

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

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NGEMOVI

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Vítězslav Plocek

Lokalizace vybraných proteinů v průběhu vývoje kvasinkové kolonie

**Localisation of selected proteins during yeast colony
development**

Praha 2011

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 8. 2011

Podpis:

Poděkování:

Tato práce vznikla pod vedením prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěl poděkovat za odbornou pomoc a podnětné připomínky při konzultaci a interpretaci výsledků, ale také za trpělivost a vstřícnost po celou dobu mé práce.

Dále bych rád poděkoval celému kolektivu laboratoře S15 za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zvláště bych rád poděkoval Michalu Čápovi, Ludku Štěpánkovi za pomoc při zvládnutí metodik použitých v této práci.

Nakonec bych rád poděkoval svým rodičům za podporu během mého studia.

Abstrakt

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které mohou vytvořit až pozoruhodně složité kolonie. Studium mnohobuněčných struktur kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že se buňky uvnitř kolonie chovají rozdílně (Kamath and Bungay, 1988; Mináriková et al., 2001; Scherz et al., 2001; Palková and Váchová, 2006; Váchová et al., 2009; Piccirillo et al., 2010; Váchová et al., 2011).

Pomocí microarray analýzy vyvíjející se kolonie byly popsány geny, jejichž exprese se zásadně mění během vývoje kolonie (Palková et al., 2002; Váchová et al., 2009). Z těchto genů jsem si vybral čtyři, *PDR5*, *STL1*, *PHO89* a *FET3*, u kterých jsem si myslel, že by mohly ovlivňovat růst a diferenciaci kolonie. Vytvořil jsem jejich fúzní varianty s GFP a pomocí technik řezů kolonií, diferenciaci kolonií v sacharózovém gradientu a měření na průtokovém cytometru jsem identifikoval místa v kolonii, kde dochází k expresi těchto proteinů. Zjistil jsem, že v kvasinkové kolonii dochází k diferenciaci a rozdílné expresi už v časných fázích vývoje.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, diferenciaci kolonie, pH, GFP, *PDR5*, *STL1*, *PHO89*, *FET3*.

Abstrakt (in English)

Yeasts is unicellular organisms which can create remarkably complex colonies. By studying multicellular structures of *Saccharomyces cerevisiae* yeast it was found that cells within the yeast colony behave differently. (Kamath and Bungay, 1988; Mináriková et al., 2001; Scherz et al., 2001; Palková and Váchová, 2006; Váchová et al., 2009; Piccirillo et al., 2010; Váchová et al., 2011).

Through microarray analysis of the developing yeast colony (Palková et al., 2002; Váchová et al., 2009) were described genes whose expression changes basically during the development of the colony. Of those genes, I chose four - *PDR5*, *STL1*, *PHO89*, *FET3* - that , as I thought, could affect the growth and differentiation of the yeast colony. I created their fusion variants with GFP and, using techniques of yeast colony cuts, yeast colony differentiation in sucrose gradient and measuring by flow cytometry I identified places in the colony, where the gene expression occurs. I found out that in the yeast colony differentiation and different expression take place in early phases of the development.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, colony differentiation, pH, GFP, *PDR5*, *STL1*, *PHO89*, *FET3*.

Obsah:

Seznam zkratek	10
1. Úvod	11
2. Přehled literatury	12
2.1. Co je to pH?	12
2.1.1. Teorie Kyselin a zásad	12
2.1.2. Disociace vody a pH	12
2.2. Vliv pH na buňku	13
2.3. Způsoby měření pH	14
2.3.1. pH citlivé sondy	15
2.3.2. GFP	16
2.4. Regulace pH v buňce	18
2.4.1. Buněčné ATPázy	18
2.4.1.1. <i>Plazmatická ATPáza (PMA)</i>	19
2.4.1.2. <i>Vakuolární ATPáza (VMA)</i>	20
2.4.1.3. <i>Mitochondriální ATPáza (F1FO syntáza)</i>	21
2.4.2. Transportéry	22
2.5. Diferenciace kvasinkové kolonie	24
3. Materiál a metody	26
3.1. Materiál	26
3.1.1. Použité mikroorganismy	26
3.1.2. Použité plazmidy	26
3.1.3. Přístroje	28
3.1.4. Použité internetové databáze a počítačové programy	28
3.1.5. Roztoky a média	29
3.1.5.1. <i>Roztoky</i>	29
3.1.5.2. <i>Média</i>	31
3.1.5.3. <i>Ostatní</i>	34
3.2. Metody	34
3.2.1. Sterilizace	34
3.2.2. Kultivace mikroorganismů	35

3.2.3.	Uchovávání kmenů	35
3.2.4.	Počítání buněk stanovením optické denzity	35
3.2.5.	Maxipreparace plazmidů z bakterií (alkalická)	35
3.2.6.	Minipreparace plazmidů z bakterií – boiling metoda	36
3.2.7.	Kompetentní bakteriální buňky	36
3.2.8.	Transformace bakterií elektroporací	37
3.2.9.	Navržení primerů pro GFP transformaci	37
3.2.10.	Navržení primerů pro ověření úspěšnosti transformace	38
3.2.11.	PCR	39
3.2.12.	PCR na koloniích	40
3.2.13.	Elektroforéza DNA	40
3.2.14.	Transformace kvasinek	40
3.2.15.	Nakapání obřích kolonií	42
3.2.16.	Izolace chromozomální DNA kvasinek zymolýzou	43
3.2.17.	Mikroskopie fúzních proteinů GFP	43
3.2.18.	Mikroskopie s agarózovým plátkem	44
3.2.19.	Frakcionace buněk v sacharózovém gradientu	44
3.2.20.	Příprava vzorků pro průtokový cytometr	45
3.2.21.	Řezy kvasinkových kolonií	45
4.	Výsledky	46
4.1.	Fluorescenční značení vybraných proteinů	46
4.1.1.	Plazmidy pro fluorescenční značení vybraných proteinů	46
4.1.2.	Příprava integračních kazet pomocí PCR	47
4.1.3.	Výběr transformantů	47
4.1.4.	Morfologie a vývoj kolonií připravených kmenů	50
4.1.5.	Rozdílná produkce Fet3c-GFP a Fet3i-GFP	51
4.1.6.	Vyhodnocení úspěšnosti transformace	52
4.2.	Lokalizace fúzních proteinů během vývoje kolonie	53
4.2.1.	Vertikální diferenciace kolonií	53
4.2.1.1.	<i>Buněčné subpopulace kolonií kmene BY4742</i>	55
4.2.1.2.	<i>Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Pdr5-GFP</i>	56
4.2.1.3.	<i>Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Stl1-GFP</i>	56

4.2.1.4.	<i>Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Pho89-GFP</i>	57
4.2.1.5.	<i>Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Fet3-GFPc</i>	57
4.2.2.	Frakcionace vyvíjející se kolonie Fet3p-GFP a Stl1p-GFP	99
4.2.2.1.	<i>Frakcionace buněk v sacharózovém gradientu</i>	101
4.2.2.2.	<i>Průtokový cytometr</i>	109
5.	Diskuse	113
5.1.	Vnitřní morfologie kolonie a její autofluorescence	113
5.2.	Rozdíly ve fúzních proteinech Fet3c-GFP a Fet3i-GFP	114
5.3.	Lokalizace vybraných proteinů značených GFP během vývoje kolonie	115
5.4.	Lokalizace fúzního proteinu Pdr5p-GFP během vývoje Kolonie	115
5.5.	Lokalizace fúzního proteinu Stl1p-GFP během vývoje Kolonie	116
5.6.	Lokalizace fúzního proteinu Pho89p-GFP během vývoje Kolonie	118
5.7.	Lokalizace fúzního proteinu Fet3p-GFP během vývoje Kolonie	120
5.8.	Metody analýzy diferenciací kolonií	121
6.	Závěr	123
7.	Seznam literatury	124
	Příloha: Sekvenční ověření vytvořených konstruktů	136

Seznam zkratk:

NAD/NADH	- Oxidovaný a redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
FAD/FADH ₂	- Oxidovaný a redukovaný flavin adenin dinukleotid
DNP	- Dynamická nukleární polarizace
NMR	- Nukleární magnetická resonance
FitC	- Fluorescein isothiokyanát
KDEL	- Aminokyselinová sekvence potřebná pro transport proteinu do endoplazmatického retikula
GFP	- Zelený fluorescenční protein
eGFP	- Varianta GFP se zesílenou fluorescencí
yeGFP	- Varianta GFP se zesílenou fluorescencí, optimalizovaný kodón pro <i>C. albicans</i>
wtGFP	- Přírodní zelený fluorescenční protein
BFP	- Modrý fluorescenční protein
YFP	- Žlutý fluorescenční protein
CFP	- Azurový fluorescenční protein
DsRed	- Červený fluorescenční protein
ATP	- Adenosine triphosphate
ADP	- Adenosine diphosphate
RAVE	- Proteinový komplex
DNA	- Deoxyribonukleová kyselina
RPM	- Otáčky za minutu
GMA	- Glycerolové pevné médium
YEPG	- Glukózové médium
OD	- Optické denzita
BKP	- Bromokresolový purpur
PCR	- Polymerázová řetězová reakce
ŽB	- Živný bujón - tekuté médium

1. Úvod

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které nicméně vytvářejí pozoruhodně složité kolonie, jejichž morfologie a fyziologie je ovlivňována přírodním prostředím. I kmeny *Saccharomyces cerevisiae* v laboratoři tvoří vysoce strukturované kolonie. Předchozí výsledky naší laboratoře ukázaly, že buňky lokalizované v různých částech kolonií se chovají různě. Jednotlivé části kolonie se od sebe liší jak morfologicky, tak i fyziologicky.

Pomocí microarray analýz transkriptomů buněk kolonií byly identifikovány geny podílející se na vývoji kolonie (Palková et al., 2002). Exprese těchto genů se mění během času a je odlišná i v různých částech kolonie (Váchová et al., 2009; Váchová et al., 2011). Jak ukazují poslední výsledky naší laboratoře, nejedná se pouze o vertikální, ale též o horizontální diferenciaci v prostoru kolonie, což znamená, že dochází k rozdílné genové expresi v různých vrstvách buněk kolonie. Na základě výsledků microarray analýz byly vytipovány geny, jejichž exprese se v průběhu vývoje kolonií mění a které by tedy mohly kódovat proteiny s důležitými funkcemi při vývoji kolonie.

Cílem mé práce bylo vytvořit GFP C-koncové fúzní varianty proteinů Stl1p, Pdr5p, Pho89p a N-koncovou fúzní variantu proteinu Fet3p. Na těchto fúzních variantách vybraných proteinů lze studovat jejich detailní časoprostorovou lokalizaci při vývoji kolonie. Právě k tomu slouží jejich značení proteinem GFP.

Kromě určení specifické lokalizace buněk produkujících vybrané proteiny v rámci kolonie bylo dalším cílem zjistit i jejich buněčnou lokalizaci (tj. např. jejich lokalizaci na membráně či ve vakuole) a tím i odhadnout, zda je daný protein v určitém místě kolonie funkční. Získané výsledky přispějí k pochopení vnitřní struktury a vývoje kolonií.

Navíc jsem měl v rámci tvorby literárního přehledu pro diplomovou práci zpracovat problematiku intracelulárního pH, způsoby jeho měření a regulace v buňce.

2. Přehled literatury

2.1. Co je to pH?

V chemii je pH měřítkem kyselosti nebo zásaditosti vodných roztoků.

2.1.1. Teorie Kyselin a zásad

Podle klasické Arrheniovy teorie elektrolytické disociace je kyselinou látka schopná odštěpovat proton H^+ , zatímco zásada je látka schopná odštěpit ion OH^- . Tato teorie je jednoduchá a názorná, ale dá se použít pouze na vodné roztoky kyselin a zásad.

Obecnější teorii kyselin a zásad vypracovali Brønsted a Lowry. Vycházejí z toho, že při všech acidobazických reakcích dochází k přenosu protonu. Podle této teorie jsou kyseliny částice schopné odštěpovat proton H^+ a zásady jsou částice schopné se s protonem spojovat. Brønstedova kyselina se stává po ztrátě protonu svou konjugovanou zásadou.

Rozšířením Brønstedovy-Lowryho teorie je Lewisova teorie. Tato teorie vychází z elektronové struktury látek a definuje zásadu jako látku mající volný elektronový pár, který může sdílet s jiným atomem za vzniku stabilnější elektronové konfigurace. Zásady jsou tedy donorem elektronového páru. Kyselina je naopak látka s volným orbitalem, a je tedy akceptorem elektronového páru (Vacík. 1986).

2.1.2. Disociace vody a pH

Voda je rozpouštědlo, které může protony přijímat i odevzdávat. Takovým rozpouštědlem říkáme amfiprotní. Voda může reagovat jako kyselina a tvořit hydroxidový ion OH^- , nebo jako zásada, a pak tvoří hydroxoniový ion H_3O^+ . Disociaci vody lze tedy vyjádřit rovnicí:



Příslušnou rovnováhu lze charakterizovat rovnovážnou konstantou:

$$K = [H_3O^+][OH^-]/[H_2O]$$

Jelikož se při disociaci vody v ionty přemění jen velmi málo molekul, lze aktivitu nedisociovaných molekul považovat za konstantní a předmětnou rovnováhu definovat konstantou K_v neboli iontovým součinem vody:

$$K_v = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$$

Daná konstanta závisí pouze na teplotě. Konkrétně, při teplotě 25 °C má hodnotu $1,02 \times 10^{-14}$ mol/l.

Čistá voda obsahuje stejné množství H_3O^+ a OH^- , proto pro ni platí:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = (K_v)^{1/2} = 10^{-7} \text{ mol/l}$$

Ze vztahu pro konstantu K_v vychází, že koncentrace $[\text{H}_3\text{O}^+]$ a $[\text{OH}^-]$ jsou nepřímo úměrné. Proto, známe-li koncentraci jednoho druhu iontů, můžeme vypočítat koncentraci druhého druhu iontů. V souvislosti s koncentrací hydroxoniových kationtů mluvíme o kyselosti roztoku. Pro takto zavedenou kyselost se používá měřítko pH. Hodnota pH je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů ve vodném roztoku:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

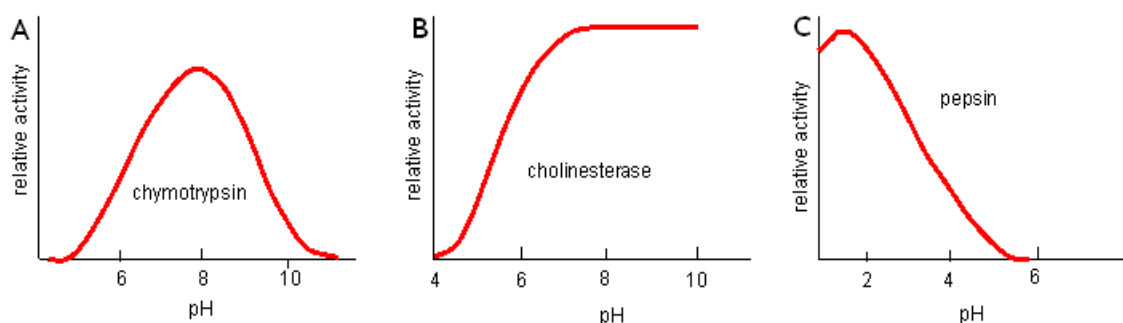
V čisté vodě je pH při 25 °C rovno 7. V kyselých roztocích je koncentrace H_3O^+ větší než 10^{-7} mol/l, a pH je tedy nižší než 7. V zásaditých roztocích je naopak koncentrace H_3O^+ nižší než 10^{-7} mol/l, a pH je tudíž vyšší než 7 (Vacík, 1986).

2.2. Vliv pH na buňku

Změna pH v buňce ovlivňuje mnoho, pro ni důležitých dějů, hlavně na úrovni molekul. Na pH závisí ionizační stavy kyselých nebo bazických bočních řetězců aminokyselin, což ovlivňuje strukturu, rozpustnost a tím i funkci proteinů. Hodnota pH je významným činitelem ovlivňujícím enzymovou aktivitu (Alberty, 2007) (Obrázek 1) a skládání proteinů (Written et al., 2001).

Změna pH přímo ovlivňuje redoxní potenciál buňky, konkrétně tak, že působí na rovnovážný stav NAD^+/NADH (Veine et al., 1998). Gradient pH je také potřebný pro transport přes membránu (Goffeau & Slayman, 1981; Wohlrab & Průtokovýers, 1982).

Dále má pH rovněž velký vliv na vezikulární transport v buňce (Nishimura et al., 1998; Ohsumi & Anraku, 1981, Mellman, 1992) a jeho specifická hodnota je nezbytná pro třídění proteinů a jejich modifikaci (Paroutis et al., 2004).



Obrázek 1: Vliv změny pH na aktivitu proteinů A) chymotrypsinu, B) cholinesterázy C) pepsinu (Henry Jakubowski, BIOCHEMISTRY Chapter 6; <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bcintro/default.html>).

2.3. Způsoby měření pH

V této podkapitole bych rád shrnul různé možnosti, jak měřit pH intracelulárně. Buňky *S. cerevisiae* jsou příliš malé na přímé měření jejich vnitrobuněčného pH pomocí mikroelektrod. Proto se v literatuře používá mnoho jiných metod pro toto měření.

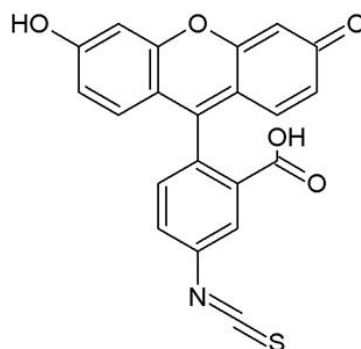
Z řady existujících metodik zmíním například spektroskopii nukleární magnetické resonance neboli NMR, což je metoda využívající interakce atomových jader s magnetickým polem. Při NMR se k měření pH využívají ionty fosforu ^{31}P (Gillies et al., 1981). Jiná metoda, dynamická nukleární polarizace neboli DNP, je založená též na magnetické resonanci, měří pH pomocí hyperpolarizovaného uhlíku ^{13}C (Gallagher et al., 2011). Dalšími metodami jsou distribuce radioaktivně značených slabých kyselin (Rottenberg, 1979), vypočítávání změn extracelulárního pH po přidání slabých kyselin (Kresnowati et al., 2007a,b) či elektroporace pyraninu do buňky a následné měření pH (Peña et al., 1995). V současnosti však tyto metody nepatří mezi nejčastější.

Nejrozšířenějšími metodami na měření intracelulárního pH je v této době využití pH sensitivních variant GFP nebo různé pH citlivé fluorescenční sondy.

2.3.1. pH citlivé sondy

V buňce můžeme hodnotu pH měřit pomocí pH citlivých sond. Na trhu jich je v současnosti velké množství od různých firem. Proto se nebudu do hloubky zabývat názvy jednotlivých sond, ale spíše principem, kterým se dostávají do buňky.

Jednou z nejčastěji používaných fluorescenčních pH citlivých sond jsou deriváty fluorescein isothiokyanátu neboli FitC (Obrázek 1Obrázek 2).



Obrázek 2: Schématický obrázek molekuly fluorescein isothiokyanátu (FitC) (<http://www.gbiosciences.com/HOOKDyeLabelingFITC-desc.aspx>)

Nejjednodušší a nejčastěji používanou metodou s využitím pH citlivých sond *in vivo* je měření pH v sekretorické dráze (Anderson and Pathak, 1985; Wu et al., 2001). Díky endocytóze se sonda dostane do sekretorické dráhy a takto může být takto měřeno pH v endoplazmatickém retikulu, Golgiho komplexu a sekretorických váčcích. Další možností je využití modifikovaného Shigova toxinu s připojenou KDEL sekvencí a pH-senzitivním fluoroforem. Takto upravený Shigův toxin se naváže na membránu, ze které se dostane do Golgiho komplexu a pomocí KDEL sekvence je pak transportován do endoplazmatického retikula (Kim et al., 1998, Demaurex, 2002).

Pro měření pH ve vakuolách se mohou používat fluorescenčních sondy, které procházejí membránou a zachytávají se v organelách s kyselým pH, kde jsou fixovány (Demaurex., 2002; Paroutis et al., 2004). Možností je také elektroporace sond do buňky, čímž můžeme měřit například cytosolické pH. Jako příklad může sloužit elektroporace pyraninu do buňky a následné měření pH (Peña et al, 1995).

Značení ostatních organel, například mitochondrií, pomocí pH senzitivních sond je velmi obtížné.

Sondy citlivé na okolní pH mají při využívání několik výhod, ale i nedostatků. Výhodou práce se sondami je jejich jednoduchost ve srovnání s pH citlivým GFP (viz dále), kdy nepotřebujeme provádět složité a dlouho trvající přípravy, abychom je mohli použít. Výhodou oproti GFP je také možnost měření nízkých hodnot pH, které se pomocí GFP nedají změřit (Oriji et al., 2008). Další výhodou je široké spektrum sond, mezi nimiž si můžeme vybrat tu nejvhodnější pro naše použití. Nevýhodou pH citlivých sond je jejich často malá specifita. U některých sond také vadí, že se jejich použitím mění fyziologický stav buněk (například elektroporace pyraninu).

2.3.2. GFP

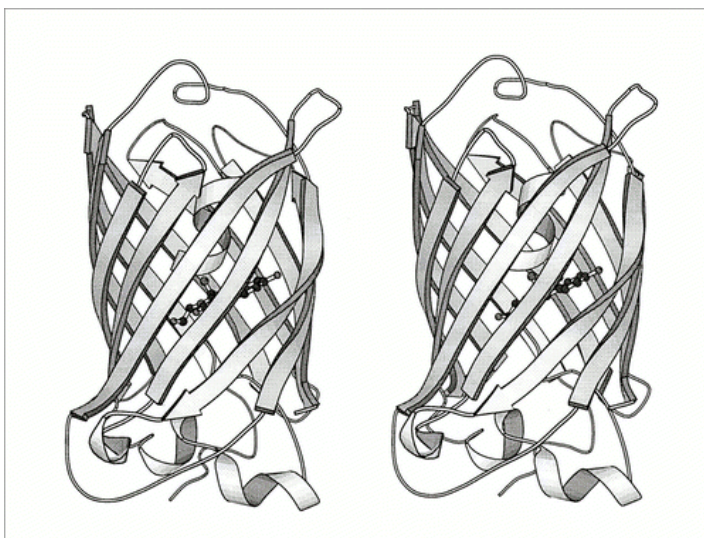
Zelený fluorescenční protein (GFP) byl objeven ve fotoorgánech medúzy *Aequorea victoria* v roce 1962 (Shimomura et al., 1962). K jeho využití v buněčné a molekulární biologii došlo až v devadesátých letech dvacátého století. V roce 1992 byla popsána jeho primární struktura (Prasher et al., 1992) a o dva roky později byla poprvé naklonována kopie jeho cDNA do bakterie *Escherichia coli* (Chalfie et al., 1994). Tento krok se stal zlomovým bodem pro jeho rozšíření ve vědě.

Přírodní GFP (wtGFP) je molekula skládající se z 238 aminokyselin. Terciární struktura specifická pro tento protein se nazývá β -can, česky také β -soudek či β -barel (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996a). Jedná se o strukturu tvořenou jedenácti β -vláknými tvořícími β -barel, s α -helixem procházejícím skrz barel (Obrázek 3). Chromofor je napojen na α -helix a je skryt téměř uprostřed barelu. Chromoforem wtGFP je p-hydroxybenzylidenimidazolinon, který je složen ze tří aminokyselinových zbytků, serinu (65), tyrosinu (66) a glycinu (67) (Shimomura et al., 1979; Cody et al., 1993).

Molekula wtGFP má dva absorpční vrcholy, vyšší ve vlnové délce 395 nm a nižší ve 475 nm. Při excitaci na délce 395 nm je emisní vrchol v 508 nm a při excitaci na 475 nm je emisní vrchol v 503 nm (Heim et al., 1994).

Jakmile se prokázala užitečnost wtGFP pro vědecký výzkum, vznikla snaha tuto molekulu vylepšit. Velmi důležitou mutací je S65T (serin za treonin), která podporuje ionizaci chromoforu, což zvyšuje intenzitu fluorescence a také způsobuje rychlejší sbalení proteinu (Heim et al., 1995), a mutace F64L (fenylalanin za leucin), vede k lepšímu sbalení proteinu při 37 °C (Cormack et al., 1996). Tyto dvě mutace jsou

základem pro jednu z nejpoužívanějších variant proteinu, a sice eGFP (Yang et al., 1996b).

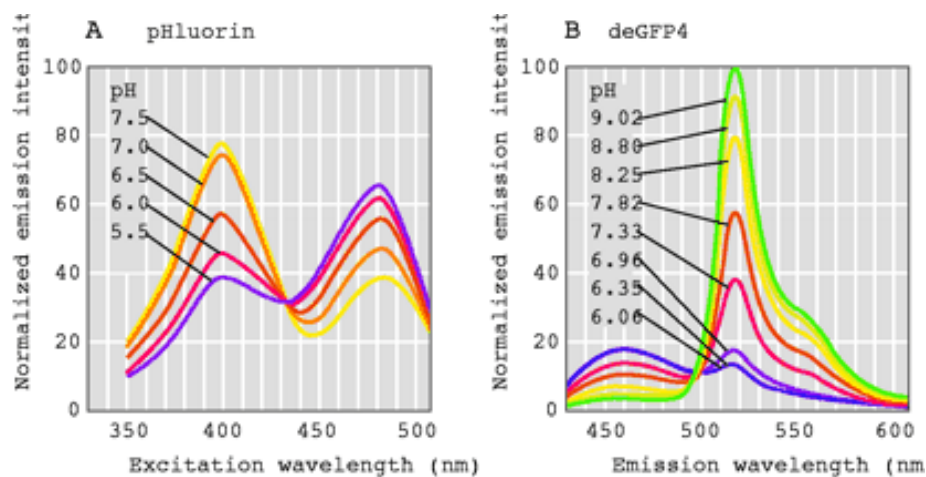


Obrázek 3: Třídímní struktura molekuly GFP, ukazující umístění 11 β -listů v prostoru do podoby β -barelu a vyznačenou polohu chromoforu uvnitř proteinu (Tsien 1998).

Dále bylo pomocí mutací v oblasti chromoforu a jeho okolí vytvořeno mnoho různých barevných variant proteinu. Z původního zeleného fluorescenčního proteinu tak vznikl například modrý BFP, žlutý YFP a azurový CFP (Tsien, 1998). Pro fluorescenci v červené oblasti spektra se ovšem nevyužívá GFP, ale varianty proteinu DsRed z korálu *Discosoma* (Matz et al., 1999).

Bylo také vyvinuto několik variant GFP upravených kvůli dosažení lepší exprese v různých organismech. Příkladem může být optimalizace GFP pro patogenní kvasinku druhu *Candida albicans* (Cormack et al., 1997), která se používá i v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*.

V experimentech se zjistilo, že wtGFP mění strukturu svého spektra v závislosti na okolním pH (Tsien, 1998), což se dá využít na měření hodnoty intracelulárního pH. Modifikacemi v okolí chromoforu byly vytvořeny varianty GFP, které tuto vlastnost proteinu využívají. Dvě základní varianty pH citlivého GFP byly pojmenovány pHluorin (Miesenböck et al., 1998) a deGFP (Hanson et al., 2002) (Obrázek 4Obrázek 3).



Obrázek 4: Rozdíly v emisních spektrech pro pH senzitivní varianty GFP při různých hodnotách pH; A) pHluorin; B deGFP (Paroutis et al., 2004).

Jak už jsem napsal v minulé kapitole, měření pH pomocí GFP má své limity a nedá se pomocí něho měřit nízké pH. Nevýhodou oproti pH citlivým sondám je taky větší náročnost přípravy GFP konstruktů. Ovšem velkou výhodou oproti měření pomocí pH citlivých sond je jeho specifita a to, že GFP měří pH za fyziologických podmínek *in vivo*.

2.4. Regulace pH v buňce

Vnitřní rozdělení eukaryotické buňky na jednotlivé membránou ohraničené kompartmenty jí dává možnost udržovat v různých částech buňky rozdílné pH (podkapitola 2.4.). Jelikož pH závisí na koncentraci protonů (podkapitola 2.1), musí buňka pro udržení hodnoty pH regulovat jejich množství. K tomu má několik možností, regulaci provádí pomocí různých ATPáz a přenašečů. V této podkapitole se budu zabývat proteiny podílejícími se na regulaci pH v kvasinkových buňkách.

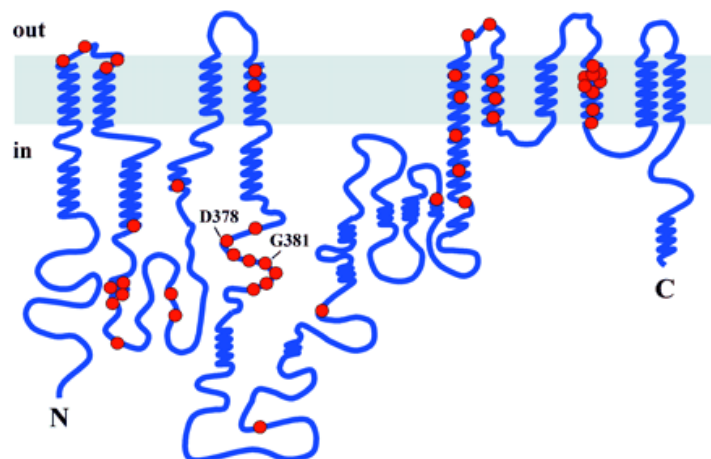
2.4.1. Buněčné ATPázy

ATPázy jsou třídou proteinů, které pomocí uvolněné energie z hydrolýzy ATP na ADP a volný fosfátový ion, mohou transportovat látky proti jejich gradientu.

V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* můžeme najít tři typy ATPáz, podílejících se na regulaci pH: P-typ lokalizovaný na plazmatické membráně, V-typ ve vakuolách a F-typ na vnitřní mitochondriální membráně.

2.4.1.1. Plazmatická ATPáza (PMA)

Plazmatickou ATPázu kóduje gen *PMA1* (Serrano et al., 1986). V buňce se nachází ještě jeho další isoforma *PMA2* (Schlesser et al., 1998). ATPáza Pma1p je jedním z nejvíce zastoupených integrálních proteinů plazmatické membrány, se zastoupením 25% (Toulmay and Schneider, 2007). Jedná se o 100 kDa velký protein s 10 transmembránovými doménami (Ferreira et al., 2001) (**Error! Reference source not found.**).



Obrázek 5: Topologie kvasinkové plazmatické H⁺-ATPázy, získaná prostřednictvím dvoudimenzionální a třídimeznionální krystalografie (Ferreira et al., 2001).

Pomocí hydrolýzy ATP dochází k pumpování protonů ven z buňky, čímž vzniká elektrochemický protonový gradient. Protein pomocí transportu protonů také reguluje cytosolické pH. Daný protein rovněž reguluje cestou díky vytváření gradientu transport živin do buňky skrz plazmatickou membránu (Morsomme et al., 2000).

Důležitá role tohoto proteinu ve fyziologii buňky vyžaduje přísnou regulaci. Pma1p je silně regulován glukózou jak na úrovni transkripce, tak i posttranslačně. Zvýšená koncentrace glukózy působí přes transkripční faktory Rap1p a Gcr1p zvýšenou

expresi Pma1p (Capieaux et al., 1989; Rao et al., 1993; Goossens et al., 2000). Na posttranslační úrovni působí produkty metabolismu glukózy zvýšení aktivity Pma1p (Serrano, 1983) a to pomocí kináz *PTK2* a *HRK1* (Goossens et al., 2000).

Gen *PMA1* je regulován rovněž mnoha dalšími mechanismy. Exprese je ovlivněna například transkripční faktory *GLN3*, který se exprimuje při hladovění na dusík (Goossens et al., 2000), transkripčním faktorem *MCM1*, který reguluje expresi v závislosti na regulaci buněčného cyklu a integrity buněčné stěny (Portillo, 2000), transkripčním faktorem *OPI1*, propojujícím metabolismus s biogenezí membrán. Dále může být aktivita genu regulována též v závislosti na faktorech výživových a stresových (Young et al., 2010).

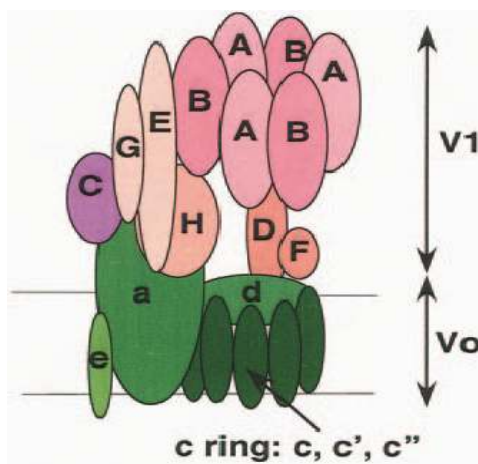
2.4.1.2. Vakuolární ATPáza (VMA)

Vakuolární ATPáza je kódována skupinou genů VMA. Proteinový komplex ATPázy se skládá ze dvou částí, V1 a VO, jež jsou analogické částem F1 a FO mitochondriální F1FO syntázy (viz dále). Část V1 se skládá z podjednotek ABCDEFGH, kódovaných geny VMA(1,2,5,8,4,7,10,13) (Graham et al., 2003; Kane, 2006) a část VO z podjednotek acc'c'd, kódovaných geny VPH1/STV1, VMA(3,11,16,6) (Obrázek 6). Pro správné fungování ATPázy je nutná asociace všech podjednotek komplexů V1 a VO (Nishi and Forgac, 2002). V1 komplex je cytosolický a dochází na něm k hydrolýze ATP, zatímco VO je membránově vázaný a slouží jako protonový kanál (Bond and Forgac, 2008).

Pomocí hydrolýzy ATP dochází k pumpování protonů dovnitř organely a tím k její acidifikaci. VMA je především lokalizována na membráně vakuol, může být ale lokalizována též v endoplazmatickém retikulu, Golgiho komplexu a sekretorických váčcích, kde hraje roli při regulaci jejich pH (Manolson et al., 1994; Kawasaki-Nishi et al., 2001). Rozdíly mezi VMA lokalizovanou ve vakuolách a Golgiho komplexu jsou pouze v odlišných izoformách podjednotky a (Graham et al., 2003).

Jedním z hlavních regulačních mechanismů VMA je reverzibilní disociace V1 a VO komplexů (Kane 2006, Beyenbach and Wiczorek, 2006). Jedná se o rychlý a efektivní mechanismus pro regulaci aktivity transportu protonů. Velmi výrazným regulátorem VMA je koncentrace glukózy. Za nízké koncentrace glukózy (nebo jiného

fermentovatelného zdroje uhlíku) dochází k disociaci V1 a VO komplexů, zatímco při vysoké koncentraci k jejich spojení (Kane, 2006; Smardon and Kane, 2007; Bond and Forgac, 2008). Bylo zjištěno, že disociaci komplexů V1 a VO při nedostatku glukózy řídí geny *IRA1* a *IRA2*, které kódují proteiny s GTPázovou aktivitou, jež jsou inhibičními regulátory Ras/cAMP dráhy (Bond and Forgac, 2008). Při regulaci asociace komplexů V1 a VO také hraje důležitou roli komplex RAVE (Smardon et al., 2002; Smardon and Kane, 2007), který se skládá z proteinů *RAV1*, *RAV2* a *SKP1* (Seol et al., 2001). Procesy asociace a disociace obou komplexů trvají v řádu minut, proto není potřebná syntéza nových proteinů (Bond and Forgac, 2008).



Obrázek 6: Strukturální model kvasinkové V-ATPázy s vyznačenou částí V1 a VO (Kane, 2006).

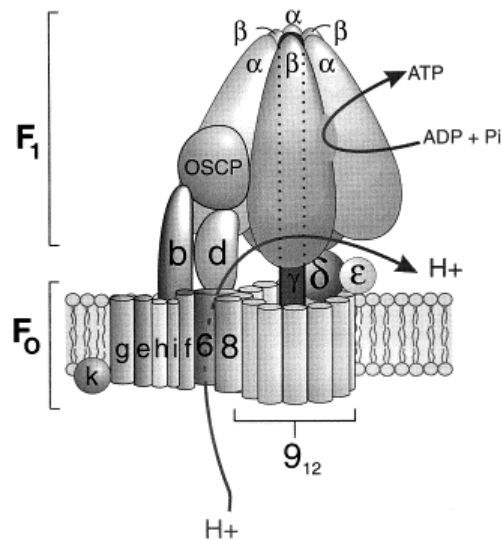
2.4.1.3. Mitochondriální ATPáza (F1FO syntáza)

Mitochondriální F1FO ATPáza je vysoce evolučně konzervovaný enzym. ATPáza nevytváří protonový gradient jakopředchozí dvě ATPázy, PMA a VMA. V mitochondriích je gradient vytvářen transportem protonů pomocí elektronového transportního řetězce (komplexy I, II a IV) během oxidace NADH a FADH₂. Uvedeným způsobem vzniklý gradient využívá F1FO ATPáza k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu. Předmětná ATPáza ovlivňuje pH v mitochondriích tím, že využívá protonový gradient mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem mitochondrií, čímž ho snižuje. Reakce katalyzovaná tímto proteinem je reverzibilní, takže F1FO ATPáza

dokáže pomocí hydrolýzy ATP transportovat protony do mezimembránového prostoru mitochondrií.

Mitochondriální F₁FO ATPáza je z větší části kódována genomovou DNA kvasinky skupinou genů ATP. Katalytická část enzymu, tj. F₁, je složena z podjednotek $\alpha\beta\gamma\delta\varepsilon$ (Obrázek 7) a je kódována v jaderné DNA. Konkrétně: podjednotka α genem *ATP1* (Takeda et al., 1986), podjednotka β genem *ATP2* (Takeda et al., 1986), podjednotka γ genem *ATP3* (Paul et al., 1994), podjednotka δ genem *ATP16* (Giraud and Velours., 1994) a podjednotka ε genem *ATP15* (Guélin et al., 1993). Část protonového kanálu, tedy F₀, je tvořena podjednotkami abc (Obrázek 7), přičemž b část je kódována v jádře genem *ATP4* (Velours et al., 1998) a zbytek je kódován mitochondriální DNA (Arnold 1998).

F₁FO ATPáza je regulována výživovými podmínkami buňky, kdy buňka přepíná mezi respirací a fermentací. V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* je F₁FO regulována glukózovou represí.



Obrázek 7: Strukturální model F₁FO ATPázy (Devenish et al., 2000) s vyznačenými částmi F₁ a F₀.

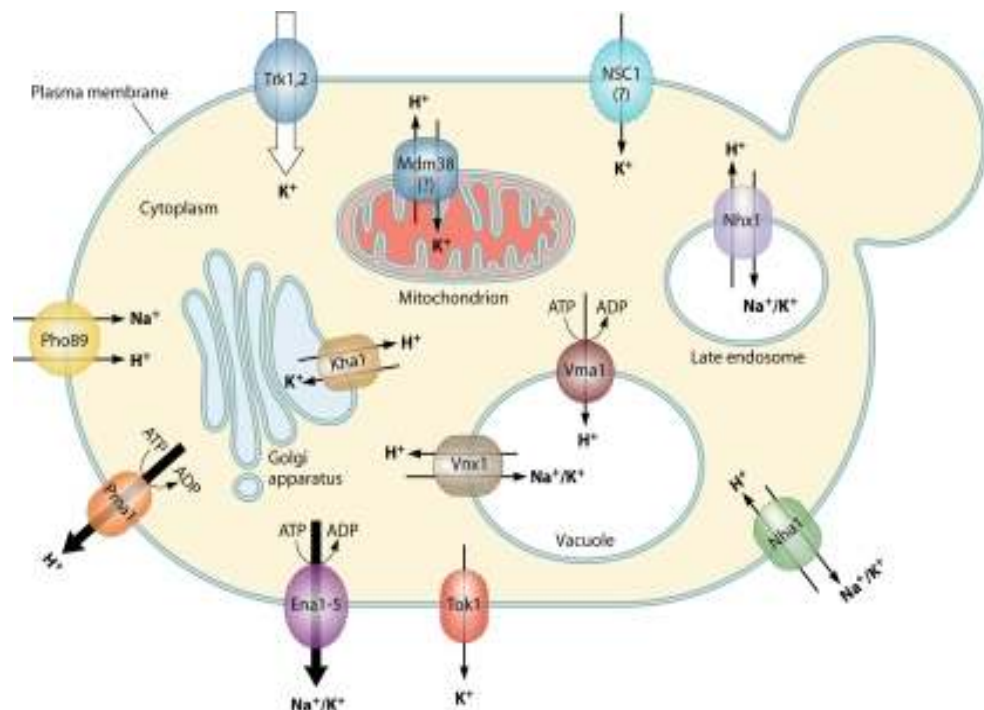
2.4.2. Transportéry

Elektrochemický protonový gradient vytvořený pomocí ATPáz může buňka také využívat k transportu látek proti jejich elektrochemickému gradientu skrz různé membrány. Takovému transportu se říká sekundární.

Pro buňku je nesmírně důležité regulovat koncentraci K^+ a Na^+ iontů v různých částech, k čemuž rovněž využívá protonového gradientu. Pomocí různých symportérů a antiportérů (Obrázek 8) dokáže buňka regulovat koncentraci uvedených iontů.

Z těch nejdůležitějších se na plazmatické membráně nachází například Na^+/H^+ symporter Pho89p (Martinez and Persson, 1998) a Na^+/H^+ antiporter Nha1p (Prior et al., 1996). Uvnitř buňky jsou to pak například v Golgiho komplexu K^+/H^+ antiporter Kha1p (Ramírez et al., 1998), Na^+/H^+ a K^+/H^+ antiporter v pozdních endosomech (Nass et al., 1997) či vakuolární Na^+/H^+ antiporter Vnx1p (Cagnag et al., 2007). Dále se v mitochondriální membráně objevuje K^+/H^+ antiporter Mdm38p (Froschauer et al., 2005), který je závislý na protonovém gradientu vytvořeném elektrotransportním řetězcem na vnitřní mitochondriální membráně.

Kromě iontových transportérů se v buňce též nacházejí transportéry živin potřebných pro buňku, například transportér vitamínu B6 Tpn1p (Stolz and Vielreicher, 2003) nebo transportér glycerolu Stl1p (Zhao et al, 1994)

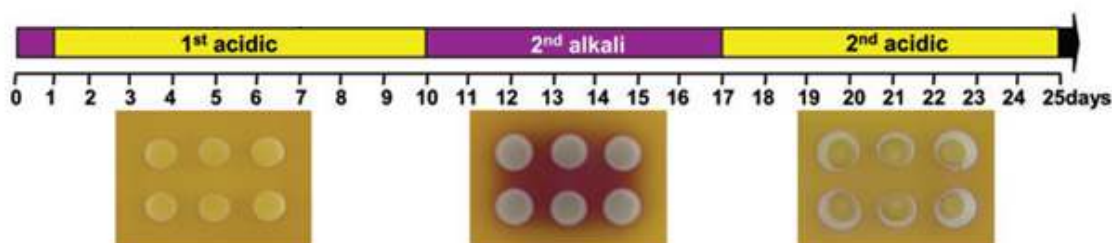


Obrázek 8: Hlavní kationtové transportéry plazmatické membrány a vnitřních membrán v kvasince *S. cerevisiae* (Ariño et al., 2010).

2.5. Diferenciace kvasinkové kolonie

Kvasinková kolonie je složitě organizované společenství buněk, které se vyvíjí jak v čase, tak v prostoru. I když je kolonie tvořena pouze jednobuněčnými kvasinkami, navenek se celá kolonie chová jako jedna entita.

Výzkum ukázal, že kvasinkové kolonie dokáží vzájemně mezi sebou komunikovat na delší vzdálenosti pomocí amoniaku (Palková et al., 1997). Díky tomuto mechanismu mohou reagovat na jiné kolonie v okolí, takto se jim přizpůsobit a synchronizovat s nimi svůj růst (Palková et al., 2000) (Obrázek 9). Během vývoje kvasinkové kolonie dochází k přepínání mezi fázemi acidickou a alkalickou, ve které kvasinková kolonie produkuje amoniak (Palková et al., 2002). Přepnutí kolonie do alkalické fáze a produkce amoniaku mají za následek výrazné změny v metabolismu buněk.

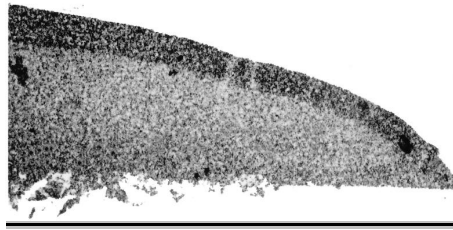


Obrázek 9: Změny v koloniích během acidicko-alkalické tranzice (Palková et al., 2002)

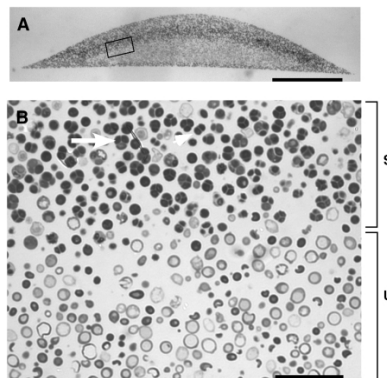
Dalším důležitým poznatkem je skutečnost, že ne všechny buňky v rostoucí kolonii se chovají stejně (Kamath and Bungay, 1988; Mináriková et al., 2001; Scherz et al., 2001; Palková and Váchová, 2006; Piccirillo et al., 2010). Buňky uvnitř kolonie tvoří různé subpopulace, které se liší jak svou morfologií, tak i expresí různých genů (Obrázek 10, 11 a 12). Dále bylo publikováno, že buňky uprostřed kolonie jeví znaky apoptózy a je to místo s umírajícími buňkami (Váchová and Palková, 2005).

Pomocí microarray analýzy vyvíjející se kolonie byly popsány geny, jejichž exprese se zásadně mění během vývoje kolonie (Palková et al., 2002; Váchová et al., 2009).

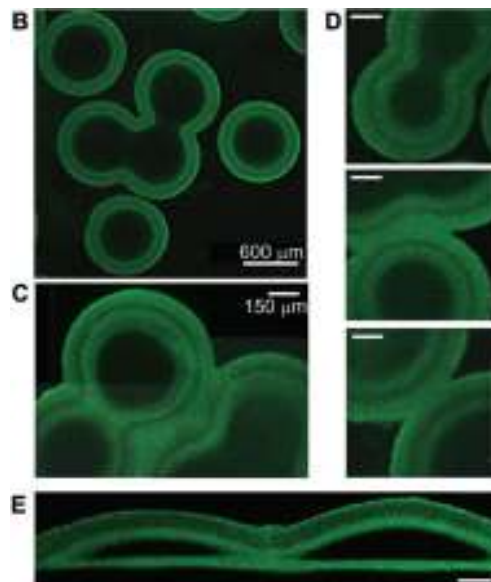
Uvedené poznatky jsem se rozhodl využít pro svůj výzkum. Zamýšlel jsem vybrat některé z takto určených genů, vytvořit jejich fúzní varianty s GFP a následně sledovat jejich lokalizaci v procesu vývoje kolonie.



Obrázek 10: Rostoucí kvasinková kolonie se skládá z dvou odlišných populací buněk (Scherz et al., 2001).



Obrázek 11: Rozdílné chování a sporulace buněk v kolonii divokého kmene kvasinek. (Piccirillo et al., 2010).



Obrázek 12: Čtyři dny stará kolonie se značeným proteinem Ato1-GFP. Na fotografiích je vidět prostorově ohraničená oblast buněk exprimující tento protein (Váchová et al., 2009)

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Použité mikroorganismy

Escherichia coli DH5 α : F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi⁻, supE44, relA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k), λ ⁻, Δ (argF-lacZya), U169, Φ 80 lac ZM15

Saccharomyces cerevisiae BY4742 ze sbírky EUROSCARF:

MAT α , his3 Δ ; leu2 Δ ; met15 Δ ; ura3 Δ

3.1.2. Použité plazmidy

Vektory pKT209 a pOM42 sloužily jako templát pro PCR integračních kazet za účelem následné transformace kvasinek a následného fluorescenčního značení vybraných proteinů. Vektor pSH62 sloužil pro expresi Cre rekombinázy a odstranění selekčního markeru ohraničeného loxP místy. Všechny použité plazmidy obsahují selekční marker ampicilinové rezistence Amp^r pro buňky *E. coli*.

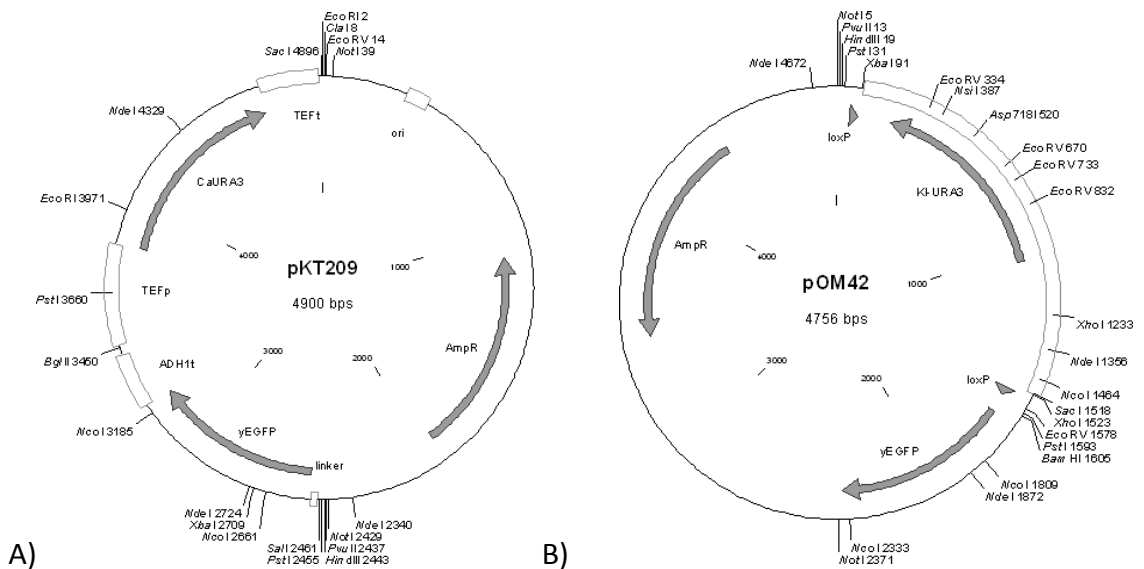
pKT209 Plazmid kódující gen *URA3* z kvasinky *Candida albicans*, který komplementuje mutaci *ura3* v *S. cerevisiae*. V integrační kazetě slouží pro tvorbu C-terminální γ EGFP fúze s vybraným proteinem (Obrázek 13). Transformované buňky *E. coli* jsou rezistentní k ampicilinu. Plazmid byl zakoupen ze sbírky EUROSCARF.

pOM42 Plazmid kódující gen *URA3* z kvasinky *Kluyveromyces lactis*, který komplementuje mutaci *ura3* v *S. cerevisiae*. V integrační kazetě slouží pro tvorbu N-terminální nebo internální γ EGFP fúze s vybraným proteinem. Obsahuje také loxP místa, sloužící k odstranění selekčního markeru (Obrázek 13). Transformované buňky *E. coli* jsou rezistentní k ampicilinu. Plazmid byl zakoupen ze sbírky EUROSCARF.

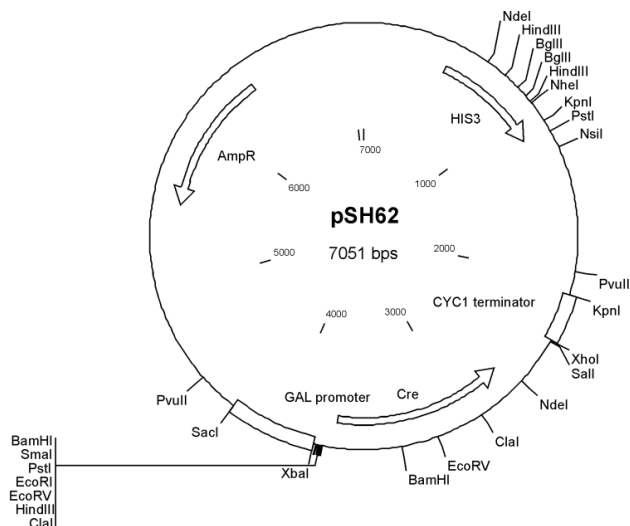
pSH62 Plazmid kódující gen pro Cre rekombinázu pod kontrolou GAL promotoru. Obsahuje také kódující gen *HIS3*, který komplementuje mutaci *his3* v *S. cerevisiae* (Obrázek 14).

Transformované buňky *E. coli* jsou rezistentní k ampicilinu.

Plazmid byl zakoupen ze sbírky EUROSCARF.



Obrázek 13: Plazmidy pKT209 a pOM42, využívané pro přípravu PCR transformačních kazet obsahujících gen pro fluorescenční protein a selekční znak pro kvasinkové buňky.



Obrázek 14: Plazmid pSH62, využívaný pro expresi Cre rekombinázy v transformovaných buňkách.

3.1.3. Přístroje

Fluorescenční mikroskop Leica DMR

Digitální monochromatická kamera na mikroskop Leica ProgRes® MFcool

Digitální barevná kamera ProgRes® CT3

Monochromatická kamera Cohu

Průtokový cytometr BD LSR II

Mikrotom Leica VT 1200S

Centrifuga s výkyvným rotorem Hettich Universal 320R

Centrifuga s výkyvným rotorem BOECO U-32R

Mikrocentrifuga Hettich Micro20

Analytické váhy Mettler AE200

Horkovzdušná třepačka Lab-Therm

PCR termocykler Bioer XP Cyclor

Zdroj pro elektroforézu Apparatus Corporation E-C250-90

Spektrofotometr Biochrom WPA S1200

UV transiluminátor Ultra Lum Electronic Dual Light™

Vortex Scientific Industries Genie 2

pH-metr Mettler Toledo Seveneasy

Termobox LBT 168

3.1.4. Použité internetové databáze a počítačové programy

Saccharomyces Genome Database (SGD):

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>

SequenceManipulationSuite:

<http://bioinformatics.org/sms>

OligoCalculator:

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

Psort II:

<http://psort.hgc.jp/form2.html>

Signal P

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

NCBI Blast

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

NIS ELEMENTS (LaboratoryImaging) – software pro analýzu obrazu

3.1.5. Roztoky a média

Demineralizovaná a destilovaná voda do médií a roztoků byla upravena přístrojem Ultrapur (Waltrex).

3.1.5.1. Roztoky

1M LiAc	10,2 g CH ₃ COOLi (Serva) na 100 ml H ₂ O
3M NaAc	24,6 g CH ₃ COONa na 100 ml H ₂ O
1000x EtBr	10 mg ethidium bromidu (Serva) na 1 ml H ₂ O
1M Tris-HCl	12,1 g Tris báze (Serva) na 100 ml H ₂ O pH upraveno HCl dle potřeby
0,5M EDTA-NaOH	18,6 g Na ₃ EDTA (Serva) na 100 ml H ₂ O pH upraveno NaOH dle potřeby
0,8% agarózový gel	0,16 g agarózy rozvařeno ve 20 ml 0,5x TBE pufru

20x BKP 2 mg BKP (bromkresolového purpuru) (Sigma) na 1 ml H₂O

TBE 0,5x 20mM Tris (Serva)
1mM EDTA (Sigma)
45mM kyselina boritá

RI 1% glukóza
25mM Tris-HCl (pH 7,5) (Serva)
10mM EDTA-NaOH (pH 8,0) (Sigma)

RII 0,2M NaOH
1% SDS (Serva)

RIII 29,44 g CH₃COOK
11,5 ml ledové CH₃COOH
doplnit H₂O na 100 ml

TE 10mM Tris-HCl (pH 7,5) (Serva)
1mM EDTA-NaOH (pH 8,0) (Sigma)

T mix (pro jednu transformaci)

PEG (50%) (Sigma)	240 µl
LiAc 1M (Sigma)	36 µl
salmon sperm ssDNA (2 mg/ml) (Sigma)	300 µl
plazmidová DNA + H ₂ O	34 µl

Upravený fenol fenol byl několikrát protřepán s 1M Tris-HCl (pH 8,0) a jednou s 0,1M Tris-HCl (pH 8,0), pH bylo posléze upraveno na 7,0, fenol byl následně uchováván při teplotě -20°C

Upravený chloroform smíchan s izoamylalkoholem v poměru 24:1

Mix I	50 μ l 1M Tris (pH 8) (Serva)
	20 μ l 0,5M EDTA (pH 8) (Sigma)
	3 μ l merkaptoetanolu (Sigma)
	1 mg zymolyázy (Sigma)
	1 ml vody
10% roztok sacharózy	10g doplnit na 100 ml H ₂ O
35% roztok sacharózy	35g doplnit na 100 ml H ₂ O
10% glycerolu	10ml glycerolu 90ml H ₂ O
10% SDS	10g na 100ml
7,5M octan amonný	578,1g/l

3.1.5.2. Média

TPN	0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)
	0,5% NaCl
	1% baktopepton (Imuna)
	1% baktotrypton (Imuna)
SOC	0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)
	2% baktopepton (Imuna)
	10mM NaCl
	2,5mM KCl
	20mM glukóza
	sterilizováno odděleně
	10mM MgCl ₂ ·6H ₂ O

	10mM MgSO ₄ ·7H ₂ O
ŽB s ampicilinem	2,5% živný bujón č. 2 (Imuna) Po sterilizaci přidáme 50–100 µg ampicilinu (Biotica) na 1 ml média.
YEPG tekuté	1% kvasničný autolyzát (Imuna) 1% pepton (Imuna) 2% glukóza (sterilizujeme odděleně)
Skladovací médium pro bakterie	2,5% živný bujón č. 2 (Imuna) 15% glycerol
Skladovací médium pro kvasinky	1% kvasničný autolyzát (Imuna) 2% pepton (Imuna) 10% glukóza (sterilizujeme odděleně) 60% glycerol
ŽA s ampicilinem	4% živný agar č. 2 (Imuna) Po sterilizaci přidáme 50–100 µg ampicilinu (Biotica) na 1 ml média.
YEPG	1% kvasničný autolyzát (Imuna) 1% pepton (Imuna) 2% agar (fa Kulich HK) 2% glukóza (sterilizujeme odděleně)
GMA	1% kvasničný autolyzát (Imuna) (před sterilizací upravíme pH na 5, sterilizujeme odděleně) 2% agar (fa Kulich HK) 3% glycerol 30mM CaCl ₂ (sterilizujeme odděleně)

GMA + BKP jako GM, po sterilizaci přidáme 0,01% BKP, který rozpustíme předem v 96% EtOH (v 1/100 výsledného objemu média)

MM (minimální médium pro kvasinky)

všechny složky sterilizujeme zvlášť

2% agar (fa Kulich HK)

2% glukóza

0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,1% KH_2PO_4

0,05% MgSO_4

20 μg aminokyseliny*) na 1 ml média

50 μg báze*) na 1 ml média

0,1% Wickerhamův roztok (nesterilizujeme, přidáváme po sterilizaci)

Wickerhamův roztok:

0,2 mg biotinu

200 mg inositolu

20 mg riboflavinu

40 mg thiaminu

20 mg kyseliny p-aminobenzoové

40 mg pantothenátu vápenatého

40 mg kyseliny nikotinové

0,2 mg kyseliny listové

100 ml H_2O

*) pro *S. cerevisiae* BY4742: aminokyseliny histidin, lysin, leucin a báze uracil

Médium s kyselinou fluoroorotovou

Jako YEPG s přidáním

1 g na 1 l média kyseliny fluoroorotové

Médium indukující expresi Cre rekombinázy

Jako MM (minimální médium pro kvasinky) s přidáním
aminokyseliny lysin, leucin a báze uracil (viz MM médium)

1% rafinóza

1% galaktóza

3.1.5.3. Ostatní

PPP Master Mix (TopBio)

150mM Tris-HCl (pH 8,8)

40mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,02% Tween 20

5mM MgCl_2

400mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

100 U/ml TaqPurple DNA polymeráza

stabilizátory, barviva

Ampicilin (Biotica, *Duchefa Biochemie*)

BKP (bromkresolový purpur) (Sigma)

Salmon sperm ssDNA (BioLabs)

3.2. Metody

3.2.1. Sterilizace

Chemické sklo, roztoky, média, párátko, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky byly sterilizovány suchým teplem v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 20 minut za tlaku 120 kPa.

Plastové centrifugační zkušavky a kyvety pro elektroporaci byly sterilizovány nejméně 24 hodin parami kyseliny peroctové v uzavřeném igelitovém sáčku.

Drobné předměty byly sterilizovány namočením do etanolu a žiháním nad plamenem kahanu.

3.2.2. Kultivace mikroorganismů

Buňky v tekutých médiích jsem kultivoval aerobně v horkovzdušné třepačce, buňky na pevných médiích v termostatu – kvasinkové kmeny při 28 °C a bakteriální kmeny při 37 °C.

3.2.3. Uchovávání kmenů

Bakteriální i kvasinkové kmeny jsem krátkodobě uchovával na Petriho miskách v lednici při 4 °C.

Pro dlouhodobé uchovávání jsem použil skladovací médium pro bakterie nebo pro kvasinky (3.1.5.2. Média) a kmeny uchovával v hluboko mrazícím boxu při –80 °C. Kmeny z hluboko mrazícího boxu jsem vyočkovával na komplexní media ŽA s ampicilinem (bakterie) a YEPG (kvasinky) (3.1.5.2. Média).

3.2.4. Počítání buněk stanovením optické denzity

Optickou denzitu kultury jsem měřil na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. K měření jsem používal kyvety s optickou dráhou 1 cm, jako blank jsem použil příslušné médium. Optická denzita 0,1 odpovídala množství 1×10^6 buněk na ml.

3.2.5. Maxipreparace plazmidů z bakterií (alkalická)

Přes noc jsem nechal růst bakterie ve 200 ml ŽB s ampicilinem (3.1.5.2. Média), umístěného v třepačce při 37 °C. Ráno jsem bakterie stáčil 10 min při 4 °C a rychlosti 5500 RPM. Sediment jsem poté resuspendoval v 10 ml roztoku I. Následně jsem přidal 20 ml roztoku II a promíchal otáčením centrifugační zkumavky. Po dobu 5 minut jsem nechal vzorek inkubovat při laboratorní teplotě a přidal jsem 15 ml ledového roztoku III. Opět jsem promíchal otáčením a nechal asi půl hodiny inkubovat v ledové lázni.

Po uplynutí uvedené doby jsem roztok stáčil 30 minut při frekvenci 4000 RPM bez chlazení a supernatant jsem přelil přes několikrát přeloženou gázu do nové zkumavky. Přidal jsem 0,8 objemu izopropanolu. Zvortexoval jsem a opět stáčil

30 minut při frekvenci 4000 RPM a bez chlazení. Izopropanol jsem odstranil a vzorek promyl 80% etanolem, promíchal a stáčel 10 min při 4 °C a 5500 RPM. Etanol jsem odstranil a nechal vzorek vyschnout.

K vyschlému vzorku jsem přidal 0,5 ml TE pufru a 1/100 RNázy a inkuboval přes hodinu při laboratorní teplotě. Po skončení daného procesu jsem prováděl fenol chloroformové čištění. Nejprve jsem ke vzorku přidal fenol v poměru 1:1, zvortexoval a stáčel 10 minut při maximálních otáčkách. Odebral jsem supernatant, poté jsem dvakrát vzorek přečistil směsí fenolu a chloroformu a provedl totéž jako při čištění chloroformem. Nakonec jsem vzorek čistil pouze chloroformem.

K přečištěnému vzorku jsem přidal 2,5 objemu 98% etanolu a 1/10 objemu NaAc a nechal v ledničce přes noc. Druhý den jsem vzorek stáčel 30 min při 13000 RPM a 4 °C, sediment opláchl 80% etanolem a nechal vzorek vyschnout. Nakonec jsem jej resuspendoval v TE pufru.

3.2.6. Minipreparace plazmidů z bakterií – boiling metoda

Sterilním párátkem jsem odebral malé množství bakteriální biomasy do 100-200 µl STET roztoku. Roztok jsem nechal 40 s inkubovat ve vroucí vodě. Vzorek jsem stáčel 8 min při 13000 RPM, bez chlazení. Potom jsem párátkem odstranil sediment. K supernatantu jsem přidal stejný objem izopropanolu, směs jsem zvortexoval a pár minut počkal. Následně jsem roztok stáčel znovu 8 min při 13000 RPM a 4 °C, odstranil supernatant a pelet vysušil. Nakonec jsem vzorek resuspendoval v TE pufru.

3.2.7. Kompetentní bakteriální buňky

Bakterie DH5α jsem zaočkoval do 30 ml TPN (3.1.5.2. Média) a inkubovat přes noc ve 37 °C. Ráno jsem změřil OD. Objem 500 ml TPN jsem zaočkoval narostlými bakteriemi tak, aby OD výsledného roztoku byla mezi 0,125 a 0,2, a následně jsem nechal bakterie růst na OD = 0,5–1,0.

Narostlé buňky jsem stáčel 10 min při 4 °C a 4000 RPM a odstranil jsem supernatant. Od tohoto okamžiku jsem pracoval s bakteriemi pouze na ledu. Bakterie

v centrifugačních zkumavkách jsem promýval 50 ml H₂O na falkonku a poté jsem bakterie opět stočil a odstranil supernatant. Následně jsem promyl bakterie ještě jednou, a to 25 ml H₂O. Po promývání jsem bakterie resuspendoval v 10 ml 10% glycerolu, převedl vše do jedné centrifugační zkumavky a stáčil 10 min při 4 °C. Nakonec jsem bakterie resuspendoval ve 2 ml 10% ledového glycerolu, rozdělil po 50 µl do Eppendorfovy zkumavky a zchládl v tekutém dusíku. Kompetentní buňky jsem skladoval v hlubokomrazivím boxu. Jako kontrolu jsem část bakterií vysel na ŽAmp. Pokud na misce nic nenarostlo, bylo to potvrzením, že jsem buňky připravil dobře.

3.2.8. Transformace bakterií elektroporací

Ke kompetentním buňkám jsem přidal 1 µl plazmidové DNA, promíchal v ledové lázni a převedl do předchlazené elektroporační kyvety. Kyvetu jsem rychle osušil tak, aby se neohřála, vložil ji do elektroporační komůrky a aplikoval na ni puls stejnosměrného napětí 2,5 kV při kapacitanci 25 µF a odporu 200 Ω. Do kyvety jsem následně přidal 1 ml SOC média (3.1.5.2. Média), poté jsem médium převedl do 25 ml Eppendorfovy zkumavky. Médium jsem pak kultivoval 1 hodinu při 37 °C. Buňky jsem nakonec vysel na selekční médium.

3.2.9. Navržení primerů pro GFP transformaci

Primery pro C-terminální fúzi jsem navrhoval podle výrobcem doporučené literatury (Sheff and Thorn, 2004). Pro forward primer je specifická oblast 40 nukleotidů před STOP kodonem, zatímco pro revers 40 nukleotidů za STOP kodonem (Tabulka 2). Primery pro internální fúzi jsem navrhoval podle výrobcem doporučené literatury (Gauss et al., 2005) (Obrázek 15).

Navržené primery pro C-terminální GFP fúzi *PDR5*, *STL1* a *PHO89* a internální fúzi *FET3* jsou v tabulce 2.

Forward primer:	40 nukleotidů specifická oblast - ggtgacgggtgctggttta
Revers primer:	40 nukleotidů specifická oblast - tcgatgaattcgagctcg

Tabulka 1: Návrh primerů pro C-terminální fúzi GFP (Sheff and Thorn, 2004).

A Internal tagging

5'- 45 bp upstream target site + TGC AGG TCG ACA ACC CTT AAT

5'- 45 bp downstream target site (reverse-complement) + GCG GCC GCA TAG GCC ACT

Obrázek 15: Návrh primerů pro internální fúzi GFP (Gauss et al., 2005).

Jméno primeru	Sekvence primeru
PHO89 Forward	GGTATCATTTTGAATGCTCCTCGCTTTGGTGTGGAATACCAAATGACAGGTGACGGTGCTGGTTTA
PHO89 Revers	TTCTACCTAATGTTGTAAAAGTATTTCATAACCGAAACACATTATGATCGATGAATTCGAGCTCG
STL1 Forward	AACATCAAAAATGAAGATACAGTGAACGATAAAGCAAATTTTGAGGGTGGTGACGGTGCTGGTTTA
STL1 Revers	TGCTTTCTTAAGTAAATTACAAAATATGATTTGTGAGTTGTGTGAATCGATGAATTCGAGCTCG
PDR5 Forward	TACTGGTTAGCAAGAGTGCCTAAAAAGAACGGTAAACTCTCCAAGAAAGGTGACGGTGCTGGTTTA
PDR5 Revers	AAAGTCCATCTTGGTAAGTTTCTTTTCTTAACCAAATTCAAAATCTATCGATGAATTCGAGCTCG
FET3 Forward	GCCGTTTGTCTTTCTCGATGCTCTCGCTAGCACAAGCGGAGACGTGCAGGTGACAAACCTTAAT
FET3 Revers	ATCAACGTTCTGTAGTCCCAGCCAGTGGTCCAATTAACGTGTGGCGGCCGCATAGGCCACT

Tabulka 2: Navržené primery pro transformaci.

3.2.10. Navržení primerů pro ověření úspěšnosti transformace

Pro PCR ověření správnosti vložení transformační kazety jsem použil jako základ primery vytvořené A. Pinedou pro GFP (Tabulka 3: yEGFPInt Forward a yEGFPInt Revers) a k nim vytvořil do dvojice vlastní primery (Tabulka 3).

Při návrhu specifických primerů jsem koreloval jejich délku a zastoupení GC párů s již vyzkoušenými EGFP primery tak, aby měly přibližně stejnou teplotu tání (a tudíž hybridizace). Tuto korelaci jsem kontroloval pomocí programu OligoCalculator.

FET3 Int Revers:	CCCATGTCAGATTCATCG
PHO89 Int Forward:	GGTTCTCCAAGCCATTAC
STL1 Int Forward:	CATGGATATACCCACCAG
PDR Int Forward:	GTTGGTTCTATGGGTCTG
yEGFPInt Forward:	GACGGTAACTACAAGACC
yEGFPInt Revers:	CTGGACCATCACCAATTG

Tabulka 3: Použité ověřovací primery

Výsledné dvojice primerů, které jsem pro ověřování konstruktů používal, byly tedy: FET3 Int Forward a yEGFPInt Revers; yEGFPInt Forward a FET3 Int Revers; PHO89 Int Forward a yEGFPInt Revers; STL1 Int Forward a yEGFPInt Revers, PDR Int Forward a yEGFPInt Revers (Tabulka 3).

3.2.11. PCR

Do mikrozkušavek pro PCR jsem napipetoval jednotlivé složky v objemu na 50 μ l PCR směsi:

- 25 μ l PPP Master Mix (TopBio)
- 2 μ l přímý primer (10 \times ředěný 100 pmol/ μ l)
- 2 μ l reverzní primer (10 \times ředěný 100 pmol/ μ l)
- 1 μ l templátová DNA (120 \times ředěná)
- 20 μ l PCR H₂O

Program pro PCR transformačních kazet

1. 1 min 94°C
 2. 15 s 94°C
 3. 30 s 44°C
 4. 2 min 68°C
- kroky 2–4 30 \times opakovat
5. 10 min 68°C

Program pro PCR fragmentů s GFP

1. 1 min 94°C
 2. 15 s 94°C
 3. 30 s 53°C
 4. 90 s 68°C
- kroky 2–4 35 \times opakovat
5. 10 min 68°C

3.2.12. PCR na koloniích

Špičkou automatické pipety jsem odebral malou část kolonie, kterou jsem resuspendoval v 50–100 μl H_2O . Vzorky jsem dal do termocykleru zahřát na 100 °C po dobu 10 minut. Poté jsem je stočil na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty.

Připravil jsem PCR směs, se stejným složením jednotlivých chemikálií, až na to, že místo templátové DNA jsem dal 1 μl supernatantu. Dále jsem používal normální program pro PCR fragmentů s GFP. Tato metodika slouží k rychlému ověření transformantů.

3.2.13. Elektroforéza DNA

Pro získání 0,8% gelu jsem smíchal 160 mg agarózy a 20 ml 0,5x TBE pufru (množství záleží na velikosti bločku na elektroforézu). Změřil jsem hmotnost roztoku a nechal jsem ho poté rozpustit v mikrovlnné troubě. Následně jsem doplnil pomocí H_2O hmotnost roztoku na původní váhu. Do rozehřátého gelu jsem přidal ethidium bromid a roztok nalil do připraveného bločku s hřebenem. Gel jsem nechal půl hodiny chladnout.

Vychladlý gel jsem dal do elektroforézové vany a zalil 0,5x TBE, aby byl gel pod pufrem. Vyndal jsem hřeben a mohl jsem nanášet vzorky na gel. Nanášel jsem je buď přímo jako PCR směs, nebo jako vzorek smíchaný s BFM v poměru 4:1. Zdroj elektroforézy jsem pouštěl na napětí 70 V (5 V na 1 cm délky gelu) a nechal běžet asi 45 minut. Nakonec jsem gel vyfotografoval pod UV zdrojem záření.

3.2.14. Transformace kvasinek

Transformaci kvasinek pomocí LiAc jsem prováděl podle „vysoce efektivního protokolu“ (Gietz and Woods, 2006). Kvasinky jsem zaočkoval do 50 ml tekutého YEPG (3.1.5.2. Média) a nechal růst přes noc při 28 °C.

Druhý den jsem nejprve připravil kompetentní kvasinkové buňky. U kultury, jež přes noc narostla, jsem změřil OD. Do 50 ml předeštěného tekutého YEPG (podkapitola 3.1.5.2.) jsem zaočkoval buňky na $\text{OD}=0,1$ (3.2.4. Počítání buněk stanovením optické

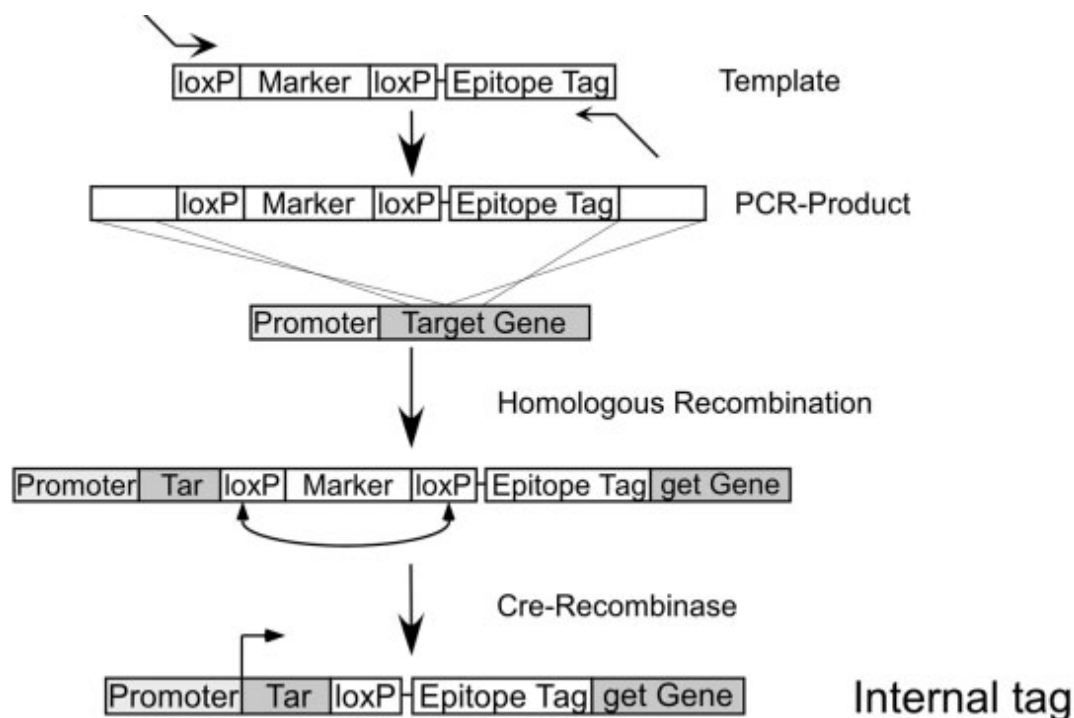
denzity) a nechal je růst po dvě generační doby. To trvalo zhruba čtyři hodiny, což jsem zkontroloval pomocí měření OD.

Narostlé buňky jsem stáčil při 4000 RPM po dobu 5min. Poté jsem je opláchl 25 ml sterilní H₂O, opět stočil a resuspendoval v 1 ml sterilní H₂O. Buňky jsem převedl do Eppendorfovy mikrozkušavky a stáčil je 30 s při maximálních otáčkách. Stočené buňky jsem resuspendoval vodou do objemu 1 ml a následně připravil vzorky o objemu 100 µl. Vzorky jsem stáčil 30 s při maximálních otáčkách a pak jsem odstranil supernatant.

Poté jsem připravil transformační mix (360 µl na vzorek), ve kterém jsem resuspendoval připravené buňky. Následně jsem nechal transformační směs inkubovat 40 min ve vodní lázni o teplotě 42 °C.

V dalším kroku jsem vzorky stáčil 30 s při maximálních otáčkách a potom odstranil transformační mix. Buňky jsem resuspendoval v 1 ml H₂O a vyočkoval na selekční MM plotny (u kmene BY4742 jsem pracoval se selekcí na uracil) (3.1.5.2. Média). Plotny jsem poté inkuboval 3 dny v termoboxu. Jednotlivé transformanty jsem ověřil pomocí PCR (3.2.11. PCR) a vybráne nechal osekvenovat.

Tento postup je dostačující při C-terminální transformaci. Při N-terminální transformaci *FET3* jsem navíc musel odstranit selekční marker, který byl mezi signální sekvencí a GFP se zbytkem proteinu (Obrázek 15).

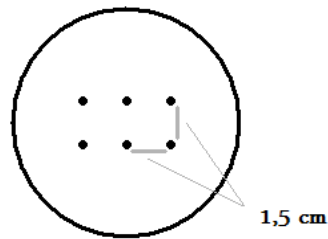


Obrázek 16: Schematické znázornění interní transformace GFP do cílového genu (Gauss et al., 2005).

Z uvedeného důvodu jsem vybrané transformanty podruhé transformoval (postup výše popsáný), pomocí plazmidu pSH62 který nese selekční marker *HIS3* a Cre rekombinázu. Transformované buňky jsem selektoval na růst na médiu bez histidinu a uracilu (3.1.5.2. Média). Buňky jsem nechal den růst na selekčním médiu a následně přeočkoval do tekutého selekčního média indukujícího expresi Cre rekombinázy (3.1.5.2. Média), kde jsem je nechal růst 4 h při 30 °C (Gauss et al., 2005). Následnou negativní selekcí prostřednictvím kyseliny fluoroorotové (3.1.5.2. Média) jsem získal ty transformanty, které měly za signální sekvencí *FET3* genu vložen pouze GFP bez selekčního markeru.

3.2.15. Nakapání obřích kolonií

Při experimentech s kvasinkovými koloniemi jsem pracoval s obřimi koloniemi na médiích GMA a GMA s BKP (3.1.5.2. Média). Biomasu jsem naředil v destilované vodě na OD cca 10. Kapal jsem 6 × 10 µl suspenze na misku (Obrázek 17).



Obrázek 17: Nanášení obřích kolonií na Petriho misky s agarem. Vzdálenost kapek (10 μ l suspenze) je 1,5 cm.

3.2.16. Izolace chromozomální DNA kvasinek zymolýzou

Objem 2 ml kultury kvasinek narostlé přes noc jsem stáčel při maximálních otáčkách po dobu 2 min. Buňky jsem resuspendoval ve 150 μ l mixu I a inkuboval 1 hodinu ve 37 °C. Po uplynutí této doby jsem přidal 20 μ l SDS a 100 μ l 7,5M octanu amonného a vše vložil na 15 min do –80 °C.

Roztok jsem poté stáčel 15 min při 15000 RPM a supernatant naředil H₂O do objemu cca 600 μ l. Následně jsem vzorek přečistil pomocí fenol-chloroformové extrakce. Do vzorku jsem dále přidal 0,6 \times objem izopropanolu a nechal vysrážet 15 s v –80 °C. Chromozomální DNA jsem stočil, opláchl etanolem a nechal vysušit. Nakonec jsem ji resuspendoval ve 20 μ l H₂O.

3.2.17. Mikroskopie fúzních proteinů GFP

Při mikroskopování a fotografování lokalizace fúzních proteinů s GFP jsem používal pro pořízení fotografií kvasinkových buněk místo podložního sklíčka agarózový plátek (viz. dále), který lépe fixoval preparát. Při sledování řezů kolonií jsem používal klasickou sestavu podložního a krycího sklíčka.

Buňky jsem pozoroval pod imerzním objektivem se zvětšením 100x. Některé řezy jsem pozoroval pod čtyřicetinásobným zvětšením. Využíval jsem filtry pro fluorescenci GFP (excitace: modrá / emise: zelená). Číslo u fotografií fluorescenčně značených kvasinkových buněk udává dobu snímání signálu v sekundách.

3.2.18. Mikroskopie s agarózovým plátkem

Připravil jsem 1% roztok agarózy, který jsem rozeřál v mikrovlnné troubě. Přibližně 1 ml rozpuštěné agarózy jsem nanesl na plastovou podložku a rozetřel do pásu asi 7 cm dlouhého a 2 cm širokého. Před další prací jsem nechal agarózu ztuhnout.

Pro sledování buněk jsem nanesl vzorek o objemu kolem 5 μ l na krycí sklíčko a přikryl jej agarózovým plátkem o rozměrech asi 0,5 \times 1 cm², který jsem vyřízl z agarózového pásu. Takto připravený vzorek jsem položil na podložní destičku s vyříznutým otvorem 1,5 \times 1,5 cm², do kterého byl vzorek uložen agarózovým plátkem dolů. Na krycí sklíčko jsem následně kápnul imerzní olej a mohl jsem začít s mikroskopováním.

3.2.19. Frakcionace buněk v sacharózovém gradientu

Nejprve si připravím sacharózový gradient pro následné dělení kolonií. Do přístroje na vrstvení gradientu naliji po 22,5 ml připravených 10% a 35% roztoků sacharózy. Do 50ml falkony nejprve pustím 10% roztok a počkám, až do ní několik ml roztoku nateče. Poté pustím i 35% roztok, který se začne smíchávat s 10% roztokem, a tím se mi postupně vytvoří gradient sacharózy ve falkoně.

Když mám připraven sacharózový gradient, odeberu kvantitativně biomasu kvasinkové kolonie a resuspenduji ji v 1 ml H₂O. Poté suspenzi nanesu na vršek sacharózového gradientu a dám točit. Stáčím v centrifuze s výklopným rotorem, při 1000 otáčkách za minutu a laboratorní teplotě. Zrychlení a zpomalení centrifugy nastavím na nejmenší stupeň, aby se mi během stáčení sacharózový gradient nezničil.

Stočený gradient pak začnu odebírat od vrchu po 6 ml. Každý takto odebraný díl je jednou frakcí. Odeberu 4 frakce, ve kterých jsou buňky. Každou frakci poté stáčím 5 min při 5000 otáčkách za minutu. Následně frakce resuspenduji a potom už mohu s buňkami pracovat.

3.2.20. Příprava vzorků pro průtokový cytometr

Příprava buněčné suspenze: Obří kvasinkovou kolonii jsem resuspendoval v 1 ml H₂O. Abych připravil vzorek pro průtokový cytometr, do mikrotitrační destičky jsem takto připravenou suspenzi naředil vodou na OD kolem 2. Vzorky jsem pak zamrazil na teplotu –18 °C.

Příprava buněčné frakce: Získanou frakci z dělení buněk v sacharózovém gradientu jsem stáčil 5 min při rychlosti 4000 RPM. Odstranil jsem supernatant a resuspendoval vzorek v 1,5 ml H₂O. Abych připravil vzorek pro průtokový cytometr, do mikrotitrační destičky jsem takto připravenou suspenzi naředil vodou na OD kolem 2. Vzorky jsem pak zamrazil na teplotu –18 °C.

3.2.21. Řezy kvasinkových kolonií

Kvasinkovou kolonii i s okolní částí agarové plotny jsem vyřízl skalpelem, zalil v plastové komůrce asi 5 ml 3% roztoku agarózy a nechal 20 minut chladnout. Po vychladnutí jsem agarózový bloček upravil skalpelem tak, aby kolem kolonie byla jen několikamilimetrová vrstva agarózy. Při práci s mikrotomem jsem nejprve zarovnal vzorek řezy o tloušťce 200 μm a postupně šířku řezu snižoval.

4. Výsledky

4.1. Fluorescenční značení vybraných proteinů

Cílem mé práce bylo vytvořit kmeny *S. cerevisiae* nesoucí geny *FET3*, *PDR5*, *STL1* a *PHO89* fúzované s genem pro fluorescenční protein GFP přímo v kvasinkovém genomu. Gen pro GFP bylo proto nutno integrovat do genomu pomocí homologní rekombinace. Takto vytvořené transformanty jsou oproti transformaci autonomně se replikujícím plazmidem stabilní, exprese vybraných proteinů je regulována přirozeným promotorem, a neliší se tedy od exprese původních proteinů.

4.1.1. Plazmidy pro fluorescenční značení vybraných proteinů

Kmen *S. cerevisiae* BY4742 je auxotrofní pro histidin, uracil, leucin a lysin. Pro následnou transformaci jsem proto mohl použít plazmidy, které mají jako selekční markery geny *HIS3*, *URA3*, *LEU2* nebo *LYS2*. Ke své práci jsem si vybral plazmidy nesoucí gen *URA3* jako selekční marker (3.1.1. Použité mikroorganismy).

Pro vytvoření fúzovaných proteinů nesoucích GFP na C-konci příslušného proteinu (*PDR5*, *STL1* a *PHO89*) jsem zvolil komerční plazmid pKT209 (3.1.2. Použité plazmidy), který nese gen pro γ EGFP a gen *URA3* z kvasinky *Candida albicans*.

K vytvoření fúzního proteinu Fet3p nesoucího GFP na N-konci jsem vybral komerční plazmid pOM42 (3.1.2. Použité plazmidy) který nese gen pro γ EGFP, gen *URA3* z kvasinky *Kluyveromyces lactis* a loxP místa, sloužící následně k odstranění selekčního markeru pomocí Cre rekombinázy (3.2.14. Transformace kvasinek) od kontrolou GAL promotoru (3.1.2. Použité plazmidy).

Vybranými plazmidy jsem transformoval kompetentní bakteriální buňky (3.2.8. Transformace bakterií elektroporací). Po kultivaci bakteriálních transformantů jsem vyzoloval plazmidovou DNA (3.2.5. Maxipreparace plazmidů z bakterií (alkalická); 3.2.6. Minipreparace plazmidů z bakterií – boiling metoda) a použil ji jako templátovou DNA pro PCR transformačních kazet (3.2.11. PCR).

4.1.2. Příprava integračních kazet pomocí PCR

Pro integraci genu GFP do specifického místa genomu je třeba pomocí PCR připravit transformační kazetu (3.2.9. Navržení primerů pro GFP transformaci), která obsahuje gen pro GFP a selekční marker použitelný v daném kvasinkovém kmenu. Dále musí být oba okraje kazety homologní s oblastí genomu, do níž chceme kazetu vložit (3.2.14. Transformace kvasinek). Během transformace se fragment dostane dovnitř buňky a pomocí homologní rekombinace se integruje do daného místa genomu. Výsledný fúzní gen je kontrolován z přirozeného promotoru.

Při navrhování primerů pro C-koncovou transformaci genů *PDR5*, *STL1* a *PHO89* jsem vycházel z doporučení původní publikace (3.2.14. Transformace kvasinek) (Sheff and Thorn, 2004).

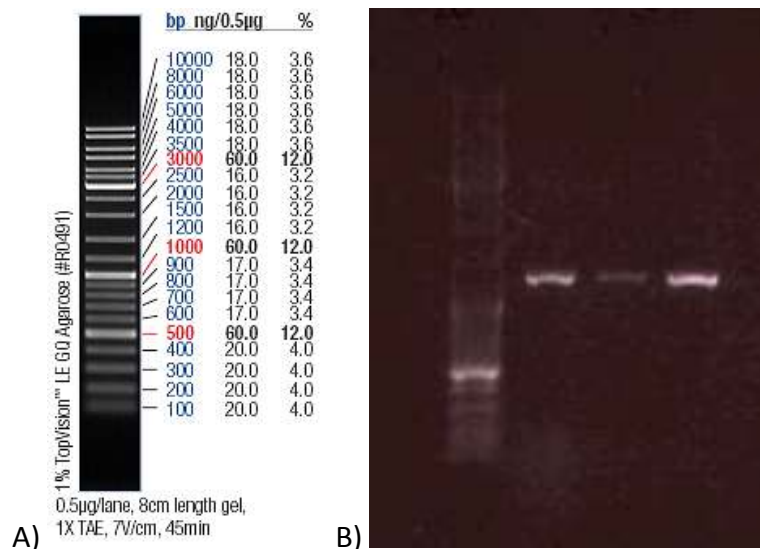
V případě genu *FET3* jsem vkládal GFP za genovou sekvenci kódující signální sekvenci proteinu. Tu jsem zjistil pomocí predikčních programů Signal P a Psort II. Oba tyto programy určily oblast konce signální sekvence, nutné pro transport proteinu na membránu, mezi 21 a 22 aminokyselinou Fet3p proteinu. Při návrhu primerů pro vnitřní integraci do genu (tak, aby ve výsledném konstruktu byl GFP na N-konci Fet3p) jsem opět vycházel z doporučení původní publikace (3.2.14. Transformace kvasinek) (Spang et al., 2005).

Pro zvýšení výtěžku PCR (3.2.11. PCR) jsem optimalizoval teplotu nasedání primerů, koncentraci templátové DNA a koncentraci primerů.

Připravené transformační kazety jsem použil pro transformaci (3.2.14. Transformace kvasinek) kmene BY4742 kvasinky *S. cerevisiae*.

4.1.3. Výběr transformantů

U získaných potenciálních transformantů, nesoucích geny *FET3*, *PDR5*, *STL1* a *PHO89*, fúzované s GFP, které byly selektovány na základě komplementace auxotrofie pro gen *URA3*, jsem nejprve provedl kontrolu integrace kazety pomocí PCR na koloniích (3.2.12. PCR na koloniích) (Obrázek 18). Proto tento účel jsem navrhl ověřovací primery (3.2.10. Navržení primerů pro ověření úspěšnosti transformace). Kromě těchto nových, specifických, primerů, jsem použil též primery dříve používané A. Pinedou pro yEGFP (3.2.10. Navržení primerů pro ověření úspěšnosti transformace).



Obrázek 18: A) Marker použitý pro zjištění velikosti PCR produktů; B) Ověření transformantů pomocí ověřovacích colonyPCR; zleva Pdr5-GFP,Stl1-GFP a Pho89-GFP

V dalším kroku jsem sledoval u vybraných transformantů genů *PDR5*, *STL1* a *PHO89* expresi daných fúzovaných proteinů pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 19) (3.2.17. Mikroskopie fúzních proteinů GFP; 3.2.18. Mikroskopie s agarózovým plátkem). Správnost vytvořených konstruktů u vybraných transformantů jsem ověřil sekvenací (příloha: sekvenční analýza). K sekvenaci jsem použil ověřovací primery navržené pro daný fúzovaný gen a primery navržené pro yEGFP.

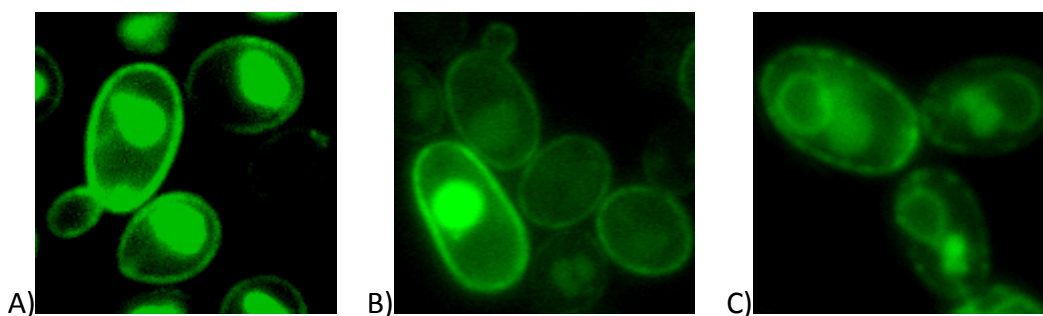
U vybraných transformantů genu *FET3*, ověřených pomocí PCR, jsem musel provést druhou transformaci, abych odstranil selekční marker (*URA3*) vložený spolu s GFP mezi signální sekvenci genu *FET3* a jeho zbylou sekvenci. Kvůli vloženému genu *URA3* nemohlo totiž dojít k propojení signální sekvence se zbytkem proteinu, a tudíž ani k produkci fúzního proteinu s GFP.

Z uvedeného důvodu jsem vybrané transformanty podruhé transformoval. K předmětné transformaci jsem použil plazmidu pSH62, jenž nese selekční marker HIS3 a Cre rekombinázu. Selektované buňky, které obsahovaly plazmid pSH62, jsem poté nechal růst v podmínkách, při nichž došlo k expresi Cre rekombinázy, která odstranila z genomu selekční marker *URA3* ohraničený loxP místy (**metodika**). Následnou negativní selekcí prostřednictvím kyseliny fluoroorotové jsem získal ty transformanty,

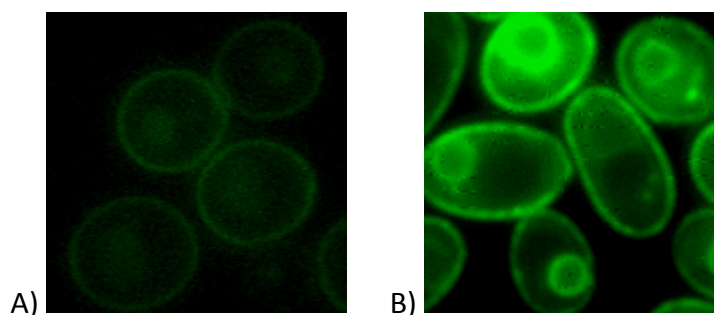
kteře měly za signální sekvenci *FET3* genu vložen pouze GFP bez selekčního markeru (**metodika**; Spang et al., 2005).

U vybraných transformantů nesoucích gen GFP interně vložený za signální sekvenci (kmeny BY-Fet3-GFPi) jsem následně pozoroval produkci Fet3p-GFPn fúzaných proteinů pomocí fluorescenčního mikroskopu a porovnával s C-terminální fúzí Fet3p-GFPc (kmen BY-Fet3-GFPc) vytvořenou dříve O. Štěpánkem (Štěpánek, 2007).

Správnost vytvořených konstruktů u vybraných transformantů jsem ověřil sekvenací (příloha: sekvenční analýza). K sekvenaci jsem použil ověřovací primery navržené pro *FET3* gen a primery navržené pro γ EGFP.



Obrázek 19: Fluorescenční fotografie vytvořených transformant; A) kmen BY-Stl1-GFP, 3 dny stará kolonie na GMA, doba expozice 1s; B) kmen BY-Pdr5-GFP, 3 dny stará kolonie na GMA, doba expozice 1s; C) kmen BY-Pho89-GFP, 1 den stará kolonie na GMA, doba expozice 3s.



Obrázek 20: Fluorescenční fotografie vytvořených transformant; A) kmen BY-Fet3-GFPi (Fet3p-GFPn), 5 dní stará kolonie na GMA, doba expozice 3s; B) BY-Fet3-GFPc (Fet3p-GFPc), 3 dny stará kolonie na GMA, doba expozice 3s.

4.1.4. Morfologie a vývoj kolonií připravených kmenů

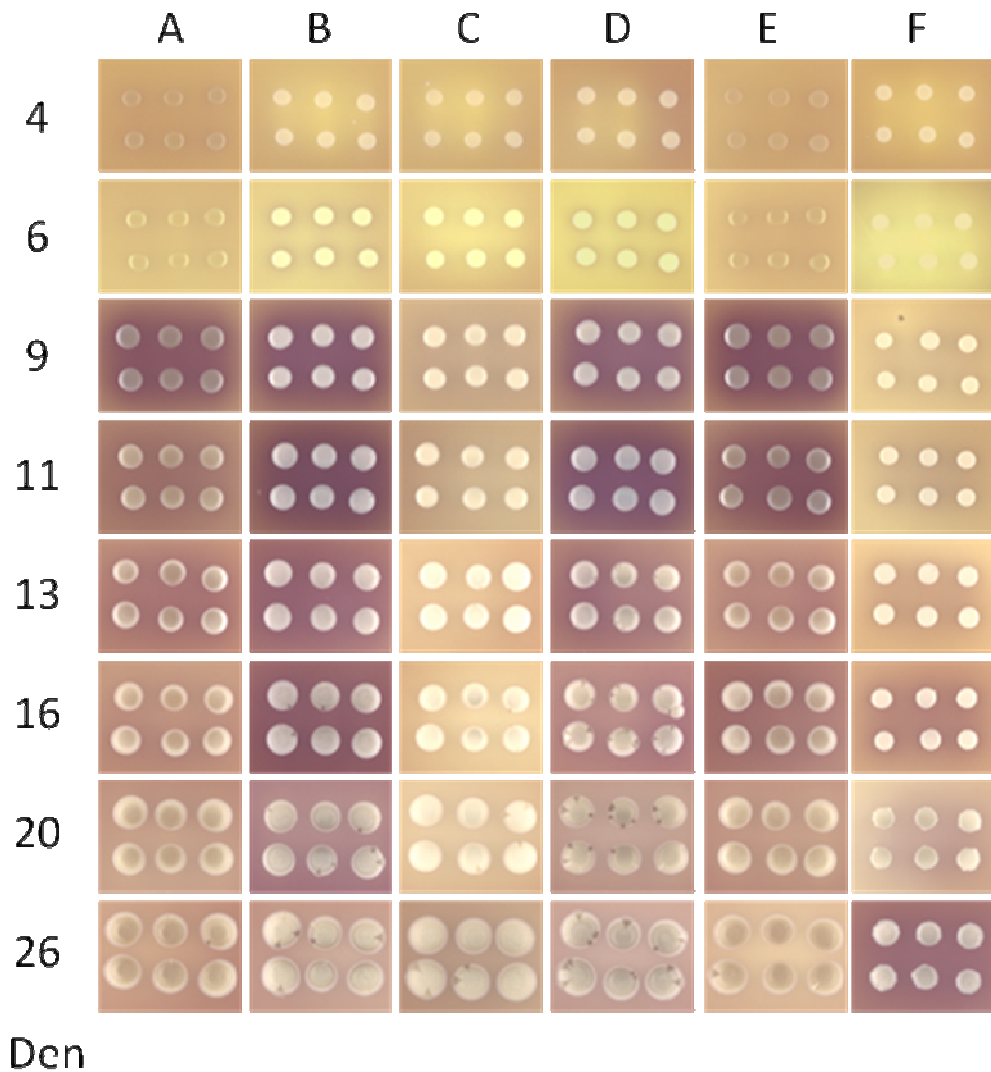
Vývoj kolonií rodičovského kmene BY4742 a od něj odvozených transformant jsem sledoval standardním způsobem na GM+BKP pevném médiu (Obrázek 21) (3.2.15. Nakapání obřích kolonií).

U kolonií kmene BY4742 došlo k přepnutí z první acidické do alkalické fáze přibližně v osmém dni vývoje. Od jedenáctého dne docházelo k postupné acidifikaci média (přechod z fialového do žlutého zbarvení pH indikátoru), protože kolonie přešly z alkalické do druhé acidické fáze. Morfologický vývoj rodičovského kmene odpovídal standardním pokusům.

U kolonií kmenů BY-Pdr5-GFP, BY-Pho89-GFP a BY-Fet3-GFPc došlo k přepnutí do alkalické fáze ve stejný čas jako u kolonií kontrolního kmene. U BY-Pdr5-GFP a BY-Pho89-GFP byla alkalizace o něco výraznější (podle zbarvení pH indikátoru), ale pozdější přepnutí z alkalické do druhé acidické fáze probíhalo podobně jako u kolonií kontrolního kmene. U kolonií kmene BY-Stl1-GFP došlo po osmém dni k velmi slabé alkalizaci v porovnání s kontrolním kmenem.

Kolonie kmenů BY-Pdr5-GFP, BY-Stl1-GFP, BY-Pho89-GFP a BY-Fet3-GFPc měly stejný morfologický vzhled jako kolonie kontrolního kmene, pouze u kolonií kmene BY-Pho89-GFP se v pozdějších fázích vývoje vyskytovalo větší množství sektorů, které se lišily od zbytku kolonie.

Velmi odlišný od kolonií ostatních transformant i kontrolního kmene BY4742 byl vývoj kolonií kmene BY-Fet3-GFPi. Kolonie tohoto kmene rostly velmi špatně. Přepnutí do alkalické fáze u nich proběhlo kolem třináctého dne, ale alkalizace byla (podle zbarvení pH indikátoru) velmi slabá.



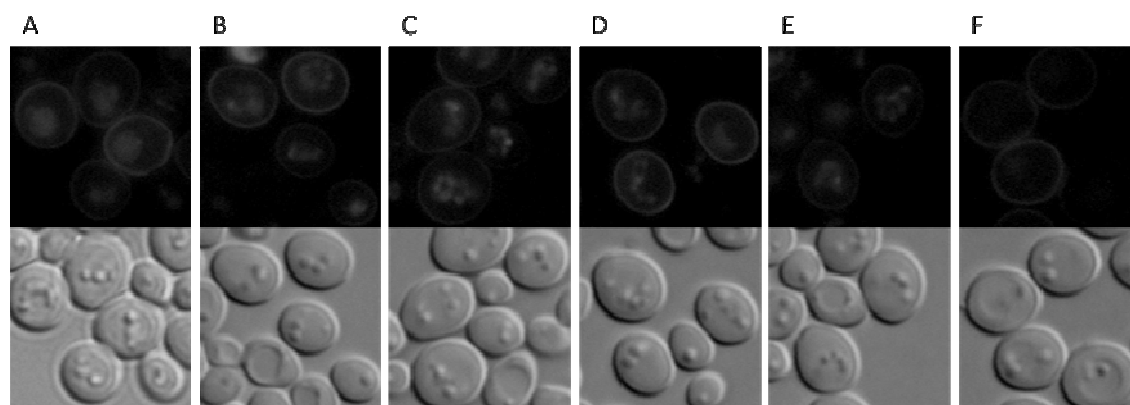
Obrázek 21: Vývoj kolonie v čase a její morfologie na GMA: A) kontrolní rodičovský kmen BY4742; B) kmen BY-Pdr5-GFP; C) kmen BY-Stl1-GFP; D) kmen BY-Pho89-GFP; E) kmen BY-Fet3c; F) kmen BY-Fet3-GFPi.

4.1.5. Rozdílná produkce Fet3c-GFP a Fet3i-GFP

Při sledování změn morfologie během vývoje kolonií Fet3p-GFPn a Fet3p-GFPc, v porovnání s kontrolním kmenem BY4742, jsem pozoroval horší růst varianty s internální fúzí na GMA. Signál obou konstruktů se také výrazně lišil v intenzitě fluorescence na cytoplazmatické membráně. Z toho důvodu jsem se rozhodl otestovat i další transformanty BY-Fet3-GFPi, které jsem měl ověřeny pomocí sekvenace. Proto jsem použil i varianty B113 a B115, mající bodovou mutaci S222P.

Ve všech případech růstu Fet3p-GFPn na GMA byla morfologie buněk podobná to - se týká všech šesti testovaných konstruktů (Obrázek 22). U všech konstruktů jsem pozoroval lokalizaci na cytoplazmatické membráně (Obrázek 22). Nepozoroval jsem ovšem lokalizaci v endoplazmatickém retikulu jako u Fet3p-GFP C-koncové fúze.

Ukázalo se tedy, že mutace S222P nemá vliv na funkčnost proteinu GFP. To znamená, že jsem takto vyloučil chybu v konstruktu B209.



Obrázek 22: Lokalizace signálu Fet3p-GFP N-koncové fúze na membráně během 5. dne růstu na GMA; expozice fluorescenčních fotografií byla 3s. Transformanty: A) transformant B113, B) transformant B115, C) transformant B209, D) transformant B214, E) transformant B215; F) transformant B510.

4.1.6. Vyhodnocení úspěšnosti transformace

Podařilo se mi vytvořit fúzní konstrukty BY-Fet3-GFPi (B113, B209, B115, B214, B215, B510), BY-Pdr5-GFP (C01, C02), Stl1p-GFP (D01, D02), BY-Pho89-GFP (E01, E03). Všechny čtyři fúzní proteiny lokalizují na membráně. Ve všech případech jsem pomocí sekvenace ověřil správnost vložení GFP do genomu. U konstruktů BY-Fet3-GFPi B113 a B115 došlo k bodové mutaci S222P v genu pro GFP, ta by ale neměla mít žádný vliv na funkci proteinu. V ostatních konstruktech se bodové mutace nevyskytovaly.

Při porovnání Fet3-GFPp C-terminální a N-terminální fúze jsem zjistil, že N-terminální fúze má řádově slabší fluorescenční signál na membráně a také mnohem hůře roste na GMA.

Pro další práci jsem vybral tyto mnou vytvořené konstrukty: BY-Pdr5-GFP – klon C01, BY-Stl1-GFP – klon D01, BY-Pho89-GFP – klon E03. Dále jsem pro protein *FET3* vybral konstrukt BY-Fet3-GFPc vytvořený Ondřejem Štěpánkem (Štěpánek, 2007).

4.2. Lokalizace fúzních proteinů během vývoje kolonie

V další fázi své práce jsem se zaměřil na lokalizaci připravených fúzních konstruktů vybraných proteinů v rámci vývoje kvasinkové kolonie. Z předchozích výsledků microarray analýzy vývoje kolonie (Palková et al., 2002) jsem znal údaje o expresi genů, které tyto proteiny kódují. Cílem proto bylo zjistit, zda a jak produkce a membránová lokalizace daných proteinů s expresními daty koreluje.

4.2.1. Vertikální diferenciací kolonií

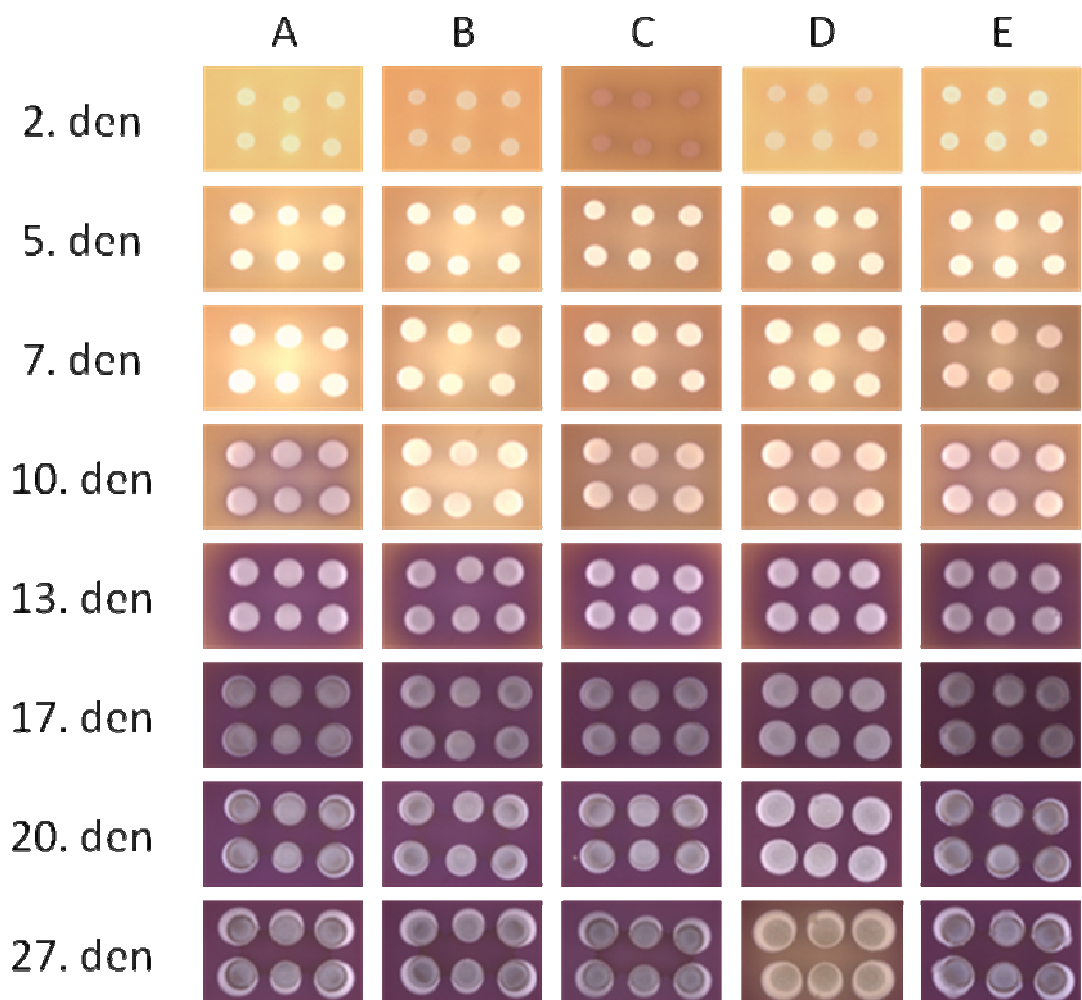
Abych zjistil vertikální lokalizaci buněčných subpopulací a buněk produkujících vybrané fúzní proteiny, vytvářel jsem pomocí mikrotomu 10 a 20 μm tlusté řezy z centrálních oblastí kolonií, které jsem následně analyzoval pod mikroskopem (3.2.21. Řezy kvasinkových kolonií). Při zvětšení 400x jsem pozoroval 20 μm tlusté řezy, na nichž jsem sledoval strukturu a celkové rozložení fluorescence buněčných vrstev. Detailní pozorování fluorescence jednotlivých buněk ve vybraných oblastech jsem prováděl při zvětšení 1000x s imerzním olejem a řezy tlustými 10 μm . U 20 μm tlustých řezů jsem pozoroval vnější okraj a střední část kolonie. U 10 μm řezů jsem pak na vnějším okraji pozoroval buňky s větším rozlišením. Ve střední části kolonie jsem sledoval horní okraj kolonie, dolní okraj kolonie u agaru a střední vrstvu kolonie. V pozdějších časech vývoje jsem se ještě navíc zajímal o přechodovou oblast mezi populací malých buněk dole a velkých buněk nahoře.

Pokus probíhal na GMA pevném médiu. Kolonie, které jsem pozoroval pod mikroskopem a dále s nimi pracoval, rostly na miskách bez pH indikátoru. Misky, na nichž jsem pozoroval přepínání mezi acidickou a alkalickou fází vývoje kolonií, obsahovaly navíc pH indikátor BKP.

V případě kontrolního kmene BY4742 probíhal přechod kolonií do alkalické fáze během desátého dne. Podle zbarvení misek došlo k silné alkalizaci, a nebylo tedy

možno pozorovat druhou acidickou fázi během dalšího vývoje až do cca třicátého dne, kdy začalo docházet k „odbarvování“ pH indikátoru. Morfologicky se rodičovský kmen choval stejně jako v předchozích pokusech.

U kolonií kmenů Stl1p-GFP, Pdr5p-GFP, Pho89p-GFP a Fet3cp-GFP také došlo k začátku alkalizace během desátého až jedenáctého dne a průběh alkalizace byl stejný jako u rodičovského BY4742. Pouze u Stl1p-GFP došlo k „odbarvení“ média dříve, v průběhu dvacátého sedmého dne. Morfologický vývoj kolonií fúzních kmenů byl podobný rodičovskému kmeni.



Obrázek 23: Vývoj kolonie v čase a její morfologie na GMA: A) kontrolní rodičovský kmen BY4742; B) kmen BY-Pdr5-GFP; C) kmen BY-Stl1-GFP; D) BY-Pho89-GFP; E) kmen BY-Fet3-GFPc.

4.2.1.1. Buněčné subpopulace kolonií kmene BY4742

Při sledování autofluorescence řezů kolonií BY4742 bylo zřejmé, že v počátečních fázích růstu kolonie mají nejvýraznější autofluorescenci buňky u horního okraje kolonie. Zde svítí vrstva o tloušťce několika buněk, která je i morfologicky odlišná od zbytku kolonie (Obrázek 24, 25, 26). V době přepnutí kolonie z acidické do alkalické fáze růstu dochází k oddělení dvou subpopulací buněk, jež se morfologicky liší. Ve spodní části kolonie jsou buňky malé, s výraznou vakuolou, která zabírá velkou část prostoru buňky, zatímco v horní části kolonie jsou buňky velké, většinou bez výrazné vakuoly a s dobře pozorovatelnými lipidickými partikulami. Od desátého dne můžeme také pozorovat nárůst autofluorescence ve spodní části kolonie, přibližně uprostřed vrstvy malých buněk. Rovněž od desátého dne se neustále zvětšuje tloušťka horní části kolonie s velkými buňkami. Na konci pozorovaného vývoje (den 27) je tloušťka obou vrstev srovnatelná. Přechod mezi oběma populacemi je výrazný (**Error! Reference source not found.**, 28, 29,30, 31)). V pozdějších fázích vývoje (**Error! Reference source not found.**, 28, 29,30, 31) můžeme sledovat rozdílnou autofluorescenci v obou hlavních vrstvách buněk kolonie. Ve vrstvě velkých buněk nahoře je autofluorescence nejsilnější na povrchu kolonie a směrem dolů klesá až k „hranici“ s malými buňkami. Ve vrstvě malých buněk od „hranice“ s horní vrstvou velkých buněk směrem ke středu této vrstvy autofluorescence roste. Od středu k povrchu média pak opět klesá.

Kromě diferenciací kolonie na dvě hlavní subpopulace vzniká malá subpopulace buněk (několik buněčných vrstev), která se nachází na rozhraní kolonie a agaru. Tyto buňky jsou velmi podobné buňkám v horní části kolonie, jsou též velké, bez viditelné vakuoly a s výraznými lipidickými partikulami. Předmětná subpopulace buněk je však technicky obtížně pozorovatelná, a to především v pozdějších fázích vývoje kolonie, jelikož se buňky na spodu kolonie agarózou relativně špatně fixují a často jsou během řezání vzorku odplaveny.

Další, poměrně velkou, subpopulací jsou buňky na vnějším okraji kolonie. Tyto buňky se svou velikostí podobají v pozdějších fázích růstu buňkám ze spodní vrstvy kolonie, mají však protáhlejší tvar a nemají tak výraznou vakuolu. Zmiňované buňky mají menší autofluorescenci.

4.2.1.2. Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Pdr5-GFP

U kolonií kmene Pdr5p-GFP je druhý den vidět silnější signál buněk z vrchní části kolonie (Obrázek 32). U buněk ze středu a ze spodní části kolonie sice je viditelný signál na membráně, ale je slabý. Vnější okraj se co do intenzity fluorescence opět podobá horním buňkám kolonie.

Signál ve spodních buňkách v průběhu vývoje rychle mizí a od pátého dne už není vidět vůbec (Obrázek 32). V horních buňkách se GFP fluorescence udržuje déle (Obrázek 32) a k jejímu výraznému snížení dochází až kolem sedmého dne (Obrázek 32). Po tomto časovém mezníku je ještě na několika snímcích pozorovatelný slabý GFP signál z vakuol zmiňovaných buněk (Obrázek 32-36). Nejdéle je viditelný fluorescenční signál v buňkách z vnějšího okraje kolonie, kde je možno pozorovat slabý signál na membráně ještě desátý den (Obrázek 32). V následující časové fázi už není až do konce sledovaného vývoje možno najít v kolonii žádný GFP signál (Obrázek 32, 36, 37, 38, 39).

4.2.1.3. Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Stl1-GFP

V průběhu prvních dní vývoje kolonie je Stl1p-GFP lokalizován v celé kolonii (Obrázek 40). Třetí den pokusu mají horní buňky slabý GFP signál na membráně a je u nich také vidět slabý GFP signál z vakuoly (Obrázek 40). Tento profil GFP fluorescence je typický pro buňky zhruba v horní třetině kolonie. Ve spodních dvou třetinách mají buňky slabší GFP signál, s výjimkou buněk těsně nad agarem, které mají nejsilnější GFP fluorescenci v rámci celé kolonie. U buněk ve spodní části kolonie též není vidět signál ve vakuolách, ale objevují se u nich cytosolické partikule s velmi silnou fluorescencí (Obrázek 40). Většinou je vidět jedna partikule na buňku a nedá se přesně určit, o jakou buněčnou komponentu se jedná. Vnější okraj kolonie má podobnou fluorescenci jako buňky v horní části kolonie.

Od pátého dne vývoje kolonie však v jejích horních částech dochází k přesunu GFP fluorescence do vakuol (Obrázek 41). V horních vrstvách buněk už není vidět GFP signál na membráně. Velmi slabý signál je viditelný na buňkách ve spodních vrstvách kolonie. Fluorescence vnějšího okraje poklesla, ale je stále jasně pozorovatelná a je nejsilnější v celé kolonii (Obrázek 41).

V horních vrstvách se v pozdějším časovém stadiu vývoje objevuje pouze GFP signál z vakuol, který časem slábne, zřejmě tím, jak je GFP degradováno (Obrázek 41 43, 44). Signál ve střední části kolonie skoro není a je překryt autofluorescencí, jež je v této části kolonie nejsilnější (Obrázek 413, 45, 46, 47). Buňky ve spodní části kolonie udržují GFP signál o něco déle (Obrázek 41, 42). Ještě desátý den je možno pozorovat GFP signál na membráně, poté i z těchto buněk mizí (Obrázek 41). Intenzita GFP signálu u buněk z vnějšího okraje klesá zhruba do 10.–12. dne, avšak ke konci sledovaného vývoje se opět mírně zvyšuje (Obrázek 413, 45, 46, 47).

4.2.1.4. Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Pho89-GFP

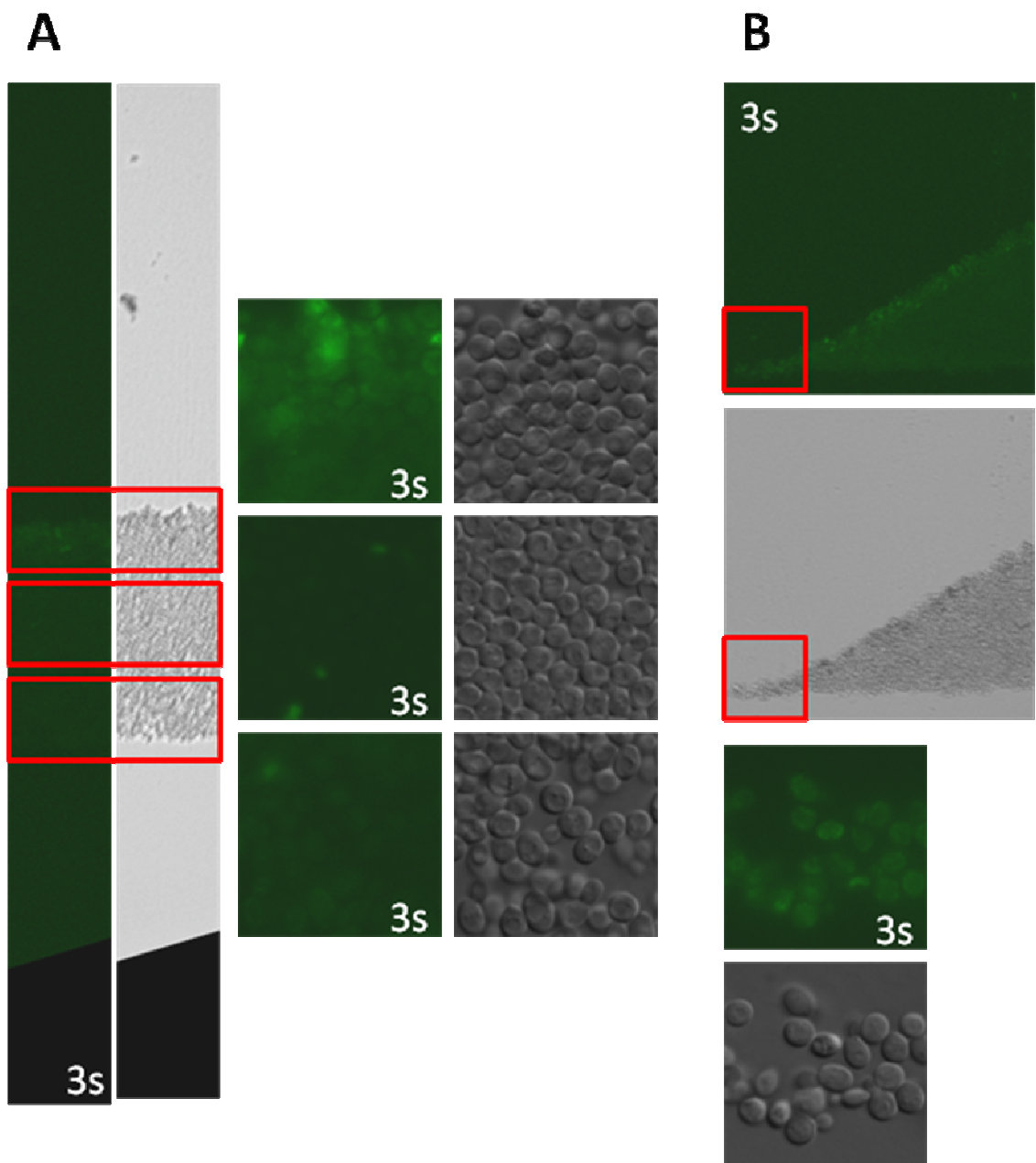
Během počátečního vývoje zkoumané kolonie kmene Pho89p-GFP je pozorovatelná pouze autofluorescence (Obrázek 32, 49, 50). Jediná pozorovatelná GFP fluorescence se objevila ve vnějším okraji kolonie v době po začátku alkalizace. Od desátého dne vývoje je tedy vidět velmi slabý signál GFP na membráně a v endoplazmatickém retikulu buněk okraje kolonie (Obrázek 32, 52, 53, 54, 55).

4.2.1.5. Buněčné subpopulace kolonií kmene BY-Fet3-GFPc

Nejvýraznější fluorescence byla pozorovatelná u kolonií kmene Fet3c-GFP. V časných fázích vývoje kolonie je vidět signál GFP na cytoplazmatické membráně všech buněk v kolonii, často je také viděna lokalizace GFP v endoplazmatickém retikulu (Obrázek 41 57, 58). Nejsilnější GFP signál je v buňkách v horní třetině kolonie a na jejím vnějším okraji. Během vývoje kolonie (od cca 7. dne) se GFP signál v jejích horních buňkách přesouvá do vakuol (Obrázek 41 58). Intenzita GFP signálu na membráně u těchto buněk klesá, ale po celou dobu sledovaného vývoje je vidět (Obrázek 41 62, 63). Buňky ve střední části kolonie postupně GFP signál ztrácejí. Od desátého dne u nich přestává být viditelná GFP membránová lokalizace a je pozorovatelný pouze silný GFP signál z endoplazmatického retikula (Obrázek 41 62, 63). Buňky ze spodní části kolonie mají na začátku vývoje nejslabší signál v rámci celé kolonie. Během vývoje jim sice klesá, ale u těchto buněk není viděn přesun signálu do vakuol a jeho následná degradace (Obrázek 41 62, 63).

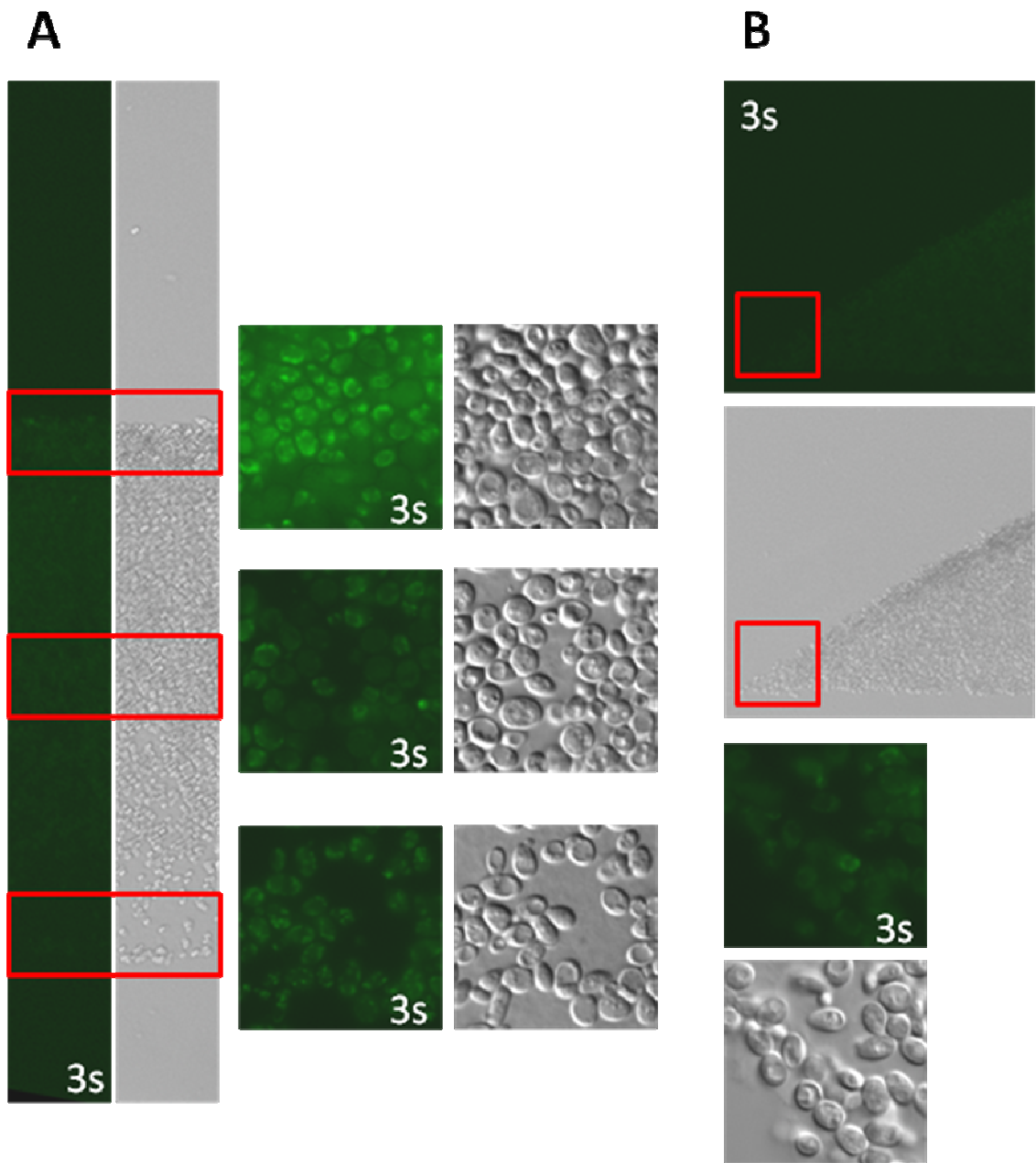
Nejzajímavěji se z celé kolonie chová vnější okraj. Buňky v této části kolonie mají na začátku silný GFP signál, který postupně slábne, avšak po přechodu kolonie z acidické do alkalické fáze vývoje dochází nejspíše k zesílené produkci daného proteinu, protože intenzita fluorescence se během alkalizace výrazně zvyšuje. Po zmiňovaném zvýšení GFP signálu dochází opět k jeho postupnému zeslabování (Obrázek 41 62, 63).

2. Den BY4742



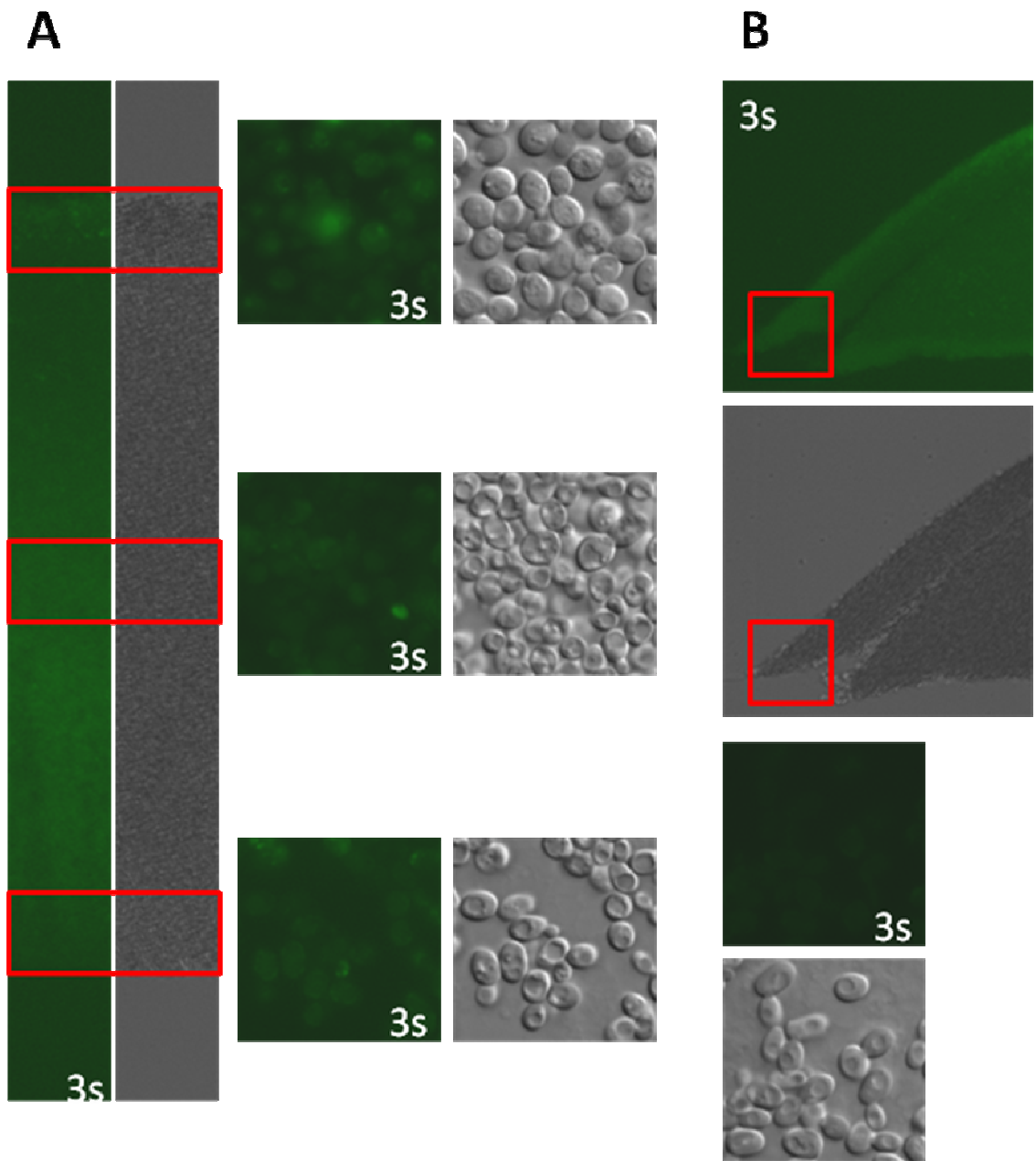
Obrázek 24: Řez dvoudenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

5. Den BY4742



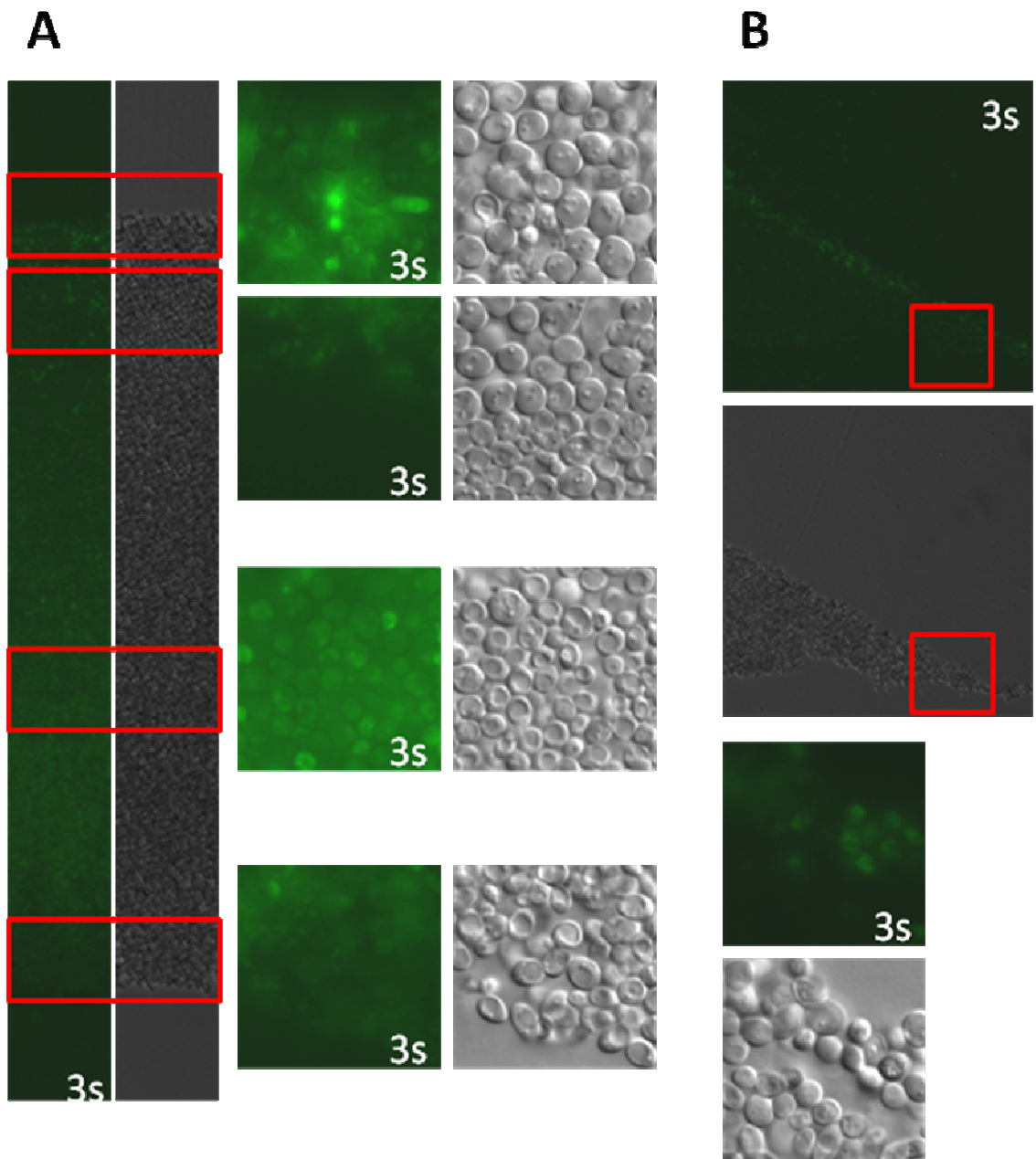
Obrázek 25: Řez pětidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

7. Den BY4742



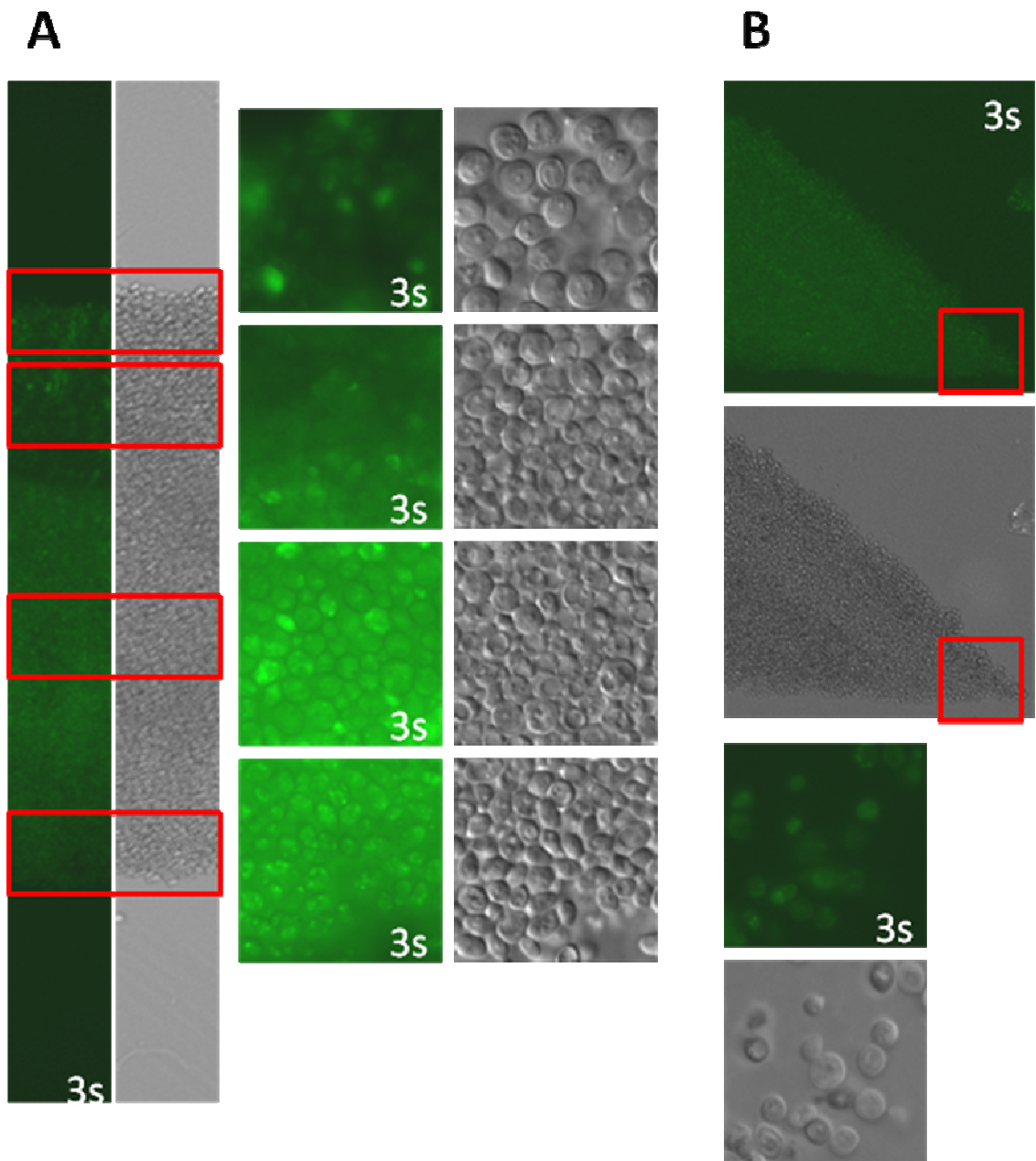
Obrázek 26: Řez sedmidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

10. Den BY4742



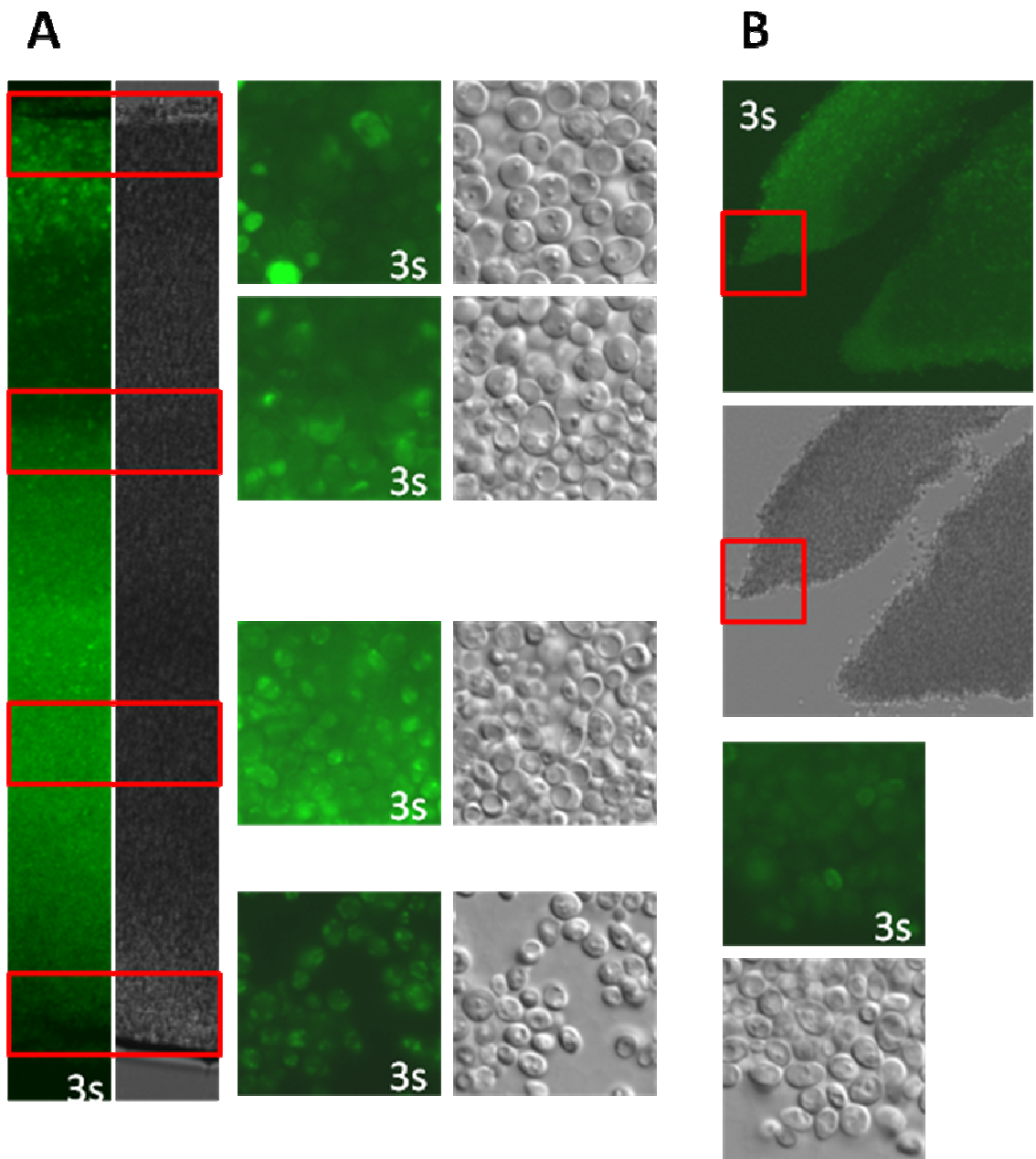
Obrázek 27: Řez desetidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

13. Den BY4742



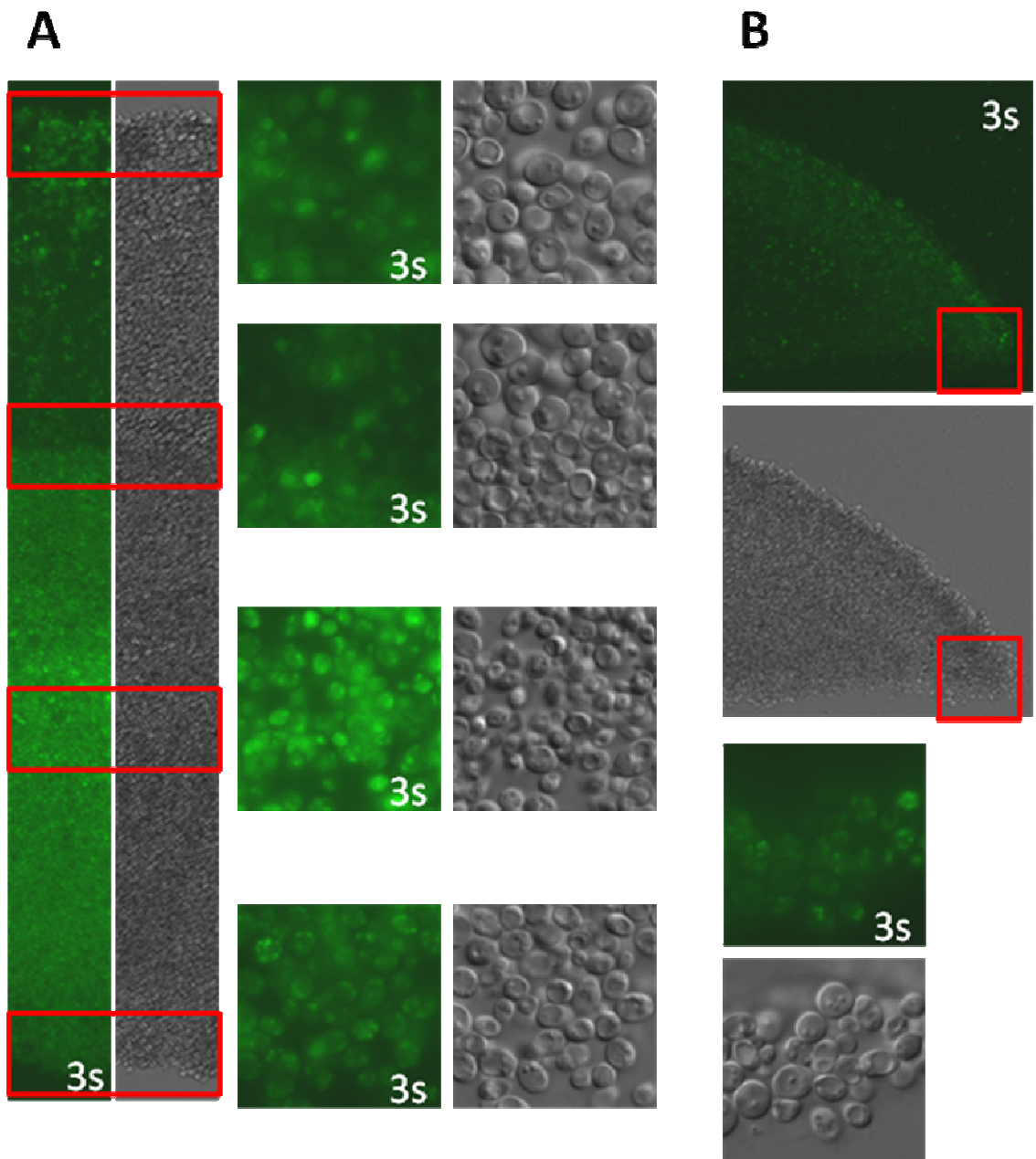
Obrázek 28: Řez třináctidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

17. Den BY4742



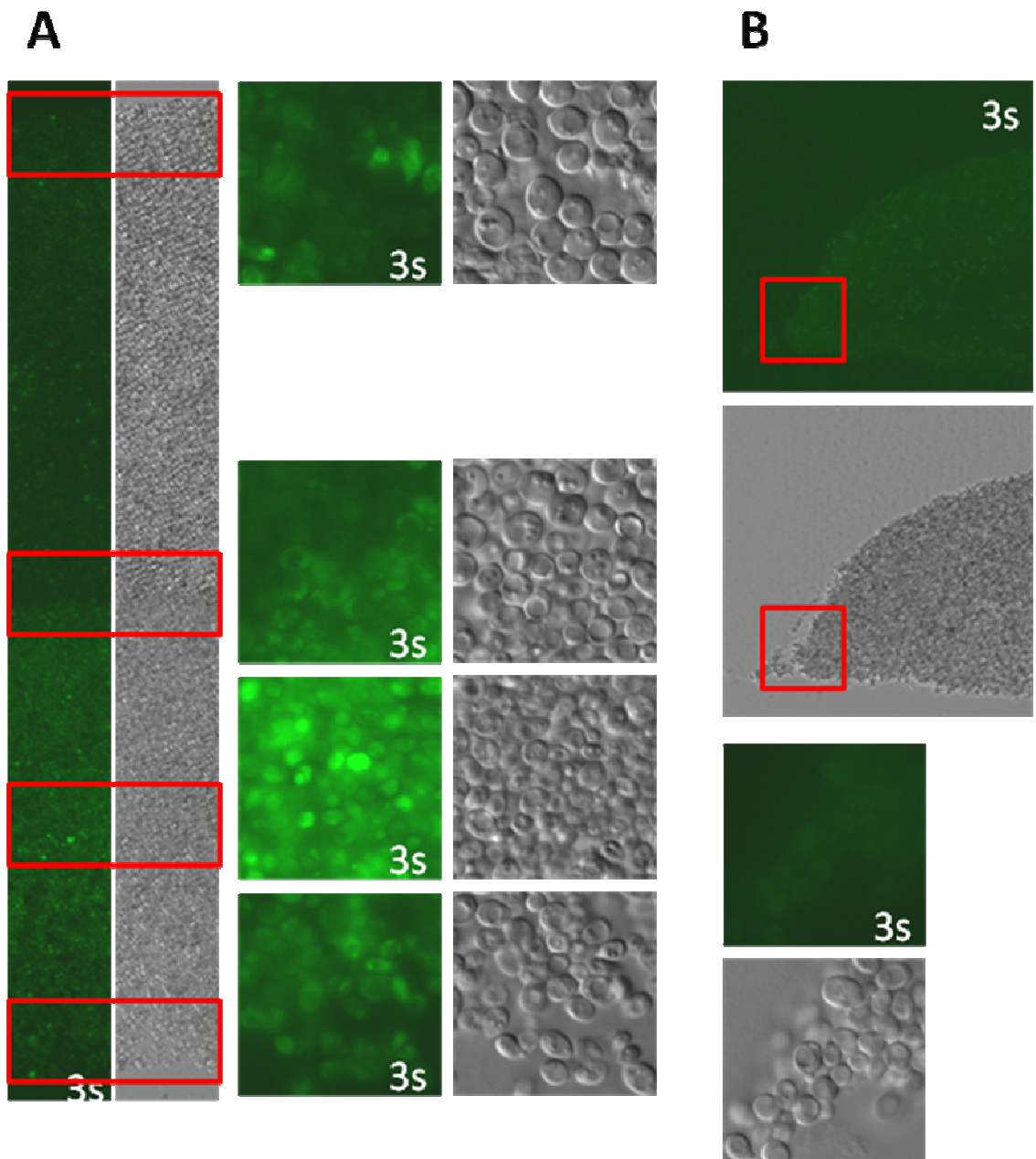
Obrázek 29: Řez sedmnáctidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

20. Den BY4742



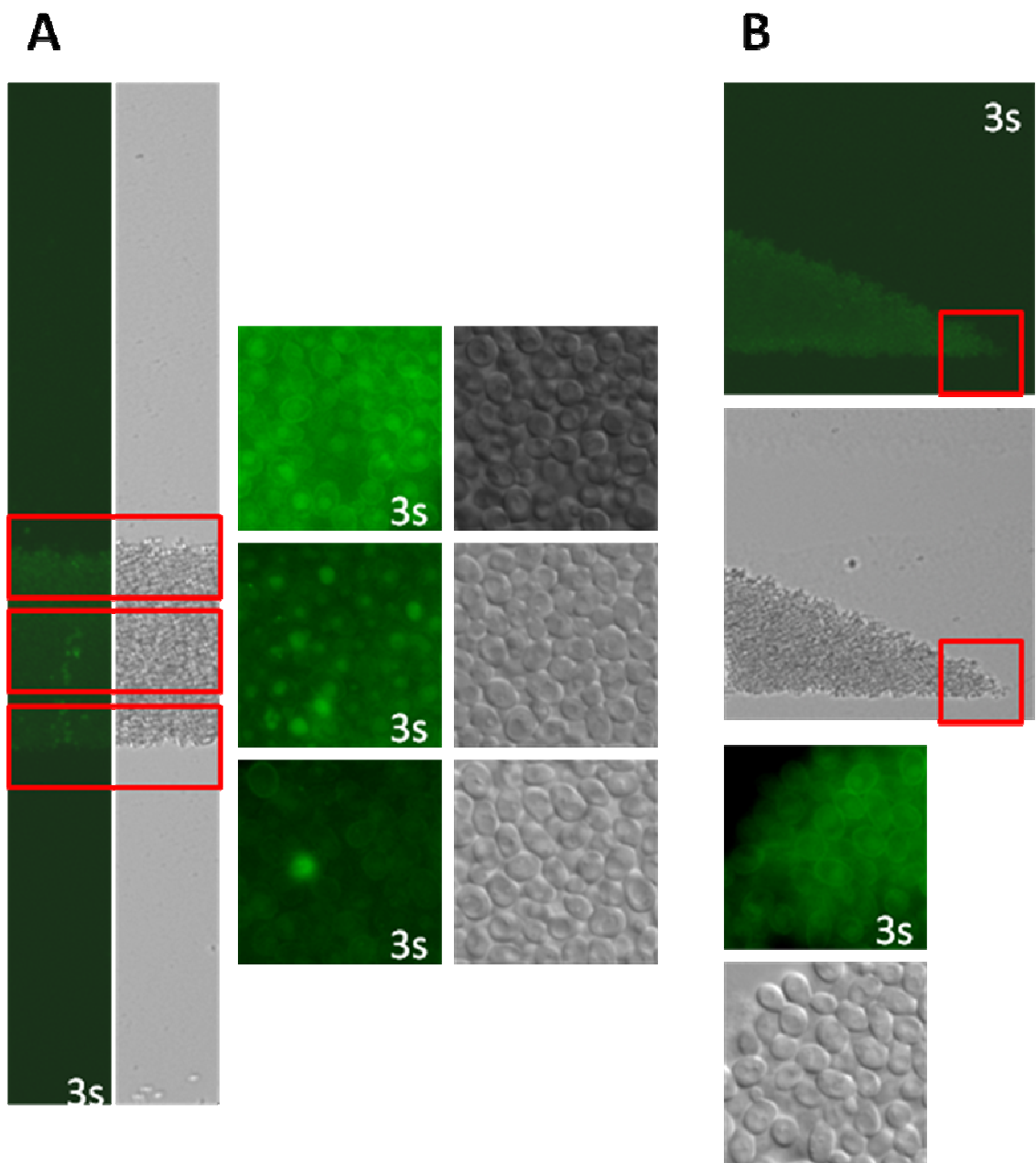
Obrázek 30: : Řez dvacetidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

27. Den BY4742



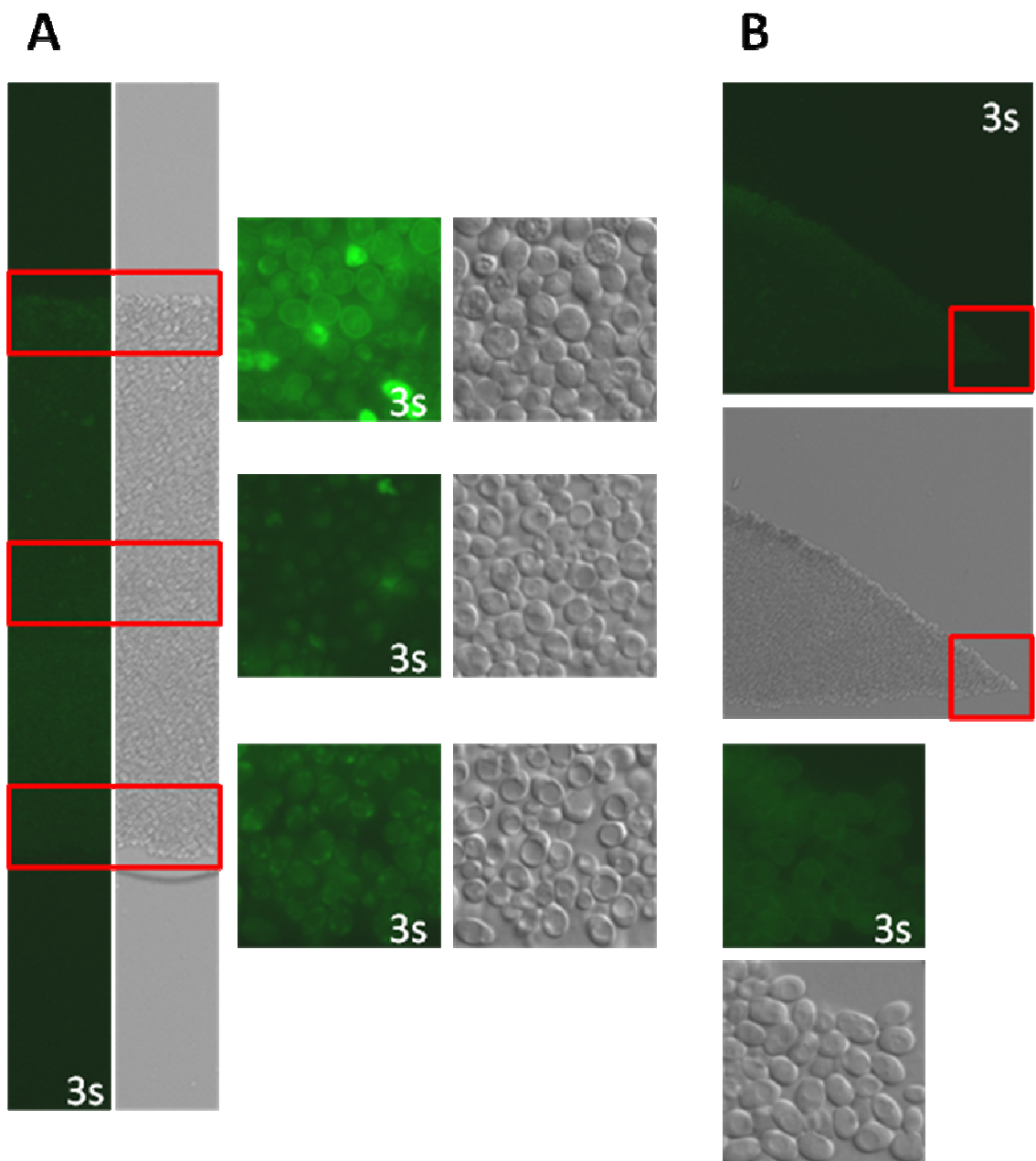
Obrázek 31: Řez dvacetisedmidenní kolonií kontrolního kmene BY4742 na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

2. Den Pdr5-GFP



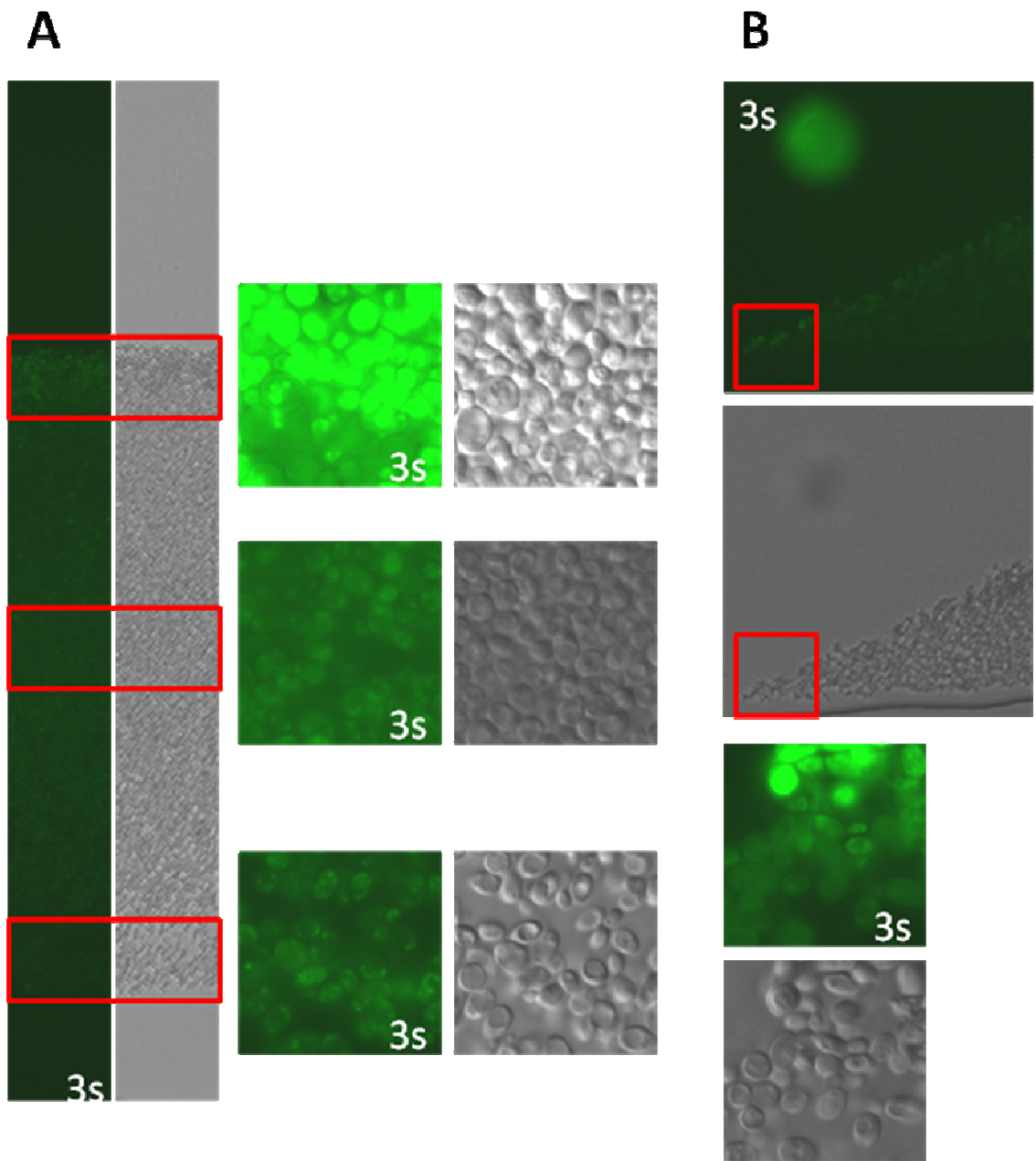
Obrázek 32: Řez dvoudenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

5. Den Pdr5-GFP



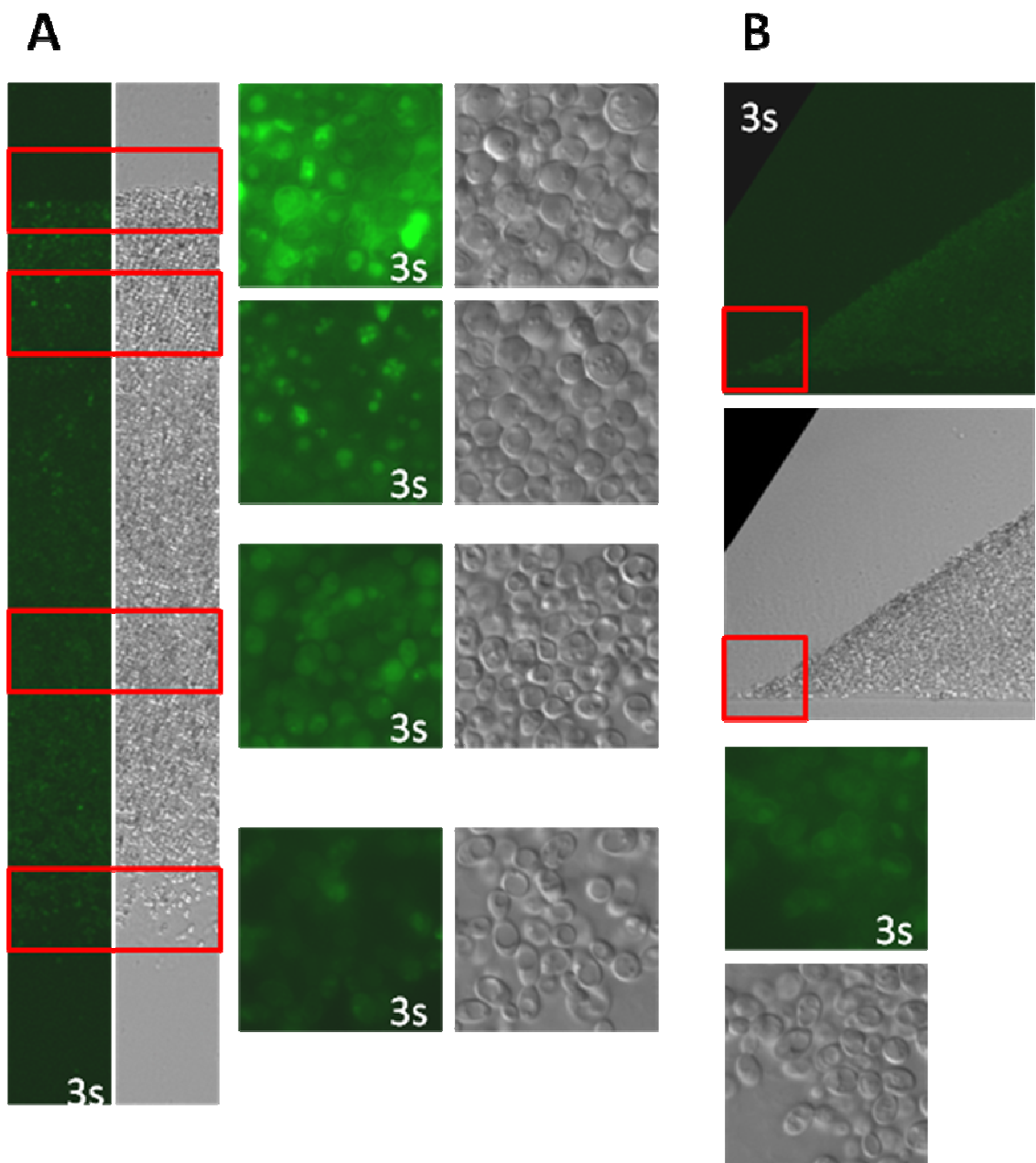
Obrázek 33: Řez pětidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

7. Den Pdr5-GFP



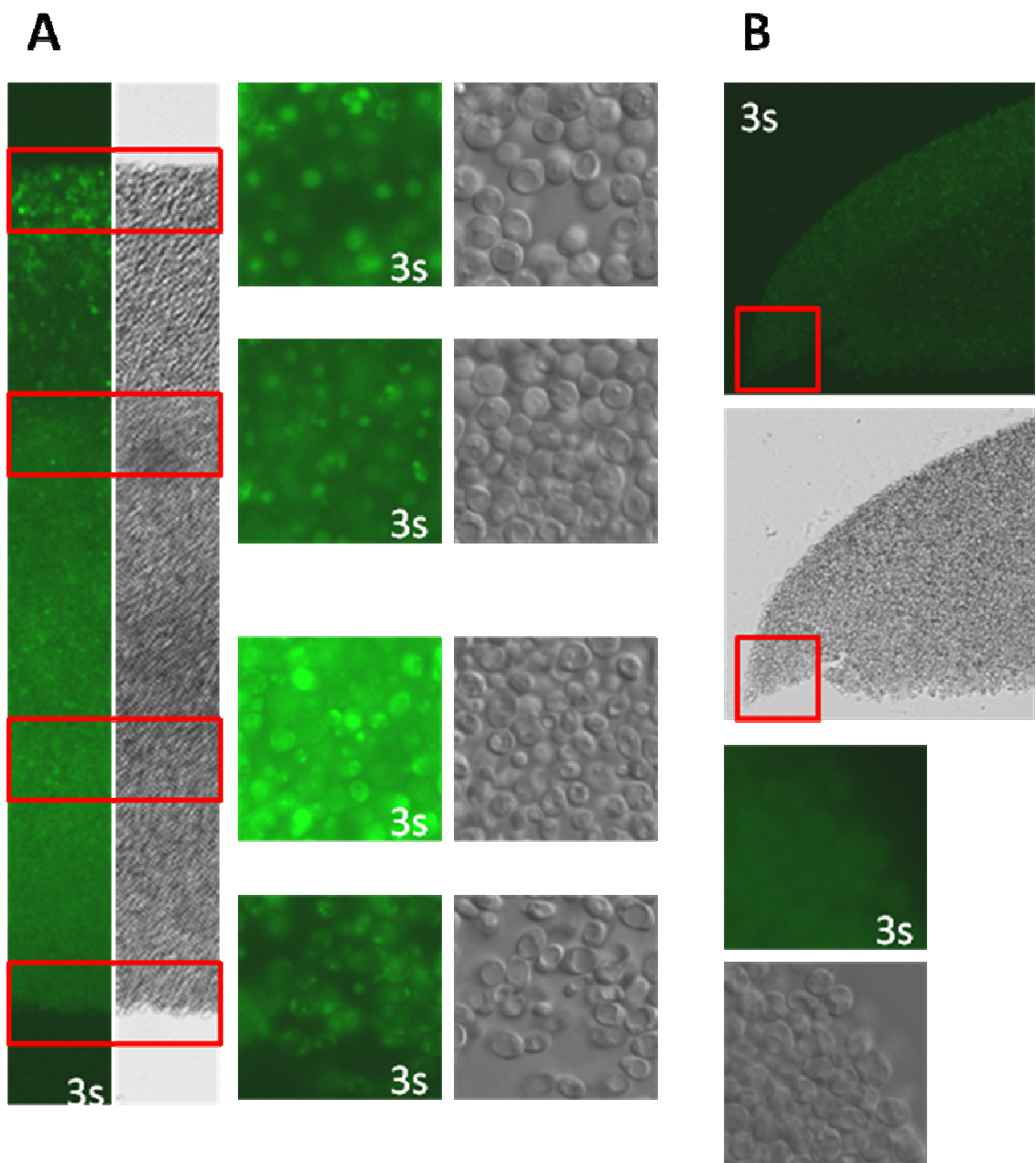
Obrázek 34: Řez sedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

10. Den Pdr5-GFP



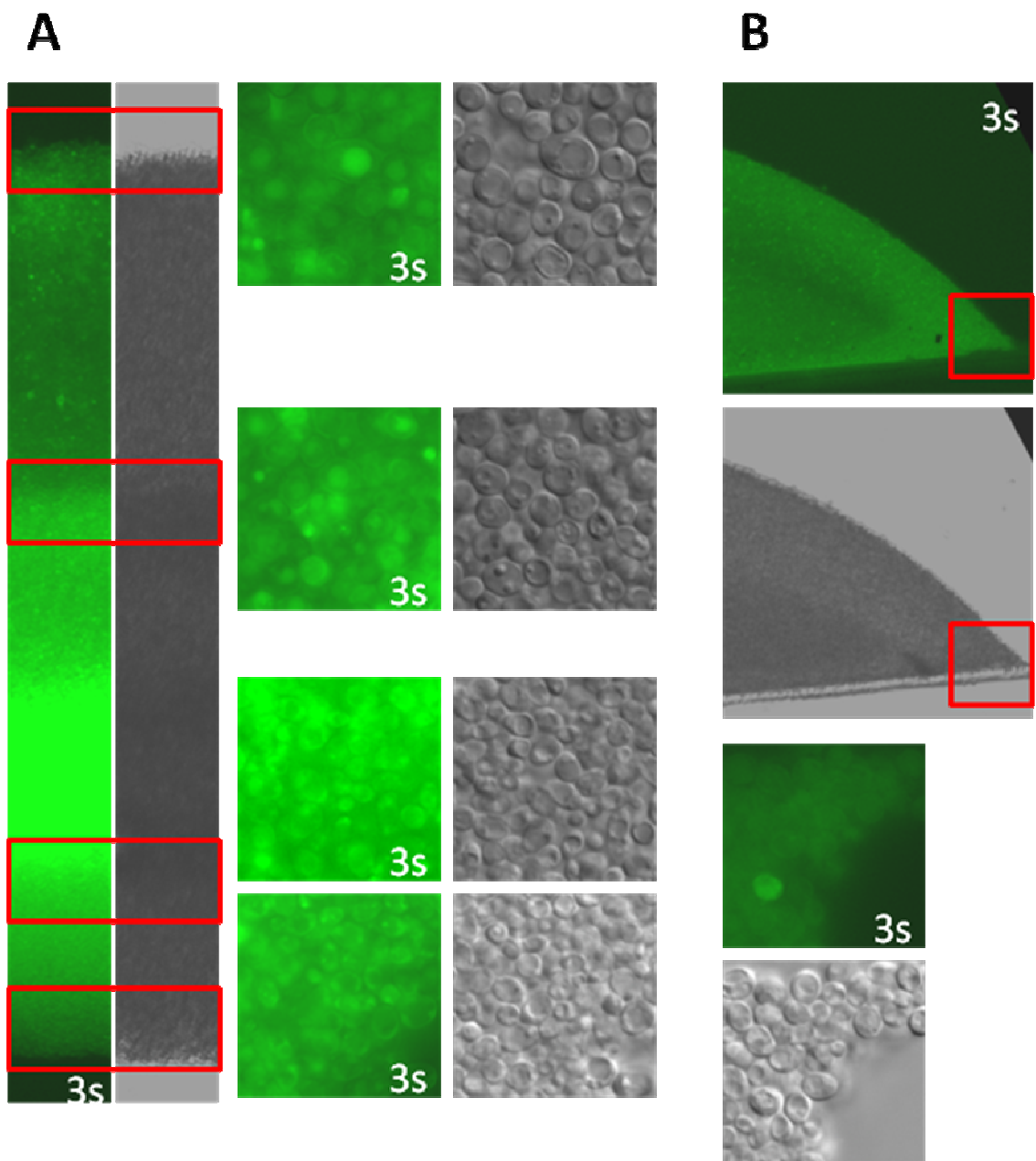
Obrázek 35: Řez desetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

13. Den Pdr5-GFP



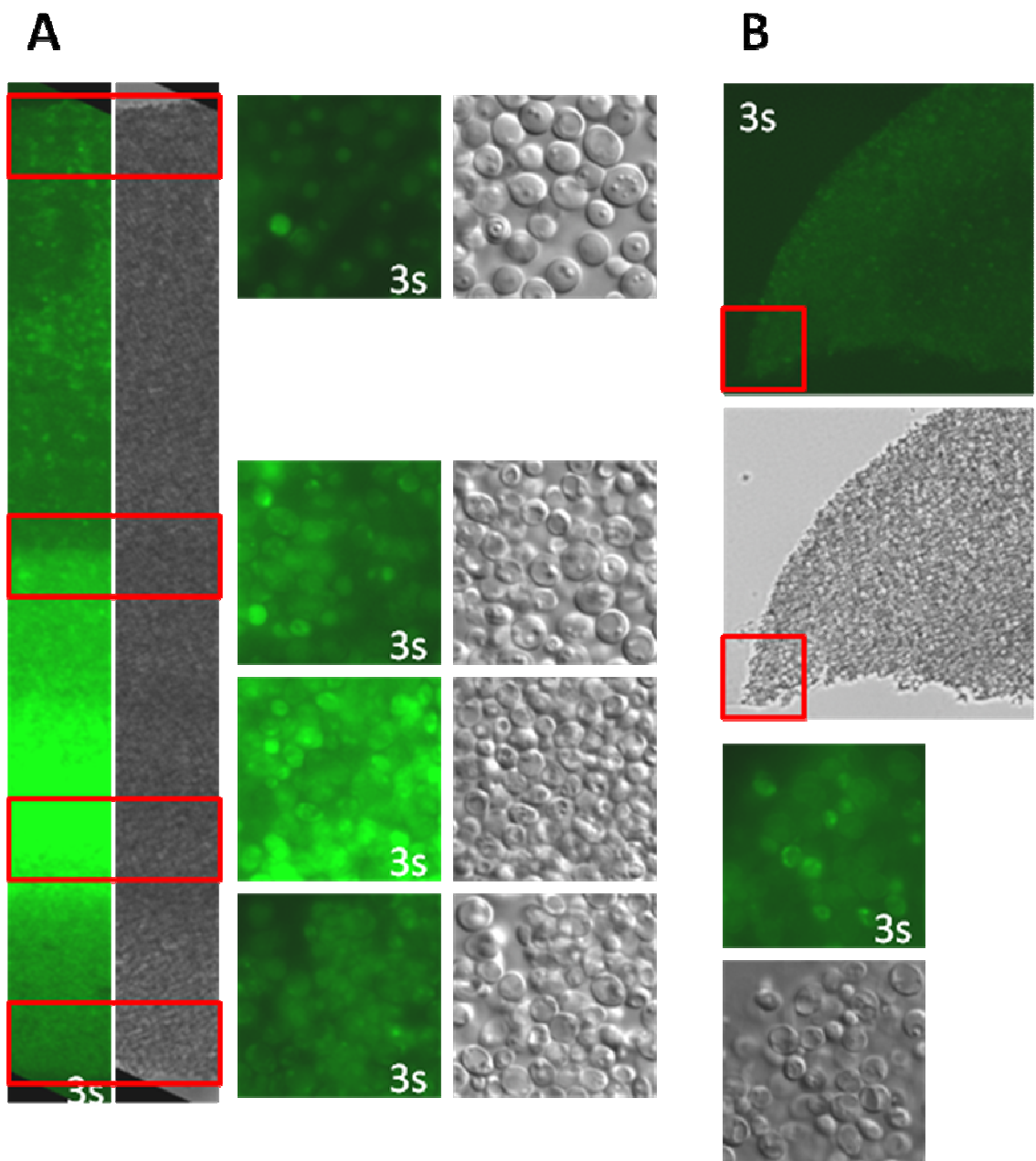
Obrázek 36: Řez třináctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

17. Den Pdr5-GFP



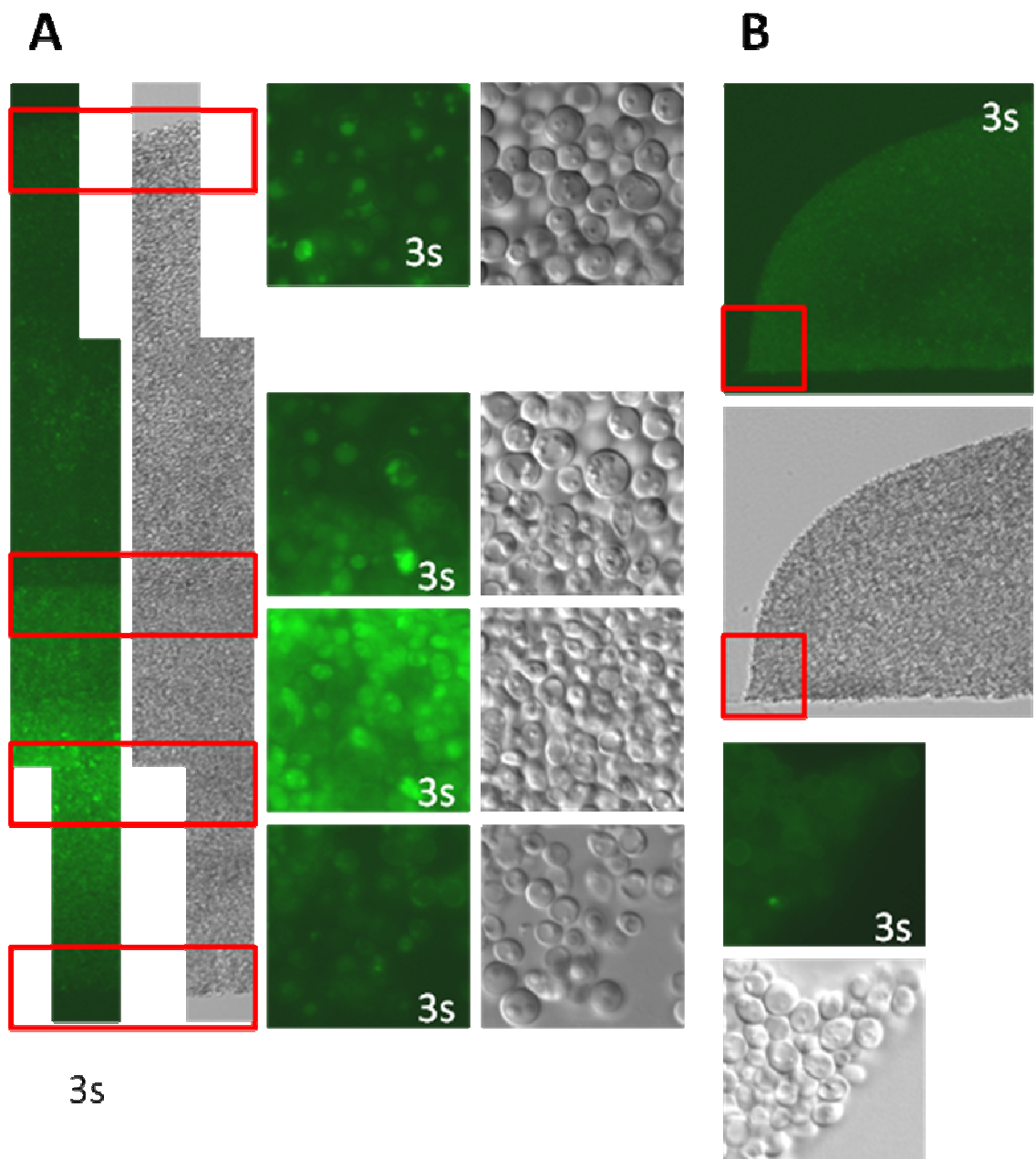
Obrázek 37: Řez sedmnáctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

20. Den Pdr5-GFP



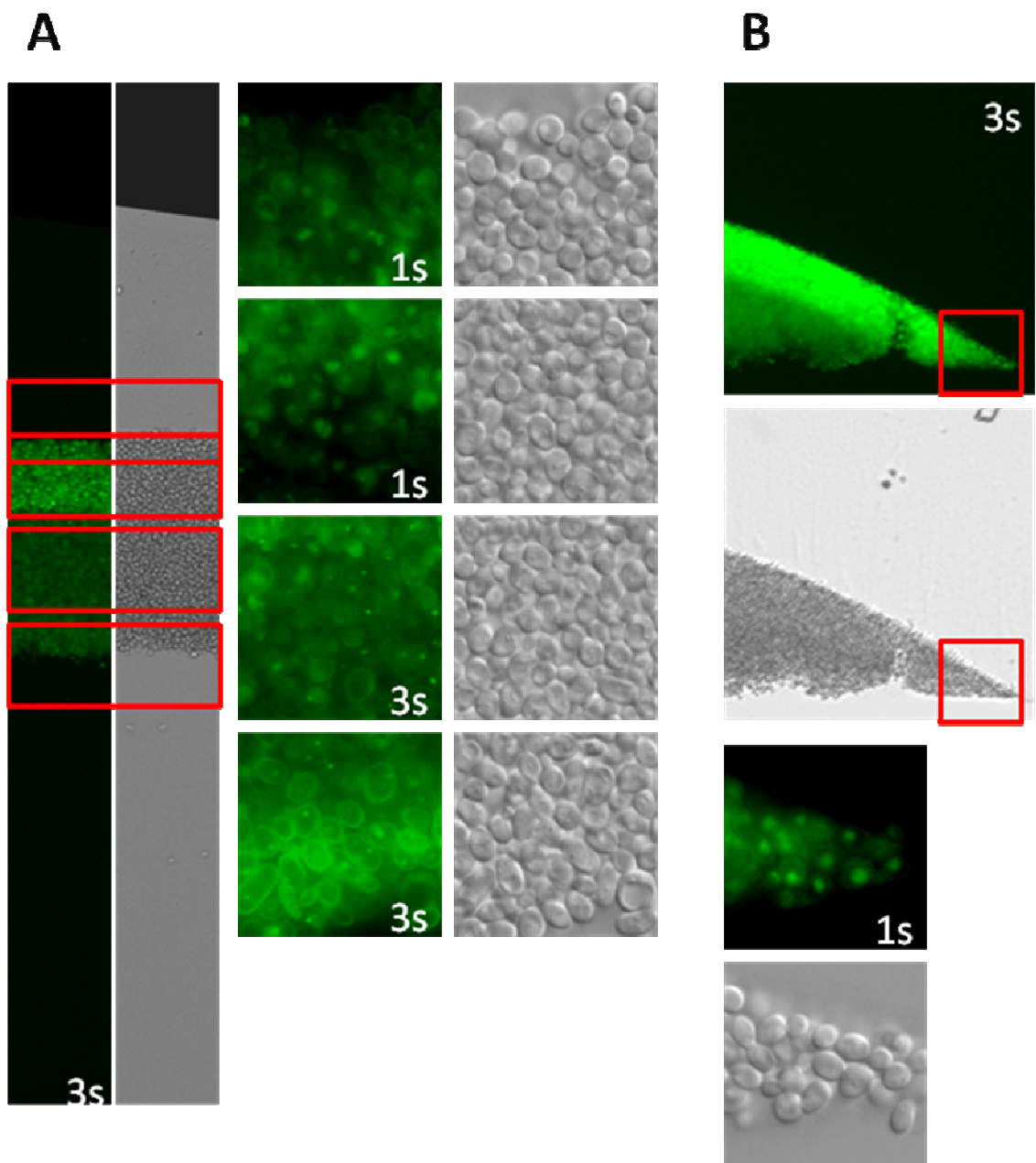
Obrázek 38: Řez dvacetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

27. Den Pdr5-GFP



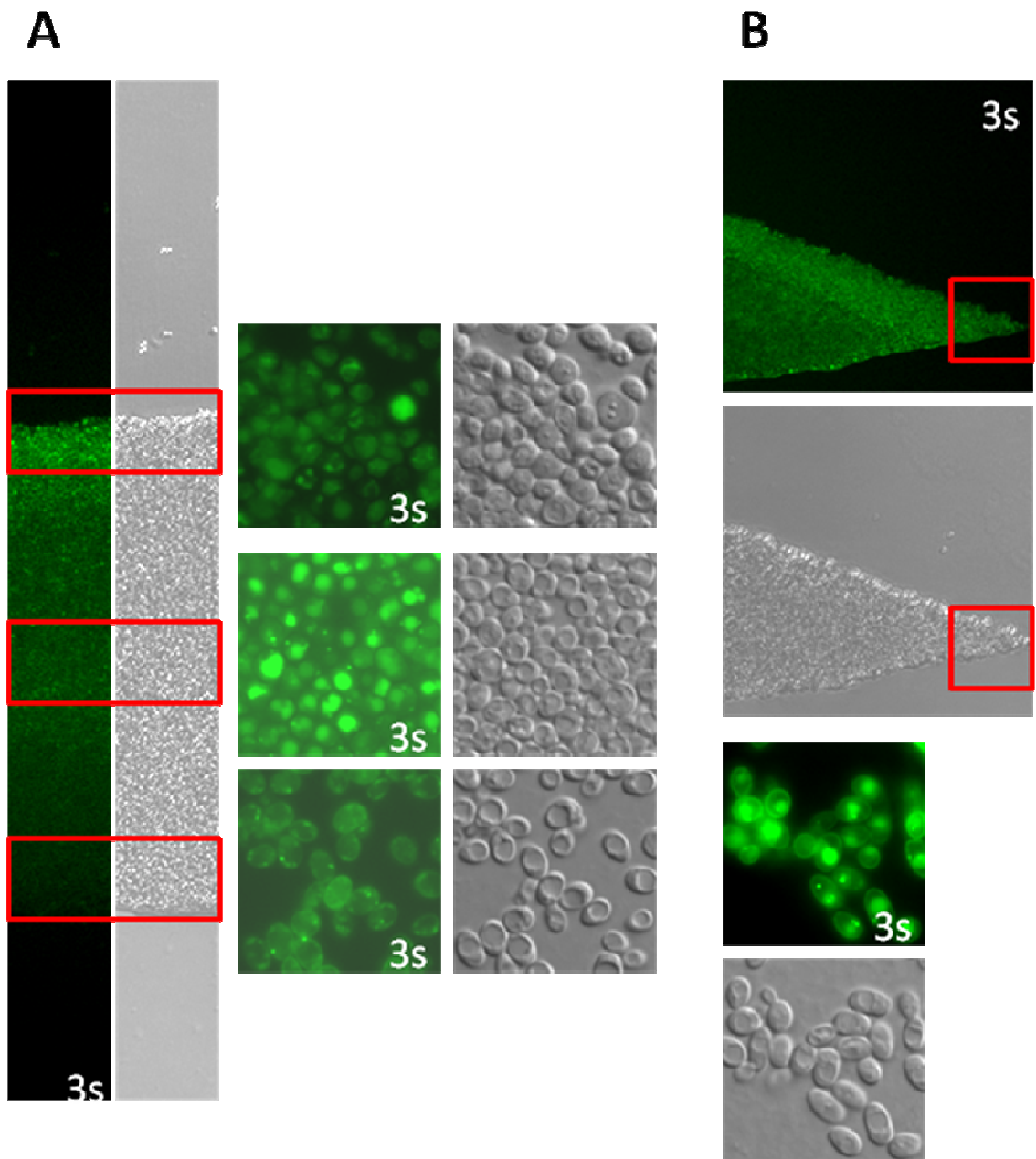
Obrázek 39: Řez dvacetisedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pdr5-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

2. Den StI1-GFP



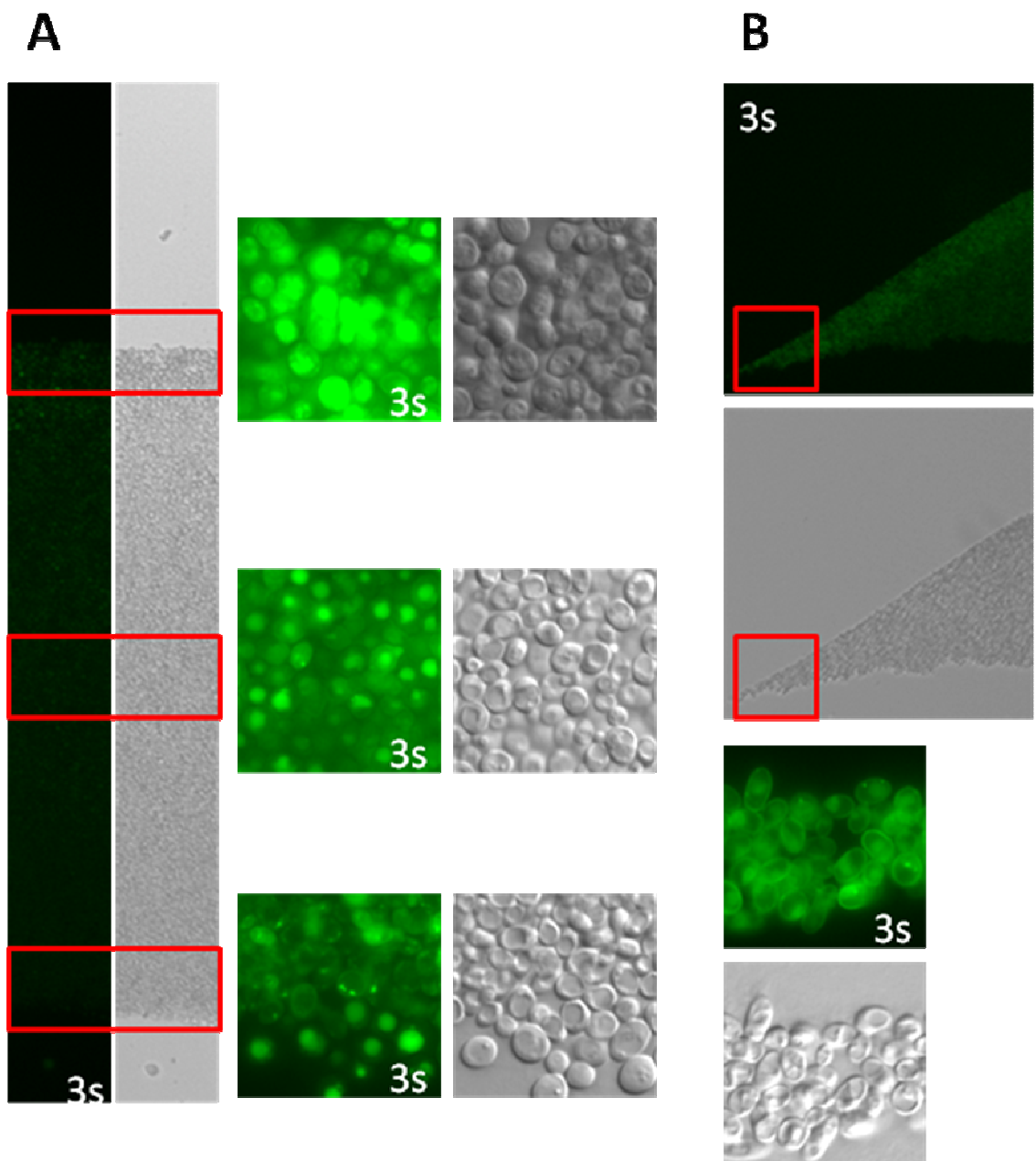
Obrázek 40: Řez dvoudenní kolonií transformovaného kmene BY-StI1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje a podokraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

5. Den StI1-GFP



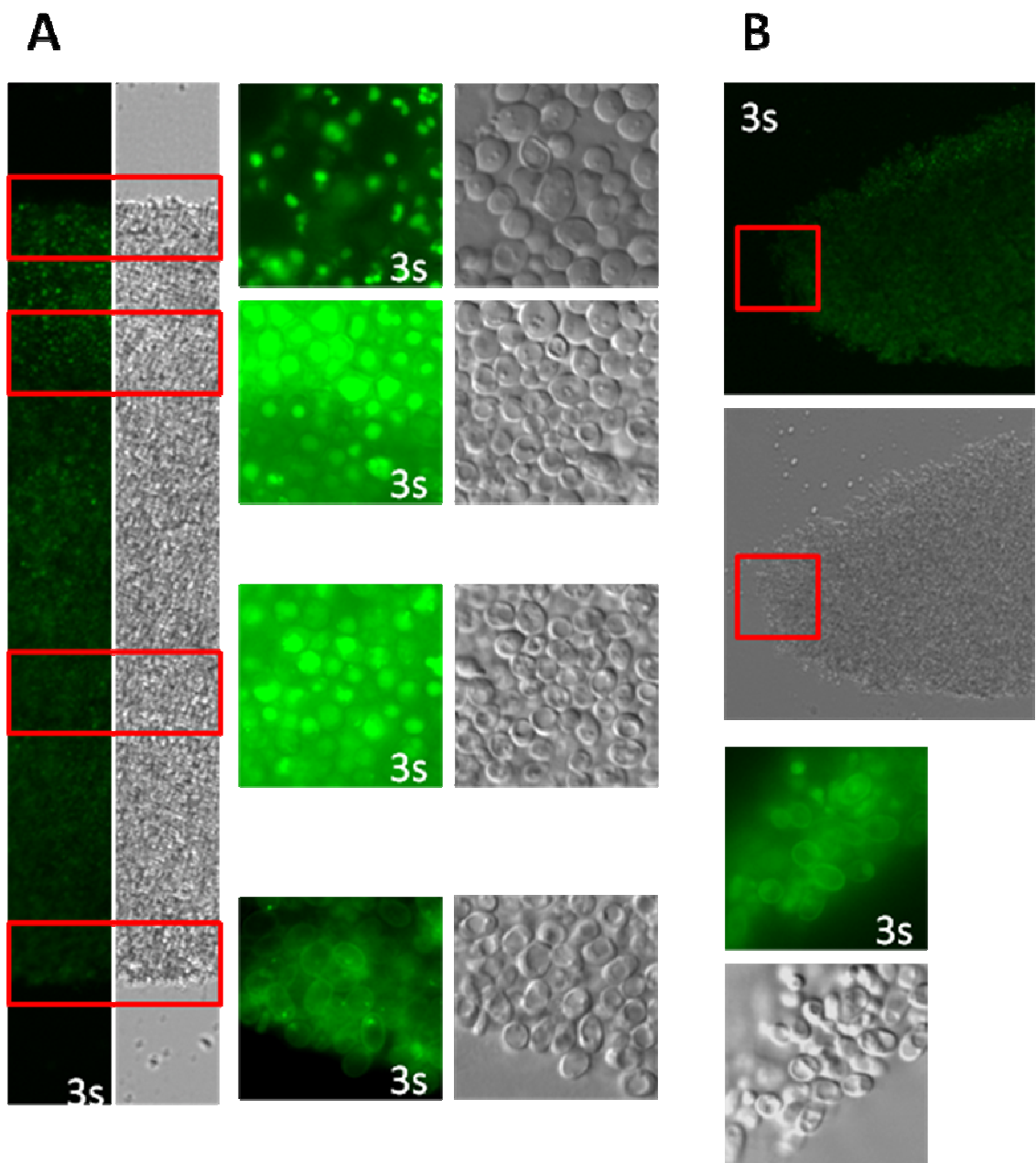
Obrázek 41: Řez pětidenní kolonií transformovaného kmene BY-StI1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

7. Den Stl1-GFP



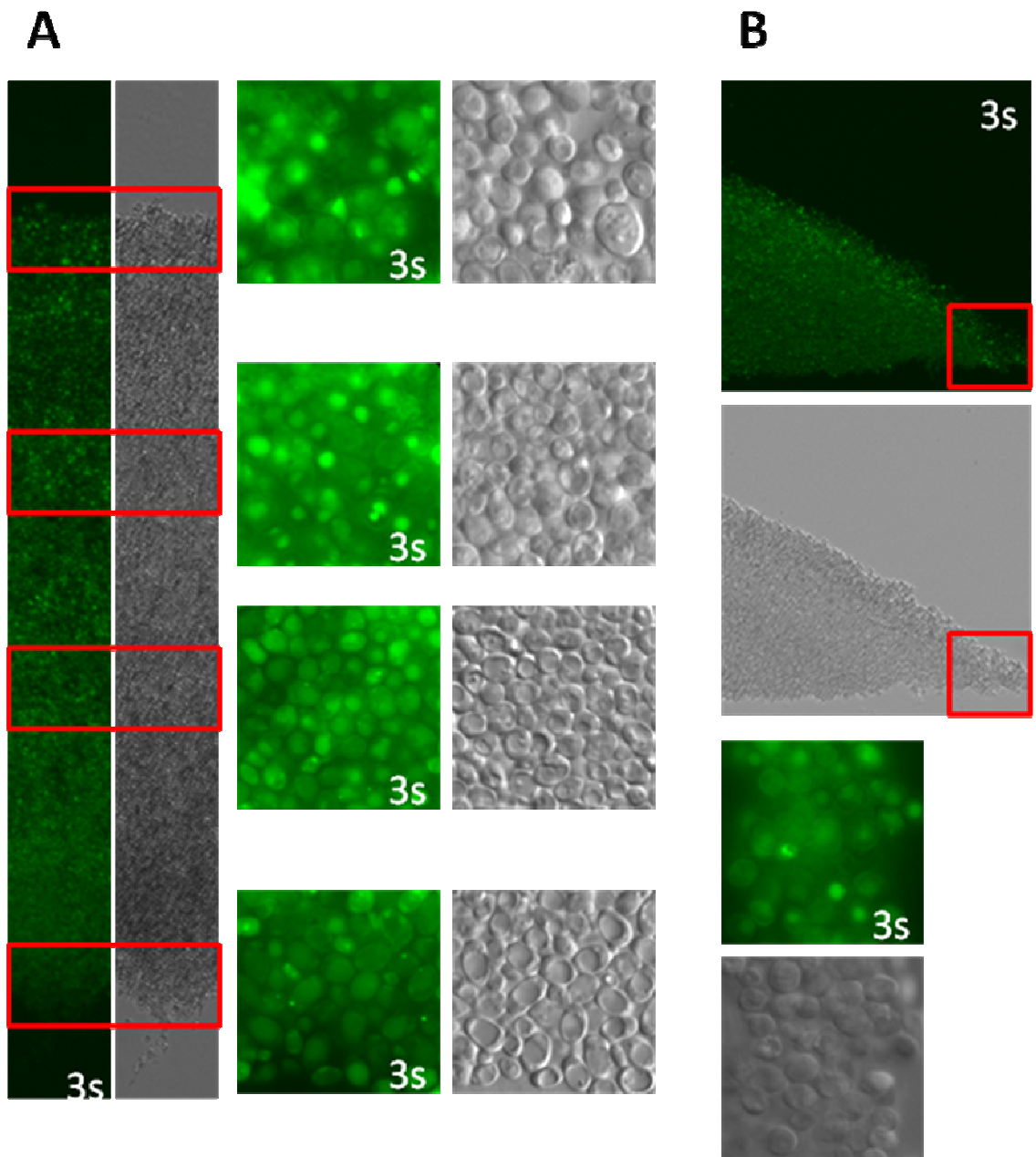
Obrázek 42: Řez sedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

10. Den Stl1-GFP



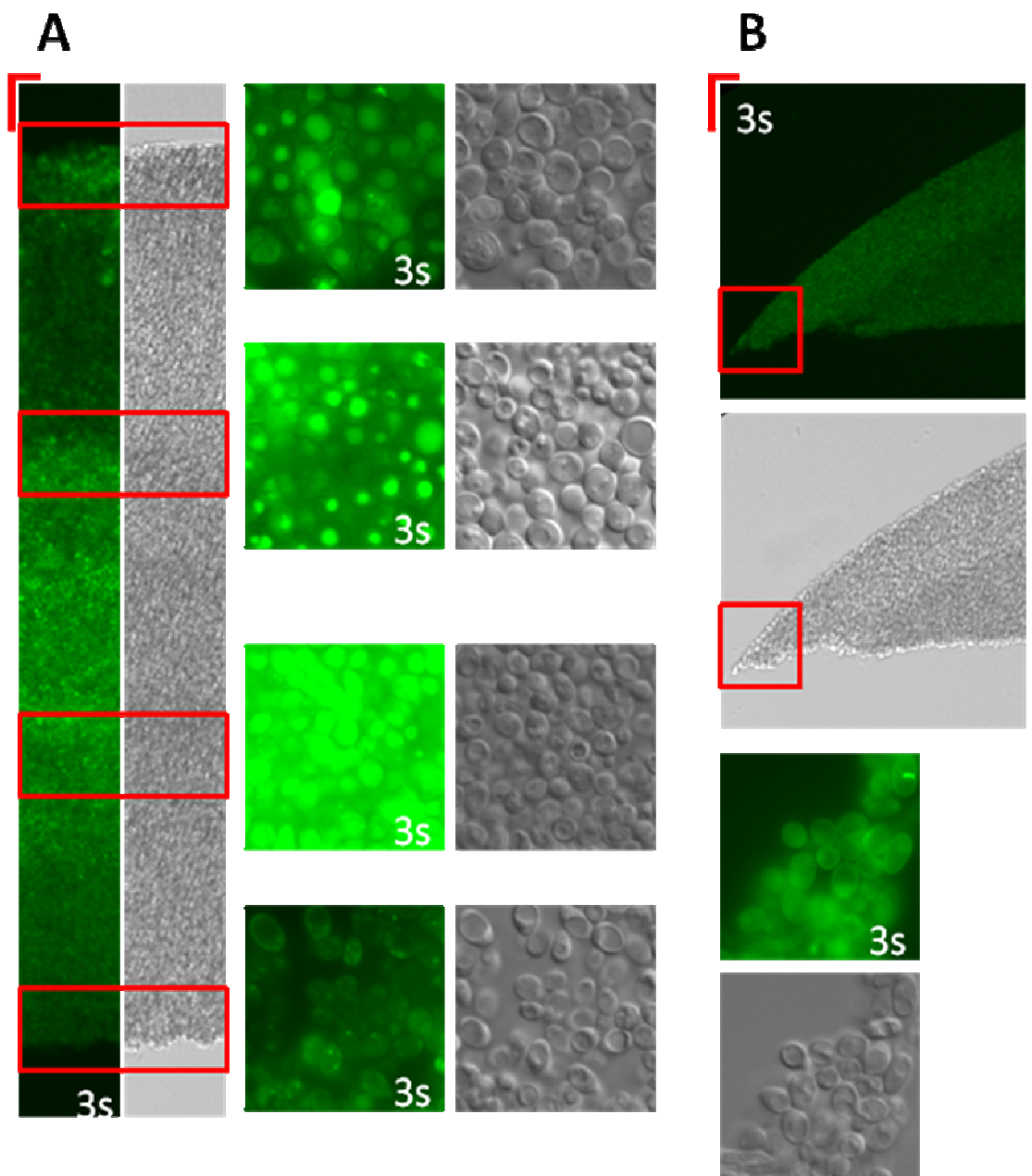
Obrázek 43: Řez desetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

13. Den Stl1-GFP



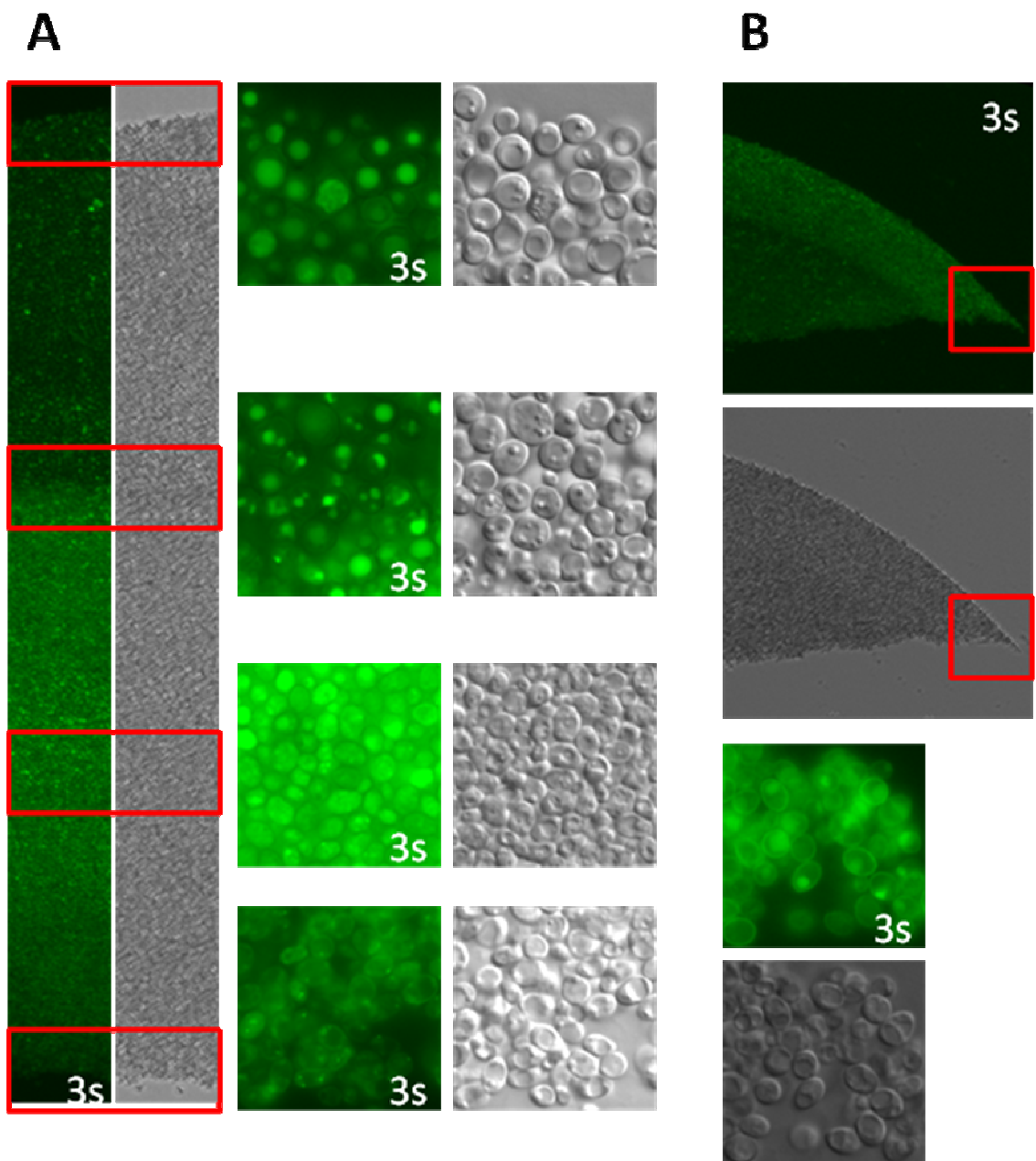
Obrázek 44: Řez třináctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

17. Den Stl1-GFP



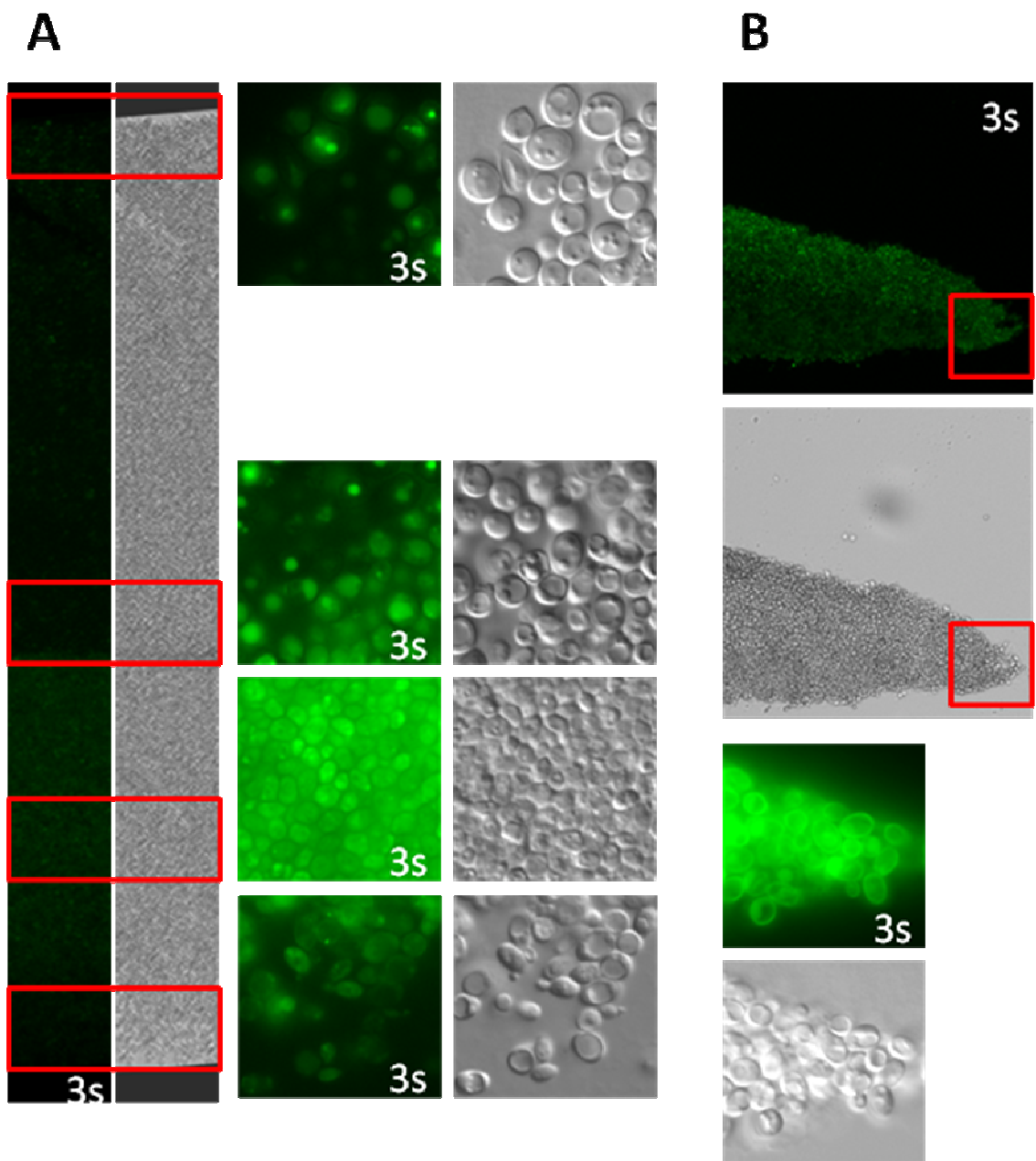
Obrázek 45: Řez sedmnáctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

20. Den Stl1-GFP



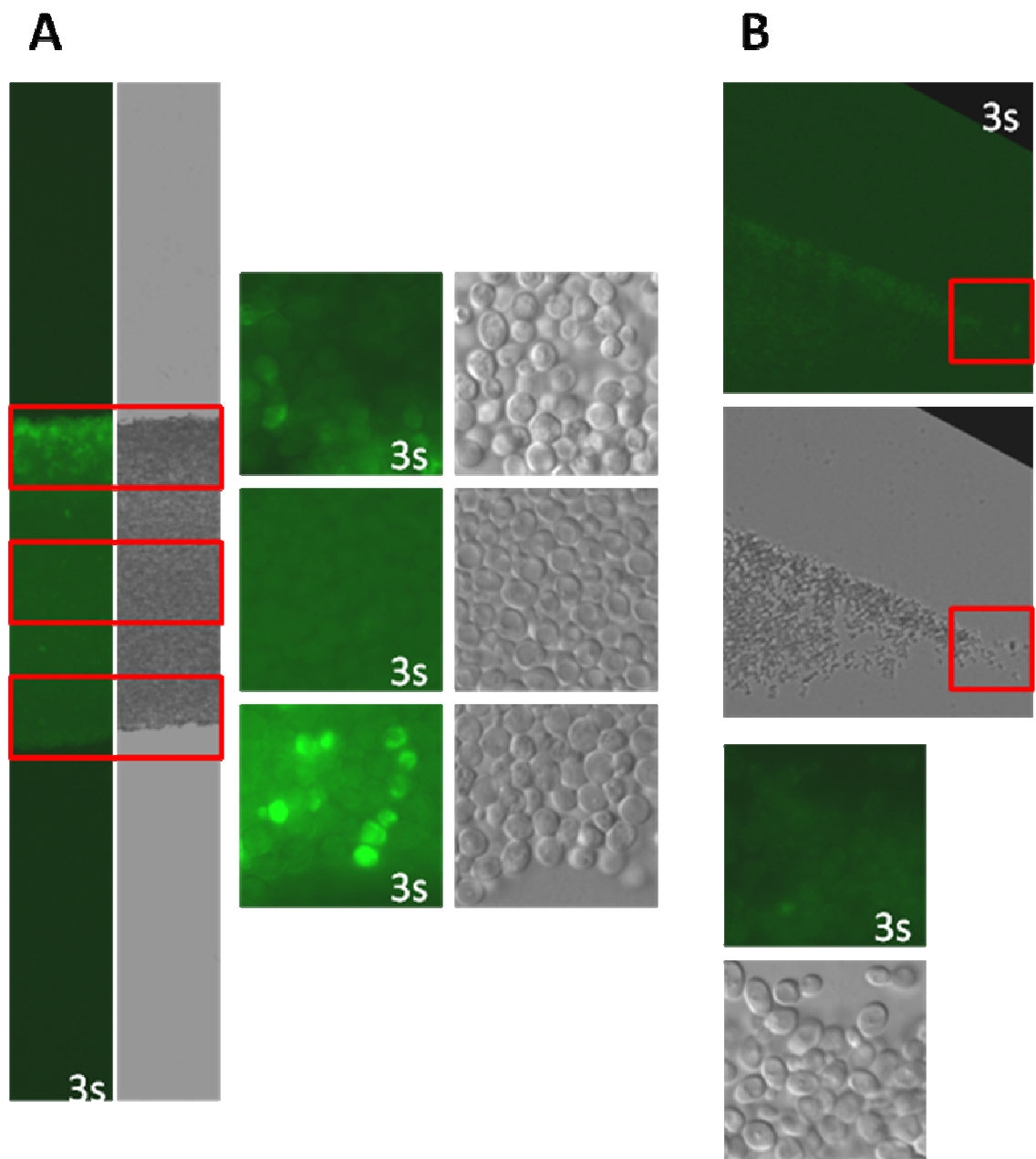
Obrázek 46: Řez dvacetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

27. Den Stl1-GFP



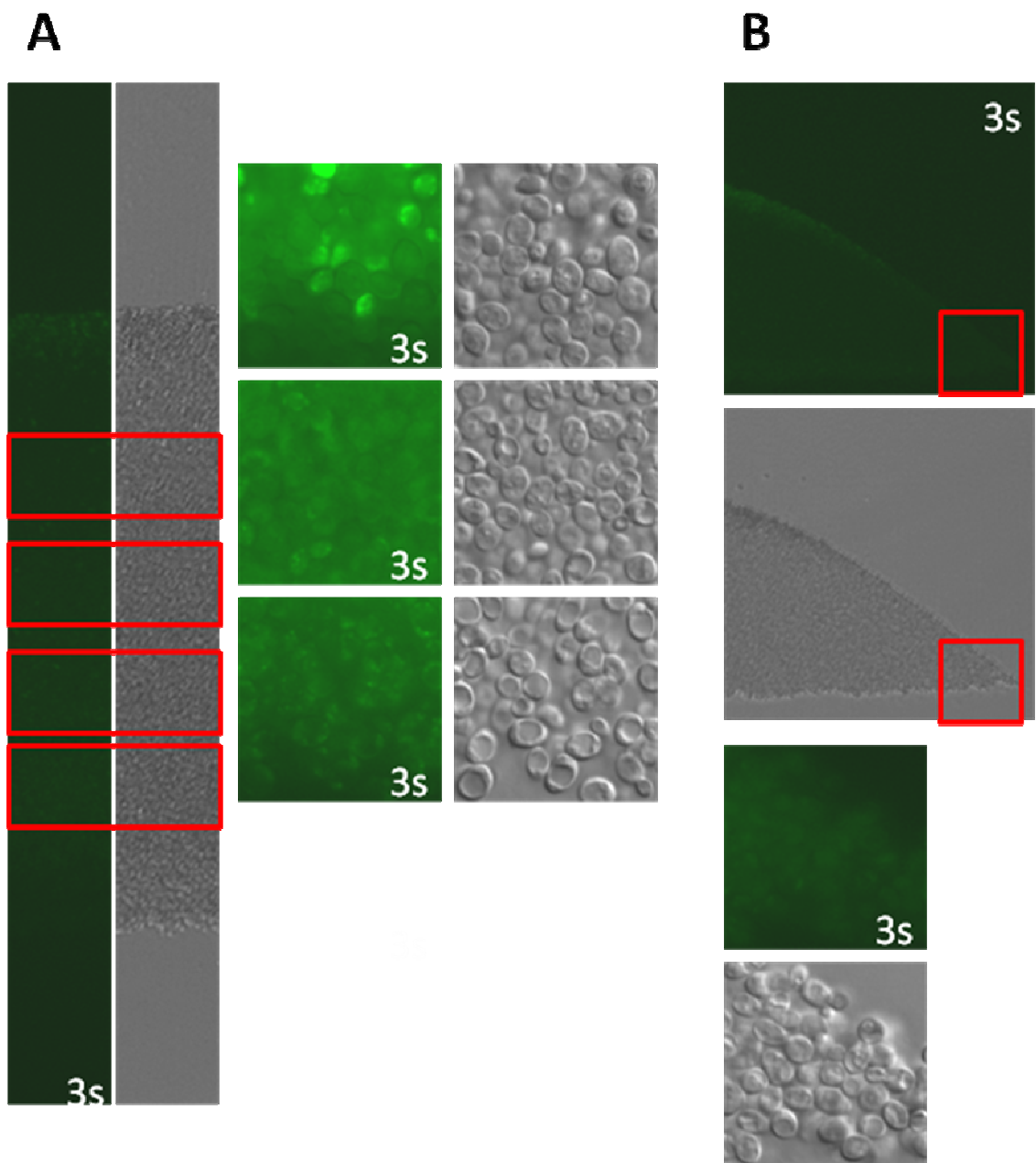
Obrázek 47: Řez dvacetisedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Stl1-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

2. Den Pho89p-GFP



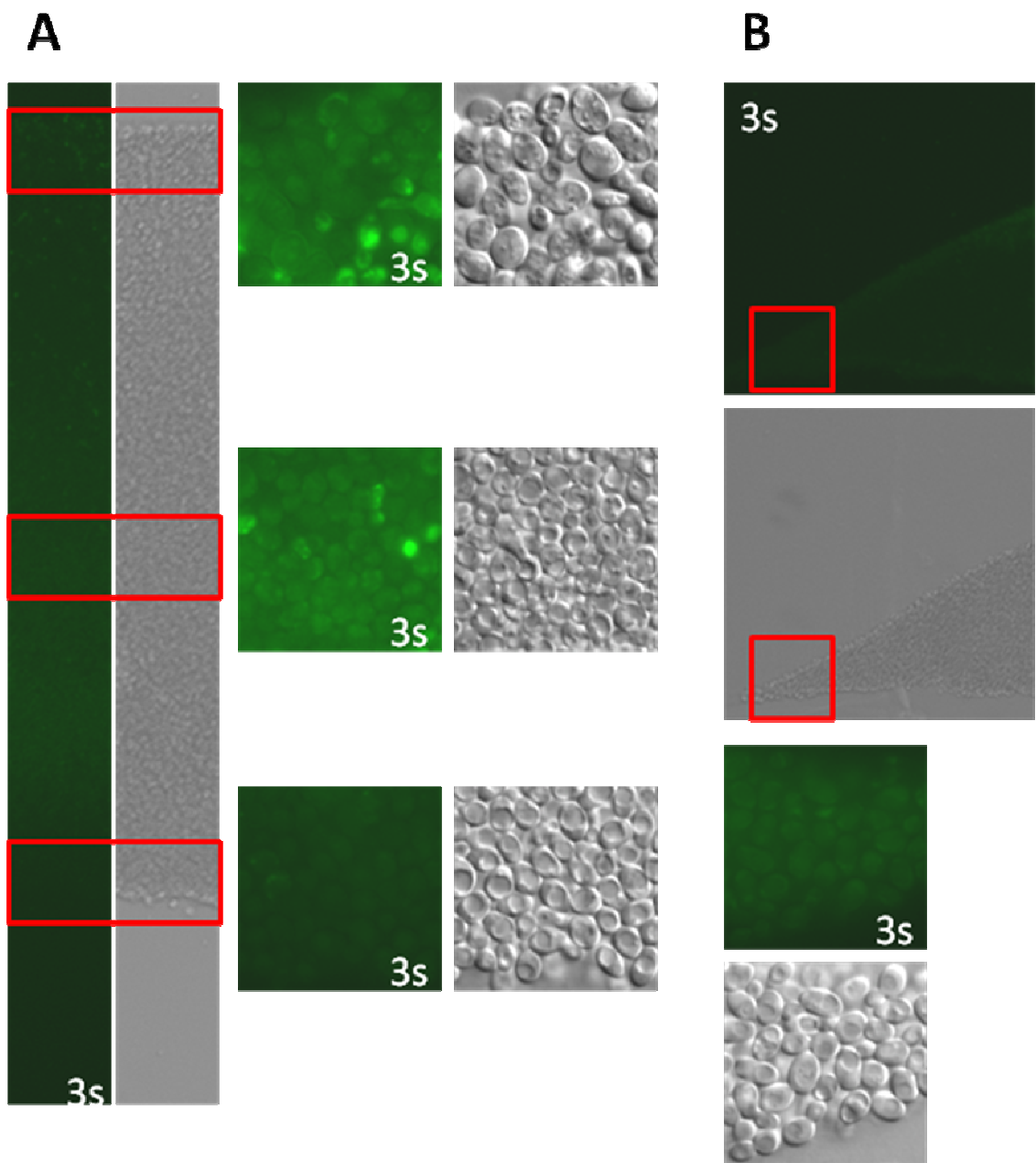
Obrázek 48: Řez dvoudenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

5. Den Pho89p-GFP



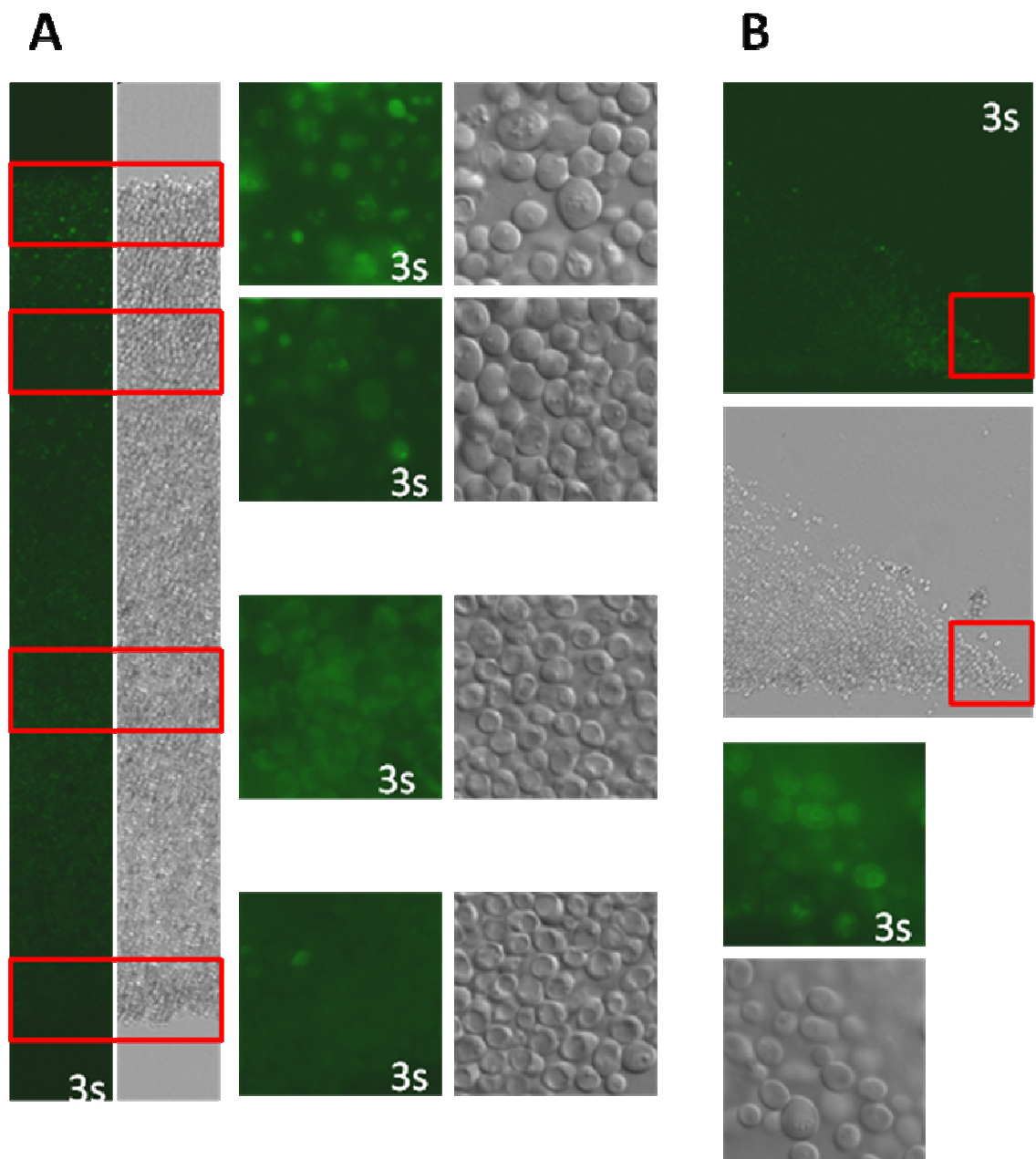
Obrázek 49: Řez pětidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

7. Den Pho89p-GFP



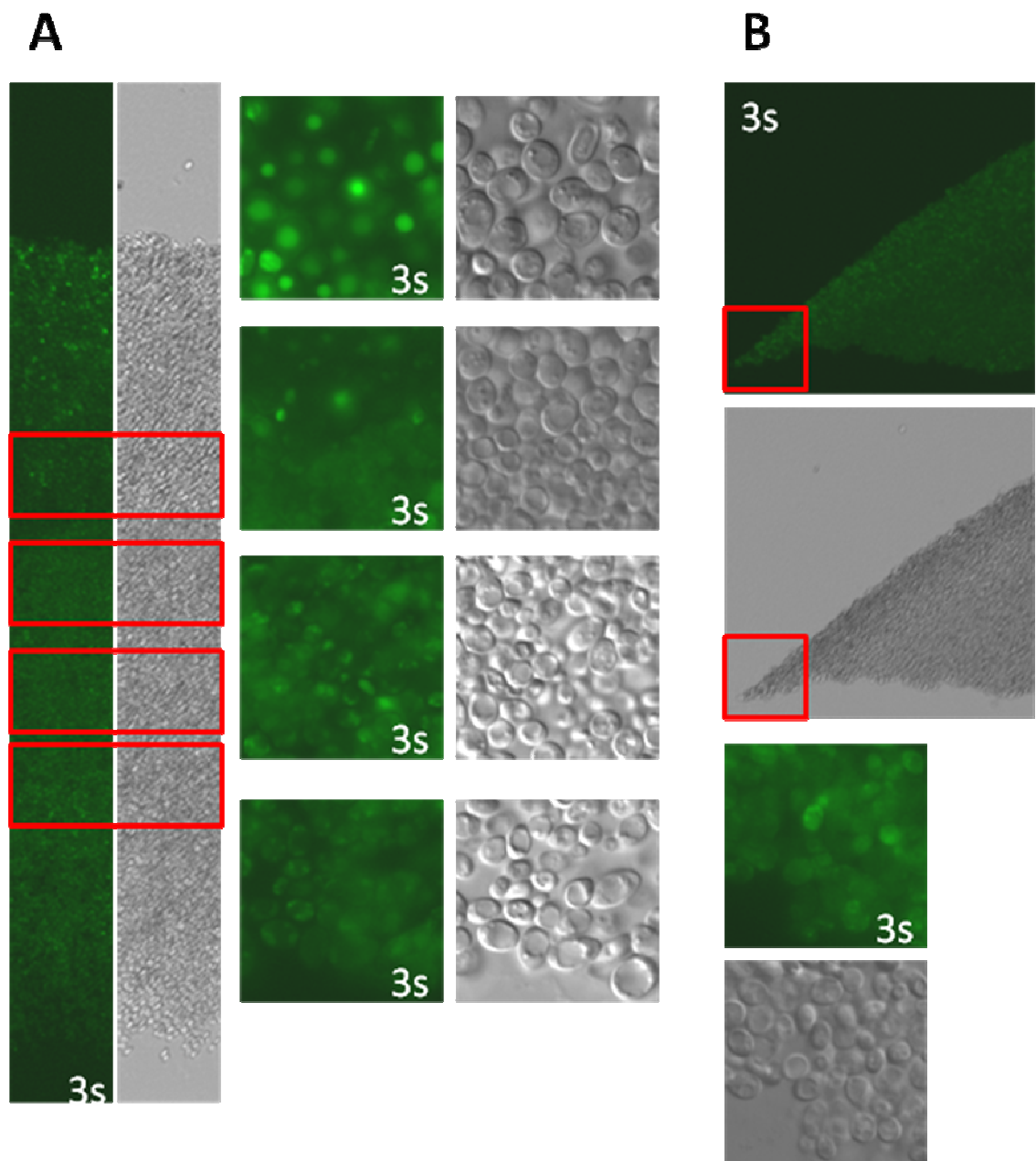
Obrázek 50: Řez sedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

10. Den Pho89p-GFP



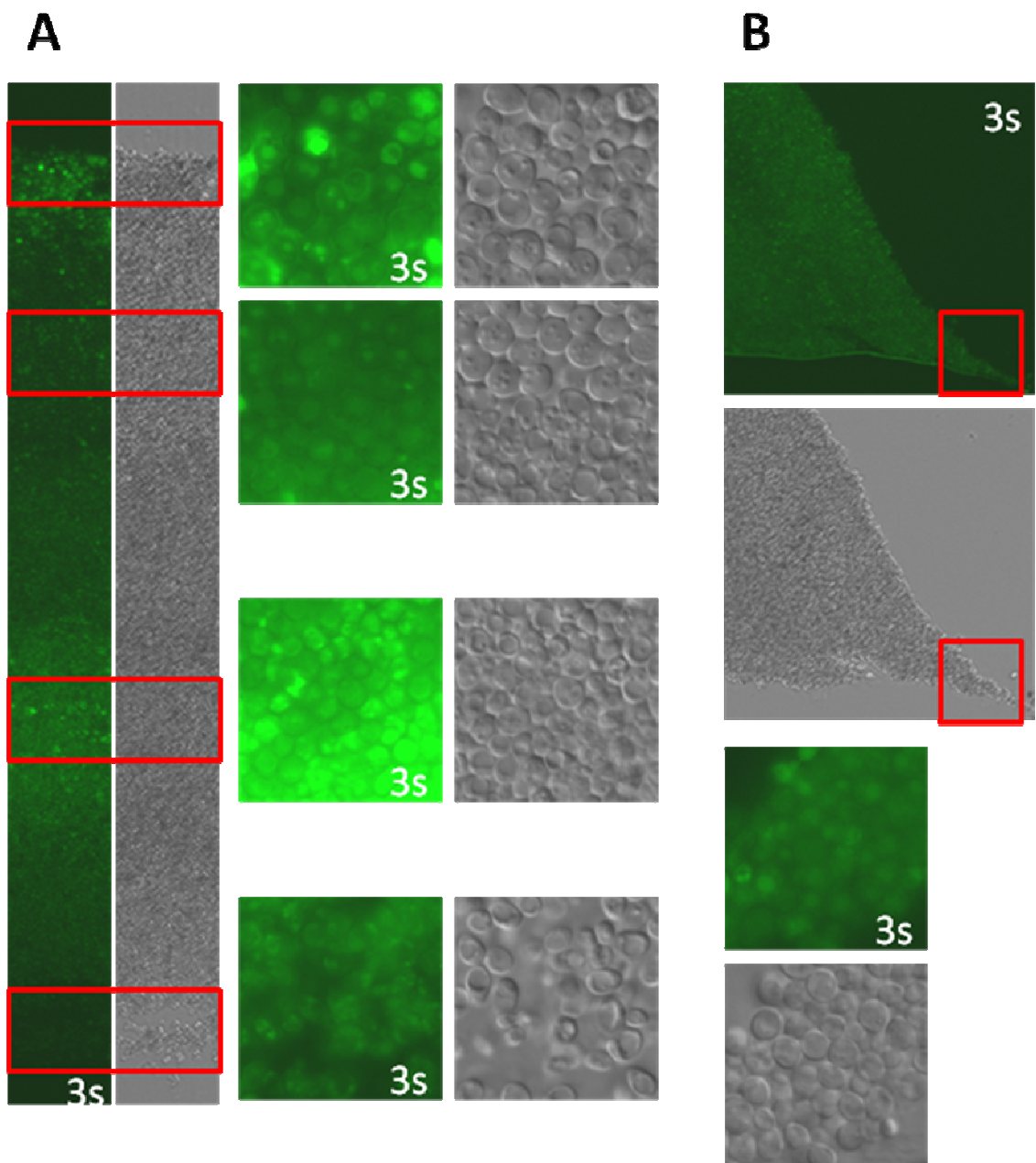
Obrázek 51: Řez desetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

13. Den Pho89p-GFP



Obrázek 52: Řez třináctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

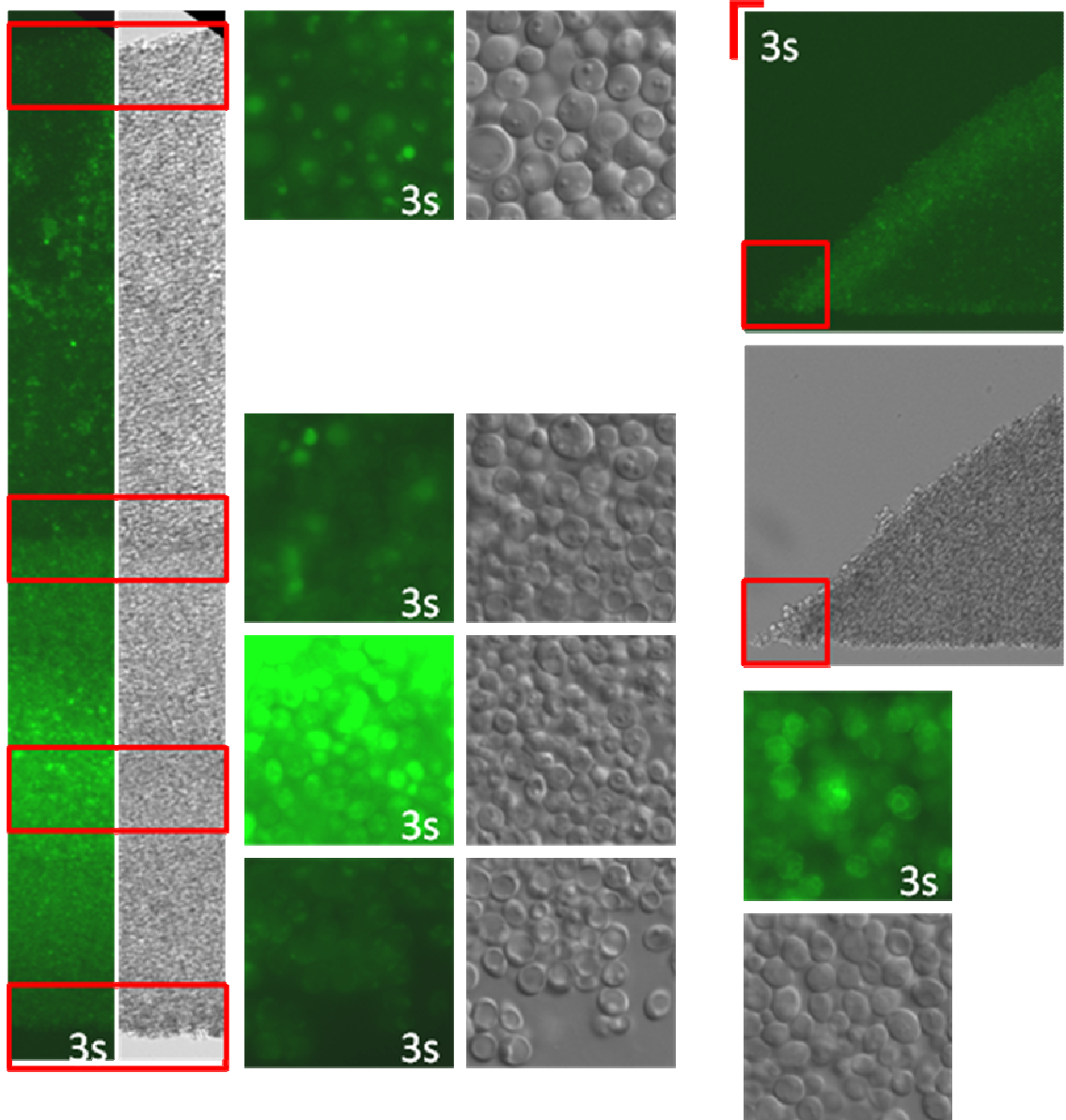
17. Den Pho89p-GFP



Obrázek 53: Řez sedmnáctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

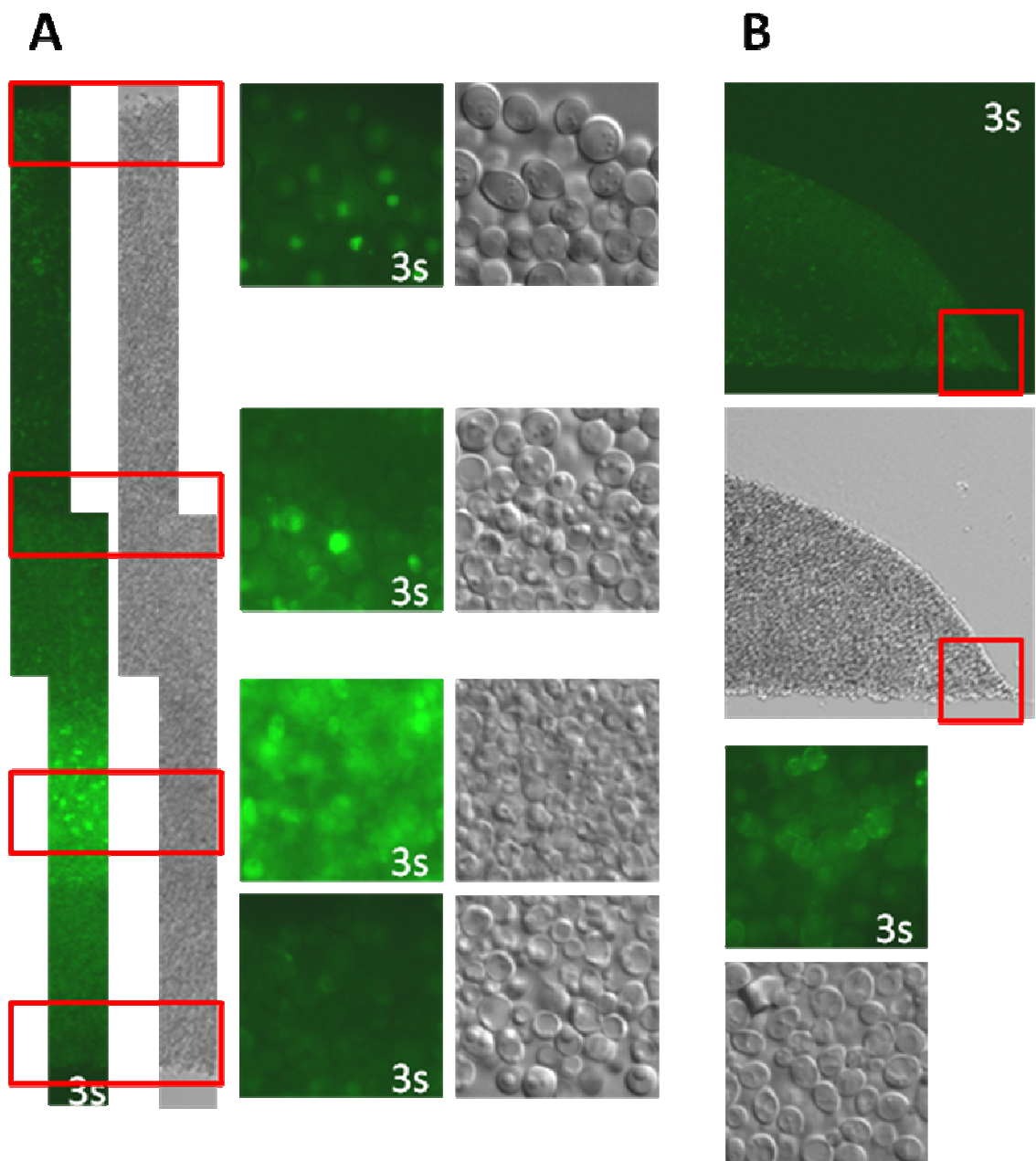
20. Den Pho89p-GFP

A



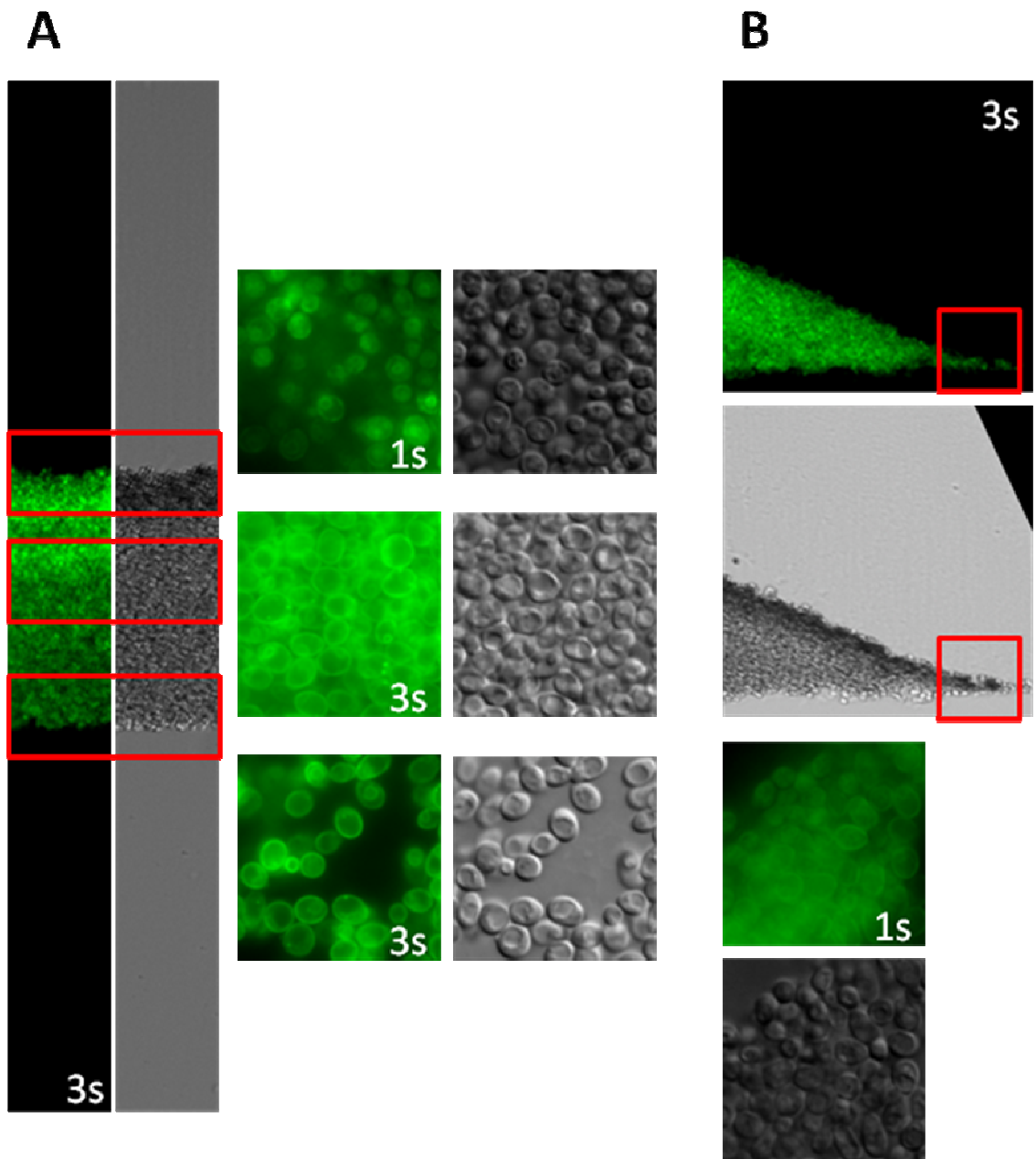
Obrázek 54: Řez dvacetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

27. Den Pho89p-GFP



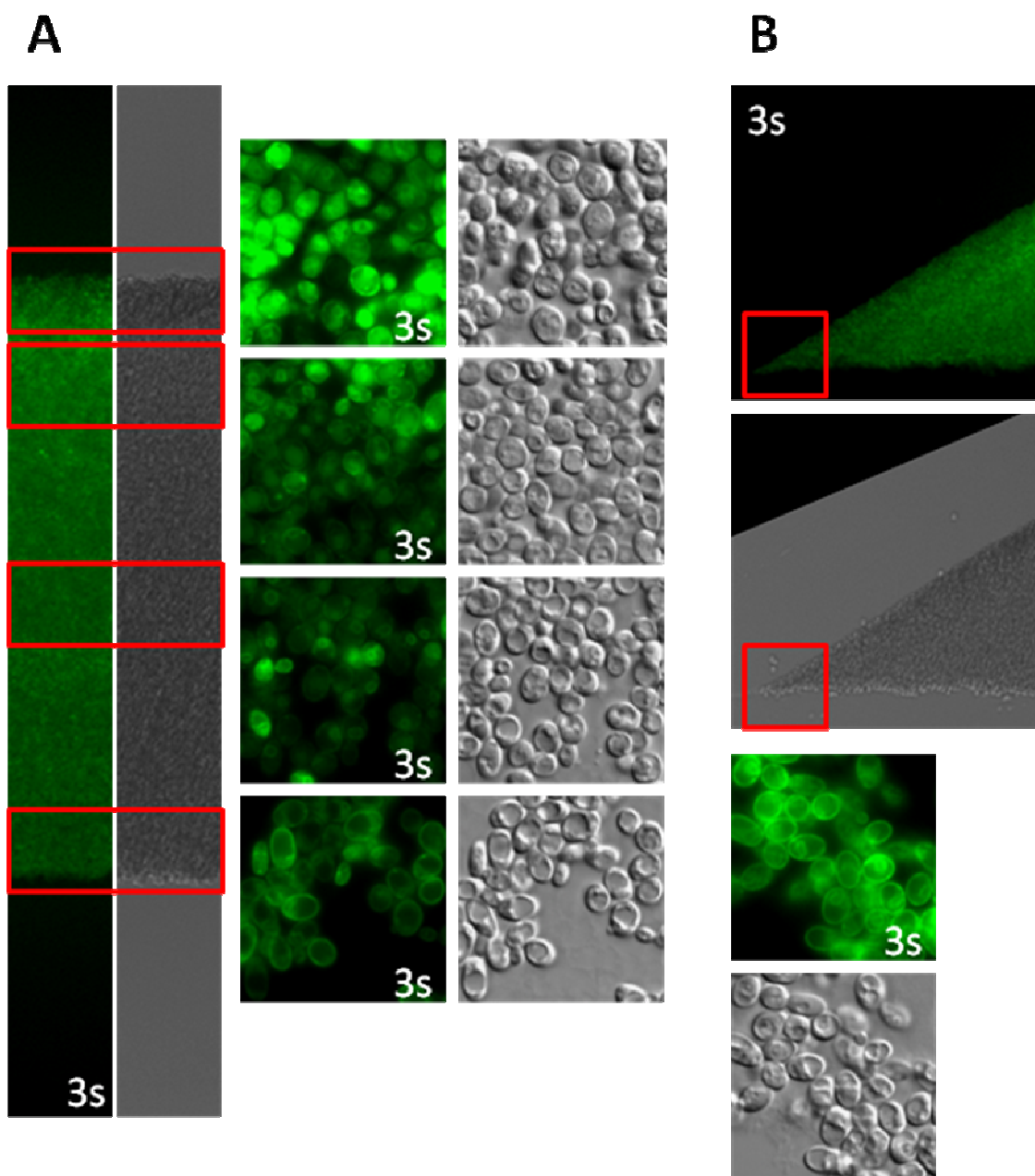
Obrázek 55: Řez dvacetisedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Pho89-GFP na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

2. Den Fet3-GFPc



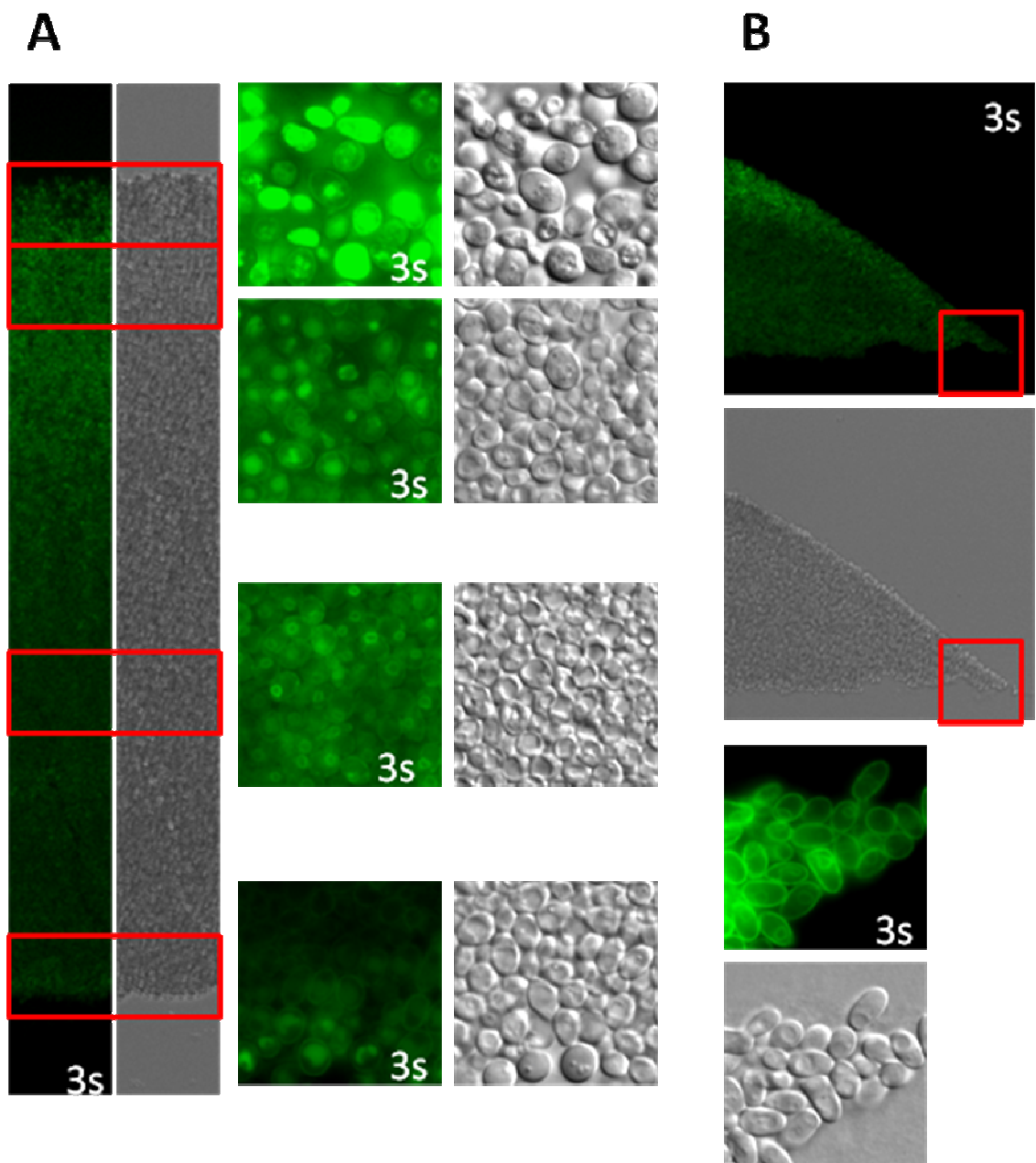
Obrázek 56: Řez dvoudenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

5. Den Fet3-GFPc



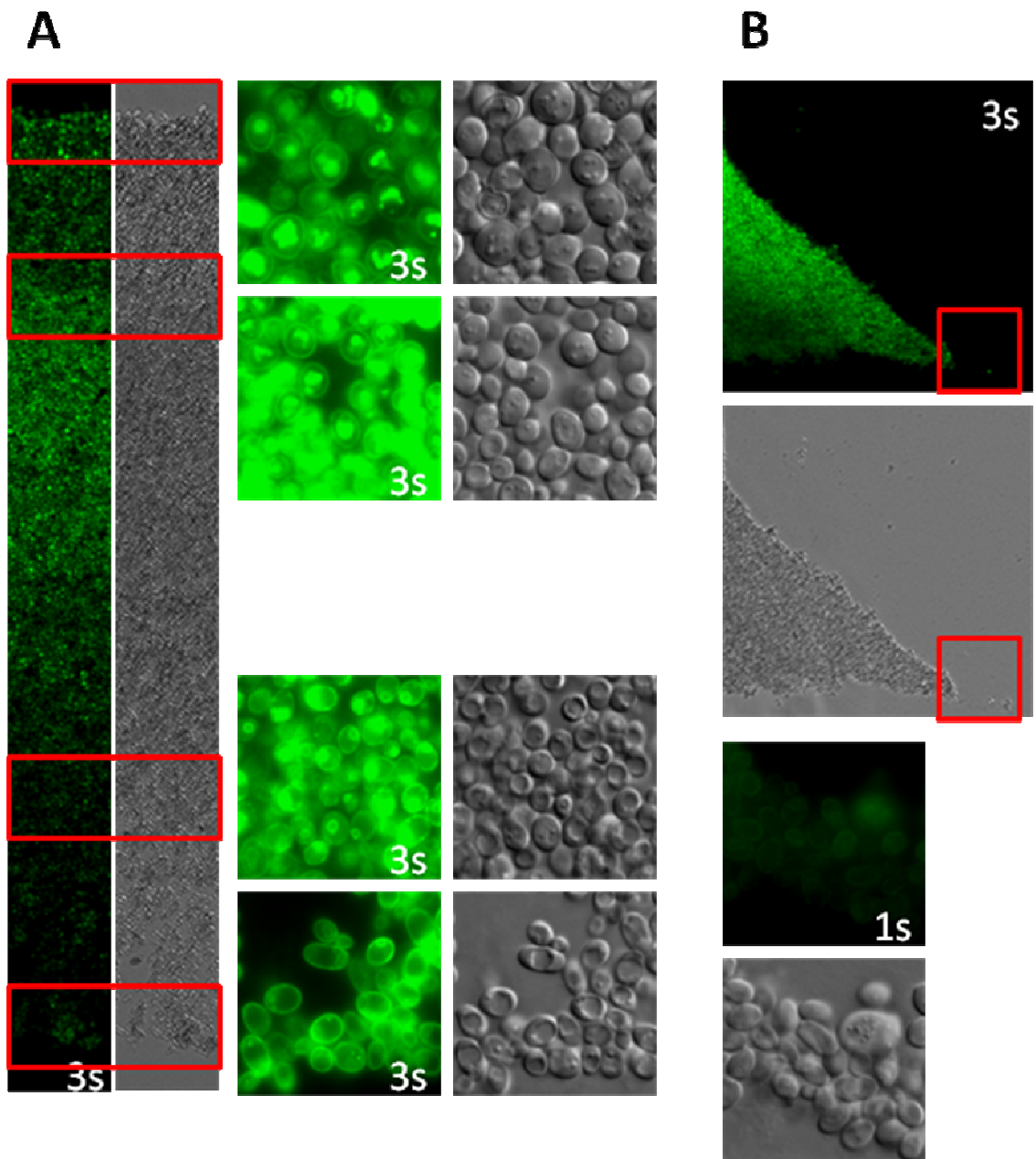
Obrázek 57: Řez pětidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

7. Den Fet3-GFPc



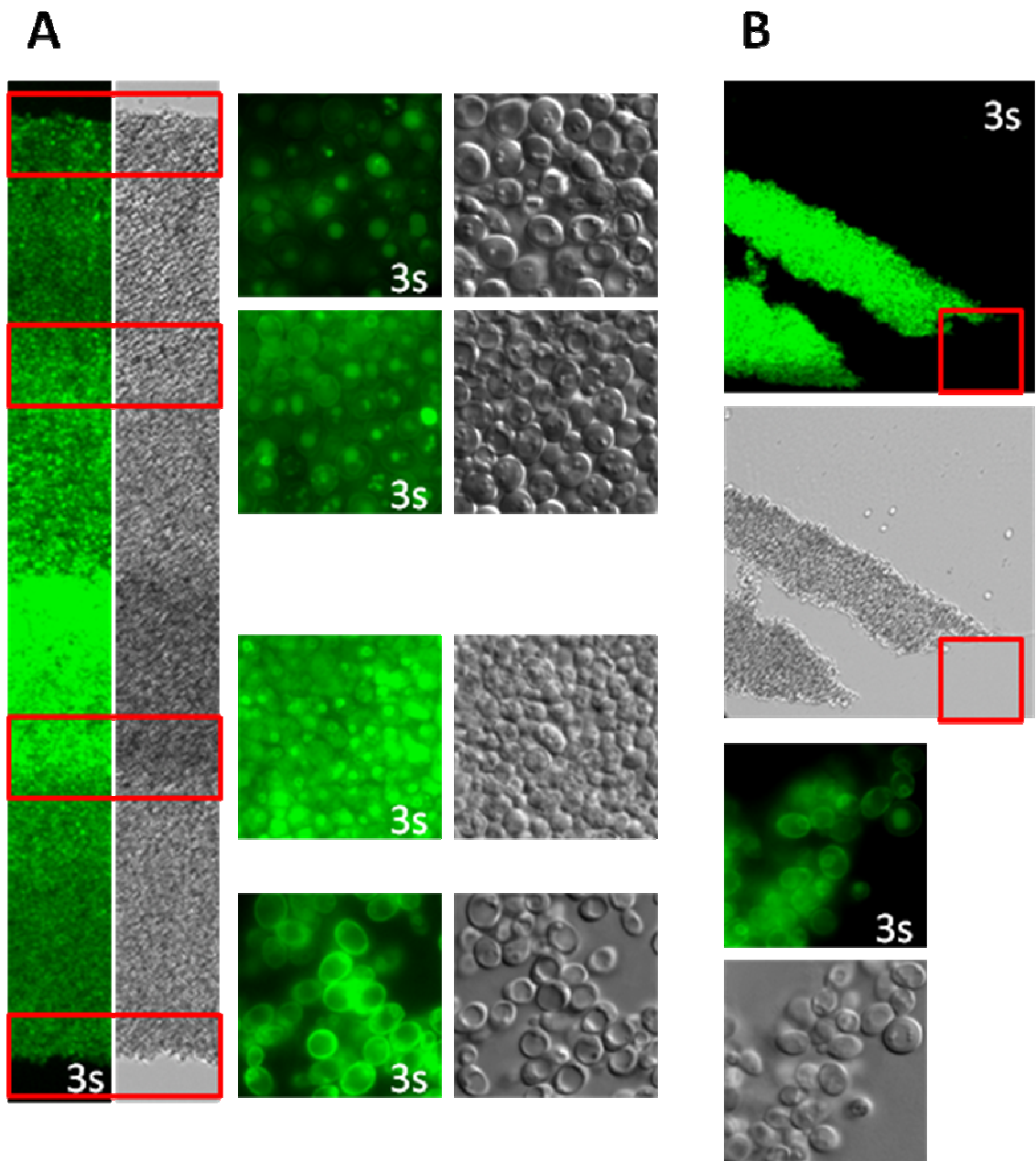
Obrázek 58: Řez sedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA:
A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

10. Den Fet3-GFPc



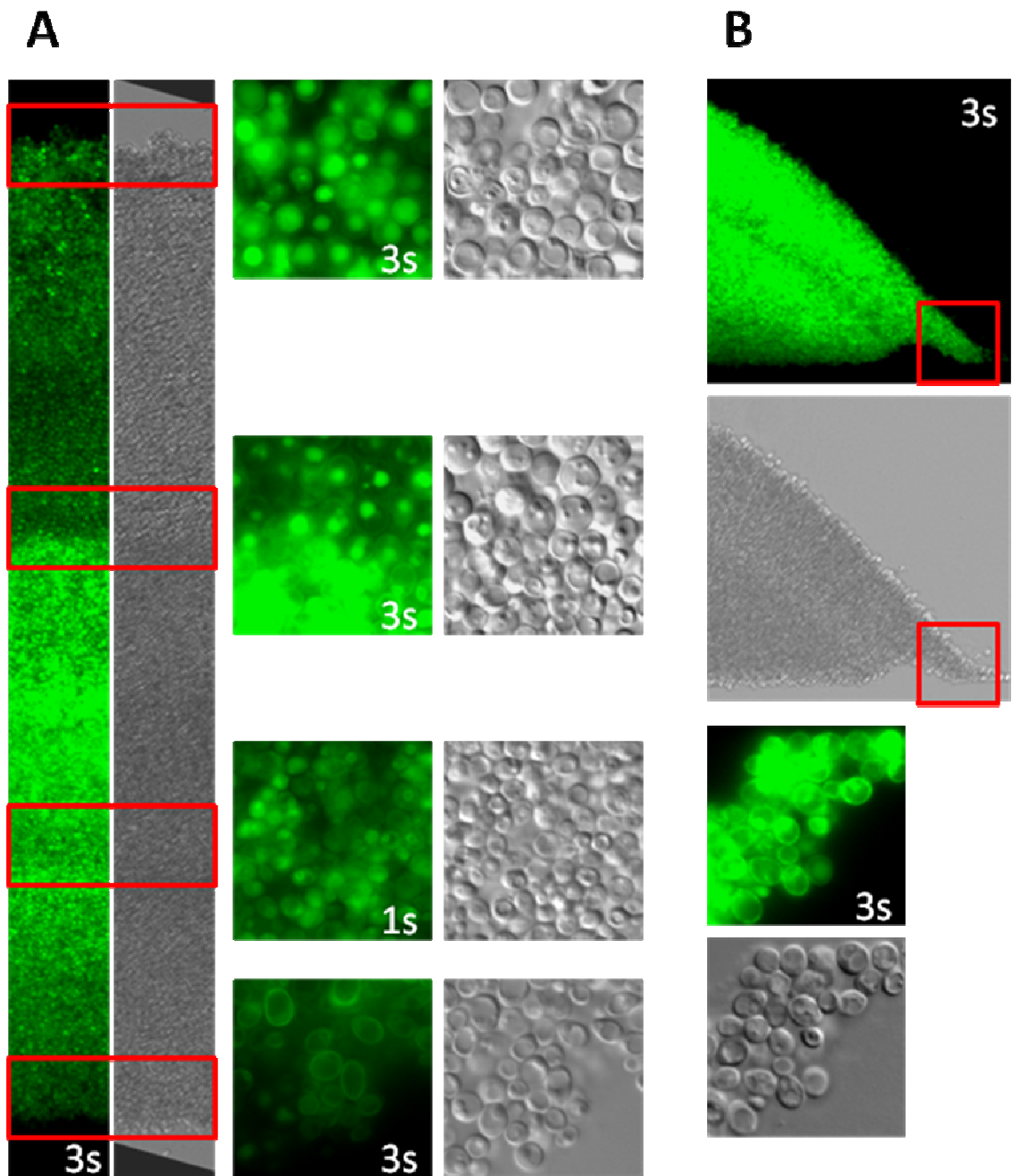
Obrázek 59: Řez desetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

13. Den Fet3-GFPc



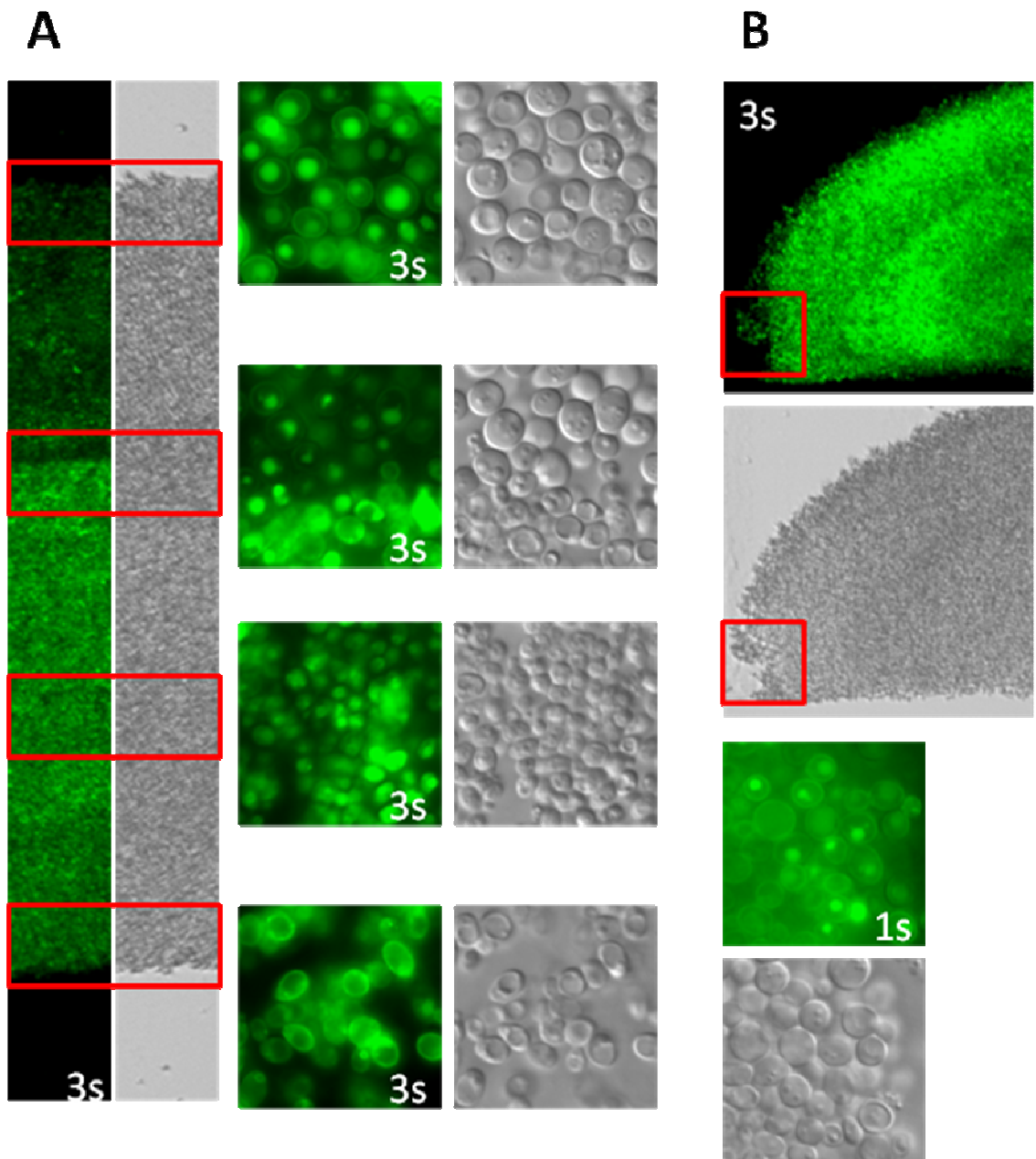
Obrázek 60: Řez třináctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

17. Den Fet3-GFPc



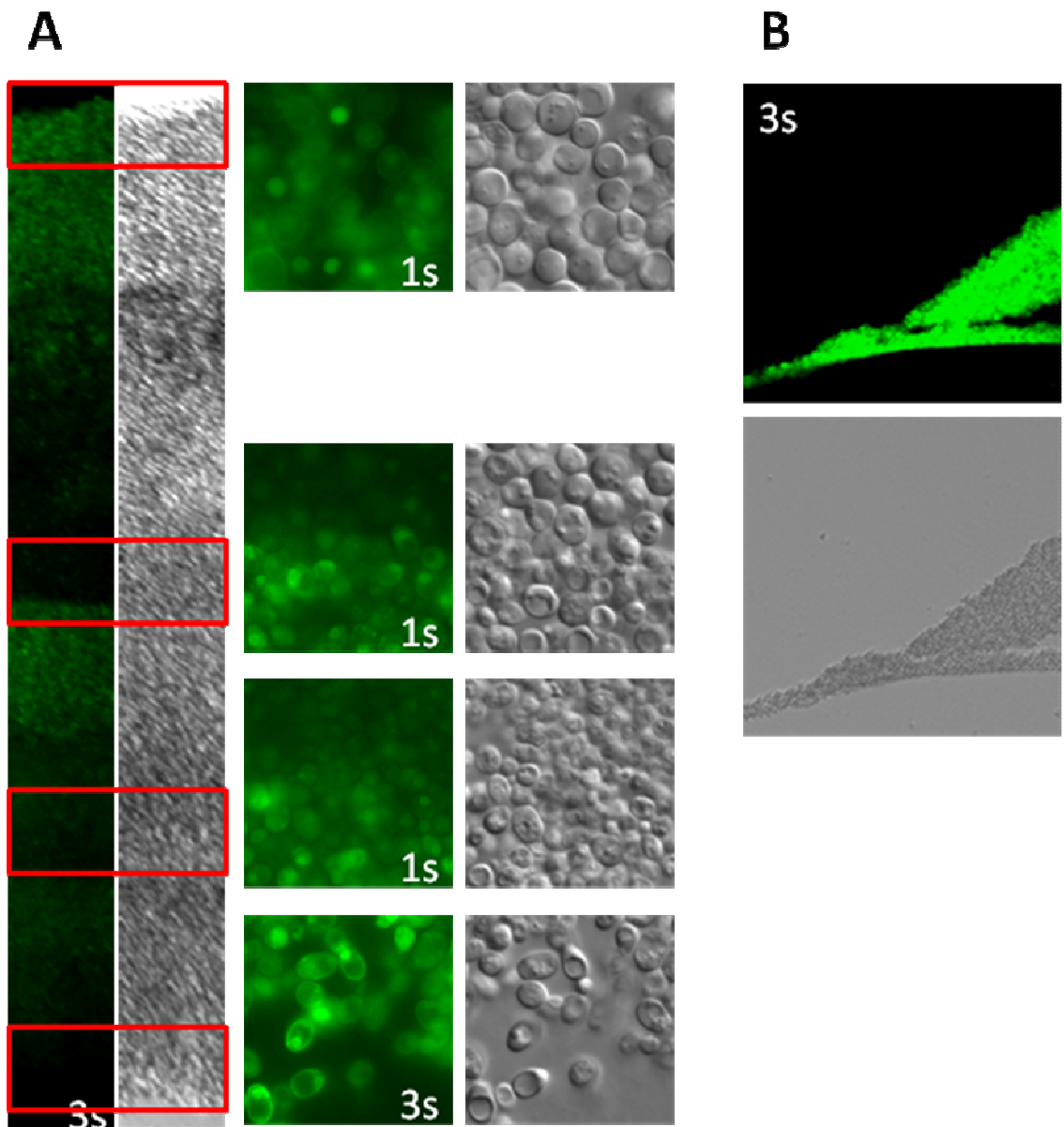
Obrázek 61: Řez sedmnáctidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

20. Den Fet3-GFPc



Obrázek 62: Řez dvacetidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

27. Den Fet3-GFPc



Obrázek 63: Řez dvacetisedmidenní kolonií transformovaného kmene BY-Fet3-GFPc na GMA: A) průřez středem kolonie s detaily horního okraje, přechodu mezi populacemi, středu a spodního okraje; B) průřez vnějším okrajem kolonie s jeho detailem.

4.2.2. Frakcionace vyvíjející se kolonie Fet3p-GFP a Stl1p-GFP

Díky odebraným řežům vyvíjející se kolonie jsem měl přesnou představu, v jaké části kolonie dochází k expresi a lokalizaci zkoumaných proteinů. Tato metodika však není vhodná pro kvantifikaci signálu z buněk. Z uvedeného důvodu jsem pro kvantitativní vyhodnocení fluorescence vybral metodu frakcionace buněk kolonie v sacharózovém gradientu (3.2.19. Frakcionace buněk v sacharózovém gradientu) a měření buněk pomocí průtokového cytometru (3.2.20. Příprava vzorků pro průtokový cytometr).

Na řezech kolonií je vidět, že po začátku alkalizace dochází k diferenciaci kolonie na dvě velké subpopulace. V horní části kolonie se nacházejí velké buňky, většinou bez výrazné vakuoly a s dobře pozorovatelnými lipidickými partikulami, ve spodní části kolonie jsou buňky malé, s výraznou vakuolou, která zabírá velkou část prostoru buňky. Pomocí centrifugace buněk v sacharózovém gradientu můžeme odebrané buňky rozdělit do jednotlivých frakcí (metodika), kdy se ve frakci 1 shromáždí malé buňky ze spodní části kolonie, zatímco ve frakcích 3 a 4 se budou vyskytovat velké buňky z horní části kolonie. Frakce 2 je přechodem mezi těmito dvěma populacemi, takže se zde objeví jak malé, tak velké buňky.

Pro popsání pokusu jsem zvolil transformanty Fet3p-GFPc a Stl1p-GFP. Transformant Pdr5p-GFP jsem nevybral z toho důvodu, že je degradován ve velmi časných fázích vývoje kolonie, zatímco metodika frakcionace buněk v sacharózovém gradientu je vhodná pro provádění až u starších kolonií. A Pho89p-GFP jsem vyloučil také, protože jeho exprese je velmi slabá a lokalizovaná jen ve vnějším okraji kolonie, který se pomocí frakcionace buněk v sacharózovém gradientu nedá odlišit.

Během tohoto pokusu jsem chtěl kvantifikovat fluorescenci buněk Fet3p-GFPc a Stl1-GFP pro dvě hlavní subpopulace buněk kolonie.

Pokus probíhal částečně na GMA médiu s BKP, abych tak mohl paralelně monitorovat přepínání mezi acidickou a alkalickou fází. Kolonie, jejichž buňky jsem pozoroval pod mikroskopem a analyzoval pomocí průtokového cytometru, rostly na GMA médiu bez pH indikátoru, neboť ten může částečně ovlivnit fluorescenci buněk.

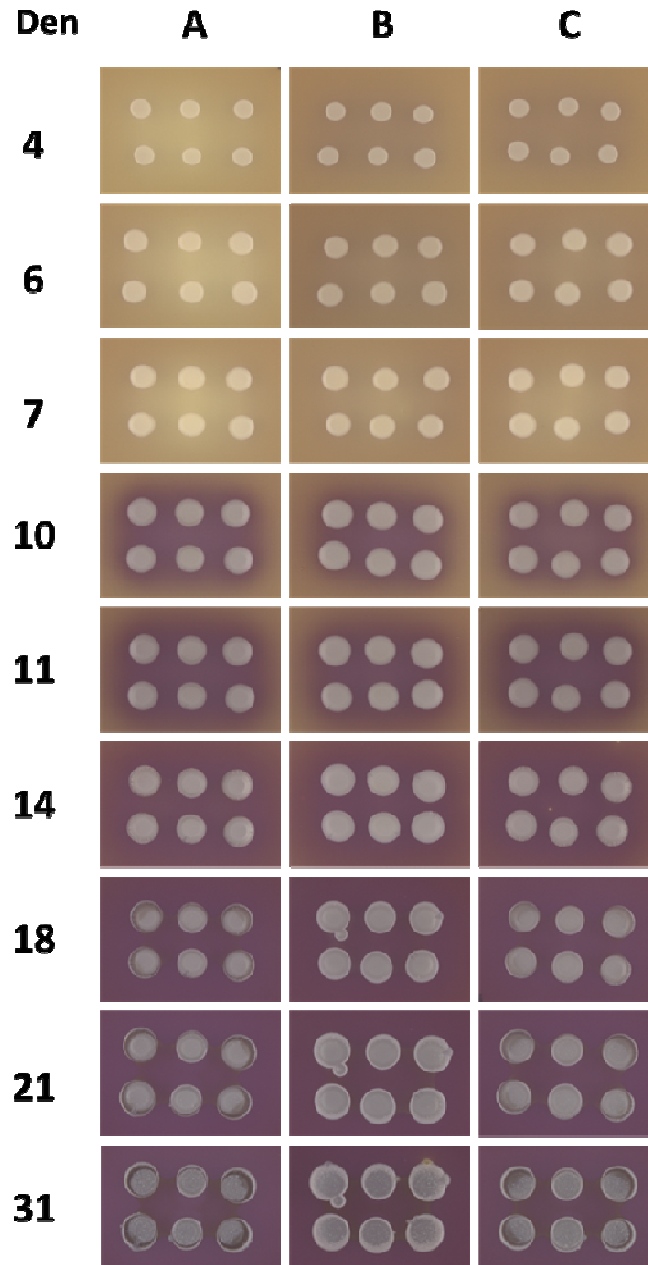
Během celého vývoje kolonií jsem odebíral vzorky na mikroskopování. Do desátého dne jsem odebral vzorky vždy z celé kolonie a od jedenáctého dne vzorky z centrální části kolonie a z jejího vnějšího okraje.

Paralelně jsem během celého pokusu kvantitativně odebíral biomasu celé kolonie, kterou jsem resuspendoval ve vodě a následně dělil pomocí centrifugace v sacharózovém gradientu. Vzorky pro měření průtokovým cytometrem (metodika) jsem připravoval jak z jednotlivých frakcí po dělení buněk v sacharózovém gradientu, tak i z vodné suspenze buněk celé kolonie. Pro stanovení reprodukovatelnosti měření jsem připravil v každém čase měření tři vzorky z biomasy kolonií, každý z nich jsem odebral z jiné agarové misky. Při dělení buněk v sacharózovém gradientu jsem všechny tři tyto vzorky spojil v jeden.

Přepnutí kolonií všech testovaných kmenů z první acidické do alkalické fáze proběhlo kolem devátého dne. Podle zbarvení pH indikátoru v médiu byla alkalizace silná a v tomto pokusu nejspíše nedošlo k typickému přepnutí do druhé acidické fáze, protože nenastalo viditelné odbarvení pH indikátoru. Během fáze alkalizace navíc došlo ke vzniku sraženiny v agaru (Obrázek 64), což je charakteristické pro případy, kdy se objevuje velmi silná alkalická fáze. Transformanty Stl1p-GFP a Fet3p-GFPc měly stejný průběh alkalizace jako kontrolní rodičovský kmen BY4742. Morfologický vývoj kolonií rodičovského kmene BY4742 i kmenů Stl1p-GFP a Fet3p-GFPc odpovídal předchozím pokusům (Obrázek 65).



Obrázek 64: Vysrážená zóna kolem kolonií kontrolního kmene BY4742, 14. den růstu na GMA bez BKP.



Obrázek 65: Vývoj kolonie v čase a její morfologie na GMA: A) kontrolní rodičovský kmen BY4742; B) kmen BY-Stl1-GFP; C) kmen BY-Fet3-GFPc

4.2.2.1. Frakcionace buněk v sacharózovém gradientu

Během vývoje kolonií rodičovského kmene BY4742 postupně vzrůstala autofluorescence buněk (Obrázek 66). V době, kdy kolonie přepnuly z acidické do alkalické fáze, bylo již možno odlišit dvě rozdílné subpopulace buněk. Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu je vidět, že buňky z frakce 1, odpovídající malým buňkám

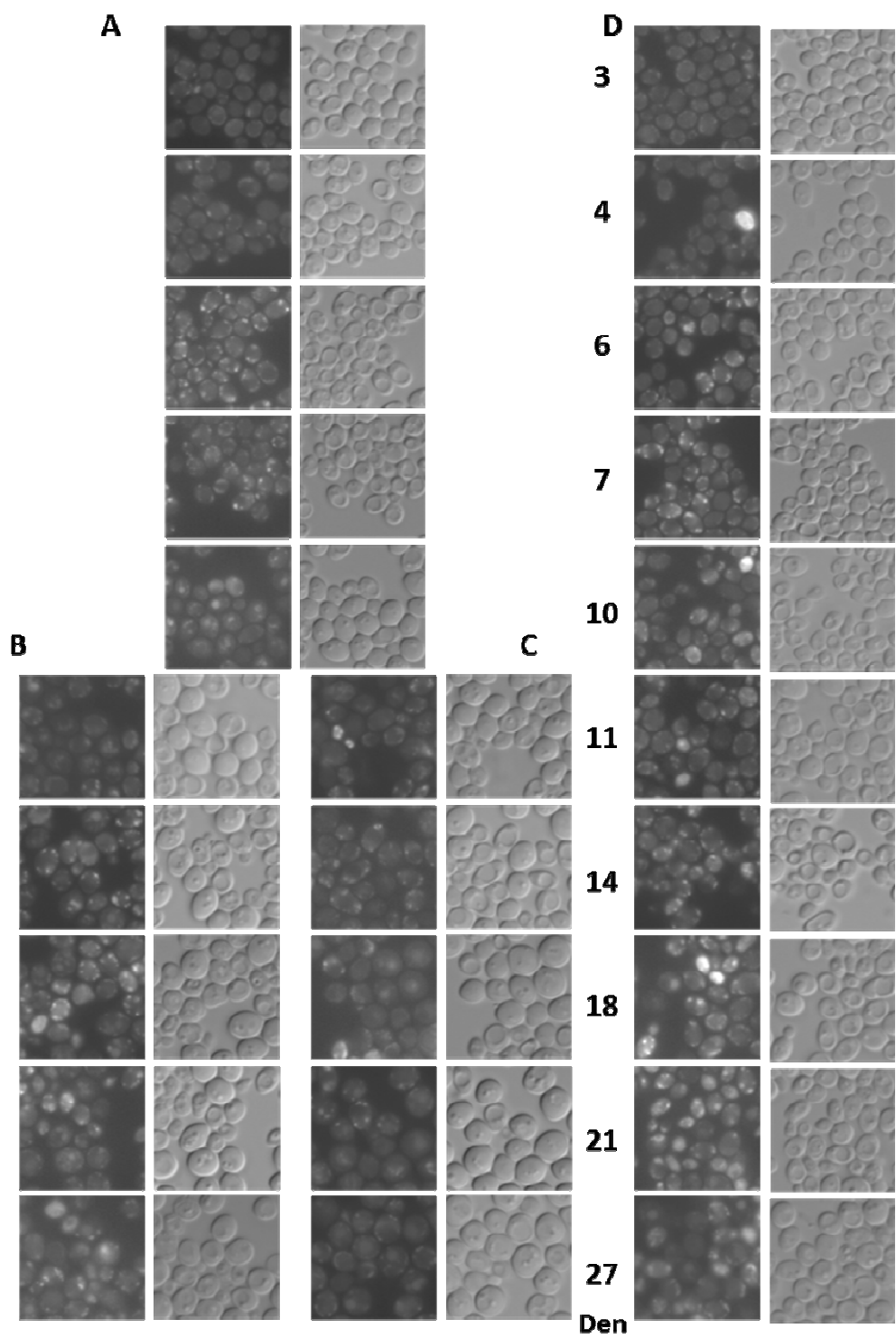
ze spodní části kolonie, mají mnohem větší autofluorescenci než buňky z frakcí 3 a 4, které odpovídají velkým buňkám z horní části kolonie (Obrázek 66).

U kolonií kmene BY-Fet3-GFPc je viditelné, že na začátku vývoje kolonie mají všechny buňky silný signál Fet3p-GFPc na membráně. Dále je také u většiny buněk pozorovatelná GFP fluorescence lokalizovaná pravděpodobně na endoplazmatickém retikulu. Zatímco skoro v celé kolonii GFP fluorescence během dalšího vývoje kolonie slábně, ve vnějším okraji kolonie je fluorescence GFP relativně stabilní (Obrázek 70). V buněčné suspenzi je dobře sledovatelný začátek degradace signálu v buňkách. Po jedenáctém dni vývoje, po přepnutí kolonií z acidické do alkalické fáze, dochází ke snížení GFP fluorescence. Od této doby jsou též častěji vidět svítící vakuoly, ve kterých se akumuluje stabilní GFP po degradaci Fet3p proteinu (Obrázek 70).

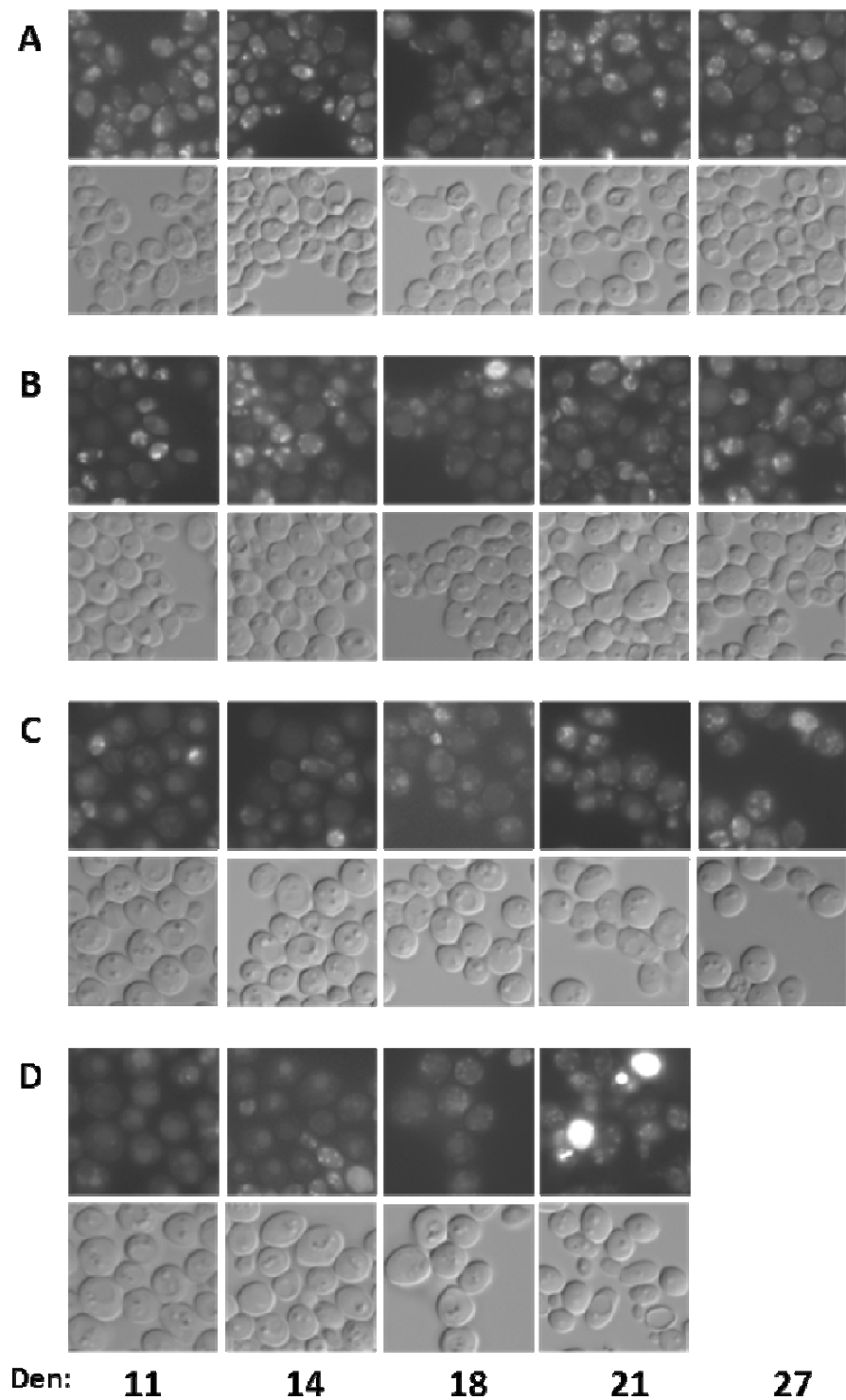
V případě frakcí ze subpopulací buněk Fet3cp-GFP můžeme pozorovat rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi. U subpopulace spodních buněk, odpovídající frakci 1 při frakcionaci kvasinkové kolonie v sacharózovém gradientu, dochází k pomalému snižování GFP fluorescence (Obrázek 71). Od 11 dne vývoje kolonie se v této frakci objevují jak buňky s GFP signálem na membráně, tak i buňky, ve kterých GFP svítí silně pouze z endoplazmatického retikula. Ve frakci 1 však téměř nejsou buňky s výrazně svítící vakuolou. Populace horních buněk, která odpovídá frakcím 3 a 4 při frakcionaci kvasinkové kolonie v sacharózovém gradientu, ztrácí GFP signál z membrány rychleji. Dále je vidět, že dochází k akumulaci GFP ve vakuole, a tedy k degradaci fúzního proteinu. Horní buňky mají ve frakcích menší GFP fluorescenci než buňky ze spodní části kolonie (Obrázek 71).

U kolonií kmene Stl1p-GFP je GFP fluorescence u některých buněk lokalizovaná na membráně v průběhu několika prvních dní růstu kolonie. Během šestého dne vývoje je už pozorovatelný přesun GFP signálu z membrány do vakuol v buňkách skoro celé kolonie. V pozdějších dnech vývoje je vidět slabá GFP fluorescence na membráně pouze u buněk odebraných z vnějšího okraje kolonie. (Obrázek 69)

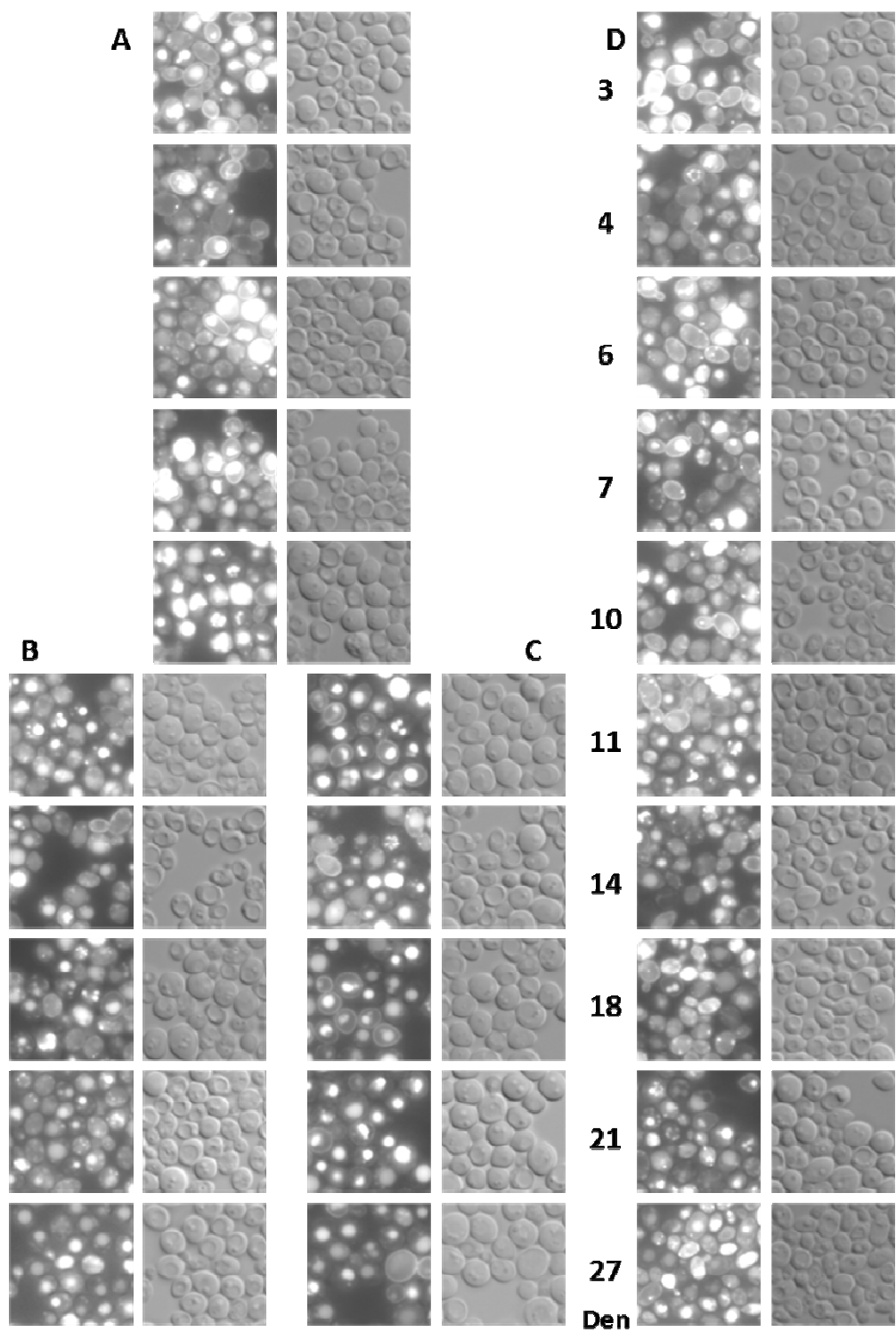
Ve frakci 1 je vidět velmi málo buněk s fluorescenčním signálem na membráně. U některých buněk je viditelná silná GFP fluorescence ve vakuole. Ve frakcích 3 a 4 vůbec není pozorovatelný GFP signál na membráně. Velmi silná je však GFP fluorescence ve vakuolách těchto buněk. Zdá se také, že do vakuol se přesouvá GFP fluorescence z membrány dříve v buňkách z horní části kolonie (Obrázek 70).



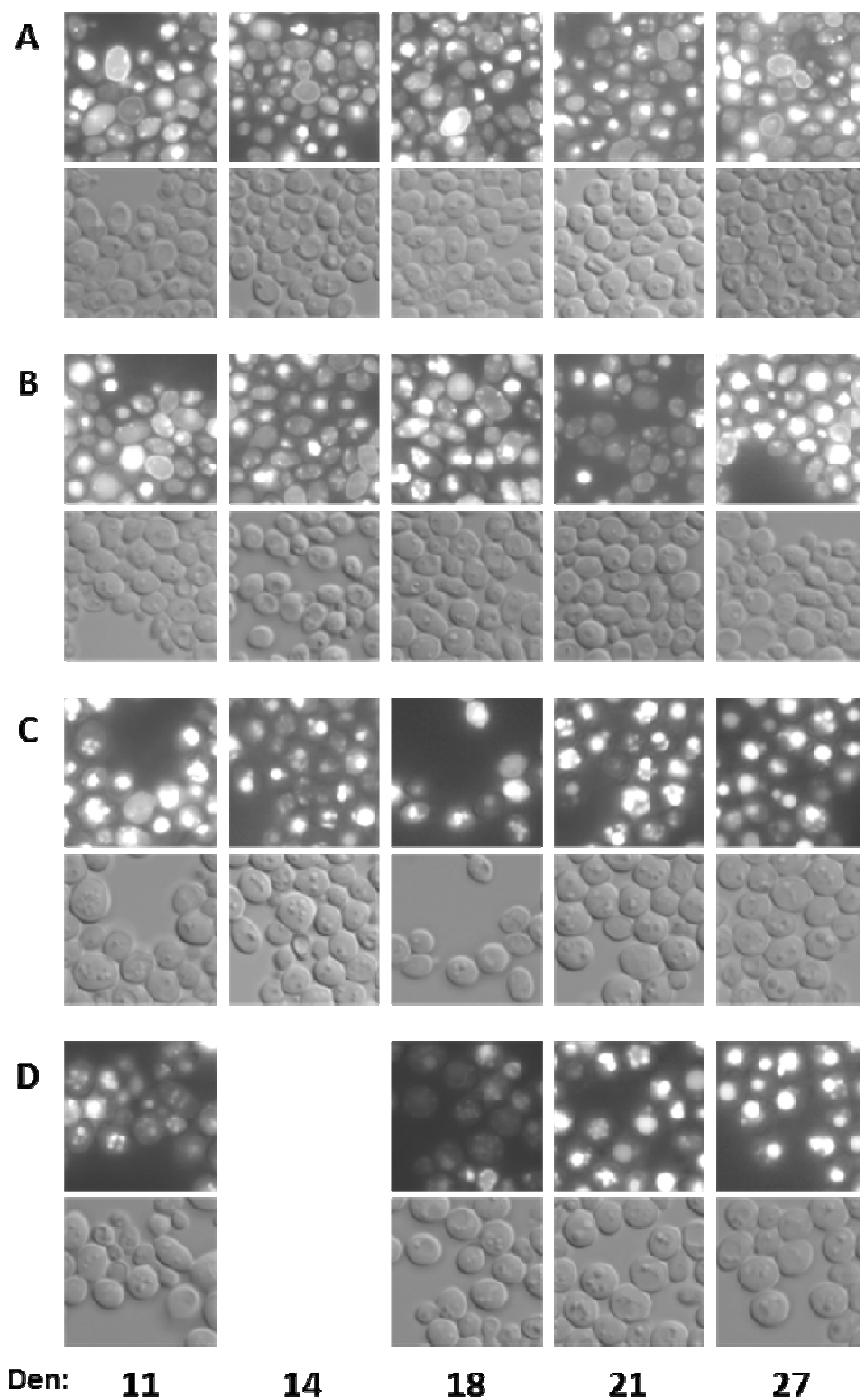
Obrázek 66: Autofluorescence kontrolního kmene BY4742 mezi dny 3-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) buňky odebrané z celé kolonie; B) buňky odebrané ze střední části kolonie; C) buňky odebrané z vnějšího okraje kolonie; D) buněčná suspenze celé kolonie.



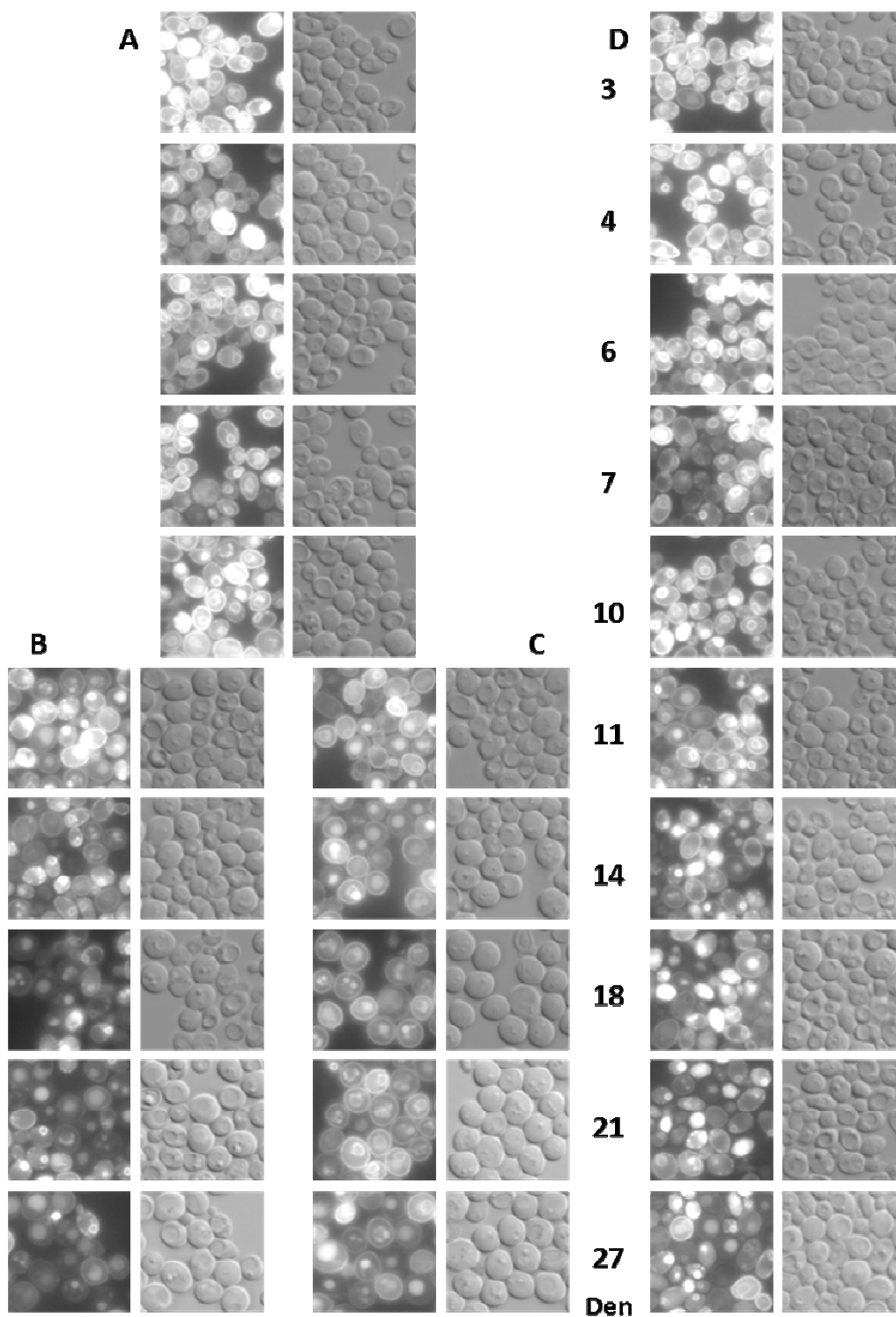
Obrázek 67: Jednotlivé frakce vyvíjející se kolonie kontrolního kmene BY4742 mezi dny 11-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) frakce 1 – populace malých buněk; B) frakce 2 – směs populací malých a velkých buněk; C) frakce 3 - populace velkých buněk; D) frakce 4 - populace velkých buněk.



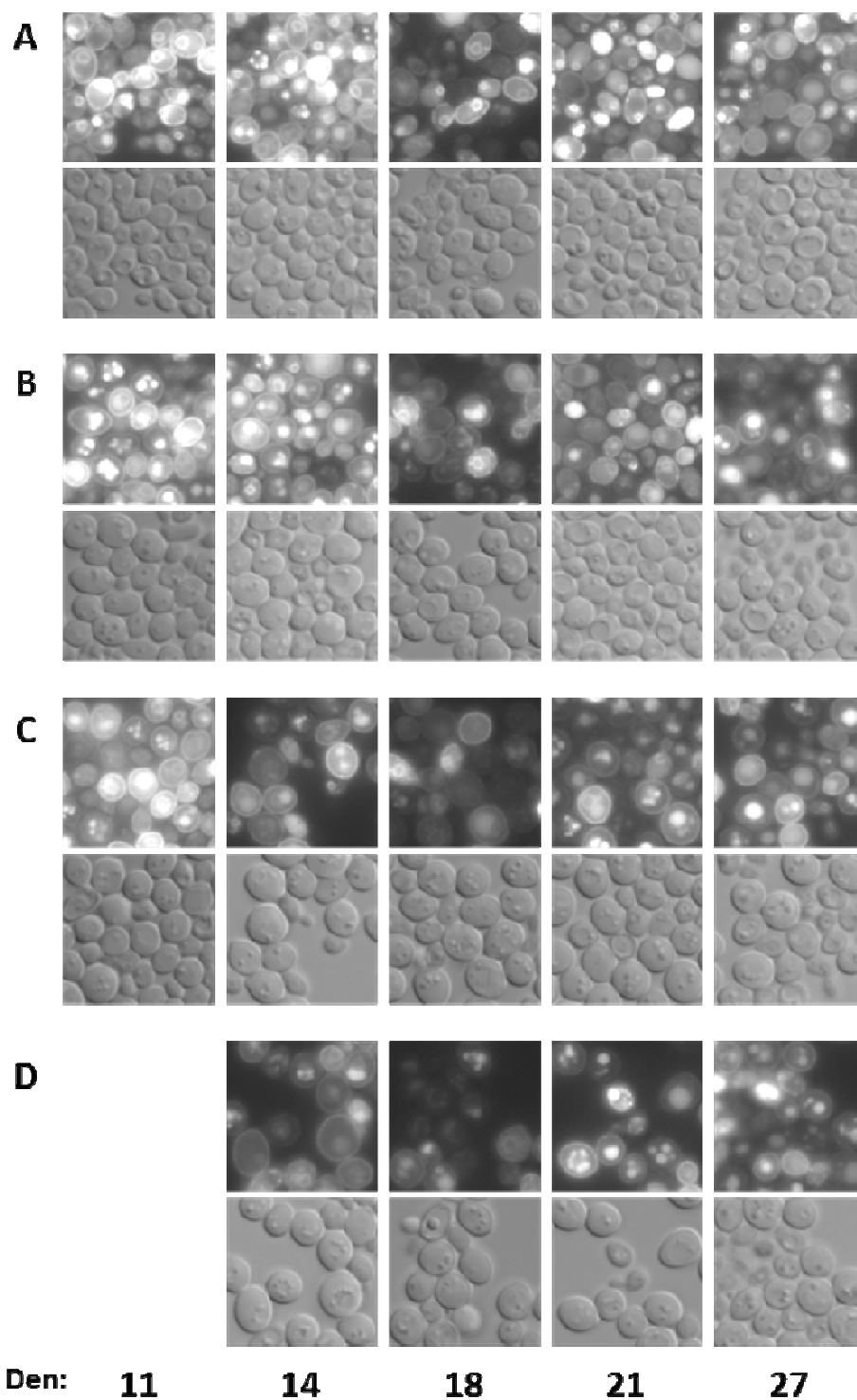
Obrázek 68: Vzorok vyvíjející se kolonie kmene BY-Stl1-GFP mezi dny 3-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) celá kolonie 1; B) střední část kolonie; C) vnější okraj kolonie; D) suspenze.



Obrázek 69: Jednotlivé frakce vyvíjející se kolonie kmene BY-Stl1-GFP mezi dny 11-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) frakce 1 – populace malých buněk; B) frakce 2 – směs populací malých a velkých buněk; C) frakce 3 - populace velkých buněk; D) frakce 4 - populace velkých buněk.



Obrázek 70: Vzorky vyvíjející se kolonie kmene BY-Fet3-GFPc mezi dny 3-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) buňky odebrané z celé kolonie; B) buňky odebrané ze střední části kolonie; C) buňky odebrané z vnějšího okraje kolonie; D) buněčná suspenze celé kolonie.

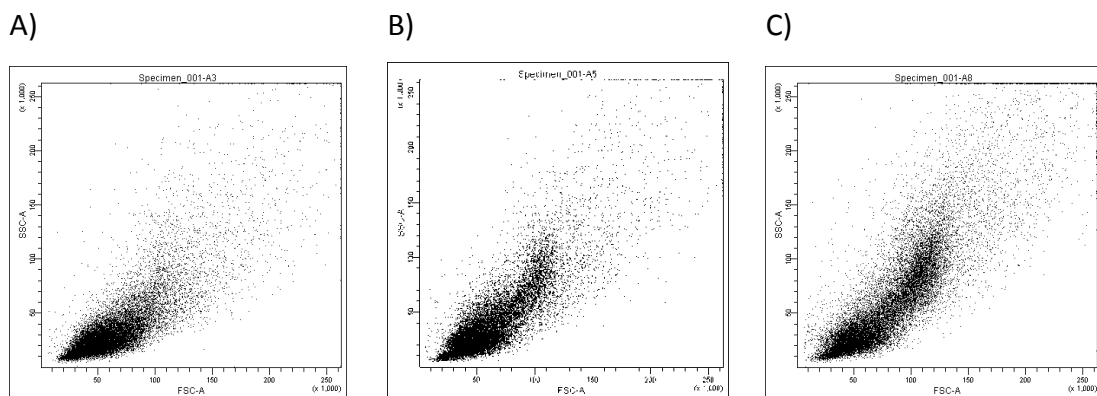


Obrázek 71: Jednotlivé frakce vyvíjející se kolonie kmene BY-Fet3-GFPc mezi dny 11-27., expozice fluorescenčních snímků byla 3s: A) frakce 1 – populace malých buněk; B) frakce 2 – směs populací malých a velkých buněk; C) frakce 3 - populace velkých buněk; D) frakce 4 - populace velkých buněk.

4.2.2.2. Průtokový cytometr

Z připravených vzorků kolonií (metodika) jsem na průtokovém cytometru měřil jednotlivé frakce a suspenze z celých kolonií. Při každém měření jsem hodnotil 20 000 buněk. Při analýze naměřených dat z jednotlivých frakcí jsem vyznačil dvě oblasti grafu, které přibližně odpovídaly dvěma populacím buněk v kolonii.

Populace P1 přibližně odpovídá malým buňkám nacházejícím se ve spodní části kolonie (viz úvod oddílu 4.2.2). Tyto buňky z 80–90 % korespondují s frakcí 1, získanou frakcionací buněk celé kolonie v sacharózovém gradientu. Populace P2 přibližně odpovídá velkým buňkám z horní části kolonie. Tyto buňky jsou relevantní frakcím 3 a 4, obdrženým frakcionací buněk celé kolonie v sacharózovém gradientu (Obrázek 72). Pro stanovení reprodukovatelnosti a přesnosti měření byly vzorky z kolonií Fet3p-GFPc a Stl1p-GFP analyzovány v tripletech.

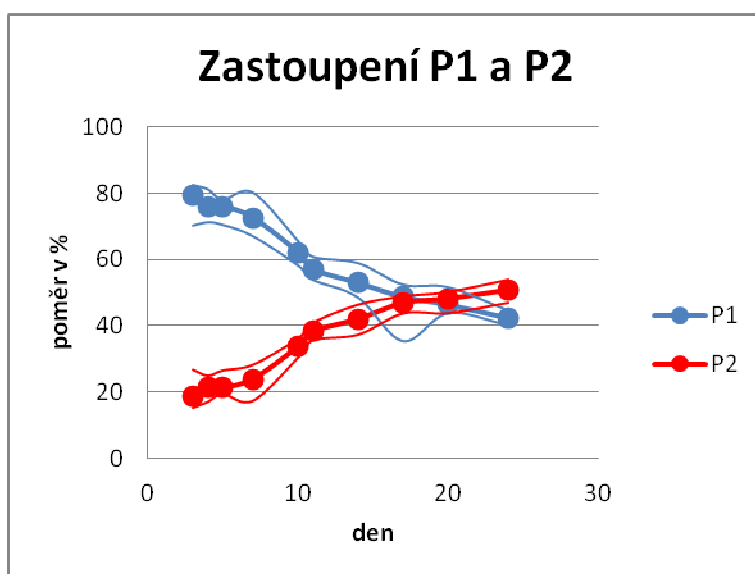


Obrázek 72: Změny v zastoupení subpopulací buněk během vývoje kolonie. A) 6. den vývoje kolonie. Většina buněk patří do frakce 1 (populace P1). B) 10. den vývoje kolonie. Lze pozorovat počátek diferenciacie kolonie a přítomnost dvou subpopulací buněk. Začínají se objevovat velké buňky, tvořící horní část kolonie. C) 18. den vývoje. Kolonie je tvořena dvěma buněčnými subpopulacemi.

Buňky z vnějšího okraje kolonie nejdu při dělení v sacharózovém gradientu odlišit, jelikož separují podle svých vlastností někde mezi buňkami populace P1 a P2. Proto jsou často buňky z okraje kolonie separovány do frakce 2 v sacharózovém gradientu, kde je směs buněk obou hlavních subpopulací. Buňky ze spodního okraje a horního okraje mají podobné vlastnosti jako buňky z horní vrstvy kolonie, které se

objevují ve frakcích 3 a 4. Proto tyto dvě okrajové subpopulace rovněž nemůžeme během analýz separovaných buněk odlišit.

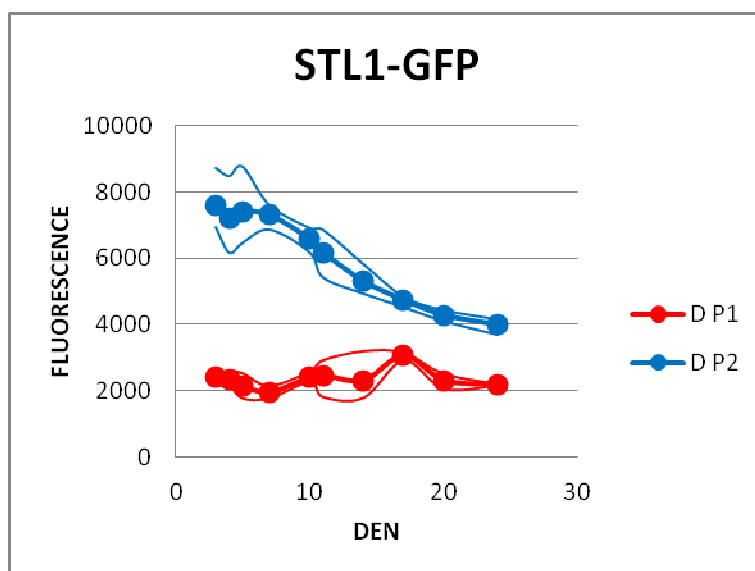
V grafech ukazujících intenzitu fluorescence jednotlivých populací z kolonií Fet3p-GFPc a Stl1p-GFP (Graf 2 Graf 3 **Graf 2** Graf 3) je zanesena hodnota průměrné fluorescence pro danou populaci buněk, od které byla odečtena hodnota autofluorescence naměřená pro buňky kolonií kontrolního kmene BY4742. Výsledná tři čísla pro každý den měření a pro každou populaci byla průměrována a zanesena do grafu. Dále jsou v grafu uvedeny i maximální a minimální hodnota rozptylu pro každý průměr z naměřených hodnot kontrolního vzorku kmene BY4742 a od něj odvozených transformant Fet3p-GFPc a Stl1p-GFP.



Graf 1: Procentuální zastoupení populace malých buněk P1 a populace velkých buněk P2 v závislosti na čase vývoje kolonií pro vzorky kontrolního kmene BY4742 a od něj odvozených Stl1p-GFP a Fet3p-GFPc.

Relativní intenzita fluorescence proteinu Stl1p-GFP v populaci P1 zůstává během celého vývoje kolonie stejná a je velmi nízká (Graf 2). Daný výsledek odpovídá zjištění, že již v brzkých časech vývoje kolonie lze pozorovat v buněčné suspenzi i vzorku z celé kolonie (Obrázek 68, 69) buňky, které mají signál na membráně velmi slabý nebo žádný. Většina buněk ve střední části kolonie tedy Stl1p protein neprodukuje. U populace P2 je relativní intenzita fluorescence oproti populaci P1 velká, ale od sedmého dne vývoje kolonie se projevuje její pokles. Mikroskopie ukázala, že od

přibližně šestého dne dochází k přesunu GFP signálu z membrány do vakuol. V čase pozorovaného snižování intenzity signálu (kolem 10.–11. dne) pak dochází i k zeslabování signálu ve vakuolách v důsledku degradace GFP. Uvedené výsledky ukazují, že buňky na povrchu kolonie Stl1p protein produkují v časných fázích jejího vývoje.

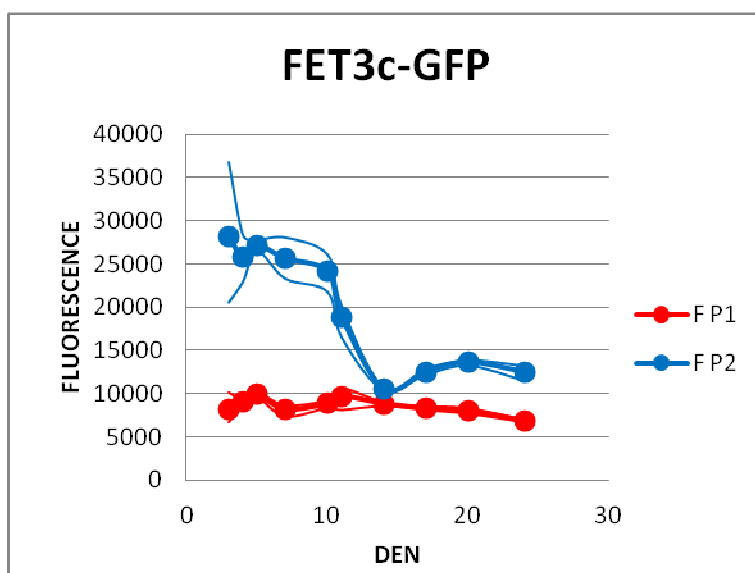


Graf 2: Změny v intenzitě signálu fluorescence Stl1p-GFP u subpopulací malých buněk P1 a velkých buněk P2. Intenzita signálu P1 je v průběhu celého vývoje kolonie nízká. Intenzita signálu P2 je na počátku vývoje vysoká a v průběhu času kontinuálně klesá, k většímu poklesu dochází po 7. dni vývoje.

Při porovnání relativní intenzity fluorescence u buněk kolonií kmene Fet3p-GFPc (Graf 3) je na první pohled zřejmé, že intenzita fluorescence buněk Fet3p-GFPc je asi 4-5x vyšší než intenzita GFP signálu Stl1p-GFP (Graf 2). Naměřené hodnoty pro subpopulaci P1 z Fet3p-GFPc kolonií jsou po celou dobu vývoje na stejné úrovni (Graf 3). Z mikroskopického pozorování je patrné, že GFP signál na membráně mají na začátku vývoje kolonie všechny buňky. V pozdějších časech vývoje mizí GFP signál z membrány u většiny buněk. U této většiny je potom zřetelná fluorescence endoplazmatického retikula, což by mohlo naznačovat zablokování transportu Fet3p-GFPc proteinu na membránu. V předmětné subpopulaci buněk také téměř není detekovatelný GFP signál z vakuoly. U menší části buněk zůstává GFP signál

na membráně. V této subpopulaci buněk se také často objevují mrtvé buňky, svítící silnou autofluorescencí (signál z celé buňky).

Populace P2 má silnou GFP fluorescenci na začátku a v průběhu vývoje dochází ke strmému poklesu intenzity signálu, konkrétně po desátém dni vývoje kolonie (Graf 3). V daném čase přitom probíhá přepnutí do alkalické fáze růstu a také se v této době začíná utvářet horní vrstva velkých buněk. Jak ukazuje mikroskopie, v pozdějších časových fázích mají P2 buňky stále signál na membráně, ale je slabý. U P2 buněk také nastává přesun GFP fluorescence do vakuol, avšak GFP signál ve vakuolách není tak výrazný jako v případě Stl1-GFP kmene (Obrázek 70, 71).



Graf 3: Změny v intenzitě signálu fluorescence Fet3p-GFPc u populace malých buněk P1 a populace velkých buněk P2. Intenzita GFP signálu subpopulace P1 je stabilní v průběhu vývoje kolonie. Intenzita GFP signálu subpopulace P2 v průběhu času klesá, k jejímu výraznému poklesu dochází kolem 14. dne vývoje.

5. Diskuse

5.1. Vnitřní morfologie kolonie a její autofluorescence

V časných fázích vývoje kolonie, před přechodem z acidické do alkalické fáze, vypadá většina buněk podobně. Jsou to menší buňky často s viditelnou vakuolou. Tyto buňky mají velmi slabou autofluorescenci. Na povrchu kolonie můžeme pozorovat několik vrstev buněk, které jsou menší a mají jiné vnitřní uspořádání a silnější autofluorescenci, což svědčí o odlišném metabolismu. Dotyčné buňky vytvářejí ochrannou vrstvu na povrchu kolonie. Různé typy ochranných povrchových vrstev buněk byly popsány u divokých i laboratorních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ochraňují kolonii před vysycháním nebo průchodem chemikálií (Váchová et al., 2011).

V pozdějších fázích vývoje dochází k diferenciaci buněk v rámci kolonie. Většina buněk se dá rozdělit do dvou velkých subpopulací. První z nich je ve spodní části kolonie. Jedná se o malé buňky, které nepučí a mají výraznou vakuolu zabírající většinu objemu buňky. Předmětné buňky vzkazují v pozdějších časových fázích velmi intenzivní autofluorescenci, hlavně ve středu kolonie. V této části kolonie se rovněž vyskytují umírající buňky (Váchová and Palková, 2005), které mohou také přispět k silné autofluorescenci, jež je zde pozorovatelná. Největší akumulace takových umírajících buněk je, na základě provedených řezů kolonií, ve středu vrstvy malých buněk.

Druhá subpopulace se skládá z velkých buněk, z nichž část je schopna dělení. Mají většinou nevýraznou vakuolu, jsou u nich výrazné lipidické partikule a nacházejí se v horní části kolonie. Tyto buňky mají slabší autofluorescenci. Ve vrstvě velkých buněk je autofluorescence nejvyšší na povrchu kolonie a směrem dolů klesá, což připomíná autofluorescenci buněk na povrchu kolonie v časných fázích růstu. I když se buňky v obou fázích růstu radikálně liší, je možné, že jejich autofluorescence je dána stejnými důvody.

Kromě dvou uvedených velkých populací se dají na řezech kolonií pozorovat také další, malé subpopulace. Na spodním okraji kolonie u agaru se nachází tenká vrstva buněk, které jsou velmi podobné populaci velkých buněk z horní části kolonie. Dotyčné buňky projevují slabou autofluorescenci v porovnání s buňkami ve vrstvách nad nimi. Pozorování časového vývoje těchto buněk v rámci kolonie je technicky obtížné.

V pozdějších časových fázích vývoje je kolonie totiž už tak vysoká, že zalití agarózou není zcela dokonalé, a buňky ve spodní části kolonie u agaru jsou tudíž špatně fixované. Proto se z řezu uvolňují a jsou špatně pozorovatelné *in situ*.

Na vnějším okraji kolonie lze najít další z marginálních subpopulací. Jde o menší buňky, s protáhlejším tvarem a viditelnou vakuolou. U těchto buněk je možno pozorovat pučení. Autofluorescence takových buněk je slabší než u buněk z horní části kolonie.

5.2. Rozdíly ve fúzních proteinech Fet3c-GFP a Fet3i-GFP

Jak výsledky ukázaly, kmen BY-Fet3-GFPi roste na GM mnohem hůř než kmen BY-Fet3-GFPc. Oba fúzní produkty lokalizují na cytoplazmatické membráně, avšak fluorescence Fet3p-GFPn je řádově menší než fluorescence Fet3p-GFPc. Vzhledem ke skutečnosti, že nezávisle připravené konstrukty Fet3i-GFP se chovají stejně, je snížená fluorescence zřejmě důsledkem vložení GFP na N-konec proteinu Fet3p. Zjištění, že kmeny BY-Fet3-GFPi rostou hůř než kmen BY-Fet3-GFPc, uvedenou možnost podporuje.

Existuje několik možností, proč má N-koncové připojení GFP k Fet3p za následek snížení vitality buněk. První z nich se zakládá na špatné predikci odstřížení signální sekvence. I když se oba predikční programy, které jsem používal, tj. Signal P a Psort II, shodly na stejném místě odštěpení signální sekvence, v buňce může docházet k odštěpení signální sekvence na jiném místě. To by mohlo mít za následek nedostatečně účinné směrování proteinu na membránu a jeho předčasnou degradaci. V mnou pozorovaných buňkách ovšem k transportu fúzního proteinu na membránu docházelo a nepozoroval jsem zvýšené množství GFP signálu ve vakuolách. Takto daná možnost je tedy zřejmě méně pravděpodobná.

Druhou možností, jež připadá v úvahu, je umístění fúzního GFP za signální sekvenci, tj. při správném odstřížení, lokalizace GFP na N-konci maturovaného proteinu. Pokud by byl N-konec strukturně důležitý pro funkci Fet3p proteinu, navázání GFP na tento konec by mohlo mít za následek sníženou funkčnost Fet3p a jeho rychlejší degradaci. To by také mohlo vysvětlovat zhoršený růst pozorovaný u daného kmene.

Třetí uvažovanou možností je špatné sbalení proteinu. GFP je asi 27 kDa velký protein, proto jeho vložení mezi signální sekvenci a zbytek Fet3p může mít za následek zhoršení maturace tohoto proteinu. Ve výsledku by pak mohlo dojít ke snížení množství správně sbalených molekul fúzního proteinu Fet3c-GFPn na membráně. Protože je uvedený protein na cytoplazmatické membráně hojně zastoupen, jeho snížená koncentrace by mohla mít negativní vliv na růst buněk.

5.3. Lokalizace vybraných proteinů značených GFP během vývoje kolonie

Při sledování lokalizace proteinů značených GFP během vývoje kolonie je nutno brát v potaz skutečnost, že GFP je výrazně více odolný vůči degradaci ve vakuole (Arai et al., 2001) ve srovnání s vlastním značeným proteinem. V pozdějších stadiích vývoje je například při řezech kolonií možno pozorovat silný fluorescenční signál z vakuol (**Obrázek 36**, 43). Ten se objevuje proto, že dochází ke kumulaci molekul GFP ve vakuole, i když vlastní protein, ke kterému byl GFP připojen, je už dávno degradován. Z toho důvodu je v buňce signál i poté, kdy je vlastní protein z membrány odstraněn. Tato skutečnost v pozdějších fázích růstu kolonie zkresluje například výsledky získané pomocí flow cytometrie, protože přístroj měří fluorescenci celé buňky a nedokáže odlišit fluorescenci z membrány od fluorescence ve vakuole. Proto neodpovídá úbytek celkové fluorescence odstranění signálu z membrány (Graf 2 a 3). Toto je jeden z důvodů, proč je důležité kombinovat výsledky celkové kvantifikace proteinu s výsledky získanými *in situ* pomocí řezů koloniemi.

5.4. Lokalizace fúzního proteinu Pdr5p-GFP během vývoje kolonie

Prd5p je transportér lokalizovaný na plazmatické membráně vázající ATP, podílí se na mnohočetné lékové resistence u buněk a je regulován pomocí Pdr1p. Patří do velké skupiny takzvaných ABC transportérů (zkratka z ATP binding cassette).

U toho transportéru bylo publikováno několik prací, ve kterých se pracovalo s Prd5p-GFP (Guan et al., 2010; Váchová et al., 2011). Byla zjištěna zvýšená exprese v době exponenciálního růstu (Mamnum et al., 2004) a exprese a lokalizace tohoto proteinu byla popsána v divokém kmeni kvasinek (Váchová et al., 2011), který se však

liší svoji morfologií od laboratorního kmene BY4742, se kterým jsem pracoval já. V divokém kmeni dochází k expresi a lokalizaci Prd5p-GFP v časných fázích vývoje kolonie ve vrstvě buněk horního okraje kolonie a u buněk u agaru. (Váchová et al., 2011). Z microarray analýzy vyplývá, že exprese tohoto genu během vývoje kolonie klesá (Palková et al., 2002).

Při sledování kmene BY-Pdr5-GFP jsem v časných fázích růstu kolonie pozoroval v časných fázích vývoje kolonie v horní vrstvě buněk (Obrázek 32, Obrázek 33) a spodní části kolonie u buněk blízko agaru. Dále jsem také pozoroval signál Pdr5p-GFP celou dobu pokusu v oblasti vnějšího okraje, ale signál v této oblasti byl v pozdějších časech pokusu velmi slabý.

Mnou zjištěné výsledky exprese a lokalizace na kmeni BY-PDR5-GFP odpovídají předchozí práci na koloniích divokého kmene kvasinek *S. cerevisiae* (Váchová et al., 2011). I když se laboratorní a divoký kmeny kvasinky *S. cerevisiae* výrazně liší morfologicky (Kuthan et al., 2003; Šťovíček et al., 2010), u obou se vyskytuje na povrchu vrstva buněk, které exprimují Pdr5p-GFP. Při studiu této vrstvy buněk u kolonií divokého kmene se zjistilo, že tyto buňky mají nejspíše speciální funkci ve smyslu jejich schopnosti odstraňovat toxické molekuly a tvoří tedy na povrchu kolonie ochrannou vrstvu (Váchová et al., 2011). Lze tedy předpokládat, že mnou pozorovaná vrstva buněk produkujících Pdr5p na povrchu kolonií kmene BY-PDR5-GFP by mohla plnit podobnou funkci a ochranná povrchová vrstva využívající Pdr5p exporter je zachovaná i u hladkých kolonií laboratorních kmenů.

Časové změny množství Prd5p-GFP přibližně odpovídají změnám Pdr5p transkriptů u vyvíjející se kolonie (Palková et al., 2002).

5.5. Lokalizace fúzního proteinu Stl1p-GFP během vývoje kolonie

Gen *STL1* kóduje glycerol-protonový kotransportér (Ferreira et al. 2005). Gen je negativně regulován glukózovou represí. V literatuře se můžeme dočíst, že protein Stl1p je důležitý pro adaptaci na stresové podmínky, jako jsou vysoký osmotický tlak (Ferreira et al., 2005) nebo vysoká (Ferreira and Lucas, 2007) a nízká (Tulha et al., 2010) teplota. V literatuře byla popsána GFP fúzní varianta předmětného genu

(Ferreira et al., 2005). Z microarray analýzy vyplývá, že exprese tohoto genu během vývoje kolonie klesá (Palková et al., 2002).

Během vývoje kolonie jsem nejsilnější fluorescenční signál na řezech pozoroval hned na začátku růstu (Obrázek 40), kdy jsem viděl GFP ve všech buňkách kolonie. Nejsilnější fluorescenci vykazovaly buňky v horní třetině kolonie. Během krátké doby však došlo ke snížení fluorescenčního signálu a viditelné GFP na membráně bylo pouze u buněk ve spodní části kolonie u agaru a buněk ve vnějším okraji kolonie (Obrázek 41). V buňkách horní části kolonie jsem pozoroval jenom signál degradujícího se GFP ve vakuolách. Ve spodní části jsem zaznamenával signál do doby přepnutí kolonie z acidické do alkalické fáze. Ve vnějším okraji zůstal viditelný signál po celou dobu pozorování. Jak už bylo zmíněno, další lokalizace GFP byla pozorována v buňkách ve spodní části kolonie u agaru. Kromě lokalizace na membráně byl u těchto buněk patrný silný GFP signál z blíže neurčených cytosolických partikulí (Obrázek 42Obrázek 43). V souladu s takto danými výsledky je skutečnost, že jsem po frakcionaci již diferencované kolonie (X den staré) v sacharózovém gradientu pozoroval fluorescenční signál na membráně pouze u malého počtu buněk z frakce č. 1. Ve frakcích č. 3 a 4 jsem zaznamenal fluorescenční signál jen ve vakuolách. U plně diferencovaných kolonií se okrajové buňky, které jsou relativně malé, kopurifikují s buňkami ze spodní části středu kolonie. Buňky frakce 1 vykazující fluorescenční signál na membráně tedy pravděpodobně pocházejí právě z vnějšího okraje kolonie.

Při měření fluorescence suspenze z biomasy kolonie na flow cytometru jsem zjistil, že fluorescenční signál populace malých buněk, které jsem definoval pomocí velikosti a vnitřní komplexity tak, aby jejich parametry odpovídaly hodnotám buněk z frakce 1, je konstantní. To se děje i přesto, že v pozdějších časech jsem u těchto buněk, jež pocházejí ze spodní části kolonie, nepozoroval signál na membráně. Daná skutečnost může být způsobena tím, že na začátku růstu kolonie je signál na membráně u buněk z její spodní části slabší a během vývoje kolonie přechází v silnou autofluorescenci.

U fluorescenčního signálu populace velkých buněk jsem kolem doby alkalizace zaznamenal prudký pokles intenzity signálu. Uvedený efekt může být způsoben tím, že v dotyčném čase dochází k vytvoření horní vrstvy velkých buněk, ve kterých je v této

době fluorescenční signál lokalizován ve vakuolách. Také se zdá, že po přepnutí do alkalické fáze růstu dochází k rychlejší degradaci GFP.

Z dosažených výsledků je zřejmé, že po krátké době exprese proteinu Stl1p ve všech buňkách mladé kolonie dochází k jeho lokalizaci na membráně pouze u buněk ve spodní části kolonie a ve vnějším okraji kolonie. Jedná se o buňky, které jsou díky své poloze v kolonii blízko zdroji živin média, a tedy i glycerolu. Buňky v horní části kolonie jsou od přímého zdroje živin vzdálenější a navíc k nim zdroje difundují přes spodní buňky, které je mohou přednostně konzumovat. Je tudíž možné, že dostávají menší množství glycerolu, a proto u nich dochází k odstranění Stl1p-GFP z membrány. V pozdějších fázích vývoje, kolem začátku alkalizace, nastává zřejmě vyčerpání živin z média, což má vést k úbytku fluorescenčního signálu Stl1p-GFP na membráně buněk ve spodní části kolonie. Po přepnutí z acidické do alkalické fáze zůstává viditelný fluorescenční signál na membráně pouze u buněk ve vnějším okraji kolonie, které se díky rozrůstání kvasinkové kolonie dostávají do oblasti s vyšší koncentrací glycerolu v médiu. Časové změny množství Stl1p-GFP přibližně odpovídají změnám Stl1p transkriptů u vyvíjející se kolonie (Palková et al., 2002).

5.6. Lokalizace fúzního proteinu Pho89p-GFP během vývoje kolonie

Pho89p je Na⁺/H⁺ kotransporter (Martinez and Persson, 1998, Pattison-Granberg and Persson, 2000), který je součástí vysokoafinitního transportního systému anorganického fosfátu v buňce, který je regulovaný nízkou hladinou extracelulárního fosfátu vně buňky (Oshima, 1997; Persson et al., 2003). Při kultivacích buněk v tekutém médiu se ukázalo, že tento protein je exprimovaný v časných fázích exponenciálního růstu (Pattison-Granberg and Persson, 2000). Lokalizace Pho89p v koloniích nebyla známa, pouze při microarray analýze vyvíjející se kolonie (Palková et al., 2002), byla prokázána zvýšená exprese *PHO89* genu v době přepnutí kolonie z acidické do alkalické fáze (Palková et al., 2002).

Při studiu proteinu Pho89p, se obvykle pracuje s kmeny *S. cerevisie*, u kterých jsou některé geny pro ostatní transportéry fosfátu deletovány (Auesukaree et al., 2003, Zvyagilskaya et al., 2008). To může mít ale za následek změnu celkové fyziologie buněk a tedy i expresi Pho89p proteinu. V dostupné literatuře jsem také nenašel

žádnou práci, ve které by bylo pracováno s fúzní variantou tohoto proteinu s GFP. Pro lokalizační studii jsem proto připravil nejjednodušší konstrukt Pho89 s GFP na C-konci, který se ukázal být životaschopný srovnatelně s rodičovským kmenem.

Při analýze řezů kolonií kmene BY-Pho89p-GFP jsem signál v časných fázích růstu kolonie nezaznamenal. Slabý signál na cytoplazmatické membráně a v endoplazmatickém retikulu jsem pozoroval až v době alkalizace pouze ve vnějším okraji kolonie. Tento signál zůstal patrný až do X-tého dne, tj. do doby, kdy byl pokus ukončen. Objevení signálu časově odpovídá výsledkům microarray analýzy (Palková et al., 2002). Ke zvýšení vlastní produkce proteinu ale nedošlo v celé kolonii, ale jen úzce vymezené oblasti kolonie.

V čase po začátku alkalizace se slabý signál lokalizovaný ve vakuolách objevil i u buněk v horní části kolonie. Je proto možné, že i u těchto buněk Pho89-GFP lokalizoval do membrány, ale že fluorescenční signál byl pod hranicí detekovatelnosti pomocí fluorescenční mikroskopie. Akumulace GFP ve vakuole v tomto případě může sloužit jako indicie slabé produkce sledovaného proteinu v dané oblasti. K expresi v horní části kolonie došlo ve stejné době jako u buněk z vnějšího okraje kolonie.

Slabá Pho89p produkce v buňkách tvořících horní vrstvu velkých buněk v kolonii, paralelně s produkcí v buňkách ve vnějším okraji kolonie, ukazuje na to, že se Pho89p protein produkuje v těch částech kolonie, kde dochází k pučení i v pozdějších fázích vývoje kolonie. Zároveň k produkci dochází v čase, kdy kolonie produkuje amoniak, čímž mění okolní pH. To by mohlo mít vliv na druhý důležitý protein vysoko afinitního transportního systému anorganického fosfátu v buňce, a to Pho84p (Bun-Ya et al., 1991), který transportuje fosfát společně s H⁺. Zvýšení pH by mohlo vést ke snížení funkce Pho84p, a k jeho částečnému nahrazení Pho89p. Analýza vývoje kvasinkové kolonie nicméně ukazuje paralelní nárůst exprese PHO89 a PHO84. Bude proto zajímavé zjistit časování exprese a lokalizaci Pho84p na proteinové úrovni a porovnat ji s hladinou mRNA.

Získané výsledky naznačují, že v počátcích vývoje, kdy je fosfátu v médiu dostatek by i buňky kolonii mohly využívat nízko afinitní transportéry fosfátu Pho87p, Pho90p, nebo Pho91p. Během růstu kolonie dochází k vyčerpání fosfátu z média. Kolonie se dostává do nutričního stresu a čelí mu přepnutím do alkalické fáze spojené s produkcí amoniaku, díky čemuž dojde k velkým změnám metabolismu, včetně zapnutí

adaptivního metabolismu (citace). Součástí této adaptace může být i přepnutí z nízko afinitního na vysoce afinitní transport fosfátu, Pho89p a to především v buňkách, které ještě stále pomalu rostou.

5.7. Lokalizace fúzního proteinu Fet3p-GFP během vývoje kolonie

Gen *FET3* kóduje železo-kyslíkovou oxidoreduktázu (Askwith et al., 1994), lokalizovanou na plazmatické membráně, potřebnou pro vysokoafinitní příjem železných iontů (Stearman et al., 1996) buňkou a podílející se na resistenci vůči měďným iontům (Askwith et al., 1994). Dříve bylo zjištěno, že Fet3p-GFP lokalizuje do plazmatické membrány (Strochlic et al., 2007). V případě kolonií kmene BY-Fet3-GFP lokalizoval Fet3-GFP jednak do cytoplazmatické membrány, jednak pravděpodobně do endoplazmatického retikula. Je možné, že tento rozdíl je způsoben různými růstovými podmínkami a množstvím produkovaného proteinu. Z microarray analýzy vyplývá, že exprese tohoto genu během vývoje kolonie klesá (Palková et al., 2002).

Na začátku vývoje kolonie dochází k produkci a lokalizaci Fet3-GFP ve všech buňkách kolonie. Ve většině buněk je také vidět GFP signál v endoplazmatického retikula. Nejsilnější je fluorescenční signál u buněk v horní části kolonie a ve vnějším okraji kolonie. Během vývoje dochází k úbytku signálu ve všech buňkách. V horní části kolonie a vnějším okraji kolonie zůstává viditelná lokalizace GFP na membráně buněk i v pozdějších časech vývoje kolonie. U buněk ze spodní části kolonie dochází k úbytku intenzity GFP signálu a v pozdějších časech už není vidět membránová lokalizace Fet3p-GFP. V pozdějších časech je u těchto buněk pozorovatelný hlavně signál Fet3p-GFP v endoplazmatickém retikulu. Nejstálejší intenzitu signálu Fet3-GFP mají buňky ve vnějším okraji kolonie.

Při měření fluorescence suspenze z biomasy kolonie na flow cytometru jsem zjistil, že fluorescenční signál populace malých buněk, které jsem definoval pomocí velikosti a vnitřní komplexity tak, aby jejich parametry odpovídali hodnotám buněk z frakce 1, je konstantní. Je to i přesto, že v pozdějších časech u těchto buněk postupně mizí signál z membrány. Stále však u nich zůstává silný GFP signál lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu a navíc v pozdějších časech roste u těchto buněk intenzita autofluorescence. Celková intenzita naměřeného signálu u těchto

buněk je proto skutečně pravděpodobně po celou sledovanou dobu vývoje kolonie stabilní. Naproti tomu jsem přibližně ve fázi alkalizace zaznamenal prudký pokles intenzity fluorescenčního signálu u populace velkých buněk. To může být způsobeno tím, že v tomto čase je již vytvořena horní vrstva velkých buněk, ve kterých začíná docházet k degradaci Fet3p-GFP ve vakuolách. Přesto je po celou dobu sledovaného vývoje kolonie u těchto buněk vidět membránová lokalizace GFP.

Získané výsledky naznačují, že protein Fet3p je v časných fázích vývoje kolonie nezbytný pro všechny buňky kolonie a jeho zvýšená produkce je u pučících buněk. To by vysvětlovalo pozorování, že v pozdějších časech vývoje kolonie v populaci malých nerostoucích buněk dochází k postupnému odstranění Fet3p-GFP z membrány. Dále by to vysvětlovalo skutečnost, že největší intenzita signálu je pozorovatelná u dělících se buněk vnějšího okraje kde dochází k rozrůstání kolonie do okolí. Časové změny množství Fet3-GFP přibližně odpovídají změnám Fet3p transkriptů u vyvíjející se kolonie (Palková et al., 2002).

5.8. Metody analýzy diferenciací kolonií

Řezy koloniemi se ukázaly být vhodnou metodou pro sledování lokalizace a produkce proteinů v rámci vývoje kolonie. Díky této metodě jsem mohl pozorovat vnitřní strukturu kolonie a zjistit i malé subpopulace buněk, které jsou velmi obtížně detekovatelné pomocí jiných technik. Touto metodou jsem krom jiného zjistil, že v rámci dvou velkých buněčných subpopulací lišících se morfologicky, tj. jednak subpopulace malých buněk ve spodní části kolonie a jednak subpopulace velkých buněk v horní části kolonie, dochází k další diversifikaci buněk viditelné na úrovni proteinové produkce a lokalizace. Jinými slovy, ani jedna z obou velkých subpopulací není homogenní a buňky v rámci nich dále diversifikují. Rovněž buňky v okrajových oblastech se chovají odlišně. Nevýhodou metody řezů je obtížnější práce se staršími koloniemi, které se hůře prosycují rozpuštěnou agarózou. Buňky ze spodní části kolonie následně nejsou dostatečně fixovány pro řezání na mikrotomu a mohou být při něm odmyty. Navíc se také zdá, že zalití kolonie agarózou může mít za následek zvýšenou autofluorescenci buněk na povrchu kolonie. Též je občas problémem pracovat s koloniemi majícími silnou alkalizaci – v důsledku velké produkce amoniaku se na

povrchu kolonie totiž objevuje precipitát (pravděpodobně vysrážené soli z média), kvůli němuž se do kolonie špatně dostává agaróza a zhoršuje se řezání na mikrotomu.

Při pozorování řezů kolonií jsem viděl jednotlivé buňky a populace, ale nebyl jsem schopen je nějakým způsobem kvantifikovat. Z uvedeného důvodu jsem jako dodatečnou techniku používal frakcionaci buněk kolonie v sacharózovém gradientu. Pomocí této metody jsem mohl rozdělit kolonii na dvě základní subpopulace buněk, a sice malé buňky ve spodní části kolonie a velké buňky v horní části kolonie. Na jednotlivých populacích buněk jsem poté mohl provádět měření na průtokovém cytometru. Nevýhodou této metody je, že neumožňuje rozlišit ostatní, malé subpopulace, například buňky z vnějšího okraje kolonie. Nejedná se tedy o kvalitativní vyhodnocení fluorescence buněk, nýbrž o kvantitativní shrnutí vlastností hlavních subpopulací. Měření na průtokovém cytometru rovněž neumožňuje odlišit fluorescenci z membrány od fluorescence z vakuol a je proto nutné doplnit snímky z fluorescenčního mikroskopu, které slouží pro kontrolu a vyhodnocení naměřených dat.

6. Závěr

V rámci své diplomové práce zaměřené na zjištění lokalizace vybraných proteinů v průběhu vývoje kolonie kvasinky *S. cerevisiae* jsem získal tyto výsledky:

- Za využití homologní rekombinace jsem vytvořil 4 stabilní konstrukty odvozené od rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742, a sice kmeny BY-Stl1-GFP, BY-Pdr5-GFP, BY-Pho89-GFP a BY-Fet3-GFPi. U všech čtyř konstruktů jsem potvrdil lokalizaci fúzovaných proteinů v plazmatické membráně.
- Zjistil jsem výrazné rozdíly ve fyziologii kolonií a v expresi Fet3p-GFP u kmenů BY-Fet3-GFPi a BY-Fet3-GFPc. Kvůli tomu jsem při dalších pokusech pracoval s variantou BY-Fet3-GFPc dříve vytvořenou O. Štěpánkem (Štěpánek, 2007).
- U proteinů Stl1p-GFP, Pdr5p-GFP, Pho89p-GFP a Fetp3-GFPi jsem sledoval jejich expresi a lokalizaci v rámci vývoje kvasinkové kolonie na komplexním médiu s glycerolem (GMA).
- Signál Stl1p-GFP je v začátcích růstu kolonie ve všech buňkách, s tím, že v horní třetině kolonie je síla signálu větší. Po brzké degradaci signálu ve většině buněk zůstává signál pouze u buněk vnějšího okraje.
- Signál Pdr5p-GFP je pouze v buňkách na okrajích kolonie, hlavně na jejím povrchu, kde dochází k jeho velmi brzké degradaci. Signál zůstává velmi slabý u buněk vnějšího okraje.
- Signál Pho89p-GFP je pouze u buněk ve vnějším okraji kolonie po přepnutí kolonie z acidické do alkalické fáze růstu.
- Signál Fetp3-GFPi je v začátcích růstu kolonie ve všech buňkách, s tím, že v horní třetině kolonie je síla signálu větší. Během vývoje kolonie dochází k úbytku signálu a ve střední části kolonie k jeho vymizení z membrány.
- V rámci tvorby literárního přehledu pro diplomovou práci jsem zpracoval problematiku intracelulárního pH, způsoby jeho měření a jeho regulaci v buňce.

7. Seznam literatury

1. Alberty, R.A. (2007): Effects of pH in rapid-equilibrium enzyme kinetics. *J Phys Chem B* 111: 14064–14068.
2. Anderson, R.G., Pathak, R.K. (1985): Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell*. 40(3):635-43.
3. Arai, K., Ohkuma, S., Matsukawa, T., Kato, S. (2001): A simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein – an application for cell cycle analysis. *FEBS Lett*. 507(2):181–6.
4. Ariño, J., Ramos, J., Sychrová, H. (2010): Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74(1):95-120.
5. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger, H. (1998): Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J*. 17(24):7170-8.
6. Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D.M., Kaplan, J. (1994): The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*. 76(2):403-10.
7. Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., Harashima, S. (2003): Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 306(4):843-50.
8. Beyenbach, K.W., Wieczorek, H. (2006): The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol*. 209(Pt 4):577-89.
9. Bond, S., Forgac, M. (2008): The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H⁺)-ATPase in yeast. *J Biol Chem*. 283(52):36513-21. Epub 2008 Oct 20.

10. Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., Blumwald, E. (2007): Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 282(33):24284-93.
11. Capieaux, E., Vignais, M.L., Sentenac, A., Goffeau, A. (1989): The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J Biol Chem.* 264(13):7437-46.
12. Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., Ward, W.W. (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32(5):1212–8.
13. Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S., Brown, A.J. (1997): Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (pt2):303–11.
14. Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 173(1 Spec No):33–8.
15. Demaurex, N. (2002): pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci.* 17:1-5.
16. Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X., Nagley, P. (2000): Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta.* 1458(2-3):428-42.
17. Ferreira, C., Lucas, C. (2007): Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene STL1 is overcome by high temperature. *FEBS Lett.* 581(9):1923-7..
18. Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A.; (2005): A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16(4):2068-76.

19. Ferreira, T., Mason, A.B., Slayman, C.W. (2001): The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J Biol Chem.* 276(32):29613-6.
20. Froschauer, E., Nowikovsky, K., Schweyen, R.J. (2005): Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1711(1):41-8.
21. Gallagher, F.A., Kettunen, M.I., Brindle, K.M. (2011) Imaging pH with hyperpolarized (¹³C) NMR Biomed. doi: 10.1002/nbm.1742.
22. Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T., Spang, A.(2005): New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 22(1):1-12.
23. Gietz, R.D., Woods, R.A. (2006): Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol.* 313:107-20.
24. Gillies, R.J., Ugurbil, K., den Hollander, J.A., Shulman, R.G. (1981): ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(4):2125-9.
25. Giraud, M.F., Velours, J. (1994): *Eur J Biochem.* ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the F1 delta subunit, sequence and disruption of the structural gene. 222(3):851-9.
26. Goffeau, A., Slayman, C.W. (1981): The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 639, 197–223.
27. Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., Portillo, F. (2000): Regulation of yeast H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol.* 20(20):7654-61.
28. Graham, L.A., Flannery, A.R., Stevens, T.H. (2003): Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 35(4):301-12.

29. Guan, W., Jiang, H., Guo, X., Mancera, E., Xu, L., Li, Y., Steinmetz, L., Li, Y., Gu, Z. (2010): Antagonistic changes in sensitivity to antifungal drugs by mutations of an important ABC transporter gene in a fungal pathogen.; PLoS One. 5(6):e11309.
30. Guélin, E., Chevallier, J., Rigoulet, M., Guérin, B., Velours, J. (1993): J Biol Chem. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation and disruption of the ATP epsilon gene. 268(1):161-7.
31. Hanson, G.T., McAnaney, T.B., Park, E.S., Rendell, M.E., Yarbrough, D.K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S.G., Montrose, M.H., Remington, S.J. (2002): Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. Biochemistry 31; 41(52):15477–88.
32. Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995): Improvement of green fluorescent protein by site-directed mutations. Nature 373: 663–664.
33. Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994): Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12501–12504.
34. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263(5148):802–5.
35. Kamath, R.S., Bungay, H.R. (1988): Growth of yeast colonies on solid media. J Gen Microbiol. Nov;134(11):3061-9.
36. Kane, P.M. (2006): The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. Microbiol Mol Biol Rev. 70(1):177-91.
37. Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M., Stevens, T.H. (2001): The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. J Biol Chem. 276(50):47411-20.

38. Kim, J.H., Johannes, L., Goud, B., Antony, C., Lingwood, C.A., Daneman, R., Grinstein, S. (1998): Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6):2997-3002.
39. Kresnowati, M.T., Suarez-Mendez, C., Groothuizen, M.K., van Winden, W.A., Heijnen, J.J. (2007 a): Measurement of fast dynamic intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae* using benzoic acid pulse. *Biotechnol Bioeng*. 97(1):86-98.
40. Kresnowati, M.T., Suarez-Mendez, C.M., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J. (2007 b): Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metab Eng*. 2008 Jan;10(1):39-54.
41. Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I. (2003): Jacq C, Palková Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol*. 47(3):745-54.
42. Mamnun, Y.M., Schüller, C., Kuchler, K. (2004): Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett*. 559(1-3):111-7.
43. Manolson, M.F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B.E., Roberts, B.T., Hoyt, M.A., Jones, E.W. (1994): STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p. *J Biol Chem*. 269(19):14064-74.
44. Martinez, P., Persson, B.L. (1998): Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 258(6):628-38.
45. Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S. A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol*. 17(10):969–73.

46. Mellman, I. (1992): The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol* 172: 39–45.
47. Miesenböck, 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.
48. Mináriková, L., Kuthan, M., Ricicová, M., Forstová, J., Palková, Z. (2001): Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res.* 271(2):296-304.
49. Morsomme, P., Slayman, C.W., Goffeau, A. (2000): Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1469(3):133-57 .
50. Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R. (1997): Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem.* 272(42):26145-52.
51. Nishi, T., Forgac, M. (2002): The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(2):94-103.
52. Nishimura, K., Igarashi, K., Kakinuma, Y. (1998): Proton gradient driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180, 1962–1964.
53. Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1981): Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 256, 2079–2082.
54. Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., Smits, G.J. (2009): In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology.* 155(Pt 1):268-78.

55. Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996 Sep 6;273(5280):1392–5.
56. Oshima, T., Ikeda, K., Furukawa, M., Takasaka, T. (1997): Alternatively spliced isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the guinea pig cochlea. *Biochem Biophys Res Commun.* 233(3):737-41.
57. Palková, Z., Devaux, F., Ricicová, M., Mináriková, L., LeCrom, S., Jacq, C. (2002): Ammoniapulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell.* 13(11):3901-14.
58. Palková, Z., Forstová, J. (2000): Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci.* 113 (Pt 11):1923-8.
59. Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390 (6659):532-6.
60. Palková, Z., Váchová, L. (2006): Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev.* 30(5):806-24.
61. Paroutis, P., Touret, N. & Grinstein, S. (2004): The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* 19, 207–215.
62. Pattison-Granberg, J., Persson, B.L. (2000): Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 182(17):5017-9.
63. Paul, M.F., Ackerman, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., Tzagolof, A., Ackermann S. (1994): Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of atp3 mutants. *J Biol Chem.* 269(42):26158-64.
64. Peña, A., Ramirez, J., Rosas, G., Calahorra, M. (1995): Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J Bacteriol* 177: 1017–1022.

65. Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., Lundh, F. (2003): Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 43(4):225-44. Epub 2003 May 10.
66. Piccirillo, S., White M.G., Murphy, J.C., Law, D.J. (2010): Honigberg SM., The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies, *Genetics*. 184(3):707-16. Epub 2009 Dec 28.
67. Portillo, F. (2000): Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*. 1469(1):31-42.
68. Prasher, D.C., Eckenrode V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229–33.
69. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrova, H. (1996): Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 27;387(1):89-93.
70. Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R., Peña, A. (1998): A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J Bacteriol*. 180(22):5860-5.
71. Rao, R., Drummond-Barbosa, D., Slayman, C.W. (1993): Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H(+)-ATPase. *Yeast*. 9(10):1075-84.
72. Rottenberg, H. (1979): The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles, and vesicles. *Methods Enzymol*. 55:547-69.
73. Seol, J.H., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Deshaies, R.J. (2001): Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat Cell Biol*. 3(4): 384-91.
74. Serrano, R. (1983): In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156(1):11-4.

75. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., Fink, G.R. (1986): Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺ and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319(6055):689-93.
76. Sheff, M.A., Thorn, K.S. (2004): Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*.; *Yeast*. 21(8):661-70.
77. Shimomura, O. (1979): Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 104:220–22.
78. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223–39.
79. Scherz, R., Shinder, V., Engelberg, D. (2001): Anatomical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* stalk-like structures reveals spatial organization and cell specialization. *J Bacteriol.* 183(18):5402-13.
80. Schlessler, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., Goffeau, A. (1988): A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263(36):19480-7.
81. Smardon, A.M., Kane, P.M. (2007): RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem.* 282(36):26185
82. Smardon, A.M., Tarsio, M., Kane, P.M. (2002): The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J Biol Chem.* 277(16):13831-9. Epub 2002 Feb 13.
83. Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D., Dancis, A. (1996): A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science.* 271(5255):1552-7.
84. Stolz, J., Vielreicher, M. (2003): Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 278(21):18990-6. Epub 2003 Mar 20.

85. Sťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., Palková, Z. (2010): General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genet Biol.* 47(12):1012-22.
86. Strohlic, T.I., Setty, T.G., Sitaram, A., Burd, C.G. (2007): Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol.* 177(1):115-25.
87. Štěpánek, O. (2007): Transportery železa a vývoj kvasinkových kolonií, Diplomová práce, PŘF UK
88. Takeda, M., Chen, W.J., Saltzgaber, J., Douglas, M.G. (1986): Nuclear genes encoding the yeast mitochondrial ATPase complex. Analysis of ATP1 coding the F1-ATPase alpha-subunit and its assembly. *J Biol Chem.* 261(32):15126-33.
89. Toulmay, A., Schneiter, R. (2007): Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie.* 89(2):249-54.
90. Tsien, R.Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509–44.
91. Tulha, J., Lima, A., Lucas, C., Ferreira, C. (2010): *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. *Microb Cell Fact.* 9:82.
92. Vacík, J. 1986; *Obecná chemie.* SPN, Praha
93. Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Fercíková, I., Kubínová, L., Palková, Z. (2009): Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter; *Environ Microbiol.* 11(7):1866-77.

94. Váchová, L., Kucerová, H., Devaux, F., Ulehlová, M., Palková, Z. (2009): Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol.* 11(2):494-504.
95. Váchová, L., Palková, Z. (2005): Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia.; *J Cell Biol.* 169(5):711-7
96. Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová L., Palková, Z.(2011): Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies, Cite by DOI: 10.1083/jcb.201103129
JCB
97. Veine, D.M., Arscott, L.D. & Williams, C.H. Jr (1998): Redox potentials for yeast, *Escherichia coli* and human glutathione eductase relative to the NAD⁺/NADH redox couple: enzyme forms active in catalysis. *Biochemistry* 37, 15575–15582.
98. Velours, J., Durrens, P., Aigle, M., Guérin, B. (1988): ATP4, the structural gene for yeast FOF1 ATPase subunit 4. *Eur J Biochem.* 170(3):637-42.
99. Whitten, S.T., Wooll, J.O., Razeghifard, R., García-Moreno, E.B., Hilser, V.J. (2001): The origin of pH-dependent changes in m-values for the denaturant-induced unfolding of proteins. *J Mol Biol* 309: 1165–1175.
100. Wohlrab, H., Průtokovýers, N. (1982): pH gradient-dependent phosphate transport catalyzed by the purified mitochondrial phosphate transport protein. *J Biol Chem* 257, 28–31.
101. Wu, M.M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R.Y., Moore, H.P., Machen, T.E. (2001): Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem.* 276(35):33027-35. Epub 2001 Jun 11.
102. Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N. Jr. (1996a): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14:1246–51..

103. Yang, T.T., Cheng, L., Kain, S.R. (1996b): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24:4592–93.
104. Young, B.P., Shin, J.J., Orij, R., Chao, J.T., Li, S.C., Guan, X.L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M.R., Prinz, W.A., Smits, G.J., Loewen, C.J. (2010): Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science.* 329(5995):1085-8.
105. Zhao, S., Douglas, N.W., Heine, M.J., Williams, G.M., Winther-Larsen, H.C., Meaden, P.G. (1994): The STL1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is predicted to encode a sugar transporter-like protein. *Gene.* 146(2):215-9.
106. Zvyagil'skaya, R.A., Lundh, F., Samyn, D., Pattison-Granberg, J., Mouillon, J.M., Popova, Y., Thevelein, J.M., Persson, B.L. (2008): FEMS Yeast Res. Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. 8(5):685-96

Sekvenční ověření kmene BY-Stl1-GFP:

Genomic DNA (SGD)/C01 BY-Stl1-GFP Forward primer:

```
Query 4023 GGGTCTGCTTGTCAATTCATTCAACCAAGTTGCAGAAAGTGCAGCTAACTTAGCCTCTTT 4082
          |||
Sbjct 1079 GGGTCTGCTGTCATTCATTCAACCAAGTTGCAGAAAGTGCAGCTAACTTAGCCTCTTT 1022

Query 4083 GTTGTTTACAATGTCTTTGTCTTTTTGTGGTGTATGACTACCCCAAGTGCCATGCCTAG 4142
          |||
Sbjct 1021 GTTGTTTACAATGTCTTTGTCTTTTTGTGGTGTATGACTACCCCAAGTGCCATGCCTAG 962

Query 4143 ATTTTGGATATTCATGTACAGGGTTTCACCTTTGACTTATTTCAATTCAGGCTCTGTTGGC 4202
          |||
Sbjct 961 ATTTTGGATATTCATGTACAGGGTTTCACCTTTGACTTATTTCAATTCAGGCTCTGTTGGC 902

Query 4203 TGTGGTGTGGCTAACGTAGACGTCAAATGCGCTGATTACGAATTGCTAGAATTCACACC 4262
          |||
Sbjct 901 TGTGGTGTGGCTAACGTAGACGTCAAATGCGCTGATTACGAATTGCTAGAATTCACACC 842

Query 4263 ACCATCCGGTATGACATGTGGGCAGTACATGGAACCATATTTACAAC TAGCAAAGACTGG 4322
          |||
Sbjct 841 ACCATCCGGTATGACATGTGGGCAGTACATGGAACCATATTTACAAC TAGCAAAGACTGG 782

Query 4323 TTA CT TAACTGATGAAAATGCCACTGACACCTGTAGTTTCTGTCAAATATCTACAACCAA 4382
          |||
Sbjct 781 TTA CT TAACTGATGAAAATGCCACTGACACCTGTAGTTTCTGTCAAATATCTACAACCAA 722

Query 4383 TGATTACTTAGCTAATGTCAATTCTTTCTACAGTGAGAGATGGAGAAATATGGTATCTT 4442
          |||
Sbjct 721 TGATTACTTAGCTAATGTCAATTCTTTCTACAGTGAGAGATGGAGAAATATGGTATCTT 662

Query 4443 CATCTGTTATATTGCATTCAATTATATCGCTGGTGTCTTTTTCTACTGGTTAGCAAGAGT 4502
          |||
Sbjct 661 CATCTGTTATATTGCATTCAATTATATCGCTGGTGTCTTTTTCTACTGGTTAGCAAGAGT 602

Query 4503 GCCTAAAAGAACGGTAAACTCTC CAAGAAAGGTGACGGTGTGGTTAATTAACATGTC 4562
          |||
Sbjct 601 GCCTAAAAGAACGGTAAACTCTC CAAGAAAGGTGACGGTGTGGTTAATTAACATGTC 542

Query 4563 TAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGT 4622
          |||
Sbjct 541 TAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGT 482

Query 4623 TAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATT 4682
          |||
Sbjct 481 TAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATT 422

Query 4683 GACCTTAAAATTTATTTGTA CTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCAC 4742
          |||
Sbjct 421 GACCTTAAAATTTATTTGTA CTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCAC 362
```

```

Query 4743 TACTTTAACTTATGGTGTTC AATGTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGA 4802
          |||
Sbjct 361 TACTTTAACTTATGGTGTTC AATGTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGA 302

Query 4803 CTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTattttttCAAAGA 4862
          |||
Sbjct 301 CTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGA 242

Query 4863 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 4922
          |||
Sbjct 241 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 182

Query 4923 AATCGAATTAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTAGGTCACAAATTGGA 4982
          |||
Sbjct 181 AATCGAATTAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTAGGTCACAAATTGGA 122

Query 4983 ATACA ACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 5042
          |||
Sbjct 121 ATACA ACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 62

Query 5043 AGTTAACTTCAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACC-ATT 5101
          |||
Sbjct 61 AGTTAACTTCAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGT-CAATTAGCT ACCATT 4

```

Sekvenční ověření kmene BY-Stl1-GFP:

Genomic DNA (SGD)/C01 BY-Stl1-GFP Revers primer:

```
Query 4023 GGGTCTGCTTGTTCATTTCAATCAACCAAGTTGCAGAAAGTGCAGCTAACTTAGCCTCTTT 4082
          |||
Sbjct 1079 GGGTCTGC TGTTCATTTCAATCAACCAAGTTGCAGAAAGTGCAGCTAACTTAGCCTC TT 1022

Query 4083 GTTGTTTACAATGCTCTTTGTCTTTTTGTGGTGTATGACTACCCCAAGTGCCATGCCTAG 4142
          |||
Sbjct 1021 GTTGTTTACAATGCTCTTTGTCTTTTTGTGGTGTATGACTACCCCAAGTGCCATGCCTAG 962

Query 4143 ATTTTGGATATTCATGTACAGGGTTTCACCTTGACTTATTTCAATCAGGCTCTGTTGGC 4202
          |||
Sbjct 961 ATTTTGGATATTCATGTACAGGGTTTCACCTTGACTTATTTCAATCAGGCTCTGTTGGC 902

Query 4203 TGTGGTGGTTGCTAACGTAGACGTCAAATGCGCTGATTACGAATTGCTAGAATTCACACC 4262
          |||
Sbjct 901 TGTGGTGGTTGCTAACGTAGACGTCAAATGCGCTGATTACGAATTGCTAGAATTCACACC 842

Query 4263 ACCATCCGGTATGACATGTGGGCAGTACATGGAACCATATTTACAAC TAGCAAAGACTGG 4322
          |||
Sbjct 841 ACCATCCGGTATGACATGTGGGCAGTACATGGAACCATATTTACAAC TAGCAAAGACTGG 782

Query 4323 TTA CT TAACTGATGAAAATGCCACTGACACCTGTAGTTTCTGTCAAATATCTACAACCAA 4382
          |||
Sbjct 781 TTA CT TAACTGATGAAAATGCCACTGACACCTGTAGTTTCTGTCAAATATCTACAACCAA 722

Query 4383 TGATTACTTAGCTAATGTCAATCTTTCTACAGTGAGAGATGGAGAAATTATGGTATCTT 4442
          |||
Sbjct 721 TGATTACTTAGCTAATGTCAATCTTTCTACAGTGAGAGATGGAGAAATTATGGTATCTT 662

Query 4443 CATCTGTTATATTGCATTCAATTATATCGCTGGTGTCTTTTTCTACTGGTTAGCAAGAGT 4502
          |||
Sbjct 661 CATCTGTTATATTGCATTCAATTATATCGCTGGTGTCTTTTTCTACTGGTTAGCAAGAGT 602

Query 4503 GCCTAAAAGAACGGTAAACTCTC CAAGAAAGGTGACGGTGTGGTTAATTAAC ATGTC 4562
          |||
Sbjct 601 GCCTAAAAGAACGGTAAACTCTC CAAGAAAGGTGACGGTGTGGTTAATTAAC ATGTC 542

Query 4563 TAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGT 4622
          |||
Sbjct 541 TAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGGTGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGT 482

Query 4623 TAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATT 4682
          |||
Sbjct 481 TAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATT 422

Query 4683 GACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATGCCAGTTCATGGCCAACCTTAGTCAC 4742
          |||
```

Sbjct 421 GACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCAC 362
 Query 4743 TACTTTAACTTATGGTGTTCATGTTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGA 4802
 |||
 Sbjct 361 TACTTTAACTTATGGTGTTCATGTTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGA 302
 Query 4803 CTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTAtttttttCAAAGA 4862
 |||
 Sbjct 301 CTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGA 242
 Query 4863 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 4922
 |||
 Sbjct 241 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 182
 Query 4923 AATCGAATTAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGA 4982
 |||
 Sbjct 181 AATCGAATTAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGA 122
 Query 4983 ATACAACATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 5042
 |||
 Sbjct 121 ATACAACATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 62
 Query 5043 AGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTCTGTTCATTAGCTGACC-ATT 5101
 |||
 Sbjct 61 AGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTCTGT-CAATTAGCT ACCATT 4

Sbjct 663 TACTTTAACTTATGGTGTTC AATGTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGA 722

 Query 1977 CTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTAtttttttCAAAGA 2036
 |||
 Sbjct 723 CTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTCCAAGAAAGAACTATTTTTTCAA-GA 781

 Query 2037 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 2096
 |||
 Sbjct 782 TGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAG 841

 Query 2097 AATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGA 2156
 |||
 Sbjct 842 AATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGA 901

 Query 2157 ATACA ACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 2216
 |||
 Sbjct 902 ATACA ACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAA 961

 Query 2217 AGTTAACTTCAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTA 2276
 |||
 Sbjct 962 AGTTAACTTCAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTA 1021

 Query 2277 TCAACAAAATACTCCAATTGG-TGA 2300
 |||
 Sbjct 1022 TCAACAAAATACTCCAATTGG-TGA 1046

Sekvenční ověření kmene BY-Pdr5-GFP:

Genomic DNA (SGD)/C01 BY-Pdr5-GFP Revers primer:

```
Query 1233 CCCACCAGAAATTGCATCAATGAAAGTTCGTGCATCAACAAACGCTTCTCCACATGTAC 1292
      |||
Sbjct 1043 CCCA CAGAAATTGCATCAATGAAAGTTCGTGCATCAACAAACGCTTCTCCACATGTAC 985

Query 1293 TAATTGGTTGTGTAACCTTTCGGTTGTCATGTTACCCCAATATTTATTGGACAGTCCGG 1352
      |||
Sbjct 984 TAATTGGTTGTGTAACCTTTCGGTTGTCATGTTACCCCAATATTTATTGGACAGTCCGG 925

Query 1353 TTGGGGTTGCTACTTATTTTTTGCTGTTATGAATTATTTATACATTCAGTTATCTTCTT 1412
      |||
Sbjct 924 TTGGGGTTGCTACTTATTTTTTGCTGTTATGAATTATTTATACATTCAGTTATCTTCTT 865

Query 1413 TTTCTACCCTGAAACCGCCGGAAGAAGTTGGAGGAAATCGACATCATCTTTGCTAAAGC 1472
      |||
Sbjct 864 TTTCTACCCTGAAACCGCCGGAAGAAGTTGGAGGAAATCGACATCATCTTTGCTAAAGC 805

Query 1473 ATACGAGGATGGCACTCAACCATGGAGAGTTGCTAACCATTTGCCCAAGTTATCCCTACA 1532
      |||
Sbjct 804 ATACGAGGATGGCACTCAACCATGGAGAGTTGCTAACCATTTGCCCAAGTTATCCCTACA 745

Query 1533 AGAAGTCGAAGATCATGCCAATGCATTGGGCTCTTATGACGACGAAATGGAAAAAGAGGA 1592
      |||
Sbjct 744 AGAAGTCGAAGATCATGCCAATGCATTGGGCTCTTATGACGACGAAATGGAAAAAGAGGA 685

Query 1593 CTTTGGTGAAGATAGAGTAGAAGACACCTATAACCAAATTAACGGCGATAATTCGTCTAG 1652
      |||
Sbjct 684 CTTTGGTGAAGATAGAGTAGAAGACACCTATAACCAAATTAACGGCGATAATTCGTCTAG 625

Query 1653 TTCTTCAAACATCAAAAATGAAGATACAGTGAACGATAAAGCAAATTTGAGGGTGGTGA 1712
      |||
Sbjct 624 TTCTTCAAACATCAAAAATGAAGATACAGTGAACGATAAAGCAAATTTGAGGGTGGTGA 565

Query 1713 CGGTGCTGGTTAATTAACATCTCTAAAGGTGAAGAATTATCACTGGTGTGTCCCAAT 1772
      |||
Sbjct 564 CGGTGCTGGTTAATTAACATCTCTAAAGGTGAAGAATTATCACTGGTGTGTGTCCCAAT 505

Query 1773 TTTGGTTGAATTAGATGGTGAATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGA 1832
      |||
Sbjct 504 TTTGGTTGAATTAGATGGTGAATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGA 445

Query 1833 AGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCC 1892
      |||
Sbjct 444 AGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCC 385

Query 1893 AGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTCTAGATA 1952
      |||
```

Sbjct 384 AGTTCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTCTAGATA 325

Query 1953 CCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCA 2012
 |||

Sbjct 324 CCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTCCA 265

Query 2013 AGAAAGAACTAttttttCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTT 2072
 |||

Sbjct 264 AGAAAGAACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTT 205

Query 2073 TGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATAAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGG 2132
 |||

Sbjct 204 TGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATAAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGG 145

Query 2133 TAACATTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCACAATGTTACATCATGGC 2192
 |||

Sbjct 144 TAACATTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCACAATGTTACATCATGGC 85

Query 2193 TGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGG 2252
 |||

Sbjct 84 TGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGG 25

Query 2253 TTCTGTTCAATTAGCTGACC 2272
 ||| | | | | |

Sbjct 24 TTCTGT CAAT AGCTGACC 7

Sekvenční ověření kmene BY-Pho89-GFP:

Genomic DNA (SGD)/C01 BY-Pho89-GFP Forward primer:

```
Query 1243 TCTTTTGCTCATGGAGCTAATGACGTTGCCAACGCTACTGGTCCTTTGTCTGCTGTGTAT 1302
          |||
Sbjct 1 TCTTTTGCTATGGAGCTATGACGTTGCCACGCTACTGGTCCTTTGTCTGCTGTGTAT 57

Query 1303 GTGATCTGGAAAATAACACTATTGGGGCAAAGTCCGAAGTCCCGTGTGGGTCTGGCT 1362
          |||
Sbjct 58 GTGATCTGGAAAATAACACTATTGGGGCAAAGTCCGAAGTCCCGTGTGGGTCTGGCT 117

Query 1363 TATGGTGGTGTGCCTTAGTTATTGGTTGCTGGACTTATGGTTACAATATTATCAAAAAT 1422
          |||
Sbjct 118 TATGGTGGTGTGCCTTAGTTATTGGTTGCTGGACTTATGGTTACAATATTATCAAAAAT 177

Query 1423 CTAGGTAATAAGATGATTTTGCAGTCGCCATCAAGAGGCTTTTCAATTGAAC TAGCTGTT 1482
          |||
Sbjct 178 CTAGGTAATAAGATGATTTTGCAGTCGCCATCAAGAGGCTTTTCAATTGAAC TAGCTGTT 237

Query 1483 GCTATTACTACTGTCATGGCTACCCAATTAGGTATTCTACCTCAACAACCCAGATCGCC 1542
          |||
Sbjct 238 GCTATTACTACTGTCATGGCTACCCAATTAGGTATTCTACCTCAACAACCCAGATCGCC 297

Query 1543 GTTGGTGGTATTGTCGCTGTTGGTTTATGTAACAAGGATCTCAAATCAGTTAATTGGAGA 1602
          |||
Sbjct 298 GTTGGTGGTATTGTCGCTGTTGGTTTATGTAACAAGGATCTCAAATCAGTTAATTGGAGA 357

Query 1603 ATGGTAGCCTGGTGTATTCTGGTTGGTTTTTAACCTTACCAATTGCTGGTTTGATTGCC 1662
          |||
Sbjct 358 ATGGTAGCCTGGTGTATTCTGGTTGGTTTTTAACCTTACCAATTGCTGGTTTGATTGCC 417

Query 1663 GGTATCATAAATGGTATCATTTTGAATGCTCCTCGCTTTGGTGTGGAATACCAATGACA 1722
          |||
Sbjct 418 GGTATCATAAATGGTATCATTTTGAATGCTCCTCGCTTTGGTGTGGAATACCAATGACA 477

Query 1723 GGTGACGGTGCCTGGTTAATTAACATGCTCTAAAGGTGAAGAATTATCACTGGTGTGTC 1782
          |||
Sbjct 478 GGTGACGGTGCCTGGTTAATTAACATGCTCTAAAGGTGAAGAATTATCACTGGTGTGTC 537

Query 1783 CCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAA 1842
          |||
Sbjct 538 CCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAA 597

Query 1843 GGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAATTTATTTGTACTACTGGTAAA 1902
          |||
Sbjct 598 GGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAATTTATTTGTACTACTGGTAAA 657

Query 1903 TTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTTCT 1962
          |||
Sbjct 658 TTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGTTTTTCT 717
```

```

Query 1963 AGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTAT 2022
          |||
Sbjct 718 AGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTAT 777

Query 2023 GTTCAAGAAAGAACTAttttttCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTC 2082
          |||
Sbjct 778 GTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTC 837

Query 2083 AAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAA 2142
          |||
Sbjct 838 AAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAA 897

Query 2143 GATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCACAATGTTTACATC 2202
          |||
Sbjct 898 GATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCACAATGTTTACATC 957

Query 2203 ATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAA 2262
          |||
Sbjct 958 ATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAA 1017

Query 2263 GATGG-TTCT-GTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAA 2299
          |||||
Sbjct 1018 GATGG-TTCT-GTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAA 1056

```



```

Query 1951 CAATGTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATG 2010
          |
Sbjct 339 CAATGTTTTCTAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATG 280

Query 2011 CCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTAttttttCAAAGATGACGGTAACTACAAGACC 2070
          |
Sbjct 279 CCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACC 220

Query 2071 AGAGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATAAAAGGTATT 2130
          |
Sbjct 219 AGAGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATAAAAGGTATT 160

Query 2131 GATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCAC 2190
          |
Sbjct 159 GATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCAC 100

Query 2191 AATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTAGA 2250
          |
Sbjct 99 AATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTAGA 40

Query 2251 CACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCT 2283
          |
Sbjct 39 CACAACATTGAAGATGGTTCTGT CAAT AGCT 9

```

Sekvenční ověření kmene BY-Fet3-GFPi:

Genomic DNA (SGD) /B209 BY-Pho89-GFP Forward primer:

```

Query 39      GTTTCTGTGTGAGACATTACTGCTGTAAAAAGGAAAAATAGAAAAGAATAACAGATACGA 98
              |||
Sbjct 13      GTTTCTGTGTGAGA-ATTACTGCTGT-AAAAGGAAAAATAGAAAAGAATAACAGATACGA 70

Query 99      GAATCTGTGCTGCCTTCTTTGCGATAATGCCTTGGCTTGCCTATTTACGGTTACAGGAA 158
              |||
Sbjct 71      GAATCTGTGCTGCCTTCTTTGCGATAATGCCTTGGCTTGCCTATTTACGGTTACAGGAA 130

Query 159     TAATAACATGTTTCATACCGTTTCAGGACCAATAAATGGTCTTCTGCGAGAGAAAAGGAC 218
              |||
Sbjct 131     TAATAACATGTTTCATACCGTTTCAGGACCAATAAATGGTCTTCTGCGAGAGAAAAGGAC 190

Query 219     ACTCTCCGTCCGACAGAAAATAAGCTTTACTTTCCGGGTGCGAATCAGCCCGTTGCGCCTG 278
              |||
Sbjct 191     ACTCTCCGTCCGACAGAAAATAAGCTTTACTTTCCGGGTGCGAATCAGCCCGTTGCGCCTG 250

Query 279     GGGTGGTCCCTACAGTACGCTGAGTCGCCGATAAAGACCCTCCGCTAGAGCTAGGCGAG 338
              |||
Sbjct 251     GGGTGGTCCCTACAGTACGCTGAGTCGCCGATAAAGACCCTCCGCTAGAGCTAGGCGAG 310

Query 339     GCTGACTTAGGCAGGCCAACAGGCAAGGCCCATCTTCAAAAGTGCACCCATTTGCAGGT 398
              |||
Sbjct 311     GCTGACTTAGGCAGGCCAACAGGCAAGGCCCATCTTCAAAAGTGCACCCATTTGCAGGT 370

Query 399     GCTCTTATTCTCGCCAATTGCGACAGAAAATGAAGGATGCACTCAAACAGTCGATCCTTC 458
              |||
Sbjct 371     GCTCTTATTCTCGCCAATTGCGACAGAAAATGAAGGATGCACTCAAACAGTCGATCCTTC 430

Query 459     GAGGGAGTATGCCAAGGCCTCGTGCATGTAGTGCGATtataatataatataatataat 518
              |||
Sbjct 431     GAGGGAGTATGCCAAGGCCTCGTGCATGTAGTGCGATTATATATATATATATATATAT 490

Query 519     atatatGTATGTAAGCAGGCCATGCCCTATAGCTCTTGTCTATAAGCGATGGATAGGCA 578
              |||
Sbjct 491     ATATATGTATGTAAGCAGGCCATGCCCTATATCTCTTGTCTATAAGCGATGGATAGGCA 550

Query 579     TAGGAAACGAAGAGGACCCAGTGTAAGGAAGAGTAGCAAAAATTAGAACTAGATGACT 638
              |||
Sbjct 551     TAGGAAACGAAGAGGACCCAGTGTAAGGAAGAGTAGCAAAAATTAGAACTAGATGACT 610

Query 639     AACGCTTTGCTCTCTATAGCCGTTTTGCTTTTCTCGATGCTCTCGCTAGCACAA 698
              |||
Sbjct 611     AACGCTTTGCTCTCTATAGCCGTTTTGCTTTTCTCGATGCTCTCGCTAGCACAA 670

Query 699     ACGTGCAGGTGCACAACCCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTA 758
              |||
Sbjct 671     ACGTGCAGGTGCACAACCCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTA 730

Query 759     GGTGATATCATCGTACGCTGCAGGTGACGATCCGGAGCAGGTGCTGGTGTGGTGTCT 818
              |||
Sbjct 731     GGTGATATCATCGTACGCTGCAGGTGACGATCCGGAGCAGGTGCTGGTGTGGTGTCT 790

Query 819     GGAGCAATTCTGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTGTGTCCTCCCAATTT-TGGTTGA 877
              |||
Sbjct 791     GGAGCAATTCTGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTGTGTCCTCCCAATTTGTGGTGA 850

Query 878     ATTAGATGGTATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAG-GTGAAGGTGATG 936
              |||
Sbjct 851     ATTAGATGGAGATGTTAATGCACACAAATTTTCTGTCTCCGGTGA-GTGTGA-GGTGATG 908

Query 937     CTAATTACGGTAAATTGACCTTAAATTTATTTGTAATACTGTAATAATTGCCAGTTCCAT 996
              |||
Sbjct 909     CTAATTACGGTAAATTGACCTTAAATTTATTTGTAATACTGTAATAATTGCCAGTTCCGT 968

Query 997     GGCCAAACCTT-AGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCATGTTTGGCAGATACCCAGAT 1055
              |||
Sbjct 969     GGCCAAACCTT-AGTCACTACTTTCGGTATATGGTGGTCA-TGTTTGGCAGATACCCAGAT 1027

Query 1056    CATATGAAACAACATGACTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTAT-GTTCAAGAAAG 1114
              |||
Sbjct 1028    CATATGAAACA-CATGACTTTTTCAGTCTGCCATGCCAGATGGT-ATTGTCCA-GAAAG 1083

```

Sekvenční ověření kmene BY-Fet3-GFPi:

Genomic DNA (SGD)/B209 BY-Fet3-GFPi Revers primer:

```

Query 285   TCCCTACAGTACGCTGAGTCGCCGATAAAGACCCCTCCGCCTAGAGCTAGGCGAGGCTGAC 344
          |||
Sbjct 1089  T-CCTACAGTACGCTGAGTCGCCGATAAAGA-CCTCCGCCTAGAGCTAGGCGAGGCTGAC 1032

Query 345   TTAGGCAGGCCCAACAGGCAAGGCCCATCTTCAAAGTGCACCCATTGTCAGGTGCTCTT 404
          |||
Sbjct 1031  TTA-GCAGACCCAACAGGCAAGGCCCATCTTCAAAGTGCACCCATTGTCAGGTGCTCTT 973

Query 405   ATTCTCGCCAATTGCGACAG-AAAATGAAGGATGCACTCAAACAGTCGATCCTTCGAGGG 463
          |||
Sbjct 972   ATTCTCGCCAA-TGCGACAGAAAATGAAGGATGCACTCACACAGTCGATCCTTCGAGGG 914

Query 464   AGTATGCCAAGGCCCTCGTGCATGTAGTGCGATtatatatatatatatatatatatata 523
          |||
Sbjct 913   AGTATGCCAAGACCTCGTGCATGTAGTGCGATTATATATATATATATATATATATATA 854

Query 524   tGTATGTAAGCAGGCCATGCCCTATAGCTCTTGTTCATAAGCGATGGATAGGCATAGGA 583
          |||
Sbjct 853   TGTATGTAAGCAGGCCATGCCCTATAGCTCTTGTTCATAAGCGATGGATAGGCATAGGA 794

Query 584   AACGAAGAGGACCCAGTGTAAGGAAGAGTAGCAAAAATTAGAACTAGACTACTAACGC 643
          |||
Sbjct 793   AACGAAGAGGACCCAGTGTAAGGAAGAGTAGCAAAAATTAGAACTAGACTACTAACGC 734

Query 644   TTTGCTCTCTATAGCCGTTTGGCTTTTCTCGATGCTCTCGCTAGCACAAACCGAGACTG 703
          |||
Sbjct 733   TTTGCTCTCTATAGCCGTTTGGCTTTTCTCGATGCTCTCGCTAGCACAAACCGAGACTG 674

Query 704   CAGGTCGACAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTGA 763
          |||
Sbjct 673   CAGGTCGACAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTGA 614

Query 764   TATCATCGGTACGCTGCAGGTGCAGGATCCGGAGCAGGTGCTGGTGTGGTCTGGAGC 823
          |||
Sbjct 613   TATCATCGGTACGCTGCAGGTGCAGGATCCGGAGCAGGTGCTGGTGTGGTCTGGAGC 554

Query 824   AATTCTGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGA 883
          |||
Sbjct 553   AATTCTGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTGTGTCCCAATTTGGTTGAATTAGA 494

Query 884   TGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTA 943
          |||
Sbjct 493   TGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTA 434

Query 944   CGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGACTACTGGTAAATTGCCAGTTCATGGCCAAC 1003
          |||
Sbjct 433   CGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGACTACTGGTAAATTGCCAGTTCATGGCCAAC 374

Query 1004  CTTAGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTCAATGTTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAA 1063
          |||
Sbjct 373   CTTAGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTCAATGTTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAA 314

Query 1064  ACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTAtttt 1123
          |||
Sbjct 313   ACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTT 254

Query 1124  tttCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTT 1183
          |||
Sbjct 253   TTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTT 194

Query 1184  AGTTAATAGAATCGAATTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCA 1243
          |||
Sbjct 193   AGTTAATAGAATCGAATTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCA 134

Query 1244  CAAATTGGAATACAACATAAECTCTACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAA 1303
          |||
Sbjct 133   CAAATTGGAATACAACATAAECTCTACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAA 74

Query 1304  TGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAAT-TAG 1362
          |||
Sbjct 73   TGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAAT-G 16

```