

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Zuzana Novosadová

Autofagie a další procesy v koloniích přírodních kmenů kvasinek

Autophagy and other processes in colonies of natural yeast strains

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

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.

V Praze, 10.8.2014

Podpis:

Tato práce vznikala v letech 2012 – 2014 za finanční podpory grantového projektu GAČR 13-08605S „Biofilmové kolonie divokých kvasinek: Vývoj, obranné strategie a regulační dráhy.“

Tato práce vznikla pod vedením Prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěla poděkovat za odborné vedení mé práce a za cenné rady. Chtěla bych touto cestou poděkovat také všem členům Laboratoře kvasinkových kolonií, především RNDr. Blance Zikánové, Mgr. Vítězslavu Plockovi, RNDr. Vratislavovi Šťovíčkovi, Ph.D. a RNDr. Ditě Strachotové, Ph.D. nejen za ochotu, podporu a pomoc při řadě experimentů, ale i za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* na pevném médiu vytvářejí mnohobuněčné útvary zvané kolonie. V rámci vývoje kvasinkové kolonie dochází k diferenciaci buněk a změnám metabolismu, mimo jiné se tvoří vrstva horních a dolních buněk. Metabolická aktivita horních a dolních buněk se liší. Například hladina autofagie je vyšší v U buňkách. V rámci této diplomové práce byl z dostupné literatury vytvořen ucelený přehled poznatků o molekulárních mechanismech autofagie v kvasinkách. Kolonie kvasinek při nedostatku živin do okolí v pulzech produkují amoniakový signál, díky kterému komunikují na dlouhé vzdálenosti. Studie, odhalující diferenciaci buněk v kolonii a amoniakovou signalizaci mezi koloniemi, byly prováděny s použitím laboratorních kmenů kvasinek. Kvasinky izolované z přírody vytvářejí trojrozměrné útvary zvané vrásčité kolonie. Kvasinky v rámci vrásčitých kolonií také vytvářejí různé buněčné subtypy, ale situace se zdá složitější než v rámci kolonií laboratorních kmenů kvasinek, které vytvářejí hladké kolonie. Pro studium diferenciaci a dalších procesů v koloniích divokých kmenů kvasinek byly vytvořeny kmeny produkující ukazatelové proteiny Icl2p, Pox1p, Mae1p, Pma1p, Pma2p, Ino1p, Met17p, Atg8p s fluorescenční značkou. Pro pozorování amoniakového signálu mezi koloniemi divokých kmenů kvasinek byl zaveden nový systém měření. V této diplomové práci bylo prokázáno, že mikrokolonie divokého kmene kvasinek produkují amoniakový signál v pulzech v podobném časování, jako mikrokolonie laboratorních kmenů kvasinek. Paralelní měření produkce amoniaku a pozorování fluorescence fúzních proteinů Ato1p-GFP a Icl2p-GFP ukázalo souvislost jejich fluorescence s amoniakovou signalizací. Dále byly vytvořeny kmeny laboratorních kmenů kvasinek produkující ukazatelové proteiny Icl2p, Cyc2p a Om45p s fluorescenční značkou a byla pozorována jejich produkce ve vývoji kolonií. Pozorování produkce fúzních ukazatelových proteinů Icl2p-GFP a Cyc2p-GFP, v koloniích laboratorních kmenů kvasinek, ukázalo souvislost amoniakové signalizace se změnami jejich produkce. Tato diplomová práce je odrazovým můstkem pro zkoumání diferenciaci buněk a amoniakové signalizace v koloniích divokých kmenů kvasinek.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, kolonie, kvasinky, amoniak, autofagie

Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* on solid media forms multicellular colonies. Cells within colonies undergo differentiation and metabolic diversification, including formation of two layers of cells called Upper and Lower cells. The metabolic activity of U and L cells is different. For instance a higher level of autophagy was observed in U cells. This thesis includes a literature review of molecular mechanisms of autophagy in yeasts. Yeast colonies, under starvation conditions, produce volatile ammonia signal. This signal allows them communicate over a distance. Studies, revealing cell differentiation within colonies and ammonia signalling among colonies, were performed in colonies of laboratory strains. Strains isolated from nature, so-called wild strains, form distinct structured colonies, termed fluffy. Yeast within fluffy colonies also form different cell types. However the situation seems to be more complex than within smooth colonies of laboratory strains. Strains were constructed during this study, which express marker proteins Icl2p, Pox1p, Mae1p, Pma1p, Pma2p, Ino1p, Met17p and Atg8p fused with fluorescent labels in order to study cell differentiation and other processes within fluffy colonies. Furthermore, a new system for measuring ammonia signalling in microcolonies of wild yeast strains was established. During this project it was found, that microcolonies of wild yeast strains produce volatile ammonia in pulses with similar timing to that, observed in microcolonies of laboratory yeast strains. Parallel measurement of ammonia production and observation of fluorescence of fusion proteins Ato1p and Icl2p in microcolonies of wild yeast strains revealed a correlation between their fluorescence and ammonia signalling. Furthermore laboratory yeast strains expressing fluorescently-tagged marker proteins Icl2p, Cyc2p and Om45p were constructed and production of these proteins during colony development was observed. The production of fusion proteins Icl2p-GFP and Cyc2p-GFP in colonies of laboratory yeast strains revealed a correlation between changes in their production and ammonia signalling. This thesis is a starting point for the investigation of cell differentiation and ammonia signalling in colonies of wild yeast strains.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, colony, yeasts, ammonia, autophagy

OBSAH

1	Úvod	9
2	Přehled literatury	10
2.1	Autofagie	10
2.1.1	Makroautofagie.....	11
2.1.1.1	Neselektivní makroautofagie	12
2.1.1.2	Selektivní makroautofagie	25
2.1.2	Mikroautofagie.....	28
2.2	Kolonie <i>S.cerevisiae</i>	30
2.2.1	Typy morfologie kvasinkových kolonií	30
2.2.2	Amoniaková signalizace u kolonií <i>S.cerevisiae</i>	32
2.2.3	Diferenciace kvasinkových kolonií	34
2.2.4	Ukazatelové proteiny pro studium různých procesů v koloniích.....	36
3	Materiál a metody.....	38
3.1	Materiál	38
3.1.1	Použité mikroorganismy	38
3.1.2	Seznam připravených kvasinkových kmenů.....	38
3.1.3	Vektory	39
3.1.4	Primery	41
3.1.5	Kultivační média	44
3.1.6	Ostatní materiál	46
3.1.7	Standardy molekulových hmotností	46
3.1.8	Počítačové programy a internetové databáze	47
3.2	Metody	48
3.2.1	Sterilizace	48
3.2.2	Práce s kvasinkovými kulturami	48
3.2.2.1	Kultivace a skladování	48
3.2.2.2	Konstrukce kmenů <i>S.cerevisiae</i>	48
3.2.2.3	Výsev kvasinkových kolonií	52
3.2.2.4	Sledování fluorescence	53
3.2.3	Metody práce s proteiny	53
3.2.3.1	Odběr buněk pro Western Blott analýzu	53
3.2.3.2	Příprava kvasinkových lyzátů a stanovení koncentrace proteinů	54
3.2.3.3	Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	55
3.2.3.4	Western-blott.....	56
3.2.3.5	Imunodetekce	56
3.2.4	Měření produkce amoniaku koloniemi	57

4	Cíle práce	59
5	Výsledky.....	60
5.1	Konstrukce kmenů odvozených od kmene BY4742 s proteiny značenými GFP a mCherry..	60
5.2	Sledování produkce proteinů značených GFP v rámci vývoje obřích kolonií	65
5.3	Konstrukce kmenů odvozených od divokého kmene BR-F s proteiny značenými GFP..	71
5.3.1	Značení proteinů označujících subtypy buněk v koloniích kmene BY4742.....	71
5.3.2	Značení proteinů Pma1p a Pma2p pomocí GFP.....	74
5.3.3	Konstrukce kmenů pro studium autofagie.....	76
5.4	Optimalizace metody pro studium amoniakové signalizace mikrokolonií kmene BR-F	81
6	Diskuse	93
6.1	Mitochondriální proteiny kmene BY4742.....	93
6.2	Konstrukce kmene se změnami <i>ATG8</i>	94
6.3	Optimalizace metody pro odběr amoniaku u divokého kmene BR-F.....	96
7	Souhrn	99
8	Seznam použité literatury	100

Seznam zkratk

Ape1	aminopeptidasa 1
bp	páry bazí (DNA)
BR-F	přírodní diploidní kmen <i>S.cerevisiae</i>
BR-S	diploidní domestikovaný kmen <i>S.cerevisiae</i> odvozený od kmene BR-F
BSA	hovězí sérum albumin
BY4742	haploidní laboratorní kmen <i>S.cerevisiae</i>
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cvt	dráha transportu látek z cytosolu do vakuoly
ECM	extracelulární matrix
etOH	etanol
fw	přímý (primer)
G418	geneticinové antibiotikum
GFP	zelený fluorescenční protein
GM	glycerolové kultivační médium
GTP	guanosin trifosfát
kDa	kilodalton
L buňky	dolní vrstva buněk kolonie laboratorního kmene kvasinek
MAPK	mitogen aktivovaná kinasa
MDR	transportéry mnohočetné lékové rezistence
NAT	nourseotricin
NT	nukleotid
NV	spojení jádro-vakuola
PAS	pre-autofagosomální komplex
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	fosfatidyl etanolamin
PKA	protein kinasa A
PMN	částečná mikronukleofagie
prApe1	prekurzor aminopeptidasy 1
PtdIns3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PtdIns3P	fosfatidylinositol-3-fosfát
rev	zpětný (primer)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
ssDNA	jednovláknová DNA
TORC	Tor komplex
U buňky	dolní vrstva buněk kolonie laboratorního kmene kvasinek
UPS	ubiquitin-proteasový systém
VFT-komplex	komplex obsahující Vps53p
YEPG	komplexní kultivační médium

1 Úvod

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři kvasinkových kolonií na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vytvářejí na pevném médiu mnohobuněčné útvary zvané kolonie. Laboratoř kvasinkových kolonií se dlouhodobě zabývá studiem amoniakové signalizace mezi koloniemi kvasinek *S.cerevisiae* BY4742 (Palková *et al.*, 1997, 2002; Zikánová *et al.*, 2002; Váchová a Palková, 2005). V rámci vývoje kvasinkové kolonie dochází k diferenciaci buněk a změnám metabolismu kvasinek. Dochází k tvorbě vrstev v rámci kolonií tzv. horní a dolní buňky (VÁCHOVÁ *et al.* 2009a; ČÁP *et al.* 2012). Bylo objeveno, že mezi horními a dolními buňkami se liší i míra autofagie (ČÁP *et al.* 2012). Jedním z cílů této diplomové práce bylo shrnout dosavadní poznatky o molekulárních mechanismech autofagie.

Diferenciace kolonií byla objevena u laboratorních kmenů *S.cerevisiae*, které na pevném agarovém médiu vytvářejí tzv. hladké kolonie. Kvasinky izolované z přírody, tzv. divoké kmeny, vytvářejí trojrozměrné útvary obsahující mimo jiné i extracelulární matrix (ŠŤOVÍČEK *et al.* 2012). Předmětem výzkumu naší laboratoře je kromě laboratorních kmenů také divoký kmen BR-F, který rovněž vytváří rozdílné buněčné subtypy, ale situace se zdá složitější, než u laboratorních kmenů (PALKOVÁ 2004; VÁCHOVÁ *et al.* 2011). Předmětem této diplomové práce bylo vytvořit kmeny s funkčním proteiny, značenými GFP, pro studium diferenciace kolonií divokých kmenů kvasinek.

Kolonie kvasinek *S.cerevisiae* při nedostatku živin vysílají do okolí amoniakový signál, díky kterému jsou schopny spolu komunikovat na dlouhé vzdálenosti. Produkce amoniaku probíhá v pulzech a má charakteristický průběh (PALKOVÁ *et al.* 1997). Studie zabývající se amoniakovou signalizací kolonií *S.cerevisiae* byly prováděny u laboratorního kmene kvasinek (PALKOVÁ *et al.* 2002; ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002; VÁCHOVÁ *et al.* 2009a). V rámci této diplomové práce byl připravován nový postup pro zkoumání amoniakové signalizace i u divokých kmenů kvasinek *S.cerevisiae*.

Tematické rozpětí této diplomové práce je velmi široké a zahrnuje nejen studium obřích kolonií kmene BY4742, ale zaměřuje se především na poznání procesů, probíhajících v koloniích divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F. Studium divokého kmene *S.cerevisiae* v naší laboratoři má již dlouhou tradici (KUTHAN *et al.* 2003; ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014) a tato diplomová práce usiluje o rozšíření možností jeho zkoumání.

2 Přehled literatury

2.1 Autofagie

Autofagie je proces, který se objevuje v eukaryotických buňkách od jednobuněčných kvasinek až po mnohobuněčný savčí organismus. Pokud se v blízkosti buňky nenachází zdroj živin, je nucena získávat stavební částice a energii z vlastních zásob, tedy například degradací makromolekul. Eukaryotická buňka dokáže proteiny a další makromolekuly rozložit několika způsoby. Mezi nejznámější patří degradace v ubiquitin-proteasovém systému (UPS) a autofagie (REGGIORI a KLIONSKY 2013). Na rozdíl od degradace v cytosolu pomocí UPS probíhá degradace autofagií ve vakuole, nebo lysosomu. Degradace proteinů v savčí buňce pomocí autofagie může dosáhnout až 4% celkového objemu proteinů za hodinu. V případě rostlinných buněk je toto procento ještě vyšší (TAKESHIGE *et al.* 1992). V případě autofagie může buňka velmi efektivně degradovat i celé organely, je tedy zapotřebí, aby tento proces byl velmi přesně regulován. Pokud by docházelo k náhodnému spouštění autofagie, mohlo by to pro buňku mít dalekosáhlé a dokonce i likvidační důsledky (YORIMITSU a KLIONSKY 2005a). V některých případech může buňka využít proces autofagie k likvidaci cizorodé bakterie nebo viru, který ji v cytoplasmě ohrožuje. Nicméně některé bakterie mohou zablokovat fúzi autofagosomu s lysozomem a naopak tento proces využít ve svůj prospěch (SHINTANI a KLIONSKY 2004b).

Zmínky o autofagii se v literatuře objevují již od šedesátých let dvacátého století. Například Ashford a Porter se zmiňují o tělískách nalezených v jaterních buňkách potkanů, které obsahují mitochondrie a endoplasmatické retikulum (ASHFORD a PORTER 1962). Nejprve byl výzkum autofagie zaměřen především na savčí buňky. V kvasinkových buňkách se výzkum autofagie dostal do popředí zájmu na přelomu tisíciletí (TAKESHIGE *et al.* 1992; TSUKADA a OHSUMI 1993). Již zpočátku se soudilo, že mechanismus kvasinkové autofagie je velmi podobný mechanismu autofagie v savčích buňkách (BABA *et al.* 1994).

V současné době jsou na poli výzkumu molekulárních mechanismů autofagie odborníky skupina Daniela Klionskeho, Ph.D. z University of Michigan, zabývající se autofagií u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a skupina z University of Tokyo pod vedením Noboru Mizushimy, Ph.D, která se zaměřuje na autofagii v savčích buňkách.

Kvasinky mají oproti savčímu organismu při zkoumání autofagie výhodu. Sledování funkčních mutant je zde snazší, než u savčích buněk (TSUKADA a OHSUMI 1993). Autofagie je v současné době členěna na makroautofagii a mikroautofagii, přičemž u obou je znám selektivní i neselektivní proces (viz. Obrázek č.1) (FENG *et al.* 2014).

2.1.1.1 Neselektivní makroautofagie

Neselektivní makroautofagie je proces, při kterém buňka obklopí nespecifický cytoplasmatický obsah a prostřednictvím autofagosomu jej dopraví do vakuoly, kde je degradován. Neselektivní autofagie probíhá na velmi nízké úrovni neustále a je indukovaná vývojovými signály anebo stresem (LEVINE a KLIONSKY 2004).

2.1.1.1.1 Molekulární mechanismy neselektivní makroautofagie u kvasinek

Hlavními proteiny podílejícími se na autofagii u kvasinek jsou Atg proteiny (AuTophagy), které se během autofagie hierarchicky uspořádávají (SUZUKI *et al.* 2007). Většina Atg proteinů je cytosolických a interagují s autofagosomem díky vazbám na další atg proteiny nebo lipidy (MARI *et al.* 2010). V podmínkách bez dostatku dusíku nejsou kvasinky schopny přežít při delecích v atg proteinech. Již v roce 1993 byla poprvé publikována studie charakterizující funkční mutanty v autofagii (TSUKADA a OHSUMI 1993). Podle kontextu svého objevení byly atg proteiny nazývány různými jmény, například cvt proteiny, když byly objeveny v souvislosti s Cvt dráhou. Nicméně ani v případě jejich objevení v souvislosti s autofagii nebylo jejich označení jednotné, objevila se označení apg a nebo aut. Před rokem 2003 bylo jistě velmi složité se zorientovat v tolika názvech mnohdy stejných proteinů. Situaci dalším vědcům, zabývajícím se autofagií usnadnil Daniel J. Klionsky Ph.D., se svými týmem, který shrnul všechny dosud známé názvy autofagických proteinů pod jednotné označení "atg". Současná nomenklatura, jak ji v roce 2003 popsal Klionsky, je shrnuta v tabulce č. 1. Atg proteiny s vyšším číslem než 27 byly předmětem novějších výzkumů, proto nejsou v tabulce zahrnuty. V rámci této diplomové práce je používáno pouze současné označení.

Současné označení	Předchozí označení					
	ATG	APG	AUT	CVT	GSA	PAZ
1	1	3	10	10	1	7
2	2	8	-	11	7	-
3	3	1	-	20	-	-
4	4	2	-	-	8	-
5	5	-	-	-	-	-
6	6	-	-	-	-	-
7	7	-	2	7	12	-
8	8	7	5	-	2	-
9	9	9	7	14	9	-
10	10	-	-	-	-	-
11	-	-	9	9	6	18
12	12	-	-	-	-	-
13	13	-	-	-	-	-
14	14	-	12	-	-	-
15	-	5	17	-	-	-
16	16	-	11	-	3	-
17	17	-	-	-	-	-
18	-	10	18	12	-	-
19	-	-	19	-	-	-
20	-	-	20	-	-	-
21	-	-	21	-	-	-
22	-	4	-	-	-	-
23	-	-	23	-	-	-
24	-	-	13	-	16	-
25	-	-	-	-	-	4
26	-	-	-	-	4	-
27	-	-	24	-	-	-

Tabulka č. 1: Současná nomenklatura ATG genů účastnících se autofagie a jejich předchozí označení. Adaptováno z (KLIONSKY *et al.* 2003)

Současné souhrnné články rozdělují Atg proteiny do pěti skupin podle fáze procesu autofagie, do kterého se začleňují (i) Atg1p protein kinasový komplex podílející se na iniciaci autofagie, (ii) komplex zahrnující Atg14p a fosfatidylinositol-3-kinasový komplex, (iii) Atg12p-Atg5p konjugační systém, (iv) Atg8p lipidový konjugační systém a (v) Atg9p recyklační systém (YORIMITSU a KLIONSKY 2005a; REGGIORI a KLIONSKY 2013; FENG *et al.* 2014). Tyto skupiny budou postupně podrobně rozebrány v následujících kapitolách. Dosud bylo objeveno ~ 38 atg proteinů podílejících se na autofagii v kvasinkách, které jsou shrnuty v následující tabulce (tabulka č. 2).

ATG charakteristika a funkce proteinu

1	serin/threoninová protein kinasa fosforylována mTORC1, podílí se na iniciaci autofagie
2	interaguje s proteinem Atg18p a spolu tvoří komplex vázající se na PtdIns3P spolu s Atg18p zajišťují retrográdní transport Atg9p
3	E2-podobný enzym váže Atg8p na PE (po jeho aktivaci pomocí Atg7p)
4	cysteinová C-terminální hydrolasa; štěpí vazbu Atg8p-PE štěpí terminální C-koncový arginin proteinu Atg8p
5	navázán na Atg12 skrze interní lysin společně s Atg12p tvoří komplex podobný E3
6	složka PtdIns3K komplexu I a II jiný název proteinu je Vps30p
7	enzym podobný E1 aktivující ubiquitin podobné proteiny Atg8p a Atg12p
8	ubiquitin podobný protein C koncem připojený na PE
9	integrální membránový protein; možný nosič membrány pro PAS
10	enzym podobný E2; spojuje Atg12 s Atg5
11	váže Atg19p, Atg33p a Atg36p; zprostředkovává jejich kontakt s PAS ubiquitin podobný protein
12	C-terminálním glycinem navázán na Atg5p (tvoří komplex Atg12p- Atg5p.Atg16p)
13	v komplexu s Atg1p, důležitý pro jeho kinasovou aktivitu hyperfosforylován pomocí TORC1
14	složka PtdIns3K komplexu I určuje specifitu PtdIns3K komplexu I pro makroautofagii
15	lipasa podílející se na rozkladu váčků ve vakuole
16	homodimerizuje a interaguje s Atg5p; vytváří komplex Atg1p-Atg5p.Atg16p
17	část Atg1 kinasového komplexu v komplexu s proteiny Atg29 a Atg31
18	váže PtdIns3P s Atg2p se podílí na retrográdním transportu Atg9p
19	receptor pro náklad Cvt váčku; váže Atg11p
20	část Atg1p komplexu; váže PtdIns3P
21	homolog Atg18p; váže PtdIns3P
22	vakuolární permeasa aminokyselin
23	podílí se na anterográdním transportu Atg9p
24	část Atg1p komplexu váže PtdIns3P
25	<i>protein zapojený do makropexofagie Hansenula polymorpha</i>
26	<i>glukosyltransferasa podílející se na pexofagii Pichia pastoris</i>
27	integrální protein účstnící se anterográdního transportu Atg9p
28	<i>protein vyskytující se u Pichia pastoris; hraje roli v pexofagii</i>

29	tvoří ternární komplex spolu s Atg17p a Atg31p na PAS v rámci selektivní makroautofagie
30	<i>receptor pro peroxisomy v rámci pexofagie Pichia pastoris</i>
31	tvoří ternární komplex spolu s Atg29p a Atg17p
32	mitochondriální protein vnější membrány sloužící jako receptor při mitofagii váže Atg8p a Atg11p
33	účastní se mitofagie
34	receptor pro α -mannosidasu při selektivní makroautofagii
35	<i>reguluje tvorbu MIPA při mikropexofagii u Pichia pastoris</i>
36	receptor pro Pex3p při pexofagii
37	<i>integrální protein peroxisomu; podílí se na vazbě Atg30p-Atg11p u Pichia pastoris</i>
38	účastní se propojení Atg14p-Vps34p a Vps30p/Atg6-Vps15p v rámci PtdIns3K komplexu I

Tabulka č. 2: Souhrnná tabulka funkce známých Atg proteinů v procesu makroautofagie. Kurzívou jsou vyznačeny proteiny nevyskytující se u *Saccharomyces cerevisiae*. Informace převzaty z (KAMETAKA *et al.* 1998; SHINTANI *et al.* 2001; KLIONSKY *et al.* 2003, 2011; STASYK *et al.* 2006; MIZUSHIMA *et al.* 2011; ARAKI *et al.* 2013; NAZARKO 2014)

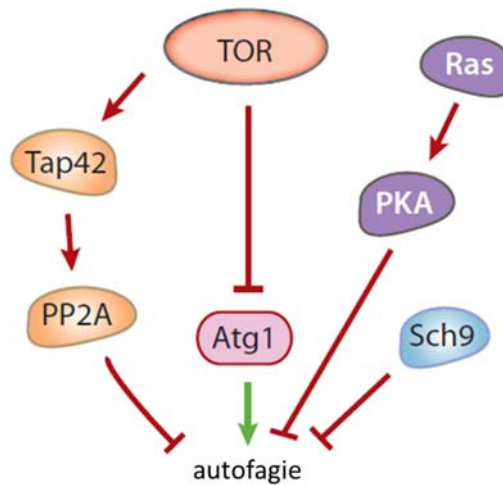
Kromě atg proteinů uvedených v tabulce č. 2, jsou známy další atg proteiny, které se podílejí na procesech autofagie u jiných organismů, než u kvasinek. Například protein Atg101, který v savčích buňkách formuje komplex s Atg13 a je pro indukci autofagie nezbytný (KLIONSKY *et al.* 2011).

2.1.1.1.2 Indukce a regulace autofagie

Autofagie je proces, který buňkám umožňuje přečkat nepříznivé období nedostatku živin. Kvasinky *S.cerevisiae* jsou schopny zaznamenat nedostatek živin několika signálními drahami a některé z nich vedou k indukci autofagie. Jednou z nich je Ras/PKA signální dráha, která je důležitá v regulaci růstu buněk v závislosti na dostupnosti živin. Při dostatku živin jsou malé GTPasy Ras aktivní a stimulují produkci cAMP, a tím zajistí následnou aktivaci Protein Kinasy A (PKA). Ras/PKA dráha dále ovlivňuje například protein kinasu Rim15p a transkripční faktory Msn2p a Msn4p (THEVELEIN a DE WINDE 1999). Druhou hlavní signální dráhou, reagující na dostupnost živin, je Tor signální dráha. Právě Tor signální dráha hraje hlavní roli v indukci autofagie. Tor tvoří dva rozdílné komplexy, Tor komplex I (TORC1) a Tor komplex 2 (TORC2). TORC1 je inaktivován v přítomnosti rapamycinu a při nedostatku živin. Inaktivace TORC1 vyvolá mnoho různých buněčných odpovědí, mimo jiné právě autofagii (CARDENAS *et al.* 1999).

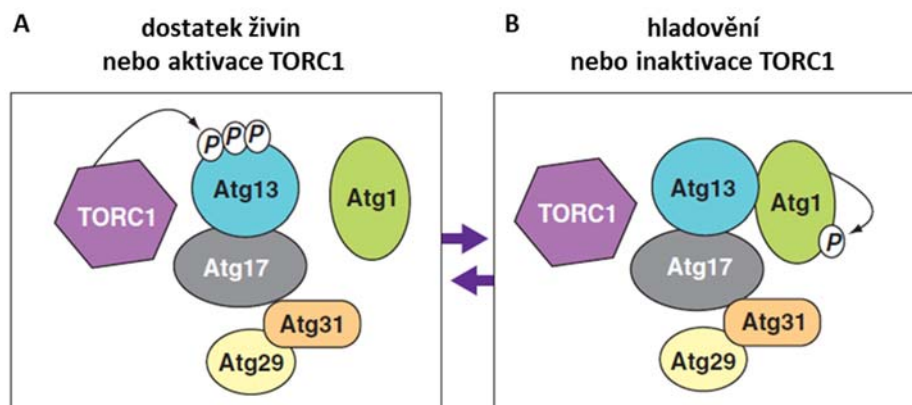
Tyto dvě hlavní signální dráhy se navzájem ovlivňují, PKA signální dráha zabraňuje aktivaci autofagie a zároveň Tor signální dráha reguluje lokalizaci Tpk1, katalytické podjednotky PKA. TORC1 také ovlivňuje kinasu Yak1, která nepřímo reguluje expresi Msn4p (NODA a OHSUMI 1998; SCHMELZLE *et al.* 2004). Autofagii v prostředí s dostatkem živin může

vyvolat inaktivace PKA zároveň s inaktivací Sch9p, kinasy, která se podílí na širokém spektru reakcí v závislosti na dostupnosti živin. Tedy na inaktivaci autofagie se spolupodílí i PKA a Sch9p (viz. Obrázek č. 2) (CRAUWELS *et al.* 1997; YORIMITSU *et al.* 2007).



Obrázek č. 2: Signální dráhy kvasinky *S.cerevisiae* ovlivňující indukci autofagie. Adaptováno z (HE a KLIONSKY 2009).

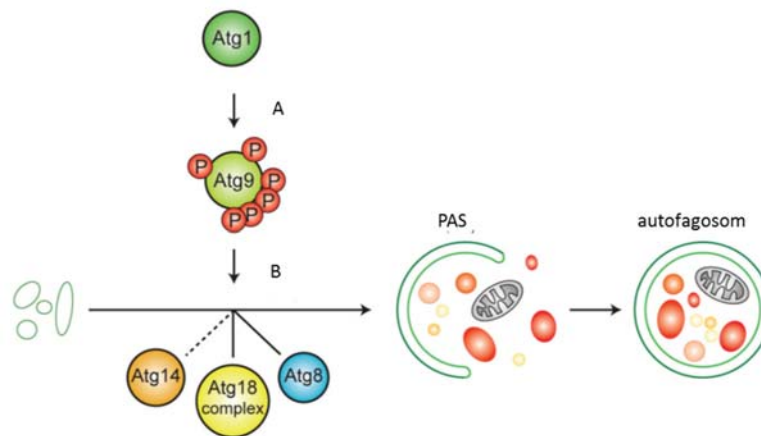
Na inaktivaci TORC1 komplexu reagují atg proteiny, které dále hrají roli v iniciaci procesu autofagie. Protein Atg13p je v případě dostatku živin hyperfosforylován, ale v případě inaktivace TORC1 je okamžitě defosforylován (viz. Obrázek č. 3). Defosforylovaný Atg13p má vysokou afinitu k serin/treonin kinase Atg1p, aktivuje ji a dále působí v komplexu Atg13p-Atg1p (KAMADA *et al.* 2000). Atg1p-Atg13p interaguje s Atg17p a v komplexu Atg1p-Atg13p-Atg17p zajišťuje iniciační kroky tvorby pre-autofagosomálního komplexu (PAS) a také se podílí na dynamickém obratu dalších Atg proteinů (CHEONG *et al.* 2005, 2008; KABEYA *et al.* 2005).



Obrázek č. 3: Dynamika regulace Atg13p a Atg1p. (A) v případě dostatku živin je Atg13p hyperfosforylováno a v (B) případě hladovění fosforylován není a váže se na Atg1p a tím ji aktivuje. Adaptováno z (CHEN a KLIONSKY 2011).

Atg17p tvoří spolu s proteiny Atg31p a Atg29p ternární komplex Atg17p-Atg31p-Atg29p, který funguje jako lešení pro nově vznikající PAS. Atg31p je tomto v komplexu fosforylován a působením rapamycinu (také při hladovění na dusík) je v buňkách jeho hladina zvýšena (KABEYA *et al.* 2009). Atg31p je pro indukci autofagie nezbytný a jeho lokalizace na PAS je závislá také na činnosti Atg17p, se kterým interaguje (KABEYA *et al.* 2007). Další složka komplexu, Atg29p, kolokalizuje s Atg17p a Atg31p na PAS a je rovněž pro autofagii nezbytný (KAWAMATA *et al.* 2005).

Protein Atg17p se spolu s Atg1p rekrutují k vznikající izolační membráně Atg9p, který je nezbytný pro další kroky maturace autofagosomu. Atg9p přímo interaguje s Atg17p a je fosforylován na šesti místech pomocí kinyasy Atg1p. Bez fosforylace Atg9p se izolační membrána nezačne prodlužovat a tedy nemůže dojít ke zformování autofagosomu (viz. obrázek č. 4). Tato fosforylace má pravděpodobně také vliv na rekrutování fosfatidylinositol-3-kinasového (PtdIns3K) komplexu I (NICE *et al.* 2002; PAPINSKI a KRAFT 2014).

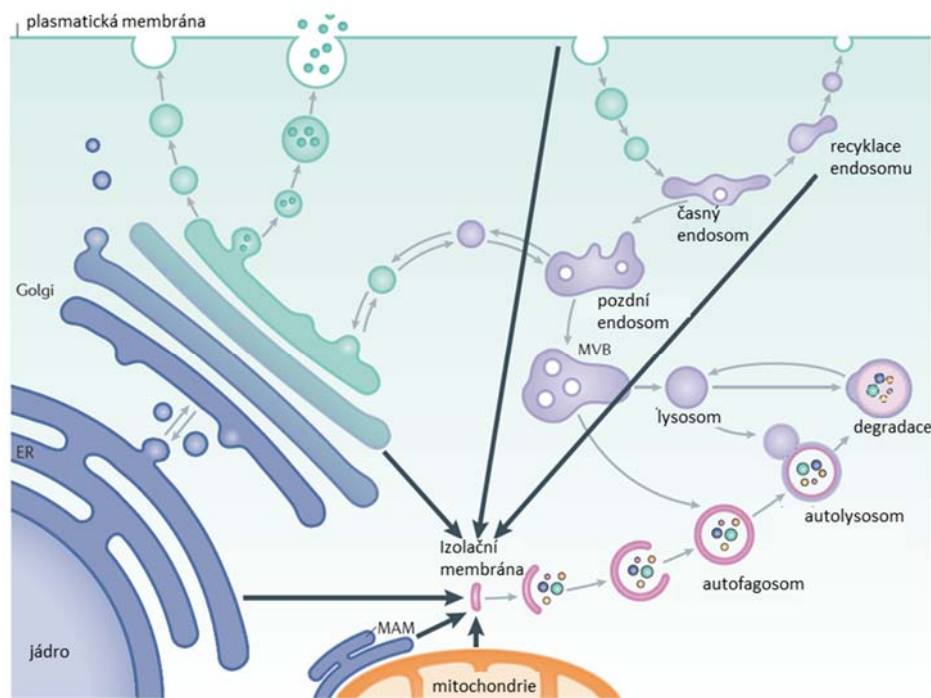


Obrázek č. 4: Schéma fosforylace Atg9p kinasou Atg1p po iniciaci autofagie. (A) Atg1p fosforyluje Atg9p na šesti místech. (B) fosforylace Atg9p umožní rekrutování dalších proteinů na PAS, například Atg18p a Atg8p. PAS - pre-autofagosomální struktura. Adaptováno z (PAPINSKI a KRAFT 2014).

Je zapotřebí, aby hladina autofagie byla regulována i negativně, aby nedocházelo k přílišné degradaci buněčného obsahu. Negativní regulace je zprostředkována přes protein DAP1 (death-associated protein), který je efektoem TOR komplexu. V případě inaktivace TOR komplexu se změní fosforylace dvou serinů (3 a 5) proteinu DAP1 a dojde k jeho aktivaci a k tlumení autofagie. Tímto způsobem může TOR zamezit přílišné míře autofagie v buňkách (KOREN *et al.* 2010).

2.1.1.1.3 Tvorba autofagosomu

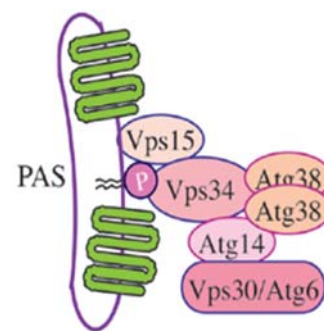
Na začátku tvorby autofagosomu se vytvoří izolační membrána, neboli fagofor. Jedná se o dvě fosfolipidové dvojvrstvy těsně u sebe. Fagofor vzniká v cytoplasmě odděleně od dalších membránových komponent detekovatelných pomocí elektronové mikroskopie. Kovács *et al.* v roce 2007 vyvrátil, že by zdrojem membrány byla cisterna tím, že označil prostor mezi dvěma membránami za minimální. Větší vzdálenost mezi membránami označil jako artefakt přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii. Uvádí také spekulace, že fosfolipidy k fagoforu přináší malinké váčky, které jsou pod detekčním limitem elektronové mikroskopie (Kovács *et al.* 2007). V současné době převládá názor, že zdrojem fosfolipidů izolační membrány jsou různé buněčné části, jako například endoplasmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát a další (viz. obrázek č. 5) (YEN *et al.* 2007; GENG a NAIR 2010; HAILEY *et al.* 2010; MCEWAN a DIKIC 2010; LAMB *et al.* 2013). Nicméně otázka původu izolační membrány není stále uspokojivě zodpovězena.



Obrázek č. 5: Možné zdroje membrány pro autofagosom zahrnují různé buněčné organely, například mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a další. MAM – membrány asociované s mitochondriemi. Adaptováno z (LAMB *et al.* 2013).

Ačkoliv původ fosfolipidů fagoforu není zcela objasněn, jsou známy procesy, ke kterým na nově vznikající izolační membráně dochází. Kvasinkové autofagosomy vznikají na pre-autofagosomální struktuře, neboli PAS (pre-autophagosomal structure /site), kde se sdružují všechny proteiny důležité pro vznik a expanzi fagoforu. PAS se v kvasinkových buňkách nachází v blízkosti vakuol (SUZUKI *et al.* 2001).

Tvorba fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P) na PAS je důležitou součástí iniciačních fází tvorby fagoforu (NICE *et al.* 2002). Na PtdIns3P se váží některé iniciační atg proteiny, jako například Atg18p v komplexu s Atg2p (SHINTANI *et al.* 2001; REGGIORI *et al.* 2004a). Jedinou kvasinkovou fosfatidylinositol-3-kinasou (PtdIns3K) třídy III je Vps34p, která specificky fosforyluje fosfatidylinositol na pozici 3 a podílí se v buňkách na mnoha procesech, mimo jiné je nezbytná pro transport proteinů (SCHU *et al.* 1993). Vyskytuje se ve dvou různých tetramerických komplexech spolu s Vps15p a Vps30p/Atg6p. Tyto dva komplexy byly pojmenovány komplex I a komplex III. Čtvrtou molekulou komplexu I je Atg14p a ke komplexu II patří Vps38p (KIYHARA *et al.* 2001; BURDA *et al.* 2002). Atg14p interaguje s Vps30p/Atg6p proteinem, který je pro vazbu na PAS nezbytný (KAMETAKA *et al.* 1998; KIYHARA *et al.* 2001; OBARA *et al.* 2006). Kvasinkový PtdIns3K komplex I je znázorněn na obrázku č. 6. Vps15p je regulační podjednotkou Vps34p komplexů a je nezbytný pro vazbu na membránu. S PAS interaguje nezávisle na Atg14p (OBARA *et al.* 2006). V rámci PtdIns3K komplexu I se uplatňuje také Atg38p, který svými C konci tvoří homodimery a N konci se váže na Atg14p a Vps34p. Zprostředkovává vazbu Vps15p-Vps34p a Atg14-Vps30/Atg6p, a tím zjednodušuje tvorbu komplexu I (ARAKI *et al.* 2013). Na PtdIns3P se váží iniciační atg proteiny, například Atg2p a Atg18p, které v komplexu Atg2p-Atg18p rekrutují protein Atg9p k PAS (REGGIORI *et al.* 2004a).



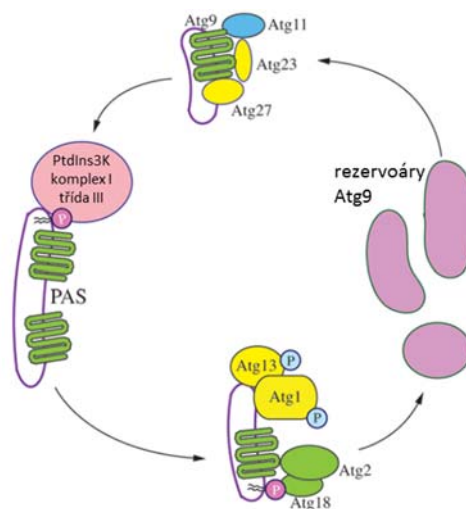
Obrázek č. 6: Kvasinkový PtdIns3K komplex I a jeho vazba přes Vps15p na PAS. Převzato z (FENG *et al.* 2014).

Atg9p je jedním z hlavních proteinů na vznikající membráně PAS. Atg9p je integrálním proteinem atg rodiny proteinů, který je nezbytný pro formaci autofagosomu (MARI *et al.* 2010). Také z tohoto důvodu je mu přisuzována role "nosiče" membrány, ze které izolační membrána vzniká. Přesná funkce Atg9p však není známa, ale předpokládá se, že by mohl hrát roli i v řízení procesů spojených se vznikem izolační membrány (JIN a KLIONSKY 2014). Po iniciaci autofagie je na šesti místech fosforylován prostřednictvím kinasy Atg1p. Současná literatura také uvádí, že tato fosforylace Atg9p by mohla hrát klíčovou roli v následném navázání PtdIns3K komplexu I prostřednictvím Atg14p (PAPINSKI a KRAFT 2014).

Atg9p je integrální protein, skládající se ze šesti transmembránových domén. Oba konce tohoto proteinu, N i C jsou vystaveny do cytosolu. Atg9p proteiny spolu interagují pomocí C konců a tato interakce je pro autofagii velmi důležitá, mimo jiné pro zformování normálního fagoforu v PAS. Tato interakce probíhá nezávisle na ostatních atg proteinech a je nezbytná při selektivní i neselektivní autofagii. Proteiny spolu interagují i v prostředí s dostatkem živin (HE *et al.* 2008). Reggiori *et al.* popisuje umístění rezervoárů Atg9p na mitochondriích, ale Mari *et al.* označuje tuto lokalizaci jako artefakt mitochondriální autofluorescence (REGGIORI *et al.* 2005; MARI *et al.* 2010). Mari *et al.* popisuje shluky

proteinů Atg9p s vesikly a tubuly, které jsou velmi často přítomny poblíž mitochondrií. Po přiblížení k vakuole tyto shluky tvoří základ membrány fagoforu (MARI *et al.* 2010). Při organizaci tubulovesikulárních shluků Atg9p proteinů hrají důležitou roli Q/t-SNARE proteiny, které zprostředkovávají fúze membrán i v pozdějších fázích vývoje autofagosomu (NAIR *et al.* 2011).

Cirkulace proteinu Atg9p mezi periferií a PAS závisí na několika dalších atg proteinech (viz. Obrázek č. 7). Pro anterográdní pohyb Atg9p z periferií na PAS jsou nezbytné proteiny Atg11p, Atg23p a Atg27p. Oscilace proteinu Atg23p je zároveň závislá na Atg9p. Atg23p interaguje s oběma konci (N i C) proteinu Atg9p a Atg27 interaguje s amino koncem Atg9p. Spojení proteinů Atg23p a Atg27p je pravděpodobně nepřímé a probíhá prostřednictvím Atg9p (LEGAKIS *et al.* 2007; YEN *et al.* 2007). Kromě PAS spolu proteiny Atg9p, Atg27p a Atg23p kolokalizují i na dalších dosud neidentifikovaných strukturách, mimo jiné také v blízkosti mitochondrií. Atg 27p a Atg9p jsou integrálními proteiny, ostatní atg proteiny účastníci se lokalizace Atg9p na PAS jsou solubilní a s membránami interagují periferně (LEGAKIS *et al.* 2007). Interakce proteinu Atg11p s PAS je také závislá na aktinovém cytoskeletu a pravděpodobně formuje určité lešení i pro Atg19p a Atg1p (HE *et al.* 2006). Pro anterográdní pohyb Atg9p je také zapotřebí funkční post-Golgi mechanismus váčkového transportu (OHASHI a MUNRO 2010).



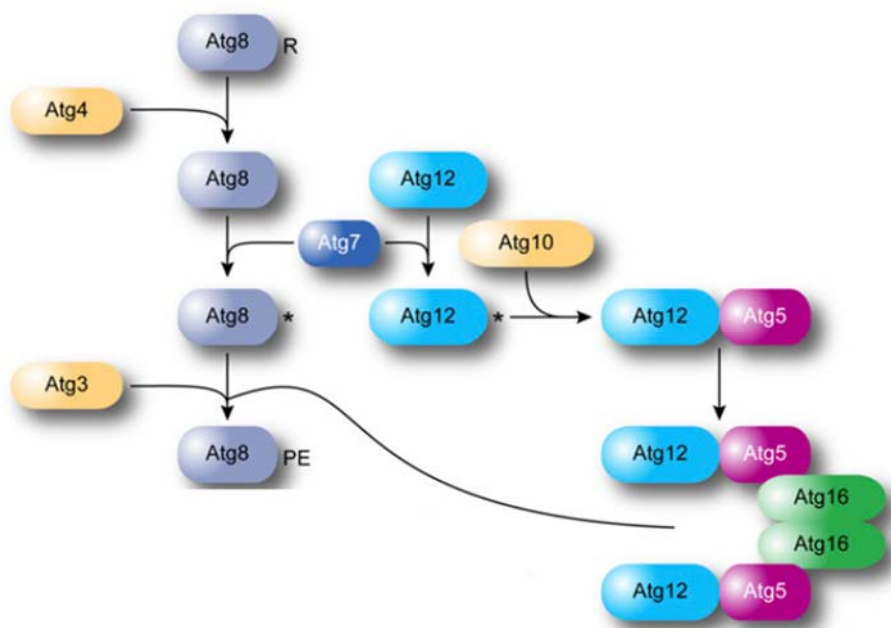
Obrázek č. 7: Model cirkulace Atg9p mezi PAS a periferií, tzv. rezervoáry Atg9p. Adaptováno z (FENG *et al.* 2014).

Pro retrográdní pohyb Atg9p z PAS na periferii je nezbytná jeho interakce s Atg1p, Atg2p a Atg18p. Recyklační koloběh Atg9 a Atg23 je ovládán pomocí komplexu Atg1-Atg13 (REGGIORI *et al.* 2004a). Atg9p i Atg23p pro svůj retrográdní pohyb potřebují Atg1p, ale pouze Atg9p potřebuje také Atg2p a Atg18p (REGGIORI *et al.* 2004a; LEGAKIS *et al.* 2007). Atg2p ke své funkci vyžaduje interakci s Atg1p kinasou a PtdIns3K komplexem I. Funkce Atg18p zahrnuje vazbu na fosfatidylinositol-3-fosfát a je zde tedy zapotřebí Atg14p a

PtdIns3K komplexu I (SHINTANI *et al.* 2001). Atg1p, atg13p a PtdIns3P jsou zapojeny do další formace membrány fagoforu (MARI *et al.* 2010).

Dalšími významnými kroky při expanzi fagoforu je tvorba komplexů, zahrnujících ubiquitinu podobné proteiny Atg12p a Atg8p (SUGAWARA *et al.* 2004; SHPILKA *et al.* 2011). Tvorba komplexů je velmi podobná procesu ubiquitinace. V případě tvorby obou komplexů je prvním krokem aktivace proteinů podobných ubiquitinu, tedy Atg12p a Atg8p, pomocí Atg7p, enzymu podobného E1. Pro jeho E1 enzymovou aktivitu je nezbytná homodimerizace Atg7p přes jeho C-konce (KOMATSU *et al.* 2001). Atg7p je jediným společným enzymem při aktivaci Atg12p a Atg8p, další kroky tvorby komplexů jsou již rozdílné (TANIDA *et al.* 1999) (viz. Obrázek č. 8).

V případě tvorby komplexu Atg12p-Atg5p první krok zahrnuje vazbu cysteinu v aktivním místě Atg7p thioesterovou vazbou k C-terminálnímu glycinu proteinu Atg12p. Po následné hydrolýze je Atg12p aktivní (TANIDA *et al.* 1999). Dalším krokem je tvorba thioesterové vazby Atg12p s cysteinem proteinu Atg10p, který má E2 enzymovou aktivitu a je schopen zprostředkovat tvorbu kovalentní vazby Atg12p a Atg5p (SHINTANI *et al.* 1999). Enzym podobný E3 není v procesu konjugace Atg12p-Atg5p znám. Ke komplexu Atg12p-Atg5p se připojuje malý protein Atg16p, který se váže na Atg5p. Atg16p interaguje s Atg5p pouze pokud je v komplexu s Atg12p (MIZUSHIMA *et al.* 1999). Díky schopnosti Atg16p tvořit homo-oligomery se v cytosolu vytváří několikanásobné Atg12p-Atg5p-Atg16p multimerní komplexy (KUMA *et al.* 2002).



Obrázek č. 8: Schéma atg proteinů podílejících se na tvorbě konjugačních komplexů s ubiquitinu podobnými proteiny Atg12p a Atg8p. Adaptováno z (REGGIORI a KLIONSKY 2013).

Jedním z posledních proteinů, navazujících se na PAS je Atg8p. Jeho vazba neovlivňuje navázání ostatních atg proteinů na vznikající membránu, ale je ovlivněna aktivitou komplexu Atg12p-Atg5p-Atg16p (SUZUKI *et al.* 2007; NODA *et al.* 2013). Atg8 je ubiquitin podobný protein, který je v procesu autofagie esenciální a bez něho nemůže probíhat. Protein Atg8p je bezprostředně po syntéze štěpen v C-koncovém regionu cysteinovou proteasou Atg4p, která odstraní koncový arginin (LANG *et al.* 1998; KIRISAKO *et al.* 1999, 2000). Takto upravený protein je dále aktivován pomocí Atg7p. Po aktivaci následuje konjugace Atg8p k fosfatidylethanolaminu (PE) na membráně pomocí Atg3p enzymu. Atg3p je analogem ubiquitin-konjugujícího enzymu E2, liší se ale v centrálním regionu, kde se nachází dvě části specifické pro vazbu Atg7p a Atg8p. (SCHLUMBERGER a SCHAEFFELER 1997; ICHIMURA *et al.* 2000; YAMADA *et al.* 2007; HANADA *et al.* 2007). Jako E3 podobný enzym, zprostředkovávající vazbu Atg8p k PE, působí komplex Atg12p-Atg5p. Atg12p se váže na Atg3p a umožňuje, aby se Atg5p navázal na Atg8p (NODA *et al.* 2013). Dalším proteinem, významným pro lokalizaci Atg8p k PAS, je Sec2p. V případě inaktivace proteinu Sec2p a nebo Sec4p znatelně klesne hladina autofagie v buňkách (GENG a NAIR 2010).

Přibližně čtvrtina genů, které se zapojují do procesu tvorby a zrání autofagosomů, se podílí na zprostředkování a dalším udržení vazby Atg8 a fosfatidylethanolaminu (PE)

(NAIR *et al.* 2012). Štěpení Atg8p-PE proteasou Atg4p v pozdějších fázích maturace autofagosomu je ale nezbytné pro normální formaci autofagosomů. Neschopnost Atg8p odvázat se od PE vede k jeho chybné lokalizaci a defektům autofagie i Cvt dráhy. Defekty se projeví i v případě nadprodukce Atg8p. V případě nefunkčního mechanismu štěpení Atg8p-PE v *Δatg4* buňkách se protein Atg8p vyskytuje ve vazbě s PE nejen na PAS a autofagosomech, ale také na jiných membránách. Pokud je mechanismus štěpení neporušen, tak Atg4p neustále štěpí Atg8p-PE ve všech ostatních místech v buňce kromě PAS a membrány autofagosomů (NAIR *et al.* 2012).

Atg8p je nejvíce používaným markerem pro pozorování autofagosomů a procesu jejich tvoření (KIRISAKO *et al.* 1999, 2000; XIE *et al.* 2008; NAIR *et al.* 2012). Atg8p je totiž jediným známým proteinem, který zůstává navázán na autofagosomu v průběhu celého procesu jeho zrání (NAIR *et al.* 2012).

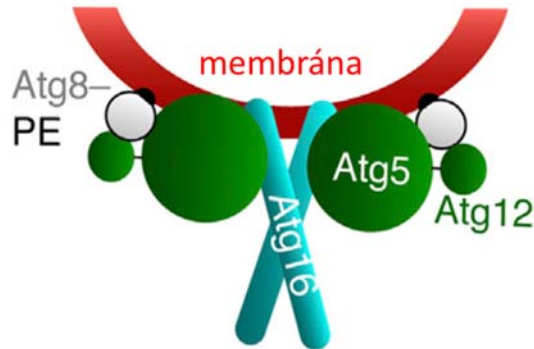
Expanze fagoforu a formování autofagosomu začne až ve chvíli, kdy je k membráně připojený Atg8p. Xie *et al.* v roce 2008 navrhl model expanze fagoforu vzhledem k Atg8p v pěti krocích: První krok zahrnuje lokalizaci faktorů nutných pro navázání Atg8p do blízkosti PAS. Ve druhém kroku se do struktury naváže Atg8p a membrána fagoforu začne expandovat. Třetí krok je přechodný a zahrnuje pokračující expanzi a začátek odvázení Atg8p z membrány. Ve čtvrtém kroku jsou uvolňovány další molekuly Atg8p. V posledním, pátém, kroku je autofagosom kompletní a některé molekuly Atg8p zůstaly uvnitř váčku (XIE *et al.* 2008).

Uvolnění Atg8p z PE pravděpodobně slouží jako určitý signál pro ostatní navázané proteiny na autofagosomu, například pro uvolnění proteinu Atg14p z PAS je jeho odštěpení nezbytné. Nair *et al.* v článku z roku 2012 také navrhuje, že by měl existovat mechanismus, který zabraňuje nechtěnému odštěpení Atg8p z membrány v průběhu formování autofagosomu. Ale takovýto mechanismus dosud nebyl popsán (NAIR *et al.* 2012).

Atg8-PE vazba řídí a indukuje fúzi liposomů *in vitro*, uvažovalo se tedy o roli Atg8-PE jako "fúzogenu" membrán *in vivo* (NAKATOGAWA *et al.* 2007). Fúzogenní role proteinu Atg8p ale může být pouze artefaktem v *in vitro* pokusech při použití liposomů s nefyziologicky vysokou koncentrací Atg8-PE na svém povrchu (55 mol%). V případě fyziologické koncentrace proteinu Atg8 (30 mol%) v podmínkách *in vitro* se jako fúzogen nechová. V takovém případě fúzi váčků zajišťují především Q/t-SNARE proteiny. (NAIR *et al.* 2011)

Xie *et al.* ve své studii tvrdí, že hladina Atg8p ovlivňuje velikost váčků, ale jejich počet v buňce neovlivní (XIE *et al.* 2008). Geng *et al.* naopak prokázal, že větší množství tohoto proteinu povede ke zvýšení počtu autofagosomů v buňce (GENG *et al.* 2008). Současná literatura se přiklání k názoru, že velikost autofagosomu je určena nejen velikostí nákladu, ale také množstvím Atg8p na vnější membráně autofagosomu. Spolu s Atg12p-Atg5p komplexem tvoří plášti podobné struktury na nově vznikajících autofagosomech a určují i jejich velikost. Atg12p-Atg5p-Atg16p tvoří spolu s Atg8p-PE organizovanou síť na povrchu

membrán (viz. Obrázek č. 9). Tato síť je velmi flexibilní a dokáže se přizpůsobit různým tvarům nákladu. Takto tvořený plášť je později disociován pomocí Atg4p (KAUFMANN *et al.* 2014; JIN a KLIONSKY 2014). Nicméně výzkum byl prováděn na obřích unilamelárních vesiklech *in vitro*, je tedy otázkou, jak tento mechanismus přesně funguje *in vivo*.



Obrázek č. 9: Schéma interakce komplexu Atg12p-Atg5p-Atg16p a Atg8p-PE dohromady tvořící stavební částici možného opláštění autofagosomů. Adaptováno z (KAUFMANN *et al.* 2014).

2.1.1.1.4 Maturace a fúze autofagosomu s cílovou membránou

Ve chvíli, kdy je autofagosom téměř uzavřen je Atg8p stále přítomen na konkávní straně fagoforu, která se později stane vnitřní membránou autofagosomu (XIE *et al.* 2008). Uvnitř autofagosomu se také nachází více PtdIns3P, tedy situace je podobná jako u endosomů v multivesikulárních tělískách. Zdá se tedy, že procesy maturace pozdního endosomu a autofagosomu jsou regulovány podobnými faktory. Nicméně proces autofagie využívá rozdílný proteinový aparát. Dynamika lipidů na membráně autofagosomu může také regulovat funkce Atg proteinů. Různé uspořádání lipidů podle oblasti autofagosomální membrány by mohlo pomoci formovat membránu v průběhu maturace (CEBOLLERO *et al.* 2012a).

Odštěpení Atg8p z membrány autofagosomu je nezbytné, jinak k fúzi nedojde (XIE *et al.* 2008). Pro fúzi autofagosomů s cílovou membránou u kvasinek je také nezbytná specifická PtdIns3P fosfatasa Ymr1p, která je přítomna již na PAS. Ymr1p napomáhá disociaci atg proteinů od autofagosomu v pozdních fázích zrání autofagosomu. V případě její inaktivace k fúzi váčků s cílovou membránou vůbec nedojde (CEBOLLERO *et al.* 2012b). V případě $\Delta YMR1$ stále dochází k autofagii, ale v malé míře. Protein Inp53p spolupracuje s Ymr1p při obratu PtdIns3P v buňce a může jej částečně i zastoupit (CEBOLLERO *et al.* 2012a).

Zformování autofagosomu trvá 4-5 minut a celý cyklus od začátku tvorby fagoforu až po fúzi autofagosomu s cílovou membránou trvá přibližně 7-9 minut. V buňce může začít další cyklus tvorby autofagosomu ještě předtím, než skončí ten předchozí (GENG *et al.* 2008). Podle studie autorů Baba *et al.* se morfologická struktura autofagosomu liší v závislosti na

podmínkách hladovění. V případě hladovění na uhlík jsou autofagosomy obklopeny dvojitou membránou s větším mezimembránovým prostorem. Pokud jsou kvasinky v prostředí s nedostatkem dusíku, jsou jejich autofagosomy více kompaktní a mezi membránami je jen minimální prostor (BABA *et al.* 1994). Nicméně v roce 2007 Kovács *et al.* ve své studii podotýká, že větší vzdálenost dvou membrán na povrchu autofagosomu je artefaktem (Kovács *et al.* 2007).

Po fúzi vnější membrány autofagosomu s vakuolou dojde nejprve k rozpadu vnitřní membrány autofagosomu. V průběhu degradace membrány a také nákladu autofagosomu je tato struktura nazývána autofagické tělísko. Autofagická tělíska jsou ve vakuole velmi rychle rozložena hydrolytickými enzymy a permeasami přemístěna do cytosolu, tak umožní buňce v nepříznivých podmínkách okamžitě využít takto získané živiny (BABA *et al.* 1997).

Ačkoliv bylo již publikováno mnoho studií zaměřujících se na indukci autofagie a na tvorbu autofagosomu, stále zůstává mnoho otázek nezodpovězených. Například přesný mechanismus aktivace iniciačních atg proteinů, které jsou ovlivněny inaktivací TORC1, a jejich spolupráce v začátcích tvorby autofagosomu. Přestože bylo již objeveno několik signálních drah vedoucích k indukci autofagie, jedná se o velmi spletitý mechanismus, ve kterém s dalšími studii stále přibývají nové proměnné.

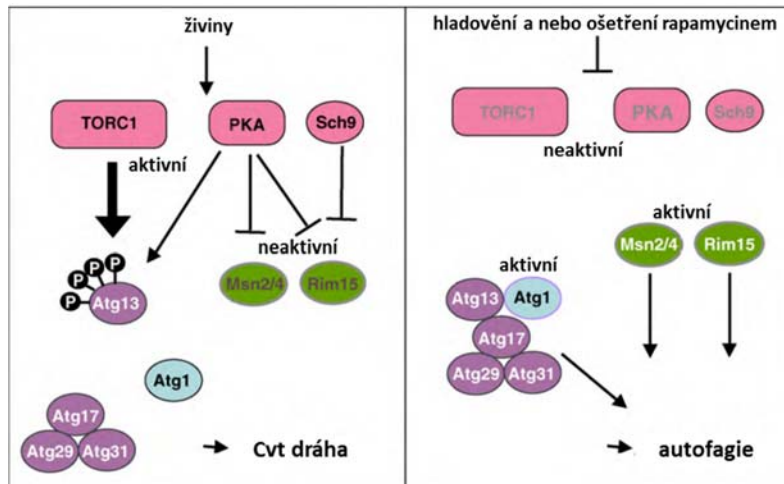
2.1.1.2 Selektivní makroautofagie

Selektivní makroautofagie je proces, při kterém dojde k obklopení konkrétního nákladu vesiklem s dvojitou membránou. U kvasinek *S.cerevisiae* jsou procesem selektivní makroautofagie do vakuoly dopravovány rezidentní vakuolární proteiny aminopeptidasa 1 a α -mannosidasa prostřednictvím Cvt (Cytosol to Vacuole Transport) dráhy. Dráhy selektivní autofagie využívá buňka také k likvidaci poškozených mitochondrií v rámci procesu mitofagie a také peroxisomů procesem pexofagie. Peroxisomy i mitochondrie mohou být do vakuoly dopraveny také selektivní mikroautofagií, nazývanou mikropexofagie a mikromitofagie.

2.1.1.2.1 Cvt dráha

Cvt dráha je typ selektivní autofagie, který slouží k dopravě rezidentních vakuolárních proteinů aminopeptidasy 1 a α -mannosidasy (Ams1) (KLIONSKY *et al.* 1992; HUTCHINS a KLIONSKY 2001; SHINTANI *et al.* 2002). Tato dráha selektivní makroautofagie na rozdíl od neselektivní autofagie probíhá v buňce prakticky neustále (viz Obrázek č. 10). Aminopeptidasa 1 (Ape1) postrádá klasickou signální sekvenci a je syntetizována do cytosolu jako prekurzor (prApe1) (KLIONSKY *et al.* 1992; SHINTANI *et al.* 2002). Nejprve se prApe1 uspořádá v cytoplasmě do formy dodekameru a tuto formu oligomeru si zachovává

po celou dobu svého transportu. Ams1 se v cytoplasmě také skládá do formy oligomeru a tak zůstává po celou dobu svého transportu stejně jako prApe1 (HUTCHINS a KLIONSKY 2001).



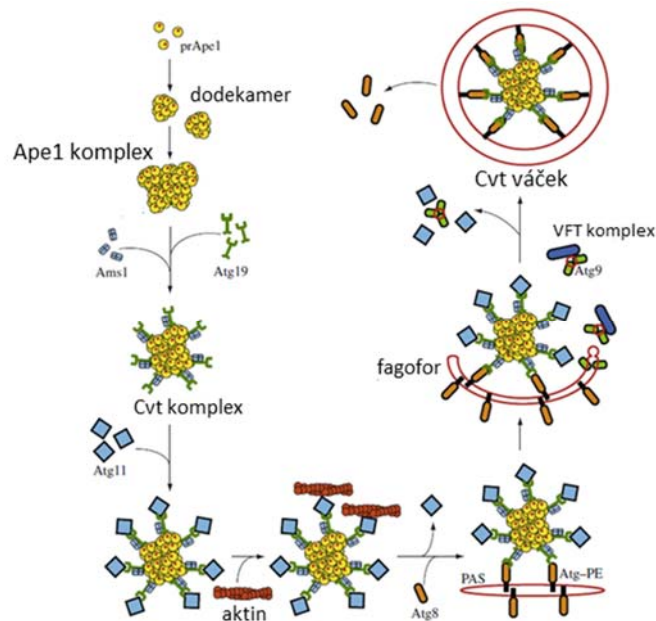
Obrázek č. 10: Srovnání indukce autofagie při hladovění a indukce Cvt dráhy v prostředí s dostatkem živin. Adaptováno z (INOUE a KLIONSKY 2010).

Dříve se v literatuře uváděla autofagie a cvt dráha odděleně, současná literatura ale označuje Cvt dráhu jako příklad selektivní autofagie (LYNCH-DAY a KLIONSKY 2010; FENG *et al.* 2014). Cvt váček je topologicky velmi podobný autofagosomu tvořenému v rámci neselektivní makroautofagie. Výrazný rozdíl je ale v jejich velikosti. Cvt váček má v průměru ~ 150nm, ale autofagosom může být i mnohonásobně větší v závislosti na nákladu, který pohltí (BABA *et al.* 1997).

Spojením několika dodekamerů prApe1 spolu s Ams1 se vytvoří náklad pro Cvt váček, takzvaný Cvt komplex (SCOTT *et al.* 1997). Na takto vytvořený Cvt komplex se naváže protein Atg19p, který funguje jako receptor pro náklad Cvt váček. Na Atg19p se naváže adaptorový protein Atg11p, který přiblíží náklad k PAS (KIM *et al.* 2001; SHINTANI a KLIONSKY 2004b). Na tomto pohybu se podílí mimo jiné i aktin (viz. Obrázek č. 11).

Atg11p tvoří homodimer a interaguje s Atg1p, Atg17p, Atg20p a Atg24p. Význam Atg20p a Atg24p pro Cvt dráhu nebyl zatím přesně popsán, ale vzhledem k tomu, že se jedná o proteiny vážící PtdIns3P, mohou hrát roli ve vazbě Cvt komplexu k fagoforu (NICE *et al.* 2002; YORIMITSU a KLIONSKY 2005b). V blízkosti PAS se Atg19p s navázaným Cvt komplexem naváže na Atg8p. Postupně se všechny Atg19p, které obklopují Cvt komplex, naváží na Atg8p a dojde k postupnému obklopení Cvt komplexu fagoforem a k tvorbě Cvt váčku (BABA *et al.* 1997; SHINTANI *et al.* 2002). Na správném navázání Cvt komplexu na fagofor se podílí také VFT-komplex (Vps Fifty-three Tethering). Tento komplex se skládá z proteinů Vps51p, Vps53p a Vps54p, které se mimo jiné spolupodílejí na fúzi membrán fagoforu na vznikajícím

Cvt váčku. Fúze membrán se také účastní SNARE proteiny Tlg1p a Tlg2p (REGGIORI *et al.* 2003; REGGIORI a KLIONSKY 2006).



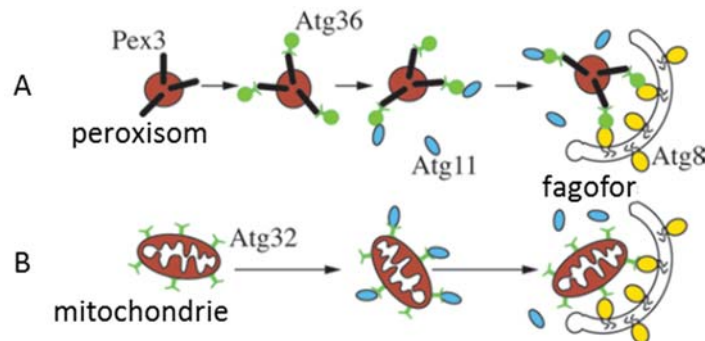
Obrázek č. 11: Proces formování Cvt váčku. Adaptováno z (LYNCH-DAY a KLIONSKY 2010).

2.1.1.2.2 Mitofagie a Pexofagie

Rozlišujeme mitofagii typu 1, 2 a 3. Mitofagie prvního typu je vyvolána v podmínkách nedostatku živin a mitochondrie je degradována v procesu selektivní makroautofagie. Mitofagie typu 2 byl popsán u savců a je iniciován poškozením mitochondrií. V tomto případě k degradaci mitochondrie není nutný PAS, ani činnost PtdIns3K. Mitofagie třetího typu zahrnuje mikromitofagii, která probíhá invaginací membrány multivesikulárního tělíska a nebo vakuoly (LEMASTERS 2014). Mitofagie tedy může být regulována i nezávisle na mechanismu indukce autofagie, například glutathion je schopen mitofagii inhibovat (DEFFIEU *et al.* 2009). Mitofagie prvního a třetího typu je u kvasinek ovládána také prostřednictvím dvou mitogeny-aktivovaných protein kinas (MAPKs) Hog1p a Slt2p. Hog1p je specifický pro mitofagii, ale Slt2p, který ovlivňuje připojení mitochondrie k PAS, hraje svou roli i při pexofagii (MAO *et al.* 2011). Mikromitofagie je preferována při kultivaci kvasinek na laktátu, nefermentovatelném zdroji uhlíku (KISSOVÁ *et al.* 2007).

V rámci mitofagie prvního typu je selektivní rozeznání nákladu, tedy mitochondrie, zprostředkováno proteinem Atg32p, který je pro mitofagii specifický. Možným ligandem na povrchu mitochondrie je Uth1p, který je membránovým proteinem vnější membrány mitochondrie a je nezbytný pro mitofagii indukovanou rapamycinem (KISSOVÁ *et al.* 2004). Atg32p se dále váže na Atg11p, který zajistí připojení mitochondrie k PAS (viz. obrázek č. 12). Atg32p se naváže na Atg8p na PAS a fagofor obklopí celou mitochondrii (KANKI *et al.*

2009c). Mitofagie se účastní i další protein, Atg33p, který je nezbytný, ale jeho přesná funkce zatím není známa (KANKI *et al.* 2009b; KLIONSKY *et al.* 2011).



Obrázek č. 12: Mechanismus selektivní autofagie (A) pexofagie a (B) mitofagie. Adaptováno z (FENG *et al.* 2014).

Pexofagie je proces, kdy jsou peroxisomy dopravovány do vakuoly a degradovány. Proces degradace peroxisomů nastává ve chvíli, kdy je kvasinka přenesena z média ve kterém se peroxisomy množí, například methanolové médium, do média s glukosou nebo s nedostatkem dusíku (HUTCHINS *et al.* 1999). Integrovaný membránový peroxin Pex14p a Pex3p je pravděpodobně ligandem pro Atg36p (BELLU a KIEL 2003; HARA-KUGE a FUJIKI 2008). Protein Atg36p je specifický pro makropexofagii a podobně jako Atg32p v případě mitofagie, váže Atg11p a Atg8p na PAS (MOTLEY *et al.* 2012).

Při procesech makro- i mikropexofagie v kvasince *Pichia pastoris* se uplatňuje protein Atg28p, jehož homology nebyly v ostatních kvasinkách nalezeny (STASYK *et al.* 2006).

2.1.2 Mikroautofagie

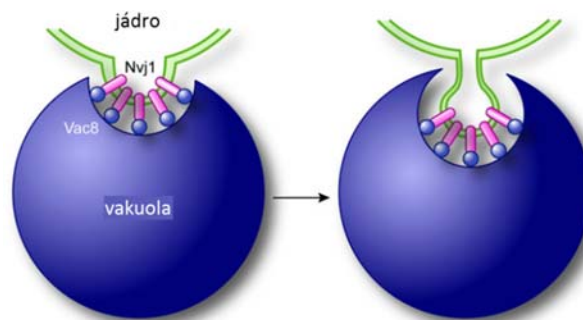
Mikroautofagie spočívá v pohlcení nákladu do vakuoly, které probíhá přímo na membráně vakuoly. Účel a molekulární mechanismy neselektivní mikroautofagie nejsou dosud dostatečně objasněny, ale uvažuje se o paralelách s dráhou MVB, ve které endosomální membrána vytváří intralumenální váčky invaginací membrány. Nicméně proteiny MVB dráhy pravděpodobně roli v procesech autofagie nehrají (REGGIORI *et al.* 2004b).

V rámci neselektivní mikroautofagie je část cytosolu, tedy náklad, obklopen válcovými strukturami vznikajícími invaginací vakuolární membrány. Postupně se kolem nákladu vytvoří váček, který pravděpodobně vzniká nezávisle na buněčném cytoskeletu (MÜLLER *et al.* 2000; SATTLER a MAYER 2000).

Nejvíce prozkoumanými případy selektivní mikroautofagie jsou mikropexofagie, mikromitofagie a postupné rozložení jádra - mikronukleofagie. Mikropexofagie probíhá za

pomocí specifického mikropexofagického aparátu (MIPA), což je uskupení membránových cisteren, které obklopí pohlcované peroxisomy (Oku *et al.* 2003).

Mikronukleofagie (PMN – Piecemeal Microautophagy of Nucleus) je zprostředkována interakcí proteinu Vac8p na povrchu vakuoly s proteinem Nvj1p na povrchu jádra (viz. Obrázek č. 13). Přiblížení membrán vakuoly a jádra pomocí těchto proteinů se nazývá NV (nukleus-vacuole). PMN je řízena pomocí TORC1 a probíhá v rychle se dělících buňkách a je indukována při akutním nedostatku zdrojů dusíku a uhlíku (ROBERTS *et al.* 2003; MILLEN *et al.* 2009).



Obrázek č. 13: Schéma mikronukleofagie. Pohlcení části jádra je zprostředkováno vazbou Nvj1p a Vac8p. Adaptováno z (REGGIORI a KLIONSKY 2013).

2.2 Kolonie *S.cerevisiae*

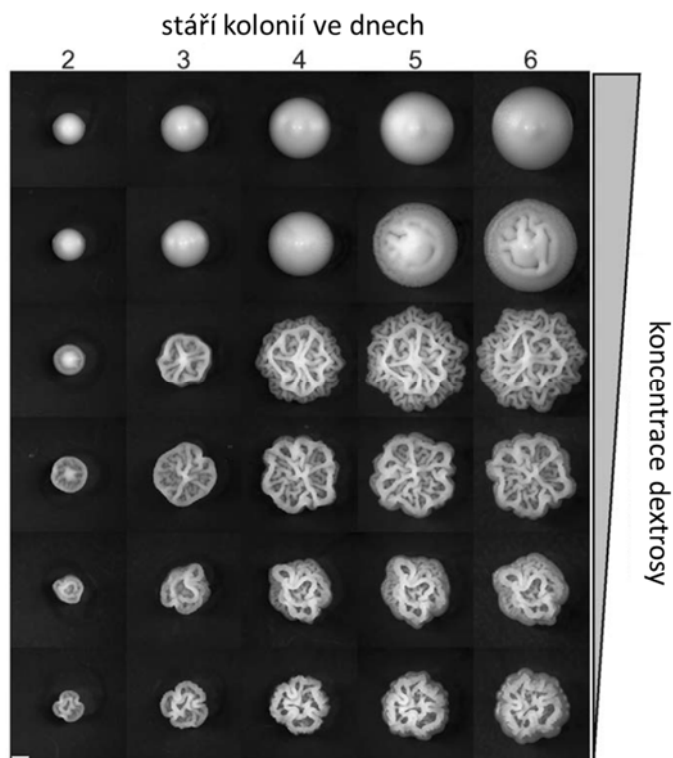
Kolonie je společenstvem mikroorganismů, které vzniká růstem nepohyblivých buněk na povrchu pevného substrátu. V laboratořích se takové společenstvo tvoří zpravidla na agarovém médiu, na rozhraní se vzduchem. Buněčný růst je na rozdíl od třepaných kultur limitován omezenou difúzí živin z okolí. V přírodě vytvářejí kvasinky i bakterie často velmi komplexní trojrozměrné kolonie obsahující i extracelulární matrix (PALKOVÁ 2004).

2.2.1 Typy morfologie kvasinkových kolonií

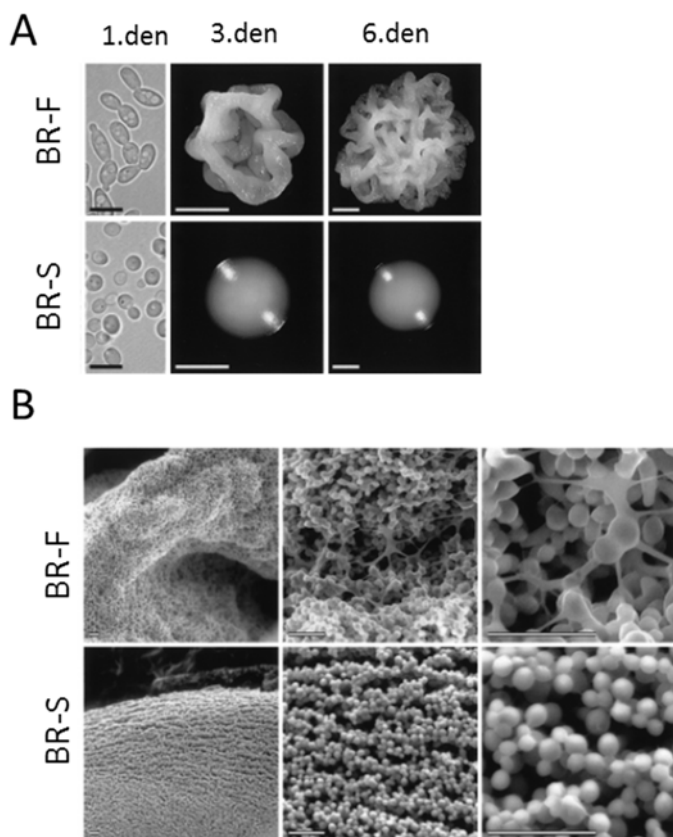
Běžně používané laboratorní kmeny kvasinek *S.cerevisiae* (například kmen BY4742) vytvářejí, až na výjimky, hladké kolonie. Naopak kmeny izolované z přírody, často tvoří trojrozměrné heterogenní útvary, které se nazývají strukturované kolonie (PALKOVÁ 2004). Morfologie kolonií se liší v závislosti na kmenu kvasinky a je ovlivněna mnoha faktory, například kvasinkovou ploidií. Je také možné ovlivnit architekturu a tvar kolonie kultivačními podmínkami. Například kolonie některých kmenů *S.cerevisiae* při dostatečné koncentraci fermentovatelného zdroje uhlíku v médiu svou strukturu ztrácejí, naopak snížená dostupnost uhlíku a dusíku může vyvolat tvorbu složitějších struktur (viz. obrázek č. 14) (GRANEK a MAGWENE 2010). Při zvýšení koncentrace agaru v kultivačním médiu vykazují některé kmeny *S.cerevisiae* extrémní růst ve vertikálním směru a mohou tvořit tzv. stopku (SCHERZ *et al.* 2001). Při růstu na kultivačním médiu s nízkou koncentrací agaru tvoří struktury nazývané „maty“. Jedná se o tenkou vrstvu buněk na agaru podobnou biofilmu. Morfologie těchto struktur je také ovlivněna ploidií (REYNOLDS a FINK 2001).

Kvasinky jsou tedy schopny vytvářet velkou fenotypovou variabilitu kolonií, které se vyznačují často velmi rozdílnou morfologií. Každý z těchto fenotypů si zároveň udržuje schopnost přecházet v jiný fenotyp. Tento fenomén byl nejprve pozorován u patogenní kvasinky *Candida albicans*, která je schopna spontánně přepínat mezi nejméně sedmi typy morfologií (SLUTSKY *et al.* 1985). Schopnost přepínání fenotypů může kvasinkám zajistit lepší adaptaci na dynamicky se měnící prostředí. Například patogen *Cryptococcus neoformans* se pomocí přepínání fenotypů dokáže přizpůsobit různým hostitelům (D'SOUZA a HEITMAN 2001). V patogenních kvasinkách je přepínání fenotypů zapříčiněno mnoha procesy, například změnou exprese, aktivací mutátorových genů, transpozicí mobilních elementů anebo přeskupením repetitivních DNA elementů v genomu (DEITSCH *et al.* 1997).

Kmen BR-F (fluffy) *S.cerevisiae* izolovaný z přírody vytváří trojrozměrné strukturované kolonie jejichž buňky jsou propojeny extracelulární matrix (ECM). Při kultivaci na agarovém médiu bohatém na živiny po několika pasážích tento kmen přechází z produkce tzv. vrásčitých kolonií k tvorbě hladkých kolonií. Tento proces se nazývá domestikace a kmen vytvářející hladké kolonie se označuje BR-S (smooth) (viz. obrázek č. 15) (KUTHAN *et al.* 2003).



Obrázek č. 14: Morfologie kolonií kmene YJM311 v čase a v závislosti na koncentraci dextrosy v kulturačním médiu. Měřítka odpovídá 1mm. Adaptováno z (GRANEK a MAGWENE 2010).



Obrázek č. 15: (A) srovnání buněk i morfologií kolonií BR-S a BR-F 1., 3. a 6. den kultivace, černé měřítko odpovídá 10 μ m, bílé měřítko odpovídá 1mm; (B) povrch sedmidenních kolonií BR-F a BR-S sledovaný pomocí ESEM (environmentální skenovací elektronový mikroskop), měřítko odpovídá 20 μ m. Adaptováno z (KUTHAN *et al.* 2003).

Domestikace kmenů je doprovázena výraznými změnami v genové expresi. Hlavní změny byly zaznamenány v uhlíkovém metabolismu, Ty-transposonech, buněčném cyklu, metabolismu vitaminů a polaritě buněk. Tvorba vrásčitých kolonií může být strategií k přežívání za nepříznivých podmínek, která není v příznivých laboratorních podmínkách potřebná. V rámci vrásčitých kolonií jsou buňky více rozptýleny v prostoru, takové uspořádání poskytuje výhodu v kompetici o prostor. Buňky vrásčitých kolonií mají protáhlejší tvar, než buňky hladkých kolonií (viz. obrázek č. 15) (KUTHAN *et al.* 2003). Přechod mezi vrásčitými a hladkými koloniemi kvasinky *S.cerevisiae* zahrnuje také represí genu *AQY1*, který kóduje aquaporin. Tato represe ukazuje na změny v permeabilitě membrán buněk tvořících různé typy kvasinkových kolonií. Zajímavé je, že gen *AQY1* je v mnoha laboratorních kmenech kvasinek mutován (BONHIVERS *et al.* 1998; LAIZÉ *et al.* 1999). Adaptace kolonií může také zahrnovat remodelaci chromatinu vzhledem k tomu, že v rámci přepínání mezi hladkým a vrásčitým fenotypem se mění transkripce (KUTHAN *et al.* 2003). Mnoho genů zapojených do produkce komplexních kolonií je součástí signálních kaskád MAP kinasové dráhy a nebo Ras-PKA dráhy. Právě tyto dvě dráhy kvasinkám umožňují adaptovat se na změnu prostředí (GRANEK a MAGWENE 2010). Domestikovaný kmen BR-S, tvořící hladké kolonie, je možné nepříznivými podmínkami přimět k tvorbě vrásčitých kolonií a takto indukovaný kmen je nazýván BR-RF (re-fluffy). Genová exprese BR-RF se ale v některých aspektech liší od exprese genů v kmeni BR-F (ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014).

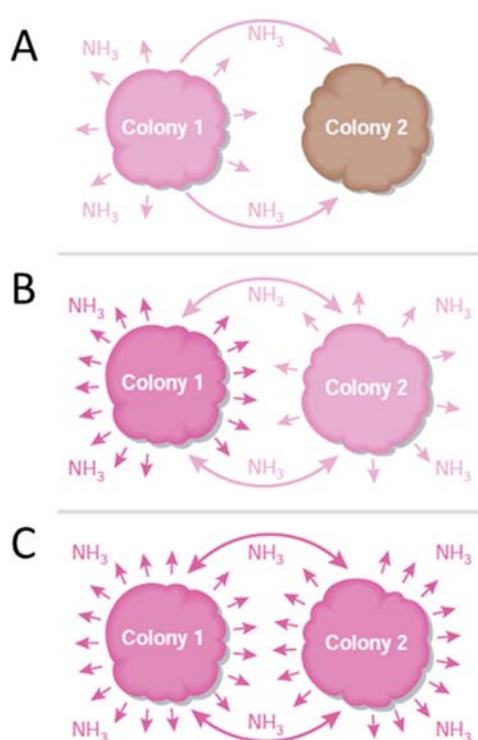
2.2.2 Amoniaková signalizace u kolonií *S.cerevisiae*

Komunikace organismů jednobuněčných i mnohobuněčných probíhá nejen na základě přímého fyzického kontaktu, ale také na dlouhou vzdálenost pomocí molekul uvolňovaných do prostředí. Mezi nejznámější signální molekuly patří feromony, které hrají důležitou roli v rozmnožování organismů od kvasinek až po člověka (DUNTZE *et al.* 1970). Pro přenos signálu na dlouhou vzdálenost jsou nejvhodnější molekuly plynů, zejména těch, které jsou schopné difundovat přes biologické membrány. Jedním z vhodných kandidátů je amoniak. Amoniak je ve vodě dobře rozpustný, bezbarvý plyn, který při pH 9,23 (pKa amoniaku) tvoří stejné množství nabitě (NH_4^+) a nenabitě formy (NH_3). Amonné ionty jsou pro kvasinky *S.cerevisiae* preferovaným zdrojem dusíku, nicméně jsou schopny pro získání dusíku použít široké spektrum látek (HOFMAN-BANG 1999). Amonné ionty jsou kvasinkami přijímány pomocí tří homologních methylamoniových permeas Mep1p, Mep2p a Mep3p. Exprese těchto tří permeas je závislá na dostupných zdrojích dusíku (MARINI *et al.* 1997).

Kolonie kvasinek rodu *S.cerevisiae*, *Candida mogii* či *Rhodotorula glutinis* jsou schopny po určité době růstu na médiu produkovat amoniak a alkalizovat své okolí (PALKOVÁ *et al.* 1997). Produkce amoniaku závisí na přítomnosti aminokyselin v médiu, a také na transportérech aminokyselin (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Kolonie kvasinek *S.cerevisiae* produkují plyný amoniak v pulzech (viz. obrázek č. 16). První alkalický pulz není orientován a je následován acidifikací média. Druhý alkalický pulz je silnější a je orientován směrem k sousedním koloniím. Alkalický pulz je opět následován acidifikací média (PALKOVÁ *et al.* 1997).



Obrázek č. 16: Průběh acidifikace a alkalizace kultivačního média s pH indikátorem v okolí obřích kolonií kmene BY4742. Adaptováno z (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b).



Amoniak produkovaný jednou kolonií dokáže přimět kolonie v okolních oblastech k produkci amoniaku nehledě na jejich vývojové stádium (viz. obrázek č. 17). Nejstarší kolonie je tedy schopna indukovat tvorbu amoniaku u okolních kolonií (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Molekuly amoniaku slouží jako určitý stresový signál vyvolaný například hladověním anebo oxidačním stresem (PALKOVÁ 2004). Kolonie, které přijmou amoniakový signál, změni směr svého růstu a rostou směrem od místa signálu, kde tedy pravděpodobně působí nějaký stresor (PALKOVÁ *et al.* 1997).

Obrázek č. 17: Schéma amoniakové signalizace mezi kvasinkovými koloniemi. (A) produkce prvních molekul (B) indukuje tvorbu amoniaku i u sousedních kolonií a (C) signál je zesílen populací kolonií. Adaptováno z (PALKOVÁ 2004).

Při vstupu do alkalické fáze růstu dochází k velkým změnám v transkripci. Nejvíce jsou ovlivněny geny pro metabolické enzymy, například dochází k potlačení exprese genů pro citrátový cyklus, oxidativní fosforylaci a další mitochondriální funkce. Na druhou stranu je indukována exprese genů metabolismu aminokyselin a nukleotidů. Jednou z významných skupin ovlivňovaných genů jsou geny kódující membránové $H^+ATPasy$ Pma1p a Pma2p (PALKOVÁ *et al.* 2002). Pokud probíhá alkalizace správně, dochází za pomoci amoniaku k diferenciaci buněk v kvasinkových koloniích. Po vstupu do alkalické fáze se buňky vnějšího okraje kolonie začínají výrazně odlišovat od buněk ve středu kolonie. Nově vznikající buňky jsou od starých prostorově odděleny a vznikají především na okrajích kolonie, zatímco starší buňky tvoří střed kolonie. Díky metabolickým změnám, způsobených amoniakovou signalizací, je buňkám okraje kolonie umožněno snížit hladinu stresu. Buňky středu kolonie naopak vykazují charakteristiky apoptotických buněk a jejich regulovaná smrt by mohla

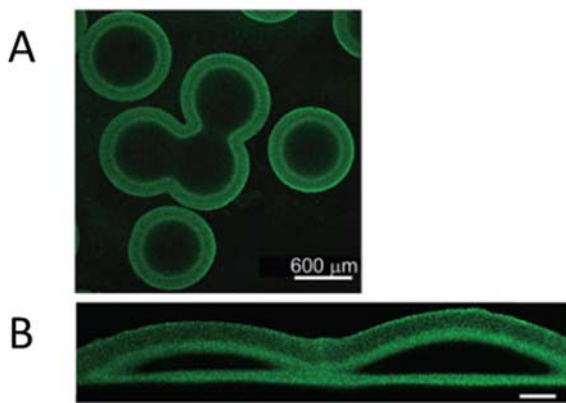
hrát roli ve vyživování buněk okraje kolonie (PALKOVÁ *et al.* 2002; VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Buňky vnějšího okraje kolonií mají schopnost do okolí produkovat amoniak (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b).

V rámci studia změn exprese genů v závislosti na amoniakové signalizaci byly objeveny v té době nepojmenované geny, které byly jedny z nejvíce indukovaných genů v alkalické fázi vývoje kolonií. Tyto geny byly pojmenované podle své role v amoniakové signalizaci jako *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* (Amonia Transport Outward) v roce 2002 (PALKOVÁ *et al.* 2002). Proteiny Ato1p, Ato2p a Ato3p se nacházejí v cytoplasmatické membráně a Ato1p spolu s Ato3p lokalizují v mikrodoménách bohatých na ergosterol a sfingolipidy. Přítomnost proteinu Ato1p v mikrodoménách na membráně je závislá na pH a je patrná pouze v alkalické fázi vývoje kolonií (ŘIČICOVÁ *et al.* 2007). O přesné funkci proteinu Ato1p existuje několik hypotéz, jedna z nich přisuzuje proteinům Ato1p, Ato2p i Ato3p funkci v exportu amonného kationtu ven z buňky (PALKOVÁ *et al.* 2002). Zvýšení pH v okolí kvasinkových kolonií v alkalické fázi může být způsobeno aktivací Ato proteinů, nebo sníženou expresí Pma1p protonové pumpy. Ato proteiny pravděpodobně do okolí exportují NH_4^+ a změna pH v okolí vede k jeho konverzi na NH_3 (PALKOVÁ *et al.* 2002; PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003).

Jednou z reakcí kvasinkových kolonií na amoniak je také dimorfická transice, neboli přepnutí z normálního na pseudohyfální růst. Kromě dimorfické transice vyvolané amoniakem na počátku vývoje kolonií probíhá v pozdějších stádiích vývoje kolonie druhá transice. K druhému dimorfickému přechodu, který probíhá v době začínajícího vertikálního růstu kolonií, je nezbytný povrchový flokulin Flo11p. Flo11p je také nezbytný pro další formaci trojrozměrných struktur v rámci kolonií divokých kmenů kvasinek (VOPÁLENSKÁ *et al.* 2010; VÁCHOVÁ *et al.* 2011).

2.2.3 Diferenciace kvasinkových kolonií

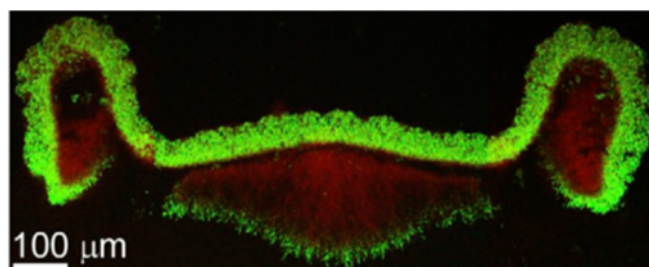
Mnohobuněčné organismy mají schopnost vytvářet diferencované buněčné populace, které v organismu plní specifické funkce. Ačkoliv mnohobuněčná společenstva kvasinek jsou často monoklonální, je možné i zde nalézt subpopulace buněk, které mají různé fyziologické charakteristiky. V předchozí kapitole byla zmíněna rozdílnost buněk středu a okraje kolonií, ale toto rozlišení je pouze zjednodušující. Heterogenitu populací je možné pozorovat pomocí sledování produkce určitých proteinů v rámci těchto společenstev (ČÁP *et al.* 2012). Na příkladu produkce proteinu Ato1p v rámci kolonií byla demonstrována přítomnost různých vrstev buněk (viz. obrázek č. 18) (VÁCHOVÁ *et al.* 2009a).



Obrázek č. 18: Rozvrstvení produkce Ato1p-GFP v rámci struktury kvasinkových kolonií kmene BY4742:ATO1-GFP, (A) pohled na celé kolonie (B) boční pohled na kolonie, měřítko odpovídá 150µm. Adaptováno z (VÁCHOVÁ *et al.* 2009a).

Mnohobuněčné útvary kvasinek jsou složeny z morfologicky a funkčně diferencovaných buněčných subpopulací, které jsou schopny ovlivňovat tvorbu, strukturu i ochranu celé kolonie, často bez ohledu na vlastní osud (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Obří kolonie laboratorního kmene BY4742 se v rámci vývoje diferencují na takzvané horní (U, upper) a dolní (L, lower) buňky. Tyto buňky se liší svou morfologií metabolismem. U buňky jsou charakterizovány zvětšenými mitochondriemi s málo vyvinutými kristami a naopak mitochondrie L buněk jsou malé s dobře vyvinutými záhyby vnitřní membrány. Jako typické proteiny U buněk se jeví Ato3p, peroxisomální Pox1p a mitochondriální Icl2p. Mezi proteiny specifickými pro L buňky byly nalezeny Met17p, Ino1p a Ole1p (ČÁP *et al.* 2012). Podobná diferenciaci, jako u obřích kolonií, byla zjištěna i u mikrokolonií kvasinek (VÁCHOVÁ *et al.* 2013).

U kolonií divokých kmenů kvasinek *S.cerevisiae* bylo také zaznamenáno několik vrstev v rámci vývoje kolonií. Horní vrstvu tvoří buňky, které produkují transportéry mnohočetné lékové rezistence (MDR), tudíž tato vrstva by mohla mít ochranný charakter. Pod ní se nacházejí dělící se buňky a v pozdějších stádiích také ECM. Extracelulární matrix je chráněna před vnějšími vlivy a může poskytnout prostor pro vrůstání nových buněk v nepříznivých vnějších podmínkách. V místě kontaktu s agarem zarůstá kolonie do podkladu „kořínky“, které jsou tvořené pseudohyfy (viz. obrázek č. 19) (VÁCHOVÁ *et al.* 2011).



Obrázek č. 19: Struktura třídní mikrokolonie divokého kmene *S.cerevisiae*. Kmen BR-F-P_{GAL}-GFP obsahuje zelený fluorescenční protein pod inducibilním galaktosovým promotorem. Zelený fluorescenční signál je patrný jen v okrajových buňkách do ECM (červená oblast, autofluorescence) se galaktosa přes buněčnou bariéru nedostala. Převzato z (VÁCHOVÁ *et al.* 2011).

2.2.4 Ukazatelové proteiny pro studium různých procesů v koloniích

V koloniích kvasinek *S.cerevisiae* je možné sledovat různé procesy, například diferenciaci buněk v rámci kolonie, a další specifické procesy, jako například autofagii, či mitofagii. V této kapitole jsou shrnuty proteiny, které je možné použít jako ukazatele (markery) pro studování procesů v rámci kolonií kvasinek. V předchozích kapitolách již bylo několik markerů zmíněno, například H⁺-ATPasová pumpa Pma1p využitelná při studiu amoniakové signalizace spolu s Ato proteiny (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003; VÁCHOVÁ *et al.* 2009b).

Icl2p a Pox1p

Studium diferenciaci kvasinkových kolonií ukázalo Icl2p a Pox1p jako proteiny typické pro U buňky (ČÁP *et al.* 2012). Výraznější exprese *ICL2* byla prokázána také v buňkách okraje kolonie (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b). Exprese *POX1* byla indukována v souvislosti s alkalickou fází růstu kolonií (PALKOVÁ *et al.* 2002). Icl2p je specifická 2-methylisocitrát lyasa uplatňující se v uhlíkovém metabolismu. Transkripce mimo jiné podléhá také glukosové katabolické represi (LUTTIK *et al.* 2000). Pox1p je peroxisomální acyl-CoA oxidasa podílející se na oxidaci mastných kyselin. Exprese *POX1* je snížena při kultivaci na glukóze, ale při kultivaci na glycerolu se navrátí do původních hodnot (WANG *et al.* 1994).

Om45p

Om45p je hlavním proteinem vnější mitochondriální membrány. Svůj název získal díky své velikosti 44,9kDa. Tento protein pro kvasinku není esenciální, ani nezbytný pro funkci mitochondrií. V současnosti je jeho funkce uváděna jako neznámá, nicméně pravděpodobně se účastní proteinového importu do mitochondrií (YAFFE *et al.* 1989). Protein Om45p je hojně využíván jako marker mitochondrií například při studiu jejich dělení (CERVENY *et al.* 2001). Dále slouží také k pozorování procesu mitofagie, kdy je možné v případě jeho značení pozorovat jak mitochondrie ve vakuole, tak i míru mitofagie podle množství volného GFP ve vakuolách (KANKI *et al.* 2009a).

Cyc2p a Mae1p

Proteiny Cyc2p a Mae1p jsou markery mitochondrií a je možné díky nim sledovat morfologii anebo rozmístění mitochondrií v buňkách v rámci kolonie a také mitofagii. Protein Cyc2p je nezbytný pro funkci cytochrom c hemové lyasy (CCHL), která zajišťuje připojení hemové skupiny k apocytochromu c₁. Cyc2p ke své C-terminální doméně váže molekulu FAD a je zapojen do redukce hemu, která předchází jeho napojení na apocytochrom c (BERNARD *et al.* 2005). V případě neaktivity proteinu Cyc2p je v mitochondriích přítomno pouze 20% normální hladiny cytochromu c (PEARCE *et al.* 1998). Spolu s porinem Por1p se podílí na integritě a osmotické stabilitě mitochondrií (SÁNCHEZ *et al.* 2001).

Protein Mae1p je mitochondriální malický enzym, který katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát. Mae1p je nezbytný pro růst kvasinek na ethanolu. Expresa *MAE1* se několikanásobně zvýší při anaerobní kultivaci na glukózovém médiu (BOLES *et al.* 1998). Expresa *MAE1* je zvýšena při přechodu kvasinkových kolonií do druhé acidické fáze (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b).

Met17p a Ino1p

Proteiny Met17p a Ino1p jsou typickými proteiny L buněk v rámci kolonií laboratorního kmene kvasinek (ČÁP *et al.* 2012). V koloniích divokých kmenů kvasinek byly zaznamenány změny exprese v čase, exprese *INO1* byla zvýšena čtvrtý den a *MET17* až 7. den růstu kolonie (ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014). Expresa *INO1* byla v rámci vývoje kolonií laboratorních kmenů kvasinek snížena s nástupem alkalické fáze vývoje kolonií (PALKOVÁ *et al.* 2002).

Met17p je O-acetylserin sulfhydrolasa, která se podílí na biosyntéze homocysteinu, který dále hraje roli v biosyntéze aminokyselin cysteinu a methioninu (THOMAS a SURDINKERJAN 1997). Ino1p je enzym inositol-3-fosfát syntasa a podílí se na vzniku inositol-3-fosfátu, který se podílí na signalizaci v buňkách (DONAHUE a HENRY 1981; DEAN-JOHNSON a HENRYE 1989).

Atg8p

Účastní se autofagie a nachází se na autofagosomech (KIRISAKO *et al.* 1999). Studie kolonií *S.cerevisiae* laboratorního kmene prokázala důležitost autofagie pro vývoj U buněk. Mutanty s poškozenou autofagií vykazovaly sníženou viabilitu U buněk (ČÁP *et al.* 2012). V rámci kmene BR-S, který vznikl domestikací kmene BR-F, byla exprese *ATG8* zvýšena v koloniích 7. den růstu (ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité mikroorganismy

***Saccharomyces cerevisiae* kmen BR-F**

MAT α/a , prototrofní přírodní kmen získaný ze sbírky Chemického institutu Akademie věd Slovenské republiky v Bratislavě, kat. číslo CCY 21-4-97. Na glycerolovém médiu (GM) vytváří vrásčité kolonie

***Saccharomyces cerevisiae* kmen BY4742**

MAT α , *his3 Δ 1*, *ura3 Δ 0*, *leu2 Δ 0*, *lys2 Δ 0*, laboratorní auxotrofní haploidní kmen získaný se sbírky Euroscarf. Na GM médiu vytváří hladké kolonie.

3.1.2 Seznam připravených kvasinkových kmenů

Kmeny vytvořené a použité v rámci této diplomové práce jsou shrnuté v tabulce č.3.

název kmenu	genotyp	autor*	
BY4742:CYC2-GFP	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>CYC2-EGFP-CaURA3</i>	ZN	
BY4742:ICL2-GFP	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ICL2-EGFP-kanMX</i>	LŠ	
BY4742:OM45-GFP	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>OM45-EGFP-CaURA3</i>	ZN	
BY4742:ICL2-mCherry	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ICL2-mCherry-hph</i>		
BY4742:CYC2-mCherry	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>CYC2-mCherry-hph</i>		
BY4742:OM45-mCherry	MAT α , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>OM45-mCherry-hph</i>	ZN	
BR-F:ATO1-GFP	MAT α/a , <i>ATO1-GFP-kanMX</i>		VŠ
BR-F:INO1-GFP	MAT α/a , <i>INO1-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:ICL2-GFP	MAT α/a , <i>ICL2-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:POX1-GFP	MAT α/a , <i>POX1-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:MAE1-GFP	MAT α/a , <i>MAE1-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:MET17-GFP	MAT α/a , <i>MET17-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:PMA1-GFP	MAT α/a , <i>PMA1-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:PMA2-GFP	MAT α/a , <i>PMA2-yEGFP-kanMX</i>		
BR-F:GFP-ATG8	MAT α/a , <i>yEGFP-ATG8</i>		
RB-F:<i>atg8Δ</i> +/ -	MAT α/a , <i>atg8Δ::kanMX</i>		

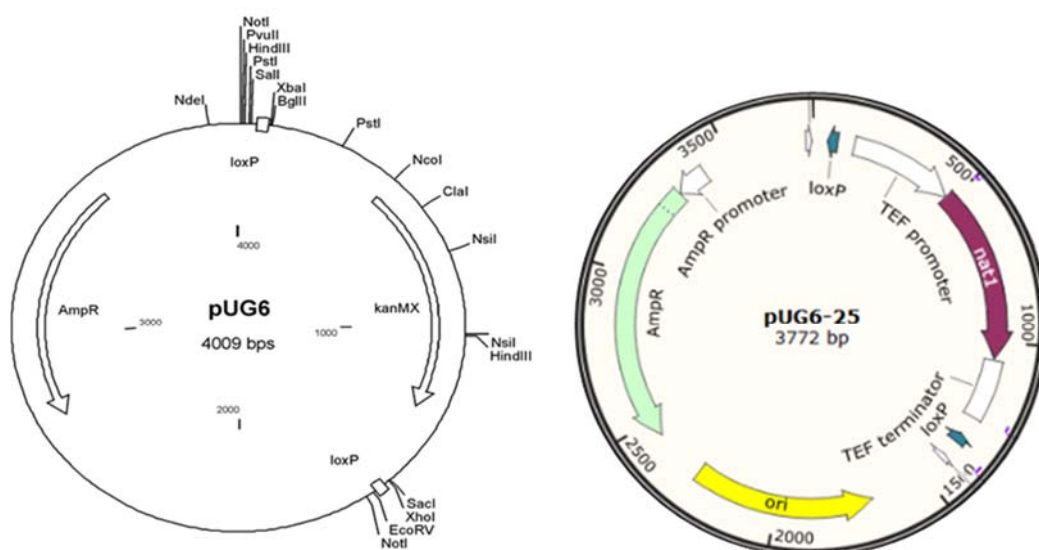
Tabulka č. 3: seznam kmenů vytvořených a použitých v této práci; * ZN = Zuzana Novosadová, LŠ = Mgr. Luděk Štěpánek, VŠ = RNDr. Vratislav Šťovíček, Ph.D.

3.1.3 Vektory

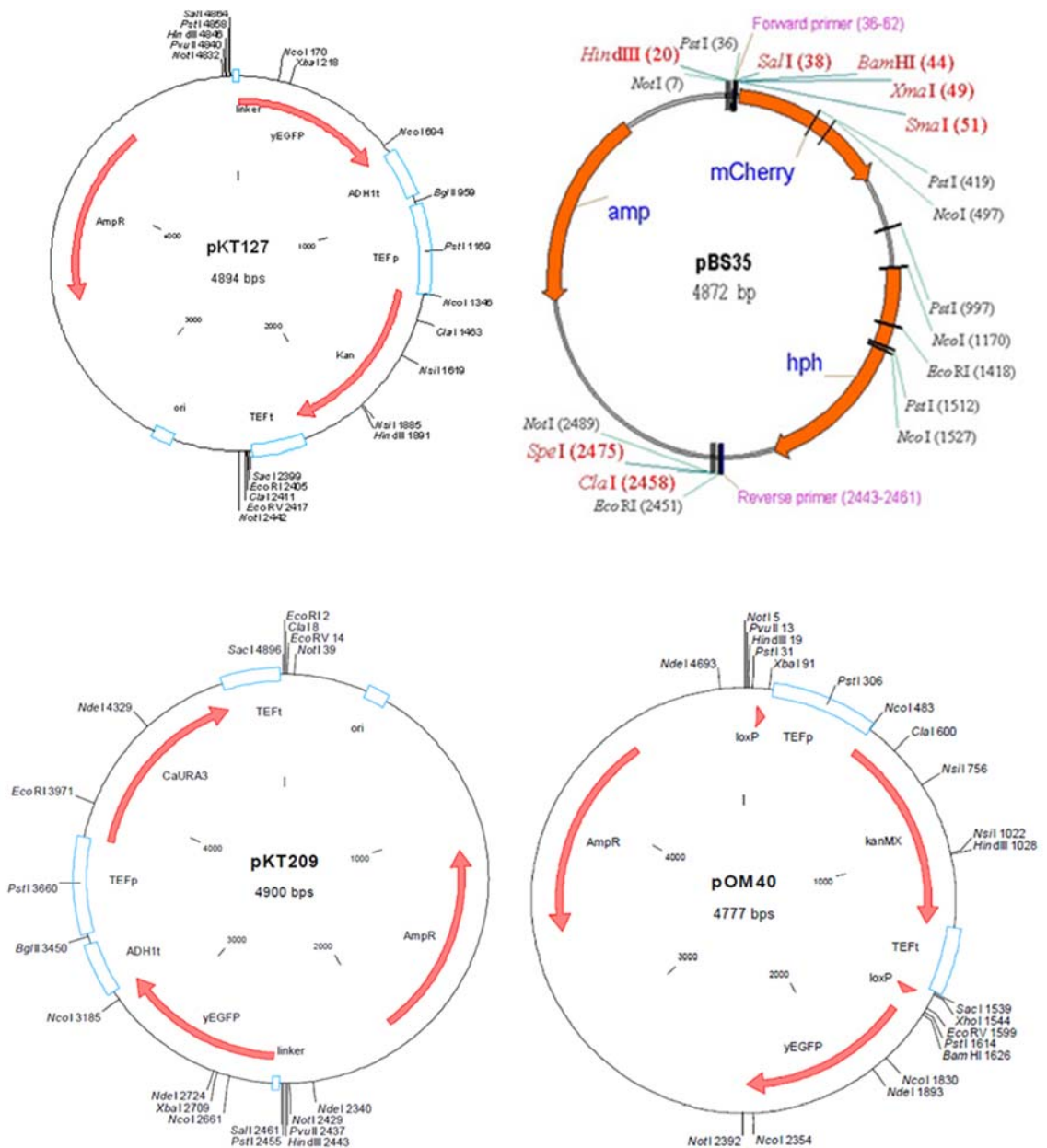
Použité vektory sloužily jako templát pro PCR pro vytvoření transformačních kazet pro následnou transformaci buněk:

- pro tvorbu delečních kazet byly použity plasmidy pUG6 a pUG6-25
- transformační kazety pro GFP značení C-konce zvoleného proteinu byly vytvořeny z plasmidu pKT127 v případě kmene BR-F a plasmidu pKT209 při značení proteinů u kmene BY4742
- pro tvorbu kazet obsahujících mCherry pro C-koncové značení proteinů plasmid pBS35
- transformační kazety pro N-koncové značení proteinů byly vytvořeny z plasmidu pOM40

Pro vyštěpení rezistence v případě N-koncové fúze proteinu plasmidem pOM40 byl použit plasmid pSH66 kódující Cre rekombinázu. Mapy plasmidů jsou znázorněny na obrázku č. 20,21 a 22 a jejich charakterizace jsou shrnuty v tabulce č. 4. Plasmidy, s výjimkou plasmidu pUG6-25, který pochází z knihovny plasmidů Laboratoře kvasinkových kolonií, byly získány ze sbírky Euroscarf.

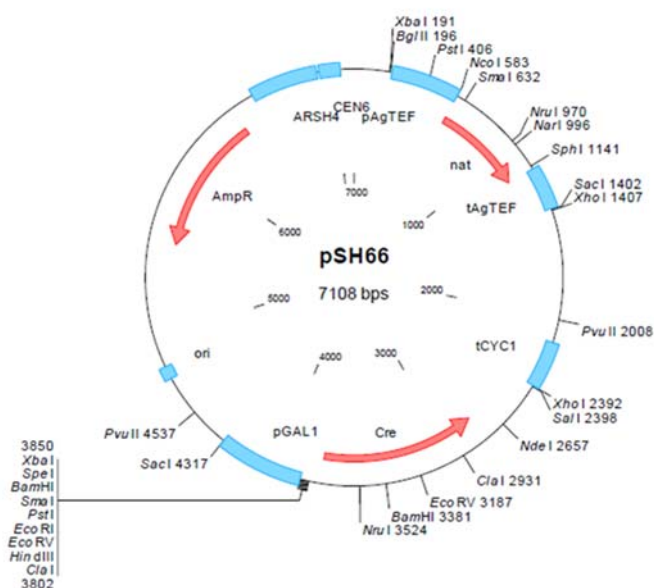


Obrázek č. 20: plasmidy použité jako templáty PCR pro tvorbu delečních kazet. Mapa plasmidu pUG6 převzata z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pUG6.html> mapa plasmidu pUG6-25, autor: Ing. Otakar Hlaváček, Ph.D. (autor souhlasí s uveřejněním dat)



Obrázek č. 21: mapa templátových plasmidů pro tvorbu transformačních kazet pro fluorescenční značení proteinů

Převzato z : <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pKT127.html>,
<http://depts.washington.edu/yeastrc/pages/pBS35.html>,
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/P30225.html>,
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pOM40.html>



Obrázek č. 22: mapa plasmidu pSH66 kódujícího Cre rekombinázu, převzato z: http://www.euroscarf.de/plasmid_details.php?accno=P30672

plasmid	charakteristika plasmidu (5'→3')
pKT127	<i>kanMX</i> – rezistence vůči geneticinu (G418), <i>yEGFP</i>
pKT209	<i>caURA3</i> – kompenzace auxotrofie <i>ura3</i> u kmene BY4742, <i>yEGFP</i>
pBS34	<i>hph</i> – rezistence vůči hygromycinu B, <i>mCherry</i>
pUG6	<i>kanMX</i> – rezistence vůči geneticinu (G418), loxP místa pro vyštěpení rezistence
pUG6-25	<i>nat1</i> – rezistence vůči nourseotricinu, loxP místa pro vyštěpení rezistence
pOM40	<i>kanMX</i> - rezistence vůči geneticinu (G418), <i>yEGFP</i> , loxP místa pro vyštěpení rezistence (N-koncová fúze)
pSH66	<i>Cre</i> – Cre rekombináza s galaktosou ovládaným GAL promotorem, <i>nat1</i> – rezistence vůči nourseotricinu

Tabulka č. 4: charakteristika použitých plasmidů

3.1.4 Primery

Při navrhování primerů se vycházelo ze sekvence cílového genu ± 1000 kb v „upstream“ i „downstream“ oblasti. Primery pro C-koncovou fúzi proteinů s fluorescenčním proteinem byly navrženy podle výrobcem doporučeného postupu, tedy pro přímý primer (FW) je specifická oblast 40 nukleotidů před STOP kodónem a v případě zpětného primeru (REV) je odpovídající oblastí 40 nukleotidů za STOP kodónem (SHEFF a THORN 2004). Primery použité při tvorbě transformačních kazet a použití plasmidu pKT127 jsou uvedeny v tabulce č. 5. Primery pro C-koncovou fúzi s GFP při použití templátového plasmidu pKT209 jsou uvedeny v tabulce č. 6 a pro tvorbu primerů pro C-koncovou fúzi s mCherry za použití plasmidu pBS35 jsou uvedeny v tabulce č. 7.

<i>gen</i>		<i>primery pro tvorbu transformačních kazet (C-koncová fúze s GFP) (5'→3')</i>	<i>autor*</i>
MAE1	fw	CAAGGTCCAACATGACCCATCGGTGCACACCAACCAATTGGGTGACGGTGCTGGTTA	MČ
	rev	GGTTTTTTTTTTAAGTGCAGGCGTTGGTTATGCTTCGTTTCGATGAATTCGAGCTCG	
ICL2	fw	TCCCAAACCTTAAGTACATCTGGTGAGAGCTTTACCGAAACGCAATTTGGTGACGGTGCTGGTTA	LŠ
	rev	GTTGCTGGCAATATGTATTATTTATACTTTTATCTTCTTGAAGCGTATTCGATGAATTCGAGCTCG	
PMA1	fw	GACTTCATGGCTGCTATGCAAAGAGTCTCTACTCAACACGAAAAGGAAACCGGTGACGGT	ZM
	rev	AAGTTGATTAATAATGTGACAAAAATTATGATTAATGCTACTTCAACAGGATCGATGAAT	
PMA2	fw	GATTCATGGCTGCTATGCAAAGAGTTTCTACTCAACACGAAAAAGCAGTGGTGACGGTGCTGGTTA	AH
	rev	CAAAAAGGAGATCAATAAGAAAAAATCAGATGGATGATGTTTAAATTCGATGAATTCGAGCTCG	
POX1	fw	AAAAGTTAGGTGGTGCAGCTAATCGGAAATTTATCGAAAATAACAAGGGTGACGGTGCTGGTTA	LŠ
	rev	AAACAAAAGTCGAAAACAGAGGGTTCGAAGGAAAACAGGAAACCTCTACTCGATGAATTCGAGCTCG	
INO1	fw	TGATTGGATTGCCTTCTCAAACGAACTAAGATTGAAAGAGAGATTGTTGGGTGACGGTGCTGGTTA	LŠ
	rev	GTTTTTTTATAGGTAGGCGGAAAAAGAAAAAGAGAGTCGTTGAAATGAGATCGATGAATTCGAGCTCG	
MET17	fw	TTGCGACTTCCAGCAATCTTTGAACTGTTTTCGCTGGCCAAAACAGGTGACGGTGCTGGTTA	LŠ
	rev	TTGTGAGAGAAAGTAGGTTTATACATAATTTTCAACTCATTACGCACACTCGATGAATTCGAGCTCG	

Tabulka č. 5: primery pro tvorbu transformačních kazet pro C-koncovou fúzi proteinů s GFP pomocí templátového plasmidu pKT127; * MČ = RNDr. Michal Čáp Ph.D., LŠ = Mgr. Luděk Štěpánek, ZM = Mgr. Zuzana Moráňová, AH = Mgr. Aleš Holoubek

<i>gen</i>		<i>primery pro tvorbu transformačních kazet (C-koncová fúze s GFP) (5'→3')</i>	<i>autor*</i>
OM45	FW	GAATGGAATGATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTCGAAAAAGGACGGTGACGGTGCTGGTTA	ZN
	REV	ATGTATATATGTTATGCGGGAACCAACCCCTTACAATTAGCTATCTAATCGATGAATTCGAGCTCG	
CYC2	FW	TTACTTTCAAAGAAGGCTGGAACCTCCGATAATGTGTATAAACTTTCAGGTGACGGTGCTGGTTA	ZN
	REV	ACAGTATGTAATATTATTGTAATTGCCTTCTTAATCTCGAACGTTAAATCGATGAATTCGAGCTCG	

Tabulka č. 6: primery pro tvorbu transformačních kazet pro C-koncovou fúzi proteinů s GFP pomocí templátového plasmidu pKT209; * ZN = Zuzana Novosadová

<i>gen</i>		<i>primery pro tvorbu transformačních kazet (C-koncová fúze s mCherry) (5'→3')</i>	<i>autor*</i>
OM45	fw	GAATGGAATGATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTCGAAAAAGGACGGTGACGGATCCCCGGG	ZN
	rev	ATGTATATATGTTATGCGGGAACCAACCCCTTACAATTAGCTATCTAATCGATGAATTCGAGCTCG	
CYC2	fw	TTACTTTCAAAGAAGGCTGGAACCTCCGATAATGTGTATAAACTTTCAGGTGACGGATCCCCGGG	ZN
	rev	ACAGTATGTAATATTATTGTAATTGCCTTCTTAATCTCGAACGTTAAATCGATGAATTCGAGCTCG	
ICL2	fw	TCCCAAACCTTAAGTACATCTGGTGAGAGCTTTACCGAAACGCAATTTGGTTCGACGGATCCCCGGG	ZN
	rev	GTTGCTGGCAATATGTATTATTTATACTTTTATCTTCTTGAAGCGTATTCGATGAATTCGAGCTCG	

Tabulka č. 7: primery pro tvorbu transformačních kazet pro C-koncovou fúzi proteinů s mCherry pomocí templátového plasmidu pBS35; * ZN = Zuzana Novosadová

Primery pro N-koncovou fúzi proteinu Atg8p s GFP při použití templátového plasmidu pOM40 a primery pro tvorbu transformačních kazet byly vytvořeny na základě doporučeného postupu, tedy FW primer obsahoval 45 nukleotidů před START kodónem, včetně START kodónu, a REV primer 45 nukleotidů za START kodónem cílového genu (GAUSS *et al.* 2005). Primery jsou shrnuty v tabulce č. 8.

<i>gen</i>	<i>primery pro tvorbu transformačních kazet (N-koncová fúze s GFP) (5'→3')</i>		<i>autor*</i>
ATG8	fw	AATTGTAAAGTTGAGAAAATCATAATAAAAATAATTACTAGAGACATGTGCAGGTCGACAACCTTAAT	ZN
	rev	CTCCGCCTTCCTTTTTTCAAATGGATATTCAGACTTAAATGTAGACTTGC GGCCGCATAGGCCACT	

Tabulka č. 8: primery pro tvorbu transformačních kazet pro N-koncovou fúzi proteinu Atg8p s GFP pomocí templátového plasmidu pOM40; * ZN = Zuzana Novosadová

Primery použité pro delecí genu *ATG8* byly navrženy ze sekvence cílového genu ±1000kb v „upstream“ i „downstream“ oblasti. FW primer byl navržen v oblasti -250 NT až -280 NT a REV primer byl navržen 45 NT za STOP kodónem genu *ATG8*. Primery pro přípravu delečních kazet jsou shrnuty v tabulce č. 9.

<i>gen</i>	<i>primery pro tvorbu delečních kazet (5'→3')</i>		<i>autor*</i>
ATG8	fw	TAATTGTAAAGTTGAGAAAATCATAATAAAAATAATTACTAGAGACCAGCTGAAGCTTCGTAGC	ZN
	rev	TTTCGATTTTAGATGTTAACGCTTCATTTCTTTTCATATAAAAAGAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	

Tabulka č. 9: primery pro tvorbu transformačních kazet pro tvorbu delečních kazet pro delecí genu *ATG8* za pomoci delečních plasmidů pUG6 a pUG6-25; * ZN = Zuzana Novosadová

Konstruované kmeny kvasinek byly ověřovány pomocí colony PCR za použití ověřovacích primerů. Tyto primery byly navrhovány ze sekvence genomové DNA se snahou, aby měly navrhované primery podobnou teplotu připojování v rámci PCR reakce a aby obsah GC párů byl 40 % - 60 %. Neměly by vznikat dimery uvnitř navržených primerů, docházelo by tak ke tvorbě vlásenky a narušení PCR reakce. Navržené primery byly analyzovány programem OligoCalculator (viz. kapitola 3.1.8). FW primery byly navrhovány v oblasti 300 – 500 NT upstream od STOP kodónu cílového genu a jsou shrnuty v tabulce č. 10. REV primery jsou shrnuty v tabulce č. 11. Primery pro ověření správného vložení transformační kazety pro N-koncovou fúzi Atg8p s GFP jsou shrnuty v tabulce č. 12.

<i>gen</i>	<i>FW ověřovací primer (5'→3')</i>	<i>autor*</i>
MAE1	CTTCCACCTGTTGATG	ZN
ICL2	CGGCTTTGATGATAAGGC	
CYC2	GCAATGAAAGGGCAATAAC	
OM45	TTGGTAGAGAAGAGTTGGAG	
MET17	TCCCATACGTATCTTGG	
PMA1	CGGTAAGCCAATGAAGGAAA	ZM
PMA2	CAATCAATGAGGCCAGAAACC	ZN
INO1	AAAGTGGAATGGACGAG	
POX1	ATTCATGCCTTGCGCTG	

Tabulka č. 10: FW ověřovací primery; * ZN = Zuzana Novosadová, ZM = Mgr. Zuzana Moráňová Ph.D.

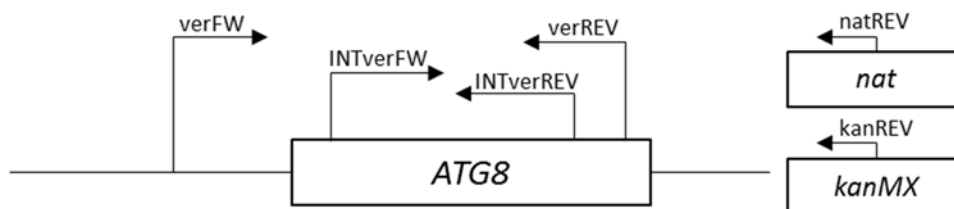
<i>gen</i>	<i>REV ověřovací primer (5'→3')</i>	<i>autor*</i>
mCherry	TCACCTGTAGATGAACTCG	DS
yEGFP	CTGGACCATCAACCAATTG	VP

Tabulka č. 11: REV ověřovací primery vložených kazet s geny pro fluorescenční proteiny; * DS = RNDr. Dita Strachotová Ph.D., VP = Mgr. Vítězslav Plocek

primery pro ověření N-koncové fúze (5'→3')		autor*
<i>revATG8</i>	CTCCTGAGTAAGTGACATAC	ZN
<i>fwEGFP</i>	CAATTGGTGATGGTCCA	VP

Tabulka č. 12: primery pro ověření N-koncové fúze; * ZN = Zuzana Novosadová, VP = Mgr. Vítězslav Plocek

Pro ověření delece genu *ATG8* byly navrženy primery pro ověření vložené rezistence a také primery pro ověření nepřítomnosti genu *ATG8* v genomu v jeho přirozeném lokusu a také interní primery pro zjištění případné přítomnosti další alely v genomu. Schéma navrhovaných primerů vzhledem k jejich orientaci je uvedeno na obrázku č. 23 a jejich sekvence je uvedena v tabulce č. 13.



Obrázek č. 23: schéma navrhování primerů pro ověření delece genu *ATG8*

Primery pro ověření delece genu <i>ATG8</i> (5'→3')		autor*
<i>verFW</i>	CTCTACTCGAAGTGATATAGA	ZN
<i>verREV</i>	AATGAAGATGGCCTTCTCAG	
<i>INTverFW</i>	AAAAAGGAAGGCGGAGTC	
<i>INTverREV</i>	AACCCGTCCTTATCCTTGT	
<i>natREV</i>	GAGTACGAGATGACCACGAA	VŠ
<i>kanREV</i>	CGTGAGTCTTTTCTTACCC	

Tabulka č. 13: primery pro ověření delece genu *ATG8*;

* ZN = Zuzana Novosadová, VŠ = RNDr. Vratislav Šťovíček Ph.D.

3.1.5 Kultivační média

Uvedená média byla připravována v destilované vodě připravené v aparatuře Ultrapur (Watrex).

Pevná kultivační média

- GM

- 3% (v/v) glycerol (Lach-Ner)
- 1% (w/v) kvasničný autolyzát (Ø upravený pomocí 3M HCl na pH=5) (Imuna)
- 2% (w/v) agar (Dr.Kulich Pharma)

Pozn.: Ø kvasničného autolyzátu byl klávován samostatně

- GM + BKP
 - GM
 - 0,01% (w/v) bromkresolpurpur (BKP)
 - 1% (v/v) etanolu (96%)
 - Pozn.: BKP rozpuštěný v etanolu se přidává po sterilizaci GM média

- YEPG
 - 2% (w/v) glukosa
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát
 - 2% (w/v) agar
 - 1% (w/v) pepton
 - Pozn.: Ø glukosy byl klávován samostatně

- médium s antibiotikem
 - GM nebo YEPG médium do kterého bylo po sterilizaci přidáno potřebné množství antibiotika
 - 0,02% (w/v) geneticinu (G418) (MP Biochemicals)
 - 0,01% (w/v) nourseotricinu (NAT) (WERNER BioAgents)
 - 0,002% (w/v) edicin (SANDOZ)
 - Médium s edicinem bylo používáno při přenášení kmenů z/do kvasinkové konzervy a při přečišťování kvasinkového kmene od případné kontaminace (edicin je toxický pro bakterie)

- MM – minimální médium

	Wickerhammův roztok:
2% (w/v) agar	0,002% (w/v) Biotin
2% (w/v) glukosa	2% (w/v) Inositol
0,5% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	0,2% (w/v) Riboflavin
0,1% (w/v) KH ₂ PO ₄	0,4% (w/v) Thiamin
0,05% (w/v) MgSO ₄	0,2% (w/v) Kyselina p-aminobenzoová
0,1% (v/v) Wickerhammův roztok	0,4% (w/v) Pantotenát vápenatý
	0,4% (w/v) Kyselina nikotinová
	0,02% (w/v) Kyselina listová

V případě kultivace auxotrofního kmene BY4742 se do MM přidává:

20 µl/ml média	histidin, lysin, leucin
50 µg/ml	uracil

Tekutá kultivační média

- YEPG
 - 2% (w/v) glukosa
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát

- SD-N médium
 - 0,17% (w/v) kvasinková dusičná báze bez aminokyselin (Sigma Aldrich)
 - 2% (w/v) glukosa

- Galaktosové médium pro aktivaci Cre rekombinázy ovládané *GAL* promotorem
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát
 - 1% (w/v) galaktosa
 - 1% (w/v) rafinosa

Kvasinkové konzervy

- Skladovací médium
 - 60% (v/v) glycerol
 - 10% (w/v) glukosa
 - 2% (w/v) pepton
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát

3.1.6 Ostatní materiál

Membrána s póry – Nucleopore Membrane Circles (Nucleopore®)

průměr membrány 47mm,

Ø pórů - 5μm

Skleněné kuličky 425 – 600μm

Vyvolávání filmů:

Fotografické filmy (FOMEI a.s.)

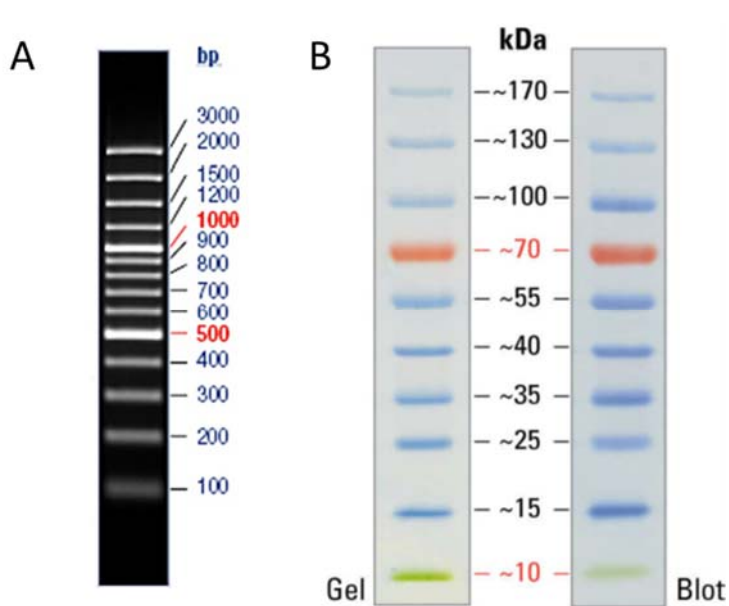
Práškový RTG rychloustalovač – složky A,B,C-připravené podle pokynů výrobce

Vyvíjecí kazety (Cawo ABS cassette)

Vývojka Röntgen Rapid Entwickler (Adefo-chemie GmbH) – složky A,B – připravené podle pokynů výrobce

3.1.7 Standardy molekulových hmotností

Standardy molekulových hmotností pro DNA elektroforézu a proteinovou SDS-PAGE jsou uvedeny na obrázku č. 24.



Obrázek č. 24: standardy molekulových hmotností (A) standard nukleových kyselin GeneRuler™ DNA ladder (MBI Fermentas) a (B) proteinový standard PageRuler™ Plus Protein Ladder určený na SDS-PAGE a následnou imunodetekci (MBI Fermentas). Převzato z www.fermentas.com

3.1.8 Počítačové programy a internetové databáze

Databáze:

Saccharomyces genome database (SGD)

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

Pubmed Medline

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

Pro navrhování primerů a práci s DNA:

NCBI Blast

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Oligo Calculator

<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>

Sequence format converter

<http://genome.ncbi.nlm.nih.gov/tools/reformat.html>

SequenceManipulationSite

<http://bioinformatics.org/sms>

Chromas Lite 2.1

Statistická analýza dat:

GraphPad Prism 5.0

Analýza obrazu:

NIS Elements (Laboratory Imaging)

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace

Roztoky, média, párátka, špičky k automatickým pipetám a mikrozskumavky byly sterilizovány v autoklávu při tlaku 120kPa po dobu 20 min. Plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 a 50ml a jímky na odběr amoniaku byly sterilizovány parami kyseliny peroctové v uzavřeném sáčku minimálně 24 hodiny před použitím. Chemické sklo bylo sterilizováno suchým teplem při teplotě 180°C po dobu 50min. Skleněné hokejky byly sterilizovány namočením v etanolu a následným odhořením etOH v plameni.

3.2.2 Práce s kvasinkovými kulturami

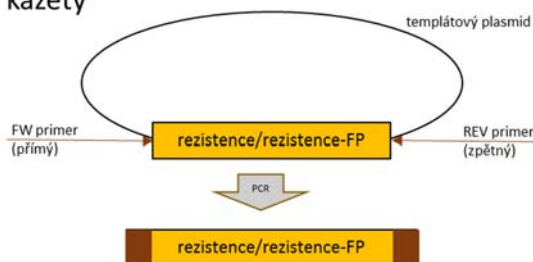
3.2.2.1 Kultivace a skladování

Kvasinkové kmeny byly uchovávány v kvasinkových konzervách se skladovacím médiu při teplotě -80°C. Na začátku práce s kvasinkovým kmenem bylo ze skladovacího média pomocí sterilního párátka odebráno malé množství biomasy a sterilně přeneseno na kultivační médium s edicinem. Buňky byly kultivovány přes noc v termostatu při teplotě 28°C. Kultury kvasinek byly kultivované při teplotě 28°C na pevných médiích v termostatu anebo v tekutých médiích za aerobních podmínek v Erlenmeyerových baňkách na teplovzdušné třepačce (Kühner, Lab-Therm).

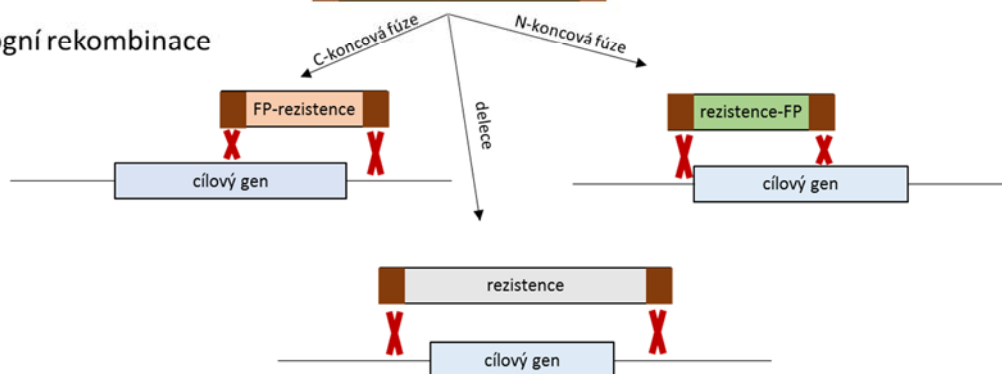
3.2.2.2 Konstrukce kmenů *S.cerevisiae*

Příprava kmenů *S.cerevisiae* produkujících protein fúzovaný s GFP nebo mCherry a s delecí příslušného genu byla založena na principu homologní rekombinace. Vkládané transformační kazety obsahující v případě delecí rezistenci a v případě fúze s fluorescenčními proteiny rezistenci a gen pro fluorescenční protein, byly vytvořeny pomocí metody PCR (viz. kapitola 3.2.2.2.1). Následovala transformace kvasinkových buněk LiAc/ssDNA/PEG metodou (viz. kapitola 3.2.2.2.3). Takto připravené kmeny byly dále ověřovány ověřovací PCR, která je také shrnuta v kapitole 3.2.2.2.4. Následovala kontrola morfologie kmenů, která probíhala sledováním monoklonií v případě divokých kmenů kvasinek a sledováním obřích kolonií v případě laboratorního kmene BY4742 (výsev viz kapitola č. 3.2.2.3). Dalším krokem ověřování byla izolace DNA a její následná sekvenace (viz kapitola č. 3.2.2.2.5). První dva kroky konstrukce kmenů, tedy příprava transformačních kazet a homologní rekombinace, jsou znázorněny na obrázku č. 25.

Příprava transformační kazety



Homologní rekombinace



Obrázek č. 25: schéma přípravy transformačních kazet a jejich začlenění do genomu kvasinky pomocí homologní rekombinace v případě delece, C-koncové fúze a N-koncové fúze s fluorescenčním proteinem. FP – gen pro fluorescenční protein

3.2.2.2.1 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Reakce probíhaly v PCR cyklerech (gradientový termocykler BIOER XP cycler, PCR termocykler BIOER GenePRO). Složení reakční směsi a PCR program byl specifický pro každou reakci v tabulce č. 14 jsou uvedené příklady reakční směsi a zvoleného programu. Objem reakční směsi byl standardně 25 μ l. V průběhu této diplomové práce byl dvakrát změněn dodavatel reakčního Master Mixu. Byl používán PPP Master Mix (Top-Bio, Emerald Amp GT PCR Master Mix (TaKaRa) a OneTaq[®] 2xMaster Mix (BioLabs). Množství přidaného Master Mixu bylo ve všech případech stejné. Pro každou reakční směs byl navržen odlišný PCR program, v tabulce jsou uvedeny oba používané programy. Po vytvoření transformačních kazet pro transformaci proběhla jejich elektroforetická analýza.

Reakční směs		Program PCR reakce (Emerald/OneTaq [®] a PPP)		
Master Mix	13 μ l	1.	95°C/94°C (start reakce)	2min/30s
demi H ₂ O	10 μ l	2.	95°C/94°C (denaturace dsDNA)	10s/20s
FW primer 5pmol. μ l ⁻¹	1 μ l	3.	60°C (připojení primerů)	30s
REV primer 5pmol. μ l ⁻¹	1 μ l	4.	72°C/68°C (extenze)	1min/kb
plasmid 1ng. μ l ⁻¹	1 μ l	5.	72°C/68°C (dosyntetizování)	5min
		6.	4°C (ukončení reakce)	∞

Tabulka č. 14: složení reakční směsi pro PCR reakci a program PCR reakce pro přípravu transformačních kazet

3.2.2.2.2 Elektroforetická analýza DNA

- 1x TBE pufr
 - 0,2M Tris
 - 10mM EDTA
 - 0,45M kyselina boritá

Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu byla použita pro zjištění přítomnosti specifického DNA produktu PCR reakce. Požadované množství 0,8% (w/v) agarózy bylo v mikrovlnné troubě rozpuštěno v 30 ml 1xTBE pufru. Po ochlazení Θ bylo přidáno 15 μ l roztoku ethidiumbromidu pro zviditelnění DNA. Agaróza byla přelita do vaničky z plexiskla s hřebenem. Po ztuhnutí gelu (cca 20min) byla vanička přemístěna do elektroforetického přístroje (OWL EASYCAST™ B1, Thermo Scientific), přelita 1xTBE puftrem a do jamek vytvořených v gelu hřebenem byly mikropipetou nanášeny vzorky a standard GeneRuler™ DNA Ladder mix (standards molekulových hmotností na obrázku č. 24). Aparatura byla připojena po dobu 40minut ke zdroji jednosměrného napětí (ENDURO™, Labnet International) s napětím 80V. Gel byl následně vyfotografován pod UV transluminátorem „Electronic Dual Light™“ (Ultra Lum)

3.2.2.2.3 Transformace kvasinkových buněk LiAc/ssDNA/PEG metodou

Transformace probíhala pomocí LiAc/ssDNA/PEG metody (GIETZ a WOODS 2002). Do 10ml tekutého YEPG média s 0,002% (w/v) edicinem bylo sterilně přeneseno 300 μ l buněčné suspenze, která byla vytvořena resuspendováním čerstvě narostlé kvasinkové kultury ve velikosti špendlíkové hlavičky v 1ml sterilní demi H₂O. Kvasinková kultura byla přes noc inkubována v horkovzdušné třepačce při teplotě 28°C. Ráno bylo inokulum naředěno do 25ml čerstvého YEPG média tak, aby hustota kultury odpovídala 5x10⁶ buněk/ml (OD měřené pomocí spektrofotometru). Kultura byla aerobně kultivována 2 generační doby (3,5 – 4 hod.) na třepačce při 28°C. Když kultura nabyla na 2x10⁷ buněk/ml, kultura byla stočena na centrifuze při 3500g, 5min, 22°C (Hettich Universal 320R, Hettich Zentrifugen). Pelet byl promyt sterilní demi H₂O a znovu stočen za stejných podmínek. Poté byl pelet resuspendován v 500 μ l demi H₂O. Pro jednu transformaci bylo použito 100 μ l takto vytvořené suspenze. Ke 100 μ l suspenze buněk byla přidána transformační směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce č. 15. Salmon sperm DNA (ssDNA) byla před přidáním do transformační směsi denaturována 10min vařením a potom ihned schlazena na ledu.

Tabulka č. 15: složení transformační směsi

transformační směs	
50% PEG	240 μ l
1M LiAc	36 μ l
ssDNA (10mg/ μ l)	10 μ l
demi H ₂ O	40 μ l
PCR kazeta/plasmid	34 μ l

Směs buněk s transformační směsí byla inkubována 40 minut ve vodní koupeli při 42°C (Barnstead International, Lab-Line). Poté byla směs stočena při 11500g, 1min (Centrifuga Hettich Mikro 200, Hettich, Zentrifugen). Pelet byl resuspendován v 1 ml YEPG média a inkubován 3 – 4 hod. v horkovzdušné třepačce při teplotě 28°C (Kühner, Lab-Therm). Buňky byly vysety na selekční médium s příslušným antibiotikem. V případě transformace kmene BY4742 a použití PCR kazety vytvořené z templátového plasmidu pKT209 byly buňky vysety na MM médium bez uracilu.

3.2.2.2.4 Získání DNA z kvasinkových buněk a ověřovací PCR

Malé množství biomasy buněk testovaného kmene, rostoucích maximálně 24 hodin, bylo resuspendováno v 40 µl NaOH. Suspenze byla promíchána (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a denaturována při 95°C po dobu 15min v PCR cykleru. Suspenze byla poté scentrifugována při 2000xg, 1min (mikrocentrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International). 0,5 µl supernatantu byl použit jako templát pro následnou PCR reakci v objemu 14 µl (viz tabulka č. 16). Teplota a doba připojení ověřovacích primerů se lišila v závislosti na očekávané velikosti produktu, orientační údaj je uveden v tabulce č. 16.

Reakční směs		Program PCR reakce (Emerald/OneTaq®)		
Master Mix	7 µl	1.	95°C/94°C (start reakce)	2min/30s
demi H ₂ O	5,5 µl	2.	95°C/94°C (denaturace dsDNA)	10s/20s
FW primer 5pmol.µl ⁻¹	0,5 µl	3.	60°C (připojení primerů)	30s
REV primer 5pmol.µl ⁻¹	0,5 µl	4.	72°C/68°C (extenze)	1min/kb
supernatant	0,5 µl	5.	72°C/68°C (dosyntetizování)	5min
		6.	4°C (ukončení reakce)	∞

Tabulka č. 16: reakční směs a program ověřovací PCR

3.2.2.2.5 Sekvenování DNA

DNA získaná pomocí ověřovací PCR byla použita jako templát pro přípravu DNA pro sekvenční analýzu. Sekvenování DNA bylo použito pro ověření vložení transformačních kazet s geny pro fluorescenční proteiny. Objem reakce na přípravu templátu byl standardně 40 µl. Složení reakční směsi a nastavení PCR reakce je uvedeno v tabulce č. 17.

Reakční směs		Program PCR reakce (Emerald/OneTaq®)		
Master Mix	20 µl	1.	95°C/94°C (start reakce)	2min/30s
demi H ₂ O	17 µl	2.	95°C/94°C (denaturace dsDNA)	10s/20s
FW primer 5pmol.µl ⁻¹	1 µl	3.	60°C (připojení primerů)	30s
REV primer 5pmol.µl ⁻¹	1 µl	4.	72°C/68°C (extenze)	1min/kb
produkt ověřovací PCR	1 µl	5.	72°C/68°C (dosyntetizování)	5min
		6.	4°C (ukončení reakce)	∞

Tabulka č. 17: reakční směs a program pro získání DNA pro sekvenaci

Po dokončení PCR byla DNA srážena etanolem. Po vysušení bylo k DNA 30 μl demi H_2O . Koncentrace DNA byla měřena na mikrokapilárním spektrofotometru NANODROP 100 (Thermo Scientific). Koncentrace DNA [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] byla vypočítána ze vztahu: $\text{Constant} * A_{260}$ kde $\text{Constant} = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V tabulce č. 18 je znázorněno požadované množství DNA pro sekvenaci ve vztahu k délce templátu. Podle těchto pravidel Laboratoře sekvenace DNA, Přf UK byl připravený vzorek s celkovým objemem 14 μl . Složení vzorku je shrnuto v tabulce č. 18. Ke vzorku byl přidán FW a nebo REV primer v závislosti na požadovaném začátku sekvenace.

PCR produkt	Množství DNA
100 – 200bp	1 – 3ng
200 – 500bp	3 – 10ng
500 – 1000bp	5 – 20ng
1000 - 2000bp	10 – 40ng
2000bp <	20 – 50ng

Složení vzorku na sekvenaci	
FW/REV primer $5\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1 μl
Demi H_2O	13 – x μl
DNA	x

Tabulka č. 18: požadované množství DNA v objemu 14 μl a složení vzorku na sekvenaci

Vzorek na sekvenaci byl odeslán do Laboratoře sekvenace DNA, PřfUK a výstup byl analyzován v programu Chromas Lite 2.1. Očekávaná sekvence byla porovnávána se získaným výsledkem sekvenace pomocí internetové databáze NCBI Blast.

3.2.2.2.6 Odstranění selekčních markerů pomocí Cre rekombinázy

V případě N-koncového značení proteinů pomocí GFP bylo nutné odstranit selekční marker pomocí Cre rekombinázy. Cre rekombináza byla do buněk vnesena transformací plasmidem pSH66. Gen pro Cre rekombinázu je pod kontrolou GAL promotoru. Po transformaci metodou LiAc/ssDNA/PEG byli buňky vysety na selekční médium s nourseotricinem. Po třech dnech kultivace bylo několik kolonií přenesených na plotny s nourseotricinem. Následující den byly stěry z několika kolonií přeneseny do 5ml tekutého média s nourseotricinem a kultivovány přes noc v horkovzdušné třepačce při 28°C . Ráno byly buňky z tohoto inokula přeneseny do média pro indukci Cre rekombinázy v poměru 1ml inokula:10ml média. Buňky byly v třepačce kultivovány 3-4hod. při teplotě 28°C a vyseté v hustotě 100 kolonií/plotnu na 4 YEPG plotny. Po třech dnech kultivace byly kolonie razítkem přeneseny na 4 YEPG plotny s G418 (původní rezistenční marker v transformační kazetě pro N-koncové značení). Následující den byly negativní selekcí vybrány klony, které nenarostly na plotnách s G418, tedy se zbavily rezistence. Tyto klony byly přeneseny na YEPG médium s edicinem. Následně bylo vyštěpení a správné vložení GFP do genomu testováno ověřovací PCR.

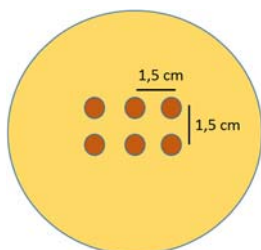
3.2.2.3 Výsev kvasinkových kolonií

Malé množství biomasy bylo odebráno z buněk kultivovaných přes noc na kultivačním médiu s edicinem a přeneseno do 1ml demineralizované H_2O připravené v přístroji Ultrapur (Watrex). Počet buněk v suspenzi byl stanovený pomocí Thomovy

počítací komůrky ve světelném mikroskopu při zvětšení 200krát. Koncentrace buněk v suspenzi byla měřena také spektrofotometricky (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) při vlnové délce 600nm. Optická denzita přiměřeně naředěné buněčné suspenze byla měřena v plastové kyvetě s optickou dráhou 1cm. Jako blank byla použita demineralizovaná H₂O.

Suspenze buněk obsahující 10³ buněk/ml byla použita pro výsev mikrokolonií na pevné médium. Na misku obsahující kultivační médium s \varnothing 6cm bylo mikropipetou umístěno 50 μ l buněčné suspenze a skleněnou hokejkou byla suspenze rozprostřena po celém povrchu média.

V případě pozorování obřích kolonií laboratorního kmene BY4742 byly očkovány obří kolonie. Z buněk kultivovaných přes noc bylo odebráno 12mg biomasy a resuspendováno v 1ml demineralizované H₂O. Z takto vytvořené suspenze bylo vytvořeno na každé \varnothing 9cm kultivační misce 6 kapek po 10 μ l vzdálených od sebe vždy 1,5cm. Rozložení obřích kolonií na médiu je znázorněno na obrázku č. 26. V případě výsevu obřích kolonií na kultivační misky s průměrem 6cm bylo vytvořeno 6 kapek po 1 μ l.



Obrázek č. 26: schéma očkování obřích kolonií kvasinek na kultivačních miskách \varnothing 9cm

Alkalizace média v okolí kolonií byla pozorována na miskách s pH indikátorem BKP.

3.2.2.4 Sledování fluorescence

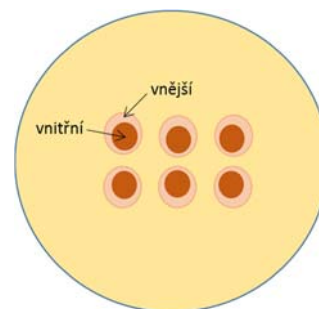
Při pozorování buněk byl používán mikroskop Leica DMR. Preparát byl pozorován pomocí Nomarského kontrastu ve viditelném světle. Pole s buňkami produkujícími fluorescenční značku bylo následně pozorováno s filtrem pro fluorescenci bez Nomarského kontrastu při zvětšení 1000x. Standardní doba expozice snímku je vždy uvedena u příslušných fotografií. Obraz byl snímáný monochromatickou kamerou JENOPTIK Progres[®] a programem NIS Elements. Snímky byly následně upravovány v programu IrfanView.

3.2.3 Metody práce s proteiny

3.2.3.1 Odběr buněk pro Western Blott analýzu

Produkce fúzních proteinů byla sledována v rámci obřích kolonií kvasinek kmene BY4742. Buňky byly odbírány odděleně z vnitřní a vnější části kolonie, kromě odběru ve druhém dni kultivace, kdy byly odebrány kolonie celé. Schéma odběru je uvedeno na obrázku č. 27. 200 – 300mg buněk bylo přeneseno do předvážených zkumavek a okamžitě zmrazeno v tekutém dusíku. Následně byly vzorky uchovány v -80°C.

Obrázek č. 27 schéma odběru vnitřní a vnější části obřích kolonií



3.2.3.2 Příprava kvasinkových lyzátů a stanovení koncentrace proteinů

- MES pufr s inhibitory proteas

10mM	MES, pH = 6,8	(upraveno roztokem NaOH)
1/50 objemu	2xPIC	(Inhibitor proteas Mix FY; Serva)
8mM	DTT	(DL-dithiotreitol; Sigma)
0,1M	AEBSF	(fluorid hydrochlorid; Fluka)

Vzorky uskladněné v -80°C byly přeneseny na led a podle jejich mokré váhy k nim bylo přidáno 200 - 300 μl MES pufru s inhibitory proteas. Po rozmíchání byla suspenze převedena do zkumavek naplněných do cca $\frac{1}{2}$ skleněnými kuličkami. Na mechanické rozbití buněk byl použit desintegrátor FASTPREP, kde byly buňky rozbíjené 4x20s a mezitím se 2min chladily na ledu. Lyzát byl dále centrifugován 680xg, 2 min, 4°C (centrifuga Hettich Universal 320R, Hettich Zentrifugen). Následně byla v supernatantu stanovena koncentrace proteinů pomocí metody podle Bradfordové. Vzorky byly celou dobu udržovány na ledu.

Metoda podle Bradfordové je založena na posunu absorpce po vazbě činidla Coomassie Brilliant Blue R 250 na molekulu proteinu. Tato metoda umožňuje kolorimetricky stanovit koncentraci proteinů ve vzorku. Postup přípravy vzorků na analýzu koncentrace proteinů je uveden v tabulce č. 19.

blank	750 μl demiH ₂ O	50 μl MES s inhibitory proteas (50x ředěný)	200 μl činidla Bradfordové
standard	750 μl demiH ₂ O	50 μl BSA s výslednou koncentrací 5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	200 μl činidla Bradfordové
vzorek	750 μl demiH ₂ O	50 μl vzorku (50x naředěný lyzát)	200 μl činidla Bradfordové

Tabulka č. 19: příprava vzorků na stanovení koncentrace proteinů

Směsi byly promíchány a ponechány 10min při laboratorní teplotě. Následné měření koncentrace proteinů probíhalo pomocí spektrofluorometru (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) při vlnové délce 595nm. Každý vzorek byl měřen v duplikátech, ze kterých byly vypočteny průměrné hodnoty. Z absorbance standardního vzorku BSA ($A_{595} = 0,3$ při koncentraci 5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) byla vypočítána koncentrace vzorků. Vzorky byly uchovávány v -80°C .

3.2.3.3 Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

- Separační pufr (pH = 8,8)
 - 1,5M Tris (Sigma)
 - 0,4% (w/v) SDS (dodecylsulfát sodný, Sigma)
 - pH upraveno pomocí 1M HCl

- Zaostřovací pufr (pH = 6,8)
 - 0,5M Tris
 - 0,4% (w/v) SDS
 - pH upraveno pomocí 1M HCl

- SDS elektrodový pufr
 - 0,05M Tris
 - 0,384M glycin
 - 0,1% (w/v) SDS

- Vzorkový denaturační pufr
 - 2,5M Tris
 - 50% (v/v) glycerol
 - 0,02% (w/v) BFM (bromfenolová modř, Bio-Rad)
 - 10% (w/v) SDS

Vertikální elektroforéza v akrylamidovém gelu slouží k rozdělení proteinů podle jejich molekulových hmotností v závislosti na jejich migraci v SDS denaturačním prostředí gelu (SDS-PAGE). Skla přečištěná lihem byla zafixována v upínači skel a umístěny do nalévacího stojanu (Bio-Rad). Mezi skla bylo přeneseno 5ml separačního gelu (namíchan podle tabulky č. 20) a převrstvilo se 200 μ l isopropanolu. Po zpolymerování gelu, cca po 1hod., byl gel destilovanou vodou promyt od isopropanolu. Poté byl na separační gel mezi skla nanesen roztok zaostřovacího gelu (složení uvedeno v tabulce č. 20) do kterého byl ihned umístěn hřeben. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl hřeben vysunut a jamky byly naplněny SDS elektrodovým pufrem. Skla s gely byla umístěna do elektroforetické aparatury (Bio-Rad) do které bylo nalito dostatečné množství SDS elektrodového pufru. Ke 100 μ l vzorku s požadovanou koncentrací proteinů byla přidána 1/5 objemu vzorkového pufru a 1/10 objemu DTT. Takto připravený vzorek byl inkubován 5min při teplotě 95°C. Po ochlazení byli vzorky na nanoseny na gel spolu s proteinovým standardem PageRuler™. Aparatura byla připojena ke zdroji jednosměrného proudu (ENDURO™, Labnet International) napětí bylo pro dva gely nastaveno na 200V a proud na konstantní hodnotu 50mA. Elektroforéza probíhala 50 – 60 minut.

separační gel (9%)	
Akrylamid	3 ml
Separační pufr	2,5 ml
Demi H ₂ O	4,5 ml
TEMED	10 μ l
10% persíran amonný	20 μ l

zaostřovací gel	
Akrylamid	0,65 ml
Zaostřovací pufr	1,25 ml
Demi H ₂ O	3,05 ml
TEMED	10 μ l
10% persíran amonný	25 μ l

Tabulka č. 20: složení separačního a zaostřovacího gelu na SDS-PAGE

3.2.3.4 Western-blott

- Western-blott pufr
 - 0,025M Tris
 - 0,192M glycin
 - 10% (v/v) metanol

- Barvicí roztok
 - 40% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) kyselina octová
 - 0,1% (w/v) Coomasie Brilliant Blue R 250

- Odbarvovací roztok
 - 40% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) kyselina octová

Po rozebrání elektroforetického přístroje a vyjmutí gelu s proteiny byl odstraněn zaostřovací gel. PVDF membrána byla předem aktivována 5 minut v metanolu, 5 minut byla promývána demi H₂O a dalších 5 minut ve Western-blott pufru. Na držák (Bio-Rad) byl naskládán postupně kobereček, filtrační papír Whatman, polyakrylamidový gel, membrána, filtrační papír Whatman a kobereček. Koberečky a filtrační papíry byly předem namočený v blottovacím pufru. Zdroj byl nastaven na 120V, 250mA po dobu 1,5 hodiny. Aparatura byla zalita blottovacím pufrém a umístěna na led. Po ukončení přenosu proteinů na membránu byl z membrány odstřižen proteinový standard a membrána byla na 20s vložena do barvicího roztoku. Poté byla propláchnuta odbarvovacím roztokem. Po uschnutí byla membrána vyfocena spolu s proteinovým standardem.

3.2.3.5 Imunodetekce

- PBS, pH = 7,4
 - 10mM Na₂HPO₄.12H₂O
 - 0,15M NaCl
 - pH upraveno pomocí 0,2M H₃PO₄
 - (PBS pro přípravu 1% kaseinu se neupravuje)

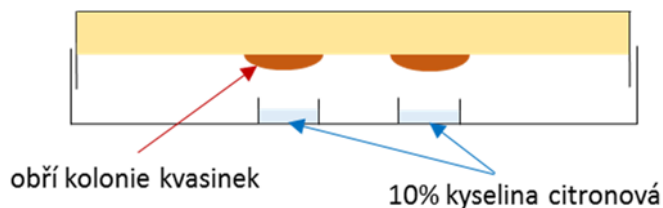
- GFP (B-2) SC9996HRP, myší monoklonální protilátka IgG_{2a}, (Santa Cruz Biotechnology)
- SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent substrate (Thermo Scientific)
Luminol/Enhancer Solution
Stable Peroxide Solution
Pozn.: dvě složky byly smíchány v poměru 1:1 těsně před aplikací

Membrána byla odbarvena pomocí metanolu a byla propláchnuta demi H₂O. Dále byla promývána v PBS a blokována PBS-1% kaseinem po dobu 30 minut a po opláchnutí v PBS byla po dobu 1hod. inkubována s anti-GFP protilátkou 1000x naředěnou v PBS s Tweenem. Po inkubaci byla promývána PBS s Tweenem 3x5min. Na takto připravenou membránu byl aplikován detekční roztok Super Signal West Pico smíchaný těsně před aplikací a membrána byla inkubována po dobu 5 minut. Membrána byla umístěna do vyvíjecí kazety. Doba expozice filmu je uvedena vždy u konkrétního filmu v kapitole 5.2.

3.2.4 Měření produkce amoniaku koloniemi

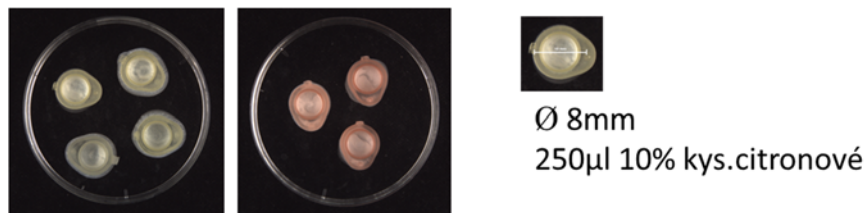
- 10% (w/v) 0 kyseliny citronové
- Nesslerovo činidlo (Merck)
- Standardní kalibrační roztok (1μg/ml N)
0,4717% (w/v) síran amonný
Pozn.: z důvodu nutnosti velmi přesné navážky byl síran amonný 1 hod před vážením sušen v horkovzdušném sterilizátoru při 100°C

Měření produkce amoniaku probíhá na základě jímání amoniaku do jímek s 10% 0 kyselinou citronovou, kde je tvořen citrát amonný. Jímky s roztokem kyseliny citronové jsou umístěny naproti kvasinkovým koloniím. Uspořádání jímek vzhledem k obřím koloniím je znázorněno na obrázku č. 28. Kvantitativní stanovení amoniaku je založeno na reakci amoniaku s K₂(HgI₄) a hydroxidem alkalických kovů v Nesslerově činidle. Výsledkem je barevná sloučenina, tzv. Millonova báze, která je vyhodnocována kolorimetricky. V Laboratoři kvasinkových kolonií je tento postup využíván pro stanovení produkce amoniaku obřimi koloniemi kvasinek laboratorního kmene BY4742.



Obrázek č. 28: uspořádání jímek s kyselinou citronovou při měření produkce amoniaku obřimi koloniemi kvasinek

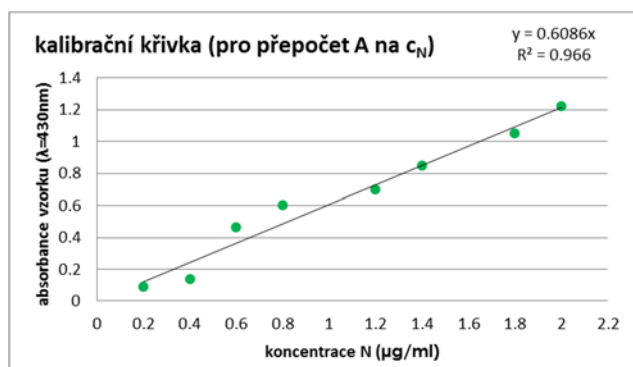
V rámci této diplomové práce byl optimalizován odběr amoniaku pro mikrokolonie divokých kmenů kvasinek BR-F. Bylo navrženo několik uspořádání jímek pro odběr amoniaku. Nebylo možné pod každou mikrokolonií umístit jednu jíмку s kyselinou citronovou, protože mikrokolonie jsou rozprostřeny po celé ploše kultivačního média. Bylo navrženo uspořádání se třemi a čtyřmi jímkami (viz obrázek č. 29) pro odběr amoniaku a tyto byly dále testovány (viz kapitola 5.4.). Víčka kultivačních misek s jímkami pro odběr amoniaku byla vytvořena pro účely této diplomové práce.



Obrázek č. 29: uspořádání odběrných jímek pro detekci amoniaku se třemi a čtyřmi jímkami, každá určena pro 250 µl kyseliny citronové.

Pro měření produkce amoniaku mikrokoloniemi divokých kmenů kvasinek bylo optimalizováno uspořádání tří jímek, každá s 250 µl 10% kyseliny citronové. Kultivační misky s mikrokoloniemi a s jímkami naplněnými 10% kyselinou citronovou na víčku kultivační misky, byly kultivovány ve stejné orientaci jako při odběru amoniaku z obřích kolonií (viz. obrázek č. 28) v termostatu při 28°C. Časový interval mezi odběry byl přesně zaznamenán, aby bylo možné získané hodnoty přepočítat na produkci amoniaku/den. Kyselina citronová byla odebrána do sterilních zkumavek a ihned uzavřena, aby nedocházelo k vázání atmosférického amoniaku. Před kolorimetrickým měřením odebraných vzorků byla změřena kalibrační křivka za použití 10x zředěného standardního kalibračního roztoku. Byla připravena kalibrační řada roztoků s výslednou koncentrací amoniaku (resp. dusíku) v rozmezí 0,2 – 2,5 µg. K 100 µl kalibračních roztoků bylo přidáno 900 µl demi H₂O a 1ml Nesslerova činidla a směs byla inkubována po dobu 20min v laboratorní teplotě. Následné kolorimetrické stanovení probíhalo na spektrofotometru Optizen Pop (UV/Vis spectrophotometer, Mecasys) při vlnové délce 430nm. Ze získaných hodnot absorbance standardních kalibračních roztoků byla vytvořena kalibrační křivka (viz. obrázek č. 30) a byl získán faktor pro přepočet absorbance na koncentraci amoniaku.

K 100 µl odebraného vzorku bylo přidáno 900 µl demi H₂O a 1ml Nesslerova činidla. Po 20min inkubace v laboratorní teplotě byl vzorek kolorimetricky vyhodnocen.



Obrázek č. 30: kalibrační křivka pro přepočet absorbance na koncentraci amoniaku

4 Cíle práce

- Vytvořit z dostupné literatury ucelený přehled o molekulárních mechanismech autofagie u kvasinek
- Sledování produkce mitochondriálních proteinů u kmene *S.cerevisiae* BY4742 ve vývoji obřích kolonií i v kontextu kvasinkové komunikace
- Optimalizace metody pro sledování produkce dusíku u divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F
- Konstrukce kmenů pro další studium procesů probíhajících v koloniích divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F
- Konstrukce kmenů pro studium autofagie u divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F

5 Výsledky

5.1 Konstrukce kmenů odvozených od kmene BY4742 s proteiny značenými GFP a mCherry

V rámci studia produkce mitochondriálních proteinů ve kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* byly pro tuto práci vybrány proteiny Icl2p, Cyc2p a Om45p, jejich charakteristika je stručně shrnuta v tabulce č. 21 a podrobněji rozepsána v kapitole 2.2.4.

název proteinu	lokalizace	funkce
Cyc2p	vnitřní mitochondriální membrána	cytochrom C pravděpodobně se podílí na spojení hemu s cytochromem c1 (Cyc1p)
Icl2p	mitochondriální matrix	2-metylisocitrát lyasa katalyzuje přeměnu 2-metylisocitrátu na sukcinát a pyruvát
Om45p	vnější mitochondriální membrána, cytosolická strana	neznámá množství proteinu v buňce se zvyšuje v odpovědi na DNA replikační stres

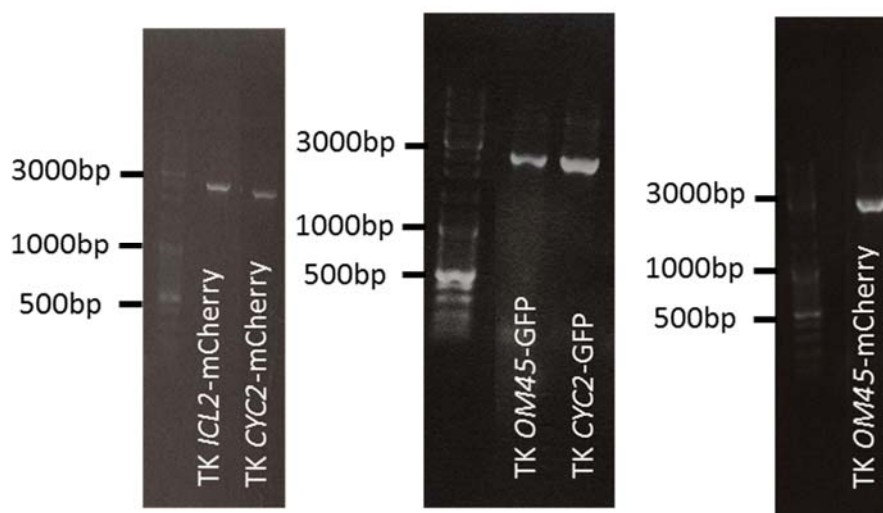
Tabulka č. 21: charakteristika proteinů vybraných pro studium mitochondrií (informace převzaty z www.yeastgenome.com)

Kvasinky *S.cerevisiae* vytvářejí v rámci kolonií diferencované subpopulace buněk (viz. kapitola 2.2.3). Během studia diferenciací ve vývoji obřích kolonií kmene BY4742 byl prokázán rozdíl v lokalizaci Icl2p mezi centrálním regionem kolonie a jeho vnějším okrajem i v rámci fáze vývoje kolonie. Byl výrazněji exprimován na okraji kolonie a také v alkalické fázi vývoje kolonií (PALKOVÁ *et al.* 2002; VÁCHOVÁ *et al.* 2009b). Studium diferenciací buněk také odhalilo rozdíly v morfologii mitochondrií v různých oblastech kolonie. Obří kolonie *S.cerevisiae* se v pozdějších stádiích diferencují na horní (U) buňky a dolní (L) buňky. U L buněk bylo zaznamenáno množství mitochondrií s dobře vyvinutými kristami, naopak mitochondrie U buněk byly velké a ztratily velkou část krist (ČÁP *et al.* 2012). Vytvoření fúzního proteinu Cyc2p.GFP, který označuje vnitřní mitochondriální membránu, umožní lepší sledování změn morfologie mitochondrií v rámci kolonie.

V rámci studia mitofagie v kvasinkách *S.cerevisiae* je používán protein Om45p značený GFP. Pomocí imunoblottu je sledována produkce volného GFP po degradaci mitochondrií ve vakuole (KANKI *et al.* 2009a).

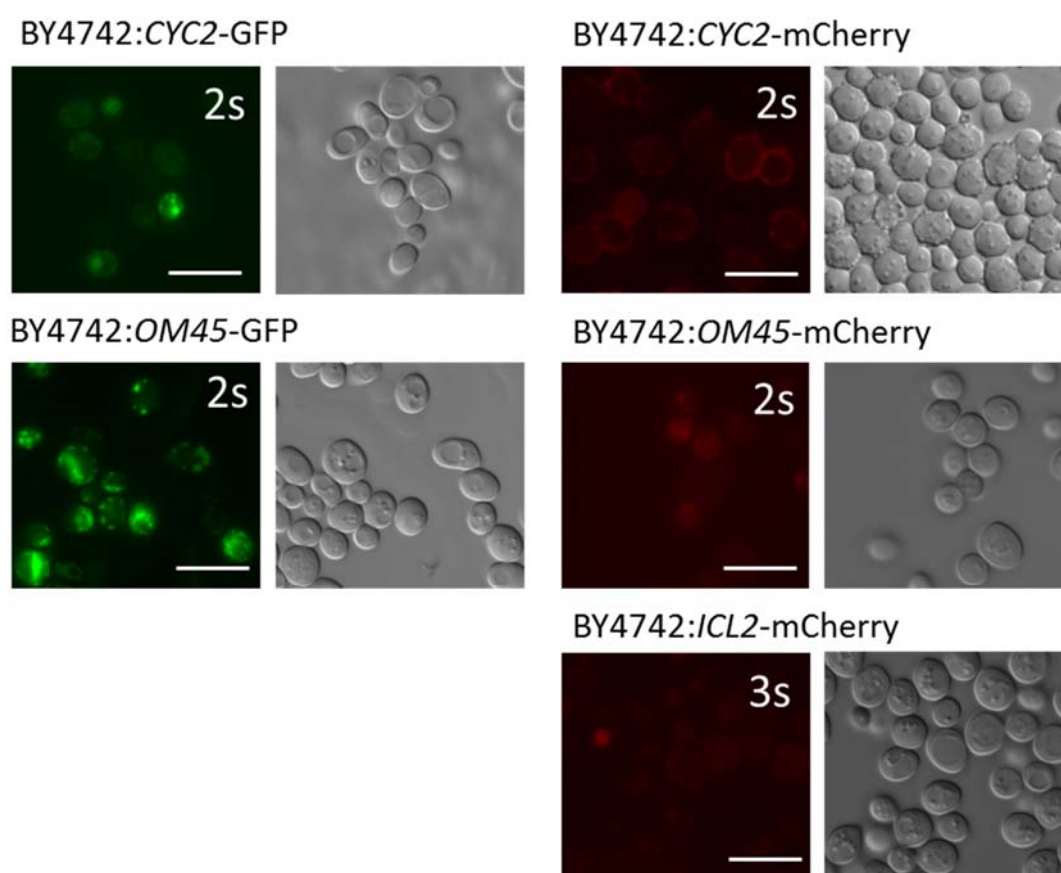
Cílem bylo vytvořit kmeny s vybranými mitochondriálními proteiny značenými GFP i mCherry. Kmeny, produkující fúzní proteiny, byly vytvořeny integrováním genu pro fluorescenční protein do genomu kvasinek (viz. kapitola 3.2.2.2). Integrovaní genu do genomu pomocí homologní rekombinace je na rozdíl od transformace autonomně se replikujícím plasmidem stabilní. Expres fluorescenčního proteinu je tak regulována přirozeným promotorem značeného genu, neliší se tedy od exprese sledovaného genu.

Jako templát pro vytvoření transformačních kazet pro značení proteinů pomocí GFP byl použit plasmid pKT209, který kromě genu kódujícího γ EGFP obsahuje i gen *CaURA3*, který kompenzuje uracilovou auxotrofii kmene BY4742. Mapa plasmidu je uvedena v kapitole 3.1.3 a jeho charakteristika je uvedena v téže kapitole v tabulce č. 4. Gen γ EGFP kóduje zelený fluorescenční protein optimalizovaný pro pozorování proteinů *in vivo* v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (CORMACK *et al.* 1997). Templátem pro přípravu transformačních kazet s mCherry byl plasmid pBS35. Primery pro přípravu inserčních kazet pomocí metody PCR jsou uvedeny v kapitole 3.1.4. Velikost připravených kazet byla ověřena pomocí gelové elektroforézy (viz.obrázek č. 31). Očekávaná velikost připravovaných kazet z plasmidu pKT209, obsahující γ EGFP a gen pro rezistenci na hygromycin, je 2441bp. V případě inserčních kazet připravených z plasmidu pBS35 obsahující mCherry a rezistenci ke kanamycinu je očekávaná velikost 2432bp.



Obr.č. 31: Gelová elektroforéza, ověřování připravovaných kazet pro fúzi mitochondriálních proteinů Icl2p, Cyc2p a Om45p s mCherry a pro fúzi Cyc2p a Om45p s GFP. TK = transformační kazeta.

Nově připravené kmeny byly ověřovány v několika krocích, nejprve pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz. obrázek č. 32). Pro ověření správného vložení GFP byla využita metoda PCR s následnou vizualizací pomocí gelové elektroforézy (viz. obrázek č. 33). Primery byly navrženy tak, aby bylo možné ověřit především spojení sledovaného proteinu a fluorescenční značky. Očekávané velikosti produktů jsou uvedeny v tabulce č. 22. Dalším krokem ověření byla izolace a sekvenace dané sekvence genu spolu s částí GFP a získaná sekvence byla porovnávána s předpokládanou sekvencí proteinu (data neuvedena).

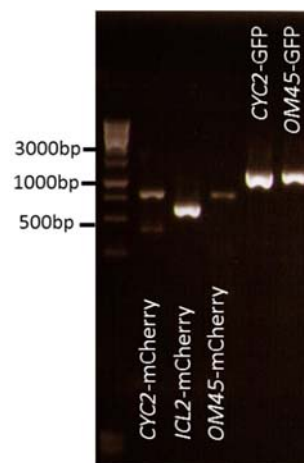


Obrázek č. 32: Fluorescence izolovaných kmenů odvozených z rodičovského kmene BY4742 s fúzí GFP nebo mCherry s mitochondriálními proteiny Icl2p, Om45p a Cyc2p v porovnání se snímky buněk (Nomarski kontrast). Měřítka odpovídá 10 μ m, doba expozice je uvedena na snímku.

značení pomocí mCherry		značení pomocí GFP	
Cyc2-mCherry	906bp	Cyc2-GFP	1097bp
Om45-mCherry	903 bp	Om45-GFP	1094bp
Icl2-mCherry	731 bp		

Tabulka č. 22: očekávaná velikost produktů PCR při ověřování správného vložení transformačních kazet s GFP a mCherry.

Obrázek č. 33: Ověření vložení transformačních kazet do genomu, pomocí PCR a následné gelové elektroforézy.



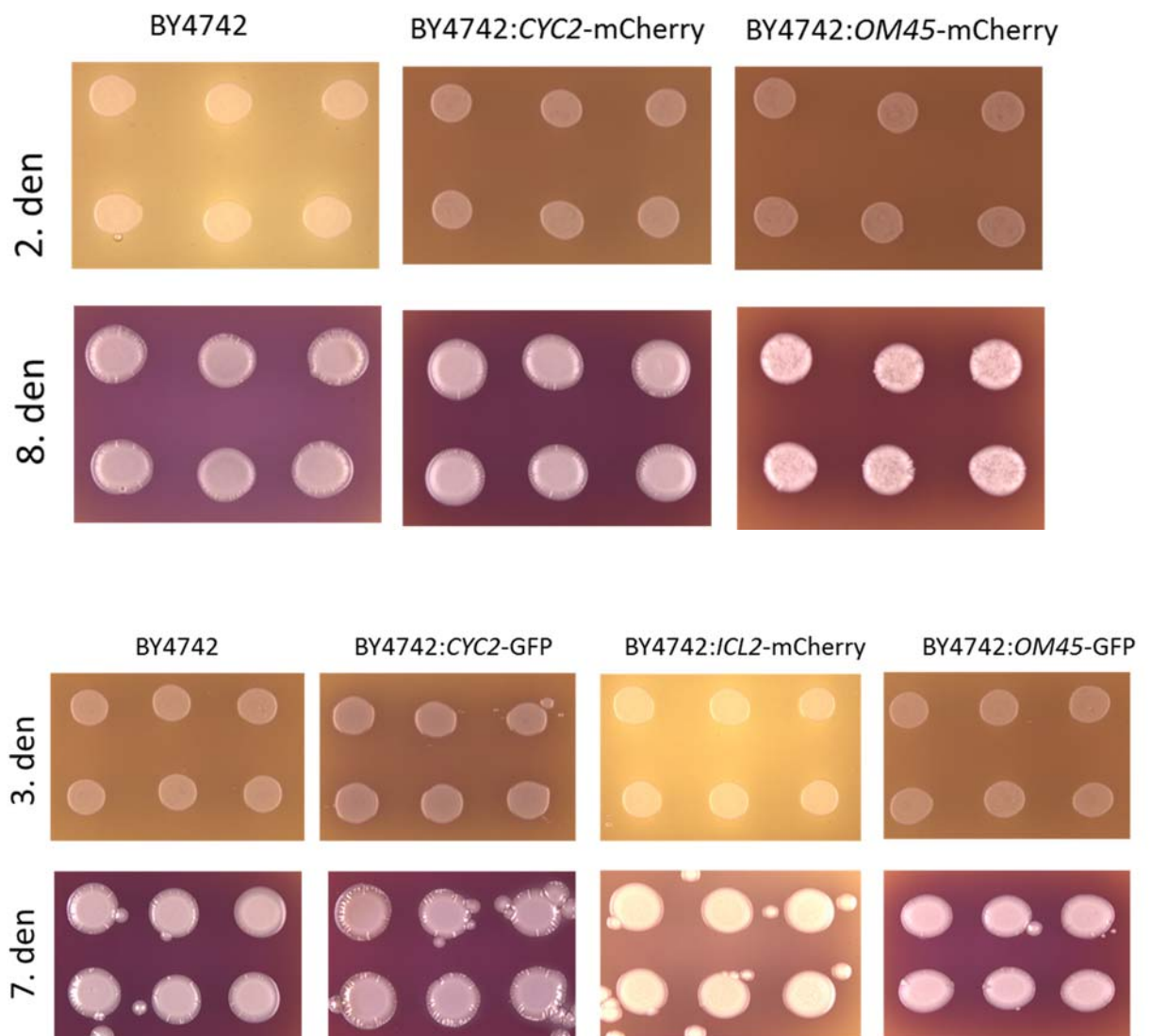
Po PCR ověřování kmene následovalo testování, zda nedochází k výrazným změnám morfologie oproti rodičovskému kmenu v souvislosti s produkcí fúzního proteinu (viz obrázek č. 34). Cílem značení proteinů bylo pozorování jejich produkce při normálním růstu kolonie, pokud by ale kolonie měly jinou morfologii než rodičovský kmen, znamenalo by to, že zelený fluorescenční protein interferuje s normálním vývojem kolonie, tudíž by byl pro tento typ výzkumu nevhodný.

V případě konstrukce kmene BY4742:CYC2-GFP bylo vytvořeno 10 kmenů s pozitivním signálem GFP při kontrole pomocí fluorescenčního mikroskopu. Po kontrole vložení transformační kazety pomocí PCR byly vyřazeny 4 klony. Následná kontrola fenotypu kolonií prokázala shodné morfologie obřích kolonií při pěstování na GM médiu s pH indikátorem a také shodné časování alkalizace média v rámci vývoje kolonií.

V rámci konstrukce kmene BY4742:OM45-GFP bylo vytvořeno 6 kmenů s pozitivním GFP signálem, nicméně po PCR ověřování byly vyřazeny tři kmeny, které se nepodařilo ověřit. V rámci kontroly morfologie kolonií nebyly u tří ověřených kmenů zaznamenány rozdíly s rodičovským kmenem BY4742.

Při konstrukci kmenů s proteiny značenými mCherry bylo množství vytvořených kmenů s pozitivním signálem fluorescenčního proteinu nižší. V případě kmene BY4742:ICL2-mCherry byly vytvořeny tři klony a po PCR ověřování byl vybrán jeden. Při přípravě kmene BY4742:CYC2-mCherry byly ověřeny z původních čtyř klonů dva. Kmen BY4742:OM45-mCherry vykazoval nejsilnější signál v případě dvou klonů, přičemž se podařilo ověřit oba kmeny.

Podařilo se vytvořit a ověřit všechny zamýšlené kmeny. Z důvodu velmi slabého fluorescenčního signálu proteinů fúzovaných s mCherry (RFP), nebyly tyto kmeny dále využity ke studiu adaptačních mechanismů kvasinek. Připravené kmeny s GFP byly využity ke studiu produkce mitochondriálních proteinů ve vývoji kolonií (viz. kapitola 5.2.).



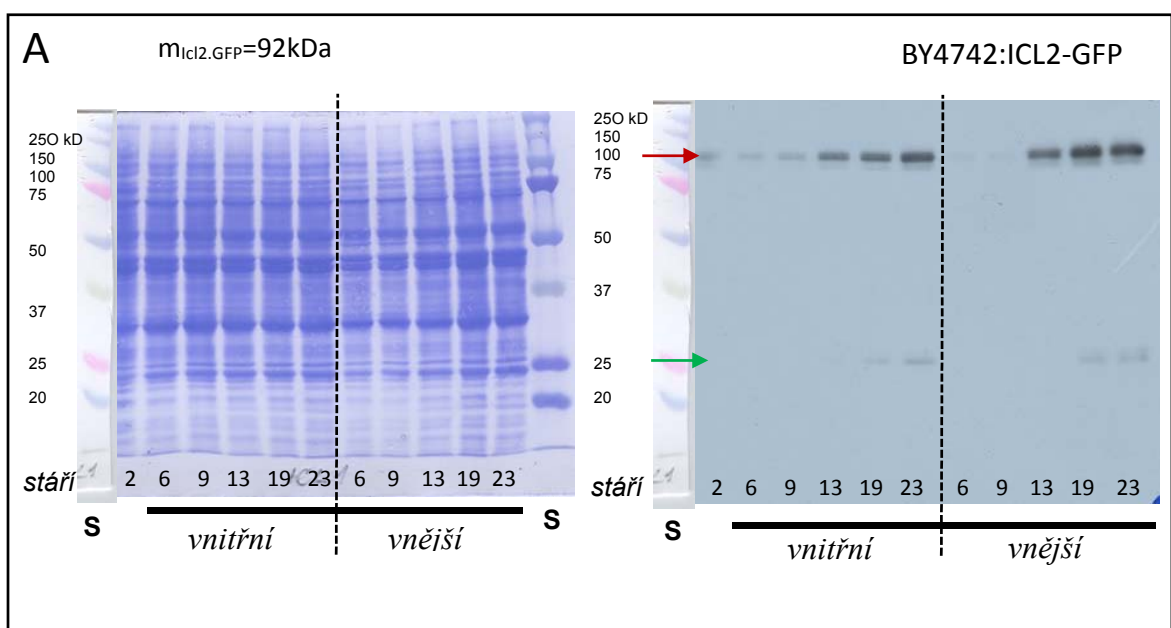
Obrázek č. 34: Ověřování morfologie izolovaných kmenů, srovnání morfologie kmenů produkujících fúzními proteiny Cyc2p-GFP, Icl2p-GFP a Om45p-GFP odvozených od kmene BY4742 spolu s rodičovským kmenem

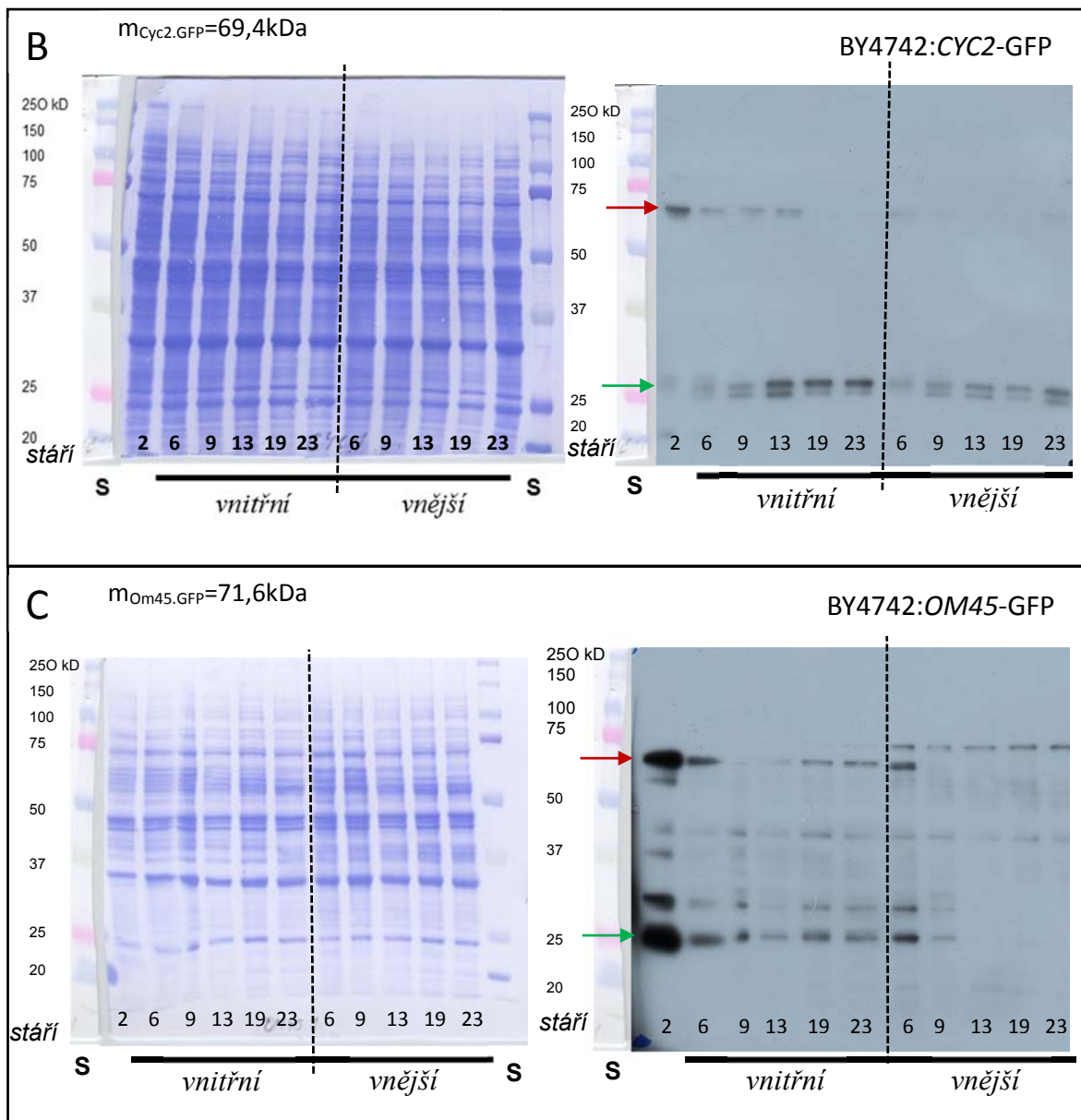
5.2 Sledování produkce proteinů značených GFP v rámci vývoje obřích kolonií

Pro sledování produkce mitochondriálních proteinů Cyc2p, Om45p a Icl2p v průběhu vývoje obřích kolonií byly použity nově připravené kmeny odvozené od laboratorního kmene *S.cerevisiae* BY4742. Další použitý kmen BY4742:*ICL2*-GFP pochází ze sbírky kmenů Laboratoře biologie kvasinkových kolonií, autorem je Mgr. Luděk Štěpánek. Sledování probíhalo na obřích koloniích kultivovaných na pevném GM médiu. Buňky obřích kolonií byly odebírány 2., 6., 9., 13., 19. a 23. den od výsevu. Vyjma druhého dne kultivace, kdy byly použity celé kolonie, byla odebírána odděleně vnější a vnitřní část kolonie (viz. kapitola 3.2.3.1). Buňky byly dále lyzovány a dále rozděleny pomocí SDS-PAGE. Následně byly pomocí Western blottu přeneseny na membránu. Fotografie membrán jsou uvedeny v obrázku č. 35 v levé části. Pro detekci přítomnosti značených proteinů v dané frakci buněk byla použita protilátka proti GFP.

Současně s odběry byla sledována alkalizace koloniemi příslušných kmenů s GFP v porovnání s rodičovským kmenem BY4742. Pozornost byla také věnována morfologii kolonií těchto kmenů.

Při sledování produkce proteinu Icl2-GFP v průběhu vývoje kolonií (obrázek č. 35., A) byl detekován produkt očekávané velikosti 92kDa, což odpovídá velikosti fúzního proteinu Icl2-GFP. V buňkách středu i okraje kolonie bylo pozorováno zvýšené množství Icl2p-GFP při nástupu plné alkalické fáze, tedy 13. den, nicméně ve vnějším regionu kolonie bylo množství proteinu vyšší. V pozdní alkalické fázi vývoje kolonií se objevuje protein v oblasti 27kDa, odpovídající velikosti GFP. Tento protein ukazuje na přítomnost volného GFP v buňkách, naznačující degradaci fúzního proteinu.



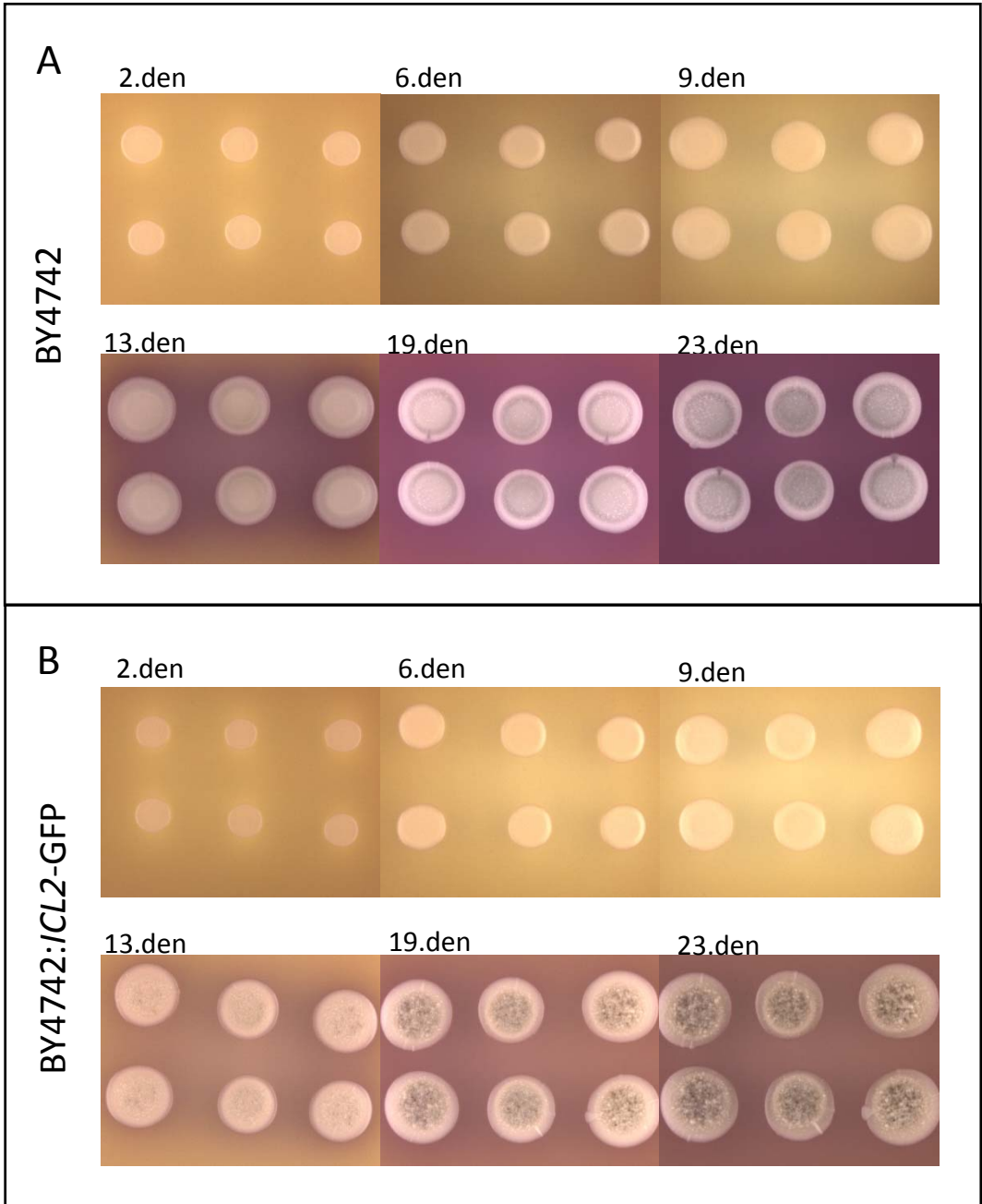


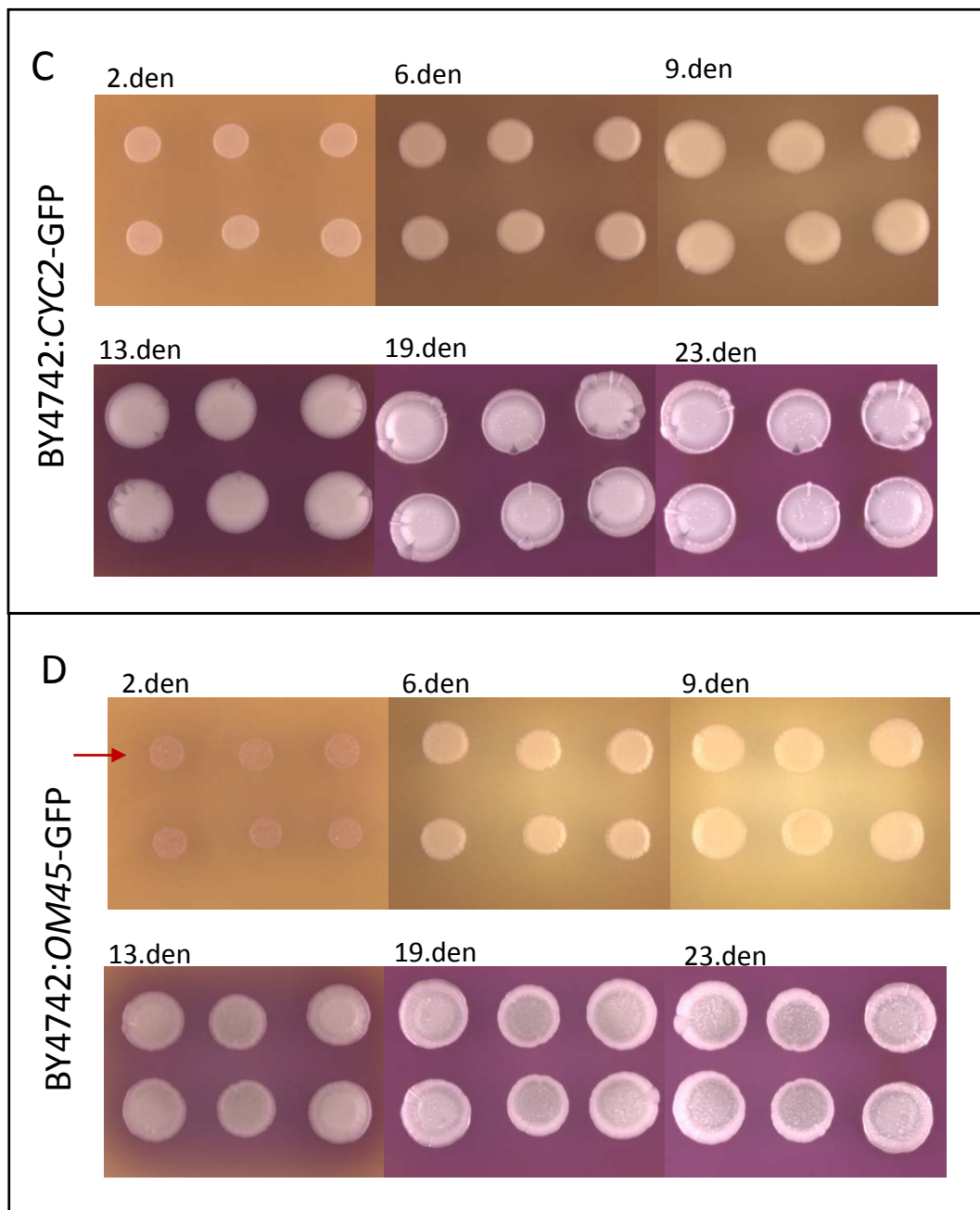
Obrázek č. 35 : Pozorování produkce mitochondriálních proteinů v průběhu vývoje obřích kolonií pomocí PAGE a Western blottu. Stáří kvasinkových kolonií ve dnech je vyznačeno číslem v dolní části membrány či filmu. (A) Kmen BY4742:*ICL2*-GFP membrána s proteiny $C_{\text{bílkovin}} = 7 \text{ mg/ml}$ a detekce protilátkou anti-GFP, doba expozice 30s (B) kmen BY4742:*CYC2*-GFP, membrána s proteiny $C_{\text{bílkovin}} = 10 \text{ mg/ml}$ a výsledek kultivace s protilátkou anti-GFP, doba expozice 45min; (C) BY4742:*OM45*-GFP, membrána s proteiny $C_{\text{bílkovin}} = 10 \text{ mg/ml}$ a detekce protilátkou anti-GFP, doba expozice 10min; červenou šipkou je označena předpokládaná velikost fúzního proteinu s GFP (hodnota je uvedena v obrázku), zelenou šipkou je označena molekulová hmotnost GFP (27kDa).

Produkce fúzního proteinu Cyc2p-GFP byla zvýšena v počáteční alkalické fázi vývoje kolonie, již druhý den byla zaznamenána vyšší produkce proteinu (obrázek č. 35., B). Šestý den kultivace bylo detekováno velmi málo proteinu v očekávané velikosti Cyc2-GFP, tedy 64,9kDa, nicméně se objevil signál, naznačující přítomnost volného GFP. Dvojitý signál v oblasti 27kDa může naznačovat dvě různé formy degradace GFP, u podobných analýz se

vyskytuje poměrně často (osobní sdělení prof. Zdena Palková). V buňkách vnitřní oblasti kolonií se produkce volného GFP v pokračující alkalické fázi zvyšovala a naopak produkce Cyc2-GFP slábla. 23. den kultivace již nebyla produkce fúzního proteinu viditelná. V buňkách okraje kolonií byla produkce Cyc2-GFP velmi slabá již od 6. dne kultivace a 9. den kultivace již nebyla viditelná. Vzhledem k narůstající produkci volného GFP a slábnoucí produkci fúzního proteinu Cyc2-GFP lze usuzovat, že v plné alkalické fázi dochází především k degradaci Cyc2-GFP v obou regionech.

Pozorování fúzního proteinu Om45p-GFP ukázalo dynamickou produkci i degradaci během vývoje kolonií (obrázek č. 35., C). Ve vnitřní oblasti kolonií produkce proteinu ve vývoji kolonií kolísala, což mohlo být způsobeno špatným přenesením proteinů na membránu pomocí Western blottu. Opakování pokusu ale ukázalo konzistentní produkci v centrálním regionu ve všech dnech odběrů. Kromě očekávaného signálu v oblasti 71,6kDa, odpovídající fúznímu proteinu Om45p-GFP, byl ve vnější oblasti kolonií detekován větší proteinový produkt, odpovídající molekulové hmotnosti 75kDa. Velmi malá produkce byla detekována 23. den kultivace i ve vnitřní části kolonií, nicméně v rámci opakování detekce se projevila produkce většího produktu ve všech pozorovaných frakcích. Ve vnější části kolonií nebyl od šestého dne kultivace detekován protein v očekávané oblasti Om45p-GFP. Volné GFP bylo detekováno ve všech fázích vývoje vnitřní části kolonií a naopak od 13. dne kultivace, tj. při přechodu do alkalické fáze, volné GFP nebylo detekováno.





Obrázek č. 36: Sledování alkalizace šestic obřích kolonií kmene *S. cerevisiae* BY4742 (A) a kmenů s proteiny značenými GFP z něho odvozených (B) BY4742:*ICL2*-GFP; (C) BY4742:*CYC2*-GFP; (D) BY4742:*OM45*-GFP. Časná alkalická fáze kmene BY4742:*OM45*-GFP je vyznačena červenou šipkou (D).

Obří kolonie rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 přešly do plné alkalické fáze 13. den od začátku kultivace (obrázek č. 36). Kolonie kmenů BY4742:*CYC2*-GFP, BY4742:*ICL2*-GFP a BY4742:*OM45*-GFP do plné alkalické fáze přešly také 13. den. U kolonií kmene BY4742:*OM45*-GFP byla navíc zaznamenána slabá alkalizace již 2. den kultivace. Fúze mitochondriálních proteinů s GFP neměla vliv na dobu nástupu plné alkalické fáze, ale u kolonií kmene BY4742:*ICL2*-GFP byla alkalizace viditelně méně intenzivní. V tomto případě došlo také ke změnám morfologie obřích kolonií oproti rodičovskému kmeni.

Výsledky proteinových analýz naznačují souvislost nástupu plné alkalické fáze u kolonií a produkce vybraných mitochondriálních proteinů. Ačkoliv míra alkalizace média byla u kolonií kmene BY4742:*ICL2*-GFP viditelně nižší než u rodičovského kmene, produkce proteinu Icl2p-GFP po nástupu alkalické fáze prudce stoupla v buňkách středu i okraje kolonie. V buňkách okraje kolonie bylo zjištěno větší množství fúzního proteinu Icl2p-GFP. Zároveň s tímto nástupem produkce Icl2p-GFP se začalo objevovat volné GFP, což ukazuje na degradaci Icl2p-GFP. Se stoupající produkcí fúzního proteinu ve vrcholné alkalické fázi stoupala i jeho degradace.

Produkce Cyc2p-GFP s počátkem alkalické fáze naopak klesala v buňkách vnitřního i vnějšího regionu. Na počátku alkalické fáze se také zvýšilo množství volného GFP. V buňkách středu kolonií bylo množství volného GFP nejvyšší 13. den, tedy při nástupu alkalické fáze, což ukazuje na souvislost začátku alkalizace média s degradací proteinu Cyc2p-GFP. Oproti tomu v buňkách okraje kolonií byla produkce volného GFP nejvyšší v pozdní alkalické fázi.

V případě sledování produkce proteinu Om45p-GFP se při nástupu plné alkalické fáze projevila největší změna produkce v buňkách okraje kolonií, ve kterých se snížila produkce volného GFP. Při nástupu plné alkalické fáze se také snížila produkce proteinu Om45p-GFP a v pokročilé alkalické fázi již nebyl viditelný a převážila produkce proteinu s větší molekulovou hmotností. Produkce tohoto většího produktu byla zaznamenána ve všech sledovaných stádiích vývoje.

Morfologie kolonií kmenů s proteiny Icl2p, Cyc2p a Om45p značenými GFP se od rodičovského kmene BY4742 nelišila, pouze v případě kmene BY4742:*ICL2*-GFP se při nástupu alkalické fáze objevil papilnatý fenotyp obřích kolonií. Vzhledem k tomu, že sledování produkce vybraných mitochondriálních proteinů proběhlo ve dvou opakováních, k přesnějšímu určení produkce proteinů Icl2p, Cyc2p a Om45p ve vývoji obřích kolonií bude zapotřebí provést další dodatečné experimenty.

5.3 Konstrukce kmenů odvozených od divokého kmene BR-F s proteiny značenými GFP

Laboratorní kmen *S.cerevisiae* BY4742 a jemu podobné kmeny již byly předmětem výzkumů v naší laboratoře, které poskytují informace o různých procesech v kvasinkových koloniích (PALKOVÁ *et al.* 1997; VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005; ČÁP *et al.* 2012). Jedním z cílů této diplomové práce bylo vytvořit kmeny s GFP značenými proteiny odvozené od divokého kmene BR-F, které by mohly v rámci budoucích výzkumů pomoci zkoumat nejen diferenciaci buněk v rámci kvasinkových kolonií, ale například i některé pochody autofagie také v divokých kmenech *S.cerevisiae*.

5.3.1 Značení proteinů označujících subtypy buněk v koloniích kmene BY4742

V naší laboratoři bylo zjištěno, že kolonie kvasinek laboratorního kmene *S.cerevisiae* BY4742 jsou tvořeny několika subpopulacemi buněk, které kromě jiného produkují specifické proteiny (blíže popsáno v kapitole 2.2.3). K těmto proteinům patří například Ino1p a Met17p, jejichž signál byl pozorován v L buňkách kolonií kmene BY4742 a Pox1p a Icl2p, které jsou typicky produkovány U buňkami (ČÁP *et al.* 2012). Pro studium subtypů buněk u divokého kmene BR-F byly vytvořeny kmeny nesoucí geny pro vybrané proteiny fúzané s GFP. Značené proteiny, jejich funkce v buňkách a lokalizace v koloniích laboratorního kmene, jsou shrnuty v tabulce č. 23. Produkovány proteiny nesly GFP na C konci.

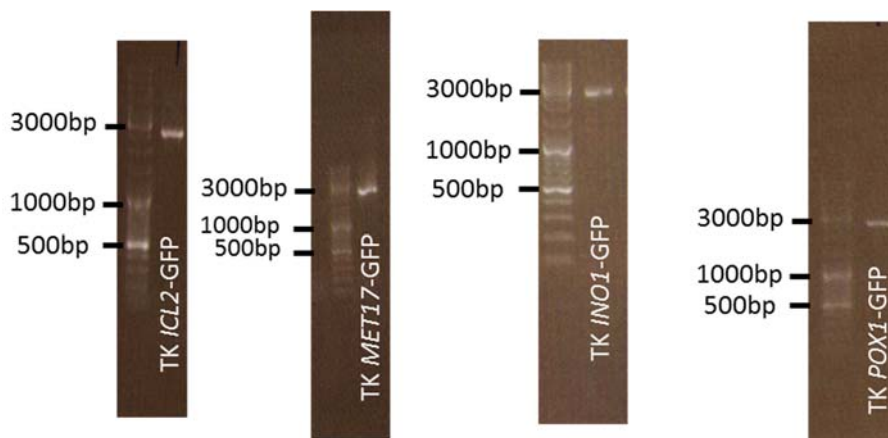
protein	lokalizace	funkce	produkován
Ino1p	cytoplasma	inositol-3P-syntasa syntéza inositol-fosfátů a fosfolipidů obsahujících inositol	L buňky
Met17p	cytoplasma	O-acetyl homoserin-O-acetyl serin sulfydrylasa biosyntéza methioninu a cysteinu	L buňky
Pox1p	matrix peroxisomu	oxidasa co-A mastných kyselin zapojen do beta oxidace mastných kyselin	U buňky
Icl2p	mitochondriální matrix	2-metylisocitrát lyasa katalyzuje přeměnu 2-metylisocitrátu na sukcinát a pyruvát	U buňky

Tabulka č. 23: Shrnutí vybraných proteinů značených pomocí GFP v kmeni BR-F, jejich lokalizace, funkce a produkce buněčným subtypem v koloniích kmene BY4742

Cílem bylo vytvořit kmeny s vybranými proteiny značenými GFP. Kmeny byly vytvořeny integrováním genu pro GFP do genomu kvasinek. V případě integrování genu do genomu je exprese fluorescenčního proteinu regulovaná přirozeným promotorem značeného genu, neliší se tedy od exprese sledovaného genu. Jako templát pro vytvoření transformačních kazet pro vložení GFP do genomu byl použit plasmid pKT127, obsahující gen pro γ EGFP a také pro kanamycinovou rezistenci. Očekávané velikosti transformačních kazet jsou shrnuty v tabulce č. 24 a ověření jejich vytvoření je na obrázku č. 37.

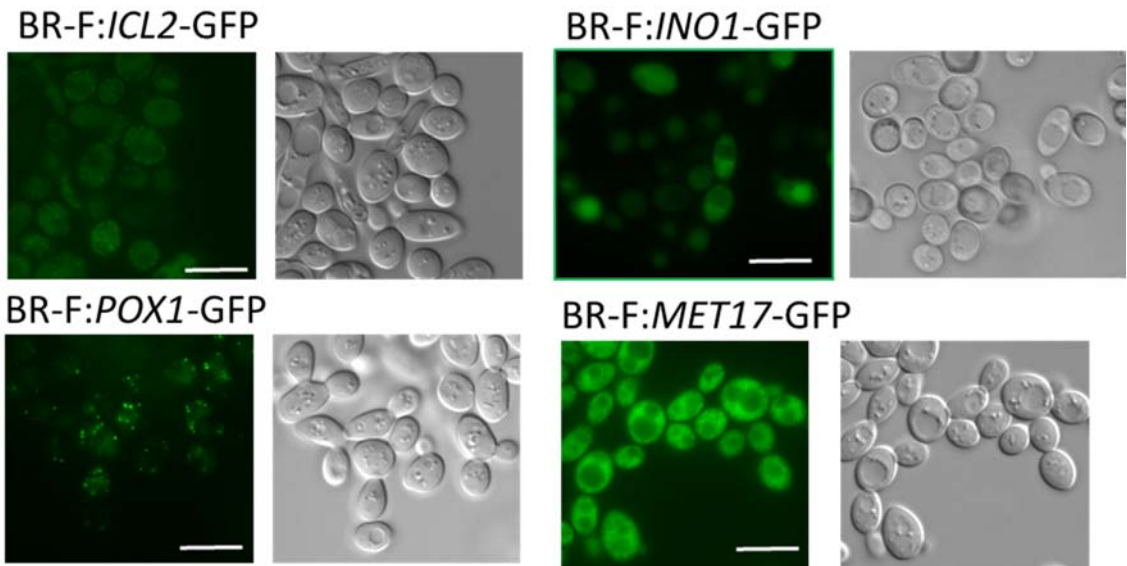
transformační kazeta	očekávaná velikost
<i>INO1</i>	2505bp
<i>ICL2</i>	2483bp
<i>POX1</i>	2505bp
<i>MET17</i>	2511bp

Tabulka č. 24: očekávaná velikost transformačních kazet pro GFP značení

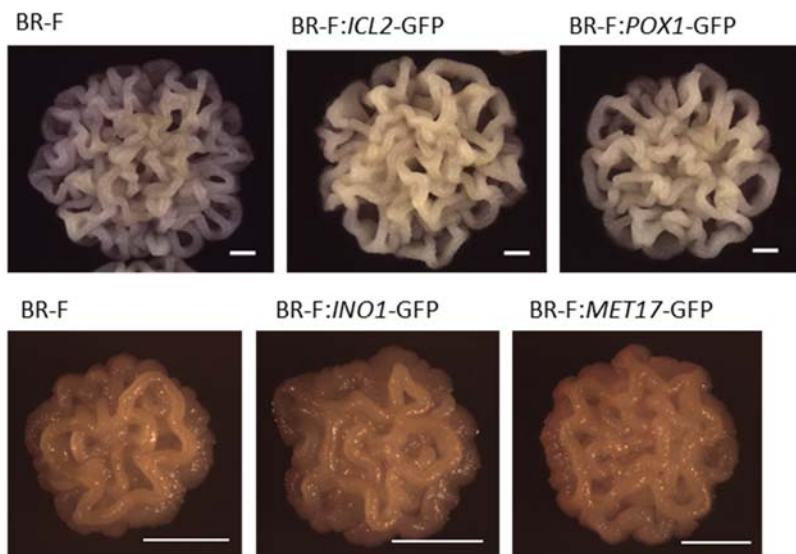


Obrázek č. 37: gelová elektroforéza, ověřování připravovaných kazet pro fúzi proteinů Pox1p, Met17p, Ino1p a Icl2p s GFP

U připravených kmenů byla kromě fluorescence fúzních proteinů (viz. obrázek č. 38) ověřována také morfologie jejich kolonií v porovnání s rodičovským kmenem (viz. obrázek č. 39), aby bylo možné vyloučit nežádoucí vliv vloženého GFP na vývoj morfologie kolonie. Správnost vložení kazety byla ověřena pomocí PCR (viz. obrázek č. 40) a následné sekvenace. Velikost očekávaných produktů colony PCR je uvedena v tabulce č. 25.



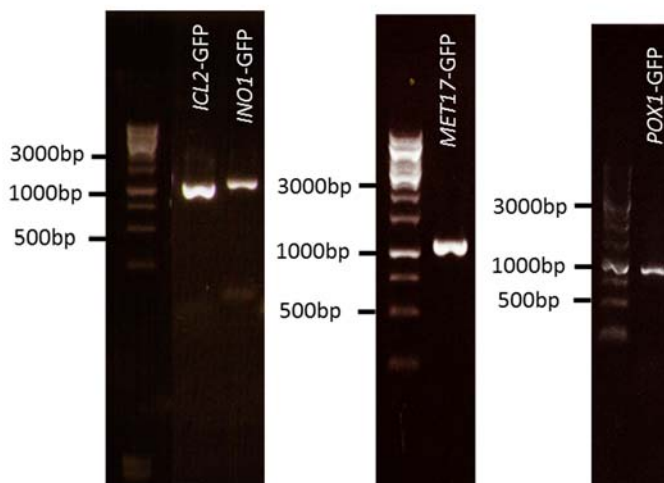
Obrázek č. 38: Fluorescence buněk kmenů odvozených od BR-F s označenými proteiny specifickými pro buněčné subtypy kolonií kmene BY4742; vizualizace buněk pomocí Nomarskeho kontrastu je uvedena pro srovnání, měřítko odpovídá 10 μ m



Obrázek č. 39: Porovnání morfologií kmenů s fluorescenčně značenými proteiny Icl2p, Pox1p, Ino1p a Met17p; měřítko odpovídá 1mm

gen	očekávaná velikost
ICL2-GFP	922bp
MET17-GFP	999bp
POX1-GFP	1187bp
INO1-GFP	969bp

Tabulka č. 25: očekávaná velikost produktů ověření vložení transformačních kazet



Obrázek č. 40: Ověření izolovaných kmenů pomocí PCR a následné elektroforézy

Byly připraveny a ověřeny kmeny BR-F:*INO1*-GFP, BR-F:*ICL2*-GFP, BR-F:*MET17*-GFP a BR-F:*POX1*-GFP. V této diplomové práci se podařilo vytvořit kmeny s fúzními proteiny, které mohou sloužit k dalšímu studiu diferenciaci kolonií divokého kmene BR-F.

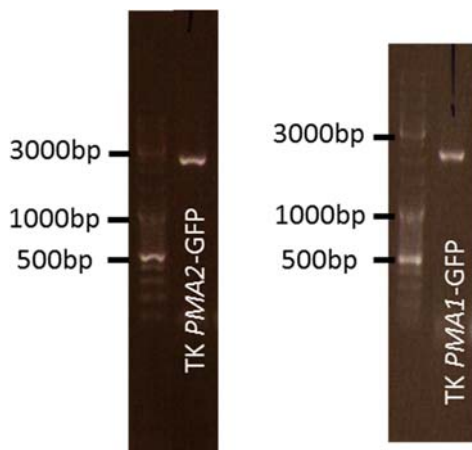
5.3.2 Značení proteinů Pma1p a Pma2p pomocí GFP

Další proteiny, jejichž produkce je odlišná v různých oblastech kolonií laboratorního kmene BY4742 jsou plasmatické H⁺ATPasy Pma1p (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b) a Pma2p (ústní sdělení prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.). V rámci této diplomové práce byly proto připraveny také kmeny BR-F s H⁺ATPasami Pma1p a Pma2p označenými GFP. Bližší popis těchto proteinů je v tabulce č. 26.

protein	lokalizace	funkce
Pma1p	plasmatická membrána	H ⁺ ATPasa Hlavní regulátor cytosolického pH v buňce
Pma2p	plasmatická membrána	H ⁺ ATPasa regulace cytosolického pH pumpováním protonů ven z buňky isoforma Pma1

Tabulka č. 26: Lokalizace a funkce proteinů Pma1p a Pma2p

Kmeny s fúzními proteiny Pma1p-GFP a Pma2p-GFP byly vytvořeny integrováním genu pro GFP do genomu. Templátem pro vytvoření transformačních kazet byl plasmid pKT127, který obsahuje gen pro γ EGFP a pro kanamycinovou rezistenci. PCR produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz. obrázek č. 41) a jejich očekávaná velikost je shrnuta v tabulce č. 27. Zelený fluorescenční protein byl připojen na C-konec značených proteinů.



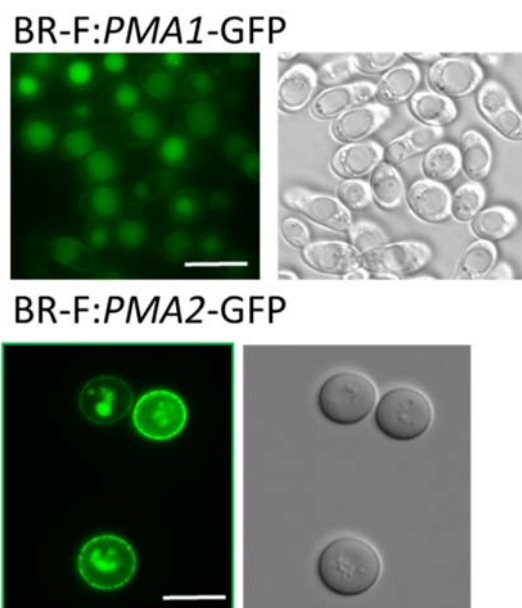
obrázek č. 41: výsledek PCR pro vytvoření transformačních kazet pro fúzi genů *PMA1* a *PMA2*.

transformační kazeta	očekávaná velikost
<i>PMA1-GFP</i>	2501bp
<i>PMA2-GFP</i>	2501bp

Tabulka č. 27: očekávaná velikost transformačních kazet

Signál obou fúzních proteinů je nejsilnější na plasmatické membráně. Na obrázku č. 42 je znázorněn fluorescenční signál konstruovaných kmenů, který se v případě Pma1p-GFP nachází ve větší míře ve vakuolách, jedná se totiž o starší buňky.

Obrázek č. 42: Fluorescenční signál Pma1p-GFP a Pma2p-GFP v izolovaných kmech odvozených od BR-F; vizualizace buněk pomocí Nomarskeho kontrastu je uvedena pro srovnání, měřítko odpovídá



Kontrola správného vložení byla ověřována pomocí izolace úseku DNA pomocí colony PCR (viz obr.č. 43) a následné sekvenace. Velikost očekávaných produktů byla u *PMA1*-GFP 697bp a u ověřování *PMA2*-GFP 1030bp. Dalším krokem ověřování bylo testování, zda nedochází k výrazným změnám morfologie oproti rodičovskému kmenu v souvislosti s produkcí fúzního proteinu (viz. obrázek č. 44).



Obrázek č. 43: PCR ověření kmenů BR-F:*PMA1*-GFP a BR-F:*PMA2*-GFP

Obrázek č. 44: Srovnání morfologie kolonií rodičovského kmene a kolonií kmenů s fúzními proteiny Pma2p-GFP a Pma1p-GFP. Měřítko odpovídá 1mm

V rámci této diplomové práce se podařilo připravit kmeny, které produkují fúzní proteiny Pma1p-GFP a Pma2p-GFP. Tyto kmeny jsou dále využitelné ke studiu lokalizace těchto proteinů v buňkách vyvíjejících se kolonií divokého kmene *S.cerevisiae*, BR-F.

5.3.3 Konstrukce kmenů pro studium autofagie

Pro studium autofagie byly vybrány proteiny Atg8p a Mae1p. Protein Mae1p je z důvodu jeho lokalizace na mitochondriích vhodným markerem pro studium mitofagie v kvasinkových koloniích, podobně jako Om45p (KANKI *et al.* 2009a). Atg8p je proteinem, který je používán mnoha výzkumnými skupinami pro studium autofagie, z důvodu jeho lokalizace na membráně autofagosomů (KIRISAKO *et al.* 1999; TUCKER *et al.* 2003; NAIR *et al.* 2012). U proteinu Atg8p je zapotřebí N-koncová fúze s GFP z důvodu modifikace C-konce proteinu v rámci jeho maturace (NAKATOGAWA *et al.* 2007). Charakteristika těchto proteinů je uvedena v tabulce č. 28.

protein	lokalizace	funkce	označení
Mae1p	mitochondrie	mitochondriální malický enzym katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát	mitofagie
Atg8p	autofagosom	je zapojen do expanze fagoforů a může zprostředkovávat fúzi membrán při jejich formaci	makroautofagie

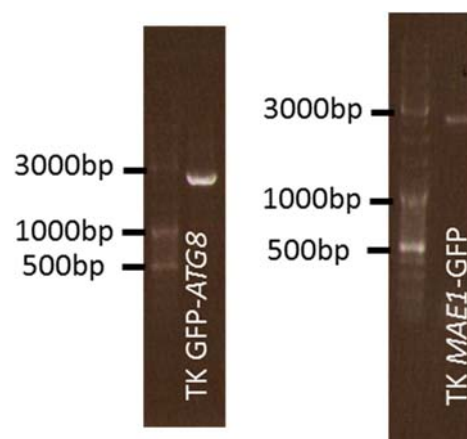
Tabulka č. 28: lokalizace, funkce a označení proteinů fúzovaných s GFP v rámci izolace kmenů pro studium autofagie

Pro tvorbu transformační kazety pro *MAE1* byl jako templát použit plasmid pKT127, který obsahuje kromě genu pro *yEGFP* také gen pro kanamycinovou rezistenci. Transformační kazeta pro N-koncovou fúzi *Atg8p* byla vytvořena z templátového plasmidu pOM40, který kromě genu pro *yEGFP* obsahuje také vyštěpitelný gen pro kanamycinovou rezistenci. Vytvořené kazety byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz. obrázek č.

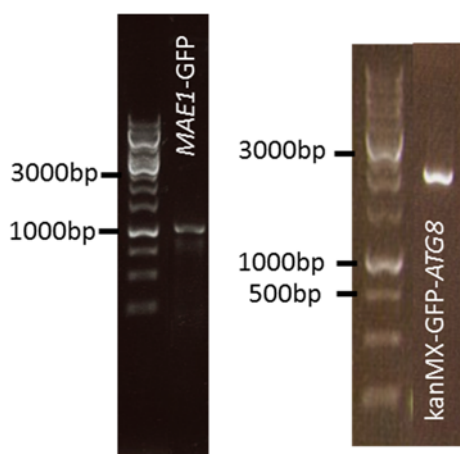
transformační kazeta	očekávaná velikost
GFP-ATG8	2464bp
MAE1-GFP	2479bp

45) a jejich očekávaná velikost je shrnuta v tabulce č. 29.

Tabulka č. 29: očekávaná velikost transformačních kazet

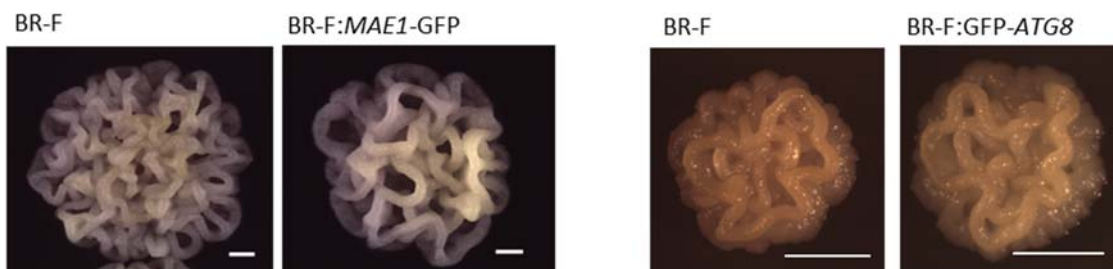


Obrázek č.45: transformační kazety pro konstrukci kmenů s GFP značenými proteiny *Atg8p* a *Mae1p*



Obrázek č. 46: PCR ověření kmene BR-F:*MAE1*-GFP a BR-F:GFP-kanMX-*ATG8*

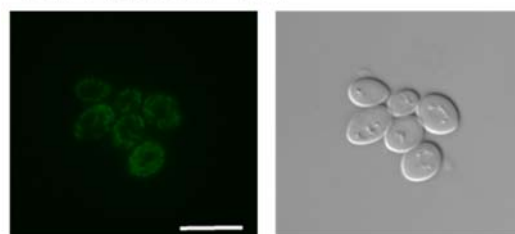
U vytvořených kmenů bylo pomocí PCR ověřováno správné vložení transformačních kazet (viz. obrázek č. 46). Velikost očekávaných produktů byla u *MAE1*-GFP 1034bp a u kanMX-GFP-*ATG8* 2536bp. Kromě správnosti vložení transformačních kazet do genomu byla také sledována morfologie, zda nedochází k výrazným změnám morfologie oproti rodičovskému kmeni v souvislosti s produkcí fúzního proteinu (viz. obrázek č. 47).



Obrázek č. 47: srovnání morfologie rodičovského kmene a kmenů s fúzními proteiny Mae1p-GFP a GFP-Atg8p

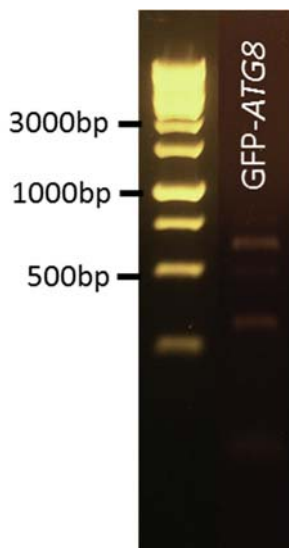
Mitochondriální lokalizace proteinu Mae1p-GFP je patrná z obrázku č. 48.

BR-F:MAE1-GFP



Obrázek č. 48: fluorescence fúzního proteinu Mae1p-GFP; vizualizace buněk pomocí Nomarskeho kontrastu je uvedena pro srovnání, měřítko

V případě N-koncové fúze proteinu Atg8p s GFP bylo zapotřebí vyštěpit kanamycinovou rezistenci pomocí Cre rekombinázy. Kanamycinová rezistence je obklopena LoxP místy, které Cre rekombináza rozpoznává a je tak schopna pomocí homologní rekombinace rezistenci vyštěpit (GAUSS *et al.* 2005). Kmeny s vloženou transformační kazetou kanMX- GFP-ATG8 byly transfekovány plasmidem pSH66, který obsahuje Cre rekombinázu s galaktosou ovládaným promotorem a také nourseothricinovou rezistenci. Po vyštěpení kanamycinové rezistence z genomu kvasinky byl opakován proces ověřování pomocí PCR (viz. obrázek č. 49). Velikost očekávaného produktu GFP-ATG8 byla 510kb.



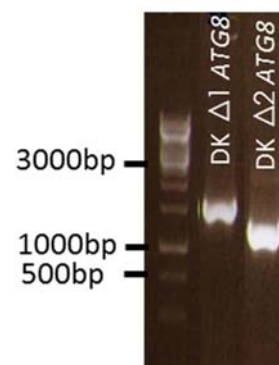
Ačkoliv se podařilo ověřit 12 kmenů s fúzním genem *GFP-ATG8* pomocí PCR, nepodařilo se u kmenů pozorovat viditelný signál zeleného fluorescenčního proteinu. Buňky kmene BR-F:*GFP-ATG8* byly kultivovány v tekutém médiu s nedostatkem dusíku (SD-N) a po intervalu 30 minut, 1hod a 1,5 hod a 3 hod byly pozorovány. Podle dostupné literatury je hladovění buněk na dusík po dobu 1 hodiny dostatečné pro vyvolání autofagie (ICHIMURA *et al.* 2004; NAIR *et al.* 2012), nicméně v rámci této diplomové práce se nepodařilo autofagii pozorovat.

Obrázek č. 49: PCR ověření kmene BR-F:*GFP-ATG8* po vyštěpení rezistence

Předmětem této diplomové práce byla také příprava delečních mutant $\Delta ATG8$ kmene BR-F. Vzhledem k tomu, že divoký kmen BR-F není haploidní jako většina laboratorních kmenů kvasinek (například BY4742), bylo zapotřebí provést dvě po sobě jdoucí delecce pro vytvoření deleční mutanty. Pro vytvoření deleční kazety pro první delecce byl použit plasmid pUG6, který obsahuje kanamycinovou rezistenci a pro druhou delecce byl použit plasmid pUG6-25, obsahující rezistenci k nourseothricinu. Výsledek tvorby delečních kazet pomocí PCR je znázorněn na obrázku č. 50 a očekávaná velikost kazet je uvedena v tabulce č. 30

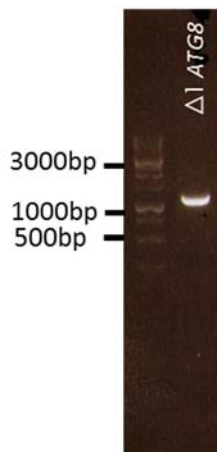
deleční kazeta	použitý plasmid	očekávaná velikost
DK $\Delta 1$ <i>ATG8</i>	pUG6	1703bp
DK $\Delta 2$ <i>ATG8</i>	pUG6-25	1340bp

Tabulka č. 30: očekávaná velikost delečních kazet pro $\Delta ATG8$



Obrázek č. 50: deleční kazety vytvořené pro delecce genu *ATG8*

Správné vložení první deleční kazety bylo ověřováno u deseti získaných klonů a podařilo se ověřit u tří z nich. Tyto tři kmeny byly dále transformovány druhou deleční kazetou. Ověření vložení první deleční kazety do genomu kvasinky je na obrázku č. 51 a očekávaná velikost produktu byla 774bp.



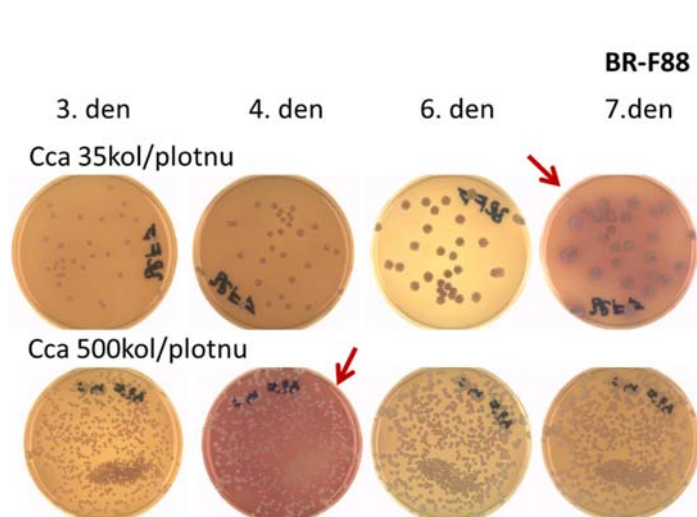
Obrázek č. 51: ověření vložení první deleční kazety pro delecí *ATG8*

Po vložení druhé deleční kazety do již jednonásobných $-/+ATG8$ mutantů bylo ověřováno správné vložení kazety. Byly transformovány tři klony s jednonásobnou delecí a z každého klonu po inserci druhé deleční kazety vznikly čtyři klony s předpokládanou $-/-ATG8$. Celkem tedy bylo vytvořeno 12 kmenů, které se ale nepodařilo ověřit pomocí PCR. Pro ověření byly použity primery pro ověření kanamycinové rezistence, použité při první delecí, a primery pro ověření nourseothricinové rezistence použité při druhé delecí a také interní primery pro ověření (ne)přítomnosti genu *ATG8* v genomu. Ověření vložené nourseothricinové rezistence se podařilo, nicméně kanamycinová rezistence nebyla prokázána ani při opakované kultivaci na selekčním médiu s kanamycinem. Při ověřování pomocí interních primerů byla nalezena kopie genu *ATG8* v genomu, tedy s největší pravděpodobností se kazeta pro druhou delecí začlenila do genomu v místě první delecce, protože při následném ověřování se nepodařilo prokázat přítomnost selekčního markeru první delecce. Pravděpodobně došlo ke dvěma úpravám jedné alely a druhá zůstala nepoškozená.

V rámci této diplomové práce se podařilo vytvořit kmen s $-/+ATG8$, ale připravit kmeny s dvojnásobnou delecí genu *ATG8* se nepodařilo.

5.4 Optimalizace metody pro studium amoniakové signalizace mikrokolonií kmene BR-F

V Laboratoři kvasinkových kolonií je zaveden protokol na měření produkce amoniaku u obřích kolonií laboratorního kmene *S.cerevisiae* BY4742. V rámci studia chování divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F bylo zapotřebí provést optimalizaci metody odběru amoniaku. V případě divokého kmene není optimální sledovat vývoj u obřích kolonií, protože dochází k výrazné domestikaci buněk v centrálních oblastech kolonií. Cílem proto bylo optimalizovat odběry z mikrokolonií kmene BR-F z hlediska počtu vyšetřovaných mikrokolonií a počtu odběrových misek s kyselinou citronovou (resp. Množství použité kyseliny citronové). Z důvodu jednak lepší standardizace postupu, jednak úspornosti média, byl odběrový systém standardizován pro mikrokolonie rostoucí na menších miskách (Ø6cm).

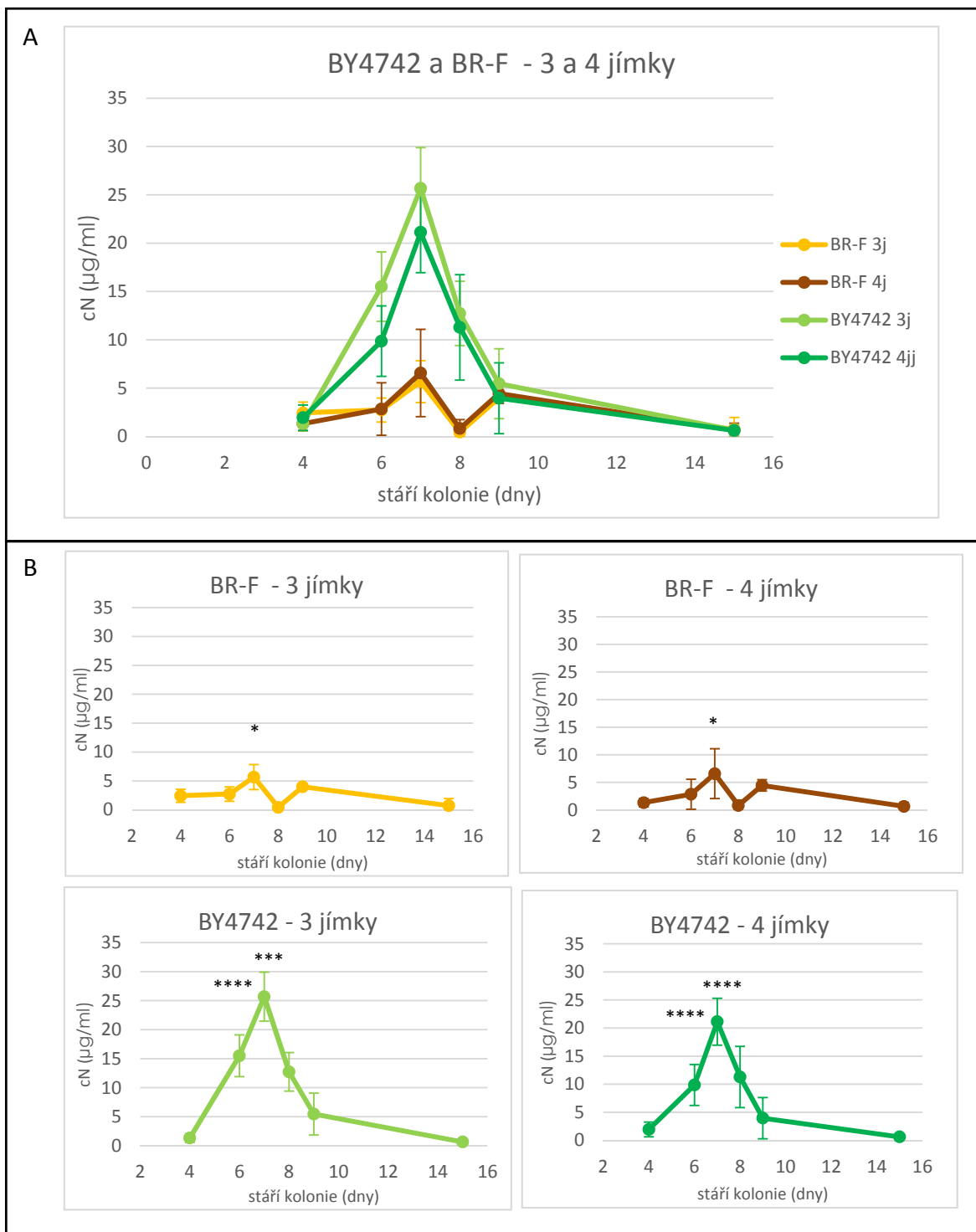


Obrázek č. 52: Počátek alkalizace média závisí na hustotě výsevu kolonií, červené šipky ukazují začátek alkalizace

Nejprve bylo zapotřebí zjistit optimální množství mikrokolonií tak, aby se na kultivačních miskách nacházelo stejné množství kolonií. Pokud je mikrokolonií na misce více, dochází k časnější alkalizaci média (viz. obrázek č. 52). Vzhledem k pozvolnějšímu nástupu alkalizace u řidšího výsevu, cca. 50 kolonií na plotnu, byl tento výsev zvolen pro další měření produkce NH_3 .

Po optimalizaci výsevu mikrokolonií byl optimalizován způsob odběru. Byly použity jímký s 250 μl 10% kyseliny citronové a v rámci několika opakování bylo zjišťováno, zda je vhodnější použití tří anebo čtyř jímek (viz. kapitola 3.2.4). Produkce NH_3 u mikrokolonií divokého kmene BR-F byla sledována paralelně s produkcí NH_3 mikrokoloniami laboratorního kmene BY4742.

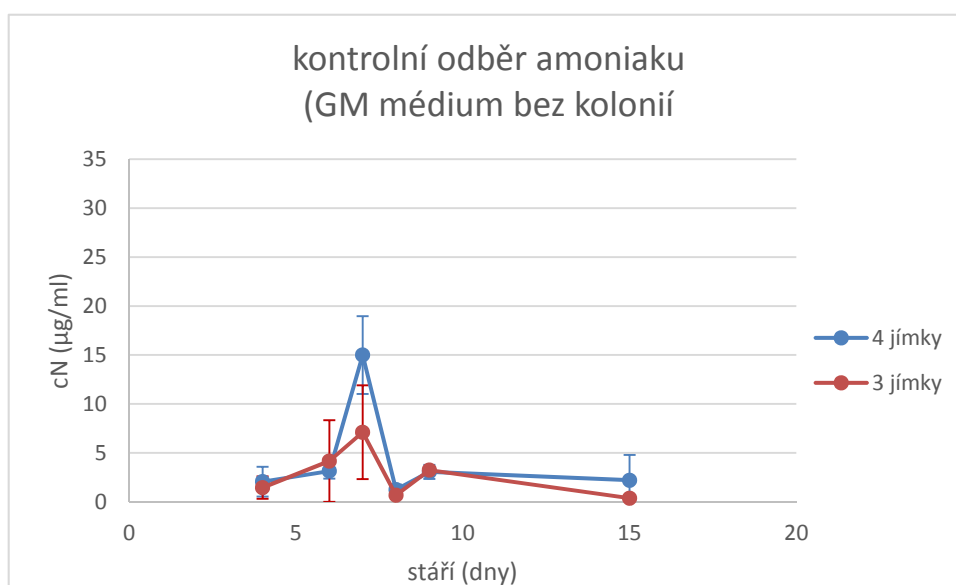
Pokus byl proveden ve čtyřech opakováních, pokaždé ve třech paralelách. V jednom experimentu je proto hodnota produkce NH_3 při jímání do 3 jímek průměrem z devíti hodnot (tři paralely, každá po třech jímkách). V případě jímání NH_3 do 4 jímek je výsledná hodnota průměrem dvanácti hodnot. Ve výsledných grafech (viz. obrázek č. 53), znázorňujících naměřenou produkci NH_3 , jsou uvedeny směrodatné odchylky. Dvouvýběrovým neparametrickým Mann-Whitney testem byl statisticky vyhodnocen nástup produkce amoniaku, vždy porovnáním s předchozí hodnotou. Kontrolní odběr byl uskutečněn třemi i čtyřmi jímkami naproti GM médiu bez kolonií.



Obrázek č. 53: (A) porovnání produkce NH₃ u kmenů BY4742 a BR-F pro optimalizaci odběru za použití 3 anebo 4 jímek s 10% kys. citronovou; (B) porovnání produkce NH₃ u jednotlivých uspořádání, statisticky významný nástup produkce NH₃ je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; **** p≤0,0001)

Produkce NH_3 u mikrokolonií kmene BR-F je výrazně nižší, než u mikrokolonií kmene BY4742 (obrázek č. 53), nicméně vrchol produkce se u obou kmenů shodně nachází v 7. dni kultivace. U kmene BY4742 byla průměrná produkce NH_3 za použití jímání třemi jímkami $25,6\mu\text{g/ml/den}$ a za použití čtyř jímek $21,1\mu\text{g/ml/den}$. U kmene BR-F byla průměrná produkce NH_3 nižší, při jímání 3 jímkami byla $5,6\mu\text{g/ml/den}$ a při jímání do 4 jímek $6,5\mu\text{g/ml/den}$. Nástup produkce amoniaku byl ve všech případech signifikantní (p hodnoty jsou v grafech znázorněny hvězdičkami). U mikrokolonií divokého kmene BR-F se objevila vyšší produkce NH_3 i 9. dne kultivace, kdy dosáhla v případě odběru 3 jímkami hodnoty $3,9\mu\text{g/ml/den}$ a v případě odběru 4 jímkami dosáhla produkce NH_3 hodnoty $4,5\mu\text{g/ml/den}$.

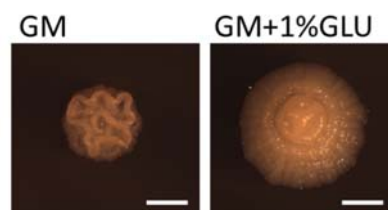
Kontrolní jímání amoniaku u GM média bez kolonií pro určení pozadí ukázalo vlastní průběh nárůstu zaznamenaného amoniaku a dosahovalo až $14\mu\text{g/ml/den}$ (viz. graf č. 1). Z tohoto důvodu nebylo naměřené pozadí odečteno od naměřených hodnot produkce amoniaku u mikrokolonií. Vysoké hodnoty mohly být způsobeny kultivací ve stejném termostatu jako alkalizující mikrokolonie BY4742 a BR-F, proto byla kontrola v následujících experimentech měřena v jiném termoboxu.



Graf č. 1: Kontrolní jímání amoniaku při použití 3 a 4 jímek.

Pro odběr NH_3 v dalších experimentech bylo jako optimálnější uspořádání zvoleno použití 3 jímek s kyselinou citronovou, které vykazovalo o něco vyšší (a tedy přesnější) naměřené hodnoty, než jímání NH_3 do 4 jímek u mikrokolonií kmene BY4742.

Ve dvou opakováních pokusu pro optimalizaci množství jímek na odběr amoniaku (data neuvedena) byla hodnota produkce NH_3 u kmene BR-F druhý den vyšší než 3. den. Vyšší produkce NH_3 ve 2. dni kultivace již naznačuje slabou alkalickou fázi, jejíž nástup se ale nepodařilo detekovat. Z důvodu časného nástupu alkalické fáze u kmene BR-F bylo testováno, zda zvýšení koncentrace živin v kultivačním médiu prodlouží první acidickou fázi a zpozdí nástup alkalické fáze tak, aby bylo možné změny studovat. V případě přidání 1% glukózy do GM média došlo k výrazným změnám morfologie kolonií (viz. obrázek č. 54). V případě zvýšení koncentrace ethanolu na 2% (GM médium obsahuje 1% etanol) k výrazným změnám morfologie nedošlo. Pro další optimalizaci odběrů NH_3 bylo tedy porovnáno médium s 1% etanolem s médiem obsahujícím 2% etanol a byla měřena produkce NH_3 .

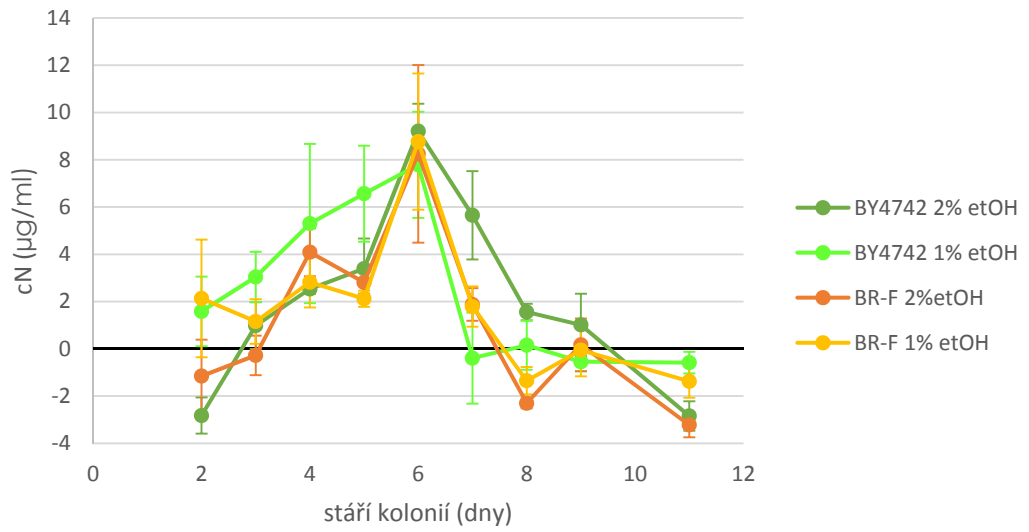


Obrázek č. 54: morfologie kolonií kmene BR-F v závislosti na médiu bez glukózy a s přidanou 1% glukózou (měřítko odpovídá 1mm)

Každá hodnota produkce NH_3 při jímání (viz. obrázek č. 55) je průměrem hodnot ze tří paralel (odběr do tří jímek – devět hodnot). Ve výsledných grafech, znázorňujících naměřenou produkci NH_3 , jsou uvedeny směrodatné odchylky. Nástup produkce amoniaku byl statisticky vyhodnocen Dvouvýběrovým neparametrickým Mann-Whitney testem, vždy porovnáním s předchozí hodnotou. Kontrolní odběr byl uskutečněn třemi jímkami naproti GM médiu bez kolonií.

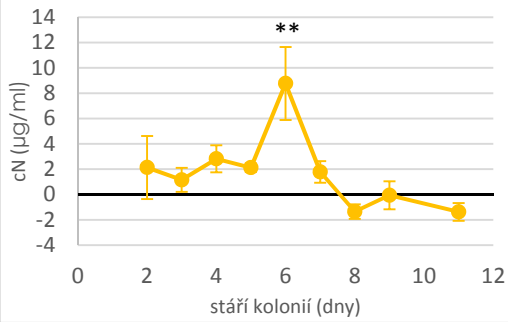
A

BR-F a BY4742 1% a 2% et OH v médiu

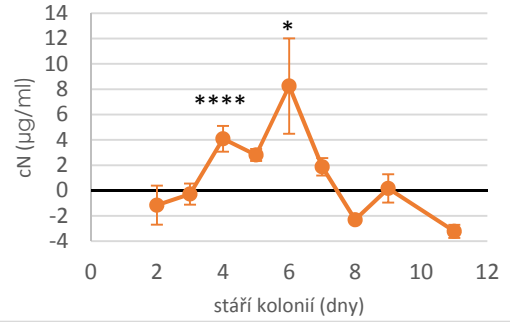


B

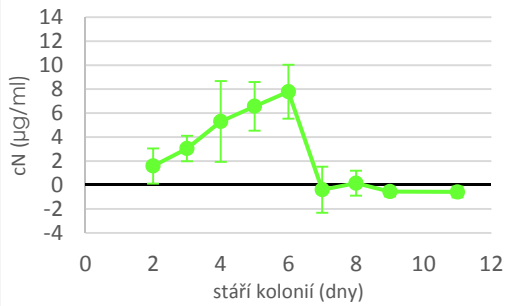
BR-F na 1% et OH v médiu



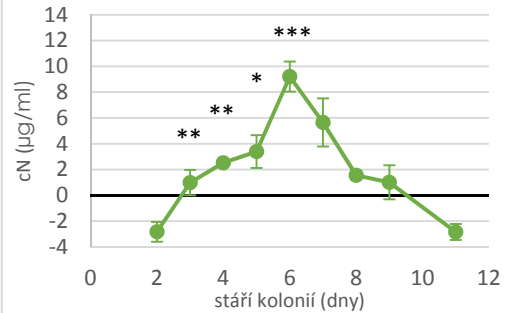
BR-F na 2% et OH v médiu

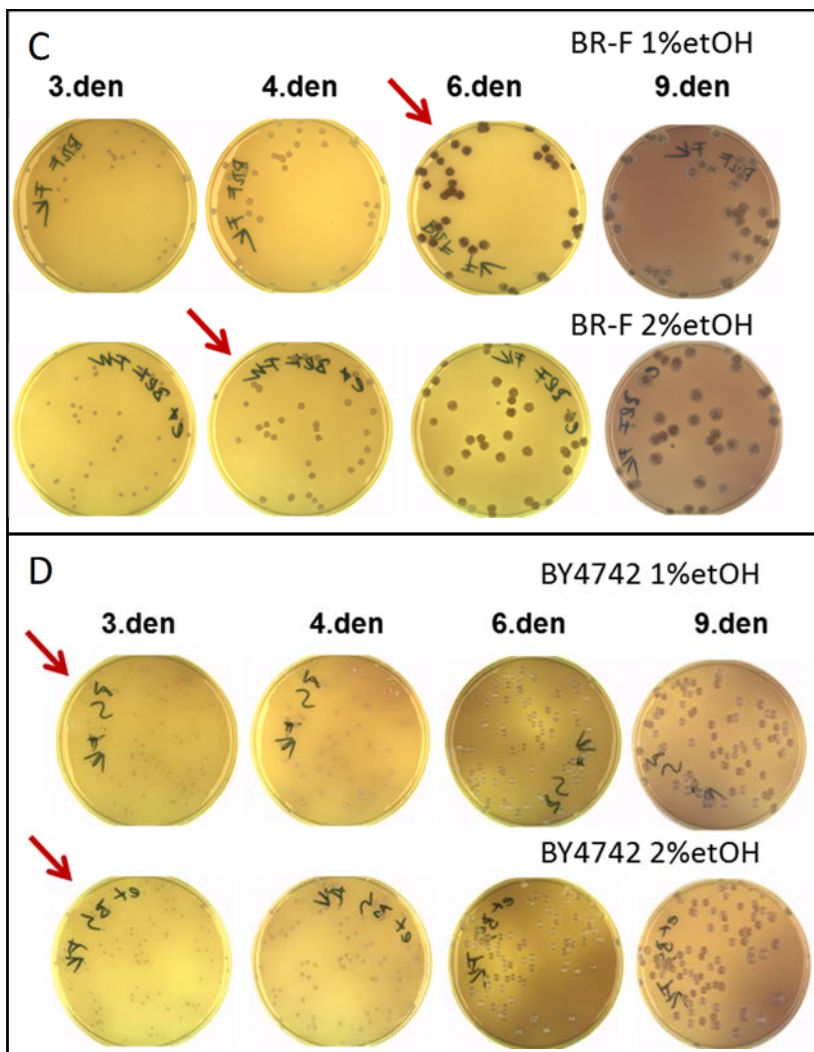


BY4742 na 1% et OH v médiu



BY4742 na 2% et OH v médiu





Obrázek č. 55:

(A) porovnání produkce NH_3 ve vývoji mikrokonií BY4742 a BR-F při kultivaci na médiích s 1% a s 2% etanolem; (B) porovnání produkce u jednotlivých uspořádání, statisticky významný nástup produkce NH_3 je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$);

(C) sledování alkalizace média u mikrokonií kmene BR-F; (D) sledování alkalizace u mikrokonií kmene BY4742, začátek alkalizace je označen červenou šipkou.

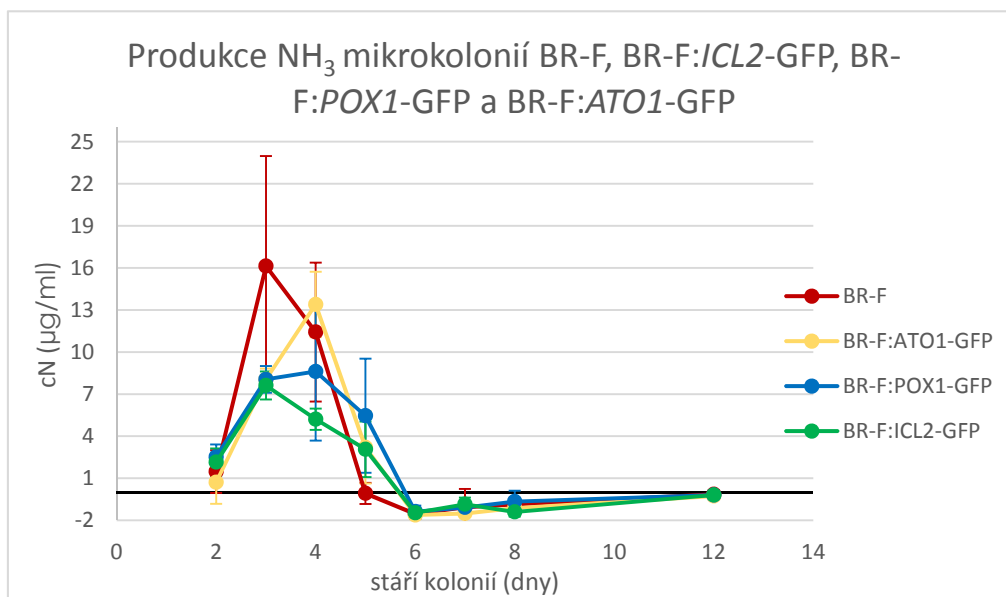
Nejvyšší produkce NH_3 byla naměřena na obou použitých médiích u obou kmenů 6. den kultivace mikrokonií (viz obrázek č. 55). Záporné hodnoty jsou způsobeny odečtením pozadí, které bylo měřeno na GM kulturačním médiu bez kolonií. Při kultivaci na GM médiu s 1% etanolem byla po odečtení pozadí nejvyšší hodnota produkce NH_3 u kmene BR-F $8,7 \mu\text{g/ml/den}$ a u kmene BY4742 byla nejvyšší hodnota $7,8 \mu\text{g/ml/den}$. V případě kultivace na médiu s 2% etanolem byla nejvyšší hodnota u kmene BR-F $8,2 \mu\text{g/ml/den}$ a u kmene BY4742 dosáhla produkce $9,2 \mu\text{g/ml/den}$. Nástup produkce NH_3 v šestém dni kultivace byl ve většině případů signifikantní (p hodnoty jsou v grafech znázorněny hvězdičkami), pouze v případě mikrokonií kmene BY4742 při kultivaci na GM médiu s 1% etanolem nebyl nástup alkalizace v šestém dni kultivace signifikantní.

K posunutí vizuální alkalizace média při kultivaci mikrokonií BR-F na GM médiu s 2% etanolem sice došlo, ale vliv koncentrace ethanolu posunutí na časování nejvyšší produkce NH_3 nebyl prokázán. Ačkoliv nejvyšší hodnoty produkce NH_3 byly u kmene BY4742 při kultivaci na médiu s více živinami vyšší, než při kultivaci na GM médiu s 1%

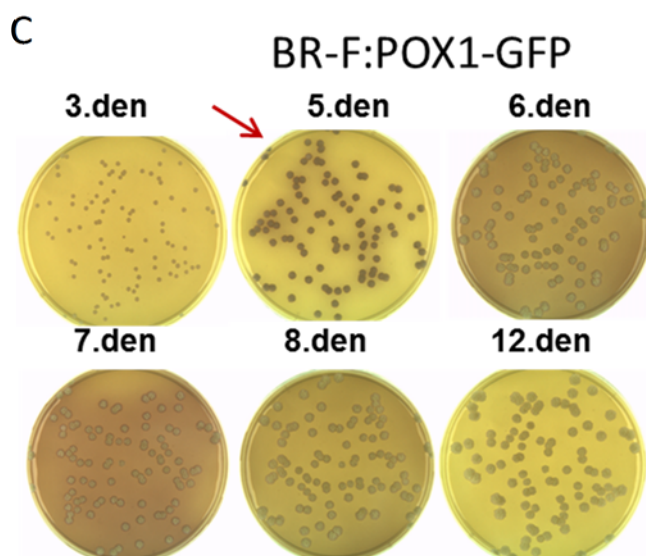
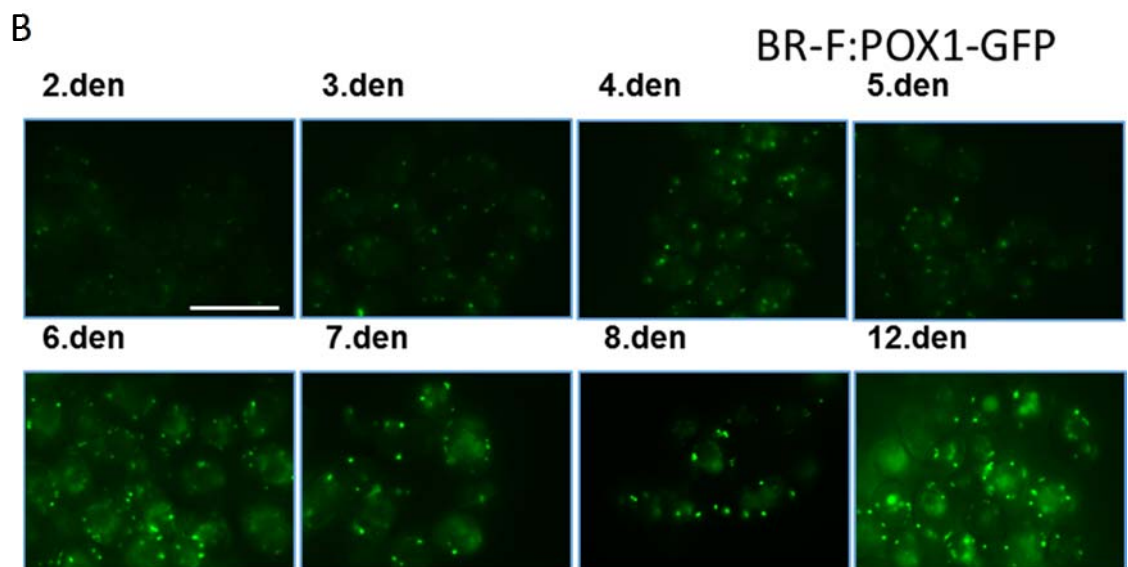
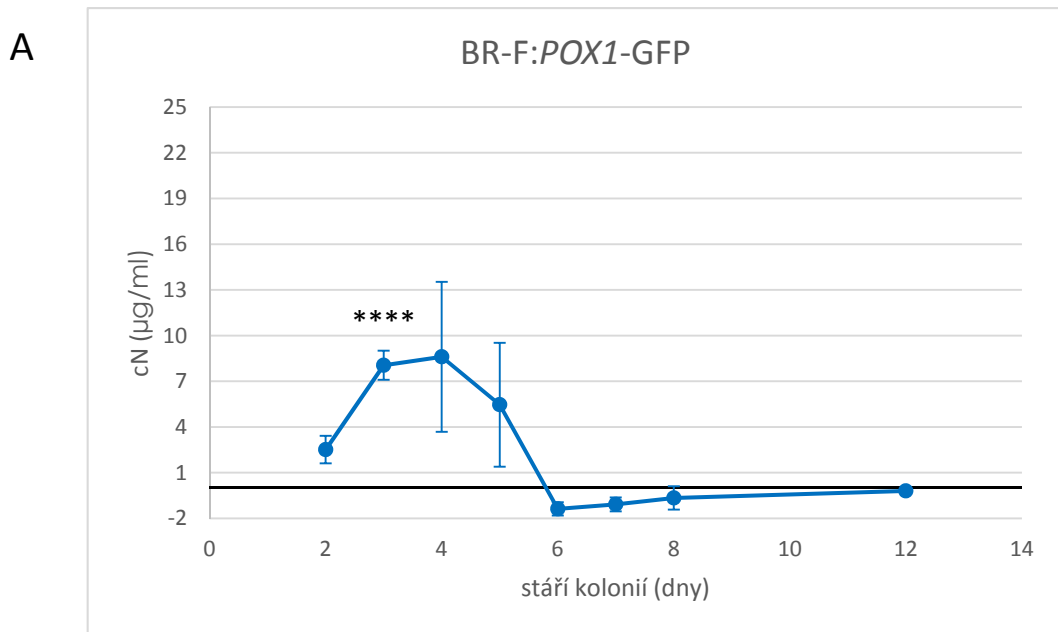
etanolu, u mikrokolonií kmene BR-F to bylo naopak. Z toho důvodu byla produkce amoniaku dále studována při kultivaci na GM médiu s 1% etanolem.

Oproti hladinám produkce NH_3 v případě pokusů optimalizujících počet jímek pro odběr, byly v tomto případě nejvyšší hodnoty produkce NH_3 u kmene BR-F téměř dvojnásobné a naopak u kmene BY4742 došlo k jejich snížení. Nejstabilnější uspořádání systému v rámci opakování bylo použití tří jímek k měření produkce NH_3 u kolonií kultivovaných na GM médiu s 1% etanolem.

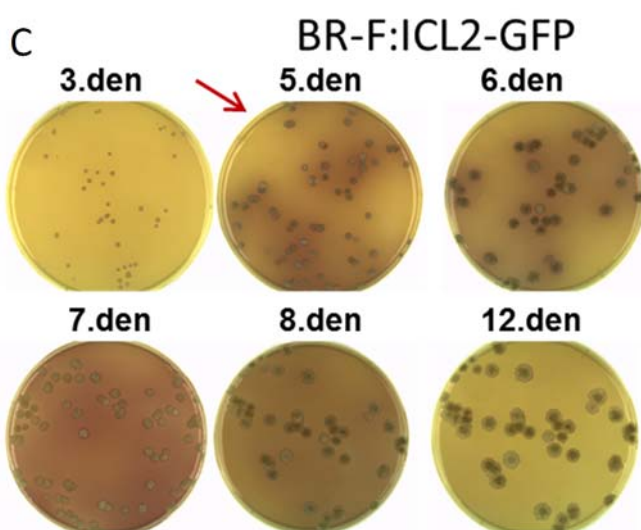
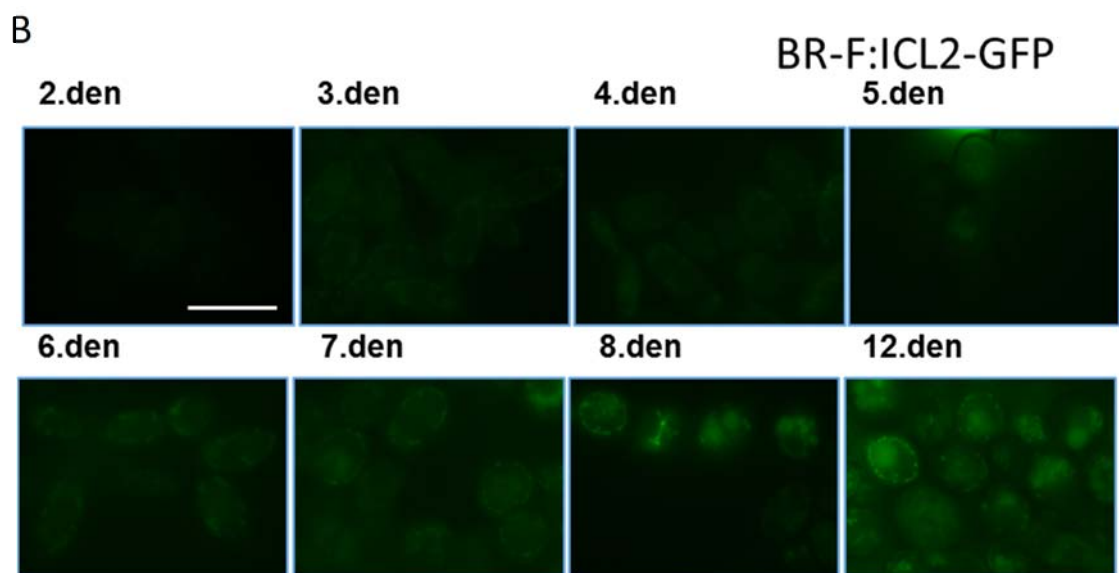
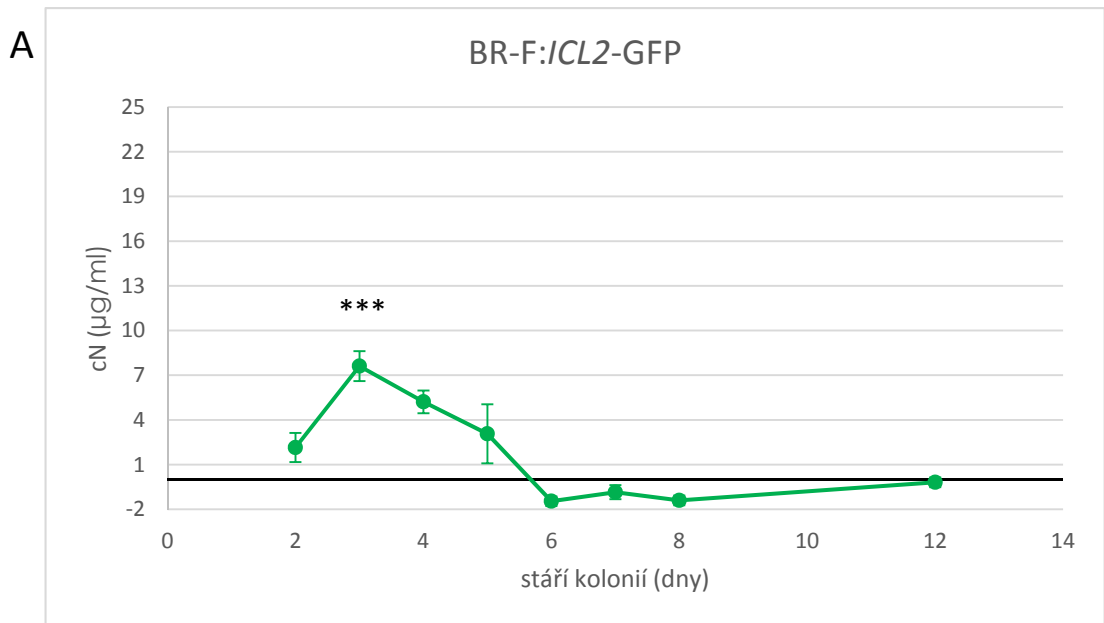
Metoda pro odběr amoniaku u mikrokolonií divokého kmene *S.cerevisiae* BR-F byla optimalizována. Tímto nově zavedeným způsobem detekce byla následně zjišťována produkce NH_3 u kmenů produkujících fúzní proteiny Icl2p-GFP, Pox1p-GFP a Ato1p-GFP, (viz. graf č. 2) s cílem zjistit, zda fúze ovlivňuje průběh produkce amoniaku v průběhu kultivace mikrokolonií, což by mohlo svědčit o nefunkčnosti fúzního proteinu. Kmeny BR-F:*ICL2*-GFP a BR-F:*POX1*-GFP byly vytvořeny pro potřeby této diplomové práce. Kmen BR-F:*ATO1*-GFP pochází se sbírek Laboratoře kvasinkových kolonií a jeho autorem je Mgr. Vratislav Šťovíček, Ph.D. Paralelně byla sledována fluorescence jednotlivých fúzních proteinů v mikrokoloniích pomocí fluorescenční mikroskopie. Sledování fluorescence fúzních proteinů probíhalo na mikrokoloniích kultivovaných paralelně s mikrokoloniemi, určenými pro odběr amoniaku. Alkalizace média byla sledována u všech kultivačních misek použitých v pokusu i na paralelně kultivovaných miskách.



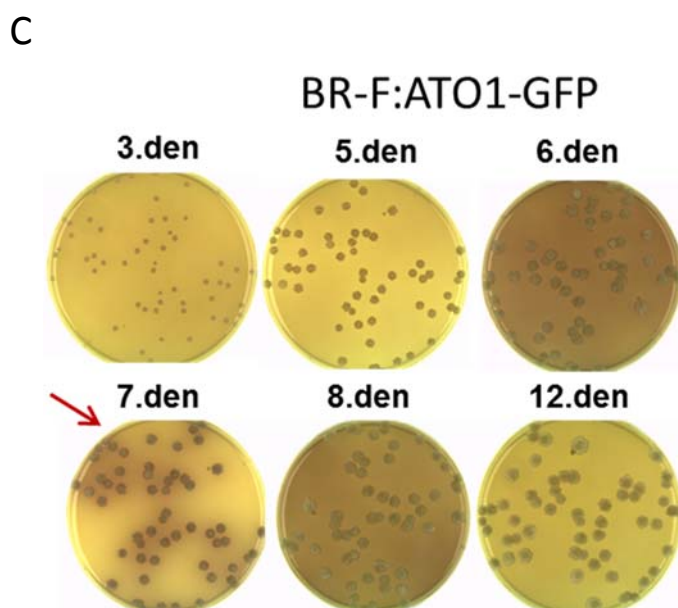
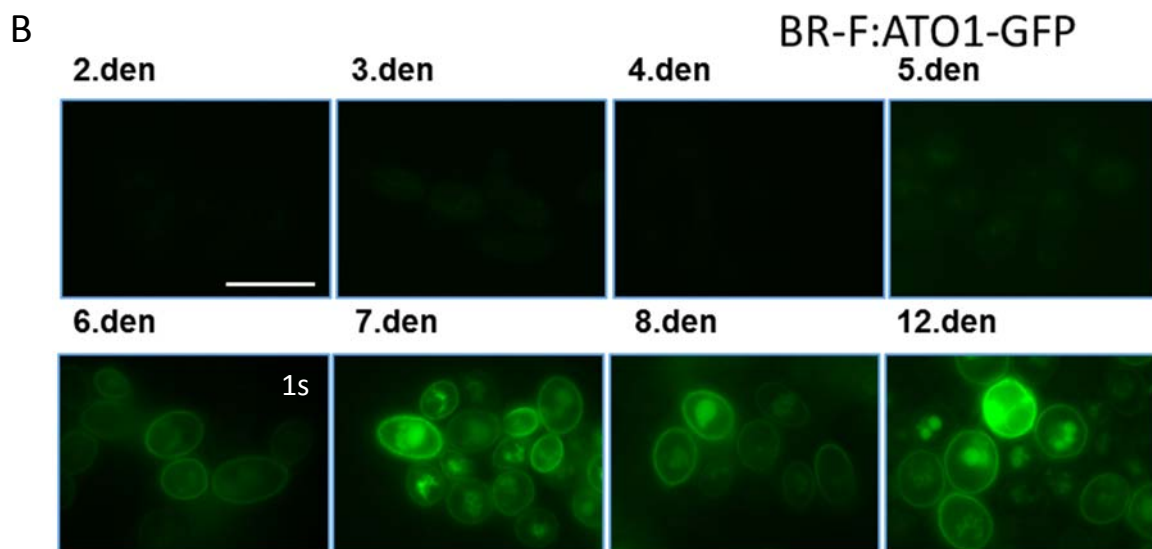
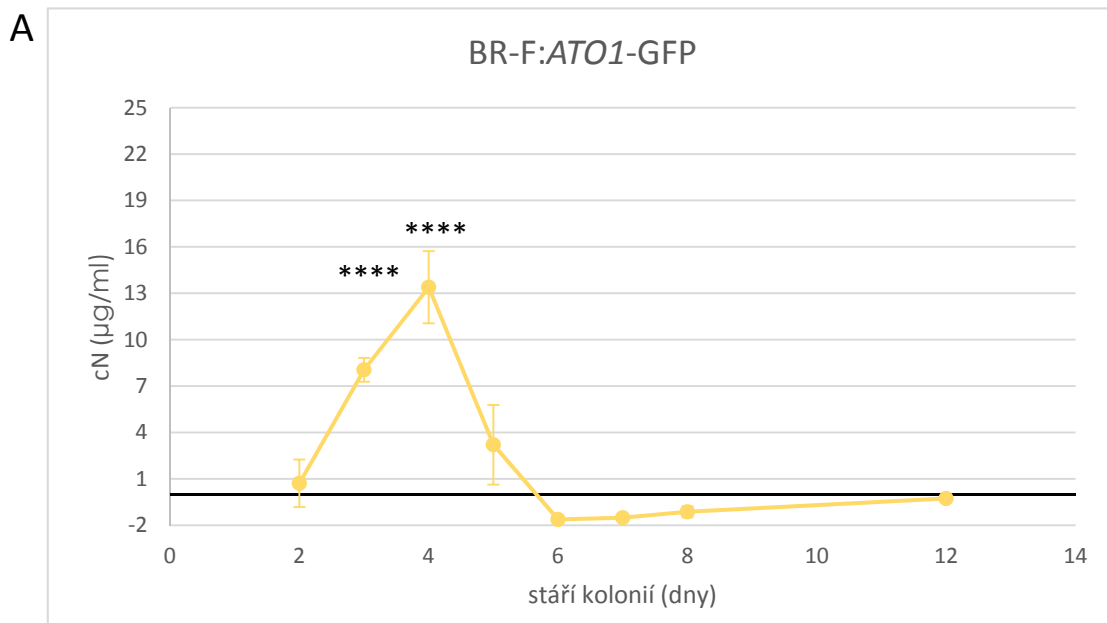
Graf č. 2: sledování produkce NH_3 kolonií kmenů odvozených od BR-F s proteiny Pox1p, Icl1p a Ato1p značenými GFP v porovnání s rodičovským kmenem; chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



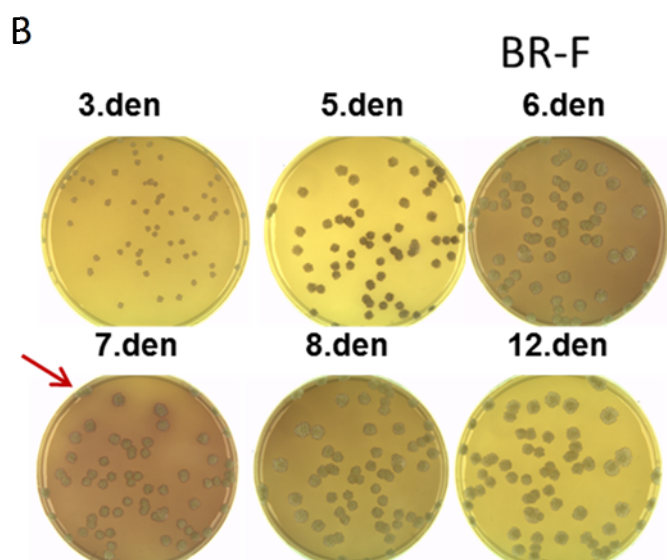
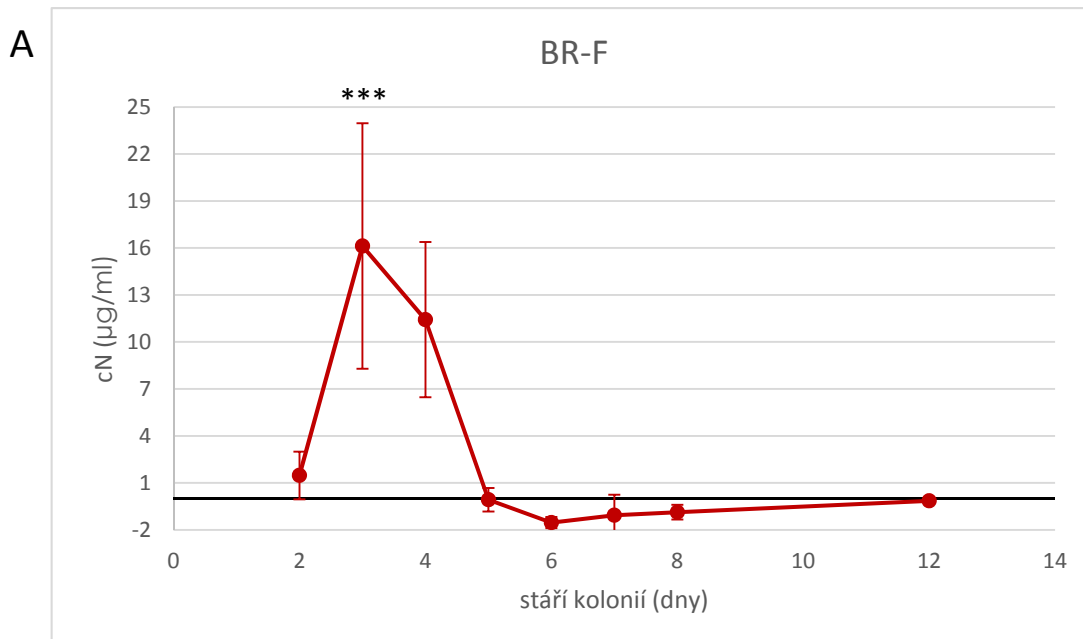
Obrázek č. 56: Sledování mikrokolonií kmene BR-F:POX1-GFP (A) produkce NH₃ mikrokoloniemi, statisticky významný nástup produkce NH₃ je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001); (B) fluorescence buněk ve vývoji kolonií, měřítko odpovídá 10µm, doba expozice byla 3s; (C) alkalizace média, nástup alkalizace je označen červenou šipkou;



Obrázek č. 57: Sledování mikrokolonií kmene BR-F:*ICL2*-GFP (A) produkce NH₃ mikrokoloniemi, statisticky významný nástup produkce NH₃ je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001); (B) fluorescence buněk ve vývoji mikrokolonií, měřítko odpovídá 10µm, doba expozice byla 3s; (C) alkalizace média na paralelně kultivovaných miskách, nástup alkalizace je označen červenou šipkou;



Obrázek č. 58: Sledování mikrokolonií kmene BR-F:ATO1-GFP (A) produkce NH₃ mikrokoloniemi, statisticky významný nástup produkce NH₃ je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001); (B) fluorescence buněk ve vývoji mikrokolonií, měřítko odpovídá 10µm, doba expozice byla 3s, pokud není uvedeno jinak; (C) alkalizace média na paralelně kultivovaných miskách, nástup alkalizace je označen červenou šipkou;



Obrázek č. 59: Sledování mikrokolonií kmene BR-F (A) produkce NH₃ mikrokoloniemi; statisticky významný nástup produkce NH₃ je vyznačen podle p hodnoty hvězdičkami (* p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001); (B) alkalizace média na paralelně kultivovaných miskách, nástup alkalizace je označen červenou šipkou;

Každá hodnota produkce NH₃ při jímání (viz. graf č. 2) je průměrem hodnot ze tří paralel (odběr do tří jímek – devět hodnot). Ve výsledných grafech, znázorňujících naměřenou produkci NH₃, jsou uvedeny směrodatné odchylky. Nástup produkce amoniaku byl statisticky vyhodnocen Dvouvýběrovým neparametrickým Mann-Whitney testem, vždy porovnáním s předchozí hodnotou. Kontrolní odběr byl uskutečněn třemi jímkami naproti GM médiu bez kolonií.

Nejvyšší produkce NH₃ bylo u mikrokolonií rodičovského kmene BR-F a kmene BR-F:*ICL2*-GFP dosaženo již 3. den kultivace (viz. graf č. 2). U mikrokolonií rodičovského kmene BR-F byla nejvyšší hodnota produkce NH₃ u 16,1µg/ml/den (viz. obrázek č. 59). Mikrokolonie kmenů BR-F:*ATO1*-GFP a BR-F:*POX1*-GFP dosáhly nejvyšší produkce NH₃ u 0 den později. U všech kmenů byl nástup produkce NH₃ signifikantní (p hodnoty jsou v grafech znázorněny hvězdičkami).

Hodnota produkce NH_3 u kolonií kmene BR-F:*POX1*-GFP byla 4. den 8,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (viz. obrázek č. 56). Sledování fluorescence ukázalo od 4. dne kultivace konstantní silný fluorescenční signál. Peroxisomy byly viditelné v podobě jasných zelených teček. Viditelnost fluorescenčního signálu se po nástupu produkce NH_3 zvýšila.

Produkce NH_3 mikrokoloniemi kmene BR-F:*ICL2*-GFP (viz. obrázek č. 57) 3. den kultivace byla 7,6 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{den}$, tedy v porovnání s rodičovským kmenem nízká. Pozorovaná fluorescence byla v prvních 5 dnech kultivace velmi nízká. Šestý den se objevila velmi slabá zelená fluorescence a s postupujícím vývojem od sedmého dne zůstávala na podobné hladině.

Nejvyšší hodnota produkce NH_3 u kolonií kmene BR-F:*ATO1*-GFP (viz. obrázek č. 58) byla 13,3 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{den}$, tedy podobná jako nejvyšší hodnota naměřená u rodičovského kmene BR-F. Od 6. dne kultivace se objevil velmi silný signál GFP na buněčné membráně. V dalších dnech měření, 7., 8. a 12. den, byl zelený fluorescenční signál silný a jasně viditelný. Slabší signál se vyskytoval také ve vakuolách.

Měření produkce NH_3 u kmenů s fúzními proteiny Pox1p-GFP, Ato1p-GFP a Icl2p-GFP proběhlo z časových důvodů pouze jednou, pro přesnější určení produkce NH_3 u těchto kmenů bude zapotřebí provést další opakování a také případně doplnění informací detekcí produkce fúzních proteinů pomocí Western blott analýzy.

Podářilo se zavést nový systém pro měření produkce NH_3 u mikrokolonií kvasinek *S.cerevisiae*. Tento systém byl použit pro stanovení produkce NH_3 mikrokoloniemi u laboratorního kmene BY4742 a divokého kmene BR-F a odvozených kmenů BR-F:*ICL2*-GFP, BR-F:*POX1*-GFP a BR-F:*ATO1*-GFP.

6 Diskuse

Kvasinky *S.cerevisiae* tvoří mnohobuněčná společenstva nazývaná kolonie. Kolonie může vzniknout z jediné buňky, pak se nazývá mikrokolonie, nebo je základem kapka buněčné suspenze obsahující větší množství buněk ze kterých vzniká obří kolonie. V rámci této diplomové práce byla zkoumána produkce mitochondriálních proteinů v obřích koloniích laboratorního kmene *S.cerevisiae* BY4742 a produkce amoniaku u mikrokolonií divokého kmene BR-F. U kolonií divokého kmene byla sledována také produkce markerových proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie s paralelním sledováním produkce amoniaku.

6.1 Mitochondriální proteiny kmene BY4742

V průběhu vývoje kolonie buňky *S.cerevisiae* diferencují do specializovaných buněčných subpopulací. Velké rozdíly v produkci proteinů byly zaznamenány mezi středem a okrajem kolonie. Jedním z těchto proteinů byl Icl2p, který byl výrazněji přítomen na okraji kolonie. Výraznější přítomnost Icl2p v buňkách okraje kolonie byla zaznamenána v alkalické fázi a tento profil se zachoval i v pozdní druhé acidické fázi vývoje kolonií (VÁCHOVÁ *et al.* 2009b). Sledování hladiny proteinu Icl2p v rámci této diplomové práce potvrdilo jeho zvýšení v pozdějších stádiích vývoje, konkrétně při nástupu alkalické fáze. Vysoká produkce byla zaznamenána i v následující acidické fázi. Nicméně hladina proteinu Icl2p v alkalické fázi byla vysoká ve vnitřních i vnějších buňkách kolonií, tedy nepodařilo se potvrdit lokalizaci tohoto proteinu preferenčně v buňkách okraje kolonie.

Sledování hladiny fúzního proteinu Om45p-GFP ukázalo jeho dynamickou produkci i degradaci v průběhu vývoje obřích kolonií. V průběhu vývoje kolonií se objevil proteinový signál, který byl o 4kDa větší, než sledovaný Om45p a byl detekovatelný anti-GFP protilátkou. Přítomnost tohoto "produktu" může naznačovat interakci Om45p s jinými proteiny, nebo jeho modifikaci.

Podle databáze SGD (www.yeastgenome.org) interaguje Om45p s 17 proteiny, například s Mgr1p (podjednotka mitochondriální i-AAA proteasy), Mic10p (konzervovaná součást MitOS komplexu, který je ve vnitřní mitochondriální membráně a zajišťuje tvorbu krist), Mic12p (také součást MitOS komplexu), Mic60p (součást MitOS), Om14p (integrální protein vnější membrány), Por1p (napětím ovládaný kanál vnější membrány, zodpovědný za udržení osmotické stability mitochondrií), Tom22p (součást TOM komplexu, zodpovědného za import do mitochondrie) a Tom70p (součást TOM komplexu). Velikosti hledaného potenciálního interakčního partnera, tedy přibližně 4kDa, žádný z dosud známých proteinů, interagujících s Om45p, neodpovídá. Nicméně nejbliže je protein Mic10p, jehož velikost odpovídá 10,4kDa, anebo Mic12p, jehož velikost odpovídá 12kDa. Tato interakce nebyla dosud popsána, ale jelikož se jedná o proteiny účastnící se uspořádání vnitřní mitochondriální membrány do krist, je možné spekulovat, zda tato

interakce v buňkách vnějšího okraje kolonie souvisí s rozdílnou morfologií mitochondrií v U a L buňkách. V U buňkách se nacházejí zvětšené mitochondrie s málo vyvinutými kristami a naopak v L buňkách malé mitochondrie s dobře vyvinutými kristami (ČÁP *et al.* 2012). Dosud zjištěné interakce proteinu Om45p byly odhaleny pomocí metod s velkým výtěžkem, v anglické literatuře nazývané “high throughput”, a často jsou výsledkem pouze jedné publikace. Ve více případech byla prokázána interakce pouze u Tom70p, Mic60p a Om14p. Interakce Om45p s dalšími složkami MitOS komplexu, a také s proteiny Por1p a Tom70p, je významná pro architekturu a uspořádání mitochondriálních membrán (HOPPINS *et al.* 2011).

V buňkách okraje kolonie byl od 9. dne přítomen pouze tento větší protein a přítomnost proteinu odpovídajícího velikosti Om45p-GFP nebyla zaznamenána. Od devátého dne vývoje kolonií také nebyl detekován volný GFP, tedy je možné, že v pozdějších stádiích vývoje v buňkách okraje kolonie převládne interakce Om45p s neznámým proteinem a v tomto uspořádání nedochází k jeho degradaci.

V buňkách středu kolonie je možné pozorovat volný GFP, což naznačuje degradaci fúzního proteinu Om45p-GFP. Vzhledem k tomu, že Om45p-GFP je běžně používaným markerem mitofagie (KANKI *et al.* 2009a), může přítomnost volného GFP v buňkách středu kolonie naznačovat probíhající mitofagii. Ve vývoji obřích kolonií kmene BY4742 bylo prokázáno, že starší buňky se nacházejí spíše ve středu kolonie a mezi nimi se nachází také buňky s určitými znaky programované buněčné smrti (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005). Subtypy buněk, které vznikají při vývoji kvasinkových kolonií, spolu navzájem komunikují a také si předávají živiny a další látky. Spodní buňky při vertikální stratifikaci kolonií jsou schopny v pozdějších fázích vývoje zásobovat svrchní (U) buňky živinami (ČÁP *et al.* 2012). Možná role mitofagie v buňkách středu kolonie ještě čeká na své odhalení.

Hladina mitochondriálního proteinu Cyc2p, který se podílí na spojení hemu s apocytochromem c_1 , byla nejvyšší druhý den kultivace, zatímco v dalších sledovaných dnech vývoje převládala forma volného GFP, naznačující degradaci fúzního proteinu Cyc2p-GFP. Je možné, že C-terminální fúze s GFP tomuto proteinu v pozdějších fázích vývoje kolonií znesnadňuje funkci, protože na svém C konci má navázáno FAD, které se podílí na redukci hemu (BERNARD *et al.* 2005).

6.2 Konstrukce kmene se změnami *ATG8*

Při značení proteinu Atg8p je nutné vzít v potaz, že jeho C-konec prochází při maturaci štěpením pomocí proteinu Atg4p, tedy navázání GFP na C-konec nemá smysl. Je tedy zapotřebí využít protokol umožňující vytvořit fúzní gen, jehož produkt má GFP na svém N konci (GAUSS *et al.* 2005). V případě tzv. N-koncové fúze probíhá konstrukce kmenů ve dvou po sobě následujících transformačních krocích. Nejdříve je do kvasinky vložena DNA kazeta s geny pro GFP a selekční marker a poté následuje transfekce takto modifikované

kvasinky plasmidem kódujícím Cre rekombinázu, která je schopna vyštěpit nežádoucí rezistenci z genomu kvasinky.

Přestože byl v rámci této diplomové práce vytvořen kmen s genem *GFP-ATG8*, nepodařilo se v buňkách vizualizovat fúzní protein GFP-Atg8p. Očekávan byl viditelný fluorescenční signál v podobě velkých teček v buňkách, za podmínek hladovění buněk na dusík. Při dostatku živin má být cytoplazma vyplněna velmi malými roztroušenými tečkami (KIRISAKO *et al.* 1999).

Vzhledem k tomu, že protein Atg8p je malý protein o velikosti 13kDa a velikost GFP je 24kDa, nabízí se otázka, zda takto modifikovaný protein bude schopný v buňce normálně fungovat. Nicméně jedná se o široce využívaný systém pro sledování autofagosomů (SHINTANI a KLIONSKY 2004a; KANKI *et al.* 2009c; KRICK *et al.* 2010; KAUFMANN *et al.* 2014; PAPINSKI *et al.* 2014), a proto by kvasinky *S.cerevisiae* měly být schopny zabudovat modifikovaný GFP-Atg8p do autofagosomů.

Značení proteinu Atg8p je klasickým nástrojem pro pozorování autofagie. Většina studií sledujících autofagosomy byla prováděna s kmeny *S.cerevisiae*, které jsou auxotrofní nejméně na dvě aminokyseliny (Geng *et al.*, 2008; Kaufmann *et al.*, 2014; Kirisako *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2007; *etc.*). Laboratorní kmeny kvasinek, které jsou běžně využívány pro molekulárně biologické studie, jsou haploidní a také jsou auxotrofní na několik aminokyselin. V případě kmene BR-F, který haploidní není, tedy může dojít k produkci Atg8p z genu na druhé alele, která není značená GFP. Je také možné, že divoké kmeny kvasinek mají ve svém genomu další kopie genu *ATG8*, bylo by tedy zapotřebí nejdříve provést několikanásobnou delecí a zjištění počtu kopií genu v genomu.

V případě delecí u diploidních kmenů může docházet k tomu, že se deleční kazeta pro delecí druhé alely vloží na stejné místo, jako první deleční kazeta. Tak zůstane druhá alela genu nezměněná, což je přesně případ neúspěšné dvojnásobné delecce genu *ATG8* v rámci této diplomové práce. Jelikož při ověřování vložení druhé deleční kazety se nepodařilo prokázat přítomnost rezistence z první deleční kazety, došlo pravděpodobně k jejich výměně. I delecce genu, který není pro kvasinku esenciální (jako je v případě *ATG8*), může vést ke změnám v genomu kvasinky a tím ovlivnit výsledný fenotyp. Navíc delecce genu v jednom kmeni kvasinek může mít na buňky jiný vliv, než delecce stejného genu u jiného kmene kvasinek (DOWELL *et al.* 2010). Pro konstrukci $\Delta atg8$ v kmeni *S.cerevisiae* BR-F je zapotřebí experiment opakovat a také zvážit použití jiných primerů pro konstrukci deleční kazety, aby nemohlo dojít k výměně první deleční kazety za druhou při konstrukci dvojnásobného deletanta.

6.3 Optimalizace metody pro odběr amoniaku u divokého kmene BR-F

Bylo zjištěno, že kvasinky *S.cerevisiae* v případě přítomnosti stresoru, například nedostatku živin, produkují plyný amoniakový signál. Dosavadní studie amoniakové signalizace byly prováděny u obřích kolonií a mikrokolonií laboratorních kmenů *S.cerevisiae* (PALKOVÁ *et al.* 2002; ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002; VÁCHOVÁ *et al.* 2013). Zavedený protokol pro měření plyného amoniaku byl ale optimalizován pouze pro odběr NH_3 z obřích kolonií laboratorních kmenů. Cílem této diplomové práce bylo zavést protokol na měření plyného amoniaku u mikrokolonií divokého kmene kvasinek BR-F. Nejprve byl optimalizován výsev mikrokolonií. Ačkoliv proběhla velmi rozsáhlá optimalizace výsevu, lze jen velmi těžko, zejména u divokého kmene BR-F, docílit vždy stejný počet kolonií na misce. Výsev mikrokolonií probíhá ze suspenze buněk s určenou buněčnou koncentrací. Buňky kmene BR-F mají na svém povrchu mnoho adhezních molekul, jako je například Flo11p, který je specifický pro tvorbu vrásčitých kolonií (GUO *et al.* 2000; BAYLY *et al.* 2005; ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014). Díky těmto adhesinům mají buňky tendenci se shlukovat a tím je znesnadněn výsev jednotlivých buněk na kultivační agarové médium.

Časování produkce amoniaku koloniemi je ovlivňováno mnoha faktory, mimo jiné i koncentrací vysetých mikrokolonií. V případě hustšího výsevu jsou živiny z média vyčerpány rychleji, a proto dochází k amoniakové signalizaci dříve, než v případě řidšího výsevu. Kontrolní odběry amoniaku z kultivačního média bez kolonií, byly při optimalizaci počtu jímek nejprve umístěny ve stejném termostatu, jako misky s koloniemi. Z toho důvodu docházelo k zachytávání nespécifického pozadí, které dosahovalo vysokých hodnot. V následujících experimentech byly tyto kontrolní odběry prováděny v odděleném termostatu od misek s mikrokoloniemi. Nicméně ani v tom případě není možné někdy zamezit vedlejším vlivům na sledování produkce amoniaku, protože v termostatu se mohou nacházet kultivační misky s koloniemi z paralelních experimentů a záleží tak na jejich fázi alkalizace.

Dalším faktorem při měření amoniaku u mikrokolonií je také rozmístění misek v termostatu. Pokud jsou misky kultivovány v příliš vysokých sloupcích (4 misky +) je nástup alkalizace nerovnoměrný. Je třeba tedy dbát i na pravidelné rozmístění misek v termostatu. Svou roli na době nástupu alkalizace hraje také stáří kultivačních misek, respektive jejich humidita. Pokud jsou mikrokolonie kvasinek kultivovány na sušších médiích, začínají vysílat stresový amoniakový signál dříve, než při kultivaci na miskách s vyšší humiditou. Jedním z faktorů je také nerovnoměrnost výsevu, kdy mikrokolonie v oblasti s hustším výsevem začnou signalizovat dříve. Signalizující obří kolonie mají schopnost naindukovat ostatní kolonie na kultivačním médiu bez ohledu na jejich fázi (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Mikrokolonie v oblasti hustšího výsevu tedy mohou indukovat amoniakovou signalizaci i u ostatních mikrokolonií na kultivačním médiu. Všechny tyto faktory jsou důkazem složitosti zkoumaného biologického systému, jakým jsou kvasinkové kolonie.

V rámci experimentů s cílem určit počet jímek pro odběr amoniaku byly paralelně sledovány mikrokolonie laboratorního kmene BY4742 spolu s mikrokoloniemi divokého kmene BR-F. Mikrokolonie kmene BY4742 produkovaly až čtyřikrát více amoniaku, než mikrokolonie divokého kmene BR-F. Nástup produkce ale proběhl u obou kmenů shodně 7. den kultivace. Nicméně v dalších experimentech byly hodnoty odebraného amoniaku u divokého kmene BR-F vyšší. Jak bylo již dříve zmíněno, jedná se o složitý biologický systém a není jednoduché určit příčinu tak výrazných rozdílů hodnot u mikrokolonií kmene BR-F a BY4742 v rámci prvních experimentů. Ačkoliv v dalších experimentech byly naměřené hodnoty amoniaku u mikrokolonií kmene BR-F vyšší, ani v jednom opakování nedosáhly maxima, které bylo naměřeno při optimalizaci odběru NH_3 u mikrokolonií kmene BY4742. Jedním z důvodů může být také to, že v prvních experimentech nebylo možné od naměřených hodnot odečíst kontrolní odběry, protože byly kontrolní hodnoty příliš vysoké.

Je ale také možné spekulovat, zda nižší produkce amoniaku mikrokoloniemi divokého kmene BR-F souvisí s rozdílnou morfologií kolonií. Role extracelulární matrix (ECM) v rámci kolonií divokého kmene ještě nebyla do detailů objasněna, ale již bylo prokázáno, že mimo jiné hraje roli jakéhosi vnitřního systému schopného selektivně zadržovat látky důležité pro vývoj kolonie, resp. látky toxické (VÁCHOVÁ *et al.* 2011). Díky svým adsorpčním vlastnostem je schopna zadržovat vodu i jiné živiny z okolí a tak se podílet na vyšší odolnosti mikrobiálního společenstva (FLEMMING a WINGENDER 2010). Amoniak je pro kvasinky preferenčním zdrojem dusíku (HOFMAN-BANG 1999) a je tedy hypoteticky možné, že ECM zachycuje část amoniakového signálu, aby kolonie neztrácela dusík v prostředí, kde je nedostatek živin.

Při odebírání amoniaku v experimentu se dvěma použitými médii, s 1% a 2% ethanolem, byl pozorovatelný rozdíl mezi dobou alkalizace média a dobou nástupu produkce amoniaku. Alkalizace média proběhla u mikrokolonií kmene BY4742 na obou médiích shodně 3. den kultivace a v případě mikrokolonií kmene BR-F proběhla 4. den na médiu s 2% etanolu a 6. den na médiu s 1% etanolu, zatímco nejvyšší produkce amoniaku byla ve všech uspořádáních šestý den. Tedy nejvyšší produkce amoniaku se s alkalizací média shodovala pouze při kultivaci mikrokolonií BR-F na GM médiu s 1% etanolu. Tyto rozdíly mohly být způsobeny nerovnoměrným rozvrstvením kultivačních misek v termostatu, což zapříčinilo rozdílný nástup alkalizace média.

Nově zavedený způsob detekce produkce amoniaku byl využit v pilotním experimentu paralelní detekce produkce amoniaku a daného proteinu u mikrokolonií kmenů s fúzními GFP proteiny.

Zvýšení fluorescence fúzního proteinu Ato1p-GFP bylo u kolonií kvasinek kmene BY4742 prokázáno v souvislosti s nástupem produkce amoniaku. Ato proteiny hrají v amoniakové signalizaci významnou roli (PALKOVÁ *et al.* 2002; ŘIČICOVÁ *et al.* 2007). V rámci této diplomové práce se podařilo zaznamenat zvýšení fluorescence Ato1p-GFP současně s nástupem produkce amoniaku i u kolonií kmene BR-F. Nejvyšší produkce amoniaku byla

zaznamenána 4. den kultivace, ale viditelná alkalizace média nastala až v sedmém dni kultivace. Tento rozdíl může být způsoben například jinou pufrací kapacitou použitého kvasničného autolyzátu v kombinaci s pomalejší difúzí signální molekuly v médiu oproti rychlé difúzi vzduchem.

Stejné časování produkce amoniaku i alkalizace média se projevilo u mikrokolonií kmene BR-F, produkujícího fúzní protein Pox1p-GFP. Fluorescenční signál fúzního proteinu bylo možné pozorovat již od 4. dne kultivace, přičemž slabá fluorescence se vyskytovala ve všech pozorovaných stádiích vývoje. Protein Pox1p vykazuje v rámci vrásčitých kolonií divokého kmene BR-F v sedmém dni kultivace vyšší expresi, než u hladkých kolonií téhož kmene (ŠŤOVÍČEK *et al.* 2014). Gen *POX1* je neaktivní v případě kultivace kvasinky na glukose, ale při kultivaci na glycerolu je aktivně transkribován (WANG *et al.* 1994). Mikrokolonie kvasinek kmene BR-F byly kultivovány na glycerolovém médiu a z tohoto důvodu byl GFP signál pozorovatelný ve všech sledovaných stádiích vývoje.

Mikrokolonie kmene BR-F, produkující fúzní protein Icl2p-GFP, alkalizovaly médium ve svém okolí již 3. den kultivace, podobně jako rodičovský kmen BR-F. Nejvyšší produkce amoniaku byla zaznamenána 5. den kultivace. Fluorescence fúzního proteinu byla pozorovatelná od šestého dne kultivace. Zvýšení exprese *ICL2* souvisí se začátkem amoniakové signalizace u kolonií laboratorního kmene kvasinek (PALKOVÁ *et al.* 2002), což se podařilo potvrdit i v rámci pozorování fluorescence fúzního proteinu Icl2p-GFP v mikrokoloniích divokého kmene BR-F.

Dosavadní výsledky pozorování souvislosti produkce amoniaku a fluorescence fúzních proteinů Icl2p-GFP, Ato1p-GFP i Pox1p-GFP se shodují s literaturou, nicméně pro přesnější určení časování produkce těchto proteinů v rámci mikrokolonií divokého kmene BR-F je nutné provést další experimenty.

7 Souhrn

- Byly vytvořeny kmeny odvozené od kmene BY4742, produkující fúzní mitochondriální proteiny Om45p-GFP, Cyc2p-GFP, Icl2p-mCherry, Om45p-mCherry a Cyc2p-mCherry. Tyto kmeny je možné využít v dalším zkoumání produkce mitochondriálních proteinů v rámci kolonií laboratorního kmene kvasinek *S.cerevisiae*.
- Protein Om45p-GFP je produkován v průběhu celého sledovaného vývoje kolonií na okraji i ve středu kolonie. V buňkách okraje kolonie se objevuje větší produkt, než Om45p-GFP a jeho produkce je na stejné úrovni ve všech stádiích vývoje, což naznačuje možné interakce s dalšími proteiny nebo modifikaci proteinu Om45p-GFP. Pro identifikování možných interakčních partnerů a/nebo potenciální modifikace je zapotřebí provést další experimenty.
- V rámci vývoje obřích kolonií laboratorního kmene byla zjištěna vyšší produkce fúzního proteinu Icl2p-GFP v pozdějších stádiích vývoje kolonií. Vyšší produkce byla zaznamenána s nástupem alkalické fáze vývoje kolonií.
- Sledování produkce proteinu Cyc2p-GFP v rámci vývoje obřích kolonií laboratorního kmene kvasinek odhalilo jeho zvýšenou degradaci v pozdějších stádiích vývoje obřích kolonií, která se projevila přítomností volného GFP.
- Podařilo se vytvořit kmeny, odvozené od divokého kmene BR-F pro studium diferenciac buněk v rámci kolonií, produkující fúzní proteiny Ino1p-GFP, Met17p-GFP, Pox1p-GFP a Icl2p-GFP. Dále byly zkonstruovány kmeny pro studium amoniakové signalizace, produkující fúzní proteiny Pma1p-GFP a Pma2p-GFP.
- Byly vytvořeny kmeny pro studium autofagie u kolonií divokého kmene BR-F produkující fúzní protein Mae1p-GFP a GFP-Atg8p. U kmene produkujícího fúzní protein GFP-Atg8p se nepodařilo pozorovat fluorescenční signál, nicméně správné vložení GFP do genomu bylo ověřeno metodou PCR.
- Byl zaveden nový systém pro sledování produkce amoniaku mikrokoloniemi kvasinek *S.cerevisiae*. Mikrokolonie divokého kmene *S.cerevisiae* produkují amoniakové signály v pulzech, které mají podobný průběh, jako u mikrokolonií laboratorního kmene, který na pevném médiu tvoří hladké kolonie.
- Produkce proteinu Ato1p-GFP a Icl2p-GFP byla zvýšena v souvislosti se zvýšením produkce amoniaku koloniemi kmene BR-F, tudíž lze usuzovat, že produkce těchto proteinů souvisí s nástupem alkalické fáze vývoje kolonií. Protein Pox1p-GFP byl produkován po celou sledovanou dobu vývoje kolonií a při nástupu alkalické fáze se jeho fluorescence nepatrně zvýšila.

8 Seznam použité literatury

- ARAKI Y., KU W.-C., AKIOKA M., MAY A. I., HAYASHI Y., ARISAKA F., ISHIHAMA Y., OHSUMI Y., 2013 Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.* **203**: 299–313.
- ASHFORD T., PORTER K., 1962 Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.* **12**: 198–202.
- BABA M., OSUMI M., SCOTT S. V., KLIONSKY D. J., OHSUMI Y., 1997 Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* **139**: 1687–95.
- BABA M., TAKESHIGE K., BABA N., OHSUMI Y., 1994 Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* **124**: 903–13.
- BAYLY J. C., DOUGLAS L. M., PRETORIUS I. S., BAUER F. F., DRANGINIS A. M., 2005 Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **5**: 1151–6.
- BELLU A. R., KIEL J. a K. W., 2003 Selective degradation of peroxisomes in yeasts. *Microsc. Res. Tech.* **61**: 161–70.
- BERNARD D. G., QUEVILLON-CHERUEL S., MERCHANT S., GUIARD B., HAMEL P. P., 2005 Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation of mitochondrial c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **280**: 39852–9.
- BOLES E., JONG-GUBBELS P. de, PRONK J., 1998 Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *J. Bacteriol.* **180**: 2875–2882.
- BONHIVERS M., CARBREY J. M., GOULD S. J., AGRE P., 1998 Aquaporins in *Saccharomyces*: genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *J. Biol. Chem.* **273**: 27565–27572.
- BURDA P., PADILLA S. M., SARKAR S., EMR S. D., 2002 Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J. Cell Sci.* **115**: 3889–3900.
- CARDENAS M. E., CUTLER N. S., LORENZ M. C., COMO C. J. DI, HEITMAN J., 1999 The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* **13**: 3271–9.
- CEBOLLERO E., VAART A. VAN DER, REGGIORI F., 2012a Understanding phosphatidylinositol-3-phosphate dynamics during autophagosome biogenesis. *Autophagy* **8**: 1868–70.
- CEBOLLERO E., VAART A. VAN DER, ZHAO M., RIETER E., KLIONSKY D. J., HELMS J. B., REGGIORI F., 2012b Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr. Biol.* **22**: 1545–53.
- CERVENY K. L., MCCAFFERY J. M., JENSEN R. E., 2001 Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell* **12**: 309–21.
- CORMACK B. P., BERTRAM G., EGERTON M., GOW N. a, FALKOW S., BROWN a J., 1997 Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 303–11.
- CRAUWELS M., DONATON M. C., PERNAMBUCO M. B., WINDERICKX J., WINDE J. H. DE, THEVELEIN J. M., 1997 The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* **143**: 2627–37.

- ČÁP M., STĚPÁNEK L., HARANT K., VÁCHOVÁ L., PALKOVÁ Z., 2012 Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol. Cell* **46**: 436–48.
- D'SOUZA C., HEITMAN J., 2001 It infects me, it infects me not: phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* **108**: 11–12.
- DEAN-JOHNSON M., HENRYE S. A., 1989 Biosynthesis of Inositol in Yeast. *J. Biol. Chem.* **264**: 1274–1283.
- DEFFIEU M., BHATIA-KIŠŠOVÁ I., SALIN B., GALINIER A., MANON S., CAMOUGRAND N., 2009 Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **284**: 14828–37.
- DEITSCH K., MOXON E., WELLEMS T., 1997 Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 281–293.
- DONAHUE T., HENRY S., 1981 Myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **10**: 7077–7085.
- DOWELL R. D., RYAN O., JANSEN A., CHEUNG D., AGARWALA S., DANFORD T., BERNSTEIN D. a, ROLFE P. A., HEISLER L. E., CHIN B., NISLOW C., GIAEVER G., PHILLIPS P. C., FINK G. R., GIFFORD D. K., BOONE C., 2010 Genotype to phenotype: a complex problem. *Science* **328**: 469.
- DUNTZE W., MACKAY V., MANNEY T., 1970 *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science*. **168**: 1472–1473.
- FENG Y., HE D., YAO Z., KLIONSKY D. J., 2014 The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**: 24–41.
- FLEMMING H.-C., WINGENDER J., 2010 The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–33.
- GAUSS R., TRAUTWEIN M., SOMMER T., SPANG A., 2005 New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1–12.
- GENG J., BABA M., NAIR U., KLIONSKY D. J., 2008 Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **182**: 129–40.
- GENG J., NAIR U., 2010 Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2257–2269.
- GIETZ R. D., WOODS R. A., 2002 Transformation of the yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**: 87–96.
- GRANEK J. a, MAGWENE P. M., 2010 Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet.* **6**: 823.
- GUO B., STYLES C. A., FENG Q., FINK G. R., 2000 A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 12158–63.
- HAILEY D. W., RAMBOLD A. S., SATPUTE-KRISHNAN P., MITRA K., SOUGRAT R., KIM P. K., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., 2010 Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**: 656–67.
- HANADA T., NODA N. N., SATOMI Y., ICHIMURA Y., FUJIOKA Y., TAKAO T., INAGAKI F., OHSUMI Y., 2007 The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**: 37298–302.

- HARA-KUGE S., FUJIKI Y., 2008 The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. *Exp. Cell Res.* **314**: 3531–41.
- HE C., BABA M., CAO Y., KLIONSKY D., 2008 Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol. Biol. Cell* **19**: 5506–5516.
- HE C., KLIONSKY D. J., 2009 Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 67–93.
- HE C., SONG H., YORIMITSU T., MONASTYRSKA I., YEN W.-L., LEGAKIS J. E., KLIONSKY D. J., 2006 Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J. Cell Biol.* **175**: 925–35.
- HOFMAN-BANG J., 1999 Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* **12**: 35–73.
- HOPPINS S., COLLINS S. R., CASSIDY-STONE A., HUMMEL E., DEVAY R. M., LACKNER L. L., WESTERMANN B., SCHULDINER M., WEISSMAN J. S., NUNNARI J., 2011 A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* **195**: 323–40.
- HUTCHINS M. U., KLIONSKY D. J., 2001 Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 20491–8.
- HUTCHINS M. U., VEENHUIS M., KLIONSKY D. J., 1999 Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J. Cell Sci.* **112**: 4079–87.
- CHEN Y., KLIONSKY D. J., 2011 The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**: 161–70.
- CHEONG H., NAIR U., GENG J., KLIONSKY D. J., 2008 The Atg1 Kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **19**: 668–681.
- CHEONG H., YORIMITSU T., REGGIORI F., LEGAKIS J. E., WANG C.-W., KLIONSKY D. J., 2005 Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3438–3453.
- ICHIMURA Y., IMAMURA Y., EMOTO K., UMEDA M., NODA T., OHSUMI Y., 2004 In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **279**: 40584–92.
- ICHIMURA Y., KIRISAKO T., TAKAO T., SATOMI Y., SHIMONISHI Y., ISHIHARA N., MIZUSHIMA N., TANIDA I., KOMINAMI E., OHSUMI M., NODA T., OHSUMI Y., 2000 A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488–92.
- INOUE Y., KLIONSKY D. J., 2010 Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**: 664–70.
- JIN M., KLIONSKY D. J., 2014 Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett.* **588**: 2457–2463.
- KABEYA Y., KAMADA Y., BABA M., TAKIKAWA H., SASAKI M., OHSUMI Y., 2005 Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2544–2553.
- KABEYA Y., KAWAMATA T., SUZUKI K., OHSUMI Y., 2007 Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**: 405–10.

- KABEYA Y., NODA N., FUJIOKA Y., SUZUKI K., INAGAKI F., OHSUMI Y., 2009 Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**: 612–5.
- KAMADA Y., FUNAKOSHI T., SHINTANI T., NAGANO K., OHSUMI M., OHSUMI Y., 2000 Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* **150**: 1507–13.
- KAMETAKA S., OKANO T., OHSUMI M., OHSUMI Y., 1998 Apg14p and Apg6/Vps30p Form a Protein Complex Essential for Autophagy in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 22284–22291.
- KANKI T., KANG D., KLIONSKY D., 2009a Monitoring mitophagy in yeast: The Om45-GFP processing assay. *Autophagy* **5**: 1186–1189.
- KANKI T., WANG K., BABA M., BARTHOLOMEW C. R., LYNCH-DAY M. a, DU Z., GENG J., MAO K., YANG Z., YEN W.-L., KLIONSKY D. J., 2009b A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**: 4730–4738.
- KANKI T., WANG K., CAO Y., BABA M., KLIONSKY D. J., 2009c Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* **17**: 98–109.
- KAUFMANN A., BEIER V., FRANQUELIM H. G., WOLLERT T., 2014 Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell* **156**: 469–81.
- KAWAMATA T., KAMADA Y., SUZUKI K., KUBOSHIMA N., AKIMATSU H., OTA S., OHSUMI M., OHSUMI Y., 2005 Characterization of a novel autophagy-specific gene, ATG29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 1884–9.
- KIHARA A., NODA T., ISHIHARA N., OHSUMI Y., 2001 Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **152**: 519–30.
- KIM J., KAMADA Y., STROMHAUG P. E., GUAN J., HEFNER-GRAVINK a, BABA M., SCOTT S. V, OHSUMI Y., DUNN W. a, KLIONSKY D. J., 2001 Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J. Cell Biol.* **153**: 381–96.
- KIRISAKO T., BABA M., ISHIHARA N., MIYAZAWA K., OHSUMI M., YOSHIMORI T., NODA T., OHSUMI Y., 1999 Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* **147**: 435–46.
- KIRISAKO T., ICHIMURA Y., OKADA H., KABEYA Y., MIZUSHIMA N., YOSHIMORI T., OHSUMI M., TAKAO T., NODA T., OHSUMI Y., 2000 The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* **151**: 263–76.
- KISSOVÁ I., DEFFIEU M., MANON S., CAMOUGRAND N., 2004 Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**: 39068–74.
- KISSOVÁ I., SALIN B., SCHAEFFER J., BHATIA S., MANON S., CAMOUGRAND N., 2007 Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* **3**: 329–36.
- KLIONSKY D. J., BAEHRECKE E. H., BRUMELL J. H., CHU C. T., CODOGNO P., CUERVO A. M., DEBNATH J., DERETIC V., ELAZAR Z., ESKELINEN E., FINKBEINER S., FUEYO-MARGARETO J., 2011 A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy* **7**: 1273–1294.
- KLIONSKY D. J., CREGG J. M., DUNN W. A., EMR S. D., SAKAI Y., SANDOVAL I. V, SIBIRNY A., SUBRAMANI S., THUMM M., VEENHUIS M., ARBOR A., 2003 A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**: 539–545.

- KLIONSKY D., CUEVA R., YAVER D., 1992 Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **119**: 287–299.
- KOMATSU M., TANIDA I., UENO T., OHSUMI M., OHSUMI Y., KOMINAMI E., 2001 The C-terminal region of an Apg7p/Cvt2p is required for homodimerization and is essential for its E1 activity and E1-E2 complex formation. *J. Biol. Chem.* **276**: 9846–54.
- KOREN I., REEM E., KIMCHI A., 2010 DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr. Biol.* **20**: 1093–8.
- KOVÁCS A., PÁLFI Z., RÉZ G., VELLAI T., KOVÁCS J., 2007 Sequestration Revisited. *Autophagy* **3**: 655–662.
- KRICK R., BREMER S., WELTER E., SCHLOTTERHOSE P., MUEHE Y., ESKELINEN E.-L., THUMM M., 2010 Cdc48/p97 and Shp1/p47 regulate autophagosome biogenesis in concert with ubiquitin-like Atg8. *J. Cell Biol.* **190**: 965–73.
- KUMA A., MIZUSHIMA N., ISHIHARA N., OHSUMI Y., 2002 Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**: 18619–25.
- 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. *Mol. Microbiol.* **47**: 745–54.
- LAIZÉ V., GOBIN R., ROUSSELET G., BADIER C., HOHMANN S., RIPOCHE P., TACNET F., 1999 Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 139–44.
- LAMB C. a, YOSHIMORI T., TOOZE S. a, 2013 The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 759–74.
- LANG T., SCHAEFFELER E., BERNREUTHER D., BREDSCHNEIDER M., WOLF D. H., THUMM M., 1998 Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* **17**: 3597–607.
- LEGAKIS J. E., YEN W.-L., KLIONSKY D. J., 2007 A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy* **3**: 422–32.
- LEMASTERS J. J., 2014 Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol.* **2**: 749–754.
- LEVINE B., KLIONSKY D., 2004 Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**: 463–477.
- LUTTIK M. a, KÖTTER P., SALOMONS F. a, KLEI I. J. VAN DER, DIJKEN J. P. VAN, PRONK J. T., 2000 The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J. Bacteriol.* **182**: 7007–13.
- LYNCH-DAY M., KLIONSKY D. J., 2010 The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* **584**: 1359–66.
- MAO K., WANG K., ZHAO M., XU T., KLIONSKY D. J., 2011 Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **193**: 755–67.

- MARI M., GRIFFITH J., RIETER E., KRISHNAPPA L., KLIONSKY D. J., REGGIORI F., 2010 An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **190**: 1005–1022.
- MARINI A. M., VISSERS S., ANDRE B., VISSERS S., ANDRE B., 1997 A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4282–4293.
- MC EWAN D. G., DIKIC I., 2010 Not all autophagy membranes are created equal. *Cell* **141**: 564–6.
- MILLEN J., KRICK R., PRICK T., THUMM M., GOLDFARB D. S., 2009 Measuring piecemeal microautophagy of the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **5**:1: 75–81.
- MIZUSHIMA N., NODA T., OHSUMI Y., 1999 Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* **18**: 3888–96.
- MIZUSHIMA N., YOSHIMORI T., OHSUMI Y., 2011 The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**: 107–32.
- MOTLEY A. M., NUTTALL J. M., HETTEMA E. H., 2012 Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **31**: 2852–68.
- MÜLLER O., SATTLER T., FLÖTENMEYER M., SCHWARZ H., PLATTNER H., MAYER a, 2000 Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J. Cell Biol.* **151**: 519–28.
- NAIR U., JOTWANI A., GENG J., GAMMOH N., RICHERSON D., YEM W.-L., GRIFFITH J., NAG S., WANG K., MELIA T., KLIONSKY D. J., 2011 SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* **146**: 290–302.
- NAIR U., YEN W., MARI M., CAO Y., XIE Z., BABA M., REGGIORI F., KLIONSKY D. J., 2012 A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* **8**: 780–793.
- NAKATOGAWA H., ICHIMURA Y., OHSUMI Y., 2007 Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* **130**: 165–78.
- NAZARKO T. Y., 2014 Atg37 regulates the assembly of the pexophagic receptor protein complex. *Autophagy* **10**: 1348–1349.
- NICE D. C., SATO T. K., STROMHAUG P. E., EMR S. D., KLIONSKY D. J., 2002 Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J. Biol. Chem.* **277**: 30198–207.
- NODA N. N., FUJIOKA Y., HANADA T., OHSUMI Y., INAGAKI F., 2013 Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation. *EMBO Rep.* **14**: 206–11.
- NODA T., OHSUMI Y., 1998 Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *J. Biol. Chem.* **273**: 3963–3966.
- OBARA K., SEKITO T., OHSUMI Y., 2006 Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes—Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **17**: 1527–1539.
- OHASHI Y., MUNRO S., 2010 Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol. Biol. Cell* **21**: 3998–4008.

- OKU M., WARNECKE D., NODA T., MÜLLER F., HEINZ E., MUKAIYAMA H., KATO N., SAKAI Y., 2003 Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *EMBO J.* **22**: 3231–41.
- PALCOVÁ Z., 2004 Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* **5**: 470–6.
- PALCOVÁ Z., DEVAUX F., ŘIČICOVÁ M., MINÁRIKOVÁ L., CROM S. LE, JACQ C., 2002 Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3901–3914.
- PALCOVÁ Z., FORSTOVÁ J., 2000 Yeast colonies synchronise their growth and development. *J. Cell Sci.* **113**: 1923–8.
- PALCOVÁ Z., JANDEROVÁ B., GABRIEL J., ZIKÁNOVÁ B., POSPÍŠEK M., FORSTOVÁ J., 1997 Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**: 532–6.
- PALCOVÁ Z., VÁCHOVÁ L., 2003 Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int. Rev. Cytol.* **225**: 229–274.
- PAPINSKI D., KRAFT C., 2014 Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9. *Autophagy* **10**: 1338–1340.
- PAPINSKI D., SCHUSCHNIG M., REITER W., WILHELM L., BARNES C. a, MAIOLICA A., HANSMANN I., PFAFFENWIMMER T., KIJANSKA M., STOFFEL I., LEE S. S., BREZOVICH A., LOU J. H., TURK B. E., AEBERSOLD R., AMMERER G., PETER M., KRAFT C., 2014 Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol. Cell* **53**: 471–83.
- PEARCE D. a, CARDILLO T. S., SHERMAN F., 1998 Cyc2p is required for maintaining ionic stability and efficient cytochrome c import and mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **439**: 307–11.
- REGGIORI F., KLIONSKY D. J., 2006 Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**: 2903–11.
- REGGIORI F., KLIONSKY D. J., 2013 Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **194**: 341–61.
- REGGIORI F., SHINTANI T., NAIR U., KLIONSKY D., 2005 Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* **1**: 101–109.
- REGGIORI F., TUCKER K. a, STROMHAUG P. E., KLIONSKY D. J., 2004a The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell* **6**: 79–90.
- REGGIORI F., WANG C., NAIR U., SHINTANI T., ABELIOVICH H., KLIONSKY D. J., 2004b Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2189–2204.
- REGGIORI F., WANG C.-W., STROMHAUG P. E., SHINTANI T., KLIONSKY D. J., 2003 Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J. Biol. Chem.* **278**: 5009–20.
- REYNOLDS T. B., FINK G. R., 2001 Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878–81.
- ROBERTS P., MOSHITCH-MOSHKOVITZ S., KVAM E., O'TOOLE E., WINEY M., GOLDFARB D. S., 2003 Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**: 129–141.

- 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**: 1170–8.
- SÁNCHEZ N. S., PEARCE D., CARDILLO T. S., URIBE S., SHERMAN F., 2001 Requirements of Cyc2p and the porin, Por1p, for ionic stability and mitochondrial integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **392**: 326–32.
- SATTLER T., MAYER a, 2000 Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation. *J. Cell Biol.* **151**: 529–38.
- SCOTT S. V, BABA M., OHSUMI Y., KLIONSKY D. J., 1997 Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.* **138**: 37–44.
- SHEFF M. a, THORN K. S., 2004 Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661–70.
- SHINTANI T., HUANG W.-P., STROMHAUG P. E., KLIONSKY D. J., 2002 Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev. Cell* **3**: 825–37.
- SHINTANI T., KLIONSKY D. J., 2004a Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 29889–94.
- SHINTANI T., KLIONSKY D. J., 2004b Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990–5.
- SHINTANI T., MIZUSHIMA N., OGAWA Y., MATSUURA a, NODA T., OHSUMI Y., 1999 Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* **18**: 5234–41.
- SHINTANI T., SUZUKI K., KAMADA Y., NODA T., OHSUMI Y., 2001 Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *J. Biol. Chem.* **276**: 30452–60.
- SHPIILKA T., WEIDBERG H., PIETROKOVSKI S., ELAZAR Z., 2011 Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* **12**: 226.
- SCHERZ R., SHINDER V., ENGELBERG D., 2001 Anatomical Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Stalk-Like Structures Reveals Spatial Organization and Cell Specialization. *J. Bacteriol.* **183**: 5402–5413.
- SCHLUMBERGER M., SCHAEFFELER E., 1997 AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 1068–1076.
- SCHMELZLE T., BECK T., MARTIN D. E., HALL M. N., 2004 Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 338–351.
- SCHU P. V, TAKEGAWA K., FRY M. J., STACK J. H., WATERFIELD M. D., EMR S. D., 1993 Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**: 88–91.
- SLUTSKY B., BUFFO J., SOLL D., 1985 High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*. **230**: 666–669.
- STASYK V., STASYK O., MATHEWSON R., FARRÉ J.-C., NAZARKO V., KRASOVSKA O. S., SUBRAMANI S., CREGG J. M., SIBIRNY A., 2006 Atg28, a Novel Coiled-Coil Protein Involved in Autophagic Degradation of Peroxisomes in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy* **2**: 30–38.

- SUGAWARA K., SUZUKI N., FUJIOKA Y., MIZUSHIMA N., OHSUMI Y., INAGAKI F., 2004 The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes to cells* **9**: 611–618.
- SUZUKI K., KIRISAKO T., KAMADA Y., MIZUSHIMA N., NODA T., OHSUMI Y., 2001 The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**: 5971–81.
- SUZUKI K., KUBOTA Y., SEKITO T., OHSUMI Y., 2007 Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**: 209–18.
- ŠŤOVIČEK V., VÁCHOVÁ L., BEGANY M., WILKINSON D., PALKOVÁ Z., 2014 Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC Genomics* **15**: 136–152.
- ŠŤOVIČEK V., VÁCHOVÁ L., PALKOVÁ Z., 2012 Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism. *Commun. Integr. Biol.* **5**: 203–5.
- TAKESHIGE K., BABA M., TSUBOI S., NODA T., OHSUMI Y., 1992 Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**: 301–11.
- TANIDA I., MIZUSHIMA N., KIYOOKA M., OHSUMI M., UENO T., OHSUMI Y., KOMINAMI E., 1999 Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1367–79.
- THEVELEIN J. M., WINDE J. H. DE, 1999 Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **33**: 904–18.
- THOMAS D., SURDIN-KERJAN Y., 1997 Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 503–532.
- TSUKADA M., OHSUMI Y., 1993 Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 169–174.
- TUCKER K. a, REGGIORI F., DUNN W. a, KLIONSKY D. J., 2003 Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J. Biol. Chem.* **278**: 48445–52.
- VÁCHOVÁ L., HATÁKOVÁ L., ČÁP M., POKORNÁ M., PALKOVÁ Z., 2013 Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**: 102485.
- VÁCHOVÁ L., CHERNYAVSKIY O., STRACHOTOVÁ D., BIANCHINI P., BURDÍKOVÁ Z., FERČÍKOVÁ I., KUBÍNOVÁ L., PALKOVÁ Z., 2009a Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* **11**: 1866–77.
- 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. *J. Cell Biol.* **169**: 711–7.
- VÁCHOVÁ L., ŠŤOVIČEK V., HLAVÁČEK O., CHERNYAVSKIY O., STĚPÁNEK L., KUBÍNOVÁ L., PALKOVÁ Z., 2011 Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* **194**: 679–87.
- VOPÁLENSKÁ I., ŠŤOVIČEK V., JANDEROVÁ B., VÁCHOVÁ L., PALKOVÁ Z., 2010 Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ. Microbiol.* **12**: 264–77.

- WANG T., LUO Y., SMALL G. M., 1994 The POX1 Gene Encoding Peroxisomal Acyl-CoA Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Is under the Control of Multiple Regulatory Elements. *J. Biol. Chem.* **269**: 24480–5.
- XIE Z., KLIONSKY D. J., 2007 Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**: 1102–9.
- XIE Z., NAIR U., KLIONSKY D., 2008 Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* **19**: 3290–3298.
- YAFFE M. P., JENSEN R. E., GUIDO E. C., 1989 The major 45-kDa protein of the yeast mitochondrial outer membrane is not essential for cell growth or mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **264**: 21091–6.
- YAMADA Y., SUZUKI N. N., HANADA T., ICHIMURA Y., KUMETA H., FUJIOKA Y., OHSUMI Y., INAGAKI F., 2007 The crystal structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2) enzyme that mediates Atg8 lipidation. *J. Biol. Chem.* **282**: 8036–43.
- YEN W., LEGAKIS J., NAIR U., KLIONSKY D. J., 2007 Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol. Biol. Cell* **18**: 581–593.
- YORIMITSU T., KLIONSKY D., 2005a Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12**: 1542–1552.
- YORIMITSU T., KLIONSKY D., 2005b Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1593–1605.
- YORIMITSU T., ZAMAN S., BROACH J. R., KLIONSKY D. J., 2007 Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **18**: 4180–4189.
- ZIKÁNOVÁ B., KUTHAN M., ŘIČICOVÁ M., FORSTOVÁ J., PALKOVÁ Z., 2002 Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 962–7.