

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

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra genetiky a mikrobiologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie (NMIKRO)



**Bc. Markéta Dvořáková**

**Role metabolismu nukleotidů při vývoji kolonií**

*Saccharomyces cerevisiae*

**Nucleotide metabolism in the development  
of *Saccharomyces cerevisiae* colony**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce:**

**Prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.**

**Konzultant: RNDr. Blanka Zikánová**

**Praha 2014**

### Prohlášení:

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

1. května 2014

Tato práce vznikla pod vedením prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěla poděkovat za odborné vedení, pomoc a podnětné připomínky při konzultacích a zpracovávání diplomové práce. Můj dík patří RNDr. Blance Zikánové za konzultace při zpracovávání této diplomové práce a při zpracování a interpretaci výsledků a také za velikou trpělivost, přívětivost, vstřícnost a pochopení po celou dobu mé práce. Děkuji také celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Ing. Ladislavě Hatákové děkuji za konzultace a pomoc v počátcích mé laboratorní práce a laborantce paní Haně Žďárské za zajištění chodu laboratoře. Svému muži a rodině děkuji za trpělivost a morální i finanční podporu během studia.

MOTTO:

Co je důležité, je očím neviditelné.

*Antoine de Saint-Exupéry, Malý princ*

## Abstrakt

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které tvoří kolonie, jejichž morfologie je charakteristická pro daný kmen a liší se v závislosti na růstových podmínkách. Při komunikaci kolonií *Saccharomyces cerevisiae* je v pulzech produkován amoniak, který slouží jako signál o vyčerpání živin (PALKOVÁ *et al.* 1997). Bylo zjištěno, že v průběhu vývoje obřích kolonií *S.cerevisiae* dochází ke změnám genové exprese, metabolismu a také změnám v produkci amoniaku. Byly identifikovány geny, jejichž exprese se mění v průběhu vývoje obřích kolonií *S. cerevisiae*. Mezi tyto geny patří některé geny účastníci se různých metabolických drah, transportu amoniaku, metabolismu aminokyselin a také nukleotidů. Byly také popsány geny, jejichž delece může mít vliv na produkci amoniaku (ČÁP *et al.*, 2010), (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005), (PALKOVÁ *et al.* 2002).

Tato práce je zaměřena na sledování vlivu delece vybraných genů účastnících se nukleotidového metabolismu a také možného vlivu přidaných extracelulárních bází na růst, morfologii, diferenciaci a také na produkci amoniaku u obřích kolonií *S. cerevisiae*. V rámci práce byly připraveny kmeny *S. cerevisiae* produkující proteiny značené Gfp (Ade4p-Gfp, Adk1p-Gfp, Urk1p-Gfp, Fcy2p-Gfp, Fur4p-Gfp, Fcy22p-Gfp) a dále sledován vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae* s delecemi vybraných genů (*ADE5,7, ADE4, ADK1, APT1, HPT1, FCY22, URA3*) účastnících se nukleotidového metabolismu při kultivaci na médiích s různými koncentracemi přidaných purinových nebo pyrimidinových bází; a to z hlediska jejich růstu, morfologie kolonií, produkce amoniaku a sledování morfologie buněk a diferenciaci uvnitř obřích kolonií. Bylo zjištěno, že delece genů účastnících se metabolismu purinů významně snižují produkci amoniaku a v některých případech mají výrazný vliv na morfologii a diferenciaci buněk (delece genů *ADK1, ADE4, ADE5,7*), a že koncentrace přidaných purinových bází (adenin, guanin) v médiu mohou mít vliv na morfologii obřích kolonií, morfologii buněk a diferenciaci u mutantních kmenů.

**Klíčová slova**

*Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, amoniaková signalizace, nukleotidový metabolismus, diferenciace a morfologie buněk.

## Abstract

Yeasts are unicellular microorganisms which are able to form colonies. The morphology of colonies is characteristic for the strain and differs according to particular growth conditions. *Saccharomyces cerevisiae* colonies are able to produce volatile ammonia which functions as a signalling molecule alarming nutrient depletion (PALKOVÁ *et al.* 1997). Changes in gene expression, metabolism and ammonia production occur during the development of giant *S. cerevisiae* colonies. Genes with changes in expression have been identified to be involved in ammonia transport, amino acid metabolism and also in nucleotide metabolism. Genes, whose deletion may affect the induction of ammonia production have been described (ČÁP *et al.*, 2010), (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005), (PALKOVÁ *et al.* 2002). This work is focused on studying of an impact of deletions of selected genes involved in nucleotide metabolism, as well as of changes in extracellular concentrations of different bases on growth, morphology, ammonia production, cell morphology and differentiation of giant *S. cerevisiae* colonies. *S. cerevisiae* strains producing Gfp-tagged proteins (Ade4p-Gfp, Adk1p-Gfp, Urk1p-Gfp, Fcy2p-Gfp, Fur4p-Gfp, Fcy22p-Gfp) have been constructed and analyzed. Development of *S. cerevisiae* giant colonies with deletions of selected genes (*ADE5,7*, *ADE4*, *ADK1*, *APT1*, *HPT1*, *FCY22*, *URA3*) was monitored during their cultivation on media with various concentrations of added purine or pyrimidine bases; colony growth, morphology, ammonia production, cell morphology and differentiation was followed. It was found that colonies of strains with deletions of genes involved in purine metabolism significantly reduce ammonia production and in some cases exhibit altered morphology and cell differentiation (deletions of *ADK1*, *ADE4* and *ADE5,7* genes). Changes in concentrations of purine bases (adenine, guanine) in the media may affect cell morphology, differentiation and morphology of colonies of mutant strains.



**Keywords**

*Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, ammonia signalling, nucleotide metabolism, differentiation and cell morphology.

## OBSAH:

### SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

### SEZNAM GENŮ UVEDENÝCH V TÉTO PRÁCI

<b>1. ÚVOD</b>	<b>14</b>
1.1. Cíle práce	15
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>16</b>
2.1. Mnohobuněčná společenstva mikroorganismů	16
2.2. Komunikace mikroorganismů prostřednictvím signálních molekul	16
2.3. Amoniaková signalizace	18
2.3.1. Změny pH v průběhu vývoje kolonií <i>S. cerevisiae</i> a transportní procesy amoniaku	18
2.3.2. Fyziologické funkce a transport amoniaku	19
2.3.3. Produkce amoniaku v různých fázích vývoje kolonií <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a změny na biochemické a transkripční úrovni	22
2.3.3.1. První acidická fáze – fáze rychlého růstu, první slabý pulz amoniaku	22
2.3.3.2. Časná alkalická fáze – počátek silného pulzu produkce amoniaku	23
2.3.3.3. Plná alkalická fáze – silná produkce amoniaku, fáze adaptace	24
2.3.4. Diferenciace kolonií	24
2.4. Paralely metabolických změn v koloniích <i>S. cerevisiae</i> s nádorovými buňkami	27
2.5. Nukleotidový metabolismus u <i>S. cerevisiae</i>	29
2.5.1. Fyziologické funkce bází nukleových kyselin a jejich sloučenin	29
2.5.2. Vnitrobuněčná rovnováha nukleotidů	30
2.5.3. Významné sloučeniny purinů a pyrimidinů	32
2.5.3.1. Sloučeninu adeninu a guaninu – AMP, ADP, ATP, GTP	32
2.5.3.2. S-Adenosyl methionin – SAM, AdoMet	33
2.5.3.3. Uridin trifosfát – UTP	33
2.5.3.4. Cytidin trifosfát – CTP	33
2.5.3.5. Guanosin trifosfát – GTP	34
2.5.4. Syntéza nukleotidů	34
2.5.4.1. Biosyntetická dráha <i>de novo</i> purinů	35
2.5.4.2. Regulace <i>de novo</i> biosyntézy adenylových nukleotidů na transkripční úrovni u <i>S. cerevisiae</i>	37
2.5.4.3. Regulace <i>de novo</i> biosyntézy guanylových nukleotidů na transkripční úrovni u <i>S. cerevisiae</i>	39

2.5.4.4. Biosyntetická dráha <i>de novo</i> pyrimidinů – tzv. „orotátová dráha“	39
2.5.4.5. Regulace <i>de novo</i> biosyntézy UTP na transkripční úrovni u <i>S. cerevisiae</i>	42
2.5.4.6. Regulace <i>de novo</i> biosyntézy nukleotidů odpovědí na růstovou fázi kvasinek	43
2.5.4.7. Šetřící dráhy – „salvage pathways“	44
2.5.4.8. Degradace nukleotidů a bází nukleových kyselin	46
2.5.4.9. Transport bází nukleových kyselin z extracelulárního prostředí	47
2.5.4.10. Využití bází nukleových kyselin a nukleotidů v šetřících drahách	48
2.5.5. Vybrané geny s významnou funkcí v nukleotidovém metabolismu <i>S. cerevisiae</i>	48
2.5.5.1. Geny účastníci se metabolismu purinů	48
2.5.5.2. Geny účastníci se metabolismu pyrimidinů	51
<b>3. MATERIÁL A METODY</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Materiál</b>	<b>53</b>
3.1.1. Použité mikroorganismy	53
3.1.2. Použitý plazmid, primery a materiál pro práci s DNA	54
3.1.3. Přístroje, internetové databáze a počítačové programy	58
3.1.4. Roztoky a kultivační média	59
3.1.4.1. Roztoky	59
3.1.4.2. Tekutá média	61
3.1.4.3. Pevná média	62
3.1.5. Ostatní materiál	63
<b>3.2. Metody</b>	<b>64</b>
3.2.1. Sterilizace	64
3.2.2. Uchovávání kvasinkových kmenů	65
3.2.3. Kultivační metody	65
3.2.3.1. Stanovení optické denzity kultury	65
3.2.3.2. Kultivace v tekutém médiu	65
3.2.3.3. Kultivace na pevném médiu	65
3.2.3.4. Výsev pro kontrolu rezistence na kanamycin a výsev mikrokolonií	65
3.2.3.5. Očkování obřích kolonií	66
3.2.4. Práce s DNA	67
3.2.4.1. Příprava integračních kazet pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)	67
3.2.4.2. Amplifikace integrovaného úseku DNA v genu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) pro ověření integrace	68
3.2.4.3. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu	69
3.2.5. Transformace kvasinkových buněk	69
3.2.5.1. Příprava kompetentních buněk	69
3.2.5.2. Transformace kvasinkových buněk	70
3.2.6. Příprava tenkých řezů koloniemi	71
3.2.7. Fotodokumentace kolonií a mikroskopická dokumentace buněk	71
3.2.8. Stanovení amoniaku produkovaného obřimi koloniemi	72

3.2.8.1. Kalibrace a odběr vzorků	72
3.2.8.2. Stanovení amoniaku	72
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>74</b>
<b>4.1. Vytvoření kmenů <i>S. cerevisiae</i> produkujících proteiny fluorescenčně značené Gfp</b>	<b>74</b>
4.1.1. Příprava integračních kazet pro fluorescenční značení proteinů Gfp	75
4.1.2. Příprava kmenů produkujících proteiny značené Gfp	76
4.1.3. Ověření exprese genů fúzovaných s genem pro Gfp a lokalizace jejich produktů	79
4.1.3.1. Lokalizace proteinu Ade4p-Gfp	80
4.1.3.2. Lokalizace proteinu Adk1p-Gfp	83
4.1.3.3. Lokalizace proteinu Fcy2p-Gfp	86
4.1.3.4. Lokalizace proteinu Fur4p-Gfp	90
<b>4.2. Sledování vlivu extracelulárních pyrimidinových a purinových bází na vývoj obřích kolonií kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>93</b>
4.2.1. Sledování vlivu extracelulární báze uracilu na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	94
4.2.2. Sledování vlivu extracelulární báze cytosinu na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	98
4.2.3. Sledování vlivu extracelulární báze guaninu na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	102
4.2.4. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	106
4.2.5. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu a uracilu na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	110
<b>4.3. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu na vývoj obřích kolonií kmenů <i>S. cerevisiae</i> s delecemi vybraných genů účastnících se nukleotidového metabolismu</b>	<b>114</b>
4.3.1. Alkalizace média	114
4.3.2. Produkce amoniaku	115
4.3.3. Morfologie obřích kolonií	117
4.3.4. Morfologie buněk a diferenciacce	129
<b>5. DISKUZE</b>	<b>136</b>
<b>5.1. Lokalizace proteinů účastnících se metabolismu nukleotidů značených Gfp v buňkách <i>in vivo</i> pomocí fluorescenční mikroskopie</b>	<b>136</b>
<b>5.2. Sledování vlivu extracelulárních bází na vývoj kolonií <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>137</b>
5.2.1. Sledování vlivu extracelulárních purinových bází na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	138
5.2.2. Sledování vlivu extracelulárních pyrimidinových bází na vývoj obřích kolonií <i>S. cerevisiae</i>	143
<b>6. SOUHRN</b>	<b>145</b>
<b>7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b>	<b>146</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam
AdoMet	S-adenosyl methionin
AMP, ADP, ATP	adenosin monofosfát, adenosin difosfát, adenosin trifosfát
Asp	asparagin
BKP	bromkresolový purpur
bp	páry bazí (base pair)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CMP, CDP	cytidin monofosfát, cytidin difosfát
CTP	cytidin trifosfát
ECM	extracelulární matrix
EM	elektronová mikroskopie
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GFP /Gfp	gen pro zelený fluorescenční protein / protein
Gly	glycin
Gln	glutamin
GM	komplexní glycerolové médium
GMP, GDP	guanosin monofosfát, guanosin difosfát
IMP, IDP	inosin monofosfát, inosin difosfát
kbp	tisíc párů bazí
kDa	tisíc daltonů
LiAc	octan lithný
OD	optická denzita
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PCD	programovaná buněčná smrt (programmed cell death)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PRPP	5-fosforibosyl- $\alpha$ -pyrofosfát
ROS	kyslíkové volné radikály (reactive oxygen species)
ssDNA	jednořetězová DNA
SAM	S-adenosyl methionin
TBE	tris-borátový pufr
THF	tetrahydrofolát (kyselina listová)
UMP, UDP, UTP	uridin monofosfát, uridin difosfát, uridin trifosfát
YEPG	komplexní glukózové médium

## SEZNAM GENŮ UVEDENÝCH V TÉTO PRÁCI

Pozn.: Jedná se o gen *S. cerevisiae*, pokud není uvedeno jinak.

Gen	Funkce proteinu
<i>AAH1</i> -	adenin deamináza
<i>AAT1</i>	mitochondriální aspartát aminotransferáza
<i>ADE1-8, 12, 13, 16</i>	proteiny účastníci se biosyntézy purinů <i>de novo</i>
<i>ADK1</i>	adenylát kináza
<i>ADO1</i>	adenosin kináza
<i>AMD1 (3)</i>	AMP deamináza
<i>AMT</i>	bakteriální AmtB protein, transportér amonného kationtu
<i>APT1, 2</i>	adenin fosforibosyltransferáza
<i>ATO1 – 3:</i>	permeázy pro amoniak (amonný kationt)
<i>BAS1, BAS2</i>	transkripční faktory, aktivátory biosyntézy purinů <i>de novo</i>
<i>CDD1</i>	cytidin deamináza
<i>FCY1</i>	cytosin deamináza
<i>FCY2, FCY21, FCY22</i>	permeázy pro puriny a cytosin
<i>FPS1</i>	aquaglyceroporin
<i>FUN26</i>	transportér pro nukleosidy ve vakuolární membráně
<i>FUR1</i>	uracil fosforibosyl transferáza
<i>FUR4</i>	permeáza pro uracil
<i>GCN4</i>	transkripční faktor, aktivátor biosyntézy aminokyselin
<i>GUA1</i>	GMP syntáza
<i>GUD1</i>	guanin deamináza
<i>GUK1</i>	guanylát kináza
<i>HIS1, 4, 7</i>	ATP fosforibosyltransferáza
<i>HIS4</i>	multifunkční enzym účastníci se biosyntézy histidinu
<i>HIS7</i>	multifunkční enzym účastníci se biosyntézy histidinu a purinů
<i>HPT1</i>	hypoxantin – guanin fosforibosyltransferáza
<i>IMD1, 3, 4</i>	IMP dehydrogenáza
<i>MEP1, 3</i>	transportéry amoniaku (amonného kationtu)
<i>MTD1</i>	dehydrogenáza účastníci se oxidace jednoulíkatých sloučenin
<i>NDK1</i>	nukleosid difosfát kináza
<i>PHO2, PHO4</i>	transkripční faktory, regulátory fosfátového metabolismu
<i>PHO84, PHO 89</i>	transportéry fosfátu
<i>PMA1, 2</i>	plazmatická H <sup>+</sup> ATPáza
<i>PPR1</i>	transkripční faktor, aktivátor genů biosyntézy pyrimidinů <i>de novo</i>
<i>PRS1-5</i>	ribózafosfát difosfokináza
<i>PYK1</i>	pyruvát kináza
<i>SAF1</i>	protein typu F-box účastníci se degradace proteinů v proteasomu
<i>SAM1,2</i>	methionin adenosyltransferáza
<i>SHM2</i>	serinová hydroxymethyltransferáza
<i>SOK2</i>	regulátor PKA transdukční dráhy a pseudohyální růstu
<i>SRY1</i>	threonin dehydratáza
<i>SSN3,SSN8</i>	kináza Ssn3p a její cyklin Ssn8p
<i>URA1-8, URA10, URA13</i>	proteiny účastníci se biosyntézy pyrimidinů <i>de novo</i>
<i>URK1</i>	uridin kináza

## 1. ÚVOD

Buňky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* rostoucí na pevném podkladu tvoří kolonie, které nejsou tvořeny homogenní buněčnou masou, ale jsou to struktury s vyšším stupněm organizace (VÁCHOVÁ *et al.* 2012). Kolonie kvasinek *S. cerevisiae* se tak liší nejen makroskopicky, ale existují rozdíly i na mikroskopické úrovni v morfologii buněk uvnitř kolonie (PALKOVÁ *et al.*, 2013).

Kolonie kvasinek během svého vývoje mění pH okolí a prochází tak dobře sledovatelnými vývojovými fázemi, kdy se střídá tzv. fáze alkalická a fáze acidická a naopak. Alkalizaci média je spojena s produkcí amoniaku, který je koloniemi uvolňován do vnějšího prostředí a slouží jako signál o vyčerpání živin (PALKOVÁ *et al.* 1997). Ve fázi produkce amoniaku prokazatelně dochází k významným změnám na úrovni genové exprese a metabolismu (PALKOVÁ *et al.* 2002) a amoniaková signalizace je důležitá i pro diferenciaci kolonií *S. cerevisiae* v horizontálním i vertikálním směru (ČÁP *et al.* 2012). Metabolické změny a diferenciaci provázející amoniakovou signalizaci jsou důležité pro vývoj kolonií a jejich dlouhodobé přežívání (VÁCHOVÁ *et al.* 2012)

Řada metabolických dějů provázejících adaptivní reprogramování během amoniakové signalizace je spojena s metabolismem dusíku. Bylo prokázáno, že pro produkci amoniaku koloniemi *S. cerevisiae* je nutná přítomnost aminokyselin v médiu (PALKOVÁ *et al.* 1997). Je též známo, že k uvolnění amoniaku dochází při katabolismu nukleotidů (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). Tato diplomová práce je proto zaměřena na sledování vlivu extracelulárních dusíkatých bází na morfologii obřích kolonií kvasinek *S. cerevisiae* během jejich vývoje, amoniakovou signalizaci a produkci amoniaku a buněčnou diferenciaci uvnitř kolonií v alkalické fázi růstu. Téma diplomové práce tak spadá do širší problematiky řešené výzkumnou skupinou Laboratoře biologie kvasinkových kolonií na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Práce je podpořena granty GAČR13-08605S a SVV-2014-260081 a byla částečně řešena v rámci projektu Biocev (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy CZ.1.05/1.1.00/02.0109 z Evropského fondu regionálního rozvoje).

## 1.1. Cíle práce:

Cílem této práce bylo:

- sledovat vliv vybraných extracelulárně přidaných dusíkatých bází na vývoj obřích kolonií *Saccharomyces cerevisiae*
- sledovat a porovnat vliv vybrané extracelulární báze na vývoj obřích kolonií vybraných kmenů *S. cerevisiae* s delecemi v genech účastnících se metabolismu dusíkatých bází
- pro sledování exprese vybraných genů nukleotidového metabolismu v průběhu vývoje obřích kolonií *S. cerevisiae* připravit kmeny s těmito geny značenými zeleným fluorescenčním proteinem Gfp.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Mnohobuněčná společenstva mikroorganismů

Mikroorganismy mimo laboratorní prostředí nemívají dostatek všech živin jako v laboratorních podmínkách, ale téměř permanentně hladoví a čelí nepříznivým podmínkám přírodního prostředí. Nacházejí se v blízkosti dalších více či méně příbuzných druhů mikroorganismů a musí často přežívat v podmínkách nevhodných pro rozmnožování. Obklopují se extracelulární matrix (ECM) s vysokým obsahem exopolysacharidů a vytvářejí biofilmy nebo různě strukturované kolonie, v jejichž mikroprostředí buňky nacházejí výhodnější podmínky pro přežití (PALKOVÁ 2004). Příkladem jsou kolonie divokých kmenů kvasinek *S. cerevisiae*, které produkují ECM a mají zvrásněnou strukturu narozdíl od hladkých kolonií laboratorních kmenů (KUTHAN *et al.* 2002), (ŠTOVÍČEK *et al.* 2010). Morfologie kolonií je charakteristická pro daný kmen a závisí na růstových podmínkách (rychlost difúze živin, pH, teplota) (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2006). Změna růstových podmínek může vyvolat tzv. přepínání morfortypu (změna z drsného na hladký). Kultivujeme-li například divoký kmen *S. cerevisiae* v laboratorních podmínkách, dochází ke komplexním změnám, které zahrnují i vypnutí obranných mechanismů nezbytných pro přežití v přírodě (PALKOVÁ 2004).

V závislosti na růstových podmínkách dochází ke změnám mezi různými morfortypy kolonií také u patogenních kvasinek *Cryptococcus neoformans* (hladké vs. zvrásněné kolonie) (SRIKANTA *et al.* 2014), u *Candida albicans* (různé morfortypy nebo tvorba hyf) a *C. tropicalis*. Typy kolonií těchto kvasinek se liší z hlediska virulence, tvaru a pučení buněk, adhesivity i genové exprese (SUZUKI *et al.* 1991) (SLUTSKY *et al.* 1985). Změny ve struktuře biofilmu závislé na komplexním systému mezibuněčné signalizace a diferenciačních signálech byly zjištěny i u prokaryot, např. u *Bacillus subtilis* (ROMERO 2013).

### 2.2. Komunikace mikroorganismů prostřednictvím signálních molekul

Pro komunikaci na krátkou i delší vzdálenost používají buňky mikroorganismů molekuly různé chemické povahy – např. feromony, nízkomolekulární látky, aminokyseliny, peptidy, signální oligopeptidy, proteiny, nukleotidy, steroidy, mastné kyseliny, látky příbuzné makrolidovým antibiotikům, CO<sub>2</sub> i rozpuštěné plyny. U bakterií byla popsána

signalizace různými tzv. *quorum sensing* molekulami (např. N-acyl-homoserin laktone, posttranslačně modifikovanými peptidy, furanosyl borát diesterem), na základě které dochází k regulaci bioluminiscence, plazivého růstu, syntézy antibiotik a faktorů virulence nebo monitorování buněčné hustoty (MILLER a BASSLER 2001), (LAZAZZERA 2000), (CHEN *et al.* 2006).

Kvasinky produkují různé látky těkavé povahy schopné difúze - např. těkavé estery, amoniak, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S. Farnesol a tyrosol mají u kvasinek funkci *quorum sensing* molekul a spolu s CO<sub>2</sub> regulují dimorfické přechody a filamentární růst u *C. albicans*. Dimorfické změny u *C. albicans* jsou inhibovány při nízké hustotě buněk prostřednictvím sekrece farnesolu a aktivovány při vysoké hustotě buněk sekrecí tyrosolu – aromatického alkoholu (CHEN *et al.* 2006), (HALL *et al.* 2010). Tyto signální molekuly se mohou účastnit také tvorby biofilmu u *C. albicans*. Bylo zjištěno, že v přítomnosti farnesolu nedochází k maturaci biofilmu (RAMAGE *et al.* 2002).

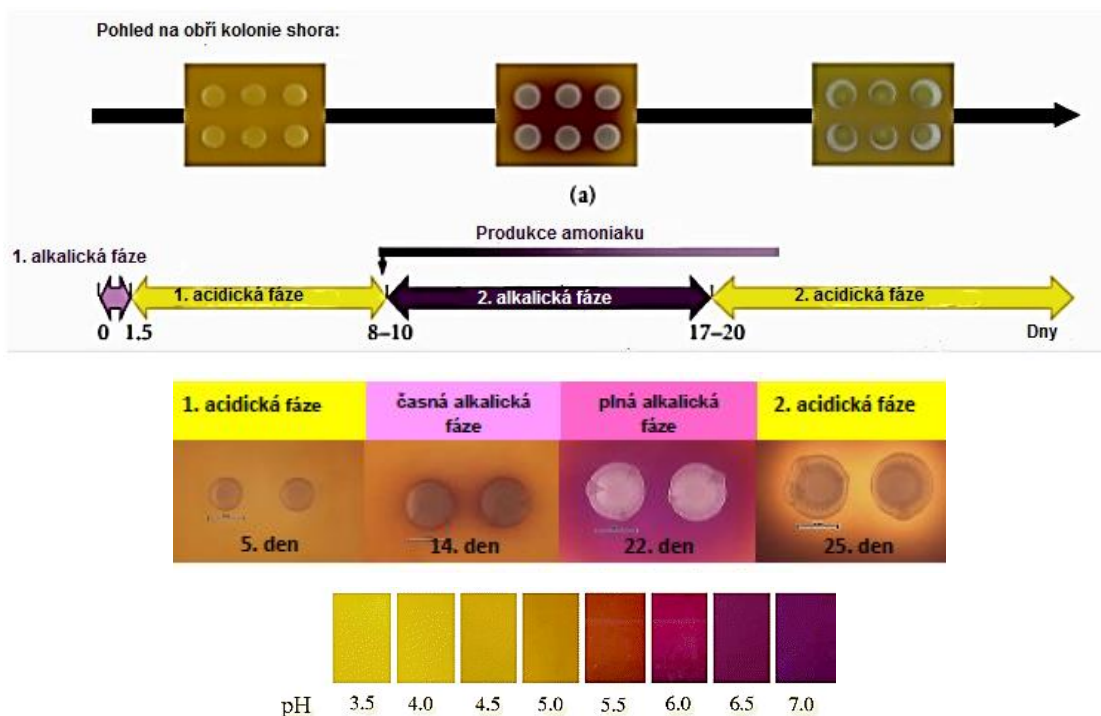
Signalizace pomocí malých peptidů - feromonů je typická pro buňky *S. cerevisiae*. Objevuje se během pohlavního rozmnožování mezi haploidními buňkami párovacích typů *a* a *α*. (DOHLMAN a SLESSAREVA 2006). Feromony aktivují párovací odpověď prostřednictvím MAP kinázové dráhy a Ste12p transkripčního faktoru. Dimorfické změny u *S. cerevisiae* jsou regulovány například aromatickými alkoholy biphenylethanolem a tryptopholem, přičemž tyto molekuly rovněž inhibují dimorfické změny u *C. albicans*. (CHEN *et al.* 2006). Aromatické alkoholy také regulují u *S. cerevisiae* vznik pseudohyfy (CHEN a FINK, 2006).

Kolonie *S. cerevisiae* produkují amoniak, který funguje jako signál v různých fázích jejich vývoje ( kap. 2.3.). Např. mikrokolonie *S. cerevisiae* kultivované v dostatečné blízkosti podstupují dimorfické změny. Z mladých mikrokolonií vyrůstají směrem k sousedním koloniím pseudohyfy a později dochází k propojení sousedních mikrokolonií. Tyto dimorfické změny mohou být indukovány amoniakem nebo některými jinými plynnými molekulami (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2010).

## 2.3. Amoniaková signalizace

### 2.3.1. Změny pH v průběhu vývoje kolonií *S. cerevisiae* a transportní procesy amoniaku

Během svého růstu na pevném substrátu kolonie *S. cerevisiae* pravidelně mění pH média ve svém okolí. V počáteční růstové acidické fázi je pH média v okolí kolonie nízké (např. 4-5). Po určité době dochází ke zvýšení pH (např. na 6-7) a přechodu do tzv. alkalické fáze, při níž je růst kolonie inhibován. Změnu pH lze pozorovat jako barevnou změnu pH indikátoru bromkresolového purpuru (BKP) přidaného do média, kdy se acidická fáze projeví žlutým zbarvením média a alkalická fáze zbarvením fialovým (obr. 1). Bylo zjištěno, že k alkalizaci média dochází v důsledku produkce amoniaku (PALKOVÁ *et al.* 1997). První slabý pulz produkce amoniaku se objevuje krátce po nanesení buněčné kultury a trvá přibližně 24h. Počet amoniakových pulzů závisí na dostupnosti živin a dostatku prostoru pro růst kolonií. Kolonie během svého růstu mohou procházet několika acidickými a alkalickými fázemi s pulzy produkovaného amoniaku (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000).



**Obr. 1:** Alkalizace média při produkci amoniaku.

Obě kolonie laboratorního kmene BY4742 *S. cerevisiae* na komplexním glycerolovém médiu s přidávkem pH indikátoru (BKP) uvolňují amoniak v pulzech (první, slabý pulz v prvních 24h kultivace; druhý, silný pulz po 8. dnu kultivace), což se projeví změnou barvy pH indikátoru (fialová). V alkalické fázi se rychlý růst kolonií zpomalí. Kolonie se šíří do prostoru v opačném směru než přichází amoniakový signál. Schéma - modifikováno podle VÁCHOVÁ *et al.* (2012). Foto kolonií – vlastní data, měřítko 10 mm. Tabulka pH – převzato z LONG *et al.* (2007)

Na počátku alkalické fáze se snižuje exprese plazmatické H<sup>+</sup>ATPázy, což by mohlo také ovlivňovat pH média v blízkosti kolonií (PALKOVÁ *et al.* 2002). Amoniak NH<sub>3</sub> je slabá báze a amonný iont NH<sub>4</sub><sup>+</sup> je slabou kyselinou, přičemž tyto dvě molekuly se liší nábojem a schopností volné difúze skrze buněčné membrány. Mohou proto podstatně ovlivňovat jak intracelulární pH, tak membránový potenciál i pH v extracelulárním prostředí buněk, resp. v blízkém okolí kolonií. V cytosolu buněk z NH<sub>3</sub> přijetím protonu vzniká NH<sub>4</sub><sup>+</sup> v závislosti na dostupnosti protonů v cytoplazmě (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). Při interakci s buňkou se vzhledem ke své poměrně vysoké rozpustnosti (cca 45 mM/mm Hg) molekula NH<sub>3</sub> rozpustí ve slabé vrstvě vody na povrchu buněk a dále může být v závislosti na dostupnosti volných protonů v okolí buněk redukována na amonný iont NH<sub>4</sub><sup>+</sup> přijetím protonu. Molekula NH<sub>3</sub> může (v závislosti na teplotě a lipidickém složení a tloušťce membrán) prostupovat membránami a volně difundovat do buněk rychleji než molekula NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, jejíž přenos vyžaduje specifický transportér (PALKOVÁ *et al.* 2002) nebo akvaporiny (MARCAGGI a COLES 2001).

Při studiu kmene *S. cerevisiae* defektního v genu pro Mep1p a Mep3p permeázu a pro aquaglyceroporin Fps1p se při neutrálním nebo mírně zvýšeném pH a koncentraci NH<sub>3</sub> vyšší než 10 μM snížila růstová rychlost a počet duplikací kvasinkových buněk. Expese genů pro akvaporiny se zvýšila až při koncentraci 100 μM NH<sub>3</sub>. Výměna amoniaku za aminokyseliny nebo ureu tento efekt plně nepotlačila. Některé akvaporiny (např. aquaglyceroporin Fps1p) zřejmě mají v alkalických podmínkách dostatečnou selektivitu pro vstup molekul větších než voda, ale menších než glycerol a mohou tak mít vliv na zvýšení permeability plazmatické membrány pro takové molekuly a v důsledku na zachování růstu kolonie (KRENC *et al.* 2013). Nízké pH a akumulace NH<sub>4</sub><sup>+</sup> může ovlivňovat přenos iontů, snižovat metabolickou rychlost a umožňovat akumulaci amoniaku také u vyšších eukaryot (bezobratlých), u kterých byly tyto účinky amoniaku taktéž prokázány (SCHRÜNDER *et al.* 2013).

### 2.3.2. Fyziologické funkce a transport amoniaku

Amoniak má různé regulační funkce. U *S. cerevisiae* bylo prokázáno, že mutanty s delecí genu pro transkripční faktor Sok2p, které neprodukují amoniak jsou defektní i v adaptaci buněk a jejich diferenciaci v koloniích na oblasti kde dochází ke zvýšenému odumírání buněk procesem podobným programovanému odumírání („programmed cell death“, PCD). Je možné, že produkce amoniaku indukuje expresi genů, které přispívají k omezení PCD

v okrajových oblastech kolonií *S. cerevisiae*. V koloniích nemutovaného kmene *S. cerevisiae* produkujícího amoniak jsou buňky se znaky PCD lokalizované do centrální oblasti kolonie nacházející se v alkalické fázi vývoje. Tam mohou pravděpodobně sloužit jako jeden ze zdrojů živin pro buňky nacházející se na okrajích kolonie (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Buňky v centrální části 23 až 30 dní starých kolonií *S. cerevisiae* produkují vyšší hladinu kyslíkových radikálů (např.  $H_2O_2$ ) a méně amoniaku než buňky na okraji kolonie (ČÁP *et al.* 2009). Kolonie mutantních kmenů defektních v enzimech eliminujících kyslíkové radikály, např. v mitochondriální superoxid dismutáze Sod2p nebo cytosolické kataláze Ctt1p vykazovaly také defekt v produkci amoniaku a v lokalizaci buněk se znaky PCD v centrální oblasti kolonie (ČÁP *et al.* 2010). Toto zjištění naznačilo, že kyslíkové radikály by mohly mít kromě negativních důsledků na viabilitu buněk také signalizační funkce, ovlivňující produkci amoniaku (ČÁP *et al.* 2012). U *S. cerevisiae* bylo dále zjištěno, že transportu amoniaku se účastní proteiny z rodiny Ato – „Ammonia Transport Outward“, které byly nazvány Ato1p, Ato2p, Ato3p (PALKOVÁ *et al.* 2002). Byla potvrzena jejich lokalizace v plazmatické membráně v komplexech závislých na pH (u Ato1p), přičemž jejich výskyt koreluje s počátkem produkce amoniaku a jejich exprese je amoniakem indukována (ŘIČICOVÁ *et al.* 2007). Ato proteiny v plazmatické membráně tvoří komplexy a dochází k jejich vzájemné interakci (STRACHOTOVÁ *et al.* 2012). Exprese genů kódujících Ato1p, Ato2p a Ato3p proteiny je v koloniích *S. cerevisiae* indukována na počátku 2. alkalické fáze a pokračuje i ve fázi acidické. Byla zjištěna zvýšená lokalizace těchto proteinů v okrajových oblastech kolonií a jejich snížená lokalizace v centrální oblasti kolonií (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). Amoniak produkovaný koloniemi *S. cerevisiae* i amoniak přidaný do média se účastní synchronizace vývoje kolonií *S. cerevisiae* na daném teritoriu. Produkuje-li amoniak jedna kolonie, indukuje tím produkci amoniaku i v blízkých sousedních koloniích a tím dochází k synchronizaci amoniakových pulzů. Signál se může šířit i na vzdálenost v řádu centimetrů mezi blízkými koloniemi. Při kultivaci kolonií různých kvasinkových druhů v dostatečné blízkosti dochází po expozici amoniakem ke koordinaci růstu kolonií, bez ohledu na jejich aktuální vývojovou fázi nebo růstovou rychlost. Indukovaná produkce amoniaku byla prokázána u různých rodů kvasinek – např. *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, což dokládá univerzalitu amoniakové signalizace a její rozšířené využití k indukci metabolických změn vedoucích k synchronizaci růstu i mezi různými kvasinkovými rody (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000).

Amoniak má významnou fyziologickou úlohu i u vyšších eukaryot a je často studována jeho neuropatogenita. V tkáňových kulturách myších mikroglíí BV-2 amoniak při vyšších koncentracích spouští mitózu a při nižších koncentracích indukuje apoptózu. Bylo také zjištěno, že apoptický efekt v důsledku vystavení vyšším koncentracím amoniaku je zprostředkován cyklickým adenosin 3'5'-monofosfátem (cAMP). Po kontaktu s amoniakem se u myších mikroglíí podstatně zvýšila koncentrace cAMP. To naznačuje souvislost mezi amoniakovou signalizací a intracelulární koncentrací nukleotidů. Při zablokování funkce adenylát cyklázy došlo k potlačení apoptózy u mikroglíí BV-2 indukované amoniakem. Při inhibici funkce fosfodiesterázy se zvýšil relativní počet apoptických buněk. Určité koncentrace amoniaku zřejmě mohou ovlivňovat protichůdné signální dráhy (SVOBODA *et al.* 2007). Bylo prokázáno, že se amoniak zřejmě za současného účinku kyslíkových radikálů účastní indukce apoptózy i u myších fibroblastů (CHEONG *et al.* 2011).

Je delší dobu známo, že savčí buňky disponují vysoce konzervovanými specifickými membránovými glykoproteiny z rodiny rhesus proteinů (rodina Amt/Mep/Rh) (MARINI *et al.* 1997b), které se účastní transportu amoniaku přes plazmatickou membránu. Rhesus proteiny byly identifikovány nejprve u kvasinek (permeáza Mep2p) a později i u rostlin, řas a savců. Funkční studie na liposomech ukázaly, že amoniak je s velkou pravděpodobností substrátem pro protein RhCG. Krystalografická struktura lidského RhCG a homologního bakteriálního AmtB proteinu (KHADEMI *et al.* 2004) dále naznačují, že tyto proteiny mohou tvořit kanály pro plyny a umožňovat přenos NH<sub>3</sub> (WAGNER *et al.* 2011). U *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že permeáza pro amoniak Mep2p je homologní s vysoce konzervovanými Rh proteiny. Tato permeáza je nutná pro indukci pseudohyfálního růstu při limitaci živin, má transportní i regulační funkci a může sloužit i jako senzor dostupnosti zdrojů dusíku. Je lokalizována na povrchu buněk během pseudohyfálního růstu a účastní se filamentárního i invazivního růstu, kdy se kolonie buněk rozšiřují do prostoru za účelem získání dalších živin. Funkce permeázy Mep2p při pseudohyfálním růstu je spojena s MAP kinázovou dráhou. Proteiny typu Mep2p by proto mohly mít funkci transportéru i senzoru živin a tím ovlivňovat buněčnou diferenciaci (RUTHERFORD *et al.* 2008).

I u prokaryot má amoniak významné fyziologické funkce. U fixátora dusíku *Pseudomonas stutzeri* byl využit kvasinkový dvouhybridní systém a bylo zjištěno, že na kontrole intracelulární koncentrace amoniaku se podílí transportéry amoniaku - proteiny AmtB (ZHANG *et al.* 2012).

### **2.3.3. Produkce amoniaku v různých fázích vývoje kolonií *Saccharomyces cerevisiae* a změny na biochemické a transkripční úrovni**

V alkalické fázi vývoje kolonií při produkci amoniaku se zvyšuje intracelulární i extracelulární pH a dochází k významným změnám na úrovni metabolismu a genové exprese. Výsledkem je adaptace kolonie na vyčerpání živin (PALKOVÁ *et al.* 2002). Zdrojem signální molekuly amoniaku produkované koloniemi *S. cerevisiae* při vyčerpání živin jsou zřejmě hlavně aminokyseliny, jejichž deaminací amoniak může vznikat (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). Je otázkou, zda dalším zdrojem amoniaku, produkovaného koloniemi v alkalické fázi vývoje mohou být i dusíkaté báze, při jejichž katabolismu také dochází k uvolnění amoniaku.

V acidické a alkalické fázi dochází v kolonii *S. cerevisiae* k rozdílné expresi mnoha genů a rozdílům v aktivaci metabolismu (PALKOVÁ *et al.* 2002), (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). Přímé měření uvolňovaného amoniaku potvrdilo, že kolonie mutantních kmenů uvolňují méně amoniaku (PALKOVÁ *et al.* 2002).

#### **2.3.3.1. První acidická fáze – fáze rychlého růstu, první slabý pulz amoniaku**

Mezi geny, jejichž exprese je aktivována nejdříve v počáteční acidické fázi rychlého růstu patří geny environmentální stresové odpovědi a geny kódující enzymy biosyntézy a degradace aminokyselin. V acidické fázi vývoje kolonie dochází též k aktivaci exprese genů pro permeázy iontů, sulfátu, zinku, pro transportéry fosfátů Pho84p a Pho89p a pro permeázy karboxylových kyselin (PAULSEN *et al.* 1998), (PALKOVÁ *et al.* 2002). Příjem karboxylových kyselin může zřejmě probíhat paralelně s indukcí metabolismu aminokyselin. Následně mohou být karboxylové kyseliny metabolizovány enzymy glyoxalátového cyklu a Krebsova cyklu. V souvislosti s indukcí exprese různých permeáz může též docházet k ovlivnění pH a polarity plazmatické membrány. V pozdní acidické fázi vývoje kolonie též dochází k postupné represi genů účastnících se mitochondriální oxidativní fosforylace a syntézy ATP (PALKOVÁ *et al.* 2002). Jsou též reprimovány geny elektronového transportního řetězce, ATP syntázy, mitochondriálních transportérů fosfátu, proteiny účastnící se transportu NADH. Současně s aktivací exprese genů pro metabolismus aminokyselin je aktivována exprese genu pro transportér oxalacetátu z cytoplazmy do mitochondrií (PALMIERI *et al.* 1999). Zároveň dochází k aktivaci genů pro mitochondriální aldehyd dehydrogenázu, katalyzující oxidaci acetaldehydu na acetát za regenerace NADH. Katabolická fáze Krebsova cyklu se snižuje, avšak dochází k indukcí exprese genů

pro biogenezi a aktivitu peroxizomů. Při přechodu do časně alkalické fáze, v počátcích produkce amoniaku dochází k indukci genů účastnících se  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a produkce AcetylCoa v peroxizomech, transportu mastných kyselin do peroxizomů a genů účastnících se biogeneze peroxizomů (PALKOVÁ *et al.* 2002). To naznačuje počínající komplexní změny v metabolismu celé kolonie, jejichž důsledkem může být pozdější přepnutí na úsporný metabolismus, adaptaci na vyčerpání živin a produkce amoniaku.

### **2.3.3.2. Časná alkalická fáze – počátek silného pulzu produkce amoniaku**

V počátku alkalické fáze jsou reprimovány geny PMA1 a PMA2 kódující plazmatickou  $H^+$  ATPázu. Důsledkem může být snížená schopnost buněk uvolňovat protony a snižovat extracelulární pH (PALKOVÁ *et al.* 2002). Analýzou genové exprese bylo prokázáno, že na počátku alkalické fáze jsou reprimovány enzymy Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace a jsou indukovány enzymy glyoxalátového cyklu (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). V této fázi vývoje kolonie dochází v buňkách k aktivaci exprese genů pro různé enzymy katabolizmu aminokyselin a snižuje se jejich obsah ve vakuolách, v pozdějších fázích vývoje (v plné alkalické fázi) však dochází k jeho opětovnému zvýšení. Tyto změny se týkají převážně vakuolárních aminokyselin, přičemž koncentrace cytoplazmatických aminokyselin se téměř nemění. Byla též zjištěna aktivace exprese genů kódujících enzymy katalyzující reakce související s produkcí amoniaku, např. gen pro glycin dekarboxylázu účastnící se uvolnění  $NH_3$  z molekuly glycinu nebo gen *SRY1* pro threonin dehydratázu. Přechod z acidické do alkalické fáze by mohl být adaptivním mechanismem umožňujícím koloniím *S. cerevisiae* dlouhodobé přežití (PALKOVÁ *et al.* 2002). Dochází také k represi genů ADP/ATP přenašečů a transportéru dikarboxylových sloučenin. Mastné kyseliny jsou konvertovány v peroxizomech na acetyl-CoA, který je následně transportován do mitochondrií, kde může být využit citrát syntázou. Z výsledků vyplývá, že dochází k přenosu oxaloacetátu z cytoplazmy do mitochondrií, kde je oxaloacetát konvertován na citrát. Ten nicméně nyní nevstupuje do Krebsova cyklu, ale může být v pozdější alkalické fázi využit k biosyntéze aminokyselin.



### 2.3.3.3. Plná alkalická fáze – silná produkce amoniaku, fáze adaptace

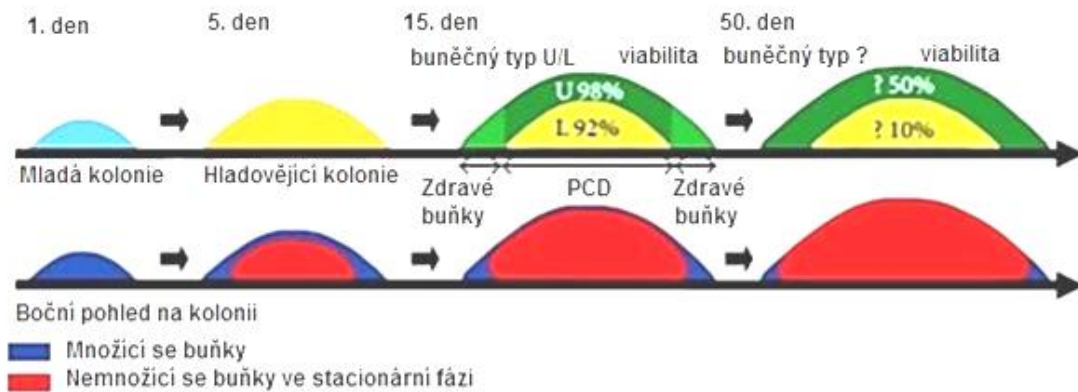
V plné alkalické fázi jsou geny environmentální stresové odpovědi, indukované na počátku acidické fáze, reprimovány (PALKOVÁ *et al.* 2002). Represe těchto genů může být projevem úniku ze stresových podmínek převládajících v acidické fázi rychlého růstu a úspěšné adaptace na podmínky nedostatku živin. Ve fázi plné alkalizace dochází k indukci exprese genu pro citrát syntetázu. Substrátem pro tento enzym katalyzující v citrátovém cyklu syntézu citrátu a CoA je oxaloacetát a AcetylCoa. V této fázi vývoje je také indukován gen pro 2-methylisocitrát lyázu, která konvertuje citrát na sukcinát a glyoxalát (PALKOVÁ *et al.* 2002) a dochází též k indukci exprese genu *AAT1* pro mitochondriální aspartát aminotransferázu, která katalyzuje konverzi oxaloacetátu a L-glutamátu na L-aspartát a 2-oxoglutarát, což naznačuje, že v aminokyselinovém metabolismu může docházet k dalším změnám v pozdějších fázích vývoje kolonie, jejichž výsledkem může být obnovení stavu zásob aminokyselin. Tato zjištění mohou podpořit i další data, ze kterých vyplývá, že pokles intracelulární koncentrace aminokyselin v časně alkalické fázi je v pozdější plné alkalické fázi následován zvýšením intracelulární koncentrace aminokyselin opět na téměř původní hladinu a v této fázi vývoje dochází také k represí exprese genů kódujících enzymy účastníci se degradace aminokyselin (PALKOVÁ *et al.* 2002). Ze zjištění spojitosti příjmu externích aminokyselin a schopností kolonií produkovat amoniak (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002) vyplývá, že spotřeba aminokyselin může být důležitým faktorem ovlivňujícím přechod kolonií do alkalické fáze.

V průběhu růstu kolonie se na některých kmenech mohou v alkalické fázi objevovat papily. Ty jsou projevem nepravidelné morfologie kolonie a jsou zřejmě tvořeny buňkami, které nepozastavily růst jako většina kolonie a využívají ke svému růstu živiny pocházející z umírajících buněk. Papily se často objevují na kmenech s deletovanými geny, které nedosahují intenzivní produkce amoniaku. Tvorba papil může také souviset s defektem správné lokalizace některých přenašečů aminokyselin (LJUNGDAHL *et al.* 1992) a objevuje se i u kmenů, které nepřecházejí do alkalické fáze (PALKOVÁ *et al.* 1997).

### 2.3.4. Diferenciace kolonií

V průběhu vývoje kolonií je možné pozorovat makroskopické změny v růstu kolonií (obr. 1) a mikroskopické změny na úrovni morfologie buněk a vnitřního uspořádání kolonie (obr. 3). V kolonii dochází k horizontální diferenciaci na zdravé okrajové oblasti a centrální části s vyšším výskytem buněk se znaky programované buněčné smrti (PCD)

(obr. 2) (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). Centrální oblast není homogenní a vznikají v ní dva hlavní typy buněk (vertikální diferenciace) s odlišnou morfologií i metabolizmem – buňky U („upper“) v horních oblastech) a buňky L („lower“) v dolních oblastech kolonie (obr. 3) (ČÁP *et al.* 2012).



**Obr. 2: Boční pohled na rostoucí kolonii *S. cerevisiae*:**

**Horní část:** vertikální diferenciace v kolonii po 15 dnech a 50 dnech kultivace na dva typy buněk: horní (U, zelené) a spodní (L, žluté) se specifickými metabolickými vlastnostmi. Viabilita: je udáno procento buněk tvořících kolonie (colony-forming). PCD: buňky se znaky PCD jsou lokalizovány v centrální části kolonie. V okrajových částech kolonie jsou dělicí se buňky. **Dolní část:** horizontální diferenciace v kolonii. Přítomnost subpopulací dělicích se buněk (modře) a nedělicích se buněk (červeně). Modifikováno dle VÁCHOVÁ *et al.* (2012).

Pokročilá vertikální diferenciace a tvorba buněk typu U a L byla prokázána v centrální části kolonií od cca 10. dne kultivace. Tato diferenciace původně uniformních buněk na buňky U a L souvisí s produkcí amoniaku časově i vzhledem k tomu, že tvorba U buněk může být vyvolána působením amoniaku předčasně. Buňky U a L se liší morfologicky i fyziologicky a byly u nich zjištěny též významné rozdíly v expresi genů.

U buňky jsou kulaté, velké (cca 4  $\mu\text{m}$ ) a obsahují více menších vakuol a větší mitochondrie s menším obsahem krist. Navíc často obsahují několik lipidických partikulí a akumulují glykogen. Tvoří vrstvu v horní části kolonie, která může mít tloušťku cca 150  $\mu\text{m}$ . L buňky jsou menší (cca 3  $\mu\text{m}$ ), obsahují jednu velkou vakuolu a jednu lipidickou partikuli, ale četné mitochondrie s dobře vyvinutými kristami. Tvoří vrstvu ve spodní části kolonie, která může mít tloušťku cca 200  $\mu\text{m}$  (obr. 3).

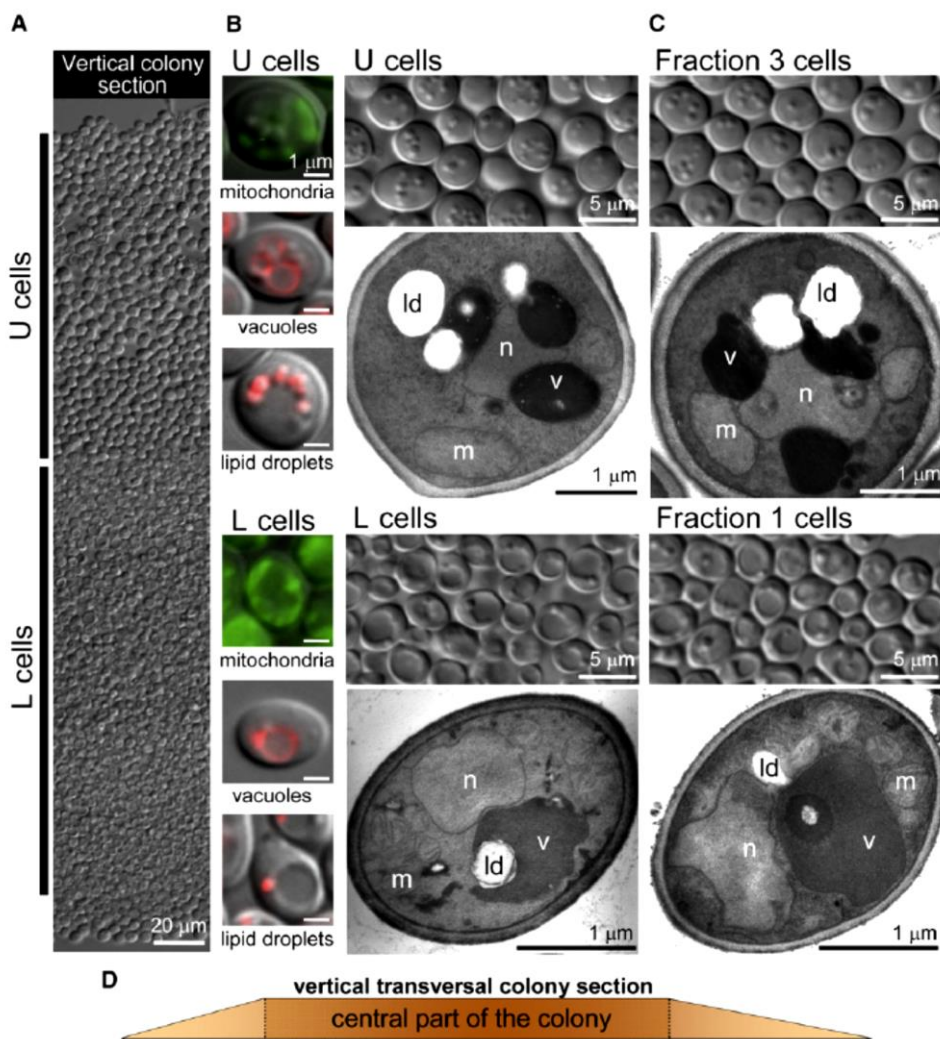
Analýza kmenů s Gfp značenými proteiny prokázala, že v těchto vrstvách buněk dochází k typické lokalizaci některých proteinů. Např. v U buňkách typicky lokalizují proteiny Ato (ČÁP *et al.* 2012), (VÁCHOVÁ *et al.* 2009a)). Analýza U a L buněk z hlediska jejich odolnosti vůči stresu a produkce kyslíkových radikálů (ROS) ukázala,

že L buňky produkují více kyslíkových radikálů než U buňky a vykazují také vyšší citlivost vůči různým druhům stresu (tepelný šok, ethanol, zymolyáza). Transport živin, glukózový metabolismus a aminokyselinový metabolismus je zřejmě charakteristický pro U buňky, přičemž L buňky se vyznačují respiračním metabolismem.

Analýzou transkriptomu bylo zjištěno, že U buňky exprimují geny účastníci se translace, geny pro ribozomální proteiny, geny pro různé metabolické enzymy a transportéry zapojené např. do aminokyselinového metabolismu a transportu, glykolýzy, pentózofosfátové dráhy a biosyntézy a transportu nukleotidů (geny *ADE* regulonu, *FCY22*, *FUN26* a *FUR4*). L buňky upregulují geny účastníci se biogeneze mitochondrií a oxidativní fosforylace, různé chaperony a komponenty ubiquitin-proteosomálního systému, vakuolární komponenty a geny pro proteiny degradující buněčnou stěnu. Expres metabolických genů byla v L buňkách snížena, byla však prokázána indukce několika genů účastnících se metabolismu lipidů, které byly lokalizovány do lipidických partikulí. Dále L buňky indukují geny pro odpověď na chudé zdroje živin, např. gen pro enzym *Pck1p* účastníci se glukoneogeneze, geny pro transportéry hexózu a geny z rodiny genů pro rezistenci („multidrug resistance genes“). L buňky rovněž exprimují geny pro různé komponenty signálních drah a transkripční regulátory (např. pro geny obecné stresové odpovědi, utilizace nefermentovatelných zdrojů uhlíku). Oproti U buňkám byla u L buněk zjištěna snížená exprese genů pro aminokyselinový metabolismus.

U a L buňky byly také analyzovány z hlediska obsahu intracelulárních aminokyselin a transportu aminokyselin z extracelulárního prostředí. Byl zjištěn rozdíl v zastoupení aminokyselin, např. glutaminu (vyšší obsah u U buněk), kyseliny gama-aminomáselné (GABA) (vyšší obsah u L buněk) (ČÁP *et al.* 2012).

Aminokyselinový metabolismus a transport může mít souvislost se schopností kolonií produkovat amoniak (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Proto byla u U a L buněk odebraných z kolonií zjišťována i jejich schopnost produkce amoniaku a byly zjištěny významné rozdíly. Značné množství amoniaku bylo produkováno U buňkami, avšak L buňky amoniak téměř neprodukovaly (ČÁP *et al.* 2012).



**Obr. 3: Kolonie *S. cerevisiae* se diferencuje na dvě populace buněk U a L.**

A) Vertikální řez dvacetidenní kolonií kmene BY4742.

B) Mikroskopický snímek U a L buněk. Nomarski kontrast, fluorescence, transmisní EM.

Levý panel: mitochondrie barvené DiOC<sub>6</sub>. Vakuoly barvené FM4-64. Lipidická tělíska barvená Nile Red.

C) Detaily buněk z řezů 1 a 3 mikroskopicky dokumentované za využití Nomarski kontrastu a transmisní

EM. n – jádro, v – vakuola, m – mitochondrie, ld – lipidická tělíska.

D) Schéma centrální části kolonie použité k dokumentaci. Převzato z ČÁP *et al.* (2012).

## 2.4. Paralely metabolických změn v koloniích *S. cerevisiae* s nádorovými buňkami

Kolonie *S. cerevisiae* jsou výborný model pro studium metabolismu. V metabolických vlastnostech a výměně živin a odpadních látek mezi U a L buňkami vykazují kolonie *S. cerevisiae* řadu podobností s metabolismem a tokem živin a odpadních látek nádorových a zdravých buněk tkání v savčím organismu. Nádorové buňky odčerpávají zásoby živin jiným buňkám a uvolňují odpadní produkty jako oxid dusnatý (NO), polyaminy, amoniak a laktát,

kteřé navozují u zdravých buněk oxidační a osmotický stres, avšak u nádorových buněk podporují jejich množení a růst, protože jim poskytují selekční výhodu v boji o živiny, získávané i z jiných buněk, které podstoupily apoptózu. Mezi nádorovými buňkami a zdravými buňkami může být navozena kooperace za účelem maximální produkce ATP v závislosti na zdrojích živin a koncentraci kyslíku (ICARD a LINCET 2013). V kulturách nádorových buněk bylo prokázáno, že v případě hladovění mohou buňky získat nezbytné aminokyseliny prostřednictvím autofagie. Amoniak, získaný z katabolizmu aminokyselin při limitaci glukózou může taktéž stimulovat autofagii (CHEONG *et al.* 2012). U kolonií *S. cerevisiae* s diferencovanými vrstvami U a L buněk byly též identifikovány procesy toku živin a odpadních látek podobné jako u nádorových buněk v savčím organizmu: L buňky aktivují katabolické a degradativní procesy, aktivují specifické transportéry, exportují aminokyseliny, cukry a další metabolity, které mohou být využity U buňkami v horní vrstvě kolonie. Odpadní produkty metabolismu U buněk, jako např. amoniak, těkavé alkoholy, acetát a pyruvát mohou být zpracovány L buňkami (ČÁP *et al.* 2012).

Obecné podobnosti v přeměně metabolismu mezi buňkami v kvasinkové kolonii a nádorovými buňkami zahrnují zvýšení příjmu glukózy a fermentaci na úkor respirace a oxidativní fosforylace a změny v metabolismu aminokyselin a nukleotidů. Podstatnou regulační roli u lidských i kvasinkových buněk má pyruvát kináza, jejíž hladina se zvyšuje u nádorových buněk. V U buňkách diferencované kvasinkové kolonie dochází k aktivaci metabolismu aminokyselin a glykolýzy a transportu karboxylových kyselin a později amoniaku. Procesy oxidativní fosforylace a Krebsova cyklu jsou deaktivovány a naopak dochází k aktivaci  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (ČÁP *et al.* 2012), (TOSATO *et al.* 2013). Nádorové buňky aktivují aerobní glykolýzu, glutaminolýzu a  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin a zvyšují tak biosyntézu proteinů. Z katabolizmu glukózy vzniká mimo jiné ribóza pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin nebo glycerol pro syntézu lipidů a také pyruvát, pocházející taktéž z katabolizmu aminokyselin. Vzhledem k inhibici pyruvát dehydrogenázy je pyruvát preferenčně transformován na laktát (v přítomnosti kyslíku – tzv. Warburgův efekt). Dehydrogenací laktátu vzniká kyselina mléčná, která acidifikuje mikroprostředí nádorových buněk, což podporuje jejich růst a regeneruje NAD<sup>+</sup>, kofaktor glykolýzy, DNA syntézu a opravné mechanismy. Nádorové buňky spotřebují mnoho glutaminu a tím poskytují substráty pro Krebsův cyklus, spojený s produkcí ATP a dále aspartát pro syntézu nukleotidů. Metabolizmus nukleotidů

je u nádorových buněk podporován onkogeny (Myc, AKT, atd.) a inaktivací supresorů (P53, PTEN) (TOSATO *et al.* 2013), (ICARD a LINCET, 2013).

## **2.5. Nukleotidový metabolismus u *S. cerevisiae***

Nukleotidy jsou významnými regulátory metabolických drah v různých buněčných kompartmentech u nižších i vyšších eukaryot. Některé metabolické dráhy jsou závislé na energetickém stavu buňky (resp. hladině ATP), rychlost jiných drah závisí na dostupnosti substrátu. Metabolismus nukleotidů je provázán s mnoha buněčnými a metabolickými ději - např. s metabolismem jednouhlíkatých sloučenin, resp. tetrahydrofolátu – THF (DENIS a DAIGNAN-FORNIER 1998). Molekula THF se uplatňuje jako kofaktor v mnoha enzymových reakcích pro svou schopnost přenášet methylové, methylenové, formylové, formiminové a methenylové zbytky, které mohou být různě redukovány a oxidovány. Prostřednictvím společných substrátů a metabolických intermediátů nebo regulačními procesy je metabolismus nukleotidů také propojen mimo jiné s katabolizmem glukózy (pentózafosfátová cesta poskytující redukované kofaktory NADPH a pentózu ribózu-5-fosfát), s metabolismem aminokyselin a fosfátu (VOET, D. a VOET, J.G. 2011) nebo metabolismem síry (přídavek adeninu do média např. zvyšuje sulfitovou rezistenci u vinných kvasinek (ARANDA *et al.* 2006).

### **2.5.1. Fyziologické funkce bází nukleových kyselin a jejich sloučenin**

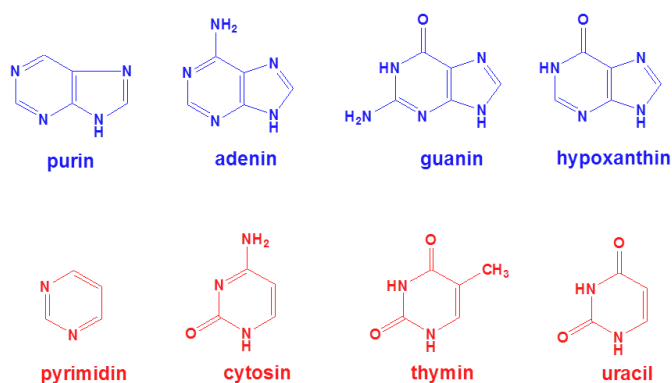
Dusíkaté báze nukleových kyselin (adenin, guanin, hypoxanthin, cytosin, thymin, uracil) mají významné fyziologické funkce v metabolismu. Nukleová báze adenin tvoří mimo jiné součást koenzymů a kofaktorů (např. NAD<sup>+</sup>, NADP, FAD, CoA). Báze navázané N-β-glykosidovou vazbou na C1 ribózy nebo deoxyribózy s esterově navázaným jedním až třemi zbytky kyseliny fosforečné tvoří (deoxy) ribonukleotidy, které jsou stavebními bloky DNA, mRNA, tRNA a rRNA a účastní se tak proteosyntézy. Díky fosfátovým skupinám vázaným anhydridovou vazbou, schopným přenášet funkční skupiny a při hydrolýze uvolňovat velké množství energie se nukleotidy mohou účastnit aktivace metabolických intermediátů (např. UDP glukóza při syntéze glykogenu, CTP v metabolismu fosfolipidů, SAM - S-Adenosyl methionin při přenosu methylové skupiny, PAPS - 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát ve fosfátovém metabolismu), umožňovat průběh endergonických reakcí (ATP), regulaci metabolických drah

nebo transdukcí signálu při buněčné signalizaci (např. cAMP, cGMP).

Vzhledem k ionizaci fosfátové skupiny se nukleotidy chovají jako středně silné kyseliny. Díky konjugovaným dvojným vazbám v heterocyklických purinových a pyrimidinových bázích absorbují nukleotidy mutagenní UV záření o vlnových délkách cca 260 nm. Absorbovaná vlnová délka je závislá na pH, určujícím distribuci protonů  $H^+$  a tím elektrický náboj (VOET, D. a VOET, J.G. 2011).

Nukleotidy se ve formě prekurzorů mohou účastnit i syntézy sekundárních metabolitů (např. kofeinu, cytokininů, fytohormonů). U bakterií a rostlin jsou nukleotidy prekurzory riboflavinu, thiaminu a kyseliny listové (HANSON a GREGORY 2002). U hlenky *Dictyostelium discoideum* bylo zjištěno využití cAMP jako prvního posla v mezibuněčné signalizaci, kdy cAMP působí jako chemoatraktant řídící organizované shlukování buněk do center v agregační fázi vývoje (HERELD a DEVREOTES 1992).

Báze nukleových kyselin se dělí na puriny (adenin, guanin, hypoxanthin) a pyrimidiny (cytosin, thymin, uracil). Disociační konstanta  $pK_A$  purinů je 2,3,  $pK_A$  pyrimidinů je 1,2 a chovají se jako slabé báze. Puriny a pyrimidiny se mezi sebou liší ve struktuře heterocyklu (puriny obsahují pyrimidinové a imidazolové jádro se čtyřmi atomy dusíku a pyrimidiny obsahují pouze jeden heterocyklus se dvěma atomy dusíku) – obrázek 4 (RODWELL 1993), (ALBERTS *et al.* 2002).



Obr. 4: Strukturální vzorce purinů a pyrimidinů. Upraveno dle ALBERTS *et al.* (2002)

### 2.5.2. Vnitrobuněčná rovnováha nukleotidů

Vnitrobuněčná koncentrace nukleotidů, nukleosidů a bází nukleových kyselin se liší v jednotlivých buněčných kompartmentech a na udržení jejich poměru se podílí specifické přenašeče (permeázy). Z bází nukleových kyselin jsou nejvíce zastoupeny adenin a uracil, které mají výraznější úlohu v energetickém a sacharidovém metabolismu

(WAGNER a BACKER 1992). V buňkách obecně je obvyklá fyziologická převaha nukleosid-5'- trifosfátů, v hypoxických buňkách je zvýšená koncentrace nukleosid-5'- di a monofosfátů. Celková koncentrace všech nukleotidů v buňce je konstantní. Energetický stav buňky lze pak popsat rovnicí:  $ATP/(ATP+ADP+AMP)$ . Množství ribonukleotidů se pohybuje v řádech mM. Mění se jejich poměr, přičemž nejvíce je v buňce zastoupen ATP jako hlavní přenašeč energie. Množství deoxyribonukleotidů, které jsou nutné pro syntézu DNA při replikaci závisí na fázi buněčného cyklu a pohybuje se v řádech  $\mu$ M. Vnitrobuněčná koncentrace purinů a pyrimidinů jsou uvedeny v tabulce na obr. 5.

Intracelulární koncentrace nukleotidů	
Nukleotid	Koncentrace: (mM)
ATP	4.6 ± 0.6
GTP	1.3 ± 0.2
UTP	1.6 ± 0.1
CTP	0.73 ± 0.03
ADP	0.82 ± 0.081
GDP	0.39 ± 0.036
UDP	0.093 ± 0.007
AMP	0.049 ± 0.012
GMP	0.12 ± 0.011
UMP	0.394 ± 0.061
CMP	0.017 ± 0.006
IMP	0.178 ± 0.019
dATP	0.031 ± 0.008
dGTP	0.016 ± 0.005
dCTP	0.023 ± 0.004
dTTP	0.022 ± 0.007

**Obr. 5: Vnitrobuněčná koncentrace purinů a pyrimidinů.**

Upraveno dle LJUNGDAHL a FORNIER (2012.)

Vnitrobuněčná rovnováha nukleotidů je zajištěna sledováním a úpravou koncentrace jednotlivých nukleotidů. Přísun nukleotidů musí být vyvážený vzhledem k tomu, že adenin, thymin, resp. uracil v RNA a guanin, cytosin se nacházejí v DNA a RNA ve stejných proporcích (dle Watson-Crickova pravidla párování bází) (<http://www.cliffsnotes.com/sciences/biology/biochemistry-ii/purines-and-pyrimidines/salvage-and-biosynthetic-pathways> 25. 3. 2014). Proto jsou syntézy nukleotidů, jejich recyklace i degradace složitě regulovány. Syntéza samostatných nukleotidů je regulována na základě koncentrací nukleotidů úrovní transkripce, zahrnující nekódující RNA a specifické odpovědi na dostupnost každého z nukleotidů. Enzymatické mechanismy zajišťují rovnováhu mezi nukleotidy. K syntéze CTP dochází z UTP, syntéza GTP a ATP vychází ze společného prekurzoru IMP. Biosyntéza každého samostatného nukleotidu tedy neprobíhá nezávisle. Například syntéza GMP vyžaduje ATP v jedné reakci katalyzované enzymem Gualp a syntéza AMP vyžaduje GTP pro aktivaci Ade12p



(dále). Hlavním faktorem, který řídí syntézu purinů je dostupnost substrátu. Rychlost syntetických reakcí je ovlivňována pozitivním zpětnovazebným mechanismem v různých reakčních stupních, vyvolaných AMP, ADP, GMP a GDP.

Pro analýzu složité regulace rovnováhy nukleotidů byly připraveny specifické mutanty s narušenou rovnováhou purinů a s výslednou sníženou vnitrobuněčnou koncentrací ATP a GTP (GAUTHIER *et al.* 2008, SAINT-MARC *et al.* 2009; IGLESIAS-GATO *et al.* 2011) nebo mutanty se zvýšenou zásobou GTP (BRETON *et al.* 2008). Tyto mutace způsobily zpomalení růstu kvasinkových buněk a projevíly se narušením transkripce a translace, přičemž došlo k derepresi klíčového transkripčního faktoru Gcn4p. Prostřednictvím Gcn4p je regulováno mnoho genů, např. geny biosyntézy *de novo* purinů nebo většina genů aminokyselinového metabolismu (NATARAJAN *et al.* 2001), kdy exprese genu *GCN4* je aktivována při limitaci aminokyselin (IGLESIAS-GATO *et al.* 2011). Nebyla však zjištěna specifická buněčná odpověď na defektní rovnováhu nukleotidů. Kvasinkové buňky zřejmě nemají jednotnou komplexní buněčnou odpověď na narušenou rovnováhu nukleotidů.

### 2.5.3. Významné sloučeniny purinů a pyrimidinů

#### 2.5.3.1. Sloučeniny adeninu a guaninu - AMP, ADP, ATP, GTP

Nejdůležitějším přenašečem energie v buňkách je ATP. Hlavním zdrojem ATP u *S. cerevisiae* je syntéza ATP syntázami za využití protonového gradientu na vnitřní membráně mitochondrií. Kromě toho vzniká ATP při glykolýze účinkem fosfoglycerátkinázy (při přeměně 1,3-bisfosfoglycerátu na 3-fosfoglycerát) a dále účinkem pyruvátkinázy (při přeměně fosfoenolpyruvátu na pyruvát). V Krebsově cyklu vzniká ATP zprostředkovaně z GTP vzniklého v reakci katalyzované sukcinyl-CoA-syntetázou, přičemž GTP pak může být na ATP převeden v reakci  $ADP + GTP \rightleftharpoons ATP + GDP$  (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). ATP se kromě energetického metabolismu v buňkách účastní fixace dusíku, fosforu a síry do organických sloučenin, je substrátem pro kinázy a pro enzymy s ATPázovou aktivitou a stejně jako GTP, CTP a UTP je ATP substrátem pro syntézu RNA. Aminokyseliny při proteosyntéze jsou aktivovány adenosin monofosfátem - AMP. Při syntéze polysacharidů jsou monosacharidy aktivovány adenosin difosfátem - ADP. ATP může mít i alostericky regulační funkci, kdy mění prostorovou aktivitu enzymu, čímž ho aktivuje či naopak deaktivuje. Je substrátem pro adenylátcyklázu, která vytváří z ATP cyklický adenosinmonofosfát - cAMP. (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). Vnitrobuněčná

koncentrace ATP je odlišná druhově, tkáňově i v rámci buněčného typu a je velice proměnlivá i v průběhu buněčného cyklu – kolísá mezi 1 – 10 mmol/l. (BEIS a NEWSHOLME 1975). AMP je obvykle za katalýzy adenylát kinázy (u *S. cerevisiae* kódované genem *ADK1*) převeden na 2 ADP v reakci  $AMP + ATP \rightarrow 2ADP$ . Aby v buňce nenarůstala koncentrace ADP na úkor ATP, dochází v buňkách k aktivaci negativní zpětné vazby. Při vysoké hladině ADP v buňce se aktivují enzymy podílející se na oxidaci cukrů, což stimuluje obnovu ATP fosforylací na substrátové úrovni z ADP za účasti nukleosid difosfát kinázy (u *S. cerevisiae* gen *NDK1*) a pyruvát kinázy (u *S. cerevisiae* gen *PYK1*) (ALBERTS et al. 2002), (obr. 6 v kap. 2.5.4.1.).

### 2.5.3.2. S-Adenosyl methionin - SAM, AdoMet

SAM vzniká z ATP a aminokyseliny methioninu v reakci katalyzované methionin adenosyltransferázou (u *S. cerevisiae* kódované geny *SAM1* a *SAM2*). Methylová skupina ( $CH_3$ ) vázaná na atom síry v methioninu je reaktivní a v mnoha metabolických reakcích může být transmethylací přenesena na různé akceptorové molekuly, kterými mohou být nukleové kyseliny, proteiny, lipidy nebo sekundární metabolity (CANTONI 1952). SAM se dále účastní biosyntézy polyaminů (např. spermidinu, sperminu), je nutný pro buněčný růst a obnovu a pro metylaci v čepičce mRNA.

### 2.5.3.3. Uridin trifosfát – UTP

Hlavní funkcí UTP je syntéza RNA při transkripci. Slouží také jako zdroj energie nebo aktivátor některých substrátů v různých metabolických drahách. Při aktivaci substrátů se obvykle na substrát váže pouze UDP za uvolnění fosfátové skupiny (např. UDP glukóza se následně podílí na syntéze glykogenu, UDP galaktóza je intermediát při konverzi galaktózy na glukózu). UTP je také nutný pro tetramerizaci CTP syntázy při syntéze CTP (dále) (ALBERTS et al. 2002).

### 2.5.3.4. Cytidin trifosfát – CTP

CTP je jedním ze čtyř základních substrátů pro syntézu RNA při transkripci. Slouží také jako koenzym při syntéze glycerolfosfolipidů a při glykosylaci proteinů. Jeho vznik umožňuje mimo jiné CTP syntáza (u *S. cerevisiae* kódované geny *URA7*, *URA8*) při konverzi s UTP v reakci  $ATP + UTP + \text{glutamin} \rightarrow ADP + P_i + CTP + \text{glutamát}$  v konečných krocích biosyntézy *de novo* i šetřící recyklační dráhy (obr. 7 v kap. 2.5.4.4.).

Maximální aktivita CTP syntázy byla u lidí zjištěna při fyziologických koncentracích ATP, GTP a glutaminu, kdy byly zjištěny taktéž fyziologické hodnoty jejího substrátu UTP a produktu CTP. V případě nízkých koncentrací enzymu a při absenci ATP a UTP se CTP syntáza vyskytuje v buňkách v neaktivní formě. Při vzestupu hladiny enzymu polymeruje a tvoří dimer a v přítomnosti ATP a UTP tvoří tetramer. Funkce CTP syntázy je zřejmě regulována jednak vnitrobuněčnou koncentrací substrátu UTP, ale také schopností tvořit oligomery a fosforylací na aminokyselině serinu (KASSEL *et al.* 2010). CTP se také účastní alosterických regulací aktivity enzymů.

#### **2.5.3.5. Guanosin trifosfát - GTP**

GTP vzniká mimo jiné v citrátovém cyklu při štěpení sukcinyl-Coa (substrátovou fosforylací) nebo z GDP fosforylací na GTP za spotřeby 1 molekuly ATP. Uplatňuje se při přenosu energie při reakcích zprostředkovaných ligázami nebo při translaci při prodlužování peptidového řetězce, kdy je třeba na připojení jedné aminokyseliny dvou molekul GTP. Ve své cyklické formě (cGMP – cyklický guanosin monofosfát) se účastní v eukaryotických buňkách přenosu signálu jako druhý posel, kdy aktivuje řadu cGMP vazebných kináz. Jeho cyklická forma (cGMP) vzniká činností guanylátcyklázy. Výskyt cGMP je ve srovnání s cAMP mnohem nižší (cca 5%). GTP je hydrolyzován GTPázami, které mají důležitou roli při buněčné signalizaci. Jde například o G-proteiny, elongační faktory, malé proteiny z rodiny Ras nebo velké proteiny z rodiny dynaminů (ALBERTS *et al.* 2002), (CAMMACK R. *et al.* 2006).

#### **2.5.4. Syntéza nukleotidů**

Nukleotidy vznikají syntézou purinů a pyrimidinů v evolučně zachovaných biosyntetických drahách *de novo* a v šetřících drahách („salvage pathways“) jak u prokaryotických, tak i eukaryotických buněk. Energeticky náročná biosyntéza *de novo* z aminokyselin a cukrů je kombinována s recyklačním způsobem syntézy, kde zdrojem prekurzorů syntézy (purinů a pyrimidinů) jsou buď makromolekuly pocházející z obměny nukleových kyselin v buňce nebo dochází k příjmu prekurzorů z extracelulárního prostředí, kdy např. báze nukleových kyselin tvoří složku růstového média (tzv. šetřící dráhy – „salvage pathways“). V průběhu těchto syntéz dochází k přeměnám nukleovýchází,

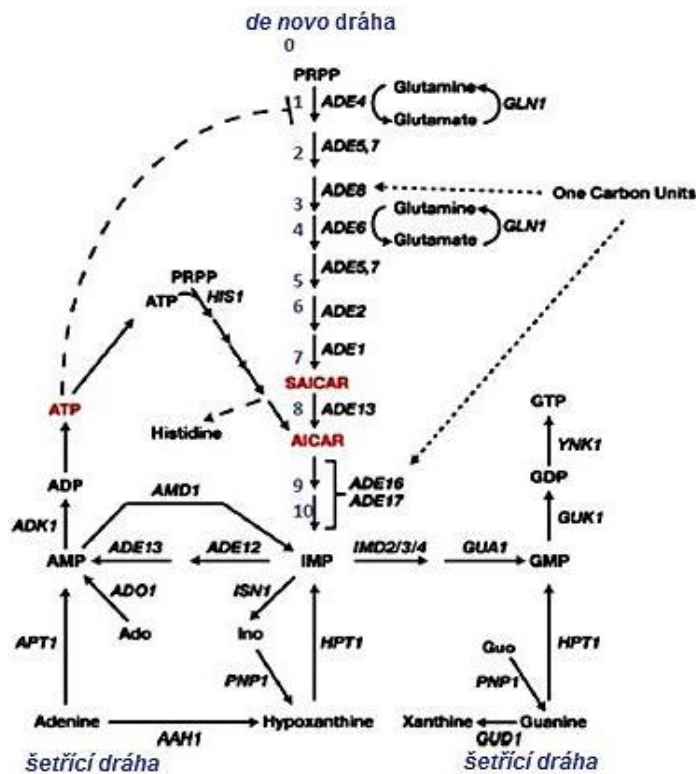
nukleosidů a nukleotidů v závislosti na vnitrobuněčné koncentraci konečných produktů (LJUNGDAHL a FORNIER 2012).

*De novo* biosyntetické dráhy purinů a pyrimidinů mají jeden společný metabolický meziprodukt, jejich další kroky jsou však odlišné. Společným výchozím materiálem pro syntézu *de novo* purinů i pyrimidinů je produkt pentózafosfátové dráhy  $\alpha$ -D-ribosa-5-fosfát, který se aktivuje ATP na 5-fosforibosyl- $\alpha$ -pyrofosfát (PRPP). PRPP je počátečním substrátem biosyntézy *de novo* purinů. Biosyntézy *de novo* pyrimidinů se však účastní až v páté reakci dráhy (viz dále). PRPP je také substrátem při syntéze nukleotidů v šetřících drahách; je tudíž pro oba způsoby syntézy nukleotidů společným regulačním činitelem. Aktivita ribózafosfát difosfokinázy (u *S. cerevisiae* kódované geny *PRS1-5*) aktivující za spotřeby ATP  $\alpha$ -D-ribosa-5-fosfát za vzniku PRPP se mění na základě koncentrace různých metabolitů – fosfátu, 2,3-bisfosfoglycerátu (působících jako aktivátory), ADP a glukóza-6-fosfátu (působících jako inhibitory). Společný důležitý meziprodukt *de novo* biosyntézy purinů je IMP (inosinmonofosfát), který jako bázi obsahuje hypoxanthin. Z IMP vznikají následnými samostatnými *de novo* dráhami konečné produkty (adenosinmonofosfát - AMP, guanosinmonofosfát – GMP). Společný meziprodukt biosyntézy *de novo* pyrimidinů je UMP (uridinmonofosfát), ze kterého postupně vznikají cytidintrifosfát CTP a uridintrifosfát – UTP ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?sce00230](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00230) 25. 3. 2014), ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?sce00240](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00240) 25. 3. 2014), (VOET, D. a VOET, J.G. 2011), obr. 6 a 7.

#### **2.5.4.1. Biosyntetická dráha *de novo* purinů**

Biosyntéza purinů *de novo* je silně evolučně zachovaná. Probíhá v cytoplazmě jako sled reakcí z malých prekurzorů, přičemž monosacharid  $\alpha$ -D-ribosa-5-fosfát je do syntézy zapojen již od počátečního kroku (narozdíl od biosyntézy *de novo* pyrimidinů). Substráty pro syntézu jsou PRPP, aminokyseliny glycin (Gly), glutamin (Gln) a kyselina asparagová (Asp), tetrahydrofolát (THF) a CO<sub>2</sub>. Koenzymy reakcí jsou NAD<sup>+</sup> a THF. Ve druhé reakci biosyntetické dráhy *de novo* vstupuje do molekuly purinu atom dusíku reakcí PRPP s Gln za současné hydrolýzy PPi a vzniká meziprodukt  $\beta$ -5-fosforibosylamin (PRA). Tato reakce je prvním krokem biosyntézy purinů *de novo* a účastní se jí jeden z důležitých regulátorů biosyntetické dráhy *de novo* - enzym amidofosforibosyltransferáza (Ade4p, u *S. cerevisiae* kódovaná genem *ADE4*).

Funkce tohoto enzymu, stejně jako dalších genů z *ADE* regulonu je alostericky inhibována IMP, AMP a GMP a aktivována dostupností PRPP. Na dostupnosti PRPP proto závisí rychlost syntézy (NIETO a WOODS, 1983), (MÄNTSÄLA a ZALKIN 1984). V dalších krocích biosynetické dráhy dochází za účasti mnoha enzymů a za vzniku několika meziproductů k dalším vstupům uhlíkových a dusíkových atomů z Gly, Gln, HCO<sub>3</sub> a Asp. Konečným meziproductem je IMP. Podrobný popis reakcí včetně zúčastněných enzymů je uveden v legendě k obrázku č. 6.



Zúčastněné geny a názvy kódovaných enzymů u jednotlivých reakcí biosynetické dráhy de novo purinů u *S. cerevisiae*:

0. *PRS4* – ribózafozfát difosfokináza
1. *ADE4* - amidofosforibosyltransferáza
2. *ADE5,7* - bifunkční aminoimidazolribotid syntáza/glycinamidribotid syntáza
3. *ADE8* – fosforibosylglycinamid formyltransferáza
4. *ADE6* - fosforibosylformylglycinamidin syntáza
5. *ADE2* – fosforibosylaminoimidazol karboxyláza
6. *ADE5,7* - bifunkční aminoimidazolribotid syntáza/glycinamidribotid syntáza
7. *ADE2* – fosforibosylaminoimidazol karboxyláza
8. *ADE1* – fosforibosylaminoimidazol sukcinokarboxamid syntáza
9. *ADE13* (*BRA1*, *BRA8*) - adenylsukcináza
10. *ADE16* – bifunkční fosforibosylaminoimidazolkarboxamid formyltransferáza/ IMP cyklohydroláza

Obr.6: Syntéza IMP de novo. Modifikováno dle LJUNGDAHL a FORNIER (2012)

**Popis reakcí biosynetické dráhy de novo purinů u *S. cerevisiae*:**

0. Aktivace α-D-ribosa-5-fosfátu ATP na PRPP (společná reakce pro získání substrátu PRPP pro syntézu purinů i pyrimidinů i pro šetřící dráhy).
1. Vstup atomu N9 reakcí PRPP s Gln za vzniku PRA (fosforibosylaminu). Kontrolní krok biosyntézy. Účast amidofosforibosyltransferázy Ade4p. Zpětná inhibice puriny.
2. Vstup atomů C4, C5 a N7. Atomy vstupují ve formě Gly na PRA za tvorby glycinamidribotidu (GAR). Spotřeba ATP. Reverzibilní reakce.
3. Vstup atomu C8 formylací aminoskupiny GAR za účasti kofaktoru N<sup>10</sup>-Formyl-THF (donor formylové skupiny) za vzniku FGAR
4. Vstup atomu N3 ve formě Gln za vzniku formyl glycinamidu FGAM. Spotřeba ATP.
5. Tvorba imidazolového kruhu kondenzací za vzniku AIR. Spotřeba ATP.
6. Vstup atomu C6 jako HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> za katalýzy N<sup>5</sup>-CAIR syntetázy a vzniku N<sup>5</sup>-CAIR. Spotřeba ATP.
7. Karboxylace a intramolekulární konverze N<sup>5</sup>-CAIR za účasti CO<sub>2</sub>, AIR karboxylázy a N<sup>5</sup>-CAIR mutázy. Vznik CAIR.
8. Vstup atomu N1 kondenzací z aminoskupiny Asp za vzniku SAICAR. Spotřeba ATP.
9. Odštěpení fumarátu ze SAICAR a vznik AICAR.
10. Vstup atomu C2. Formylace za účasti N<sup>10</sup>-formyl-THF a vzniku FAICAR.
11. Eliminace vody a cyklizace za vzniku IMP bez spotřeby ATP.

Celková spotřeba ATP: 5 molekul.

([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?sce00230](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00230) 25. 3. 2014), (VOET, D. a VOET, J.G. 2011)

Rychlost tvorby IMP je kontrolována hladinou ATP a GTP. Vysoká hladina purinových nukleotidů syntézu IMP inhibuje. IMP se v buňce nehromadí a ihned dochází k dvoukrokové syntéze AMP a GMP. Při syntéze AMP dochází nejprve k vazbě Asp na IMP za spotřeby GTP. V druhém kroku dochází k eliminaci fumarátu z adenylosukcinátu za katalýzy adenylosukcinátlyázy (u *S. cerevisiae* Ade13p, Bra8p, Bra1p kódované geny *ADE13*, *BRA1*, *BRA8*) a vzniku AMP. Při syntéze GMP vzniká nejprve za katalýzy IMP dehydrogenázy (Imd2p, Imd3p, Imd4p) a účasti NAD<sup>+</sup>/NADH nejprve XMP (xantosin-5'-monofosfát). V druhém kroku dochází ke vstupu atomu dusíku z molekuly Gln za spotřeby ATP a tvorby GMP. Tyto dva konečné kroky syntézy AMP a GMP jsou tedy vzájemně provázány a regulovány. Existují zde dvě hladiny regulace – regulace na úrovni syntézy IMP a na úrovni syntézy AMP a GMP. Výsledkem vzájemné koordinace je to, že při dostatku GTP je urychlena přeměna IMP na AMP a při dostatku ATP se zase urychluje přeměna XMP na GMP. Tyto vztahy zajišťují syntézu téměř stejného množství GMP jako AMP a jsou také zapojeny do hlavní regulace biosyntetické dráhy *de novo*, kdy dochází k alosterické inhibici hlavního regulátoru – amidofosforibosyltransferázy (Ade4p) dle vnitrobuněčné koncentrace IMP, AMP a GMP. Dalším místem regulace je již výše zmíněná funkce enzymu ribózafosfátdifosfokinázy (u *S. cerevisiae* podjednotky Prs1p, Prs2p, Prs3p, Prs4p, Prs5p kódované geny *PRS1* - 5) při aktivaci počátečního substrátu biosyntézy *de novo*,  $\alpha$ -D-ribosa-5-fosfátu (VOET, D. a VOET, J.G. 2011), (LJUNGDAHL a FORNIER 2012).

#### **2.5.4.2. Regulace *de novo* biosyntézy adenylových nukleotidů na transkripční úrovni**

##### **u *S. cerevisiae***

Transkripční faktor Gcn4p, který reguluje řadu genů aminokyselinového metabolismu (HINNEBUSCH 2005) se uplatňuje i při regulaci exprese genů účastnících se metabolismu purinů i pyrimidinů. U genů účastnících se metabolismu purinů – *ADE1*, *ADE4*, *ADE5,7*, *ADE8*, *ADE12*, *ADE13*, byla zjištěna indukce jejich exprese transkripčním faktorem Gcn4p v buňkách hladovějících na adenin nebo histidin. V promotorech genů *ADE1*, *ADE2*, *ADE3*, *ADE4*, *ADE5,7*, *ADE8* byly u buněk *S. cerevisiae* zjištěny konsensus vazebné sekvence pro Gcn4p (ROLFES a HINNEBUSCH 1993), (ROLFES *et al.* 1997).

Při studiu regulace dráhy histidinu byly identifikovány i jiné transkripční faktory zodpovědné za aktivaci genů *de novo* biosyntetické dráhy purinů. Významná regulační role byla zjištěna u transkripčních faktorů Bas1p a Bas2p (ARNDT *et al.* 1987),

(TICE-BALDWIN *et al.* 1989). Deleci genů kódujících tyto transkripční faktory došlo ke krátkodobému omezení zásobení adeninem. Bas1p a Bas2p aktivují expresi všech genů účastnících se biosyntézy AMP, s výjimkou *ADE16*. Tyto transkripční faktory ovlivňují i aktivaci transkripce genů účastnících se dalších drah metabolicky napojených na dráhu purinů, např. dráhu histidinu (geny *HIS1*, *HIS4* a *HIS7*), glutaminu (*GLN1*) nebo geny metabolismu jednoulíkatých sloučenin (*SHM2*, *MTD1*). Transkripční faktor Bas2p je také znám jako Pho2p – hlavní regulátor utilizace fosfátu v kvasinkách. Všechny geny aktivované těmito transkripčními faktory (Bas1p, Bas2p/Pho2p) reagují na extracelulární koncentrace adeninu. Jejich exprese je nízká při nadbytku adeninu v růstovém médiu (TICE-BALDWIN *et al.* 1989), (DAIGNAN-FORNIER a FINK 1992), (SPRINGER *et al.* 1996), (DENIS a DAIGNAN-FORNIER 1998).

Genetickou analýzou mutantů konstitutivně exprimujících geny biosyntézy purinů bylo prokázáno, že utilizace adeninu přijatého z extracelulárního prostředí je nutná pro uplatnění regulační role ADP (GUETSOVA *et al.* 1997, RÉBORA *et al.* 2001). Současně bylo také objeveno, že hypoxanthin v extracelulárním prostředí snižuje expresi genu *ADE1* (jehož produkt katalyzuje vznik intermediátu SAICAR (sukcynyl-AICAR), významného pro regulaci transkripce), přičemž účinek guaninu je pouze slabý (GUETSOVA *et al.* 1997). Hypoxanthin totiž na rozdíl od guaninu může být převeden na adenylové nukleotidy (obr. 6). Dochází také k ovlivnění genu *ADE13* kódujícího adenylyl-sukcinát lyázu, která má klíčovou roli v biosyntetické dráze při katalýze vzniku dalšího důležitého intermediátu AICAR (5'-fosforibosyl-5-amino-4-imidazol karboxamid) (RÉBORA *et al.* 2001). Další genetické analýzy potvrdily, že metabolické intermediáty AICAR a SAICAR mají stěžejní roli v interakcích mezi Bas1p a Pho2p (RÉBORA *et al.* 2001), (RÉBORA *et al.* 2005). Dále byla zjištěna souvislost mezi vnitrobuněčnou koncentrací AICAR (měřenou HPLC) a expresí *ADE* genů (PINSON *et al.* 2009). Dvouhybridní studie prokázaly, že interakce Bas1p-Pho2p je stimulována v podmínkách nahromadění (S)AICAR (RÉBORA *et al.* 2001), (PINSON *et al.* 2009). Vyšší hladina (S)AICAR stimuluje Bas1p-dependentní vazbu Pho2p na promotory genů *ADE5,7* a *ADE17*. Pho2p by mohl mít senzorickou funkci a sledovat hladinu AICAR přímou interakcí s dosud neznámou malou molekulou (PINSON *et al.* 2009). Z výsledků několika dalších studií vyplývá, že se AICAR silně váže na Pho2p (nikoli na Bas1p) a stimuluje interakci Pho2p s dalšími proteiny, např. dalším transkripčním faktorem Pho4p. Souvislost mezi hladinou adeninu extracelulárního původu a syntézou (S)AICAR se objevuje během enzymatické regulace prvního kroku biosyntetické dráhy *de novo*, katalyzované enzymem Ade4p, jehož

hladina je negativně regulována ADP a ATP in vitro (RÉBORA *et al.* 2001). Vnitrobuněčná koncentrace ADP a ATP je samozřejmě vyšší v podmínkách dostatečného přísunu adeninu (GAUTHIER *et al.* 2008), kdy se však koncentrace (S)AICAR snižuje (HURLIMANN *et al.* 2011). Obě sloučeniny, ATP – finální produkt biosyntetické dráhy *de novo* a (S)AICAR – metabolický intermediát jsou nutné pro transkripční regulaci adenylových nukleotidů. Ačkoli jde o odlišné mechanismy, základní princip se velmi podobá dráze pyrimidinů, kde první enzym biosyntetické dráhy Ura2p je zpětně inhibován vnitrobuněčnou koncentrací UTP, což reguluje syntézu orotátu a dihydroorotátu – dvou metabolických intermediátů, které přímo stimulují transkripční faktor Ppr1p (viz dále).

#### **2.5.4.3. Regulace *de novo* biosyntézy guanylových nukleotidů na transkripční úrovni u *S. cerevisiae***

Expresí genů nutných pro syntézu GTP není koregulována podobně jako expresí genů pro syntézu AMP. Geny pro inosinmonofosfát dehydrogenázu *IMD2*, *IMD3* a *IMD4* a pro GMP syntázu *GUA1* nereagují na hladinu adeninu (na rozdíl od *ADE* genů), přestože k syntéze GTP může docházet ze společného meziprojektu IMP. Geny *IMD2*, *IMD3* a *IMD4* jsou silně negativně regulovány v případě, že je do růstového média přidán guanin. Expresí genu *GUA1* však ovlivněna není. Negativní regulační vliv guaninu na expresi *IMD* genů se neprojeví u mutantů *fcy2* (purin-cytosinová permeáza), *hpt1* (dimerní hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza) a *guk1* (guanylát kináza) s mutovanými geny pro transport guaninu z extracelulárního prostředí v šetřící dráze a jeho následnou utilizaci (ESCOBAR-HENRIQUES a DAIGNAN-FORNIER 2001), (SAINT-MARC *et al.* 2009). U genu *IMD2* byly zjištěny regulační elementy obsahující TATA box motiv, jehož delece má za následek konstitutivní expresi genu *IMD2*. Postupně byly objeveny i další struktury v lokusu tohoto genu (např. represivní element) (SHAW *et al.* 2001) nebo neobvyklé struktury produkující nestabilní transkripty (CUTs) (DAVIS a ARES 2006). Transkripční systém monitoruje zřejmě koncentraci GTP a reaguje na její změny změnou místa počátku transkripce. Celkový mechanismus regulace však není dosud plně objasněn.

#### **2.5.4.4. Biosyntetická dráha *de novo* pyrimidinů – tzv. „orotátová dráha“**

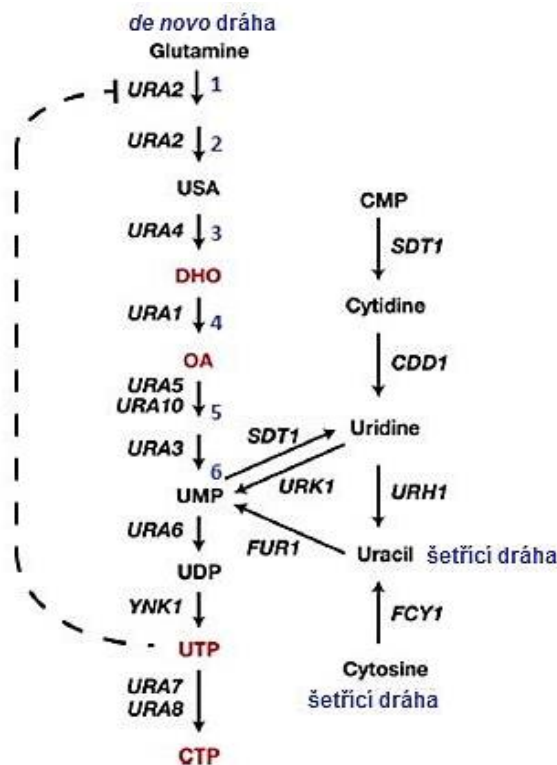
Orotátová dráha je sice silně evolučně zachovaná, ale přesto jsou rozdíly ve struktuře katalytických enzymů mezi mikroorganizmy a vyššími eukaryoty. Reakce této dráhy probíhají převážně v cytoplasmě. Jedna z reakcí však probíhá



v mitochondriích, kde se nachází enzym dihydroorotát dehydrogenáza. Biosyntéza *de novo* pyrimidinů je sled šesti návazných reakcí a oproti syntéze purinů vychází z větších podjednotek. Nejprve se tvoří pyrimidinový kruh a k zapojení monosacharidu dochází až v konečné fázi dráhy. Dráha probíhá vždy tak, že ze substrátů karbamoylfosfátu, Asp a PRPP vzniká UMP, meziproducty jsou kyselina orotová, ornitin monofosfát (OMP) a uridin monofosfát (UMP), konečnými produkty jsou CTP a TMP (VOET, D. a VOET, J.G. 2011).

Hlavním regulátorem dráhy je karbamoylfosfát syntetáza II lokalizovaná v cytoplazmě. Karbamoylfosfát, hlavní substrát biosyntézy pyrimidinů *de novo* vzniká v cytoplazmě z  $\text{HCO}_3^-$  a amoniaku nebo amidového atomu dusíku glutaminu v první reakci dráhy katalyzované karbamoylfosfátsyntetázou II za spotřeby dvou molekul ATP, z nichž jedna dodává fosfátovou skupinu a druhá energizuje reakci. Karbamoylfosfátsyntetáza se vyskytuje ve dvou enzymových izoformách (GIERMANN *et al.* 2002). Jde o mitochondriální CPSI, využívající jako donor dusíku amoniak a účastníci se biosyntézy močoviny a cytosolovou CPSII, využívající jako donor dusíku glutamin a účastníci se biosyntézy pyrimidinů (VOET, D. a VOET, J.G. 2011).

U *S. cerevisiae* byl identifikován gen *URA2* kódující bifunkční enzym karbamoylfosfátsyntetázu/aspartát transkarbamylázu. Její lokalizace je udávána jak v cytoplazmě, tak v mitochondriích (BENOIST *et al.* 2000) s tím, že jde o multifunkční enzymový komplex. *URA2* katalyzuje první dva kroky biosyntetické dráhy. Je zpětně inhibována UTP a pro svou funkci vyžaduje uracil. Při biosyntéze pyrimidinů jsou zřejmě zapojeny transportéry, umožňující přenos meziproductů biosyntézy z cytosolu do mitochondrií a naopak, protože enzymy *de novo* syntézy pyrimidinů se u kvasinkových buněk vyskytují v jádře, cytosolu a mitochondriích. V regulaci *de novo* syntézy pyrimidinů se významně uplatňuje ATP a UMP, zejména z hlediska alosterické regulace některých enzymů (např. karbamoylfosfátsyntetázy a ATPázy, které jsou ATP aktivovány a UMP inhibovány). U kvasinek je známo šest strukturních genů účastnících se *de novo* biosyntézy UMP – *URA2*, *URA4*, *URA1*, *URA5*, *URA10* a *URA3* a jeden regulační gen *PPR1* (DENIS-DUPHIL 1989). Biosyntéza UMP *de novo* je schématicky znázorněna na obrázku 7.



Zúčastněné geny a názvy kódovaných enzymů u jednotlivých reakcí biosynthetické dráhy *de novo* pyrimidinů u *Saccharomyces cerevisiae*:

0. *PRS4* - ribózafosfát difosfokináza
1. *URA2* - karbamoylfosfátsyntetáza / aspartát transkarbamyláza
2. *URA2* - karbamoylfosfátsyntetáza / aspartát transkarbamyláza
3. *URA4* - dihydroorotáza
4. *URA1* - dihydroorotát dehydrogenáza
5. *URA5*, *URA10* - orotát fosforibosyltransferáza
6. *URA3* – OMP - dekarboxyláza

**Obr.7:** Syntéza UMP *de novo*. Modifikováno dle LJUNGDAHL a FORNIER (2012).

**Popis reakcí biosynthetické dráhy *de novo* pyrimidinů u *S. cerevisiae*:**

0. Aktivace  $\alpha$ -D-ribosa-5-fosfátu ATP na PRPP (společná reakce pro získání substrátu PRPP pro syntézu purinů i pyrimidinů i pro šetřící dráhy).
1. Vznik karbamoylfosfátu z  $\text{HCO}_3^-$  a amidového atomu dusíku Gln za katalýzy karbamoyl fosfát syntetázy II. Spotřeba 2 ATP.
2. Vznik karbamoyl aspartátu kondenzací aktivovaného karbamoyl fosfátu s Asp za katalýzy ATCázy. Bez spotřeby ATP.
3. Vznik dihydroorotátu intramolekulární kondenzací z karbamoyl aspartátu za katalýzy dihydroorotázy. Bez spotřeby ATP.
4. Oxidace dihydroorotátu na orotát za katalýzy dihydroorotát dehydrogenázy bez spotřeby ATP.
5. Vznik orotidin-5'-monofosfátu (OMP) z orotátu a PRPP za katalýzy orotát fosforibosyltransferázy. Spotřeba ADP.
6. Vznik UMP z OMP za katalýzy OMP dekarboxylázy. Bez spotřeby kofaktorů a ATP.

Celková spotřeba ATP: 3 molekuly.

([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00240](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00240) 28. 3. 2014), (VOET, D. a VOET, J.G. 2011)

V poslední, šesté reakci orotátové dráhy je OMP dekarboxylován na UMP za katalýzy OMP-dekarboxylázy. Pro tento enzym byl u *Saccharomyces cerevisiae* identifikován gen *URA3*. Ztráta funkce tohoto enzymu se projeví zhoršením růstu, pokud není do růstového média přidán uracil nebo uridin (JONES, M.E. 1992).

#### 2.5.4.5. Regulace *de novo* biosyntézy UTP na transkripční úrovni u *S. cerevisiae*

Na kvasinkových mutantních kmenech kumulujících kyselinu orotovou (OA) a dihydroorotát (DHO) bylo již dříve prokázáno, že tyto metabolické intermediáty by mohly mít přímou roli v regulaci pyrimidinové biosyntetické dráhy (LACROUTE 1968). *De novo* biosyntéza pyrimidinů je regulována na enzymatické úrovni zpětnou inhibicí prvního enzymu, Ura2p (karbamoylfosfátsyntetáza-aspartáttranskarbamyláza) finálním produktem UTP. Několik genů je rovněž pozitivně regulováno na transkripční úrovni při hladovění na pyrimidinové bázi (JONES a FINK 1982). Byl identifikován protein Ppr1p jako transkripční faktor s motivem zinkových prstů, nutný pro expresi genů *URA1* (kódujícího dihydroorotát dehydrogenázu) a *URA3* (kódujícího orotidin-5'-fosfát dekarboxylázu) (LOISON *et al.* 1980), (KAMMERER *et al.* 1984). Exprese za účasti Ppr1p je také zřejmě pozitivně regulována u genů *URA4* (kódujícího dihydroorotázu) a *URA10* (kódujícího orotát fosforibosyltransferázu) (ROY *et al.* 1990), (ROY 1992). Dále bylo zjišťováno, zda by OA a DHO mohly mít specifické funkce v biosyntetické dráze pyrimidinů *de novo* jako kofaktory transkripčních aktivátorů (resp. Ppr1p) za předpokladu, že nadbytek těchto metabolitů je negativně regulován zpětnou inhibicí. Tyto předpoklady byly přímo ověřeny s použitím purifikovaného enzymu Ppr1p v *in vitro* studii, kdy bylo zjištěno, že přidáním DHO nebo OA do reakce je stimulována Ppr1p-dependentní transkripce, že Ppr1p přímo monitoruje hladiny intermediátů v pyrimidinové biosyntetické dráze a upravuje syntézu enzymů v závislosti na toku intermediátů. Bylo také zjištěno, že efektivní vazba Ppr1p na DNA vyžaduje zřejmě zatím neznámou malou molekulu (FLYNN a REECE 1999). Transkripce *URA2*, kódující první krok syntézy UTP je taktéž pozitivně regulována v odpovědi na úbytek pyrimidinů. Exprese *URA2* však není na Ppr1p závislá, ale je regulována jiným mechanismem. Jde o alternativní místa počátku transkripce, které vedou k syntéze malých „kryptických nestabilních transkriptů“ (CUTs). „Neproduktivní“ transkripce z protisměrných míst negativně reguluje expresi *URA2*. Nedostatek uracilu aktivuje výběr startovních míst transkripce pro funkční *URA2* mRNA. Mechanizmy zahrnující nekódující RNA se objevují při regulaci i dalších genů účastnících se biosyntézy *de novo* jak purinů, tak pyrimidinů: např. *URA8*, *IMD2* a *ADE12* (DAVIS a ARES 2006), (KWAPISZ *et al.* 2008), (THIEBAUT *et al.* 2008). Na molekulární úrovni nejsou všechny tyto regulační procesy zcela objasněny, nicméně je známo, že zahrnují sledování vnitrobuněčné koncentrace nukleotidů transkripčním systémem, čímž je zajištěna syntéza jednotlivých nukleotidů s ohledem na jejich aktuální dostupnost. U genů *URA1*

a *URA10* bylo zjištěno, že jejich exprese se liší, resp. dochází ke střídavým změnám v nízké expresi genu nebo k jeho represí. U obou genů byla prokázána plná represe v poslední plné alkalické fázi vývoje kolonie (PALKOVÁ *et al.* 2012). Zajímavé výsledky poskytla studie zaměřená na vývoj metabolismu *S. cerevisiae*, jejímž předmětem byly mimo jiné paralogní enzymy Ura10p (s majoritní funkcí) a Ura5p (s minoritní funkcí). Tato studie potvrdila tzv. „patchwork model“ vývoje oproti tzv. „retrográdnímu modelu“ a také dřívější zjištění, že existuje u genů kódujících tyto enzymy anti-korelace jejich exprese (GRASSI a TRAMONTANO 2011).

#### **2.5.4.6. Regulace *de novo* biosyntézy nukleotidů odpovědí na růstovou fázi kvasinek**

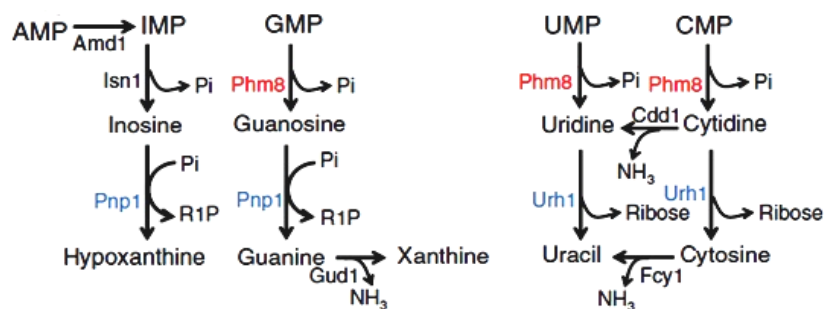
Nukleotidy jsou nutné jako stavební kameny nukleových kyselin zejména ve fázi růstu a dělení (u kolonií *S. cerevisiae* acidická fáze rychlého růstu). Jejich syntéza by měla být proto nižší u buněk, jejichž růst je dočasně zpomalen (u kolonií *S. cerevisiae* alkalická fáze vývoje), a u kterých může docházet k efektivní recyklaci v šetřících drahách („salvage pathways“), která by měla potřebu nukleotidů pokrýt. Podrobné studie u *S. cerevisiae* však odhalily, že geny účastníci se biosyntézy purinů *de novo* (*ADE5,7, ADE12, ADE13, ADE1*) jsou v koloniích indukované ve fázi rychlého růstu (acidická fáze) i při růstovém zpomalení (alkalická fáze) (PALKOVÁ *et al.* 2002). Později bylo zjištěno, že ve fázi rychlého růstu (1. acidické fázi) může docházet k represí transkripce genů *ADE6* a *ADE12* biosyntetické dráhy purinů *de novo* a naopak k indukci v alkalické fázi vývoje (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). U genů pro biosyntézu pyrimidinů *de novo* *URA1* a *URA10* byla zjištěna represe v obou fázích vývoje (PALKOVÁ *et al.* 2002). U kvasinkových buněk je exprese genů *IMD* (kódujících inosinmonofosfát dehydrogenázu katalyzující počátek přeměny IMP na GMP) silně ovlivněna růstovou fází (SHAW *et al.* 2001), (ESCOBAR-HENRIQUES *et al.* 2003a). Regulace při vstupu do stacionární fáze se objevuje u adenin deaminázy Aah1p, a to na transkripční i post-transkripční úrovni. Genetické studie mutantů, u kterých byl tento způsob regulace odstraněn potvrdily, že transkripční regulace zahrnuje kinázu Ssn3p a její cyklin Ssn8p. Posttranskripční regulace se objevuje během degradace Aah1p v proteasomu a je zajištěna komplexem SCF, obsahujícím protein Saf1p typu F-box, jehož syntéza je zvýšena ve stacionární fázi (ESCUSA *et al.* 2006). Saf1p mutanty mohou začít i ukončit stacionární fázi normálním způsobem a role syntézy nukleotidů během vstupu do stacionární fáze není dosud zcela jasná. Dále bylo zjištěno, že několik enzymů zajišťujících biosyntézu purinů (Ade4p, Ade5p, Ade7p, Ade17p, Ade12p) tvoří v buňkách ve stacionární

fázi cytoplazmatická granula. Studiemi proteinu Ade4p fúzovaného s Gfp bylo potvrzeno, že tato granula v cytoplazmě mizí s přidáním adeninu nebo hypoxanthinu do růstového média (NARAYANASWAMY *et al.* 2009). Tato neobvyklá vlastnost je podobná vlastnostem enzymů biosyntetické dráhy *de novo* purinů v HeLa buňkách, kdy tyto enzymy mají sklon se shlukovat v podmínkách nedostatku purinů (AN *et al.* 2008).

#### 2.5.4.7. Šetřící dráhy – „salvage pathways“

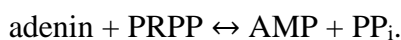
Recyklační dráhy se druhově liší a nejsou silně evolučně zachované jako biosyntézy *de novo*. Oproti spotřebě 5 molekul ATP pro syntézu jednoho mononukleotidu v biosyntézách *de novo* se v šetřících drahách může spotřebovat pro syntézu jednoho mononukleotidu pouze 1 molekula ATP, jsou proto méně energeticky náročné. Cukerná složka nukleosidů a aromatické heterocykly bází získaných z degradace makromolekul nebo z extracelulárního prostředí mohou být navíc zdrojem dusíku a uhlíku pro syntézu jiných sloučenin. V buněčném cyklu dochází při katabolických dějích k obměně nukleových kyselin (zejména některých druhů RNA, např. rRNA), kdy jsou štěpeny na nukleotidy, nukleosidy a báze. Nukleázy atakem na fosfodiesterové vazby uvolňují nukleotidy z 3' konce DNA a RNA. Nukleotidázy odštěpením fosfátu z nukleotidů na 3' konci DNA a RNA uvolňují nukleosidy. Nukleotidy pocházející z degradace DNA a RNA mohou být štěpeny nukleosidfosforylázami na báze, ribózu a fosfát a být tak zdrojem fosfátu. Část takto získaných bází a nukleosidů vnitrobuněčného původu je využita pro syntézu nových nukleotidů v recyklačních šetřících drahách – „salvage pathways“. Nukleotidy, využívané pro recyklaci v šetřících drahách pocházejí převážně z degradace ribozomální RNA (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). Ribozomy jsou nutné při rychlé fázi růstu a mohou později sloužit jako zdroj uhlíku, dusíku a fosfátu při přechodu do fáze pomalého růstu nebo stacionární fáze. Při hladovění dochází u kvasinek k ribofagii. Nukleotidy uvolněné degradací rRNA jsou dále degradovány na nukleosidy (AMP je převeden na IMP). Purinové nukleosidy jsou dále převedeny na ribóza-1-fosfát (R1P) a nukleovou bázi, pyrimidiny jsou hydrolyzovány na ribózu a nukleovou bázi. Ribóza a R1P jsou převedeny na ribóza-5-fosfát (R5P), který vstupuje do neoxidativní větve pentóza-fosfátové dráhy (obr. 8) (XU *et al.* 2013).

Savčí buňky neprocházejí fázemi hladovění jako mikroorganismy, významnou roli u nich však má proces autofagie, uplatňující se zejména v počátečních fázích vývoje nebo při růstu tumorů řízených proteinem Ras (MATHEW a WHITE 2011a, b)).



**Obr. 8: Degradace nukleotidů.** Upraveno podle XU *et al.* (2013).

Hlavním enzymem pro resyntézu purinů i pyrimidinů v šetřící dráze je fosforibosylpyrofosfát syntetáza (PRPP syntetáza). PRPP syntetáza je hlavním enzymem také na počátku biosyntézy purinů *de novo* a funkce tohoto enzymu podléhá zpětnovazebné inhibici na základě vnitrobuněčné koncentrace příslušných nukleosid mono- a difosfátů (viz výše). Substrátem pro šetřící dráhu syntézy purinů jsou nukleotidové báze adenin, guanin a hypoxanthin a fosforibosylpyrofosfát (PRPP) nebo příslušné ribonukleosidy pocházející z obměny RNA, z nichž při spotřebě 1 molekuly ATP dochází k syntéze příslušných nukleotidů (viz dále). Enzym adenin fosforibosyltransferáza (Apt1p) katalyzuje reverzibilní reakci adeninu s PRPP, při které dochází k vzniku AMP a fosfátu:



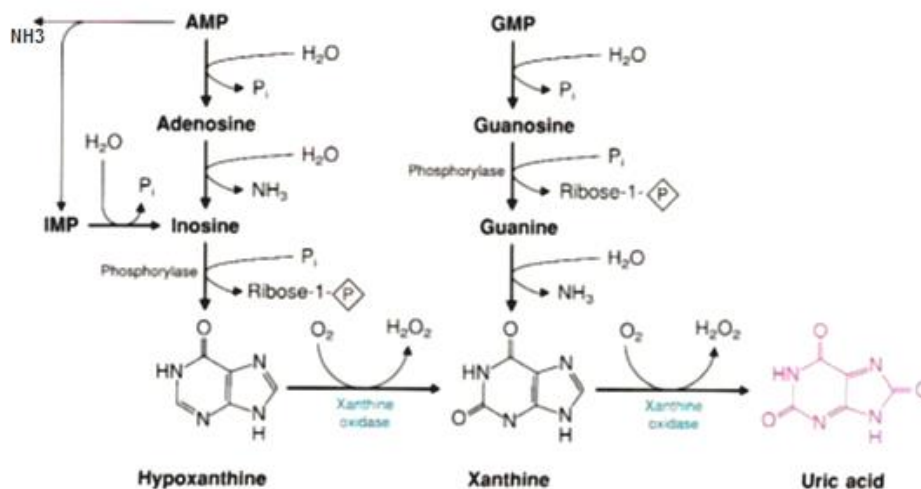
Enzym hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza (Hpt1p) katalyzuje reverzibilní reakci hypoxanthinu a guaninu s PRPP, za které vzniká IMP a fosfát:



Substrátem pro šetřící dráhu syntézy pyrimidinů jsou pyrimidinové báze kromě cytosinu nebo opět příslušné ribonukleosidy, z nichž při spotřebě 1 molekuly ATP dochází k syntéze příslušných nukleotidů. U šetřící dráhy pyrimidinů byly identifikovány geny *FCY1* pro cytosin deaminázu (katalyzující hydrolytickou deaminaci cytosinu na uracil). Konverze cytosinu na uracil má velký význam v šetřící dráze pyrimidinů u *S. cerevisiae* neboť buňkám poskytuje jak energii, tak uracil nutný pro syntézu RNA a aminokyselin (KURTZ *et al.* 1999) Dále byl identifikován gen *FUR1* pro uracil fosforibosyltransferázu katalyzující konverzi uracilu na UMP. Enzym je indukován v přítomnosti uracilu a v jeho přítomnosti je reprimována *de novo* biosyntetická dráha pyrimidinů (KURTZ *et al.* 2002). Pro uridin kinázu byl identifikován gen *URK1*. Tento enzym fosforyluje uridin na UMP a cytidin na CMP (KURTZ *et al.* 1999)

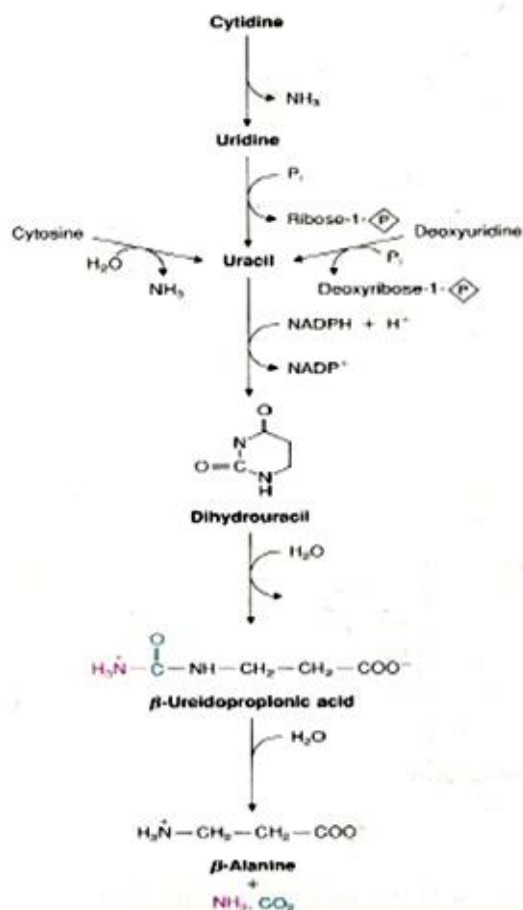
### 2.5.4.8. Degradace nukleotidů a bází nukleových kyselin

Při degradaci některých bází nukleových kyselin dochází k uvolnění amoniaku. Degradace purinů probíhá z adenosinu přes inosin na hypoxanthin za katalýzy xanthin oxidázy nebo přímo z adenosin monofosfátu na inosin monofosfát příslušnými deaminázami. Pro AMP deaminázu, katalyzující vznik IMP z AMP byl u *S. cerevisiae* identifikován gen *AMD1* (*AMD3*). Při těchto reakcích je uvolňován amoniak. Amoniak je také uvolňován během degradace purinů při vzniku xanthinu z guaninu za katalýzy guanin deaminázy (*GUDI*) (SAINT-MARC a DAIGNAN-FORNIER 2004). Xanthin také vzniká z hypoxanthinu za katalýzy xanthin oxidázy. Xanthin je následně xanthin oxidázou hydrolyzován na kyselinu močovou. Při reakci katalyzované xanthin oxidázou dochází ke vzniku peroxidu vodíku (obrázek 9). Dále byl identifikován gen *ADO1* pro adenosin kinázu, nutnou pro utilizaci S-adenosylmethioninu (AdoMet) a účastníci se zřejmě recyklace adenosinu vznikajícího v methylovém cyklu (LECOQ et al. 2001) a také gen pro adenosin kinázu *AAH1*, katalyzující vznik inosinu z adenosinu (GUETSOVA et al. 1997), (ESCUSA et al. 2006).



Obr. 9: Degradace purinů. Upraveno podle MATHEWS a HOLDE (1996).

Při degradaci pyrimidinů jsou konečnými produkty degradace NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> a β-alanin, při degradaci thyminu vzniká NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> a β-aminoisobutyřát. Jde o nízkomolekulární látky dobře rozpustné ve vodě (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). Během degradace pyrimidinů také dochází k uvolnění amoniaku, a to při vzniku uracilu z cytosinu za katalýzy cytosin deaminázy a při vzniku uridinu z cytidinu za katalýzy cytidin deaminázy (*CDD1*) (obr. 10).



Obr. 10: Degradace pyrimidinů. Upraveno podle MATHEWS a HOLDE (1996).

#### 2.5.4.9. Transport bází nukleových kyselin z extracelulárního prostředí

Pro aktivní transport adeninu, hypoxanthinu, guaninu a cytosinu do buňky jsou využívány nespecifické purin-cytosinové permeázy Fcy2p, Fcy21p a Fcy22p, které mají zřejmě shodnou funkci (WAGNER *et al.* 2001). U genu *FCY22* není s určitostí potvrzeno, že jde o funkční enzym. Některé studie uvádí, že se jedná o gen vzniklý v důsledku duplikace genomu. Tyto permeázy se nacházejí v plazmatické a vakuolární membráně a ke svým substrátům mají vyrovnanou afinitu. Mutantní kmeny s delecí genu *FCY2* jsou viabilní, ale nevykazují obvyklou represi *ADE* genů v přítomnosti adeninu nebo *IMD* genů v přítomnosti guaninu (FERREIRA *et al.* 1997) Transport uracilu je zajištěn specifickou permeázou Fur4p (KURTZ *et al.* 1999). Tato permeáza se nachází v lipidických raftech v plazmatické membráně (MALÍNSKÁ *et al.* 2004). Transport uracilu probíhá jako symport s protony (URBAN-GRIMAL *et al.* 1995) a je tak ovlivněn protonovým gradientem (EDDY a HOPKINS 1998). Transkripce genu *FUR4* je reprimována v přítomnosti uracilu endogenního i exogenního původu. V přítomnosti uracilu dochází k rychlé degradaci nově syntetizovaného proteinu ještě v průběhu sekreční dráhy.



Transport uracilu je takto vysoce regulován zřejmě z důvodu, že vyšší koncentrace uracilu je pro buňky toxická (BLONDEL *et al.* 2004).

#### **2.5.4.10. Využití bází nukleových kyselin a nukleotidů v šetřících drahách**

Studium využití dusíkatých bází pro šetřící dráhy syntézy nukleotidů u *S. cerevisiae* není snadné. Šetřící dráhy, narozdíl od biosyntetických drah *de novo* nejsou esenciální pro růst a enzymy účastníci se šetřících drah mohou mít paralogní enzymy s podobnou funkcí nebo afinitu k více substrátům (např. purin-cytosinová permeáza Fcy2p, Fcy21p, Fcy22p, Tpn1 nebo adenin fosforibosyltransferáza Apt1p, Apt2p) (WAGNER *et al.* 2001). V nové studii metabolomu mutantních kmenů s delecemi byla objasněna fyziologická funkce enzymů účastnících se degradace nukleotidů u *S. cerevisiae*. Bylo zjištěno, že degradace nukleotidů je esenciální pro homeostázu metabolismu a přežití hladovějících buněk kvasinek (XU *et al.* 2013). Nedávno byla publikována také studie uvádějící, že AMP pocházející z degradačních drah se účastní udržování energetického náboje v kvasinkových buňkách. Při hladovění může AMP a další nukleotidy sloužit jako zdroj uhlíku, dusíku a fosforu (WALTHER *et al.* 2010). Studiemi nukleotidového metabolismu bylo prokázáno u savců, že nukleosidy přecházejí do enterocytů převážně difuzí nebo transportem za účasti Na<sup>+</sup>. Následně jsou přijaté nukleosidy katabolizovány a je vyloučen produkt degradace - kyselina močová. Při využití nukleosidů z extracelulárního prostředí dochází tedy k převaze katabolických procesů. Pro střevní patogenní protozoa jsou exogenní purinové báze esenciální.

### **2.5.5. Vybrané geny s významnou funkcí v nukleotidovém metabolismu *S. cerevisiae***

#### **2.5.5.1. Geny účastníci se metabolismu purinů**

##### ***ADE4***

Produkt genu *ADE4* je fosforibosyltransferáza, katalyzující první krok biosyntetické *de novo* dráhy purinů. Exprese tohoto genu je reprimována v přítomnosti konečného produktu dráhy, tj. purinových bází a dereprimována při absenci purinů prostřednictvím transkripčních faktorů Bas1p, Pho2p a Gcn4p (SOM *et al.* 2005). V buňkách procházejících stacionární fází vytváří Ade4p (podobně jako Ade5,7p, Ade12p, Ade17p) granule v cytoplazmě v nepřítomnosti adeninu. V přítomnosti adeninu nebo hypoxanthinu se lokalizace Ade4p v buňce změní na difúzní (NARAYANASWAMY *et al.* 2009). Mutanti s delecí genu *ADE4* se projevují jako auxotrofové pro adenin a vykazují sníženou rezistenci k ethanolu a pomalý růst (YOSHIKAWA *et al.* 2008).

### ***ADE5,7***

Produkt genu *ADE5,7* je aminoimidazol ribotid syntetáza a glycinamid ribotid syntetáza – bifunkční enzym účastnící se biosyntetické dráhy *de novo* purinů. Nachází se v cytoplazmě. Mutanti s delecí genu *ADE5,7* vykazují auxotrofii pro adenin (JONES a FINK 1982) a stejně jako u dalších genů z *ADE* regulonu je exprese *ADE5,7* regulována v závislosti na hladině purinů. Stejně jako další enzymy (Ade4p, Ade17p, Ade12p) vytváří Ade5,7p v buňkách procházejících stacionární fází (tj. u *S. cerevisiae* alkalické fázi vývoje) granule v cytoplazmě, jejichž výskyt se mění v závislosti na hladině adeninu nebo hypoxanthinu (NARAYANASWAMY *et al.* 2009). Tento projev se podobá seskupování HeLa buněk při limitaci puriny (AN *et al.* 2008).

### ***ADK1***

Produkt genu *ADK1* je adenylát kináza (Adk1p) - klíčový enzym uplatňující se v energetickém metabolismu i při syntéze adenylových nukleotidů, katalyzující fosforylaci AMP na ADP v biosyntéze *de novo* purinů. Nedostatek Adk1p silně indukoval expresi genů pro utilizaci fosfátu a pro biosyntézu ATP *de novo*. Katalytická aktivita Adk1p je významná pro správnou regulaci *PHO* a *ADE* genů, tj. pro metabolismus fosfátu a purinů. Mutanty s delecí genu *ADK1* jsou schopny upregulace genu *ADE1* v závislosti na syntéze intermediátu biosyntetické dráhy *de novo* (S)AICAR (viz výše). To naznačuje, že dostupnost adenylových nukleotidů je důležitým signálem, který kvasinky používají ke koordinaci utilizace fosfátu a syntézy purinů (GAUTHIER *et al.* 2008). Aktivita Adk1p je nutná pro správnou proliferaci (KONRAD 1988). Lokalizace Adk1p byla zjištěna současně v cytoplazmě a v intermembránovém prostoru mitochondrií (SCHRICKER *et al.* 2002). Mutanti s delecí genu *ADK1* vykazují zvýšenou akumulaci glykogenu, glycerolu, AMP, IMP, hypoxanthinu a sníženou hladinu ATP a ADP. V exponenciální fázi mají zpomalený růst a celkově sníženou viabilitu. Dále vykazují auxotrofní fenotyp, abnormální morfologii pupenů (prodloužené pupeny) a větší velikost buněk (WANATABE *et al.* 2009), (JORGENSEN *et al.* 2002). Fenotypový projev může být způsoben nižší hladinou ATP v buňkách mutantního kmene. V těchto podmínkách dochází k upregulaci exprese genu *PHO84*, jehož produktem je vysokoafinitní transportér inorganického fosfátu. To dokládá komplexní regulaci metabolismu purinů a fosfátového metabolismu (GAUTHIER *et al.* 2008). Delece genu *ADK1* naruší transkripční regulaci závislou na hladině adeninu (GUETSOVA *et al.* 1997). Gen *ADK1* je v buňkách poměrně silně konstitutivně exprimován. Enzymatická funkce jeho produktu Adk1p není tak zásadní u fermentujících buněk, ale je velmi nutná k utilizaci ATP produkovaného při

respiraci. Tento gen má zřejmě velký význam v oxidativním metabolismu. Jeho exprese může být mimo jiné regulována v závislosti na zdroji uhlíku (OECHSNER *et al.* 1988).

### ***HPT1***

Produkt genu *HPT1* je dimerický enzym, hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza. Katalyzuje přenos PRPP na purinovou bázi (guanin, hypoxanthin) za vzniku pyrofosfátu a purinového nukleotidu (GMP nebo IMP) v šetřící dráze syntézy nukleotidů. Nachází se v cytoplazmě a jádře. U mutantů s delecí genu *HPT1* nemá přítomnost guaninu vliv na regulaci exprese genů pro syntézu GTP, jako je tomu u kontrolního kmene bez delecce genu *HPT1* (ESCOBAR-HENRIQUES a DAIGNAN-FORNIER 2001). Mutanti s delecí *HPT1* a navíc s delecí genu biosyntézy guaninových nukleotidů *de novo* nejsou schopni růstu, pokud není do růstového média přidán guanin (GUETSOVA *et al.* 1997). Fenotyp mutantů s delecí genu *HPT1* se může projevit např. auxotrofií nebo abnormální morfologií vakuol (VILLA-GARCIA *et al.* 2011).

### ***APT1***

Produkt genu *APT1* je adenin fosforibosyltransferáza, která katalyzuje vznik AMP z adeninu a 5'- fosforibosylpyrofosfátu v šetřící dráze purinů. Její lokalizace v buňce je v jádře a v cytoplazmě. Existuje paralogní, avšak zřejmě nefunkční produkt genu *APT2*, který vznikl pravděpodobně v důsledku duplikace genomu. Mutanti s delecí genu *APT1* mohou projevovat auxotrofii a zvýšenou senzitivitu k vyšší teplotě (VILLA-GARCIA *et al.* 2011), (SINHA *et al.* 2008)

### ***FCY22, FCY 21, FCY2***

Produkt genu *FCY22* je protein s údajnou funkcí purin-cytosinové permeázy s lokalizací v plazmatické membráně. Purin-cytosinová permeáza transportuje aktivním transportem (symportem s protony) s vyrovnanou afinitou puriny (adenin, guanin, hypoxanthin) a cytosin. Předpokládaná funkce enzymu Fcy22p je velmi podobná aktivitě enzymu Fcy2p (alias Bra7p) s již prokázanou transportní funkcí. Nebylo dosud prokázáno, že mohou být tyto enzymy vzájemně nahrazeny. Mezi subrodinu purin-cytosinových permeáz patří také produkt genu *FCY21* a *TPN1* – transportér pro pyridoxin. Mutanti s delecí tohoto genu mohou vykazovat sníženou utilizaci zdrojů dusíku (WAGNER *et al.* 2001).

### 2.5.5.2. Geny účastníci se metabolismu pyrimidinů

#### ***URA3***

Produkt genu *URA3* je orotidin 5-fosfát dekarboxyláza (ODCáza), katalyzující dekarboxylaci orotidin 5-fosfátu (OMP) na UMP v *de novo* biosyntetické dráze pyrimidinů (UMEZU *et al.* 1971). Jde o velmi efektivní enzym, fungující jako dimer (MILLER *et al.* 2000), (MILLER a WOLFENDEN 2002) lokalizovaný v cytosolu, který má vysokou schopnost urychlení reakce. Defekt v aktivitě ODCázy vede k poruše růstu bez ohledu na uracil nebo uridin přidané do média. (JONES 1992). Hladovění na uracil nebo zvýšená hladina dihydroorotové kyseliny - intermediátu biosyntetické dráhy *de novo* mohou zvýšit expresi *URA3* prostřednictvím transkripčního faktoru Ppr1p, který se váže na promotorové sekvence genů *URA1*, *URA3* a *URA4* (LACROUTE 1968).

#### ***URK1***

Produktem genu *URK1* je uridin kináza, která se účastní šetřící dráhy syntézy pyrimidinů (fosforyluje uridin a cytidin na UMP a CMP) (KURTZ *et al.* 1999). Účastní se také šetřící dráhy syntézy pyrimidinových deoxyribonukleotidů (fosforyluje deoxycytidin na dCMP). Je fosforylována kterýmkoliv nukleotid trifosfátem s výjimkou UTP a CTP, které zpětně inhibují její aktivitu. Je lokalizována v cytoplazmě a jádře. Účastní se biogenezy ribozomů. Delece genu *URK1* se může projevit sníženou schopností utilizace cytidinu a uridinu (KURTZ *et al.* 2002).

#### ***FUR4***

Produkt genu *FUR4* je uracilová permeáza, zajišťující transport uracilu symportem s protony (KURTZ *et al.* 1999). Je lokalizována v lipidických raftech v plazmatické membráně, obsahujících také Can1p a Sur7p (MALINSKÁ *et al.* 2004). Efektivita transportu je ovlivněna protonovým gradientem (URBAN-GRIMAL *et al.* 1995). Množství Fur4p se v buňce nachází v nízkém množství a je ukazatelem vnitrobuněčné hladiny uracilu a podléhá různým způsobům regulace. V přítomnosti uracilu je exprese Fur4p normálně snížena za účelem předcházení vysoké vnitrobuněčné hladiny nukleotidů odvozených z uracilu, které mohou být pro buňku toxické. Nově syntetizovaný enzym prochází sekreční drahou, ale v nadbytku uracilu může být přímo degradován ve vakuole, aniž by byl dopraven k plazmatické membráně. Obvykle je Fur4p odstraňován z plazmatické membrány fosforylací, následnou ubiquitinací, endocytózou a degradací ve vakuole (BLONDEL *et al.* 2004). Nově byl

podrobněji popsán způsob degradace transportérů živin: a to v reakci na nejrůznější stresové podmínky - např. vyčerpání živin. Podobnou odpověď však vyvolá i zvýšená hladina živin. Deregulace exprese *FUR4* je zřejmě indukována substrátem. Určování specifických míst ubikvitinace při degradaci již syntetizovaného enzymu je založena na konformačně – senzorické doméně, která byla pojmenována LID (loop interaction domain). Tento nově popsáný systém, nazvaný „LID-degron systém“ je zřejmě nezávislý na chaperonech a je možné, že je konzervovaný a funguje pro mnoho transportérů (KEENER a BABST 2013)

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Materiál

##### 3.1.1. Použité mikroorganismy

*Saccharomyces cerevisiae* BY4742, rodičovský kmen, (auxotrofní pro uracil):  
MAT $\alpha$ ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*

*Saccharomyces cerevisiae* BYURA, (prototrofní pro uracil):  
MAT $\alpha$ ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*

*ade5,7 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat  $\alpha$ ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YGL234w::kanMX4)

*ade4 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat a; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YMR300c::kanMX4)

*adk1 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat a; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YDR226w::kanMX4)

*apt1 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat a; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YML022c::kanMX4)

*hpt1 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat a; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YDR399w::kanMX4)

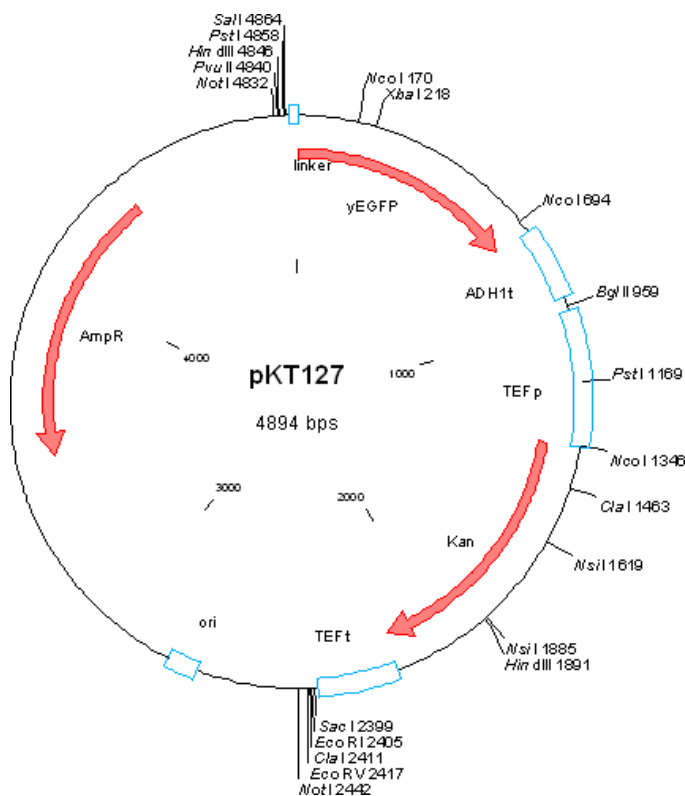
*fcy22 $\Delta$* : *Saccharomyces cerevisiae* BY4742:  
(BY4742; Mat a; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; YER060w-a::kanMX4)

Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 *ade5,7 $\Delta$* , *ade4 $\Delta$* , *adk1 $\Delta$* , *apt1 $\Delta$* , *hpt1 $\Delta$*  a *fcy22 $\Delta$*  pochází ze sbírky kmenů s deletovanými geny Euroscarf ([www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf](http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf)). Ostatní kmeny pochází ze sbírky kmenů Laboratoře biologie kvasinkových kolonií na Katedře genetiky a mikrobiologie Univerzity Karlovy v Praze.

### 3.1.2. Použitý plazmid, primery a materiál pro práci s DNA

#### Použitý plazmid

Plazmid pKT127 obsahuje v určitém úseku gen pro zelený fluorescenční protein Gfp a selekční marker Kan pro antibiotikum kanamycin. Tento úsek byl použit pro přípravu integračních kazet, následně použitých pro transformaci kvasinkových buněk s cílem vytvořit v nich fúzní proteiny s předpokládanou významnou funkcí v metabolismu purinů a pyrimidinů, fluorescenčně značené na C-konci zeleným fluorescenčním proteinem Gfp.



Obr. 11: Mapa plazmidu pKT127

### Použité primery

Pro přípravu integračních kazet, pomocí kterých jsem následně prováděla transformaci kvasinkových buněk jsem navrhla níže uvedené primery. Velkými písmeny je označena sekvence z koncové oblasti příslušného genu (přímý primer, „forward“) a sekvence reverzně komplementární k oblasti těsně za stop kodonem genu (reverzní primer, „reverse“). Malými písmeny jsou označeny přímá sekvence z plazmidu a reverzní sekvence z plazmidu.

Primery pro gen *ADE4* (YMR300C), který se nachází na VIII. chromosomu (867091 až 865559) a kóduje fosforibosyl pyrofosfát amidotransferázu:

Přímý primer:

5'GGCTGAAGTCGATATCGGATTATATAATTGTGCAGATTATggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5'AACTATTTTACATACTGAACAAGTTCGGAACAATCTAtcgatgaattcgagctcgtt3'

Primery pro gen *ADK1* (YDR226W), který se nachází na IV. chromosomu (916486 až 917154) a kóduje adenylát kinázu:

Přímý primer:

5'TACTGTTTGGGCTGACATCTTGAACAAGCTAGGTAAGGATggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5'AAAAAAGAAAAGATATTTAGAAGACATTGCGCAAGGTCAtcgatgaattcgagctcgtt3'

Primery pro gen *URK1* (YNR012W), který se nachází na XIV. chromosomu (647432 až 648937) a kóduje uridin kinázu:

Přímý primer:

5'ATTGACCAGATTTTTGATTCAAAGTATTTGGTTGTGATggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5'ACTATTATTTAATTTACTTTATATTGCCTCTAATTATTCtcgatgaattcgagctcgtt3'



Primery pro gen *FCY2* (alias *BRA7*), (YER056C), který se nachází na V. chromosomu (268113 to 266512) a kóduje permeázu pro puriny a cytosin:

Přímý primer:

5' CAACATCTTAAGACCTTTAGAATTTAAAATACTTCGGTCGTggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5' GAAATGTGCACGGGGAAATGATCGCCCTAATCATTACTTcctgatgaattcgagctcggt3'

Primery pro gen *FCY22*, (YER060W-A), který se nachází na V. chromosomu (276572 až 278164) a kóduje protein s pravděpodobnou funkcí permeázy pro puriny a cytosin, homologní k *Fcy2p*:

Přímý primer:

5' TAACATTGTAAGACCTTTAGAACTCAAATATTTTCGGTCGAggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5' TTTCAATGATTAGCAAAAATATTAATCAATTAACATTTAGtcctgatgaattcgagctcggt3'

Primery pro gen *FUR4* (YBR021W), který se nachází na II. chromosomu (281443 až 283344) a kóduje permeázu pro uracil

Přímý primer:

5' TATTAGTGTCTACGAACACGAACACGAAAAGACTTTCATT ggtgacggtgctggttta3'

Reverzní primer:

5' ATTCAGATTAATGCAGAAAGTGATGTAGATATGGAGAGCtctgatgaattcgagctcggt 3'

Pro ověření úspěšné integrace genu GFP do příslušných fúzovaných genů pomocí PCR jsem připravila pro každý z genů ověřovací primery. Přímý primer (F) vymezuje krátkou sekvenci z příslušného genu. Reverzní primer yEGFP rv, který vymezuje krátkou sekvenci z počáteční oblasti sekvence genu GFP byl poskytnut kolegou RNDr. Vratislavem Šťovíčkem, PhD.

Ověřovací primery pro gen *ADE4*:

F: 5' CCAAGGAATCCGGTGCAACA 3'

yEGFP rv: 5' AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

Ověřovací primery pro gen *ADK1*:

F: 5' CATCTTGGACGGTTTCCCAA 3'

yEGFP rv: 5' AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

Ověřovací primery pro gen *URK1*:

F: 5' CACCTGGTGAGCATACCATG 3'

yEGFP rv: 5'AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

Ověřovací primery pro gen *FCY2*:

F: 5' CAAGAGTAGTCTGGACAATG 3'

yEGFP rv: 5'AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

Ověřovací primery pro gen *FCY22*:

F: 5' CAAGAGTAGTCTGGACAATG 3'

yEGFP rv: 5'AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

Ověřovací primery pro gen *FUR4*:

F: 5' CAGTATTGCCGGTGTGTCT 3'

yEGFP rv: 5'AGCATCACCTTCACCTTCAC 3'

### **Materiál pro práci s DNA**

Standard molekulových hmotnosti pro DNA:

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas)

ssDNA - Salmon sperm (BioLabs)

PPP Master Mix (Top Bio)

PCR H<sub>2</sub>O (Top Bio)

LA polymeráza pufr

DMSO

dNTP

LA polymeráza

1% agaróza (Serva)

TBE pufr 0,5x

Ethidium Bromid 1000x

Polyethylen glykol (PEG)

1M Octan lithný (LiAc)

Vzorková barva pro elektroforézu: Loading dye 6x (MBI Fermentas)

### 3.1.3. Přístroje, internetové databáze a počítačové programy

#### Přístroje:

- Parní sterilizátor - autokláv (FEDEGARI AUTOKLAVEN AG)
- Horkovzdušný sterilizátor – KBC G-100/250 (Premed)
- Termobox LBT 168
- Laminární aseptický UV- box TELSTAR AH-1 (KRD)
- Laminární aseptický box ESCO EQU/04-EHC
- Centrifuga – Hettich Universe 320R s výměnnými rotory zkumavek - max. rychlost 5 500 ot./min (Schoeller)
- Mikrocentrifuga – rotor pro 24 mikrozkušavek, max. rychlost 13 000 ot./min (LabNet International, Inc.)
- PCR cycler BIOER GenePro (KRD)
- Elektroforéza – zdroj (E-C 250-90, E-C Apparatus Corporation)
- Tiskárna Video Graphic Printer SONY 09-895 CE
- Zobrazovací systém Panasonic Video Monitor Wv-BM 990
- Mikrotom Leica VT 1200S
- Světelný mikroskop Leica HC (objektivy 10x, 20x, 45x, imerzní objektiv 100x), (Leica Germany)
- Zdroj fluorescence ebq100 Isolated
- Fluorescenční mikroskop Leica DMR: (objektivy 10x, imerzní objektiv 100x, Nomarského kontrast, filtr BP 340 – 380)
- Digitální monochromatická kamera ProgRes<sup>®</sup> MFCool (JENOPTIK Germany)
- Digitální barevná kamera ProgRes CT3 (JENOPTIK Germany)
- Osvětlovací systém KAISER prolite basic (KFB)
- Fluorescenční lupa Leica MZ16F
- Spektrofotometr Helios Gamma Thermo Spectronic (Thermo Electron Corporation)
- Spektrofotometr WPA Spectrawave (Biochrom)
- UV transiluminátor (Ultra-Lum Electronic Dual Light)<sup>™</sup>
- Sterilní box TELSTAR AH-1
- Vortex Genie 2<sup>™</sup> (Scientific Industries)
- Kamera barevná Hitachi HV-C20, objektiv Navitar

- Kamera monochromatická (Cohu)
- pH metr METTLER TOLEDO Seven Easy (Mettler-Toledo AG, Switzerland)
- Horkovzdušná třepačka Lab-Therm
- Analytické váhy BOECO BBI-32 (Boeco, Germany)
- Laboratorní váhy KERN 440-35N (KERN & Sohn GmbH, Germany)

Internetové databáze a počítačové programy:

- Saccharomyces Genome Database (SGD)  
<http://genome-www.Stanford.edu/Saccharomyces>
- Pubmed Medline  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Yeast Proteome Database  
<http://www.proteome.com>
- KEGG Genome database  
<http://www.genome.jp/kegg/>
- Oligo Calculator pro návrh primerů:  
<http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>
- Software pro analýzu obrazu: NIS Elements (Laboratory Imaging)
- MS Office Word, Excel, Power Point
- IrfanView

### **3.1.4. Roztoky a kultivační média**

Pokud není jinak uvedeno, je složení médií a roztoků uváděno v hmotnostních procentech. Destilovaná voda pro přípravu roztoků a médií byla upravena na přístroji Rowapur (Watrex).

#### **3.1.4.1. Roztoky**

1% agarózový gel s Ethidium Bromidem pro horizontální elektroforézu:

- 0,3g agarózy (Serva) rozvařit v 30 ml TBE pufru 0,5x

- přidat 30 µl EtBr 1000x

Ethidium Bromid 1000x

5mg EtBr (prášek) rozpustit v 1 ml H<sub>2</sub>O (nejlépe v digestoři)

TBE 0,5x

20 mM Tris (Serva)

1 mM EDTA

45 mM kyselina boritá

2M NaOH:

0,4 g NaOH (Penta) do 5ml H<sub>2</sub>O (zásobní roztok)

20 mM NaOH:

100x ředit zásobní roztok 2M NaOH

1M LiAc (octan lithný):

10,2 g CH<sub>3</sub>COOLi (Serva) do 100 ml H<sub>2</sub>O

Polyethylenglykol (PEG) 40%:

40g PEG do 60 ml H<sub>2</sub>O

Bromcresol Purple (bromkresolový purpur, BKP) (Sigma):

10 mg/ 1 ml Ethanolu 96%

(konečná koncentrace 0,1 mg/ml kultivačního média)

indikátor pH: fialová: pH ≥ 6,8, žlutá pH ≤ 5,2

Zásobní roztok uracilu 2 mg/ml:

200 mg Uracilu, č. U-0750-256 (Sigma – Aldrich)

100 ml H<sub>2</sub>O

Zásobní roztok adeninu 2 mg/ml:

253,6 mg Adenin monohydrochloridu, č. 01840-256 (Sigma – Aldrich)

100 ml H<sub>2</sub>O

Zásobní roztok guaninu 2mg/ml:

174 mg Guanin hydrochloridu, č. 51030-506 (Sigma – Aldrich)

100 ml H<sub>2</sub>O

0,174 g Guanin hydrochloridu se rozpustilo v 5 ml 0,5 M HCl do bodu varu a doplnilo do 100 ml demineralizovanou vodou.

Zásobní roztok cytosinu 2 mg/ml:

200 mg Cytosinu, č. C3506-56 (Sigma – Aldrich)

100 ml H<sub>2</sub>O

10% kyselina citrónová:

10g Kyselina citrónová bezvodá, p. a. (Penta)

100 ml H<sub>2</sub>O

1M CaCl<sub>2</sub>:

14,7 g CaCl<sub>2</sub>: do 100 ml H<sub>2</sub>O

5% glukosa:

5g glukózy rozpustit v 100ml H<sub>2</sub>O

Wickerhamův roztok:

0,2 mg biotin

200 mg inositol

20 mg riboflavin

40 mg thiamin

20 mg kyselina p-aminobenzoová

40 mg pantotenát vápenatý

40 mg kyselina nikotinová

0,2 mg kyselina listová

100 ml H<sub>2</sub>O

Transformační mix pro 100  $\mu$ l buněčné suspenze v hustotě  $2 \times 10^7$

PEG (50%) (Sigma)	240 $\mu$ l
LiAc 1M (Sigma)	36 $\mu$ l
Salmon sperm ssDNA (2mg/ml) (Sigma)	50 $\mu$ l
DNA z plazmidu pKT127 v H <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l
Celkem	360 $\mu$ l

**3.1.4.2. Tekutá média**

YEPG:

1% kvasničný autolyzát (Imuna )

1% pepton (Imuna)

2 % glukóza

SKLADOVACÍ MÉDIUM:

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% pepton (Imuna)

10% glukosa (sterilizuje se odděleně)

60% glycerol

### **3.1.4.3. Pevná média**

#### YEPG s Edicinem 20 mg/l:

2% agar (Kulich)

2% glukóza

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

1% pepton (Imuna)

- agar a glukóza se sterilizují společně

- pepton a kvasničný autolyzát se sterilizují společně

- po sterilizaci se po ochlazení na cca 60 °C přidá ve sterilním boxu

k peptonu a kvasničnému autolyzátu antibiotikum Edicin do výsledné koncentrace v médiu 20 mg/l

- všechny složky média se slíjí ve sterilním boxu

#### YEPG s kanamycinem 400 mg/l:

- jako YEPG s Edicinem

- k peptonu a kvasničnému autolyzátu se po sterilizaci a ochlazení na cca 60 °C přidá antibiotikum kanamycin do výsledné koncentrace v médiu 400 mg/l

- všechny složky média se slíjí ve sterilním boxu

#### GLYCEROLOVÉ MÉDIUM (GM):

1% kvasničný autolyzát (Imuna), šarže 41

(před sterilizací upravíme pH na 5, sterilizuje se odděleně)

2% agar (Kulich HK)

3% glycerol (sterilizuje se s agarem)

10 mM CaCl<sub>2</sub> (sterilizuje se odděleně)

0,05% glukóza (sterilizuje se odděleně)

#### GLYCEROLOVÉ MÉDIUM s pH indikátorem Bromcresol Purple

##### (GM s BKP):

- jako GM

- po sterilizaci se ke kvasničnému autolyzátu přidá 0,01% BKP, předem rozpuštěný v 96% EtOH (ve výsledném objemu v médiu 1/100)

- všechny složky média se slíjí a dobře rozmíchají ve sterilním boxu

### GLYCEROLOVÉ MÉDIUM s BKP

a 20 mg/l nebo 80 mg/l dusíkaté báze (adeninu / guaninu / cytosinu / uracilu):

- jako GM

- zásobní roztok 2 mg/ml adeninu/ guaninu/ cytosinu/ uracilu se přidá ke kvasničnému autolyzátu do výsledné koncentrace 20 mg/l nebo 80 mg/l v médiu a sterilizuje se společně s kvasničným autolyzátem

- po sterilizaci se ke kvasničnému autolyzátu přidá 0,01% BKP, rozpuštěný předem v 96% EtOH (ve výsledném objemu v médiu 1/100)

### MINIMÁLNÍ MÉDIUM (MM) pro *S. cerevisiae* BY4742

- všechny složky sterilizujeme zvlášť

2% agar (Kulich HK)

2% glukóza

0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,05% MgSO<sub>4</sub>

20 µg histidinu, lysinu, leucinu na 1 ml média

50 µg uracilu na 1 ml média

0,1% Wickerhamův roztok

(nesterilizuje se, přidává se po sterilizaci všech složek)

### SKLADOVACÍ MÉDIUM:

60% glycerol

10% glukóza

2% pepton (Imuna)

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

### **3.1.5. Ostatní materiál**

PPP Master Mix (Top Bio)

150 mM Tris-HCl (pH 8,8)

40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,02% Tween 20

5 mM MgCl<sub>2</sub>



400 ml Datp, cCTP, dGTP, dTTP  
100 U/ml TaqPurple DNA polymeráza

Směs pro PCR:

PPP mix	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O -	3 $\mu$ l
10 $\mu$ M 5' primer	0,5 $\mu$ l
10 $\mu$ M 3' primer	0,5 $\mu$ l
DNA templát	1,0 $\mu$ l

Antibiotika:

Edicin (vankomycin)

Kanamycin (G418 – geneticin)

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Sterilizace

Pro sterilizaci roztoků, páráték, špiček k mikropipetám a mikrozku mávek (Eppendorf) jsem používala parní sterilizátor – autokláv. Sterilizace probíhala při tlaku 120 kPa a teplotě 127,6 °C po dobu 20 minut. Chemické sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem v horkovzdušném sterilizátoru po dobu 120 minut při teplotě 90 °C. Petriho misky opatřené nádobkami pro jímání amoniaku byly sterilizovány omytím v 96% ethanolu a následně parami Persterilu (30% roztok kyseliny peroctové) v zatavených igelitových sáčcích nejméně po dobu 48 hodin. Různé nástroje (např. skalpel, mikrobiologická klička, mikrobiologická hokejka, pinzeta) byly sterilizovány žíháním nad plamenem kahanu. Laminární box byl sterilizován UV světlem po dobu min. 15 minut a ošetřen postřikem dezinfekčním přípravkem ProCura Spray IN s baktericidním, fungicidním a plně virucidním účinkem s dobou působení minimálně 1 minutu. Termobox pro kultivaci kvasinek byl ošetřen postřikem dezinfekčním přípravkem ProCura Spray IN s dobou působení minimálně 1 minutu.

### **3.2.2. Uchovávání kvasinkových kmenů**

Kvasinkové kmeny byly uchovávány krátkodobě na Petriho miskách na YEPG médiu v lednici při teplotě 4 °C. Dlouhodobé uchovávání kvasinkových kultur bylo prováděno v mikrozkušavkách ve skladovacím médiu v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

### **3.2.3. Kultivační metody**

#### **3.2.3.1. Stanovení optické denzity kultury**

Ke stanovení optické denzity kultury jsem používala spektrofotometr WPA Spectrawave (Biochrom). Optická denzita 0,1 odpovídá množství  $1 \times 10^6$  buněk na 1 ml média. Optickou denzitu kultury jsem stanovila měřením ředěné buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Jako blank jsem používala příslušné médium.

#### **3.2.3.2. Kultivace v tekutém médiu**

Kvasinkové buňky byly kultivovány v tekutých médiích aerobně v Erlenmeyerových baňkách v horkovzdušné třepačce při 28 °C, kdy médium naplnilo 1/3 objemu baňky.

#### **3.2.3.3. Kultivace na pevném médiu**

Kvasinkové kmeny na pevných médiích jsem kultivovala v Petriho miskách v termoboxu při teplotě 28 °C. Kvasinkové kultury jsem nanášela párátky formou nátěru biomasy, mikrobiologickou hokejkou formou výsevu buněčné suspenze nebo mikropipetou formou kapek buněčné suspenze.

#### **3.2.3.4. Výsev pro kontrolu rezistence na kanamycin a výsev mikrokolonií**

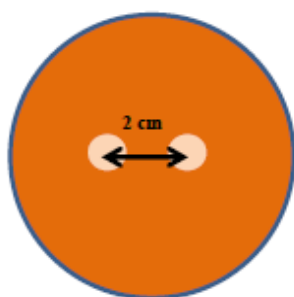
Výsev pro kontrolu rezistence k antibiotiku kanamycinu jsem prováděla po provedené transformaci buněk za účelem primární selekce transformantů rezistentních k antibiotiku kanamycinu. Po transformaci jsem mikrocentrifugací získala peletu, kterou jsem resuspendovala v 0,3 ml sterilní destilované vody. Vzniklou buněčnou suspenzi jsem mikrobiologickou hokejkou rozetřela na Petriho misky s YEPG médiem obsahujícím antibiotikum kanamycin (kap. Pevná média), a to v množství 30  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a všechno zbylé množství. Výsev na mikrokolonie jsem prováděla za účelem získání transformantů

rezistentních k antibiotiku kanamycinu a schopných produkovat proteiny fluorescenčně značené Gfp. Ve sterilních 1,5 ml zkumavkách jsem resuspendovala 5 mg biomasy od každého z transformantů v 1 ml sterilní destilované vody. Poté jsem si připravila desítkovým ředěním ředěná inokula v řadě  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ . Z inokula ředěného  $10^{-3}$  jsem 100  $\mu$ l rozetřela mikrobiologickou hokejkou na pevné YEPG médium s obsahem antibiotika kanamycinu v koncentraci 400 mg/l.

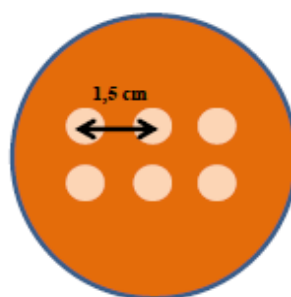
### 3.2.3.5. Očkování obřích kolonií

Očkování obřích kolonií jsem prováděla za účelem sledování jejich morfologie a alkalizace média v důsledku produkce amoniaku (dvojice i šestice kolonií), sledování produkce amoniaku (dvojice kolonií) a mikroskopické dokumentace diferenciac buněk uvnitř kolonií (šesticí kolonií). Nejprve jsem hlubokozmrazenou kulturu nanesla nátěrem sterilním párátkem na YEPG médium obsahujícím antibiotikum edicin (kap. Pevná média). Po 24 hodinách inkubace při 28 °C jsem pomocí sterilního párátko v závislosti na množství potřebného inokula odebrala dostatečné množství biomasy do sterilní kónické polypropylenové zkumavky o objemu 15 ml nebo 50 ml. Tuto odebranou biomasu jsem následně ředila do koncentrace 12 mg biomasy na 1 ml sterilní destilované vody. Vzniklé inokulum jsem nanášela mikropipetou kapkami o objemu 10  $\mu$ l na označená místa uprostřed Petriho misek, tj. pro dvojice kolonií ve vzdálenosti 2 cm od sebe a pro šestice kolonií ve vzdálenosti 1,5 cm od sebe - obrázek 12.

a)



b)



**Obr. 12: Očkování obřích kolonií.**

- a) ve dvojicích pro sledování alkalizace a produkce amoniaku
- b) v šesticích pro sledování morfologie a diferenciac buněk.

### 3.2.4. Práce s DNA

#### 3.2.4.1. Příprava integračních kazet pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Pro integraci genu GFP do příslušného genu kvasinkových buněk jsem připravila integrační kazety pomocí amplifikace příslušného úseku DNA z plazmidu pKT127, který nesl sekvenci genu GFP a dále gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycinu (jako selekční marker). Do tenkostěnných PCR mikrokumavek jsem připravila pro každý z genů celkem 50  $\mu$ l reakční směsi:

PCR voda	37 $\mu$ l
Pufř pro LA polymerázu	5 $\mu$ l
DMSO	1 $\mu$ l
směs dNTP	2,5 $\mu$ l
Primer F (přímý)	1,5 $\mu$ l (ředěný 10x na koncentraci 100pmol/ $\mu$ l)
Primer R (reverzní)	1,5 $\mu$ l (ředěný 10x na koncentraci 100pmol/ $\mu$ l)
DNA z plazmidu pKT127	1 $\mu$ l
LA polymeráza	0,5 $\mu$ l

Po krátkém promíchání na vortexu jsem směs krátce centrifugovala, vložila do PCR cyklieru. Amplifikace probíhala v následujícím programu:

#### PCR - LAP

1. 94 °C - 3 min (počáteční denaturace)
2. 94 °C - 30 s (denaturace DNA)
3. 60°C – 45 s (annealing)
4. 68°C - 2 min (extenze)
5. 72 °C - 5 min (konečná elongace)
6. 4 °C (zchlazení)

Fáze cyklu č. 2. – 4. byly opakovány 40x. Přítomnost amplifikovaného úseku (PCR produktu) byla ověřena bezprostředně po ukončení PCR reakce pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu.

### **3.2.4.2. Amplifikace integrovaného úseku DNA v genu polymerázovou řetězovou reakcí PCR pro ověření integrace**

Amplifikaci úseku DNA z plazmidu pomocí PCR jsem prováděla za účelem ověření, zda došlo k integraci integrační kazety nesoucí gen GFP do příslušného genu. Kmeny byly před ověřením kultivované na YEPG médiu s obsahem antibiotika kanamycinu. Odebrala jsem 1  $\mu$ l biomasy (na špičku mikropipety), kterou jsem v označených tenkostěnných PCR mikrozkuvkách resuspendovala v 15  $\mu$ l 20 mM NaOH, promíchala pomocí vortexu a oddělila supernatant krátkou centrifugací při 6000 otáčkách/min. Následně jsem připravila reakční směs v celkovém objemu 10  $\mu$ l, která obsahovala:

PPP mix        5  $\mu$ l  
PCR H<sub>2</sub>O       3  $\mu$ l  
5' primer       0,5  $\mu$ l (ředěný 10x na koncentraci 100pmol/  $\mu$ l)  
3' primer       0,5  $\mu$ l (ředěný 10x na koncentraci 100pmol/  $\mu$ l)  
DNA templát 1  $\mu$ l.

Směs jsem opatrně krátce promíchala na vortexu, krátce centrifugovala a vložila do PCR cyklu. PCR reakce probíhala v následujícím programu:

#### PCR - Actin

1.    94 °C - 5 min            (počáteční denaturace)
2.    94 °C - 45 s            (denaturace DNA)
3.    52 °C – 45 s            (annealing)
4.    72 °C – 1 min            (extenze)
5.    72 °C - 5 min            (konečná elongace)
6.    4 °C                        (zchlazení)

Fáze cyklu č. 2. – 4. byly opakovány 30x. Přítomnost produktu reakce - amplifikovaného úseku byla ověřena bezprostředně po ukončení PCR reakce pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu (PCR produkty byly uchovány krátkodobě při teplotě 4 °C v PCR cyklu ve fázi zchlazení po dokončení amplifikace).

### **3.2.4.3. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu**

Horizontální elektroforézu v agarózovém gelu jsem prováděla za účelem vizualizace amplifikovaného úseku DNA (produktu PCR reakce). Připravila jsem si 1% agarózový roztok (kap. Roztoky), kdy jsem požadované množství agarózy a TBE pufru 0,5x několikrát zahřívala v mikrovlnné troubě až do bodu varu. Poté jsem do roztoku přidala 30 µl EtBr (tisícina objemu roztoku). Po ochlazení na cca 60 °C jsem agarózový roztok vlila do připraveného plexisklového bločku. Hřeben, tvořící jamky v gelu pro nanášení vzorků jsem umístila cca 1 cm od okraje bločku. Po ztuhnutí gelu v bločku jsem bloček přemístila do elektroforetické soupravy a odstranila z gelu hřeben. Poté jsem gel přelila dostatečným množstvím pufru TBE až po rysku elektroforetické vany tak, aby byl agarózový gel pod jeho hladinou. Do jamek v gelu po odstranění hřebenu jsem pipetovala 5 µl vzorku produktů PCR reakce, obarvené Bromfenolovou modří (resp. Loading dye 6x). Do první jamky jsem nanášela 3 µl standard molekulových hmotností. Elektroforetická souprava byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí 5V/cm. Po cca 40 minutách, kdy byla hranice postupu v gelu viditelná cca 1 cm od okraje, byl zdroj napětí odpojen a elektroforetický proces zastaven. Agarózový gel jsem přenesla do UV transiluminátoru, pomocí kterého jsem analyzovala výsledek PCR reakce. Foto gelu pro dokumentaci výsledku PCR reakce jsem vyhotovila pomocí připojeného monitoru a tiskárny.

### **3.2.5. Transformace kvasinkových buněk**

#### **3.2.5.1. Příprava kompetentních buněk**

Kulturu BY4742 jsem zaočkovala pomocí párátka roztěrem na pevné médium YEPG s antibiotikem Edicinem v koncentraci 20 mg/l a kultivovala v termoboxu při 28 °C do druhého dne. Narostlou kulturu jsem zaočkovala do 50 ml tekutého YEPG a kultivovala přes noc při 28 °C aerobně na horkovzdušné třepačce. Další den jsem pomocí spektrofotometru při vlnové délce 600 nm nejprve změřila OD stávající buněčné kultury. OD jsem měřila v kyvetě s optickou dráhou 1 cm a jako blank použila médium YEPG. Následně jsem výpočtem

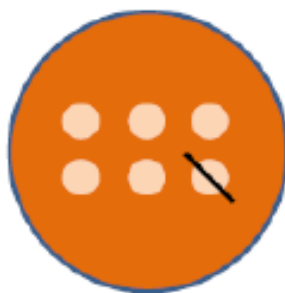
stanovila objem původní buněčné suspenze tak, abych dosáhla nastavení OD v připravované buněčné suspenzi na 0,5. Výpočet:  $OD_1 \times \text{počet ředění} = x$ . Objem suspenze  $1/x$  = objem suspenze 1 nutný pro další očkování. Následně jsem kulturu zaočkova do 50 ml tekutého YEPG média a nastavila OD na 0,5. Tuto suspenzi buněk jsem kultivovala při 28 °C aerobně na horkovzdušné třepačce po dobu 4 hodin (cca 2 generační doby). Po tomto dělení jsem opět změřila OD buněčné suspenze a ředěním nastavila OD na 2. Tuto suspenzi jsem dále centrifugovala (22 °C, 5 min., 4000 rpm). Peletu jsem poté resuspendovala ve sterilní 2ml zkumavce v 1,5 ml sterilní destilované vody a centrifugovala (laboratorní teplota, 2 min., 6000 rpm). Po odstranění supernatantu jsem peletu resuspendovala v 0,6 ml sterilní destilované vody, aby výsledný počet buněk byl  $2 \times 10^7$ . Takto připravenou buněčnou suspenzi jsem rozdělila po 100 µl do šesti 1,5 ml sterilních transformačních zkumavek a krátce centrifugovala (laboratorní teplota, 30 s, 6000 rpm).

### **3.2.5.2. Transformace kvasinkových buněk**

Nejprve jsem připravila zásobní roztok nosičové jednovláknové DNA v koncentraci 2 mg/ml (salmonsperm DNA, Sigma). Jednovláknová DNA byla denaturována varem po dobu 5 min. a poté byl zásobní roztok uložen do ledové lázně (0 °C). Následně jsem připravila transformační směs v množství 2,3 ml pro 6 vzorků, která obsahovala vždy na 1 vzorek: 50 µl jednovláknové nosičové DNA, 34 µl plazmidové DNA, 36 µl LiAc (1 M) a 240 µl PEG. 360 µl této transformační směsi jsem pipetovala do připravených transformačních zkumavek se 100 µl kompetentních buněk a vše jsem dobře promíchala špičkou. Směs jsem poté inkubovala po dobu 40 min. v termobloku při 42 °C. Poté jsem směs centrifugovala (laboratorní teplota, 30s, 6000 rpm), odstranila supernatant a pelet resuspendovala v 1 ml sterilního tekutého YEPG. Transformovanou buněčnou suspenzi jsem inkubovala v tekutém YEPG po dobu 2 hod. při 28 °C, aby byl exprimován gen pro kanamycinovou rezistenci, který byl použit při transformaci jako selekční marker. Po této inkubaci jsem transformovanou směs krátce centrifugovala (laboratorní teplota, 30s, 6000 rpm), odebrala supernatant a pelet resuspendovala v 300 µl sterilní destilované vody. Takto připravenou transformovanou buněčnou směs jsem vysela na selekční médium YEPG s antibiotikem kanamycinem v koncentraci 400 mg/l, vždy v množství 30 µl, 100 µl a celý zbytek.

### 3.2.6. Příprava tenkých řezů koloniemi

Pro přípravu tenkých řezů jsem vybrala vždy okrajovou kolonii ze šestice. Kolonii jsem nejprve pomocí skalpelu vyřízla i s přesahem okolního agarového média a přenesla do plastové vaničky (použila jsem plastové krabičky pro krycí sklička). Přenesenou kolonii jsem zalila roztokem 3% agarózy o teplotě cca 60°C. Takto připravené vzorky tuhly při laboratorní teplotě 15 min. a poté byly přeneseny do lednice, kde byly krátce skladovány při 4 °C. Po 15 min. tuhnutí jsem pomocí speciální žiletky vzorek úhlopříčně překrojila tak, aby řez probíhal středem kolonie. Ze vzorku jsem ořezáním připravila agarózový bloček, který jsem pomocí vteřinového lepidla připevnila na magnetický nosič a umístila do vany, kde byl vzorek zalit destilovanou vodou. Vzorky byly poté krájeny pomocí mikrotomu při rychlosti 20 na řezy o tloušťce 20 µm.



Obr. 13: Příprava tenkých řezů koloniemi – schéma řezu kolonií.

### 3.2.7. Fotodokumentace kolonií a mikroskopická dokumentace buněk

K fotografování celých misek s koloniemi byl použit osvětlovací systém KAISER prolite basic s horním i dolním osvitem, barevná kamera ProgRes CT3 a software NIS Elements (Laboratory Imaging). Tenké řezy celých kolonií byly pozorovány ve světelném mikroskopu pomocí objektivu 2,5x. Buňky v koloniích byly pozorovány v nativních preparátech pomocí fluorescenčního mikroskopu LEICA DMR pod imerzním objektivem 100x s filtry pro fluorescenci Gfp (excitace - modrá/ emise – zelená) a v Nomarského kontrastu v nativních preparátech a tenkých agarózových řezech. Mikroskopické preparáty byly fotografovány pomocí digitální monochromatické kamery ProgRes® MFCool a za použití softwaru NIS Elements (Laboratory Imaging).



### **3.2.8. Stanovení amoniaku produkovaného obřími koloniemi**

#### **3.2.8.1. Kalibrace a odběr vzorků**

Před vlastním měřením vzorků jsem si nejprve zhotovila kalibrační přímku, abych mohla k později zjištěným hodnotám absorbance vzorků přiřadit pomocí přepočteního faktoru hodnoty koncentrace amoniaku (resp. dusíku) ve vzorku. Kalibrační přímka byla připravena pomocí standardního kalibračního roztoku síranu amonného, obsahujícího  $1\ \mu\text{g N}/\ \mu\text{l}$ . Pro přípravu standardního kalibračního roztoku jsem síran amonný nejprve vysušila v horkovzdušném sterilizátoru po dobu 1 hod. při  $100\ ^\circ\text{C}$ . Poté jsem provedla přesnou navážku pomocí analytických vah ( $4,717\ \text{g}$  síranu amonného do  $1000\ \text{ml}$  vody). Standardní roztok síranu amonného byl poté ředěn  $10\times$  s  $10\%$  kyselinou citronovou do koncentrace dusíku  $c = 0,1\ \mu\text{g N}/\mu\text{l}$ . Pomocí tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada roztoků s výslednou stoupající koncentrací amoniaku (resp. dusíku) v rozmezí  $0,2 - 3,0\ \mu\text{g N}/\ \text{ml}$ .

Reakční směs jsem inkubovala po dobu  $20\ \text{min.}$  při laboratorní teplotě a poté měřila absorbanci jednotlivých vzorků při vlnové délce  $430\ \text{nm}$ . Následně jsem pomocí programu Microsoft Excel pro získané hodnoty absorbance získala přepočtení hodnotu koncentrace N v  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pro stanovení amoniaku produkovaného obřími koloniemi jsem používala vždy dvojice kolonií rostoucí ve vzdálenosti  $2\ \text{cm}$ . Na víčko Petriho misky jsem připevnila nádobky o průměru  $1,5\ \text{cm}$ , do kterých jsem sterilně pipetovala  $500\ \mu\text{l}$   $10\%$  kyseliny citronové. Rostoucí kolonie jsem umístila přímo nad připravené nádobky tak, aby produkovaný amoniak mohl být jímán do roztoku  $10\%$  kyseliny citronové a obří kolonie kultivovala při  $28^\circ\text{C}$ . Jímáný amoniak reaguje s roztokem  $10\%$  kyseliny citronové za vzniku citrátu amonného, který vstupuje do reakce s Nesslerovým činidlem (viz dále). Pro každý odběr vzorků jsem používala novou Petriho misku s obřími koloniemi. Vždy jsem zaznamenala čas nasazení nového vzorku a čas odběru vzorku tak, abych zjistila přesný časový interval produkce amoniaku.

#### **3.2.8.2. Stanovení amoniaku**

Kvantitativní stanovení amoniaku je založeno na reakci amoniaku s komplexním  $\text{K}_2(\text{HgI}_4)$  (tetrajodidortuřnatan draselný), kdy v důsledku této reakce dochází ke vzniku žlutého až červenohnědého zbarvení, způsobeného sloučeninou  $(\text{OHg}_2\text{NH}_2)\text{I}$  (tzv. Millonova báze, oxidimer kuriamin jodid), které umožňuje kolorimetrické stanovení obsahu amoniaku. Pro fotometrické stanovení obsahu amoniaku ve vzorcích jsem připravila reakční směs obsahující  $100\ \mu\text{l}$  vzorku (tj. odebrané  $10\%$  kyseliny citrónové s jímáným amoniakem),  $900\ \mu\text{l}$  destilované vody a  $1000\ \mu\text{l}$  Nesslerova činidla. Reakční směs jsem inkubovala po dobu

20 minut při laboratorní teplotě a poté měřila absorbanci vzorků při vlnové délce 430 nm v kyvetě s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru Helios Gamma. Jako blank jsem použila 10% kyselinu citronovou. Ze získaných hodnot absorbance jsem za použití přepočetniho faktoru zjištěného při kalibraci získala přepočetni hodnotu koncentrace N v  $\mu\text{g/ml}$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Vytvoření kmenů *S. cerevisiae* produkujících proteiny fluorescenčně značené Gfp

Cílem těchto experimentů bylo vytvořit kmeny *S. cerevisiae*, které budou produkovat fluorescenčně značené proteiny s předpokládanou významnou funkcí v nukleotidovém metabolismu; dokumentovat lokalizaci značených proteinů v transformovaných buňkách a ověřit, že transformace nenarušila fyziologické funkce buněk z hlediska růstu, morfologie a alkalizace média u obřích kolonií. Vytvořené a ověřené kmeny budou poté sloužit k dalšímu sledování exprese značených genů v průběhu vývoje kolonií v rámci výzkumné skupiny.

Nejprve jsem kultivovala obří kolonie kmenů s delecemi genů účastnících se nukleotidového metabolismu (*ADE4*, *ADK1*, *APT1*, *HPT1*, *FCY22*, *FUI1*, *FUR4*, *URK1*) na pevném glycerolovém médiu s pH indikátorem (kap. 3.1.4.3.), abych zjistila případné rozdíly v alkalizaci média a v morfologii těchto kmenů oproti rodičovskému kmeni BY4742 a bylo možné vybrat kmeny s delecemi těch genů, jejichž delece se při vývoji obřích kolonií fenotypicky projeví. Na základě tohoto úvodního pokusu byly vybrány geny, jejichž delece se projevila změnou fenotypu nebo alkalizace média oproti rodičovskému kmeni BY4742: gen *ADE4* pro fosforibosyltransferázu, gen *ADK1* kódující adenylát kinázu, gen *URK1* kódující uridin kinázu, gen *FCY2* kódující permeázu pro puriny a cytosin, gen *FCY22* homologní k *FCY2* kódující protein s předpokládanou funkcí purin-cytosinové permeázy a gen *FUR4* kódující specifickou permeázu pro uracil. Podrobnější popis těchto genů a jejich produktů je uveden v kapitolách 2.5.5. Tyto geny jsem přímo v genomu fúzovala s genem pro zelený fluorescenční protein Gfp, aby bylo možné sledovat produkci jimi kódovaných proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie. Při připojování sekvence GFP k příslušným genům jsem postupovala podle publikací SHEFF a THORN (2004), a JANKE *et al.* (2004), které popisují značení genů pomocí optimalizovaných integračních kazet, které jsou připojeny k genům tak, aby výsledný produkovaný protein byl označen fluorescenčním proteinem na C - konci. SHEFF a THORN (2004) vyvinuli speciální plazmidy s různými variantami genu GFP optimalizovanými pro kvasinky a různými selekčními markery, pomocí kterých lze připravit integrační kazety pro transformaci kvasinkových buněk. Tyto kazety se během transformační reakce pomocí homologní rekombinace připojují k příslušnému genu. Výsledný fúzovaný gen, obsahující genovou sekvenci kódující Gfp a také požadovaný selekční marker

je následně exprimován ze svého přirozeného promotoru. Proteiny značené Gfp lze pak velmi dobře sledovat v živých buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

#### 4.1.1. Příprava integračních kazet pro fluorescenční značení proteinů Gfp

Pro značení výše uvedených genů jsem použila plazmid pKT127, obsahující gen pro GFP a jako selekční marker gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycinu. Pro přípravu integračních kazet je nutná dvojice primerů: přímý primer (F2), obsahující sekvenci o 40 nukleotidech, pocházející z příslušného genu a sekvenci F5 pro část yEGFP genu z plazmidu pKT127 a reverzní primer (R1), obsahující 40 reverzně komplementárních nukleotidů k sekvenci za stop kodonem příslušného genu a sekvenci R3 pro část genu Kan rezistence z plazmidu pKT127 (R3) (obr. 14). Sekvence F5 a R3, pocházející z plazmidu pKT127 byly převzaty z publikace SHEFF a THORN (2004).



Obr. 14: Schéma integračních kazet pro značení proteinů. Modifikováno dle SHEFF a THORN (2004).

F2 je přímý primer, následovaný yEGFP - genovou sekvencí, T<sub>ADHI</sub> je terminátor pro *S. cerevisiae*, následovaný sekvencí kódující rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu, zvolenou jako selekční marker spolu se sekvencí pro část genu Kan rezistence z plazmidu pKT127, následovanou reverzním primerem R1.

Sekvence použité k amplifikaci těchto integračních kazet jsou:

5' - (sekvence z genu) - GGTGACGGTGCTGGTTTA-3' (F5)

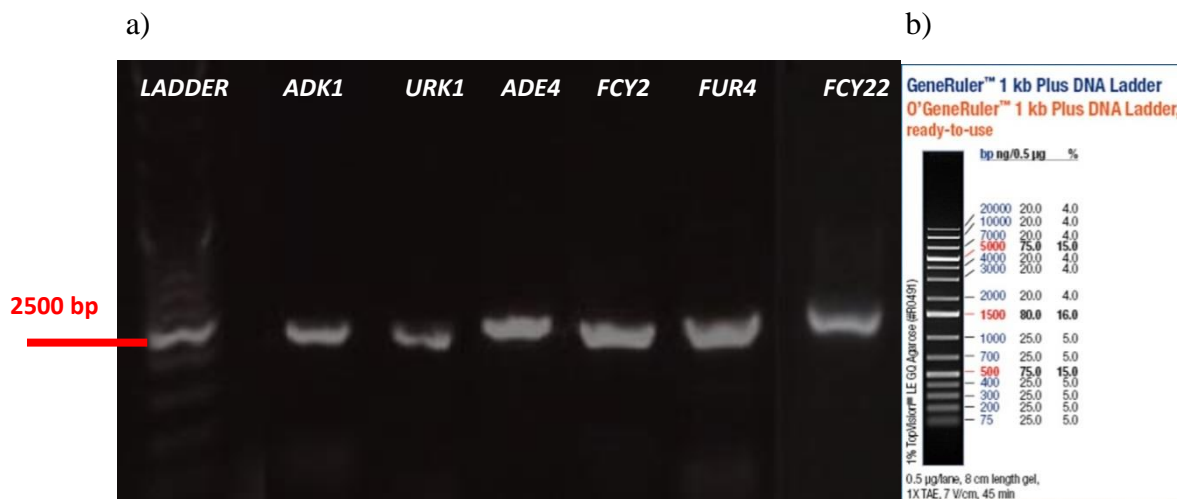
a 5' - (sekvence z genu) – TCGATGAATTTCGAGCTCG – 3' (R3)

Primery F2 a R1 pro příslušné geny jsem navrhovala pomocí Oligo Calculator

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

U integrační kazety pro gen *FCY22* bylo nutné PCR reakci optimalizovat - resp. vybrat vhodný enzym a teplotu nasedání primerů. Při použití enzymu LA polymerázy byl výsledek negativní při teplotě nasedání primerů 65 °C i při gradientu teplot 57, 60 a 63 °C. PCR produkt byl nakonec získán za použití PPP polymerázy v teplotním gradientu 57, 60 a 63 °C. Při přípravě integrační kazety pro gen *URKI* byla amplifikace modifikována z hlediska rychlosti extenze a z hlediska teploty a doby nasedání primerů. PCR reakce proběhla úspěšně

za použití enzymu LA polymerázy v objemu vzorku 50  $\mu$ l v programu LAP při teplotě 60°C po dobu 45 s pro fázi nasedání primerů a při teplotě 68 °C po dobu 2 min pro fázi extenze. Výsledek PCR reakce jsem ověřila pomocí horizontální elektroforézy. Na obrázku č. xx uvádím reprezentativní foto gelu po ověření PCR reakce pomocí horizontální elektroforézy.



**Obr.15.: a) Fotografie agarózového gelu pro ověření výsledku PCR reakce.**

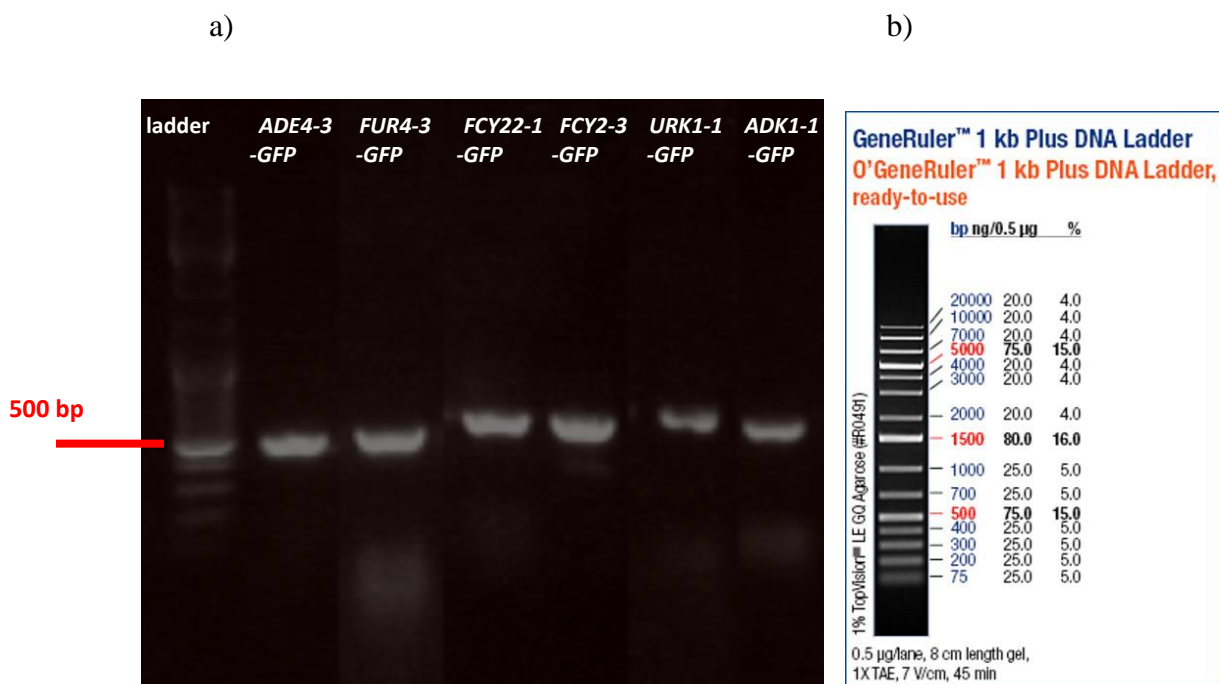
Jednotlivé produkty PCR reakce jsou označeny názvy genů, pro jejichž značení byly připravovány integrační kazety. b) Standard molekulových hmotností „DNA ladder“ s fragmenty se známými molekulovými hmotnostmi.

#### 4.1.2. Příprava kmenů produkujících proteiny značené Gfp

Připravené inzerční kazety jsem použila k transformaci kmene *S. cerevisiae* BY4742 s cílem připravit kmeny s požadovanými geny značenými GFP, rezistentní k antibiotiku kanamycinu, které budou produkovat proteiny značené Gfp. Buňky tohoto kmene jsem transformovala metodou LiAc – ssDNA - PEG popsanou v kapitole 3.2.5.

Po transformaci jsem transformační směs vysévala na plotny s médiem YEPG s kanamycinem v koncentraci 400 mg/l pro selekci transformantů rezistentních k tomuto antibiotiku. Po této selekci jsem získala více rezistentních klonů transformantů (pro gen *ADK1*-GFP 4 klony, pro gen *ADE4*-GFP 8 klonů, pro gen *URK1*-GFP 2 klony, pro gen *FCY2*-GFP 3 klony, pro gen *FCY22*-GFP 1 klon, pro gen *FUR4*-GFP 4 klony), které jsem dále kultivovala na plotnách s médiem YEPG. V průběhu kultivace jsem sledovala expresi genů značených GFP v buňkách pomocí fluorescenčního mikroskopu. U všech klonů transformantů jsem zjistila, že jde o směs buněk rezistentních ke kanamycinu schopných produkovat proteiny značené Gfp. Vybrala jsem proto klony transformantů,

u kterých jsem pozorovala nejsilnější fluorescenční signál (klony jsou pracovně označeny jako *ADE4-3-GFP*, *ADE4-6-GFP*, *ADK1-1-GFP*, *ADK1-2-GFP*, *URK1-1-GFP*, *FCY2-1-GFP*, *FCY2-3-GFP*, *FUR4-3-GFP*, *FUR4-4-GFP*, *FUR4-7-GFP*, *FUR4-8-GFP*). Tyto vybrané klony transformantů jsem přečistila, abych získala pouze transformanty rezistentní ke kanamycinu a produkující proteiny značené GFP. Pro „čistění“ jsem použila metodu výsevu na mikrokolonie (kap. 4.2.3.4.), pomocí které jsem měla možnost získat čisté izoláty buněk vzniklých z jedné mateřské buňky. V průběhu kultivace jsem opět sledovala produkci proteinů značených Gfp pomocí fluorescenčního mikroskopu a v mikrokoloniích pomocí fluorescenční lupy. Pro spolehlivé potvrzení, že došlo k integraci kazety nesoucí gen pro GFP do příslušných genů jsem použila metodu ověřovací PCR („colony PCR“), jak popsáno v kapitole 4.2.4.2. Pro každý z genů byly připraveny ověřovací primery (kap. 4.1.2.). Příímý primer (F) vymezoval krátkou sekvenci (20 nukleotidů) z příslušného genu. Reverzní primer yEGFP rv, který vymezuje krátkou (20 nukleotidů) sekvenci z počáteční oblasti sekvence genu GFP byl poskytnut kolegou RNDr. Vratislavem Šťovíčkem, PhD. Jako templát sloužila chromozomální DNA. Výsledek PCR reakce jsem ověřovala pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarózovém gelu (obr. 16). U všech transformantů se podařilo prokázat přítomnost PCR produktů, což spolehlivě potvrdilo, že příslušné geny jsou fúzovány s genem pro GFP. PCR reakci jsem prováděla u více klonů transformantů selektovaných na kanamycinovou rezistenci a s viditelnou fluorescencí. Při sledování transformantů v průběhu kultivace pomocí fluorescenčního mikroskopu se však nepodařilo prokázat fluorescenci u transformovaných klonů kmene *FCY22-GFP* a slabý fluorescenční signál byl zjištěn pouze u 1 klonu *URK1-1-GFP*. Úspěšná transformace byla tedy prokázána pomocí selekce na kanamycinovou rezistenci, ověřovací „colony“ PCR a pomocí fluorescenční mikroskopie u těchto klonů transformantů: *ADE4-3-GFP*, *ADE4-6-GFP*, *ADK1-1-GFP*, *ADK1-2-GFP*, *URK1-1-GFP*, *FCY2-1-GFP*, *FCY2-3-GFP*, *FUR4-3-GFP*, *FUR4-4-GFP*, *FUR4-7-GFP*, *FUR4-8-GFP*. Na obrázku č. 16 uvádím reprezentativní obrázek gelu po ověření PCR reakce pomocí horizontální elektroforézy, na kterém jsou jednotlivé PCR produkty označeny názvem značeného genu.



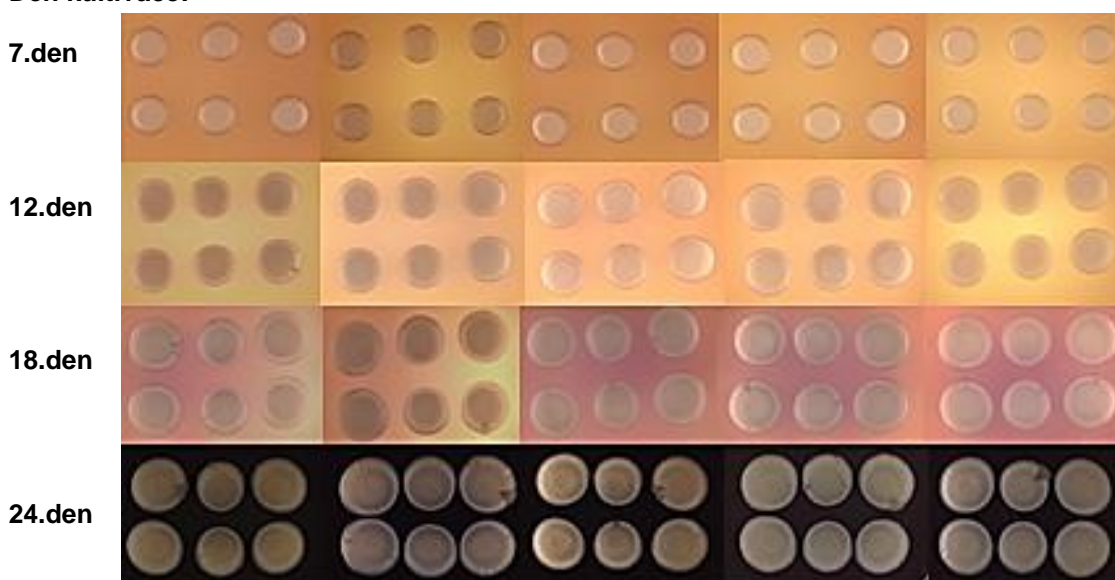
**Obr. 16.:** a) Foto agarózového gelu po ověření výsledku ověřovací „colony PCR“ reakce pomocí horizontální elektroforézy. Jednotlivé produkty PCR reakce jsou označeny částečným názvem klonu, jehož chromozomální DNA bylo použita v reakci jako templát, a jehož název obsahuje i název příslušného značeného genu. V prvním sloupci je nanesen standardní vzorek se známými molekulovými hmotnostmi. b) Standard molekulových hmotností „DNA ladder“ s fragmenty se známými molekulovými hmotnostmi, který byl použit jako srovnávací vzorek.

Po potvrzení úspěšné integrace genu pro GFP bylo nutné také ověřit, zda transformací nebyly narušeny fyziologické funkce buněk. Kultivovala jsem proto po dobu 26 dní šestice obřích kolonií transformovaných kmenů *ADE4-GFP*, *ADK1-GFP*, *FCY2-GFP* a *FUR4-GFP* na GM médiu s pH indikátorem a sledovala, zda se projeví změny v morfologii, růstu a vývoji obřích kolonií či rozdíly v alkalizaci média obřimi koloniemi oproti rodičovskému kmeni BY4742 (obr. 17). U některých klonů kmenů s geny značenými GFP (*ADE4-3-GFP*, *ADK1-1-GFP*, *FCY2-3-GFP* a *FUR4-4-GFP*) se neprojevila změna v růstu (obří kolonie měly během kultivace shodnou velikost), v morfologii (obří kolonie měly během kultivace krémovou barvu, hladkou morfologii, tvořily minimum sektorů a neobjevovaly se u nich papily) a alkalizaci média (obří kolonie alkalizovaly médium se shodným časovým vývojem a intenzitou) ve srovnání s rodičovským kmenem BY4742. U rodičovského kmene BY4742 byla alkalizace média patrná 10. den kultivace, stejně jako u výše uvedených klonů kmenů s proteiny značenými Gfp. Rodičovský kmen BY4742 se nacházel ve fázi plné alkalizace 18. den kultivace, stejně jako kolonie výše uvedených klonů

kmenů s proteiny značenými Gfp. Morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 a výše uvedených klonů kmenů s proteiny značenými Gfp se nelišila ani v pozdější fázi kultivace (jako reprezentativní den pozdější fáze uvádím 24. den kultivace). Na základě těchto výsledků jsem vybrala ty klony transformovaných kmenů, u kterých se neprojevíly změny v růstu, morfologii a vývoji obřích kolonií ani v alkalizaci média, tj. klony *ADE4-3-GFP*, *ADK1-1-GFP*, *FCY2-3-GFP* a *FUR4-4-GFP*. Tímto způsobem se mi podařilo vybrat klony transformovaných kmenů, které spolehlivě produkují fluorescenčně značené proteiny a jejich fyziologické funkce, morfologie, růst a vývoj nejsou transformací narušeny.

**Kmen:      BY4742      *ADE4-3-GFP*      *ADK1-1-GFP*      *FCY2-3-GFP*      *FUR4-4-GFP***

**Den kultivace:**



**Obr. 17: Ověření fyziologických vlastností transformovaných kmenů** (vývoje, růstu a morfologie kolonií a alkalizace média).

#### **4.1.3. Ověření exprese genů fúzovaných s genem pro Gfp a lokalizace jejich produktů**

Při hodnocení transformovaných kmenů jsem pomocí fluorescenční mikroskopie dokumentovala produkci příslušných proteinů značených Gfp, abych zjistila, zda tyto fúzní proteiny mají lokalizaci uváděnou v literatuře (kap. 2.5.5). Jak již bylo dříve zmíněno, u některých proteinů je jejich lokalizace ovlivněna kultivačními podmínkami a intracelulární hladinou nukleotidů, resp. dusíkatých bází nebo jejich koncentrací v extracelulárním prostředí. Protein Ade4p se může v přítomnosti adeninu nebo hypoxanthinu nacházet v cytoplazmě



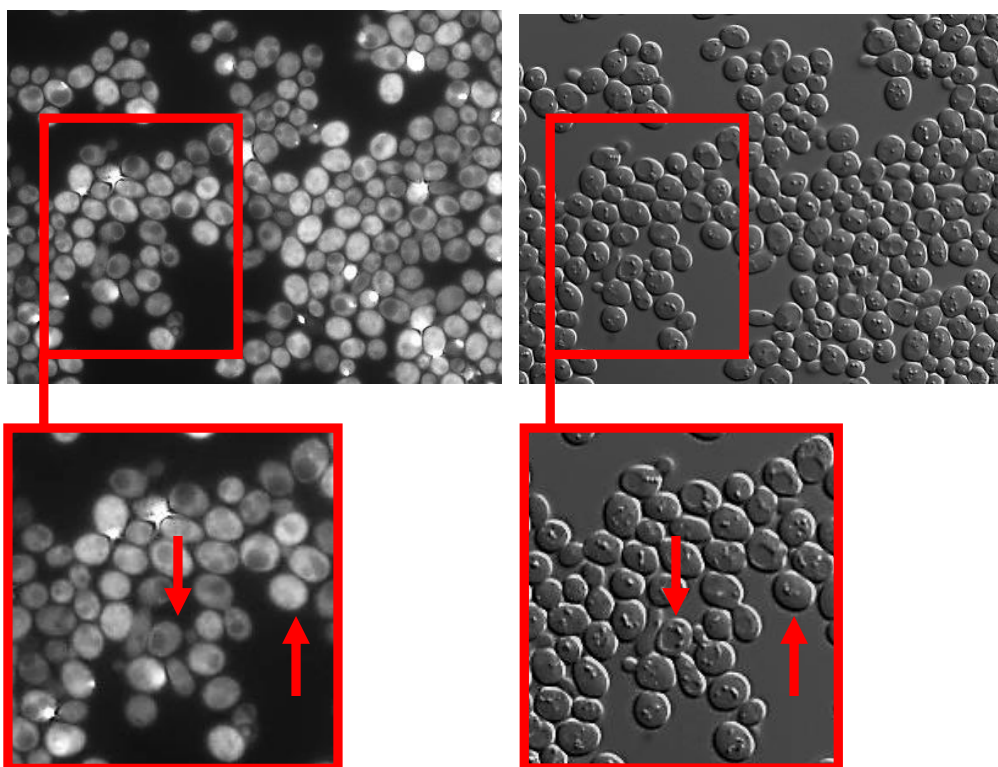
difúzně nebo v případě snížené hladiny adeninu může tvořit cytoplazmatická granula (NARAYANASWAMY *et al.* 2009). Permeázy, nacházející se v plazmatické membráně (Fur4p, Fcy2p) se v buňkách vyskytují v nízkých hladinách a jejich exprese je přísně regulována na základě extracelulární a intracelulární koncentrace jejich substrátů a zdrojů živin. Pro vizualizaci lokalizace fluorescenčně značených proteinů bylo proto nutné optimalizovat podmínky kultivace. Pro kultivaci jsem používala minimální médium nebo YEPG médium (kap. 3.1.4.3.) s různými modifikacemi, které uvádím v legendě k obrázkům. Vzhledem k tomu, že vysoká hladina nukleotidů může expresi genů účastnících se nukleotidového metabolismu snižovat, používala jsem u minimálního média sníženou koncentraci uracilu 20 mg/l nebo minimální médium bez uracilu. Optimalizovala jsem také dobu kultivace a při kultivaci jsem fluorescenční signál průběžně sledovala, abych zachytila lokalizaci fluorescenčně značených proteinů v těch buněčných kompartmentech, které jsou uváděny v literatuře.

#### **4.1.3.1. Lokalizace proteinu Ade4p-Gfp**

Difúzní lokalizaci proteinu Ade4p-Gfp v cytoplazmě se mi podařilo u klonu *ADE4-3-GFP* prokázat při kultivaci 24 hod při 28°C na YEPG médiu (obr. 18). Současnou lokalizaci difúzně v cytosolu a v cytoplazmatických granulích jsem prokázala po delší kultivaci (72 hodin) na YEPG médiu a na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l taktéž po 72 hodinách kultivace při 28°C (obr. 19). U buněk s morfologií typu A (menší, oválné, s velkou vakuolou) byla zjištěna mírně slabší síla fluorescenčního signálu než u buněk s morfologií typu B (kulaté, s malými vakuolami), a to na obou typech média při různých dobách kultivace.

## Ade4p-Gfp

1.

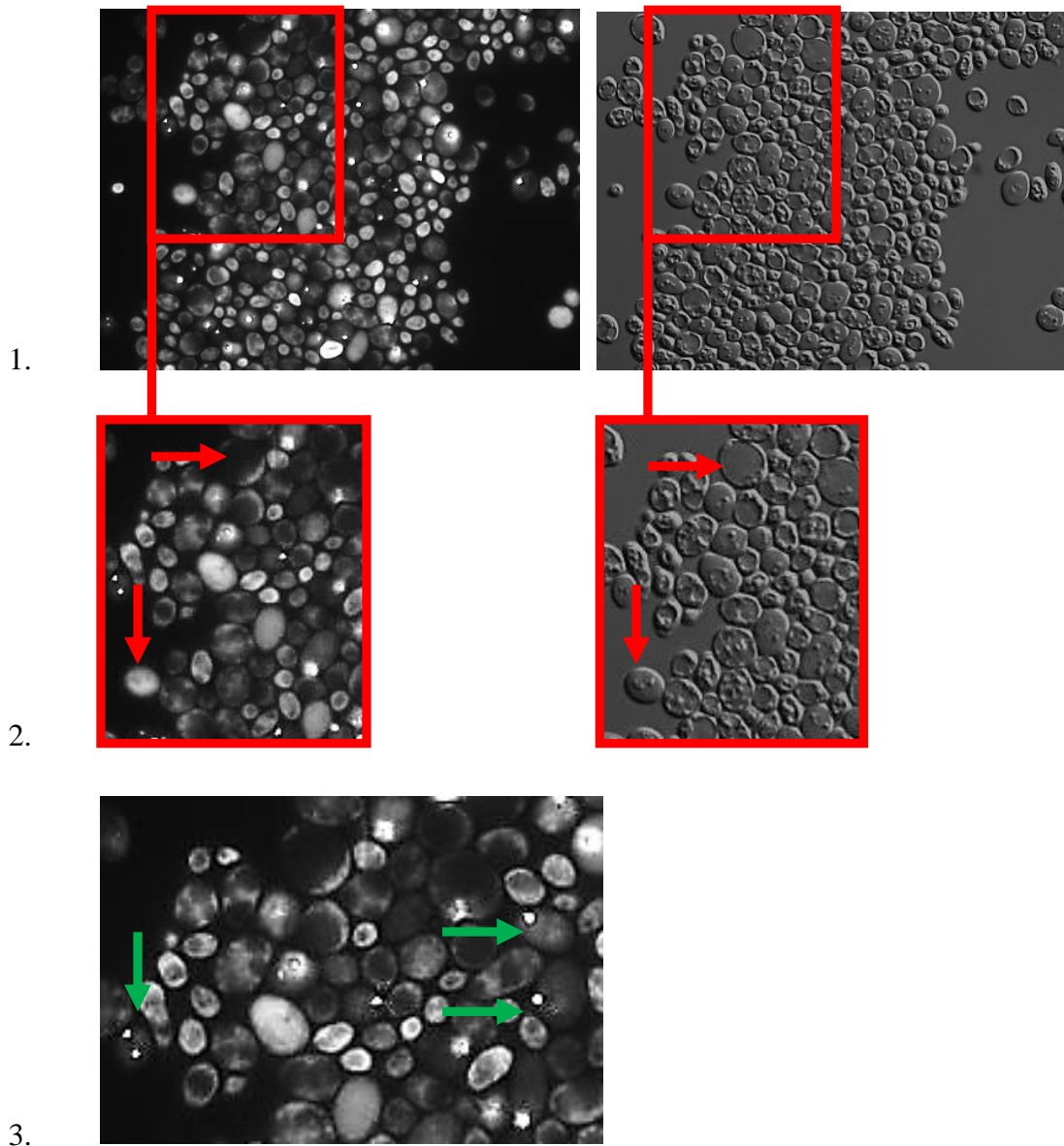


2.

**Obr. 18: 1. Lokalizace proteinu Ade4p-Gfp v cytosolu buněk** při kultivaci klonu *ADE4-3-GFP* 24 hod při 28 °C na YEPG médiu. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x., doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).

**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Červenými šipkami jsou označeny rozdíly v síle fluorescenčního signálu u buněk s morfológií typu A a B.

## Ade4p-Gfp

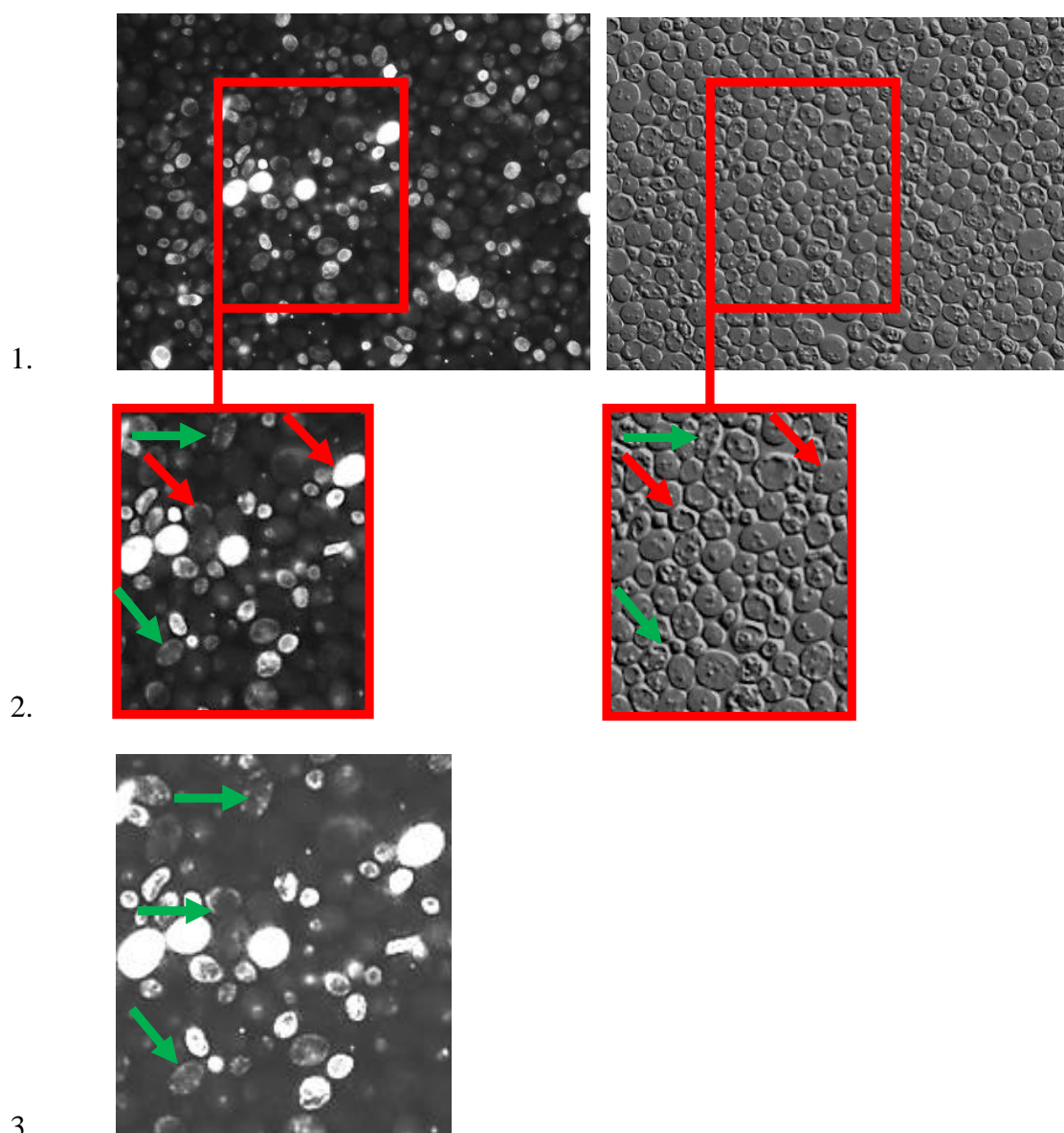


**Obr. 19: 1. Lokalizace proteinu Ade4p-Gfp v cytosolu buněk a v cytoplazmatických granulích** při kultivaci klonu *ADE4-3-GFP* 72 hod při 28°C na minimálním médiu s koncentrací uracilu 20mg/l. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x., doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast). **2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Červenými šipkami jsou označeny rozdíly v síle fluorescenčního signálu u buněk s morfologií typu A a B. **3. Lokalizace proteinu Ade4p-Gfp v cytosolu buněk a v cytoplazmatických granulích** při kultivaci klonu *ADE4-3-GFP* 72 hod při 28°C na minimálním médiu s koncentrací uracilu 20mg/l (výběr vhodné oblasti snímku z části 1). Zelenými šipkami jsou označeny buňky s lokalizací proteinu Ade4p-Gfp v cytoplazmatických granulích.

#### 4.1.3.2. Lokalizace proteinu Adk1p-Gfp

Lokalizaci proteinu Adk1p-Gfp difúzně v cytoplazmě nebo v ohraničených roztroušených oblastech v blízkosti plazmatické membrány a v cytoplazmě – tj. zřejmě v mitochondriální síti, se mi u klonu *ADK1-1-GFP* podařilo prokázat po 72 hodinách kultivace na minimálním médiu s 20 mg/l uracilu při 28 °C (obr. 20, 21). Porovnáním snímků z fluorescenčního mikroskopu a snímků ze světelného mikroskopu v Nomarského kontrastu jsem zjistila rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu u buněk s morfologií B (větší, kulaté, s malými vakuolami) a u buněk s morfologií A (menší, oválné, s velkou vakuolou).

## Adk1p-Gfp



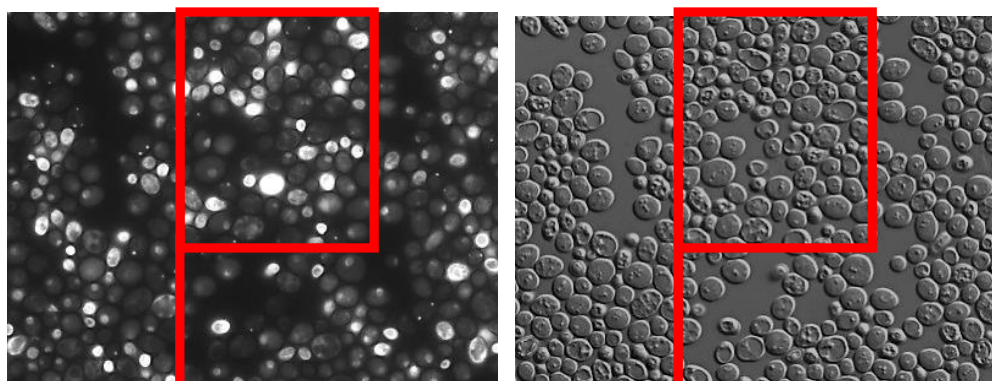
**Obr. 20: 1. Lokalizace proteinu Adk1p-Gfp v cytosolu buněk a v oblastech v blízkosti plazmatické membrány nebo v nepravidelně rozptýlených ohraničených oblastech po kultivaci 24 hod při 28°C na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l u klonu *ADK1-1-GFP*. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x., doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).**

**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Červenými šipkami jsou označeny rozdíly v síle fluorescenčního signálu u buněk s morfologií typu A a B. Zelenými šipkami jsou označeny buňky, u nichž byl fluorescenční signál zachycen v mitochondriální síti (pod plazmatickou membránou nebo v nepravidelně rozptýlených oblastech).

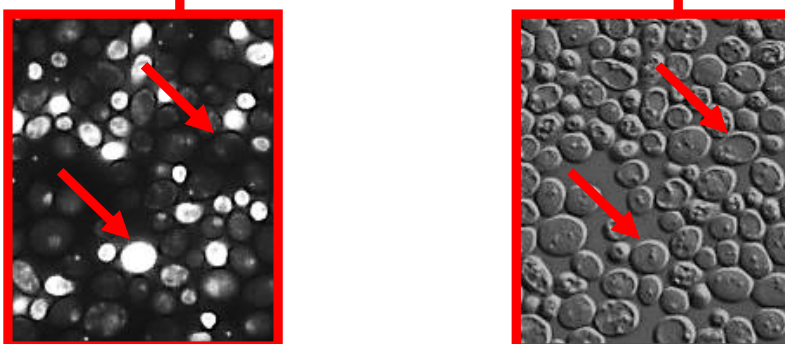
**3. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Zelenými šipkami jsou označeny buňky s lokalizací v roztroušených oblastech v cytoplazmě.

## Adk1p-Gfp

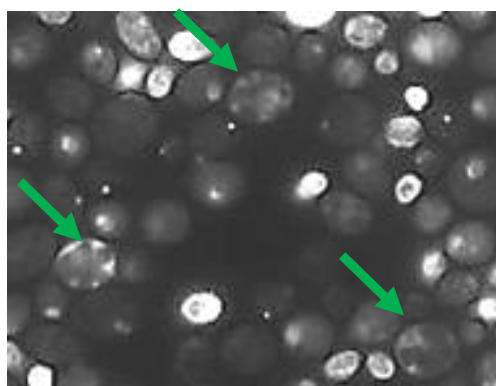
1.



2.



3.



**Obr. 21: 1. Lokalizace proteinu Adk1p-Gfp v cytosolu buněk** po kultivaci 72 hod při 28°C na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l u klonu *ADK1-1-GFP*. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s).

V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).

**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Červenými šipkami jsou označeny rozdíly v síle fluorescenčního signálu u buněk s morfologií typu A a B.

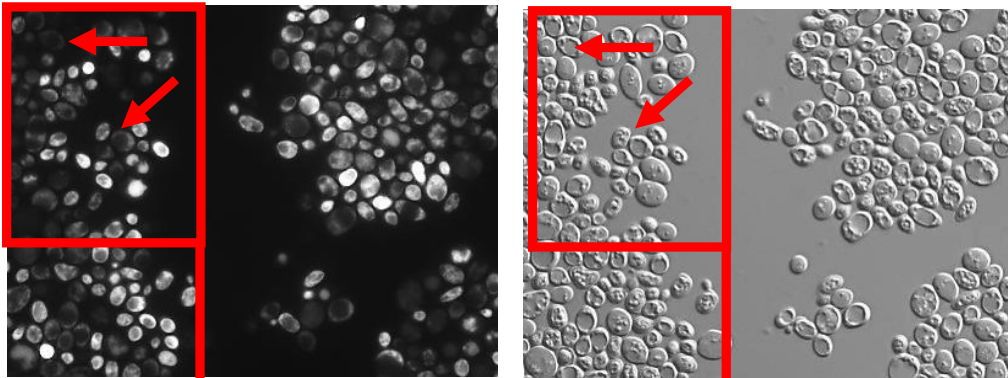
**3. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Zelenými šipkami jsou označeny buňky, u nichž byl fluorescenční signál zachycen v mitochondriální síti (pod plazmatickou membránou nebo v nepravidelně rozptýlených oblastech).

#### **4.1.3.3. Lokalizace proteinu Fcy2p-Gfp**

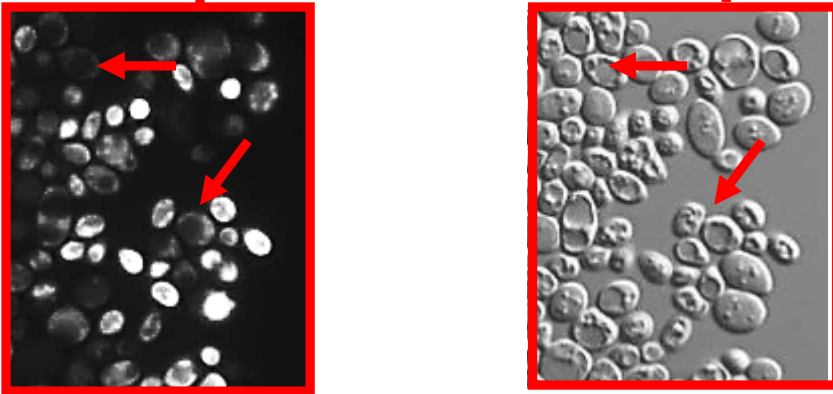
Při kultivaci klonu *FCY2-3-GFP* po dobu 72 hodin na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l při 28°C byla prokázána roztroušená lokalizace Fcy2p-Gfp v cytoplazmě buněk a pod plazmatickou membránou. U plazmatické membrány byl však fluorescenční signál jen velice slabý (obr. 22). Při sledování exprese proteinu Fcy2p-Gfp při kultivaci stejného klonu na YEPG po dobu 24 hodin také nebyla zachycena lokalizace v plazmatické membráně, ale pouze ve vakuolách (obr. 23). Buňky byly proto z YEPG média přeneseny opět na minimální médium s uracilem v koncentraci 20 mg/l, kde byl fluorescenční signál průběžně sledován. Po 24 hodinách kultivace při 28°C na minimálním médiu s uracilem v koncentraci 20 mg/l se podařilo lokalizaci Fcy2p-Gfp prokázat současně v plazmatické membráně a ve vakuole (obr. 24). Porovnáním snímků buněk kultivovaných na minimálním médiu a na YEPG médiu byla zjištěna změna tvaru buněk, resp. na minimálním médiu při kultivaci 24 hod měly buňky oválnější, protáhlejší tvar.

## Fcy2p-Gfp

1.



2.



**Obr. 22: 1. Lokalizace proteinu Fcy2p-Gfp v cytoplasmě buněk a v blízkosti plazmatické membrány**

po kultivaci klonu *FCY2-3-GFP* 72 hod při 28°C na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l.

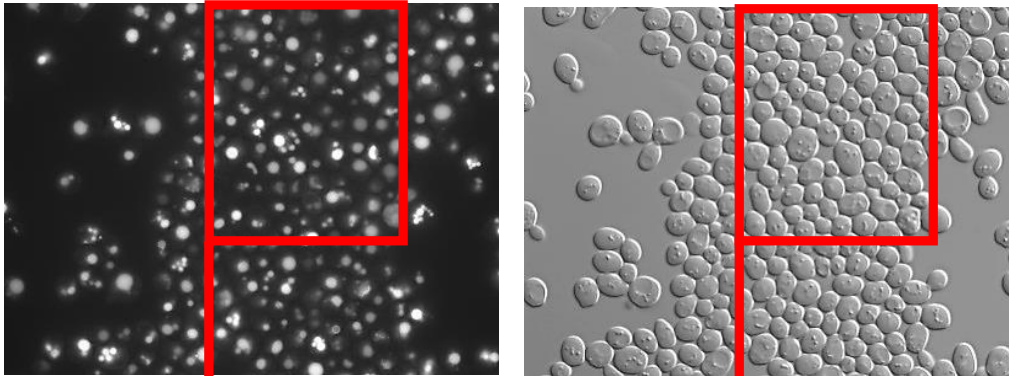
Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).

**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.** Červená šipka označuje lokalizaci v blízkosti plazmatické membrány.

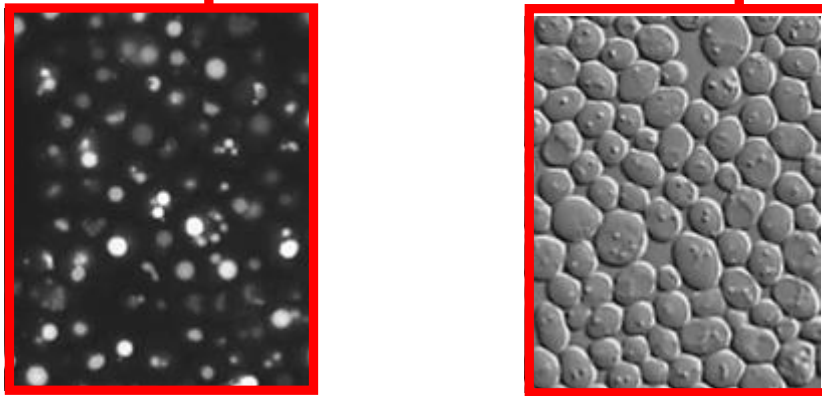


## Fcy2p-Gfp

1.



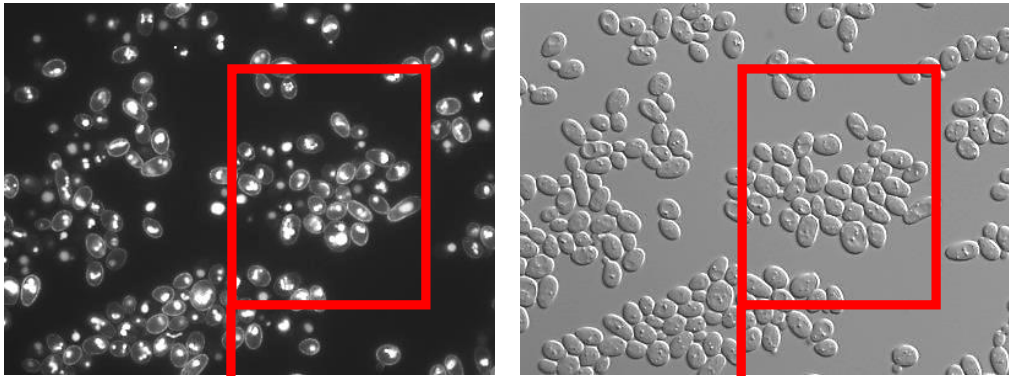
2.



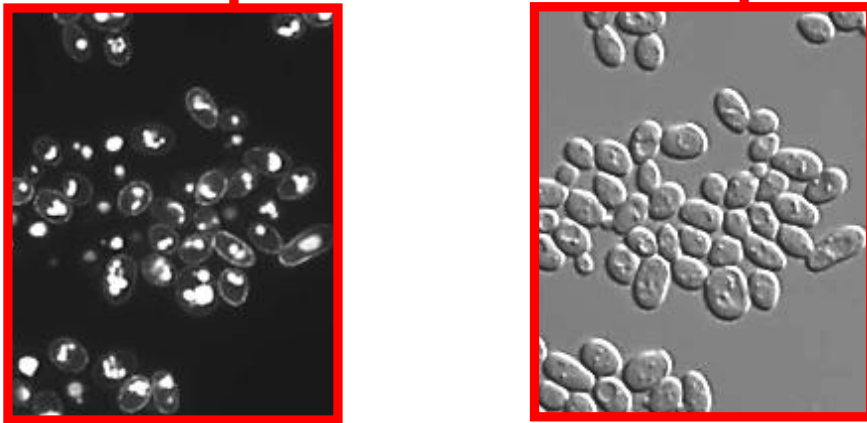
**Obr. 23: 1. Lokalizace proteinu Fcy2p-Gfp ve vakuolách buněk po kultivaci 24 hod klonu *FCY2-3-GFP* při 28°C na YEPG médiu. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast). 2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.**

## Fcy2p-Gfp

1.



2.



**Obr. 24: 1. Lokalizace proteinu Fcy2p-Gfp v plazmatické membráně, difúzně v cytoplasmě a ve vakuole buněk po kultivaci klonu *FCY2-3-GFP* 24 hod při 28 °C na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).**

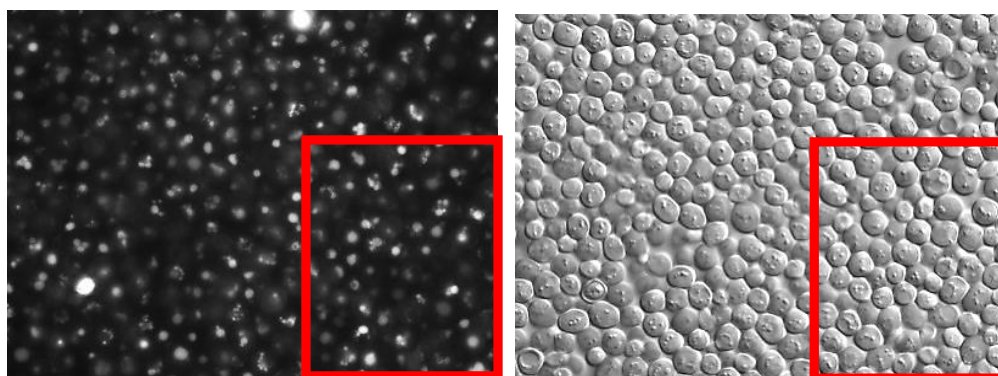
**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.**

#### 4.1.3.4. Lokalizace proteinu Fur4p-Gfp

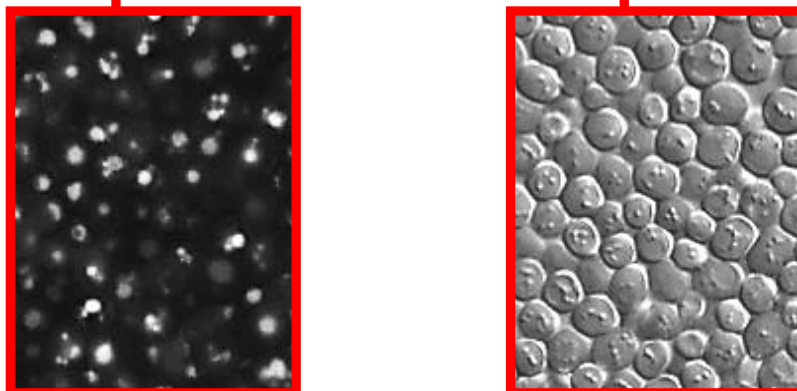
Sledovat lokalizaci proteinu Fur4p-Gfp v plazmatické membráně, kde se může nacházet v lipidických raftech, nebylo snadné vzhledem k jeho velmi rychlé degradaci a přesunu do vakuoly v odpovědi na stresové podmínky, dostupnost živin a aktuální hladinu uracilu. K degradaci může docházet ještě dříve, než protein skrze sekreční dráhu dosáhne plazmatické membrány. Zpočátku se mi podařilo zachytit fluorescenční signál v cytosolu nebo vakuole, a to po 24 hodinách kultivace na minimálním médiu s uracilem o koncentraci 20 mg/l (obr. 25); v plazmatické membráně byl ale signál velice slabý. Po delší kultivaci po dobu 36 hodin na minimálním médiu s uracilem o koncentraci 20 mg/l byla stále prokazována lokalizace jen ve vakuole nebo cytoplazmě. Při kultivaci na YEPG médiu jsem dosáhla stejného výsledku a v plazmatické membráně lokalizaci proteinu nezachytila. Bylo proto nutné optimalizovat podmínky kultivace. Vzhledem k tomu, že vyšší hladiny uracilu a dalších živin snižují hladinu Fur4p, bylo pro další kultivaci zvoleno minimální médium bez přídavku uracilu a krátká doba kultivace. Po 16 hodinách kultivace na tomto médiu byl u klonu *FUR4-4-GFP* zachycen slabší signál v plazmatické membráně a stále silný signál ve vakuole (obr. 26).

## Fur4p-Gfp

1.



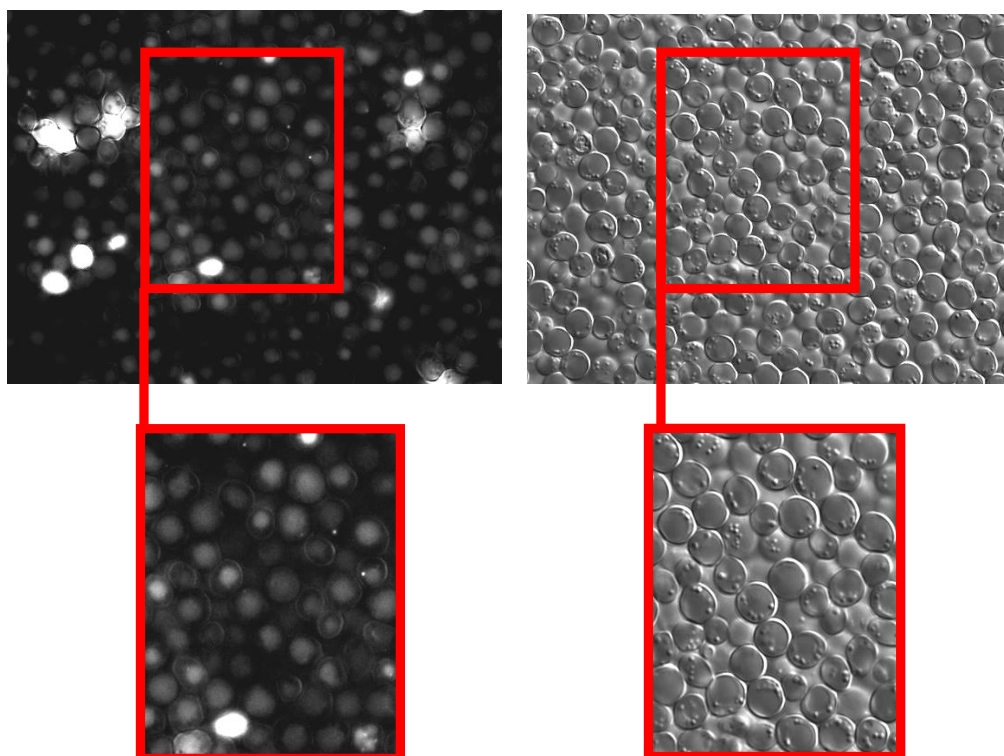
2.



**Obr. 25: 1. Lokalizace proteinu Fur4p-Gfp v plazmatické membráně, difúzně v cytoplazmě a ve vakuole buněk po kultivaci 24 hod při 28°C na minimálním médiu s uracilem 20 mg/l. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).**  
**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.**

## Fur4p-Gfp

1.



2.

**Obr. 26: 1. Lokalizace proteinu Fur4p-Gfp v plazmatické membráně, v cytoplazmě a ve vakuole buněk** po kultivaci 16 hod při 28°C na minimálním médiu bez přidavku uracilu. Červené pole označuje zajímavou oblast snímku. V levém sloupci jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu (obj. 100x, Integrace 8x, doba expozice 2s). V pravém sloupci jsou fotografie ze světelného mikroskopu (obj. 100x, Nomarski kontrast).  
**2. Výřez zajímavé oblasti snímku z části 1.**

#### 4.2. Sledování vlivu extracelulárních pyrimidinových a purinových bází na vývoj obřích kolonií kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Cílem těchto experimentů bylo sledovat možný vliv extracelulárních pyrimidinových bází (uracilu, cytosinu) a extracelulárních purinových bází (adeninu, guaninu) na vývoj obřích kolonií *Saccharomyces cerevisiae*. Sledována byla alkalizace média a produkce amoniaku obřimi koloniemi u rodičovského kmene BY4742 auxotrofního pro uracil, kmene BYURA prototrofního pro uracil (kultivovaných na médiu s různými koncentracemi pyrimidinových bází) a kmene *ade5,7Δ* BY4742 s delecí genu *ADE5,7* pro biosyntézu purinů *de novo* kultivaného na médiu s různými koncentracemi purinových bází, dále morfologie obřích kolonií a morfologie a diferenciaci buněk uvnitř obřích kolonií těchto kmenů.

Kmeny byly kultivovány na glycerolovém médiu s pH indikátorem a s přidavkem pyrimidinových bází (uracilu nebo cytosinu) nebo purinových bází (guaninu nebo adeninu) v koncentracích 0 mg/l, 20 mg/l a 80 mg/l. Během vývoje obřích kolonií jsem sledovala jejich morfologii (barvu, tvar, velikost, výskyt sektorů, papil), intenzitu a časový průběh alkalizace média prostřednictvím změny zbarvení pH indikátoru, produkci amoniaku obřimi koloniemi v čase, morfologii buněk uvnitř obřích kolonií a buněčnou diferenciaci v plné alkalické fázi vývoje kolonií těchto kmenů se zaměřením na výskyt dvou buněčných typů – buněk typu U ve svrchní části kolonií a buněk typu L ve spodní části kolonií.

Alkalizaci média a morfologii obřích kolonií jsem sledovala u dvojic obřích kolonií kultivovaných na příslušných médiích v časových intervalech 3 – 7 dní a ve stejných intervalech odebírala vzorky pro sledování průběhu a míry produkce amoniaku. Produkci amoniaku v průběhu vývoje obřích kolonií jsem sledovala vždy u dvou dvojic jednoho kmene na jednom typu média (tj. ve 4 paralelách). Pro sledování buněčné diferenciaci uvnitř obřích kolonií jsem používala okrajovou kolonii ze šestice obřích kolonií nacházející se ve fázi plné alkalizace média (tj. ve fázi 2. pulzu produkce amoniaku), ze které jsem pomocí mikrotomu připravila tenké řezy o tloušťce 20  $\mu\text{m}$  (kap. 3.2.6). Sledovala jsem velikost buněk, jejich morfologii, tvar a zastoupení buněčných typů U a L v závislosti na typu a koncentraci přidané báze v médiu.

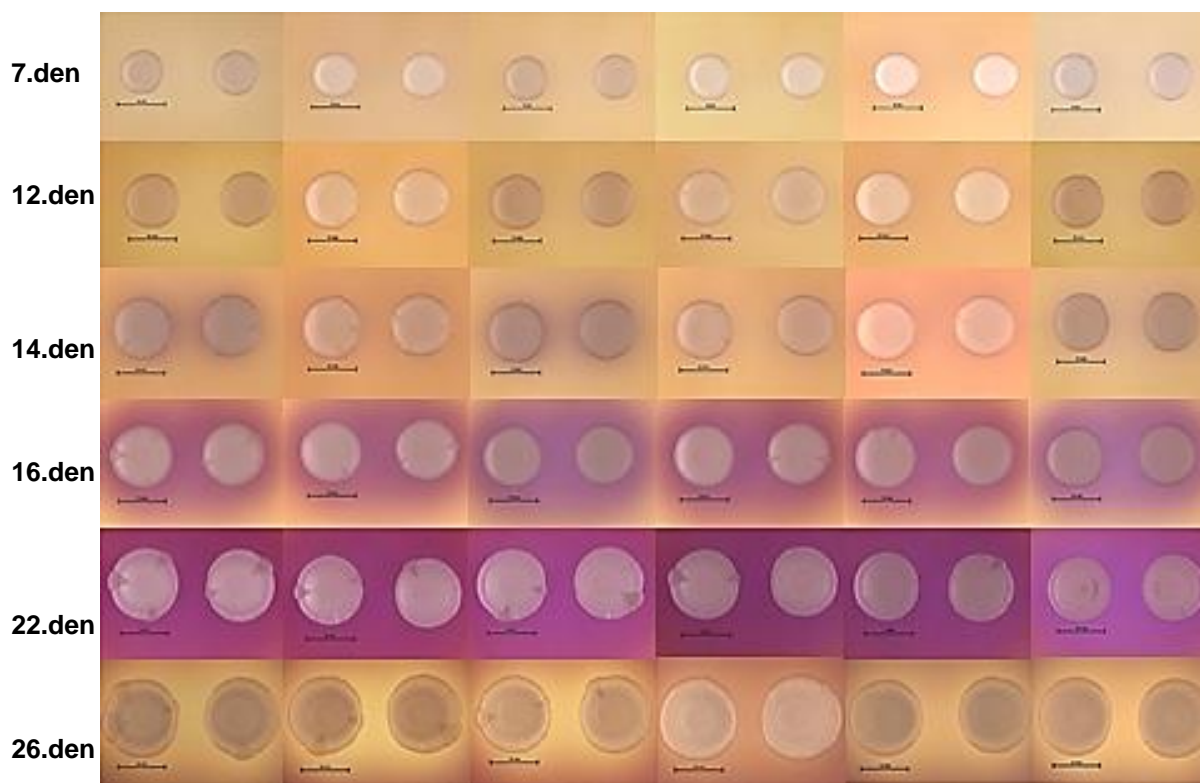
#### 4.2.1. Sledování vlivu extracelulární báze uracilu na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae*

Dvojice a šestice obřích kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 a kmene BYURA jsem kultivovala po dobu 26 dní na glycerolovém médiu s přidavkem uracilu v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l a s pH indikátorem při 28 °C.

Obří kolonie obou kmenů na všech typech média alkalizovaly médium s vyrovnanou intenzitou a nebyly patrné výrazné rozdíly z hlediska časového vývoje. Počátek druhé alkalizace jsem u obou kmenů zaznamenala 12. - 14. den kultivace. 16. den kultivace byly již všechny dvojice kolonií v pokročilé alkalické fázi vývoje. 26. den kultivace kolonie viditelně přešly do 2. acidické fáze (obr. 27). Nebyly zjištěny výrazné rozdíly v míře produkce amoniaku mezi kmeny na dané koncentraci uracilu v médiu, produkce byla pouze mírně slabší u prototrofního kmene BYURA vůči kmeni BY4742. Průběh produkce amoniaku koloniemi obou testovaných kmenů se rovněž významně nelišil v závislosti na koncentraci přidaného uracilu. Mírně silnější produkce byla zjištěna na médiu s přidavkem uracilu v koncentraci 20 mg/l a mírně slabší na médiu s přidavkem uracilu v koncentraci 0 a 80 mg/l. Počátek produkce amoniaku byl u obou kmenů shodný, a to mezi 12. a 14. dnem. U obou kmenů byla zjištěna maximální produkce amoniaku mezi 21. a 23. dnem kultivace. Produkce amoniaku odpovídala zjištěné alkalizaci média (obr. 27 a 28).

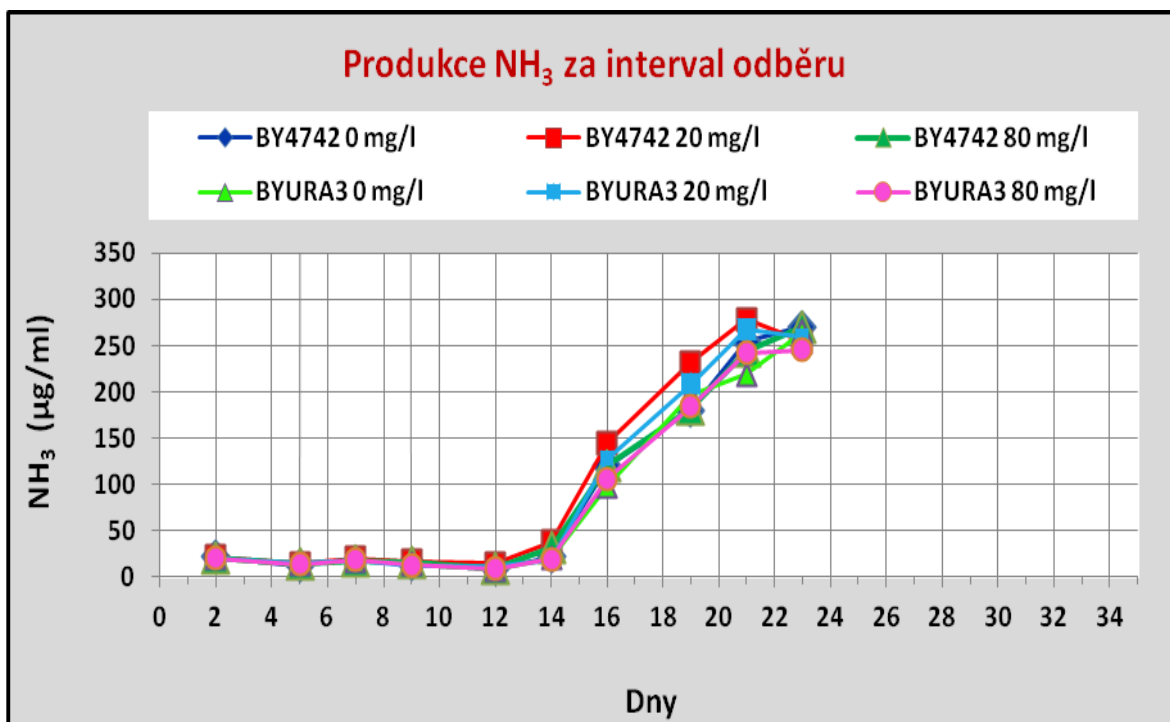
Morfologie kolonií obou kmenů na všech typech média byla shodná – tvar kruhový, barva krémová, bez tvorby papil, od cca 12. dne s výskytem ojedinělých sektorů. Ve velikosti obřích kolonií obou kmenů na všech typech média nebyly při měření jejich průměru v závěru kultivace zjištěny rozdíly (obr. 27).

Kmen:	BY4742	BY4742	BY4742	BYURA3	BYURA3	BYURA3
Uracil, c:	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l
Den kultivace:						



**Obr. 27: Alkalizace média a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 A BYURA na médiu s 0, 20 a 80 mg/l uracilu. 7. a 12. den - acidická fáze. 14. – 22. den – alkalická fáze, druhý pulz. 26. den – druhá acidická fáze. První alkalický pulz v důsledku produkce amoniaku v prvních 24 hod. po očkování není zachycen. Měřítko: 10 mm.**



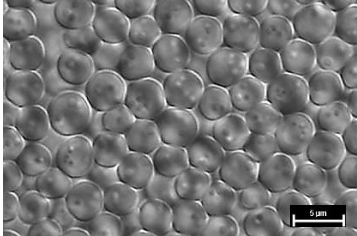


**Obr. 28: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a BYURA na GM médiu s 0, 20 a 80 mg/l uracilu.**

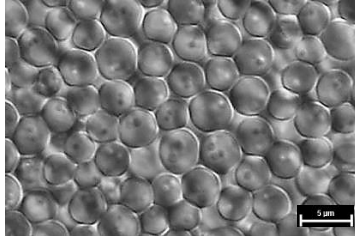
Abych zjistila, zda auxotrofie nebo prototrofie pro uracil a přidaný uracil v médiu mohou mít vliv na morfologii buněk a diferenciaci uvnitř obřích kolonií kmenů BY4742 a BYURA, připravila jsem z okrajové kolonie šestic obřích kolonií v plně alkalické fázi tenké řezy a dokumentovala diferenciaci buněk v centrální oblasti kolonie (kap. 3.2.6). U obou kmenů kultivovaných na všech typech média došlo k diferenciaci buněk na buněčné typy U a L. Morfologie buněk i velikost byla srovnatelná (obr. 29).

a) U buňky

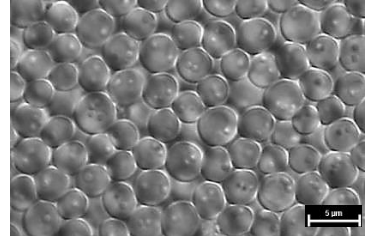
**BY4742**  
**0 mg/l**



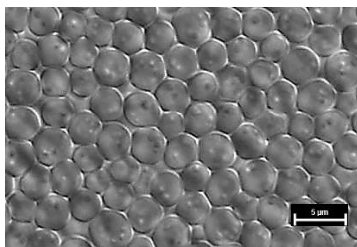
**BY4742**  
**20 mg/l**



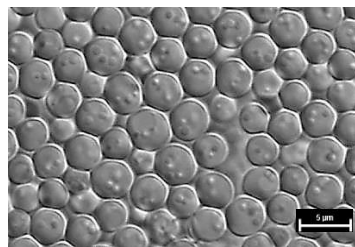
**BY4742**  
**80 mg/l**



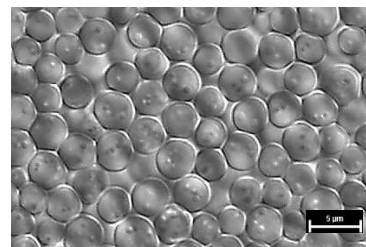
**BYURA**  
**0 mg/l**



**BYURA**  
**20 mg/l**

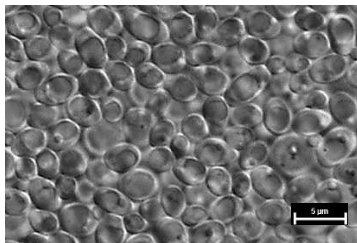


**BYURA**  
**80 mg/l**

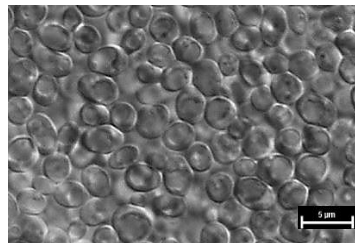


b) L buňky

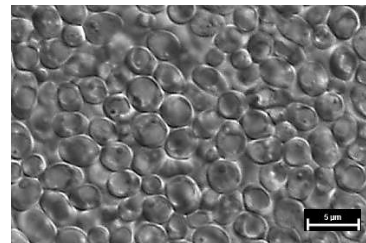
**BY4742**  
**0 mg/l**



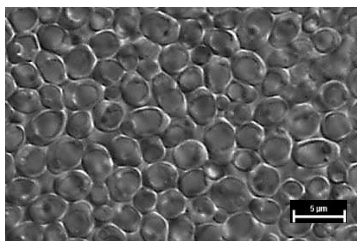
**BY4742**  
**20 mg/l**



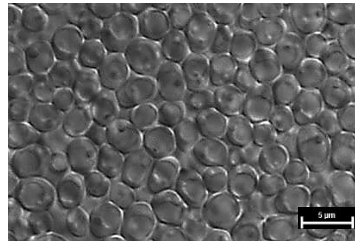
**BY4742**  
**80 mg/l**



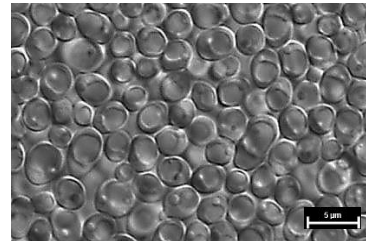
**BYURA**  
**0 mg/l**



**BYURA**  
**20 mg/l**



**BYURA**  
**80 mg/l**



**Obr. 29: Morfologie buněk a jejich diferenciace v obří kolonii kmenů BY4742 a BYURA na médiu s 0, 20 a 80 mg/l uracilu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítko 5 µm.**

#### 4.2.2. Sledování vlivu extracelulární báze cytosinu na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae*

Sledovala jsem dvojice a šestice obřích kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742, které jsem kultivovala po dobu 29 dní na glycerolovém médiu s přidavkem cytosinu v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l a s pH indikátorem při 28°C.

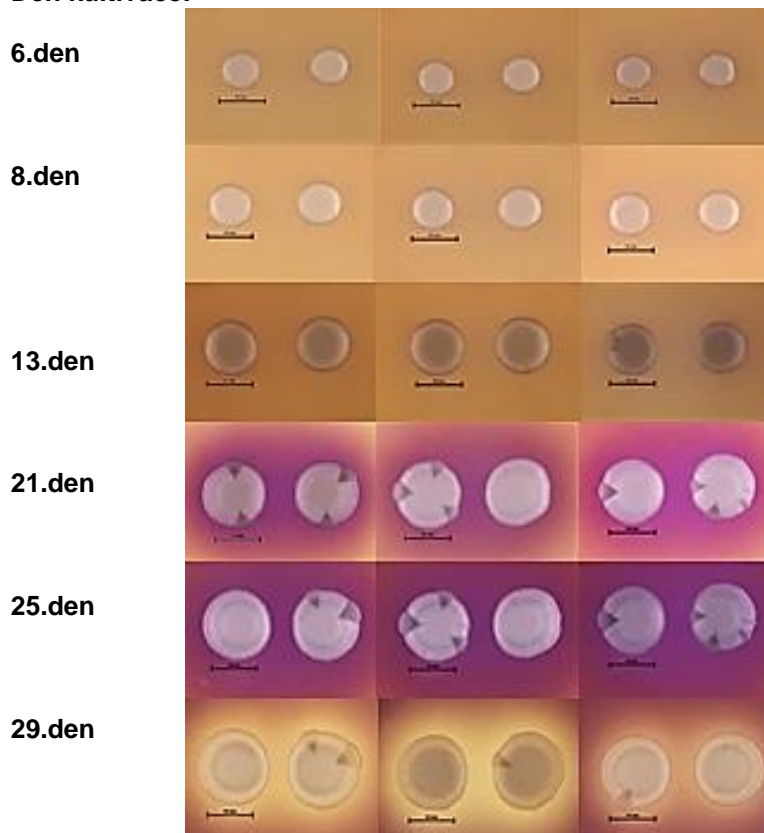
Zjistila jsem, že obří kolonie kmene BY4742 na všech typech média alkalizovaly médium se shodnou intenzitou i časovým vývojem a nezaznamenala jsem makroskopicky významné rozdíly. Počátek druhého alkalického pulzu se projevil od 13. dne kultivace. 21. den kultivace byly obří kolonie kmene BY4742 v plné alkalické fázi. 29. den kultivace byl viditelný přechod obřích kolonií do druhé acidické fáze (obr. 30).

V produkci amoniaku byly zjištěny mírné rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného cytosinu do média. Počátek druhého alkalického pulzu byl mezi 12. a 14. dnem, přičemž při kultivaci na médiu s 0 a 20 mg/l cytosinu došlo ke zpoždění o 2 dny. Nejvyšší produkce amoniaku byla zaznamenána u všech variant 25. den kultivace. Pokles produkce byl zjištěn u všech variant 29. den kultivace. Produkce amoniaku korelovala s alkalizací média (obr. 30 a 31).

Morfologie a velikost kolonií kmene BY4742 kultivovaného na médiu se všemi koncentracemi přidaného cytosinu byla v závěru kultivace shodná. Kolonie měly kruhový tvar, krémovou barvu a nevytvářely papily, pouze od 13. dne kultivace ojedinělé sektory (obr. 30). Ve velikosti obřích kolonií na všech typech média nebyly při měření jejich průměru v závěru kultivace zjištěny rozdíly.

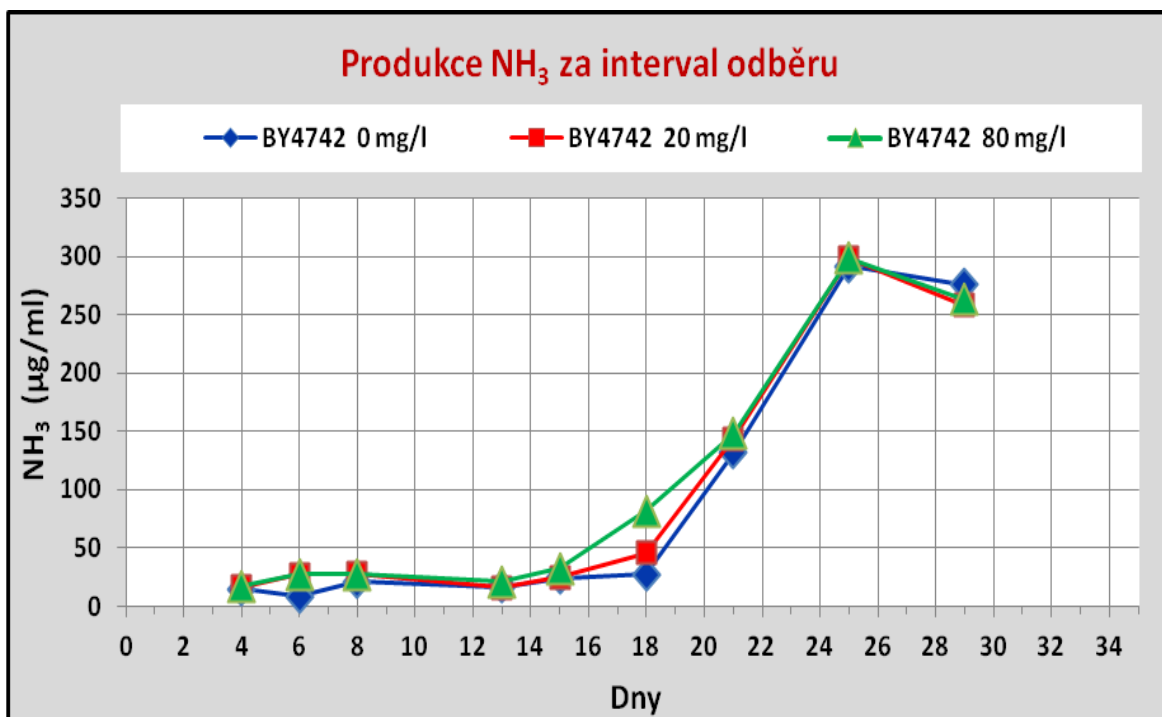
Kmen:	<b>BY4742</b>	<b>BY4742</b>	<b>BY4742</b>
Cytosin, c:	<b>0 mg/l</b>	<b>20 mg/l</b>	<b>80 mg/l</b>

Den kultivace:



**Obr. 30: Alkalizace média a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 A BYURA na médiu**

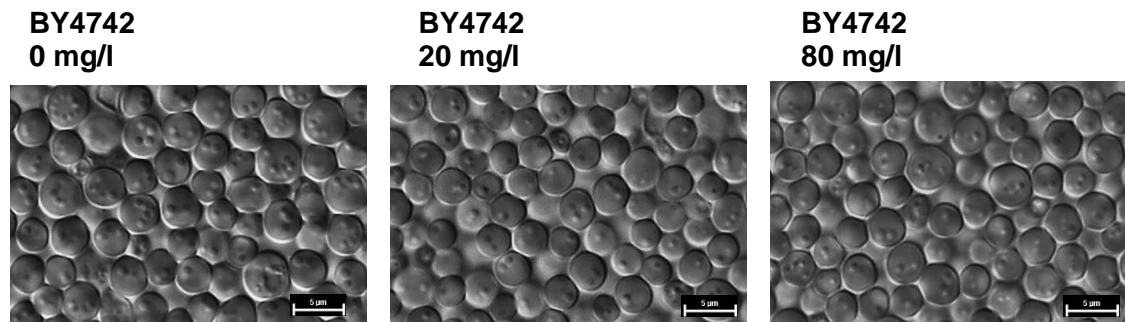
s **0, 20 a 80 mg/l cytosinu**. 6. a 8. den - acidická fáze. 13. – 25. den – alkalická fáze, druhý pulz. 29. den – druhá acidická fáze. První alkalický pulz v důsledku produkce amoniaku v prvních 24 hod. po očkování není zachycen. Měřítko: 10 mm.



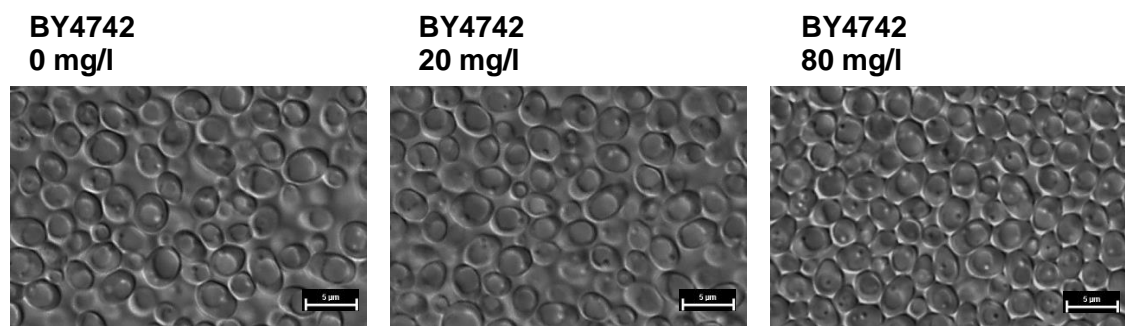
Obr. 31: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií na GM médiu s 0, 20 a 80 mg/l cytosinu u kmene BY4742.

Pro zjištění vlivu extracelulárního cytosinu na morfologii buněk a diferenciaci v obří kolonii BY4742 jsem opět dokumentovala centrální část okrajové kolonie ze šestice v tenkých řezech 15. den kultivace (kap. 3.2.6). Zjistila jsem, že u kmene BY4742 došlo na všech typech média k diferenciaci buněk na buněčné typy U a L. Morfologie a velikost buněk byla při kultivaci na všech médiích s různými koncentracemi přidaného cytosinu shodná (obr. 32).

a) U buňky



b) L buňky



**Obr. 32: Morfologie buněk a jejich diferenciace v obří kolonii kmene BY4742 kultivovaného na médiu s 0, 20 a 80 mg/l cytosinu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítko 5  $\mu$ m.**

#### 4.2.3. Sledování vlivu extracelulární báze guaninu na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae*

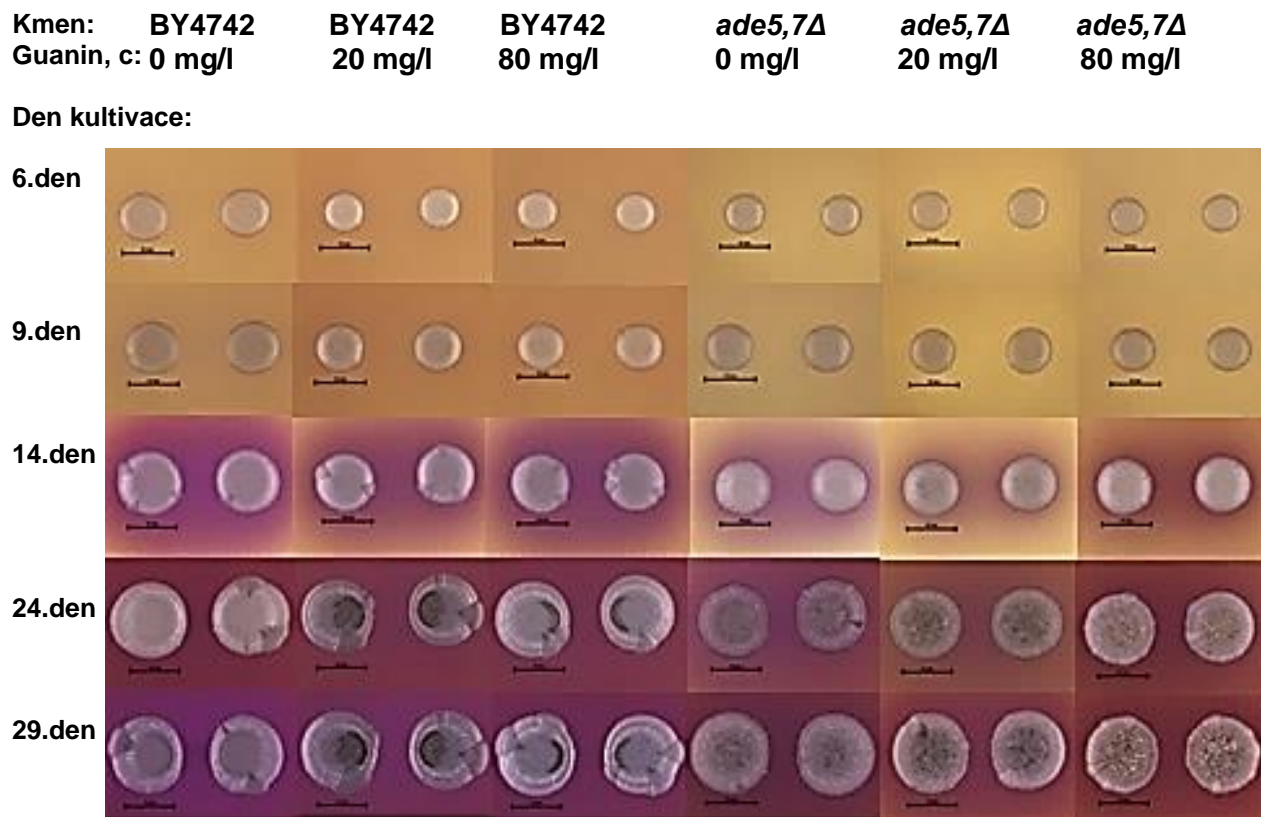
Kultivovala jsem dvojice a šestice obřích kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 a kmene *ade5,7Δ* po dobu 29 dní na glycerolovém médiu s přidavkem guaninu v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l a pH indikátoru při 28 °C.

Intenzita alkalizace byla u kmene BY4742 velmi vyrovnaná. U kmene *ade5,7Δ* byla intenzita alkalizace oproti kmeni BY4742 zřetelně slabší. U obou kmenů nebyl zjištěn rozdíl v časovém vývoji alkalizace. Nástup 2. alkalické fáze byl zaznamenán mezi 10. a 13. dnem kultivace. 14. den kultivace byly již obří kolonie obou kmenů v plné alkalické fázi. 29. den kultivace nebyl přechod obřích kolonií do druhé acidické fáze viditelný (obr. 33).

Počátek produkce amoniaku byl zjištěn u kmene BY4742 mezi 9. a 14. dnem na všech koncentracích přidavku guaninu v médiu a rovněž u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přidavkem 0 mg/l guaninu, u deletanta však byla zjištěna nižší produkce amoniaku oproti kmeni BY4742. Oproti kmeni BY4742 a kmeni *ade5,7Δ* na médiu s přidavkem 0 mg/l guaninu byl počátek produkce amoniaku u kmene *ade5,7Δ* při kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l guaninu opožděn o 2 dny a byl zjištěn od 16. dne kultivace. Maximální produkce amoniaku byla zjištěna u kmene BY4742 24. den kultivace na všech koncentracích přidavku guaninu v médiu. U kmene *ade5,7Δ* byla 24. den zjištěna nižší produkce amoniaku cca o 50 % oproti rodičovskému kmeni BY4742. Rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného guaninu nebyly významné a projevíly se u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přidavkem guaninu 0 mg/l, kdy došlo k časnější produkci amoniaku o 2 dny oproti kultivaci tohoto kmene na médiu s přidavkem guaninu 20 a 80 mg/l a dále nižší produkcí amoniaku u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přidavkem guaninu 20 a 80 mg/l oproti kultivaci tohoto kmene na médiu s 0 mg/l guaninu. Pokles produkce byl zjištěn u kmene BY4742 29. den kultivace, přičemž u kmene *ade5,7Δ* nebyl tento den výraznější pokles produkce zaznamenán. Míra produkce amoniaku odpovídala sledované alkalizaci média (obr. 33 a 34).

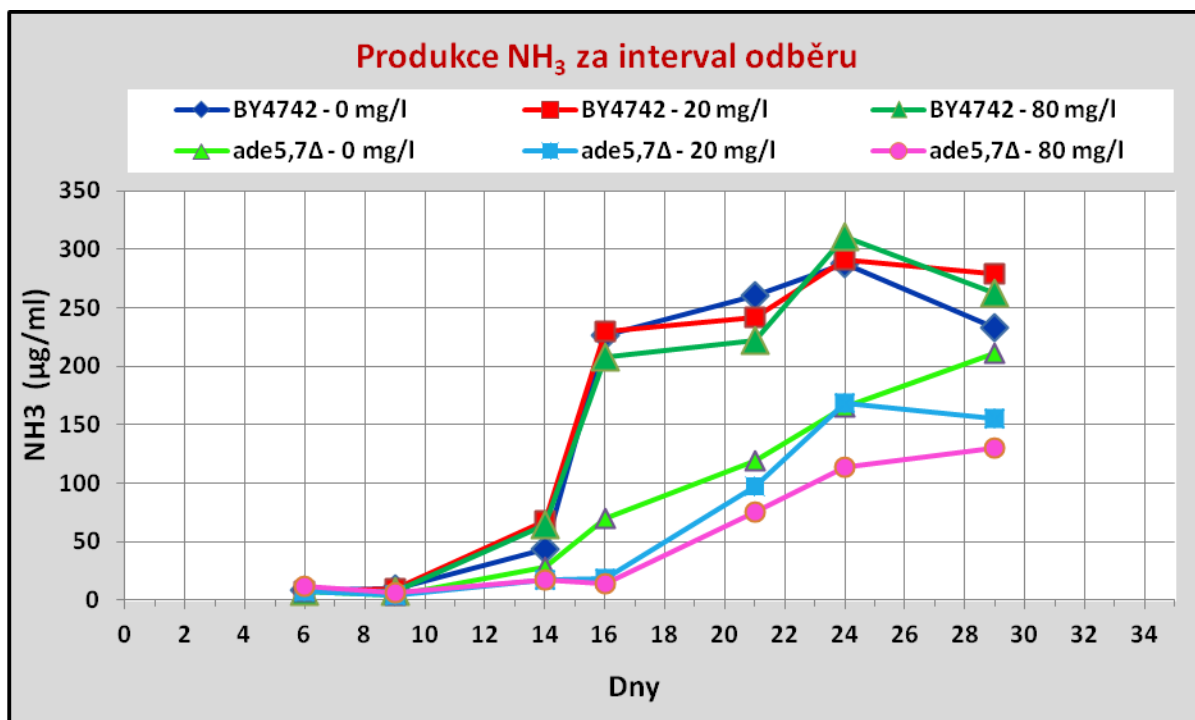
Obří kolonie rodičovského kmene BY4742 měly obvyklou morfologii tohoto laboratorního kmene: byly krémové barvy, hladké, netvořily papily a tvorba sektorů se objevila 14. den kultivace. Obří kolonie kmene *Δade5,7* se lišily v morfologii oproti rodičovskému kmeni BY4742 tvorbou papil, které byly makroskopicky zřetelné v alkalické fázi kultivace.

Ve velikosti obřích kolonií obou kmenů jsem při měření jejich průměru v závěru kultivace nezaznamenala rozdíl (obr. 33).



**Obr. 33: Alkalizace média a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l guaninu. 6. a 9. den - acidická fáze. 14. – 29. den – alkalická fáze, druhý pulz. 29. den nebyl viditelný přechod obřích kolonií do druhé acidické fáze. První alkalický pulz v důsledku produkce amoniaku v prvních 24 hod. po očkování není zachycen. Měřítka: 10 mm.**

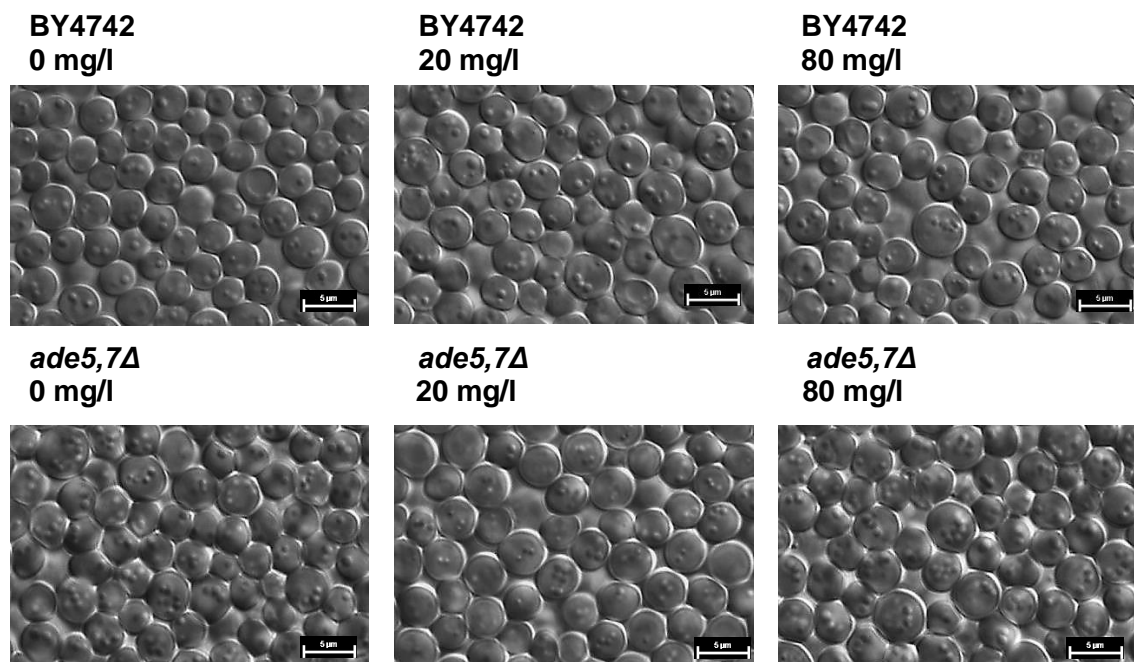




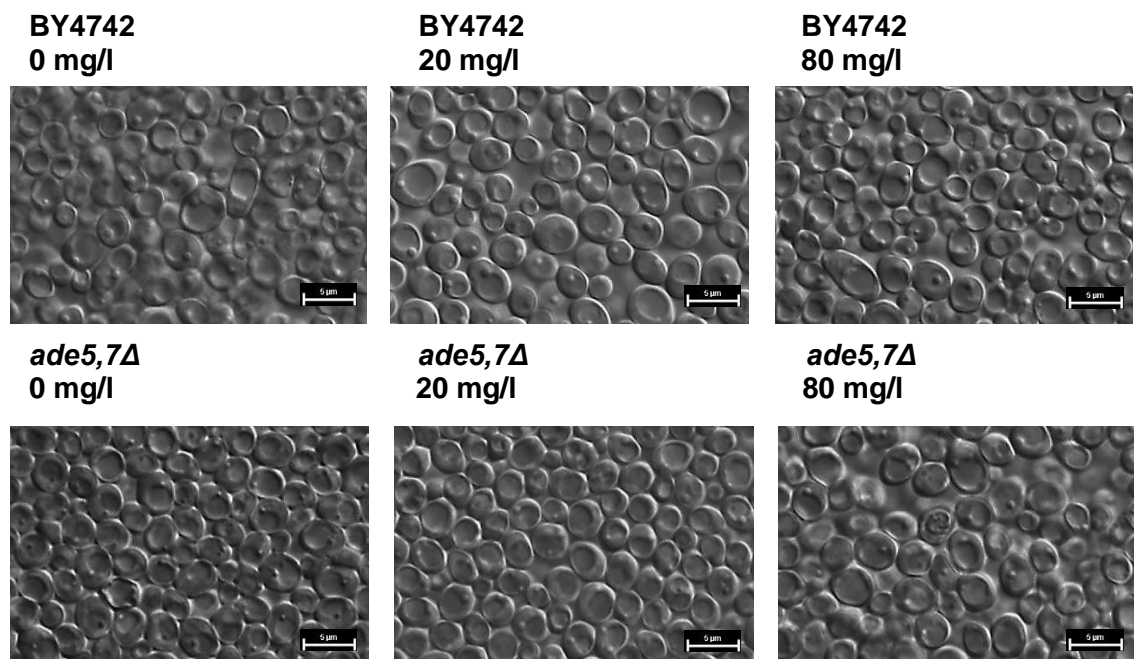
Obr. 34: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojice obřích kolonií na GM médiu s 0, 20 a 80 mg/l guaninu u kmene BY4742 a kmene *ade5,7Δ*.

Pro sledování morfologie buněk a diferenciaci jsem opět z okrajových obřích kolonií sledovaných kmenů kultivovaných v šestících připravila 15. den kultivace tenké řezy a dokumentovala centrální oblast kolonie (kap. 3.2.6). K diferenciaci buněk na buněčné typy U a L došlo 15. den kultivace u obou kmenů. Měřením jsem zjistila, že u obou kmenů se ojediněle vyskytují buňky typu L větší velikosti. Morfologie buněk typu U a L byla u obou sledovaných kmenů srovnatelná (obr. 35).

a) U buňky



b) L buňky



**Obr. 35: Morfologie buněk a jejich diferenciaci v obří kolonii kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l guaninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm.**

#### 4.2.4. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae*

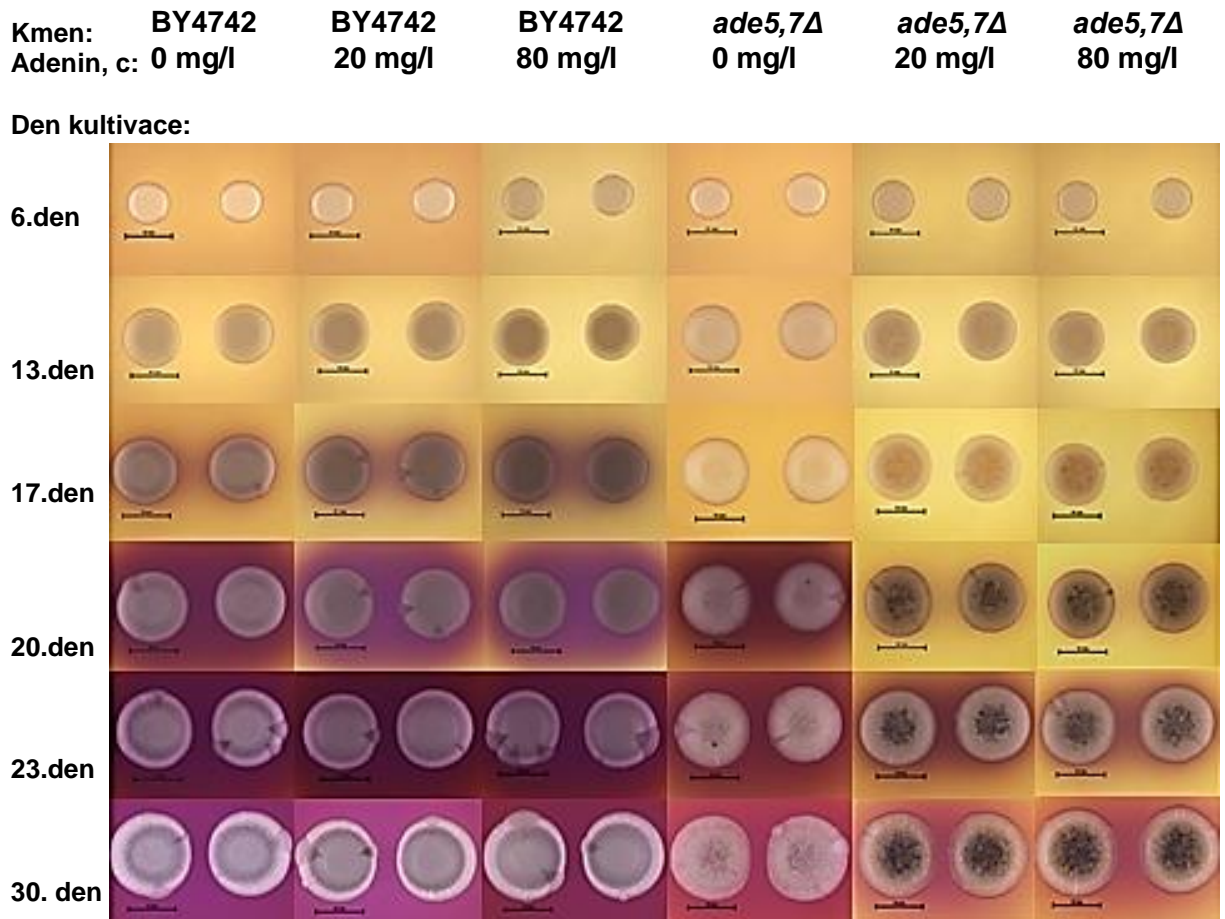
Dvojice a šestice obřích kolonií kmene *S. cerevisiae* BY4742 a kmene *ade5,7Δ* jsem kultivovala po dobu 35 dní na glycerolovém médiu s přidaným adeninem v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l a s pH indikátorem při 28°C.

Alkalizace média byla u kmene *ade5,7Δ* výrazně slabší oproti kmeni BY4742. U kmene *ade5,7Δ* na médiu s přídavkem 0 mg/l adeninu byla zjištěna silnější intenzita alkalizace oproti kultivaci na médiu s přídavkem 20 a 80 mg/l adeninu. Plná alkalická fáze se projevila u kmene BY4742 17. den kultivace a u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přídavkem 0 mg/l adeninu 20. den kultivace, u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přídavkem 20 a 80 mg/l adeninu 23. den kultivace. Na médiu s přídavkem 20 mg/l a 80 mg/l adeninu došlo u kmene *ade5,7Δ* k nástupu plné alkalické fáze o 3 dny později oproti kultivaci tohoto kmene na médiu s přídavkem 0 mg/l adeninu a o 6 dní později oproti kmeni BY4742. Na médiu s přídavkem 0 mg/l adeninu došlo u kmene *ade5,7Δ* k nástupu plné alkalické fáze o 3 dny později oproti kmeni BY4742. Všechny obří kolonie byly v plné alkalické fázi 23. den kultivace. 30. den kultivace nebyl zaznamenán přechod obřích kolonií do druhé acidické fáze (obr. 36).

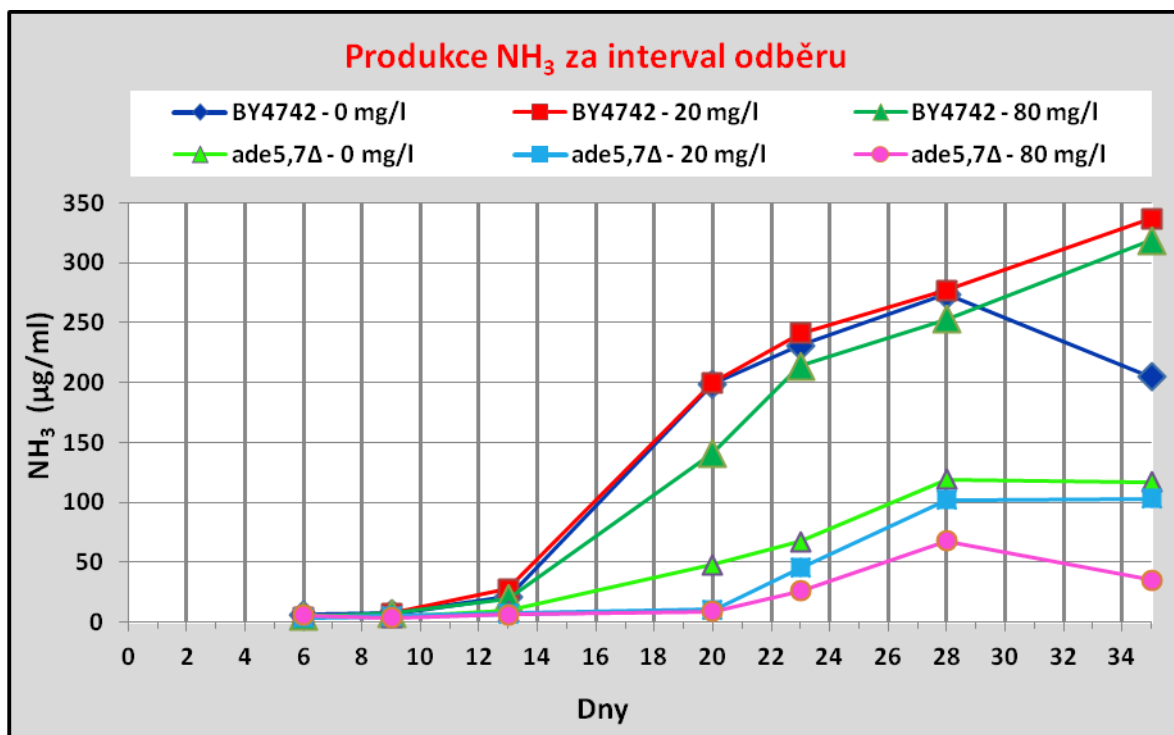
Počátek produkce amoniaku byl mezi 9. a 13. dnem u kmene BY4742, mezi 13. a 20. dnem u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přídavkem 0 mg/l adeninu a mezi 20. a 23. dnem u kmene *ade5,7Δ* na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu. U kmene *ade5,7Δ* došlo k opožděné produkci amoniaku oproti rodičovskému kmeni o 3 dny v případě kmene *ade5,7Δ* na médiu s 0 mg/l adeninu a o 6 dní v případě kmene *ade5,7Δ* na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu. K maximální produkci amoniaku došlo u obou kmenů mezi 28. a 34. dnem. 34. den byl zjištěn pokles produkce u kmene BY4742 na médiu s 0 mg/l adeninu a u kmene *ade5,7Δ* na médiu s 80 mg/l adeninu. U kmene *ade5,7Δ* na médiu s 0 mg/l adeninu byla v průběhu kultivace produkce amoniaku vyšší oproti kultivaci tohoto kmene na médiu s přídavkem adeninu 20 a 80 mg/l. Produkce amoniaku v průběhu kultivace u kmene *ade5,7Δ* byla oproti kmeni BY4742 o cca 60% nižší. Míra produkce amoniaku korelovala s alkalizací média (obr. 36 a 37).

Obří kolonie kmene BY4742 měly obvyklou krémovou barvu a hladkou morfologii bez papil s ojedinělými sektory od 17. dne kultivace. Morfologie obřích kolonií kmene *ade5,7Δ* se lišila oproti kmeni BY4742 výskytem papil v acidické fázi (cca od 17. dne). Papily byly zřetelnější

u kmene *ade5,7Δ* na médiu s přídatkem adeninu 20 a 80 mg/l. Ve velikosti obřích kolonií obou kmenů na všech typech média v závěru kultivace jsem při měření jejich průměru nezaznamenala rozdíly (obr. 36).



**Obr. 36:** Alkalizace a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. 6. až 13. den - acidická fáze. 17. – 30. den – alkalická fáze, druhý pulz. První alkalický pulz v důsledku produkce amoniaku v prvních 24 hod. po očkování není zachycen. Měřítka 10 mm.

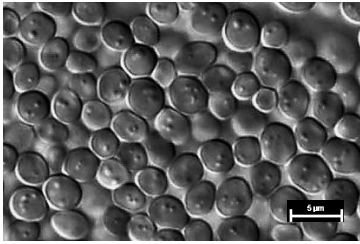


Obr. 37: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojice obřích kolonií na GM médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu u kmene BY4742 a kmene *ade5,7Δ*.

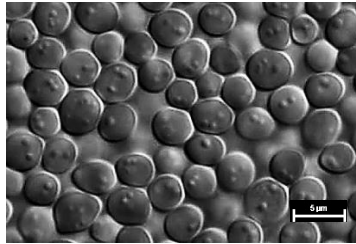
Pro sledování morfologie buněk a diferenciaci jsem připravila 15. den kultivace z okrajových kolonií příslušných kmenů kultivovaných v šestcích tenké řezy (3.2.6.). U obou kmenů došlo k diferenciaci na buněčné typy U a L. Morfologie buněk i jejich velikost u kmene BY4742 byla při kultivaci na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu srovnatelná (obr. 37). U kmene *ade5,7Δ* byly buňky typu U zřetelně větší než u kmene BY4742 (obr. 38).

a) U buňky

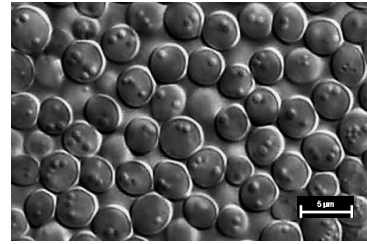
**BY4742**  
**0 mg/l**



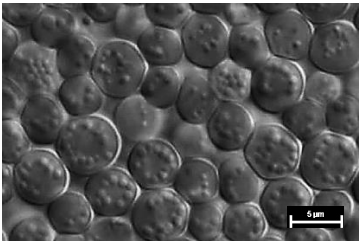
**BY4742**  
**20 mg/l**



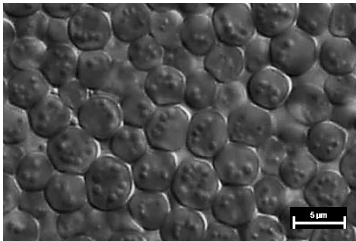
**BY4742**  
**80 mg/l**



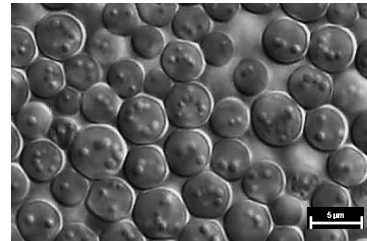
**ade5,7Δ**  
**0 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**20 mg/l**

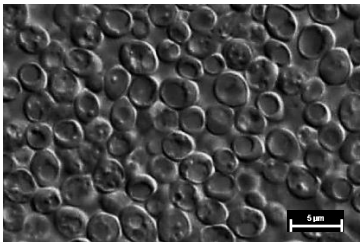


**ade5,7Δ**  
**80 mg/l**

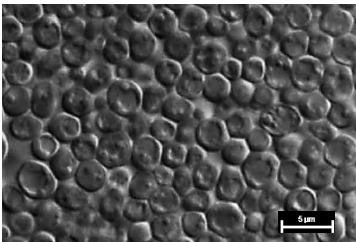


b) L buňky

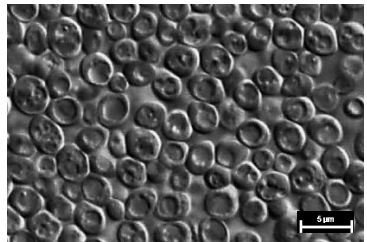
**BY4742**  
**0 mg/l**



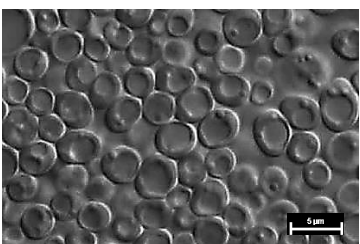
**BY4742**  
**20 mg/l**



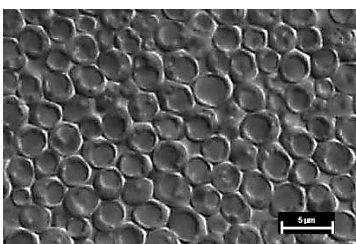
**BY4742**  
**80 mg/l**



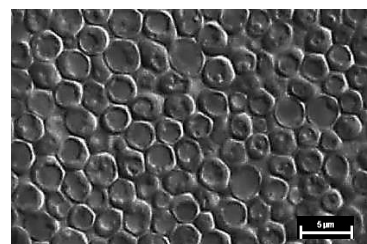
**ade5,7Δ**  
**0 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**20 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**80 mg/l**



**Obr. 38: Morfologie buněk a diferenciace v obří kolonii kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm.**

#### 4.2.5. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu a uracilu na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae*

Kmen BY4742 je auxotrofní pro uracil, proto jsem paralelně s předchozím pokusem ověřovala, zda alkalizace média, produkce amoniaku, morfologie a velikost obřích kolonií a morfologie buněk a diferenciaci mohou být ovlivněny současným přidavkem bází adeninu a uracilu v médiu. Do glycerolového média s pH indikátorem a s přidavkem adeninu v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l jsem přidala 20 mg/l uracilu a kultivovala rodičovský kmen BY4742 a kmen *ade5,7Δ* 35 dní při 28 °C. Dosáhla jsem podobných výsledků jako při předchozím pokusu při kultivaci na glycerolovém médiu s různými koncentracemi pouze adeninu bez přidavku uracilu.

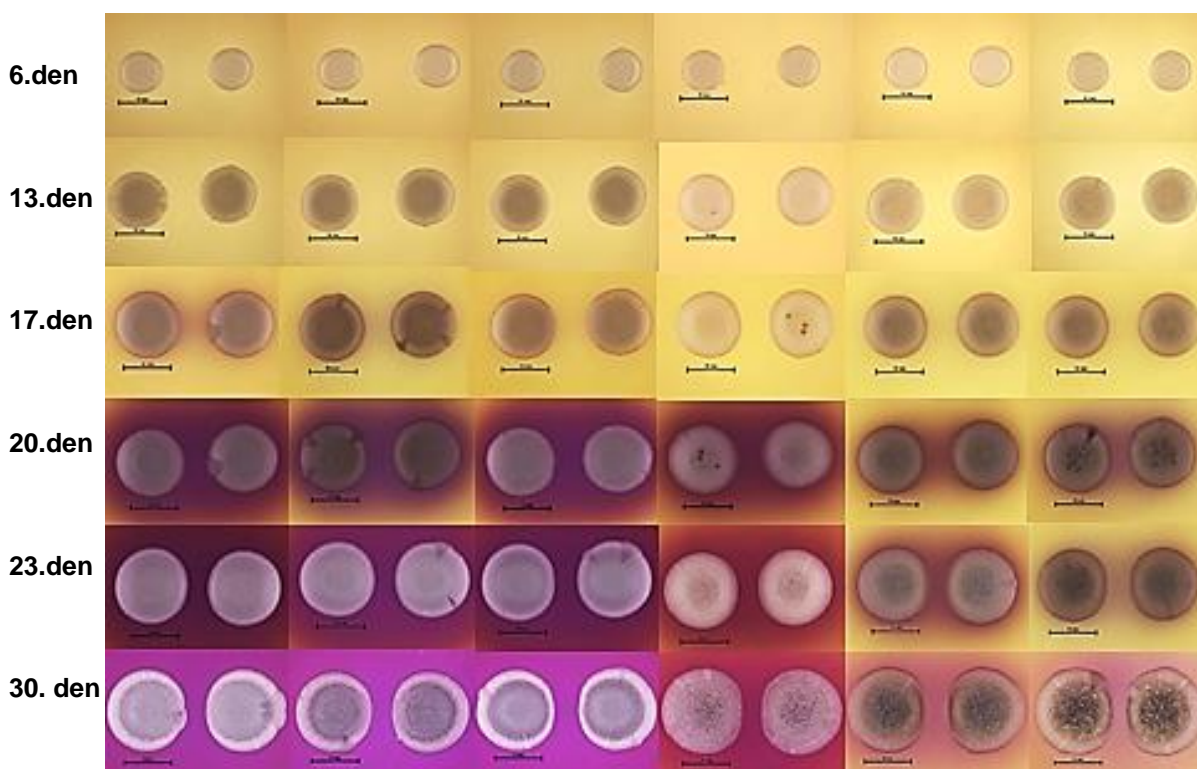
Intenzita alkalizace média byla u kmene *ade5,7Δ* zřetelně slabší oproti rodičovskému kmeni BY4742. Kmen *ade5,7Δ* kultivovaný na médiu s přidavkem 0 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu alkalizoval médium intenzivněji oproti stejnému kmeni kultivovanému na médiu s přidavkem 20 a 80 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu, nebyl však zaznamenán časový rozdíl počátku alkalické fáze. Počátek alkalické fáze byl zjištěn mezi 17. a 19. dnem kultivace u obou kmenů. 20. den kultivace byly všechny obří kolonie v plné alkalické fázi. 30. den kultivace nebyl zjištěn výrazně viditelný přechod obřích kolonií do druhé acidické fáze (obr. 39).

Počátek produkce amoniaku byl zjištěn mezi 9. a 13. dnem kultivace u rodičovského kmene BY4742 na všech koncentracích adeninu a 20 mg/l uracilu v médiu. U kmene *ade5,7Δ* byl počátek produkce zaznamenán mezi 13. a 20. dnem kultivace, přičemž při kultivaci na médiu s 0 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu byla zjištěna vyšší produkce amoniaku oproti kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu. Počátek produkce amoniaku byl u kmene *ade5,7Δ* opožděn o 4 až 7 dní oproti rodičovskému kmeni BY4742. K maximální produkci amoniaku došlo mezi 23. a 28. dnem kultivace u kmene BY4742 a mezi 23. a 35. dnem kultivace u kmene *ade5,7Δ*. Od 28. dne kultivace byl zaznamenán pokles produkce u kmene BY4742. Produkce amoniaku v průběhu kultivace byla u kmene *ade5,7Δ* o cca 80 % nižší oproti rodičovskému kmeni BY4742 (obr. 39 a 40)

Morfologie obřích kolonií rodičovského kmene BY4742 byla obvyklá (krémová barva, hladký povrch bez papil, ojedinělé sektory od 17. dne kultivace). Morfologie obřích kolonií kmene *ade5,7Δ* se lišila oproti morfologii rodičovského kmene BY4742 výskytem papil v pozdní acidické fázi. Papily byly výraznější při kultivaci kmene *ade5,7Δ* na médiu

s přidavkem adeninu v koncentraci 20 a 80 mg/l a s 20 mg/l uracilu. Oproti paralelnímu pokusu bez přidavku uracilu 20 mg/l do média byly papily méně výrazné. Ve velikosti obřích kolonií obou kmenů v závěru kultivace jsem při měření jejich průměru nezaznamenala rozdíly (obr. 39).

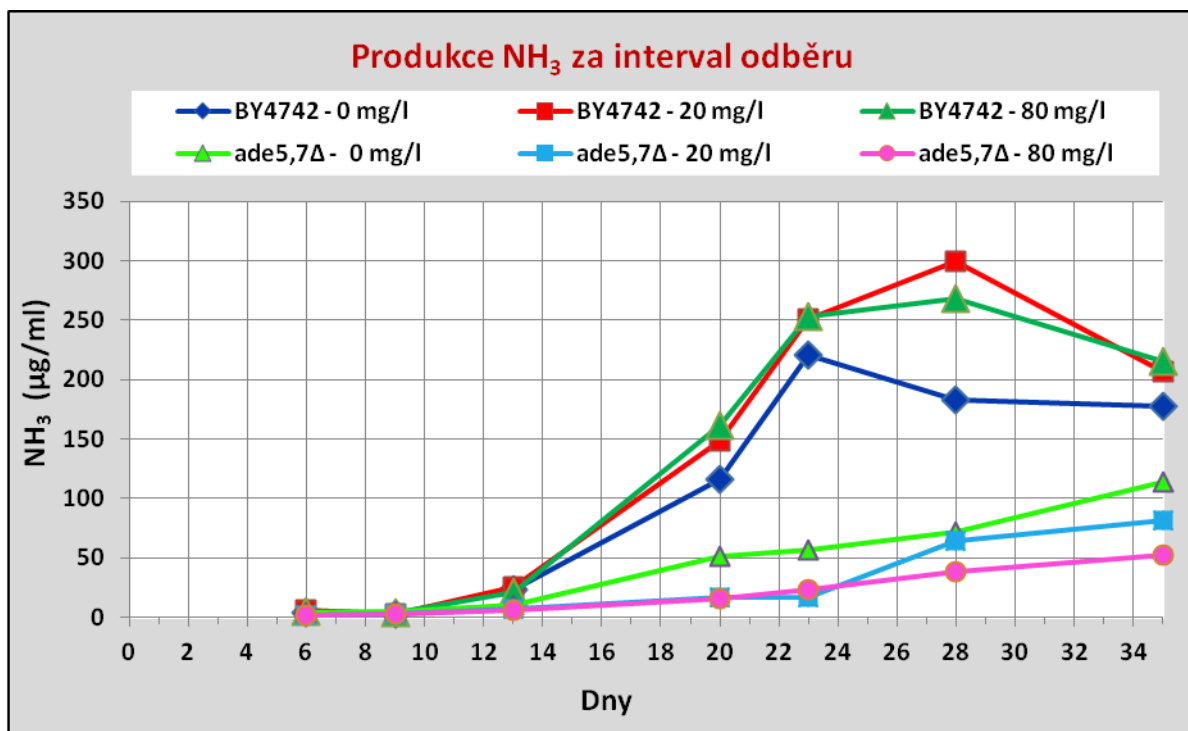
Kmen:	BY4742	BY4742	BY4742	<i>ade5,7Δ</i>	<i>ade5,7Δ</i>	<i>ade5,7Δ</i>
Adenin, c:	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l
Uracil, c:	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l
Den kultivace:						



**Obr. 39: Alkalizace a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu**

s 0, 20 a 80 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu. 6. až 13. den - acidická fáze. 17. – 30. den – alkalická fáze, druhý pulz. První alkalický pulz v důsledku produkce amoniaku v prvních 24 hod. po očkování není zachycen. Měřítka 10 mm.



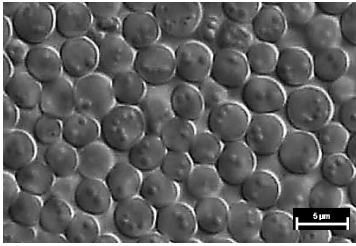


Obr. 40: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojice obřích kolonií na GM médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu u kmene BY4742 a kmene *ade5,7Δ*.

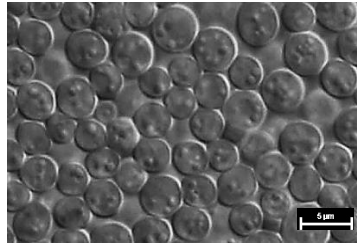
Při sledování vlivu adeninu a uracilu v médiu na morfologii buněk a diferenciaci jsem dokumentovala centrální oblast kolonie, opět na tenkých řezech připravených 15. den kultivace z okrajových kolonií příslušných kmenů kultivovaných v šesticích (kap. 3.2.6.). U obou kmenů došlo k diferenciaci buněk na typy U a L ve svrchní a spodní části obřích kolonií. Morfologie buněk i velikost buněk u kmene BY4742 byla srovnatelná při kultivaci na všech typech média. U kmene *ade5,7Δ* byly buňky typu U větší než u kmene BY4742 (obr. 41).

a) U buňky

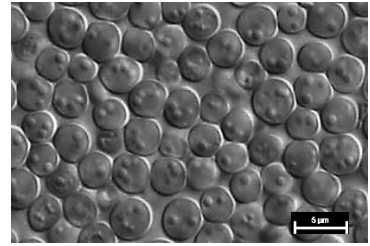
**BY4742**  
**0 mg/l**



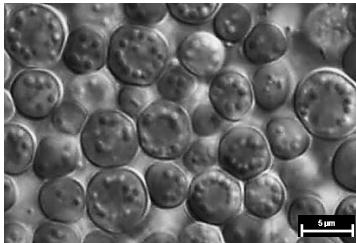
**BY4742**  
**20 mg/l**



**BY4742**  
**80 mg/l**



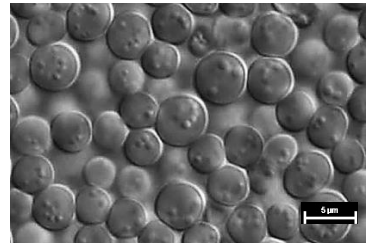
**ade5,7Δ**  
**0 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**20 mg/l**

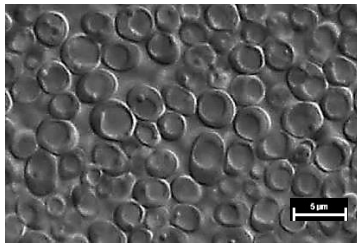


**ade5,7Δ**  
**80 mg/l**

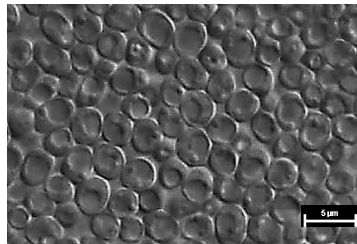


b) L buňky

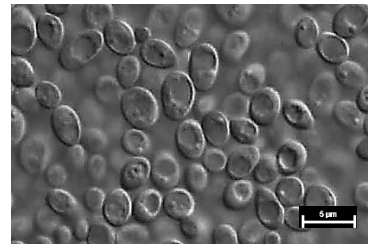
**BY4742**  
**0 mg/l**



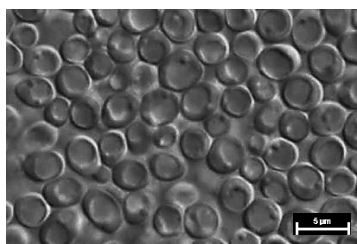
**BY4742**  
**20 mg/l**



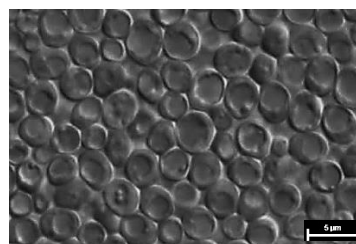
**BY4742**  
**80 mg/l**



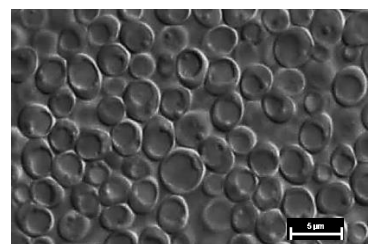
**ade5,7Δ**  
**0 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**20 mg/l**



**ade5,7Δ**  
**80 mg/l**



**Obr. 41: Morfologie buněk a diferenciace v obří kolonii kmenů BY4742 a *ade5,7Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu a 20 mg/l uracilu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm.**

### 4.3. Sledování vlivu extracelulární báze adeninu na vývoj obřích kolonií kmenů *S. cerevisiae* s delecemi vybraných genů účastnících se nukleotidového metabolismu

Kultivovala jsem dvojice a šestice obřích kolonií po dobu 35 dní při 28 °C na glycerolovém médiu s přídavkem adeninu v koncentracích 0, 20 a 80 mg/l a s indikátorem pH těchto kmenů:

- rodičovského kmene BY4742
- kmene *ade4Δ* s delecí genu ADE4 účastnícího se biosyntetické dráhy purinů *de novo*
- kmene *adk1Δ* s delecí genu ADK1 účastnícího se biosyntetické dráhy purinů *de novo*
- kmene *apt1Δ* s delecí genu APT1 účastnícího se šetřící dráhy biosyntézy purinů
- kmene *hpt1Δ* s delecí genu HPT1 účastnícího se šetřící dráhy biosyntézy purinů
- kmene *fcy22Δ* s delecí genu FCY22 účastnícího se šetřící dráhy biosyntézy purinů.

#### 4.3.1. Alkalizace média

Byly zjištěny značné rozdíly v alkalizaci média koloniemi rodičovského kmene BY4742 a kmenů s deletovanými geny. U rodičovského kmene byla zjištěna plná alkalická fáze 20. den kultivace. U kmenů s deletovanými geny byla 20. den kultivace zaznamenána alkalická fáze pouze u kmene *ade4Δ* na médiu s koncentrací 0 mg/l přidaného adeninu (obr. 41). Nejčasnější nástup alkalické fáze byl zjištěn 10. den u kmene *adk1Δ* na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu, přičemž zbarvení média v časně alkalické fázi bylo odlišné (hnědočervená až hnědofialová barva) než v počátcích alkalické fáze rodičovského kmene (fialová barva) (obr. 43).

O 4 dny byl opožděn nástup alkalické fáze oproti rodičovskému kmeni u kolonií těchto kmenů: u kmene *ade4Δ* na médiu s 20 mg/l adeninu (na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu nebyla alkalizace média viditelná) (obr. 41); u kmene *apt1Δ* (obr. 45) na všech koncentracích přidaného adeninu do média ve slabé intenzitě, u kmene *hpt1Δ* (obr. 47) ve slabé intenzitě, u kmene *fcy22Δ* (obr. 49) ve velmi slabé intenzitě. 31. den kultivace nebyl u rodičovského kmene BY4742 ani u kmenů s delecemi v genech nukleotidového metabolismu viditelný přechod do druhé acidické fáze. U kmenů *apt1Δ* a *hpt1Δ* na médiu s 0 mg/l přidaného adeninu a u *ade4Δ* na médiu s 80 mg/l adeninu nebyla 31. den kultivace viditelná alkalizace média. U všech kmenů s deletovanými geny byla zjištěna výrazně slabší intenzita alkalizace oproti kmeni BY4742 s výjimkou kmene *adk1Δ*, u kterého došlo k časnějšímu nástupu alkalické

fáze a zvyšování intenzity alkalizace v průběhu kultivace. Rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média se potvrdily u kolonií kmene *ade4Δ*, kdy na médiu s koncentrací 0 mg/l přidaného adeninu v médiu byla intenzita alkalizace výrazně silnější oproti kultivaci tohoto kmene na médiu s koncentrací 20 a 80 mg/l přidaného adeninu do média (obr. 41). U dalších kmenů s deletovanými geny nebyly rozdíly v intenzitě alkalizace v závislosti na koncentraci přidaného adeninu v médiu výrazné s výjimkou kmene *hpt1Δ*, u kterého byla zjištěna silnější alkalizace na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu 31. den kultivace (obr. 47).

#### 4.3.2. Produkce amoniaku

U kolonií kmene BY4742 byl zjištěn počátek produkce amoniaku mezi 17. a 20. dnem kultivace. Produkce amoniaku byla vyrovnaná a nebyly zjištěny výrazné rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média až do 31. dne kultivace, kdy se nejvyšší produkce amoniaku projevila při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu v médiu a nejnižší produkce při kultivaci na médiu s 0 mg/l přidaného adeninu. Produkce se plynule zvyšovala po celou dobu kultivace a maximální produkce byla zjištěna 31. den kultivace. Nebyl zjištěn pokles produkce amoniaku a přechod do druhé acidické fáze (obr. č. 41 a 42). U kmenů s delecemi v genech nukleotidového metabolismu byla zjištěna výrazně nižší produkce amoniaku oproti rodičovskému kmeni BY4742 s výjimkou kmene *adk1Δ* (obr. 41, 43, 45, 47 a 49).

U kolonií kmene *ade4Δ* byl zjištěn počátek produkce amoniaku na médiu s 0 mg/l přidaného adeninu mezi 20. a 23. dnem kultivace (tj. o 3 dny později oproti rodičovskému kmeni), na médiu s 20 mg/l adeninu byl zjištěn velmi mírný vzestup produkce 27. den kultivace (tj. o 7 dní později oproti rodičovskému kmeni) a na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu došlo k vzestupu produkce až 31. den kultivace (tj. o 11 dní později oproti rodičovskému kmeni). Maximální hodnoty produkce amoniaku byly zjištěny 31. den kultivace při kultivaci na všech použitých přidaných koncentracích adeninu v médiu. Pokles produkce amoniaku značící přechod kolonií do druhé acidické fáze nebyl zaznamenán (obr. 42).

U kolonií kmene *adk1Δ* byl zjištěn počátek produkce amoniaku mezi 14. a 17. dnem kultivace (tj. o 3 dny dříve oproti rodičovskému kmeni) při kultivaci na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu, přičemž mírně vyšší produkce byla zjištěna

při kultivaci na médiu s 20 mg/l přidaného adeninu. Produkce amoniaku se plynně zvyšovala při kultivaci na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu, přičemž mírně vyšší produkce byla zjištěna od 20. dne kultivace na médiu bez přidaného adeninu. Oproti rodičovskému kmeni byly hodnoty produkce amoniaku tohoto kmene mírně vyšší mezi 14. a 20. dnem kultivace na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu. Od 23. dne kultivace do 27. dne kultivace se hodnoty produkce amoniaku velmi shodovaly u kolonií *adk1Δ* na médiu s 0 mg/l přidaného adeninu v médiu s rodičovským kmenem kultivovaným na médiu s 20 mg/l přidaného adeninu a u *adk1Δ* na médiu s 20 mg/l přidaného adeninu v médiu s rodičovským kmenem kultivovaným na médiu bez přidaného adeninu. U kolonií *adk1Δ* na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu v médiu se hodnoty produkce blížily hodnotám při kultivaci tohoto kmene na médiu s 20 mg/l přidaného adeninu. Maximální hodnota produkce amoniaku byla zjištěna při kultivaci kolonií na médiu s 20 a 80 mg/l přidaného adeninu 27. den kultivace a při kultivaci na médiu s 0 mg/l přidaného adeninu 31. den kultivace. Pokles produkce amoniaku byl zjištěn u kolonií tohoto kmene při kultivaci na médiu s 20 mg/l adeninu, přičemž při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu byla tento den zaznamenána stagnace produkce (obr. 44).

U kolonií kmene *apt1Δ* byla produkce velice nízká oproti rodičovskému kmeni. Velice mírný vzestup byl zjištěn 23. den kultivace při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu. Počátek produkce amoniaku byl zjištěn až 31. den kultivace (tj. o 11 dní později oproti rodičovskému kmeni, a to ve velmi nízkých hodnotách (oproti rodičovskému byla maximální zjištěná produkce nižší až o cca 90 %). Hodnoty produkce se nelišily v závislosti na koncentraci přidaného adeninu v médiu do 27. dne kultivace, přičemž 31. den kultivace byla zjištěna jen mírně vyšší hodnota produkce amoniaku při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu (obr. 46).

U kolonií kmene *hpt1Δ* byla produkce taktéž velice nízká oproti rodičovskému kmeni. Velice mírný vzestup byl zjištěn 23. den kultivace při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu. Vzestup produkce byl zaznamenán až 31. den kultivace (tj. o 11 dní později oproti rodičovskému kmeni, přičemž při kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l přidaného adeninu byly hodnoty produkce shodné (obr. 48: křivky na grafu se překrývají) a byly vyšší než při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu. Maximální produkce amoniaku byla zjištěna 31. den kultivace a byla cca o 90 % nižší oproti rodičovskému kmeni. Maximální produkce amoniaku, zjištěná 31. den kultivace

při kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l přidaného adeninu byla oproti kultivaci na médiu bez přidaného adeninu vyšší o cca 50% (obr. 48).

U kolonií kmene *fcy22Δ* byl zjištěn počátek produkce amoniaku 23. den kultivace (tj. o 3 dny později oproti rodičovskému kmeni), přičemž mírně vyšší produkce byla zjištěna při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného adeninu. Produkce se plynule zvyšovala a její maximální hodnoty byly zjištěny 31. den kultivace při kultivaci na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu, přičemž mírně vyšší intenzita produkce byla tento den zaznamenána při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu oproti kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l přidaného adeninu (obr. 50).

### 4.3.3. Morfologie obřích kolonií

Morfologie obřích kolonií rodičovského kmene BY4742 byla obvyklá: tvar kruhový, barva krémová, bez tvorby papil, od cca 12. dne s výskytem ojedinělých sektorů. Morfologie obřích kolonií kmenů s delecemi genů se lišily oproti rodičovskému kmeni.

U kolonií kmene *ade4Δ* se v acidické fázi (16. den kultivace) při kultivaci na koncentracích přidaného adeninu 20 a 80 mg/l v médiu objevily papily, jejichž výskyt i velikost se zvyšovaly s dobou kultivace. Při kultivaci tohoto kmene na médiu bez přidaného adeninu se papily objevovaly také, ale byly jemnější a menší. Ve velikosti kolonií oproti kmeni BY4742 ani v závislosti na koncentraci přidaného adeninu v médiu nebyly při měření průměru kolonií zaznamenány výrazné rozdíly (obr. 41).

U kolonií kmene *adk1Δ* na všech koncentracích přidaného adeninu do média se projevil výrazný rozdíl v morfologii kolonií oproti kmeni BY4742. Kolonie byly od počátku kultivace nepravidelného tvaru a velikosti, tmavé šedohnědé barvy s četnými světlejšími šedavými vyrůstajícími sektory. V pozdější alkalické fázi (od 10. dne kultivace) se na povrchu kolonií nepravidelně objevovaly ojedinělé světlé papily či světlé okrsky buněk. Ve velikosti kolonií oproti kmeni BY4742 byl zjištěn výrazný rozdíl při měření průměru kolonií. Tvar kolonií byl nepravidelný a velikost proměnlivá, avšak kolonie byly zřetelně menší oproti rodičovskému kmeni BY4742 (obr. 43).

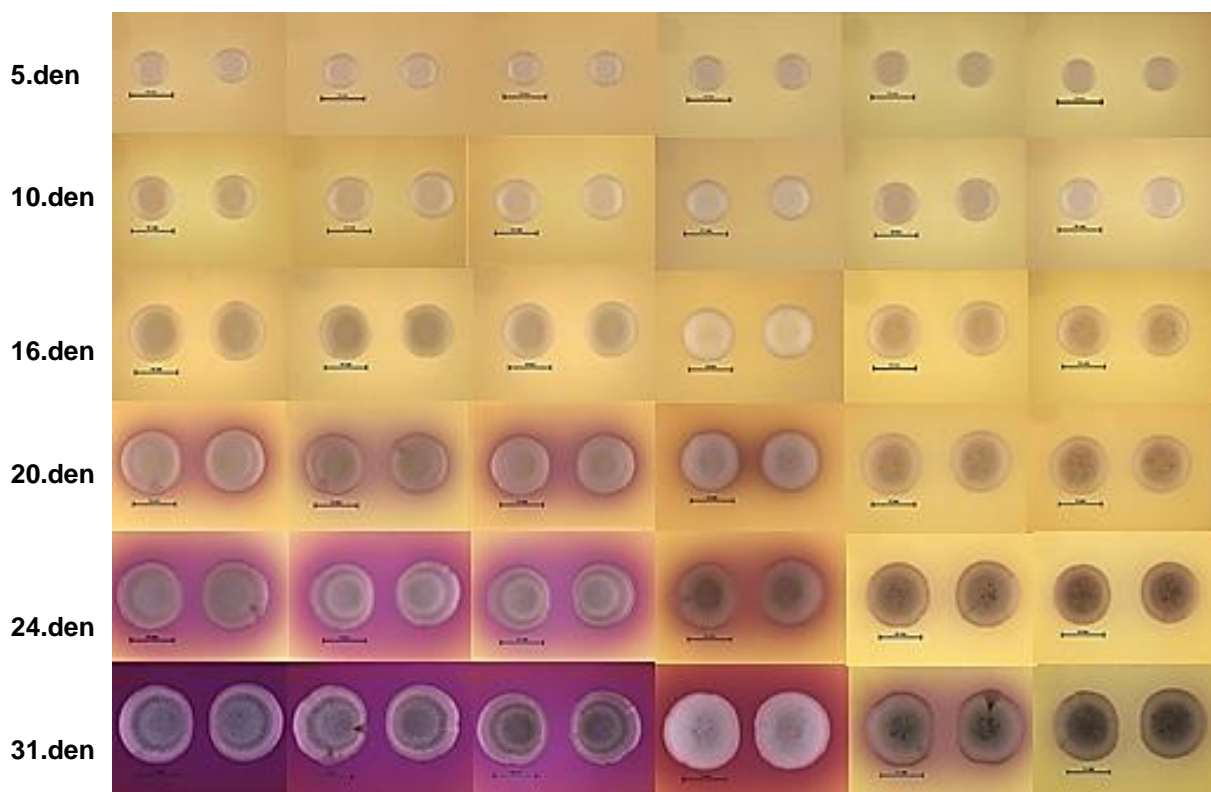
Kolonie kmene *apt1 Δ* se morfologicky lišily oproti kmeni BY4742 tvorbou papil, která se projevila v pozdní acidické fázi (od 16. dne kultivace) a tvorbou ojedinělých tmavších sektorů (od 20. dne kultivace) při kultivaci na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu. Ve velikosti obřích kolonií

na všech typech média nebyly při měření jejich průměru v závěru kultivace zjištěny rozdíly oproti kmeni BY4742 nebo v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média (obr. 45).

Morfologie kolonií kmene *hpt1Δ* se lišila oproti kmeni BY4742 výskytem papil v pozdní acidické fázi (od 16. dne kultivace). Ojedinělé tmavší sektory se projevily až v závěru kultivace (31. den). Ve velikosti obřích kolonií na všech typech média nebyly při měření jejich průměru v závěru kultivace měřítkem 10 mm zjištěny rozdíly oproti kmeni BY4742 nebo v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média (obr. 47).

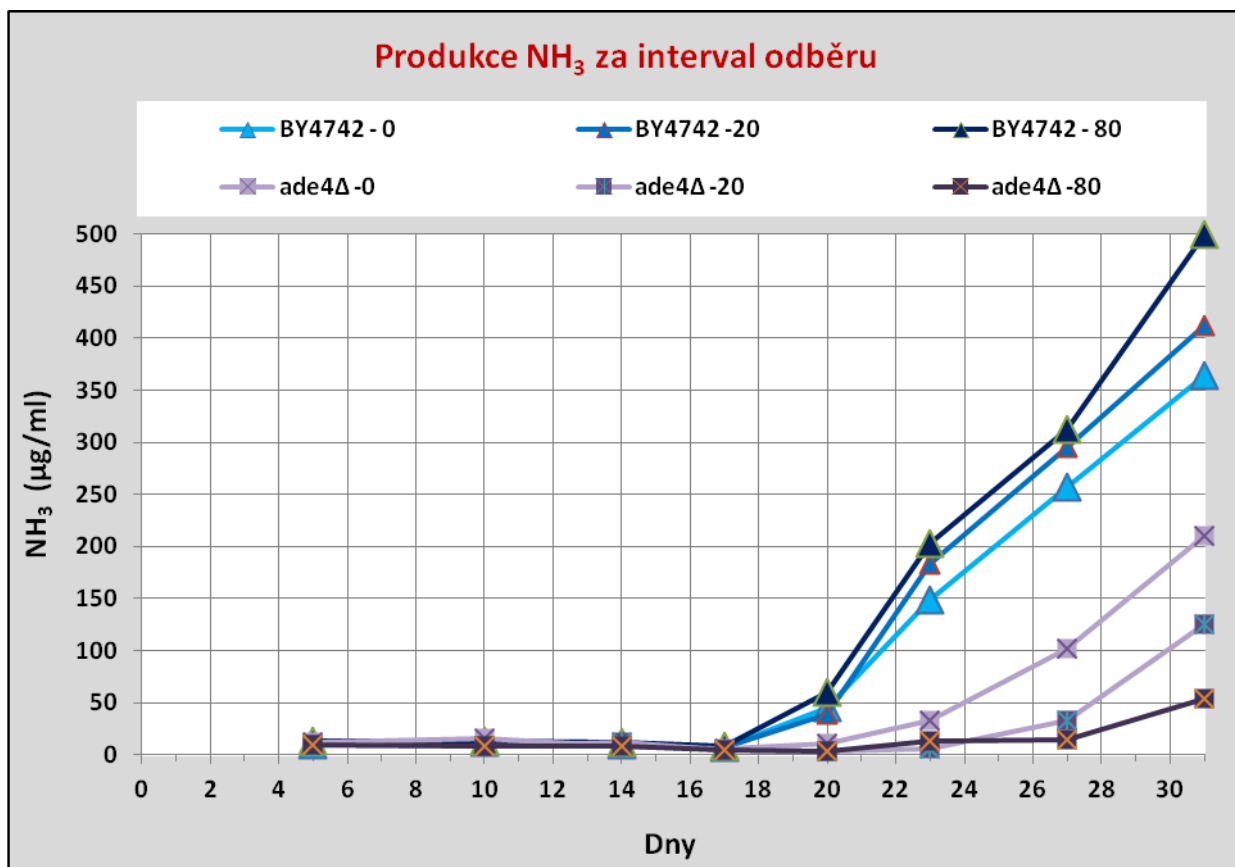
Kolonie kmene *fcy22Δ* se lišily v morfologii oproti kmeni BY4742 výskytem papil v acidické fázi od 20. dne kultivace, tvorba sektorů nebyla patrná. Ve velikosti obřích kolonií na všech typech média nebyly při měření jejich průměru v závěru kultivace zjištěny rozdíly oproti kmeni BY4742 nebo v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média (obr. 49).

Kmen:	BY4742	BY4742	BY4742	<i>ade4Δ</i>	<i>ade4Δ</i>	<i>ade4Δ</i>
Adenin, c:	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	0 mg/l	0 mg/l	80 mg/l
Den kultivace:						



Obr. 41: Alkalizace média a morfologie obřích koloniř kmenů BY4742 a *ade4Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz). Měřítko: 10 mm.



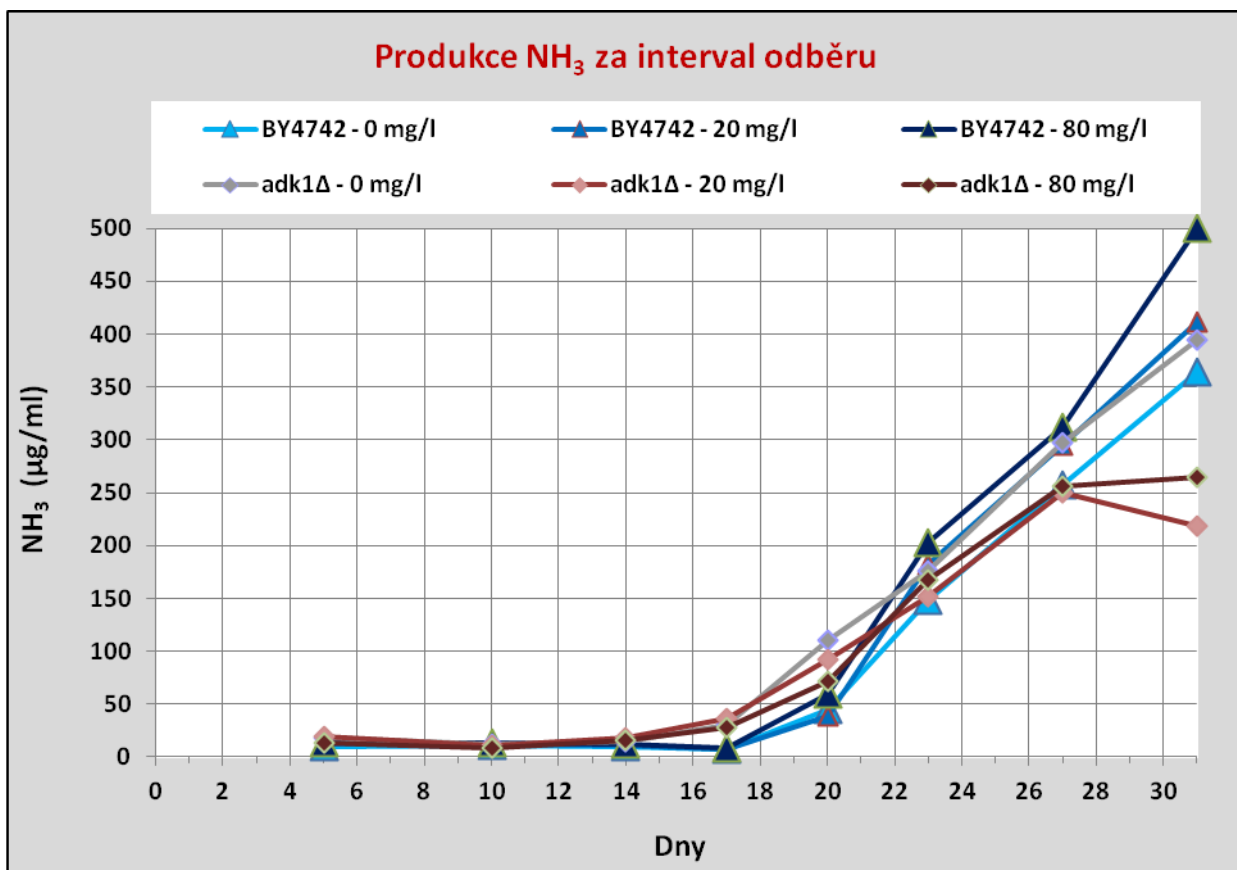


Obr. 42: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a *ade4Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu.

Kmen:	BY4742	BY4742	BY4742	<i>adk1Δ</i>	<i>adk1Δ</i>	<i>adk1Δ</i>
Adenin, c:	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l
Den kultivace:						



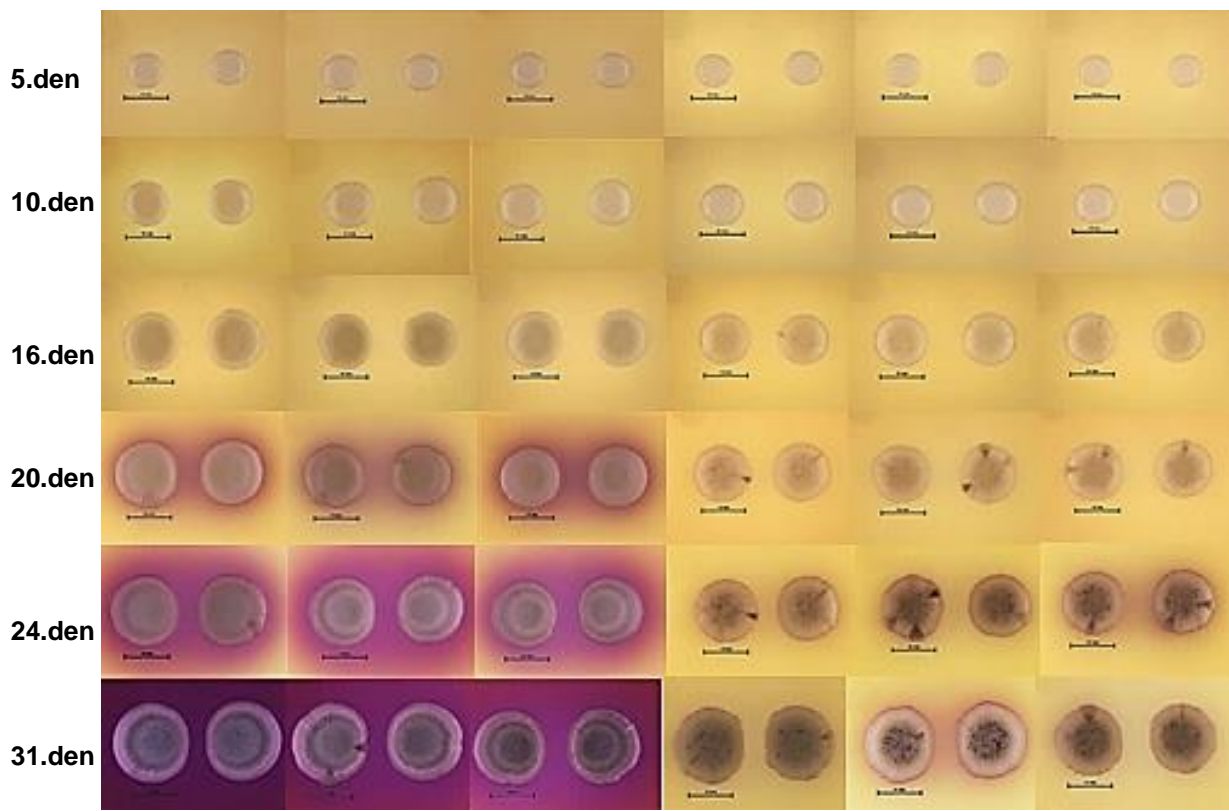
Obr. 43: Alkalizace média a morfologie obřích koloniř kmenů BY4742 a *adk1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz). Měřitko: 10 mm.



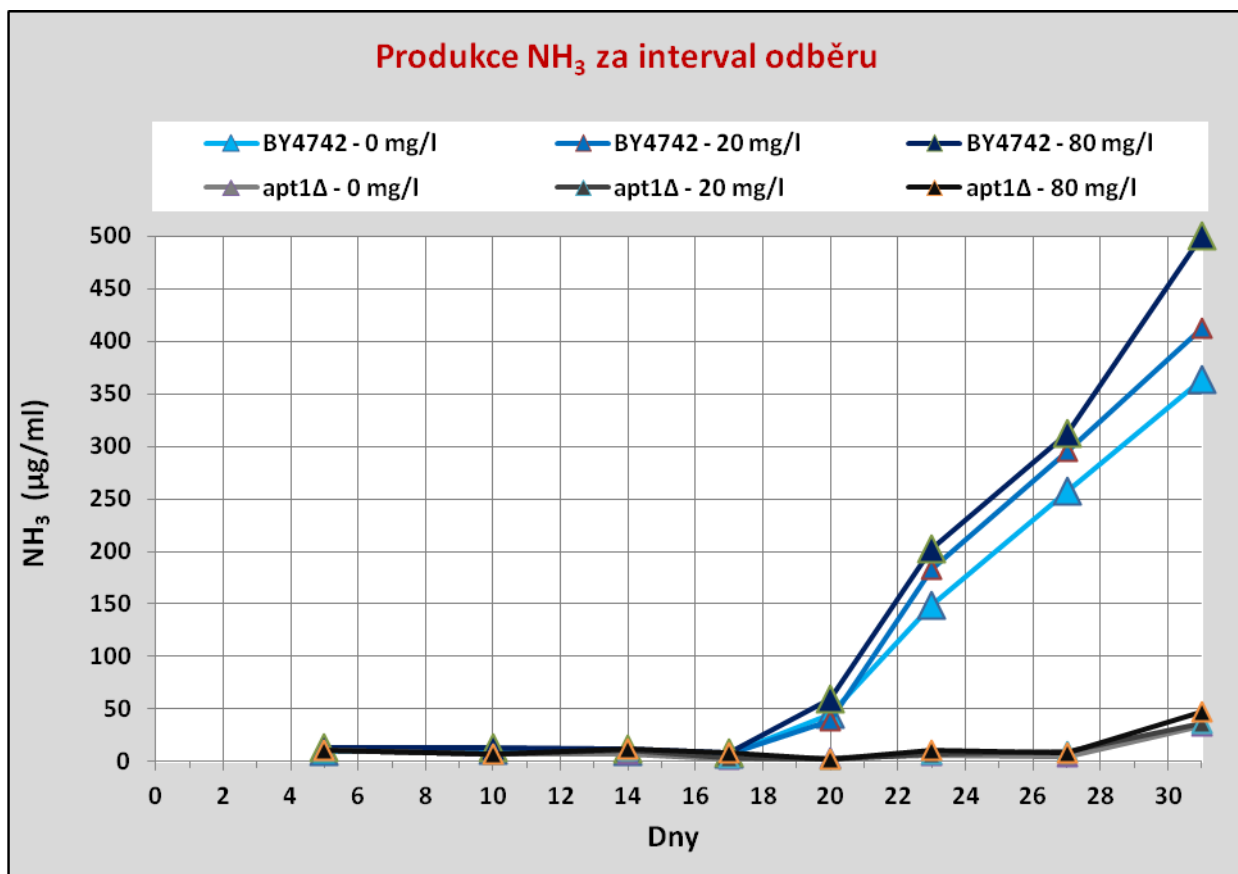
Obr.44: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a *adk1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz).

Kmen:      **BY4742**      **BY4742**      **BY4742**      *apt1Δ*      *apt1Δ*      *apt1Δ*  
 Adenin, c: **0 mg/l**      **20 mg/l**      **80 mg/l**      **0 mg/l**      **20 mg/l**      **80 mg/l**

Den kultivace:



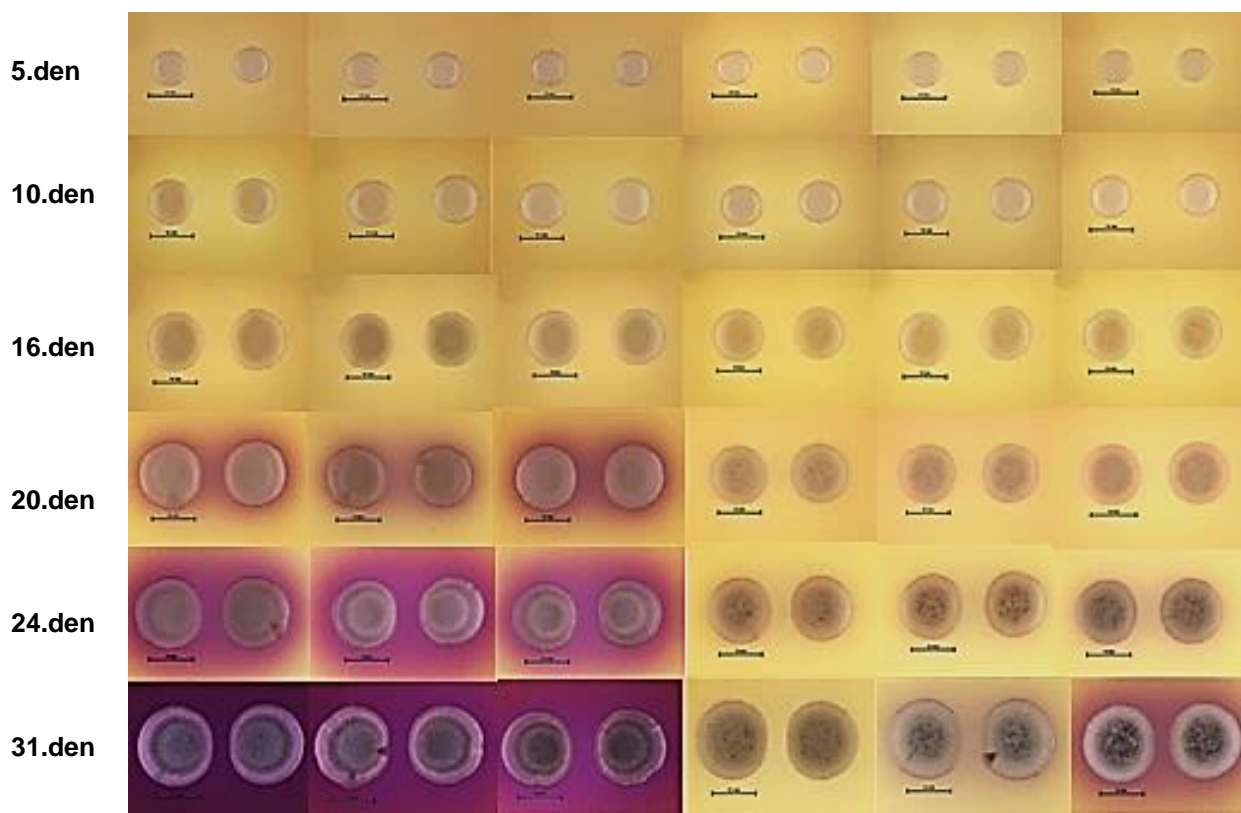
Obr. 45: Alkalizace média a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 a *apt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz). Měřítko: 10 mm.



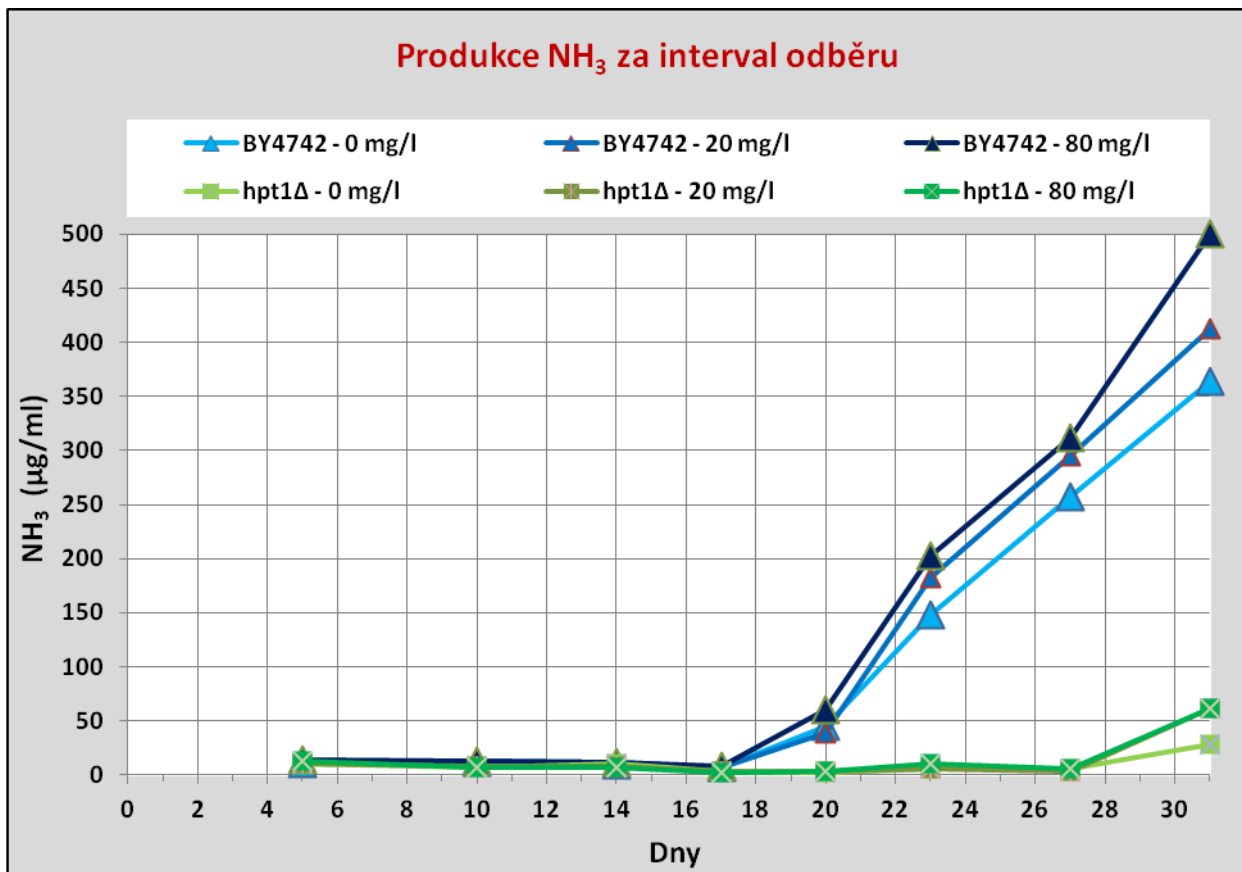
Obr. 46: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a *apt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz).

Kmen:	BY4742	BY4742	BY4742	<i>hpt1Δ</i>	<i>hpt1Δ</i>	<i>hpt1Δ</i>
Adenin, c:	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	0 mg/l	20 mg/l	80 mg/l

Den kultivace:



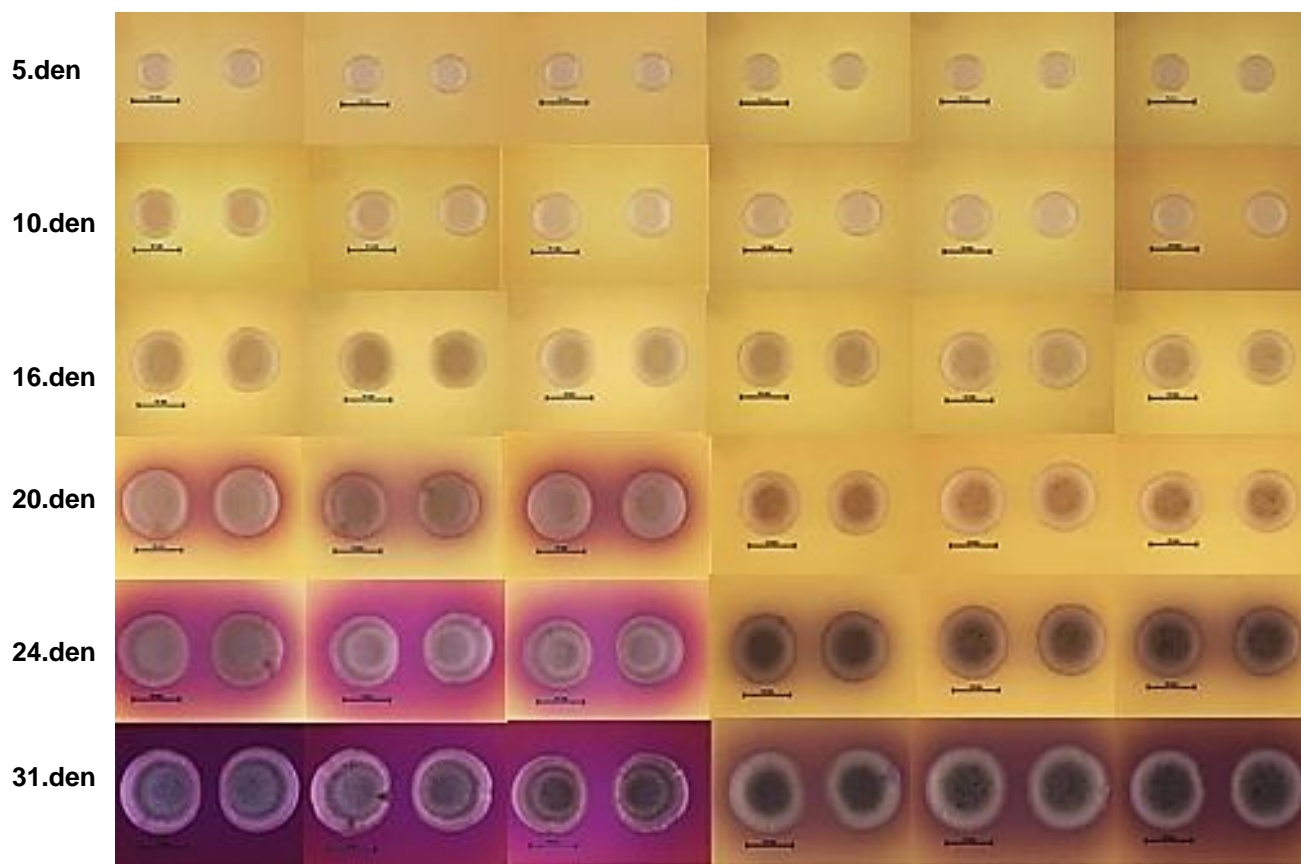
Obr. 47: Alkalizace média a morfologie obřích koloniř kmenů BY4742 a *hpt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz). Měřitko: 10 mm.



**Obr. 48:** Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a *hpt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz).

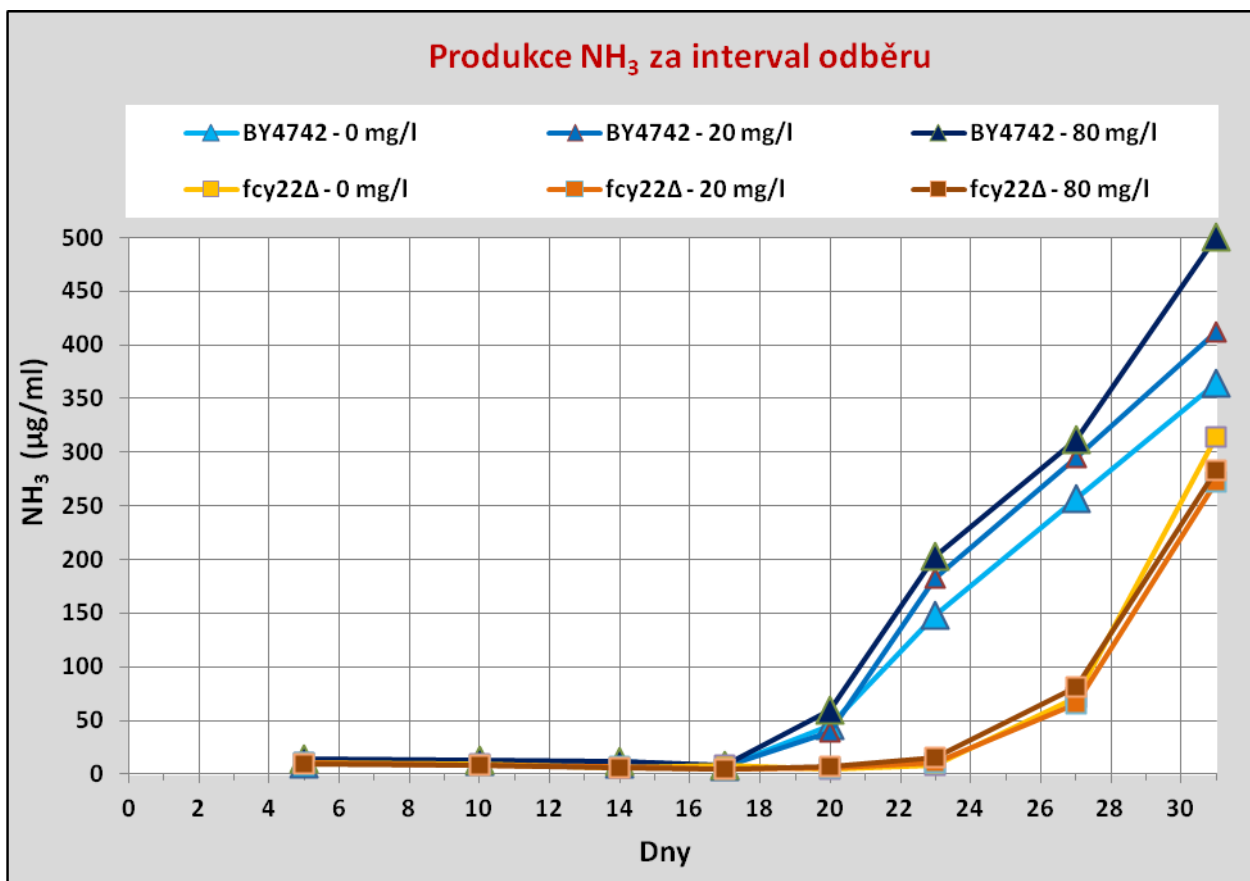
Kmen:       BY4742       BY4742       BY4742       *fcy22Δ*       *fcy22Δ*       *fcy22Δ*  
 Adenin, c:  0 mg/l       20 mg/l       80 mg/l       0 mg/l       20 mg/l       80 mg/l

Den kultivace:



Obr. 49: Alkalizace média a morfologie obřích kolonií kmenů BY4742 a *fcy22Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz). Měřítko: 10 mm.





Obr. 50: Produkce amoniaku v průběhu kultivace dvojic obřích kolonií kmene BY4742 a *fcy22Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu (druhý pulz).

#### 4.3.4. Morfologie buněk a diferenciaci

Abych zjistila, zda delece genů účastnících se nukleotidového metabolismu a přidavek adeninu do média mohou mít vliv na morfologii buněk a diferenciaci uvnitř obřích kolonií rodičovského kmene BY4742 a kmenů s delecemi vybraných genů účastnících se nukleotidového metabolismu, připravila jsem z okrajových kolonií šestic 15. a 16. den kultivace tenké řezy a dokumentovala morfologii buněk a diferenciaci v centrální oblasti kolonie (kap. 3.2.6).

U rodičovského kmene a kmenů *ade4Δ*, *apt1Δ*, *hpt1Δ* a *fcy22Δ* došlo k diferenciaci buněk na typy U a L na všech koncentracích přidaného adeninu v médiu ve svrchní a spodní části obřích kolonií (obr. 51, 53, 54 a 55).

Morfologie buněk i velikost buněk u kolonií kmene BY4742 byla srovnatelná při kultivaci na všech koncentracích adeninu v médiu (obr. 51).

U kolonií kmene *ade4Δ* na médiu bez přidaného adeninu v médiu byly buňky typu U výrazně větší než u kmene BY4742, ale při kultivaci tohoto kmene na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu v médiu byl rozdíl ve velikosti buněk méně výrazný. Buňky typu L u kmene *ade4Δ* při kultivaci na médiu s 0 a 20 mg/l přidaného adeninu byly mírně větší oproti buňkám typu L kmene BY4742 a obsahovaly větší vakuoly (obr. 51).

U kolonií kmene *adk1Δ* byla morfologie buněk významně pozmeněná při kultivaci na všech koncentracích adeninu v médiu a buňky měly větší velikost oproti rodičovskému kmeni BY4742. V kolonii se nacházely částečně lyzované buňky a dále buňky typu U větší velikosti oproti kmeni BY4742, dále buňky protáhlého tvaru (hlavně v papílách) nebo buňky s velkou vakuolou, ale morfologií typu U. V dolní části kolonie v kontaktu s médiem se nacházela vrstva nepoškozených U buněk s ojedinělým výskytem buněk typu L nebo vrstvy buněk s přechodnou morfologií mezi typem U a L – např. větší buňky kulatého až mírně oválného tvaru s jednou větší vakuolou (obr. 52).

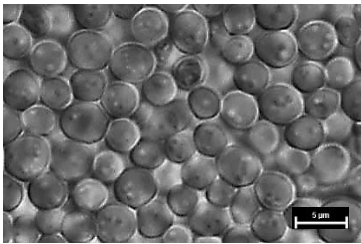
Kolonie kmene *apt1Δ* měly U a L buňky při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu větší velikost oproti U a L buňkám rodičovského kmene. Při kultivaci na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu v médiu nebyl rozdíl ve velikosti buněk tak výrazný. Buňky L tohoto kmene při kultivaci na médiu s 0 a 20 mg/l přidaného adeninu v médiu měly často velké vakuoly (obr. 53).

U kolonií kmene *hpt1Δ* při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu byla taktěž zjištěna větší velikost U a L buněk oproti U a L buňkám rodičovského kmene, přičemž na médiu s 20 a 80 mg/l adeninu v médiu nebyl zjištěn tak výrazný rozdíl ve velikosti buněk.

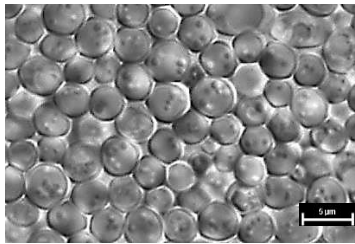
U buněk typu L tohoto kmene při kultivaci na médiu s 0 a 20 mg/l přidaného adeninu v médiu se často vyskytovaly velké vakuoly (obr. 54). U kolonií kmene *fcy22Δ* nebyly zjištěny výrazné rozdíly v morfologii a velikosti buněk a diferenciaci uvnitř obří kolonie v porovnání s rodičovským kmenem (obr. 55).

a) U buňky

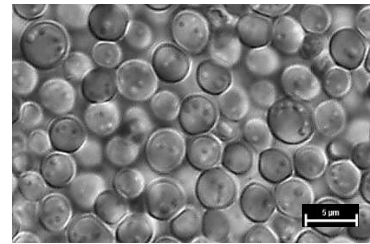
**BY4742**  
**0 mg/l**



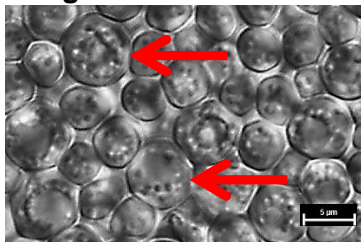
**BY4742**  
**20 mg/l**



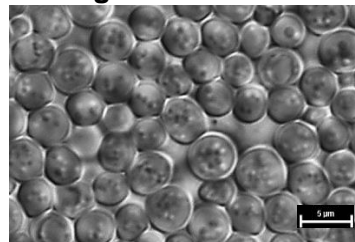
**BY4742**  
**80 mg/l**



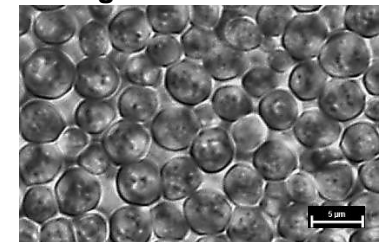
**ade4Δ**  
**0 mg/l**



**ade4Δ**  
**20 mg/l**

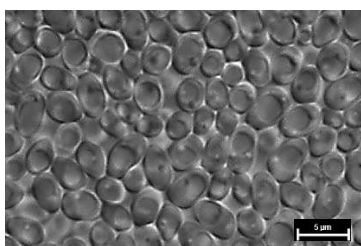


**ade4Δ**  
**80 mg/l**

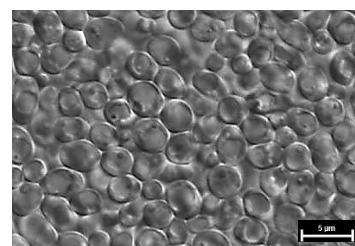


b) L buňky

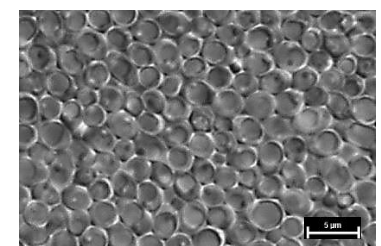
**BY4742**  
**0 mg/l**



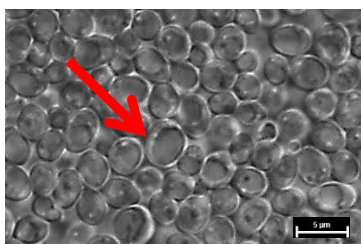
**BY4742**  
**20 mg/l**



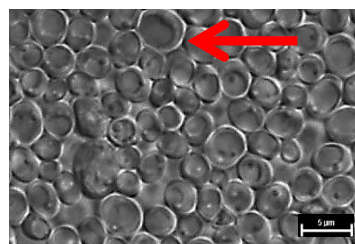
**BY4742**  
**80 mg/l**



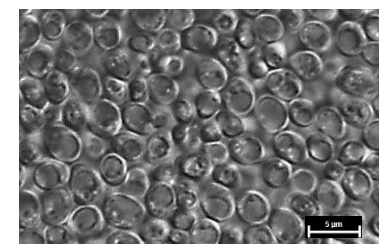
**ade4Δ**  
**0 mg/l**



**ade4Δ**  
**20 mg/l**



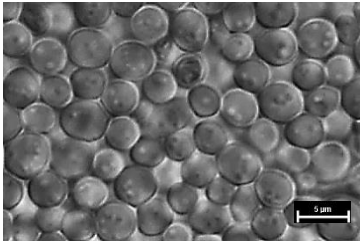
**ade4Δ**  
**80 mg/l**



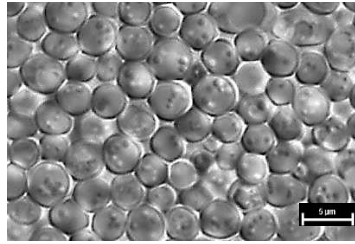
**Obr. 51: Morfologie buněk a jejich diferenciaci v obří kolonii kmenů BY4742 a *ade4Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm. Červené šipky označují buňky typu U větší velikosti oproti buňkám rodičovského kmene, buňky typu L větší velikosti a s větší vakuolou oproti buňkám typu L rodičovského kmene.**

a) U buňky

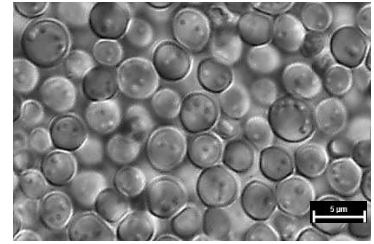
**BY4742**  
**0 mg/l**



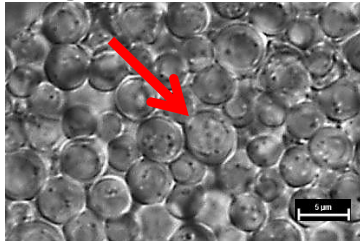
**BY4742**  
**20 mg/l**



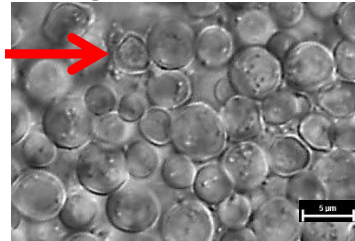
**BY4742**  
**80 mg/l**



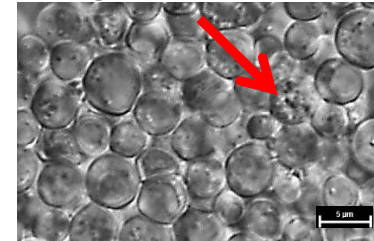
***adk1Δ***  
**0 mg/l**



***adk1Δ***  
**20 mg/l**

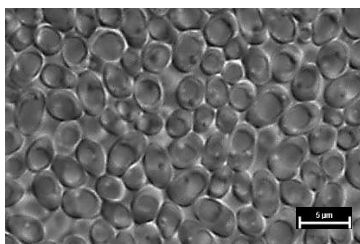


***adk1Δ***  
**80 mg/l**

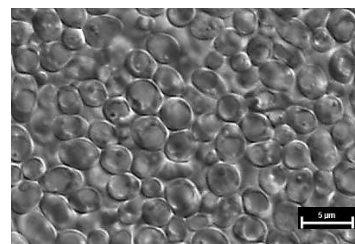


b) L buňky

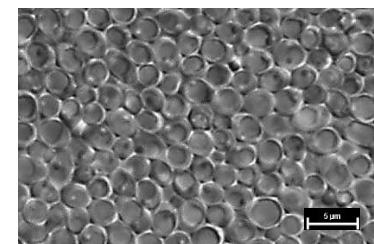
**BY4742**  
**0 mg/l**



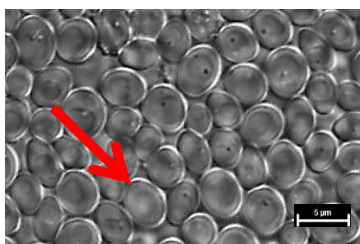
**BY4742**  
**20 mg/l**



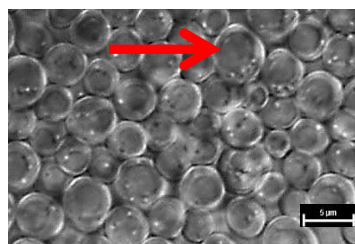
**BY4742**  
**80 mg/l**



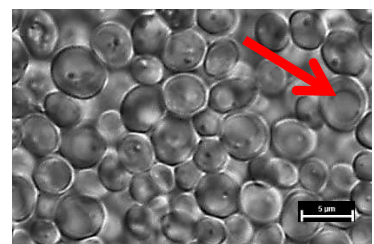
***adk1Δ***  
**0 mg/l**



***adk1Δ***  
**20 mg/l**



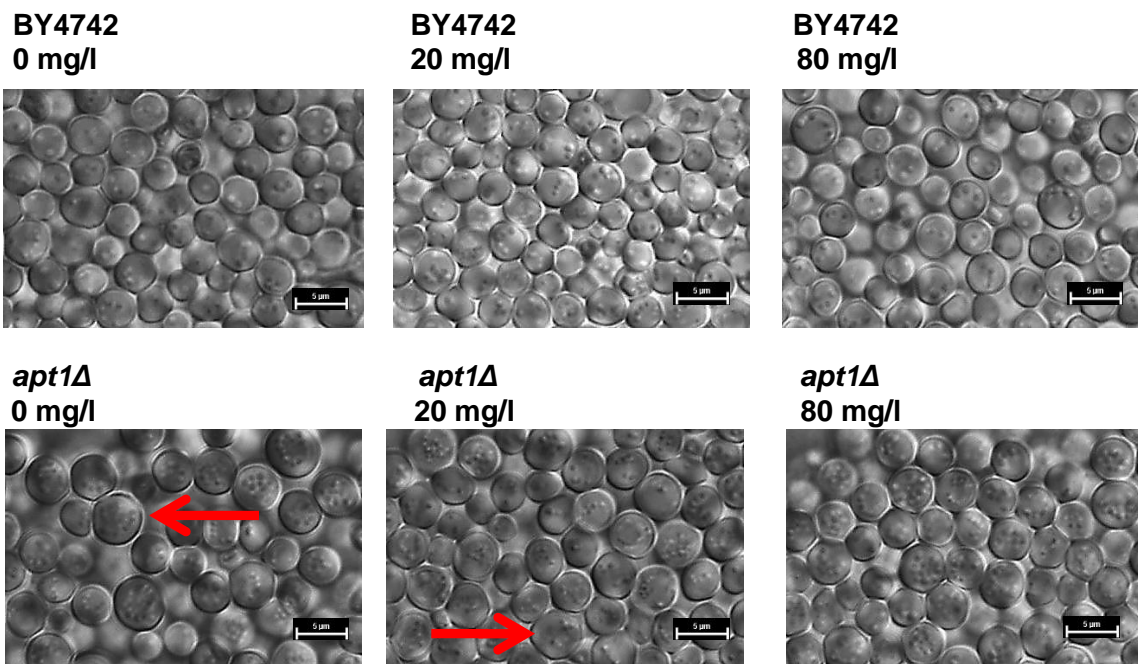
***adk1Δ***  
**80 mg/l**



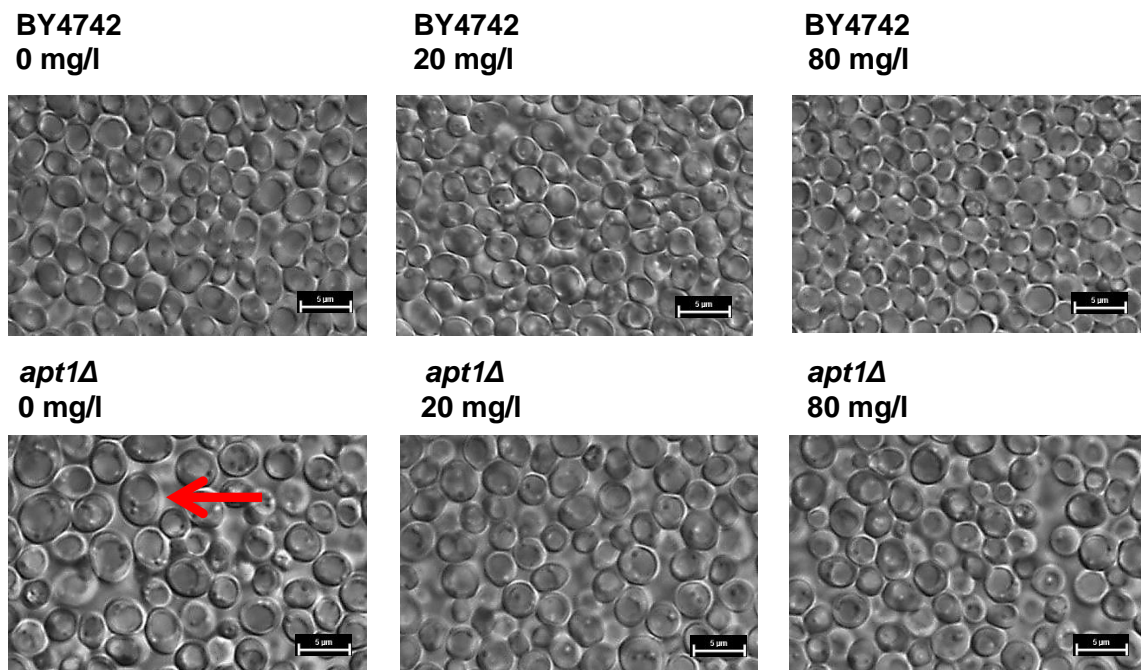
**Obr. 52: Morfologie buněk a jejich diferenciace v obří kolonii kmenů BY4742 a *adk1Δ* na médiu**

s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítko 5 µm. Červené šipky označují buňky větší velikosti oproti buňkám rodičovského kmene, lyzované buňky a kulaté buňky s velkou vakuolou s morfologií na přechodu typu U a L ve spodní části kolonie.

a) U buňky



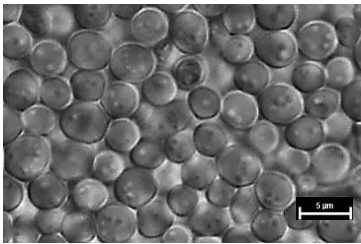
b) L buňky



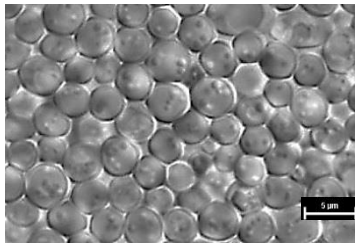
**Obr. 53: Morfologie buněk a jejich diferenciaci v obří kolonii kmenů BY4742 a *apt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5  $\mu$ m. Červené šipky označují buňky typu U větší velikosti oproti buňkám rodičovského kmene a buňky typu L větší velikosti s velkou vakuolou ve spodní části kolonie.**

a) U buňky

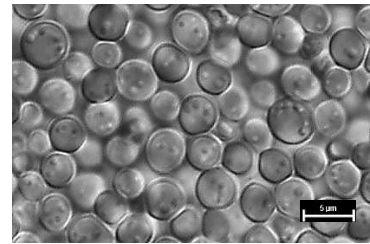
**BY4742**  
**0 mg/l**



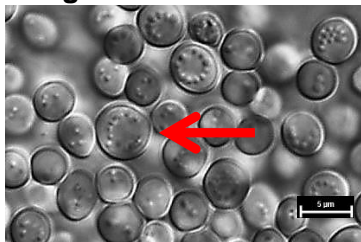
**BY4742**  
**20 mg/l**



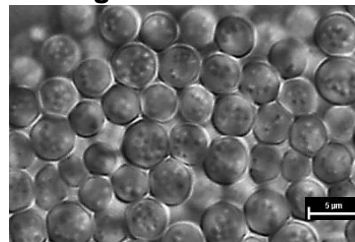
**BY4742**  
**80 mg/l**



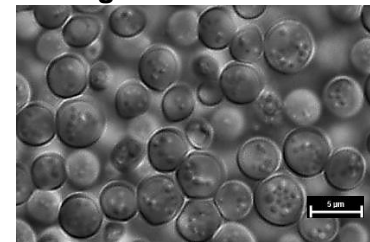
***hpt1Δ***  
**0 mg/l**



***hpt1Δ***  
**20 mg/l**

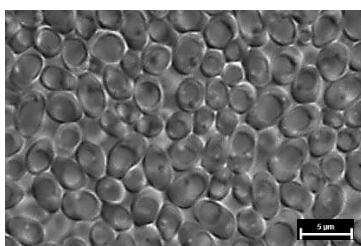


***hpt1Δ***  
**80 mg/l**

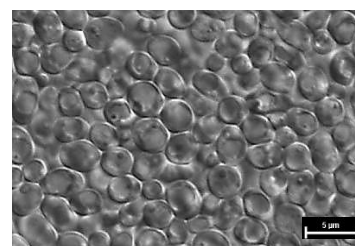


b) L buňky

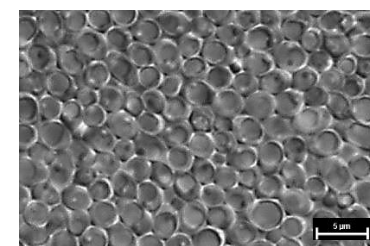
**BY4742**  
**0 mg/l**



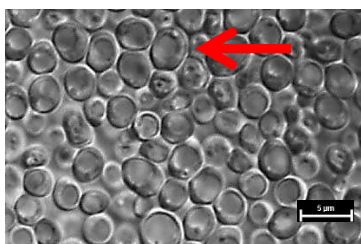
**BY4742**  
**0 mg/l**



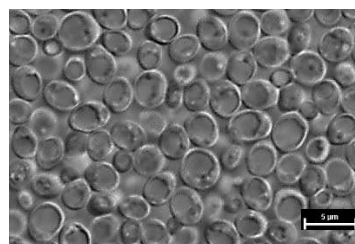
**BY4742**  
**80 mg/l**



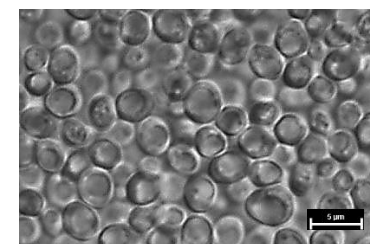
***hpt1Δ***  
**0 mg/l**



***hpt1Δ***  
**20 mg/l**



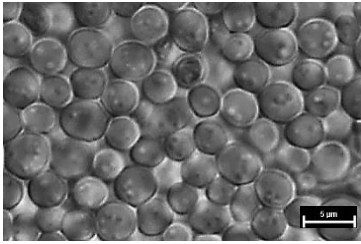
***hpt1Δ***  
**80 mg/l**



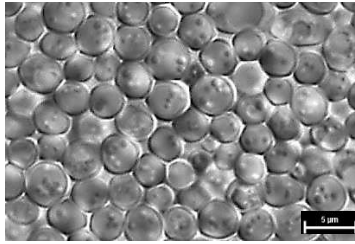
**Obr. 54: Morfologie buněk a jejich diferenciaci v obří kolonii kmenů BY4742 a *hpt1Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm. Červené šipky označují buňky typu U větší velikosti oproti buňkám rodičovského kmene a buňky typu L větší velikosti s velkou vakuolou ve spodní části kolonie.**

a) U buňky

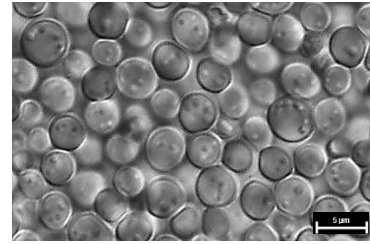
**BY4742**  
**0 mg/l**



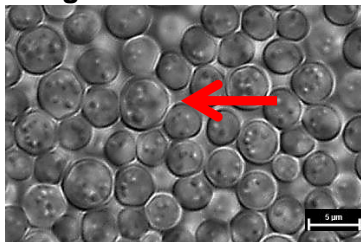
**BY4742**  
**20 mg/l**



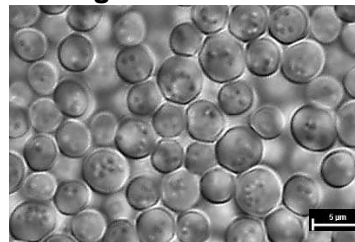
**BY4742**  
**80 mg/l**



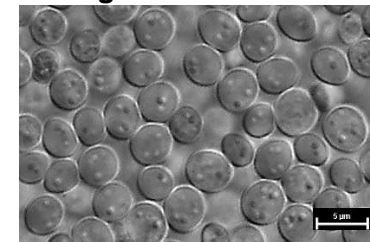
***fcy22Δ***  
**0 mg/l**



***fcy22Δ***  
**20 mg/l**

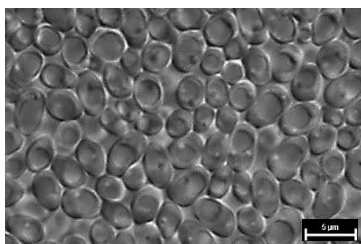


***fcy22Δ***  
**80 mg/l**

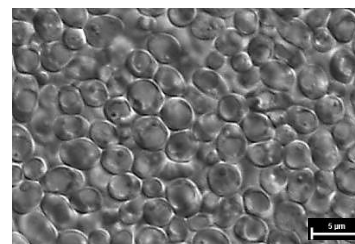


b) L buňky

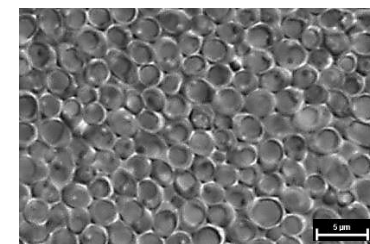
**BY4742**  
**0 mg/l**



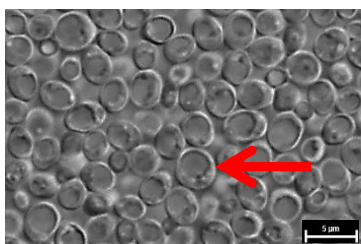
**BY4742**  
**20 mg/l**



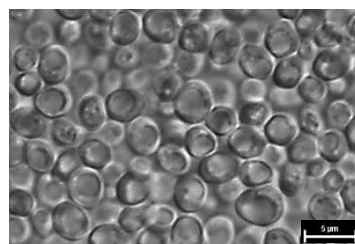
**BY4742**  
**80 mg/l**



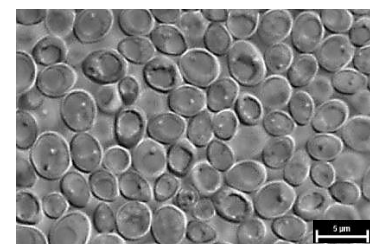
***fcy22Δ***  
**0 mg/l**



***fcy22Δ***  
**20 mg/l**



***fcy22Δ***  
**80 mg/l**



**Obr. 55: Morfologie buněk a jejich diferenciaci v obří kolonii kmenů BY4742 a *fcy22Δ* na médiu s 0, 20 a 80 mg/l adeninu. a) U buňky u horního okraje obří kolonie. b) L buňky u spodního okraje centrální oblasti obří kolonie. Měřítka 5 µm. Červené šipky označují buňky typu U větší velikosti oproti buňkám rodičovského kmene a buňky typu L větší velikosti s velkou vakuolou ve spodní části kolonie.**



## 5. DISKUZE

### 5.1. Lokalizace proteinů účastnících se metabolismu nukleotidů značených Gfp v buňkách *in vivo* pomocí fluorescenční mikroskopie

Sledováním vývoje a morfologie obřích kolonií rodičovského kmene a nově připravených konstruktů BY-*ADE4*-3-GFP, BY-*ADK*-1-GFP, BY-*FCY2*-3-GFP a BY-*FUR4*-4-GFP jsem ověřila, že nedochází k žádným změnám v růstu, morfologii a ani alkalizaci média ve srovnání s koloniemi rodičovského kmene. Připravené konstrukty tedy bylo možné použít pro sledování hladiny produkce značených proteinů. Proteiny značené Gfp a řízené přirozenými promotory (např. transportéry a permeázy, jako Fur4p Fcy2p, Fcy22p), nemusí být vždy exprimovány v dostatečném množství tak, aby bylo možné zachytit jejich buněčnou lokalizaci, např. v plazmatické membráně. Gfp protein je velmi stabilní, proto je silný fluorescenční signál po degradaci značeného proteinu často zachycen ve vakuolách buněk, což jsem pozorovala u všech proteinů značených Gfp.

Permeáza **Fur4p** pro uracil se v plazmatické membráně vyskytuje v lipidických raftech (HEARN *et al.* 2003). Fur4p při své syntéze prochází sekreční dráhou (DUPRÉ a HAGUENAUER-TSAPIS 2003). Dříve, než dosáhne plazmatické membrány, může být Fur4p směřována z Golgiho aparátu přímo do vakuoly (MANDY *et al.* 2009). Fur4p je syntetizována dle intracelulární koncentrace uracilu. Na základě ubikvitinace, zprostředkované fosforylací a prostřednictvím vazby uracilu je však velmi rychle odstraňována z plazmatické membrány, směřována do endosomálního systému a degradována ve vakuole v odpovědi na různé podmínky – např. při vstupu do stacionární fáze (BLONDEL *et al.* 2004), (GALAN *et al.* 1996), (SÉRON *et al.* 1999). V plazmatické membráně se mi podařilo zachytit velmi slabý signál Fur4p-GFP na minimálním médiu bez uracilu po 16 hodinách kultivace. Přesto, že v minimálním médiu nebyl uracil přítomen, byla zřejmě Fur4p exprimována v bazální hladině (GALAN *et al.* 1996). Silnější fluorescenční signál u Fur4p-GFP se mi podařilo pozorovat v cytoplazmě a nejsilnější ve vakuole při kultivaci na minimálním médiu s 20 mg/l uracilu.

Protein **Ade4p**, adeninová fosforybosyltransferáza, má dle literatury dvojí buněčnou lokalizaci. Difúzní lokalizace v cytoplazmě se vyskytuje v přítomnosti hypoxanthinu nebo adeninu (NARAYANASWAMY *et al.* 2009) a zachytila jsem ji na bohatém médiu (YEPG) po 24 hod kultivace. V nepřítomnosti adeninu může Ade4p agregací tvořit cytoplazmatická granula (NARAYANASWAMY *et al.* 2009). Lokalizaci

v cytoplazmatických granulích se mi podařilo zachytit po 72 hod kultivace na minimálním médiu s 20 mg/l uracilu.

Protein **Adk1p**, adenylát kináza, je dle literatury lokalizován v cytoplazmě a mitochondriích. Chybí mu však štěpitelná cílová mitochondriální sekvence a signály pro jeho směřování do mitochondrií i jeho rozdělení uvnitř mitochondrií nejsou podrobně prozkoumány (SCHRICKER *et al.* 2002). U buněk v počáteční fázi růstu se nachází až 10 mitochondrií, tvořících mitochondriální tubulární síť pod plazmatickou membránou buněk. Struktura této mitochondriální sítě je proměnlivá a dochází v ní k nepřetržitě probíhajícím fúzím a fragmentacím. Podařilo se mi pozorovat lokalizaci Adk1p-Gfp v cytoplazmě a dále v blízkosti plazmatické membrány nebo v nepravidelně rozptýlených oblastech po kultivaci 24 hod a 72 hod na minimálním médiu.

Protein **Fcy2p** je purin-cytosinová permeáza, dle literatury lokalizovaná v plazmatické membráně a membránových kompartmentech. Prochází sekreční dráhou (PINSON *et al.* 1997). Tato permeáza zajišťuje aktivní transport více substrátů: adeninu, hypoxanthinu, cytosinu a cytidinu, (FERREIRA *et al.* 1997), (ESCOBAR-HENRIQUES a DAIGNAN-FORNIER 2001), proto zřejmě může její syntéza kolísat. Po kultivaci 24 hod na bohatém médiu se mi podařilo zachytit fluorescenční signál GFP pouze ve vakuolách buněk. Na minimálním médiu po kultivaci 72 hodin jsem pozorovala lokalizaci v cytoplazmě buněk a v blízkosti plazmatické membrány. Lokalizaci v plazmatické membráně a ve vakuole jsem zachytila při kultivaci 24 hodin na minimálním médiu.

## 5.2. Sledování vlivu extracelulárních bází na vývoj kolonií *S. cerevisiae*

Šetřící dráhy mohou v případě defektu v biosyntézách *de novo* fungovat jako určitá pojistka k přežití nebo fungují jako alternativa pro méně energeticky náročnou syntézu nukleotidů z přijatých substrátů z extracelulárního prostředí nebo z vnitrobuněčných zdrojů. Vzhledem ke dvěma možným způsobům syntézy nukleotidů nelze považovat určitý fenotypový projev za přímý projev delece jednoho konkrétního genu, neboť vliv delece určitého genu biosyntézy *de novo* může být do určité míry kompenzován funkční šetřící dráhou – a naopak, vliv delece genu v šetřící dráze může být kompenzován funkční biosyntézou *de novo*. V kompenzaci mohou být dále zapojeny proteiny s podobnou funkcí nebo konverze nukleotidů (ATP/GTP a UTP/CTP) v rámci šetřících drah, případně využití „obchvatu“ při šetřící dráze - viz obr. 6 v kap. 2.6.4.1.

a obr. 7 v kap. 2.6.4.4. (LJUNGDAHL a FORNIER 2012). Šetřící dráhy, narozdíl od biosyntetických drah *de novo* nejsou evolučně zachované a byly považovány za neesenciální pro růst. Nová studie však uvádí, že degradace nukleotidů je esenciální pro přežití hladovějících buněk mutantních kmenů *S. cerevisiae* (XU *et al.* 2013), že degradovaný AMP se podílí na udržení energetických rezerv v buňkách, a že nukleotidy pocházející z degradace nukleových kyselin mohou sloužit i jako zdroj uhlíku, dusíku a fosforu při vyčerpání živin (WALTHER *et al.* 2010).

Enzymy účastníci se degradace/recyklace nukleotidů v šetřících drahách mohou mít paralogní enzymy s podobnou funkcí nebo afinitu k více substrátům. Výsledky sledování projevu delece genu šetřící dráhy a vlivu utilizace extracelulární báze jsou pravděpodobně ovlivněny biosyntézou *de novo* a také neznámým množstvím bází při kultivaci na komplexním médiu, kde není přesně definováno složení jednotlivých složek (např. kvasničný autolyzát při přípravě GM média).

Vzhledem k výše uvedenému bylo proto nutné kombinovat sledování více faktorů. Již delší dobu je známo, že při komunikaci na krátkou i delší vzdálenost mezi obřími koloniemi *S. cerevisiae* je v pulzech produkován amoniak, který slouží jako signál o vyčerpání živin (PALKOVÁ *et al.* 1997). U kmenů s delecemi vybraných genů a u rodičovského kmene jsem proto sledovala vliv přidávaných extracelulárních bází na alkalizaci média a produkci amoniaku, jejichž intenzitu a časový průběh jsem vztahovala k intenzitě a časovému průběhu stresu způsobeného vyčerpáním živin a dále vliv přidávaných extracelulárních bází na morfologii obřích kolonií, morfologii buněk a diferenciaci.

### **5.2.1. Sledování vlivu extracelulárních purinových bází na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae***

Bylo prokázáno, že v průběhu vývoje kolonií *S. cerevisiae* dochází k výrazným změnám v expresi genů, mezi kterými jsou zastoupeny i geny účastníci se nukleotidového metabolismu (PALKOVÁ *et al.* 2002), (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). Exprese genů biosyntetické dráhy *de novo* purinů je regulována např. transkripčními faktory (Bas1p, Pho2p, Gcn4p), které se uplatňují i při metabolismu fosfátů a aminokyselin (SOM *et al.* 2005) (IGLESIAS-GATO *et al.* 2011). Dále bylo zjištěno, že při regulaci exprese genů z ADE regulonu se uplatňují intermediáty biosyntetické dráhy *de novo* AICAR, SAICAR i utilizace extracelulárního adeninu (RÉBORA *et al.* 2001), (RÉBORA *et al.* 2005) a také konečné produkty ATP a GTP (HURLIMANN *et al.* 2011).

Enzymy **Ade4p** i **Ade5,7p** vyžadují pro svou funkci adenin. Hladina syntézy proteinu **Ade4p** je negativně regulována ADP a ATP *in vitro* (RÉBORA *et al.* 2001). Biosyntéza *de novo* purinů se snižuje, ale vnitrobuněčná koncentrace ADP a ATP se samozřejmě zvyšuje při dostatečném přísunu extracelulárního adeninu (GAUTHIER *et al.* 2008). Tomu by mohl odpovídat výsledek, kdy při sníženém přísunu adeninu došlo u mutantního kmene s delecí genu *ADE4* pro enzym **Ade4p** s funkcí fosforibosyltransferázy (pro biosyntézu *de novo*) kultivovaném na GM médiu bez přidaného adeninu k časnější a intenzivnější alkalizaci média a produkci amoniaku oproti stejnému kmeni kultivovaném na médiu s přidavkem adeninu 20 a 80 mg/l, který měl možnost využít adenin z extracelulárního prostředí. U rodičovského kmene nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného adeninu do média. Podobný výsledek byl zjištěn i při kultivaci mutantního kmene s delecí genu *ADE5,7* pro bifunkční enzym **Ade5,7p** s funkcí aminoimidazol ribotid syntetázy a glycinamid ribotid syntetázy (pro biosyntézu *de novo*), kdy došlo opět k časnější a intenzivnější alkalizaci média a produkci amoniaku při kultivaci na GM médiu bez přidaného adeninu oproti stejnému kmeni kultivovaném na médiu s přidavkem adeninu 20 a 80 mg/l. K potvrzení tohoto výsledku došlo dále při paralelní kultivaci kmene s delecí genu *ADE5,7* na médiu s přidavkem adeninu v různých koncentracích a s přidavkem uracilu 20 mg/l, u kterého byla opět intenzivnější alkalizace média a produkce amoniaku při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu, avšak bez časového rozdílu nástupu alkalizace a produkce amoniaku oproti stejnému kmeni kultivovaném na médiu s přidavkem adeninu 20 a 80 mg/l. Přidaný uracil zřejmě kompenzoval počátek stresu z vyčerpání živin a mohl být využit jako zdroj uhlíku a dusíku (WALTHER *et al.* 2010). U rodičovského kmene opět nebyly v alkalizaci média a produkci amoniaku zaznamenány výrazné rozdíly vztahující se ke koncentraci přidaného adeninu do média. Diferenciace buněk uvnitř kolonie byla sledována 15. den kultivace, kdy kolonie rodičovského kmene byly v plné alkalické fázi a produkovaly amoniak signalizující vyčerpání živin a jejich růst byl zpomalen. Lze proto předpokládat, že při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu došlo u deletantů v genech *ADE4* a *ADE5,7* ke snížení intracelulární koncentrace adeninu. U sledovaných kmenů s delecemi genů *ADE4* a *ADE5,7* byla zjištěna větší velikost buněk a více partikulí v cytoplazmě u buněk typu U oproti rodičovskému kmeni, což by mohl být projev delece těchto genů. Je pravděpodobné, že se jedná o lipidické partikule. V nové studii bylo prokázáno, že deletanti v těchto genech mohou vykazovat abnormální morfologii vakuol nebo defekty při jejich fragmentaci (MICHAILLAT a MAYER 2013).

Výše uvedené výsledky s extracelulárním adeninem mohou být podpořeny i výsledky při kultivaci na médiu s různými koncentracemi přidaného guaninu. Rozdíly v alkalizaci média,

produkci amoniaku, morfologii kolonií, morfologii buněk a diferenciaci nebyly při kultivaci kmene s delecí genu *ADE5,7* na médiu s různými koncentracemi guaninu tak výrazné jako při použití adeninu, i když se taktéž projevil časnější počátek produkce amoniaku (o 2 dny) při kultivaci na médiu bez přidaného guaninu oproti kultivaci stejného kmene na médiu s přídavkem 20 a 80 mg/l guaninu. Literatura uvádí, že utilizace adeninu přijatého z extracelulárního prostředí je nutná pro uplatnění regulační role ADP při regulaci transkripce genů ADE regulonu a také, že hypoxanthin snižuje expresi genu *ADE1*, což významně reguluje biosyntetickou dráhu *de novo*. Účinek guaninu byl shledán pouze slabým z toho důvodu, že guanin narozdíl od hypoxanthinu nelze převést na adenylové nukleotidy – viz obr. 6 v kap. 2.6.4.1. (GUETSOVA *et al.* 1997, RÉBORA *et al.* 2001). Tomu by odpovídal výsledek, že nedošlo k výraznému rozdílu v intenzitě alkalizace a produkce amoniaku u deletanta v závislosti na koncentraci přidaného guaninu do média. U rodičovského kmene nebyly zjištěny významné rozdíly v závislosti na koncentraci přidaného guaninu do média. Obří kolonie deletantů v genech *ADE4* a *ADE5,7* se oproti rodičovskému kmeni lišily tvorbou papil, které byly jemnější při kultivaci na médiu bez přidané purinové báze, kdy byla zjištěna taktéž časnější a intenzivnější alkalizace média a produkce amoniaku oproti kultivaci na médiu s přidanou purinovou bází v médiu. To souhlasí s informacemi z literatury, že papily se často objevují na kmenech s deletovanými geny, které nedosahují intenzivní produkce amoniaku a nepřecházejí do alkalické fáze (PALKOVÁ *et al.* 1997). Vzhledem k tomu, že není známa přesná koncentrace složek v kvasničném autolyzátu použitém pro přípravu média, je možné uvažovat časnější počátek alkalizace média a produkce amoniaku při kultivaci deletantů v genech pro biosyntézu *de novo* purinů na médiích bez přidaného adeninu za projev delece genů v biosyntetické dráze *de novo*, kdy je signalizován stres z vyčerpání živin, který však může být ovlivněn šetřicí dráhou, resp. utilizací přidaných purinových bází do média.

Jak bylo výše uvedeno, vliv delece jednoho genu šetřicí dráhy purinů a vliv utilizace extracelulárních bází se studuje obtížně, pokud uvažujeme současně funkční biosyntetickou dráhu *de novo* a existují i další faktory, které mohou výsledky ovlivnit. Vliv více faktorů se potvrdil při sledování kmene s delecí genu *FCY22* pro údajnou purin-cytosinovou permeázu **Fcy22p**. Kvasinky *S. cerevisiae* mohou defekt v tomto genu kompenzovat kromě biosyntézy *de novo* proteiny s podobnou funkcí: enzymem **Fcy2p** s již prokázanou funkcí purin-cytosinové permeázy nebo **Fcy21p** s předpokládanou funkcí purin-cytosinové permeázy (WAGNER *et al.* 2001), případně konverzí nukleotidů (ATP/GTP nebo UTP/CTP). Tomu odpovídá i výsledek, že u kmene s delecí genu *FCY2* nebyly zjištěny výrazné rozdíly v alkalizaci média, produkci amoniaku, morfologii buněk a diferenciaci v závislosti na koncentraci

přidaného adeninu v médiu. Z hlediska počátku alkalizace média a produkce amoniaku došlo sice ke zpoždění o 3 dny, ale intenzita alkalizace a produkce amoniaku se poté rovnoměrně zvyšovala bez ohledu na koncentraci přidaného adeninu v médiu a v závěru kultivace se blížila intenzitě rodičovského kmene; přičemž morfologie obřích kolonií se od rodičovského kmene lišila pouze tvorbou papil, což souhlasí s informacemi z literatury, že papily se často objevují na kmenech s deletovanými geny (PALKOVÁ *et al.* 1997). Přijatý adenin z extracelulárního prostředí mohl sloužit jako zdroj uhlíku, dusíku a fosforu (WALTHER *et al.* 2010). V morfologii buněk a diferenciaci v kolonii mutantního kmene nebyly zjištěny významné rozdíly oproti rodičovskému kmeni, kromě ojediněle se vyskytujících větších buněk typu U s více cytoplazmatickými partikulami.

Vliv šetřící dráhy (resp. utilizace přijatých extracelulárních purinových nebo pyrimidinových bází) na „záchranu“ mutantního kmene s delecí v biosyntetické dráze *de novo* lze mnohem lépe studovat, pokud je deletován gen, který má klíčovou roli v obou drahách - biosyntetické dráze *de novo* i v šetřící dráze a příslušné deletanty mají výrazný fenotypový projev. Takovým genem je ADK1, gen pro adenylát kinázu, **Adk1p**, zajišťující konverzi AMP na ADP. (LJUNGDAHL a FORNIER 2012). U kmene s delecí genu *ADK1* jsem pozorovala výrazné rozdíly v alkalizaci média, produkci amoniaku, morfologii, vývoji a růstu obřích kolonií oproti rodičovskému kmeni BY4742. Alkalizace média a produkce amoniaku byly časnější a značně intenzivnější oproti ostatním deletantům po celou dobu kultivace a oproti rodičovskému kmeni v počátcích kultivace. Morfologie buněk i diferenciaci uvnitř obřích kolonií byly významně odlišné od rodičovského kmene: buňky měly větší velikost, v kolonii se nacházely buňky s poškozenou buněčnou stěnou, buňky protáhlého tvaru nebo velké kulaté buňky s velkou vakuolou. Tento výsledek je v souladu s informacemi z literatury, že aktivita Adk1p je nutná pro správnou proliferaci (KONRAD 1998) a mutanti v genu *ADK1* vykazují větší velikost buněk a prodloužené pupeny (WANATABE *et al.* 2009), (JORGENSEN *et al.* 2002). V buňkách byla velmi pravděpodobně narušena rovnováha nukleotidů, kdy vznikla převaha AMP nad ADP, resp. ATP. Literatura rovněž uvádí, že mutanti v genu *ADK1* vykazují akumulaci AMP a sníženou hladinu ATP a ADP (WANATABE *et al.* 2009). Zdrojem ATP pak může být pouze činnost ATP syntáz za využití protonového gradientu na vnitřní membráně mitochondrií, glykolýza nebo zprostředkovaně Krebsův cyklus, kde ATP vzniká zprostředkovaně z GTP vzniklého v reakci katalyzované sukcinyl-CoA-syntetázou, přičemž GTP pak může být na ATP převeden v reakci  $ADP + GTP \rightleftharpoons ATP + GDP$  (VOET, D. a VOET, J.G. 2011). Morfologie kolonií deletantů v genu *ADK1* byla velice odlišná od rodičovského kmene – kolonie byly nízké, menšího průměru oproti rodičovskému kmeni, proměnlivého tvaru s různě

vyrůstajícími sektory, tmavě šedavé barvy a ve fázi plné alkalizace se na povrchu kolonií objevovaly ojedinělé okrsky světlejších buněk krémové barvy. Menší velikost kolonií a špatný růst na glycerolovém médiu souhlasí s informacemi z literatury, že mutanti s delecí genu *ADK1* vykazují špatný růst na médiu s glycerolem jako zdrojem uhlíku (DIMMER *et al.* 2002). Literatura rovněž uvádí, že gen *ADK1* je nutný k utilizaci ATP produkovaného při respiraci a tento gen má zřejmě velký význam v oxidativním metabolismu (OECHSNER *et al.* 1988). Tomu odpovídá výsledek, že diferenciaci buněk v koloniích deletanta v genu *ADK1* byla silně narušena, resp. morfologie buněk nebyla jednoznačná ani pro typ U (buňky aktivující glykolýzu,  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, aminokyselinový metabolismus a transportéry živin) ani pro typ L (buňky, pro které je charakteristický respirační metabolismus).

U sledování kmene s delecí genu *APT1* pro adenin fosforibosyltransferázu je nutné uvažovat ovlivnění projevu delece funkční biosyntézou *de novo* nebo možnost konverze adeninu na hypoxanthin v reakci katalyzované Aah1p (adenin deaminázou) a následnou utilizaci hypoxanthinu v reakci katalyzované Hpt1p (hypoxanthin-guaninovou fosforibosyltransferázou) a jeho přeměnu na IMP (a následně na AMP až ATP nebo GMP až GTP) (LJUNGDAHL a FORNIER 2012). Při sledování kmene s delecí genu *APT1* jsem zaznamenala velmi nízkou alkalizaci média i produkci amoniaku opožděnou o 11 dní oproti rodičovskému kmeni. Velikost buněk byla větší při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu oproti rodičovskému kmeni, buňky obsahovaly větší vakuoly a četné granule v cytoplazmě. Kromě těchto rozdílů se kmen s delecí genu *APT1* stejně jako většina ostatních mutantů lišil oproti rodičovskému kmeni tvorbou papil v pozdní acidické fázi. V literatuře není mnoho konkrétních informací o fenotypovém projevu delece genu *APT1* kromě např. udávané snížené fitness při kultivaci na glycerolovém médiu (QIAN *et al.* 2012). V morfologii buněk a diferenciaci v kolonii mutantního kmene byl zjištěn méně výrazný rozdíl při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu, kdy se v kolonii vyskytovaly ojediněle buňky typu U větší velikosti a s více partikulami (pravděpodobně lipidickými) v cytoplazmě a buňky typu L větší velikosti s velkou vakuolou oproti rodičovskému kmeni.

Velmi shodné výsledky jako u genu *APT1* jsem zaznamenala při sledování kmene s delecí genu *HPT1* pro hypoxanthin-guaninovou fosforibosyltransferázu. V porovnání s rodičovským kmenem byla alkalizace a produkce amoniaku u mutantního kmene velice slabá a počátek produkce amoniaku byl opožděn o 11 dní. Vzhledem k tomu, že substrátem pro enzym Hpt1p je hypoxanthin nebo guanin, je nutné uvažovat o způsobu využití extracelulárního adeninu pouze cestou přeměny adeninu na hypoxanthin katalyzovanou enzymem Aah1p (adenin deaminázou). Fyziologie deletantů v genech *APT1* a *HPT1* by se proto neměly odlišovat,

což odpovídá získaným výsledkům. Kolonie kmene s delecí genu *HPT1* se stejně jako kmen s delecí genu *APT1* lišil oproti rodičovskému kmeni tvorbou papil v pozdní acidické fázi. Při sledování morfologie buněk a diferenciaci jsem taktéž zaznamenala velice podobné výsledky jako při sledování kmene s delecí genu *APT1*. Buňky byly taktéž větší při kultivaci na médiu bez přidaného adeninu oproti rodičovskému kmeni s většími vakuolami a četnými granulemi v cytoplazmě, což souhlasí s údaji v literatuře, kdy mutanti s delecí genu *HPT1* vykazují abnormální morfologii vakuol (VILLA-GARCIA *et al.* 2011).

### **5.2.2. Sledování vlivu extracelulárních pyrimidinových bází na vývoj obřích kolonií *S. cerevisiae***

Pro regulaci exprese biosyntetické dráhy *de novo* pyrimidinů se uplatňují intermediáty biosyntetické dráhy *de novo* dihydroorotát a kyselina orotová (LOISON *et al.* 1980), (KAMMERER *et al.* 1984), zpětná inhibice konečným produktem UTP, ale regulační roli má i ATP a UMP při allosterické regulaci některých enzymů nebo mechanismy zahrnující nekódující RNA. Několik genů je taktéž pozitivně regulováno při hladovění na pyrimidinové báze (JONES a FINK 1982, citováno podle LJUNGDAHL a FORNIER 2012). V šetřící dráze pyrimidinů má velký význam konverze cytosinu na uracil, poskytující buňkám energii i uracil nutný pro syntézu RNA a aminokyselin (KURTZ *et al.* 1999). Byl identifikován gen *FUR1* pro uracil fosforibosyl transferázu katalyzující přeměnu uracilu na UMP (viz obr. 7 v kap. 2.6.4.4.), jehož exprese je indukována v přítomnosti uracilu, přičemž v přítomnosti Fur1p je reprimována *de novo* biosyntetická dráha pyrimidinů (KURTZ *et al.* 2002). Stejně jako v případě genů pro purinový metabolismus bylo zjištěno, že v průběhu vývoje kolonií *S. cerevisiae* dochází ke střídavým změnám v expresi genů, mezi kterými jsou zastoupeny i geny metabolismu pyrimidinů *URA1* a *URA10* (PALKOVÁ *et al.* 2002), (VÁCHOVÁ *et al.* 2009). Při sledování vlivu extracelulárních pyrimidinových bází na vývoj kolonií *S. cerevisiae* je potřeba počítat s možností ovlivnění výsledků biosyntézou *de novo*, šetřící dráhou nebo vlivem konverze nukleotidů – kdy k syntéze CTP dochází z UTP. Vliv extracelulárních pyrimidinových bází na vývoj kolonií *S. cerevisiae* může být ovlivněn i např. neznámou koncentrací pyrimidinových bází v kvasničném autolyzátu, který je podstatnou složkou média. Substrátem pro šetřící dráhu syntézy pyrimidinů jsou pyrimidinové báze kromě cytosinu, tj. uracil nebo thymin nebo příslušné ribonukleosidy. Vzhledem k vysokému obrátu nukleových kyselin při katabolických dějích při buněčném cyklu a změnách metabolismu, kdy značná část degradovaných molekul



pochází z ribozomální RNA. Lze však předpokládat dostatečnou zásobu uracilu pro recyklaci pyrimidinů šetřící dráhou a také to, že intracelulární koncentrace uracilu je ovlivněna fází buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že vnitrobuněčná koncentrace UTP je cca o 60 % nižší než koncentrace ATP (LJUNGDAHL a FORNIER 2012) a jeho hlavní funkcí je syntéza RNA při transkripci (ALBERTS *et al.* 2002), lze předpokládat, že defekt v biosyntetické dráze pyrimidinů *de novo* nebude mít výrazný fenotypový projev, neboť tento defekt může být kompenzován funkční šetřící dráhou a dostatečným přísunem uracilu při obměně RNA. Tento předpoklad jsem potvrdila při sledování rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 s auxotrofií pro uracil (deleci genu *URA3*) a prototrofního kmene *S. cerevisiae* BYURA s komplementovaným genem *URA3* pro biosyntézu uracilu *de novo* při kultivaci na médiích s různými koncentracemi uracilu. Alkalizace média, produkce amoniaku, morfologie kolonií, morfologie buněk a diferenciaci byly u kolonií obou kmenů podobné. Tento výsledek lze vysvětlit projevem funkční šetřící dráhy, která kompenzuje deleci genu *URA3* pro biosyntézu pyrimidinů *de novo*. V tomto případě ale není jisté, že extracelulární uracil byl využíván v šetřící dráze pro syntézu UTP nebo CTP. Jak bylo výše uvedeno, extracelulární purinové a pyrimidinové báze mohou sloužit jako zdroj uhlíku, dusíku nebo fosforu a mohou být v buňkách katabolizovány (WALTHER *et al.* 2010). Příjem extracelulárního uracilu se neprojevil významnými rozdíly v alkalizaci média a produkci amoniaku a byl zřejmě využit přímo k přeměně na UMP katalyzované enzymem Fur1p nebo jako zdroj živin. To má souvislost i s dalším výsledkem, který jsem získala při sledování kolonií rodičovského kmene při kultivaci na médiu s různými koncentracemi přidaného cytosinu, kdy jsem zjistila mírně časnější počátek produkce amoniaku (o 2 dny) při kultivaci na médiu s 80 mg/l přidaného cytosinu oproti kultivaci na médiu bez přidaného cytosinu a s 20 mg/l přidaného cytosinu. Cytosin přijatý z extracelulárního prostředí mohl být využit ke konverzi na uracil v reakci katalyzované enzymem Fcy1p a dále k syntéze UMP. Při této reakci dochází k uvolnění amoniaku – viz obr. 8 v kap. 2.6.4.7. (XU *et al.* 2013). Při kultivaci kmene *S. cerevisiae* BY4742 na různých koncentracích cytosinu v médiu jsem nepozorovala významné rozdíly v morfologii kolonií, morfologii buněk a diferenciaci. Vnitrobuněčná obměna nukleových kyselin, spolu s příjmem extracelulárních pyrimidinových bází a funkční šetřící dráhou zřejmě postačují ke kompenzaci defektu v biosyntetické dráze *de novo*.

Pro sledování vlivu extracelulárních bází na vývoj kolonií *S. cerevisiae* by bylo vhodné sledovat souběžně expresi genů u kmenů produkujících proteiny značené Gfp a vývoj kolonií na médiu s přesně definovaným obsahem purinových nebo pyrimidinových bází.

## 6. SOUHRN

V rámci své diplomové práce, zaměřené na sledování role nukleotidového metabolismu při vývoji kolonií *S. cerevisiae* jsem dosáhla těchto výsledků:

- Za využití homologní rekombinace jsem vytvořila 4 stabilní kmeny odvozené od rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 produkující proteiny značené Gfp: BY-*ADE4*-GFP, BY-*ADK1*-GFP, BY-*FCY2*-GFP, BY-*FUR4*-GFP. U těchto čtyř konstruktů jsem pomocí fluorescenčního mikroskopu potvrdila lokalizaci v buňkách udávanou v literatuře. Připravené kmeny budou dále využívány pro podrobnější sledování exprese příslušných genů.
- Zjistila jsem, že u rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 s auxotrofií pro uracil a kmeny *S. cerevisiae* BYURA prototrofního pro uracil nemají extracelulárně přidané pyrimidinové báze vliv na alkalizaci média, produkci amoniaku, morfologii obřích kolonií, morfologii buněk a diferenciaci.
- Zjistila jsem, že u rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 nemají extracelulárně přidané purinové báze vliv na alkalizaci média, produkci amoniaku, morfologii obřích kolonií, morfologii buněk a diferenciaci.
- Zjistila jsem výrazné rozdíly ve vývoji kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 a kolonií kmenů s delecemi vybraných genů účastnících se biosyntézy purinů *de novo* nebo šetřící dráhy purinů. Tyto rozdíly se týkaly alkalizace média, produkce amoniaku, morfologie a diferenciaci buněk kolonií při jejich kultivaci na médiu s různými koncentracemi purinových bází v médiu.
- V rámci literárního přehledu jsem zpracovala dostupnou literaturu týkající se amoniakové signalizace u kolonií *S. cerevisiae* a nukleotidového metabolismu se zaměřením na *S. cerevisiae*.

## 7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.

An, S., Kumar, R., Sheets, E.D., Benkovic, S.J. (2008): Reversible compartmentalization of *de novo* purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*. 2008;320:103–106.

Aranda, A., Jiménez-Martí, E., Orozco, H., Matallana, E., Del Olmo, M.J. (2006): Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *Agric. Food. Chem.* 54(16): 5839-46.

Arndt, K. T., Styles, C., Fink, G.R. 1987 Multiple global regulators control HIS4 transcription in yeast. *Science* 237: 874–880.

Beis, I., Newsholme, E. A. (1975): The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 152 (1): 23-32.

Benoist, P., Feau, P., Pliss, A., Vorisek, J., Antonelli, R., Raska, I., Denis-Duphil, M. (2000): The yeast Ura2 protein that catalyses the first two steps of pyrimidines biosynthesis accumulates not in the nucleus but in the cytoplasm, as shown by immunocytochemistry and Ura2-green fluorescent protein mapping. *Yeast* 16(14):1299-312.

Blondel, M.O., Morvan, J., Dupré, S., Urban-Grimal, D., Haguenaer-Tsapis, R., Volland, C. (2004): Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell* 15(2):883-95

Breton, A., Pinson, B., Couplier, F., Giraud, M.F., Dautant, A., Daignan-Fornier, B. (2008): Lethal accumulation of guanylic nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* HPT1-deregulated mutants. *Genetics* 178(2):815-24.

Cammack, R., Vella, A. F., Atwood, T., Campbell, P., Stirling, J., Smith, A. Parish, H. (2006): *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*, revised edition. New York: Oxford university press.

Cantoni, G.L. (1952): The Nature of the Active Methyl Donor Formed Enzymatically from L-Methionine and Adenosinetriphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 74 (11): 2942–3.

Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., Palková, Z. (2012a)). Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Molecular Cell* 46, 436–448

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2009): Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J. Biol. Chem.* 284:32572–32581

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2010). How to survive within a yeast colony?: change metabolism or cope with stress? *Commun. Integr. Biol.*3:198–200

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2012b)). Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:976753.

Daignan-Fornier, B., Fink, G.R. (1992): Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6746–6750.

Davis, C.A., and Ares, M. Jr. (2006): Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(9):3262-7.

- Denis, V. a Daignan-Fornier, B. (1998): Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 259(3):246-55.
- Denis-Duphil, M. (1989): Pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *ura2* cluster gene, its multifunctional enzyme product, and other structural or regulatory genes involved in *de novo* UMP synthesis. *Biochem Cell Biol.* 67(9):612-31.
- Dohlman, H.G., Slessareva, J.E. (2006): Pheromone signaling pathways in yeast. *Sci STKE.* 364:cm6.
- Eddy, A.A., Hopkins, P. (1998): Proton stoichiometry of the overexpressed uracil symport of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 336 ( Pt 1):125-30
- Escobar-Henriques, M., Daignan-Fornier, B. (2001): Transcriptional regulation of the yeast GMP synthesis pathway by its end products. *J. Biol. Chem.* 276: 1523–1530.
- Escobar-Henriques, M., Daignan-Fornier, B. Collart, M.A. (2003b): The critical cis-acting element required for IMD2 feedback regulation by GDP is a TATA box located 202 nucleotides upstream of the transcription start site. *Mol Cell Biol.*, 23(17):6267-78.
- Escusa, S., Camblong, J., Galan, J.M., Pinson, B., Daignan-Fornier, B. (2006): Proteasome- and SCF-dependent degradation of yeast adenine deaminase upon transition from proliferation to quiescence requires a new F-box protein named Saf1p. *Mol. Microbiol.* 60: 1014–1025.
- Ferreira T., Brèthes, D., Pinson, B., Napias, C., Chevallier, J. (1997): Functional analysis of mutated purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. A possible role of the hydrophilic segment 371-377 in the active carrier conformation. *J Biol Chem* 272(15):9697-702
- Flynn, P. J., Reece, R.J. (1999): Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19: 882–888.
- Gauthier, S., Couplier, F., Jourden, L., Merle, M., Beck, S., Konrad, M., Daignan-Fornier, B., Pinson, B. (2008): Co-regulation of yeast purine and phosphate pathways in response to adenylic nucleotide variations. *Mol Microbiol.* 68(6):1583-94.
- Giermann, N., Schröder, M., Ritter, T., Zrenner, R. (2002): Molecular analysis of *de novo* pyrimidine synthesis in solanaceous species. *Plant Mol Biol.* 2002 Oct;50(3):393-403.
- Grassi, L., Tramontano, A. (2011): Horizontal and vertical growth of *S. cerevisiae* metabolic network. *BMC Evol Biol.* 11:301, doi: 10.1186/1471-2148-11-301.
- Guetsova, M. L., Lecoq, K., Daignan-Fornier, B. (1997): The isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants that constitutively express purine biosynthetic genes. *Genetics* 147: 383–397.
- Hanson A.D., Gregory J.F. 3rd. (2002): Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(3):244-9.
- Hereld, D., Devreotes, P.N. (1992): Cyclic AMP Receptors of Dictyostelium. *Int Rev Cytol.* 137B:35-47.
- Hinnebusch, A.G., Natarajan, K. (2002): Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell.* 1(1):22-32

- Hinnebusch, A.G. (2005): Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* 59:407-50.
- Hurlimann, H. C., Laloo, B., Simon-Kayser, B., Saint-Marc, C., Couplier, F. (2011): Physiological and toxic effects of the purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide Ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J. Biol. Chem.* 286: 30994–31002.
- Chen, H., Fink, G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 20: 1150 – 1161
- Cheong, H, Lindsten, T., Thompson, C.B. (2012): Autophagy and ammonia. *Autophagy.* Jan;8(1):122-3
- Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:11121–6
- Icard, P., Lincet, H., (2013): The cancer tumor: a metabolic parasite? *Bull Cancer.* 100(5):427-33. doi: 10.1684/bdc.2013.1742 (in French)
- Iglesias-Gato, D., Martín-Marcos, P., Santos, M.A., Hinnebusch, A.G., Tamame, M. (2011): Guanine nucleotide pool imbalance impairs multiple steps of protein synthesis and disrupts GCN4 translational control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187(1):105-22.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004): A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast.* 21(11):947-62.
- Jones, M.E. (1992): Orotidylate decarboxylase of yeast and man. *Curr Top Cell Regul.* 33:331-42.
- Jones, E. W., Fink, G.R. (1982): Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. *In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. (eds.): The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 181–299.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.J., Tyers, M. (2002): Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297(5580):395-400
- Kammerer, B., Guyonvarch, A., Hubert, J.C. (1984): Yeast regulatory gene PPR1. I. Nucleotide sequence, restriction map and codon usage. *J. Mol. Biol.* 180: 239–250.
- Kassel, K. M., Au da, R., Higgins, M. J., Hines, M., Graves, L.M. (2010): Regulation of human cytidine triphosphate synthetase 2 by phosphorylation. *J Biol Chem* 285(44): 33727-36.
- Keener, J.M., Babst, M. (2013): Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic.* 14(4):412-27.
- HrKhademi, S., O'Connell, J. 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J., Stroud, R.M. (2004): Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305(5690):1587-94.
- Konrad, M. (1988): Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 263(36):19468-74.

- Krenc, D., Wu, B., Beitz, E. (2013): Specific aquaporins increase the ammonia tolerance of a *Saccharomyces cerevisiae* mep1-3 fps1 deletion strain. *Mol Membr Biol.* 30(1):43-51.
- Kurtz, J.E., Exinger, F., Erbs, P., Jund, R. (1999): New insights into the pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of six genes for cytidine metabolism. *Curr Genet* 36(3):130-6
- Kurtz, J.E., Exinger, F., Erbs, P., Jund, R. (2002): The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 41(3):132-41
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z. (2003): Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *OMol Microbiol.* 47(3):745-54.
- Kwapisz, M., Wery, M., Despres, D., Ghavi-Helm, Y., Soutourina, J. (2008): Mutations of RNA polymerase II activate key genes of the nucleoside triphosphate biosynthetic pathways. *EMBO J.* (18):2411-21.
- Lacroute, F. (1968): Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 95(3): 824-32.
- Lazazzera, B.A. (2000): Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol.*; 3(2): 177-82.
- Lecoq, K., Belloc, I., Desgranges, C., Daignan-Fornier, B. (2001): Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the *ADO1* gene and study of the mutant phenotypes. *Yeast* 18(4):335-42
- Lee J.C., Tsoi, A., Kornfeld, G.D., Dawes, I.W. (2013): Cellular responses to L-serine in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of general amino acid control, compartmentalization, and aspartate synthesis. *FEMS Yeast Res.* doi: 10.1111/1567-1364.12063.
- Ljungdahl, P. O., Fornier, B. D. (2012): Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, Vol. 190, 885–929.
- Ljungdahl, P. O., Gimeno, C. J., Styles, C. A., Fink, G. R., 1992. SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* 71, 463-478.
- Loison, G., Losson, R., Lacroute, F. (1980): Constitutive mutants for orotidine 5 phosphate decarboxylase and dihydroorotic acid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 2: 39–44.
- Long, L., Shu-Min, L., Jian-Hao, S., Li-Li, Z., Xing-Guo, B., Hong-Gang, Z., Fu-Suo, Z. (2007): Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *PNAS* 104 (27) 11192-11196
- Magasanik B. (2003): Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2(5):827-9
- Malinská, K., Malinský J, Opekarová, M., Tanner, W. (2004): Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J. Cell Sci.* 117 (Pt 25):6031-41
- Mäntsälä, P., Zalkin, H. (1984): Glutamine nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* *ADE4* encoding phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* 259(13):8478-84.
- Marcaggi, P., Coles, J.A. (2001): Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol.* 64(2):157-83.

- Marini, A.M., Urrestarazu, A., Beauwens, R., Andre, B. (1997b) – The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters, *Trends Biochem Sci.*; 22 (12):460-1.
- Mathew, R., White, E. (2011a): Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr Opin Genet Dev.* 21(1):113-9.
- Mathew, R., White, E. (2011b): Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 76:389-96.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. (1996): *Biochemistry*. Benjamin/Cumming Park, USA, California.
- Miller, B.G., Wolfenden, R. (2002): Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu Rev Biochem.* 71:847-85.
- Miller, B.G., Hassell, A.M., Wolfenden, R., Milburn, M.V., Short, S.A. (2000): Anatomy of a proficient enzyme: the structure of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in the presence and absence of a potential transition state analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(5):2011-6.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001): Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-99.
- Narayanaswamy, R., Levy, M., Tsechansky, M., Stovall, G.M., O'Connell, J.D., Mirrieles, J., Ellington, A.D., Marcotte, E.M. (2009): Widespread reorganization of metabolic enzymes into reversible assemblies upon nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(25):10147-52
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C. (2001): Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21: 4347–4368.
- Nieto, D.J., Woods, R.A. (1983): Studies on mutants affecting amidophosphoribosyltransferase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 29(6):681-8.
- Oechsner, U., Magdolen, V., Zoglowek, C., Häcker, U., Bandlow, W. (1988): Yeast adenylate kinase is transcribed constitutively from a promoter in the short intergenic region to the histone H2A-1 gene. *FEBS Lett.* 242(1):187-93.
- Palková, Z., Devaux, F., Řičicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C. (2002): Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* 13: 3901-14.
- Palková, Z., Forstová, J. (2000): Yeast colonies synchronise their growth and development. *J. Cell. Sci.* 113, 1923-1928.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390: 532-536.
- Palková, Z., Váchová, L. (2003): Ammonia Signaling in Yeast Colony Formation. *International Review of Cytology*, Vol. 225, p. 229 – 272
- Palková, Z., Váchová, L. (2006): Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:806–824.

- Palková, Z., Váchová, L. (2012): Communication and differentiation in the development of yeast colonies. *In: Witzany G. (ed): Biocommunication of Fungi. Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht-Heidelberg-London-New York, 141-154.*
- Palková, Z., Wilkinson, D., Váchová, L. (2013): Aging and differentiation in yeast populations: Elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Res.*, 1567-1364
- Palková, Z. (2004): Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. Review. *EMBO reports*, Vol. 5, No 5.
- Palmieri, L., Voza, A., Agrimi, G., De Marco, V., Runswick, M.J., Palmieri, F., Walker, J.E. (1999): Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J. Biol. Chem.* 274, 22184-22190.
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A., Saier, M.H., Jr. (1998): Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 430, 116 – 125.
- Pinson, B., Vaur, S., Sagot, I., Coulpier, F., Lemoine, S. (2009): Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev.* 23: 1399–1407.
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., Lopez-Ribot, J. L. (2002): Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5459–5463.
- Rébora, K., Laloo, B., Daignan-Fornier, B. (2005): Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. *Genetics* 170: 61–70.
- Rébora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., Daignan-Fornier, B. (2001): Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7901–7912.
- Rodwell, V. W. (1993): Nucleotides. *In: Murray, K.R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell V.W. Harper's Biochemistry, Prentice-Hall International Inc., London, 1993: 353–362.*
- Rolfes, R.J., Hinnebusch, A.G. (1993): Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase *GCN2*. *Mol Cell Biol.* 13(8):5099-111.
- Rolfes, R.J., Zhang, F., Hinnebusch, A.G. (1997): The transcriptional activators BAS1, BAS2, and ABF1 bind positive regulatory sites as the critical elements for adenine regulation of *ADE5,7*. *J. Biol. Chem.* 272: 13343–13354.
- Romero, D. (2013): Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology, Volume 164, Issue 7, Pages 788-798.*
- Roy, A. (1992): Nucleotide sequence of the *URA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 118: 149–150.
- Roy, A., Exinger, F., Losson, R. (1990): Cis- and trans-acting regulatory elements of the yeast *URA3* promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5257–5270.
- Rutherford, J.C., Chua, G., Hughes, T., Cardenas M.E., Heitman, J. (2008). A Mep2-dependent transcriptional profile links permease function to gene expression during pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 19(7):3028-39.



- Řičicová, M., Kučerová, H., Váchová, L., Palková, Z. (2007): Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta*. 1768(5):1170-8.
- Saint-Marc, C., Daignan-Fornier, B. (2004): GUD1 (YDL238c) encodes *Saccharomyces cerevisiae* guanine deaminase, an enzyme expressed during post-diauxic growth. *Yeast* 21(16):1359-63
- Saint-Marc, C., Pinson, B., Coulpier, F., Jourden, L., Lisova, O., Daignan-Fornier, B. (2009): Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183(2):529-38.
- Shaw, R. J., Wilson, J.L., Smith, K.T., Reines, D. (2001): Regulation of an IMP dehydrogenase gene and its overexpression in drug-sensitive transcription elongation mutants of yeast. *J Biol Chem*. 276(35):32905
- Sheff, M.A., Thorn, K.S. (2004): Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 21(8):661-70.
- Schricker, R., Angermayr, M., Strobel, G., Klinke, S., Korber, D., Bandlow, W. (2002): Redundant mitochondrial targeting signals in yeast adenylate kinase. *J Biol Chem*. 277(32):28757-64
- Schründer, S. Schnack-Schiel, S.B., Auel, H., Sartoris, F.J. (2013): Control of Diapause by Acidic pH and Ammonium Accumulation in the Hemolymph of Antarctic Copepods. *PLoS One*. 8(10):e77498.
- Sinha, H., David, L., Pascon, R.C., Clauder-Munster, S., Krishnakumar, S., Nguyen, M., Shi, G., Dean, J., Davis, R.W., Oefner, P.J., McCusker, J.H., Steinmetz, L.M. (2008): Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait Loci conditioning high-temperature growth in yeast. *Genetics* 180(3):1661-70
- Slutsky, B., Buffo, J., Soll, D.R. (1985): High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230(4726):666-9.
- Som, I., Mitsch, R.N., Urbanowski, J.L., Rolfes, R.J. (2005): DNA-bound Bas1 recruits Pho2 to activate *ADE* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. (10):1725-35.
- Springer, C., Kunzler, M., Balmelli, T, Braus, G.H. (1996): Amino acid and adenine cross-pathway regulation act through the same 59-TGACTC-39 motif in the yeast HIS7 promoter. *J. Biol. Chem*. 271: 29637–29643
- Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., Doering, T. L. (2014): *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*. doi: 10.1002/yea.2997
- Strachotová, D., Holoubek, A., Kučerová, H., Benda, A., Humpolíčková, J., Váchová, L., Palková, Z. (2012): Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM). *Biochim Biophys Acta*. 1818(9):2126-34.
- Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., Palková Z. (2010): General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genet Biol* 47: 1012-1022.
- Suzuki, T., Miyamae, Y., Ishida, I. (1991): Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. *J Gen Microbiol*. 137(1):161-7.
- Svoboda, N., Zierler, S., Kerschbaum, H.H. (2007). cAMP mediates ammonia-induced programmed cell death in the microglial cell line BV-2. *25(8):2285-95*.

- Thiebaut, M., Colin, J., Neil, H., Jacquier, A., Séraphin, B., Lacroute, F., Libri, D. (2008): Futile cycle of transcription initiation and termination modulates the response to nucleotide shortage in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*. 31(5):671-82.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G.R., Arndt, K. T. (1989): BAS1 has a Myb motif and activates *HIS4* transcription only in combination with *BAS2*. *Science* 246: 931–935
- Tosato, V., Grüning, N.M., Breitenbach, M., Arnak, R., Ralser, M., Bruschi, C.V., (2013): Warburg effect and translocation - induced genomic instability: two yeast models for cancer cells. *Frontiers in Oncology*. doi: 10.3389/fonc.2012.00212
- Umez, K., Amaya, T., Yoshimoto, A., Tomita, K. (1971): Purification and properties of orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase from baker's yeast. *J Biochem*. 70(2):249-62.
- Urban-Grimal, D., Pinson, B., Chevallier, J., Haguenaer-Tsapis, R. (1995): Replacement of Lys by Glu in a transmembrane segment strongly impairs the function of the uracil permease from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 308 ( Pt 3):847-51
- Váchová, L., Čáp, M., Palková, Z. (2012): Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation and longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2012: 601836.
- Váchová, L., Devaux, F., Kučerová, H., Řičicová, M., Jacq, C., Palková, Z. (2004): Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J. Biol. Chem*. 279:37973–37981.
- Váchová, L., Hatáková, L., Čáp, M., Pokorná, M., Palková, Z. (2013): Rapidly Developing Yeast Microcolonies Differentiate in a Similar Way to Aging Giant Colonies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2013, Article ID 102485, 9 pages.
- Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdík, Z., Fercíková, I., Kubínová, L., Palková, Z. (2009a): Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ.Microbiol*. 11:1866–1877.
- Váchová, L., Kučerová, H., Devaux, F., Úlehlová, M., Palková, Z. (2009b): Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ. Microbiol*. 11:494–504.
- Váchová, L., Palková, Z. (2005): Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *JCB Report*, Vol. 169: p. 711 – 717
- Varon, M., Choder, M. (2000): Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Bacteriol*. 182(13):3877-80.
- Villa-Garcia, M.J., Choi, M.S., Hinz, F.I., Gaspar, M.L., Jesch, S.A., Henry, S.A. (2011): Genome-wide screen for inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* implicates lipid metabolism in stress response signaling. *Mol Genet Genomics* 285(2):125-49
- Wagner, C.A., Devuyst, O., Belge, H., Bourgeois, S., Houillier, P. (2011): The rhesus protein RhCG: a new perspective in ammonium transport and distal urinary acidification. *Kidney Int*. 79(2):154-61.
- Wagner, K.G., Backer, A.I. (1992): Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int. Rev. Cytol* 1992; 134:1–84

- Wagner, R., Straub, M.L., Souciet, J.L., Potier, S., de Montigny, J. (2001): New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants. *J Bacteriol.* 2001 Jul;183(14):4386-8.
- Walther, T., Novo, M., Rössger, K., Létisse, F., Loret, M.O., Portais, J.C., François J.M. (2010): Control of ATP homeostasis during the respiro-fermentative transition in yeast. *Mol Syst Biol* 6:344
- Watanabe, M., Watanabe, D., Nogami, S., Morishita, S., Ohya, Y. (2009): Comprehensive and quantitative analysis of yeast deletion mutants defective in apical and isotropic bud growth. *Curr Genet* 55(4):365-80
- Xu, Y.F., Létisse, F., Absalan, F., Lu, W., Kuznetsova, E., Brown, G., Caudy, A., Yakunin, A., Broach, J., Rabinowitz, J. (2013): Nucleotide degradation and ribose salvage in yeast. *Molecular Systems Biology* 9:665.
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H. (2009): Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* (1):32-44.
- Zhang, T., Yan, Y., He, S., Ping, S., Alam, K.M., Han, Y., Liu, X., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., Xiang, W., Wang, X., Lin, M. (2012): Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Res Microbiol.* 163(5):332-9.
- Zikánová, B., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z. (2002): Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294. 962-967.