

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Bakalářská práce

Buněčné mechanismy zajišťující vysokou osmotoleranci kvasinky

***Zygosaccharomyces rouxii* ve srovnání s několika dalšími druhy.**

Markéta Andršová

Školitel: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha 2009

Prohlášení:

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma „Buněčné mechanismy zajišťující vysokou osmotoleranci kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii* ve srovnání s několika dalšími druhy“ jsem vypracovala sama pouze na základě uvedeného seznamu použité literatury a konzultací se svou školitelkou RNDr. Hanou Sychrovou, DrSc.

Praha 2009

Markéta Andršová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za veškerou pomoc při zpracovávání mé bakalářské práce, ochotu a trpělivost. Poděkovat chci také RNDr. Františkovi Půtovi, CSc. za mnohé cenné rady, které mi poskytl.

ABSTRAKT

Kvasinky jsou nepohyblivé eukaryotické a typicky jednobuněčné organismy patřící mezi houby, vyskytující se v mnoha rozmanitých prostředích planety. Některé druhy mají obzvlášť dobře vyvinuté mechanismy reakcí na změny prostředí, zejména změny vodní aktivity, a snadno se jim přizpůsobují. Příkladem je *Zygosaccharomyces rouxii*, osmotolerantní kvasinka ze třídy *Hemiascomycetes*, blízkce příbuzná kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Pro kvasinky typický způsob obrany proti těmto změnám je regulace syntézy, akumulace a exportu glycerolu jako intracelulárního osmolytu pro vyrovnání rozdílu osmolarity uvnitř a vně buňky. Syntéza je zajišťována expresí genů aktivovaných MAP kinázovou drahou a přenos glycerolu zprostředkovávají aktivní i pasivní transportní systémy. Aktivní je zprostředkováván symportem s Na^+ nebo H^+ , pasivní kanálovým proteinem Fps1. Pokud je osmotický tlak okolí způsoben přítomností vysoké koncentrace solí, kvasinky v odpověď na stres zapojují také aktivní exportéry kationtů alkalických kovů, ATPázy a antiportery využívající H^+ .

Objasnění všech mechanismů přispívajících k vysoké osmotoleranci některých druhů kvasinek by mohlo být významným krokem pro různé biotechnologie využívající klasické kvasinkové druhy.

Klíčová slova: kvasinky, *Zygosaccharomyces rouxii*, osmotolerance, glycerol, membránový transport.

ABSTRACT

Yeasts are non-moving eucaryotic and typically unicellular organisms ranked among Funghi that are found in many various surroundings. Some species have especially well developed mechanisms of reactions to changes of the environment, mainly changes in water activity, and adapt to them easily. The example is *Zygosaccharomyces rouxii*, an osmotolerant yeast from the *Hemiascomycetes* class, closely related to *Saccharomyces cerevisiae*. In yeasts, typical way of defence against changes in osmolarity is the regulation of synthesis, accumulation and export of glycerol as an intracellular osmolyte. Glycerol counterbalances the difference of osmolarity in and out the cell. Synthesis is ensured by expression of genes activated due to MAP kinase pathway, and transport across the plasmatic membrane is mediated by both active and passive transport systems. Active is ensured by symport with Na^+ or H^+ , passive by channel protein Fps1. If the osmotic shock is mediated by an increased concentration of salts, yeast cells use, as a part of their answer to osmotic stress, active exporters of alkali metal cations, ATPases and H^+ antiporters.

Export of alkalic metal cations from the cell also works by both types of mechanisms, in this case antiport always employs H^+ . Elucidation of all the mechanisms contributing to high osmotolerance of some yeasts could be the great step for different biotechnological processes employing classical yeast species.

Keywords: yeasts, *Zygosaccharomyces rouxii*, osmotolerance, glycerol, membrane transport.

OBSAH:

1. Úvod	8
2. Charakterizace kvasinek	9
2. 1. Zařazení do systému, metabolismus, způsob rozmnožování	9
2. 2. Životní prostor.....	9
2. 3. Význam pro člověka.....	10
3. Kvasinky a osmotolerance	11
3. 1. Vodní aktivita, osmotolerance	11
3. 2. Kvasinky a osmotolerance.....	11
3. 2. 1. Produkce glycerolu.....	12
3. 2. 1. 1. Reakce <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> na osmotický stres.....	13
3. 2. 2. Senzory osmotického stresu, MAP kinázová dráha v <i>S. cerevisiae</i> a <i>Z. rouxii</i>	14
3. 2. 3. Pasivní transport glycerolu - protein Fps1 v <i>S. cerevisiae</i> , jeho homolog v <i>Z. rouxii</i>	15
3. 2. 3. 1. Charakterizace kanálů MIP.....	16
3. 2. 4. Typy konstitutivního aktivního transportu glycerolu do buňky.....	16
3. 2. 4. 1. Symport H ⁺ -glycerol u <i>Pichia sorbitophila</i> , H ⁺ -ATPáza.....	17
3. 2. 4. 2. Symport Na ⁺ -glycerol u <i>Debaromyces hansenii</i>	17
3. 2. 5. Export kationtů alkalických kovů, Na ⁺ -ATPázy.....	18
4. Charakterizace druhů kvasinek použitých v pokusu	21
4. 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4. 2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22
4. 3. <i>Debaromyces hansenii</i>	22
4. 4. <i>Pichia sorbitophila</i>	23
4. 5. <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
4. 6. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	23
5. Metody	25
5. 1. Materiál, uchovávání kvasinkových kmenů.....	25
5. 2. Média použitá v pokusu.....	25

5. 3. Kapkový test na miskách s gradienty látek.....	26
6. Výsledky a diskuze	28
6. 1. Růst na YPG + KCl 2,5 mol/l.....	28
6. 2. Růst na YPG + sorbitol 30% (m/V).....	29
6. 3. Růst na YPG + LiCl 1 mol/l.....	30
6. 4. Srovnání osmotolerance jednotlivých druhů se <i>Z. rouxii</i>	30
7. Závěr	32
Seznam použité literatury.....	33

1. ÚVOD

Kvasinky patří mezi eukaryotické mikroorganismy vyznačující se celou řadou zajímavých vlastností, mezi něž patří osmotolerance. Obsahem této práce je shrnutí poznatků o podstatě osmotolerance u tzv. nekonvenční kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii* a srovnání s několika dalšími vybranými druhy kvasinek, a to jak s druhy velmi dobře popsányými (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), tak i s druhy dosud ne zcela charakterizovanými (*Debaromyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Yarrowia lipolytica*).

2. CHARAKTERIZACE KVASINEK

2. 1. Zařazení do systému, metabolismus, způsob rozmnožování

Kvasinky jsou charakterizovány jako eukaryotické mikroorganismy a řazeny mezi houby (Fungi). Jsou většinou jednobuněčné, zdroje uhlíku zpracovávají převážně fermentací a rozmnožují se hlavně pučením. Existují však i výjimky ze všech tří těchto charakteristik. Některé druhy se za určitých podmínek vyskytují ve formě jistého typu mnohobuněčnosti - mycelia (soubuní), a v tomto případě se pak nemnoží pučením, ale přehrádečným dělením. Rod *Schizosaccharomyces* se jako jediný rozmnožuje přehrádečným dělením i v jednobuněčné podobě. Určité druhy pak zpracovávají zdroje uhlíku pouze aerobně, nekvasí (Janderová a Bendová, 1999).

Jako zdroje uhlíku a energie jsou kvasinkami nejčastěji využívány monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy, občas i polysacharidy, dalšími využívanými látkami jsou alkoholy a u některých i alkany (*Yarrowia lipolytica*). Obecně lze říci, že podle místa svého typického výskytu v přírodě a s tím spojených různých zdrojů výživy jednotlivé druhy kvasinek nesou různé geny kódující proteiny pro jejich transport a utilizaci.

2. 2. Životní prostor kvasinek

Přirozeným životním prostředím kvasinek jsou rostliny, jejich květy, plody a šťávy, půda, pro některé mořská nebo sladká voda a některé žijí jako komenzálové nebo patogeny živočichů. Jsou izolovány i z vod odpadních, ze zkažených potravin a různých průmyslových výrob.

Jako jednobuněčné organismy bez pohybového aparátu (nemají ani bičíky nebo brvy jako některé jiné mikroorganismy) nemohou žádným způsobem ovlivnit stav prostředí, ve kterém se nachází. Proto je pro ně otázkou přežití mít dobře vyvinuté mechanismy rychlé reakce a adaptace na změny, ke kterým může dojít v každém okamžiku jejich života – například přenesením větrem, vodou či hmyzem do prostředí se zcela odlišným obsahem živin a hlavně odlišnou vodní aktivitou. Některým druhům je v důsledku těchto specifických vlastností umožněno růst i v prostředích pro jiné druhy kvasinek a většinu dalších organismů limitujících, čemuž se věnuje podrobně třetí kapitola této práce.

2. 3. Význam pro člověka

Kvasinky jsou zřejmě prvním mikroorganismem, který začal člověk cíleně využívat, kvasné procesy při výrobě piva a vína jsou známy několik tisíc let. Využití kvasinek dále sahá od výroby pekařského droždí, některých mléčných výrobků a dalších potravin až po výzkum. Mimo tyto poměrně známé oblasti možných využití kvasinek se dnes tyto mikroorganismy také uplatňují v nejmodernějších biotechnologiích při výrobě léčiv, vitamínů a dalších biologicky aktivních látek.

Kromě cíleného využití se s kvasinkami v potravinářském průmyslu setkáváme jako s častou kontaminací nejrůznějších druhů potravin, typickým projevem přítomnosti *Z. rouxii* v balených džusech je „nafouknutí“ krabice způsobené kvasnými procesy a s nimi spojeným uvolňováním oxidu uhličitého.

Výzkum lidských buněk je velmi složitý, proto pro základní porozumění funkcím eukaryotické buňky je výhodné použít minimální model eukaryotické buňky – tím je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Význam této kvasinky jako modelového organismu vzrostl poté, co se ukázalo, že řada dějů v ní probíhajících je analogická dějům probíhajícím v živočišných buňkách (Janderová a Bendová, 1999).

Jejími hlavními výhodami pro toto využití jsou – podobně jako u modelové bakterie *Escherichia coli* – jednoduchost, odolnost a rychlost reprodukce (Alberts *et al.*, 1998). Další výhodou je možnost existence organismu v haploidním i diploidním stavu, což nabízí možnosti křížení a příprav mutantních kmenů. Výhodné se jeví jistě také to, že s *S. cerevisiae* jako nepatogenní kvasinkou může být zacházeno bez ochranných opatření.

Kromě kontaminací průmyslových výrob jsou kvasinky nežádoucí v případě napadení člověka, avšak patogenních druhů neexistuje mnoho. Jejich nejdůležitějším zástupcem jsou některé druhy rodu *Candida*, kmenzála s potencionálně patogenním charakterem, a dále rody *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*.

3. OSMOTOLERANCE

3. 1. Vodní aktivita, osmotolerance

Pro všechny živé organismy je nezastupitelnou látkou voda. Bez vodního prostředí nemohou v buňce probíhat žádné z životně důležitých dějů, jakými jsou dýchání a enzymatické reakce při zpracovávání metabolitů, kromě toho molekuly vody ovlivňují stav makromolekul (DNA a proteinů), jsou rozpouštědlem a svým tlakem uvnitř buňky (turgorem) určují tvar buňky a umožňují její růst.

Přes buněčné plazmatické membrány prochází voda poměrně snadno, proto v prostředí s nízkou koncentrací osmoticky aktivních látek vstupuje osmózou do buňky až do vyrovnání osmotického tlaku na obou stranách membrány a může dojít až k prasknutí buňky. V hyperosmotickém prostředí naopak voda buňku opouští, její molekuly procházejí plazmatickou membránou do prostředí o vyšší osmotické koncentraci. Následkem je smršťování buňky, průběh normálních dějů v buňce je znemožněn, dochází k deformaci cytoskeletu, změnám v koncentracích proteinů, snížený turgor zabraňuje růstu a může tak dojít až ke smrti buňky.

Mírou koncentrace osmoticky aktivních látek v okolí je vodní aktivita a_w , která je definována jako chemický potenciál vody v roztoku a udává se v procentech. Je nepřímo úměrná osmolaritě, tedy čím vyšší je koncentrace osmoticky aktivních látek, tím nižší je vodní aktivita a naopak (<http://www.wateractivity.org/theory.html>). Nízká vodní aktivita inhibuje růst kvasinkové buňky, což je také po staletí využíváno při skladování ovoce.

Organismy, které snášejí vysoké koncentrace osmoticky aktivních látek a tedy nízkou vodní aktivitu prostředí, se označují jako osmotolerantní. Osmotolerance je definována jako schopnost snášet vysokou osmolaritu prostředí, tedy celkovou koncentraci osmoticky aktivních částic, je to vlastnost obvyklá u bakterií a některých druhů kvasinek.

3. 2. Kvasinky a osmotolerance

Mechanismy osmotolerance jsou studovány na mnoha kvasinkových druzích. Kvasinky jsou neustále vystavovány změnám prostředí, jako jsou změna dostupnosti živin, teploty, pH, radiace, dostupnosti kyslíku a zejména vodní aktivity (Hohmann *et al.*, 1997, podle Hohmann,

2002) kterým, jak již bylo řečeno, nemají možnost žádným způsobem uniknout, navíc jako jednobuněčné organismy vystavují prostředí celý svůj povrch.

První bariérou oddělující vnitřní prostředí buňky od kontaktu s vnějším prostředím je buněčná stěna. Je sice dobře propustná i pro velké makromolekuly, takže nezabraňuje vstupu látek do kvasinkové buňky, ale udržuje její pružnost a pevnost a brání prasknutí. Bez existence buněčné stěny by již malé změny v osmotickém tlaku média byly pro buňku fatální. Složení buněčné stěny je jedním z faktorů zvyšujících osmotoleranci kvasinkové buňky (Klis *et al.*, 2006 podle Příbylová *et al.*, 2007). Čtyřmi hlavními složkami buněčné stěny jsou takzvané proteiny buněčné stěny – CWP (cell wall proteins), dva typy glukanů (1,3-β-D-glukan a 1,6-β-D-glukan) a polymer N-acetylglukosaminu (chitin). Příbylová *et al.* (2007) prokázali, že rozdílná organizace buněčné stěny a rozdílný poměr jejích složek je jednou z příčin rozdílné osmotolerance dvou kmenů *Zygosaccharomyces rouxii* (ATCC 42981 a CBS 732).

3. 2. 1. Produkce glycerolu

Hlavním mechanismem biochemické odpovědi na osmotické stresy je u kvasinek produkce a akumulace osmoticky aktivních látek s malou molekulovou hmotností (Oliveira *et al.*, 1996), z nichž je kvasinkovými buňkami nejvyužívanější glycerol, v menší míře pak arabitol a další polyalkoholy (Lages *et al.*, 1999).

Glycerol je v období hyperosmotického stresu nadprodukován a akumulován v buňkách, což kvasince umožňuje vyrovnávat rozdíly v koncentraci osmoticky aktivních látek uvnitř a vně, a může tak importovat zpět ztracenou vodu. Jako malá nenabitá molekula však glycerol také z buňky snadno uniká prostou difúzí.

Schopnost kvasinek tolerovat osmotické stresy okolí je tedy zajišťována jednak expresí genů pro enzymy syntézy glycerolu a jednak specifickými membránovými transportními systémy kontrolujícími akumulaci a uvolňování této molekuly (Edgley and Brown, 1983, podle Tang *et al.*, 2005).

Klíčovými enzymy syntézy glycerolu jsou glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (GPDH), cytosolický NADH dependentní enzym tvořící glycerol-3-fosfát z glykolytického intermediátu dihydroxyacetonfosfátu (Albertyn *et al.*, 1994), a glycerol-3-fosfatáza. Transportní proteiny pro glycerol v mikroorganismech pak zahrnují jak systémy s mechanismem usnadněné difúze, tak aktivní transportéry (Sutherland *et al.*, 1997); oba typy jsou charakterizovány v následujících částech kapitoly.

Zatímco u *S. cerevisiae* je hlavním mechanismem akumulace glycerolu jeho tvorba a zadržování, u jiných, zvláště osmotolerantních druhů jako *Z. rouxii* či *P. sorbitophila*, se jako

podstatné jeví také mechanismy zpětného transportu glycerolu, který je ztracen difúzí (Lages *et al.*, 1999).

Obsah glycerolu v buňce je kontrolován také rychlostí jeho exportu. Toto zjištění bylo vzhledem k tomu, že glycerol může volně procházet plazmatickou membránou, neočekávané, ale ukázalo se, že kvasinková plazmatická membrána je pro využívání glycerolu jako osmoregulátoru dobře adaptována (Hohmann, 2002) a při osmotickém šoku se její propustnost pro glycerol ještě snižuje. Mechanismus tohoto jevu zřejmě souvisí se změnami exprese genů syntézy určitých typů lipidů v membráně, které nastávají v důsledku osmotického šoku (Rep *et al.*, 2000 podle Hohmann, 2002).

3. 2. 1. 1. Reakce *Zygosaccharomyces rouxii* na osmotický stres

U osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii* bylo Tadashim a Toshiakim (1993) prokázáno, že při příliš vysokých koncentracích NaCl produkce glycerolu klesá, protože velkým osmotickým tlakem okolí je inhibována jeho syntéza, a osmoregulace se pak účastní i ionty Na^+ a Cl^- .

Autoři zjišťovali změny koncentrace glycerolu a anorganických iontů v buňkách a změny buněčného objemu po dobu 3 hodin od začátku stresu z vysoké koncentrace NaCl. Nejvíce glycerolu *Z. rouxii* produkovala v prostředí s 1 mol/l NaCl, mnohem méně v médiu s NaCl v koncentraci 2 a 3 mol/l, v obou případech bylo toto množství dokonce menší než v prostředí bez soli (Tadashi and Toshiaki, 1993). Pokud je syntéza a akumulace glycerolu v buňce takto inhibována, jsou buňkou zachycovány ionty Na^+ a Cl^- . Akumulace Na^+ byla oproti akumulaci glycerolu přímo úměrná množství NaCl v médiu, stejně tak akumulace Cl^- , i když tady byl poměr menší (Tadashi and Toshiaki, 1993). Tyto výsledky ukázaly, že celkový součet koncentrací glycerolu, K^+ , Na^+ a Cl^- vzrůstá úměrně s množstvím NaCl v médiu, a že přitom stoupá poměr koncentrace iontů a celkového množství solutů.

V prostředí s NaCl dochází samozřejmě také k určitým změnám buněčného objemu. V médiu s 2 mol/l a 3 mol/l NaCl došlo k výraznému zmenšení objemu v průběhu prvních 30 minut po začátku osmotického stresu, asi na polovinu původního objemu, a pak zůstal objem konstantní po dobu 3 hodin. V médiu s 1 mol/l NaCl měly buňky v průběhu 3. hodiny od začátku stresu tendenci k návratu do původního objemu. Snižování objemu v prvních 30 minutách bylo úměrné zvyšování obsahu NaCl v médiu. Pokus ukazuje, že přizpůsobit vnitrobuněčný tlak vnějšímu osmotickému tlaku je buňka *Z. rouxii* schopna v průběhu 2 hodin od začátku osmotického stresu zvyšováním intracelulárního množství glycerolu, Na^+ a Cl^- a současným zmenšováním objemu.

Podle Yagi (1988) jsou po několika dnech v médiu s NaCl hodnoty koncentrací Na⁺ a Cl⁻ mnohem nižší a glycerolu naopak vyšší, což ukazuje na nahrazení iontů glycerolem potom, co se buňka stresu přizpůsobí.

3. 2. 2. Senzory osmotického stresu, MAP kinázová dráha v *S. cerevisiae* a *Z. rouxii*

MAP (mitogen activated protein) kinázové dráhy jsou vysoce konzervované signální kaskády vyskytující se zřejmě u všech eukaryot. V kvasinkových buňkách regulují kromě odpovědi na osmotický stres také sexuální rozmnožování, buněčný růst, sporulaci a mnoho dalšího. Jen u *S. cerevisiae* je jich známo 6.

Každá MAP kinázová kaskáda je zahajována receptorem. V *S. cerevisiae* byly popsány dva senzory osmotického napětí, receptory Sho1p a Sln1p, lokalizované v plazmatické membráně. Jejich aktivace spouští signální MAP kinázovou dráhu směřující přes aktivaci kinázy kinázy MAP kinázy (MAPKKK), kinázy MAP kinázy (MAPKK) a MAP kinázy (MAPK) k aktivaci transkripce *GPD1*, genu pro protein glycerol-3-fosfát dehydrogenázu (GPDH). Tato konkrétní MAP kinázová dráha je nazývána HOG dráha (high osmolarity glycerol response pathway) (Brewster *et al.*, 1993, podle Iwaki *et al.*, 1999) a konkrétní MAP kináza této dráhy v *S. cerevisiae* pak Hog1. Hog1p přímo nebo nepřímo zvyšuje aktivitu transkripčního regulátoru pro gen *GPD1*. Hog1p obsahuje charakteristický fosforylační motiv společný všem MAP kinázám, takzvaný T-G-Y motiv (threonin-glycin-tyrosin), který je fosforylován na threoninu i tyrosinu duálně specifickou kinázou MAP kinázy, v této dráze je to kináza Pbs2. Pro kinázu MAP kinázy je zase typický motiv dvou serinů fosforylovatelných kinázou kinázy MAP kinázy, MAPKKK, v této dráze konkrétně Ste11.

Iwaki *et al.* (1999) hybridizací digoxigeninem značené sondy nesoucí sekvenci genu *HOG1* s fragmenty genomové DNA *Z. rouxii* identifikovali dva úseky s nukleotidovou sekvencí asi ze 70 a 80% homologní k sekvenci *HOG1* a s asi 93 a 98% homologií aminokyselinové sekvence k Hog1p. V obou sekvencích byl nalezen i motiv T-G-Y (Brewster *et al.*, 1993, podle Iwaki *et al.*, 1999) a pro svou předpokládanou funkci analogickou *HOG1* byly nazvány *ZrHOG1* a *ZrHOG2*.

Iwaki *et al.* (1999) dále prokázali, že *Zrhog1Δ* a *Zrhog2Δ* mutanty pěstované na NaCl snášejí nižší koncentrace soli než rodičovský kmen *Z. rouxii*. Předpoklad, že produkty obou genů se podílejí na přenosu osmotického signálu v buňkách *Z. rouxii* stejným způsobem jako *HOG1* v *S. cerevisiae*, pak potvrdili transformací mutantů *S. cerevisiae hog1Δ* vektory nesoucími *ZrHOG1* nebo *ZrHOG2*. Zavedení vektoru nahradilo mutantním buňkám halotoleranci,

osmotoleranci, obsah glycerolu a normální tvar buňky, které vykazoval nemutovaný kmen *S. cerevisiae*.

Jejich studie tedy potvrdila existenci nejméně dvou MAP kinázových genů v genomu *Z. rouxii*, což zatím není známo u žádného jiného druhu. Mohl by to být jeden z možných faktorů osmotolerance této kvasinky, avšak práce Kinclové *et al.* (2001) prokázala, že u kmene *Z. rouxii* CBS 732 existuje pouze jeden *HOG1* gen. Počet *HOG* genů v genomu tedy zřejmě výši osmotolerance kvasinkové buňky neurčuje.

3. 2. 3. Pasivní transport glycerolu - protein Fps1 v *S. cerevisiae*, jeho homolog *ZrFps1* v *Z. rouxii*

Přenos glycerolu usnadněnou difúzí je v kvasince *S. cerevisiae* zajišťován konstitutivně exprimovaným proteinovým kanálem Fps1, umožňujícím usnadněnou difúzi (Sutherland *et al.*, 1997). Tento protein je zodpovědný jak za vstup glycerolu do buňky, tak za jeho rychlé uvolňování, když osmotický tlak okolí poklesne. Mutantní kmeny postrádající Fps1p vykazují snížený tok glycerolu z i do buňky.

Protein Fps1 je členem rodiny mikrobiálních MIP (major intrinsic protein), blíže popsáných v další podkapitole, do které spadají dva hlavní typy přenašečů – akvaporiny a přenašeče glycerolu (Hohmann *et al.*, 2000, podle Tang *et al.*, 2005).

Analýza genomů kvasinek řazených mezi *Hemiascomycetes* odhalila homolog *FPS1* v *Z. rouxii*. Jeho funkce byla poté potvrzena Tangem *et al.* (2005). Transformací mutantního kmene *S. cerevisiae* *fps1Δ*, který za podmínek hypoosmotického šoku roste špatně, protože není schopen uvolňovat glycerol, plazmidem nesoucím *ZrFPS1*, došlo k doplnění funkce *fps1* a mutant byl schopen uvolňovat glycerol a vyrovnávat se s hypoosmotickým stresem stejně dobře jako nemutovaný kmen *S. cerevisiae*. Zlepšení schopnosti nemutovaného kmene *S. cerevisiae* tolerovat hyperosmotické prostředí heterologní zvýšenou expresí *ZrFPS1* v *S. cerevisiae* však Tang neprokázal.

Mutantní kmen *Z. rouxii* postrádající gen *ZrFPS1* rostl na glycerolu i glukóze jako jediném zdroji uhlíku v podstatě stejně dobře jako divoký kmen, oba také tolerovaly přidání sorbitolu nebo NaCl ve stejné míře. Naopak hypoosmotické prostředí je mutantem *Zrfps1Δ* snášeno velmi špatně. Buňky divokého kmene *Zygosaccharomyces rouxii* přenesené z média o nižší vodní aktivitě do média o vyšší (z 0,86 M NaCl do 0,086 M NaCl) rychle uvolňovaly glycerol i arabitol, zatímco mutant *Zrfps1Δ* ve stejných podmínkách zadržoval obě látky

mnohem déle (Tang *et al.*, 2005). Mutanti *fps1Δ* umírají v důsledku hypoosmotického šoku mnohem více než nemutovaný kmen.

Stejně jako u *S. cerevisiae*, export glycerolu v *Z. rouxii* po osmotickém šoku závisí téměř výhradně na tomto proteinu (Luyten *et al.*, 1995). Také se ukázalo, že protein ZrFps1 není zcela nutný pro příjem glycerolu, zatímco v jeho výdeji je jeho role zásadní.

Zjištění, že kanálový protein Fps1 se účastní také exportu D-arabitolu (Tang *et al.*, 2005), může znamenat, že je zřejmě propustný i pro další polyalkoholy, což se dříve nepředpokládalo. Krystalografické studie jeho bakteriálního homologu GlpF *E. coli* totiž ukazovaly vysokou stereoselektivitu (Bill *et al.*, 2001).

3. 2. 3. 1. Charakterizace rodiny kanálů MIP

Sekvenční analýzou genu bylo potvrzeno zařazení proteinu ZrFps1 do rodiny MIP a ukázána 56,9 % homologie k Fps1p *S. cerevisiae* (Tang *et al.*, 2005).

Rodina MIP je skupina kanálových proteinů rozšířených mezi všemi organismy, od bakterií přes rostliny po člověka (Reizer *et al.*, 1993, podle Sutherland *et al.*, 1997), zahrnující aquaporiny, transportéry glycerolu a transportéry dalších malých nenabitých molekul přes biologické membrány. Kanály MIP se skládají z šesti transmembránových domén, NH₂ i COOH konec směřují do cytosolu. Podle Hohmanna a Nielsena (2000) je jich známo přes 200, z toho nejméně 10 u člověka a myši, zejména v ledvinách, a asi 30 u modelové rostliny *Arabidopsis*. U jednobuněčných organismů se jich vyskytuje zřejmě jen několik.

3. 2. 4. Typy konstitutivního aktivního transportu glycerolu do buňky

Kvasinky obecně pro aktivní transport využívají velmi často symportní mechanismy. Jde o sekundární aktivní transport, který pro přenos látky přes membránu proti jejímu gradientu využívá spřažení s přenosem jiné látky po gradientu, u kvasinek nejčastěji s protonem.

Aktivní konstitutivní transport glycerolu do buňky je u kvasinek zatím podrobně charakterizován u dvou druhů, a to u *Pichia sorbitophila* a u *Debaromyces hansenii* (Lages *et al.*, 1999), prokázán byl však u mnoha dalších, včetně *Zygosaccharomyces rouxii* (Lages *et al.*, 1999).

U halotolerantní kvasinky *Pichia sorbitophila* byl Lagesem a Lucasem (1995) prokázán konstitutivní symport glycerolu s protonem ve stechiometrii 1.

Jiná halotolerantní kvasinka *Debaromyces hansenii* využívá jako sílu pro udržování gradientu glycerolu uvnitř buňky spřažení s transportem sodného kationtu (Lucas *et al.*, 1989).

Jsou známy i další druhy kvasinek vykazujících konstitutivní příjem glycerolu do buňky, většinou s akumulací kapacitou zvýšenou v přítomnosti NaCl (Lages *et al.*, 1999).

3. 2. 4. 1. Symport H^+ -glycerol u *Pichia sorbitophila*, H^+ ATPáza

Transportní symportní systém glycerolu s protonem je závislý na protonovém gradientu přes membránu, jeho exprese je konstitutivní, nepotřebuje indukci zvýšenou extracelulární koncentrací solí ani glycerolu samotného, ani není reprimován glukózou (Lages and Lucas, 1995). Vzrůst akumulací kapacity tohoto systému za podmínek zvýšené extracelulární koncentrace NaCl byl Lagesem a Lucasem (1995) prokázán, neroste však lineárně se zvyšující se koncentrací soli.

Přítomnost systému konstitutivně přijímajícího glycerol jak v přítomnosti NaCl tak v prostředí bez něj byla zjištěna i u dalších kvasinek, a u několika málo z nich, vesměs řazených mezi osmotolerantní, pak stejně jako u *P. sorbitophila* v souvislosti s příjmem protonu, například u *Candida halophila* (Lages *et al.*, 1999).

Pro plazmatické membrány kvasinek je typická přítomnost H^+ -ATPázy, která udržuje stálý gradient protonů přes membránu na úkor energie vytvořené buňkou. Tento gradient, kromě toho, že je nutný pro symport glycerolu, je využíván v mnoha dalších mechanismech přenosů přes membránu v kvasinkových buňkách - k symportu mnoha dalších živin nebo vitamínů s protonem. Proton je totiž kvasinkami využíván analogicky k sodnému kationtu v živočišných buňkách. Dále je jeho gradient využíván pro antiport Na^+/H^+ k udržení nízké koncentrace Na^+ v buňce. Bylo prokázáno, že nízká extracelulární koncentrace H^+ iontů (pokud je například pufováno vysoké pH okolí) osmotoleranci *P. sorbitophila* snižuje, uměle snížené pH a tedy zvýšení gradientu protonů přes plazmatickou membránu ji však nezvýší (Marešová, 2001).

3. 2. 4. 2. Symport Na^+ -glycerol u *Debaromyces hansenii*

D. hansenii je vysoce halotolerantní kvasinka schopná snést koncentrace NaCl i KCl až 3,5 – 4 mol/l (Neves *et al.*, 1997). Lucas *et al.* (1989) použili techniku hladovění buněk na určité ionty k ověření závislosti transportu glycerolu na jejich koncentraci. Ukázali, že v buňkách *D. hansenii* hladovějících na sodík a draslík není glycerol transportován do buňky podle původní Michaelis – Mentenovské kinetiky a vstupuje do ní prostou difúzí, a že po přidání jednoho z kationtů je systém opět funkční.

Udržení gradientu sodných iontů přes membránu zase vyžaduje aktivní mechanismus transportující sodné kationty ven z buňky (Lucas *et al.*, 1989), což zajišťují antiportéry Na^+ a Na^+ -ATPázy, jimž je věnována následující část kapitoly.

3. 2. 5. Export kationtů alkalických kovů - antiporter Na^+/H^+ , Na^+ -ATPázy

Zatímco draselný iont je hlavním kationtem uvnitř buňky, zajišťujícím regulaci intracelulárního pH a buněčného objemu a aktivaci různých enzymů, sodný kationt je v buňce udržován v nízké koncentraci a jeho zvýšená koncentrace, stejně jako zvýšená koncentrace kationtů jeho analogu Li, je pro buňku toxická. Situace v buňkách je tak opačná než v přírodě celkově, kde draslík je spíše vzácný a sodík všudypřítomný prvek.

V živočišných buňkách je poměr koncentrací Na^+ a K^+ regulován zejména Na^+/K^+ ATPázou, kvasinky však tento transporter neobsahují. V jejich buňkách je transport sodných iontů z buňky zajišťován dvěma mechanismy, a to jednak Na^+ -ATPázou a jednak antiporterem Na^+/H^+ (gradient protonů je udržován H^+ -ATPázou plazmatické membrány zmiňovanou v přechodí podkapitole). Membránové antiportery zprostředkovávající export kationtů alkalických kovů přes plazmatickou membránu výměnou za proton jsou zřejmě nezbytné pro životaschopnost buněk všech organismů (Papoušková a Sychrová, 2007a), konzervovány jsou mezi všemi známými kvasinkovými druhy, říká se jim antiportery Nha.

Hlavní roli v exportu sodných iontů v *S. cerevisiae* však hraje Na^+ -ATPáza Ena1 (Banuelos *et al.*, 1998). *S. cerevisiae* využívá antiporter ScNha1 hlavně v kyslejší prostředí, při vyšším pH přebírá většinu práce na exportu kationtů alkalických kovů Ena1 (Banuelos *et al.*, 1998). Bylo prokázáno, že protein Nha1 se také podílí na regulaci vnitrobuněčného pH. U buněk z kmenů s delecí tohoto genu bylo zjištěno vyšší pH než u buněk z kmenů kontrolních (Sychrová *et al.*, 1999).

V *Z. rouxii* byl identifikován homolog Ena1p a nazvány ZrEna1, ale podle Watanabe *et al.* (1999) zde nese naopak hlavní úlohu v exportu sodných kationtů z buňky antiporter Na^+/H^+ a ZrEna1p se na něm podílí jen velmi málo.

Antiportery Nha různých druhů kvasinek mají rozdílnou substrátovou specifitu. Z kvasinek uváděných v mé práci byly původně *S. pombe* a *Z. rouxii* považovány za kvasinky nesoucí antiportery Nha první podrodiny, specifické pouze pro sodný a litný kationt, zatímco *S. cerevisiae*, *P. sorbitophila* a *D. hansenii* (z dalších důležitých kvasinkových druhů pak také *Candida albicans*) mají Nha antiportery druhé podrodiny se širší substrátovou specifikou – kromě Na^+ a Li^+ transportují i K^+ a Rb^+ (Velková a Sychrová, 2006).

Y. lipolytica byla první kvasinkou, u níž byly charakterizovány dva strukturou i specifikou zcela odlišné membránové antiportery kationtu alkalického kovu výměnou za proton. Zatímco YNha1p se pravděpodobně účastní udržování homeostázy, regulace obsahu K^+ v buňce, pH a buněčného objemu díky své vyšší afinitě ke K^+ (než k Na^+), YNha2p je efektivnější v exportu

sodných kationtů a zřejmě je jedním z faktorů osmotolerance *Y. lipolytica* (Papoušková a Sychrová, 2006).

Antiporter *YNha2* je zřejmě velmi efektivní, protože jeho exprese v buňkách méně halotolerantních kmenů *S. cerevisiae*, které nepostrádaly žádný ze svých vlastních systémů pro export Na^+ , prokazatelně zvyšovala jejich toleranci k NaCl v médiu (Papoušková a Sychrová, 2007b), a to více než transformace buněk analogem ze *Z. rouxii*, *ZrSOD2-22*.

V roce 2007 byla publikována další práce Papouškové a Sychrové, která vyvrátila i původní předpoklad přítomnosti pouze jednoho antiporteru kationtů alkalických kovů u *S. pombe*, a to *SpSod2p* se specifitou pouze pro Na^+ a Li^+ . Byl objeven jeho homolog a nazván *SpSod22p*. Jeho heterologní exprese v halosenzitivním kmeni *S. cerevisiae* ukázala, že toleranci k Na^+ a Li^+ zvyšuje méně než *SpSod2p* (i než *ScNha1p*), naopak v zajištění tolerance vůči K^+ je efektivnější. Samotná *S. pombe* pak rostla v přítomnosti KCl lépe při nižších hodnotách pH média, což svědčilo o přítomnosti systému s funkcí analogickou *YNha1p*, tedy funkcí antiporteru se širokou substrátovou specifitou účastnícího se v první řadě exportu K^+ výměnou za proton, tedy transporteru závislého na pH.

Potom už zůstávala jedinou výjimkou s neznámým antiporterem Na^+/H^+ s afinitou ke K^+ kvasinka *Z. rouxii*, u níž byl znám pouze antiporter *ZrSod2-22* s afinitou jen k Na^+ a Li^+ , identifikovaný Kinclou *et al.* (2002) v kmeni *Z. rouxii* CBS 732^T. Druhý nejstudovanější kmen, ATCC 42981, nese dva geny pro antiportery plazmatické membrány – *ZSOD2* a *ZSOD22*, žádný z těchto tří však nevykazuje afinitu ke K^+ (Kinclová *et al.*, 2002). Příbylová *et al.* (2008) identifikovali v genomu *Z. rouxii* ORF (otevřený čtecí rámec, open reading frame) nesoucí druhý domnělý membránový antiporter – byl pojmenován *ZrNHA1*. Heterologní exprese tohoto genu v halosenzitivním kmeni *S. cerevisiae* byla měřena jeho účinnost v exportu sodných a draselných iontů ve srovnání s buňkami nesoucími *ZrSOD2-22* a s buňkami nesoucími *ScNHA1*. Ukázalo se, že buňky exprimující *ZrSOD2-22* nemohou růst na tak vysokých koncentracích K^+ a Rb^+ jako buňky exprimující *ZrNHA1* a *ScNHA1*, a že *ZrNHA1* naopak zvyšuje zejména toleranci hlavně k těmto dvěma kationtům zatímco k Na^+ a Li^+ méně.

Tyto výsledky potvrdily nepostradatelnost *ZrNha1p* pro homeostázu draslíku a menší rozsah jeho vlivu na export Na^+ , tím byl charakterizován druhý typ membránového transporteru v *Z. rouxii*, který rozeznává a přenáší jak Na^+ , tak K^+ ionty, ale jeho afinita je vyšší ke K^+ .

Je zřejmé, že antiportery typu N^+/H^+ se ve všech kvasinkách podílejí na regulaci vnitrobuněčné koncentrace K^+ (exportu nadbytečných iontů z buněk), a že zatímco většina druhů kvasinek disponuje antiporterem se širokou substrátovou specifitou pro kationty všech

alkalických kovů, u některých kvasinek existují v plazmatické membráně dva antiportery lišící se afinitou vůči draslíku a sodíku a tím i svou fyziologickou funkcí.

4. CHARAKTERIZACE KVASINKOVÝCH DRUHŮ POUŽITÝCH V POKUSU

Všechny kvasinky použité v pokusu jsou řazeny do třídy *Hemiascomycetes*, řádu *Saccharomycetales* a čeledi *Saccharomycetaceae*, kromě *Schizosaccharomyces pombe*, která patří mezi *Schizosaccharomyceteceae*.

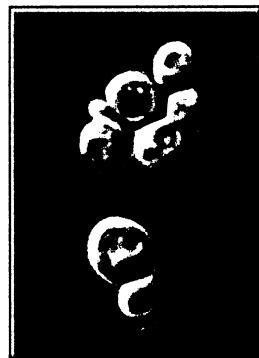
Do mého pokusu byly vybrány tři kvasinky řazené mezi vysoce osmotolerantní (*D. hansenii*, *P. sorbitophila* a *Z. rouxii*), jeden druh řazený mezi středně osmotolerantní (*Y. lipolytica*), dva kmeny druhu průměrně citlivého k osmotickým stresům (dva kmeny *S. cerevisiae*) a jako kontrola druh charakteristický vysokou citlivostí (*S. pombe*).

Genomy kvasinek jsou již kompletně známy kromě *P. sorbitophila*, jejíž genom má být zveřejněn letos. Několik genomů (*D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Z. rouxii*) bylo analyzováno v rámci mezinárodního projektu Génolevures, zahájeného v roce 1998 ve Francii, který se zabývá sekvenováním genomů kvasinek třídy *Hemiascomycetes* a odhalováním mechanismů evoluce eukaryotického genomu.

Jednotlivé druhy stručně popisuje následující kapitola.

4. 1. *Saccharomyces cerevisiae*

Anglicky „budding yeast“ (pučící kvasinka). Kvasinka *Sacharomyces cerevisiae* (obr. 1, mikroskopický snímek *S. cerevisiae*) je bezesporu nejdůležitějším kvasinkovým druhem, využívaným v mnoha odvětvích potravinového průmyslu, typicky při výrobě pečiva a alkoholických nápojů. Kromě tohoto využití je v současné době jedním z nejdůležitějších modelových organismů pro výzkum a její genom je prvním eukaryotickým genomem, jehož sekvenace byla ukončena. Projekt sekvenování byl zahájen několika spolupracujícími laboratořemi z celého světa na začátku devadesátých let a genomová sekvence publikována v roce 1996 v časopise *Science*. Genom *S. cerevisiae* je nesen 16 chromozomy o celkové délce asi 12 Mbp a počtu genů přes 6000, člověk má s kvasinkami společných asi 23% genomu (Janderová a Bendová, 1999).



Obr. 1

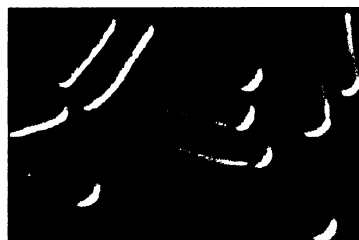
V pokusu byly použity kmeny *S. cerevisiae* Σ 1278b a FL 200. Jedná se o dva široce využívané laboratorní kmeny lišící se mnoha vlastnostmi.

4. 2. *Schizosaccharomyces pombe*

Anglicky „fission yeast“ (dělicí se, štěpící se kvasinka). *Schizosaccharomyces pombe* (obr. 2, mikroskopický snímek *S. pombe*) patří stejně jako všechny ostatní kvasinky diskutované v mé práci do třídy *Hemiascomycetes*, avšak do čeledi *Schizosaccharomyceteceae*. Je zřejmě druhou nesjtudovanější kvasinkou po *S. cerevisiae*, a to hlavně díky vyšší příbuznosti svých buněčných pochodů s pochody v buňkách živočišných.

Také genom *S. pombe* byl kompletně sekvenován a zveřejněn v roce 2002 v časopise Nature. Skládá se ze tří relativně velkých chromozomů o celkové délce 13,8 Mbp (<http://www.genomenewsnetwork.org/>) a asi 5000 genech.

Je jedinou kvasinkou rozmnožující se i v jednobuněčné formě přehrádečným dělením.



Obr. 2

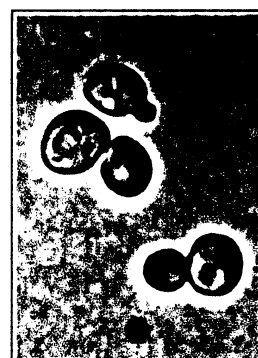
Do mého pokusu byla *S. pombe* použita jako kontrola, protože jde o typicky osmosenzitivní druh. Byl použit kmen *S. pombe* 972 h⁻.

4. 3. *Debaryomyces hansenii*

Genom *Debaromyces hansenii* (obr. 3, mikroskopický snímek *D. hansenii*) je již kompletně znám, skládá se ze sedmi chromozomů o celkové velikosti 12,2 Mbp. Sekvenování odhalilo, že tato kvasinka je blízce příbuzná kvasinkám rodu *Candida*.

D. hansenii je halotolerantní kvasinka obvykle izolovaná z mořské vody nebo jako kontaminující agens sýrů nebo solných roztoků. Pro tuto vlastnost je také v potravinářství cíleně využívána pro zrání některých druhů sýrů a masných výrobků.

U *D. hansenii* byl Lucasem *et al.* (1989) charakterizován mechanismus transportu glycerolu do buňky symportem s Na⁺ ionty, popsáný v kapitole 3.



Obr. 3

V pokusu byl použit kmen *D. hansenii* CBS 767.

4. 4. *Pichia sorbitophila*

Genom kvasinky *Pichia sorbitophila* se skládá ze sedmi chromozomů o celkové velikosti 13,9 Mbp (Sychrová *et al.*, 2000), jeho sekvenování má být dokončeno letos.

P. sorbitophila je osmotolerantní kvasinka schopná přežít vysoké koncentrace solí i jiných osmolytů v médiu. Ačkoliv není klasifikována jako osmofilní, je schopna růst až na 70% sorbitolu, jak napovídá i její druhové jméno. Zajímavé je, že jediný známý kmen tohoto druhu byl izolován z laboratorního 70% roztoku D-sorbitolu, žádný kmen vyskytující se v přírodě tedy není znám (de Miranda *et al.*, 1980, podle Marešová, 2001).

U kvasinky *P. sorbitophila* byl Lagesem a Lucasem (Lages and Lucas, 1995) prokázán způsob akumulace glycerolu do buňky kotransportem s protony, popsán v kapitole 3.

V pokusu byl použit kmen *P. sorbitophila* CBS 7064.

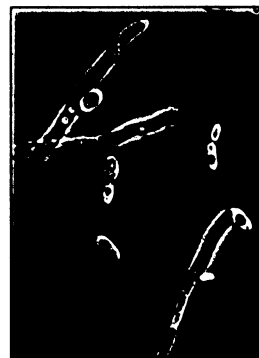
4. 5. *Yarrowia lipolytica*

Genom *Yarrowia lipolytica* (obr. 4, mikroskopický snímek *Y. lipolytica*) je tvořen šesti chromozomy o přibližné délce 20 Mbp, což je téměř dvojnásobek velikosti genomu *S. cerevisiae*.

Y. lipolytica je kvasinka izolovatelná z potravinářských produktů o vysokém obsahu lipidů – například v mlékárnách, je hojně využívána v biotechnologiích i výzkumu. Je schopna metabolizovat ropné produkty, protože jako zdroj uhlíku využívá n-alkany, a používá se k výrobě kyseliny citronové a broskvové příchutě. Dále je využívána kvůli sekreci různých proteinů, mezi nimi například RNÁzy, lipázy nebo alkalické extracelulární proteázy, jejichž množství jsou biotechnologicky zajímavá (Beckerich *et al.*, 1998). Její sekreční schopnosti mohou být také využity pro expresi heterologních proteinů (Papoušková a Sychrová, 2006).

Jako na modelovém organismu je na *Y. lipolytica* studována například sekreční dráha proteinů a biogeneze peroxizomů.

V pokusu byl použit kmen *Y. lipolytica* CBS 7504.



Obr. 4

4. 6. *Zygosaccharomyces rouxii*.

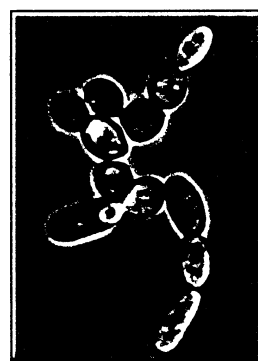
Kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii* (obr. 5, mikroskopický snímek *Z. rouxii*) je blíže příbuzná nejznámější kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, dříve byla dokonce řazena do rodu *Saccharomyces*. Genom kmene *Z. rouxii* CBS 732, který byl použit pro pokus v této práci, nese

genom skládající se ze sedmi chromozomů o celkové velikosti 12,8 Mbp (de Montigny *et al.*, 2000b, Génolevures).

Z. rouxii je charakteristická svou osmotolerancí; tato typická vlastnost jí dovoluje růst v prostředích s vysokými koncentracemi solí a/nebo cukrů, to je v prostředí limitujícím růst většiny ostatních známých druhů kvasinek (Příbylová *et al.*, 2007a). Z tohoto důvodu je také častým kontaminujícím agens mnoha potravin s vysokou koncentrací cukrů, jako jsou ovocné džusy a koncentráty, džemy a salátové dresinky (Příbylová *et al.*, 2007a). Tato vlastnost ji však řadí zároveň i mezi kvasinky člověkem využívané, a to ve fermentačních procesech při výrobě slaných asijských dochucovadel a omáček a balzamikového octa.

Porozumění molekulárním mechanismům, které řídí osmotoleranci této kvasinky, by nabízelo jejich využití v jiných organismech. Vzhledem k blízké příbuznosti *Z. rouxii* a *S. cerevisiae* by například heterologní exprese genů specifických pro osmotoleranci v průmyslově využívaných kmenech *S. cerevisiae* mohla zvýšit produktivnost biotechnologických procesů (Příbylová *et al.*, 2007b).

V pokusu byl použit kmen *Z. rouxii* CBS 732.



Obr. 5

5. METODY

5. 1. Materiál, uchovávání kvasinkových kmenů

Kvasinkové kmeny jsou běžně uchovávány při -80 °C v 30 % glycerolu.

Pro účely pokusu byly použity tyto pro laboratorní účely běžně používané haploidní kmeny kvasinkových druhů:

S. cerevisiae Σ1278b,

S. cerevisiae FL 200,

S. pombe 972 h⁻,

D. hansenii CBS 767,

P. sorbitophila CBS 7064,

Y. lipolytica CBS 7504,

Z. rouxii CBS 732.

Pro porovnávání osmotolerance v mém pokusu byla jako vnější zdroj vysokého osmotického tlaku použita jedna netoxická iontová látka přítomná v buňce ve vysokých koncentracích (KCl), jedna silně toxická iontová látka (LiCl) a jedna netoxická neiontová látka (sorbitol).

5. 2. Média použitá v pokusu

Pro pěstování kmenů bylo připraveno běžné médium YPD.

YPD: 1% Yeast Extract

2% Bacto Peptone

2% glukóza

2% agar

Pro přípravu gradientových misek byla připravena jednak běžná YPD média s vyšší koncentrací agaru (3%), jednak čtyři média YPD s přidavkem níže uvedených látek.

YPD + 2,5 mol/l KCl: 1% Yeast Extract
2% Bacto Peptone
2% glukóza
3% agar
2,5 mol/l KCl

YPD + 1 mol/l LiCl: 1% Yeast Extract
2% Bacto Peptone
2% glukóza
3% agar
1 mol/l LiCl

YPD + 35% (m/V) sorbitol: 1% Yeast Extract
2% Bacto Peptone
2% glukóza
3% agar
35% sorbitol

5. 3. Kapkový test na miskách s gradienty látek

Pro hodnocení schopnosti růstu kvasinek za různých podmínek se používají takzvané kapkové testy, kdy se ve sterilní mikrotitrační destičce (Elisa) připraví ředící řady jednotlivých testovaných druhů resuspendovaných ve vodě a pomocí aplikátoru „ježek“ se nanášejí na Petriho misky s pevnými médii. Alternativou tohoto postupu je příprava gradientových misek, na něž se vzorky buněčných suspenzí nanášejí neředěné.

Gradientové misky se připravují postupným naléváním dvou různých médií na čtvercovou Petriho misku. Rozdíl ve složení médií je v obsahu koncentrace určité soli, jiné osmoticky aktivní látky, zdroji uhlíku nebo v pH. V pokusu zahrnutém v této práci se jedná o tři soli a cukerný alkohol. Postup je takový, že jedno médium se připraví jako čisté YPD a do druhého je přidáno určité množství dané látky. Gradient je pak vytvořen postupným nalitím médií; nejprve se do misky lije médium obsahující danou látku, a to tak, že miska je na jednom

okraji podložena, aby první vrstva média ztuhla v misce našikmo. Po ztuhnutí se miska položí do vodorovné polohy a první vrstva je přelita shodným objemem druhého média.

Po ztuhnutí je tak vytvořena živná půda o postupně se měnící koncentraci dané látky. Na tyto misky se tedy vzorky buněk nanáší rovnou ve stejných koncentracích.

Gradientové misky zde byly použity k porovnání tolerance sedmi kvasinkových druhů k postupně se zvyšujícím koncentracím dvou solí solí a sorbitolu. Jako základní médium bylo použito běžné YPD s 3% agarem.

Vybrané kmeny byly naočkovány z -80°C na malé Petriho misky s YPD a kultivovány při 30°C kromě *D. hansenii*, která roste lépe při pokojové teplotě (25°C).

Z narostlých buněk byly připraveny suspenze o stejné $\text{OD}_{600} = 1$ a ty byly použity pro kapkový test na gradientových miskách.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná fotodokumentace byla pořízena asi 48 hodin po naočkování suspenze buněk na gradientové misky, slovní doprovod vychází z dalších pozorování a fotografování, která byla prováděna po dobu 10 dní. Na levé straně každé fotografie je koncentrace osmolytu nejnižší, respektive nulová, na pravé straně pak nejvyšší.

6. 1. Růst na YPG + KCl 2,5 mol/l

Růst suspenze buněk s počáteční $OD_{600}=1$ na médiu s postupně se zvyšující (odleva doprava) koncentrací KCl.

S. cerevisiae Σ 1278b

S. cerevisiae FL 200

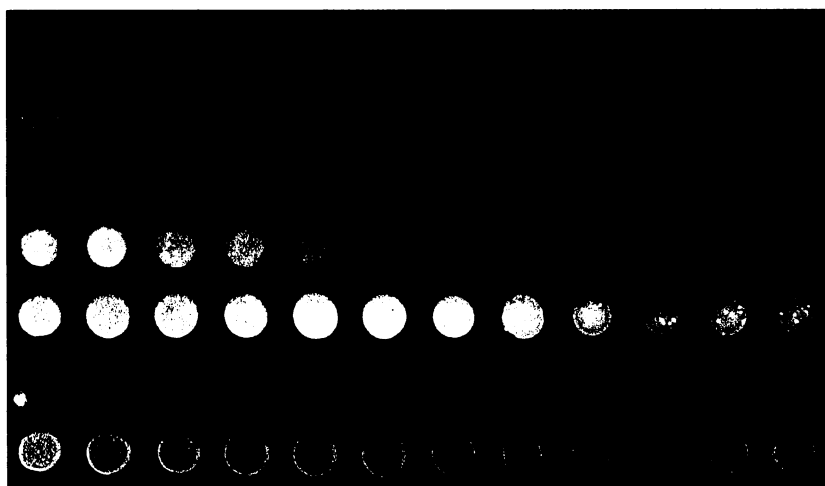
S. pombe

D. hansenii

P. sorbitophila

Y. lipolytica

Z. rouxii



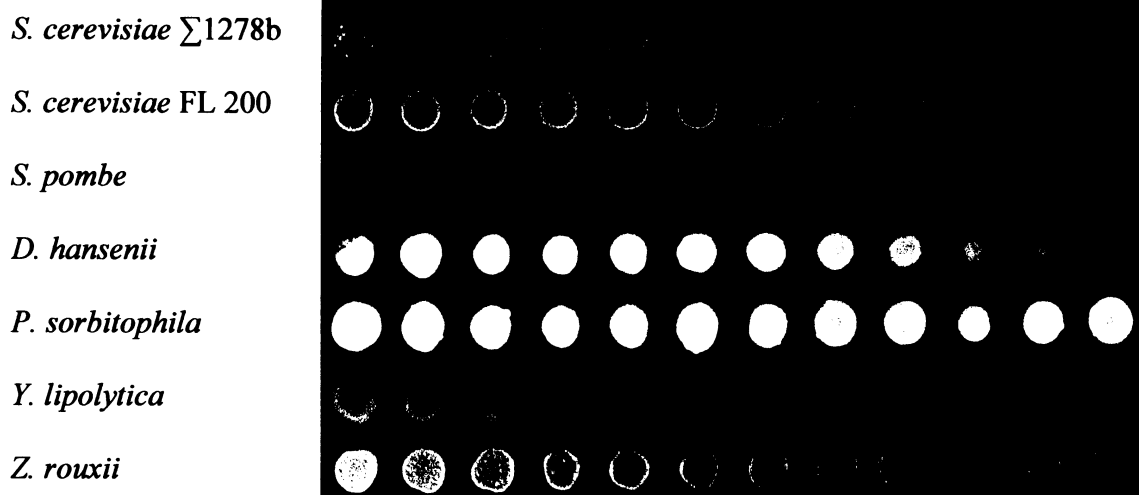
Obr. 6

Jak je zřejmé z obr. č. 6 (fotografický snímek růstu buněk na zvyšující se koncentraci KCl), KCl zpomaloval zejména růst *S. cerevisiae* Σ 1278b a *S. pombe*. *Y. lipolytica* a *D. hansenii* rostly na vyšších koncentracích také méně, ostatní tři druhy nebyly limitovány ani nejvyšší koncentrací KCl. Kromě *S. pombe* však i hůře rostoucí druhy dorostly před ukončením pokusu i na nejvyšší koncentraci.

S. cerevisiae FL 200, *P. sorbitophila* a *Z. rouxii* mají tedy nejlépe vyvinuté systémy exportu iontové netoxické látky.

6. 2. Růst na YPG + sorbitol 35%

Růst suspenze buněk s počáteční $OD_{600}=1$ na médiu s postupně se zvyšující (odleva doprava) koncentrací sorbitolu.



Obr. 7

Na sorbitolu rostly všechny buňky hned od prvního dne testu dobře, jen *S. cerevisiae* Σ1278b a *S. pombe* o něco hůř při nejvyšších koncentracích (viz obr. č. 7), rozdíl se však v posledních dnech pozorování ztrácel. Zejména *P. sorbitophila* a *Y. lipolytica* rostly velmi rychle a jejich kolonie se výrazně zvětšovaly až do konce pokusu.

Ukázalo se tak, že pro žádný z použitých kvasinkových druhů není sorbitol v koncentraci 35% nijak limitující.

6. 3. Růst na YPD + LiCl 1 mol/l

Růst suspenze buněk s počáteční $OD_{600}=1$ na médiu s postupně se zvyšující (odleva doprava) koncentrací LiCl.

S. cerevisiae Σ 1278b

S. cerevisiae FL 200

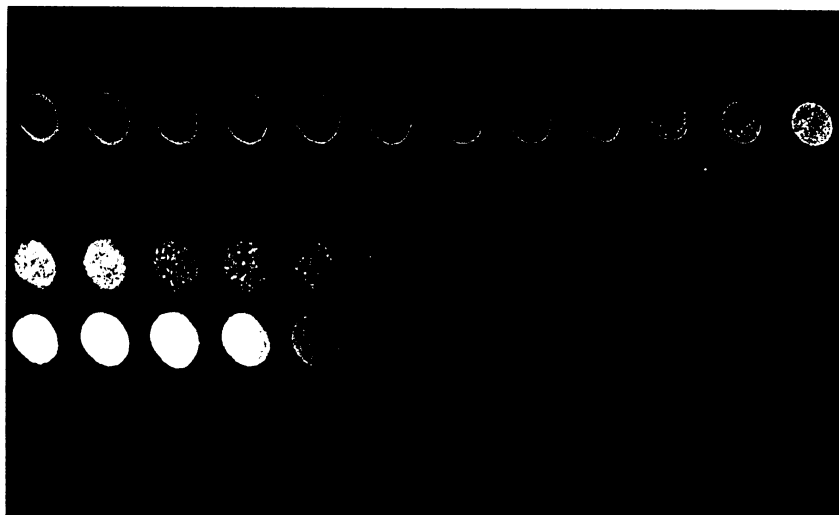
S. pombe

D. hansenii

P. sorbitophila

Y. lipolytica

Z. rouxii



Obr. 8

Jak je patrné z obrázku č. 8 (fotografický snímek růstu buněk na postupně se zvyšující koncentraci LiCl), LiCl jako vysoce toxická iontová látka již byla pro většinu druhů poměrně silně stresující. Nejúčinnější mechanismy pro export lithných iontů nese podle výsledků *S. cerevisiae* FL 200, všechny ostatní druhy měly ve vyšších koncentracích s růstem problém. Překvapivě velmi špatně rostla *Y. lipolytica*, která je řazena mezi středně osmotolerantní, stejně tak *Z. rouxii*, která dokonce, stejně jako osmosenzitivní *S. pombe*, nezačala růst ani 10. den. Tento výsledek naznačuje, že v případě LiCl se nejedná o reakci na osmotický šok, ale o různé mechanismy detoxifikace kationtů Li^+ .

Stejný pokus byl proveden ještě na médiu s NaCl, bohužel z důvodu špatně připravené gradientové misky a nedostatku času pro opakování pokus vyšel sporně a výsledky nemohu prezentovat.

6. 4. Srovnání osmotolerance jednotlivých druhů se *Z. rouxii*

Nečekaným jistěním bylo, že dva v laboratořích hojně používané kmeny *S. cerevisiae*, Σ 1278b a FL 200, vykazují značně rozdílnou toleranci ke všem třem osmotickým stresorům.

S. cerevisiae Σ 1278b na KCl i na sorbitolu roste podstatně hůře než *Z. rouxii* (obr. 6 a 7), *Z. rouxii* má tedy lepší systémy jak pro ochranu před zvýšenou koncentrací iontů soli, tak před koncentrací neiontového osmolytu. Vůči toxickým kationtům Li^+ má však zřejmě lepší obranné mechanismy *S. cerevisiae* Σ 1278b (obr. 8)

S. cerevisiae FL 200 vyrostla do konce pokusu dobře na všech osmolytech i v nejvyšší koncentraci. Její osmotolerance je podle mého názoru se *Z. rouxii* zhruba srovnatelná, kromě tolerance vůči LiCl, na němž *Z. rouxii* nevyrostla ani při nejnižší koncentraci.

S. pombe měla na všech médiích růst silně inhibovaný, na LiCl stejně jako *Z. rouxii* nezačala růst ani po deseti dnech (obr. 8). I na ostatních dvou médiích rostla nejhůře ze všech (obr. 6 a 7), potvrdilo se, že je osmosenzitivní, má nejméně účinné mechanismy exportu iontů i obrany před neiontovou látkou.

D. hansenii na sorbitolu rostla jen nepatrně hůř než *Z. rouxii* (obr. 6), na KCl pak o poznání hůře (obr. 7). Na LiCl pak do konce pokusu dorostla do poměrně vysoké koncentrace ve srovnání s ostatními.

P. sorbitophila, podle očekávání, rostla na sorbitolu nejlépe z použitých osmolytů, ve srovnání s dalšími druhy také nejlépe (obr. 6). Na KCl pak stejně jako *Z. rouxii* (obr. 7) a na LiCl byla schopna růstu až asi do půlmolární (podle odhadu) koncentrace (obr. 8).

Y. lipolytica, i když jinak je klasifikována jako osmotolerantní, měla stejně jako *Z. rouxii* velké problémy s růstem na LiCl (obr. 8). Na KCl rostla *Y. lipolytica* o něco hůře než *Z. rouxii* (obr. 7), na sorbitolu pak srovnatelně (obr. 6).

Pilotní pokus prokázal, že se v osmotoleranci a toleranci vůči toxickým kationtům alkalických kovů liší nejen jednotlivé druhy, ale i kmeny druhů mezi sebou (*S. cerevisiae* Σ 1278b a *S. cerevisiae* FL 200, viz nejlépe obr. č. 6), a že tolerance vůči těmto dvěma typům stresu není zcela spjata. Například osmotolerantní druhy *Y. lipolytica* a *Z. rouxii* jsou velmi citlivé i na nízké koncentrace lithia v médiu.

Mé výsledky tak potvrzují osmotoleranci kvasinky *Z. rouxii*, kromě toho, že na médiu obsahujícím lithium nezačala růst ani při nejnižší koncentraci. Druhou kvasinkou, obvykle řazenou mezi osmotolerantní, ale téměř neschopnou růst na lithiu, byla *Y. lipolytica*.

Zajímavé jsou výsledky s *S. cerevisiae* FL 200, o níž jsem bohužel nedohledala záznamy o míře osmotolerance, kterou jednoznačně vykazovala. Na všech médiích (včetně NaCl, i když tato data nejsou směrodatná) rostla nejlépe ze všech testovaných druhů.

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosud známé buněčné mechanismy, které přispívají nebo mohou přispívat k osmotoleranci kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii* a několika dalších kvasinek. Shrnutí literatury jsem doplnila jednoduchým pokusem srovnávajícím odolnost této kvasinky a několika dalších zajímavých druhů vůči několika typům osmotického stresu.

Klíčovými pro úspěšný růst kvasinek v prostředích s vysokou koncentrací osmolytů a pro vyrovnávání se s jejími náhlými změnami jsou jednak membránové transportéry, exportující účinně ionty ven z buňky, a jednak výborně regulované mechanismy tvorby, zadržování a uvolňování glycerolu a dalších malých osmoticky aktivních látek.

Identifikace konkrétních mechanismů a izolace genů zajišťujících osmotoleranci by byly obrovským přínosem pro biotechnologie, kde by se dala využít například heterologní exprese těchto genů v průmyslově využívaných kmenech *S. cerevisiae*. *Z. rouxii* by tak poskytla další z jedinečných vlastností, které tyto nejmenší eukaryotické organismy nabízejí k využití tomu nejvyvinutějšímu z eukaryot – člověku.

V rámci své diplomové práce a dalšího studia se budu tomuto tématu dále věnovat.

SEZNAM LITERATURY:

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (1998).** Základy buněčné biologie. Espero Publishing, s.r.o. , Ústí nad Labem.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M. and Prior, B. A. (1994).** *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**, 4135-4144.
- Banuelos, M. A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. and Potier, S. (1998).** The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**, 2749-2758.
- Beckerich, J. M., Boisrame-Baudevin, A. and Gaillardin, C. (1998).** *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int Microbiol* **1**, 123-130.
- Bill, R. M., Hedfalk, K., Karlgren, S., Mullins, J. G., Rydstrom, J. and Hohmann, S. (2001).** Analysis of the pore of the unusual major intrinsic protein channel, yeast Fps1p. *J Biol Chem* **276**, 36543-36549.
- de Montigny, J., Spehner, C., Souciet, J., Tekaiia, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F. and Potier, S. (2000a).** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 15. *Pichia sorbitophila*. *FEBS Lett* **487**, 87-90.
- de Montigny, J., Straub, M., Potier, S., Tekaiia, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F. and Souciet, J. (2000b).** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Lett* **487**, 52-55.
- Hohmann, S. (2002).** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372.
- Hohmann, S. and Nielsen, S. (2000).** Molecular biology and physiology of water and solute transport. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Iwaki, T., Tamai, Y. and Watanabe, Y. (1999).** Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* gene. *Microbiology* **145**, 241-248.
- Janderová, B., Bendová, O. (1999).** Úvod do biologie kvasinek (skriptum). Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum.

- Kinclová, O., Potier, S. and Sychrová, H. (2001).** The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol.* **88(2)** 151-8.
- Kinclová, O., Potier, S. and Sychrová, H. (2002).** Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**, 1225-1232.
- Lages, F. and Lucas, C. (1995).** Characterization of a glycerol-H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* **11**, 111-119.
- Lages, F., SilvaGraca, M. and Lucas, C. (1999).** Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology Uk* **145**, 2577-2585.
- Lucas, C., da Costa, M. and van Uden, N. (1989).** Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaromyces hansenii*. *Yeast* **6**, 187-191.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (1995).** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14**, 1360-1371.
- Marešová L. (2001)** Fyziologická charakterizace osmotolerantní kvasinky *Pichia sorbitophila* (diplomová práce). Praha.
- Neves, M. L., Oliveira, R. P. and Lucas, C. M. (1997).** Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **143 (Pt 4)**, 1133-1139.
- Oliveira, R. P., Lages, F. and Lucas, C. (1996).** Isolation and characterisation of mutants from the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila* defective in H⁺-glycerol symport activity. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 147-153.
- Papoušková, K. and Sychrová, H. (2006).** *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H⁺ antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* **580**, 1971-1976.
- Papoušková, K. and Sychrová, H. (2007a).** *Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H⁺ antiporters differing in their substrate specificity. *FEMS Yeast Res* **7**, 188-195.
- Papoušková, K. and Sychrová, H. (2007b).** Production of *Yarrowia lipolytica* Nha2 Na⁺/H⁺ antiporter improves the salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* **52**, 600-602.

- Papoušková, K. and Sychrová, H. (2007c).** The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* **118**, 1-7.
- Příbylová, L., Papoušková, K. and Sychrová, H. (2008).** The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (*ZrNha1p* and *ZrSod2-22p*) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fungal Genet Biol* **45**, 1439-1447.
- Příbylová, L., Farkaš, V., Slaninová, I., de Montigny, J. and Sychrová, H. (2007).** Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains. *Folia Microbiol (Praha)* **52**, 241-245
- Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B. A. and Kilian, S. G. (1997).** Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 7790-7795.
- Sychrová, H., Ramirez, J. and Pena, A. (1999).** Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 167-172.
- Sychrová, H., Braun, V., Potier, S. and Souciet, J. L. (2000).** Organization of specific genomic regions of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Pichia sorbitophila*: comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1377-1385.
- Tadashi and Toshiaki (1993).** Regulation of intracellular osmotic pressure and changes in intracellular proteins during the initial stages of salt stress in *Zygosaccharomyces* strains exhibiting differences in salt-tolerance. *Microbios* **74**, 155-166.
- Tang, X. M., Kayingo, G. and Prior, B. A. (2005).** Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. *Yeast* **22**, 571-581.
- Velková, K. and Sychrová, H. (2006).** The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**, 27-34.
- Watanabe, Y., Iwaki, T., Shimono, Y., Ichimiya, A., Nagaoka, Y. and Tamai, Y. (1999).** Characterization of the Na⁺-ATPase gene (*ZENAI*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* **88**, 136-142.
- Yagi (1988).** Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of a salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Microbiol Lett* **49** 317-321.
- <http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#>
- <http://www.genomenetwork.org/>
- <http://www.wateractivity.org/theory.html>