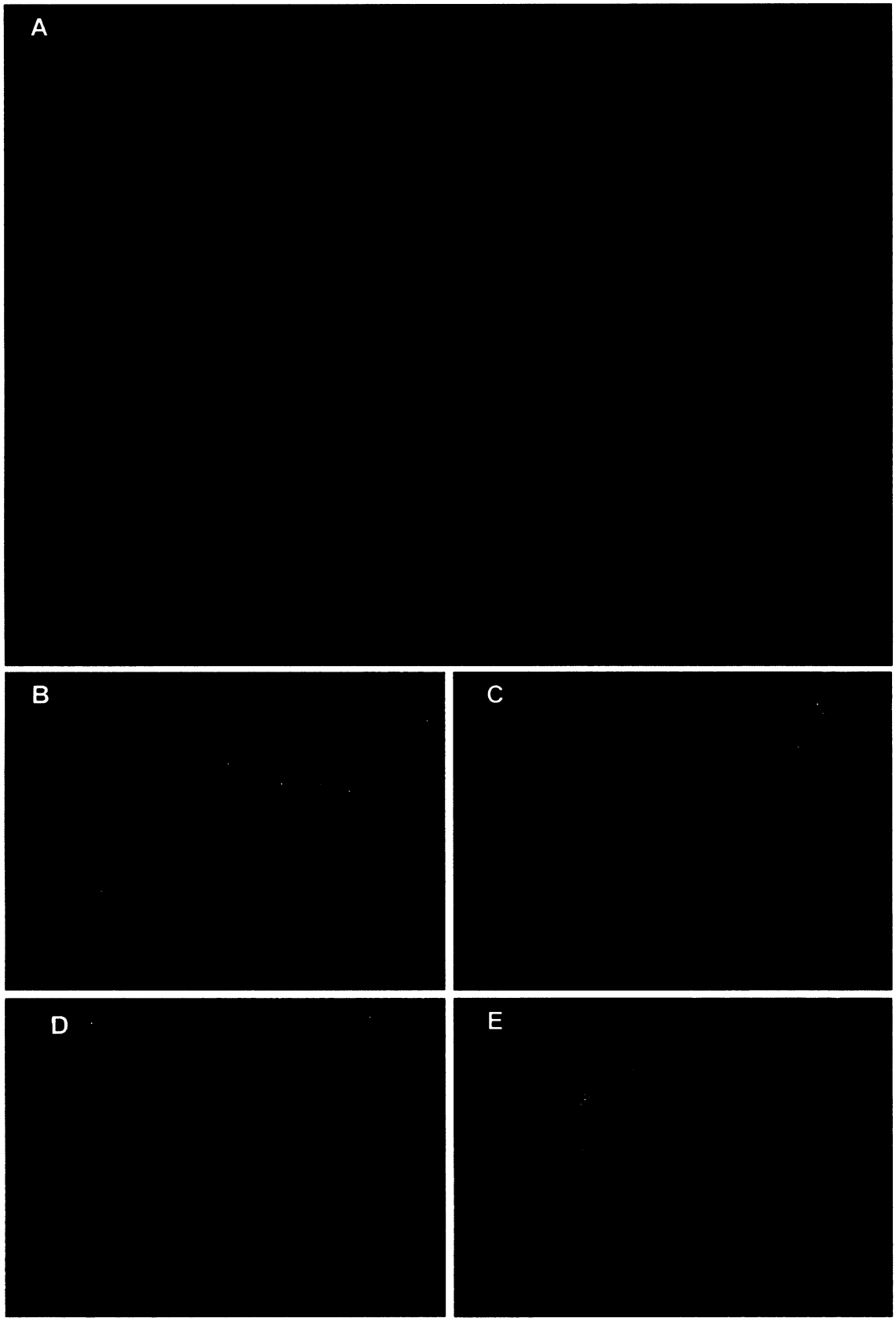


Obr. 27 **Mikroskopické srovnání alkalizující a nealkalizující kolonie 8. dne. A. řez nealkalizující kolonie pod stereomikroskopem (filtr GFP2) B-D detaily kolonie v procházejícím viditelném světle B. vnitřní okraj kolonie C. střed kolonie D. vnější okraj E-G tytéž snímky ve fluorescenčním mikroskopu (GFP filtr) H. řez alkalizující kolonií pod stereomikroskopem (filtr GFP2) I-K detaily kolonie v procházejícím viditelném světle I. vnitřní okraj kolonie J. střed kolonie K. vnější okraj L-N tytéž snímky ve fluorescenčním mikroskopu. Šipky v A. a H. opět označují okraj přilehlý k ostatním koloniím Mikroskopické snímky byly pořízeny 10x zvětšujícím objektivem**

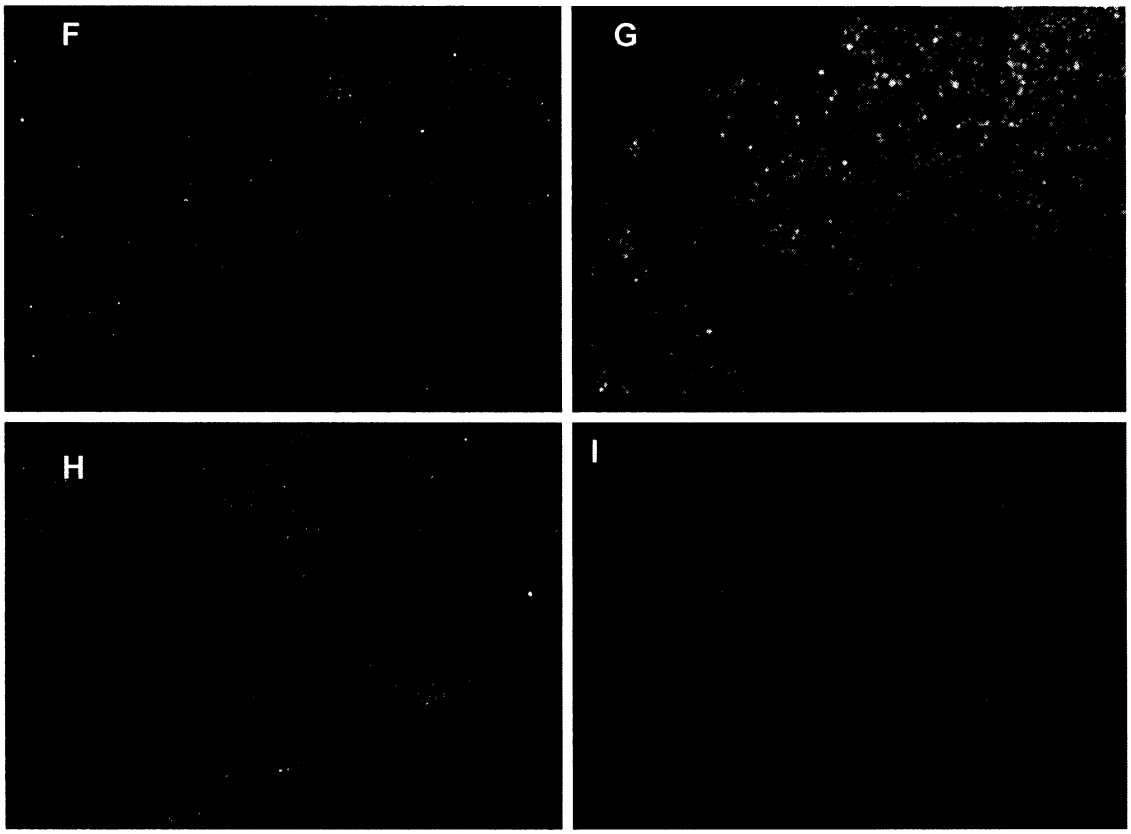


Obr. 28 **Detaily alkalizující a nealkalizující kolonie. Vlevo snímky v procházejícím světle, vpravo fluorescenční A. alkalizující kolonie, horní část středu B. alkalizující kolonie, vnější okraj C. nealkalizující kolonie, horní část středu D. nealkalizující kolonie, vnější okraj. Objektiv 40x**

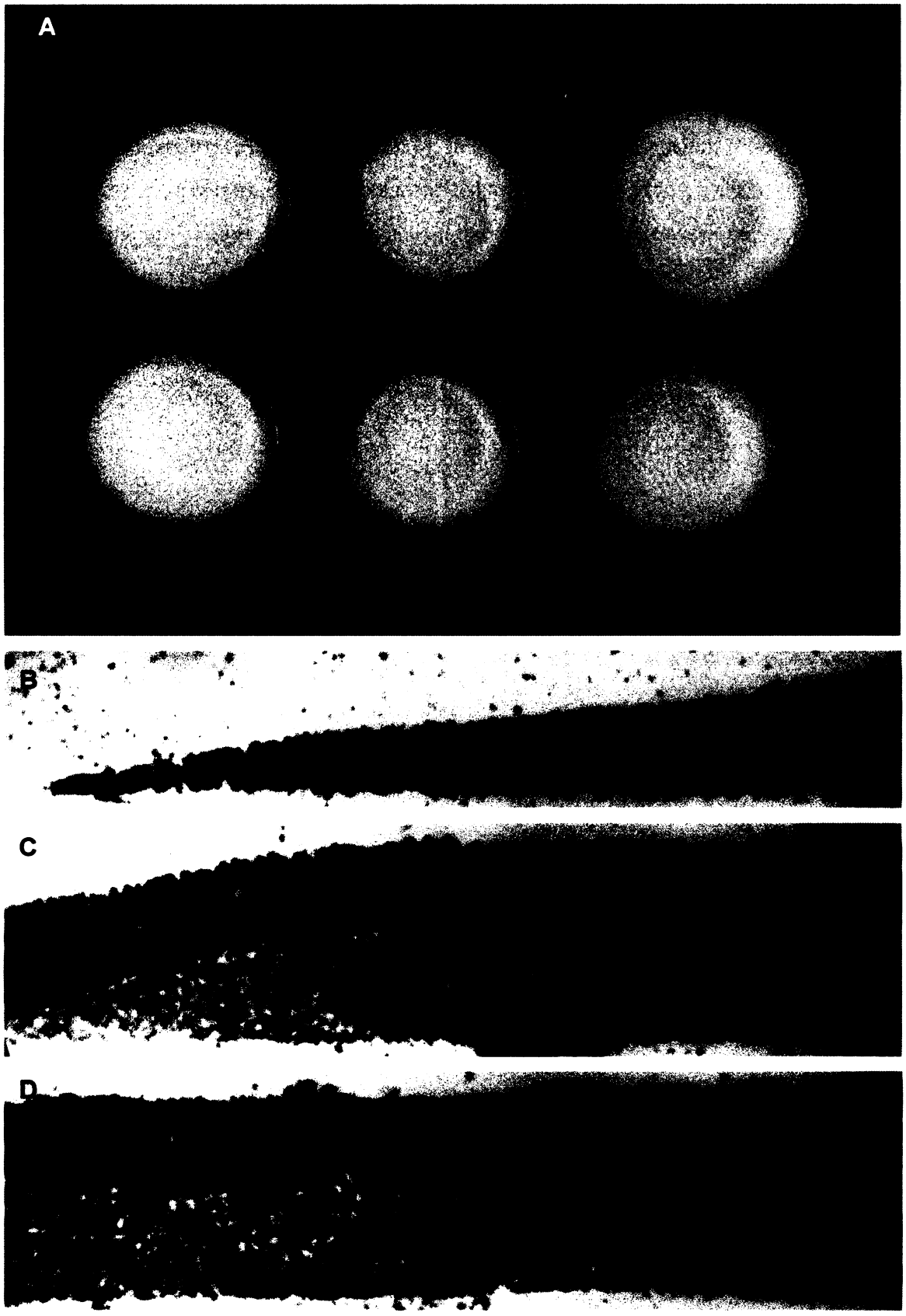
Po několika dnech alkalizace se ustálila zřetelně vymezená vrstva buněk v horní části kolonie (Obr. 29a, b). Buňky této vrstvy svítily zřetelnou GFP fluorescencí a měly společné i jiné morfologické znaky, zejména velikost. Proto bylo možné tuto vrstvu odlišit i v procházejícím viditelném světle mikroskopu bez použití fluorescence (Obr. 30). Zdá se, že tloušťka této vrstvy je po celém povrchu kolonie konstantní. V určité hloubce pod povrchem se tedy náhle mění charakter buněk. Mnoho spodních buněk, na pohled menších, má pod mikroskopem silnou autofluorescenci, GFP signál jsem však nepozoroval u žádné. Od této masy buněk uzavřené pod povrchem kolonie se výrazně odlišují až nejspodnější buňky (1-2 vrstvy), které jsou v těsném kontaktu a agarovým médiem. Ty se spíše podobají horním buňkám, přinejmenším podobně silným GFP signálem.



Obr. 29 a

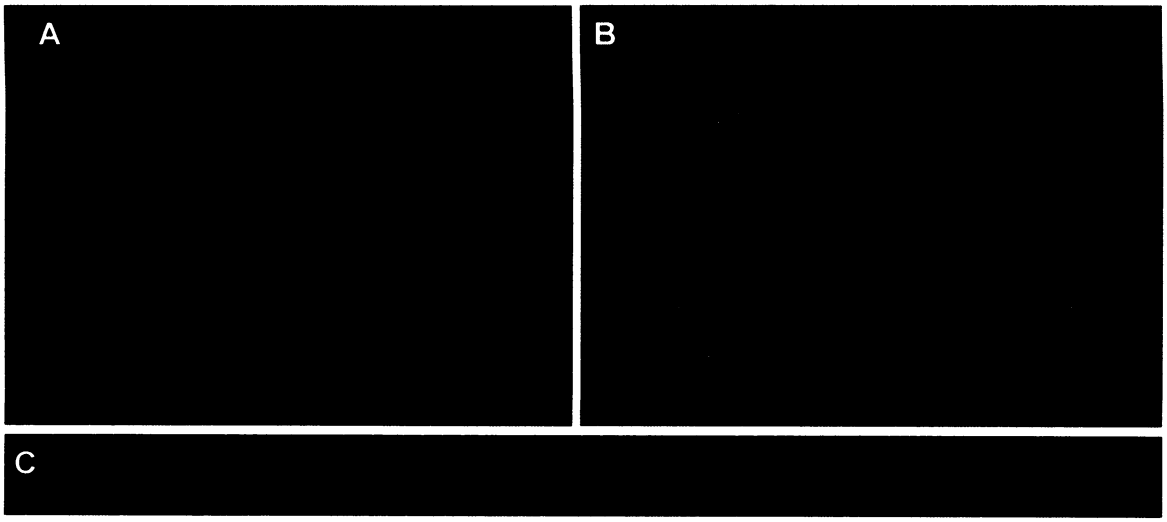


Obr. 29b devítidenní kolonie F. horní část centrální oblasti kolonie ve viditelném světle G. horní část centrální oblasti kolonie pod GFP filtrem H. spodní část centrální oblasti. I. spodní část centrální oblasti, GFP filtr, v nejspodnější vrstvě je vidět několik fluoreskujících buněk. Objektiv 20x



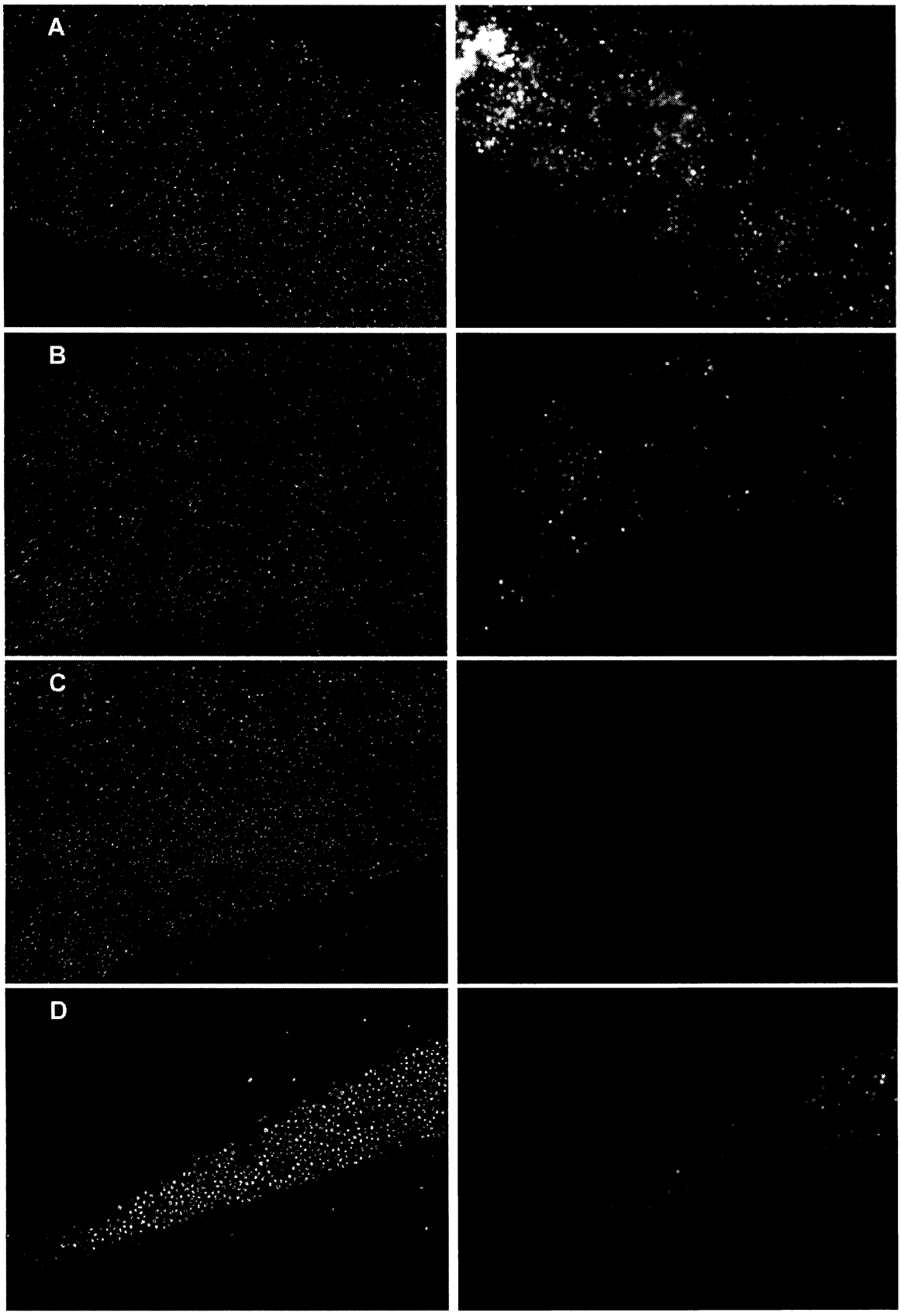
Obr. 30 13. den vývoje je již horní vrstva jasně oddělena, na silnějším preparátu ji lze rozlišit bez použití fluorescence. A. kmen BY4742 na médiu s BKP B. kmen BY4742 v procházejícím světle, vnitřní okraj kolonie C. pokračování vnitřního okraje D. střed. Objektiv 10x

Toto uspořádání kolonie se po vstupu do druhé acidické fáze ani v pozdních časech zásadně nemění (Obr. 31, 32). Intenzita fluorescence svrchní vrstvy buněk slábne, ale neztrácí se. Autofluorescence buněk pod nimi se mírně zesiluje a roste-li kolonie na médiu s bromkresolovým purpurem (BKP), je v nich patrné hromadění tohoto barviva a s tím spojená červenooranžová fluorescence. Nejspodnější vrstva buněk u agaru se rozšiřuje směrem nahoru, z původních 1-2 buněk s aktivní autofágií se stává 5-10 a zřetelně výš tato vrstva sahá na okraji přilehlém k ostatním koloniím (Obr. 33).



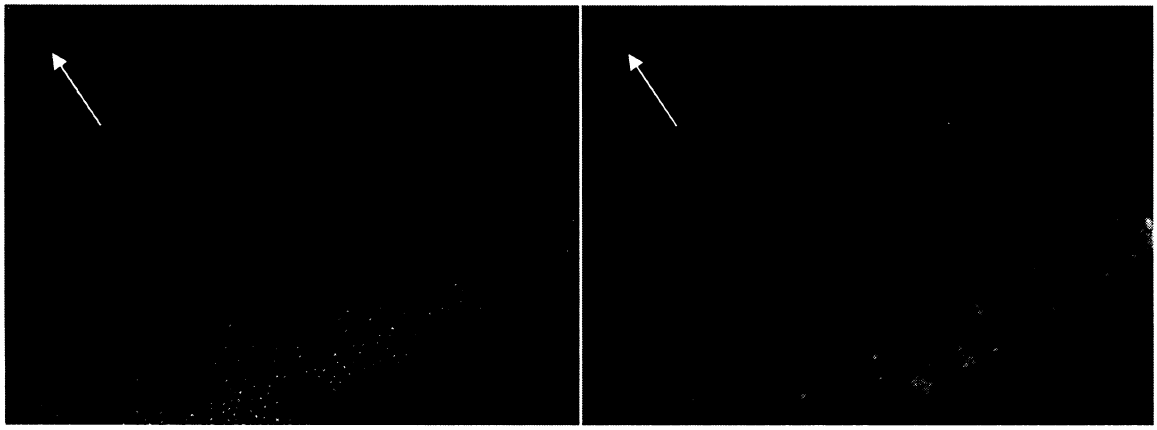
Obr. 31 **Dvacátý den vývoje kolonie. A. *S. cerevisiae ATG8*-GFP pod fluorescenčním stereomikroskopem B. BY4742, je patrná začínající acidifikace média C. řez *S. cerevisiae ATG8*-GFP pod fluorescenčním stereomikroskopem**

Viditelné světlo GFP filtr



Obr. 32 20. den, ATG8-GFP pod mikroskopem A. vnitřní okraj B. střed C. spodní část středu-jsou vidět nejspodnější buňky D. vnější okraj Objektiv 20x

Viditelné světlo GFP filtr



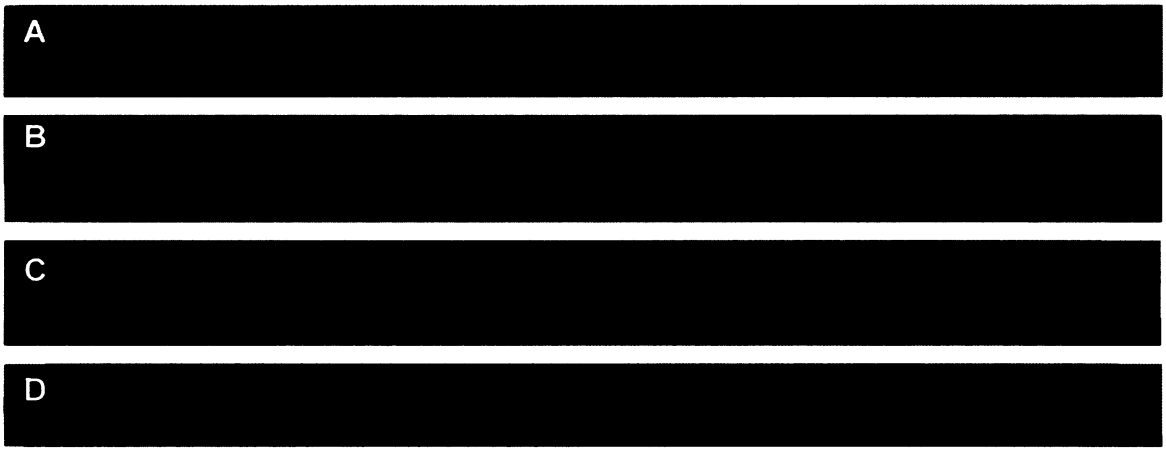
Obr. 33 30 den vývoje je již velmi zřetelná nejspodnější buněčná vrstva. Zachycena je spodní část středu kolonie, šipka ukazuje spodní okraj horní vrstvy. Vlevo viditelné světlo, vpravo GFP filtr Objektiv 20x

Vhodné doplnění poznatků o významu autofágie při vývoji kolonie představuje analýza kmenů s delecí v některém z autofágních genů. Stejným způsobem jako kmen *S. cerevisiae ATG8*-GFP jsem analyzoval kmen *atg1*, který má autofágii zcela nefunkční a *atg8*, *atg12* a *prb1*, které ji mají silně narušenou. U kmenů *atg8* a *atg12* dochází k tvorbě defektních autofagozómů, které dopraví do vakuoly méně cytoplazmatického materiálu než rodičovský kmen a větší komponenty, například mitochondrie, nejsou schopny odstranit vůbec (KISSOVA *et al.* 2004). V kmeni *prb1* není tvorba autofagozómů ovlivněna, ve vakuole se však hromadí autofagická tělíska, která tento kmen není schopen degradovat a využít jejich obsah (TAKESHIGE *et al.* 1992).

Mikroskopickou analýzu těchto kmenů jsem prováděl na koloniích pěstovaných na médiu s barvivem BKP. Přidávání BKP do růstového média je běžná metoda pro okamžité odlišení mrtvých buněk, protože do těch BKP snadno proniká a žádný mechanizmus jej z mrtvé buňky dál neodstraňuje. Předpokládá se, že živých buňkách jsou aktivní transportéry, které BKP rychle odstraňují. Nevýhodou této metody je, že může vést k zavádějícím výsledkům. Pokud je buňka živá, jen s neaktivními transportéry, bude se v ní BKP hromadit a může být mylně považována za mrtvou. Naproti tomu v

dlouho mrtvé nebo silně poškozené buňce, po které zbyla jen buněčná stěna, nebude BKP zadržován a buňka může být identifikována jako živá (PALKOVÁ, osobní sdělení). Při pozorování buněk s oranžovo-červenou BKP fluorescencí je proto lepší hovořit spíše o obarvených buňkách než o mrtvých. V případě velmi intenzivního barvení BKP je sice buněčná smrt jeho nejpravděpodobnější příčinou , ale pro definitivní závěry o umírání buněk v kolonii bude třeba zavést jinou, spolehlivější metodu.

V případě kmenů s defektní autofágií se lokalizace BKP obarvených buněk podobala lokalizaci fluorescence v *ATG8*-GFP kmeni. Odpovídal přitom i časový vývoj oblasti buněk s BKP fluorescencí. V první acidické fázi byla BKP fluorescence omezena na horní část středu kolonie, po vstupu do alkalické fáze se postupně ustálila výrazná horní vrstva stejného rozsahu a tvaru jako u kmene *ATG8*-GFP (Obr. 34).



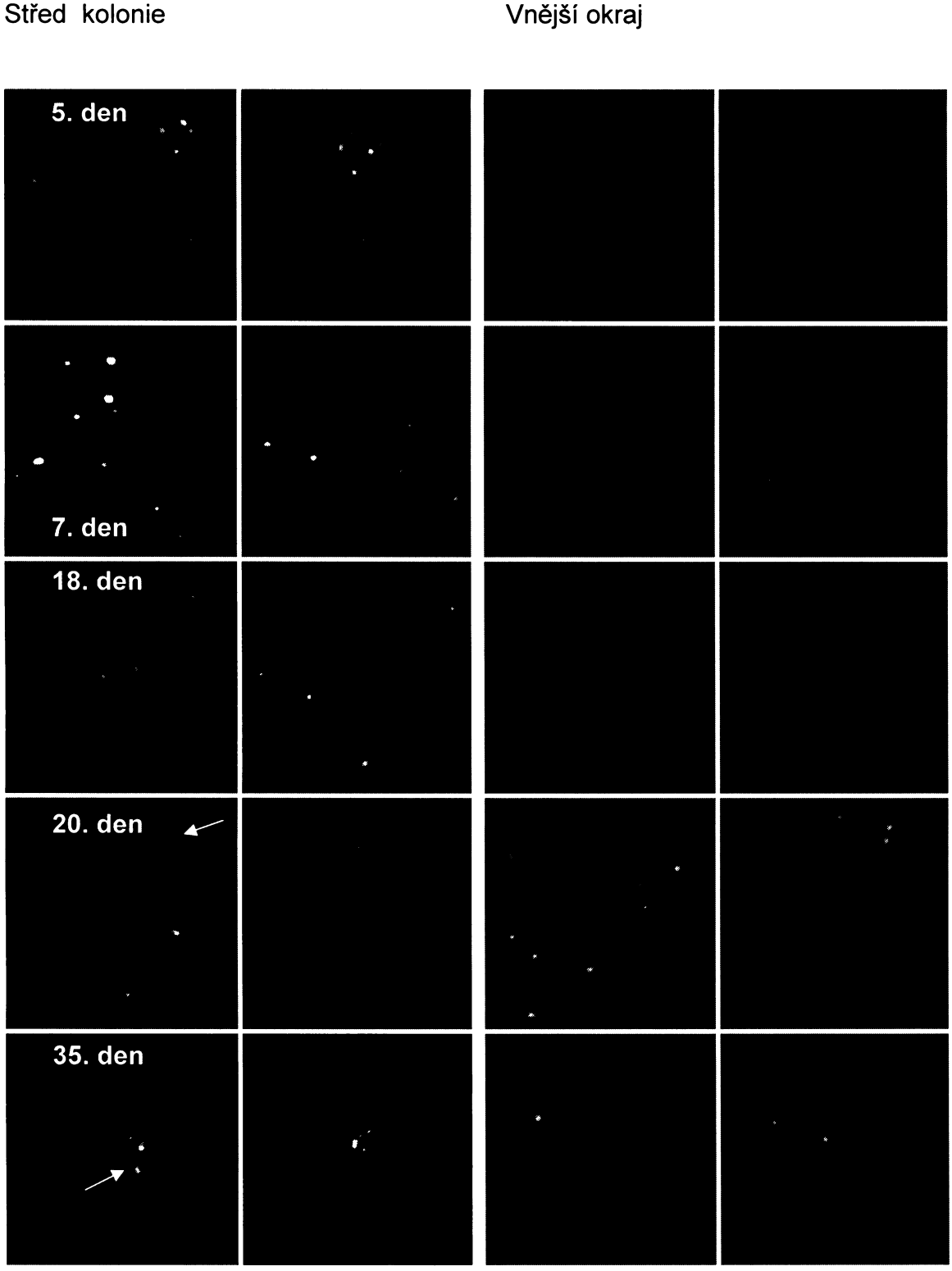
Obr. 34 . Barvení buněk BKP, řezy pod stereomikroskopem A. BY4742, 5. den B. *atg8* 5. den C. *atg8* 9. den D. *atg8* 30.den.

Tyto výsledky naznačují, že autofágie by mohla být důležitá pro existenci horní vrstvy buněk. Ta se dokáže vytvářet nezávisle na autofagické aktivitě, ale přežívání nebo přinejmenším aktivita jejích buněk je v nepřítomnosti autofágie podstatně ovlivněna. To odpovídá i výsledkům měření produkce amoniaku, které ukázalo nižší aktivitu produkce defektních kmenů při stejném nárůstu biomasy. Data týkající se barvení buněk BKP by bylo vhodné doplnit o analýzu jiných delečních kmenů, aby se potvrdila nebo vyvrátila možnost, že silné barvení horní vrstvy buněk provází každý defekt snižující životaschopnost buněk. Zatím jsem souběžně s kmeny nesoucími defekt v autofagických genech systematicky sledoval pouze kmen *sok2.* Delece genu transkripčního faktoru Sok2p byla už dříve identifikována jako příčina téměř nulové produkce amoniaku při vývoji kolonie (VÁCHOVÁ *et al.* 2004, VÁCHOVÁ a PALKOVÁ, 2005). Předběžné

výsledky ukázaly, že horní vrstva buněk v *sok2* koloniích má skutečně podobný vzhled jako v koloniích s defektní autofágií. Okrsky barvených buněk se navíc objevují i ve spodní vrstvě. Naproti tomu u starých (45 dní) kolonií kmenů s defektem v cytosolické kataláze (*ctt1*) nebo superoxid dismutáze (*sod1*) je zřetelně méně probarvená horní vrstva, než je tomu u stejně starých kolonií *atg8*. Kmeny *ctt1* a *sod1* nemají (narozdíl od kmene *sok2*) produkci amoniaku oproti rodičovskému kmeni výrazně sníženou (data neuvedena)

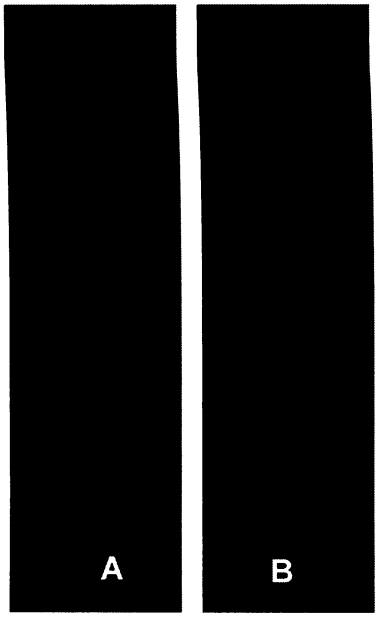
4.6 Peroxizómy ve vývoji kvasinkové kolonie

Detekce peroxizómů v kolonii je obtížnější než v případě autofágie, protože se jedná o malé organely s relativně slabou fluorescencí. První údaje o jejich výskytu jsem proto získal pozorováním buněčných suspenzí z okraje a středu kolonie. Centrální buňky obsahovaly peroxizómy se silnější fluorescencí, zpravidla v menším počtu. Výraznější GFP signál peroxizómů v centrálních buňkách může být způsoben kumulací GFP v důsledku jejich většího chronologického stáří. Buňky na okraji, které se rychleji dělí, měly zpravidla více peroxizómů se slabším signálem, což se dá analogicky vysvětlit zvýšenou proliferací peroxizómů a vyřeďováním jejich GFP (Obr. 35). Bez použití konfokálního mikroskopu je možné se o velikosti pozorovaných peroxizómů pouze dohadovat, zdá se však, že na okraji kolonie jsou menší. I to by odpovídalo jejich rychlejšímu dělení (LAZAROW, 2003). V průběhu vývoje kolonie se tyto rozdíly zmenšovaly, peroxizómy krajních buněk se začaly více podobat středovým, v pozdních časech (nad 30 dní) se velikostí a tvarem prakticky nelišily. Možnosti detekce peroxizómů *in situ* se značně zlepšily v okamžiku, kdy byl pro pozorováni použit mikroskop s novou (neopotřebovanou) výbojkou, která dávala silnější fluorescenci (Obr. 38a-c).

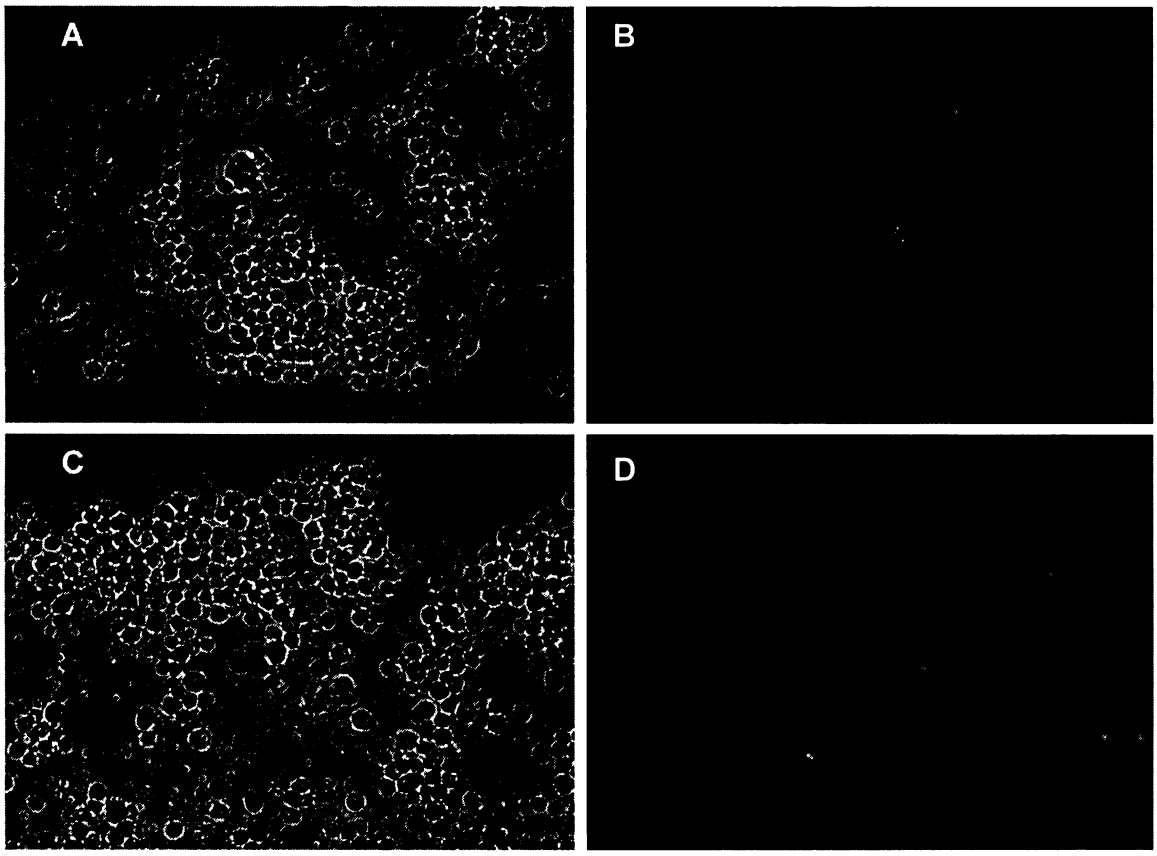


Obr. 35 **Peroxizómy ve vývoji kolonie, preparáty připravené suspenzí. 20. a 35. den už je patrné shlukování peroxizómů, označené šipkou**

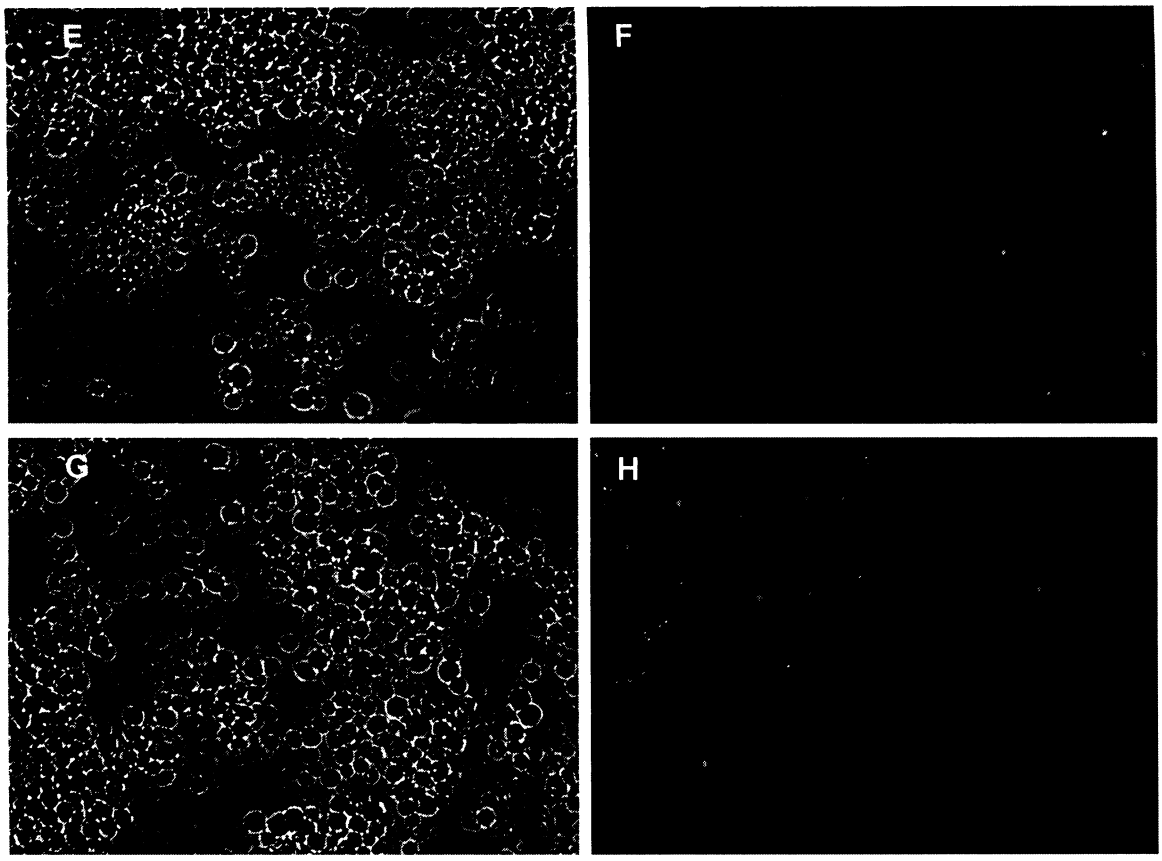
I přes nesnáze s pozorováním preparátu zachycujícího vertikální rozložení buněk v kolonii lze vypozorovat podobný vývoj přítomnosti peroxizómů jako v případě autofágie. V prvních dnech vývoje kolonie se peroxizómy vyskytují výhradně v povrchových vrstvách (zhruba 5 buněk) a to zřejmě v celé kolonii (Obr. 36). Po zahájení alkalizace se tato vrstva několikanásobně prohloubí (Obr. 37a, b). Vzhled peroxizómů ve středu a na okraji přitom odpovídá předchozímu pozorování suspenzí. V prvních dnech trvání alkalizace se opět odlišila horní vrstva buněk obsahujících peroxizómy a dolní vrstva s mírnou autofluorescencí, ale bez GFP signálu. Toto uspořádání se nezměnilo po celou dobu pozorování kolonie (Obr. 38a-c). Narozdíl od autofagie zde však nebyla nejspodnější vrstva zřetelně odlišena. Její buňky jsou mírně větší, ale peroxizómy jsem v nich zaznamenal pouze na okrajích kolonie. Je možné, pod větší vrstvou buněk už není dostatek kyslíku, který by činil indukci peroxizómů smysluplnou. Ve velmi starých koloniích (40-60 dní) se ve středových buňkách horní vrstvy objevují útvary připomínající peroxizómy, avšak větší a často protažené. Teprve suspenzní preparáty ze středu kolonie odhalily, že se jedná o shluky a řetízky peroxizómů, zmíněné už v kapitole o vlastnostech tohoto kmene (4.2.2). Peroxizómy mohou zůstat těsně u sebe po dělení (LAZAROW, 2003), mohou být takto uspořádány pohybem po mikrotubulech (SCHRADER *et al.* 2000) nebo mohou být fyzicky propojeny a tvořit tak retikulární útvary (EDRMANN a BLOBEL, 1995). Autoři těchto pozorování možné důvody takových uspořádání nevysvětlují. Není tedy jasné, proč se tyto útvary ve středu kolonie objevují, ani zda souvisí přímo s peroxizómy či spíše s celkovým uspořádáním a fyziologií buňky.



Obr. 36 Peroxizómy v sedmidenní kolonii, detail horní části středu kolonie. Peroxizómy jsou jen v několika nejsvrchnějších buňkách. A. GFP filtr B. viditelné světlo Objektiv 40x

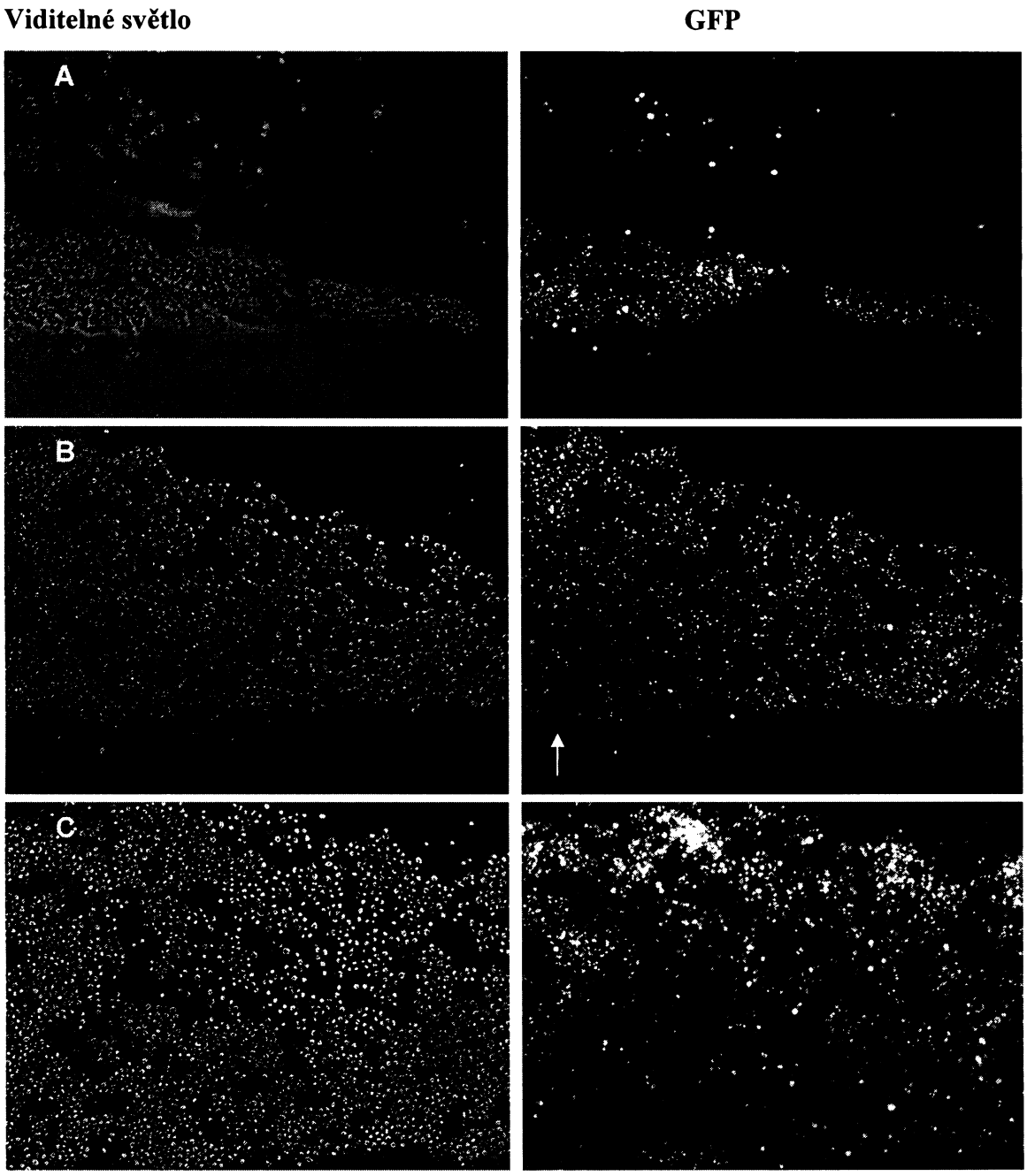


Obr. 37a 9 dní stará kolonie A. peroxizómy na vnějším okraji kolonie, viditelné světlo B. GFP filtr C. buňky v horní části středu D. GFP filtr Objektiv 20x



Obr. 37b E. spodní část středu F. GFP filtr G. horní část vnitřního okraje kolonie H. GFP filtr

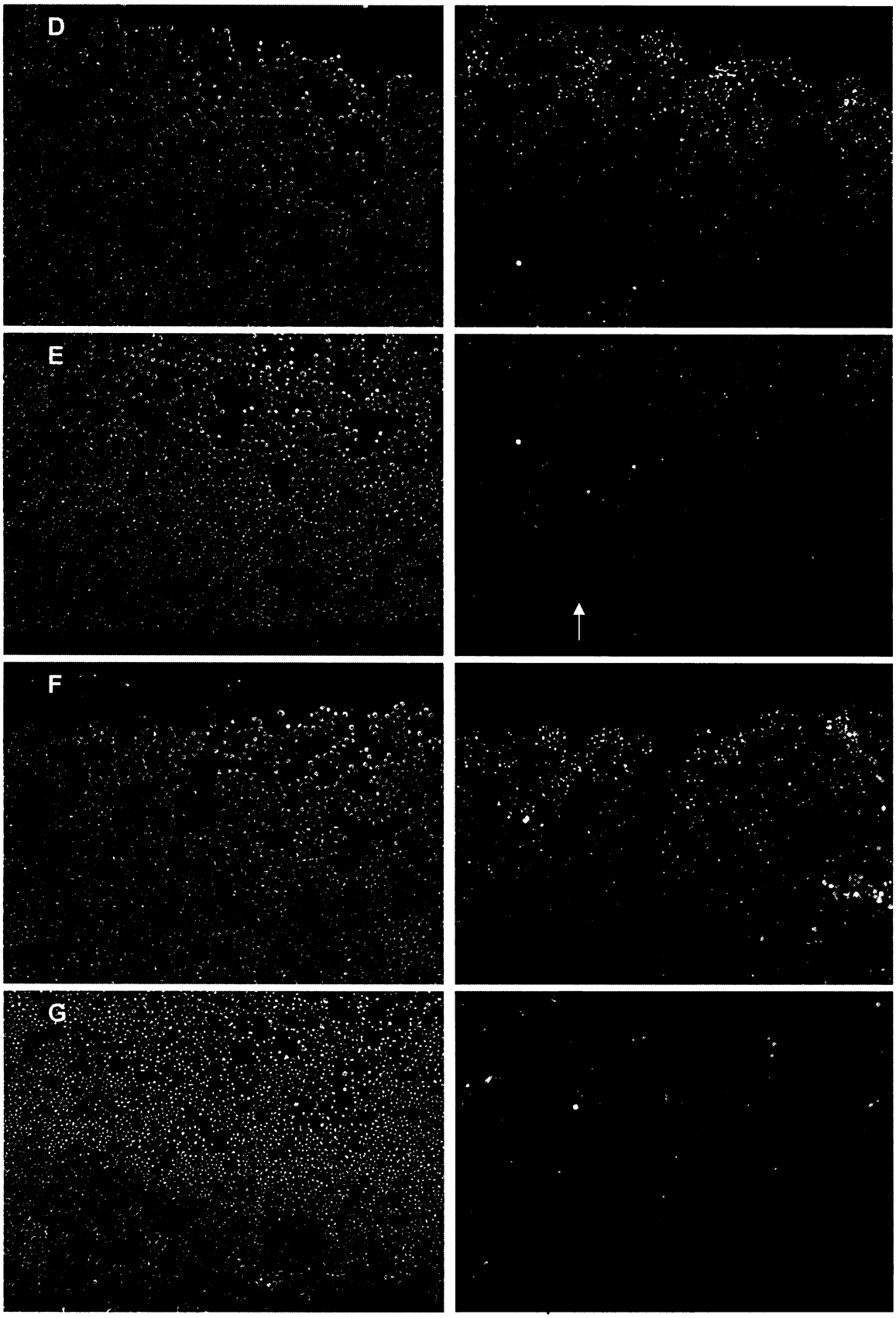
Objektiv 20x



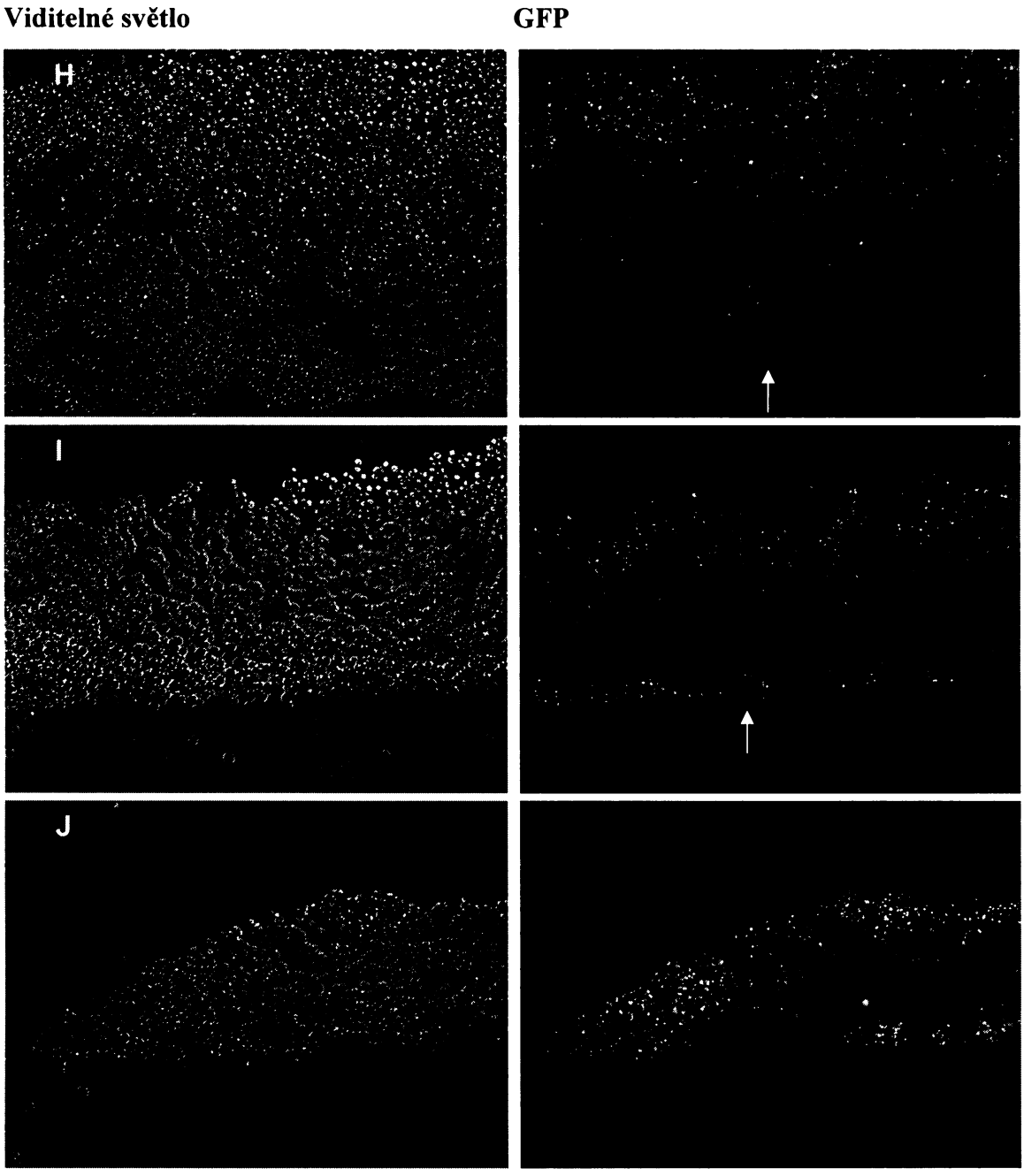
Obr. 38a Výměna opotřebované UV lampy mikroskopu umožnila pozorovat peroxizomální fluorescenci při menším zvětšení a získat tak názornější dokumentaci lokalizace peroxizómů v kolonii. A-C jsou snímky vnitřního okraje kolonie. A. všechny buňky obsahují peroxizómy B. peroxizómy přestávají zasahovat do spodní části kolonie (šipka) C. horní vrstva už je zcela odlišená

Obr. 38b **Střed kolonie D. horní vrstva v procházejícím světle a pod GFP filtrem E. spodní vrstva, šipkou je označen začátek vnitřní zóny kolonie, tvořené buňkami se silnou autofluorescencí F. horní vrstva G. spodní vrstva, zóna buněk s autofluorescencí už je plně rozvinuta.**

Viditelné světlo **GFP**



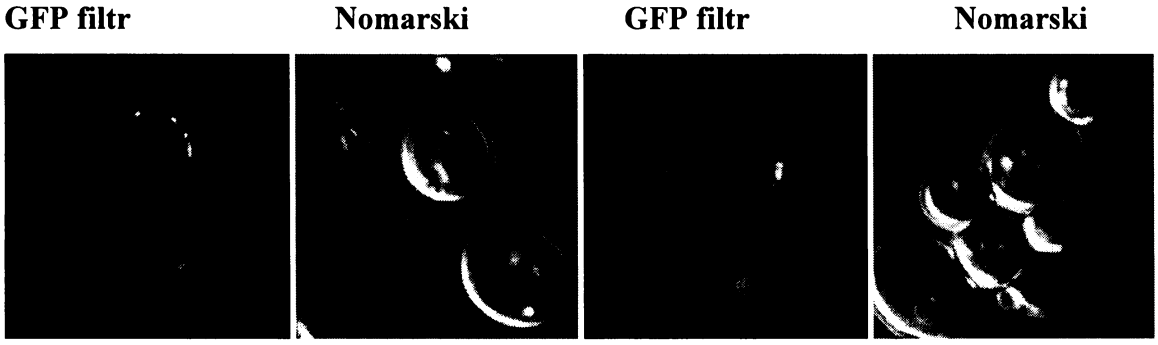
Obr. 38b



Obr. 38c peroxizómy na vnějším okraji kolonie. H. šipka ukazuje na konec vrstvy buněk s autofluorescencí I. šipka ukazuje na začátek spodní vrstvy obsahující peroxizómy J. samotný konec kolonie byl zřejmě mírně deformován při přípravě preparátů

Ve velmi starých koloniích (40-60 dní) se ve středových buňkách horní vrstvy objevují útvary připomínající peroxizómy, avšak větší a často protažené. Teprve suspenzní preparáty ze středu kolonie odhalily, že se jedná o shluky a řetízky

peroxizómů, zmíněné už v kapitole o vlastnostech tohoto kmene (4.2.2) (Obr. 39). Peroxizómy mohou zůstat těsně u sebe po dělení (LAZAROW, 2003), mohou být takto uspořádány pohybem po mikrotubulech (SCHRADER *et al.* 2000) nebo mohou být fyzicky propojeny a tvořit tak retikulární útvary (EDRMANN a BLOBEL 1995). Autoři těchto pozorování možné důvody takových uspořádání nevysvětlují. Není tedy jasné, proč se tyto útvary ve středu kolonie objevují, ani zda souvisí přímo s peroxizómy či spíše s celkovým uspořádáním a fyziologií buňky.



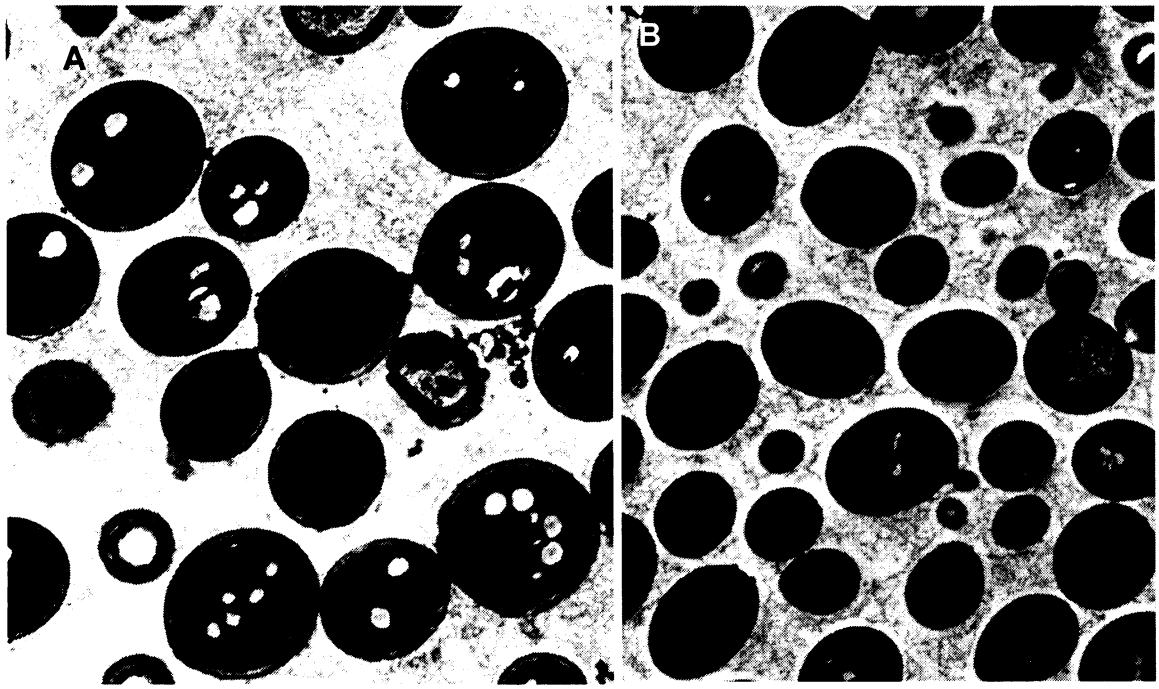
Obr. 39 Řetízky peroxizómů pozorované v kolonii staré 65 dní. Na Nomarského diferenciálním kontrastu není patrná kolokalizace řetízku s žádným útvarem. Objektiv 100x

4.7 Analýza struktury kvasinkové kolonie pomocí transmisní elektronové mikroskopie

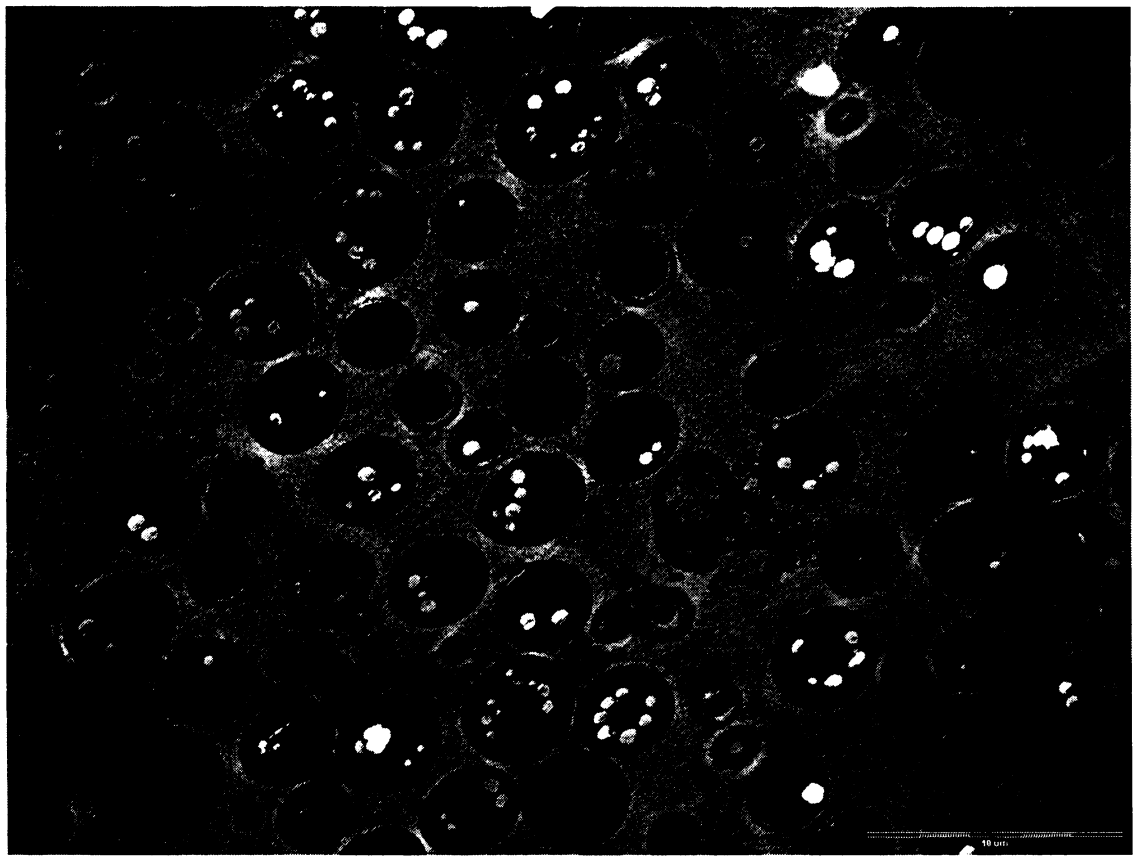
Odběry vzorků pro pozorování transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) jsem provedl 13. a 20. den vývoje kolonie, tedy v plně rozvinuté alkalické fázi, respektive na počátku druhé acidické fáze. V obou případech už byla pod světelným mikroskopem zřetelně odlišitelná horní vrstva buněk. Zpracování preparátu jako řezu kolonií zalité

v agaróze umožnilo toto uspořádání zachovat. Volil jsem fixaci glutaraldehydem a manganistanem draselným.

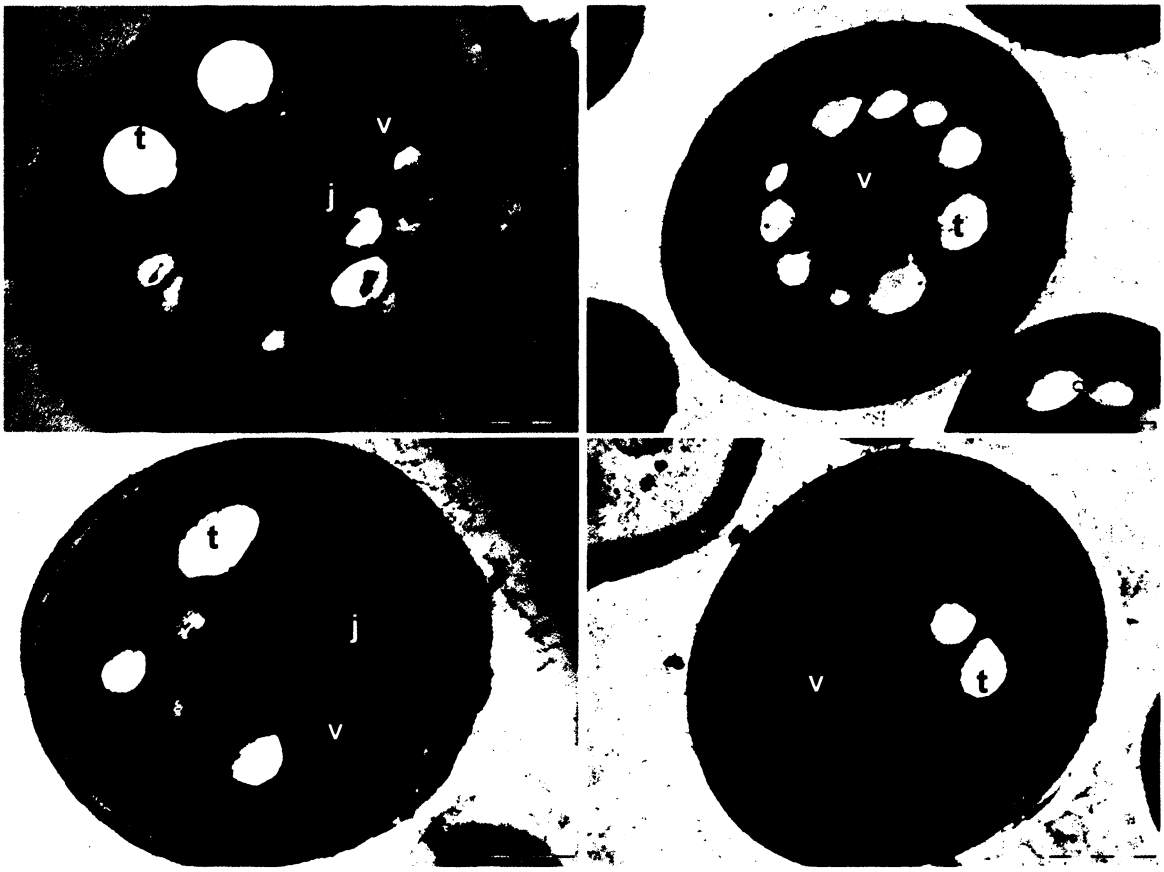
Buňky v horní vrstvě jsou zřetelně větší než je tomu ve vrstvě spodní (Obr. 40). Jejich velikost běžně dosahovala 5-7 μm. Obsah těchto buněk je poměrně bohatě strukturován způsobem podobným tomu, jaký je podle dostupných údajů běžný u kvasinek pěstovaných na glycerolovém médiu (WRIGHT, 2000). V buňkách je patrné velké jádro, jedna nebo více vakuol a několik mitochondrií. Větší vakuoly jsou často obklopeny množstvím elektrontransparentních váčků. Takový vzhled mají pod TEM často váčky s lipidy; v tom případě by zachycená situace mohla znamenat počátek utilizace buněčných zásob mastných kyselin (Obr. 41, 42).



Obr. 40 Porovnání velikosti buněk horní (A) a spodní (B) vrstvy. Obojí při shodném zvětšení 25000x



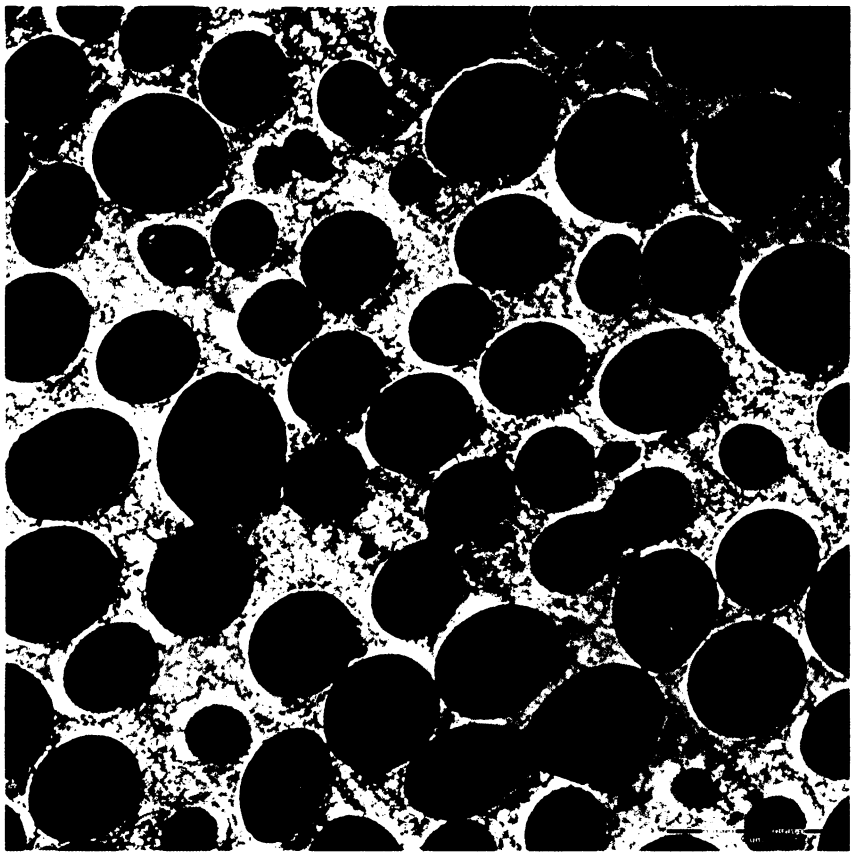
Obr. 41 **Typická populace buněk z horní části středu kolonie 13. dne. V buňkách jsou patrné transparentní váčky a tmavé vakuoly. Relativně hojně jsou zastoupeny odumřelé buňky. Úsečka odpovídá 10 μm.**



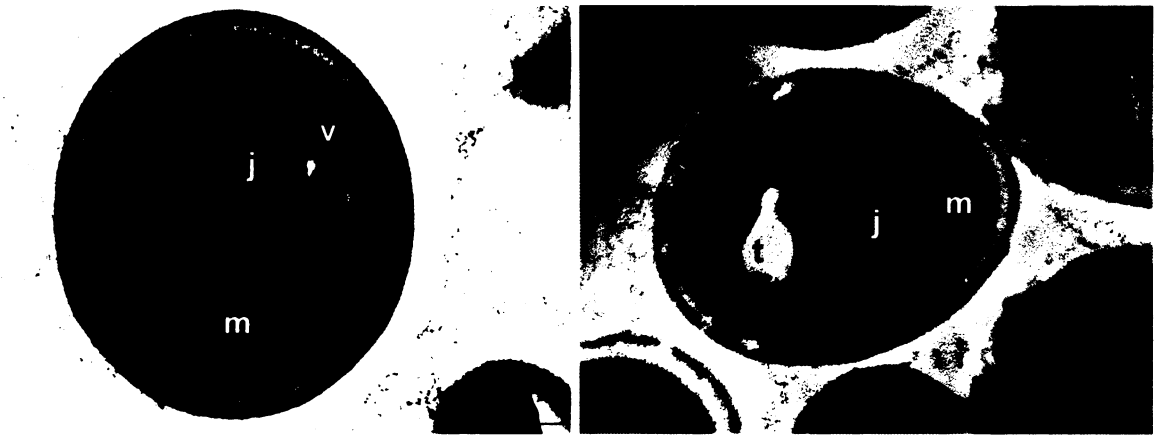
Obr. 42 Buňky horní části středu třináctidenní kolonie. v-vakuola t-transparentní váček j-jádro, m-mitochondrie. Úsečka odpovídá 1 μm

Buňky spodní vrstvy jsou oproti horním menší. Jejich vzhled je celkově tmavší, elektrondenznější, což znesnadňuje rozlišování buněčných komponent (Obr. 43, 44). Toto ztmavnutí vzniklo pravděpodobně v průběhu fixace manganistanem draselným, protože při použití jeho vyšší koncentrace podobně ztemněly i horní buňky. Je možné, že buňky spodní vrstvy jsou pro toto fixační činidlo permeabilnější, případně mohou obsahovat větší množství látek, které způsobují srážení manganistanu. Z rozeznatelných organel se zde nacházejí především mitochondrie (Obr. 44). Zabírají podstatný podíl objemu buňky, což je velký rozdíl oproti horní vrstvě. Nápadné je i to, že se ve spodními části kolonie dá nalézt jen minimum mrtvých a rozpadlých buněk. To by nasvědčovalo tomu, že přinejmenším do dvacátého dne vývoje kolonie mají buňky uzavřené v kolonii nižší úmrtnost než buňky na povrchu. Mezi spodními buňkami 13. a 20. dne nejsou patrné podstatné rozdíly. V TEM se však vždy dá prohlédnout jen velmi omezená část kolonie, což je při vyhodnocování výsledků vždy třeba brát v úvahu.

Nejspodnější vrstvu buněk se mi nepodařilo v TEM zaznamenat. Protože se v průběhu přípravy preparátu kolonie oddělila od podkladového agaru, mohla se tato vrstva při některé z manipulací snadno ztratit.

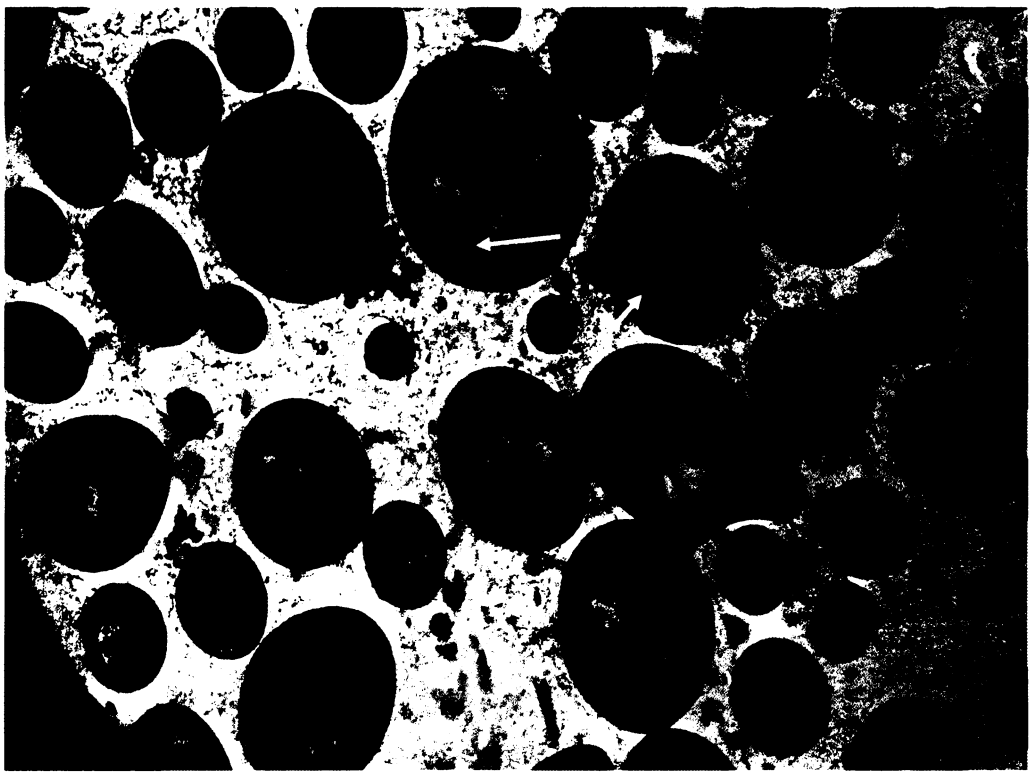


Obr. 43 Populace buněk ze spodní části kolonie 13. dne. Při takovémto zvětšení není v buňkách vidět celkem nic. Úsečka odpovídá 5 μm

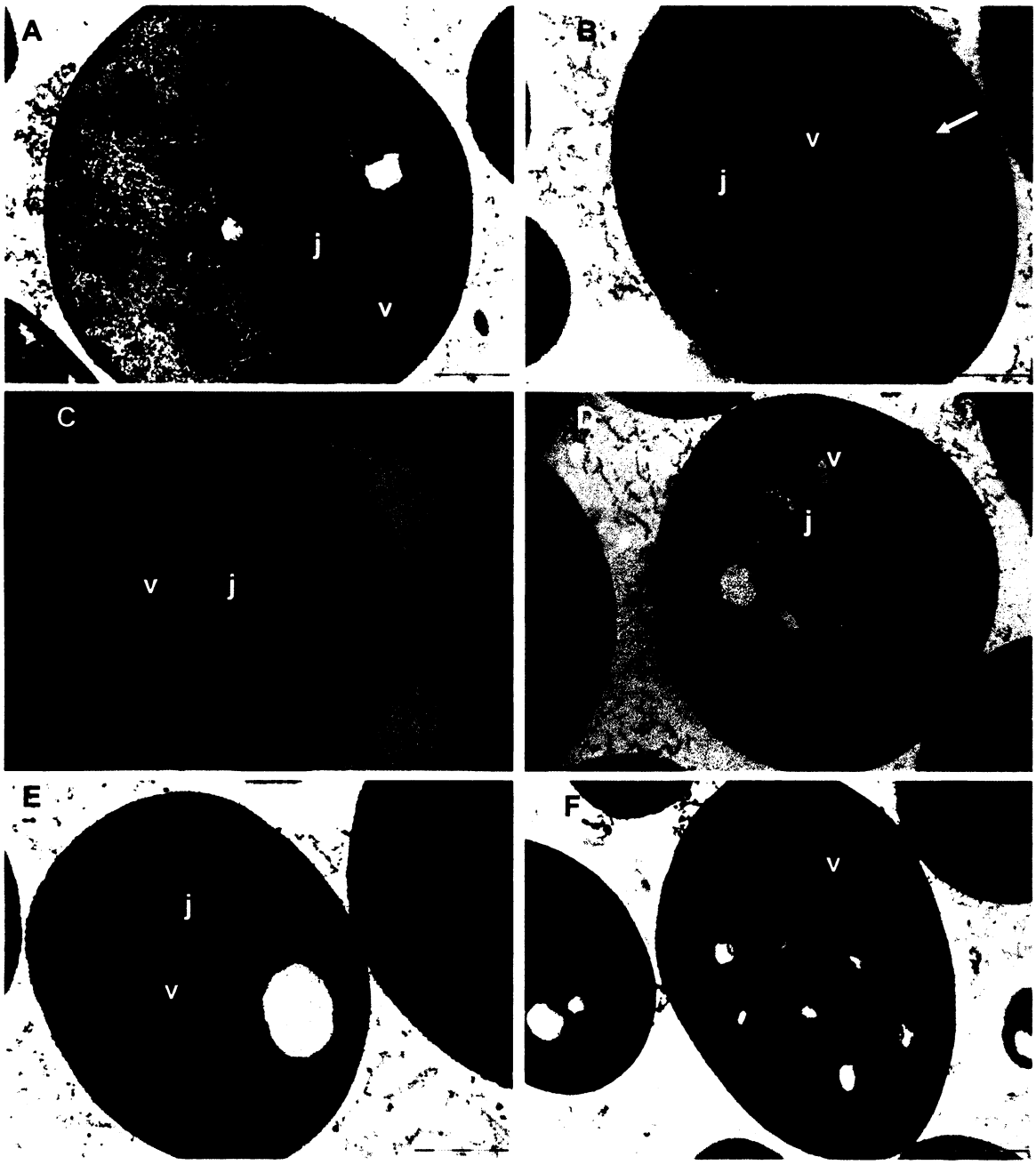


Obr. 44 Buňky ze spodní části kolonie 13. dne. Vzhledem k jejich velikosti je nápadné především množství mitochondrií. v-vakuola t-transparentní váček j- jádro, m-mitochondrie. Úsečka odpovídá 1 μm

U buněk horní vrstvy z 20. dne je pozorovatelná poměrně velká centrální organela obklopená množstvím menších organel, pravděpodobně vakuol (Obr. 45, 46). Velká organela by mohlo být jádro, ale pro definitivní průkaz bude potřeba provést další experimenty. Velké styčné plochy, kterými na tuto velkou organelu vakuoly těsně nasedají, by mohly by být průvodním jevem mikroautofágie jádra, při které se objevuje právě takové uspořádání (GOLDFARB *in* KLIONSKY 2003). Protože mikroautofágie jádra bývá indukována spolu s makroautofágií (MOSHKOVITZ *in* KLIONSKY 2003), není tato varianta nepravděpodobná. V žádné buňce se mi však nepodařilo zaznamenat kousky jádra pronikající do vakuoly, které by tuto hypotézu potvrdily. I v buňkách z dvacetidenní kolonie jsem pozoroval transparentní váčky s potenciálně lipidovým obsahem, často v těsné blízkosti vakuoly. U řady buněk je nápadná i zvýšená fragmentace vakuol a výskyt tmavších oblastí neurčitého tvaru v cytoplazmě (viz obrázek 45, 46B.). Tyto oblasti by mohly být i rozpadlým chromatinem uvolněným z rozpadlého jádra při regulovaném odumírání buněk. V některých buňkách starších kolonií byl chromatin pozorován (po barvení DAPI) rozprostřený přes velkou část buňky (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Opět i v tomto případě budou nutné další experimenty.



Obr. 45 Populace buněk horní části středu z 20. dne. Nápadná je především zvýšená fragmentace vakuol a výskyt tmavších oblastí neurčitého tvaru v cytoplazmě (viz šipky)



Obr. 46 Buňky horní části středu z 20. dne A-D mají velké množství fragmentovaných vakuol (v), v B je patrná denzní oblast cytoplazmy (šipka). E a F se podobají spíše buňkám z dřívějšího času. j-předpokládané jádro. Úsečka je 1 μm u A a B a 2 μm u C-F

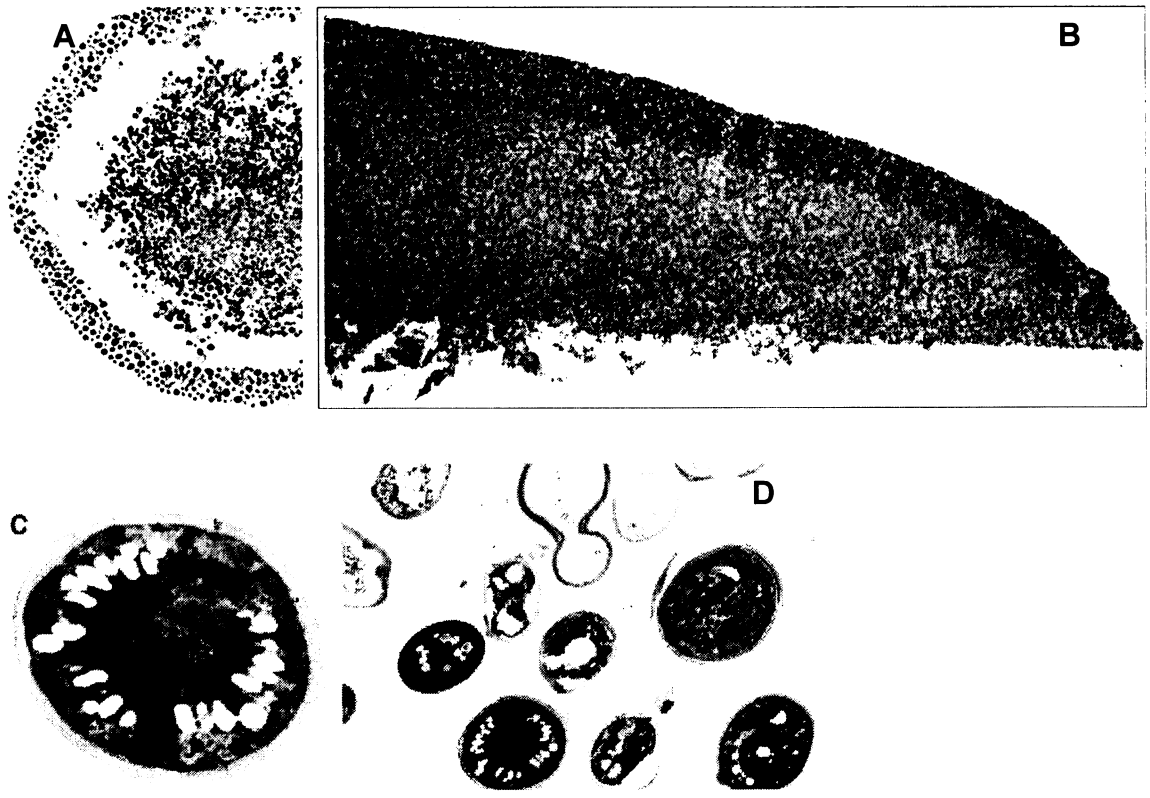
V buňkách horní vrstvy jsou pozorovatelné i další membránové útvary, jejich identifikace je však problematická. K dispozici je málo publikací s dostatečně kvalitní a rozsáhlou fotodokumentací, které by mohly s orientací v TEM pomoci a navíc se týkají převážně tekutých kultur. Takové určování organel by proto bylo vždy více či méně

nejisté vzhledem k tomu, že v diferencovaných buňkách kolonií můžeme očekávat i výskyt organel majících jinou fyziologii (a možná i ultrastrukturu) než je běžné v tekutých kulturách. Pro spolehlivou identifikaci autofagozómů, peroxizómů a dalších organel buněk kolonií bude v budoucnu nezbytné použití elektronové mikroskopie v kombinaci s imunodetekcí.

4.8 Úloha vrstev při vývoji kolonie

Uvedené výsledky potvrzují, že kvasinková kolonie není v průběhu svého vývoje homogenní. Její horní vrstva prochází při vstupu do alkalické fáze celkovou přeměnou. Ta zahrnuje indukci autofágie, peroxizómů a některé morfologické změny, pozorované v TEM. Navíc mají pravděpodobně buňky této vrstvy společnou řadu dalších, dosud nezjištěných charakteristik, které nebyly tématem této práce.

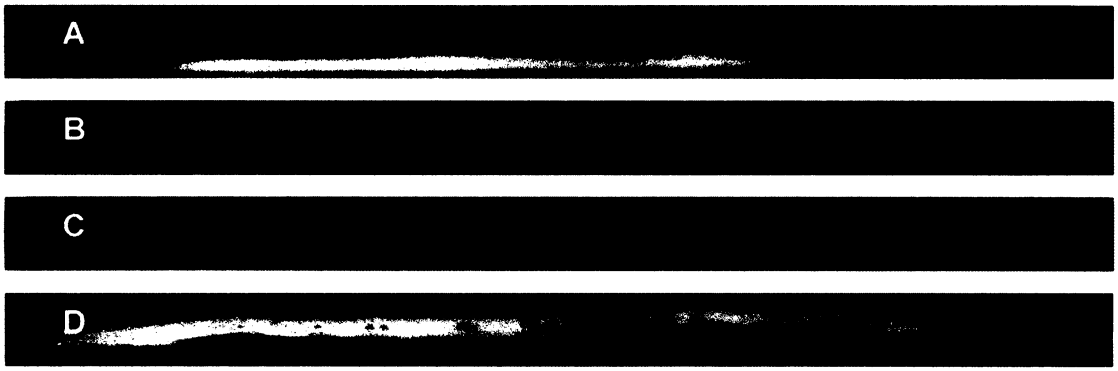
Na základě dosavadních výsledků nelze vyvodit, jaké má toto diferenciace příčiny nebo jaký je její význam pro dlouhodobé přežívání kolonie. V laboratoři Davida Engelberga byla popsána strukturovaná stopka („stalk") *Saccharomyces cerevisiae* (Obr. 47), která se skládá z obalové vrstvy a vnitřního „jádra". Vnější vrstva byla tvořena odlišným typem buněk, které byly větší než buňky jádra nebo nediferencované kolonie. Bylo mezi nimi větší množství mrtvých buněk a při analýze TEM v nich byla byly nalezeny transparentní váčky podobné těm, které jsem pozoroval v buňkách kolonie. Pro vnější vrstvu byla navržena funkce ochrany celé stopky . Podobně odlišenou vrstvu nalezli autoři i na povrchu kolonií netvořících stopku a navrhli pro ní analogickou funkci. Podrobněji se jejím výzkumem však nezabývali. (SCHERZ *et al.* 2001)



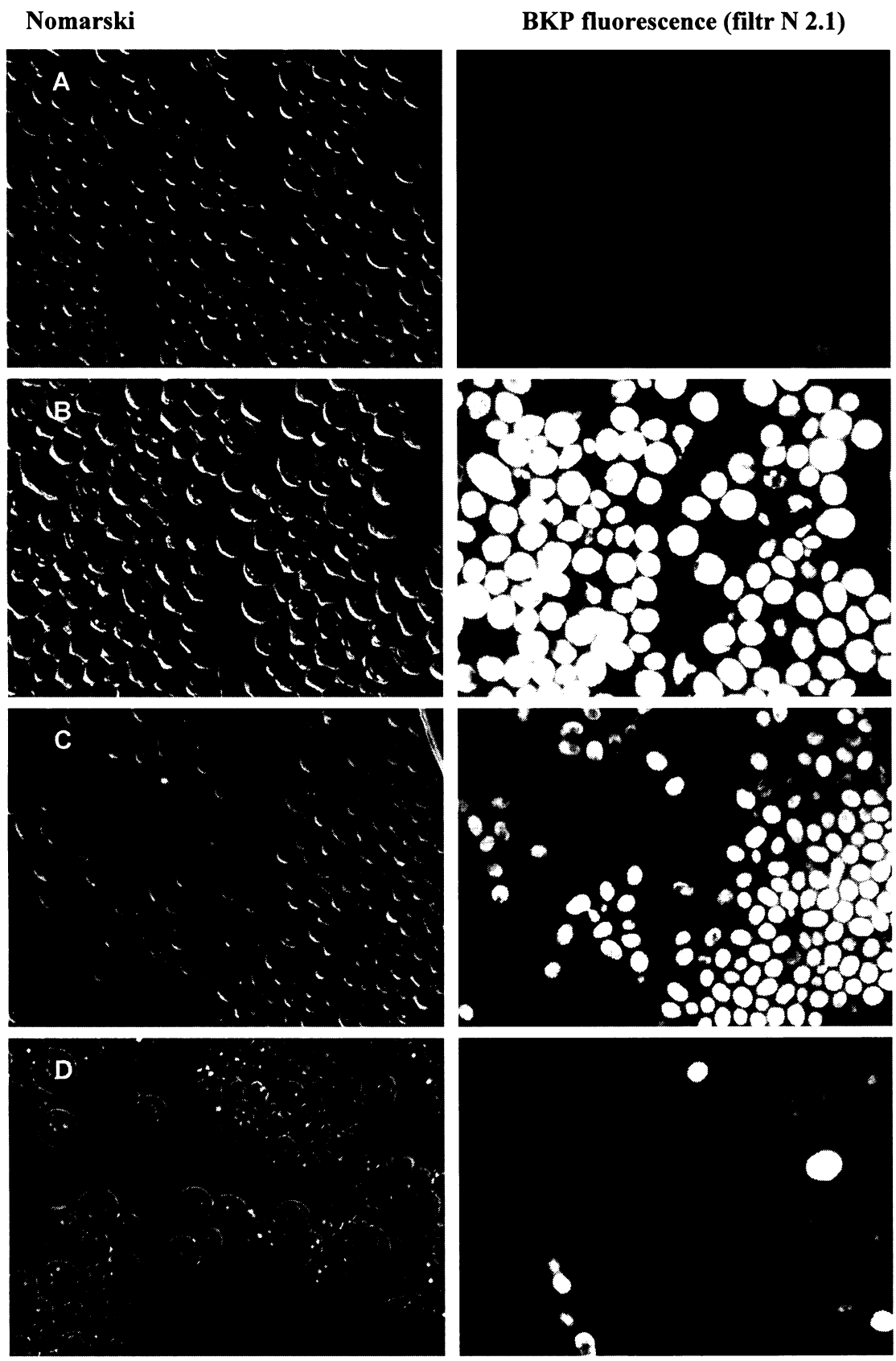
Obr. 47 Analýza kvasinkové kolonie. A. průřez plodničkou B. průřez kolonií C. a D. TEM snímky buněk z plodničky. (SCHERZ *et al.* 2001)

Svrchní vrstva buněk v kvasinkové kolonii (Obr. 47B.) (SCHERZ *et al.* 2001) se podobala vrstvě, kterou jsem na povrchu obřích kolonií kmene BY4742 pozoroval (např. obrázek 30). Je zde však značný rozdíl v celkových proporcích. Zatímco vrstva kolonie na obrázku 47B.(SCHERZ *et al.* 2001) skutečně pouze kryje povrch kolonie, horní vrstvy obřích kolonií BY742 představují podstatnou část biomasy kolonie (obr. 30) a tvoří v podstatě i celou vrstvu nově přirůstajícího okraje starších kolonií. V SCHERZ *et al.* 2001 se neuvádí, jak staré kolonie měly povrchovou vrstvu vytvořenou, což ztěžuje další srovnávání. Je otázkou, zda by se v průběhu evoluce mohl vyvinout a udržet mechanizmus investující za podmínek hladovění velkou část zbývající energie a živiny do růstu buněk nesoucích pouze ochrannou funkci. Výsledky analýzy obřích kolonií BY4742 ukazují, že přinejmenším buňky rostoucího kraje kolonie jsou živé a schopné dát vznik dále rostoucímu potomstvu (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Není proto možné, aby celá odlišná povrchová vrstva kolonií byla tvořena odumírajícími buňkami (tak jako povrchová vrstva kvasinkových stopek, (SCHERZ *et al.* 2001)) a měla pouze ochrannou funkci. Další úvahy o úloze této vrstvy komplikuje nemožnost jednoznačné interpretace barvení buněk BKP. Pokud bychom však přepokládali, že buňky silně obarvené BKP jsou v horším fyziologickém stavu než buňky nebarvené, pak by výsledky zjištěné na obřích koloniích nenasvědčovaly tomu, že by horní vrstva měla výrazně sníženou životaschopnost. Ve starých koloniích (40 dní a více) kmene BY4742 je BKP obarven jen malý podíl horních buněk a prakticky všechny buňky spodní. Naproti tomu kolonie se silně obarvenou horní vrstvou (kmeny s delecí v autofagických genech, kmen *sok2*) mají na BKP médiu spodní buňky obarvené mnohem méně (Obr. 48, 49, 50). Je tedy možné, že v daných kultivačních podmínkách je schopna dlouhodobě normálně přežívat jen určitá vrstva buněk a to preferenčně ty buňky, které jsou schopny přepnout svůj metabolizmus např. podle modelu uvedeném kapitole 2.1.2.2.1, což se u nich projevuje například indukcí peroxizómů a autofágie. Bylo by zajímavé vyzkoušet více různých podmínek kultivace a srovnat, zda se liší absolutní výška horní vrstvy buněk, její relativní výška vzhledem k výšce kolonie a jak rostou buňky pod ní. Rovněž nelze vyloučit, že tato horní vrstva je ještě dále diferencována a obsahuje buňky s různou funkcí, které ale nelze rozlišit na základě parametrů sledovaných v této práci (přítomnost peroxizómů, autofágie, barvení BKP). Využití kmenů nesoucích další metabolické proteiny značené

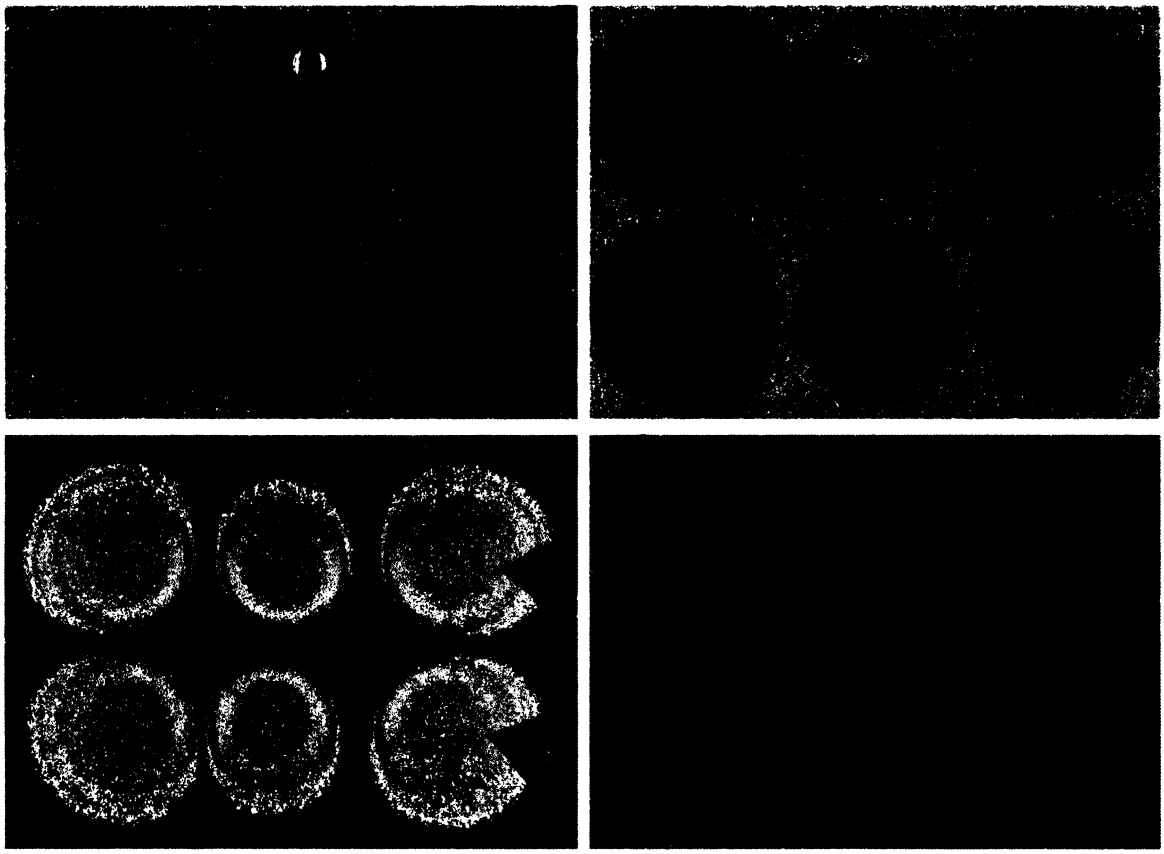
GFP i podrobnější analýzy této vrstvy pomocí elektronové mikroskopie a imunodetekce by mohly přinést přispět k objasnění této otázky.



Obr. 48 Řezy koloniemi 60. den A. *atg1* B. *sok2* C. BY4742 D. *S. cerevisiae ATG8*-GFP



Obr. 49 Buňky ze spodní části kolonií 67. den, suspenze: Nomarského kontrast a fluorescence BKP A. *atg8*, spodní vrstva B. *atg8*, svrchní vrstva C. BY 4742, spodní vrstva D. BY 4742, svrchní vrstva. Objektiv 100x



Obr. 50 **Makrokolonie kmene *atg8* a BY4742 70. den A. *atg8* shora B. *atg8* zespoda C. BY 4742 shora D. BY 4742 zespoda**

Vlastní vznik (a eventuelní další diferenciace) horní vrstvy buněk by mohl být určován vzdáleností buněk od rozhraní kolonie/vzduch a nikoli vzdáleností od podkladového agaru (tj. původního zdroje živin). Nutriční podmínky agaru by tedy mohly rozhodovat například o tom, kdy se kolonie začne diferencovat, ale v tvarování horní vrstvy by primární roli hrát nemusely. Ze vzdušných faktorů, které mohou ovlivnit horní vrstvy kolonie přichází nejspíše v úvahu kyslík a plynný amoniak. Protože kyslík je nezbytný pro metabolizmus závislý na β-oxidaci mastných kyselin, může být faktorem omezujícím hloubku horní buněčné vrstvy (charakteristické indukcí peroxizómů).

Lokalizaci autofágie v horní vrstvě kolonie lze vysvětlit z hlediska možné závislosti na gradientu kyslíku již hůře. Spodní buňky sice mohou částečně získávat živiny z odumřelých buněk v kolonii, není však pravděpodobné, že by ani po několika týdnech růstu kolonie nepociťovaly nedostatek živin. Autofagická aktivita se u nich přesto neobjevuje. Přímo na kyslíku sice autofágie nezávisí, některé její kroky však vyžadují ATP a jsou inhibovány AMP (PLOMP *et al.* 1989, YANG *et al.* 2005). Zvýšení poměru

AMP/ATP přitom může být průvodním jevem hypoxického stresu a blokovat autofágii ve spodních vrstvách buněk. V některých savčích tkáních však byla naopak pozorována aktivace autofágie za hypoxických podmínek (DAVID *et al.* 1992 *in* GOZUACICH a KIMCHI 2004). Vztah autofágie a kyslíku je tedy nejasný, navíc se zdá, že spodní vrstva buněk v kolonii se o indukci autofagie ani nepokouší, protože exprese genu *ATG8* by se mírně zvýšila i v případě, že by nadbytek AMP další průběh autofágie inhiboval. Výsledky barvení BKP také nenaznačují, že by v koloniích mutantních *atg* kmenů autofágie spodním buňkám scházela. Absence autofágie v horních vrstvách kolonie naproti tomu vede k zvýšenému barvení BKP. V této vrstvě by kyslík mohl působit jako zdroj oxidativního stresu a způsobovat problémy buňkám, které například nemohou odstraňovat zdroje kyslíkových radikálů autofágií. Výskyt autofágie v tenké nejspodnější vrstvě buněk s přístupem kyslíku pravděpodobně souviset nebude.

Vzhledem k rychlému nástupu autofágie a proliferace peroxizómů při zahájení alkalizace a jejich přesnému prostorovému vymezení v pozdějším čase se dá spekulovat o amoniaku jako faktoru urychlujícím a koordinujícím tuto diferenciaci. Bylo by zajímavé zjistit, zda nemůže právě část amoniakového signálu difundující agarem způsobit odlišení nejspodnější buněčné vrstvy. Mechanizmus účinku amoniaku na buňku je však neznámý a proto tyto spekulace prozatím zůstanou jen spekulacemi. Navíc není pravděpodobné, že by byl amoniakový signál dostupný pouze horním buňkám a tenké vrstvě buněk nejspodnějších, protože v některých jiných případech amoniak indukuje expresi genů v celé kolonii (např. indukce exprese genů kódujících potenciální exportéry amonných iontů Ato (ŘIČICOVÁ *et al.* 2006) . Diferenciace kolonie se zcela jistě účastní více signálů a faktorů.

4.9 Závěr

Tato práce přinesla poznatky týkající se struktury kolonie se zřetelem na peroxizómy a autofágii. V mnoha směrech má ovšem spíše charakter pilotní studie. Data o autofágii bude třeba podložit dalšími metodami, nejlépe biochemickými, a elektronovou mikroskopií kombinovanou s imunoznačením. Další odpovědi na otázky, jaké jsou mechanizmy diferenciace vrstev v kolonii a jaká je jejich funkce, bude možné získat jedině pomocí komplexnější analýzy struktury, biochemie a fyziologie kolonií z hlediska různých buněčných procesů, např. role mitochondrií, oxidativního stresu, anoxie, apoptotické buněčné smrti, intracelulárního pH, metabolizmu aminokyselin, mechanizmu

účinku amoniakové signalizace a dalších. Významné informace o možné úloze diferenciace kvasinkové kolonie v přírodě může přinést studium kvasinkových kmenů izolovaných z přírody. Laboratorní kmen BY4742 je vhodný pro široké spektrum genových a jiných manipulací, nicméně v řadě aspektů se chování jeho kolonií liší od chování kolonií přírodních kmenů. Například fakt, že je haploidní, znemožňuje sporulaci, která se může při dlouhodobém vývoji kolonie významně uplatnit.

4.10 Shrnutí

I. Připravil jsem kmen *S. cerevisiae* nesoucí peroxizómy značené GFP. Zjistil jsem silnou indukci peroxizómů při vstupu kolonie tohoto kmene do fáze produkce amoniaku a to převážně v horních vrstvách buněk kolonie.

II. Připravil jsem kmen, ve kterém lze zahájení autofágie monitorovat pomocí nárůstu GFP fluorescence. Pomocí tohoto kmene jsem zjistil silnou indukci autofágie při vstupu kolonie do fáze alkalizace v horních vrstvách buněk. Autofagická aktivita má tedy v kolonii přibližně stejnou lokalizaci a časování jako výskyt peroxizomů.

III. Vyzkoušel jsem několik technik transmisní elektronové mikroskopie a vybral techniku nejvhodnější pro analýzu buněk kvasinkových kolonií *in situ* na řezech kolonie. Pomocí vybrané techniky jsem provedl první charakterizace morfologií buněk z vrstev kolonie diferencovaných v průběhu jejího vývoje.

IV. Shrnul jsem současné znalosti týkající se autofágie, peroxizómů, „quorum sensing“ a amoniakové signalizace kvasinkových kolonií.

5 Literatura

Abeliovich, H., Dunn, W. A., Jr., Kim, J. and Klionsky, D. J. (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps *J Cell Biol* **151**(5): 1025-34.

Abeliovich, H. and Klionsky, D. J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(3): 463-79, table of contents.

Abeliovich, H., Zhang, C., Dunn, W. A., Jr., Shokat, K. M. and Klionsky, D. J. (2003) Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy *Mol Biol Cell* **14**(2): 477-90.

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death *Nature* **431**(7010): 805-10.

Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome *J Cell Biol* **139**(7): 1687-95.

Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. and Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization *J Cell Biol* **124**(6): 903-13.

Barth, H. and Thumm, M. (2001) A genomic screen identifies AUT8 as a novel gene essential for autophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae *Gene* **274**(1-2): 151-6.

Bassler, B. L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing *Curr Opin Microbiol* **2**(6): 582-7.

Bassler, B. L., Greenberg, E. P. and Stevens, A. M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium Vibrio harveyi *J Bacteriol* **179**(12): 4043-5.

Bellu, A. R. and Kiel, J. A. (2003) Selective degradation of peroxisomes in yeasts *Microsc Res Tech* **61**(2): 161-70.

Biederbick, A., Kern, H. F. and Elsasser, H. P. (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles *Eur J Cell Biol* **66**(1): 3-14.

Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. and Kolter, R. (2001) Fruiting body formation by Bacillus subtilis *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11621-6.

Brocard, C., Lametschwandtner, G., Koudelka, R. and Hartig, A. (1997) Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p *Embo J* **16**(18): 5491-500.

Brown, L. A. and Baker, A. (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import *J Cell Mol Med* **7**(4): 388-400.

Camougrand, N., Kissova, I., Velours, G. and Manon, S. (2004) Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death *FEMS Yeast Res* **5**(2): 133-40.

David, H., Ellermann, J. and Uerlings, I. (1992) Primary phase of hepatocytic autophagocytosis under ischaemic conditions *Exp Toxicol Pathol* **44**(2): 74-80, citováno podle Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism *Oncogene* **23**(16): 2891-906.

Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R. and Butow, R. A. (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction *Mol Biol Cell* **12**(2): 297-308.

Eskelinen, E. L. (2005) Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1468-72.

Farre, J. C. and Subramani, S. (2004) Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process *Trends Cell Biol* **14**(9): 515-23.

Federle, M. J. and Bassler, B. L. (2003) Interspecies communication in bacteria *J Clin Invest* **112**(9): 1291-9.

Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae *Gene* **192**(2): 207-13.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators *J Bacteriol* **176**(2): 269-75.

Gasch, A. P. and Werner-Washburne, M. (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation *Funct Integr Genomics* **2**(4-5): 181-92.

Goldfarb, D. S. (2003), citováno z Klionsky, D. J. (2003)(Ed.) Autophagy *Landes Bioscience*, Texas

Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism *Oncogene* **23**(16): 2891-906.

Gunkel, K., van der Klei, I. J., Barth, G. and Veenhuis, M. (1999) Selective peroxisome degradation in Yarrowia lipolytica after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media *FEBS Lett* **451**(1): 1-4.

Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I. and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages *Cell* **119**(6): 753-66.

Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M. and Ohsumi, Y. (2005) Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast *Traffic* **6**(1): 56-65.

Hamasaki, M., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2003) The early secretory pathway contributes to autophagy in yeast *Cell Struct Funct* **28**(1): 49-54.

Hettema, E. H., Distel, B. and Tabak, H. F. (1999) Import of proteins into peroxisomes *Biochim Biophys Acta* **1451**(1): 17-34.

Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J. and Gurvitz, A. (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast Saccharomyces cerevisiae *FEMS Microbiol Rev* **27**(1): 35-64.

Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. and Nickerson, K. W. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol *Appl Environ Microbiol* **67**(7): 2982-92.

Huang, P. H. and Chiang, H. L. (1997) Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway *J Cell Biol* **136**(4): 803-10.

Huang, W. P. and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery *Cell Struct Funct* **27**(6): 409-20.

Huang, W. P., Scott, S. V., Kim, J. and Klionsky, D. J. (2000) The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways *J Biol Chem* **275**(8): 5845-51.

Hutchins, M. U., Veenhuis, M. and Klionsky, D. J. (1999) Peroxisome degradation in Saccharomyces cerevisiae is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway *J Cell Sci* **112 (Pt 22)**: 4079-87.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. and Fink, G. R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 5048-52.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. and Hughson, F. M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron *Nature* **415**(6871): 545-9.

Cheong, H., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis, J. E., Wang, C. W. and Klionsky, D. J. (2005) Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response *Mol Biol Cell* **16**(7): 3438-53.

Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001) Autophagosome requires

specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion *Mol Biol Cell* **12**(11): 3690-702.

Juhasz, G. and Neufeld, T. P. (2006) Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source *PLoS Biol* **4**(2): e36.

Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M. and Ohsumi, Y. (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy *Mol Biol Cell* **16**(5): 2544-53.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation *J Cell Sci* **117**(Pt 13): 2805-12.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex *J Cell Biol* **150**(6): 1507-13.

Kamada, Y., Sekito, T. and Ohsumi, Y. (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation *Curr Top Microbiol Immunol* **279**: 73-84.

Kaplan, H. B. and Greenberg, E. P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the Vibrio fischeri luminescence system *J Bacteriol* **163**(3): 1210-4.

Khalfan, W. A. and Klionsky, D. J. (2002) Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in S. cerevisiae *Curr Opin Cell Biol* **14**(4): 468-75.

Kihara, D. and Kanehisa, M. (2000) Tandem clusters of membrane proteins in complete genome sequences *Genome Res* **10**(6): 731-43.

Kim, J., Dalton, V. M., Eggerton, K. P., Scott, S. V. and Klionsky, D. J. (1999) Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways *Mol Biol Cell* **10**(5): 1337-51.

Kim, J., Huang, W. P. and Klionsky, D. J. (2001) Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex *J Cell Biol* **152**(1): 51-64.

Kim, J. and Klionsky, D. J. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells *Annu Rev Biochem* **69**: 303-42.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast *J Cell Biol* **147**(2): 435-46.

Kirkegaard, K., Taylor, M. P. and Jackson, W. T. (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms *Nat Rev Microbiol* **2**(4): 301-14.

Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S. and Camougrand, N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria *J Biol Chem* **279**(37): 39068-74.

Klionsky, D. J. (1997) Protein transport from the cytoplasm into the vacuole *J Membr Biol* **157**(2): 105-15.

Klionsky, D. J. (2003)(Ed.) Autophagy *Landes Bioscience*, Texas

Klionsky, D. J. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions *J Cell Sci* **118**(Pt 1): 7-18.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes *Dev Cell* **5**(4): 539-45.

Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation *Science* **290**(5497): 1717-21.

Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 1-32.

Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation *Trends Cell Biol* **10**(12): 524-30.

Kruppa, M., Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F. and Calderone, R. (2004) The histidine kinases of Candida albicans: regulation of cell wall mannan biosynthesis *FEMS Yeast Res* **4**(4-5): 409-16.

Kugler, S., Schurtz Sebghati, T., Groppe Eissenberg, L. and Goldman, W. E. (2000) Phenotypic variation and intracellular parasitism by histoplasma Capsulatum *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8794-8.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. and Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period *Nature* **432**(7020): 1032-6.

Kundu, M. and Thompson, C. B. (2005) Macroautophagy versus mitochondrial autophagy: a question of fate? *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1484-9.

Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z. (2002): Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* colonies is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* **47**.

Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M. and Thumm, M. (2000) Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9 *J Bacteriol* **182**(8): 2125-33.

Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H. and Thumm, M. (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole *Embo J* **17**(13): 3597-607.

Lazarow, P. B. (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 489-97.

Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Glozman, R. and Elazar, Z. (2000) Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes *J Biol Chem* **275**(42): 32966-73.

Lemasters, J. J. (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging *Rejuvenation Res* **8**(1): 3-5.

Levine, B. (2003) Autophagy in development, tumor suppression, and innate immunity *Harvey Lect* **99**: 47-76.

Levine, B. (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense *Cell* **120**(2): 159-62.

Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy *Dev Cell* **6**(4): 463-77.

Levine, B. and Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**(10): 2679-88.

Locke, M. (1994) Preservation and contrast without osmication or section staining *Microsc Res Tech* **29**(1): 1-10.

Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein *Microbiology* **145 (Pt 2)**: 283-91.

Marino, G. and Lopez-Otin, C. (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology *Cell Mol Life Sci* **61**(12): 1439-54.

Martin, D. E. and Hall, M. N. (2005) The expanding TOR signaling network *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 158-66.

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae *Gene* **192**(2): 245-50.

Meiling-Wesse, K., Bratsika, F. and Thumm, M. (2004) ATG23, a novel gene required for maturation of proaminopeptidase I, but not for autophagy *FEMS Yeast Res* **4**(4-5): 459-65.

Miller, M. B. and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-99.

Minarikova, L., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. and Palkova, Z. (2001) Differentiated gene expression in cells within yeast colonies *Exp Cell Res* **271**(2): 296-304.

Mizushima, N. (2004) Methods for monitoring autophagy *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2491-502.

Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1535-41.

Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway *Embo J* **18**(14): 3888-96.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy *Nature* **395**(6700): 395-8.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker *Mol Biol Cell* **15**(3): 1101-11.

Mortimore, G. E. and Poso, A. R. (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply *Annu Rev Nutr* **7**: 539-64.

Moshkovitz (2003), citováno podle Klionsky, D. J. (2003)(Ed.) Autophagy *Landes Bioscience*, Texas

Munafo, D. B. and Colombo, M. I. (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation *J Cell Sci* **114**(Pt 20): 3619-29.

Nair, U. and Klionsky, D. J. (2005) Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast *J Biol Chem* **280**(51): 41785-8.

Nealson, K. H., Platt, T. and Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system *J Bacteriol* **104**(1): 313-22.

Nice, D. C., Sato, T. K., Stromhaug, P. E., Emr, S. D. and Klionsky, D. J. (2002) Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-

autophagosomal structure is required for selective autophagy *J Biol Chem* **277**(33): 30198-207.

Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways *J Cell Biol* **148**(3): 465-80.

Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1995) Novel system for monitoring autophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae *Biochem Biophys Res Commun* **210**(1): 126-32.

Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast *J Biol Chem* **273**(7): 3963-6.

Noda, T., Suzuki, K. and Ohsumi, Y. (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure *Trends Cell Biol* **12**(5): 231-5.

Ohsumi, Y. (1999) Molecular mechanism of autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1389): 1577-80; discussion 1580-1.

Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 211-6.

Ohsumi, Y. and Mizushima, N. (2004) Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 231-6.

Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2004) Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae *J Biol Chem* **279**(16): 16071-6.

Palkova, Z. (2004) Multicellular microorganisms: laboratory versus nature *EMBO Rep* **5**(5): 470-6.

Palkova, Z., Devaux, F., Icicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S. and Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development *Mol Biol Cell* **13**(11): 3901-14.

Palkova, Z. and Forstova, J. (2000) Yeast colonies synchronise their growth and development *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**: 1923-8.

Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M. and Forstova, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies *Nature* **390**(6659): 532-6.

Palkova, Z. and Vachova, L. (2003) Ammonia signaling in yeast colony formation *Int Rev Cytol* **225**: 229-72.

Palmieri, L., Lasorsa, F. M., Iacobazzi, V., Runswick, M. J., Palmieri, F. and Walker, J. E. (1999) Identification of the mitochondrial carnitine carrier in Saccharomyces cerevisiae *FEBS Lett* **462**(3): 472-6.

Plomp, P. J., Gordon, P. B., Meijer, A. J., Hoyvik, H. and Seglen, P. O. (1989) Energy dependence of different steps in the autophagic-lysosomal pathway *J Biol Chem* **264**(12): 6699-704.

Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., di Rago, J. P. and Martinou, J. C. (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast *Cell Death Differ.*

Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. (2001) Peroxisome biogenesis *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 701-52.

Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell *Eukaryot Cell* **1**(1): 11-21.

Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2005) Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* **17**(4): 415-22.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Shintani, T. and Klionsky, D. J. (2005) The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast Saccharomyces cerevisiae *Mol Biol Cell* **16**(12): 5843-56.

Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J. (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure *Dev Cell* **6**(1): 79-90.

Rice, S. A., Givskov, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. (1999) Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(1): 23-31.

Řičicová M., Váchová L., Palková Z. (2006) Ammonia induces synthesis of raft-localised yeast Ato transporters, while pH affects Ato1p raft aggregation (v tisku)

Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism *J Cell Biol* **138**(1): 37-44.

Scott, S. V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J. and Klionsky, D. J. (2001) Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway *Mol Cell* **7**(6): 1131-41.

Scott, S. V., Nice, D. C., 3rd, Nau, J. J., Weisman, L. S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (2000) Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting *J Biol Chem* **275**(33): 25840-9.

Shintani, T. and Klionsky, D. J. (2004) Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway *J Biol Chem* **279**(29): 29889-94.

Shintani, T., Suzuki, K., Kamada, Y., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001) Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure *J Biol Chem* **276**(32): 30452-60.

Scherz, R., Shinder, V. and Engelberg, D. (2001) Anatomical analysis of Saccharomyces cerevisiae stalk-like structures reveals spatial organization and cell specialization *J Bacteriol* **183**(18): 5402-13.

Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M. and Wolf, D. H. (1994) Site of catabolite inactivation *Nature* **369**(6478): 283-4.

Schrader, M., King, S. J., Stroh, T. A. and Schroer, T. A. (2000) Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**: 3663-71.

Schweichel, J. U. and Merker, H. J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues *Teratology* **7**(3): 253-66.

Silva, M. T., Sousa, J. C., Polonia, J. J., Macedo, M. A. and Parente, A. M. (1976) Bacterial mesosomes. Real structures or artifacts? *Biochim Biophys Acta* **443**(1): 92-105.

Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy *Traffic* **2**(8): 524-31.

Subramani, S. (2001) Self-destruction in the line of duty *Dev Cell* **1**(1): 6-8.

Suzuki, K., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2004) Interrelationships among Atg proteins during autophagy in Saccharomyces cerevisiae *Yeast* **21**(12): 1057-65.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction *J Cell Biol* **119**(2): 301-11.

Teter, S. A., Eggerton, K. P., Scott, S. V., Kim, J., Fischer, A. M. and Klionsky, D. J. (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase *J Biol Chem* **276**(3): 2083-7.

Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy *Microsc Res Tech* **51**(6): 563-72.

Titorenko, V. I., Keizer, I., Harder, W. and Veenhuis, M. (1995) Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast Hansenula polymorpha *J Bacteriol* **177**(2): 357-63.

Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1528-34.

Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae *FEBS Lett* **333**(1-2): 169-74.

Tucker, K. A., Reggiori, F., Dunn, W. A., Jr. and Klionsky, D. J. (2003) Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy *J Biol Chem* **278**(48): 48445-52.

Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C. and Palkova, Z. (2004) Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of Saccharomyces cerevisiae colonies *J Biol Chem* **279**(36): 37973-81.

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

van den Bosch, H., Schutgens, R. B., Wanders, R. J. and Tager, J. M. (1992) Biochemistry of peroxisomes *Annu Rev Biochem* **61**: 157-97.

van der Klei, I. J. and Veenhuis, M. (1997) Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle *Trends Microbiol* **5**(12): 502-9.

van der Zand, A., Braakman, I., Geuze, H. J. and Tabak, H. F. (2006) The return of the peroxisome *J Cell Sci* **119**(Pt 6): 989-94.

van Roermund, C. W., de Jong, M., L, I. J., van Marle, J., Dansen, T. B., Wanders, R. J. and Waterham, H. R. (2004) The peroxisomal lumen in Saccharomyces cerevisiae is alkaline *J Cell Sci* **117**(Pt 18): 4231-7.

van Roermund, C. W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J. and Tabak, H. F. (1995) The membrane of peroxisomes in Saccharomyces cerevisiae is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions *Embo J* **14**(14): 3480-6.

van Roermund, C. W., Tabak, H. F., van Den Berg, M., Wanders, R. J. and Hettema, E. H. (2000) Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in Saccharomyces cerevisiae *J Cell Biol* **150**(3): 489-98.

Veenhuis, M., Kiel, J. A. and Van Der Klei, I. J. (2003) Peroxisome assembly in yeast *Microsc Res Tech* **61**(2): 139-50.

Veenhuis, M., Salomons, F. A. and Van Der Klei, I. J. (2000) Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis *Microsc Res Tech* **51**(6): 584-600.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L. and Muller, F. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans *Nature* **426**(6967): 620, citováno podle Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy *Dev Cell* **6**(4): 463-77.

Wang, C. W., Kim, J., Huang, W. P., Abeliovich, H., Stromhaug, P. E., Dunn, W. A., Jr. and Klionsky, D. J. (2001) Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways *J Biol Chem* **276**(32): 30442-51.

Wang, C. W. and Klionsky, D. J. (2003) The molecular mechanism of autophagy *Mol Med* **9**(3-4): 65-76.

Wang, L., Seeley, E. S., Wickner, W. and Merz, A. J. (2002) Vacuole fusion at a ring of vertex docking sites leaves membrane fragments within the organelle *Cell* **108**(3): 357-69.

Waterham, H. R. and Cregg, J. M. (1997) Peroxisome biogenesis *Bioessays* **19**(1): 57-66.

Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. and Kjelleberg, S. (2003) Cell death in Pseudomonas aeruginosa biofilm development *J Bacteriol* **185**(15): 4585-92.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. and Salmond, G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria *FEMS Microbiol Rev* **25**(4): 365-404.

Wood, J. I. and Klomparens, K. L. (1993) Characterization of agaróze as an encapsulation medium for particulate specimens for transmission electron microscopy *Microsc Res Tech* **25**(4): 267-75.

Wright, R. (2000) Transmission electron microscopy of yeast *Microsc Res Tech* **51**(6): 496-510.

Xavier, K. B. and Bassler, B. L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game *Curr Opin Microbiol* **6**(2): 191-7.

Yang, Y. P., Liang, Z. Q., Gu, Z. L. and Qin, Z. H. (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy *Acta Pharmacol Sin* **26**(12): 1421-34.

Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005) Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway *Mol Biol Cell* **16**(4): 1593-605.

Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1542-52.

Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. and Lenardo, M. J. (2004a) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 *Science* **304**(5676): 1500-2.

Yu, L., Lenardo, M. J. and Baehrecke, E. H. (2004b) Autophagy and caspases: a new cell death program *Cell Cycle* **3**(9): 1124-6.

Zikanova, B., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. and Palkova, Z. (2002) Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies *Biochem Biophys Res Commun* **294**(5): 962-7.