

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie

Studijní program Biologie  
Studijní obor Buněčná a vývojová biologie



Bc. Markéta Andršová

Charakterizace a funkční analýza genu *IST2* v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*  
Characterization and functional analysis of gene *IST2* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Sychrové, DrSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 4. 5. 2012

**Tato práce vznikala v letech 2009 - 2012 v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. v rámci grantových projektů:**

MŠMT LC531 (2005-2009) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek;

GA ČR 204/08/0354 (2008-2010) Homeostáze kationtů alkalických kovů v biologii *Saccharomyces cerevisiae*;

GA AV ČR IAA500110801 (2008-2012) Úloha antiporterů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  v buněčné fyziologii – souhra transportérů v optimalizaci vnitrobuněčné homeostáze  $\text{K}^+$  a pH.

**Poděkování:**

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za vedení a všechnen čas, který mi věnovala. Dále děkuji všem kolegům z Oddělení membránového transportu, kteří mi během práce často poskytli cenné rady.

Velké poděkování patří zejména mým nejbližším za všechnu jejich podporu.

# Abstrakt

---

*IST2* je znám jako gen kódující v modelové kvasince *Saccharomyces cerevisiae* membránový protein, který je studován díky jedinečnému způsobu transportu buňkou, během něhož zřejmě není vůbec využívána klasická sekreční dráha. Přestože gen byl pojmenován před více než deseti lety podle fenotypu buněk s jeho delecí (Increased Sodium Tolerance), dodnes není známo, jakým způsobem produkt genu *IST2* ovlivňuje toleranci buněk k toxickému sodíku. Naše rešerše v databázích ukazuje, že podobný protein je kódován i v genomech ostatních druhů kvasinek, žádný však nebyl zatím studován.

V této práci byla připravena série čtyř nových kmenů s delecí *IST2* v genetickém pozadí lišícím se přítomností genů kódujících transportní systémy pro akumulaci draslíku (*Trk1*, *Trk2*), pro export nadbytečných draselných kationtů (*Tok1*, *Ena1-5*, *Nha1*) a pro export toxických kationtů lithia a sodíku (*Ena1-5*, *Nha1*). Dále byl připraven plazmid nesoucí kódující sekvenci genu *IST2*. Pomocí fenotypových testů na pevných i v tekutých médiích byl studován účinek delece *IST2* v různých genetických pozadích. Bylo zjištěno, že *IST2* zřejmě nemá úlohu v osmotoleranci obecně (absence fenotypu delece ve vysokých koncentracích KCl), ale jeho přítomnost negativně ovlivňuje schopnost buněk vypořádat se s vysokými koncentracemi toxických solí sodíku a lithia. V buňkách s absencí vysokoafinitních importérů draslíku, které v prostředích s limitními koncentracemi draslíku rostou velmi špatně, navíc delece *IST2* pomáhá ke zlepšení růstu na médiích s limitně nízkým obsahem KCl. Pokud jsou však kromě genů kódujících importéry draslíku deletovány současně i geny pro jejich export, má delece *IST2* na růst buněk v prostředí s minimálním množstvím draslíku naopak výrazně negativní účinek. Fenotypové testy dále naznačily genetickou interakci mezi *IST2* a *ENA1-5* nebo *NHA1* a prokázaly, že protein Ist2 se podílí na udržování homeostáze kationtů alkalických kovů v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* a že jeho absence vede ve většině případů ke snížení koncentrace sodíku v buňkách. Na druhou stranu však stanovení fyziologických parametrů ovlivněných homeostází kationtů, jako je membránový potenciál nebo vnitrobuněčné pH, neprokázalo jejich výrazné ovlivnění v přítomnosti či nepřítomnosti *IST2*.

Klíčová slova: *IST2*, *Saccharomyces cerevisiae*, homeostáze kationtů, tolerance k solím.

# Abstract

---

*IST2* is known as a gene encoding in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* a membrane protein, that is studied thanks to a unique way of biogenesis and trafficking that apparently does not use classical secretory pathway. Although the gene was named more than ten years ago according to the phenotype of cells with its deletion (Increased Sodium Tolerance), the role of this protein in cell tolerance to toxic sodium has not been elucidated. Our searches in databases revealed that similar proteins are encoded in the genomes of other species of yeast, but none of them has been studied so far.

In this work, four new strains lacking *IST2* have been constructed in the genetic backgrounds differing by the presence of genes encoding transport systems for accumulation of potassium (Trk1, Trk2), for export of surplus potassium cations (Tok1, Ena1-5, Nha1) and for export of toxic cations lithium and sodium (Ena1-5, Nha1). Plasmid carrying the gene coding *IST2* sequence has also been constructed. The effect of *IST2* deletion in different genetic backgrounds was studied by phenotypic tests on solid and liquid media. It was found that *IST2* probably does not play a role in osmotolerance in general (absence of the phenotype of *IST2* deletion on high concentrations of KCl), but its presence affects ability of the cells to cope with high concentrations of toxic sodium and lithium salts. Furthermore, in cells lacking high-affinity potassium importers, that in environments with the limit potassium concentration grow very poorly, *IST2* deletion improves their growth on media with low KCl amounts. On the other hand, if in addition to genes encoding potassium importers also genes for exporters are deleted, then *IST2* deletion has a negative effect on cell growth in potassium-limited conditions. The results of phenotypic tests further suggested a genetic interaction between *IST2* and *ENA1-5* or *NHA1* and showed that Ist2 protein is involved in maintaining of homeostasis of alkali metal cations in *Saccharomyces cerevisiae* cells and that its absence leads in most cases to lower concentration of sodium inside the cells. On the other hand, estimation of physiological parameters related to cation homeostasis, such as membrane potential or intracellular pH, did not show significant changes in *IST2* presence or absence.

Keywords: *IST2*, *Saccharomyces cerevisiae*, cation homeostasis, tolerance to salt.

# Obsah

---

Seznam zkratk	9
1. Úvod do řešené problematiky	11
1.1. Kvasinky a jejich využití	11
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> jako model	11
1.2. Homeostáze kationtů v kvasinkových buňkách	12
1.2.1. Tolerance kvasinek vůči vnějšímu osmotickému tlaku	13
1.3. Transportéry plazmatické membrány <i>S. cerevisiae</i> ovlivňující homeostázi kationtů	14
1.3.1. H <sup>+</sup> -ATPáza Pma1	15
1.3.2. Import draselných kationtů	16
1.3.3. Export draselných kationtů	17
1.3.4. Import a export sodných kationtů	17
1.3.5. Kmeny s delecemi genů pro transportéry	19
1.4. Gen a protein Ist2	19
1.4.1. Vývoj představ o biogenezi proteinu Ist2 v buňce	21
1.4.2. Příbuzní Ist2 v živočišné říši a jejich funkce	24
2. Cíle práce	27
3. Materiál	27
3.1. Přístroje a pomůcky	27
3.2. Chemikálie a komerčně dodávané kity	28
3.3. Roztoky	30
3.3.1. Média pro kultivaci kvasinkových buněk	30
3.3.2. Média pro kultivaci bakteriálních buněk	31
3.4. Biologický materiál (kvasinkové a bakteriální kmeny)	31
3.5. DNA – plazmidy a oligonukleotidy	32
3.5.1. Plazmidy	32
3.5.2. Oligonukleotidy	32
4. Metody	34
4.1. Mikrobiologické metody	34
4.1.1. Sterilizace materiálu	34
4.1.2. Stanovení optické denzity (OD) buněk	34

4.1.3. Kultivace a uchovávání buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
4.1.4. Kultivace a uchovávání buněk <i>Escherichia coli</i> .....	35
4.2. Metody genových manipulací .....	35
4.2.1. Transformace buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
4.2.2. Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> .....	36
4.2.3. Izolace genomové DNA ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
4.2.4. Izolace plazmidové DNA ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
4.2.5. Izolace plazmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.2.6. Restrikční analýza .....	38
4.2.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	38
4.2.8. Příprava deleční kazety pro homologní rekombinaci .....	39
4.2.9. Colony PCR .....	41
4.2.10. Elektroforetická analýza DNA .....	42
4.3. Metody pro porovnávání fenotypů kvasinkových kmenů .....	43
4.3.1. Kapkový test.....	43
4.3.2. Růstové křivky .....	43
4.3.3. Fluorescenční mikroskopie .....	43
4.3.4. Stanovení intracelulárního pH pomocí pHlorinu .....	44
4.3.5. Měření relativního membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy .....	45
4.3.6. Stanovení obsahu sodných kationtů v buňkách.....	45
5. Výsledky experimentální části práce .....	47
5.1. Delece genu <i>IST2</i> v genomu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
5.1.1. Příprava delečních kazet .....	47
5.1.2. Transformace <i>S. cerevisiae</i> delečními kazetami .....	48
5.1.3. Ověření delece genu <i>IST2</i> .....	49
5.1.4. Odstranění delečních kazet .....	51
5.2. Kmeny s genem <i>IST2</i> a kmeny <i>ist2Δ</i> v kapkových testech .....	53
5.3. Růstové křivky kmenů s geny <i>IST2</i> a s delecí <i>ist2Δ</i> .....	58
5.4. Komplementace delece <i>ist2Δ</i> zpětným vnesením genu <i>IST2</i> v plazmidu do buněk .....	61
5.4.1. Příprava fragmentu s <i>IST2</i> .....	62
5.4.2. Štěpení plazmidu YEp352-NHA1 .....	63
5.4.3. Transformace <i>S. cerevisiae</i> a selekce a ověření nového plazmidu.....	63
5.4.4. Ověření fenotypu buněk transformovaných plazmidem s <i>IST2</i> .....	64

5.5. Měření vnitrobuněčného pH .....	65
5.5.1. Transformace kmenů a ověření fluorescence.....	65
5.5.2. Vlastní měření vnitrobuněčného pH.....	66
5.6. Měření membránového potenciálu .....	69
5.7. Vnitrobuněčný obsah sodíku.....	71
5.8. Homology <i>IST2</i> v dalších kvasinkách .....	73
6. Diskuze .....	76
7. Závěr .....	79
Seznam použité literatury .....	80



# Seznam zkratek

---

AA, AAs	aminokyselina, aminokyseliny
ATP	adenosintrifosfát
bp	počet párů nukleotidů v DNA (base pairs)
BSM	směs auxotrofních přísadků
BSM-U	směs auxotrofních přísadků bez uracilu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
G	geneticin
G <sup>S</sup> /G <sup>R</sup>	geneticin senzitivní/geneticin rezistentní kmen
GFP	zelený fluorescenční protein
GK	Golgiho komplex
HML	směs auxotrofních přísadků histidin, methionin, leucin
HMU	směs auxotrofních přísadků histidin, methionin, uracil
HEPES	kys. 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová
LB	médium Luria-Bertani/lysogeny broth
leu <sup>-</sup> /leu <sup>+</sup>	kmen s auxotrofií/prototrofií na leucin
MES	kys. 2-(N-morfolino)ethansulfonová
mRNA	mediátorová RNA
OD <sub>600 (595)</sub>	optická hustota měřená při 595 (600) nm
PCR	polymerázová řetězová reakce
PM	plazmatická membrána
pH <sub>in</sub>	vnitrobuněčné pH
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
TEA	triethanolamin
U	jednotka aktivity restrikčních enzymů (1 U = 1 μmol substrátu/min)

ura <sup>-</sup> /ura <sup>+</sup>	kmen s auxotrofií/prototrofií na uracil
YNB (-F)	minimální růstové médium (yeast nitrogen base)
YPD	bohaté růstové médium (yeast peptone dextrose)

# 1. Úvod do řešené problematiky

---

## 1.1. Kvasinky a jejich využití

Kvasinky tvoří skupinu mikroorganismů patřících mezi houby, konkrétně askomycety nebo bazidiomycety. Jde o nejjednodušší, ale neuvěřitelně výkonné organizmy říše *Eukaryota*, které jsou dobře známé a denně zajišťují jak rozvoj vědění vědců či lékařů, tak třeba práci pivovarníků celého světa.

Množí se většinou pučením a vyskytují se v jednobuněčné formě, i když některé druhy kvasinek jsou schopné tvořit hyfální či pseudohyfální útvary. Průměrná kvasinková buňka obsahuje všechny důležité komponenty charakteristické pro buňky říše *Eukaryota* – mimo jiné jádro obalené membránou, mitochondrie, endoplazmatické retikulum či vakuoly odpovídající lyzozomům buněk živočišných. Zdroje uhlíku zpracovává většina kvasinek kvašením, což je už několik tisíc let využíváno lidstvem pro výrobu alkoholických nápojů. Princip kvasných procesů však odhalil a popsal až v druhé polovině 19. století ve Francii Ludvík Pasteur (Gel, 1968).

Dnes jsou kvasinkové mikroorganismy kromě výroby alkoholu a použití v pekařství využívány také k produkci některých vitamínů nebo léčiv a v dalších biotechnologických procesech. Některé druhy rodů *Candida* nebo *Cryptococcus* naopak mohou pro člověka být za určitých podmínek patogenní, ve většině případů ale u jinak zdravých jedinců nezpůsobují vážná onemocnění, kromě *Cryptococcus neoformans*, který může vyvolat i smrtelná onemocnění nervové soustavy (Alvarez *et al.*, 2009).

### 1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* jako model

Jako nejjednodušší existující *Eukaryota* sdílející s vyššími organizmy všechny základní buněčné systémy se kvasinky k využití pro výzkum dějů probíhajících v buňkách přímo nabízejí. Důvodů, proč se právě *S. cerevisiae* stala oblíbeným modelovým organizmem mnoha vědních oborů, je několik. Kromě podobnosti buněčných dějů v kvasinkách a ve vyšších *Eukaryotech*, včetně člověka, je to dostupnost kompletní sekvence genomu. Ta byla publikována v roce 1996 jako druhá genomová sekvence vůbec a jako první sekvence eukaryotická (po bakterii *Escherichia coli*). Genom *S. cerevisiae* je nesen 16 chromozomy a asi 6200 geny (Mortimer *et al.*, 1989; Goffeau *et al.*, 1996). Po ukončení projektu

sekvenování se v současné době nacházíme v takzvané éře proteomu, kdy snahou vědy je objasnění biologického významu všech genových produktů.

Znalost sekvence a možnost existence kvasinkových buněk v haploidním stavu dovolují vědcům různé genové manipulace. Krátká generační doba (mnohé divoké kmeny se rozdělí za méně než 2 hodiny) umožňuje snadno a rychle sledovat vývoj kvasinkové populace a díky tomu a díky jednoduché manipulaci s buněčnými kulturami lze za poměrně krátkou dobu provést velké množství experimentů. V neposlední řadě není výzkum (alespoň v případě běžně používaných kmenů *S. cerevisiae*) omezen patogenicitou, která znesnadňuje práci s mnoha jinými mikrobiálními druhy.

## 1.2. Homeostáze kationtů v kvasinkových buňkách

Protože kvasinky jsou organizmy bez jakékoli schopnosti pohybu, musí být schopné se vyrovnat s neustálými změnami prostředí, ve kterém se nacházejí, tedy se změnami koncentrací živin, koncentrací iontů, obsahu vody nebo hladiny pH. Udržení rozdílných koncentrací různých iontů uvnitř buněk je pro každý živý organizmus zásadní otázkou a kvasinkové buňky nejsou výjimkou. Zatímco kation draslíku je nezbytný pro regulování hladiny pH, buněčného objemu, membránového potenciálu nebo aktivaci některých enzymů, přítomnost kationtů sodíku, stejně jako jejich analogů kationtů lithia, je pro buňku nežádoucí z důvodu jejich toxicity. Vysoké koncentrace jakékoliv látky, jak sodného, tak i draselného kationtu, stejně jako třeba cukrů, což je asi forma stresu pro kvasinky žijící v přírodě nejčastější, mohou navíc buňce způsobit osmotický šok a tím ztrátu vody, která může vést až k její smrti.

Situace v buňkách včetně kvasinkových je tedy přesně opačná než v přírodě, kde sodík je velmi hojný a draslík spíše vzácný prvek. Z toho jasně vyplývá, že buňka musí neustále vynakládat obrovské množství energie na udržování poměrů koncentrací těchto dvou kationtů ve vnitrobuněčném prostoru v požadovaných hodnotách. Její základní snahou je tedy udržet vysokou vnitrobuněčnou koncentraci kationtů draselných a kationty sodíku naopak udržovat v minimálním množství. K udržení rozdílného prostředí v jednotlivých buněčných kompartmentech a celkově uvnitř buňky vzhledem k okolnímu prostředí slouží kvasinkám, stejně jako všem ostatním buňkám, vysoce organizovaný systém membrán. Buňky celé jsou obaleny pružnou a polopropustnou plazmatickou membránou, jejíž přítomnost je jednou ze základních charakteristik živé buňky. Kvasinky jsou obaleny navíc ještě buněčnou stěnou,

kteřá je první bariérou mezi jejich vintrobuněčným prostředím a okolím. Její složení je pro kvasinkové buňky typické, odlišné od složení buněčných stěn rostlin nebo bakterií. Skládá se především z chitinu, glukanu a glykosylovaných proteinů (Janderová a Bendová, 1999). Buněčná stěna udržuje pevnost a odolnost buňky, bez ní by pro kvasinku byly fatální již například malé změny osmotického tlaku okolí. Je ale relativně dobře propustná i pro velké molekuly, není tedy nijak selektivní. O tom, jaké molekuly do kvasinkové buňky vstoupí, rozhoduje pouze jejich plazmatická membrána. Jakýkoli stres zvenčí nejprve nějakým způsobem zasáhne její vlastnosti (Alberts *et al.*, 1998). Před podkapitolou, která se plazmatickou membránou kvasinek zabývá podrobněji, je nutné krátce odbočit k definici osmotického tlaku.

### **1.2.1. Tolerance kvasinek vůči vnějšimu osmotickému tlaku**

Jak bylo uvedeno, jednou ze změn, s nimiž se kvasinková buňka musí umět vyrovnat, je změna osmotického tlaku okolí. Představíme-li si nádobu s vodou rozdělenou na dvě části polopropustnou membránou, která propouští rozpouštědlo (solvent), ne však rozpuštěnou látku (solut), do jejíž jedné části přidáme lžici cukru, soli či jiné dobře rozpustné látky, voda bude prostupovat membránou do této části nádoby v ději zvaném osmóza až do vyrovnání koncentrací roztoků. Takovou bariérou je i plazmatická membrána kvasinek, stejně jako všechny ostatní buněčné membrány (Alberts *et al.*, 1998). Voda přes buněčné membrány prochází narozdíl od solutů relativně snadno, proto vstupuje či vystupuje osmózou do či z buňky podle toho, na které straně je vyšší koncentrace solutů. Protože je voda pro všechny organizmy nezastupitelnou látkou, bez níž by nemohly v buňce probíhat žádné z životně důležitých dějů, jakými jsou enzymatické reakce zpracovávající různé metabolity nebo růst buňky umožněný tlakem vody zevnitř, mohou být situace velkého úniku vody stejně jako jejího zvýšeného vstupu do buňky velmi stresující a mohou vést až k buněčné smrti. V hyperosmotickém prostředí, které může pro kvasinkovou buňku v přírodě reprezentovat třeba ovocná šťáva, uniká voda z buněk ven a to může mít za následek znemožnění průběhu životně nezbytných dějů. V prostředí hypoosmotickém, například kapce čisté vody, vniká voda do buňky a může dojít až k jejímu prasknutí. Některé kvasinkové druhy jsou sice schopny růst v podmínkách, které jsou pro buňky jiných organismů už limitující, v zásadě je pro ně ale vysoká osmolarita stresující a musí mít účinné mechanismy pro to, jak se s ní vyrovnat.

Plazmatické membrány kvasinek proto obsahují proteinové senzory osmotického tlaku, které při osmotickém stresu signalizují prostřednictvím dráhy HOG (High Osmolarity Glycerol; Hohmann, 2002), což je signální kaskáda spouštějící odpověď buňky na tento stres v podobě zahájení syntézy glycerolu a zvýšení aktivity celé řady dalších metabolických drah. Glycerol jako malá nenabitá avšak osmoticky aktivní látka je kvasinkovými buňkami v období hyperosmotického stresu akumulován a tak využíván pro vyrovnání osmolarity na dvou stranách membrány. Vedle spuštění signální dráhy HOG se pak v kvasinkových buňkách samozřejmě uplatňují rozličné způsoby transportu iontů a dalších osmoticky aktivních částic přes membránu (Hohmann, 2002).

Vedle látek, jakými jsou cukry nebo polyalkoholy, může být osmotický stres způsoben přítomností solí v okolí. *S. cerevisiae* je schopna tolerovat a růst v koncentraci až okolo asi 1,5 M NaCl nebo 2 M KCl, v závislosti na kmeni (Petreszelyova *et al.*, 2010), takové podmínky však pochopitelně nejsou přirozené a ideální. Kromě přirozené snahy o vypuzení nežádoucích iontů ven z buňky a navrácení jejich koncentrací uvnitř do původního stavu se na homeostázi kationtů alkalických kovů v cytosolu kvasinek podílí i sekvence těchto iontů do organel jako je vakuola. I tyto transportní proteiny organel, například antiporter Vnx1 ve vakuolární membráně (Cagnac *et al.*, 2007; Cagnac *et al.*, 2010), přispívají ke kontrole množství kationtů v cytosolu. Stručným popisem membrán *S. cerevisiae* a proteinových transportérů, které zajišťují import a export kationtů alkalických kovů přes plazmatickou membránu, se zabývá následující podkapitola.

### **1.3. Transportéry plazmatické membrány *S. cerevisiae* ovlivňující homeostázi kationtů**

Primární úlohou každé buněčné membrány je kontrolovat tok látek dovnitř a ven z buňky, případně dovnitř a ven z vnitrobuněčného oddílu, protože předpokladem přežití je pro buňku příjem živin a výdej metabolitů a dále nepotřebných či toxických látek. To je úlohou transportních proteinů buněčných membrán (Alberts *et al.*, 1998). Každou tuto membránu tvoří lipidová dvojvrstva, do níž jsou zanořeny či k ní různými způsoby ukotveny proteiny s funkcí receptorů reagujících na změny okolí a přenášejících informace do nitra buňky, proteiny s funkcí enzymů zprostředkovávajících různé reakce, nebo proteiny sloužící k transportu látek. Složení plazmatické membrány kvasinek nemá vzhledem ke zbytku eukaryotické říše významná specifika, snad kromě přítomnosti ergosterolu, který zde má zpevňující funkci analogickou funkcí cholesterolu buněk živočišných.

Proteiny plazmatické membrány jsou syntetizovány na ribozomech endoplazmatického retikula (ER) a v průběhu translace rovnou zanořovány do jeho membrány, z níž se pak odškrucují dále putující sekreční váčky. Na periferii proteiny cestují v těchto sekrečních váčkách přes Golgiho komplex (GK), kde jsou dále upravovány, například glykosylovány či jsou odštěpovány jejich fragmenty. K objasnění této transportní dráhy eukaryotických buněk významně přispěly právě kvasinky a jejich sekreční mutanty (Lodish *et al.*, 2000), které jsou citlivé na vyšší, takzvanou nepermissivní teplotu, obvykle 37 °C, a po přesunutí buněk do této teploty dojde k zastavení sekrece všech nových proteinů a jejich hromadění v místě, kde je dráha blokována. Tak je možné studovat vliv jednotlivých genových produktů na sekreční dráhu.

Buněčná membrána s jejími transportéry je tedy základním předpokladem životaschopnosti eukaryotické buňky. Z předchozích podkapitol vyplývá, že transportéry kvasinkové buněčné membrány buňce musí mimo jiné zajistit aktivní import draselných kationtů, aktivní export sodných kationtů, udržování ideálního poměru  $K^+/Na^+$ , udržování membránového potenciálu a pH, turgoru a ochranu před osmotickým stresem (Arino *et al.*, 2010).

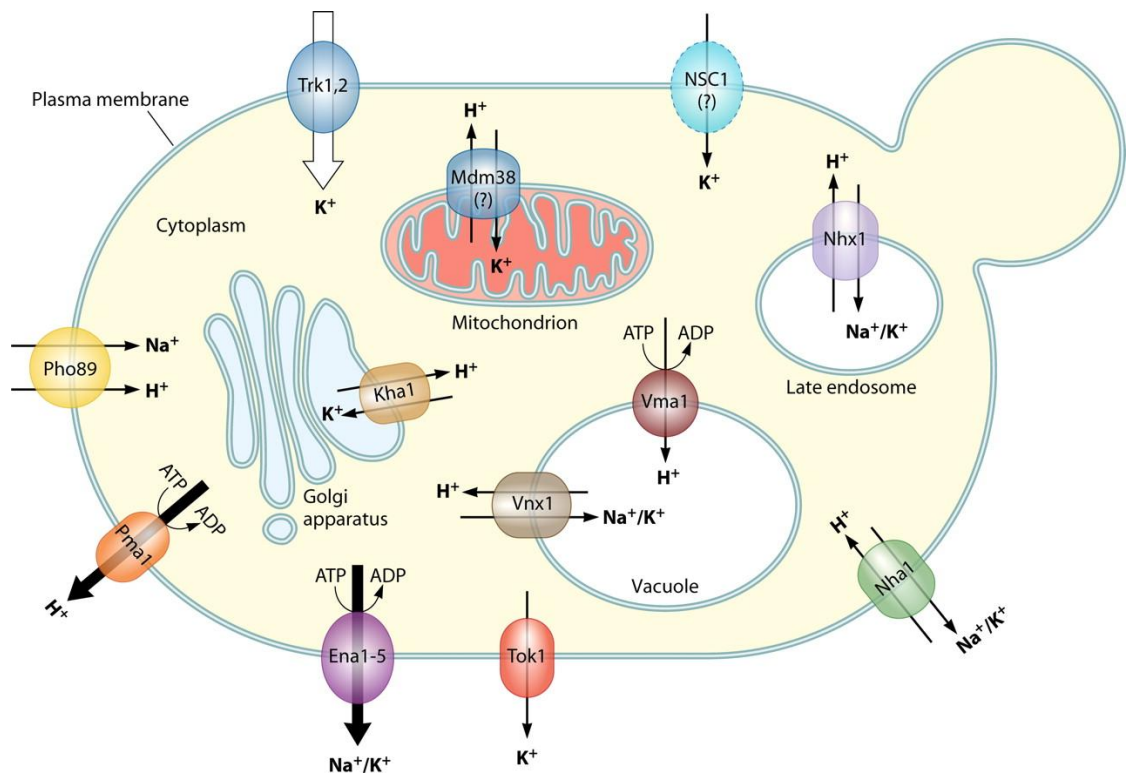
Živočišné buňky využívají k udržování ideálních poměrů koncentrací sodíku a draslíku, regulaci pH a dalších procesů v buňkách zejména  $Na^+/K^+$  ATPázu plazmatické membrány (Alberts *et al.*, 1998), která exportuje sodné kationty z buňky a importuje kationty draselné na úkor energie získané štěpením ATP. Vytvořený gradient  $Na^+$  pak slouží také k symportu živin do buněk. Kvasinkový genom takový protein nekóduje a celý systém má jiný princip. Následující podkapitoly shrnují a stručně charakterizují známé transportéry kationtů alkalických kovů plazmatické membrány *S. cerevisiae*, jejich příspěvek k homeostázi kationtů v buňce a nejdůležitější způsoby jejich regulace.

### 1.3.1. $H^+$ -ATPáza Pma1

$H^+$ -ATPáza (obr. 1) kódovaná genem *PMA1* je nejznámějším proteinem kvasinkové plazmatické membrány, na jejímž fungování je závislé udržování vnitrobuněčného pH a funkce v podstatě všech sekundárně aktivních transportních systémů. Pma1 exportuje protony proti jejich koncentračnímu gradientu za současného štěpení ATP a je tak hlavním regulátorem kontrolujícím membránový potenciál a vnitrobuněčné pH. Gradient protonů

vytvářený aktivitou Pma1 je také využíván symportními a antiportními systémy buněčné membrány jako je  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (níže).

Fungování Pma1 je citlivě regulováno. ATPáza je silně aktivována zejména přítomností glukózy, a to posttranskripčně i posttranslačně (Serrano, 1983; Sychrová and Kotyk, 1985), nebo snížením intracelulárního pH (Eraso and Gancedo, 1987). Jako jediný ze všech genů pro membránové proteiny uváděné v této práci je gen *PMA1* pro existenci kvasinkové buňky esenciální.



**Obr. 1.** Transportéry kationtů alkalických kovů v kvasinkové buňce. Převzato z Arino *et al.*, 2010.

### 1.3.2. Import draselných kationtů

K příjmu nezbytných kationtů draslíku z okolí slouží kvasinkám dva vysokoafinitní uniportní systémy Trk1 a Trk2 (TRansport of K<sup>+</sup>; obr. 1), které jim umožňují růst i v podmínkách s mikromolárním množstvím draslíku (Navarette *et al.*, 2010).

Mutantní kmeny *trk1Δ trk2Δ* jsou sice životaschopné, ale protože nemohou snadno importovat draselné kationty, vyžadují jejich několikanásobně vyšší koncentraci v médiu



v porovnání s požadavky rodičovských buněk. V důsledku tohoto omezení jsou kmeny s takto porušeným importem draslíku také v porovnání s rodičovskými kmeny hyperpolarizované (Marešová *et al.*, 2006) a mají nižší pH, což může být způsobeno sníženou funkcí Pma1 v důsledku hyperpolarizace (Navarette *et al.*, 2010). Nějaký minimální import draslíku je v těchto mutantech nejspíš zprostředkován transportérem NSC1 (Non-Specific Cation Channel), který vedle transportu dalších kationtů zprostředkovává jeho nízkoafinitní import (Bihler *et al.*, 2002). Jeho gen však zatím nalezen a definován nebyl.

### 1.3.3. Export draselných kationtů

I když se buňky za běžných podmínek snaží udržovat si poměrně vysoké koncentrace draselných iontů (většinou kolem 150-200 mM), ocitne-li se buňka v prostředí, kde je jejich koncentrace příliš vysoká, způsobí jí to osmotický stres. Kvasinková buňka je schopna nadbytek draselných kationtů eliminovat několika způsoby. Specifickým proteinem transportujícím draselný kationt je Tok1, napětově ovládaný kanál přenášející draslík ve většině případů ven z buňky (Ketchum *et al.*, 1995; Bertl *et al.*, 2003).

Tok1 je aktivován depolarizací buněčné membrány, tedy v situaci, kdy velikost záporného náboje na vnitřní straně plazmatické membrány klesá vzhledem k její kladně nabitě vnější straně (kdy se rozdíl nábojů zmenšuje), a umožňuje pak export  $K^+$  a tím upravení membránového potenciálu (Marešová *et al.*, 2006). Mutantní kmeny *tok1Δ* jsou vzhledem k rodičovským buňkám mírně depolarizované, protože kladně nabitého draselného kationtu se dostává ven z buňky v porovnání s rodičovskými buňkami méně.

Ionty draslíku jsou dále exportovány pomocí systémů primárně charakterizovaných jako exportéry kationtů sodných a lithných, a to ATPázou Ena1 a antiporterem Nha1 (Zahrádka and Sychrová, 2012).

### 1.3.4. Import a export sodných kationtů

Transportér aktivně importující specificky ionty  $Na^+$  nebyl v kvasince *S. cerevisiae* charakterizován, vzhledem k jeho toxicitě to není překvapivé. Je ale znám mechanismus umožňující import fosfátového iontu do buňky v podmínkách vyššího extracelulárního pH, a to kotransport s  $Na^+$  zprostředkovaný proteinem Pho89 (Persson *et al.*, 1998). Sodné kationty jinak vnikají do buněk nesespecificky přes jiné transportéry (Szopinska *et al.*, 2011) a jen jsou-li v extracelulárním prostředí ve vysoké koncentraci. Pro vstup do buněk mohou zneužít

transportéry primárně určené pro kationty draselné, tedy transportéry Trk, a za určitých podmínek také nespecifický kanál NSC1 a pravděpodobně i řadu dalších (Rodriguez-Navarro, 2000).

Na to, aby toxický sodík eliminovaly, buňky musí vynaložit energii. Jsou popsány dva způsoby, jimiž buňky *S. cerevisiae* toxické ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  exportují, a to jeden spotřebovávající energii ATP a druhý využívající jako zdroj energie gradient protonů přes plazmatickou membránu.

#### 1.3.4.1. $\text{Na}^+$ -ATPázy Ena

Geny *ENA* (Exitus NAtru; obr. 1) kódují proteiny plazmatické membrány sloužící k exportu  $\text{Na}^+$  a dalších kationtů alkalických kovů na úkor energie ATP (Haro *et al.*, 1991). Jejich počet se v různých kmenech *S. cerevisiae* liší, v kmeni BY4741, který byl použit pro experimentální část této práce, jsou 3, tandemově řazené *ENA1*, *ENA2* a *ENA5* (Wieland *et al.*, 1995; Petrezselyová *et al.*, 2010). Obecně platí, že vyšší počet těchto genů znamená pro vyšší toleranci kmene vůči solím (Wieland *et al.*, 1995). ATPázy Ena zajišťují kvasinkám schopnost přežít i v prostředí s ionty sodíku nebo lithia, které jsou jejich prostřednictvím eliminovány. Jsou tak klíčovými proteiny pro detoxifikaci a homeostázi iontů alkalických kovů. Mutantní kmeny *ena1-5Δ* jsou životaschopné, avšak velmi citlivé k vyšším koncentracím sodíku i lithia v prostředí (Haro *et al.*, 1991).

Exprese ATPázy Ena1 je regulována několika způsoby, zvýšena je zejména při expozici buněk vysoké koncentraci solí nebo zásaditému pH, a, jako exprese mnoha dalších genů *S. cerevisiae*, potlačována glukózou jako zdrojem energie a uhlíku (Alepez *et al.*, 1997; Janderová a Bendová, 1999).

#### 1.3.4.2. Antiporter Nha1

Jak už bylo řečeno, kvasinkové buňky nedisponují ATPázou typu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  jako buňky živočišné, ale pro regulaci vnitrobuněčných koncentrací kationtů a regulaci pH využívají antiportní systém plazmatické membrány kódovaný genem *NHA1* (obr. 1). Nha1 využívá gradient protonů vytvářený ATPázou Pma1 a je tak aktivní zejména v kyselém extracelulárním pH, jak vyplývá z jejího charakteru využívajícího extracelulární protony, zatímco v zásaditějším pH kvasinka spíše uplatní ATPázu (Banuelos *et al.*, 1998).

Membránové antiportery rodiny Nha jsou zřejmě společné všem kvasinkovým druhům, liší se však svými substráty. Nha1 kvasinky *S. cerevisiae* patří do podrodiny s takzvanou širší substrátovou specifitou, která mu umožňuje export jak kationtů sodíku a lithia, tak draslíku a jeho analogu rubidia (Kinclová *et al.*, 2001). Kmeny *S. cerevisiae* postrádající gen *NHA1* se stejně jako kmeny s delecí *ENA1* vyznačující zvýšenou citlivostí k vysokým koncentracím solí v médiu. Narozdíl od úzkostlivě regulované exprese ATPázy *ENA1* je exprese *NHA1* nízká a konstitutivní.

### 1.3.5. Kmeny s delecemi genů pro transportéry

Jak bylo zmíněno, žádný z výše uvedených genů kromě *PMA1* není esenciální, což umožňuje snadno studovat efekty jejich přítomnosti a nepřítomnosti v kvasinkových buňkách. Z uvedených charakteristik transportérů iontů v kvasinkové buněčné membráně vyplývá, že mutované kmeny, postrádající jeden či více genů pro tyto proteiny, se svým chováním od kmenů původních obvykle výrazně liší. Společné pro ně je, že v prostředí s vysokými koncentracemi solí je jejich schopnost růstu ve srovnání s divokým typem zhoršena, nebo, mají-li porušený import draslíku, stejně tak i v prostředí s limitně nízkou koncentrací draselného kationtu. Nicméně dokonce buňky s delecí pěti výše popsaných genů, jak *TRK1* a *TRK2* pro import draslíku, tak *TOK1* pro jeho export a *ENA1-5* a *NHA1* pro export nadbytku kationtů alkalických kovů, jsou životaschopné, ovšem pouze v přísně limitovaných vnějších koncentracích kationtů (Navarette *et al.*, 2010). Na druhou stranu byly popsány i geny, jejichž delece schopnost růstu buněk za stresujících podmínek naopak zlepšuje. Jedním takovým příkladem je *IST2*, jímž se zabývá tato diplomová práce.

## 1.4. Gen a protein Ist2

Protein Ist2 je kódován lokusem *IST2* se systematickým názvem *YBR086c* dlouhým 2841 nukleotidů, translatován je do 946 aminokyselin dlouhého proteinu s 8 predikovanými transmembránovými segmenty podle programu TMHMM (Program for prediction of TransMembrane Helices based on Markov; Krogh *et al.*, 2001) Jméno Ist2 dostal tento protein od autorů práce publikované v roce 1999 (Entian *et al.*, 1999), kteří provedli velkoplošný screening 150 do té doby necharakterizovaných genů kvasinky *S. cerevisiae*. Byly připraveny deleční mutanty těchto genů a testována jejich citlivost vůči stresu ze solí,

teploty, změny v uspořádání jejich cytoskeletu, změny v buněčném cyklu a různá další kritéria. Na základě toho byly studované geny rozděleny do skupin podle buněčného procesu, který jejich delece nějak ovlivnila; všechny viabilní deletanty je možné získat ze sbírky EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional Analysis; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>).

Z předchozí kapitoly o membránových transportérech kationtů v kvasinkách vyplývá, že jejich absence v genomu v zásadě vždy nějak zhoršuje schopnost adaptace takových buněk na stresující změny koncentrací iontů v prostředí. Entian *et al.* (1999) však překvapivě odhalili 8 genů, jejichž delece vedla ke zlepšení fenotypu buněk vzhledem k rodičovskému kmeni při růstu ve vysoké koncentraci NaCl. Mezi nimi byl i gen *YBR086c* pojmenovaný na základě toho *IST2* (Increased Sodium Tolerance). Je důležité zde zmínit, že autoři testovali kromě chloridu sodného také vliv chloridu draselného, ale to žádný efekt v souvislosti s *IST2* nemělo. Geny pojmenované ze stejného důvodu *IST1* nebo *IST3* získaly během následujících let nová jména podle později popsaných úloh v buňce (například protein Ist3/Snu1, jedna z komponent účastnících se sestřihu mRNA). Narozdíl od nich ale význam a mechanismus fungování proteinu Ist2 dodnes popsán nebyl.

Bioinformaticky i experimentálně (Jüschke *et al.*, 2004) bylo prokázáno, že Ist2 je integrální membránový protein. Práce z posledních let zpochybňují dřívější názor, že je lokalizován v plazmatické membráně, a favorizují jeho přítomnost v membráně přilehlého ER (Ercan *et al.*, 2009). Nedávno publikovaný výzkum však jmenuje Ist2 jako jeden z proteinů, jejichž množství se zvyšuje ve frakci PM buněk stresovaných NaCl (Szopinska *et al.*, 2011).

Jak bylo uvedeno na začátku kapitoly, proteinu Ist2 je přikládána role lehce snižující toleranci vůči NaCl v médiu (tedy kmen *ist2Δ* roste lépe). S tímto názorem se však neztotožnili Kim *et al.* (2005), kteří zlepšení fenotypu deletanta ve své práci nepozorovali. Publikovali však překvapivě jinou roli Ist2, a to jeho interakci s proteiny Btn1 a Btn2, které se účastní příjmu argininu do vakuoly a souvisí s takzvanou Battenovou chorobou, vzácným neurodegenerativním onemocněním ([http://en.wikipedia.org/wiki/Batten\\_disease](http://en.wikipedia.org/wiki/Batten_disease)). Žádná další fakta o této interakci a jejím významu však bohužel publikována nebyla. Dále se diskutovalo možné spojení Ist2 s proteiny mitotického dělení, konkrétně s jednou z podjednotek kohezinu, Irr1/Scc3, bez něhož kvasinky nejsou schopny tvořit kolonie (Bialkowska and Kurlandzka, 2002). Snížení exprese tohoto proteinu a s ním spojené malformace buněk byly částečně zlepšeny, byl-li přítomen *IST2* (Bialkowska and Kurlandzka, 2002). Ani z tohoto pole ale další výsledky, pokud je mi známo, publikovány nebyly.

Z dalších systematických screeningů delečních knihoven bylo například zjištěno, že kmen s delecí *ist2Δ* roste v podmínkách stresu z nedostatku dusíku a dalších živin hůře než divoký kmen (Davey *et al.*, 2012), ale fakta více osvětlující fungování *IST2* zatím bohužel žádný z nich nepřinesl.

V průběhu posledních dvanácti let bylo přesto o *Ist2* publikováno několik prací, převážně se však týkaly jiného fenoménu, než je způsob jeho fungování – jedinečného způsobu transportu tohoto proteinu po buňce, jemuž je věnována dále následující podkapitola. *Ist2* je prvním známým proteinem, jehož transport je nezávislý jak na předchozí lokalizaci mRNA, tak na klasické sekreční dráze.

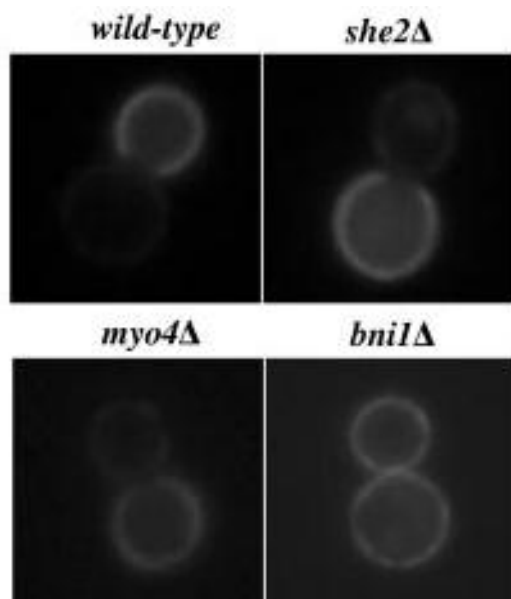
#### **1.4.1. Vývoj představ o biogenezi proteinu *Ist2* v buňce**

Je známo, že klasická sekreční dráha proteinů plazmatické membrány v eukaryotických buňkách vede z endoplazmatického retikula (ER), do jehož membrány jsou proteiny zanořovány již v průběhu translace, přes Golgiho komplex (GK), kde jsou upravovány, a odtud dále k periférii v sekrečních transportních váčcích typu COP II (Coat Protein Complex II; Lodish *et al.*, 2000). *Eukaryota*, kvasinky stejně jako živočišné buňky, potřebují a mohou na rozličných místech buňky udržovat odlišné koncentrace proteinů. Mechanismem posttranskripční regulace, který to umožňuje, je translace z předem lokalizované mRNA; fenomén, který je v posledních letech hodně studován a jak ukazují nejnovější práce, je pravděpodobně rozšířen v celé říši *Eukaryota* (Casolari *et al.*, 2012).

Na příkladu transkripčního faktoru *Ash1*, který je akumulován pouze v pučící dceřiné buňce (Takizawa *et al.*, 1997), bylo poprvé ukázáno, jak kvasinky dosahují různé koncentrace proteinu na různých místech buňky transportem mRNA pomocí aktinomyosinového skeletu na místo určení a následně místně specifické translaci. mRNA *IST2* byla druhým takovým popsaným případem (Takizawa *et al.*, 2000). Transport mRNA v kvasinkových buňkách vyžaduje proteiny rodiny *She*, kódované geny *SHE1-5*. Gen *SHE1* kóduje Myosin4, sloužící pro transport mRNA pomocí aktinu, produkty dalších genů *SHE* pak zajišťují funkce pomocných adaptorových proteinů. Ribonukleoproteinový komplex vzniklý asociací mRNA s aktinem, myosinem a dalšími potřebnými proteiny je dopraven na své místo a translace probíhá pouze tam (Long *et al.*, 1997). V případě *Ist2* jsou cílem membrány na periférii buňky. V buňkách s malým pupenem se *Ist2* nachází převážně v buňce mateřské, později

v buněčném cyklu je ho více v rostoucí buňce dceřiné; v průběhu jeho syntézy v dceřiné buňce se množství proteinu v rodičovské buňce snižuje (Takizawa *et al.*, 2000).

Pokusy s kmeny postrádajícími různé komponenty transportního aparátu pro mRNA, v nichž se lokalizace Ist2 jasně lišila od rodičovského kmene (Takizawa *et al.*, 2000; Gonsalvez *et al.*, 2003), naznačily, že lokalizace proteinu Ist2 značeného GFP (Tsien, 1998) je závislá na předchozím transportu *IST2* mRNA (obr. 2).



**Obr. 2.** Přirozená lokalizace proteinu Ist2 označeného fluorescenčním proteinem GFP a porovnání lokalizace tohoto chimérického proteinu v buňkách s delecí tří různých komponent transportu mRNA. Převzato z Takizawa *et al.*, 2000.

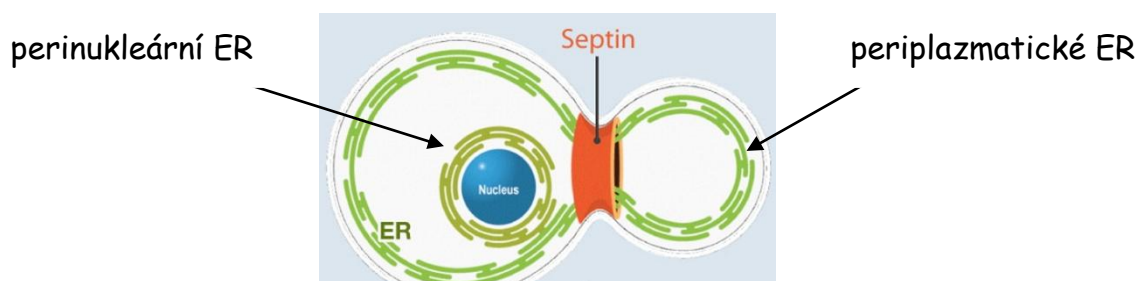
Naopak delece genu *MYO2*, který kóduje myosin pro dopravu váčků s konzervativně transportovanými proteiny, i genů *SEC* kódujících proteiny vyžadované pro jejich formování, lokalizaci Ist2 příliš neovlivňuje (Takizawa *et al.*, 2000; Jüscke *et al.*, 2004). Pozdější výzkumy s dvojitým mutantem *sec23-1/she2Δ*, v němž je delecí prvního genu zablokován transport proteinů pomocí váčků a delecí druhého genu i transport mRNA, ale přinesly zjištění, že i když je množství proteinu Ist2 značeného fluorescenčním proteinem GFP v PM dceřiné buňky poněkud nižší, jeho transport stále není znemožněn (Franz *et al.*, 2007).

Pokusy se zkrácenými verzemi proteinu Ist2, které byly označeny GFP, dále ukázaly, že pro transport je krucální jeho extrémní C-konec směřující do cytosolu (Jüscke *et al.*,

2005). Chiméřní proteiny složené z jiných membránových proteinů a této části Ist2 vůbec neprocházejí mediálním a trans GK, což napovídá, že C-koncový segment Ist2 jim umožňuje sekreční dráhu obejít (Jüschke *et al.*, 2005). Takové proteiny nejsou ani v sekrečních mutantech zadrženy v ER a dalších oddělech sekreční dráhy, jak se to děje s ostatními membránovými proteiny, ale jsou normálně transportovány přes cis GK přímo na periferii, ačkoliv bez připojeného segmentu Ist2 jsou lokalizované jinde (například v membráně vakuoly).

Pokusy o identifikaci sekvence v C-koncové doméně Ist2p, která tvoří signál pro transport do PM (či přilehlých membrán ER, jak bude diskutováno dále), ukázaly, že pro transport proteinu Ist2 v případě bloku sekreční dráhy je dostatečných posledních 69 aminokyselin tohoto proteinu (Franz *et al.*, 2007). Odstranění tohoto C-konce je jediná zatím známá skutečnost, která znemožňuje proteinu Ist2 dosáhnout své lokalizace.

Po sérii prací o transportu Ist2 v buňce vyvolal tento protein v několika posledních letech novou diskuzi, a to o tom, zda jeho místem v buňce je skutečně plazmatická membrána. V buňkách *S. cerevisiae* byly definovány dvě oblasti ER – perinukleární okolo jádra a periplazmatické, které je přilehlé k PM (Voeltz *et al.*, 2002; obr. 3). Vzhledem k tomu, jak blízko jsou k sobě membrány periplazmatického ER a sousední PM přilehlé (Pichler *et al.*, 2001), vizualizací membránových proteinů fúzovaných s GFP je není možné rozlišit.



**Obr. 3.** Periplazmatické a perinukleární ER kvasinkových buněk. Převzato z Babour *et al.*, 2010.

Opakované pokusy několika autorů sice potvrdily štěpení Ist2 v intaktních buňkách extracelulárně přidávanými proteázami (Jüschke *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2007; Ercan *et al.*, 2009) stejně jako štěpení fúzních proteinů s C-koncovou doménou Ist2 (Jüschke *et al.*, 2005), což jasně ukazuje na přítomnost Ist2 v PM, protilátky však paradoxně rozeznávají Ist2 pouze

v permeabilizovaných buňkách (Ercan *et al.*, 2009). Je-li totiž k savcím proteinům CD4 nebo CD8, receptorům T-lymfocytů typicky lokalizovaným v plazmatické membráně, fúzována C-koncová doména Ist2, protilátky se na ně v intaktních buňkách nevážou (Ercan *et al.*, 2009; Lavieu *et al.*, 2010). Tyto pokusy však byly, narozdíl od všech předchozích, které byly prováděny v kvasinkových buňkách, provedeny díky heterologní expresi *IST2* v živočišných buňkách, což by podle mého názoru možná mohlo být důvodem tohoto paradoxu.

Další výzkumy popsaly konkrétněji C-koncovou doménu proteinu, a to jako oblast skládající se z úseku hydrofobních aminokyselin, která pravděpodobně tvoří helikální strukturu, a z úseku bazických aminokyselin umožňujících proteinu kontakt se záporně nabitými lipidy (Maass *et al.*, 2009). Vazba C-konce s lipozomy simulujícími buněčné membrány se ukázala být naprosto závislá na přítomnosti fosfatidylinositol(4,5)bisfosfátu (Fischer *et al.*, 2009), což je lipid typický pro plazmatickou membránu.

Současná představa je asi taková, že mRNA *IST2* je transportována na periferii a translace většiny proteinu probíhá v periplazmatickém ER, bez nutnosti využití klasické sekreční dráhy. Protein Ist2 se pak může díky své C-koncové doméně lokalizovat v membráně periplazmatického ER a případně translokovat do přilehlé PM na základě interakce jeho C-koncové domény s fosfolipidy PM (Fischer *et al.*, 2009), nebo zůstat lokalizován v periferní, ale intracelulární membráně přilehlého periplazmatického ER (Lavieu *et al.*, 2010), která je v přímém kontaktu s PM. Pro protein Ist2 tak byla navržena existence zcela nového způsobu transportu.

#### **1.4.2. Příbuzní Ist2 v živočišné říši a jejich funkce**

Ist2 bývá zmiňován jako kvasinkový homolog savčí rodiny TMEM16. Jde o skupinu transmembránových proteinů tvořících pravděpodobně jednu z podrodin chloridových kanálů v savcích buňkách (Hartzell *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že jsou exprimovány v mnoha tkáních savčího organismu, jejich mutace vedou k vývojovým defektům (Huang *et al.*, 2009) a některé z nich se ve zvýšené míře vyskytují v rakovinných buňkách (Galindo and Vacquier, 2005), se tyto proteiny v posledních letech ocitly v centru pozornosti (Hartzell *et al.*, 2011). Nicméně, dodnes není vůbec jasné, jestli všichni členové této rodiny jsou skutečně chloridové kanály aktivované vápníkem, potvrzeno to bylo pouze u dvou z nich (Hartzell *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009). U ostatních členů rodiny, do které se řadí v současné době 10 genů, jsou



pochybnosti, zda jde vůbec o membránové proteiny, jako třeba v případě Ano7, proteinu buněk prostaty, v jehož struktuře ani nejsou predikovány transmembránové domény (Hartzell *et al.*, 2011). Nabízí se otázka, zda proteiny rodiny TMEM16 jsou po živočišných buňkách transportovány také nezávisle na sekreční dráze, ta však zatím čeká na experimentální zodpovězení.

Je tedy vidět, že Ist2 zůstává poněkud záhadným proteinem s mnoha zajímavostmi, z nichž ale většina není dořešena, a to ani, nebo spíše obzvlášť, jeho fungování v kvasinkové buňce. Cílem mé diplomové práce bylo pokusit se ověřit, zda fenotyp delece *IST2*, tj. zvýšená tolerance k NaCl, ve všech zdrojích uváděný, ale v podstatě nikdy znovu neprokázaný, opravdu existuje, a pokud ano, dále se jím zabývat.

## 2. Cíle práce

---

Cílem předkládané diplomové práce bylo pokusit se o objasnění úlohy proteinu Ist2 v toleranci buněk *Saccharomyces cerevisiae* k solím v médiu a v regulaci vnitrobuněčné homeostáze iontů. Jednotlivé podcíle byly stanoveny takto:

1. delece genu *IST2* v kmenech *S. cerevisiae* CEN.PK, BY4741 a několika odvozených mutantních kmenech postrádajících známé transportéry kationtů alkalických kovů;
2. klonování genu *IST2* do vektoru a jeho zpětná exprese v buňkách *ist2Δ*;
3. charakterizace fenotypu připravených delečních kmenů *ist2Δ* a kmenů se zvýšenou expresí *IST2* kapkovými testy a dalšími metodami;
4. vyhledání homologů *IST2* v dalších kvasinkových druzích.

# 3. Materiál

---

## 3.1. Přístroje a pomůcky

▪ aplikátor "ježek"	Sigma
▪ autokláv 2540 EL	Tuttnauer
▪ automatické pipety	Gilson
▪ automatické dávkovací pipety	Eppendorf
▪ centrifuga HERMLE Z 100M	Biotech
▪ centrifuga MiniSpin	Eppendorf
▪ centrifuga 5430 R	Eppendorf
▪ elektromagnetická míchačka VARIOMAG Poly	Labortechnik
▪ elektromagnetická míchačka RTC B	IKA
▪ elektroporátor GHT 1287-B	Jouan
▪ elektroporační kyvety EPECU102	Thermo El. Corp.
▪ filtry pro odběr buněk	Millipore
▪ filtry pro sterilizaci roztoků FP 30/0,2 CA-S	Whatman
▪ fotoaparát CoolPix P7000	Nikon
▪ fotoaparát Power Shot G7	Canon
▪ horizontální elektroforéza	Sigma
▪ inkubátor INCU-Line	Biotech
▪ inkubátor Memmert	Unimed
▪ inkubátor s orbitálním třepáním NB 205	N-Biotek
▪ inkubátor s orbitálním třepáním AI 73	HT INFORS
▪ kyvety PMMA pro měření membránového potenciálu	P-lab
▪ laminární box FBB 120	Labox
▪ mikroskop BX51	Olympus
▪ mikroskop fluorescenční AX70	Olympus
▪ mikrovlnná trouba ZM21M	Zanussi
▪ mikrozukmavky	Eppendorf
▪ PCR přístroj Mastercycler 5330	Eppendorf
▪ PCR přístroj Mastercycler Gradient 5331	Eppendorf

▪ pH metr Jenway 3505	Biotech
▪ spektrofotometr	Implen
▪ spektrofotometr 211 Spekol	Carl Zeiss Jena
▪ spektrofotometr pro destičky Elisa EL 808	BioTek
▪ spektrofotometr pro destičky Elisa Synergy HT	BioTek
▪ spektrometr pro AAS SOLAAR 969 AA	TJA Solutions
▪ termomixer	Eppendorf
▪ váhy Traveler TA 302	Ohaus
▪ váhy ALJ 120-4	Kern
▪ vortex Labdancer	IKA

### 3.2. Chemikálie a komerčně dodávané kity

▪ agar	Dr. Kulich Pharma
▪ agaróza	Amresco
▪ ampicilin	Biotek
▪ dithiotreitol	Sigma
▪ DNA away	MBP
▪ dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma
▪ EDTA	Lachema
▪ ethanol	Lachema
▪ ethidium bromid	Sigma
▪ fenol-chloroform-isoamylalkohol směs 25:24:1	Sigma
▪ fluorescenční sonda	Sigma
▪ $\alpha$ -D-galaktóza	Sigma
▪ geneticin	Formedium
▪ $\alpha$ -D-glukóza	Sigma
▪ HEPES	Sigma
▪ histidin	Sigma
▪ hydroxid amonný	Lachema
▪ hydroxid sodný	Lachema
▪ chlorid draselný	Penta

▪ chlorid hořečnatý	Fluka
▪ chlorid lithný	Fluka
▪ chlorid sodný	Penta
▪ imerzní olej	Olympus
▪ kit k přečišťování fragmentů DNA	Promega
▪ kit pro izolaci plazmidové DNA z bakterií	Sigma
▪ kit pro přípravu PCR reakce Phusion High-Fidelity PCR	Finnzymes
▪ kit pro přípravu PCR reakce s polymerázou Taq PPP Mastermix	Top-Bio
▪ kyselina chlorovodíková	Penta
▪ LB broth	Sigma
▪ leucin	Sigma
▪ loading dye pro vizualizaci fragmentů DNA při elektroforéze	Fermentas
▪ markery velikosti fragmentů DNA při elektroforéze Lambda/ <i>Hind</i> III a O'gene ruler 1 kb	Fermentas
▪ MES	Sigma
▪ methionin	Sigma
▪ octan amonný (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> )	Sigma
▪ restriční endonukleázy a pufry	Fermentas
▪ RNáza	Sigma
▪ síran amonný	Lach-Ner
▪ směs suplementů BSM	Formedium
▪ směs suplementů BSM bez uracilu (BSM-U)	Formedium
▪ triethanolamin (TEA)	Sigma
▪ Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
▪ Triton X-100	Sigma
▪ uracil	Fluka
▪ YNB bez aminokyselin (w/o AAs)	Difco
▪ YNB-F w/o AAs, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a K <sup>+</sup>	Formedium
▪ YNB-F w/o AAs, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , K <sup>+</sup> , kys. listové a riboflavinu	Formedium
▪ YPD agar	Formedium
▪ YPD broth	Formedium

### 3.3. Roztoky

Z uvedených chemikálií byly pro experimenty připravovány roztoky a pufry, jejichž složení je uvedeno vždy u příslušné metody. S výjimkou měření intracelulárního obsahu kationtů, kdy byly roztoky (kromě kultivačních médií) připravovány z deionizované vody, byly všechny roztoky vyráběny z vody destilované.

Roztoky, u nichž byla vyžadována sterilita, byly před použitím autoklávovány (20 minut při 121 °C a 120 kPa). Hrozila-li degradace některé ze složek vysokou teplotou, byl roztok sterilizován filtrací.

K pěstování kvasinkových i bakteriálních kultur byla používána buď pevná média v Petriho miskách, nebo tekutá média ve sterilních skleněných či plastových nádobách. Pevná média se od tekutých lišila přidáním 2% (m/V) agaru, kromě směsi YPD agar, která již zpevňující složku obsahuje. V případě vysokých koncentrací solí (1 a více molární) pak byl použit 3% agar. Stejně jako ostatní roztoky byla média před použitím autoklávována.

#### 3.3.1. Média pro kultivaci kvasinkových buněk

Pro kultivace kvasinkových buněk byly používány komerčně dodávané připravené směsi pro přípravu bohatého média YPD nebo několika verzí média YNB.

Složení média YPD: 5% směs YPD broth nebo 7% směs YPD agar  
V případě potřeby selekce byl po autoklávování přidáván Geneticin v konečné koncentraci 800-1000 µg/ml  
V případě kultivace buněk s delecemi *trk1Δ trk2Δ* navíc 100 mM KCl

Složení médií YNB: 0,67% YNB bez aminokyselin nebo 0,17% YNB-F Formedium  
2% D-glukóza nebo D-galaktóza  
Aminokyseliny a báze přidávané po autoklávování v konečné koncentraci 20 µg/ml, nebo směs aminokyselin BSM, případně BSM-U ze zásobních 100x koncentrovaných roztoků  
V případě obou verzí YNB-F Formedium navíc: 0,4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
definované množství KCl  
úprava pH pomocí NH<sub>4</sub>OH na 5,8 před autoklávováním

### 3.3.2. Média pro kultivaci bakteriálních buněk

Bakteriální buňky byly pěstovány v médiu LB s přidavkem ampicilinu pro selekci kolonií s plazmidy.

Složení média LB: 2% LB broth  
Ampicilin přidávaný po autoklávování v koncentraci 100 µg/ml

### 3.4. Biologický materiál (kvasinkové a bakteriální kmeny)

Většina experimentů dokumentovaných v této práci byla provedena v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* v běžně používaném laboratorním kmeni BY4741 (Brachmann *et al.*, 1998). Pro úvodní testy fenotypů kapkovými testy byl použit rovněž kmen CEN.PK (van Dijken *et al.*, 2000) a tento kmen s delecí *ist2::URA3*, v němž byl fenotyp poprvé ukázán (Entian *et al.*, 1999). Tyto dva kmeny byly zakoupeny ze sbírky EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>).

- *Saccharomyces cerevisiae* BY4741  
*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* (Brachmann *et al.*, 1998)
- *Saccharomyces cerevisiae* BYT45  
*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ena1-5Δ nha1Δ* (Navarrete *et al.*, 2010)
- *Saccharomyces cerevisiae* BYT12  
*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trk1Δ trk2Δ* (Petrezselyova *et al.*, 2010)
- *Saccharomyces cerevisiae* BYT12345  
*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ* (Navarrete *et al.*, 2010)
- *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK  
*MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2* (van Dijken *et al.*, 2000)
- *Saccharomyces cerevisiae* CEN.FE1-2A  
*Mat a trp1-289 ura3-52 his3D1 leu2-3\_112 YBR086c::URA3* (Entian *et al.*, 1999)

Pro pomnožení plazmidové DNA byly používány bakteriální buňky *Escherichia coli* kmene XL blue.

- *Escherichia coli* XL Blue  
*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thireIA1 lac- F [proAB +lac1qlacZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

## 3.5. DNA - plazmidy a oligonukleotidy

### 3.5.1. Plazmidy

- pUG6 4,0 kbp, *kanMX*, AmpR, ori  
plazmid obsahující gen *kanMX* rezistence k antibiotiku geneticinu, *kanMX* je umístěn mezi dvěma sekvencemi *loxP* (Güldener *et al.*, 1996)
- pUG73 4,8 kbp, *LEU2*, AmpR, ori  
analog plazmidu pUG6, místo *kanMX* nese gen *LEU2* udělující schopnost syntetizovat leucin (Güldener *et al.*, 2002)
- YEp352 5,2 kbp, *URA3*, AmpR, ori, 2μ  
mnohokopiový plazmid pro klonování v *E. coli* a *S. cerevisiae* s genem *URA3* pro syntézu uracilu (Hill *et al.*, 1986)
- YEp352-NHA1 8,8 kbp, *URA3*, AmpR, ori, 2μ  
mnohokopiový plazmid odvozený od YEp352 nesoucí gen *ScNHA1* pod vlastním promotorem (Kinclová *et al.*, 2001)
- pHI-U pHluorin, *URA3*, AmpR, ori, 2μ  
mnohokopiový plazmid pVT100U s genem pro expresi pHluorinu (Marešová *et al.*, 2010)
- pSH47 7,0 kbp, *URA3*, AmpR, ori, Cre  
mnohokopiový plazmid obsahující gen pro rekombinázu Cre umístěný pod galaktózovým promotorem (Güldener *et al.*, 1996)

### 3.5.2. Oligonukleotidy

V následujícím seznamu jsou uvedeny sekvence všech oligonukleotidů použitých v této práci. Použity byly k přípravě delečních kazet IST2-*kanMX* a IST2-*LEU2*,



k amplifikaci fragmentů se sekvencí *IST2* určených k inzerci do plazmidu a pro ověření přítomnosti genu v genomu nebo plazmidu (tzv. diagnostické oligonukleotidy).

Oligonukleotidy pro přípravu delečních kazet:

- IST2-kanF

GAGCATACTATGTCGCAGACAATTACATCTCTAGATCCGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC

- IST2-kanR

GCTTTTTTTTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCATAGGCCACTAGTGGATCTG

Oligonukleotidy pro amplifikaci fragmentu s *IST2*:

- YEpN-SciST2-F

GTACATTATAAAAAAAAAATCCTGAACTTAGCTAGATATTATGTCGCAGACAATTACATC

- YEpN-SciST2-R

CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCTAGCTTTTTTTTTAAAGCTTC

Diagnostické oligonukleotidy:

- IST2-2F                   CTCCACTCATTAAAGATGC
- IST2-1R                   GGTCAAATTCGATAGGTTG
- IST2-UF                   CCACCACTACATCAGTGTG
- IST2-DR                   CTCCTCTCGAACGAAGAAG
- kanX-F1                   CATTGATGCTCGATGA
- kanX-R1                   CTCTGGCGCATCGGGC
- LEU2-F                   GGGAAGGGGAATATATTG
- LEU2-R                   GGTGACGGAGTTGCTTGG
- PNHA1-1                  CAACTCTGTGTGATATAG

# 4. Metody

---

## 4.1. Mikrobiologické metody

### 4.1.1. Sterilizace materiálu

Většina pomůcek, které měly být pro práci s dále kultivovaným biologickým materiálem sterilní a bylo proto třeba zabránit jejich možné kontaminaci, stejně jako roztoky a živná média, byly před použitím sterilizovány, a to v autoklávu horkou parou 20 minut při 121°C a 120 kPa. Jednorázové pomůcky, které nejsou uvedeny v seznamu použitého materiálu, jako plastové kličky k zaočkovávání kultur, Petriho misky nebo 96-jamkové mikrotitrační destičky Elisa, byly používány z komerčně dodávaných sterilních balení; dřevěná párátka byla sterilizována v autoklávu.

Roztoky, které vysokou teplotou sterilizovat nelze, protože u nich hrozí degradace složek (například směsi aminokyselin), byly filtrovány přes filtry Whatmann s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

Elektroporační kyvety byly myty komerčně dodávaným roztokem DNA Away a sterilizovány 100% ethanolem.

### 4.1.2. Stanovení optické denzity (OD) buněk

Optická hustota buněčných suspenzí byla stanovována pomocí spektrofotometrů Spekol nebo Implen (u konkrétního experimentu je to vždy uvedeno) při vlnové délce 600 nm. Tyto dva přístroje udávají pro stejnou koncentraci buněk ve vzorku rozdílné hodnoty, pro OD od 0,1 do asi 0,8 na Spekolu, což je rozpětí hodnot použitých pro všechny experimenty v této práci, jsou těmto hodnotám hodnoty na přístroji Implen přímo úměrné a přibližně trojnásobné.

### 4.1.3. Kultivace a uchování buněk *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinkové kultury pro použití v experimentech byly kultivovány při 30 °C ve sterilních nádobách buď v tekutých médiích v inkubátoru s třepáním, nebo v obyčejném inkubátoru na miskách s pevnými médii o dříve uvedených složeních. Pro opakované použití pro experimenty uskutečňované v průběhu několika týdnů byly kmeny uchovávány na

miskách v lednici při 4 °C. Dlouhodobě byly kvasinkové kmeny uchovávány v 30% (V/V) glycerolu při -80 °C.

#### **4.1.4. Kultivace a uchovávání buněk *Escherichia coli***

Bakteriální kultury byly pěstovány ve sterilních nádobách v tekutých médiích v inkubátoru s třepáním nebo na miskách a to při 37 °C.

Dlouhodobě byly bakteriální kmeny uchovávány v 15% (V/V) glycerolu při -80 °C.

## **4.2. Metody genových manipulací**

### **4.2.1. Transformace buněk *Saccharomyces cerevisiae***

Transformace buněk *S. cerevisiae* byla prováděna metodou upravenou podle protokolu (Meilhoc *et al.*, 1990). Všechny použité roztoky a voda byly sterilní.

Buňky byly napěstovány přes noc v 80 ml tekutého YPD v uzavřené sterilní baňce v inkubátoru s třepáním (160 rpm, 30 °C) do OD<sub>600</sub> cca 1,6 – 2,2 na přístroji Implen. Buněčné suspenze pak byly centrifugovány (4000 rpm, 4 min., 24 °C), promyty sterilní vodou a znovu centrifugovány. Promytý pelet buněk z každých 80 ml buněčné suspenze byl resuspendován v 8 ml 25mM DTT. Zásobní 1M roztok DTT byl uchováván předem připravený při -20 °C a 25mM byl připravován vždy čerstvý ze sterilní vody. V něm byly buňky inkubovány 15 minut při pokojové teplotě a třepání asi 150 rpm a dále už s nimi bylo nakládáno jen v ledu a stáčení se provádělo v předem vychlazené centrifuze. Buňky byly centrifugovány, promyty 1 x ledovou vodou a 1 x ledovým elektroporačním pufrem TpEB (vždy 4000 rpm, 4 min., 4 °C) a pelet resuspendován do 800 µl TpEB (složení uvedeno níže). Takto připravené kompetentní buňky byly ihned použity k transformaci.

Transformace elektroporací byla prováděny ve vychlazených elektroporačních kyvetách přístrojem Jouan elektrickým pulzem o napětí 625 V a délce 24 ms, a to vždy 100 µl buněčné suspenze a 0,1-0,3 µg DNA (podle toho, o jakou DNA šlo; u konkrétního experimentu v kapitole Výsledky experimentální části práce je vždy uvedeno). Po elektrickém pulzu bylo do každé kyvety okamžitě přidáno 100 µl ledové vody, suspenze byla inkubována při laboratorní teplotě asi 15 minut a vyseta na agarové misky se selekčním médiem. Po několikadenní inkubaci bylo možné odebrat narostlé kandidáty a dále je ověřit.

Složení elektroporačního pufru TpEB: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
0,1 mM MgCl<sub>2</sub>  
270 mM sacharóza

#### **4.2.2. Transformace buněk *Escherichia coli***

Transformace buněk *E. coli* byla prováděna podle upraveného protokolu (Dower *et al.*, 1988). Kompetentní buňky *E. coli* byly připraveny laborantkou Pavlou Herynkovou a skladovány v -80 °C. Všechny použité roztoky a voda byly sterilní.

Buňky byly rozmrazeny, ale stále drženy v ledu, a ke 40 µl buněk byla přidána transformační DNA (plazmid) v množství přibližně 0,01 µg. Transformace elektroporací byla prováděna ve vychlazených elektroporačních kyvetách přístrojem Jouan elektrickým pulzem o napětí 1250 V po dobu 8 ms. Ihned bylo přidáváno 100 µl ledového média LB a po inkubaci asi 15 minut při teplotě 37 °C byly buňky vysety na agarové misky s LB a ampicilinem a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Druhý den bylo možné odebrat rostoucí kolonie nesoucí plazmid.

#### **4.2.3. Izolace genomové DNA ze *Saccharomyces cerevisiae***

Metoda byla upravena podle (Hoffmann and Winston, 1987). Buňky byly napěstovány přes noc v 10 ml média YPD. 2 ml kultury byly stočeny v mikrozkuhavce (3000 rpm, 5 min., 24 °C), resuspendovány v 0,5 ml vody a znovu krátce stočeny. K peletu byla přidána směs 0,2 ml TSN (složení uvedeno níže), 0,2 ml směsi fenol-chloroform-isoamyl alkohol a 0,3 g sterilních skleněných kuliček. Tato směs byla dále udržována v ledu a vortexována 8 x 30 s, mezitím vždy ukládána do ledu. Potom bylo přidáno 0,2 ml TE (složení uvedeno níže) a směs centrifugována (12 500 rpm, 5 min., 4 °C). Supernatant byl přenesen do nové sterilní mikrozkuhavky a smíchán s 1 ml 96% ethanolu. Směs byla znovu centrifugována (14 000 rpm, 15 min., 4 °C), ethanol slit a pelet vysušen. Po usušení byl pelet resuspendován v 0,4 ml TE s RNázou (75 µg/ml) a směs inkubována 5 minut při 37 °C. Bylo přidáno 10 µl 4M octanu amonného a 1 ml ethanolu, směs promíchána otočením a inkubována v -20 °C asi 15 minut. Po inkubaci byla směs opět stočena (14 000 rpm, 5 min., 4 °C), ethanol slit a pelet DNA usušen a resuspendován v 50 µl pufru TE.

Složení pufru TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA

Složení roztoku TSN: 2 % Triton X-100  
1 % SDS  
100 mM NaCl  
10 mM Tris, pH 8,0

#### **4.2.4. Izolace plazmidové DNA ze *Saccharomyces cerevisiae***

Izolace plazmidové DNA z buněk *S. cerevisiae* byla obdobně jako izolace genomové DNA prováděna podle upraveného protokolu (Hoffmann and Winston, 1987). Buňky byly napěstovány přes noc ve 2 ml YNB s příslušnými auxotrofními přísadami. Kultura byla stočena (5000 rpm, 1,5 min., 24 °C), pelet vortexován a resuspendován v 0,2 ml TSN o pH 8,0, 0,2 ml směsi fenol-chloroform-isoamyl alkohol a 0,3 g sterilních skleněných kuliček. Směs byla vortexována 2 x 1 minutu, mezitím udržována v ledu, a pak znovu stočena (14 000 rpm, 5 min., 4 °C). Horní vrstva supernatantu byla opatrně přenesena do druhé mikrozkušavky a přidán isopropanol o zhruba stejném objemu. Směs byla zamíchána otočením, inkubována při -20 °C asi 15 minut a centrifugována (14 000 rpm, 15 min., 4 °C). Supernatant byl slit, pelet vysušen, omyt v 80% etanolu a opět centrifugován (14 000 rpm, 2 min., 4 °C). Pelet byl znovu vysušen a resuspendován ve 20 µl pufru TE o pH 7,6.

Složení pufru TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6  
1 mM EDTA

#### **4.2.5. Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli***

Izolace plazmidové DNA z buněk *E. coli* byla prováděna komerčním kitem firmy Sigma podle návodu. 2-10 ml LB s ampicilinem bylo zaočkováno a kultura inkubována přes noc při 37 °C. Izolovaná plazmidová DNA byla resuspendována do 50 µl elučního roztoku, který je součástí kitu, elektroforeticky ověřena a její koncentrace byla stanovena spektrofotometricky.

#### 4.2.6. Restrikční analýza

Analýza restrikčními endonukleázami byla použita pro ověřování izolovaných plazmidů a pro štěpení plazmidů pro klonování genu *IST2*. Bylo použito několik enzymů a příslušných pufrů firmy Fermentas a reakce probíhaly ve 20  $\mu$ l směsi o níže uvedeném složení za použití 5 U (jednotek) enzymu obvykle po dobu dvou hodin při 37 °C. Byla-li reakce prováděna ve větším objemu (štěpení pro konstrukci nových plazmidů v 50  $\mu$ l směsi), bylo po prvních dvou hodinách štěpení přidáno ještě 5 U enzymu a štěpení pokračovalo další dvě hodiny.

Velikost fragmentů vzniklých štěpením byla ověřena na elektroforéze (podkapitola 4.2.10) a fragmenty byly přečištěny kitem firmy Promega.

<u>20 <math>\mu</math>l směsi pro štěpení restrikčními endonukleázami:</u>	2 $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru
	0,5 $\mu$ l, tj. 5 U. restrikčního enzymu
	1 $\mu$ g plazmidové DNA
	zbytek objemu sterilní voda

#### 4.2.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace úseků DNA pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction) byla použita k přípravě delečních kazet *IST2-LEU2* a *IST2-kanMX* a pro ověření, že byl gen z genomu opravdu odstraněn. Příprava delečních kazet je popsána v následující podkapitole. Pro reakce ověřující přítomnost či nepřítomnost genu v genomu byla používána zjednodušená verze přípravy PCR, takzvaná colony PCR, popsaná v podkapitole 4.2.9. Pro všechny tyto reakce PCR byla používána směs PPP Mastermix firmy Top-Bio.

Dále pak byl pomocí PCR namnožen fragment DNA obsahující gen *IST2* za účelem inserce do vektoru *YEp352-NHA1*. Pro tuto amplifikaci byl použit kit firmy Finnyzmes pro přípravu směsi PCR, protože obsahuje polymerázu s opravnou aktivitou, a reakce byla připravena ve směsi a za podmínek uvedených dále v této podkapitole. Produkty všech reakcí PCR byly ověřeny na elektroforéze a přečištěny.

<u>Složení 50 µl reakční směsi pro amplifikaci <i>IST2</i>:</u>	31,5 µl H <sub>2</sub> O
	10 µl pufru HF
	1 µl směsi dNTP
	1 µl MgCl <sub>2</sub>
	2,5 µl každého z primerů (c = 10 µM)
	1 µl genomové DNA (c = 300ng/µl)
	0,5 µl polymerázy Phusion DNA

<u>Průběh reakce PCR:</u>	1) 96 °C/1 min
	2) 96 °C/45 s
	3) 65 °C/30 s
	4) 72 °C/3 min
	5) 30 x opakování kroků 2-4
	6) 72 °C/10 min
	7) 4 °C

#### 4.2.8. Příprava deleční kazety pro homologní rekombinaci

Kazety pro delecí genu v kvasinkách homologní rekombinací byly připraveny podle Güldener *et al.* (1996). Jejich sekvence jsou tvořeny markerovým genem obklopeným na obou stranách sekvencemi *loxP* a sekvencemi homologními k sekvencím před (upstream) a za (downstream) sekvencí genu našeho zájmu v genomu. Je-li takový úsek úspěšně vnesen do kvasinkové buňky a dostane se do jádra, homologní sekvence jsou navzájem rozeznány a za vhodných podmínek mezi nimi může dojít k rekombinaci. Výsledkem je záměna genu našeho zájmu v genomu za vnesený gen markerový.

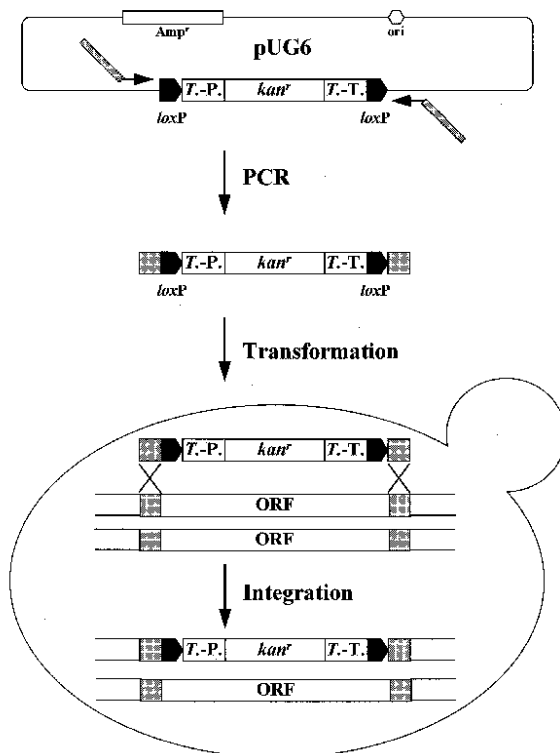
Jako templáty pro PCR byly použity plazmidy pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) pro přípravu *IST2*-kanMX kazety a pUG73 (Güldener *et al.*, 2002) pro přípravu *IST2*-LEU2 kazety. Dvojice oligonukleotidů pro přípravu delečních kazet byla v obou případech stejná, protože nasedají na sekvence společné oběma plazmidům. Jedna část každého z nich, okolo 40 nukleotidů dlouhá, je homologní k sekvenci před začátkem, respektive za koncem, genu *IST2* v kvasinkovém genomu, druhá k sekvenci těsně před, respektive těsně za, sekvencí *loxP* na templátovém plazmidu. Výsledkem amplifikace je tak segment připravený pro použití při transformaci (obr. 4). Jeho velikost byla po amplifikaci ověřena na elektroforéze (podkapitola 4.2.10).

Po transformaci a integraci kazety do lokusu *IST2* je možné díky místům *loxP* vyjmout z genomu i markerový gen. Místa *loxP* jsou rozeznávána rekombinázou Cre (Güldener *et al.*, 1996). Ta vyštěpí úseky mezi místy *loxP* a výsledkem je tak genom bez původního genu i bez deleční kazety, pouze s jedním místem *loxP*. Výsledkem je genom s delecí našeho genu a nesoucí navíc pouze jedinou 34 bp dlouhou sekvenci *loxP* (obr. 5). Sekvence rekombinázy Cre je nesena plazmidem pSH47, který obsahuje markerový gen *URA3*, a její exprese je pod kontrolou galaktózového promotoru. Buňky byly transformovány tímto plazmidem a kolonie přeneseny na misku s galaktózou jako zdrojem uhlíku. Plazmid byl pak eliminován přeočkováním na médiu YPD (podrobně popsáno v kapitole Výsledky experimentální části práce). Úspěšné odstranění kazety bylo ověřeno nejprve negativní selekcí na miskách se selekčními médii a poté pomocí PCR. Složení reakční směsi je uvedeno níže. Bylo připraveno obvykle 250  $\mu$ l směsi, což je desetinásobek objemu reakční směsi, tedy množství s rezervou postačující pro přípravu 8 reakcí po 25  $\mu$ l ve stripu mikrozkušavek.

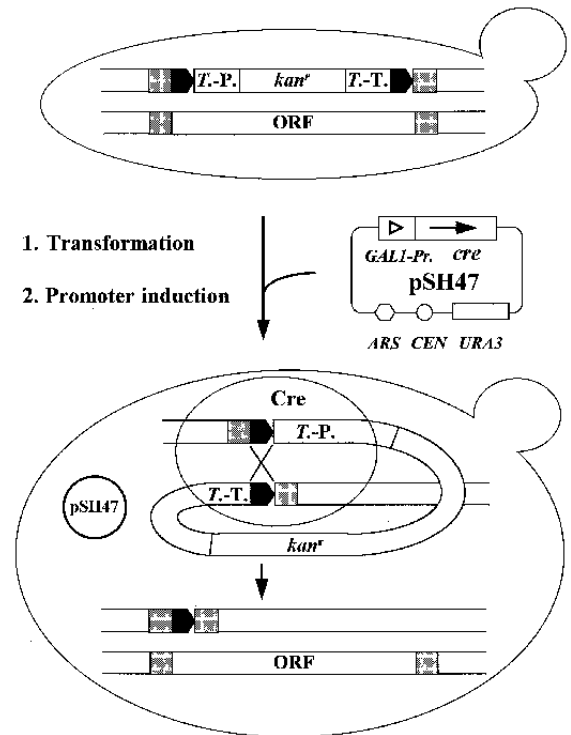
<u>Složení 250 <math>\mu</math>l reakční směsi pro přípravu deleční kazety:</u>	215 $\mu$ l PCR H <sub>2</sub> O
	15 $\mu$ l IST2-kanF (c=10 $\mu$ M)
	15 $\mu$ l IST2-kanF (c=10 $\mu$ M)
	5 $\mu$ l plazmidu pUG6 nebo pUG73 (c $\approx$ 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l)
	25 $\mu$ l směsi PPP

<u>Průběh amplifikační reakce:</u>	1) 94 °C/1 min
	2) 94 °C/45 s
	3) 60 °C/45 s
	4) 72 °C/3 min 30 s
	5) 35x opakování kroků 2-4
	6) 72 °C/10 min
	7) 4 °C





**Obr. 4.** Příprava deleční kazety k transformacím.  
Oboje převzato z Güldener *et al.*, 1996.



**Obr. 5.** Vyštěpení deleční kazety.

#### 4.2.9. Colony PCR

Colony PCR umožňuje použít k přípravě reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci přímo celé buňky bez nutnosti izolovat genomovou DNA. V této práci byla vždy používána pro ověření integrace delečních kazet a odstranění genu *IST2*, stejně jako pro ověření následného vyjmutí delečních kazet. Jako primery reakce byly použity příslušné kombinace diagnostických primerů uvedených v podkapitole 3.5.2.

Jako templát byly použity čerstvě narostlé buňky odebrané z kolonií sterilním párátkem. Buňky byly resuspendovány v 15  $\mu$ l vody v destičce Elisa. 7,5  $\mu$ l této buněčné suspenze bylo přeneseno do mikrozkušavky s 2,5  $\mu$ l čerstvě připraveného 1% SDS a asi 30 s vortexováno. Poté bylo přidáno 90  $\mu$ l vody a směs byla centrifugována 3 minuty při 14 000 rpm. Supernatant, který obsahoval genomovou DNA, pak byl rovnou použit jako templát pro

amplifikační reakci. Reakce pro jeden vzorek, tedy buňky z 1 kolonie, byla prováděna ve 12  $\mu\text{l}$  objemu.

Složení 12  $\mu\text{l}$  reakční směsi: 4,0  $\mu\text{l}$  sterilní vody  
0,5  $\mu\text{l}$  každého z oligonukleotidů ( $c=10\mu\text{M}$ )  
1,0  $\mu\text{l}$  buněčného lyzátu  
6,0  $\mu\text{l}$  směsi PPP Mastermix.

Průběh amplifikační reakce: 1) 94 °C/2 min  
2) 94 °C/1 min  
3) 55 °C/1 min  
4) 72 °C/2 min  
5) 35x opakování kroků 2-4  
6) 72 °C/10 min  
7) 4 °C

#### **4.2.10. Elektroforetická analýza DNA**

K analýze fragmentů DNA byla používána horizontální agarózová elektroforéza. Gel byl připraven ze směsi agarózy v pufru TAE (1% m/V) krátce rozvařený v mikrovlnné troubě a po zchlazení na cca 60 °C byl přidán ethidium bromid v konečné koncentraci 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Po ztuhnutí gelu v elektroforetické vaně byly do jamek nanášeny vzorky o objemu 5  $\mu\text{l}$  smíchané s 1  $\mu\text{l}$  6x koncentrovaného Loading Dye pro vizualizaci pohybu DNA gelem a vedle nich 2  $\mu\text{l}$  markeru velikosti fragmentů. Při práci s fragmenty amplifikovanými směsí PPP Master Mix byl tento krok vynechán, protože barevná složka je již obsažena v této směsi.

Elektroforéza probíhala v pufru TAE při konstantním napětí 80 V asi 30-60 minut (v závislosti na typu fragmentů). Fragmenty byly vizualizovány UV světlem a fotografovány.

Složení pufru TAE: 40 mM Tris  
1 mM EDTA  
20 mM kyselina octová

### **4.3. Metody pro porovnávání fenotypů kvasinkových kmenů**

#### **4.3.1. Kapkový test**

Pro srovnání schopnosti růstu dvou či více kvasinkových kmenů byly nejprve všechny tyto kmeny inkubovány společně na jedné misce po dobu 2 až 3 dnů při 30 °C a potom na stejnou dobu uloženy do 4 °C. Buňky byly sterilně resuspendovány ve vodě o objemu 200 µl. 100 µl bylo použito pro změření optické denzity suspenze a zbylých 100 µl naředěno příslušným objemem sterilní vody tak, aby všechny vzorky měly stejnou OD<sub>600</sub>, a to 2 na spektrofotometru IMPLEN.

Každému kvasinkovému kmeni příslušel jeden řádek destičky Elisa. Do první jamky každého řádku bylo přeneseno 150 µl připravené buněčné suspenze jednoho kmene o OD<sub>600</sub> = 2, do ostatních jamek 135 µl sterilní vody. Do každé jamky řádku pak byla přenášena vždy 1/10 objemu suspenze z jamky předchozí, tedy 15 µl. Byla provedena obvykle čtyři 10-tinásobná ředění suspenze každého kmene, tedy pro každý kmen bylo v destičce 5 jamek suspenzí s postupně klesající koncentrací buněk. Pomocí aplikátoru „ježek“ pak byly buněčné suspenze přeneseny na připravené misky. Inkubace probíhala při 30 °C obvykle po dobu jednoho týdne a každý den byly misky fotografovány.

#### **4.3.2. Růstové křivky**

Růstové křivky také sloužily k porovnání růstu několika kmenů za rozdílných podmínek. Měření byla prováděna podle Marešová and Sychrová (2007).

Buňky byly napěstovány a resuspendovány stejně jako při přípravě kapkového testu. OD<sub>600</sub> suspenzí byla upravena na 1 na přístroji IMPLEN. Vždy do 4 nebo 8 sousedních jamek destičky Elisa bylo napipetováno 98 µl růstového média a 2 µl buněčné suspenze. Připravená destička Elisa byla překryta sterilní fólií a za stálého třepání při 30 °C byla ve spektrofotometru EL 808 po dobu 48 hodin každých 60 minut měřena OD<sub>595</sub>.

Ze získaných hodnot byly vytvořeny grafy závislosti rostoucí koncentrace buněk jednotlivých kmenů v jednotlivých médiích na čase.

#### **4.3.3. Fluorescenční mikroskopie**

Fluorescenční mikroskopie byla použita pro ověření přítomnosti fluorescenčního proteinu pHluorinu v buňkách, v nichž poté bylo měřeno pH.

Buňky transformované plazmidem s pHluorinem (podrobně je popsáno v kapitole Výsledky experimentální části práce) byly napěstovány přes noc v tekutém médiu bez uracilu, aby byl pHluorin dostatečně exprimován. 3 nebo 4  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze byly pozorovány za použití imerzního oleje v mikroskopu Olympus AX70 a to jednak za použití fluorescenční vizualizace hranolem U-MWB s excitačním filtrem 450-480 nm a jednak za použití Nomarského kontrastu.

#### 4.3.4. Stanovení intracelulárního pH pomocí pHluorinu

Měření byla prováděna podle Marešová *et al.* (2010). Buňky byly nejprve transformovány plazmidem pHl-U, který nese gen pro pHluorin a selekční gen pro syntézu uracilu. Byly proto pěstovány vždy v médiu bez uracilu. Exprese pHluorinu byla ověřena mikroskopicky.

Před vlastním experimentem byly buňky transformované plazmidem s pHluorinem napěstovány přes noc v tekutém médiu YNB-F bez fluorescenčních složek, tedy YNB-F w/o AAs,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}^+$ , kys. listové a riboflavínu, do  $\text{OD}_{600}$  0,4 - 0,7 na přístroji Spekol. Po změření OD byly suspenze ihned připraveny k měření pH. Do destičky Elisa byla napipetována vždy nejprve kalibrační část skládající se ze směsi 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a 50  $\mu\text{l}$  kalibračních pufrů o stanoveném pH v každé jamce (složení pufrů je uvedeno níže). Po 3 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla rychle napipetována měřicí část skládající se ze 4 paralel čistého média a 20 paralel buněčných suspenzí, vždy o objemu 100  $\mu\text{l}$ , a destička byla ihned proměřena přístrojem Synergy HT (Marešová *et al.*, 2010). pH měřených suspenzí pak bylo stanoveno pomocí kalibrační křivky závislosti poměru intenzit fluorescence při 400 a 485 nm, tedy  $I_{400}/I_{485}$ , na pH.

<u>Složení kalibračních pufrů:</u>	100 mM MES
	100 mM HEPES
	100 mM KCl
	100 mM NaCl
	0,4 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$
	20 mM $\text{NaN}_3$ ; směs rozdělena na 6 dílů a jejich pH upraveno pomocí NaOH a HCl na 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 a 8,0.

#### 4.3.5. Měření relativního membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy

Měření relativního membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy v této práci bylo prováděno podle Marešová *et al.* (2006) a podle Gášková *et al.* (1998).

Buňky byly napěstovány přes noc v 10 ml média YNB-F (w/o AAs,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $\text{K}^+$ ) s příslušnými přísadkami a 100 mM KCl do OD 0,4 – 0,7 (Spekol). Polovina buněčné suspenze byla odebrána, promyta stejným médiem bez KCl, resuspendována zpět do stejného objemu (5 ml) a inkubována další 2 hodiny pro následné měření možné změny potenciálu způsobené hladověním na draslík.

Zbylá polovina buněk byla stočena, dvakrát promyta pufrům MES-TEA (složení níže) a pak resuspendována v 1 ml tohoto pufru (všechna točení 4000 rpm, 4 min, 24 °C). Do kyvet pro měření ve spektrofotometru byly napipetovány vždy 3 ml tohoto pufru a přidáním malého množství buněčné suspenze bylo OD této směsi upraveno na 0,1 v přístroji IMPLÉN. Objem připravené směsi byl pak upraven zpět na 3 ml.

Těsně před vlastním měřením byly do kyvet přidávány 3  $\mu\text{l}$  zásobního 0,1 mM roztoku fluorescenční sondy 3,3'-dipropylthiadikarbokyanin jodid (diS-C3(3)) v ethanolu. V přístroji ISS PCI byly vzorky buněk se sondou měřeny při vlnových délkách 531 (excitační) a 560 a 580 (emisní). Z hodnot byly získány poměry intenzit při těchto dvou emisních vlnových délkách, tedy  $I_{580}/I_{560}$  (Marešová *et al.*, 2006), a tyto hodnoty vyneseny do grafu v závislosti na čase. Při druhém způsobu měření (Gášková *et al.*, 1998) byl při excitační vlnové délce 531 nm měřen růst maxima emisního světla v čase.

S polovinou buněčné suspenze inkubované bez KCl bylo nakládáno stejně a nakonec byly porovnávány výsledky měření za těchto dvou odlišných podmínek.

Složení pufru MES-TEA: 10 mM MES, pH upraveno pomocí TEA na 6,0

#### 4.3.6. Stanovení obsahu sodných kationtů v buňkách

Koncentrace kationtů v buňkách byla stanovena plamenovou emisní spektrofotometrií. Všechny roztoky použité pro tuto metodu byly připraveny z deionizované vody a všechno používané nádobí v ní bylo předem několikrát omýváno, aby nedošlo ke znečištění vzorků kationty ze skla či z vody.

10 ml média YNB-F (w/o AAs,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $\text{K}^+$ ) + 100 mM KCl bylo zaočkováno buňkami a inkubováno přes noc do OD 0,4 – 0,7 (Spekol). 5 ml buněčné suspenze bylo odebráno, promyto tímž médiem s NaCl (konkrétně v kapitole Výsledky experimentální části práce) a inkubováno po další 2 hodiny. Druhá polovina buněk byla stočena, promyta 1 x ledovou deionizovanou vodou a 1 x inkubačním pufrem a resuspendována zpět do 5 ml inkubačního pufru (všechna točení 4000 rpm, 3 min, 4 °C). Byl odebrán 3 x 1 ml této suspenze a ta byla přefiltrována pomocí vývěvy přes filtr Millipore, ten byl dále promyt 2 x 5 ml promývacího roztoku a vložen do zkumavky s 5 ml extrakčního roztoku. Byly tak odebrány 3 paralelní vzorky každé buněčné suspenze. S druhou polovinou buněk bylo po uplynutí doby inkubace naloženo stejně.

Zkumavky byly překryty parafilmem, zvortexovány a zůstaly při laboratorní teplotě alespoň 24 hodin pro extrakci sodných kationtů z buněk do roztoku. Druhý den byly znovu zvortexovány, stočeny (4000 rpm, 3 min, 24 °C) a supernatant rovnou použit pro změření obsahu kationtů sodíku uvolněných z buněk pomocí přístroje SOLAAR 969. Pro kalibraci byly použity standardy o známé koncentraci připravené z komerčně dodávaného roztoku a deionizovaná voda.

Složení extrakčního pufru: 10 mM  $\text{MgCl}_2$  + 0,2 M HCl  
v případě stanovení draslíku navíc CsCl v množství 1g/l

Složení inkubačního pufru: 10 mM Tris + 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$ , úprava pH pomocí kyseliny citronové na 4,4 a pak na 4,5 pomocí pevného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Složení promývacího pufru: 20 mM  $\text{MgCl}_2$

# 5. Výsledky experimentální části práce

---

## 5.1. Delece genu *IST2* v genomu *Saccharomyces cerevisiae*

Prvním krokem k analýze funkce genového produktu bývá delece genu z genomu a porovnání chování výsledného kmene s kmenem původním. Takový byl i přístup použitý v experimentální části této práce. Gen *IST2* byl odstraněn z genomu buněk *S. cerevisiae* homologní rekombinací, kdy byly metodou transformace elektroporací do buněk vneseny takzvané deleční kazety jako transformující DNA.

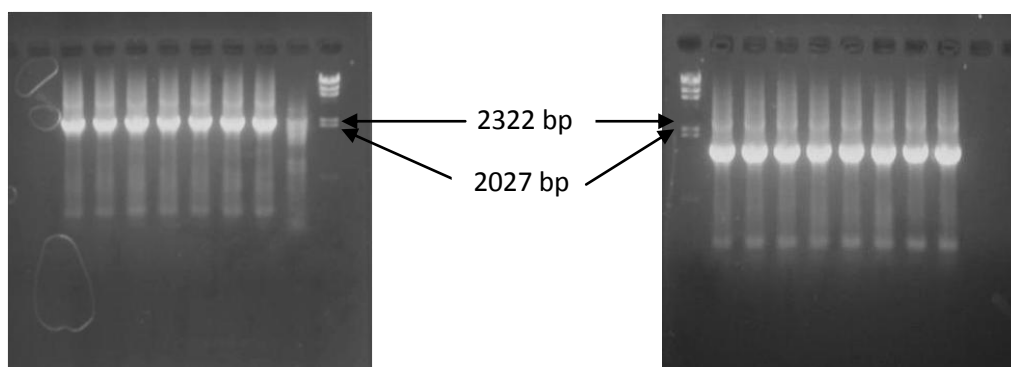
Naší první snahou bylo ověřit význam *IST2* v kmeni CEN.PK, v němž byl fenotyp poprvé pozorován (Entian *et al.*, 1999). Kmeny CEN.PK A CEN.PK *ist2::URA3* jsme zakoupili ze sbírky EUROSCARF (podkapitola 3.4). Mimo to jsme se rozhodli v kmeni CEN.PK připravit vlastní deleční kmeny *ist2Δ*. Kmeny, které se liší auxotrofií na uracil, tedy kmeny *ura<sup>+</sup>* a *ura<sup>-</sup>*, totiž vykazují odlišné fyziologické parametry. Vzhledem k tomu, že přítomnost deleční kazety s markerovým genem *URA3*, který kóduje orotidin-5'-fosfát dekarboxylázu, jeden z proteinů syntézy uracilu, zlepšuje růst buněk (Marešová and Sychrová, 2005), chtěli jsme pokusy charakterizující fenotyp buněk zopakovat ve dvojici kmenů *IST2* a *ist2Δ*, které budou mít stejné auxotrofní požadavky. Druhým kmenem, s nímž jsme se rozhodli pracovat, byl BY4741, kmen, který je hojně používán a v němž bylo kolegy v naší laboratoři pro projekt Translucent (<http://www.translucent-network.org/>) provedeno mnoho delecí genů pro membránové transportéry v různých kombinacích. Tak byly tento kmen a kmeny od něj odvozené navíc zajímavými kandidáty pro studium možných genetických interakcí *IST2* a genů pro transportéry kationtů alkalických kovů.

Transformovány byly nejprve kmeny CEN.PK, BY4741 a BYT45 (BY4741 *ena1-5Δ nha1Δ*), později jsme se rozhodli připravit deletanty *ist2Δ* také v dalších kmenech, a to BYT12 (BY4741 *trk1Δ trk2Δ*), BYT3 (BY4741 *tok1Δ*) a BYT12345 (*trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ*) (podkapitola 3.4).

### 5.1.1. Příprava delečních kazet

Pro zvýšení šancí na úspěch byly připraveny a použity dvě různé deleční kazety, s markerovým gene *KILEU2* (dále jen *LEU2*) a s markerovým genem *kanMX*, za použití plazmidů pUG73 respektive pUG6 jako templátů a oligonukleotidů *IST2*-kanF a *IST2*-kanR

(uvedených v seznamu DNA v podkapitole 3.5). Amplifikační reakce proběhla za podmínek popsaných v podkapitole 4.2.8 a množství a velikost (2380 bp v případě kazety *LEU2* a 1620 bp v případě kazety s *kanMX*) amplifikovaných fragmentů byly ověřeny na elektroforéze (obr. 6). Napoprvé se s úspěchem podařilo připravit obě deleční kazety. DNA pak byla přečištěna komerčním kitem firmy Promega.



**Obr. 6.** Ověření delečních kazet s markerovými geny *LEU2* (vlevo, 2380 bp) a *kanMX* (vpravo, 1620 bp). Marker Lambda DNA/*HindIII*.

### 5.1.2. Transformace *S. cerevisiae* delečními kazetami

Přítomnost genu *LEU2* uděluje buňkám schopnost růst na médiu bez leucinu, což je jinak v kmenech BY4741 a CEN.PK znemožněno auxotrofní mutací *leu2Δ*, přítomnost genu *kanMX* zase přináší rezistenci k antibiotiku geneticinu (dále jen G). Buňky po transformaci se tak změní z auxotrofních  $leu^-$  na prototrofní  $leu^+$ , respektive se z G senzitivních ( $G^S$ ) stanou G rezistentní ( $G^R$ ). Kvasinky byly transformovány podle protokolu v podkapitole 4.2.1 asi 0,3  $\mu$ g deleční kazety a vysety na půdy YNB + histidin, methionin a uracil (dále jen YNB + HMU) respektive YPD s geneticinem (dále jen YPD + G). V případě transformace kmenů s delecí genů *TRK* bylo médium vždy doplněno KCl v koncentraci 100 mM. Pro transformaci každého z kmenů byly použity obvykle čtyři misky každého typu média, celkem tedy osm misek. Dále byla na devátou misku (nezáleželo kterého typu) vyseta negativní kontrola, tedy jedna dávka buněk elektroporovaných „naprázdno“, bez přidání DNA. Na desátou misku YNB + histidin, methionin a leucin (dále jen YNB + HML) byla vyseta pozitivní kontrola, což byly buňky transformované prázdným vektorem YEp352, který nese gen *URA3* a uděluje tak buňkám schopnost růstu v médiu bez uracilu (prototrofii na uracil). Celkem bylo tedy vždy prováděno 10 transformací v jednom pokusu s jedním kmenem. Po několika dnech nebo



nejpozději po jednom týdnu bylo zpravidla možné pozorovat rostoucí kolonie. Na kontrolní misce žádné kolonie nebyly, protože buňky nezískaly schopnost růst na selekčním médiu. Na pozitivní kontrole narostlo obvykle přes 1000 kolonií. Na jednotlivých miskách s buňkami transformovanými kazetou narostlo obvykle kolem 40 – 300 kolonií v případě transformace kazetou *LEU2* respektive 200 – 800 kolonií v případě kazety *kanMX*, přesné počty se lišily případ od případu.

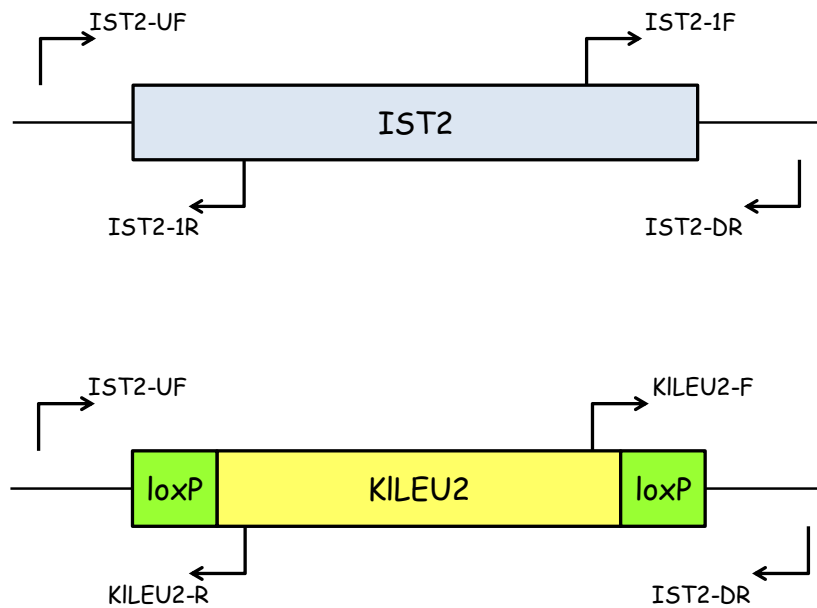
### 5.1.3. Ověření delece genu *IST2*

Obvykle tři kolonie z každé misky s narostlými kandidáty byly přeočkovány na čerstvé misky se stejným selekčním médiem a po dalších několika dnech jsme opět pozorovali, které z kolonií úspěšně rostly i zde. U těch se dala předpokládat úspěšná integrace deleční kazety do genomu. Na prvních miskách totiž často rostlo mnoho kandidátů, kteří sice nesli kazetu se selekčním genem, ale nemusela být trvale integrovaná. Přítomnost genu *IST2* jsme dále ověřovali metodou colony PCR, protože bylo třeba vyloučit také integraci kazety na jiné místo genomu. Amplifikační reakce byla vždy připravena a prováděna podle protokolu popsaného v podkapitole 4.2.9 za použití diagnostických primerů v těchto kombinacích (v závorkách je uvedena velikost vzniklých fragmentů v případě nasednutí obou primerů):

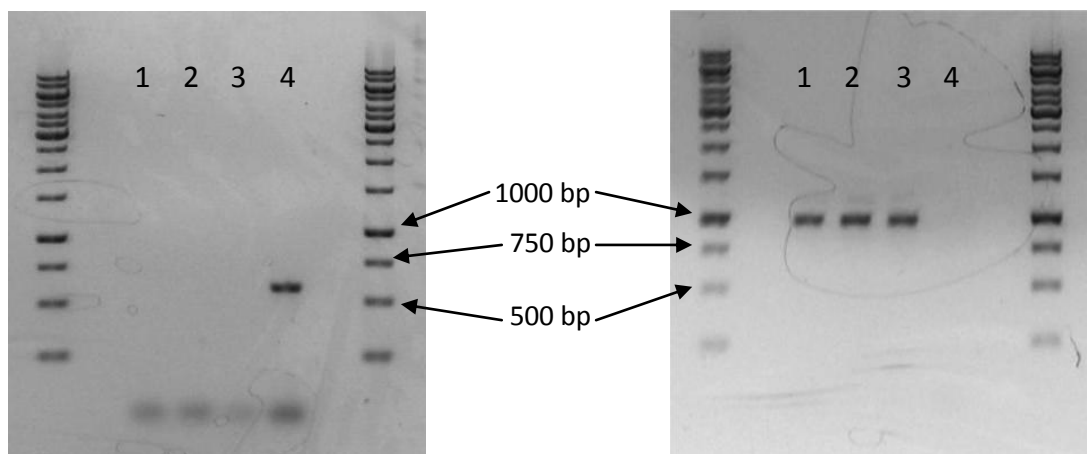
- 1) *IST2-UF* + *KILEU2-R* (1050 bp), respektive *IST2-UF* + *kanX-R1* (350 bp)
- 2) *IST2-DR* + *KILEU2-F* (950 bp), respektive *IST2-DR* + *kanX-F1* (370 bp)
- 3) *IST2-UF* + *IST2-1R* (675 bp),
- 4) *IST2-DR* + *IST2-1F* (560 bp).

Jako kontrola byly vždy použity buňky původního kmene, které mají gen *IST2* a žádnou deleční kazetu. V ideálním případě, u kandidátů s úspěšně integrovanou kazetou a bez *IST2*, se amplifikací vytvořily proužky očekávané délky při použití kombinací oligonukleotidů 1) a 2), protože sekvence *IST2* byla v genomu nahrazena sekvencí genu *LEU2* nebo *kanMX*. Naopak oligonukleotidy *IST2-1R* a *IST2-1F* rozeznávající sekvenci *IST2* neměly kam nasednout a proužek se za použití kombinací 3) a 4) nevytvořil (schéma na obrázku 7 a obrázek 8). V buňkách kontrolního původního kmene tomu bylo přesně naopak (schéma na obrázku 7 a obrázek 8). Několikrát došlo k výše zmíněné situaci, kdy buňky sice nesly trvale

integrovanou deleční kazetu ve svém genomu a byly tak  $leu^+$  nebo  $G^R$ , ale na jiném místě, než měla být, protože při kontrolním PCR došlo k amplifikaci jak genu kazety, tak *IST2*.



**Obr. 7.** Schémata sekvencí, na které nasedají diagnostické primery. V případě markerového genu *kanMX* je nasedání primerů *kanX-R1*, *kanX-F1* analogické nasedání primerů *KILEU2-R*, *KILEU2-F*.



**Obr. 8.** Ukázka elektroforetické vizualizace produktů colony PCR 4 vzorků, z nichž ve vzorcích 1, 2 a 3 byl gen *IST2* nahrazen sekvencí *LEU2* a vzorek 4 je kontrolní. Na levém obrázku použita kombinace olig *IST2-DR* + *IST2-F1* (560 bp), na pravém *IST2-DR* + *KILEU2-F* (950 bp). Marker O'gene Ruler 1kb.

U některých kmenů se podařilo již při první sérii transformací získat kandidáty s delecí *ist2Δ*, u jiných byly transformace několikrát opakovány. V kmeni BYT3 a bohužel ani CEN.PK se ani po čtyřech opakováních osmi transformací, tedy celkem po 32 transformacích, nepodařilo získat kandidáty. Souhrn počtů získaných kandidátů s ověřenou delecí *ist2Δ* v každém kmeni je uveden na závěr celé této podkapitoly 5.1.

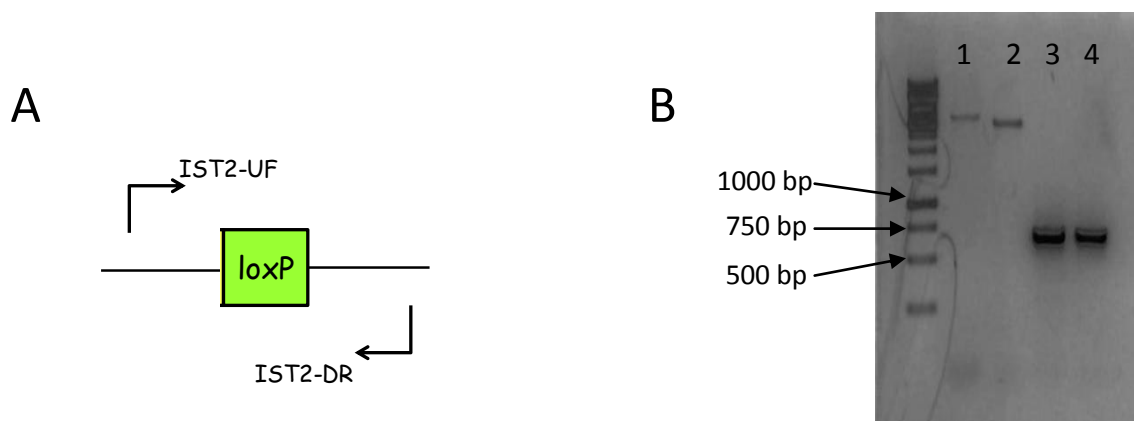
#### 5.1.4. Odstranění delečních kazet

Protože po delecí sekvence *IST2* deleční kazetou zůstává v genomu navíc gen *LEU2* nebo *kanMX* obklopený sekvencemi *loxP*, je vhodné odstranit tyto markerové geny pomocí rekombinázy Cre (Güldener *et al.*, 1996; podkapitola 4.2.8). Ta rozeznává sekvence *loxP* a vyštěpí úseky mezi nimi a výsledkem je tak genom bez původního genu i bez deleční kazety, pouze s jedním místem *loxP*. Rekombináza Cre je nesena plazmidem pSH47 uvedeným v podkapitole 3.5. Jelikož tento plazmid obsahuje markerový gen *URA3* a buňky tedy s jeho vnesením získají prototrofii *ura*<sup>+</sup>, bylo jako selekční médium připraveno YNB + HML (v případě BYT12 a BYT12345 opět s přidavkem KCl). Buňky byly transformovány elektroporací stejně jako v předcházejícím případě, transformující DNA bylo 0,1 μg plazmidu pSH47. Buňky každého kmene byly vysety na čtyři misky a ty úspěšně transformované vytvořily na médiu bez uracilu kolonie. Jelikož rekombináza Cre je v plazmidu pod kontrolou galaktóзовého promotoru, je její exprese spuštěna až po nahrazení glukózy jako zdroje uhlíku v médiu galaktózou. Z každé misky jsme proto několik kolonií přenesli na novou misku s galaktózou. Aby v buňkách po vyštěpení kazety, ke kterému dojde na tomto médiu, nezůstával ani plazmid, byly nakonec kolonie několikrát přeočkovány na médiu YPD. V neselekčních podmínkách bohatého média nemají buňky potřebu plazmid udržovat a je brzy eliminován.

Úspěšné odstranění kazety bylo ověřeno negativní selekcí na miskách se selekčními médii YNB + HMU respektive YPD + G, kde kandidáti s odstraněnou deleční kazetou, tedy kmeny, které jsou opět *leu*<sup>-</sup> respektive *G*<sup>S</sup>, nerostou, zatímco kandidáti stále nesoucí kazetu ano. Na miskách YNB + HM respektive YNB + HML + G bylo ověřeno, že tyto buňky eliminovali i plazmid pSH47 a jsou tedy opět i *ura*<sup>-</sup>. Buňky, které jsme chtěli získat, byly tedy *leu*<sup>-</sup> *ura*<sup>-</sup> respektive *G*<sup>S</sup>*ura*<sup>-</sup>. Kandidáti, kteří prošli tímto testováním, byli dále ověřeni pomocí colony PCR za použití těchto kombinací primerů:

- 1) IST2-UF + KILEU2-R, respektive IST2-UF + kanX-R1
- 2) IST2-DR + KILEU2-F, respektive IST2-DR + kanX-F1
- 3) IST2-UF + IST2-DR.

Je-li z buněk odstraněna kazeta, očekáváme vznik proužku pouze za použití třetí kombinace primerů, a to pouze krátkého proužku složeného ze sekvencí okolo genu *IST2* (obrázek 9).



**Obr. 9.** Schéma nasedání primerů IST2-UF a IST2-DR v genomu kmenů, ve kterých už není sekvence *IST2* ani sekvence markerového genu *LEU2*, respektive *kanMX* (A). Ukázka elektroforetické vizualizace produktů PCR za použití této dvojice oligonukleotidů (B) - vzorku původního kmene s *IST2* (č. 1), kde došlo k amplifikaci *IST2* spolu s krátkými oblastmi upstream a downstream, kmene s kazetou *LEU2* místo původního *IST2* (č. 2), kde došlo k amplifikaci *LEU2* spolu s krátkými oblastmi upstream a downstream původního *IST2*, a dvou vzorků kmene bez *IST2* i bez kazety (č. 3 a 4), kde došlo k amplifikaci sekvence složené jen z oblastí upstream a downstream původního *IST2*. Marker O'gene Ruler 1kb.

Celkový souhrn nově připravených kmenů s delecí *ist2Δ* udává následující tabulka (tab. 1). Připravit nový kmen *ist2Δ* a odstranit z nich deleční kazetu se podařilo celkem ve 4 ze 6 zamýšlených kmenů. Přes mnohá opakování se nepodařilo deletovat gen *IST2* z kmene CEN.PK a z kmene BYT3, i tak jsme ale získali několik nových kmenů, s nimiž jsme mohli provést velké množství experimentů.

Všechny pokusy následující v kapitole výsledků, není-li uvedeno jinak, byly provedeny vždy se stejným kandidátem s odstraněnou kazetou, tedy ve verzi *ist2::loxP*. Tyto kmény byly

pojmenovány a i v dalším textu budou pro zjednodušení většinou značeny „MI“, tedy BY4741 *ist2::loxP* je „BYMI“, BYT12 *ist2::loxP* je „BYT12MI“ a podobně.

**Tabulka 1.** Souhrn připravených kmenů s delecí *ist2Δ*.

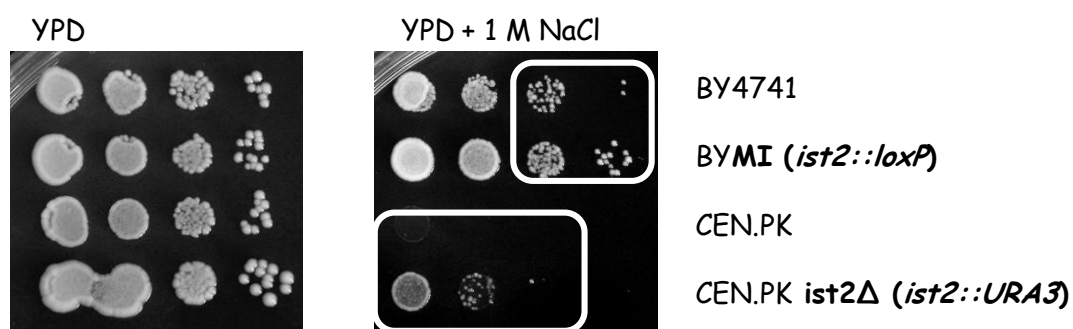
Kmen	Počet provedených transformací	Počet získaných kandidátů <i>ist2::LEU2</i>	Počet získaných kandidátů <i>ist2::kanMX</i>	Získán nový kmen <i>ist2::loxP</i>
CEN.PK	4 x 8	0	0	x
BY4741	1 x 8	3	0	✓
BYT45	5 x 8	3	4	✓
BYT12	1 x 8	1	0	✓
BYT3	4 x 8	0	0	x
BYT12345	1 x 8	0	1	✓

## 5.2. Kmeny s genem *IST2* a kmeny *ist2Δ* v kapkových testech

K porovnání tolerance buněk s genem *IST2* a s delecí *ist2Δ* vůči solím v médiu byla využita metoda kapkových testů popsaná v podkapitole 4.3.1. Patří mezi nejjednodušší a nejpoužívanější způsoby porovnávání fenotypů kvasinek, byla tedy i prvním přístupem pro porovnávání buněčných variant v této práci.

Suspenze buněk byly připraveny podle uvedeného protokolu a nakapány na misky s různými médii. Protože všechny rozdíly pozorované mezi kmeny s *IST2* a s delecí *ist2Δ* byly velmi malé, provedli jsme kapkových testů celou řadu za účelem nalezení nejvhodnějších koncentrací solí pro dobrou viditelnost fenotypu. Tak jsme všechny zde prezentované výsledky pozorovali při nejméně dvou nezávislých obdobných pokusech. Misky byly inkubovány a fotografovány obvykle po dobu jednoho týdne a není-li uvedeno jinak, fotky jednotlivých misek byly pořízeny ve stejný den.

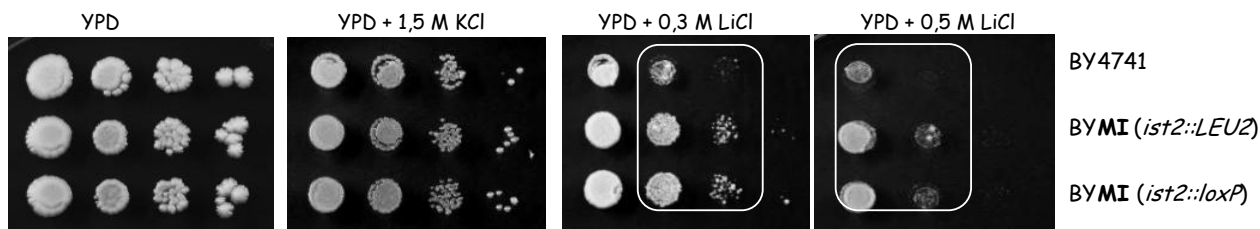
Nejprve byly testy provedeny na médiích YPD a YPD s koncentracemi NaCl 0,8 M, 1,0 M a 1,2 M. Chtěli jsme tak zopakovat pokus, který dal genu *IST2* jeho jméno, v kmeni CEN.PK i v kmeni BY4741. Efekty absence genu *IST2* byly vždy velmi malé, nicméně pozorovatelné při všech použitých koncentracích NaCl (obrázek 10). Oba kmeny s delecí *ist2Δ* rostly na vysoké koncentraci NaCl o něco lépe, v kmeni CEN.PK však bylo zlepšení růstu po delecí genu *IST2* zřetelně větší než v kmeni BY4741. Je ale vidět, že kmen CEN.PK *ist2::URA3* roste o něco lépe i na kontrolní misce, zřejmě díky prototrofii na uracil.



**Obr. 10.** Fenotyp delece *IST2* v kmeni BY4741 a CEN.PK v prostředí s vysokou koncentrací NaCl.

Naším druhým přístupem bylo použití vysoké koncentrace dalších dvou solí, a to KCl a LiCl (obrázek 11). Použitím draselné soli jsme chtěli také zopakovat již publikované pokusy Entiana *et al.* (1999), kteří vedle vlivu vysoké koncentrace NaCl testovali i vliv vysoké koncentrace KCl. Vysoká koncentrace draselné soli sice není pro buňky toxická, působí jim však osmotický stres. Entian *et al.* ale při růstu na médiu s 1,5 M KCl žádný rozdíl mezi buňkami s *IST2* a buňkami *ist2Δ* nepozorovali (1999), což by znamenalo, že delece *ist2Δ* nemá v ochraně vůči osmotickému stresu efekt. Na druhou stranu je *IST2* v databázích uváděn jako gen „pravděpodobně se účastní ochrany vůči osmotickému stresu“ (<http://www.yeastgenome.org/>). Chtěli jsme se tedy na tento problém podívat v našich podmínkách a kmenech. LiCl jsme použili, abychom zjistili, jaký vliv na naše kmeny má působení dalšího toxického kationtu, kationtu lithného, který je pro transportní systémy membrán kvasinkových buněk analogem kationtu sodného. Naše výsledky s KCl (v koncentracích 1,0 M, 1,5 M a 2,0 M) také potvrdily výsledek práce Entiana *et al.* (1999), tedy, že v přítomnosti této soli žádný rozdíl mezi kmeny s *IST2* a *ist2Δ* vidět není. Naopak při použití chloridu lithného (v koncentracích 0,1 M, 0,3 M a 0,5 M) jsme pozorovali fenotyp dokonce výraznější než na médiu s NaCl (obrázek 11).

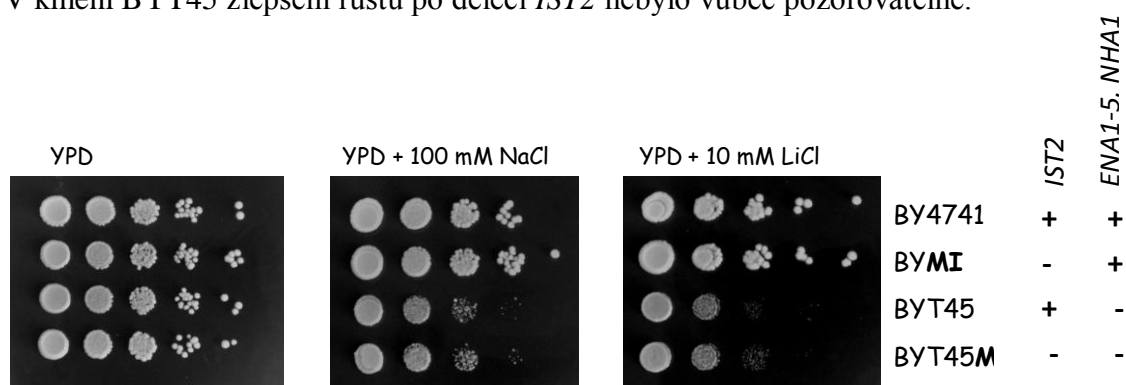
Na začátku podkapitoly bylo uvedeno, že přítomnost deleční kazety s genem *URA3*, který kóduje protein syntézy uracilu, může mít na růst buněk zlepšující vliv. Tato myšlenka se také nabízí při pohledu na výsledky prvního kapkového testu, kde v genetickém pozadí CEN.PK je fenotyp vidět výrazně lépe. Rozhodli jsme se tedy v pokusu s KCl a LiCl pro zajímavost porovnat mezi sebou i kmeny s delecí *ist2Δ* ve verzi s deleční kazetou *LEU2*, jejíž přítomnost by mohla mít obdobný vliv, vzhledem k tomu, že kóduje jeden z proteinů syntézy



**Obr. 11.** Fenotyp delece *IST2* v kmeni BY4741 a efekt přítomnosti deleční kazety v prostředí s vysokou koncentrací KCl a LiCl.

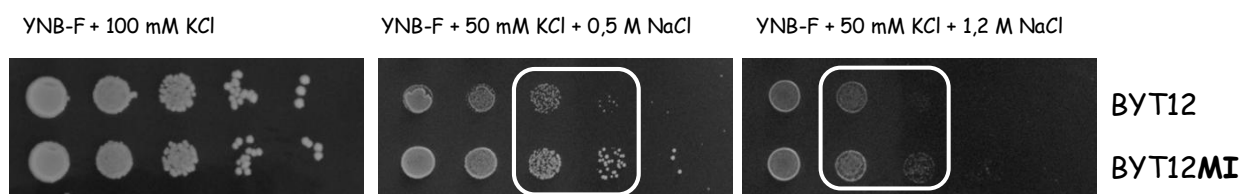
leucinu, a kmeny s delecí *ist2Δ* ve verzi po jejím odstranění. V případě genu *LEU2* a v genetickém pozadí BY4741 ale žádný rozdíl mezi verzí nesoucí kazetu a verzí nesoucí pouze sekvenci *loxP* vidět není (obrázek 11).

Poté, co se podařilo deletovat gen *IST2* i z dalších kmenů, jsme mohli přistoupit k pokusům i s nimi. Pokusili jsme se zopakovat předchozí experimenty s NaCl a LiCl v kmeni BYT45, který má deletované geny pro exportéry kationtů alkalických kovů *ENA1-5* a *NHA1* (podkapitola 1.3), a jeho verzi BYT45MI. Vzhledem k absenci exportérů a tím celkově výrazně nižší odolnosti vůči solím byly použity podstatně nižší koncentrace NaCl (0,1 M, 0,2 M a 0,3 M) i LiCl (10 mM a 20 mM) než v případě BY4741, nicméně i tak buňky rostly pouze na nejnižších z použitých koncentrací (obrázek 12). V kmeni BY4741 fenotyp způsobený delecí *ist2Δ* tentokrát vidět není, protože koncentrace solí jsou pro něj příliš nízké. V kmeni BYT45 zlepšení růstu po delecí *IST2* nebylo vůbec pozorovatelné.



**Obr. 12.** Fenotyp delece *IST2* v kmeni BY4741 a v kmeni BYT45, který postrádá geny pro export kationtů alkalických kovů *ENA1-5* a *NHA1*, v prostředí s NaCl a LiCl. Vpravo je pro lepší orientaci schématicky znázorněna přítomnost genů v jednotlivých kmenech.

Když se podařilo připravit deleční verzi MI i v kmeni BYT12, provedli jsme zkoušku růstu na vysoké koncentraci NaCl i s ním. Do médií bylo kromě NaCl přidáváno i malé množství (50 mM) KCl, protože bez přidavku draselné soli do média vzhledem k absenci importérů Trk nemohou tyto kmeny růst. Pro kontrolu přesného obsahu draslíku bylo proto místo běžného média YPD používáno médium YNB-F bez draslíku, které obsahuje pouze mikromolární množství  $K^+$ , se suplementy podle podkapitoly 3.3. Jako kontrolní médium bylo připraveno YNB-F se 100 mM KCl. Překvapivě v kmeni BYT12 byl fenotyp delece *IST2* vidět také. Na všech použitých koncentracích (0,4 M, 0,5 M, 0,8 M, 1,2 M a 1,5 M) NaCl byl lepší růst kmene BYT12MI zřetelný (obrázek 13). Obdobný pokus byl proveden i s vysokou koncentrací KCl, kde ale stejně jako v kmenech BY4741 a BYT45 delece *IST2* růst buněk nijak neovlivnila.

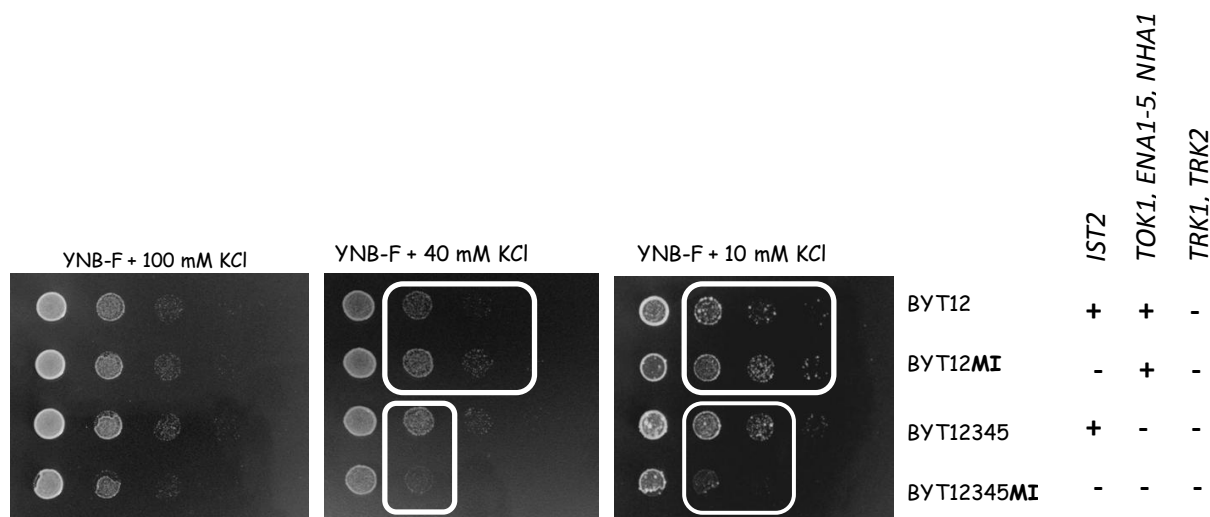


**Obr. 13.** Efekt delece *IST2* v kmeni BYT12, který postrádá geny pro aktivní import  $K^+$  *TRK1* a *TRK2*, v prostředí s vysokou koncentrací NaCl.

Zajímalo nás dále také, zda by přítomnost *IST2* v genomu mohla nějak ovlivňovat chování kmenů s delecemi *trk1Δ trk2Δ* v prostředí s velmi nízkými koncentracemi KCl, kde se jim jinak roste velmi těžce. Provedli jsme tedy několik pokusů s kmeny BYT12 a BYT12345 a z nich odvozenými delečními kmeny MI na médiích s několika nízkými koncentracemi KCl. Výsledky byly překvapivé. V kmeni BYT12, který postrádá importéry draslíku Trk1 a Trk2, delece *IST2* vedla v prostředí s limitně nízkou koncentrací KCl ke zlepšení růstu (obrázek 14). Naopak v kmeni s absencí jak importérů Trk, tak exportérů Ena1-5, Nha1 a Tok1, delece *IST2* růst zhoršila (obrázek 14).

Napoprvé použitá koncentrace KCl 10 mM byla později doplněna i dalšími (30, 40, 50), kde byl fenotyp pozorovatelný ještě lépe (obrázek 14). Jako kontrolní koncentrace KCl bylo používáno 100 mM množství.





**Obr. 14.** Efekt delece *IST2* v kmeni BYT12, který postrádá aktivní import  $K^+$ , a v kmeni BYT12345 postrádajícím geny pro importéry draslíku *TRK1* a *TRK2* i pro exportéry kationtů alkalických kovů *TOK1*, *ENA1-5* a *NHA1*. Obrázky se 100 mM a 40 mM KCl byly pořízeny po 24 h růstu, obrázek s 10 mM KCl až po 3 dnech vzhledem k pomalejšímu růstu buněk na tomto médiu. Vpravo je pro lepší orientaci schématicky znázorněna přítomnost genů v jednotlivých kmenech.

Testy vlivu vysoké koncentrace NaCl, KCl a LiCl v kmeni BY4741 a třech od něj odvozených kmenech s delecemi genů pro membránové transportéry regulujícími homeostázi kationtů alkalických kovů potvrdily mírné zlepšení růstu kmenů s delecí *ist2Δ* v prostředí zvýšené koncentrace NaCl v divokém kmeni BY4741 (od 0,8 M do 1,2 M) a v od něj odvozeném kmeni BYT12, který nemá aktivní import draslíku (od 0,4 M do 1,5 M). V kmeni BYT45, který postrádá exportéry kationtů alkalických kovů, zlepšený fenotyp pozorován nebyl. Dále jsme prověřili růst kmenů v prostředí s vysokou koncentrací KCl (od 1,0 M do 2,0 M), ale žádné zlepšení růstu v kmenech s delecí *ist2Δ* jsme zde nepozorovali. Poprvé zaznamenaným jevem bylo naopak zlepšení růstu kmene BY4741 s delecí *ist2Δ* v prostředí s LiCl (od 0,1 M do 0,5 M).

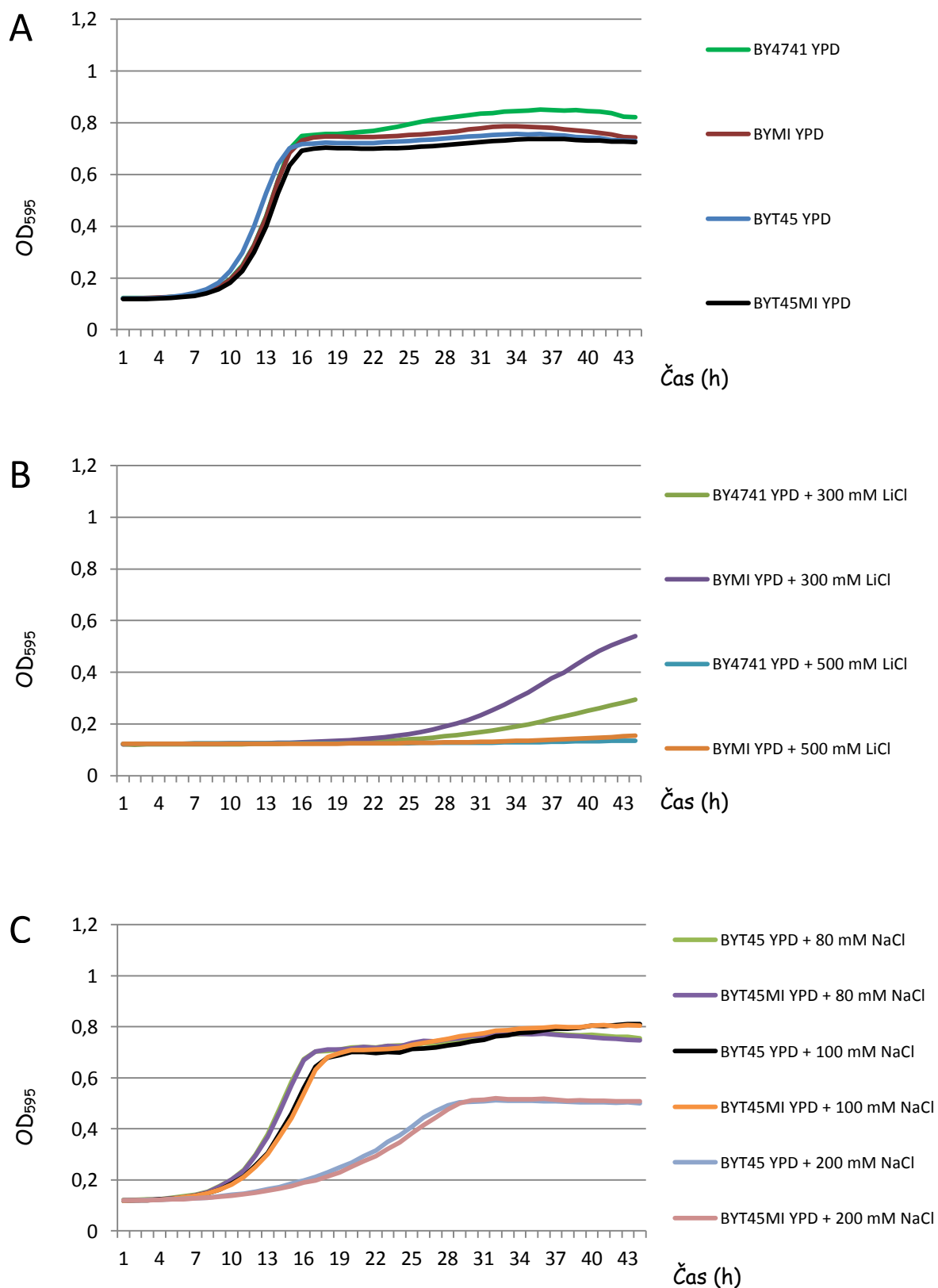
Druhým přístupem bylo testování vlivu limitně nízkých koncentrací KCl v médiu na růst kmenů s absencí transportérů pro aktivní import draselných kationtů a jejich verzí s delecí *ist2Δ*. Ukázalo se, že v kmeni BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) vede odstranění *IST2* ke zlepšení růstu tohoto kmene. Naopak v kmeni BYT12345, který kromě delece *trk1Δ trk2Δ* postrádá rovněž všechny exportéry kationtů alkalických kovů (*Ena1-5*, *Nha1* a *Tok1*), delece *ist2Δ* růst kmene zhoršila, a to poměrně výrazně.

Zopakovali a potvrdili jsme tedy již publikované výsledky s vysokými koncentracemi NaCl a KCl a nově provedli pokusy s LiCl. Kromě ovlivnění tolerance k vysokým koncentracím NaCl a LiCl se ukázalo, že *IST2* zřejmě nějak ovlivňuje také schopnost buněk, které nemohou importovat draselné kationty, růst v limitně nízkých koncentracích draslíku. Zároveň výsledky naznačily genetickou interakci mezi *IST2* a *ENA1-5* a/nebo *NHA1*.

### 5.3. Růstové křivky kmenů s geny *IST2* a s delecí *ist2Δ*

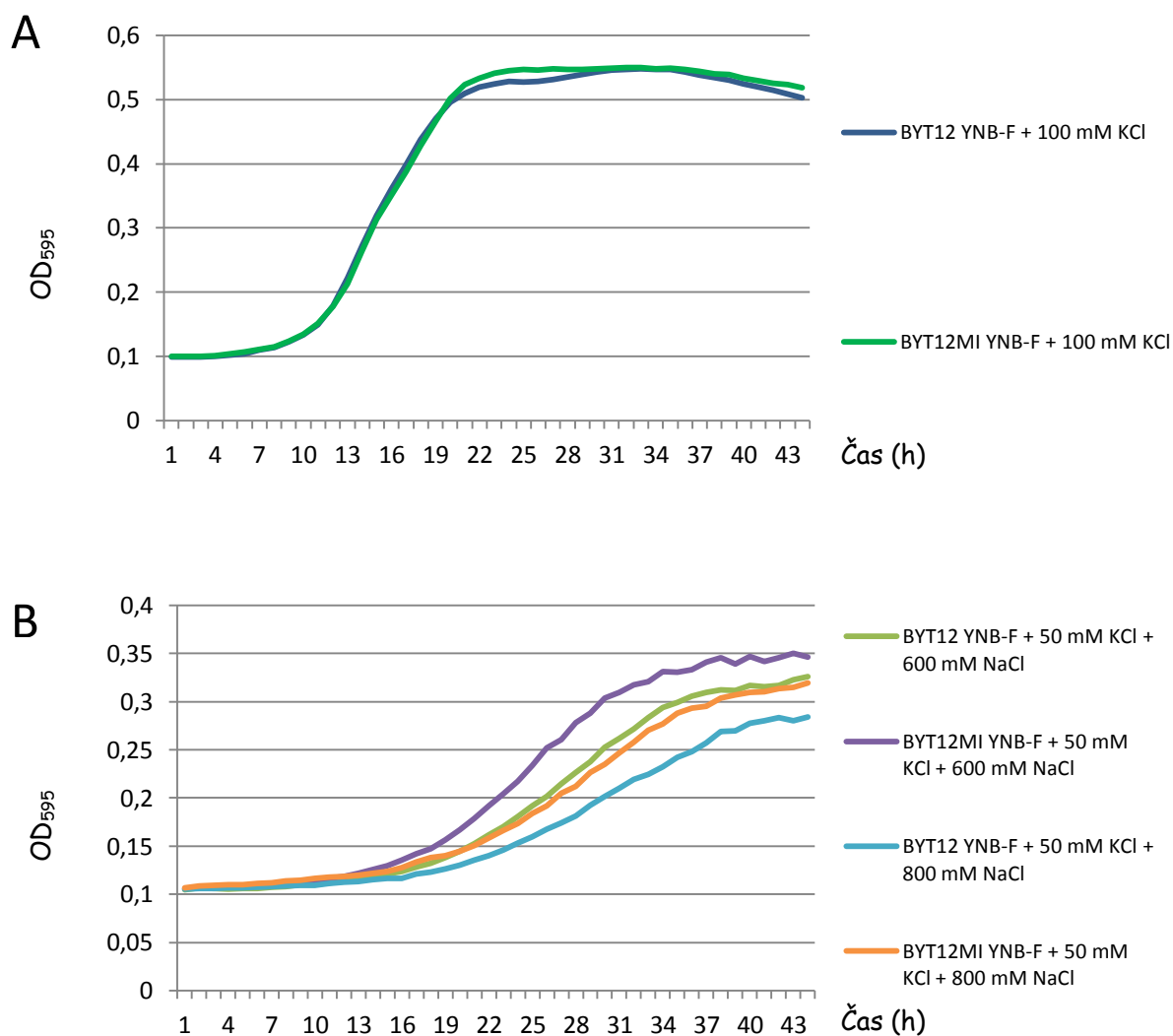
Pro potvrzení pozorovaných jemných rozdílů mezi fenotypy buněk s *IST2* a buněk MI jsme se rozhodli některé kapkové testy doplnit růstovými křivkami. Ty jsme měřili v tekutých médiích přístrojem Multiplate Reader tak, jak je popsáno v podkapitole 4.3.2. Výsledky byly zpracovány do grafů závislosti OD<sub>595</sub>, tedy koncentrace buněk, na čase. Všechny uváděné výsledky, pokud není uvedeno jinak, byly získány při dvou nezávislých měřeních.

Nejprve jsme porovnali růst dvojice kmenů BY4741 a BYMI a kmenů BYT45 a BYT45MI. Provedli jsme měření růstu BY4741 a BYMI v médiu s LiCl a dále BYT45 a BYT45MI v médiu s NaCl, abychom tak zopakovali naše nová pozorování z kapkových testů. V kontrolním médiu YPD bez solí rostly obě dvojice kmenů velmi podobně (obr. 15, graf A). V médiu s LiCl rostl kmen s delecí *ist2Δ* lépe (obr. 15, graf B). Rozdíl rychlosti růstu buněčné kultury byl dobře pozorovatelný při koncentraci 300 mM, koncentrace 500 mM už byla příliš vysoká, ale i tak je dobře vidět, že kmen s delecí *ist2Δ* narozdíl od rodičovského kmene začíná v posledních hodinách pokusu růst (obr. 15, graf B). K porovnání růstu dvojice kmenů BYT45 a BYT45MI bylo použito několik koncentrací NaCl (obr. 15, graf C). Ve všech byly získané růstové křivky dvojice kmenů téměř identické, v tomto kmeni a tomto médiu tedy zřejmě delece *ist2Δ* zlepšující vliv na růst buněk nemá, což potvrzuje pozorování na miskách s kapkovými testy.



**Obr. 15.** Růstové křivky kmenů BY4741, BYMI BYT45 a BYT45MI v YPD (A), růst kmenů BY4741 a BYMI v YPD + LiCl (B) a růst kmenů BYT45 a BYT45MI v YPD + NaCl (C).

Pro porovnání růstových křivek kmenů BYT12 a BYT12MI v médiích s NaCl bylo použito médium YNB-F doplněné 100 mM KCl jako kontrola, do médií s NaCl pak bylo stejně jako v kapkových testech přidáváno vždy 50 mM KCl. Výsledné růstové křivky ukázaly, že v kontrolním médiu kmeny rostou téměř shodně (obr. 16, graf A), zatímco po přidání NaCl se zlepšuje růst kmene s delecí *ist2Δ* (obr. 16, graf B).



**Obr. 16.** Růstové křivky kmenů BYT12 a BYT12MI v médiu YNB-F + 100 mM KCl (A) a růstové křivky v médiích YNB-F s NaCl (B).

Na závěr byly porovnány růstové křivky dvojic kmenů BYT12 a BYT12MI a BYT12345 a BYT12345MI v prostředích s limitně nízkými koncentracemi draslíku. Přesto,

že tento pokus byl několikrát zopakován, se nepodařilo získat typické růstové křivky, které by byly reprodukovatelné, a nejsou zde uvedeny.

Shrneme-li výsledky měření růstových křivek a porovnáme je s výsledky kapkových testů, dospěli jsme k závěru, že delece *ist2Δ* v kmeni BY4741 skutečně vede k mírnému zlepšení růstu v médiu s NaCl a kromě toho také ke zlepšení růstu v prostředí obsahujícím vysoce toxické LiCl (a to výraznějším než v případě NaCl). V kmeni BYT12, který postrádá importní systémy draslíku Trk1 a Trk2, bylo zlepšení růstu v prostředí s NaCl po delecí *ist2Δ* potvrzeno také. V kmeni BYT45, který postrádá systémy Ena1-5 a Nha1 pro export kationtů alkalických kovů, delece *ist2Δ* žádné zlepšení růstu v přítomnosti NaCl nezpůsobila, jak je vidět z výsledků kapkových testů i růstových křivek. Tyto výsledky nabízejí hypotézu o možnosti existence genetické interakce *IST2* s geny pro transportéry pro výstup kationtů alkalických kovů z buněk.

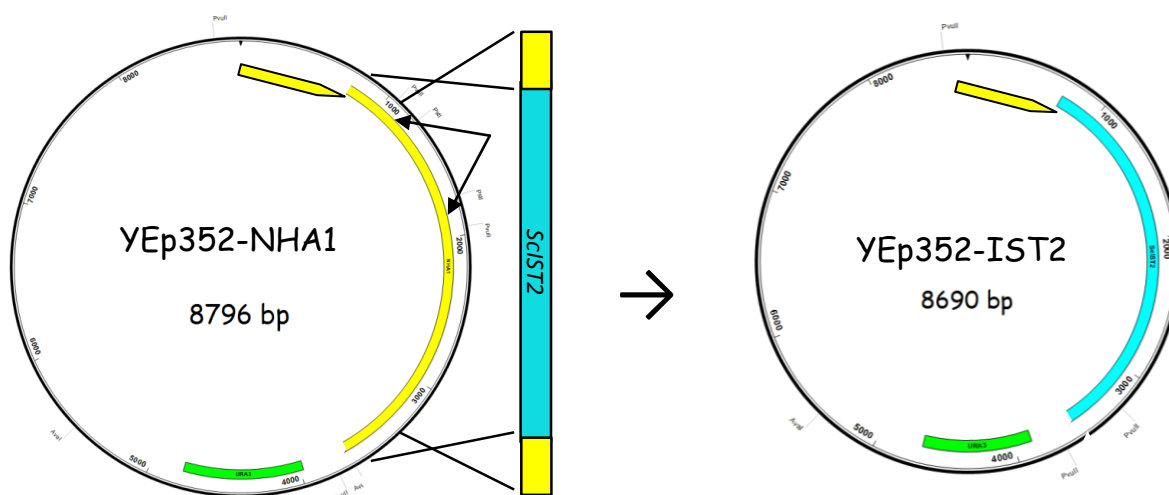
Dále jsme zjistili, že v kmeni BYT12 rostou buňky s delecí *ist2Δ* lépe také v prostředí s limitně nízkou koncentrací draselného kationtu. V buňkách kmene BYT12345, který kromě importérů Trk postrádá i exportéry Ena1-5, Nha1 a Tok1, jsme však pozorovali opačný efekt – po delecí genu *IST2* se růst těchto buněk v prostředí s nedostatkem draslíku zhoršil. Ukázalo se tedy, že kromě tolerance k NaCl a LiCl gen *IST2* zřejmě nějak ovlivňuje také schopnost buněk, které mají porušený import draslíku, růst v prostředích s jeho nedostatkem.

#### **5.4. Komplementace delece *ist2Δ* zpětným vnesením genu *IST2* v plazmidu do buněk**

Pro ověření komplementace fenotypu pozorovaného v buňkách s delecí *ist2Δ* jsme zkonstruovali nový plazmid nesoucí kódující sekvenci *IST2* a transformovali jím buňky *ist2Δ*. Konstrukt byl připraven nahrazením sekvence genu *NHA1* sekvencí *IST2* v plazmidu pYEp352-NHA1. Tento konstrukt byl vytvořen homologní rekombinací v kvasinkových buňkách, která proběhla mezi původním plazmidem pYEp352-NHA1 a připraveným fragmentem DNA, který obsahoval sekvenci *IST2* a měl konce homologní k sekvencím v plazmidu. Z kolonií narostlých na selekčním médiu byl plazmid vyizolován, pomnožen v buňkách *E. coli* a přítomnost *IST2* v plazmidu byla ověřena restričním štěpením a colony PCR. Správně vytvořeným plazmidem jsme pak transformovali buňky *S. cerevisiae ist2Δ* a

zhodnotili jsme jejich růst kapkovým testem. Schémata původního a nového plazmidu, který byl nazván pYEp352-IST2, jsou na obrázku 17. Pro analýzu jejich sekvencí a výběr vhodných restričních enzymů jsme použili program DNA Lasergene.

Vzhledem k tomu, že připravený plazmid byl v této práci použit jen k jednomu kapkovému testu komplementace delece, neuvádíme zde úplně podrobně všechny dílčí výsledky.



**Obr. 17.** Schéma plazmidu YEp352-NHA1 a nového plazmidu YEp352-IST2. Malá žlutá šipka ve schématech značí oblast promotoru *NHA1*. Dvě malé černé šipky ve schématu plazmidu YEp352-NHA1 znázorňují štěpení sekvence genu *NHA1* restričním enzymem *Pst*I.

#### 5.4.1. Příprava fragmentu s *IST2*

Prvním krokem pro klonování *IST2* byla amplifikace fragmentu DNA se sekvencí tohoto genu a s konci homologními k úsekům v plazmidu. Pro zajištění co největší přesnosti amplifikační reakce jsme použili kit Phusion High Fidelity PCR s polymerázou Taq, která má opravnou funkci. Jako templát byla použita genomová DNA kmene BY4741 a jako primery dvojice oligonukleotidů YEpN-ScIST2-F a YEpN-ScIST2-R uvedených v podkapitole 3.5. Ty se skládají ze dvou částí, a to části nasedající na konce genu *IST2* v genomu a části homologické k sekvencím plazmidu, do něž má být konstrukt vložen. Jde tedy o obdobný princip jako v případě delečních kazet.

Směs pro PCR byla připravena a amplifikační reakce byla provedena tak, jak je uvedeno v podkapitole 4.2.7. Velikost namnoženého fragmentu jsme ověřili elektroforeticky.

### 5.4.2. Štěpení plazmidu YEp352-NHA1

Plazmid YEp352-NHA1, do nějž měl být připravený fragment DNA vložen, jsme nejprve naštěpili, čímž bylo zajištěno, že pokud nedojde k homologní rekombinaci a naštěpený plazmid se nespojí s fragmentem obsahujícím *IST2*, nebude tato lineární DNA předávána do dceřiných buněk a ty neporostou na selekčním médiu bez uracilu. Použili jsme restriční enzym *PstI*, který plazmid štěpí na dvou místech v sekvenci *NHA1*. Restriční reakce byla provedena tak, jak je uvedeno v podkapitole 4.2.6, a velikost fragmentů ověřena elektroforeticky.

### 5.4.3. Transformace *S. cerevisiae* a selekce a ověření nového plazmidu

Pro transformaci byly použity buňky *S. cerevisiae* BY4741. Buňky jsme připravili stejně, jako je uvedeno v podkapitole 4.2.1, a provedli 5 transformací. Vždy 100  $\mu$ l kompetentních buněk byla transformováno:

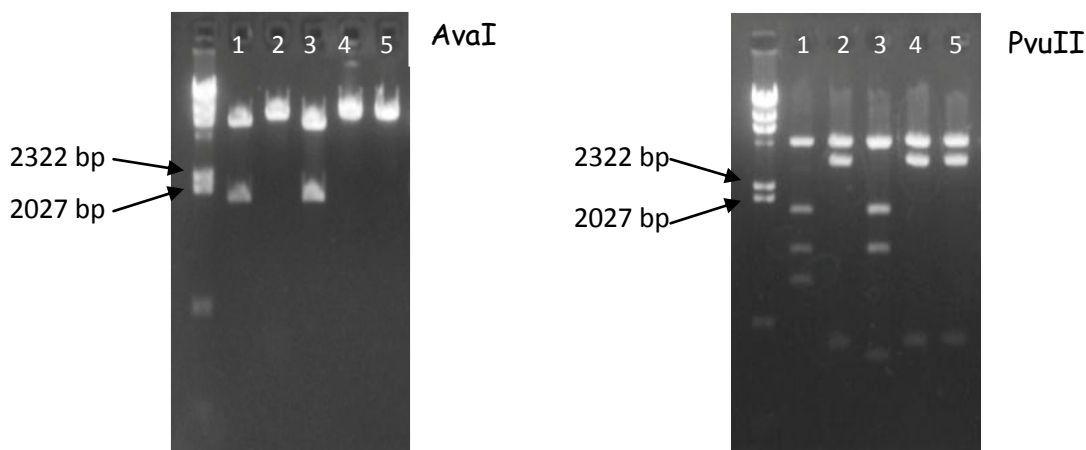
- 1) „naprázdno“ bez plazmidu, tj. 1. negativní kontrola,
- 2) 0,05  $\mu$ g naštěpeného plazmidu YEp352-NHA1, tj. 2. negativní kontrola,
- 3) 0,1  $\mu$ g nenaštěpeného plazmidu YEp352-NHA1, tj. pozitivní kontrola,
- 4) a 5) 0,05  $\mu$ g naštěpeného plazmidu YEp352-NHA1 + 0,15  $\mu$ g fragmentu DNA.

Buněčné suspenze byly vysety na pevné půdy YNB + HML. 4. a 5. transformace byly každá vysety na 2 misky, a to tak, že na jednu byla vyseta 1/10, tedy 20  $\mu$ l, a na druhou zbylých 180  $\mu$ l, aby v případě vysoké účinnosti transformace byly kolonie dobře rozeznatelné.

Po několika dnech narostlo na miskách s menší koncentrací vyšetých buněk asi 60 kolonií a na miskách s větší koncentrací asi 180 - 250 kolonií. Na pozitivní kontrole bylo kolem 800 kolonií. 3 kandidáti z každé misky byli přeočkováni na čerstvé selekční médium a po několika dnech byly narostlé buňky použity pro ověření nového plazmidu pomocí colony PCR (podkapitola 4.2.9) za použití dvojice diagnostických oligonukleotidů PNHA1-1 (nasedajícím v plazmidech v oblasti promotoru *NHA1*) + IST2-1R uvedených v podkapitole 3.5.2. Amplifikace tak proběhla a proužek se vytvořil pouze v přítomnosti genu *IST2*, tedy v případě nového plazmidu jako templátové DNA.

Mimoto byla sekvence nového plazmidu ověřena pomocí restričních enzymů *AvaI* a *PvuII*, které jsme vybrali pomocí programu DNA Lasergene proto, že štěpí jak nově

zkonstruovaný plazmid, tak původní YEp352-NHA1, ovšem za vzniku různého počtu fragmentů o různých velikostech. Tak bylo možné plazmidy jednoznačně rozlišit (obrázek 18).

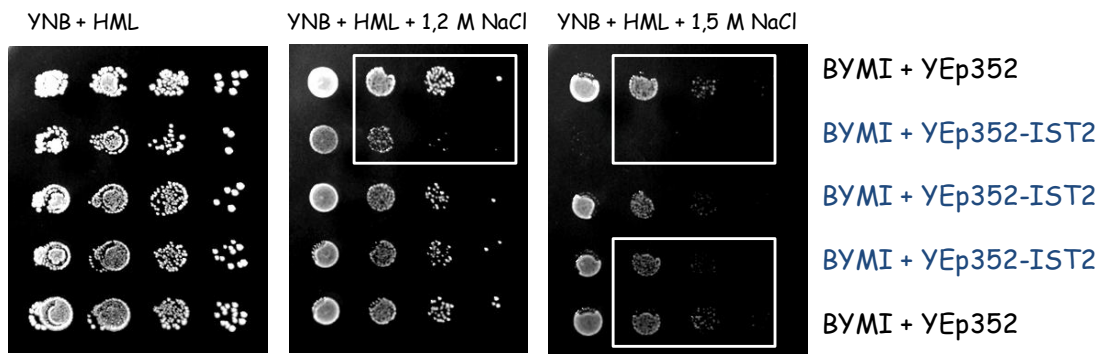


**Obr. 18.** Štěpení kontrolního původního plazmidu YEp352-NHA1 (č. 1) a 4 kandidátů nového plazmidu YEp352-IST2 (č. 2, 3, 4 a 5) restričními enzymy *AvaI* a *PvuII*. Vzorky 2, 4 a 5 jsou správně připravené nové plazmidy, vzorek 3 je plazmid původní, stejný jako kontrolní vzorek 1. Marker Lambda DNA/*HindIII*.

#### 5.4.4. Ověření fenotypu buněk transformovaných plazmidem s *IST2*

Buňky BYMI, které postrádají vlastní gen *IST2*, jsme transformovali buď novým plazmidem YEp352-IST2, nebo kontrolním prázdným plazmidem YEp352 a buněčné suspenze vyseli na misky s médiem YNB + HML. 3 kandidáty s plazmidem YEp352-IST2 a 2 kandidáty s kontrolním plazmidem YEp352 jsme podrobili srovnání růstu pomocí kapkového testu. Použili jsme média YNB + HML s přidávkem několika koncentrací NaCl (0,8 M, 1,0 M, 1,2 M a 1,5 M) a YNB + HML bez soli sloužilo jako kontrolní médium. Ve všech případech došlo po vnesení plazmidu YEp352-IST2 k mírného zhoršení fenotypu vůči buňkám bez *IST2* (obrázek 19), lépe viditelné jsou výsledky na médiu s vyšší koncentrací. Všichni 3 kandidáti se nechovali zcela stejně, první z trojice vykazoval fenotyp výrazněji zhoršený než další 2 (obrázek 19).





**Obr. 19.** Komplementace delece *ist2Δ* vnesením *IST2* na plazmidu.

## 5.5. Měření vnitrobuněčného pH

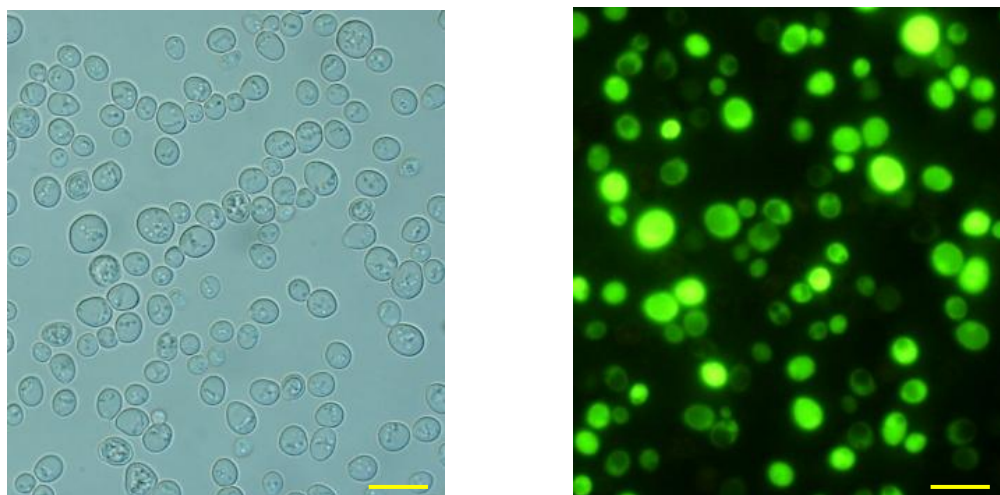
Udržování vnitrobuněčného pH je stěžejní pro mnoho procesů probíhajících v buňkách. Jelikož vnitrobuněčné pH a koncentrace a transport kationtů jsou jevy úzce spolu související, zajímalo nás, zda se nějak liší pH v buňkách s a bez *IST2*. Měření bylo prováděno pomocí pH-senzitivní varianty GFP, pHluorinu, jehož sekvenci nese plazmid pHl-U, jak je popsáno v kapitole 4.3.4. pHluorin je pH dependentní forma známého fluorescenčního proteinu GFP se dvěma excitačními maximy, a to při 400 a 485 nm (Miesenböck *et al.*, 1998). V prvním případě je chromofor protonován, ve druhém deprotonován. Poměr množství proteinu v těchto dvou stavech je samozřejmě ovlivněno pH okolí, v němž se pHluorin nachází. Porovnání intenzit signálů při těchto dvou vlnových délkách je tedy možné využít k měření intracelulárního pH buněk (Miesenböck *et al.*, 1998).

### 5.5.1. Transformace kmenů a ověření fluorescence

Nejprve bylo nutné kmene transformovat plazmidem pHl-U (Marešová *et al.*, 2010). Plazmid vyizolovaný z *E. coli*, jak je uvedeno v podkapitole 4.2.5, byl použit k transformacím obvyklým způsobem, jak je popsáno v podkapitole 4.2.1. Na každých 100  $\mu$ l buněk bylo použito asi 0,1  $\mu$ g plazmidu. Transformované kvasinky byly vzhledem k tomu, že plazmid nese selekční gen *URA3*, vysety na pevná média YNB + HML. Jako negativní kontrola byly použity vždy buňky, které absolvovaly všechny kroky přípravy i elektroporaci, ale nebyl k nim přidán plazmid. Pozitivní kontrolou byly buňky transformované plazmidem pSH47. Buněčná suspenze každého kmene po elektroporaci byla vyseta na 2 misky, z nichž jsme po

týdnu odebrali kolonie k ověření přítomnosti plazmidu. Z každé misky jsme přeočkovali 2 kolonie, tedy celkem 4 kandidáty každého kmene na čerstvé misky se selekčním médiem. Transformaci několika kmenů bylo nutné jednou zopakovat, protože napoprvé nenarostly na selekčních miskách kolonie všech kmenů. Druhou transformací už byli získáni kandidáti všech zbývajících kmenů. Na každé misce narostlo obvykle 400 – 1000 kolonií.

Dále bylo potřeba ověřit, zda kvasinky, i když rostou na selekčním médiu a tedy pravděpodobně nesou plazmid, skutečně exprimují pHluorin. Buňky všech kandidátů byly proto pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu za použití filtrů pro fluorescenci a Nomarského kontrastu. Fluorescence byla u všech kandidátů pozorována v cytosolu (vzorový obrázek 20). Kandidát každého kmene, jehož fluorescence byla nejlepší, byl použit k vlastnímu měření pH.



**Obr. 20.** Buňky kmene BYT12 exprimující pHluorin. Žlutá úsečka v pravém dolním rohu každého obrázku znázorňuje rozměr 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.2. Vlastní měření vnitrobuněčného pH

Měření vnitrobuněčného pH bylo prováděno nejprve v buňkách narostlých v médiu YNB-F bez fluorescenčních složek + 100 mM KCl. Vzhledem k výsledkům kapkových testů a růstových křivek bylo toto médium považováno za kontrolní, protože v dosavadních pokusech v něm všechny kmeny rostly bez rozdílů mezi dvojicemi s *IST2* a *ist2* $\Delta$ . Jako zdroj aminokyselin a dalších auxotrofních přísad byla vždy používána směs BSM bez uracilu.

Nejprve jsme chtěli vidět, zda se pH mezi dvojicemi *IST2/ist2Δ* nějak liší při růstu v uvedeném kontrolním médiu. Měření bylo provedeno čtyřikrát, uvedené hodnoty pro každý kmen jsou průměrem těchto nezávislých měření (tabulka 2). Měření bylo provedeno u všech 8 testovaných kmenů. Z uvedených výsledků je vidět, že rozdíly mezi vnitrobuněčným pH dvojic *IST2/ist2Δ* jsou za standardních růstových podmínek nepatrné a zřejmě nevýznamné (tabulka 2).

**Tabulka 2.** Vnitrobuněčné pH čtyř dvojic studovaných kmenů rostoucích v YNB-F + 100 mM KCl.

Kmen	pH <sub>in</sub>
BY4741	6,96 ± 0,09
BYMI ( <i>ist2Δ</i> )	6,97 ± 0,06
BYT45	6,96 ± 0,03
BYT45MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,99 ± 0,06
BYT12	6,99 ± 0,07
BYT12MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,86 ± 0,06
BYT12345	6,84 ± 0,09
BYT12345MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,95 ± 0,03

Vzhledem k dříve pozorovanému rozdílu růstu buněk v médiích s velmi nízkým obsahem draslíku jsme se rozhodli provést i měření vnitrobuněčného pH při hladovění na draslík. Buňky byly za tím účelem pěstovány nejprve v médiu YNB-F + 50 mM KCl a kultury rozděleny na dvě části. V první bylo ihned změřeno vnitrobuněčné pH, druhá byla 1 x promyta médiem bez přidaného KCl a přenesena do tohoto média na 3 hodiny. Po inkubaci v prostředí bez draslíku bylo změřeno vnitrobuněčné pH. Uvedené výsledky byly opět získány jako průměr alespoň tří nezávislých měření.

**Tabulka 3.** Vnitrobuněčné pH kmenů rostoucích v médiu YNB-F + 50 mM KCl a po 3 hodinách hladovění na draslík.

Kmen	pH <sub>in</sub>	pH <sub>in</sub> po hladovění na KCl
BY4741	7,00 ± 0,045	6,93 ± 0,06
BYMI ( <i>ist2Δ</i> )	6,95 ± 0,04	6,88 ± 0,02
BYT45	6,86 ± 0,04	7,00 ± 0,08
BYT45MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,90 ± 0,04	6,93 ± 0,01
BYT12	6,76 ± 0,04	6,55 ± 0,01
BYT12MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,78 ± 0,07	6,65 ± 0,07
BYT12345	6,79 ± 0,07	6,66 ± 0,1
BYT12345MI ( <i>ist2Δ</i> )	6,77 ± 0,03	6,67 ± 0,08

Z výsledků vyplývá, že po inkubaci v prostředí s nedostatkem KCl se vnitrobuněčné prostředí kmenů mírně okyseluje, výjimkou je pouze dvojice BYT45/BYT45MI, která postrádá exportéry Ena1-5 a Nha1. Rozdíly mezi kmeny s *IST2* a *ist2Δ* většinou dosahují velmi malých hodnot. Opakovaně pozorovaným rozdílem je výraznější zvýšení pH v kmeni BYT45 v porovnání s BYT45MI. Druhým významnějším rozdílem ve dvojici *IST2/ist2Δ* je výraznější pokles pH při hladovění na draslík v kmeni BYT12 v porovnání s kmenem BYT12MI. To by mohlo souviset s lepší schopností kmene BYT12MI akumulovat za těchto podmínek draslík, což byl jev pozorovaný na miskách s kapkovými testy.

## 5.6. Měření membránového potenciálu

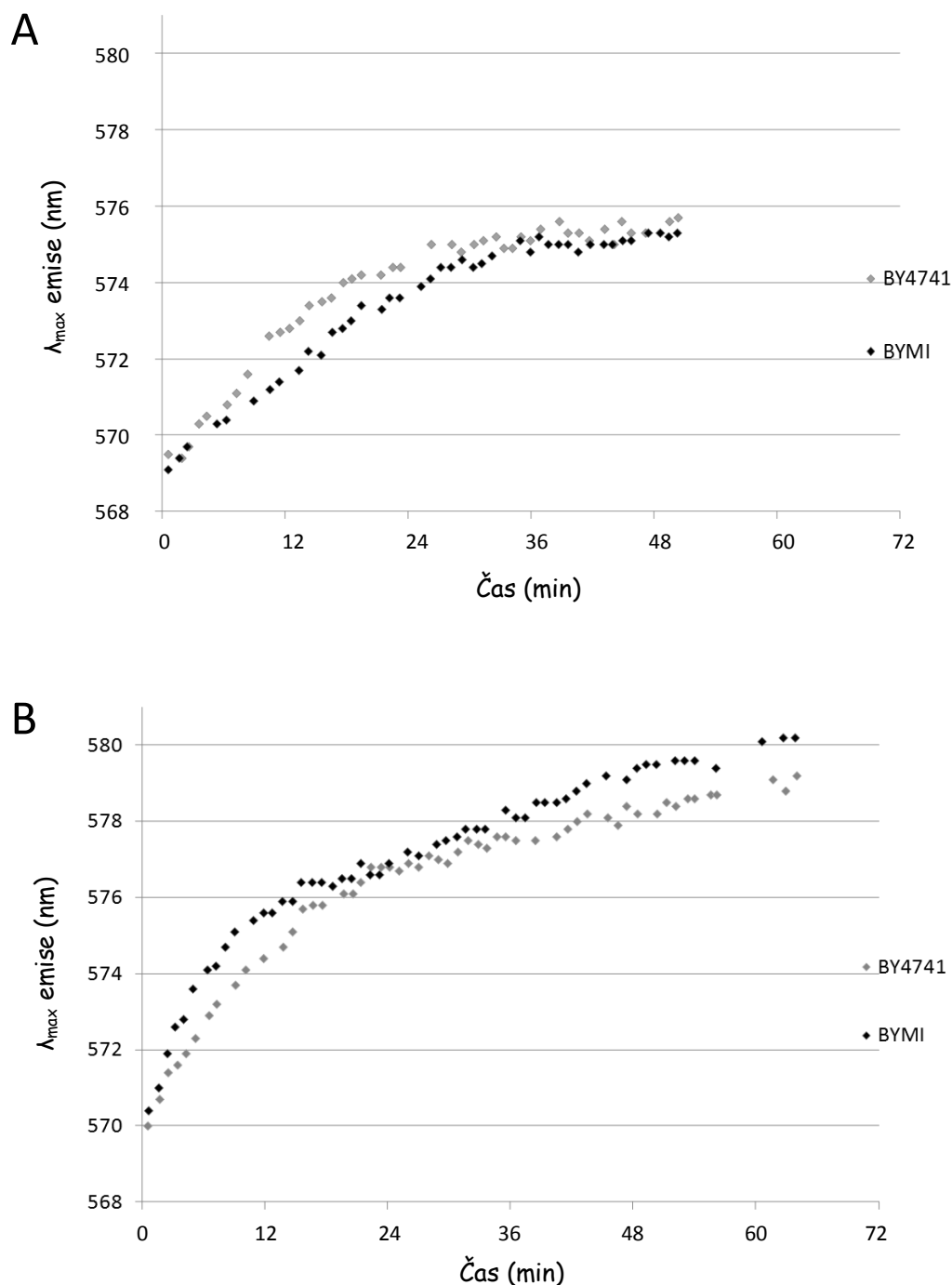
Membránový potenciál je rozdíl elektrického potenciálu na dvou stranách buněčné membrány, napětí, ovlivňující tok iontů přes tuto membránu. Každou nabitou molekulu žene přes membránu síla způsobená jednak chemickým gradientem této molekuly (je-li solutu víc uvnitř, nebo vně prostoru ohraničeného membránou), a jednak membránovým potenciálem. Víme, že membránovým potenciálem je také ovládána aktivita některých transportních proteinů (Marešová *et al.*, 2006; Navarette *et al.*, 2010). Rozhodli jsme se tedy porovnat membránový potenciál mezi dvojicemi kmenů s a bez genu *IST2*.

Fluorescenční sonda 3,3'-dipropylthiadikarbokyanin jodid (dále vždy jen diS-C<sub>3</sub>(3)) je kladně nabitá lipofilní sloučenina, která se akumuluje v buňce v závislosti na potenciálu plazmatické membrány buněk (Peňa *et al.*, 1984). Čím záporněji je nabitá vnitřní strana membrány, tím více sondy vstupuje do buňky a váže se na buněčné komponenty, což je provázeno posunem emisního maxima z 560 nm na 580 nm. Sonda vstupuje do buněk až do té doby, než se ustaví rovnováha její koncentrace na obou stranách membrány. Podle literatury k tomu v buňkách s buněčnou stěnou dochází zhruba za 30 minut (Gášková *et al.*, 1998).

Buňky kvasinek byly napěstovány v médiu YNB-F + 100 mM KCl a připraveny pro měření tak, jak je popsáno v podkapitole 4.3.5. Fluorescenčním spektrofotometrem jsme pak měřili poměry intenzit  $I_{580}/I_{560}$  při excitaci 531 nm (Marešová *et al.*, 2006). Tímto způsobem měření se však navzdory několika opakováním nepodařilo dospět k reprodukovatelným výsledkům. Rozdíly mezi kmeny *IST2/ist2Δ* byly ve všech čtyřech dvojicích vždy velmi malé a při opakování experimentů se je nepodařilo potvrdit. To může být důsledkem skutečně velmi malého rozdílu potenciálů, který není snadné touto technikou zaznamenat, nebo technického problému, který se nepodařilo odhalit. Dalším problémem při práci s touto metodou bylo, že ani po 40 minutách měření obvykle poměr koncentrací sondy uvnitř a vně nezůstával konstantní, ale stále mírně stoupal, což znamená, že sonda stále vstupovala do buňky.

Pro porovnání jsme se proto rozhodli v buňkách BY4741 a BYMI proměřit místo poměru intenzit pouze posun emisního maxima v čase, tedy v podstatě zvyšování koncentrace sondy vázané na záporně nabitě komponenty uvnitř buňky vůči koncentraci sondy volné (Gášková *et al.*, 1998). Čím více stoupá hodnota emisního maxima směrem k 580 nm, tím zápornější je hodnota potenciálu přes plazmatickou membránu. Vyšší hodnoty dosažené

vlnové délky tedy znamenají zápornější hodnotu membránového potenciálu (Gášková *et al.*, 1998). Naše měření probíhala 50 – 70 minut při excitaci 531 nm. Získané hodnoty jsme zpracovali do formy barvicích křivek znázorňujících rychlost vstupu sondy do buněk (obr. 21).



**Obr. 21.** Maximální vlnová délka emisního světla sondy při excitaci 531 nm v buňkách BY4741 a BYMI rostoucích v YNB-F + 100 mM KCl (A) a po 3 hodinách hladovění na draslík (B).

Výsledky těchto měření říkají, že buňky s delecí *ist2Δ* rostoucí v médiu s dostatkem draslíku jsou mírně depolarizovány vzhledem k rodičovskému kmeni, při hladovění na draslík se však naopak rychleji hyperpolarizují.

Shrneme-li výsledky měření membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy, nepodařilo se dospět k žádným závěrům založeným na opakovaném dosažení podobného výsledku. Metodu měření růstu poměru intenzit fluorescence  $I_{580}/I_{560}$  v čase se pro účely našeho zkoumání nepodařilo optimalizovat. Na vině mohla být nějaká opakovaná chyba v přípravě buněk, kterou jsme nedokázali odhalit. Je také možné, že pro účely zkoumání *IST2*, jehož delece má za následek vždy velmi malý fenotyp, alespoň za podmínek dosavadních pokusů, není tento způsob měření membránového potenciálu dostatečně citlivý.

Druhým způsobem měření, tedy sledováním růstu maximální vlnové délky emisního světla v čase, jsme dospěli v případě dvojice BY4741/BYMI ke zjištění, že kmen s delecí *ist2Δ* je vůči kmeni s genem *IST2* depolarizován a po hladovění na draslík hyperpolarizuje rychleji. Nepodařilo se však zatím získat platné výsledky v dalších dvojicích kmenů.

## 5.7. Vnitrobuněčný obsah sodíku

Abychom rozhodli, zda je zlepšený růst buněk s delecí *ist2Δ* v prostředí s vysokou koncentrací NaCl způsoben nižším vnitrobuněčným obsahem toxického sodného kationtu, rozhodli jsme se změřit jeho obsah v kmenech s *IST2* a *ist2Δ*. Měření jsme provedli ve všech čtyřech dvojicích kmenů.

Měření probíhala tak, jak je popsáno v podkapitole 4.3.6. Buňky byly napěstovány do požadované OD v médiu YNB-F + 100 mM KCl a pak přeneseny do média YNB-F + 50 mM KCl + 200 mM NaCl. Po 2 hodinách inkubace byly odebrány vzorky buněk a změřen obsah sodíku. Tento pokus byl zopakován 2-krát nebo 3-krát pro každou dvojici kmenů s *IST2* a *ist2Δ*. Uvedené výsledky (tabulka 4) jsou průměrem získaných hodnot přepočtených na molární množství na suchou váhu buněk. Základní informace z jednotlivých měření, tedy, ve kterém kmeni z dvojice *IST2/ist2Δ* je obsah sodíku vyšší, zůstávala pro každou dvojici ve všech nezávislých pokusech stejná.

Pro všechny tři kmeny BYT45, BYT12 a BYT12345 platilo, že delece *ist2Δ* má za následek nižší vnitrobuněčný obsah sodíku ve verzi s delecí *ist2Δ*. V rodičovském kmeni BY4741 byl naopak nečekaně při všech měřeních obsah sodíku naměřen nižší než v jeho *ist2Δ* verzi BYMI. Vzhledem k podezření, že koncentrace NaCl 200 mM může být pro

rodičovský kmen příliš nízká, byl stejný pokus proveden také po inkubaci buněk v médiu YNB-F + 50 mM KCl + 500 mM NaCl. Výsledky však byly analogické předchozím, kromě toho, že vzhledem k vyšší použité koncentraci byl obsah sodíku ve všech kmenech vyšší než při předchozích pokusech. Zatímco v kmenech BYT45, BYT12 a BYT12345 měly buňky s delecí *ist2Δ* sodíku méně, v kmeni BY4741 byl výsledek i tady opačný.

**Tabulka 4.** Obsah kationtů sodíku v buňkách po 2 hodinách inkubace v médiu YNB-F + 50 mM KCl + 200 mM NaCl.

Kmen	Na <sup>+</sup> (nmol/mg suché váhy)
BY4741	12,21 ± 3,84
BYMI ( <i>ist2Δ</i> )	20,09 ± 8,78
BYT45	130,97 ± 20,00
BYT45MI ( <i>ist2Δ</i> )	89,89 ± 22,76
BYT12	113,52 ± 14,70
BYT12MI ( <i>ist2Δ</i> )	108,59 ± 15,99
BYT12345	198,08 ± 20,94
BYT12345MI ( <i>ist2Δ</i> )	157,27 ± 4,47



Výsledky těchto měření tedy potvrdily snížení obsahu sodných iontů po inkubaci v médiu s NaCl ve kmenech BYT45, BYT12 a BYT12345 s delecí *ist2Δ*, ovšem ne v kmeni BY4741. To je překvapivé, protože v tomto kmeni jsme pozorovali lepší růst buněk s delecí *ist2Δ* jak na agarových miskách s NaCl (kapkové testy), tak v tekutém médiu s NaCl (růstové křivky).

## 5.8. Homology *IST2* v dalších kvasinkách

Jedním z podcílů této diplomové práce bylo vyhledání homologů *IST2* *Saccharomyces cerevisiae* (dále jen *ScIST2*) v dalších kvasinkových druzích. Je známo, že *ScIST2* má své příbuzné v buňkách vyšších živočichů (podkapitola 1.4), nebylo však jasné, jestli existuje také v buňkách ostatních kvasinkových druhů. Pro vyhledání homologů jsme použili volně přístupné databáze na serverech SGD (Cherry *et al.*, 1997), Génolevures (Sherman *et al.*, 2006) a program BLAST na serveru NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Sekvence byly porovnány na úrovni proteinu.

Nejprve jsme pomocí programu BLAST (za použití algoritmu BLOSUM62; Henikoff and Henikoff, 1992) vyhledali všechny proteiny v říši *Eukaryota* s vysokým stupněm identity a podobnou délkou jakou má protein Ist2, kterých bylo asi 100. Ukázalo se, že naprostá většina takových proteinů je kódována genomy dalších kvasinek. Dalším krokem tedy bylo prohledání databáze Génolevures, která shromažďuje genomové sekvence kvasinkových druhů (Sherman *et al.*, 2006). V tabulce 5 na následující straně jsou abecedně shrnuty kvasinkové druhy, v nichž jsou podle této databáze přítomny sekvence podobné *ScIST2*. *Ashbya (Eremothecium) gossypii* nese gen, který je v databázi Génolevures jako jediný klasifikován jako pravý homolog *ScIST2*. Vesměs jde jinak o zatím nepojmenované či jen predikované proteiny, nebo proteiny nesoucí název jako „hypothetical protein, similar to Ist2“. Další známé kvasinkové druhy, které databáze Génolevures neřadí do skupiny se sekvencí podobnou *ScIST2*, ale v nichž byly takové sekvence pomocí programu BLAST jednoznačně nalezeny, jsou v tabulce uvedeny také. Je vidět, že jde hlavně o rody *Candida* a *Kluyveromyces*, jejichž genomy kódují proteiny sekvencí a délkou podobné *ScIst2*. Genomy dalších známých kvasinek, např. *Yarrowia lipolytica* nebo *Zygosaccharomyces rouxii*, kódují protein o vysoké identitě s Ist2 také, ale tyto homology mají mnohem delší sekvenci. V genomech všech kvasinkových druhů jsme našli pouze jeden gen vysoce podobný *ScIST2*, pouze v kvasince *Pichia sorbitophila* byly nalezeny sekvence dvě.

**Tabulka 5.** Homology genu *ScfST2* v dalších kvasinkových druzích s porovnáním identit a délek jejich proteinů. Na konci tabulky jsou uvedeny savčí homology rodiny Anoctamin.

Organismus	Název proteinu	Délka proteinu (AA)	Identita	Klasifikace genu podle Genolevures
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScfST2p	946	100 %	/
<i>Asbyva gossypii</i>	AGOS_ADL300W	926	30 %	homolog <i>ScfST2</i>
<i>Candida albicans</i>	hypothetical protein CaO19.2792	952	30 %	/
<i>Candida dubliniensis</i>	increased sodium tolerance protein, putative	955	25 %	/
<i>Candida glabrata</i>	hypothetical protein	929	34 %	/
<i>Candida parapsilosis</i>	Ist2p	981	31 %	/
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DEHA2F25740p	990	34 %	/
<i>Kluyveromyces lactis</i>	KLLA0B12287p	857	33 %	podobný <i>ScfST2</i>
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	KLTH0E14630p	890	30 %	podobný <i>ScfST2</i>
<i>Pichia sorbitophila</i>	PISO0N106590g a PISO0N106723g	855	31 %	podobný <i>ScfST2</i>
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	SAKL0B06908g	935	32 %	podobný <i>ScfST2</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	membrane transporter, predicted	668	16 %	/
<i>Xarromia lipolytica</i>	YALI0C21538p	2465	28 %	/
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ZYR00G13222g	1876	24 %	podobný <i>ScfST2</i>
<i>Homo sapiens</i>	Anoctamin-1, Anoctamin-2, ..., Anoctamin-10	660 - 1008	21 – 24 %	/

Překvapivě naopak v hojně studované kvasince s kompletně sekvenovaným genomem *Schizosaccharomyces pombe* byla nalezena pouze podstatně kratší sekvence (668 aminokyselin) s identitou pouze asi 16 %, což nelze považovat za homologii. Kromě druhů uvedených v tabulce 4 byla nalezena řada dalších druhů méně známých kvasinek, například *Naumovozyma castellii* nebo patogenní *Cryptococcus neoformans*, s podobnými otevřenými čtecími rámci. Na konci tabulky je rovněž pro srovnání zařazena rodina savčích proteinů TMEM16 (podkapitola 1.4).

Shrneme-li výsledky této části práce, zjistili jsme, že v databázích je přímo anotován homolog genu *ScIST2* pouze v kvasinkovitém organismu *Ashbya (Eremothecium) gossypii*, nicméně jen díky anotaci na základě homologie, experimentálně ověřeno to nebylo. I v ostatních druzích kvasinek jsme našli geny, jejichž produkty s vysokou pravděpodobností kódují orthology *Ist2*. Lze tedy předpokládat, že v různých druzích kvasinek by tento protein mohl mít také obdobnou funkci.

## 6. Diskuze

---

Hlavním cílem této diplomové práce bylo přinést nové poznatky o významu genu *IST2* v buňkách kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Ist2 byl zatím studován zejména jako protein, který pro transport na své místo v buňce nevyužívá klasickou sekreční dráhu (Juschke *et al.*, 2004; Juschke *et al.*, 2005; Maas *et al.*, 2009). Jeho delece lehce zvyšuje životaschopnost buněk *S. cerevisiae* v prostředí s NaCl (Entian *et al.*, 1999), ale čím je tento jev způsoben, nebylo dosud známo. Tato práce se tedy zaměřila na získání nových znalostí, které by mohly vést k odhalení úlohy Ist2 v homeostázi kationtů alkalických kovů. Analýzou v databázích dostupných sekvencí genomů různých kvasinkových druhů jsme prokázali, že homologní kódující sekvence existují v genomech pravděpodobně všech kvasinkových druhů, i když v případě *S. pombe* je stupeň příbuznosti pouze velmi nízký. Žádný z identifikovaných potenciálních homologů však zatím nebyl studován.

Fenotyp buněk *S. cerevisiae* s delecí *ist2Δ*, které mají mírně zlepšený růst při stresu z vysoké koncentrace NaCl v okolí, byl poprvé pozorován v kmeni CEN.PK (Entian *et al.*, 1999). Většinu pokusů v této práci jsme však provedli v buňkách laboratorního kmene BY4741, jehož genomová sekvence je dostupná a který je základem mnoha referenčních knihoven (Brachmann *et al.*, 1998; <http://www.translucent-network.org/>). V původním kmeni CEN.PK *ist2Δ*, který jsme zakoupili ze sbírky EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>), byl gen *IST2* nahrazen markerovým genem *URA3*. Deleční kazeta nebyla z těchto buněk odstraněna. Protože je známo, že kmeny lišící se přítomností genu *URA3* se liší v základních fyziologických parametrech (Marešová and Sychrová, 2005), rozhodli jsme se připravit vlastní deleční kmeny, které žádné markerové geny neponesou. Vzhledem k tomu, že navzdory velkému počtu pokusů se nepodařilo v kmeni CEN.PK delecí genu *IST2* úspěšně provést, zaměřili jsme se na totéž v kmeni BY4741 a několika od něj odvozených kmenech s různými kombinacemi delecí genů pro transportéry kationtů alkalických kovů plazmatické membrány. Gen *IST2* jsme úspěšně deletovali a deleční kazetu poté odstranili v kmeni BY4741 a třech od něj odvozených kmenech - BYT45 (*ena1-5Δ nha1Δ*), BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) a BYT12345 (*trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ*). Výsledné kmeny s delecí *ist2Δ* jsme porovnali s původními kmeny v sérii pokusů.

Prvním podcílem, který měla tato práce, bylo potvrzení fenotypu, podle něhož je *IST2* pojmenován – Increased Sodium Tolerance (Entian *et al.*, 1999) – tedy zlepšení růstu buněk postrádajících *IST2* v podmínkách stresu z NaCl. Vzhledem k tomu, že sami autoři tento fenotyp charakterizovali jako „mírné zlepšení“ (Entian *et al.*, 1999) a že autoři další publikace jej nepozorovali vůbec (Kim *et al.*, 2005), byl už toto dost zajímavý úkol. Většina fenotypů, které jsme viděli na kapkových testech, byla skutečně sotva patrná a jen díky mnoha opakováním a mnoha jemným úpravám podmínek si nyní můžeme být jisti výsledky, které tato práce předkládá. Mírné zlepšení růstu kmene BY4741 s delecí *ist2Δ* ve srovnání s rodičovským kmenem BY4741 bylo potvrzeno. Pro ověření toho, že pozorované rozdíly jsou způsobené absencí genu *IST2*, jsme tento gen klonovali do vektoru a ověřili, že buňky transformované tímto plazmidem ztratily zvýšenou toleranci k NaCl. Podobný fenotyp, nalezený při růstu buněk s LiCl, je úplně novým výsledkem. Ve shodě s literaturou jsme nepozorovali žádné rozdíly v růstu na médiích s vysokými koncentracemi KCl (Entian *et al.*, 1999).

Asi nejdůležitějším poznatkem této práce jsou výsledky ukazující, že fenotyp buněk s delecí *ist2Δ* je závislý na tom, které transportní systémy pro kationty alkalických kovů jsou v daném kmeni přítomny a které ne. Zatímco v kmenech BY4741 a BYT12 je růst po delecí genu *IST2* v médiu s NaCl zlepšený, v kmeni BYT45 jsme toto chování nikdy nepozorovali ani na miskách s kapkovými testy, ani při měření růstových křivek. Jelikož kmen BYT45 narozdíl od druhých dvou postrádá geny pro exportéry kationtů alkalických kovů *Ena1-5* a *Nha1*, mohla by důvodem být genetická interakce *IST2* s jedním nebo oběma geny pro tyto exportéry.

Dalším zcela novým poznatkem, který přinesl náš výzkum, je vliv přítomnosti *IST2* na hospodaření s kriticky malým množstvím draselného kationtu v médiu. To je jev pozorovaný v kmenech BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) a BYT12345 (*trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ*), které nesou delece genů *TRK1* a *TRK2* kódujících vysokoafinitní importéry draslíku. Kmen BYT12, který postrádá pouze tyto dva geny, roste při nedostatku draslíku ve formě *ist2Δ* opět mírně lépe. Naopak, v kmeni BYT12345, který kromě absence *Trk1* a *Trk2* nemá ani exportní systémy *Tok1*, *Ena1-5* a *Nha1*, je růst formy *ist2Δ* při hladovění na draslík zhoršený. Lepší růst kmene BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) s delecí *ist2Δ* tedy naznačuje lepší schopnost těchto buněk udržet uvnitř buňky více kationtů draslíku, zatímco rodičovský kmen jich exportuje více. Je známo, že BYT12 je vzhledem k BY4741 hyperpolarizovaný (Marešová *et al.*, 2006; Navarette *et al.*, 2010), což je způsobeno sníženou schopností importu iontů  $K^+$ . Tato

hyperpolarizace má pravděpodobně dále za následek nižší aktivitu ATPázy Pma1 a tím mírně snížené vnitrobuněčné pH vzhledem k buňkám BY4741 (Navarette *et al.*, 2010; výsledky v této práci). V kmeni BYT12345 (*trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ*), kterému chybí jak importní, tak exportní systémy pro draslík a další kationty alkalických kovů, a roste tedy v prostředí s limitní koncentrací draslíku o trochu lépe než BYT12 (Navarette *et al.*, 2010), protože vnitrobuněčný draslík se neztrácí, ovlivňuje delece *ist2Δ* růst buněk s opačným výsledkem. Hypoteticky by tedy změněný růst kmenů BYT12 a BYT12345 po deleci *ist2Δ* v prostředí s nedostatkem draslíku mohl souviset nejen s absencí exportérů kationtů, ale také se změnami vnitrobuněčného pH a membránového potenciálu. Proto jsme dále hledali tyto souvislosti.

Provedli jsme měření velikosti membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy s kladným nábojem a proměnlivým emisním maximem, díky kterému lze porovnat její vstup do buněk s různou hodnotou záporného náboje na vnitřní straně plazmatické membrány, a to dvěma různými metodami (podle Marešová *et al.*, 2006 a podle Gášková *et al.*, 1998). V našich pokusech jsme ovšem buď pozorovali jen velmi malé rozdíly, nebo nezískali dostatečně reprodukovatelné výsledky. Potiže s touto metodou mohly být podle mého názoru i důsledkem toho, že membránový potenciál buněk s a bez *IST2* se liší skutečně nepatrně, pokud vůbec, a metoda není pro odhalení takto malých rozdílů dostatečně citlivá, nebo toho, že manipulace s buňkami při přípravě nebyla dostatečně šetrná, aby byl zajištěn průběh všech měření za naprosto stejných podmínek.

Měření vnitrobuněčného pH buněk rostoucích za standardních podmínek neukázalo žádné rozdíly mezi kmeny s *IST2* a s jeho delecí. Při hladovění buněk na draslík byl pozorován menší pokles pH v kmeni BYT12MI v porovnání s BYT12. To by mohlo souviset s lepší schopností akumulovat za těchto podmínek nedostatkový draselný kationt, jak bylo pozorováno na kapkových testech.

Měření obsahu sodných kationtů v buňkách mělo potvrdit, či vyvrátit, že zlepšení růstu kmenů s delecí *ist2Δ* je skutečně způsobeno nižším obsahem toxického sodíku v těchto buňkách po inkubaci v médiích s NaCl. V několika nezávislých měřeních a za použití dvou různých koncentrací NaCl byl obsah sodíku v delečních verzích *ist2Δ* skutečně vždy nižší než v rodičovských buňkách. Jedinou výjimkou byl kmen BY4741, kde buňky BYMI s delecí *ist2Δ* měly sodných kationtů vždy více.

Nové poznatky, které tato práce přinesla, zejména o vlivu *Ist2* na homeostázi kationtů  $K^+$ , vyvolaly řadu dalších otázek, jimž bude pozornost věnována v budoucnu.

## 7. Závěr

---

Cílem této diplomové práce bylo pokusit se na základě různých kritérií vysvětlit význam genu *IST2* v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* a objasnit princip fungování jím kódovaného proteinu.

Za účelem analýzy tohoto problému byly připraveny 4 nové kmeny s delecí *ist2Δ*, a to v kmeni BY4741 a od něj odvozených kmenech BYT45 (*ena1-5Δ nha1Δ*), BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) a BYT12345 (*trk1Δ trk2Δ tok1Δ ena1-5Δ nha1Δ*). Dále byl zkonstruován nový plazmid nesoucí sekvenci *IST2* pro studium komplementace fenotypu.

Díky provedeným pokusům s novými kmeny byly potvrzeny výsledky pilotní publikace o fenotypu delece *ist2Δ*, tedy zlepšení růstu kmenů s touto delecí v prostředí s vysokou koncentrací NaCl v porovnání s rodičovskými kmeny, zatímco, rovněž ve shodě s autory, vliv vysoké koncentrace KCl na růst těchto kmenů prokázán nebyl. Zcela nově byl dále zjištěn fenotyp delece v přítomnosti lithných kationtů v médiu, kde obdobně jako v přítomnosti kationtů sodných kmeny s delecí *ist2Δ* vykazovaly zvýšenou toleranci. Vnesením plazmidu se sekvencí *IST2* do těchto buněk byla potvrzena komplementace fenotypu. Fenotyp delece *ist2Δ* se dále ukázal být závislý na tom, které geny pro transportéry kationtů alkalických kovů jsou v daných buňkách přítomny. V buňkách s absencí importních systémů pro draslík přítomnost *IST2* navíc ovlivňuje schopnost těchto buněk získávat draselné kationty z média.

Ve třech mutantních kmenech s delecí *ist2Δ* a delecemi genů pro transport kationtů alkalických kovů byl opakovaně zjištěn nižší obsah sodných kationtů než v rodičovském kmeni. Tento výsledek naznačuje úlohu Ist2 v homeostázi či detoxifikaci sodných a lithných kationtů. Na druhou stranu se neprokázalo, že by delece genu *IST2* výrazněji ovlivňovala vnitrobuněčné pH či membránový potenciál, což jsou parametry, které s homeostází kationtů alkalických kovů úzce souvisí.

Navzdory velkému množství provedených pokusů a mnoha nově získaným poznatkům nebyl v této práci dosud objasněn mechanismus, jakým se protein Ist2 v kvasinkové buňce přesně uplatňuje. Nicméně připravené kmeny s delecí *ist2Δ* a plazmid se sekvencí *IST2* budou využity pro další experimentální práci k objasnění úlohy Ist2.

# Seznam použité literatury

---

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998):  
Základy buněčné biologie. Espero Publishing s.r.o., Ústí nad Labem.
- Alepuz, P. M., Cunningham K. W., Estruch, F. (1997): Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* **26**(1): 91-8.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Alvarez, M., Burn, T., Luo, Y., Pirofski, L. A., Casadevall, A. (2009): The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. *BMC Microbiol* **9**:51.
- Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H. (2010): Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**(1): 95-120.
- Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte J., Niwa, M. (2010): A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* **142**(2): 256-69.
- Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L., Potier, S. (1998): The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**(Pt 10): 2749-58.
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P. O. (2003): Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47**(3):767-80.



- Bialkowska, A. and Kurlandzka, A. (2002): Additional copies of the *NOG2* and *IST2* genes suppress the deficiency of cohesin Irr1p/Scc3p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* **49**(2): 421-5.
- Bihler, H., Slayman, C. L., Bertl, A. (2002): Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**(2):109-18.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D. (1998): Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115-132.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., Blumwald, E. (2007): Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**(33): 24284-93.
- Cagnac, O., Aranda-Sicilia, M. N., Leterrier, M., Rodriguez-Rosales M. P., Venema, K. (2010): Vacuolar cation/H<sup>+</sup> antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**(44): 33914-22.
- Casolari, J. M., Thompson, M. A., Salzman, J., Champion, L. M., Moerner, W. E., Brown, P. O. (2012): Widespread mRNA association with cytoskeletal motor proteins and identification and dynamics of myosin-associated mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **7**(2): e31912.
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., Wong, E. D. (2012): *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* **40**: D700-5.

- Davey, H. M., Cross, E. J., Davey, C. L., Gkargkas, K., Delneri, D., Hoyle, D. C., Oliver, S. G., Kell, D. B., Griffith, G. W. (2012): Genome-wide analysis of longevity in nutrient-deprived *Saccharomyces cerevisiae* reveals importance of recycling in maintaining cell viability. *Environ Microbiol* **14**(5): 1249-1260.
- van Dijken, J. P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J. M., Gancedo, C., Giuseppin, M. L., Heijnen, J. J., Hoare, M., Lange, H. C., Madden, E. A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J. L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H. Y., Verrips, C. T., Vindelov, J., Pronk, J. T. (2000): An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb Technol* **26**(9-10): 706-714.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A. O., Cui, Y., Hartzell, H. C. (2012): ANOs 3-7 in the anoctamin/TMEM16 Cl<sup>-</sup> channel family are intracellular proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(3): C482-93.
- Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani, R. M., Rohmer, A., Romer A, Hinnen, A, *et al.* (1999): Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 683-702.
- Eraso, P. and C. Gancedo (1987): Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett* **224**(1): 187-92.
- Ercan, E., Momburg, F., Engel, U., Temmerman, K., Nickel, W., Seedorf, M. (2009): A conserved, lipid-mediated sorting mechanism of yeast Ist2 and mammalian STIM proteins to the peripheral ER. *Traffic* **10**(12): 1802-1818.

- Fischer, M. A., Temmerman, K., Ercan, E., Nickel, W., Seedorf, M. (2009): Binding of plasma membrane lipids recruits the yeast integral membrane protein Ist2 to the cortical ER. *Traffic* **10**(8): 1084-1097.
- Franz, A., Maass, K., Seedorf, M. (2007): A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Lett* **581**(3): 401-405.
- Galindo, B. E. and V. D. Vacquier (2005): Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *Int J Mol Med* **16**(5): 919-24.
- Gaskova, D., Brodska, B., Herman, P., Vecer, J., Malínský, J., Sigler, K., Benada, O., Plasek, J. (1998): Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(13): 1189-97.
- Gel, F. (1968): Přemožitel neviditelných dravců. Státní pedagogické nakladatelství a nakladatelství Svoboda.
- Goffeau *et al.*, 1996. Citováno podle Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani, R. M., Rohmer, A., Romer A, Hinnen, A, *et al.* (1999): Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 683-702.
- Gonsalvez, G. B., Lehmann, K. A., Ho, D. K., Stanitsa, E. S., Williamson, J. R., Long, R. M. (2003): RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the *ASH1* mRNA ribonucleoprotein complex. *RNA* **9**(11): 1383-1399.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., Hegemann, J. H. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**(13): 2519-24.

- Guldener, U., Heinisch, J., Koehler G. J., Voss, D., Hegemann, J. H. (2002): A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **30**(6): e23.
- Haro, R., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A. (1991): A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**(2):189-91.
- Hartzell, H. C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L. T., Qu, Z. (2009): Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J Physiol* **587**(Pt 10): 2127-39.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992): Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10915–10919.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., Tzagoloff, A. (1986): Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hoffmann, C. S., Winston, F. (1987): A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**(2-3): 267-72.
- Hohmann, S. (2002): Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2): 300-72.
- Huang *et al.* (2009). Citováno podle Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A. O., Cui, Y., Hartzell, H. C. (2012): ANOs 3-7 in the anoctamin/TMEM16 Cl<sup>-</sup> channel family are intracellular proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(3): C482-93.
- Janderová, B., Bendová, O. (1999): Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha.
- Juschke, C., Ferring, D., Jansen, R. P., Seedorf, M. (2004): A novel transport pathway for a yeast plasma membrane protein encoded by a localized mRNA. *Curr Biol* **14**(5): 406-11.

- Juschke, C., Wachter, A., Schwappach, B., Seedorf, M. (2005): *SEC18/NSF*-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J Cell Biol* **169**(4): 613-22.
- Ketchum, K. A. *et al.* (1995). Citováno podle Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P. O. (2003): Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47**(3):767-80.
- Kim, Y., Chattopadhyay, S., Locke, S., Pearce, D. A. (2005): Interaction among Btn1p, Btn2p, and Ist2p reveals potential interplay among the vacuole, amino acid levels, and ion homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**(2):281-8
- Kinclova, O., Potier, S., Sychrova, H. (2001): The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol* **88**(2): 151-8.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**(3): 567-580.
- Lavieu, G., Orci, L., Shi, L., Geiling, M., Ravazzola, M., Wieland, F., Cosson, P., Rothman, J. E. (2010): Induction of cortical endoplasmic reticulum by dimerization of a coatomer-binding peptide anchored to endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(15): 6876-81.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000): Molecular cell biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Long *et al.* (1997). Citováno podle Shepard, K. A., Gerber, A. P., Jambhekar, A., Takizawa, P. A., Brown, P. O., Herschlag, D., DeRisi, J. L., Vale, R. D. (2003): Widespread

- cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11429-11434.
- Maass, K., Fischer, M. A., Seiler, M., Temmerman, K., Nickel, W., Seedorf, M. (2009): A signal comprising a basic cluster and an amphipathic alpha-helix interacts with lipids and is required for the transport of Ist2 to the yeast cortical ER. *J Cell Sci* **122**(Pt 5): 625-635.
- Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R., Sychrova, H. (2006): New applications of pHluorin - measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**(6): 317-25.
- Maresova, L., Muend, S., Zhang, Y. Q., Sychrova, H., Rao, R. (2009): Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J Biol Chem* **284**: 2795-2802.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2005): Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**(2): 588-600.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2007): Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* **43**(5): 667-72.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2010): Genetic interactions among the Arl1 GTPase and intracellular Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporters in pH homeostasis and cation detoxification. *FEMS Yeast Res* **10**(7): 802-11.
- Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D, Sychrova, H. (2006): Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**(7): 1039-1046.

- Meilhoc, E., Masson, J. M., Teissie, J. (1990): High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (N Y)* **8**: 223-227.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E. (1998): Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**(6689): 192-5.
- Mortimer *et al.* (1989). Citováno podle Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani, R. M., Rohmer, A., Romer A, Hinnen, A, *et al.* (1999): Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 683-702.
- Navarrete, C., Petrezselyova, S., Barreto, L., Martinez, J. L., Zahradka, J., Arino, J., Sychrova, H., Ramos, J. (2010): Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**(5): 508-517.
- Pena, A., Uribe, S., Pardo, J. P., Borbolla, M. (1984): The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch Biochem Biophys* **231**(1): 217-25.
- Persson, B. L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez, P., Pattison, J., Petersson, J., Weinander, R. (1998): Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2): 23-30.
- Petrezselyova, S., Zahradka, J., Sychrova, H. (2010): *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* **114**: 144-150.
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., Perktold, A., Daum, G. (2001): A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* **268**(8): 2351-61.

- Ramos, J., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A. (1990): Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1029**: 211-217.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000): *Potassium transport in fungi and plants*. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1-30.
- Serrano, R. (1983): In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **156**(1): 11-4.
- Shepard, K. A., Gerber, A. P., Jambhekar, A., Takizawa, P. A., Brown, P. O., Herschlag, D., DeRisi, J. L., Vale, R. D. (2003): Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11429-11434.
- Sherman, D., Durrens, P., Iragne, F., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J. L. (2006): Genolevures complete genomes provide data and tools for comparative genomics of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res* **34** :D432-5.
- Sychrova, H. and Kotyk, A. (1985): Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **183**(1): 21-4.
- Szopinska, A., Degand, H. Hochstenbach, J. F., Nader, J., Morsomme, P. (2011): Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress. *Mol Cell Proteomics* **10**(11): Manuscript M111.009589.
- Takizawa, P. A., DeRisi, J. L., Wilhelm, J. E., Vale, R. D. (2000): Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* **290**(5490): 341-4.
- Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., Vale, R. D. (1997): Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**(6646): 90-93.



Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509–44.

Voeltz, G. K., Rolls, M. M., Rapoport, T. A. (2002): Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **3**(10): 944-50.

Wieland, J., Nitsche, A. M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H. K. (1995): The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**(16):3870-82.

Zahrádka, J. and Sychrová, H. (2012): Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **12**(4):439-46.

Internetové databáze:

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

<http://www.genolevures.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.translucent-network.org/>

<http://www.yeastgenome.org/>