

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena 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. Kristýna Podholová**

Role mitochondrií a retrográdní signalizace při vývoji kvasinkových kolonií  
Role mitochondria and retrograde signalization during development of yeast colony

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2016

## **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. 2016

## **Poděkování**

V první řadě patří mé díky paní profesorce RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za vedení mé diplomové práce, dále za pomoc při interpretaci získaných dat, kterým tímto dala směr a smysl. Také bych chtěla poděkovat paní doktorce Libuši Váchové, CSc., která spolu s paní profesorkou Palkovou vytvořila velmi zajímavá data na konfokálním mikroskopu.

Také bych chtěla poděkovat paní doktorce Heleně Kučerové, za zpracování vzorků biomasy a přípravu imunodetekce. A za to, že mě celým procesem provedla od začátku do konce a předala mi potřebné „know how“, které jistě využiji v budoucnosti. Nemalé díky patří celému kolektivu Laboratoře biologie kvasinkových kolonií, který mi vždy s ochotou pomohl zvládnout pracovní proces a nemalá úskalí vědy.

V neposlední řadě děkuji své rodině za finanční i psychickou podporu při studiích, bez jejich podpory by tato diplomová práce nemohla vzniknout. Rovněž děkuji svému snoubenci za podporu při studiích.



## Abstrakt

Jednobuněčné organismy jako jsou kvasinky, byly dříve převážně studovány v třepaných kulturách a nikoli na pevném povrchu, jak je tomu běžné v přírodě. V přírodě totiž skoro žádná buňka nežije osamoceně, ale naopak často tvoří mnohobuněčné kolonie nebo biofilmy. V současné době již řada studií probíhá i na pevném médiu, tedy za podmínek podobnějších podmínkám přírodním. Naše laboratoř vyvinula speciální techniky pro výzkum kolonií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto techniky nám umožňují popis a zkoumání jednotlivých subpopulací a buněk v kvasinkové kolonii. Cílem této práce bylo připravit řadu mutantních kmenů produkujících cílové geny mitochondriální RTG signalizace, popsat morfologii a ultrastrukturu jejich kolonií a pomocí nich přispět k objasnění funkce retrogradní dráhy při vývoji kvasinkové kolonie. Práce popisuje expresi několika vybraných genů (*CIT2*, *RTG1*, *RTG2*, *RTG3*) ve výchozím kmeni BY4742 a v dalších mutantních kmenech s delecí jednoho či více regulačních genů RTG dráhy. Výsledky získané v rámci diplomové práce spolu s výsledky dalších autorů se staly součástí vědecké publikace (Podholová et al., 2016).

Klíčová slova: kolonie, *Saccharomyces cerevisiae*, retrogradní dráha, mitochondrie, regulace genové exprese, Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p, Mks1p, Cit2p, Dld3p

## Abstract

Unicellular organisms such as yeast have been traditionally studied in shaken cultures, i.e., under condition in which they do not grow attached to solid surfaces as under natural conditions. In nature, cells only rarely live alone, but, on the other hand often create multicellular colonies or biofilms. During last years, yeasts started to be investigated also when grown on solid media. Our laboratory has previously developed special techniques for investigation of yeast colonies. These techniques allowed us to describe individual cell subpopulations within the colonies. The aim of this work was to prepare a series of mutant strains, describe morphology and ultrastructure of their colonies with the aim to contribute to understanding of the role of mitochondrial retrograde signalling pathway in the development of yeast colonies. This work describes expression of few selected genes (*CIT2*, *RTG1*, *RTG2*, and *RTG3*) in colonies of the parental strain BY4742 and of other mutant strains with deletion of one or more genes of RTG regulatory pathways. The results of the diploma thesis together with results of other authors became part of the publication (Podholová et al., 2016).

Key words: colony, *Saccharomyces cerevisiae*, retrograde pathway, mitochondria, regulation of gene expression, Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p, Mks1p, Cit2p, Dld3p

## Seznam zkratk:

ATP	adenosintrifosfát
MMP	mitochondriální membránový potenciál
mtDNA	mitochondriální DNA
ROS	reaktivní kyslíkový radikály
RTG dráha	retrográdní dráha
U buňky	(„upper“) horní buňky obří kolonie
L buňky	(„lower“) spodní buňky obří kolonie
GM	glycerové médium tekuté
GMA médium	glycerové médium pevné
BKP	bromkresolový purpur (pH indikátor)
YEPG	(„yeast extrakt, pepton, glucose“) tekuté médium
YEPGA	(„yeast extrakt, pepton, glucose“) pevné médium
MM	minimální tekuté médium
MMA	minimální pevné médium
GFP	„green fluorescent protein“ zelený fluorescenční protein
<i>MKS1</i>	multikopiová kináza
bHLHZ	helix-loop-helix leucínový zip (typ transkripčního faktoru)
TF	transkripční faktor
NES	(„nuclear export sequence“) adresná sekvence pro export proteinu z jádra
NLS	(„nuclear localization sequence“) adresná sekvence pro import proteinu do jádra
STP	staurosporin
RTG	retrográdní

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	3
3	Literární rešerše.....	4
3.1	Obří kolonie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
3.2	Retrográdní dráha.....	9
3.2.1	Retrográdní dráha u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
3.2.2	Retrográdní dráha u savců.....	12
3.2.3	Průběh retrográdní dráhy a jeho složitost u savčích buněk.....	16
3.2.4	Invazivita buněk s aktivovanou retrográdní drahou.....	18
3.2.5	Retrográdní dráha a apoptóza.....	19
4	Materiál a metody .....	20
4.1	Materiál.....	20
4.1.1	Laboratorní přístroje .....	20
4.1.2	Chemikálie .....	21
4.1.3	Roztoky .....	22
4.1.4	Média.....	24
4.1.5	Použitý mikroorganismus .....	26
4.1.6	Geny související s RTG dráhou.....	26
4.1.7	Seznam připravených kmenů .....	27
4.1.8	Plazmidy .....	29
4.1.9	Oligonukleotidy .....	30
4.1.10	Polymerázy.....	35
4.1.11	Standarty .....	35
4.1.12	Programy.....	36
4.2	Metody .....	36
4.2.1	Sterilizace .....	36

4.2.2	Uchovávání kvasinkových kmenů .....	36
4.2.3	Kultivace.....	36
4.2.4	Test alkalizace kolonií.....	37
4.2.5	Stanovení optické denzity .....	37
4.2.6	Práce s DNA.....	37
4.2.7	Příprava kmenů.....	39
4.2.8	Mikroskopické techniky .....	45
5	Výsledky .....	47
5.1	Příprava kmenů .....	47
5.2	PCR verifikace.....	48
5.3	Alkalizační test a výběr klonů .....	52
5.4	Sekvence kmenů.....	67
5.5	Ověření GFP signálu, jeho lokalizace a intenzita .....	69
5.5.1	Ověření GFP signálu kmene BY-Rtg3p-GFP .....	77
5.6	Charakteristika kolonií připravených kmenů .....	77
5.6.1	Analýza buněčných subpopulací kolonií modifikovaných kmenů řezy na mikrotonu – pozorování subpopulací kolonií .....	80
5.7	Sběr biomasy pro Western blot a imunodetekci .....	108
6	Diskuze .....	113
6.1	Příprava mutantních kmenů <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	113
6.2	Popis morfologie kmenů pomocí speciálních technik a exprese genu <i>CIT2</i> .....	113
6.3	Role retrogradní dráhy v subpopulacích kvasinkové kolonie.....	115
7	Souhrn .....	119
8	Literární zdroje .....	120
9	Další zdroje .....	127

# 1 Úvod

Kvasinky rostoucí na pevném podkladě vytváří mnohobuněčné kolonie, které svojí stavbou připomínají jednoduché mnohobuněčné organismy. Tvorba kolonií a jiných mnohobuněčných struktur umožňuje organismu lepší ochranu populace proti škodlivinám z prostředí, výhodu v obsazování prostředí, poskytnutí živin kolonií a vytvoření populace vysoce rezistentní vůči toxickým látkám. Kvasinky jsou schopny se navzájem dorozumívat mezi koloniemi pomocí signální molekuly amoniaku (Palková et al., 1997). Produkce amoniaku vyvolává změny exprese v rámci celé kolonie a kolonie se začíná diferencovat. Střed kolonie můžeme rozdělit do dvou subpopulací. Ve vrchní části kolonie jsou tzv. horní buňky („upper“; U buňky) a ve spodní dolní buňky („lower“; L buňky). Obě subpopulace se navzájem liší v několika důležitých znacích (Čáp et al., 2012):

- morfoloii a velikosti buněk,
- uspořádáním buňky,
- odolnosti vůči stresu,
- metabolismem,
- genovou expresí.

Studiem kvasinkové kolonie se naše laboratoř zabývá již několik let a za tu dobu vyvinula účinné metody studia celých kolonií, včetně porovnávání jejich schopnosti alkalizovat a diferencovat, a mikroskopické speciální techniky pro studium jednotlivých subpopulací kvasinkové kolonie. Tyto metody již přinesly mnoho poznatků o vývoji kolonií a o tom jak navzájem různé subpopulace spolupracují.

Naše laboratoř se také zabývá buněčnou signalizací buněk subpopulací. Jednou ze signálních drah je retrográdní dráha. Tato signalizační dráha je definovaná jako dráha mezi mitochondriemi a jádrem, odpovídající na stimuly přicházející především z dysfunkční mitochondrie a podle současných poznatků i z okolního prostředí (Biswas et al., 1999; Epstein et al., 2001; Guha et al., 2015; Parikh et al., 1987; Srinivasan et al., 2010; Traven et al., 2001).

Buňka na základě získaného signálu začne měnit svůj metabolismus. V případě nefunkčního citrátového cyklu zapne alternativní metabolické pochody jako je např. glyoxalátový cyklus u *S. cerevisiae* (Epstein et al., 2001; Traven et al., 2001). Zvyšuje expresi vybraných genů pro zlepšení své odolnosti vůči stresu. Na savčích tkáňových kulturách byla popsána přeměna neinvazivních buněk na invazivní a stoupla např. jejich odolnost vůči apoptóze (Amuthan et al., 2002, 2001). V jiných tkáňových kulturách pak aktivace retrográdní odpovědi vedla naopak ke zvýšení citlivosti k apoptóze a buňky snadněji podléhaly apoptóze. Genová exprese vyvolaná aktivací retrográdní dráhy je závislá na typu studované tkáňové kultury (Arnould et al., 2002; Biswas et al., 2005; Cavalli et al., 1997; Miceli and Jazwinski, 2005; Morais et al., 1994).

Tato práce se v literárním úvodu zaměřuje na obecný popis retrográdní dráhy především u savců, kde je situace značně odlišná od relativně jednoduché retrográdní dráhy u kvasinky *S.*

*cerevisiae*. Odpověď retrográdní dráhy nebo také mitochondriální stresové dráhy je specifická pro každý typ tkáňové kultury. Dochází k aktivaci několika signálních drah, které specificky řídí expresi genů (Biswas et al., 1999; Guha et al., 2015).

Práce využívá model kvasinkové kolonie *S. cerevisiae* rostoucí na pevném povrchu. Dosavadní výzkum retrográdní dráhy u kvasinek byl prováděn s využitím kultur rostoucích v tekutém třepaném médiu, proto si od výzkumu na koloniích slibujeme nové důležité poznatky o retrográdní dráze. Experimentální část práce zahrnuje především přípravu, verifikaci a popsání nových kvasinkových kmenů s delecí, GFP fúzí či kombinací obojího. Výsledky této diplomové práce spolu s výsledky dalších autorů se staly součástí vědecké publikace (Podholová et al., 2016)

## 2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo pozorovat vliv retrográdní dráhy na morfologii a diferenciaci kvasinkové kolonie:

1. V literárním úvodu seznámit čtenáře s retrográdní dráhou u *S. cerevisiae* a s homology retrográdní dráhy u savců.
2. Připravit mutantní kmeny *S. cerevisiae* a ověřit jejich správnost.
3. Popsat morfologii kolonií připravených kmenů odvozených od laboratorního kmene *S. cerevisiae* BY4742.
4. Popsat RTG dráhu v jednotlivých subpopulacích kvasinkové kolonie.
5. Zjistit zda je exprese genu *CIT2* plně závislá na RTG dráze.



### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Obří kolonie *Saccharomyces cerevisiae*

Na rozdíl od tekutých kvasinkových kultur, které jsou běžně studované v laboratořích, mikroorganismy žijící v jejich přirozeném prostředí jsou často organizovány do mnohobuněčných útvarů (např. kolonií a biofilmů). Kvasinková kolonie je specificky organizovaná mnohobuněčná struktura. Její struktura je pravděpodobně ovlivňována prostřednictvím signálních molekul produkovaných buňkami kolonie. Signální molekuly mohou fungovat na krátkou i dlouhou vzdálenost a mohou být zodpovědné za nejrůznější metabolické změny.

Buňky rostoucí na agarovém komplexním GMA médiu tvoří kolonie, které se navzájem spolu dorozumívají pomocí plyné signální molekuly, amoniaku. Tato signalizace je u kvasinek poměrně univerzální a byla zjištěna u kolonií rodů *Candida*, *Cryptococcus*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* (Palková et al., 1997). V případě vyšší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v agarovém médiu se amoniaková signalizace, respektive s ní spojená změna pH, projevuje vznikem precipitovaných "stop" v médiu, orientovaných mezi koloniemi (Palková et al., 1997).

Jak mikrokolonie (kolonie narostlé z jedné buňky), tak obří kolonie (kolonie odvozené ze suspenze buněk) rostoucí na agarovém komplexním GMA médiu procházejí několika fázemi vývoje, jež je možné pozorovat pomocí přidání pH indikátoru bromkresolového purpuru do média (Palková et al., 1997; Váchová et al., 2013). Po inokulaci obřích kolonií dochází po několika desítkách hodin k první alkalizaci média provázené produkcí amoniaku. Tuto fázi nazýváme první alkalickou fází a je doprovázená slabým fialovým zbarvením média okolo kolonií a trvá jen několik hodin (Palková et al., 1997). První alkalická fáze je nezávislá na složení média a na přítomnosti ostatních kolonií v okolí. Nezávislost na médiu může být způsobena skutečností, že amoniak není vyráběn z aminokyselin v prostředí, ale z degradovaných proteinů nebo z aminokyselin přítomných v buňce (Palková et al., 2002a). Následuje první acidická fáze doprovázená okyselením média a rychlým růstem kolonií. V průběhu acidické fáze rostou kolonie lineárně (Váchová and Palková, 2005). V průběhu acidické fáze dochází k oscilaci membránového potenciálu na plasmatické membráně. Periody oscilace membránového potenciálu jsou oddělené prudkým poklesem potenciálu během neprogramování metabolismu populace (Palková et al., 2009). Přibližně po 10 dnech začíná docházet k opětovné alkalizaci média provázené silnou produkcí amoniaku, zpomalením růstu obřích kolonie a diferenciací kolonie na tzv. U a L buňky (Čáp et al., 2012). Druhá fáze alkalizace je podstatně intenzivnější než první. Solitérní kolonie rovněž vykazují nižší schopnost alkalizace média než kolonie ve vyšším počtu (Palková et al., 1997).

Během druhé alkalické fáze kolonie dochází k dalšímu útlumu růstu kolonie. Střed kolonie je tvořen převážně buňkami ve stacionární fázi (Palková and Forstová, 2000; Paz et al., 1999). Rovněž se mění koncentrace aminokyselin ve vakuolách, která klesá na začátku alkalické fáze (Palková et al., 2002). Analýza transkriptomů kolonií ukázala, že se v průběhu přechodu kolonií do alkalické fáze mění exprese přibližně 200 genů. Toto zjištění ukázalo, že přestože většina buněk obřích kolonií je v stacionární fázi, jsou tyto buňky stále schopny výrazně změnit svůj metabolismus. Změny exprese se týkají skupiny genů podílejících se na biosyntéze a degradaci aminokyselin (např. glycin dekarboxyláza, treonin dehydratáza a aspartát aminotransferáza), dále dochází k aktivaci genů pro peroxisomy a  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, methyl-glyoxylátový cyklus a pro některé transportéry plazmatické membrány (Palková et al., 2002).

Amoniak, produkovaný koloniemi v alkalické fázi, funguje jako regulátor na dlouhou vzdálenost, který ovlivňuje vývoj kolonií (Palková et al., 1997). Amoniak funguje jako signální molekula i u jiných organismů, např. u *Dictyostelium discoideum* nebo u savců (Gross, 1994; Szerb and Butterworth, 1992).

Doba trvání a intenzita alkalizace média se u jednotlivých druhů kvasinek liší a signalizace funguje i mezi koloniemi různých druhů/rodů (Palková and Forstová, 2000). Reakce na amoniak produkovaný jinou kolonií v blízkosti vyvolává metabolické změny, které jsou poměrně velmi rychlé (několik hodin). Produkce amoniaku kolonií v alkalické fázi vyvolá produkci amoniaku u sousední kolonie, bez ohledu na její vývojovou fázi. Tyto výsledky ukázaly roli amoniaku při synchronizaci růstu kolonií a při indukci jejich vlastní produkce amoniaku. Pro amoniakovou signalizaci je důležitá přítomnost tří proteinů Ato1p, Ato2p a Ato3p, jejichž exprese se nápadně zvyšuje v průběhu alkalické fáze (Palková et al., 2002). Proteiny Ato1p a Ato2p mají 78 % aminokyselinovou homologii, zatímco Ato3p je mnohem méně homologní k ostatním (přibližně 35 %) (Palková et al., 2002). Ato1p a Ato3p mohou na plazmatické membráně tvořit homodimery nebo homooligomery. Pouze Ato1p může interagovat s Ato2p (Strachotová et al., 2012).

Buňky kolonií v alkalické fázi rovněž vykazují větší odolnost vůči metylamoniaku než buňky z kolonií acidických. Předpoklad je, že Ato1p, Ato2p a Ato3p by mohly fungovat jako exportéry amoniaku, které jsou schopny exportovat metyl amoniak (Palková et al., 2002).

Efektivní příjem aminokyselin pomocí vysokokapacitní permeázy Gap1p je velmi důležitý pro produkci amoniaku. Naopak přítomnost specifických aminokyselinových permeáz Can1p a Lyp1p na množství uvolněného amoniaku vliv neměla. Nezbytnost přítomnosti aminokyselin v médiu a jejich příjem spolu se změnami exprese genů metabolismu aminokyselin a přechodný pokles hladiny aminokyselin v buňce na začátku produkce amoniaku vedly k závěru, že aminokyseliny jsou pravděpodobným zdrojem amoniaku v kvasinkové kolonii (Palková et al., 2002; Zikánová et al., 2002). Koncentrace extracelulárních a/nebo intracelulárních aminokyselin by mohla být rovněž důležitá pro přepnutí kolonie do fáze produkce amoniaku. Defekt v senzoru aminokyselin SPS

ovlivňuje toto přepínání a jeho funkce by mohla být důležitá pro správné vyhodnocení stavu externích zdrojů aminokyselin (Zikánová et al., 2002).

Produkce amoniaku kvasinkovými koloniemi je nezávislá na množství extracelulárních amonných iontů a na jejich příjmu z extracelulárního prostředí pomocí permeáz Mep1p, Mep2p, Mep3p (Marini et al., 1994; Zikánová et al., 2002).

Na zvýšení extracelulárního pH během alkalizace se zřejmě podílí některé transportéry lokalizované na plazmatické membráně, např. transportéry sulfátu (*SUL1*, *SUL2*), zinku (*ZRT1*) a fosfátu (*PHO84*, *PHO89*). V průběhu přechodu kolonií do alkalické fáze rovněž klesá exprese genu *PMA1* kódujícího hlavní buněčnou protonovou ATPázu. Taktéž dochází k represi genů podílejících se na oxidativní fosforylaci, genů pro proteiny podílejících se na mitochondriálním transportním systému, genů pro některé proteiny citrátového cyklu a dalších genů. Naopak se zvyšuje exprese genů podílejících se na  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, produkci acetyl-CoA v peroxisomech, genů pro proteiny účastnící se transportu v peroxisomech a biosyntéze peroxisomů (Palková et al., 2002)

Nicméně ne všechny laboratorní kmeny jsou schopny alkalizace média. Kmen postrádající gen *SOD2* kódující mitochondriální superoxid dismutázu, vykazuje defekt v signalizaci pomocí amoniaku a není schopen alkalizace média (Čáp et al., 2009; Ravindranath and Fridovich, 1975)

Signalizace mezi koloniemi je důležitá pro vývoj kolonií a indukuje metabolické přeprogramování, které je důležité pro přežití kolonie a diferenciaci středu kolonie (Čáp et al., 2012; Palková et al., 2002; Vachova et al., 2004, p. 2; Váchová et al., 2009; Váchová and Palková, 2005). Ve středu mikrokolonií i obřích kolonií byly identifikovány dvě hlavní subpopulace, které se navzájem liší svojí lokalizací, morfologií buněk, fyziologií, genovou expresí a metabolismem (Čáp et al., 2012; Váchová et al., 2013). Obří kolonie se začíná vertikálně diferencovat do těchto dvou subpopulací mezi 7. a 10. dnem. V horní části kolonie se nacházejí větší buňky nazvané „upper“ buňky (U buňky). Ve spodní části kolonie se nacházejí „lower“ buňky (L buňky) (Obr. 2) (Čáp et al., 2012). U buňky obsahují několik malých vakuol a velké objemné mitochondrie s malým množstvím krist. Buňky také obsahují několik velkých lipidových kapek a ukládají glykogen. Spodní vrstva L buněk má buňky menší, obsahují jednu velkou vakuolu s lipidovou kapkou a několik mitochondrií s velmi dobře vyvinutými kristami (Čáp et al., 2012).

### **Rozdíly v buněčné expresi**

Jak již bylo dříve zmíněno mezi oběma vrstvami je značný rozdíl v genové expresi. Doposud bylo popsáno několik genů typických právě pro U buňky, z nejdůležitějších to jsou např. *ATO* geny, zodpovědné za uvolňování amoniaku do média. Gen typický pro L buňky je např. *INO1*, kódující inositol-3-fosfát syntázu (Čáp et al., 2012; Donahue and Henry, 1981; Palková et al., 2002).

Pro U buňky je velmi důležitá exprese genů pro autofagii a pexofagii. Autofagie je důležitá pro životaschopnost U buněk, zatímco L buňky mají velmi nízkou hladinu autofagie. Pro U buňky je dále velmi důležitá exprese genů pro translaci, geny pro transportéry živin a iontů, dále geny podílející

se na glykolýze, pentózo-fosfátovém cyklu, biosyntéze nukleotidů a jejich transportu a metabolismu mastných kyselin v mitochondriích a peroxizómech (Čáp et al., 2012).

L buňky exprimují geny pro biosyntézu mitochondrií a oxidativní fosforylaci, mnoho genů pro chaperony, komponenty ubiquitin-proteazomového systému, některé komponenty vakuol, proteiny buněčné stěny a velké množství proteinů neznámé funkce (celkem 44 genů). Dále je zde zvýšená exprese genů metabolismu mastných kyselin, geny účastníci se odpovědi na nízkou hladinu živin, některé geny pro proteiny glukoneogeneze, hexózové transportéry a transportéry mnohačetné lékové rezistence (PDR), geny pro transkripční faktory stresové odpovědi a zpracování nefermentovatelného zdroje uhlíku (Čáp et al., 2012).

Expresí genů pro biosyntézu a transport aminokyselin je velmi důležitá pro U buňky. V rámci horní vrstvy je předpokládán vysoký obrát a syntéza aminokyselin. Vše v kontrastu s L buňkami, kde je exprese těchto genů nízká (Čáp et al., 2012).

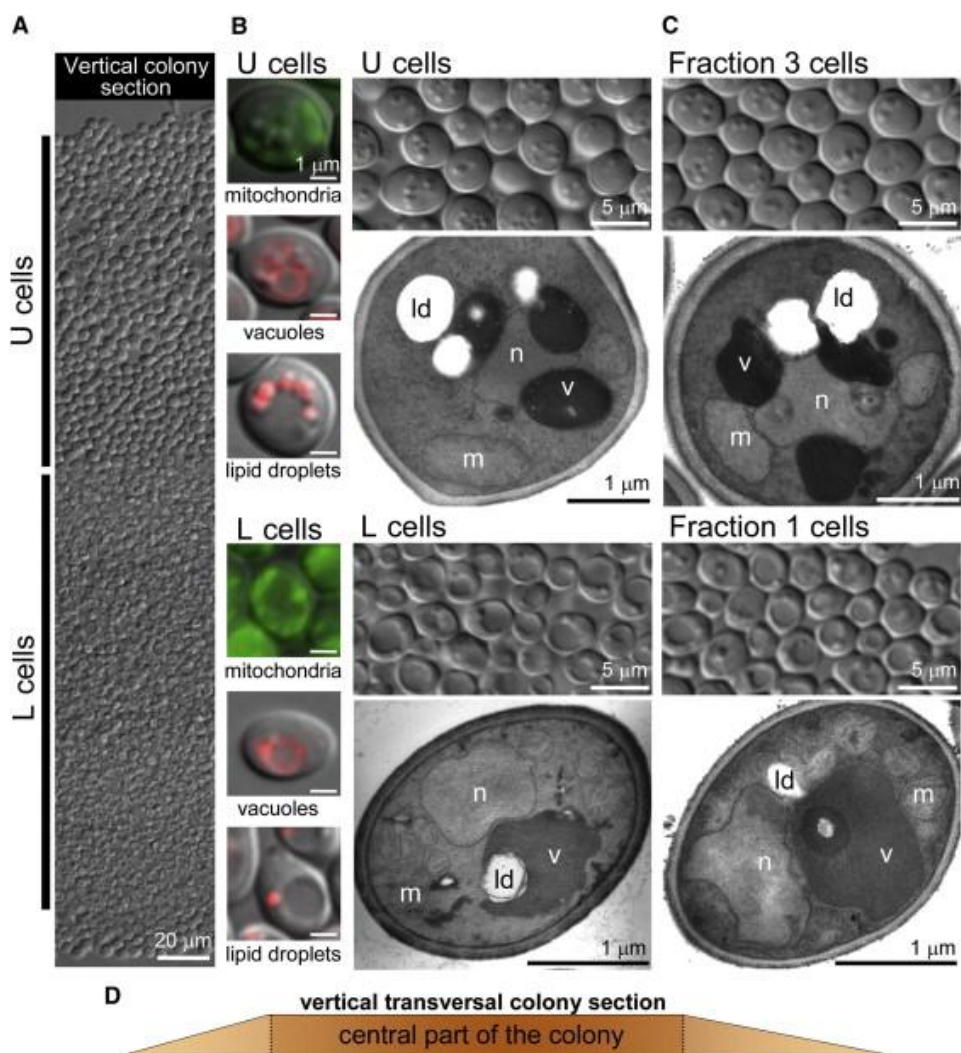
### **Životaschopnost a odolnost vůči stresu**

L buňky produkují tři krát více ROS (reaktivní kyslíkové radikály) a jsou mnohem citlivější ke stresu. Celkově mají menší šance na dlouhotrvající život než U buňky. V porovnání pouze 10 % 50-ti denních L buněk bylo schopno znovu vytvořit kolonie vůči 50 % 50-ti denních U buněk (Čáp et al., 2012).

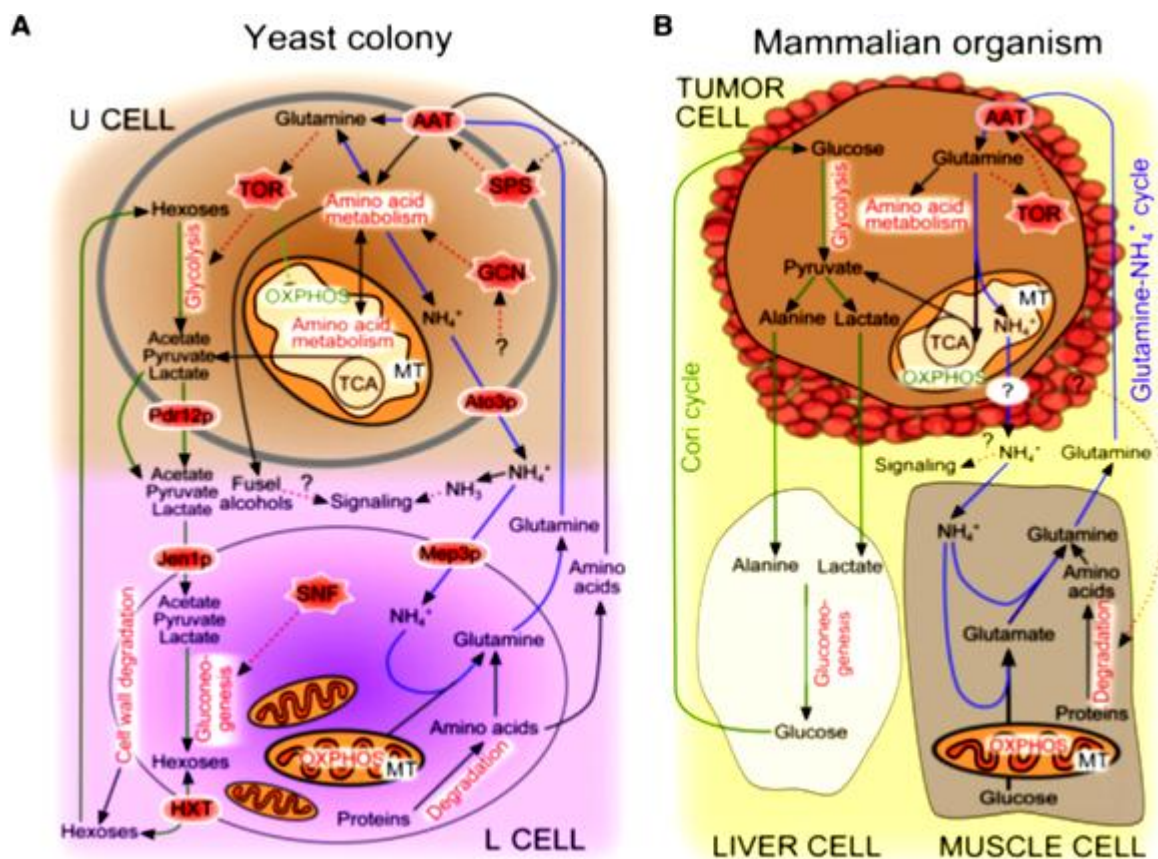
### **Metabolická charakteristika buněk**

Pro dlouhověkost U buněk je velmi důležitý metabolismus glukózy a aminokyselin. Zatímco pro L buňky by mohla být důležitá respirační kapacita. Správný metabolismus a životaschopnost L buněk je pak velmi důležitá pro přežití U buněk (Čáp et al., 2012).

Z vlastností U a L buněk vyplývá, že obě skupiny buněk by mohly navzájem interagovat. Horní vrstva U buněk má řadu vlastností, kterými se podobá buňkám nádorovým. U buňky pravděpodobně nějakým doposud neobjasněným způsobem získávají živiny z L buněk, především aminokyseliny. L buňky pak z U buněk přijímají odpadní látky jako laktát, pyruvát a acetát. U buňky tedy „vykořisťují“ L buňky. K podobné situaci dochází v lidském těle, kdy nádor parazituje na tkáni. Z tkáně bere živiny a nutí ji přijímat odpadní látky svého metabolismu. Podrobné schéma a porovnání kvasinkového modelu nádoru s buňkami nádoru v lidském těle zobrazuje Obr. 2.



Obr. 1. Diferenciace buněk ve středu kolonie kvasinky *S. cerevisiae* staré 20 dní (A). U a L buňky zobrazené pomocí Nomarski kontrastem, fluorescence a transmisního elektronového mikroskopu (B). Levá část: mitochondrie obarvení DiOC<sub>6</sub>(3), vakuoly s FM4-64, a lipidové kapénky s Nile RED. Detaily buněk jednotlivých frakcí zobrazuje C. Část D zobrazuje oblast kolonie zahrnuté do studie diferenciace kolonie (Čáp et al., 2012).



Obr. 2. Porovnání kvasinkového modelu pro studium nádorů a nádoru v těle savce. Obrázek zachycuje metabolickou diferenciaci a signalizaci mezi U a L buňkami, které jsou nápadně podobné u buněk nádoru a tkáně. Díky tomuto zjištění naši laboratoře se kvasinkové kolonie jeví jako vynikající model pro studium právě nádorových onemocnění (Čáp et al., 2012).

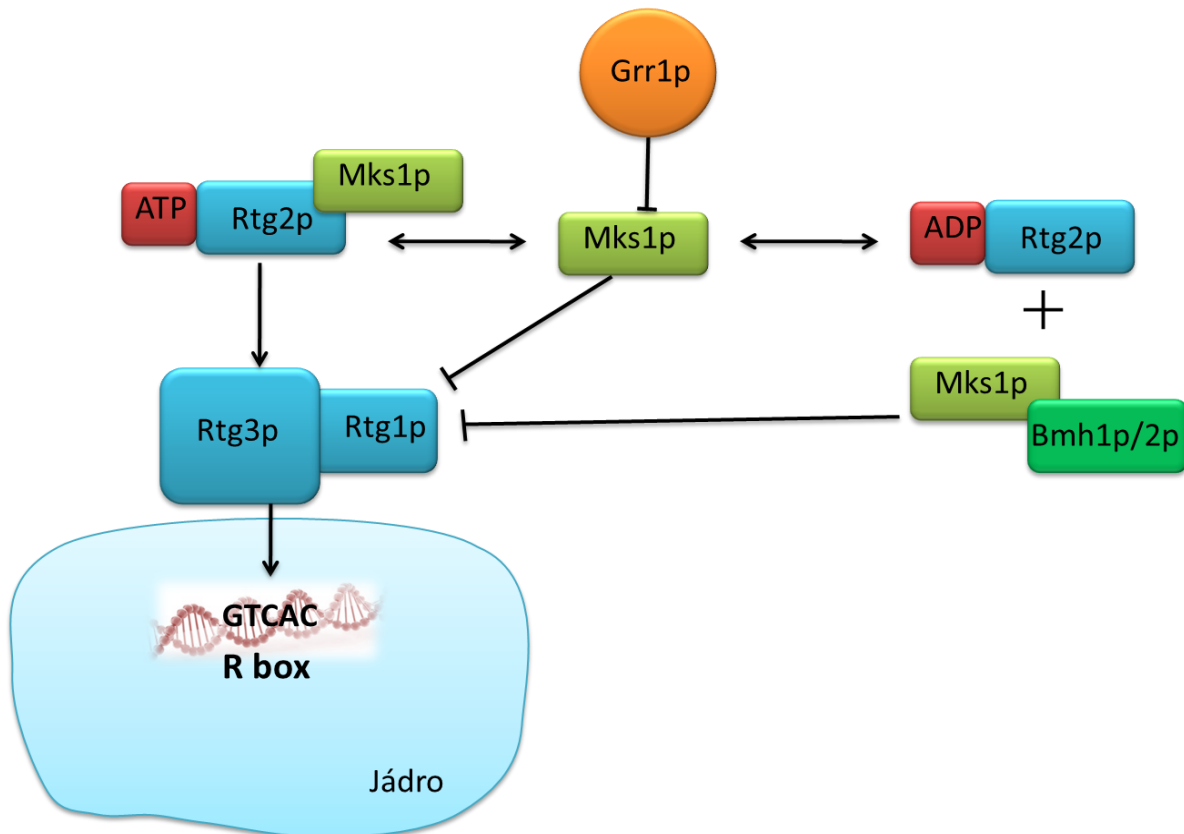
### 3.2 Retrográdní dráha

Retrográdní signalizace je obecně definovaná jako reakce na zdroj stresu nebo zhoršené životní podmínky. Tato vnitrobuněčná dráha směřuje z mitochondrií do jádra a mění expresi cílových genů, které umožní buňce překonat stresovou situaci (Epstein et al., 2001; Parikh et al., 1987; Traven et al., 2001). Retrográdní dráha byla u *S.cerevisiae* poprvé objevena v roce 1987 (Parikh et al., 1987) a postupně byly její obdoby a homologie objeveny u hád'átka *Caenorhabditis elegans* (Dillin et al., 2002; Lee et al., 2003), u savčího modelu *Mus musculus* (Liu et al., 2005) a samozřejmě i u savčích buněk (Biswas et al., 1999).

#### 3.2.1 Retrográdní dráha u *Saccharomyces cerevisiae*

U kvasinky *S. cerevisiae* byla retrográdní dráha popsána jako meziorganelová komunikační dráha mezi mitochondriemi a jádrem. Mezi hlavní pozitivní regulátory dráhy patří RTG proteiny Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p kódované geny *RTG1*, *RTG2*, *RTG3*. Proteiny Rtg1p a Rtg3p tvoří dimer Rtg1p/Rtg3p, který má v jádře funkci transkripčního faktoru. Naproti tomu protein Rtg2p je

cytoplazmatický. Velkou roli hraje translokace transkripčního faktoru do jádra. Při aktivní retrográdní dráze se dimer nachází v jádře, kde nasedá do R boxu v promotoru cílových genů. A naopak při neaktivní dráze se nalézá v cytoplazmě. Na translokaci se podílí několik regulátorů, které ovlivňují fosforylační stav a tedy lokalizaci dimeru Rtg1p/Rtg3p. Všechny tři RTG proteiny jsou pro RTG dráhu esenciální a jejich delece vede ke glutamátové auxotrofii (Chelstowska and Butow, 1995; Jia et al., 1997; Liao and Butow, 1993). Schéma retrográdní dráhy zobrazuje Obr. 3.



Obr. 3. Zjednodušené schéma retrodrádní dráhy u *S. cerevisiae*. Transkripční dimer Rtg1p/Rtg3p je regulován prostřednictvím proteinů Rtg2p a Mks1p. Mks1p je negativní regulátor, který může párovat s proteiny Rtg2p (RTG dráha je zapnutá) nebo 14-3-3 proteiny Bmh1p a Bmh2p (RTG dráha je vypnutá). Volný nepárující Mks1p je degradován Grr1p (Podholová, 2014).

Fosforylace dimeru je důležitá pro inaktivaci RTG dráhy. Fosforylovaný je protein Rtg3p na svém N-konci. Hyperfosforylovaný protein se nalézá v cytoplazmě, zatímco defosforylovaný v jádře. Translokace do jádra je zprostředkována NLS („nuclear localization sequence“) sekvencí na proteinu Rtg3p. NES („nuclear export sequence“) exportní sekvence se naopak nachází na proteinu Rtg1p. Tyto dva proteiny spolu interagují permanentně bez ohledu na aktivaci RTG dráhy a do jádra nejspíše putují jako dimer (Dilova and Powers, 2006; Komeili et al., 2000; Sekito et al., 2000). Cytoplazmatický protein Rtg2p se podílí na translokaci dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra pomocí defosforylace Rtg3p. Předpokládá se, že interakce probíhá nepřímo (Rothermel et al., 1997; Sekito et al., 2000). Rtg2p

interaguje rovněž s dalším proteinem RTG dráhy Mks1p a to pomocí ATP vazebné domény na N-konci (Ünlü et al., 2013).

K pozitivním regulátorům Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p se často řadí i protein Grr1p. Grr1p, kódovaný genem GRR1, je podjednotkou SCF<sup>GRR1</sup> E3 komplexu ubiquitinligázy. Tento protein ubiquitínuje a tím určí k degradaci volný protein Mks1p, který je negativním regulátorem RTG dráhy (Z. Liu et al., 2005).

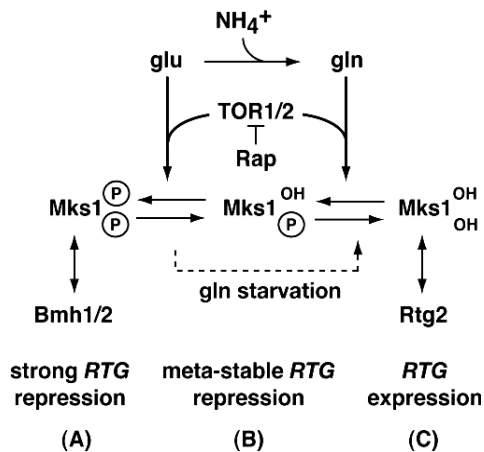
Mezi negativní regulátory RTG dráhy patří proteiny Mks1p, Bmh1p, Bmh2p a Lst8p.

Mks1p je pleiotropní negativní transkripční regulátor participující v mnoha procesech (Matsuura and Anraku, 1993). Míra fosforylace tohoto fosfoproteinu určuje jeho interakční partnery a tím ovlivňuje RTG dráhu. V cytoplazmě interaguje s dimerem Rtg1p/Rtg3p a tím zabraňuje jeho translokaci do jádra (Dilova et al., 2002; Liu et al., 2003; Sekito et al., 2002; Tate et al., 2002).

Mks1p se může vyskytovat celkem ve třech stavech (Obr. 4). Hyperfosforylovaný Mks1p se nalézá v cytoplazmě v komplexu s 14-3-3 proteiny Bmh1p a Bmh2p. V tomto stavu inhibuje RTG dráhu a dimer Rtg1p/Rtg3p se nalézá v cytoplazmě hyperfosforylovaný. Defosforylovaný Mks1p je vyvázan z vazby s 14-3-3 proteiny proteinem Rtg2p. Zároveň dochází k defosforylaci dimeru Rtg1p/Rtg3p a jeho translokaci do jádra (Dilova et al., 2004, 2002; Liu et al., 2003; Zhang et al., 2013). Semifosforylovaný Mks1p nedokáže plně inhibovat RTG dráhu a nachází se v cytoplazmě bez vazby jak 14-3-3 proteinů, tak i Rtg2p (Dilova et al., 2004, 2002). Volný Mks1p se stává substrátem pro pozitivní regulátor RTG dráhy Grr1p. Grr1p po navázání na Mks1p spustí jeho polyubiquitinaci a dochází k jeho degradaci v proteazomu (Z. Liu et al., 2005; Liu et al., 2003). Delece genu *MKS1* vede k permanentní aktivaci RTG dráhy (Ünlü et al., 2013).

Dalšími negativními regulátory nejčastěji uváděnými v literatuře jsou kvasinkové homology 14-3-3 proteinů Bmh1p a Bmh2p. Oba dva proteiny jsou navzájem zastupitelné a delece jednoho z nich nevyvolává na bohatých médiích růstové obtíže. Ovšem delece obou genů je pro většinu kmenů *S. cerevisiae* letální (Gelperin et al., 1995; Heusden et al., 1995, 1992; Roberts et al., 1997). Proteiny Bmh1p a Bmh2p interagují spolu s fosforylovaným negativním regulátorem Mks1p a váží se na jeho N-konec (Bruckmann et al., 2004; Z. Liu et al., 2005; Liu et al., 2003). V komplexu s Mks1p se prostřednictvím 14-3-3 proteinů váží na Rtg3p a inaktivují RTG dráhu (van Heusden and Steensma, 2001). V kmenech pro které není delece obou Bmh proteinů letální je exprese *CIT2* zvýšena až 40x (Liu et al., 2003).





Obr. 4. Negativní regulátor Mks1p se v buňce může vyskytovat celkem ve třech stavech. Fosforylovaný Mks1p se váže s 14-3-3 proteiny Bmh1p nebo Bmh2p. Dále semifosforylovaný Mks1p, který v buňce nalzáme při změně podmínek (například hladovění). A konečně fosforylovaný Mks1p, který se váže na Rtg2p a dochází k aktivaci RTG dráhy (Dilova et al., 2002).

Posledním negativním regulátorem je TOR dráha (Tate et al., 2002). TOR dráha negativně reguluje RTG dráhu za předpokladu, že *S. cerevisiae* roste na médiích s bohatými zdroji (Komeili et al., 2000). Pokud je RTG dráha inhibovaná rapamycinem nebo buňka nemá přístup k bohatému zdroji dusíku, dochází k inhibici TOR dráhy a k aktivaci RTG dráhy (Dilova et al., 2004; Liu et al., 2003; Sekito et al., 2002; Tate et al., 2002). Součástí TORC1 komplexu je mimo jiné i protein Lst8p. Prostřednictvím tohoto proteinu spolu s TOR reguluje translokací dimeru Rtg1/Rtg3p do jádra (Chen and Kaiser, 2003; Giannattasio et al., 2005; Roberg et al., 1997).

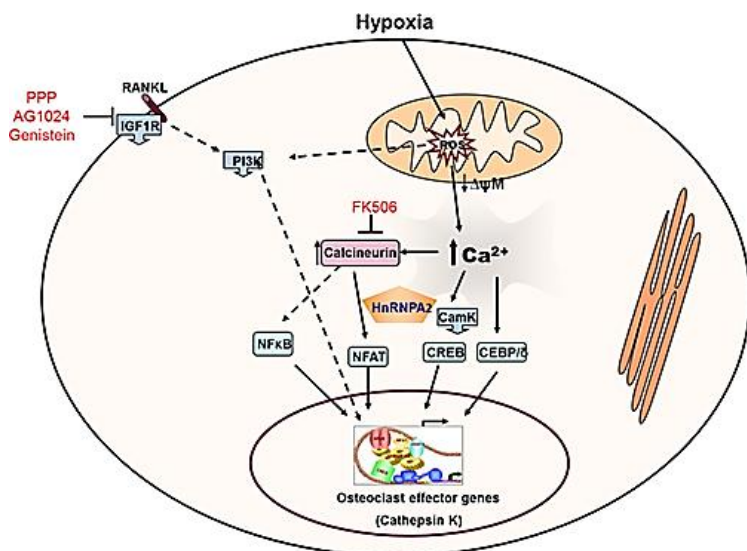
### 3.2.1.1 Spouštěče retrogradní dráhy

V současné době se spekuluje o několika možnostech, které by mohli vést ke spuštění RTG dráhy. Impulsem k interakci Rtg2p a Mks1p by mohla být klesající koncentrace ATP (Zhang et al., 2013), ztráta membránového potenciálu a vzniku ROS (reaktivních kyslíkových radikálů) (Miceli et al., 2012), či nedostatek glutamátu a špatné zdroje dusíku (Komeili et al., 2000; Tate et al., 2002). V současné době se uvažuje i o osmotickém stresu a roli proteinu Hog1p (Ruiz-Roig et al., 2012). Spouštěčem RTG dráhy budou nejpravděpodobněji všechny možnosti a jejich kombinace.

### 3.2.2 Retrogradní dráha u savců

Komunikace mezi mitochondriemi a jádrem je již několik let diskutovaným tématem a poruchy normální funkce mitochondrií (např. ztráta mtDNA nebo přerušení elektrontransportního řetězce ionoforem) ovlivňují expresi mnoha jaderných genů (Heddi et al., 1993). Retrogradní signalizace u savců (také nazývaná mitochondriální stresová signalizace) je komplexní signální dráha zahrnující několik transkripčních faktorů jako jsou NFκ-B, ATF2, CEBP/δ, NFATc a další proteiny odpovídající na zvýšenou hladinu  $Ca^{2+}$ . Retrogradní dráha je aktivovaná prostřednictvím různých signálů způsobujících mitochondriální stres jako je např. kompletní ztráta mtDNA, přerušení

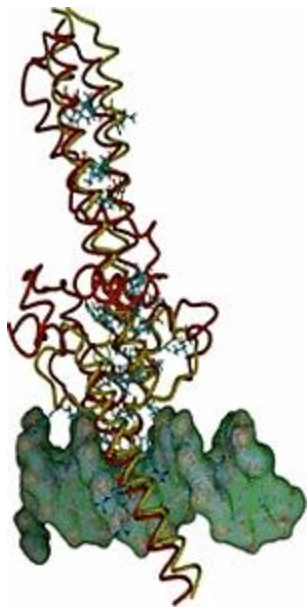
elektrontransportního řetězce ionoforem, léky, ROS anebo buněčná hypoxie (Amuthan et al., 2001; Biswas et al., 1999; Guha et al., 2015). Přehled aktivovaných signálních drah u myších makrofágů je zobrazen na Obr. 5.



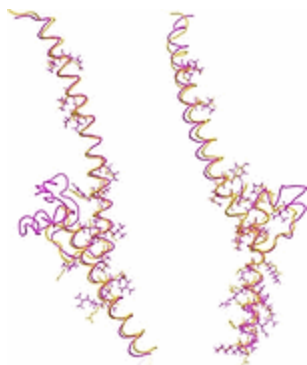
Obr. 5. Schématické shrnutí mechanismů vyvolané hypoxií, které vedou k aktivaci retrográdní dráhy u myších makrofágů. (Guha et al., 2015)

U *S.cerevisiae* retrográdní dráhu představuje skupina tří RTG proteinů (Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p). Jako transkripční faktor zde funguje dimer Rtg1p/Rtg3p, patřící do rodiny bHLHZ (helix-loop-helix leucínový zip) transkripčních faktorů. Předpokládá se, že strukturálním homologem tohoto dimeru u savců by mohl být dimer Myc/Max (Srinivasan et al., 2010). Podobnost obou transkripčních faktorů zobrazují Obr. 6 a 7. Protein Myc je onkoprotein, který v dimeru s Max reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Spolu se váží do E-boxu na DNA, který je zároveň enhancerem (Nair and Burley, 2003; Wu et al., 1999). c-Myc reguluje řadu buněčných genů účastnících se například glykolýzy, oprav DNA, apoptózu reguluje na mitochondriální úrovni, také se účastní regulace translace a mnohé další (Menssen and Hermeking, 2002). Díky časté expresi u rakovinových buněk je dimer Myc/Myx potenciálním kandidátem a cílem rakovinové terapie. Transkripční faktor Myc/Max je tedy velmi důležitým buněčným regulátorem, který je aktivován prostřednictvím NFκ-B dráhy (Jazwinski, 2013; Srinivasan et al., 2010). Homolog kvasinkového proteinu Rtg2p nebyl doposud u savců nalezen.

Savčí retrográdní dráha aktivuje řadu genů, které vedou k přizpůsobení buněk a tkání vůči stresu a prodlužují tak jejich přežívání (Biswas et al., 1999; Guha et al., 2015; Miceli and Jazwinski, 2005). Odpověď na mitochondriální stres, ztrátu mtDNA a s tím spojený pokles MMP, se velmi liší a je často tkáňově specifická (Arnould et al., 2002; Cavalli et al., 1997; Morais et al., 1994).



Obr 6. Model strukturní homologie kvasinkového Rtg1p (přední červená) a Rtg3p (zadní červená) s lidským faktorem Myc (přední žlutá) a Max (zadní žlutá) v komplexu s DNA (zelená dvoušroubovice dole) (Srinivasan et al., 2010).



Obr 7. Bližší pohled na strukturní homologii mezi Rtg1p (levá červená) a Myc (levá, žlutá) a mezi Rtg3p (pravá červená) a Max (pravá žlutá) (Srinivasan et al., 2010).

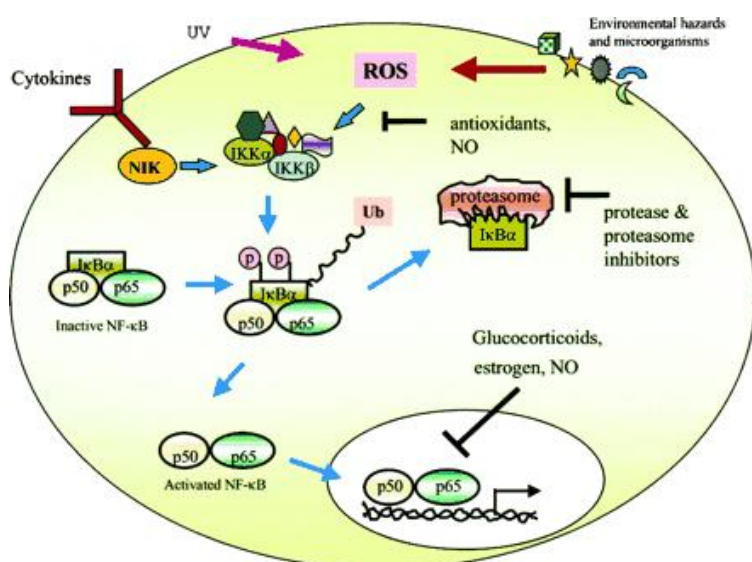
Metabolismus savčích buněk se ztrátou mtDNA se příliš neliší od  $\rho^0$  buněk kvasinek (buněk bez mtDNA), ikdyž mezi savčími buňkami jsou navzájem drobné rozdíly dle jejich tkáňového původu. V obou případech je glykolýza hlavním zdrojem ATP, zatímco glukoneogeneze byla u buněk  $\rho^0$  206B - lidské osteosarkomové linie,  $\rho^0$ ARPE19 - buněk z linie pigmentovaného epitelu sítnice a KSS fibroblastů inhibována (Epstein et al., 2001; Miceli and Jazwinski, 2005; Traven et al., 2001). Glukogeneze byla aktivovaná pouze některých typů tkání (Amuthan et al., 2002). Velmi typické je zvýšení exprese citrát syntázy (CS), genů reagující na mitochondriální stres (*SOD2*, *HOX1*, ...) a rovněž transkripčního faktoru *MYC*. Dále dochází ke zvýšení exprese genu pyruvát karboxylázy, enzymu velmi důležitého pro anaplerotické reakce. Tato reakce je podobná aktivaci glyoxylátového cyklu v peroxisomech kvasinek, který poskytuje prekurzory pro biosyntézu aminokyselin. Nicméně přes mnohé společné rysy se odpověď savčích buněk mezi sebou liší dle jejich původu a hlavně typu

metabolismu, který používají za běžných podmínek (Epstein et al., 2001; Miceli and Jazwinski, 2005; Traven et al., 2001).

Zvýšení exprese genu pro transkripční faktor *MYC* bylo společné pro všechny testované linie buněk ( $\rho^0$ 206B,  $\rho^0$ ARPE19, KSS fibroblasty). Odpověď na ztrátu mtDNA pravděpodobně vede k prodloužení života buněk. Podobně jako u *S. cerevisiae* aktivace retrográdní dráhy u savců přispívá ke zvýšení rezistence buněk vůči stresu a může pomoci objasnit rozdíly v dlouhověkosti v lidské populaci a možná i rozdíly mezi jednotlivými tumory (Miceli and Jazwinski, 2005).

### 3.2.2.1 NF- $\kappa$ B dráha

Jedna z drah odpovídající u savců na mitochondriální stimul je NF- $\kappa$ B dráha. NF- $\kappa$ B je aktivována prostřednictvím různých signálních drah, např. MAP kinázové dráhy (Norris and Baldwin, 1999), a je všeobecně známo, že odpovídá na mnoho podmětů, např. na ultrafialové záření, cytokininy, bakteriální toxiny a mnohé další. Také aktivuje celou řadu genů.



Obr 8. Schéma NF- $\kappa$ B dráhy v savcích buňkách (Chen et al., 1999).

Biswas et al, 1999 a 2003 zjistil, že NF- $\kappa$ B dráha odpovídá na stimul z mitochondrií, kdy při ztrátě mtDNA nebo přerušení elektrontransportního řetězce a následném poklesu MMP dochází k uvolnění  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy (Biswas, 2003; Biswas et al., 1999). Faktor NF- $\kappa$ B se nalézá v neaktivním stavu v cytoplazmě, v aktivním stavu v jádře, ale i v mitochondriích, kde je signální dráha odlišná od dráhy cytoplazmatické. NF- $\kappa$ B tedy reguluje jak jadernou expresi, tak i mitochondriální expresi genů (Cogswell et al., 2003). NF- $\kappa$ B je tvořen několika proteiny. Proteiny vázající se na DNA p50 a p52 (známé i jako NFKB1 a NFKB2) a proteiny regulační cRel, RelA a RelB (někdy jako REL, RELA, RELB). Proteiny p50 a p52 jsou sestřiženy z prekurzorů p105 a p100 (Lin and Ghosh, 1996).

V případě neaktivní NF- $\kappa$ B dráhy je faktor držen v cytoplasmě pomocí inhibitoru I $\kappa$ B (Baeuerle and Baltimore, 1988). I $\kappa$ B inhibitor je tvořen proteiny I $\kappa$ B $\alpha$  a I $\kappa$ B $\beta$ , jejichž funkce se liší (Biswas, 2003). Fosforylací inhibitoru a jeho degradací dojde k uvolnění transkripčního faktoru a jeho translokaci do jádra (Baeuerle and Baltimore, 1988; Brown et al., 1995; Ghosh and Baltimore, 1990; Traenckner et al., 1995). K exportu z jádra při ukončení signalizace je zapotřebí I $\kappa$ B $\alpha$ , který obsahuje adresu do jádra („nuclear localization sequence“ NLS), ale i adresu zajišťující export z jádra („nuclear export sequence“ NES) (Johnson et al., 1999). V jádře dochází k interakci NF- $\kappa$ B s I $\kappa$ B $\alpha$  a NF- $\kappa$ B disociuje z DNA. Vše za předpokladu fosforylovaného I $\kappa$ B $\beta$ . Z jádra se oba proteiny dostávají v komplexu I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B (Johnson et al., 1999; McKinsey et al., 1997). Jaderný exit I $\kappa$ B $\alpha$  je důležitý pro inaktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. I $\kappa$ B $\alpha$  hraje důležitou roli v translokaci Rel proteinů z jádra do cytoplasmy a ukončení signalizace. Naproti tomu je I $\kappa$ B $\beta$  striktně cytoplazmatický protein (Biswas, 2003).

I $\kappa$ B $\beta$  a I $\kappa$ B $\alpha$  mají dvě fosforylační místa, která se nachází v tzv. PEST doméně na Ser313 a Ser315 (Brown et al., 1995; Chu et al., 1996; McKinsey et al., 1997). Fosforylací I $\kappa$ B $\beta$  a I $\kappa$ B $\alpha$  zprostředkovává serin/treoninová kináza CKII. Základní úroveň fosforylace I $\kappa$ B $\beta$  je důležitá pro stabilitu NF- $\kappa$ B, kdy je I $\kappa$ B $\alpha$  defosforylovaný. Pokud odstraníme Ser313 a Ser315 dochází k permanentní aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. Fosforylace I $\kappa$ B $\alpha$  vede k jeho degradaci (Chu et al., 1996; Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996; McKinsey et al., 1997; Schwarz et al., 1996). Faktory I $\kappa$ B $\beta$  i I $\kappa$ B $\alpha$  jsou defosforylované pomocí calcineurin (Cn). Zároveň je PEST doména důležitá pro vlastní interakci mezi calcineurinem a I $\kappa$ B $\beta$  (kritická jsou právě místa S513 a S515). Tato defosforylace je klíčová pro aktivaci faktoru NF- $\kappa$ B. Podjednotka calcineurinu CnA způsobuje defosforylací a snížení I $\kappa$ B $\beta$  v cytoplasmě pomocí degradace, ale na I $\kappa$ B $\alpha$  nemá vliv (Biswas, 2003).

I $\kappa$ B $\alpha$  a I $\kappa$ B $\beta$  se od sebe zásadně liší svojí funkcí (Biswas, 2003). U buněk se sníženým obsahem mtDNA nebo vystavených působením inhibitorů respiračního řetězce dochází ke zvýšení cytoplazmatického I $\kappa$ B $\alpha$  a snížení I $\kappa$ B $\beta$  (Biswas, 2003).

### 3.2.3 Průběh retrográdní dráhy a jeho složitost u savčích buněk

Retrográdní dráha vede k aktivaci exprese širokého spektra genů pro proteiny podílející se na čerpání Ca<sup>2+</sup> z a do cytoplazmy (RyR1, RyR2, calreticulin, calsequestrin), v metabolismu a transportu glukózy (Glut 4, IGF1R, hexokinázy, fosfoenolpyruát karboxylázy, IRS1), onkogenezi (cathepsin L, myší antigen myelomu, cJun, RelA, cRel, TGF $\beta$ 1, p53 a cMyc), apoptóze (Bcl-2, Survivin, BAD, Bax, Bid) a proteiny podílející se na mitochondriální struktuře a funkci (COX Vb, COX IV, TOM40) (Biswas et al., 2005, 1999). Mitochondriální signalizace je zodpovědná za regulaci exprese mnoha jaderných genů, které kódují proteiny s odlišnou lokalizací a funkcí (Amuthan et al., 2001).

Ztráta mtDNA vede k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), ale i změně morfologie buňky. Dále má vliv na zvýšení basální koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytoplasmě, zřejmě vlivem snížení ATP. Zvedá se exprese genu pro ryanodinový receptor 1 (RyR-1), který je kanálem pro transport Ca<sup>2+</sup> a dochází ke změnám tří Ca<sup>2+</sup> dependentních signálních drah (Amuthan et al., 2001;

Biswas et al., 1999). U buněk se sníženým obsahem mtDNA i u buněk vystavených působení inhibitorů respiračního řetězce (CCCP, valinomycin) dochází ke ztrátě MMP a poklesu ATP, což vede ke zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě. Zvýšení  $Ca^{2+}$  vede k iniciaci na vápníku závislých změnách v jaderné expresi (Biswas et al., 1999).

Buňky se sníženým obsahem mtDNA vykazují snížení proteinu Rel A, Rel podjednotky NF- $\kappa$ B, a naopak zvýšení p50. Kromě RelA může faktor NF- $\kappa$ B být tvořen několika dalšími faktory (Chen et al., 1999). Exprese heterodimeru cRel/p50 stoupá u buněk se sníženým obsahem mtDNA nebo u buněk vystavených působení inhibitorů respiračního řetězce. Heterodimer NF- $\kappa$ B, tvořený p50 a cRel, je ovlivněn zvýšenou hladinou  $Ca^{2+}$ . U buněk se zapnutou retrográdní drahou má zvýšenou expresi a je aktivní v jádře (Biswas, 2003; Biswas et al., 1999).

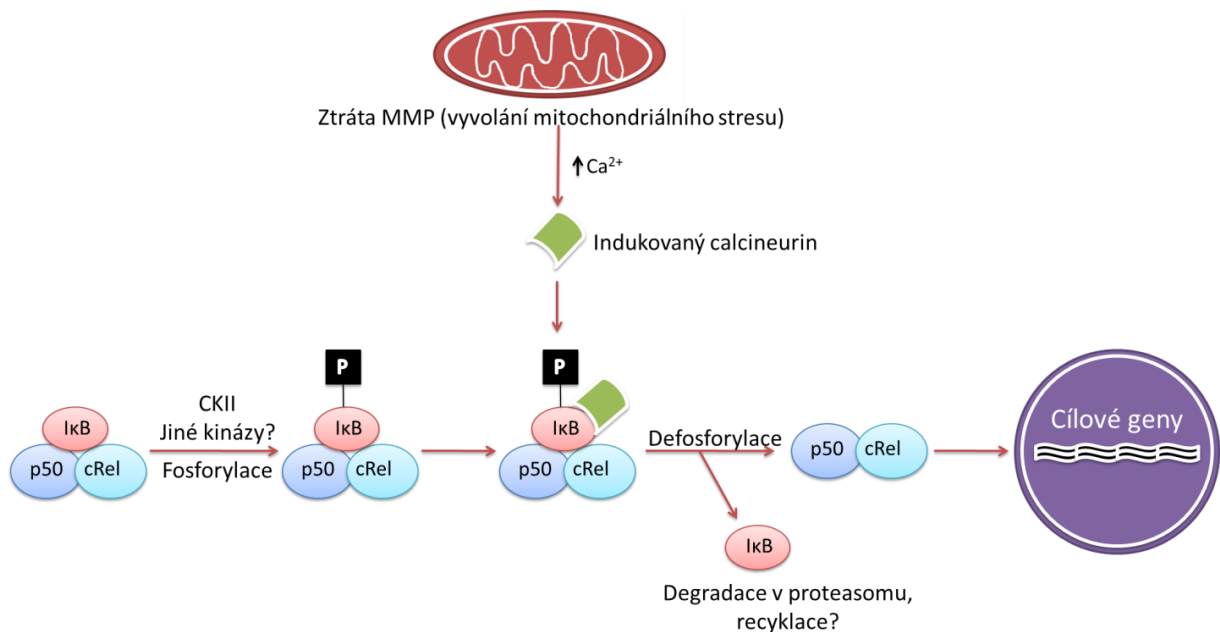
Při zjišťování podobnosti mezi změnami závislými na  $Ca^{2+}$  a odpovědí na ztrátu mtDNA nebo při použití inhibitorů respiračního řetězce se ukázalo, že v obou případech došlo ke zvýšení hladiny podjednotky calcineurinu CnA, negativního regulátoru I $\kappa$ B (Biswas et al., 1999). Tyto změny způsobily aktivaci tří drah PKC, MAP a JNK, které dále aktivovaly transkripční faktory ATF2, CEBP/ $\delta$ , CREB, Erg-1 a CHOP u C2C12 myocytů (Obr. 9) a A549 rakovinových buněk plic (Biswas et al., 2005, 1999). U  $p^0$  buněk fibrosarkomu mitochondriální stres indukoval CamK IV a CREB, zatímco stres vyvolaný nadměrným množstvím špatně sbalených proteinů vedl k indukci MAPK a tím ke zvýšení exprese CHOP (Biswas et al., 2005).

Calcineurin je cytoplasmatická,  $Ca^{2+}$  dependentní protein fosfatáza, která se podílí na  $Ca^{2+}$  zprostředkované signalizaci (Guerini and Klee, 1989) a obsahuje katalytickou podjednotku CnA, která defosforyluje cílové proteiny (Shibasaki et al., 1996). Druhá podjednotka CnB reguluje aktivitu katalytické podjednotky (Milan et al., 1994). Katalytická podjednotka CnA je až desetkrát zvýšená u buněk se sníženým obsahem mtDNA. Rovněž je zvýšená hladina calcineurin dependentního faktoru NFATc (Biswas et al., 1999). Sám calcineurin není aktivovaný přímo  $Ca^{2+}$  ionty, ale přes calmodulin (Klee et al., 1988). Calcineurin pak sám fyzicky interaguje s I $\kappa$ B $\beta$ -NF- $\kappa$ B komplexem (Biswas, 2003).

Tyto výsledky ukazují, že mitochondriálním stresem zprostředkována retrográdní  $Ca^{2+}$  signalizace ovlivňuje aktivitu několika klíčových regulačních proteinů a také aktivitu tří odlišných transkripčních faktorů reagujících na protizánětlivé odpovědi. Dále, že tři různé signální dráhy NF- $\kappa$ B, JNK a NFATc jsou aktivní a hovoří se o nich jako o retrográdní dráze. Pro aktivaci retrográdní dráhy stačí jen mírné snížení obsahu mtDNA (asi 20 %) doprovázené snížením koncentrace ATP (20 – 25 %) (Biswas et al., 1999).

U buněk se sníženým obsahem mtDNA nebo buněk vystavených působení oligomycinu dochází k padesátiprocentnímu snížení hladiny ATP oproti kontrole. Na syntézu ATP používají buňky vystavené mitochondriálnímu stresu mimo mitochondriální zdroje, což potvrzuje zvýšená aktivita hexokinázy, prvního enzymu glykolýzy. Paradoxně byla zvýšena i aktivita PEPCK, prvního enzymu glukoneogeneze. V buňkách A549 vystavených mitochondriálnímu stresu dochází k aktivaci obou protichůdných drah – glykolýze i glukoneogenesi (Amuthan et al., 2002). Dále dochází ke zvýšení

fosforylace MAP kináz ERK1 a ERK2, zvýšení aktivity transkripčních faktorů Erg-1, ATF2 a NFATc. Dále došlo ke zvýšení exprese cathepsinu L a jeho exkreci do okolí buněk (Amuthan et al., 2002). U osteoclastů dochází při aktivované retrográdní signalizaci k nadměrné aktivaci cathepsinu K, který je odpovědný za degradaci kostní matrix. Nadměrná degradace může vést až k osteoporóze (Guha et al., 2015). ERK1 a ERK2 jsou fosforylovány pouze u A549 a HeLa buněk ne u C2C12. Tyto rozdíly opět potvrzují specifiku odpovědi retrográdní dráhy podle typu buněk (Amuthan et al., 2002).



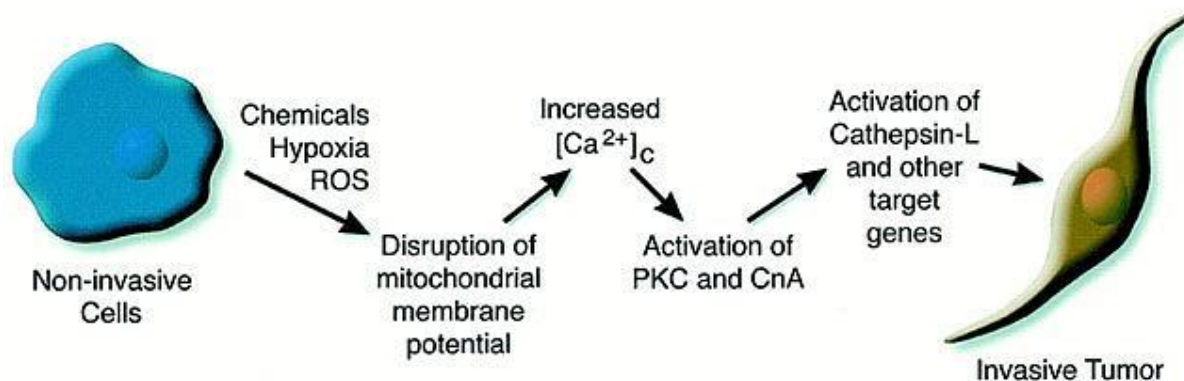
Obr. 9. Retrográdní dráha u myoblastů C2C12 (Biswas, 2003).

### 3.2.4 Invazivita buněk s aktivovanou retrográdní drahou

Genetický a metabolický stres ovlivňující mitochondriální membránový potenciál mění buňky, které za normálních podmínek netvoří nádory a jsou neinvazivní, na buňky vysoce tumorogenní s invazivním fenotypem (Amuthan et al., 2001). Role retrográdní dráhy v progresi a invazivitě buněk je omezená pouze na některé typy nádorů (Amuthan et al., 2002).

U buněk C2C12 a A549 se sníženým obsahem mtDNA a u buněk vystavených působení inhibitorů respiračního řetězce (CCCP) dochází ke zvýšení TGF $\beta$ , calsequestrinu, calreticulinu a cathepsinu L, který je všeobecně považován za marker invazivních buněk. Jeho indukce vede k zvýšení invazivity buněk (Obr. 10). Kromě zvýšení těchto proteinů byla pozorována aktivace PKC dráhy, která se zřejmě podílí na aktivaci kromě jiného právě cathepsinu L (Amuthan et al., 2002, 2001). Expresce cathepsinu a TGF $\beta$  je snížena na polovinu při nadprodukci inhibitoru I $\kappa$ B $\beta$ , což poukazuje na parciální vliv transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B na expresi cathepsinu a TGF $\beta$  (Amuthan et al., 2002).





Obr 10. Přeměna neinvazivní buňky na invazivní a tumorogenní buňku. Po přerušení MMP dochází k zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplasmě, které aktivují PKC a CnA dráhy. Dochází ke zvýšení exprese cathepsinu-L a přeměně buňky na invazivní a tumorogenní buňku (Amuthan et al., 2001).

### 3.2.5 Retrográdní dráha a apoptóza

Zvýšená invazivita buněk bez mtDNA je přímo nebo nepřímo asociovaná s resistencí vůči apoptóze (Amuthan et al., 2002). Staurosporin (STP) je obecný inhibitor protein kináz u buněk vystavených jeho působení způsobuje pokles MMP a indukuje apoptózu.

U buněk se sníženým obsahem mtDNA a buněk opůsobených ionoforem CCCP se zvyšuje exprese apoptických proteinů BAD, Bid a Bax stejně jako anti-apoptických proteinů Bcl-2 a Survivinu (Biswas et al., 2005; shrnuto v Martinou and Youle, 2011; shrnuto v Wang and Youle, 2009). Ve stresových podmínkách vyvolaných STP byla velmi snížena aktivita sestříhu proteinu p21 Bid (Biswas et al., 2005).

Sestřih proteinu p21 Bid na jeho aktivní p17 Bidt brání spuštění apoptózy a zvyšuje rezistenci buněk s aktivovanou retrográdní drahou vůči apoptóze. Pokud je in vitro k buňkám vystaveným působení mitochondriálního stresu externě přidaná sestřižená aktivní forma 17kD Bidt dochází k uvolnění cytochromu c do cytoplazmy a aktivaci apoptózy i u těchto buněk. Tento experiment potvrzuje důležitost sestřížení p20 na aktivní formu p17 Bidt (Biswas et al., 2005). Sestřih je aktivován pomocí kaspázy 8, jedné z časných kaspáz, která u buněk bez mtDNA není funkční nebo zcela chybí. Pro aktivaci kaspázy 8 je potřeba jejího sestříhu. Neaktivní se vyskytuje ve formě pro-kaspázy (Biswas et al., 2005).



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Laboratorní přístroje

analytické váhy Sartorius CPA225D-0CE

CERTOCLAV

fluorescenční binolupa Leica MZ16F

fluorescenční mikroskop Leica DMR

Fotoaparát Olympus C-5060

generátor vysokého napětí „Gene Pulser Apparatus“ (Bio-Rad)

horizontální laminární box ESCO EQU/04EHC

horizontální třepačka GFL

horkovzdušná třepačka BioTRADE INFORS-HT

hybridizační pec ProBlot (Labnet International)

kamera barevná JENOPTIK ProgRes CT3

kamera barevná Nikon DS-U1

kamera monochromatická Cohu

kamera monochromatická JENOPTIK ProgRes MFcool

magnetické míchadlo s ohřevem IKARA basic 2

mikrocentrifuga a centrifuga s výkyvným rotorem Boeco Germany UNIVERSAL 32R

mikrocentrifuga Micro20 (Hettich)

mikrocentrifuga Spectrafuge 24D (Labnet International)

mikroton Leica VT 1200 S

NANODROP1000 spektrofotometr (Thermo Scientific)

PCR termocycler BioER GenePro

PCR termocycler gradientový BIOER XP cyklér

pH-metr (Mettler Toledo)

předvážky KERN PCB

předvážky Scout

spektrofotometr S1200 (WPA Spectrawave Biochrom)

termostaty TERMOBOX LBT 168

transilluminator (HeroLab)

UV transiluminátor „Electronic Dual light™“

vortex Genie 2 (Scientific Industries)

vyhřívavý bloček (Torrey Pines Scientific INC)  
 WARTEX ROWAPUR 40  
 WARTEX ULTRAPUR  
 zdroj EBQ 100 Isolated  
 zdroj pro elektroforézu (E-C Apparatus Corporation)

#### 4.1.2 Chemikálie

Seznam chemikálií zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1. Seznam chemikálií používaných při přípravě roztoků a médií.

Název	Zkratka	Výrobce
10 mM dNTP		Top-Bio
6x DNA Loading Dye		MBI Fermentas
Acetát (Octan) litný	LiAc	Sigma-Aldrich
Agar		Dr. Kulich Pharma
Agaróza		Sigma-Aldrich
Agaróza, For Routine Use (DNase and RNase free)		Amresco
Akrylamid	AA	MP Biomedicals
Bromkresolový purpur	BKP	Sigma-Aldrich
Combi PPP PCR Master Mix		Top-Bio
D-glukóza		Lach-Ner
dH <sub>2</sub> O (PCR)		Top-Bio
dihydrogenfosforečnan draselný	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PENTA
Dimetyl sulfoxid (pro PCR)	DMSO	Top-Bio
DNA ze sledě obecného sperma lyofilizováno NaCl	ssDNA	Boehringer Mannheim
Dodecylsulfát sodný	SDS	Serva
Dusíkaté báze bez aminokyselin a síranu amonného	YNB	DIFCO
Emerald Amp GT PCR Master Mix		TaKaRa
Emerald Amp Max PCR Master Mix		TaKaRa
Etanol 96% (v/v)	EtOH	Penta, Lach-Ner
Ethidiumbromid	EtBr	M.G.P.
Etylendiamintetraacetát	EDTA	EDTA
Fenol		Sigma-Aldrich
Glycerol bezvodý	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Lach-Ner
Glycin	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich

Histidin	HIS	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner, PENTA
Hydrogenfosforečnan draselný	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PENTA
Chlorid draselný	KCl	PENTA
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý	CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Lachema
Izopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Lach-Ner
Kvasničný autolyzát (pro mikrobiologii)		Imuna
Kvasničný autolyzát (šarže 41)		IMUNA PHARM
Kyselina chlorovodíková (35%)	HCl	PENTA
LA DNA polymerázový mix LA DNA Pol Mix		Top-Bio
LA pufr		Top-Bio
Leucin	LEU	Serva
Lysin	LYS	Serva
Octan sodný bezvodý	CH <sub>3</sub> COONa (NaAc)	Lach-Ner
Pepton (pro bakteriologii)		Eurex Medica
Persteril®36	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	Dr. Kulich Pharma
Polyetylglykol	PEG	Sigma-Aldrich
Síran amonný	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lach-Ner
Síran hořečnatý	MgSO <sub>4</sub>	HiChem s.r.o.
Tris(hydroxymetyl)aminometan	Tris	Serva
Uracil	URA	Sigma-Aldrich

### 4.1.3 Roztoky

Seznam roztoků zobrazuje Tab. 2.

Tab. 2. Seznam a složení běžně používaných roztoků v této diplomové práci.

Název roztoku	Složení
0,1 % Wickerhamův roztok	0,2 mg biotin, 200 mg inositol, 20 mg riboflavin, 40 mg thiamin, 20 mg kyselina p-aminobenzoová, 40 mg pantothenát vápenatý, 40 mg kyselina nikotinová, 0,2 mg kyselina listová, 100 ml H <sub>2</sub> O
1 % agarózový gel	0,3 g agarózy rozvařeno v 30 ml 0,5x TBE
1 M LiAc	10,2 g CH <sub>3</sub> COOLi na 100 ml H <sub>2</sub> O

1000 x Ethidium bromid	10 mg ethidium bromidu na 1 ml H <sub>2</sub> O
2 M zásobní roztok NaOH	0,4 g NaOH na 5 ml H <sub>2</sub> O
20 mM roztok NaOH	50 µl zásobního roztoku do 4,950 ml H <sub>2</sub> O
3 % agaróza	0,3 g agarózy rozvařeno v 10 ml H <sub>2</sub> O pro 4 vzorky
3 M NaAc	24,6 g CH <sub>3</sub> COONa na 100 ml H <sub>2</sub> O
50 % PEG	30 g polyethylenglykolu doplnit H <sub>2</sub> O do 60 ml
BKP v EtOH	100 mg na 10 ml 96 % EtOH
EDTA pH 8	93,75 g na 500 ml H <sub>2</sub> O, poté upraveno pH na 8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g na 10 ml H <sub>2</sub> O
HIS	5 mg na 1 ml H <sub>2</sub> O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g na 10 ml H <sub>2</sub> O
LEU	5 mg na 1 ml H <sub>2</sub> O
LYS	5 mg na 1 ml H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g na 10 ml H <sub>2</sub> O
RNAasy A	10 mg ribonukleasy A, 10 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 3,5 µl 5 M NaCl, doplnit redestilovanou H <sub>2</sub> O do 1 ml; takto připravený roztok byl 15 min. povařen, pomalu ochlazen a dále skladován při teplotě -20°C
URA	2 mg na 1 ml H <sub>2</sub> O
TBE 0,5 x	100 ml zásobního TBE na 900 ml H <sub>2</sub> O
zásobní TBE	53 g TRIS, 22,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) na 1 l H <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.1 Antibiotika

Antibiotika použitá při práci s mutantními kmeny jsou shrnuta v Tab. 3.

Tab. 3. Tabulka zobrazuje použitá antibiotika. Edicin sloužil k inhibici růstu bakterií. G418, hygromycin B a nurseothricin jako selekční antibiotika použitá po transformaci kmenů.

Antibiotika		
G418 disulfate salt	418	Sigma-Aldrich
edicin		Sandoz
hygromycin B	hph	Sigma-Aldrich
nurseothricin	nat	Werner BioAgents

#### 4.1.4 Média

##### 4.1.4.1 Tekutá média

YEPG tekuté

- 1 % kvasniční autolyzát pro mikrobiologii
- 1 % pepton pro bakteriologii
- 2 % D-glukóza (sterilizace probíhá odděleně)

Minimální médium (MM)

- 5 g glukózy v 232 ml vody
- 2,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g/10 ml)
- 2,5 ml  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/10 ml)
- 2,5 ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5g/10 ml)
- 250  $\mu\text{l}$  Wickerhamův roztok 0,1%

Auxotrofie BY4742:

- 2,5 ml LYS (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml LEU (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml HIS (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml URA (2 mg/1 ml)
- Jednotlivé složky se sterilizují odděleně

MD médium (Dilova and Powers, 2006)

- 0,8 % YNB – Dusíkaté báze bez aminokyselin a síranu amonného
- 2 % D-glukóza
- Jednotlivé složky se sterilizují odděleně

Skladovací médium

- 60 % glycerol
- 10% D-glukóza
- 2% pepton pro bakteriologii
- 1% kvasniční autolyzát pro mikrobiologii
- Sterilizace probíhá v mikrozskumavkách se speciálním uzávěrem po 1 ml

##### 4.1.4.2 Pevná média

YEPGA médium

- 1 % kvasniční autolyzát pro mikrobiologii

- 1 % pepton pro bakteriologii
- 2 % D-glukóza
- Jednotlivé složky se sterilizují odděleně

#### YEPGA médium s antibiotikem

Příprava jako YEPGA médium, po sterilizaci přidáme na 1 l média antibiotikum:

- 400 mg G418 sulfátu disodného
- 400 mg hygromycinu B
- 200 mg nurseotricinu
- 20 mg edicinu (inhibice růstu bakterií)

#### GMA médium 1 l

10 g kvasničného autolyzátu číslo šarže 41. (celkem 1%) do 100 ml, upraveno na pH 5, poté přidat 300 ml destilované H<sub>2</sub>O

- do 530 ml 20 g agaru celkem (2%) a 30 ml bezvodého glycerolu
- 10 ml CaCl<sub>2</sub> (1M)
- 10 ml D-glukóza (5%)
- 10 ml uracil (2mg/ml)
- Jednotlivé složky sterilizovat odděleně
- 10 ml 96 % etanolu

#### GMA médium 1l s BKP

Příprava jako GMA médium, po sterilizaci přidáme 100 mg BKP (bromcresolpurple) rozmíchaného v 10 ml 96% etanolu

#### Minimální médium (MMA)

- 5 g glukózy ve 132 ml H<sub>2</sub>O
- 5 g agaru ve 102,5 ml H<sub>2</sub>O
- 2,5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g/10 ml)
- 2,5 ml MgSO<sub>4</sub> (0,5 g/10 ml)
- 2,5 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5g/10 ml)
- 250 µl Wickerhamův roztok 0,1%
- Auxotrofie BY4742:
- 2,5 ml LYS (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml LEU (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml HIS (5 mg/1 ml)
- 2,5 ml URA (2 mg/1 ml)

Jednotlivé složky se sterilizují odděleně

#### 4.1.5 Použitý mikroorganismus

*S. cerevisiae* BY4742 (MAT $\alpha$ , *his3* $\Delta$ , *ura3* $\Delta$ , *leu2* $\Delta$ , *lys2* $\Delta$ ) byl získán ze sbírky evropského archivu *S. cerevisiae* pro funkční analýzu EUROSCARF (European Saccharomyces cerevisiae archiv for functional analysis).

Kmen BY4742 je odvozen od laboratorního kmene S288C.

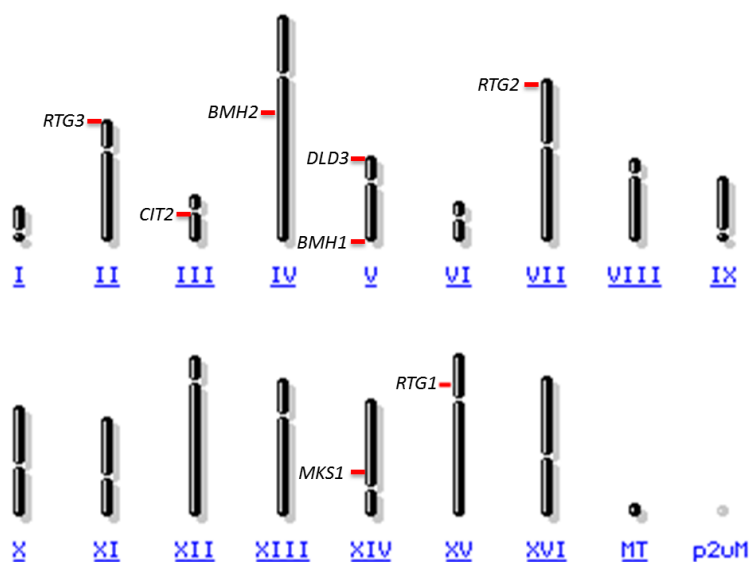
#### 4.1.6 Geny související s RTG dráhou

Pro diplomovou práci bylo vybráno celkem sedm genů, jejichž přehled přináší Tab. 4. Přibližnou lokalizaci genů v rámci genomu kvasinky *S. cerevisiae* ukazuje Obr. 11. Geny můžeme rozdělit do tří skupin: Geny kódující klíčové aktivátory RTG dráhy (*RTG1*, *RTG2* a *RTG3*), geny pro negativní regulátory (*MKS1*, *BMH1* a *BMH2*) a geny, které jsou RTG dráhou regulovány (*CIT2* a *DLD3*).

Tab. 4. Přehled vybraných kmenů pro studium retrográdní dráhy. Tabulka shrnuje všechny geny, jejich proteiny, funkci a stručný popis proteinů a lokalizaci v genomu *S. cerevisiae*.

Gen	Protein	Funkce	Chromosom
<i>CIT2</i>	citrátsyntáza 2, peroxisomální isoforma	katalyzuje kondenzaci acetylkoenzymu A a oxalacetátu za vzniku citrátu, je součástí glyoxalátového cyklu v peroxisomech	3
<i>DLD3</i>	D-laktát dehydrogenáza	katalyzuje reverzní přeměnu laktátu na pyruvát, je součástí katabolismu glukózy, nachází se v cytoplazmě	5
<i>RTG1</i>	bHLH transkripční faktor	Součástí meziorganelové komunikace, mezi mitochondriemi a jádrem, tvoří dimer s proteinem Rtg3p	15
<i>RTG2</i>	cytoplasmatický regulátor translokace dimeru Rtg1p/Rtg3p	spouštěč retrográdní dráhy prostřednictvím translokace dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra	7
<i>RTG3</i>	bHLH transkripční faktor	součástí meziorganelové komunikace, mezi mitochondriemi a jádrem, tvoří dimer s proteinem Rtg1p	2
<i>MKS1</i>	multikopiová kináza, pleiotropický negativní	negativní regulátor Ras-cAMP dráhy, biosyntézy lysinu a součástí	14

	transkripční regulátor	dusíkové regulace; retrogradní dráhy	
<i>BMH1</i>	14-3-3 protein, majoritní isoforma	ovlivňuje množství signálních drah, v rámci retrogradní dráhy působí jako negativní regulátor, částečně zastupitelný Bmh2p	5
<i>BMH2</i>	14-3-3 protein minoritní isoforma	ovlivňuje množství signálních drah, v rámci retrogradní dráhy působí jako negativní regulátor	4



Obr. 11. Přibližné umístění genů *CIT2*, *DLD3*, *RTG1*, *RTG2*, *RTG3*, *MKS1*, *BMH1* a *BMH2* v genomu kvasinky *S. cerevisiae*. Jak je patrné z obrázku, geny se nenacházejí v genových klastrech ani blízko sebe, ale jsou roztroušeny po genomu.

#### 4.1.7 Seznam připravených kmenů

Bylo připraveno celkem 31 kmenů (Tab. 5): i) kmeny nesoucí příslušné geny fúzované s GFP pro monitorování hladiny fluorescence a tedy exprese příslušného genu v jednotlivých buněčných subpopulacích kolonií, ii) kmeny s delecí/emi příslušných genů a iii) kmeny s různými kombinacemi delece a genu fúzovaného s GFP.



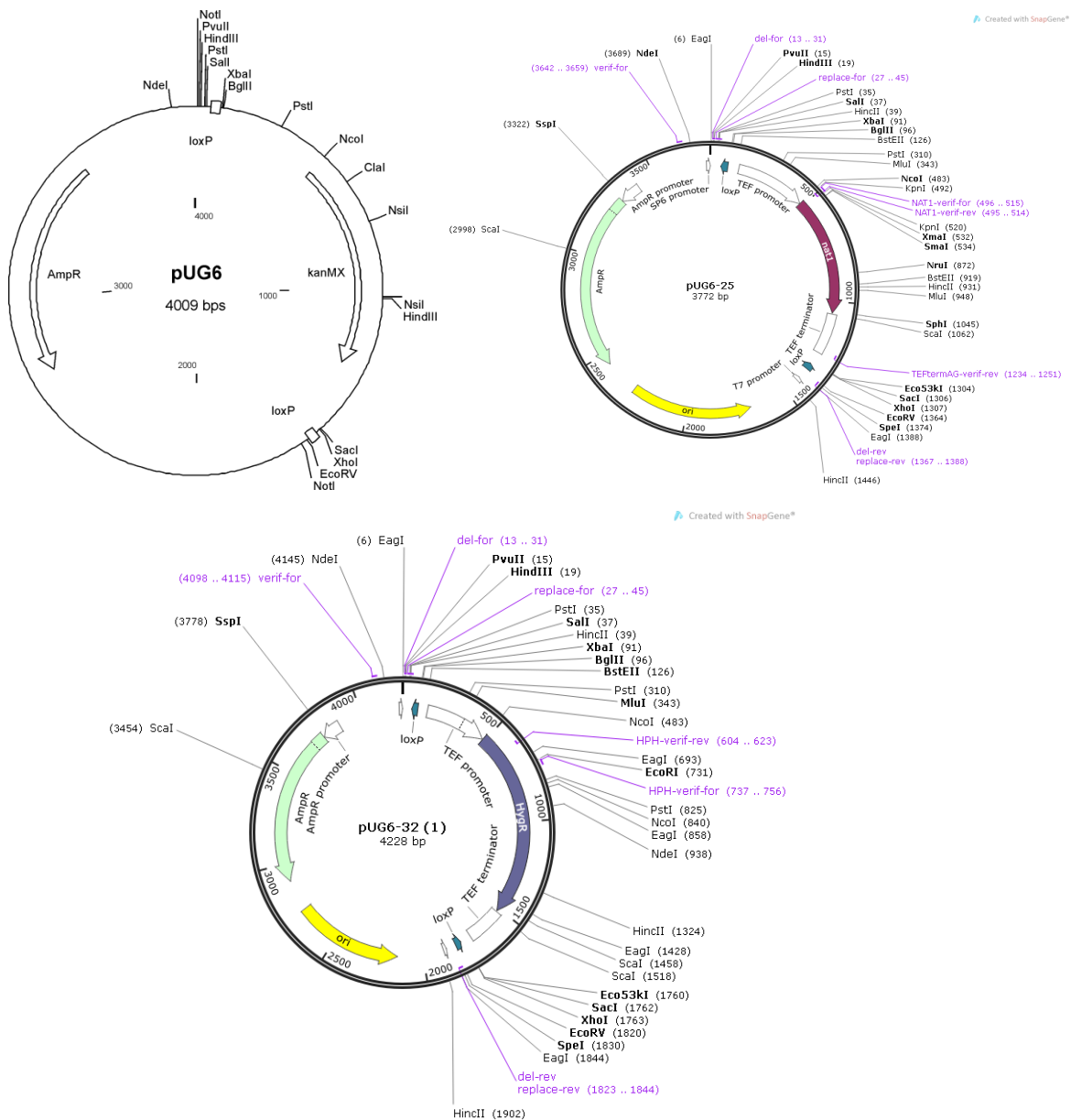
Tab. 5. Přehled připravených kmenů včetně použitého plazmidu pro konstrukci kazety a selekčního markeru. Pozn. Kmeny označené \* byly připraveny ve spolupráci s Mgr. V. Plockem.

Název kmene	Rodičovský kmen	Použitý plasmid, selekční marker
BY-Cit2p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg1p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg2p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg3p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Mks1p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Dld3p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-rtg1Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg2Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg3Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg1Δ Dld3p-GFP	BY-rtg1Δ	pKT127, kanamycin
BY-rtg2Δ Dld3p-GFP	BY-rtg2Δ	pKT127, kanamycin
BY-rtg3Δ Dld3p-GFP	BY-rtg3Δ	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Rtg1p-GFP	BY-Rtg1p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Dld3p-GFP	BY-mks1Δ	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ rtg1Δ*	BY-mks1Δ	pUG6-35, hygromycin
BY-mks1Δ rtg2Δ*	BY-mks1Δ	pUG6-35, hygromycin
BY-mks1Δ rtg3Δ*	BY-mks1Δ	pUG6-35, hygromycin
BY-mks1Δ Cit2p-GFP rtg1Δ	BY-mks1Δ Cit2p-GFP	pUG6-32, hygromycin
BY-mks1Δ Cit2p-GFP rtg2Δ	BY-mks1Δ Cit2p-GFP	pUG6-32, hygromycin
BY-mks1Δ Cit2p-GFP rtg3Δ	BY-mks1Δ Cit2p-GFP	pUG6-32, hygromycin
BY-mks1Δ Dld3p-GFP rtg1Δ	BY-mks1Δ rtg1Δ*	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ Dld3p-GFP rtg2Δ	BY-mks1Δ rtg2Δ*	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ Dld3p-GFP rtg3Δ	BY-mks1Δ rtg3Δ*	pKT127, kanamycin
BY-bmh1Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-bmh2Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-bmh1Δ Rtg1p-GFP	BY-Rtg1p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-bmh1Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin

BY- <i>bmh2Δ</i> Rtg1p-GFP	BY-Rtg1p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh2Δ</i> Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin

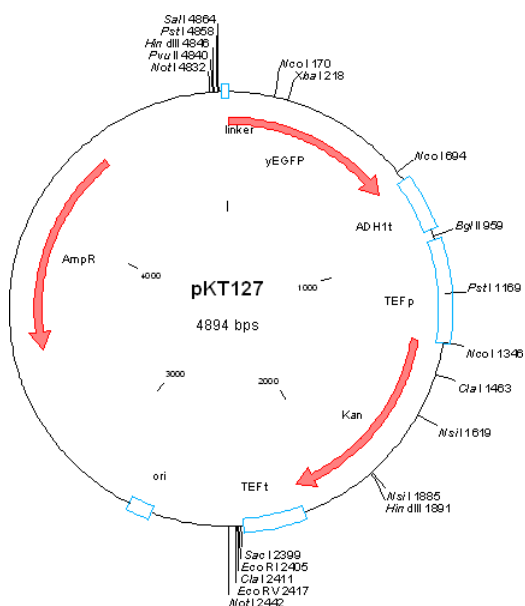
#### 4.1.8 Plazmidy

Jako PCR templát byly použity plazmidy ze sbírky Euroscarf pKT127, pUG6 a plazmidy pUG6-25 a pUG6-32 odvozené z plazmidu pUG6. Plazmidy pUG6, PUG6 -25 a pUG6-32 sloužily pro přípravu delečních kazet (Obr. 12). Plazmid pKT127 sloužil pro přípravu GFP konstruktů (Obr. 13).



Obr. 12. Mapa plazmidů pUG6, pUG6-25 a pUG6-32 použité pro přípravu delečních kazet. Plazmid pUG6 byl získán ze sbírky Euroscarf. Plazmidy pUG6-25 a pUG6-32 odvozeny od pUG6 a pAG-25 a pAG-32 byly

připraveny Ing. O. Hlaváčkem Ph.D. z MBU, AVČR. Obrázek zobrazuje uspořádání rezistencí a restrikční místa endonukleáz.



Obr. 13. Mapa plazmidu pKT127 ze sbírky Euroscarf. Plazmid byl použit pro přípravu konstrukčních kazet GFP fúzí. Obrázek znázorňuje umístění genů pro rezistence, GFP a sestřihová místa restrikčních endonukleáz.

#### 4.1.9 Oligonukleotidy

Při navrhování primerů pro přípravu GFP konstruktů se postupovalo podle článku (Sheff and Thorn, 2004). Primery pro přípravu kazety se skládají ze dvou částí. Kratší na 3' konci nasedající na plazmid o celkové délce 18 bp a delší části na 5' konci o délce 45 bp. Část na 5' konci je homologní s genomem kmene BY4742 a při jejím výběru bylo postupováno následovně. Pro forward (v názvu primeru označen jako F) byla použita sekvence 45 bp před stop kodónem námi značeného genu a pro revers (v tabulce označen jako R) byla použita sekvence o délce 45 bp za stop kodónem genu. Stop kodón značeného genu byl vynechán a na sekvenci námi zvoleného genu plynule navazuje sekvence proteinu GFP s vlastním stop kodónem. V tabulkách 6-9 jsou sekvence všech primerů v orientaci 5' → 3'. Revers primer byl navržen v orientaci 3' → 5' a bylo nutné pomocí programu Reverse Complement stanovit jeho sekvenci z vlákna 5' → 3'.

Tab. 6. Přehled primerů pro konstrukci GFP značených kmenů. Pozn. Primery označené \* připravil Ing. O. Hlaváček, Ph.D.

Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	Použití
CIT2 GFP F	ACTGAGAAATACAAGGAATTGGTCAAA AACATTGAAAGCAAAC*TAaggtagcggctgctgg ttta	Konstrukce BY-Cit2p-GFP, plasmidy pKT
CIT2 GFP R	GAAAGAAAAATATGCAGAGGGGTGTA AAAGTAGGATGTAATCCAAtc*gatgaattcga	Konstrukce BY-Cit2p-GFP, plasmidy pKT

	gctcg		
RTG1 GFP F*	CTTCGAGTACGGAGGGTATGGTGAGTA CGGTAATGGTAGCggtgacggtgctggttta	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg1p-GFP,
RTG1 GFP R*	TATCACAACATAGCAATAGTGAGAGTC AGAAGTACTTTTTAtcgatgaattcgagctcg	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg1p-GFP,
RTG2 GFP F	GGAAGTGTAGAGAGGGTTAAAATTGGC GTGCAATTTTATGAAGAAggtgacggtgctggt tta	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg2p-GFP,
RTG2GFP R	AAGGATTTTCGTATTTATTGTTCAAGTAT TTAAAGACTAGATGTCTtcgatgaattcgagctc g	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg2p-GFP,
RTG3 GFP F	GACAACCTCTAATCCAGCTGACTATCTTT TAGAATTTGGTTCGGGGggtgacggtgctggttt a	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg3p-GFP,
RTG3 GFP R	TGACCTTTTTCAAATTTAATTTTTTCCC GCTAATAAGACCATAAAAtcgatgaattcgagctc g	Konstrukce plasmidy pKT	BY-Rtg3p-GFP,
MKS1 GFP F	AGAACGGAAGCACTGGGGCGTAAGAC GAGTAATGGAGGGCGAATAggtgacggtgct ggttta	Konstrukce plazmidy pKT	BY-Mks1p-GFP,
MKS1 GFP R	TTGAAAGAACTTTAAATACTGTATCTG ATTTATTTAACTTAGTAAAtcgatgaattcgagct cg	Konstrukce plazmidy pKT	BY-Mks1p-GFP,
DLD3 GFP F	AATCACTACGATCCAAATGGAATCTTA AACCATACAAGTACATTggtgacggtgctggt tta	Konstrukce plazmidy pKT	BY-Dld3p-GFP,
DLD3 GFP R	TACAAAAGATGATTATCTAGGACTTGT TTCCACCCAGGGGGGTGTtcgatgaattcgagct cg	Konstrukce plazmidy pKT	BY-Dld3p-GFP,

Pro přípravu kmenů s delecí genu bylo postupováno podle publikace (Gueldener et al., 2002). Primery pro přípravu kazety se skládají ze dvou částí. Kratší na 3' konci nasedající na plazmid o celkové délce 18 bp a delší částí na 5' konci o délce 45 bp. Část na 5' konci je homologní s genomem kmene BY4742 a při jejím výběru bylo postupováno následovně. Pro forward byla použita sekvence 45 bp před start kodónem námi deletovaného genu a pro revers byla použita sekvence o délce 45 bp za stop kodónem genu. Při správném postupu, kdy se do buňky vpraví takto připravená kazeta, dojde

k výměně genu ohraničeného homologními úseky za kazetu s antibiotikovou rezistencí. Revers primer byl navřen v orientaci 3' → 5' a bylo nutné pomocí programu Reverse Complement stanovit jeho sekvenci z vlákna 5' → 3'.

Tab. 7. Přehled primerů pro konstrukci delečních kmenů. Pro přípravu delečních konstruktů byly použity zobrazené primery a plasmidy pUG6 -25 a pUG6-32.

Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	Použití
RTG1 del F	CAAAAAACACTAGATAGTGAACCAAA AGAAAGCACAAACACCAAACcagctgaagctt cgtacgc	Konstrukce BY- <i>rtg1</i> Δ, plasmidy pUG6
RTG1 del R	ACGAGGGTTATCACAACATAGCAATA GTGAGAGTCAGAAAGTACTTgcataggccact agtggatctg	Konstrukce BY- <i>rtg1</i> Δ, plasmidy pUG6
RTG2 del F	CTTTACTAAGGATTGTTTTGAACGAAA AGTGTAGGCGTGCCACAA cagctgaagcttcgtacgc	Konstrukce BY- <i>rtg2</i> Δ, plasmidy pUG6
RTG2 del R	AAGGATTTTCGTATTTATTGTTCAAGTA TTTAAAGACTAGATGTCT gcataggccactagtggatctg	Konstrukce BY- <i>rtg2</i> Δ, plasmidy pUG6
RTG3 del F	CTCTTATTTTTTGTTCAGGCGAACCTACT TCTTAAATAAGTGAAGAcagctgaagcttcgta cgc	Konstrukce BY- <i>rtg3</i> Δ, plasmidy pUG6
RTG3 del R	TGACCTTTTTCAAATTTAATTTTTTCCC GCTAATAAGACCATAAAgcataggccactagt ggatctg	Konstrukce BY- <i>rtg3</i> Δ, plasmidy pUG6
MKS1 del F	AACACTTCCTAATTATCTCTAATCCTA ATAAAAAAAAAAAGAACTGcagctgaagcttcgt acgc	Konstrukce BY- <i>mks1</i> Δ, plasmidy pUG6
MKS1 del R	TTGAAAGAACTTTAAATACTGTATCTG ATTTATTTAACTTAGTAAgcataggccactagt ggatctg	Konstrukce BY- <i>mks1</i> Δ, plasmidy pUG6
BMH1 del F	GCAAGTGAGAAGAAAAAGCAAGTTAA AGATAAACTAAAGATAAAAcagctgaagctt cgtacgc	Konstrukce BY- <i>bmh1</i> Δ, plasmidy pUG6
BMH1 del R	TTTTTCTTTTTTTTAGTAATTTCTCTTT AGATTTATCAGAATACgcataggccactagtgg	Konstrukce BY- <i>bmh1</i> Δ, plasmidy pUG6

	atctg	
BMH2 del F	GAAAAATTATCAAATCAACAAAAAGT ACCCGTTACAACAAAAAAAcagctgaagctt cgtacgc	Konstrukce BY- <i>bmh2Δ</i> , plasmidy pUG6
BMH2 del R	ACTGGAGTGGTAAATCTTCATTTCCCC TTGTATTTCTCAGCGCTCgcataggccactagt ggatctg	Konstrukce BY- <i>bmh2Δ</i> , plasmidy pUG6

Při navrhování ověřovacích primerů se vycházelo ze sekvence genu s 1000 párů bází před a za genem. Ověřovací primery byly navrženy s použitím programů The MBCF Oligo Calculator pro stanovování  $T_m$  a OligoAnalyzer 3.1 pro zjištění sekundární struktury a vyloučení tvorby dimerů, které snižují účinnost PCR reakce. Záměrně byly navrženy na  $T_m$  v rozmezí 50 - 55 °C a délku 20 bp. Délka 20 bp by měla zajišťovat jejich specifitu v nasedání na templát. Jejich specifita byla ověřena pomocí programu BLAST. Obsah GC párů by se měl pohybovat okolo 50 %.

Tab. 8 shrnuje primery pro ověření GFP konstruktů a v Tab. 9 jsou shrnuty ověřovací primery pro kmeny s delecí. Pro PCR reakci na ověření byl použit roztok o koncentraci 10 μM DNA (10 pmol). GFP konstrukty byly ověřeny pomocí kombinace tří primerů ve dvou PCR reakcích a signál GFP byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem. Delece genů byly ověřeny kombinací šesti primerů ve čtyřech reakcích. Tj. tři pozitivní kontroly a jedna negativní kontrola.

Tab. 8. Přehled primerů pro ověření GFP konstrukcí. Pozn. Primery s hvězdičkou jsou používány pro kontrolu konstruktů v naší laboratoři.

Název primeru	Sekvence primeru	$T_m$	Délka	Popis
CIT2 over int F	CATTCATTCGGATCACGAAG	52 °C	20 bp	interní z genu <i>CIT2</i> , over GFP fúze
RTG1 int over F	CAAATTCTCACACAGGCGGTAG	55 °C	22 bp	interní z genu <i>RTG1</i> , over GFP fúze
RTG2 over int F	GAGCGCTGATAGGAATTGCT	52 °C	20 bp	interní z genu <i>RTG2</i> , over GFP fúze
RTG3 over int F	CCAGTTGGTCCACCATCTT	52 °C	20 bp	interní z genu <i>RTG3</i> , over GFP fúze
MKS1 over int F	AACGTGACAGCTCTAGCATC	52 °C	20 bp	interní z genu <i>MKS1</i> , over GFP fúze
DLD3 over int F	TTCGGAGGGTATGATGGCTA	52 °C	20 bp	interní z genu <i>DLD3</i> , over GFP fúze
eGFP verif rev *	AGCATCACCTTCACCTTCAC	52 °C	20 bp	ověřovací primer z <i>GFP</i> ,

				revers
GFP over R*	CCTACAGGAAAGAGTTACTC	52 °C	20 bp	primer pro sekvenaci celého genu GFP

Tab. 9. Přehled primerů pro ověření kmenů s delecí. Pozn. Primery s hvězdičkou jsou používány pro kontrolu konstruktů v naší laboratoři.

Název primeru	Sekvence primeru	Tm	Délka	Popis
RTG1 del over F	CCACTCATTACTGGAAACGG	52°C	20 bp	před genem <i>RTG1</i>
RTG1 del over R	ATTGTCATGGTCAGCTCTCC	52°C	20 bp	za genem <i>RTG1</i>
RTG1 int over R	GTA CTCACCATA CCCTCCGT	54 °C	20 bp	interní z genu <i>RTG1</i>
RTG2 del over F	GGCGGAGTTCCTAGATCAAT	52°C	20 bp	Před genem <i>RTG2</i>
RTG2 del over R	TCCGTTGGTATCATCGGTGC	54 °C	20 bp	za genem <i>RTG2</i>
RTG2 over int R	AACCCTCTCTACACTTCCTC	52°C	20 bp	interní z genu <i>RTG2</i>
RTG3 del over F	CTAGAGGCTGCACGGAATCA	54 °C	20 bp	před genem <i>RTG3</i>
RTG3 del over R	CTTGCCTATCTCTTCCACTC	52 °C	20 bp	za genem <i>RTG3</i>
RTG3 int over R	GGATTAGAGTTGTCATCTCC	52 °C	20 bp	interní z genu <i>RTG3</i>
MKS1 del over F	CTTAGTGCCTGCCAAGAGAT	52 °C	20 bp	před genem <i>MKS1</i>
MKS1 del over R	CATCTCATCGCATTTCCGGG	54 °C	20 bp	za genem <i>MKS1</i>
MKS1 int over F	GGGAGAAAGGCTGCACAATA	52 °C	20 bp	interní z genu <i>MKS1</i>
MKS1 int over R	CTGGTACTCTTGGAAGTCTC	52 °C	20 bp	interní z genu <i>MKS1</i>
BMH1 del over 2 F	ACCTGAAAACGAGACGAACC	52 °C	20 bp	před genem <i>BMH1</i>
BMH1 del over 2 R	TGCGACATTTACCCGGTTGA	52 °C	20 bp	za genem <i>BMH1</i>
BMH1 int over F	CTGAACAGGCCGAACGTTAT	52 °C	20 bp	interní z genu <i>BMH1</i>
BMH1 int over R	ACTTTGGTGCTTCACCTTCG	52 °C	20 bp	interní z genu <i>BMH1</i>
BMH2 del over F	GCGTGGGTATTCATATGACC	52 °C	20 bp	před genem <i>BMH2</i>
BMH2 del over R	CTCAACTCTGAACGATAGCC	52 °C	20 bp	za genem <i>BMH2</i>
BMH2 int over F	GCTGAACAAGCCGAACGTTA	52 °C	20 bp	interní z genu <i>BMH2</i>
BMH2 int over R	CTGGAGCTTGTTGTTGCTGT	52 °C	20 bp	interní z genu <i>BMH2</i>
NAT1-verif-for *	TCTTGACGACACGGCTTACC	53 °C	20 bp	ověřovací primer z nat rezistence
NAT1-verif-rev *	GTAAGCCGTGTCGTCAAGAG	53 °C	20 bp	ověřovací primer z nat rezistence
NAT1 over 2 F	TTCGTGGTCATCTCGTACTC	52 °C	20 bp	ověřovací primer z nat rezistence
HYG over F	ACTGTCGGGCGTACACAAAT	52 °C	20 bp	Ověřovací primer

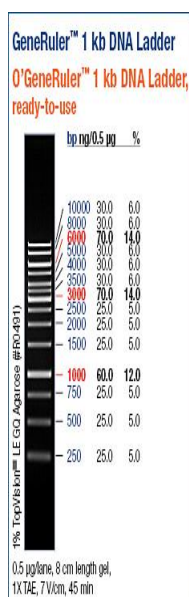
				z hph rezistence
HYG over R	GAAATCACGCCATGTAGTGT	50 °C	20 bp	Ověřovací primer
				z hph rezistence

#### 4.1.10 Polymerázy

Pro přípravu kazet byla používána jednak polymeráza EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa) s opravnou aktivitou 3' → 5', jednak LA DNA polymerázový mix (Top-Bio) složený ze dvou polymeráz vysoce procesivní Taq polymerázy a polymerázy s opravnou aktivitou 3' → 5'. Polymerázy jsou uchovávány ve skladovacím pufru pro LA DNA polymerázový mix: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Tween 20, 50% glycerol. Pro ověření kmenů byly použity polymerázy EmeraldAmp GT PCR Master MIX, PPP Master Mix a PPP Combi. EmeraldAmp GT PCR Master MIX (TaKaRa) je dodáváný v premixu (optimalizovaný pufr, PCR enzym, směs dNTP, zelená barvička a hustotní činidlo, 2x koncentrovaný). PPP Master Mix (TopBio) 2x koncentrovaný mix obsahuje: 150 mM Tris-HCl (pH 8,8), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 jednotka/ml Taq Purple DNA polymeáza, stabilizátory a barviva. Combi PPP Master Mix (Top-Bio) se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva.

#### 4.1.11 Standarty

Jako standart pro DNA byl použit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder od firmy BIOGEN (Obr. 14).



Obr. 14. Standart pro DNA GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (BIOGEN). Převzato z [http://eshop.biogen.cz/generuler-1-kb-dna-ladder\[1\]](http://eshop.biogen.cz/generuler-1-kb-dna-ladder[1]).



## 4.1.12 Programy

### Příprava primerů a práce s DNA

*The MBCF Oligo Calculator* (<http://mbcf.dfc.harvard.edu/docs/oligocalc.html>)

*Reverse Complement* ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html))

*OligoAnalyzer 3.1* (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

Align Sequences Nucleotide BLAST, NCBI

([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&BLAST\\_SPEC=blast2seq#](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq#))

### Databáze

Saccharomyces genom database (SGD) <http://www.yeastgenome.org/>

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

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://omim.org/>

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sterilizace

Roztoky, voda, média, párátky, špičky k mikropipetám, rozbíjecí zkumavky a mikrozukavky byly sterilizovány v autoklávu 20 min. při 120 kPa. Plastové centrifugační zkumavky byly sterilizovány parami kyseliny peroctové minimálně 24 hodin v uzavřeném igelitovém sáčku.

Chemické sklo bylo sterilizováno suchým teplem při 180°C 180 min., drobné předměty jako bakteriologická klička nebo skleněná klička žháním nebo zapálením po namočení do ethanolu.

### 4.2.2 Uchovávání kvasinkových kmenů

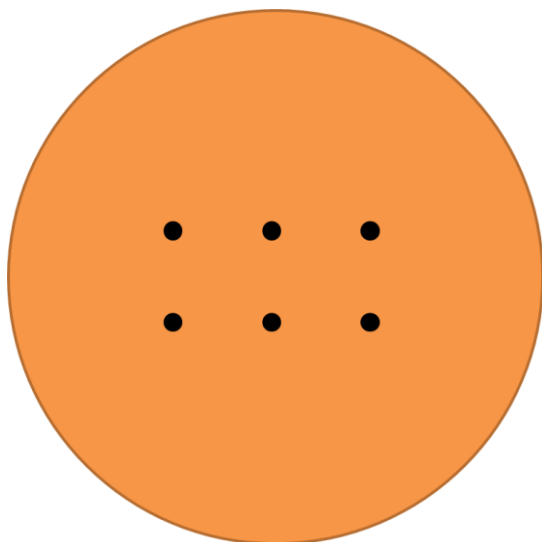
Kvasinkové kmeny jsou uchovávány ve skladovacím médiu při – 80 °C. Krátkodobě (maximálně dva dny) na agarových plotnách.

### 4.2.3 Kultivace

Před začátkem práce s kvasinkovým kmenem, byl kmen uskladněný ve skladovacím médiu přemístěn na agarovou misku s YEPGA a kultivován přes noc v termostatu při 28°C. Následně byl buď zaočkován do tekutého média nebo přenesen na agarové misky. Kultivace kvasinkových kmenů v tekutém médiu probíhala na orbitálních třepačkách v Erlenmayerových baňkách při teplotě 28°C. Kultivace na pevném médiu probíhala v termostatech v Petriho miskách při teplotě 28 °C.

#### 4.2.4 Test alkalizace kolonií

Při testování vývojových fází bylo šest obřích kolonií kultivováno na agarových plotnách s GMA médiem v termostatu při 28 °C. Kolonie byly inokulovány 10 µl kapkami suspenze buněk o koncentraci 12 mg/ml. Jednotlivé kapky byly vzdálené 1,5 cm (Obr. 15). Plotny se šesti koloniemi byly kultivovány při 28 °C v termostatu po dobu cca 30 dnů. Plotny byly průběžně fotografovány s obvyklým intervalem dva až tři dny.



Obr. 15. Způsob umístění jednotlivých kolonií na agarovou misku s GMA médiem.

#### 4.2.5 Stanovení optické denzity

Optická denzita (OD) buněčné suspenze byla stanovovaná pomocí spektrofotometru WPA Spectrawave Biochrom při vlnové délce 600 nm. Na stanovení byly použity 1 ml plastové kyvety s dráhou 1 cm. Jako blank posloužilo příslušné médium nebo voda, ve které byly buňky resuspendovány.

#### 4.2.6 Práce s DNA

Pro práci s DNA byla použita PCR voda nebo sterilní redestilovaná voda připravená přístrojem wartex ultrapur a poté sterilizovaná pomocí autoklávy.

#### **4.2.6.1 Izolace DNA**

Na izolaci DNA byly použity dva protokoly; izolace DNA z individuálních kolonií a izolace chromozomové DNA pomocí skleněných kuliček. Izolace DNA z individuálních kolonií sloužila pro běžnou amplifikaci DNA při ověřování kmenů. Izolace DNA pomocí skleněných kuliček byla použita pro izolaci chromozomové DNA nebo pro vzorky připravené na sekvenaci. Tato metoda by měla zajišťovat vyšší čistotu DNA.

##### **4.2.6.1.1 Izolace DNA z individuálních kolonií**

Pro ověřování kmenů a amplifikaci DNA bylo malé množství biomasy z testovaného kmene, resuspendováno v 15  $\mu$ l 20mM NaOH a denaturováno při 95 °C 15 minut. Denaturace probíhala v cyklérech (gradientový PCR termocyklér BIOER XP cyklér a PCR termocyklér BIOER GenePRO). Poté byl lyzát promíchán a centrifugován při 2000x g cca 45 s. DNA zůstala v roztoku a buněčná debris utvořila na dně peletu. Pro PCR byl použit 1  $\mu$ l supernatantu.

##### **4.2.6.1.2 Izolace chromozomální DNA**

2 ml suspence testovaného kmene narostlé v tekutém médiu minimálně 18 hodin byly odebrány do 2 ml zkumavky Eppendorf a centrifugovány 1 minutu při 6000 rpm. K sedimentu byly přidány další 2 ml suspence a centrifugace byla opakována. Sediment byl promyt v destilované vodě a resuspendován v 200  $\mu$ l směsi, 100  $\mu$ l fenolu, 100  $\mu$ l upraveného chlorofomu a přibližně 200  $\mu$ l skleněných kuliček. Poté byly buňky rozbity po dobu 4 minut na vortexu Genie. Ke směsi bylo přidáno 200  $\mu$ l TE pufru a centrifugováno 5 minut při 6000 rpm. Vodná fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky, smíchána s 200  $\mu$ l fenolu a 200  $\mu$ l upraveného chloroformu a centrifugována 5 minut při 6000 rpm. Odebraná vodná fáze byla smíchána s 400  $\mu$ l chloroformu a centrifugována 5 minut při 6000 rpm. Odebraná vodná fáze s DNA byla následně sražena 1 ml 96 % etanolu. Sražená DNA byla centrifugována 5 minut při 6000 rpm, supernatant odstraněn a sediment vysušen. Sediment byl resuspendován ve 400  $\mu$ l TE pufru a RNA odstraněna Rnase A, 15 minut při 37 °C. DNA byla sražena pomocí 2,5-násobku objemu 96% etanolu a 0,1-násobku objemu 3M NaAc při -20 °C 15 minut. Roztok byl centrifugován 15 minut při 14000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a DNA omyta 400  $\mu$ l 80 % etanolem a centrifugována při stejných podmínkách. Supernatant byl odstraněn a DNA vysušena a rozpuštěna v 50  $\mu$ l vody. DNA byla poté analyzována pomocí NanoDropu-1000 a pro další PCR naředěna na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l (obvykle 50x naředit).

##### **4.2.6.2 Přečištění DNA po PCR**

Pokud potřebujeme čistou DNA po PCR reakci, je nutné odstranit polymerázu, loading dye a další složky PCR reakce. To bylo provedeno pomocí protokolu srážení etanolem se solí LiAc. DNA byla sražena pomocí 2,5-násobku objemu 96% etanolem a 0,1-násobku objemu 3M NaAc při pokojové teplotě, 15 minut. Roztok byl centrifugován 15 minut při maximálních otáčkách centrifugy tj. 14000 rpm a 4 °C. Sediment DNA byl omyt 400  $\mu$ l 80 % etanolem a stočen za stejných podmínek.

Sediment DNA byl vysušen. Po dokonalém vysušení byl sediment rozpuštěn ve 45  $\mu\text{l}$  vody. Roztok DNA byl poté analyzován pomocí NanoDropu-1000. Takto přečištěnou DNA bylo dále nutné naředit pro podmínky sekvenační reakce.

#### **4.2.6.3 Měření koncentrace DNA**

Měření koncentrace DNA probíhalo na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop-1000 spectrofotometr v objemu 1  $\mu\text{l}$ . Mezi vzorky byla pro očištění přístroje použita redestilovaná  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### **4.2.6.4 Sekvence**

Sekvence probíhala v servisním pracovišti laboratoře sekvenace Přírodovědecké fakulty UK. Amplifikovaná a přečištěná DNA o definované koncentraci (změřená pomocí NanoDrop-1000) určená pro sekvenaci byla namíchána podle postupu:

Primer: o celkové koncentraci 5 pmol

Templátová DNA: na 100 bp 5 – 10 ng u PCR produktů

Celkový objem reakce je 8  $\mu\text{l}$

Do reakce byl vždy přidán jen jeden z primerů. Z jednoho vzorku byly namíchány minimálně dvě reakce.

#### **4.2.6.5 Agarózová elektroforéza pro DNA**

Pro běžnou práci s DNA byl použit 1% agarózový gel připravený rozvařením agarózy a 0,5 x TBE pufru. Po rozpuštění agarózy byl gel zchlazen na 50  $^{\circ}\text{C}$ , dále přidán ethidium bromid v koncentraci 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  gelu. Gel tuhnul po dobu 20 minut a po té byl přelit 0,5 x TBE (tris-bor-edta) puftrem. Do vzniklých jamek byly nanесeny vzorky a na aparaturu nasazeno víčko, které bylo zapojeno do zdroje pro elektroforézu. Zdroj byl nastaven na 80 V a 40 minut. Po uplynutí doby byl gel vyfocen pod UV světlem.

### **4.2.7 Příprava kmenů**

#### **4.2.7.1 PCR**

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhala v PCR cyklérech. Složení PCR reakce bylo specifické a záleželo na typu reakce a použité polymeráze. Obecný příklad složení a průběh reakce zobrazuje Tab. 8.

Tab. 8. Ilustrační průběh PCR při použití PPP polymerázy.

PPP Master Mix	čas (min)	teplota (°C)
Denaturace DNA	5:00	95
Denaturace DNA	0:45	95
Nasedání primerů	5x 0:20	52
Elongace	1:00	72
Elongace 2	5:00	72
Chlazení	∞	4

#### 4.2.7.2 Příprava kazet pro transformaci

Pro přípravu kazet byly použity polymerázy EmeraldAmp MAX PCR Master Mix a LA DNA polymerázový Mix. Příklad reakce a jejich průběh jsou shrnuty v Tab. 10 až 12. Pro přípravu delecí byly použity plazmidy pUG6-25 a pUG6-32. Pro přípravu GFP fúze byl použit plazmid pKT127. Délku jednotlivých kazet shrnuje Tab. 12. Standardní objem pro přípravu jedné kazety byl 50  $\mu$ l.

Tab. 10. Příklad složení reakce a její průběh při použití LA polymerázového mixu s opravnou aktivitou.

50 $\mu$ l	Objem ( $\mu$ l)
demi H <sub>2</sub> O	37
LA PCR pufr	5
DMSO	1
dNTP	2,5
Primer F+R	1,5
Plazmid	1
LA polymerázy	0,5

Tab. 11. Průběh reakce při použití LA polymerázového mixu s opravnou aktivitou

LA polymerázy	čas (min)	teplota (°C)
Denaturace DNA	5:00	94
Denaturace DNA	0:45	94
Nasedání primerů	35x 0:20	58
Elongace	2:30	68
Elongace 2	5:00	68
Chlazení	∞	4

Tab. 12. Přehled velikostí kazet použité pro transformaci.

Plazmid	Délka kazety
pKT127	2525 bp
pUG6-25	1469 bp
puG6-32	1923 bp

#### 4.2.7.3 Transformace kmenů kvasinek lithium-acetátovou metodou

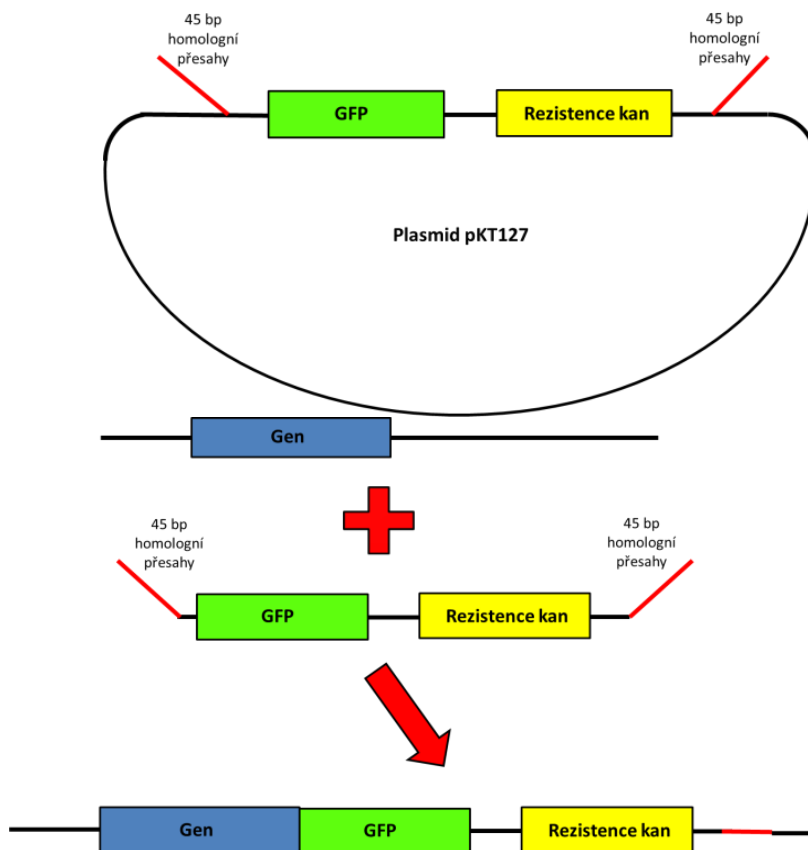
Rodičovský kmen narostlý přes noc na agarové plotně s YEPGA s edicinem byl a kultivován v 10 ml tekutého YEPG média na horizontální třepačce asi 16-18 hodin. Poté byl kmen přeočkován (asi 2 ml buněčné suspenze) do 50 ml tekutého YEPG (na OD 0,5). Kmen byl kultivován asi 4 hodiny do hustoty suspenze OD = 2.

Takto narostlé inokulum bylo stočeno v 50 ml centrifugační zkumavce při 22°C, 4000 rpm 5 minut. Sediment buněk byl resuspendován v 25 ml destilované vody a suspenze znovu stočena při 22°C, 4000 rpm 5 min. Sediment byl resuspendován v 1 ml destilované vody a přenesen do 1,5 ml zkumavky Ependorf. Suspenze stočena na mikrocentrifuze při 6000 rpm, 1 min. Supernatant byl odebrán a buňky naředěny na koncentraci  $10^7$ . Ze suspenze byly odebrány alikvóty 100  $\mu$ l do 1,5 ml zkumavky Ependorf a suspenze stočena 6000 rpm, 2 min. K sedimentu buněk byla přidána transformační směs: 240  $\mu$ l 50 % PEG, 36  $\mu$ l 1M LiAc, 10  $\mu$ l připravené suspenze ssDNA z herring sperm a celá suspenze byla promíchána. K suspenzi bylo přidáno 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a 34  $\mu$ l DNA transformační kazety. Suspenze byla přenesena na 40 minut na vyhřívání bloček při 42°C. U citlivějších kmenů byla použita zkrácená doba transformace na 20 minut při 42°C a 20 minut při 28°C. Po uplynutí doby byla suspenze stočena při 6000 rpm 30 s. Transformační směs byla odebrána a sediment buněk byl resuspendován v 1 ml tekutého YEPG. Buňky byly kultivovány na horizontální třepačce 2 – 3 hodiny při 28 °C. Poté byla suspenze stočena na mikrocentrifuze 6000 rpm 30 s.

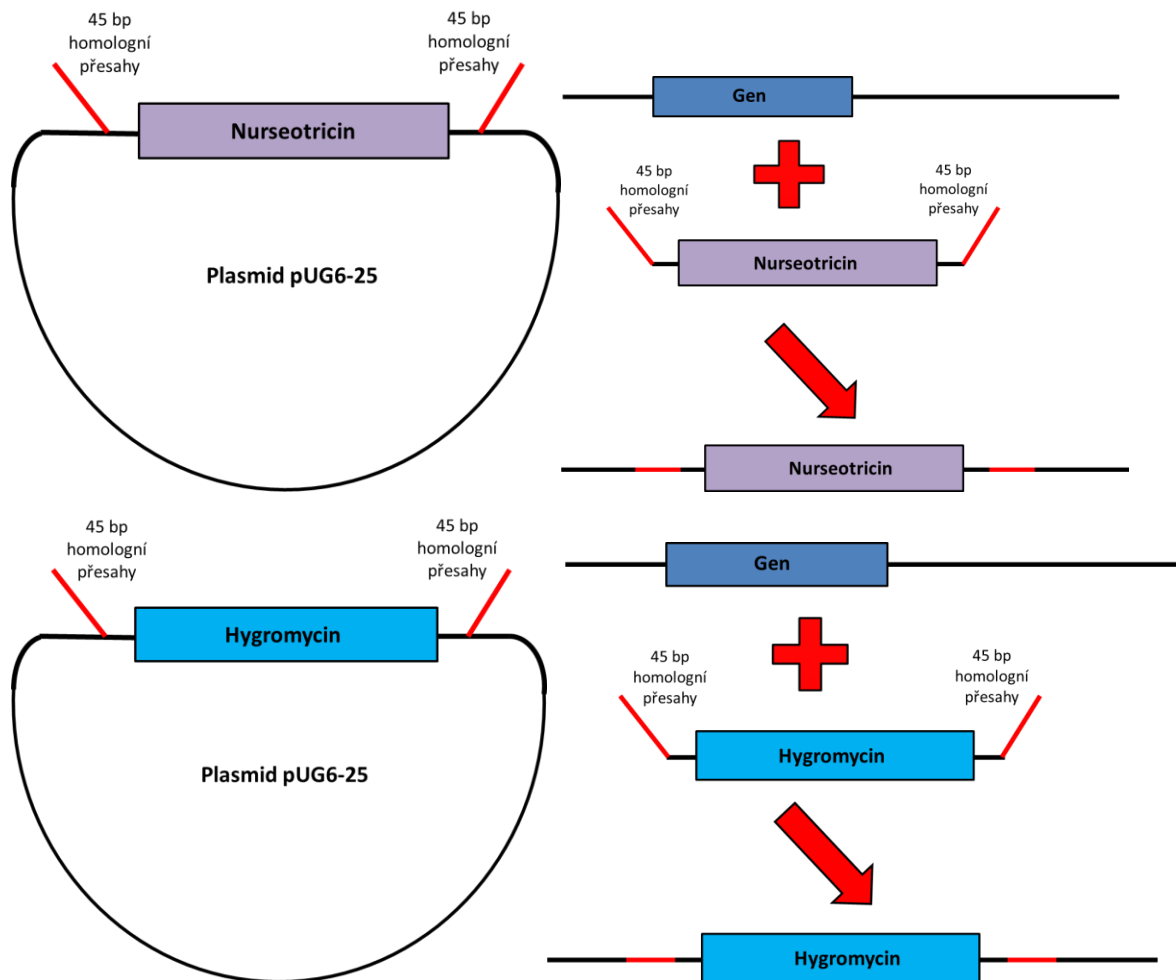
Sediment byl resuspendován v 300 µl destilované vody. Následně byla suspenze vyseta na selekční médium YEPGA a příslušným antibiotikem. Agarové misky byly přeneseny do termoboxu a vyhodnoceny obvykle po 4 – 5 dnech.

Pro přípravu GFP konstruktů byla použita kazeta připravená pomocí primerů z plazmidu pKT127. Tato kazeta obsahuje 45 bp na obou stranách homologní s genomem *S. cerevisiae*, GFP marker a gen pro rezistenci na kanamycin. Pro přípravu kmenů s delecí byla připravena kazeta z plazmidu pUG6-25 nebo pUG6-32. Tato kazeta obsahuje 45-40 bp na obou stranách homologní s genomem kvasinky a gen pro rezistenci na nurseotricin nebo hygromycin. Princip vložení kazety do genomu kvasinky zobrazují Obr. 16 a 17.

Suspenze ssDNA z herring sperm byla připravena pomocí vaření 100 µl alikvoty po dobu 5 minut. Takto denaturovaná DNA byla uchována na ledu a pak uložena do -18°C. Pro další použití je nutné herring sperm znovu povařit.



Obr. 16. Princip vložení kazety do genomu kvasinky. Kazeta pro GFP C-terminální fúzi genu byla připravená z plazmidu pKT127 pomocí primerů z Tab. 3. Pomocí homologní rekombinace byla do genomu vložena kazeta obsahující reportérový gen GFP a rezistenci na kanamycin.



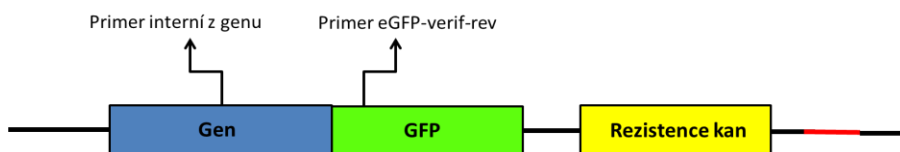
Obr. 17. Princip vložení delečních kazet do genomu kvasinky *S. cerevisiae*. Kazeta pro delecí genu byla připravena pomocí plasmidu pUG-25 nebo pUG-32. Pomocí homologní rekombinace byl deletovaný gen vyměněn za kazetu obsahující rezistenci na nurseotricin (pUG-25) nebo hygromycin (pUG-32).

#### 4.2.7.4 Ověřování kmenů

##### 4.2.7.4.1 Princip ověřování GFP kmenů

Ověřování kmenů s fúzí genu a reportérového genu GFP bylo v několika krocích. Nejprve byly jednotlivé klony ověřeny pomocí PCR. Reakce proběhla pomocí interního primeru z genu (forward) a primeru eGFP-verif-rev ze sekvence GFP (revers) (Obr. 18). Poté byl konstrukt zkontrolován pomocí fluorescenčního mikroskopu. Následně byly konstrukty osekvenovány a uloženy ve stornovacím médiu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

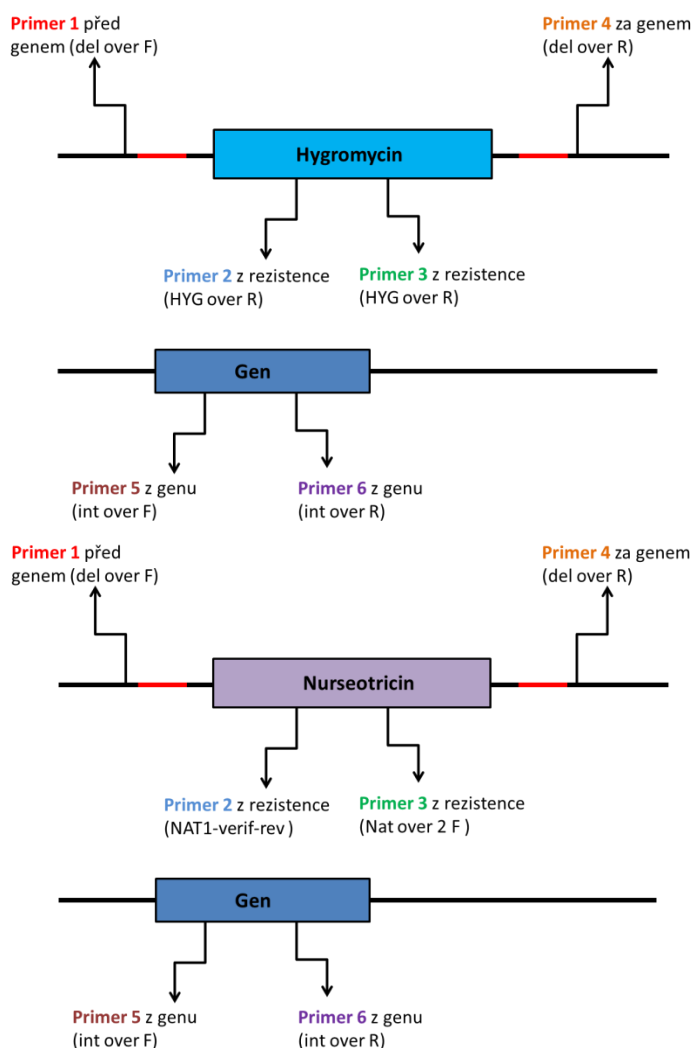




Obr. 18. Princip návržení primerů pro ověření kmenů s C-terminální GFP fúzí. GFP značené kmeny byly ověřeny pomocí PCR a fluorescenčního mikroskopu. Forward primer byl navržen ze sekvence genu. Revers primer z reportérového genu GFP.

#### 4.2.7.4.2 Princip ověřování delečních kmenů

Kmeny byly ověřeny pomocí PCR reakce. První reakce pomocí přímého primeru 1 (forward nacházející se před deletovaným genem) a zpětného primeru 2 (revers navržený z příslušné rezistence nat/hph). Druhá reakce pomocí přímého primeru 3 (forward navržený z příslušné rezistence nat/hph) a zpětného primeru 4 (revers nacházející se za deletovaným genem). Třetí reakce proběhla pomocí primerů 5 a 6 (oba navržené z původního deletovaného genu). Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek s DNA rodičovského kmene. Pozice navržených primerů zobrazuje Obr. 19. Všechny připravené kmeny byly sekvenovány a uchovávány ve stornovacím médiu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obr. 19. Ověření genů s delecí genu proběhlo v několika PCR reakcích.

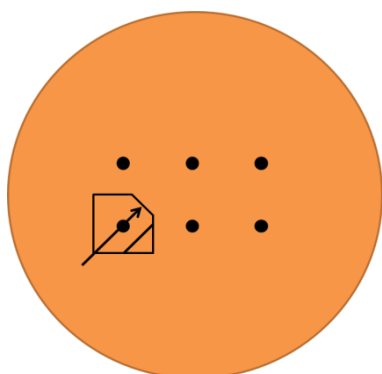
## 4.2.8 Mikroskopické techniky

Pro pozorování nativních preparátů nebo tenkých řezů koloniemi byl použit fluorescenční mikroskop Leica DMR. Buňky byly vizualizovány pomocí Nomarského kontrastu případně s použitím filtru pro fluorescenci GFP. Pro pozorování nativních preparátů buněk bylo použito zvětšení 1000x. Řezy koloniemi byly snímány při zvětšení 50x, 100x a 1000x.

### 4.2.8.1 Řezy koloniemi

Metoda řezů koloniemi kvasinek byla vyvinuta v laboratoři biologie kvasinkových kolonií a slouží k popisu vrstev a subpopulací buněk v rámci kolonie. Přípravuje se vertikální řez, který napoví o morfologii a stavbě kolonie, o přežívání a životaschopnosti buněk v jednotlivých subpopulacích a vrstvách kolonie, ale i tvaru a velikosti buněk. V této práci byly prováděny řezy kolonií z alkalického testu, kdy se na misce nachází 6 kolonií s odstupem 1,5 cm. Pokud není uvedeno jinak, stáří kolonie bylo 14 dní. Příprava preparátu spočívá ve vyříznutí jedné z kolonií a zalití 3% agarózou. Zatuhlé

agarózové bločky s koloniemi byly následně nařezány na mikrotonu. Jednotlivé řezy byly přemístěny na podložní sklíčko, překryty krycím sklíčkem a ihned mikroskopovány.



Obr. 20. Schematický obrázek vyjmutí kolonie z agarové misky a orientace centrálního řezu (viz. šipka).

#### 4.2.8.2 Výsev buněk pro konfokální mikroskopii

Na agarové plotny s GMA médiem byly vysety buňky příslušných kmenů v koncentraci  $0,5 \times 10^4$  a kultivovány 2, 3 nebo 4 dny při 28 °C. Analýza řezů těchto kolonií pomocí dvoufotonového konfokálního mikroskopu byla provedena prof. RNDr. Z. Palkovou, CSc. a RNDr. L. Váchovou, CSc. Výsledky jsou součástí publikace (Příloha 1).

#### 4.2.8.3 Sběr biomasy pro Western blota imunodetekci

Biomasa pro práci s proteiny byla získána dvěma způsoby. V prvním případě z obřích kolonií a v druhém případě z výsevu. Testované kmeny vždy rostly na GMA médiu.

Sběr z obřích kolonií spočíval v manuálním rozdělení kolonií v určité časové fázi. Kolonie byly rozebrány pomocí „hrabátka“ z žiletky na 3 – 5 horizontálních vrstev dle subpopulací. Pro správné ověření bylo možné se orientovat dle množství biomasy na misku a dle struktury kolonie. Vždy však bylo nutné zohlednit růst rozebíraného kmene a tloušťku vrstev, které jsou pro některé kmeny typické. Ideální hmotnost mokré váhy potřebné pro Western blot analýzu se pohybovala mezi 50 – 80 mg. Sběr biomasy z výsevu na GMA médiu (vyseto  $0,5 \times 10^4$  ze suspenze koncentrací 12 mg/ml) byl prováděn pomocí plastové bakteriologické kličky.

Další zpracování odebraných biomas a Western blot analýza proteinů byly provedeny RNDr. H. Kučerovou z Mikrobiologického ústavu AVČR. Výsledky jsou součástí publikace (Příloha 1).

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava kmenů

Pro diplomovou práci bylo připraveno celkem 30 modifikovaných kmenů odvozených od rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742. Každý kmen byl ověřen pomocí PCR, sekvenován a GFP konstrukty navíc ověřeny pomocí fluorescenčního mikroskopu na přítomnost GFP signálu.

Od každého kmene bylo vždy připraveno několik klonů, z nichž byl vybrán jeden klon, se kterým se dále pracovalo. Klon byl vybrán porovnáním morfologie a růstu při testu alkalizace. Seznam kmenů připravených v rámci diplomové práce je v Tab. 13.

Tab. 13. Seznam všech připravených kmenů v rámci diplomové práce. Pozn. Kmeny označené \* byly připraveny ve spolupráci s Mgr. V. Plockem.

Název kmene	Rodičovský kmen	Použitý plasmid, selekční marker
BY-Cit2p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg1p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg2p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Rtg3p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Mks1p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-Dld3p-GFP	BY4742	pKT127, kanamycin
BY-rtg1Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg2Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg3Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-rtg1Δ Dld3p-GFP	BY-rtg1Δ	pKT127, kanamycin
BY-rtg2Δ Dld3p-GFP	BY-rtg2Δ	pKT127, kanamycin
BY-rtg3Δ Dld3p-GFP	BY-rtg3Δ	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Rtg1p-GFP	BY-Rtg1p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Cit2p-GFP	BY-Cit2p-GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY-mks1Δ Dld3p-GFP	BY-mks1Δ	pKT127, kanamycin
BY-mks1Δ rtg1Δ*	BY-mks1Δ	pUG6-35, hygromycin
BY-mks1Δ rtg2Δ*	BY-mks1Δ	pUG6-35, hygromycin

BY- <i>mks1</i> Δ <i>rtg3</i> Δ*	BY- <i>mks1</i> Δ	pUG6-35, hygromycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP <i>rtg1</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP	pUG6-32, hygromycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP <i>rtg2</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP	pUG6-32, hygromycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP <i>rtg3</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP	pUG6-32, hygromycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Dld3p</i> -GFP <i>rtg1</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>rtg1</i> Δ*	pKT127, kanamycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Dld3p</i> -GFP <i>rtg2</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>rtg2</i> Δ*	pKT127, kanamycin
BY- <i>mks1</i> Δ <i>Dld3p</i> -GFP <i>rtg3</i> Δ	BY- <i>mks1</i> Δ <i>rtg3</i> Δ*	pKT127, kanamycin
BY- <i>bmh1</i> Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh2</i> Δ	BY4742	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh1</i> Δ <i>Rtg1p</i> -GFP	BY- <i>Rtg1p</i> -GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh1</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP	BY- <i>Cit2p</i> -GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh2</i> Δ <i>Rtg1p</i> -GFP	BY- <i>Rtg1p</i> -GFP	pUG6-25, nurseotricin
BY- <i>bmh2</i> Δ <i>Cit2p</i> -GFP	BY- <i>Cit2p</i> -GFP	pUG6-25, nurseotricin

## 5.2 PCR verifikace

Po transformaci pomocí lithium-acetátové metody byly jednotlivé klony přeneseny na novou plotnu s YEPGA médiem a příslušným antibiotikem. Při druhé transformaci již mutovaného kmene byla použita obě příslušná antibiotika (např. při delecí genu *MKS1* v kmeni BY-*Cit2p*-GFP s rezistencí k G418, byla po transformaci použita antibiotika G418 a nurseotricin). A při třetí transformaci pak tři antibiotika, např. kombinace G418, nurseotricin a hygromycin. Transformované kmeny byly kultivovány v termostatu přes noc.

Pro izolaci DNA byla použita metoda izolace DNA z individuálních kolonií a z izolované DNA bylo použito 0,5 μl DNA pro PCR v 10 μl. Nejprve byla používána polymeráza Emerald GT později byla používána polymeráza PPP Master Mix.

Správnost všech kmenů byla ověřena pomocí PCR a příklad výsledku zobrazuje Obr. 21. Přesný popis a pořadí vzorků zobrazuje Tab. 14, která rovněž sumarizuje použité primery a velikosti jednotlivých produktů. Ověřené klony byly uloženy do 300 μl storovacího média a uloženy do – 80 °C. V následných experimentech bylo pracováno s čerstvě narostlými kmeny ze storovacího média.

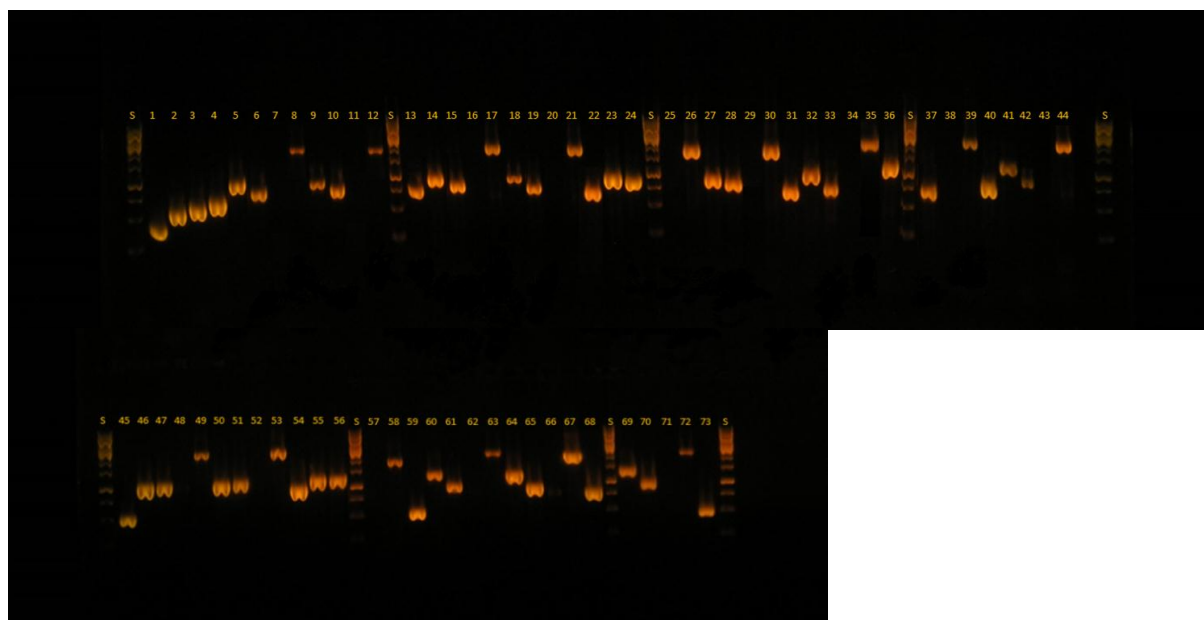
Ověření všech připravených kmenů proběhla podle stejného postupu.

Tab. 14. Ověření kmenů pomocí PCR. Tabulka zobrazuje jednotlivé kmeny, přehled použitých primerů včetně délky PCR produktu. Agarózový gel zobrazuje Obr. 21.

Kmen	Číslo	Použité primery	Délka (bp)	Délka v BY4742 (bp)
Standard	S			
BY-Rtg1p-GFP	1	Rtg1 int over F + eGFP-verif-rev	397 bp	
Rtg2p-GFP	2	Rtg2 int over F + eGFP-verif-rev	605 bp	
Rtg3p-GFP	3	Rtg3 int over F + eGFP-verif-rev	667 bp	
BY-Cit2-GFP	4	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY-rtg1Δ	5	Rtg1 del over F + NAT1-verif-rev	1038 bp	
BY-rtg1Δ	6	Rtg1 del over R + Nat over 2 F	683 bp	
BY-rtg1Δ	7	Rtg1 int over F + R	0 bp	270 bp
BY-rtg1Δ	8	Rtg1 del over F + R	1703 bp	858 bp
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	9	Rtg1 del over F + NAT1-verif-rev	1038 bp	
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	10	Rtg1 del over R + Nat over 2 F	683 bp	
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	11	Rtg1 int over F + R	0 bp	270 bp
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	12	Rtg1 del over F + R	1703 bp	858 bp
Standard	S			
BY-rtg1Δ Cit2p-GFP	13	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY-rtg2Δ	14	Rtg2 del over F + NAT1-verif-rev	1050 bp	
BY-rtg2Δ	15	Rtg2 del over R + Nat over 2 F	832 bp	
BY-rtg2Δ	16	Rtg2 int over F + R	0 bp	443 bp
BY-rtg2Δ	17	Rtg2 del over F + R	1864 bp	2252 bp
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	18	Rtg2 del over F + NAT1-verif-rev	1050 bp	
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	19	Rtg2 del over R + Nat over 2 F	832 bp	
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	20	Rtg2 int over F + R	0 bp	443 bp
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	21	Rtg2 del over F + R	1864 bp	2252 bp
BY-rtg2Δ Cit2p-GFP	22	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY-rtg3Δ	23	Rtg3 del over F + NAT1-verif-rev	1088 bp	
BY-rtg3Δ	24	Rtg3 del over R + Nat over 2 F	710 bp	
Standart	S			
BY-rtg3Δ	25	Rtg3 int over F + R	0 bp	501 bp
BY-rtg3Δ	26	Rtg3 del over F + R	1780 bp	1862 bp
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	27	Rtg3 del over F + NAT1-verif-rev	1088 bp	

BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	28	Rtg3 del over R + NAT1-verif-rev	710 bp	
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	29	Rtg3 int over F + R	0 bp	501 bp
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	30	Rtg3 del over F + R	1780 bp	1862 bp
BY-rtg3Δ Cit2p-GFP	31	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ	32	Mks1 del over F + NAT1-verif-rev	1276 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ	33	Mks1 del over R + Nat over 2 F	665 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ	34	Mks1 int over F + R	0 bp	567 bp
BY- <i>mks1</i> Δ	35	Mks1 del over F + R	1923 bp	2299 bp
BY- <i>mks1</i> Δ Cit2p-GFP	36	Mks1 del over F + NAT1-verif-rev	1276 bp	
Standart	S			
BY- <i>mks1</i> Δ Cit2p-GFP	37	Mks1 del over R + Nat over 2 F	665 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ Cit2p-GFP	38	Mks1 int over F + R	0 bp	567 bp
BY- <i>mks1</i> Δ Cit2p-GFP	39	Mks1 del over F + R	1923 bp	2299 bp
BY- <i>mks1</i> Δ Cit2p-GFP	40	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ Rtg1p-GFP	41	Mks1 del over F + NAT1-verif-rev	1276 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ Rtg1p-GFP	42	Mks1 del over R + Nat over 2 F	665 bp	
BY- <i>mks1</i> Δ Rtg1p-GFP	43	Mks1 int over F + R	0 bp	567 bp
BY- <i>mks1</i> Δ Rtg1p-GFP	44	Mks1 del over F + R	1923 bp	2299 bp
Standart	S			
2. řádek				
Standart	S			
BY- <i>mks1</i> Δ Rtg1p-GFP	45	Rtg1 int over F + eGFP-verif-rev	397 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ	46	Bmh1 del over R + Nat over 2 F	887 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ	47	Bmh1 del over F + NAT1-verif-rev	1046 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ	48	Bmh1 int over F + R	0 bp	759 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ	49	Bmh1 del over F + R	1773 bp	1198 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Cit2p-GFP	50	Bmh1 del over R + Nat over 2 F	887 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Cit2p-GFP	51	Bmh1 del over F + NAT1-verif-rev	1046 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Cit2p-GFP	52	Bmh1 int over F + R	0 bp	759 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Cit2p-GFP	53	Bmh1 del over F + R	1773 bp	1198 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Cit2p-GFP	54	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	55	Bmh1 del over R + Nat over 2 F	887 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	56	Bmh1 del over F + NAT1-verif-rev	1046 bp	
Standart	S			
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	57	Bmh1 int over F + R	0 bp	759 bp

BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	58	Bmh1 del over F + R	1773 bp	1198 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	59	Rtg1 int over F + eGFP-verif-rev	397 bp	
BY- <i>bmh2</i> Δ	60	Bmh2 del over F + NAT1-verif-rev	1386 bp	
BY- <i>bmh2</i> Δ	61	Bmh2 del over R + Nat over 2 F	959 bp	
BY- <i>bmh2</i> Δ	62	Bmh2 int over F + R	0 bp	748 bp
BY- <i>bmh2</i> Δ	63	Bmh2 del over F + R	2134 bp	1577 bp
BY- <i>bmh2</i> Δ Cit2p-GFP	64	Bmh2 del over F + NAT1-verif-rev	1386 bp	
BY- <i>bmh2</i> Δ Cit2p-GFP	65	Bmh2 del over R + Nat over 2 F	959 bp	
BY- <i>bmh2</i> Δ Cit2p-GFP	66	Bmh2 int over F + R	0 bp	748 bp
BY- <i>bmh2</i> Δ Cit2p-GFP	67	Bmh2 del over F + R	2134 bp	1577 bp
BY- <i>bmh2</i> Δ Cit2p-GFP	68	Cit2 int over F + eGFP-verif-rev	760 bp	
Standart	S			
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	69	Bmh2 del over F + NAT1-verif-rev	1386 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	70	Bmh2 del over R + Nat over 2 F	959 bp	
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	71	Bmh2 int over F + R	0 bp	748 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	72	Bmh2 del over F + R	2134 bp	1577 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ Rtg1p-GFP	73	Rtg1 int over F + eGFP-verif-rev	397 bp	
Standart	S			



Obr. 21. Ověření vybraných kmenů pomocí PCR. Všechny kmeny byly nejprve ověřeny pomocí PCR. Pořadí vzorů zobrazuje Tab. 14.



### 5.3 Alkalizační test a výběr klonů

Pro výběr klonu, který reprezentuje daný nově připravený kmen, byly získané klony podrobeny alkalizačnímu testu. Pomocí alkalizačního testu byla sledována morfologie kolonií, schopnost alkalizace a acidifikace média a bylo možné pozorovat jednotlivé fáze růstu kolonií všech kmenů.

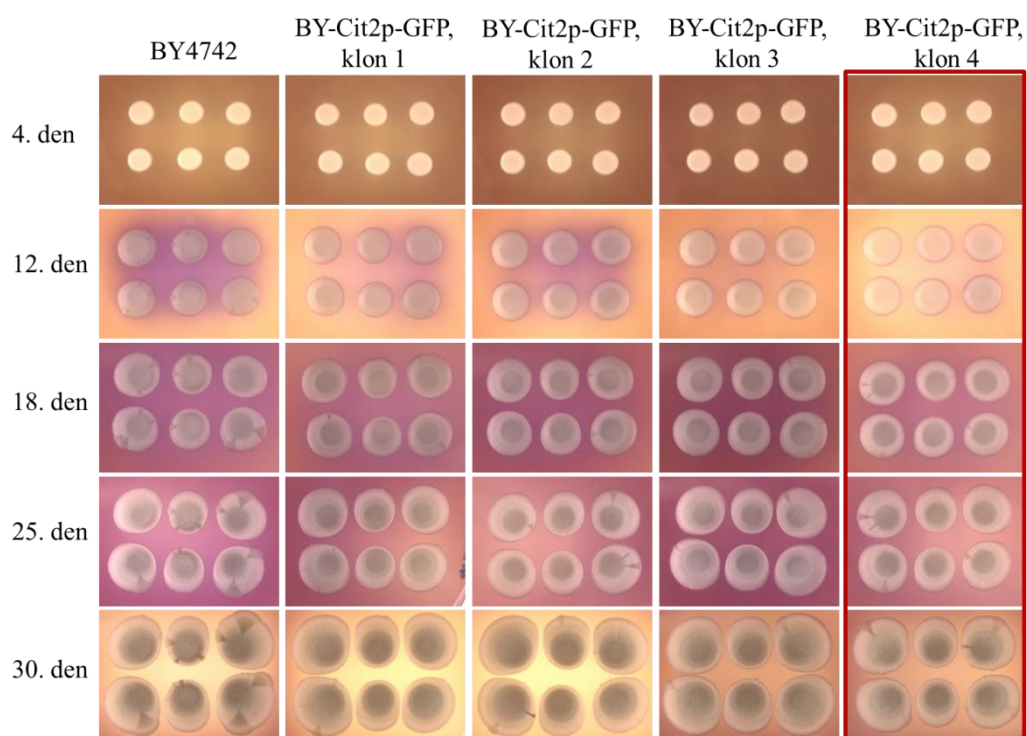
Alkalický test slouží pro sledování fází růstu kolonií *S. cerevisiae*. Mezi tyto fáze patří první acidická, alkalická a druhá acidická fáze. Protože každý pokus se od sebe může nepatrně časově lišit, bylo nutné plotny sledovat celých 30 dnů. Každý druhý nebo třetí den byly misky s koloniemi vyfoceny pomocí makroskopu. Morfologie a míra alkalizace pak byla porovnávána vždy v rámci jednoho alkalizačního testu.

Obr. 22-50 znázorňují průběh alkalizačního testu po dobu 1 měsíce, kdy kmeny rostly na GMA médiu s pH indikátorem bromkresolovým purpurem v termostatu při 28 °C. Testované kolonie byly sledovány a pravidelně foceny s odstupem jednoho až dvou dnů, pro lepší charakteristiku růstu a morfologie kmenů. Pro přehlednost celého pokusu byly vybrány obrázky kolonií, které charakterizují jednotlivé fáze růstu kolonií.

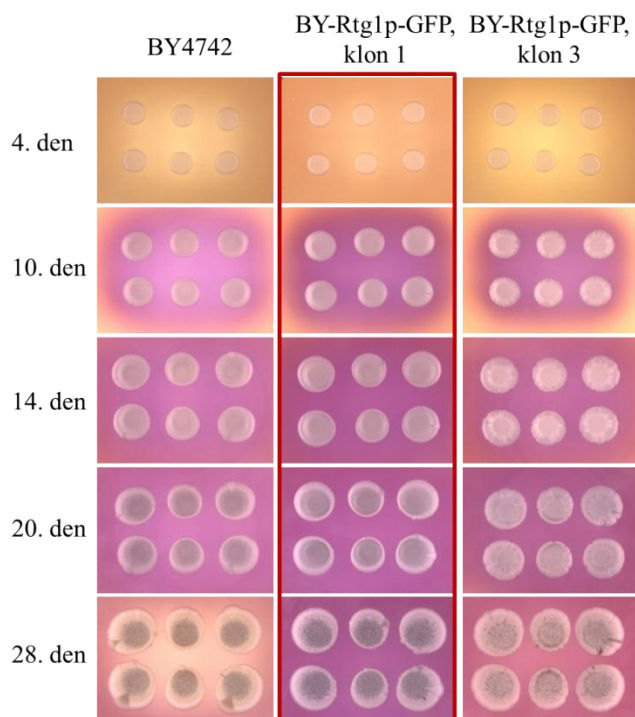
Morfologie GFP kmenů a delecí Bmh proteinů se od výchozího kmene BY4742 nijak neodlišovala. U kmenů s delecí jednoho z RTG genů došlo k významné změně morfologie kolonie. Kolonie jsou obecně menší a nižší. Kolonie kmene BY-*mks1*Δ jsou velmi malé a nízké, s množstvím sektorů.

Z množství ověřených klonů pomocí PCR bylo nutné vybrat jeden klon pro další práci. Klon byl vybrán na základě výsledků alkalického testu tak, aby reprezentoval většinu klonů (ideálně všechny) a zároveň byl co možná nejvíce podobný rodičovskému kmeni BY4742. Klony se změněnou morfologií, jež byly v menšině oproti ostatním, byly vyřazeny. Z klonů se stejnou morfologií a podobným průběhem alkalizace byl vybrán vždy ten s nejnižším pořadovým číslem. Vybraný klon byl uložen do sbírky laboratoře biologie kvasinkových kolonií. S vybraným klonem byly prováděny všechny další pokusy.

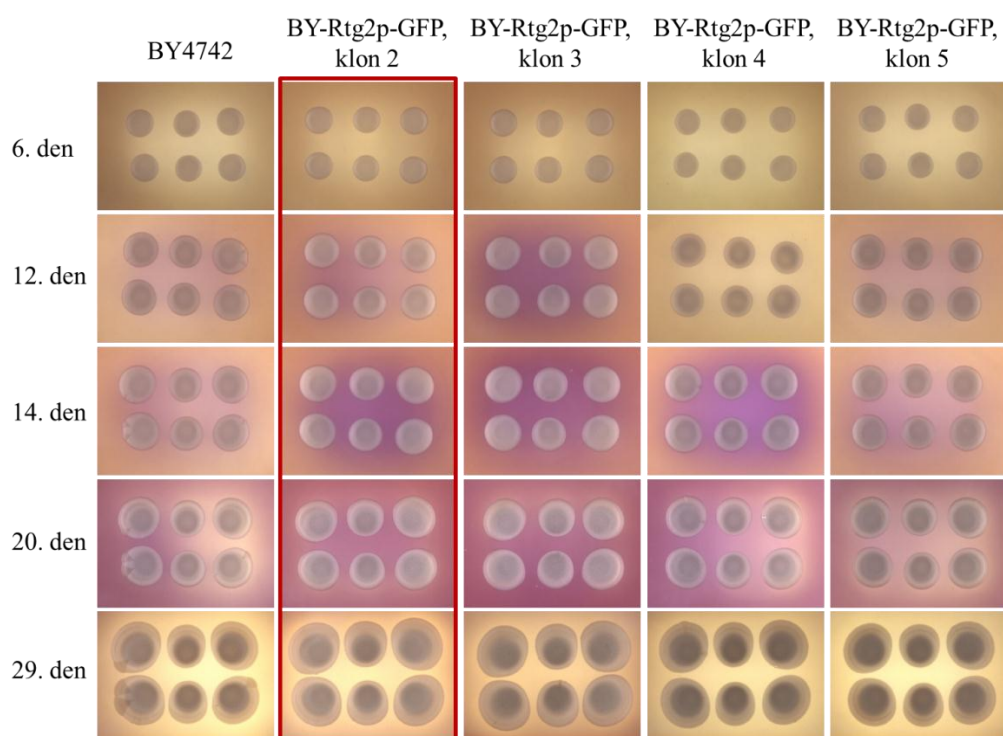
Vybraný klon byl poté sekvenován a uskladněn v -80 °C.



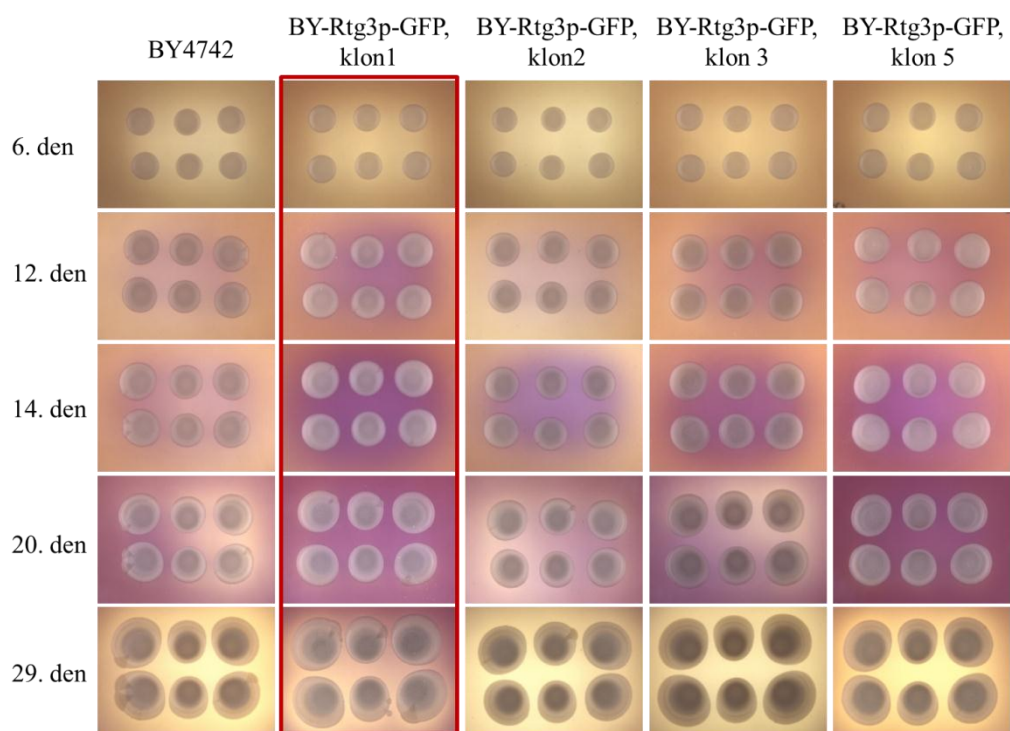
Obr. 22. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 4.



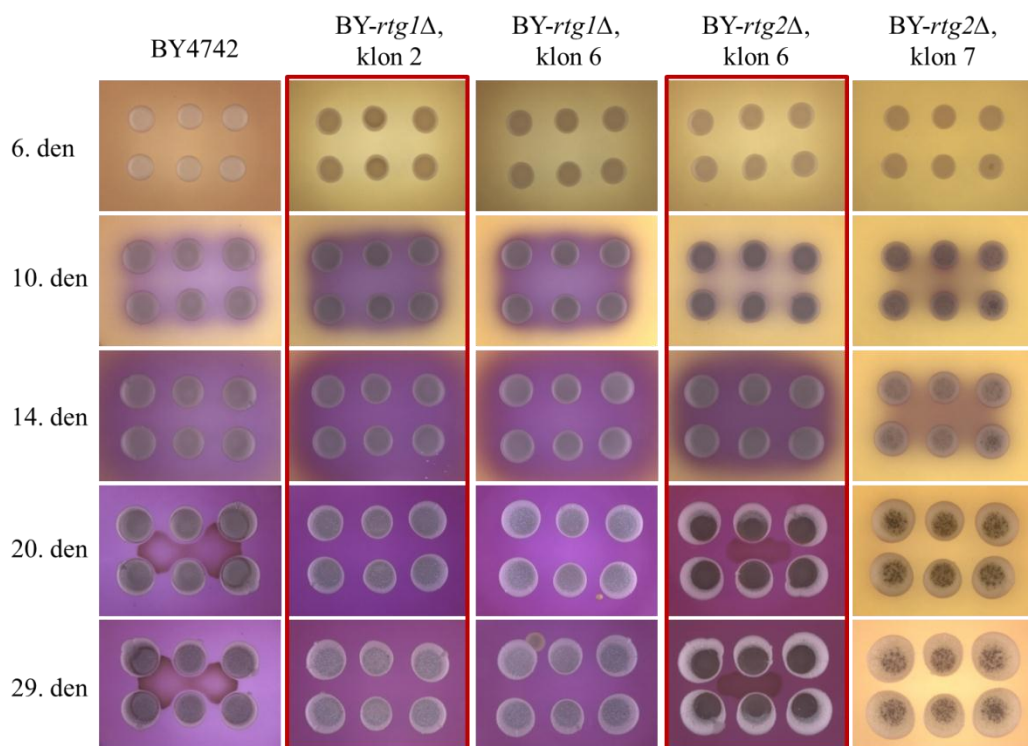
Obr. 23. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-Rtg1p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1. Klon 2 má poruchu růstu.



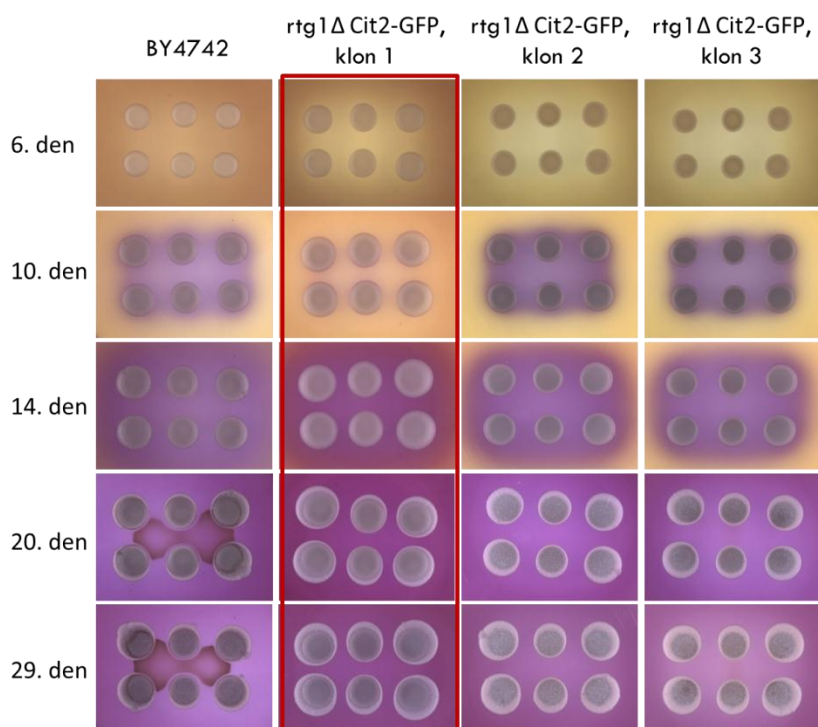
Obr. 24. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-Rtg2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 2.



Obr. 25. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-Rtg3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

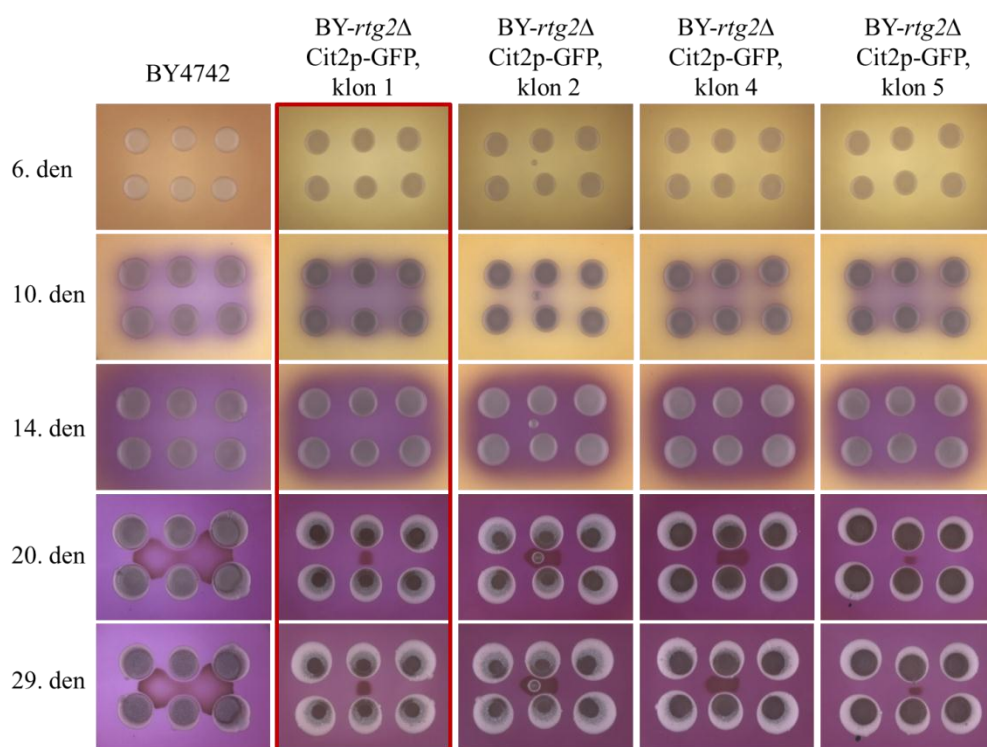


Obr. 26. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg1*Δ a BY-*rtg2*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 2 u kmene BY-*rtg1*Δ a klon 6 u kmene BY-*rtg2*Δ.

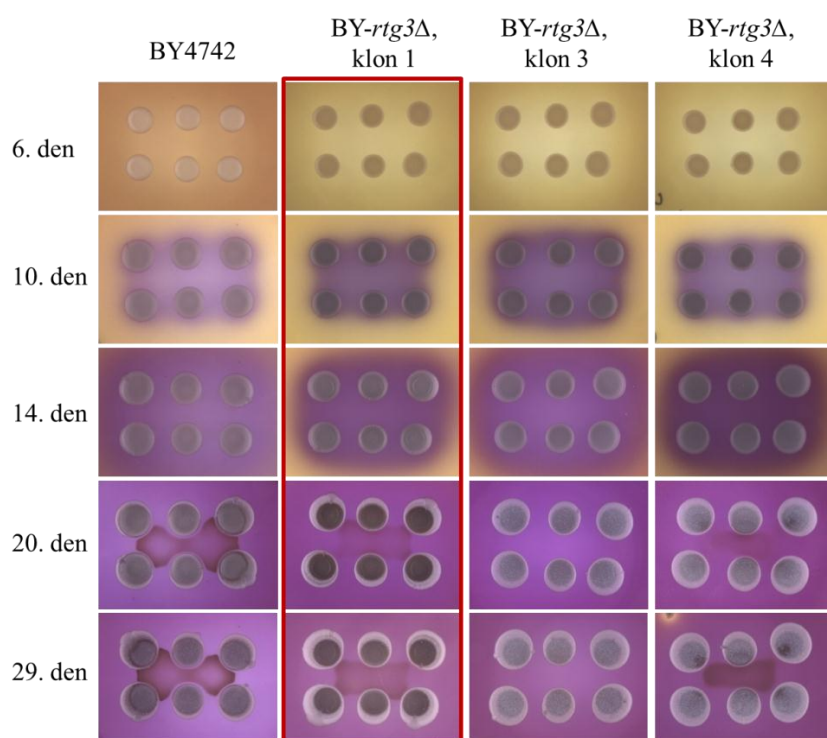


Obr. 27. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg1*Δ Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

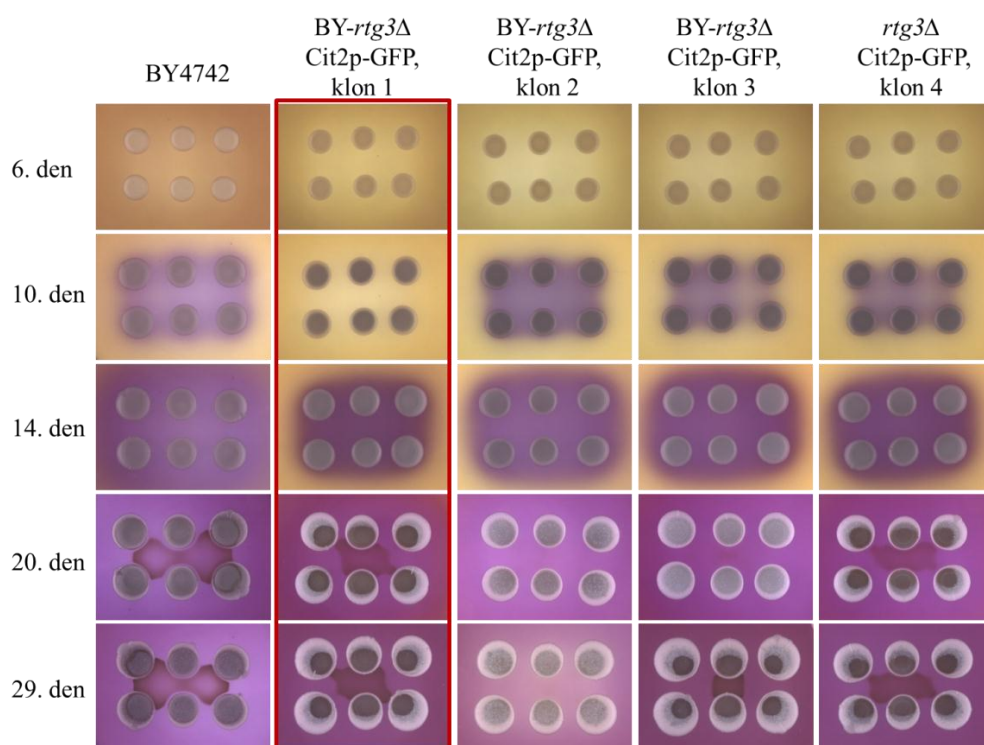




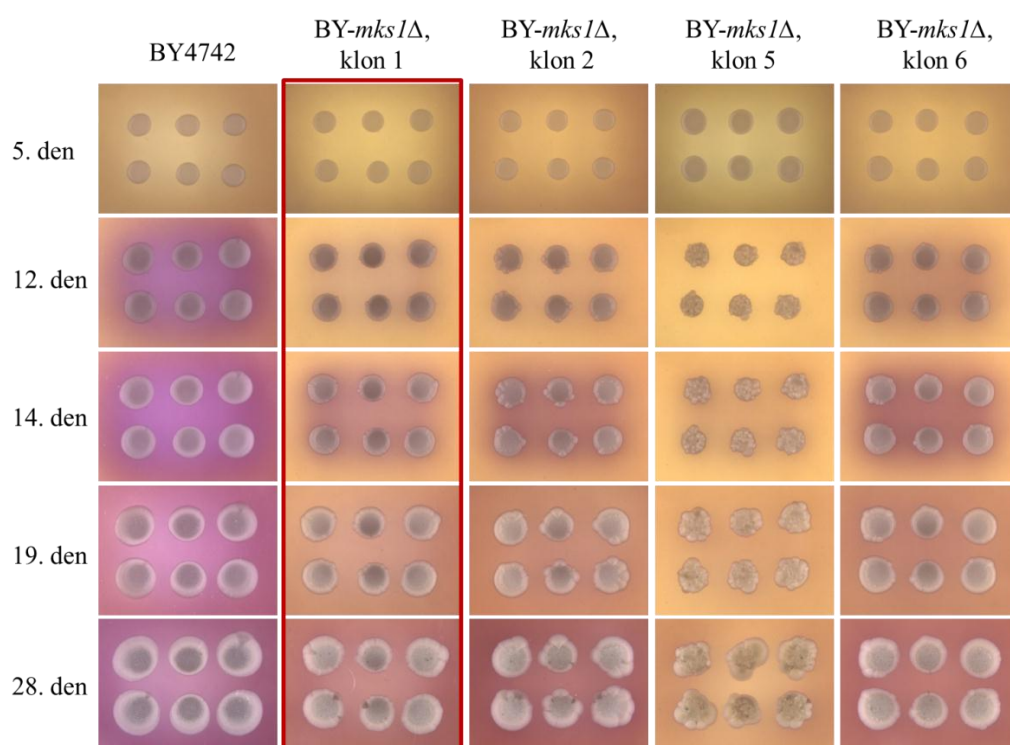
Obr. 28. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg2*Δ Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



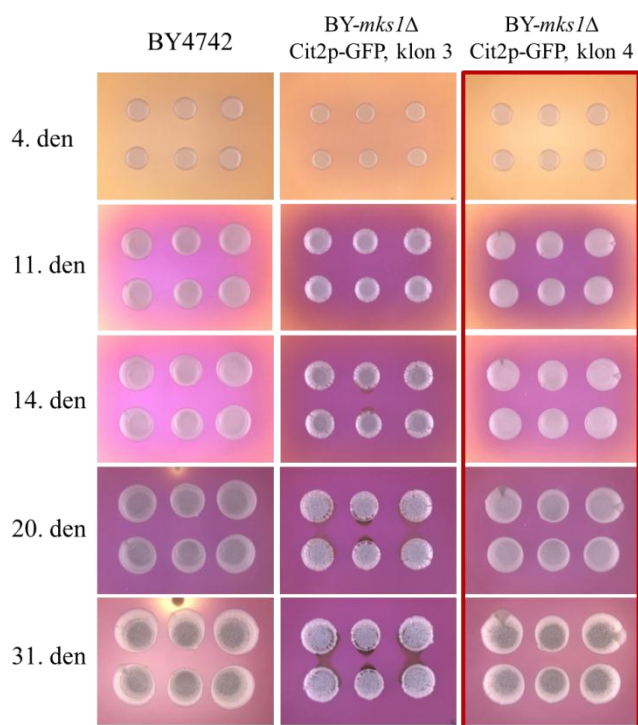
Obr. 29. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg3*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.



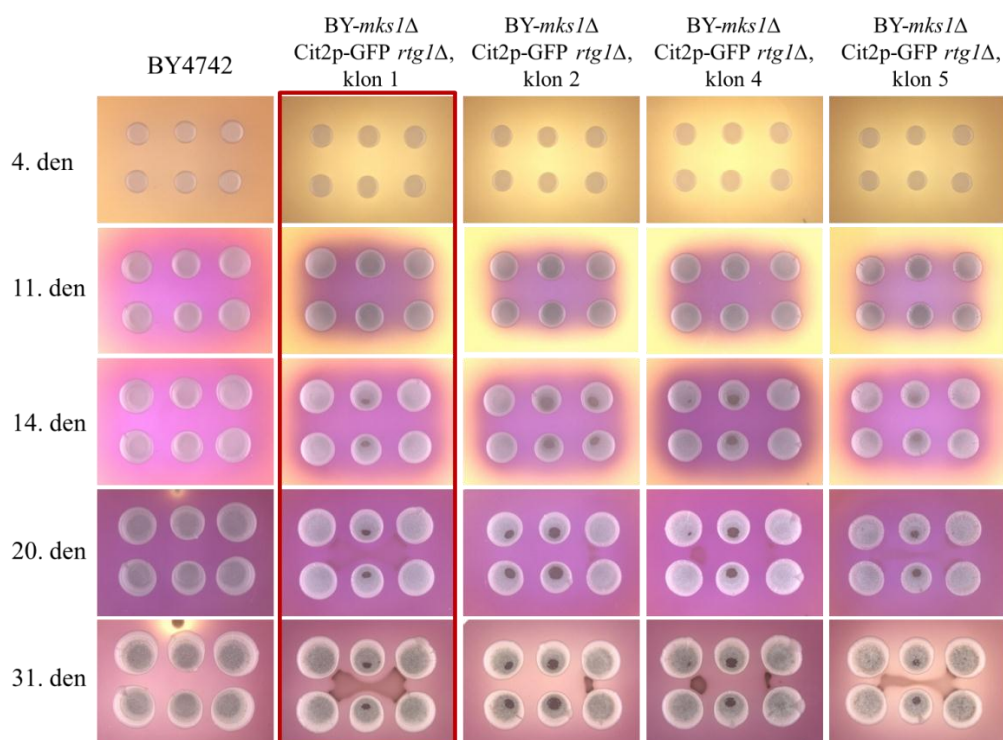
Obr. 30. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg3* $\Delta$  Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



Obr. 31. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1* $\Delta$ . Pro další práci byl vybrán klon 1. Klon 5 vykazuje podstatně zhoršený růst než ostatní klony a více tvoří sektory.

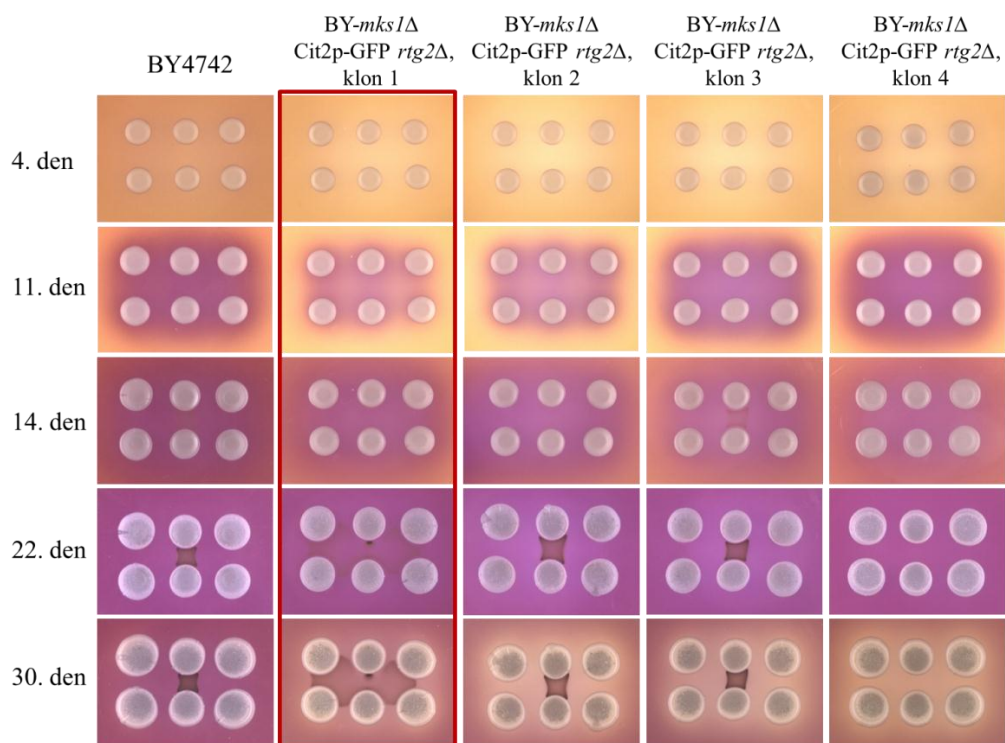


Obr. 32. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1* $\Delta$  Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 2. Klon 1 má poruchu v růstu a nadprodukuje GFP, které je degradováno ve vakuolách.

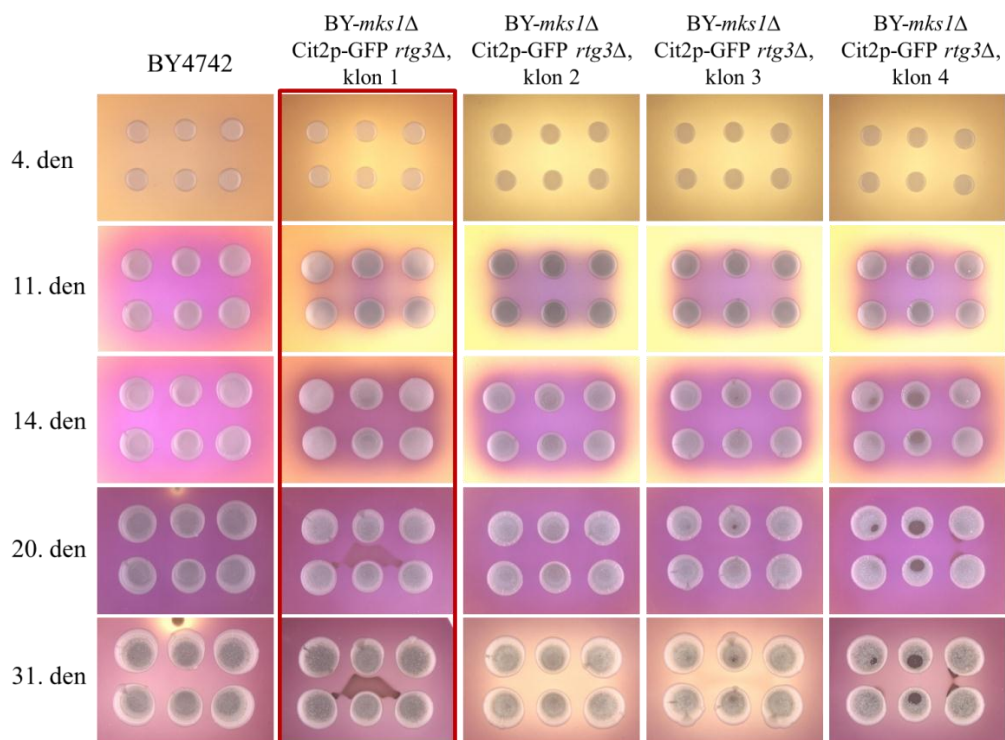


Obr. 33. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1* $\Delta$  Cit2p-GFP *rtg1* $\Delta$ . Pro další práci byl vybrán klon 1.



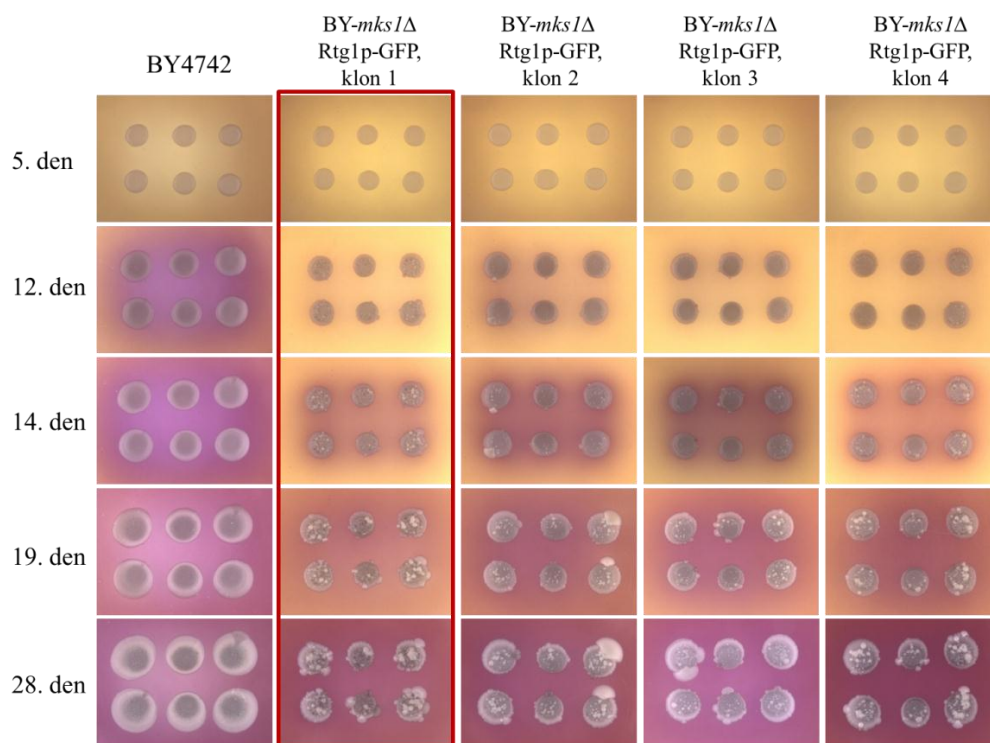


Obr. 34. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Cit2p-GFP *rtg2*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.

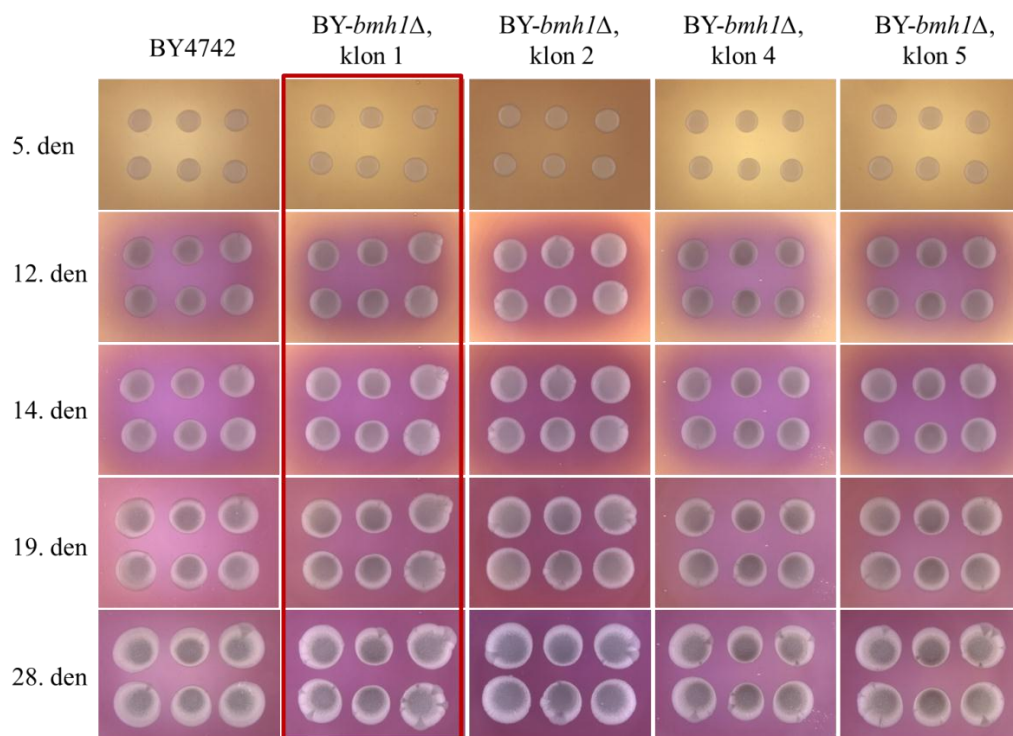


Obr. 35. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Cit2p-GFP *rtg3*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.

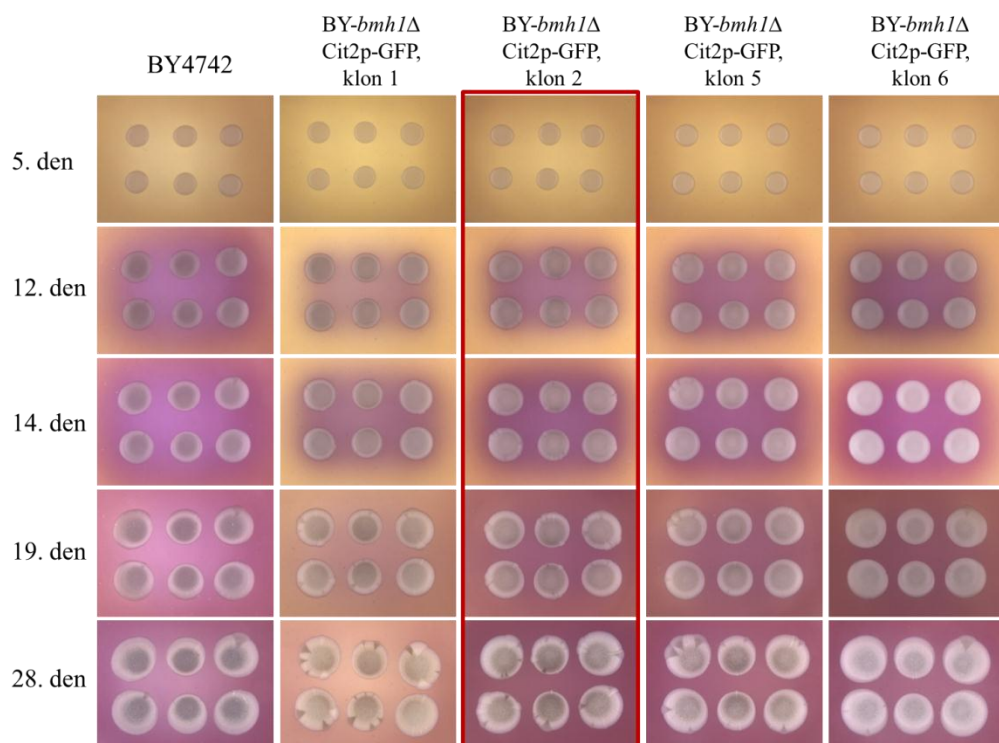




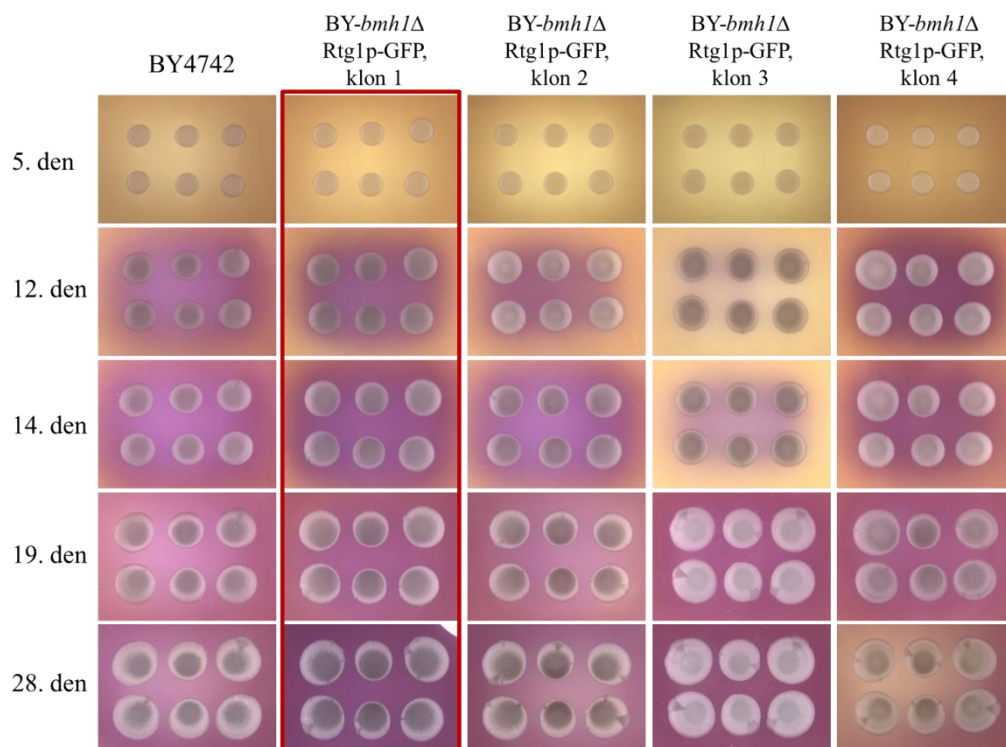
Obr. 36. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Rtg1p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



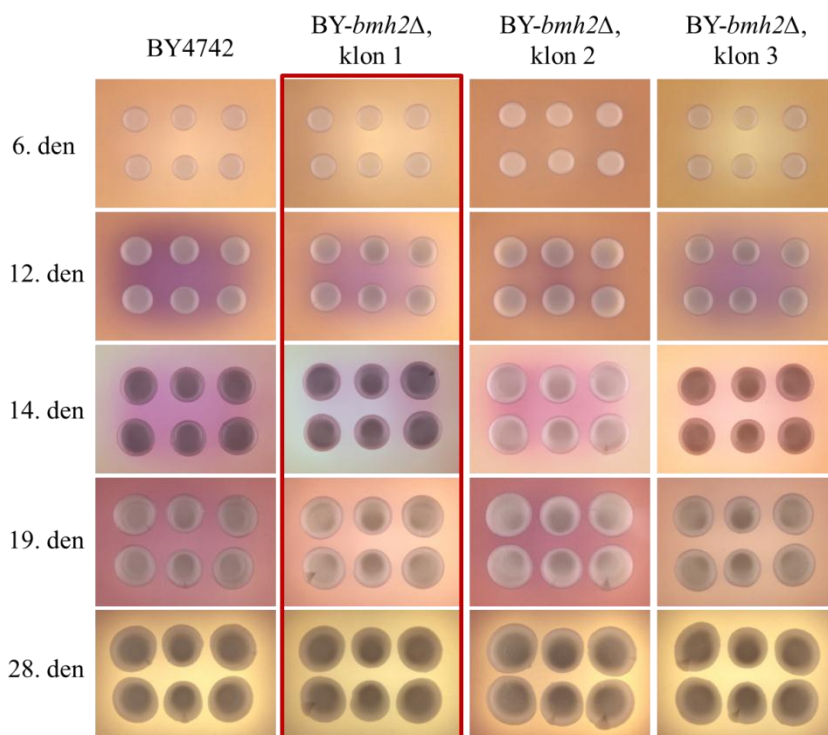
Obr. 37. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh1*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.



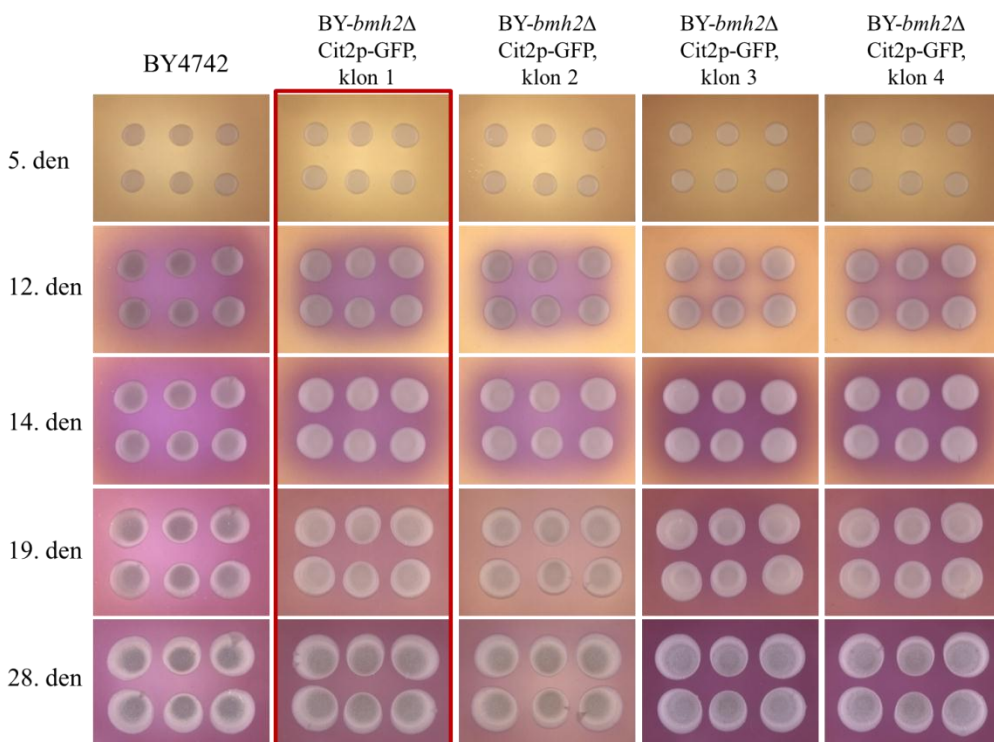
Obr. 38. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh1*Δ Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 2.



Obr. 39. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh1*Δ Rtg1p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

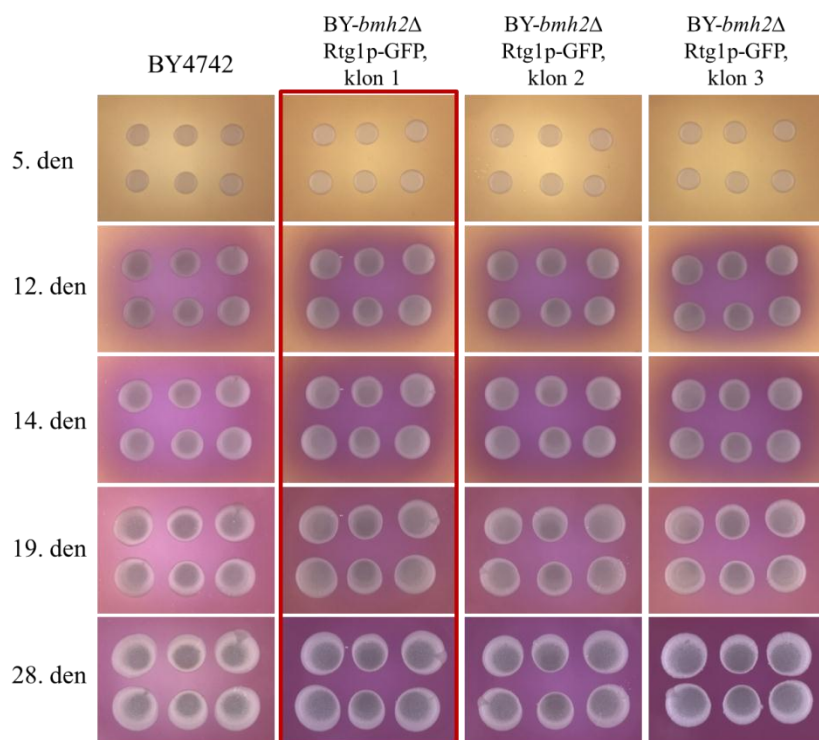


Obr. 40. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh2*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.

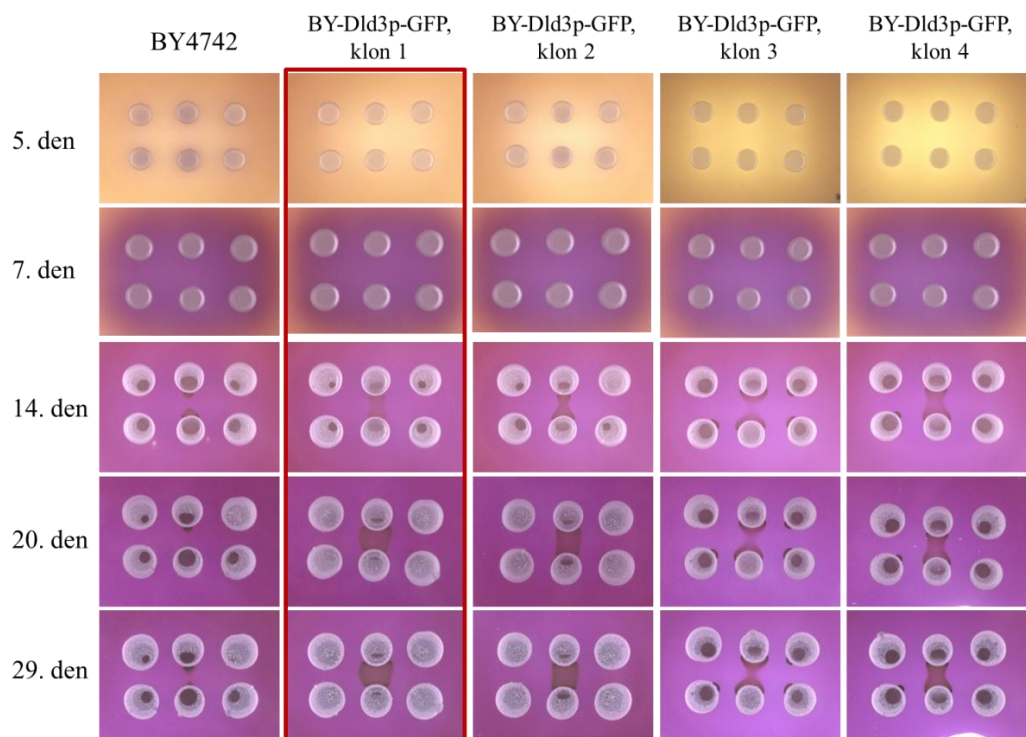


Obr. 41. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh2*Δ Cit2p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

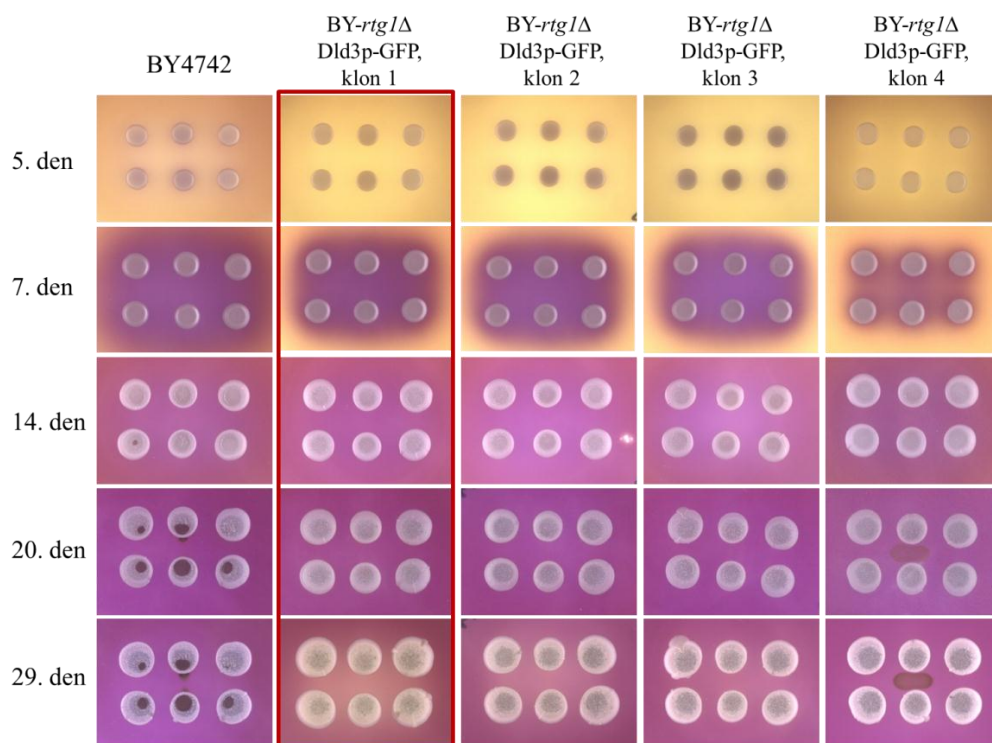




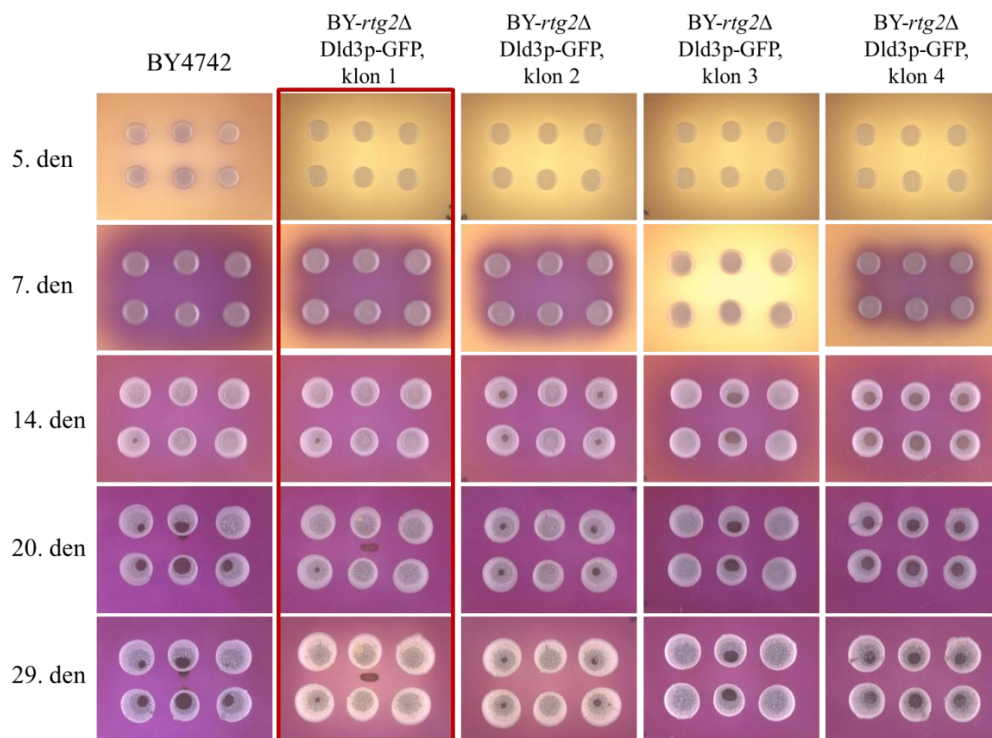
Obr. 42. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*bmh2Δ* Rtg1p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



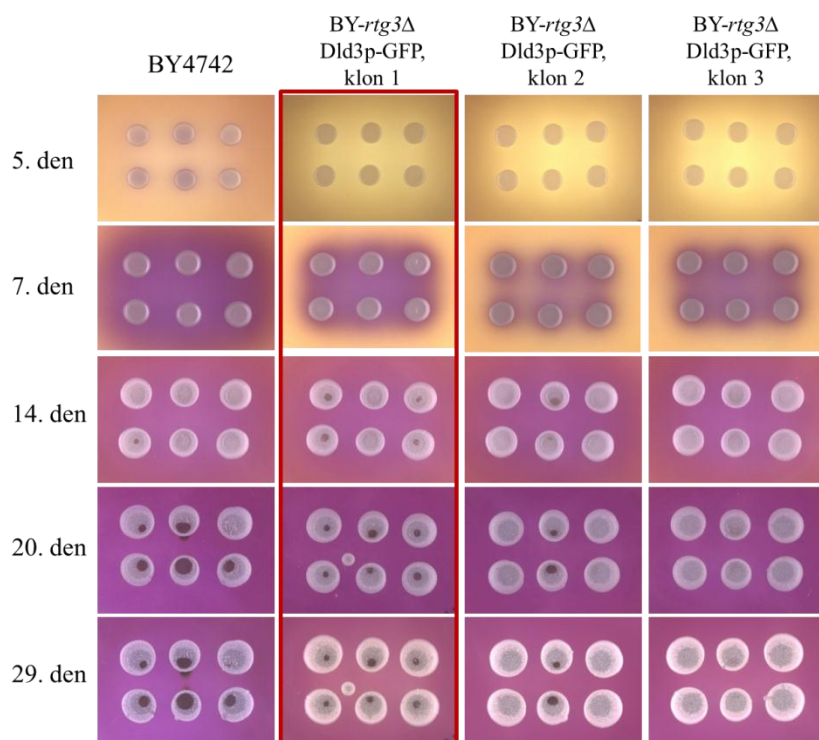
Obr. 43. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-Dld3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



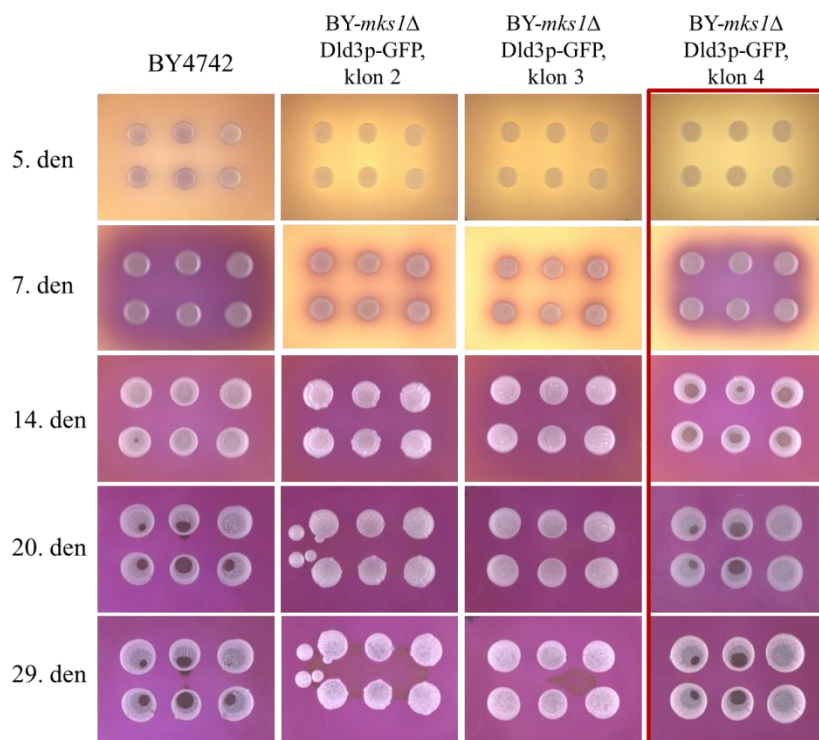
Obr. 44. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg1Δ* Dld3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.



Obr. 45. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg2Δ* Dld3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

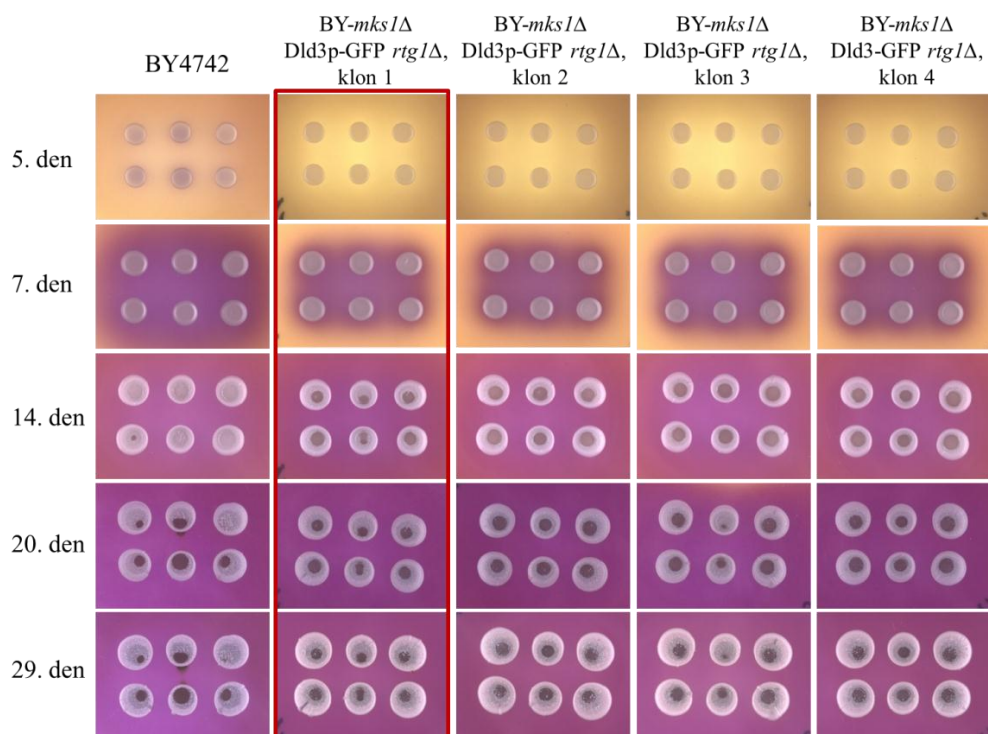


Obr. 46. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*rtg3Δ* Dld3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 1.

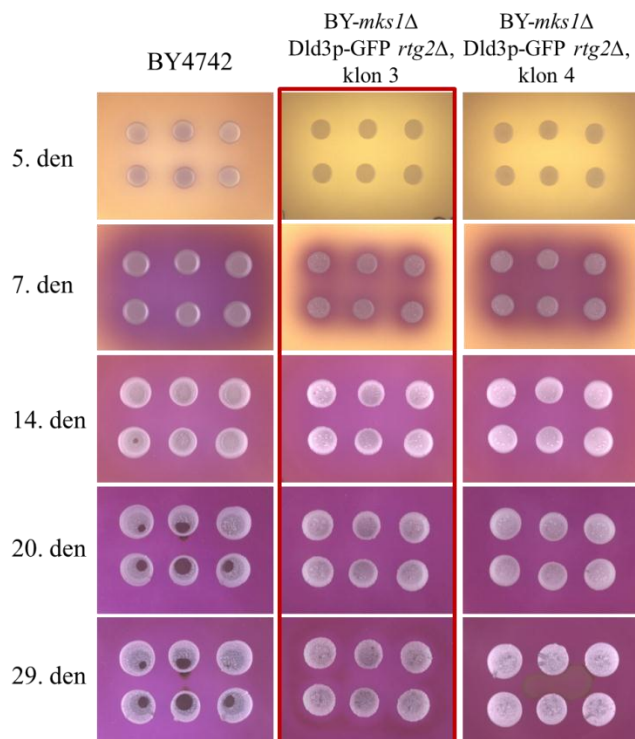


Obr. 47. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP. Pro další práci byl vybrán klon 4. Klony 2 a 3 mají poruchu růstu a nadprodukuji GFP, která degradují ve vakuolách.

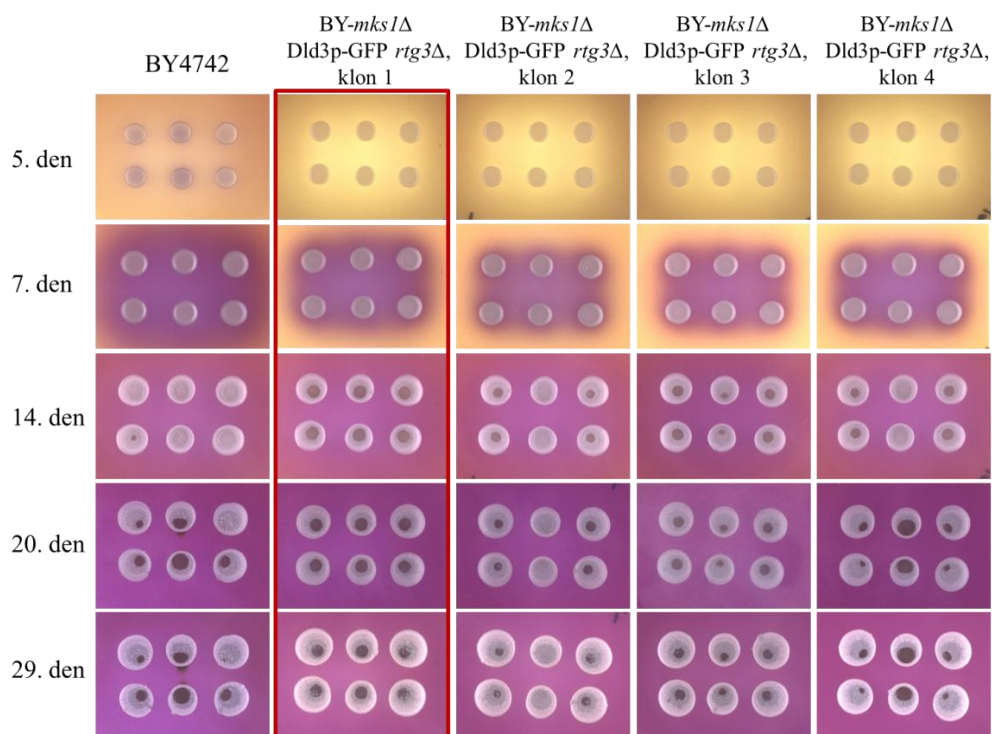




Obr. 48. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Dld3p-GFP *rtg1*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.



Obr. 49. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Dld3p-GFP *rtg2*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.



Obr. 50. Průběh alkalizace a morfologie kolonií rodičovského kmene BY4742 (kontrolní kmen) a kolonií klonů kmene BY-*mks1*Δ Dld3p-GFP *rtg3*Δ. Pro další práci byl vybrán klon 1.

## 5.4 Sekvenace kmenů

Pomocí sekvenace bylo u vybraných klonů zkontrolováno, zda nedošlo k mutaci GFP (u GFP konstruktů), resp. zda byl příslušný gen zcela odstraněn (u delečních kmenů). Z testovaných kmenů byla nejprve izolována chromosomální DNA fenol-chloroformovou extrakcí. Tato DNA byla následně použita pro PCR. U GFP konstruktů byl použit přímý primer z genu a zpětný GFP over R (za genem kódující GFP). Jednotlivé délky produktů shrnuje Tab. 15. U kmenů s delecí genu byl použit přímý primer před genem a zpětný primer nalézající se za genem. Jednotlivé délky produktů u delečních kmenů shrnuje Tab. 16.

DNA byla poté přečištěna podle protokolu Přečištění DNA po PCR a její koncentrace změřena na NanoDropu-1000. Vzorčky připravené DNA byly odeslány na sekvenační analýzu.

Pomocí programu Chromas Lite byla kontrolována úspěšnost a průběh reakce (Obr. 51) a výstupní sekvence byla porovnána s předpokládanou sekvencí. U delečních kmenů se navíc výstupní sekvence porovnávala se sekvencí deletovaného genu.

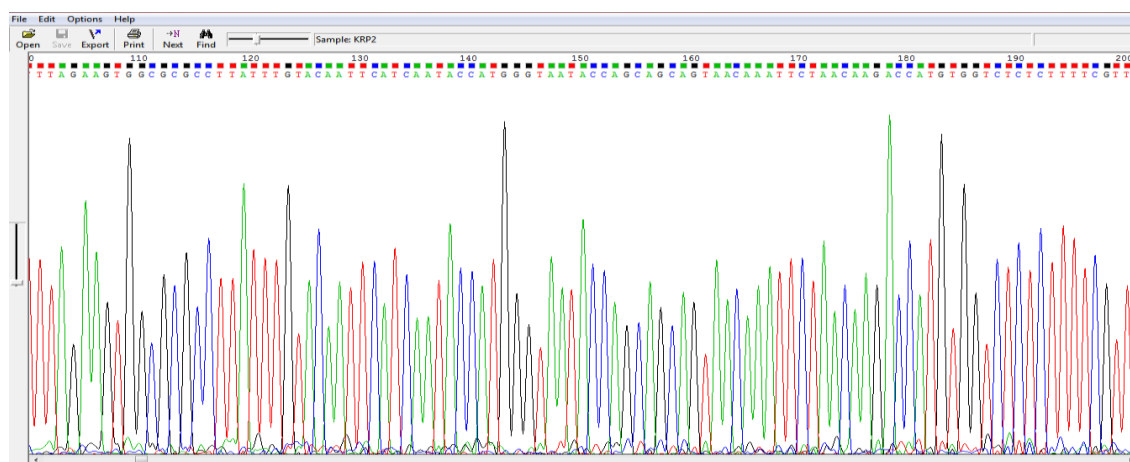


Tab. 15. Délky produktů určené pro sekvenaci. Tabulka zobrazuje jednotlivé délky produktů PCR určené pro sekvenaci GFP konstruktů.

Kmen	Délka sekvenované oblasti
BY-Cit2p-GFP	1271 bp
BY-Rtg1p-GFP	1184 bp
BY-Rtg2p-GFP	1372 bp
BY-Rtg3p-GFP	1434 bp
BY-Mks1p-GFP	1355 bp
BY-Dld3p-GFP	1380 bp

Tab. 16. Délky produktů určené pro sekvenaci. Tabulka zobrazuje jednotlivé délky produktů PCR určené pro sekvenaci delečních kmenů.

Kmen	Délka sekvenované oblasti
BY- <i>rtg1</i> Δ (nat)	1703 bp
BY- <i>rtg2</i> Δ (nat)	1864 bp
BY- <i>rtg3</i> Δ (nat)	1780 bp
BY- <i>rtg1</i> Δ (hph)	2156 bp
BY- <i>rtg2</i> Δ (hph)	2317 bp
BY- <i>rtg3</i> Δ (hph)	2233 bp
BY- <i>mks1</i> Δ (nat)	1923 bp
BY- <i>bmh1</i> Δ (nat)	1773 bp
BY- <i>bmh2</i> Δ (nat)	2134 bp



Obr. 51. Ukázka průběhu sekvenace testovaného kmene. Porovnání s předpokládanými sekvencemi neodhalilo mutaci.

## 5.5 Ověření GFP signálu, jeho lokalizace a intenzita

Všechny GFP konstrukty tj. BY-Cit2p-GFP, BY-Dld3p-GFP, BY-Mks1p-GFP, BY-Rtg1p-GFP, BY-Rtg2p-GFP, BY-Rtg3p-GFP v rodičovském kmeni BY4742 rostly 24 hodin na agarových plotnách s YEPGA médiem s edicinem při 28 °C v termostatu. Buňky byly odebrány do destilované vody a ihned pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica. Morfologie buněk všech připravených kmenů byla porovnaná s buňkami rodičovského kmene BY4742. Buňky se svou morfologií nelišily až na kmen BY-Rtg3p-GFP (Obr. 59). Kmen BY-Rtg3p-GFP má buňky větší a protáhlé většinou s jednou velkou vakuolou na kraji buňky.

Všechny proteiny označené GFP (Rtg1p, Rtg2p, Mks1p, Dld3p, Cit2p) lokalizují v cytoplazmě buňky. Pouze proteiny Rtg1p a Rtg3p mohou relokalizovat do jádra za podmínek aktivace RTG dráhy. U kmene BY-Rtg3p-GFP nebylo možné pozorovat cytoplazmatický signál na glukózovém médiu, protože je úroveň produkce proteinu nízká. Že je konstrukt v pořádku, bylo ověřeno pomocí růstu na minimálním médiu v kapitole 5.5.1.

Bylo předpokládáno, že protein Cit2p v delecích genů *RTG1*, *RTG2*, *RTG3* se nebude produkovat a tím potvrdíme i teorii, že exprese genu *CIT2* je plně závislá na RTG dráze. Protein Mks1p je negativním regulátorem RTG dráhy a odstranění je genu *MKS1* povede k permanentní aktivaci RTG dráhy a tím i nadprodukcí proteinu Cit2p. Při odstranění jednoho ze 14-3-3 proteinů pravděpodobně nedojde k žádné změně v expresi genu *CIT2*. Odstranění obou proteinů nebylo možné z hlediska životaschopnosti kmene BY-*bmh1Δ bmh2Δ*.

Úroveň exprese genu *CIT2* u kmene BY-Cit2p-GFP a kmenů od něj odvozených (BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP, BY-*bmh1Δ* Cit2p-GFP, BY-*bmh2Δ* Cit2p-GFP, BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP *rtg2Δ*) byla na glukózovém médiu na stejné úrovni (Obr. 52 a 54). Což znamená, že Mks1p nehraje významnou roli represoru na YEPG médiu. U kmene s delecí jednoho ze skupiny RTG proteinů (Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p) není funkční RTG dráha (Obr. 53). Exprese genu *CIT2* je plně závislá na RTG dráze, proto v kmenech s delecí RTG genů není produkován protein Cit2p-GFP. Pokud odstraníme jeden z proteinů transkripčního dimeru Rtg1p/Rtg3p dojde ke ztrátě schopnosti vázat se na DNA (Rtg1p) nebo aktivovat transkripci genů (Rtg3p). Jiný případ nastává u kombinace delece RTG genu a genu pro negativní regulátor Mks1p. Pokud odstraníme cytoplazmatické regulátory Rtg2p a Mks1p, transkripční faktor Rtg1p/Rtg3p zůstane permanentně v jádře, kde může aktivovat expresi cílových genů. Pokud odstraníme jeden z proteinů transkripčního dimeru Rtg1p/Rtg3p je RTG dráha nefunkční, ačkoliv je odstraněn negativní regulátor Mks1p (Obr. 54).

U kmene s *DLD3* genem fúzovaným s reportérovým genem pro GFP a kmenů odvozených od BY-Dld3p-GFP, bylo očekáváno, že gen *DLD3* je regulovaný RTG dráhou. V delecí negativního regulátoru Mks1p (BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP) bylo předpokládáno, že dojde ke zvýšení hladiny produkce Dld3p. Bylo předpokládáno, že kmen BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP se bude chovat stejně jako kmen BY-*mks1Δ* *rtg2Δ* Dld3p-GFP, protože po odstranění negativního regulátoru Mks1p již není potřeba proteinu Rtg2p, který by dráhu aktivoval, když již je RTG dráha aktivovaná permanentně. A při delecí

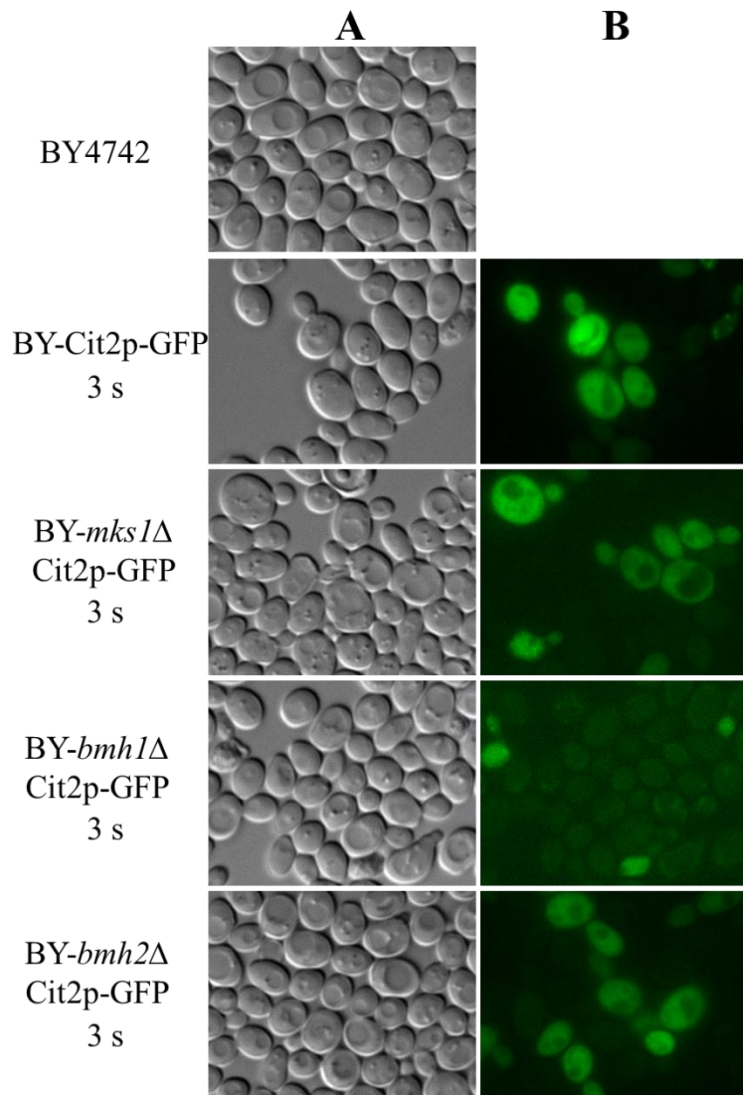
jednoho z RTG proteinů dojde k výraznému snížení hladiny proteinu až žádné produkci proteinu Dld3p. Pokud by nedocházelo k žádné produkci Dld3p-GFP, znamenalo by to, že je gen *DLD3* plně regulován RTG drahou.

Na glukózovém médiu je gen *DLD3* reprimován proteinem Mks1p. Při odstranění genu *MKS1* (kmen *BY-mks1Δ* Dld3p-GFP, obr. 55) došlo k významnému zvýšení exprese genu *DLD3*. A při odstranění RTG proteinů došlo ke snížení exprese (obr. 55).

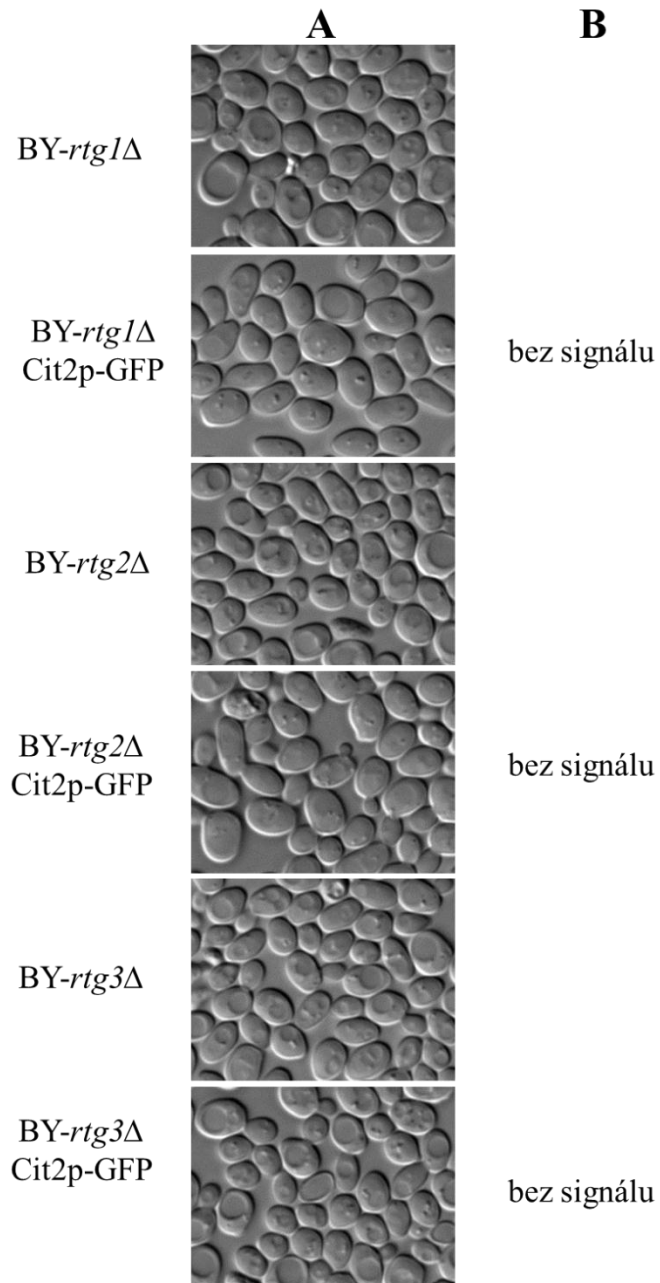
Ačkoliv je gen *DLD3* exprimován v kmenech s delecí RTG genů, v kmenech s kombinací delece RTG genů a *MKS1* genu se *DLD3* neexprimuje. Tj. v kmenech *BY-mks1Δ rtg1Δ* a *BY-mks1Δ rtg3Δ*. U kmene *BY-mks1Δ rtg2Δ* došlo k basální expresi *DLD3*. Vše poukazuje, že RTG dráha je důležitá při regulaci genu *DLD3* a zároveň je tento gen regulován pomocí jiných regulačních mechanismů, které doposud nebyly objasněny (Obr. 56). Regulace *DLD3* tedy není plně závislá na RTG dráze.

Dále byla pozorována produkce *BY-Rtg1p-GFP* v rodičovském kmeni a kmenech *BY-mks1Δ Rtg1p-GFP*, *BY-bmh1Δ Rtg1p-GFP* a *BY-bmh2Δ Rtg1p-GFP*. Produkce *Rtg1p-GFP* ve všech kmenech byla na stejné úrovni.

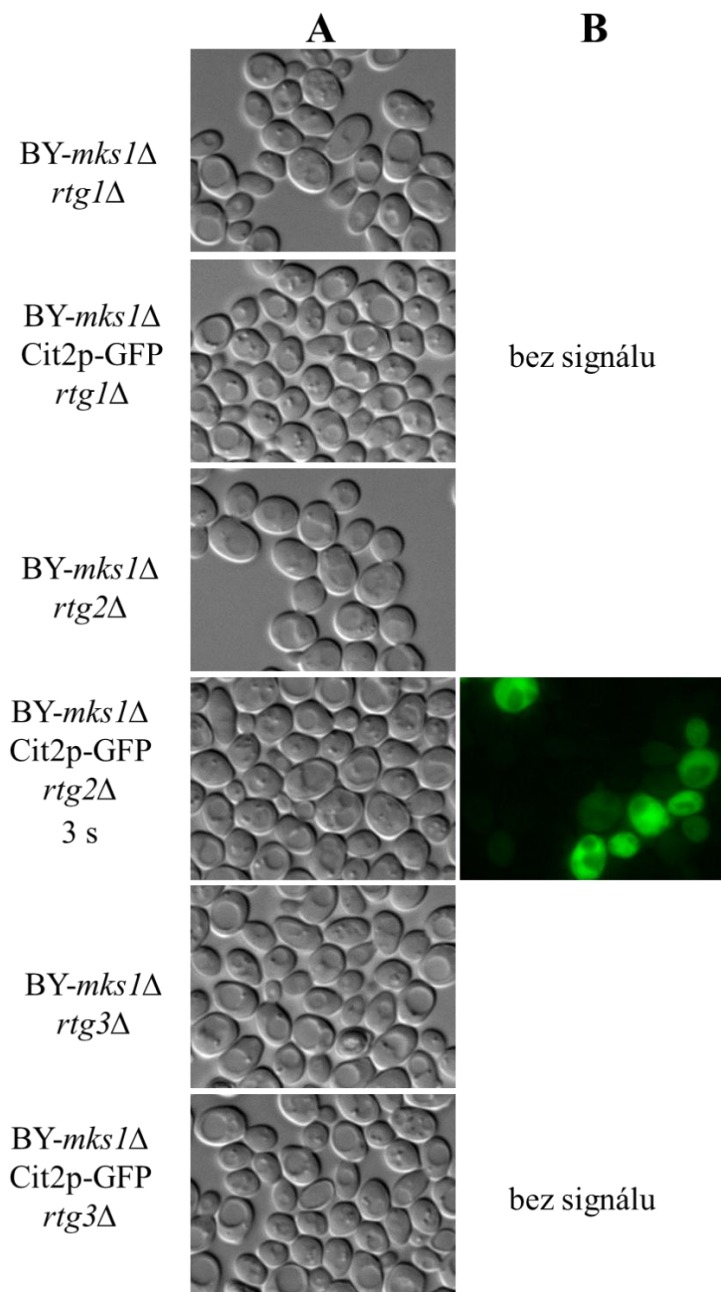
Kmen *BY-Mks1p-GFP* svítí velice slabě a jeho využití je především pro konfokální mikroskopii. Kmen *BY-Rtg2p-GFP* má cytoplazmatickou GFP lokalizaci. *BY-Rtg3p-GFP* nesvítí na glukózovém médiu (Obr. 59).



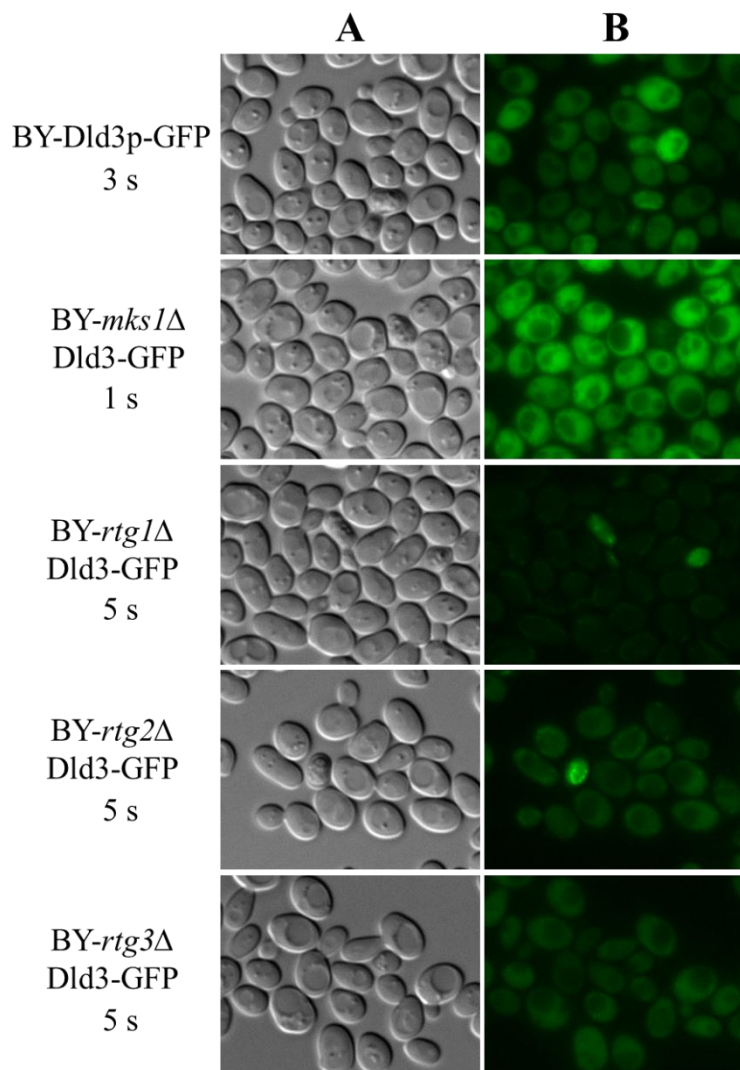
Obr. 52. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmenu příliš neliší. Intenzitou fluorescence se kmeny nelišily.



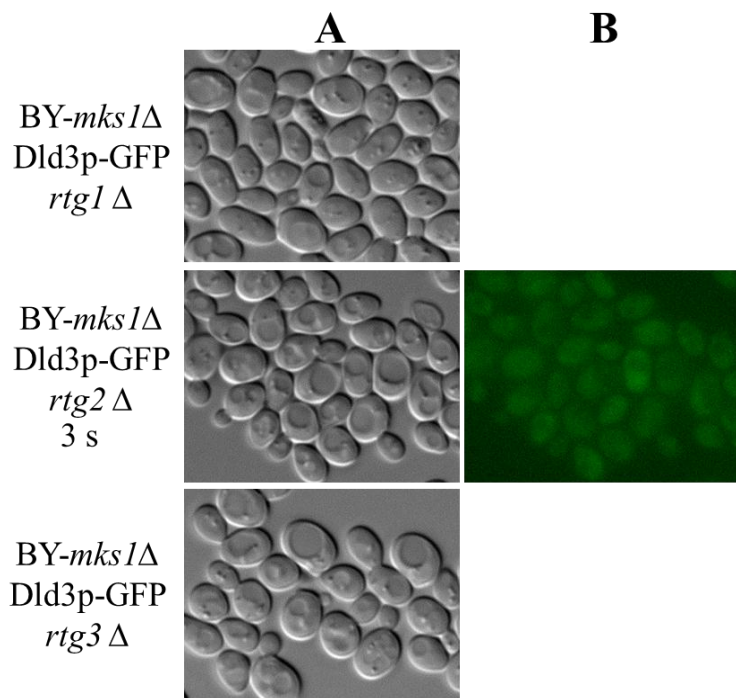
Obr. 53. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmene příliš neliší.



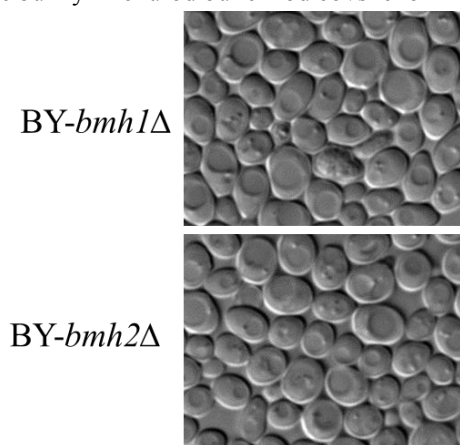
Obr. 54. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky připravených kmenů od buněk rodičovského kmene příliš neliší.



Obr. 55. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Buňkyrostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmenu příliš neliší.

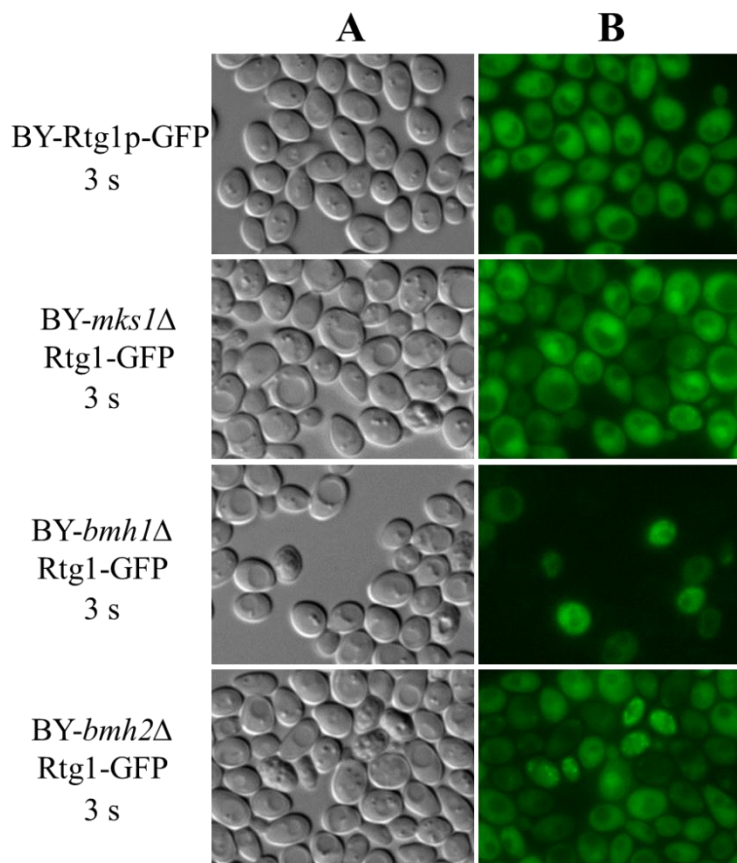


Obr. 56. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmenu příliš neliší.

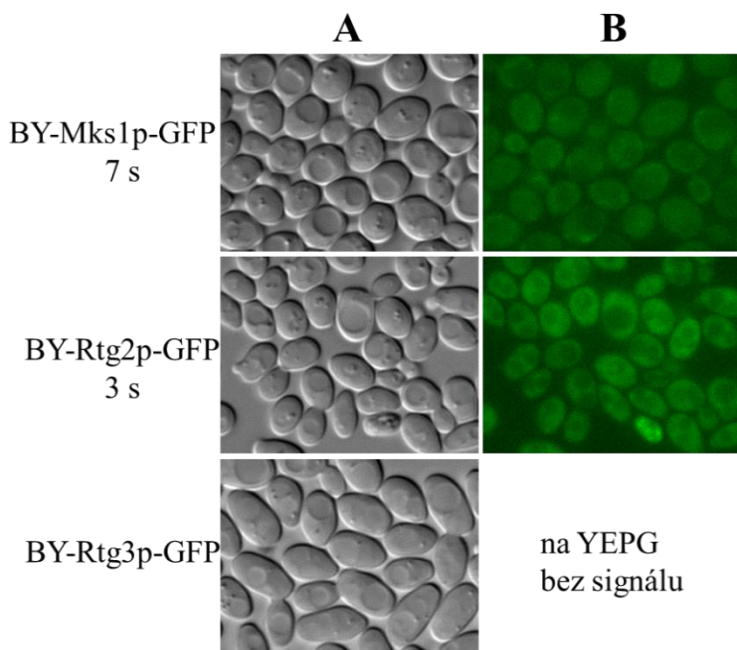


Obr. 57. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmenu příliš neliší.





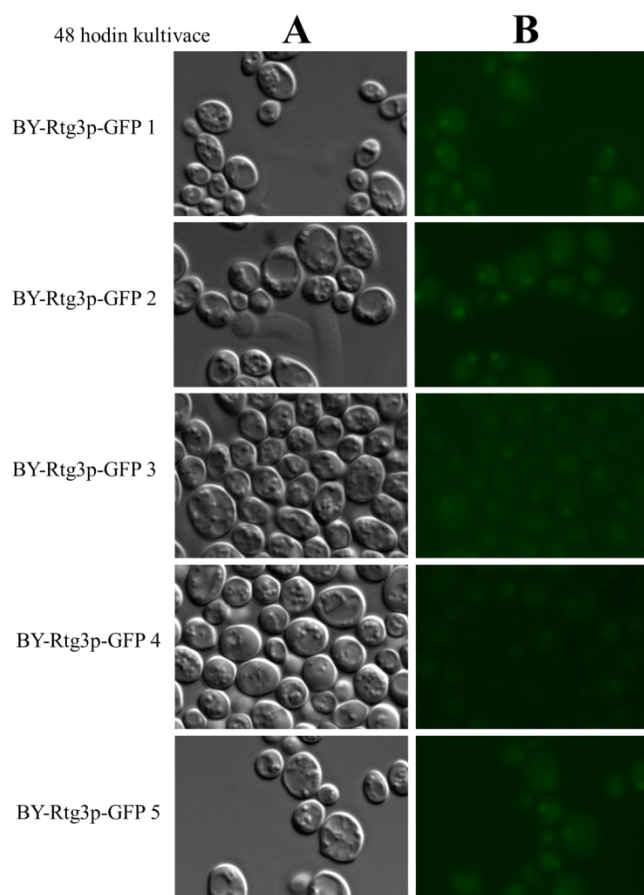
Obr. 58. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se buňky kmenů od buněk rodičovského kmene příliš neliší.



Obr. 59. Růst a fluorescence kmenů na YEPGA médiu. Kmeny rostly 24 hodin na YEPGA médiu. Morfologicky se liší buňky kmene BY-Rtg3p-GFP od buněk rodičovského kmene. Kmen BY-Mks1p-GFP má velice slabý signál na glukózovém médiu. Kmen BY-Rtg3p-GFP na glukóze nesvítí, protože exprese genu *RTG3* u kmenů rostoucí na glukóze je nízká.

### 5.5.1 Ověření GFP signálu kmene BY-Rtg3p-GFP

U kmene BY-Rtg3p-GFP nebyla za podmínek kultivace na YEPGA médiu GFP fluorescence pozorována. V literatuře se uvádí, že gen *RTG3* není konstitutivně přepisovaný a jeho exprese se zvyšuje prostřednictvím nedostatku dusíku v médiu. 4 klony kmene BY-Rtg3p-GFP byly proto kultivovány na MMA bez obsahu soli  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a roztoku Wickerhama po dobu tří dnů v termostatu při 28 °C. Předpoklad byl, že snížení obsahu dusíku povede k indukci RTG dráhy. Po 48 hodinách od inokulace na MMA byla odebrána biomasa a pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Leica. U prvních třech klonů došlo k přesunu Rtg3p-GFP do jádra. U čtvrtého klonu byl signál velmi slabý, a proto byl vyřazen. Po 72 hodinách byly buňky kmene BY-Rtg3p-GFP opět pozorovány pod mikroskopem, s negativním výsledkem. Došlo k přesunutí Rtg3p-GFP a snížení exprese genu *RTG3*. Výsledky z indukce RTG dráhy pomocí MMA zobrazuje obr. 60.

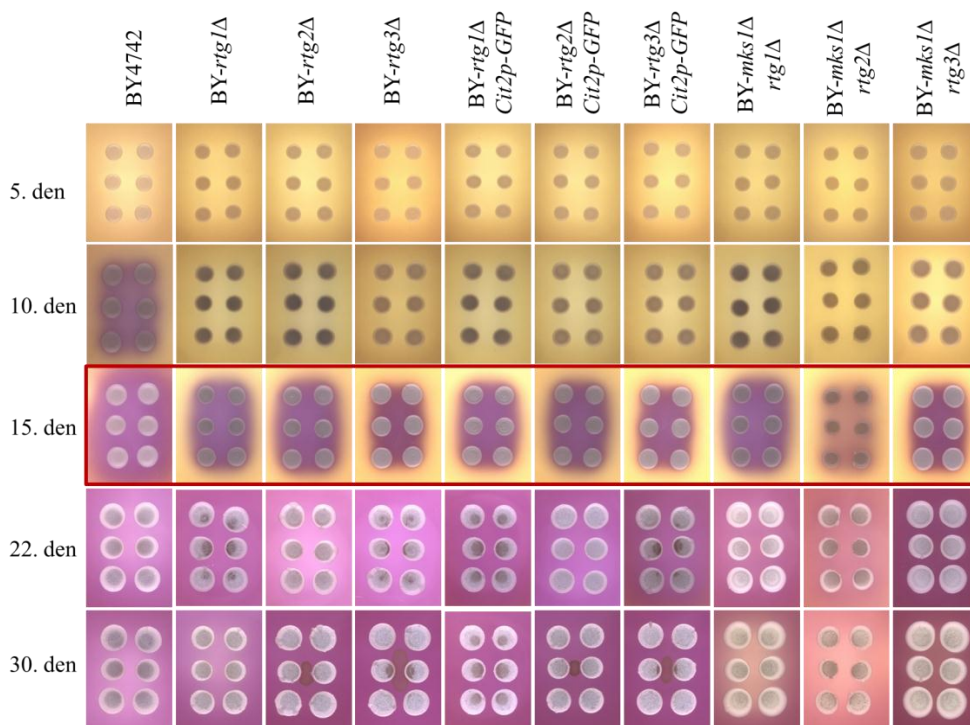


Obr. 60. Produkce Rtg3p-GFP u kmene BY-Rtg3p-GFP. Po aktivaci exprese genu dochází k přesunu dimeru Rtg1p/Rtg3p do jádra. A, buňky vizualizované pomocí Nomarského kontrastu. B, GFP fluorescence. Z obrázku je patrné, že u klonu 4 došlo ke slabé produkci Rtg3p-GFP. Z těchto důvodů se s ním nebude dále pracovat.

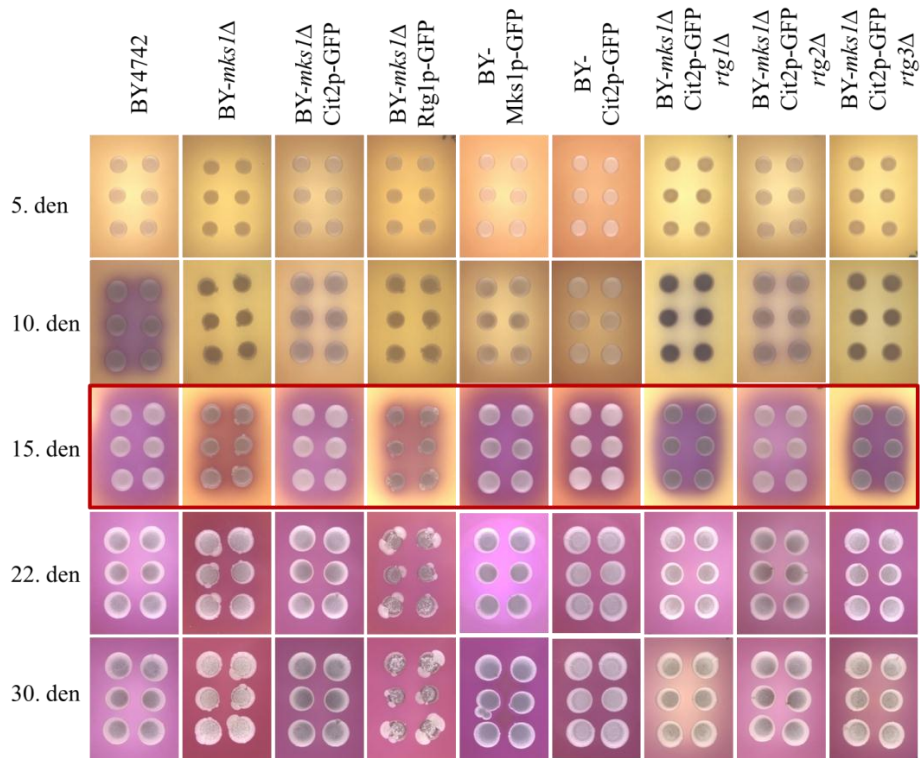
### 5.6 Charakteristika kolonií připravených kmenů

Morfologie kolonií všech kmenů byla navzájem porovnaná ve dvou pokusech (Obr. 61-64). Kmeny je možné rozdělit do tří skupin: 1. skupina, kdy změna v genomu výchozího kmene BY4742

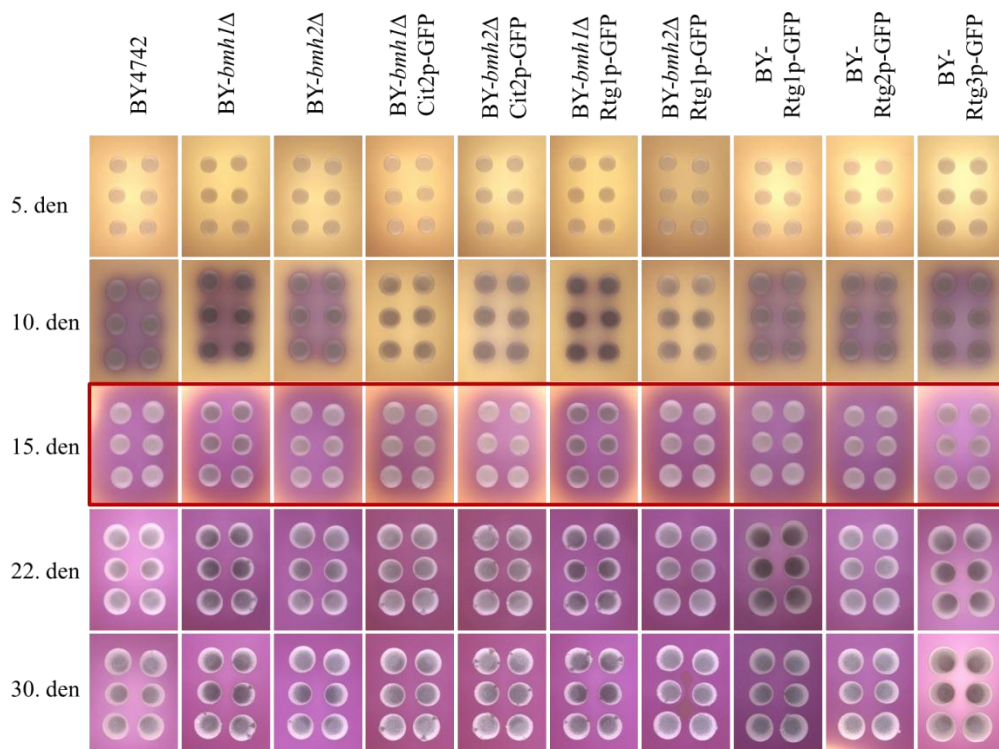
neměla vliv na vývoj a morfologii kolonií, 2. skupina, kdy změna v genetickém kódu měla vliv na růst a morfologii kmene. Do 1. skupiny patří kmeny BY-Cit2p-GFP, BY-Mks1p-GFP, BY-Rtg1p-GFP, BY-Rtg2p-GFP, BY-Rtg3p-GFP, BY-*bmh1Δ*, BY-*bmh2Δ*, BY-*bmh1Δ* Rtg1p-GFP, BY-*bmh1Δ* Cit2p-GFP, BY-*bmh2Δ* Rtg1p-GFP, BY-*bmh2Δ* Cit2p-GFP. Do 2. skupiny BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP, BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP, BY-*rtg1Δ*, BY-*rtg2Δ*, BY-*rtg3Δ*, BY-*rtg1Δ* Cit2p-GFP, BY-*rtg2Δ* Cit2p-GFP, BY-*rtg3Δ* Cit2p-GFP, BY-*rtg1Δ* Dld3p-GFP, BY-*rtg2Δ* Dld3p-GFP, BY-*rtg3Δ* Dld3p-GFP, BY-*mks1Δ*, BY-*mks1Δ* Rtg1p-GFP, BY-*mks1Δ* *rtg2Δ*, BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP *rtg1Δ*, BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP *rtg3Δ*, BY-*mks1Δ* *rtg1Δ*, BY-*mks1Δ* *rtg3Δ*, BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP *rtg2Δ*, BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP *rtg1Δ*, BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP *rtg2Δ* a BY-*mks1Δ* Dld3p-GFP *rtg3Δ*. Kolonie kmenů byly foceny ob jeden nebo dva dny po dobu jednoho měsíce. Z kolonií nacházejících se v alkalické vývojové fázi (Obr. 61-63, alkalická fáze vyznačena obdélníkem) byly připraveny tenké řezy a analyzovány mikroskopem.



Obr. 61. Morfologie a test alkalizace obřích kolonií rostoucích na GMA mediu. Z obrázku je patrná pozdější doba alkalizace u kolonií všech modifikovaných kmenů a to z důvodu pomalejšího růstu oproti rodičovskému kmeni BY4742. Morfologicky se odlišuje především kmen BY-*mks1Δ* *rtg2Δ*. Tento kmen alkalizuje podstatně slaběji a tvoří menší kolonie.

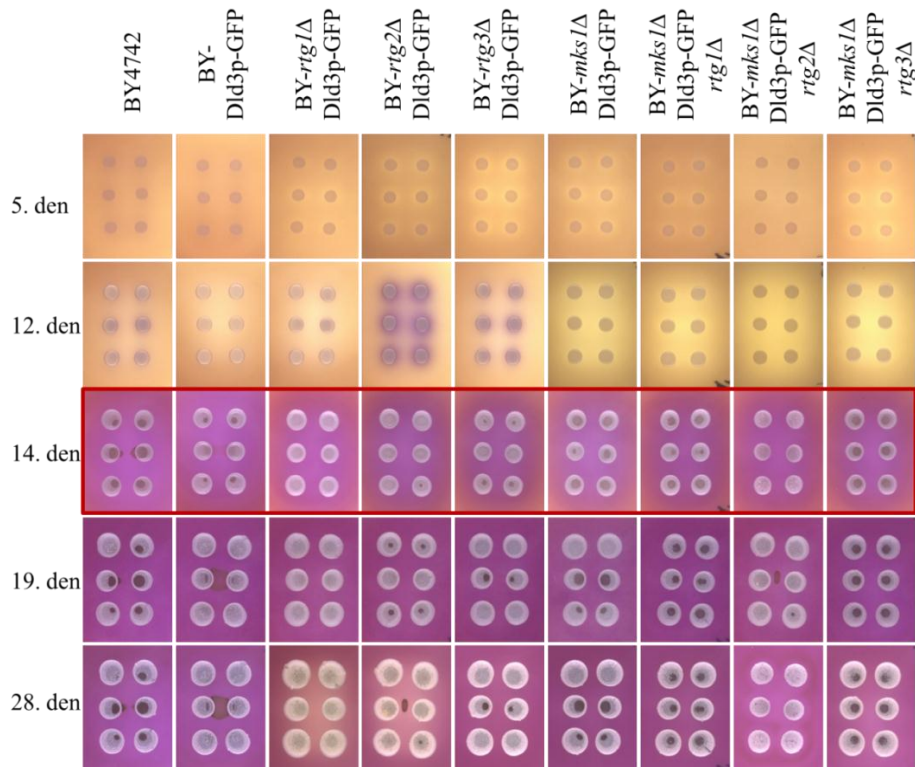


Obr. 62. Morfologie a test alkalizace oběh kolonií, růst na respiračním médiu. Z obrázku je patrná pozdější doba alkalizace u *BY-mks1*Δ, *BY-mks1*Δ Rtg1p-GFP, *BY-mks1*Δ Cit2p-GFP *rtg1*Δ, *BY-mks1*Δ Cit2p-GFP *rtg3*Δ. Kmeny *BY-mks1*Δ a *BY-mks1*Δ Rtg1p-GFP také tvoří množství sektorů, které jsou typické pro genetickou nestabilitu kmene.



Obr. 63. Morfologie a test alkalizace oběh kolonií, růst na respiračním médiu. Doba alkalizace u všech testovaných kmenů je s dobou alkalizace rodičovskému kmene BY4742 shodná.





Obr. 64. Morfologie a test alkalizace obřích kolonií, růst na respiračním médiu. Doba alkalizace u všech testovaných kmenů je s dobou alkalizace rodičovskému kmene BY4742 shodná.

### 5.6.1 Analýza buněčných subpopulací kolonií modifikovaných kmenů řezu na mikrotonu – pozorování subpopulací kolonií

Řezy byly vedeny vertikálně skrz střed kolonie tak, aby řez směřoval ze středu šestice kolonií do kraje misky (Obr. 20). Tenké řezy byly ihned mikroskopovány jednak při menším zvětšení (zpravidla objektivem 5x – 10x dle velikosti kolonie), jednak byl připraven průřez středu celé kolonie při větším zvětšení (objektiv 100x) a byly snímány jednotlivé subpopulace a jejich morfologie. Jednotlivé subpopulace jsou vždy porovnávány vůči rodičovskému kmene BY4742. Na preparátech jsem si všimla morfologii jednotlivých buněk, výšku vrstev a mrtvých buněk ve vrstvách kolonie. U kolonií GFP konstruktů jsem se zaměřila na lokalizaci a intenzitu GFP signálu v rámci vrstev (subpopulací) a lokalizaci v jednotlivých buňkách. Rovněž byl zaznamenán rozdíl intenzity fluorescence mezi U a L buňkami.

U kolonií kmene BY-Cit2p-GFP jsem pozorovala změnu intenzity GFP signálu/změnu v expresi genu *CIT2*. Fluorescence Cit2p-GFP byla nejsilnější v L buňkách, zatímco v U buňkách byla fluorescence snižena. Na základě předchozích zjištění, že exprese genu *CIT2* je plně závislá na retrográdní dráze (Dilova et al., 2002; Rothermel et al., 1997) jsme předpokládali, že i v koloniích dojde k umlčení exprese genu *CIT2* u kmenů s delecí jednoho z RTG proteinů. U kmenů BY-*rtg1Δ* Cit2p-GFP, BY-*rtg2Δ* Cit2p-GFP a BY-*rtg3Δ* Cit2p-GFP skutečně došlo k umlčení exprese genu *CIT2* (Obr. 71, 73, 75) i v rámci modelu kvasinkových kolonií.

V koloniích s delecí RTG genů se po alkalizaci u všech kmenů tvoří vrstva odumřelých buněk. Tvorba této vrstvy je závislá na intenzitě a době trvání alkalické fáze. Tvoří se až po začátku alkalizace a obecně platí, že čím je alkalizace silnější, tím dochází i většímu odumírání buněk a vrstva je silnější.

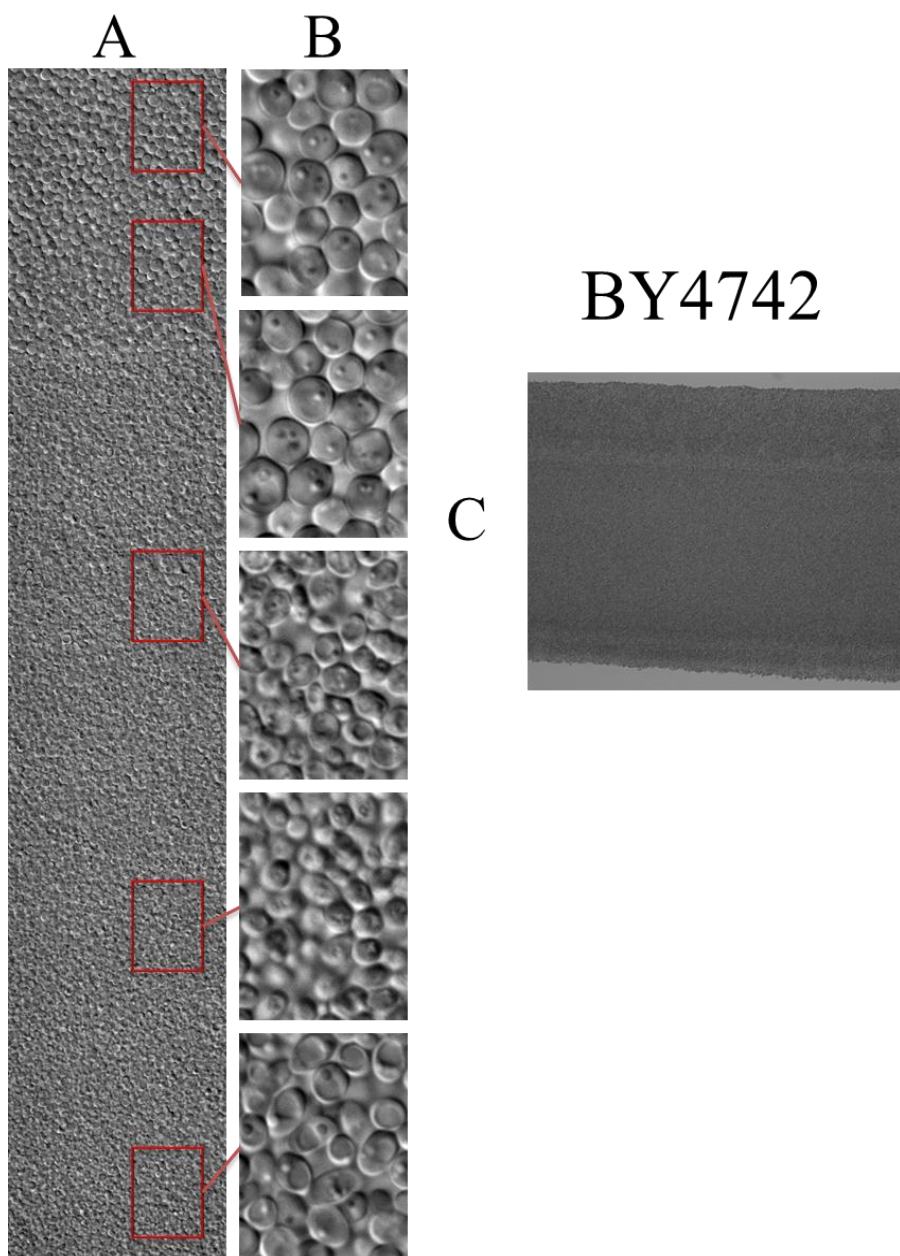
Buňky v horní vrstvě kolonií BY-*mks1Δ* jsou větší oproti buňkám kolonií rodičovského kmene, mezi jednotlivými buňkami jsou poměrně velké prostory a množství odumřelých buněk. Buňky ve spodní vrstvě jsou rovněž větší oproti buňkám kolonií rodičovského kmene.

Další náš předpoklad se týkal negativního regulátoru Mks1p. Při odstranění Mks1p jsme předpokládali zvýšení exprese genu *CIT2*. Při dvojitých delecích negativního regulátoru (gen *MKS1*) a genů transkripčního faktoru Rtg1p/Rtg3p (geny *RTG1* a *RTG3*) předpokládali, že nedojde k expresi genu *CIT2*. Naopak při delecí genu *MKS1* a *RTG2* jsme očekávali přibližně stejnou hladinu exprese genu *CIT2* jako u kmene BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP. Delecí pozitivního i negativního regulátoru by mělo dojít ke konstitutivní aktivaci retrogradní dráhy.

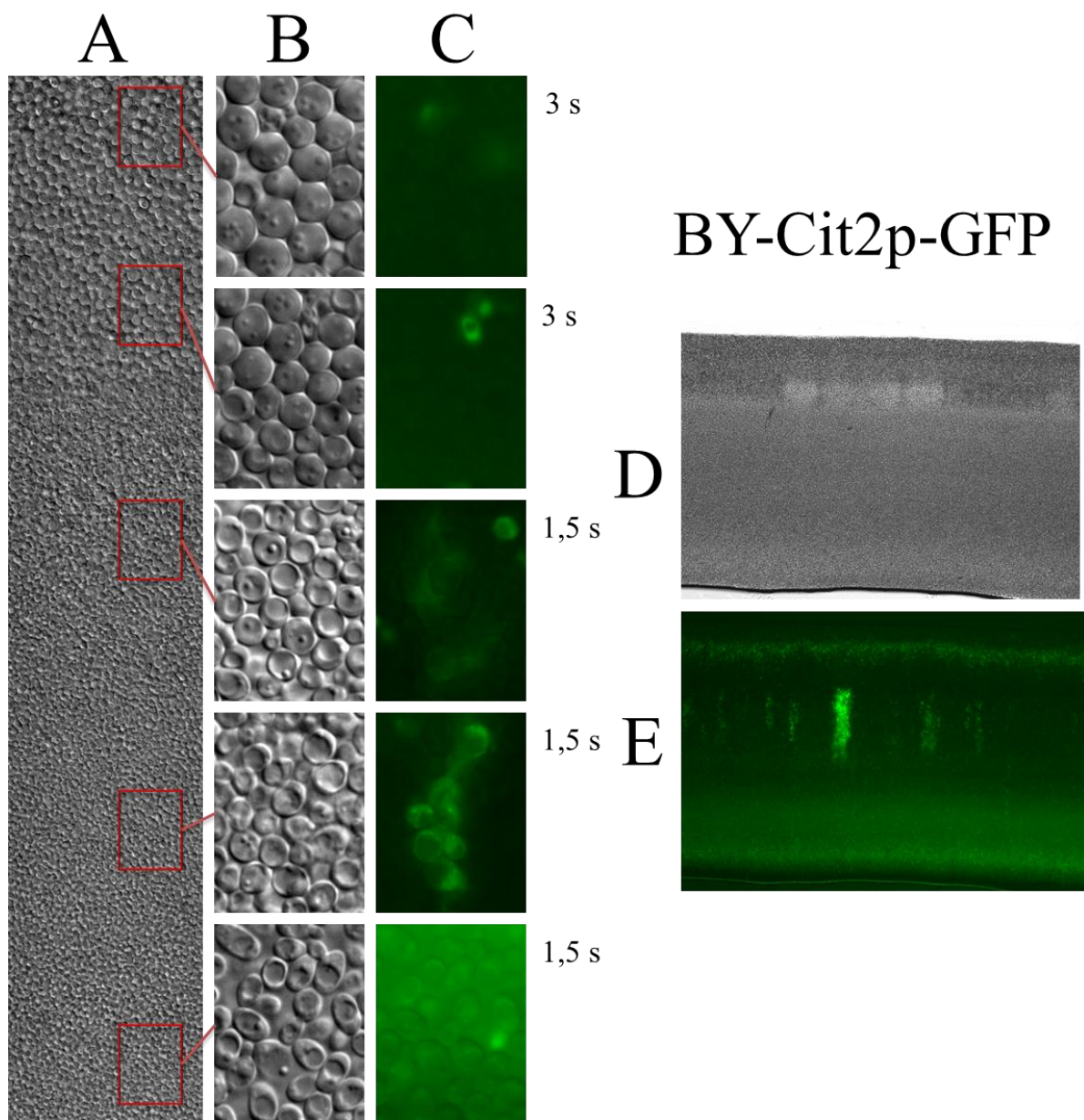
Absence dalšího negativního regulátoru Mks1p vedla k silnému zvýšení exprese genu *CIT2* v rámci kolonie (Obr. 77). Kombinace delece genu *MKS1* s *RTG* geny pak potvrdila náš předpoklad (Obr. 80, 82 a 84). U kmenů BY-*rtg1Δ mks1Δ* Cit2p-GFP a BY-*rtg3Δ mks1Δ* Cit2p-GFP nedošlo k expresi genu *CIT2* zatímco při odstranění negativního regulátoru Mks1p a zároveň aktivátoru Rtg2p i nadále docházelo k expresi genu *CIT2*. Kmen BY-*rtg2Δ mks1Δ* Cit2p-GFP vykazoval stejnou hladinu exprese *CIT2* jako kmen BY-*mks1Δ* Cit2p-GFP.

Delece obou Bmh proteinů mohou způsobit až 40-ti násobné zvýšení exprese genu *CIT2* (Liu et al., 2003). V našich pokusech se ukázalo, že delece Bmh1p nebo Bmh2p nemá významný vliv na expresi *CIT2* v koloniích. Odstranění obou Bmh genů se nezdařilo, pravděpodobně z důvodu neživotaschopnosti kmene BY-*bmh1Δ bmh2Δ*. U kmene BY-*bmh1Δ* Cit2p-GFP, došlo ke zvýšení exprese *CIT2* (Obr. 87), i když nijak výrazně. Delece genu *BMH2* neměla žádný vliv na expresi genu (Obr. 90).

Dále jsem pozorovala produkci a lokalizaci Rtg1p-GFP (Obr. 67). Gen *RTG1* byl v literatuře popsán jako konstitutivně aktivovaný (Sekito et al., 2000). V kmeni BY-Rtg1p-GFP byla hladina Rtg1p-GFP na stejné úrovni v rámci celé kolonie. Původní předpoklad byl, že by se hladina proteinu Rtg1p neměla nijak výrazně měnit, protože exprese genu *RTG1* je konstitutivní (Sekito et al., 2000). Delece genu *BMH2* skutečně nijak dramaticky neovlivnila expresi genu *RTG1* (obr. 91). Delece genu *BMH1* pak vedla k nepatrnému zvýšení exprese *RTG1*, ale pouze ve spodních L buňkách (obr. 88). V kmeni s delecí genu *MKS1* došlo k nepatrnému zvýšení exprese *RTG1* v rámci kolonie (obr. 78). Všechny změny jsou velmi malé a spíše neprůkazné. S největší pravděpodobností připravené delece nemají významný vliv na exprese genu *RTG1*.

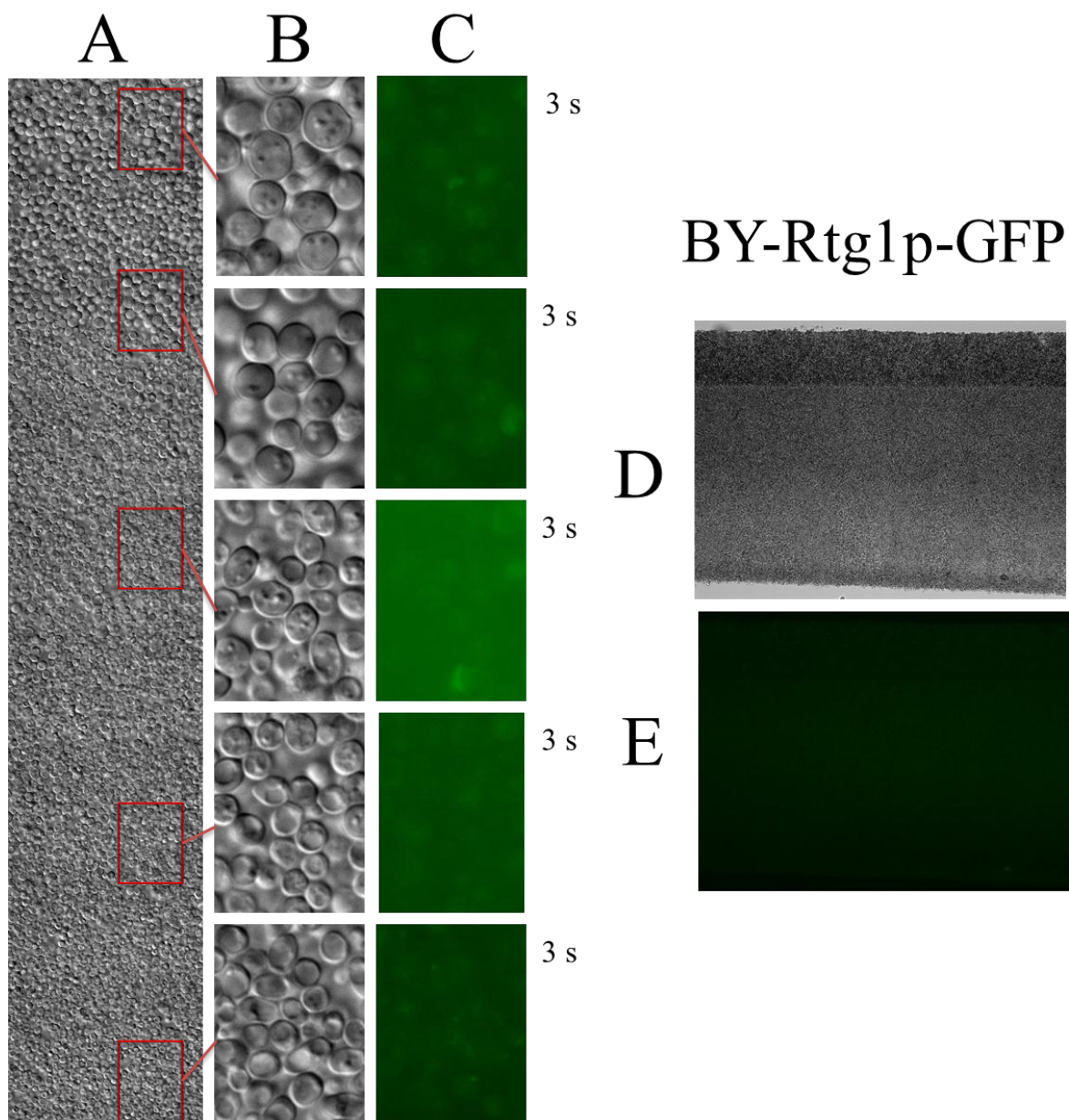


Obr. 65. Řez kolonií rodičovského kmene BY4742. A, uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. V panelu B je detail U buněk (1. a 2. obrázek ve sloupci) a detail L buněk (3. – 5. obrázek ve sloupci). Obrázky jednotlivých buněk jsou seřazeny sestupně od horní vrstvy k agaru kultivační misky. Kolonie kmene BY4742 slouží jako kontrola a vůči němu jsou porovnávány kolonie modifikovaných kmenů.

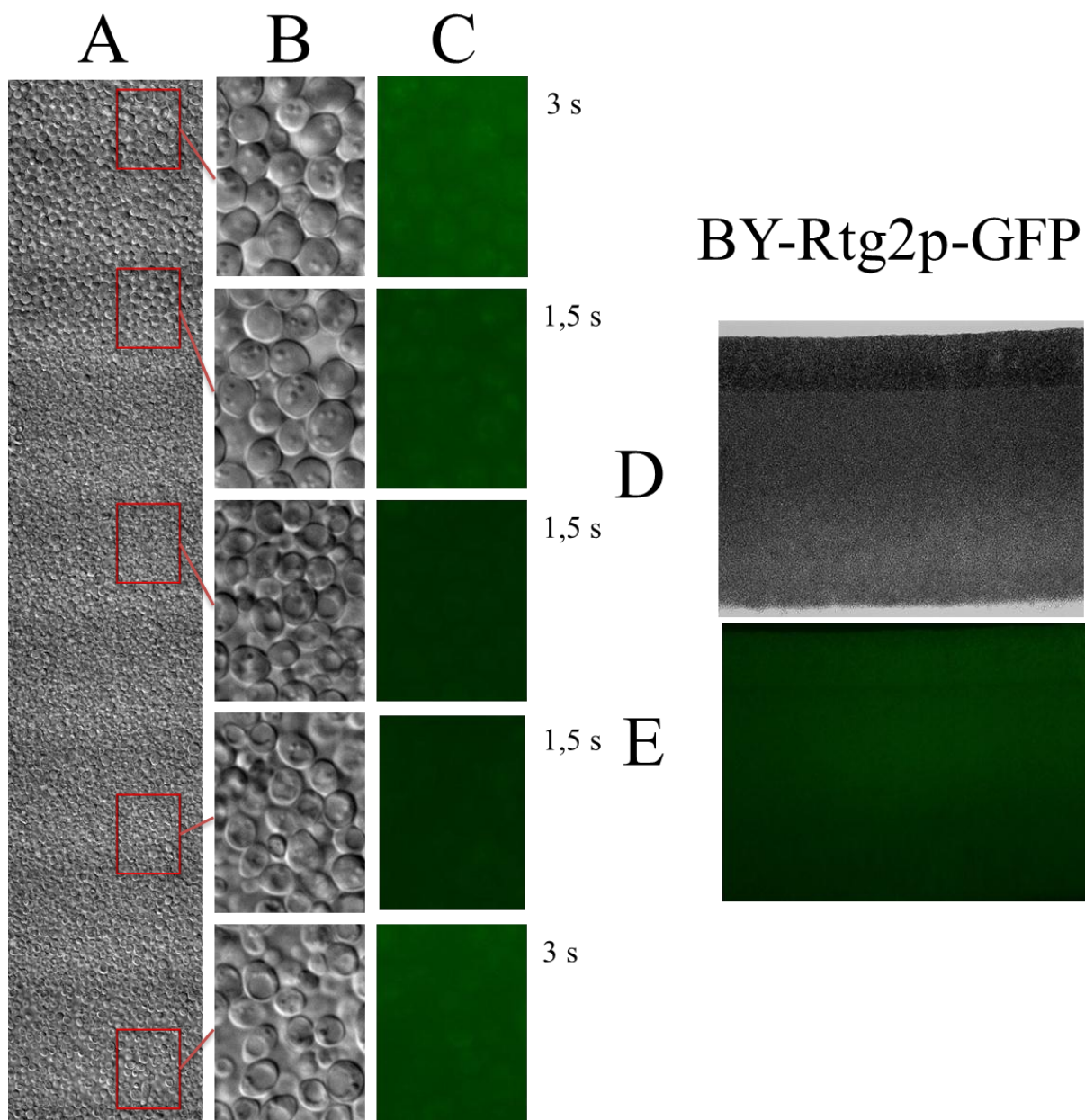


Obr. 66. Řez kolonií kmene BY-Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Kmen BY-Cit2p-GFP je typický svou lokalizací signálu GFP. U obřích kolonií, můžeme pozorovat slabý signál v U buňkách a silnější v L buňkách, kde se vyskytuje v rámci silněji svítících sektorů ve vrchní části L buněk a ve spodní vrstvě L buněk nalézající se u agaru.

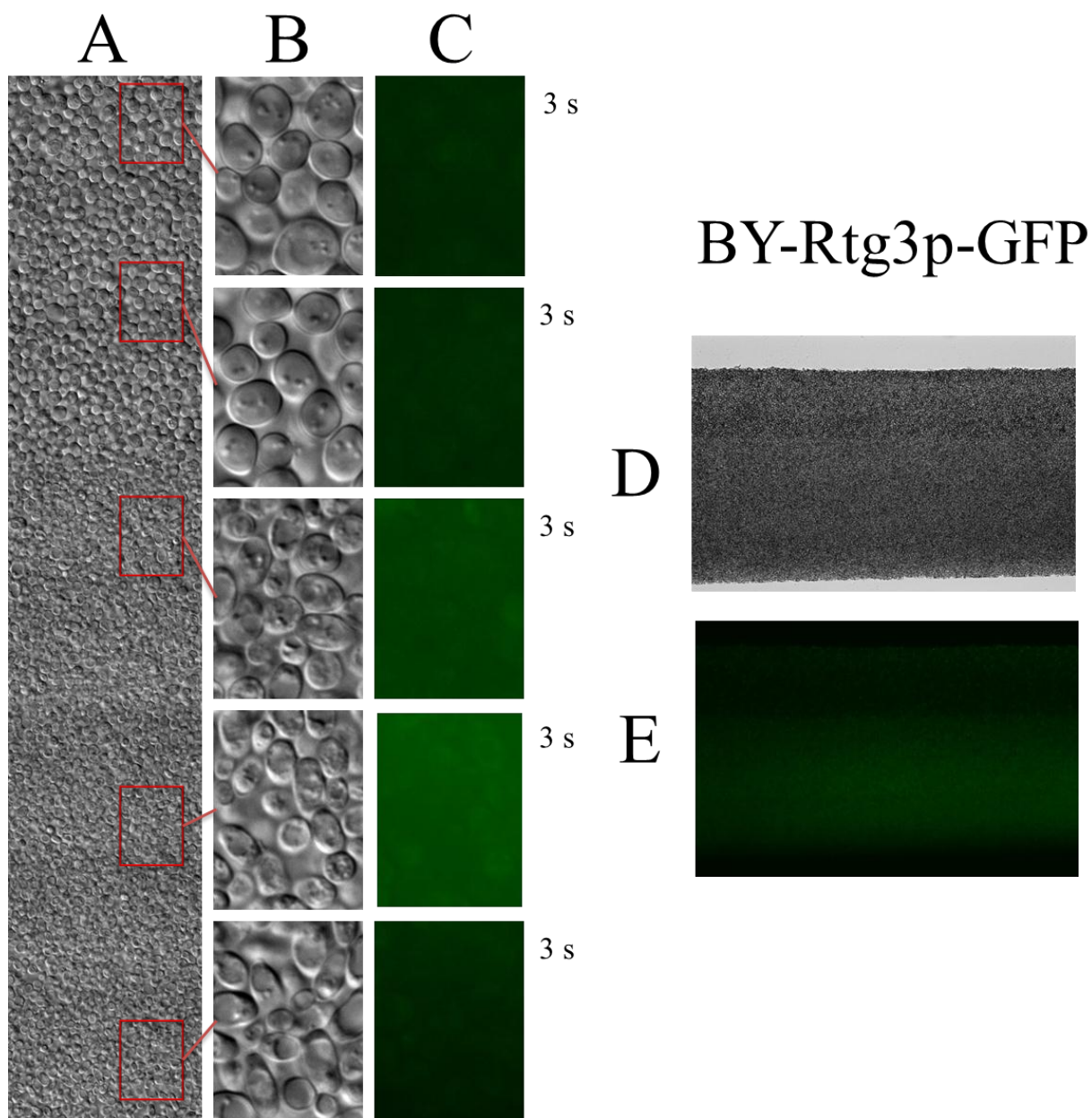




Obr. 67. Řez kolonií kmene BY- Rtg1p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Fluorescence Rtg1p-GFP je velmi slabá. Lépe je vidět v L buňkách, kde se vyskytuje v granulích.

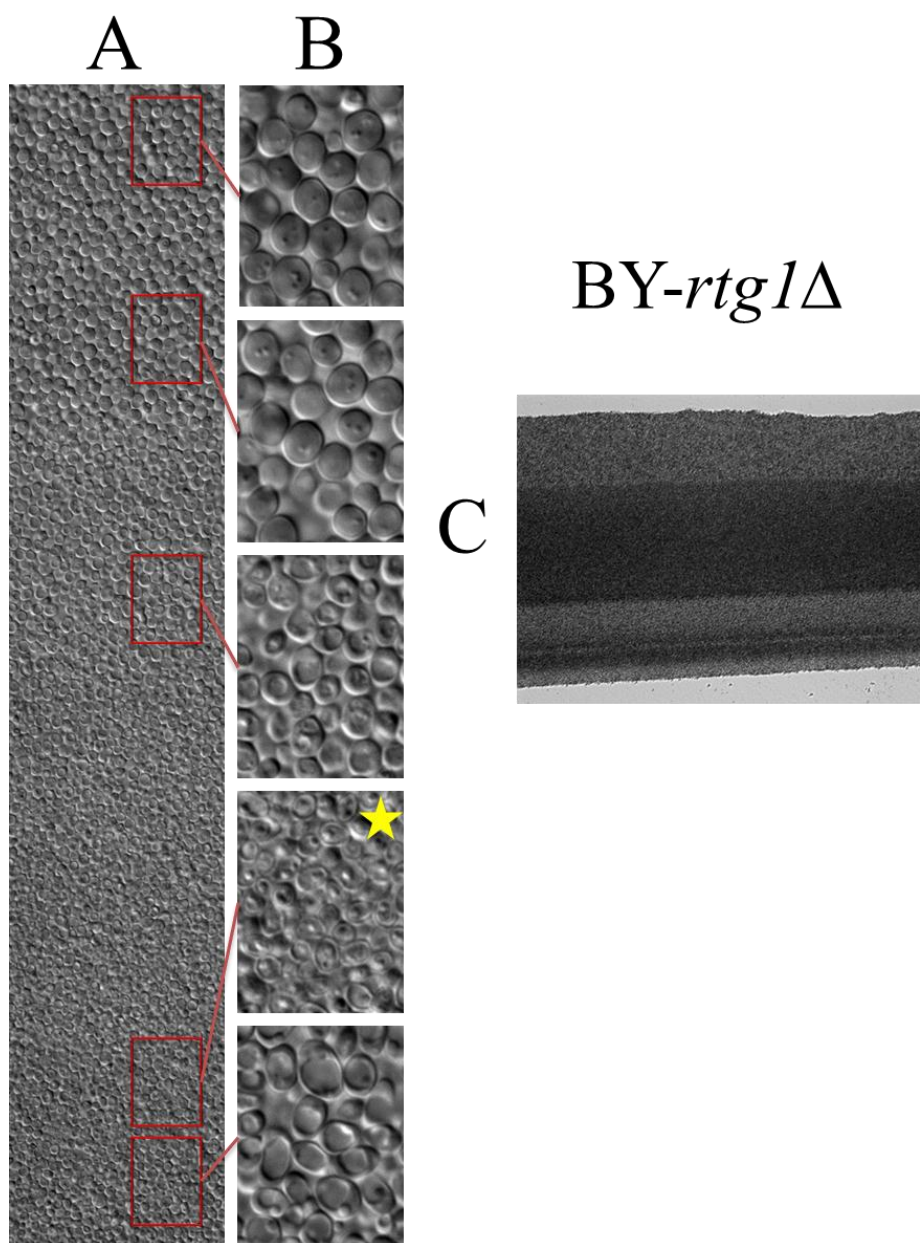


Obr. 68. Řez kolonií kmene BY-Rtg2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Kmen BY-Rtg2p-GFP má rovněž slabý signál GFP.

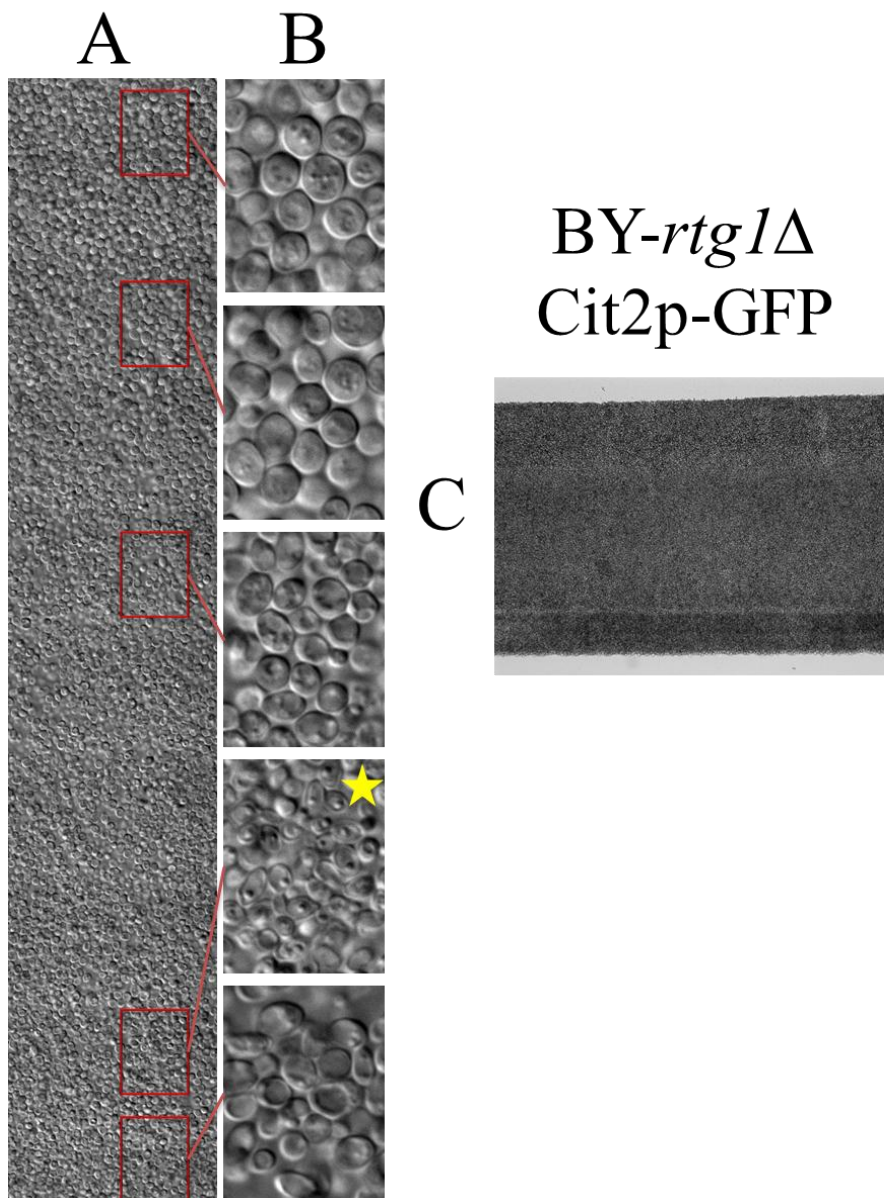


Obr. 69. Řez kolonií kmene BY-Rtg3p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Kmen BY-Rtg3p-GFP je typický slabším signálem GFP. Je to dáno nízkou hladinou proteinu Rtg3p v buňce. Expres proteinu se lehce zvedá v L buňkách pod U buňkami a ve střední části vrstvy L buněk.

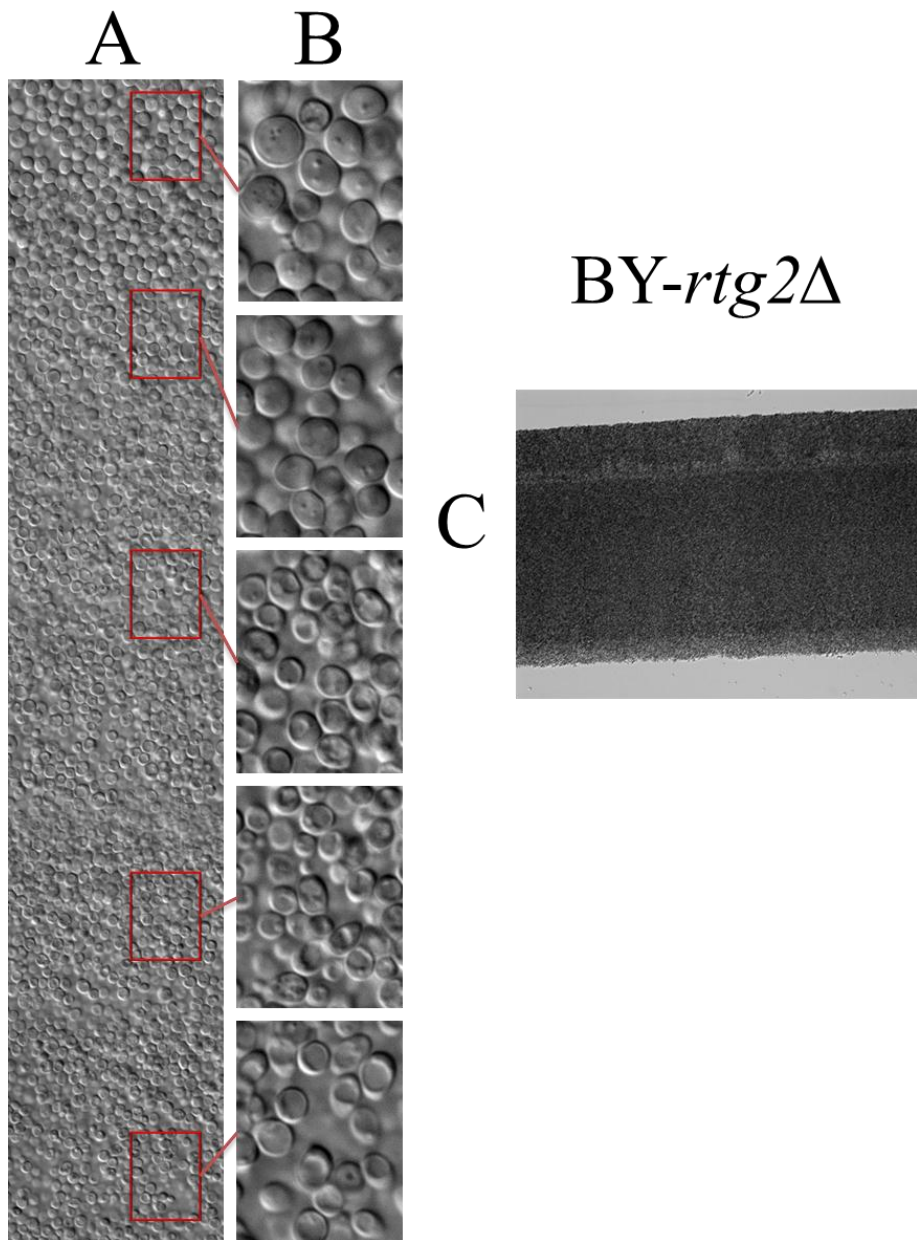




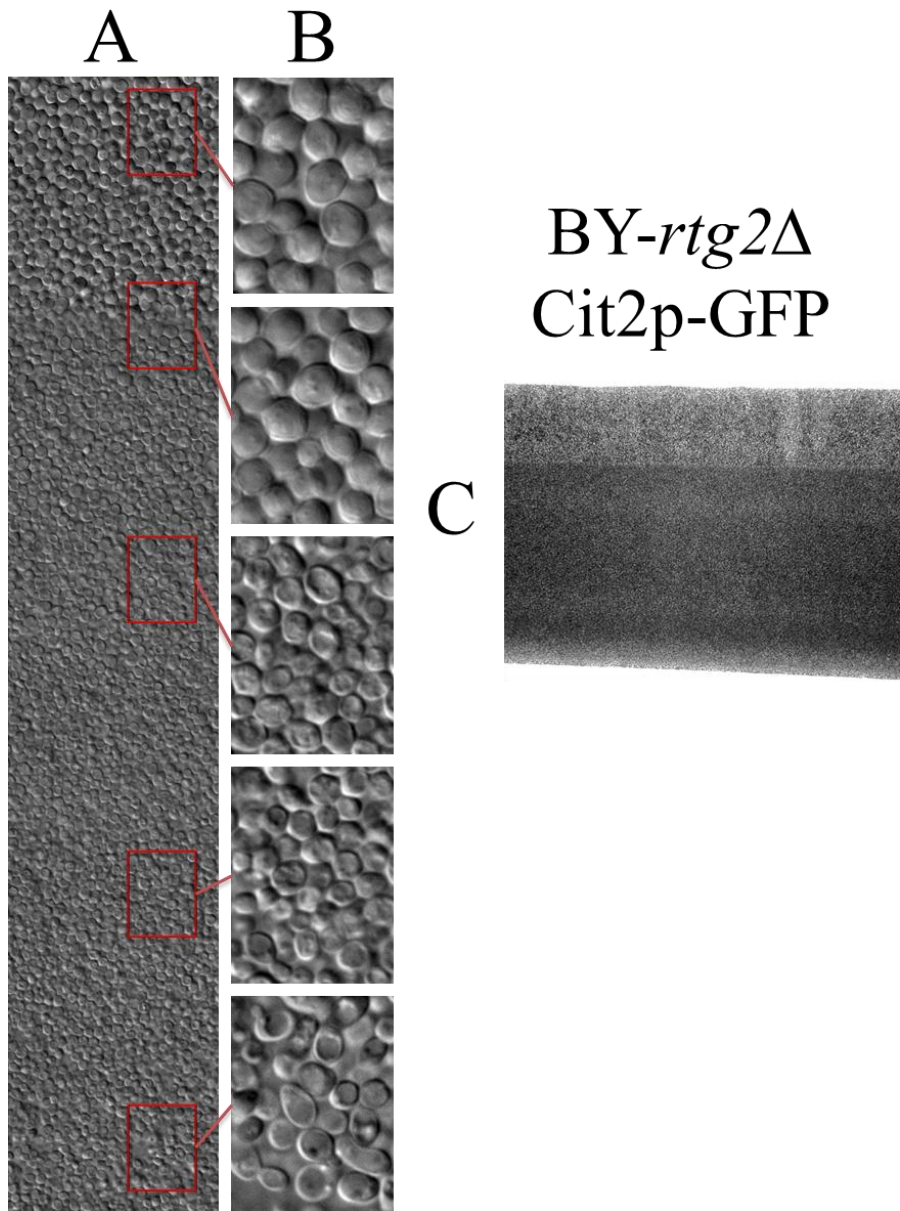
Obr. 70. Řez kolonií kmene *BY-rtg1*Δ. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Pro kmen *BY-rtg1*Δ je typická vrstva mrtvých buněk ve spodní části L buněk (obrázek ve sloupci B, označen hvězdičkou). Kmen tvoří několik morfologicky odlišných vrstev v rámci L buněk.



Obr. 71. Řez kolonií kmene BY-*rtg1*Δ Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Pro kmen BY-*rtg1*Δ je typická vrstva mrtvých buněk ve spodní části L buněk (obrázek ve sloupci B, označen hvězdičkou). Kmen tvoří několik morfologicky odlišných vrstev v rámci L buněk. Díky delecí genu *RTG1* se u kmene neexprimuje *CIT2* a kmen je bez GFP signálu.

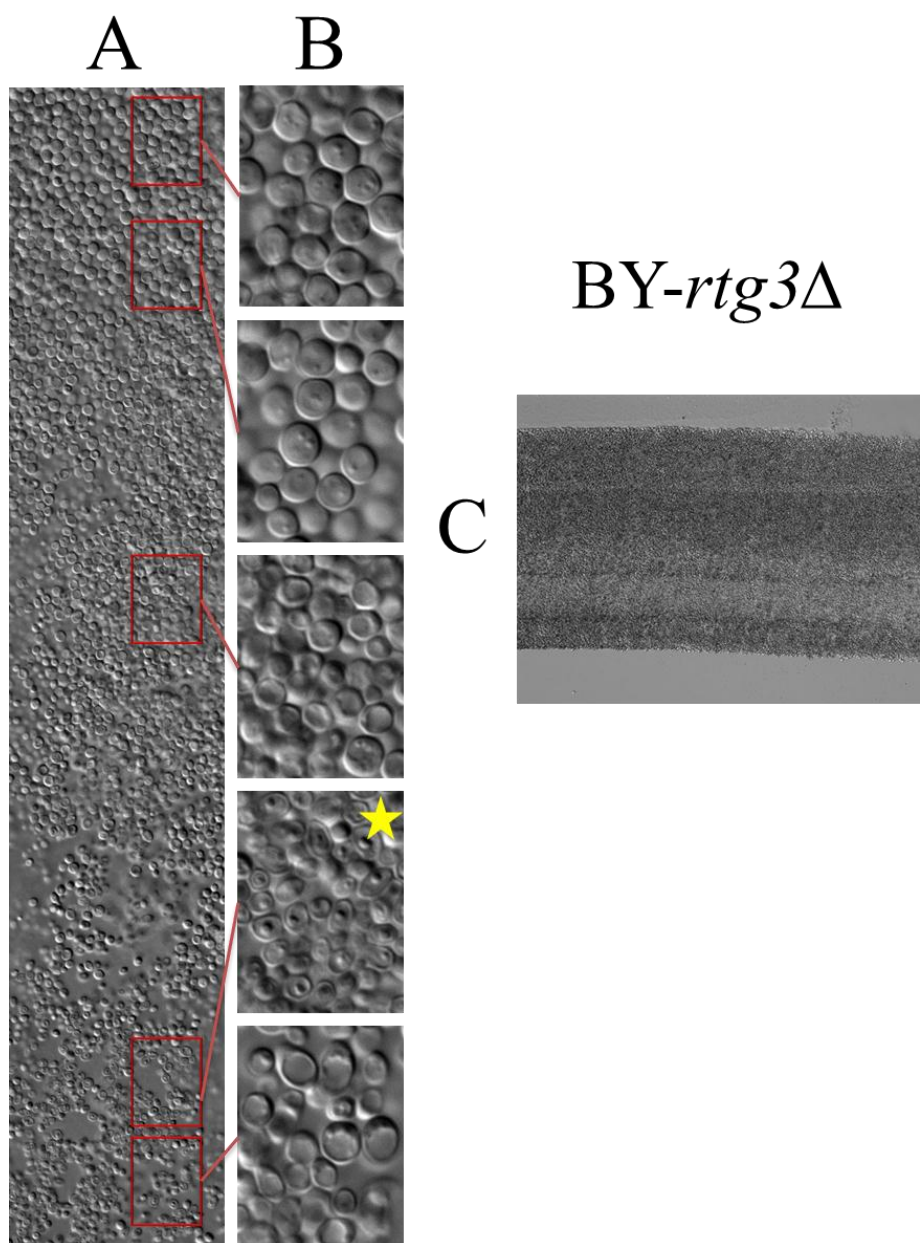


Obr. 72. Řez kolonií kmene *BY-rtg2Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk.



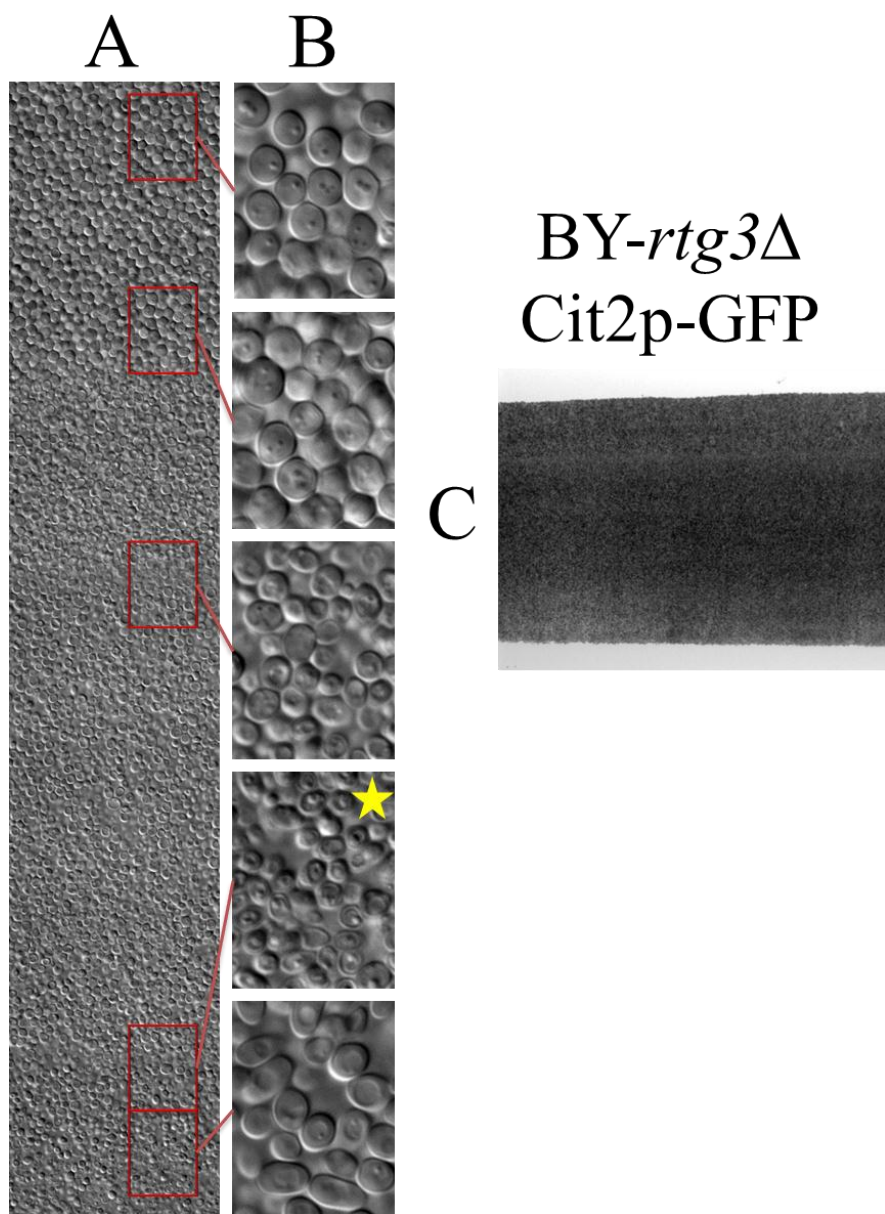
Obr. 73. Řez kolonií kmene *BY-rtg2Δ Cit2p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Díky delecí genu *RTG2* se u kmene neexprimuje *CIT2* a kmen je bez GFP signálu.



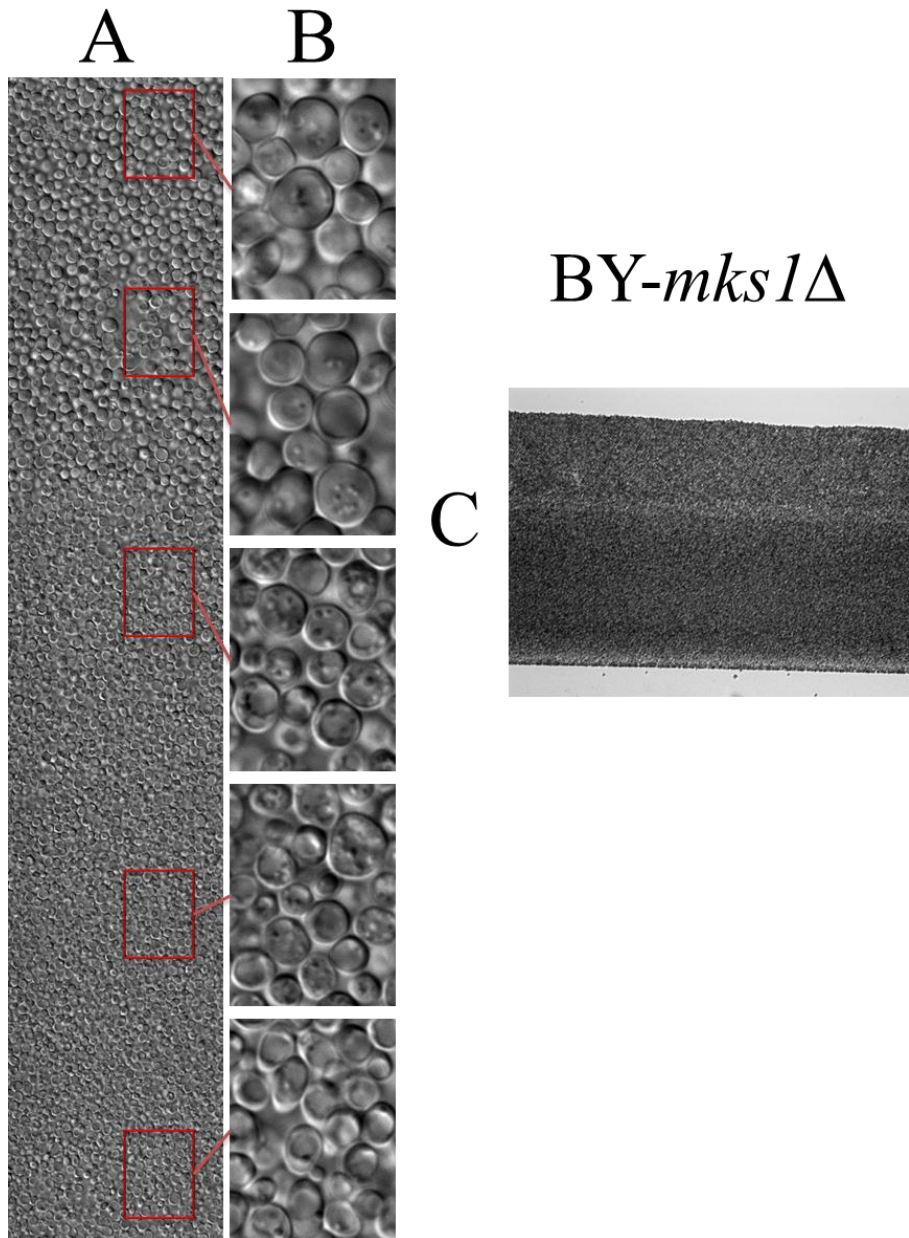


Obr. 74. Řez kolonií kmene BY-*rtg3*Δ. Sloupec A ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Pro kmen BY-*rtg3*Δ je typická vrstva mrtvých buněk ve spodní části L buněk (obrázek ve sloupci B, označen hvězdičkou). Kmen tvoří několik morfologicky odlišných vrstev v rámci L buněk.

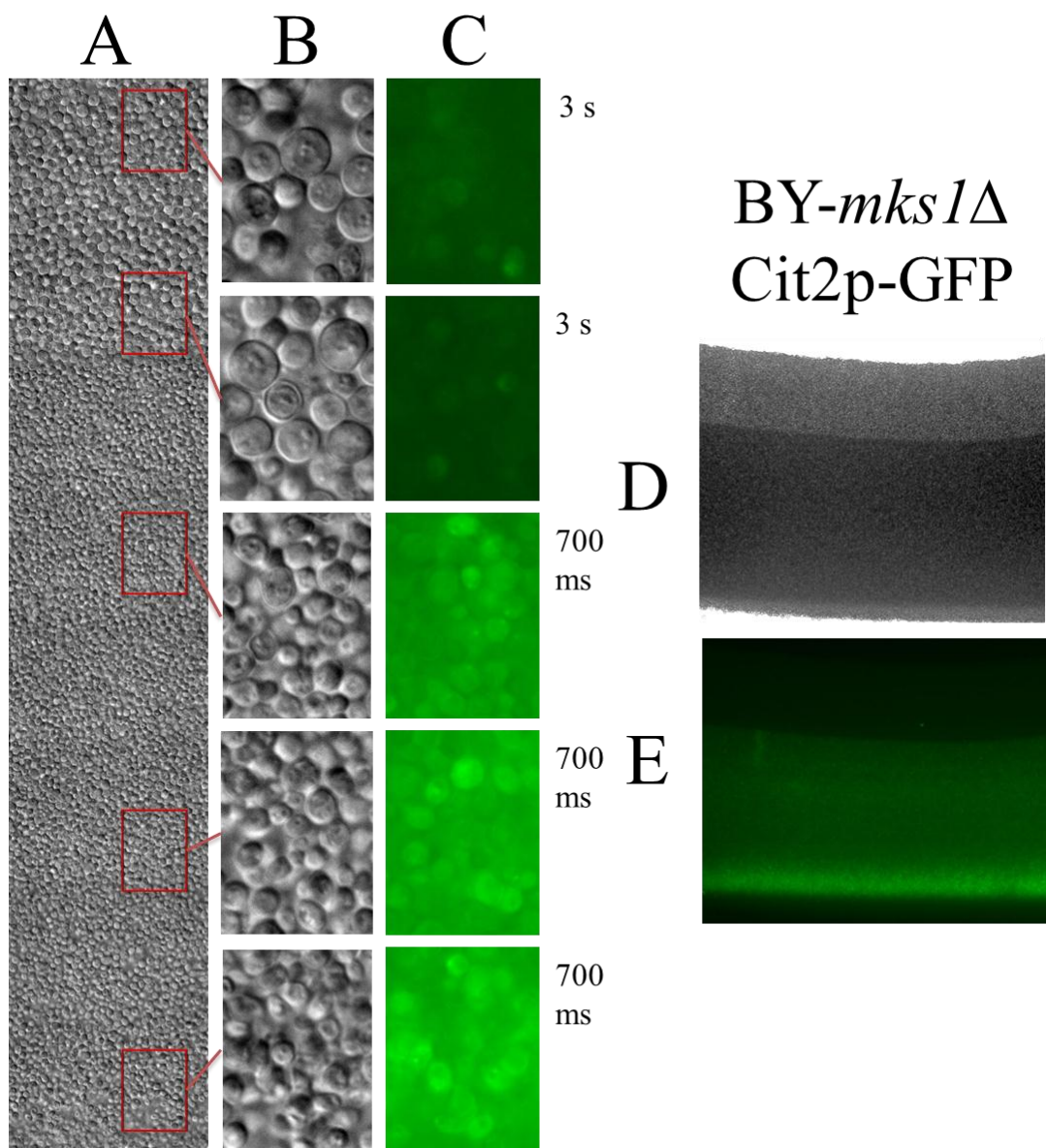




Obr. 75. Řez kolonií kmene BY-*rtg3*Δ Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Pro kmen BY-*rtg3*Δ Cit2p-GFP je typická vrstva mrtvých buněk ve spodní části L buněk (4. obrázek ve sloupci B). Kmen tvoří několik morfologicky odlišných vrstev v rámci L buněk. Díky deleci genu *RTG3* se u kmene neexprimuje *CIT2* a kmen je bez GFP signálu.

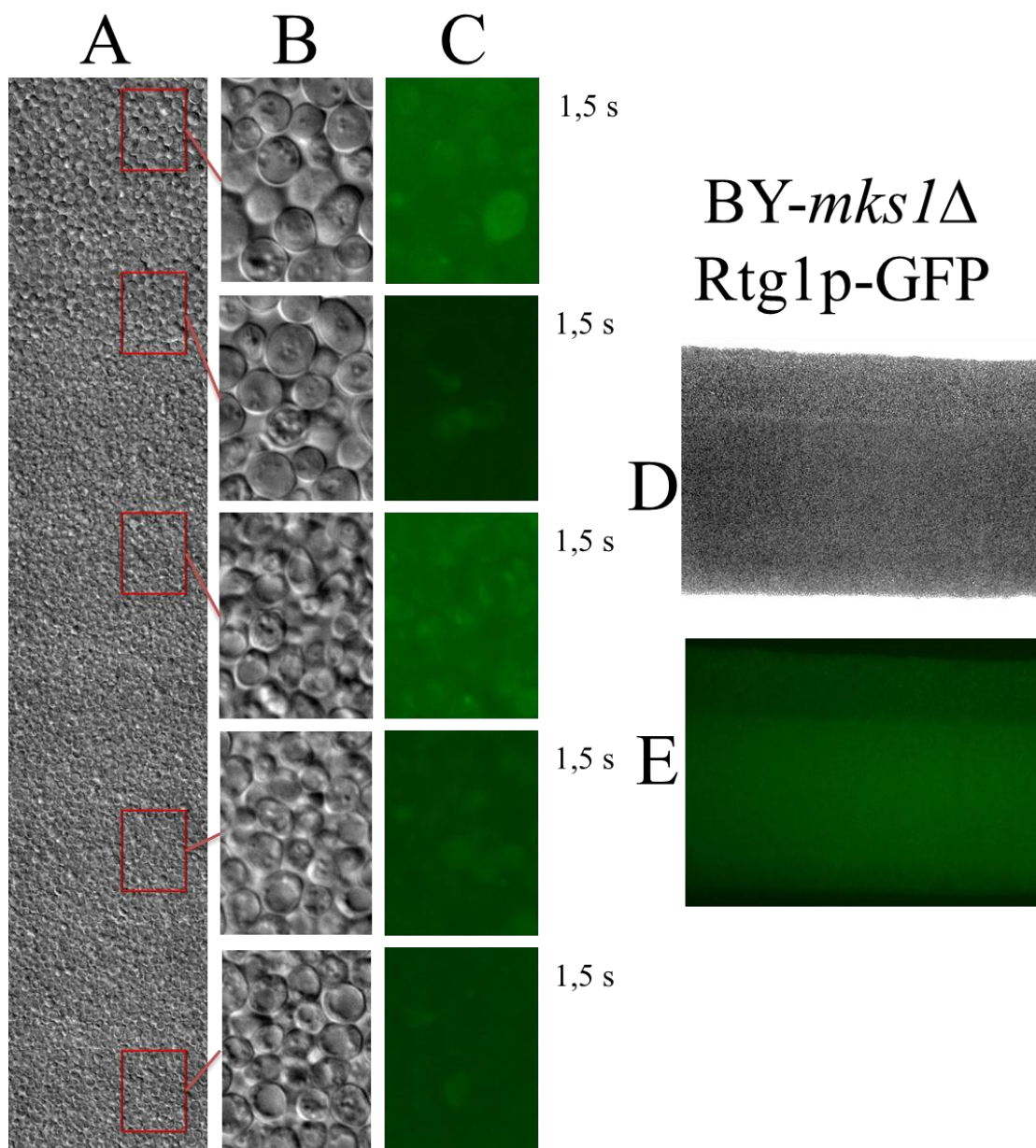


Obr. 76. Řez kolonií kmene *BY-mks1Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-mks1Δ* se vyznačuje nízkými koloniemi, většími L buňkami oproti rodičovskému kmeni *BY4742* (1. a 2. obrázek ve sloupci B) a množstvím volných mezer mezi nimi. Na obrázku D, zobrazující celou kolonii je patrná silná vrstva U buněk, ta je dána nízkým profilem kolonie a slabou vrstvou L buněk.

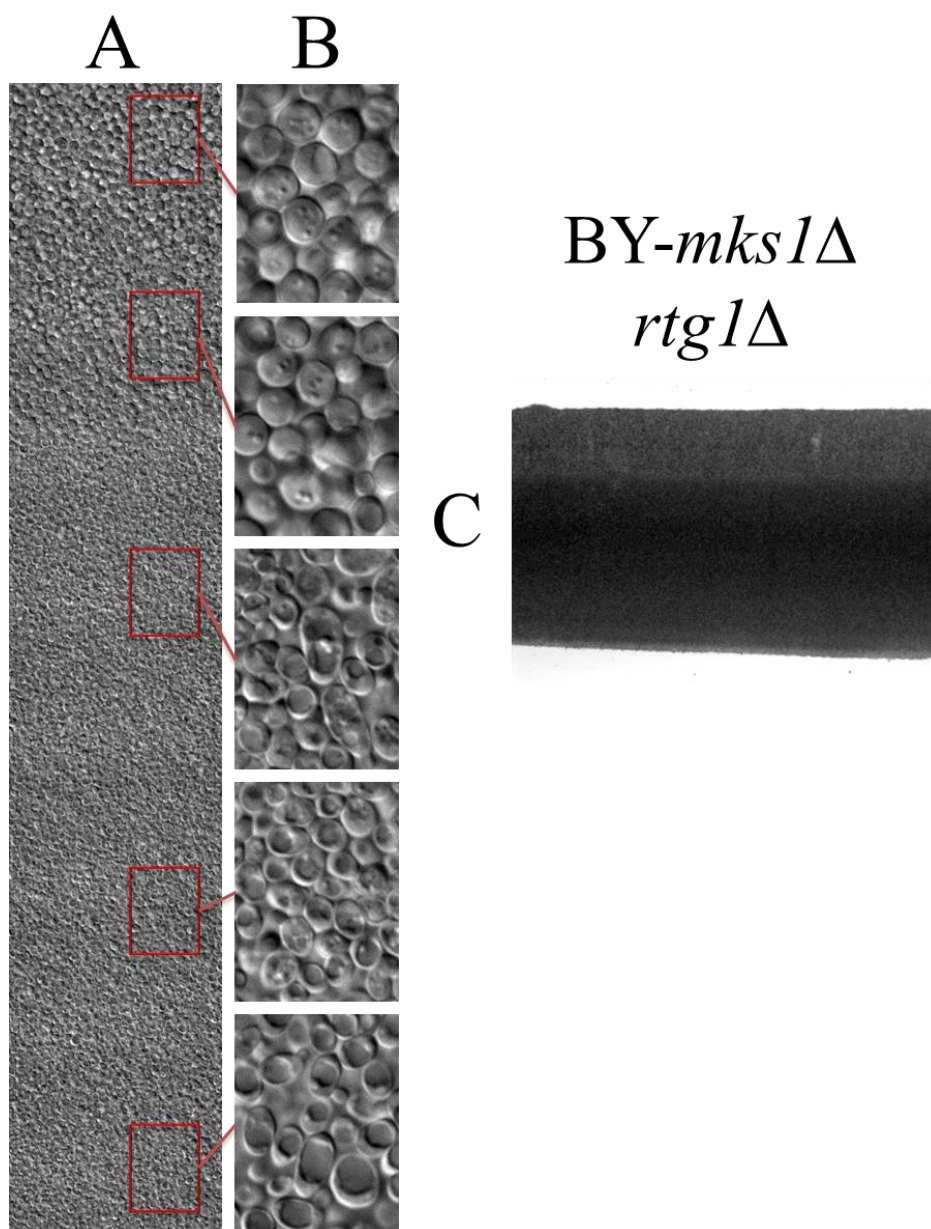


Obr. 77. Řez kolonií kmene BY-*mks1*Δ Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Zvýšenou produkci Cit2p-GFP pozorujeme ve spodní části kolonie – L buňkách. Zatímco v horních buňkách se úroveň exprese nemění.

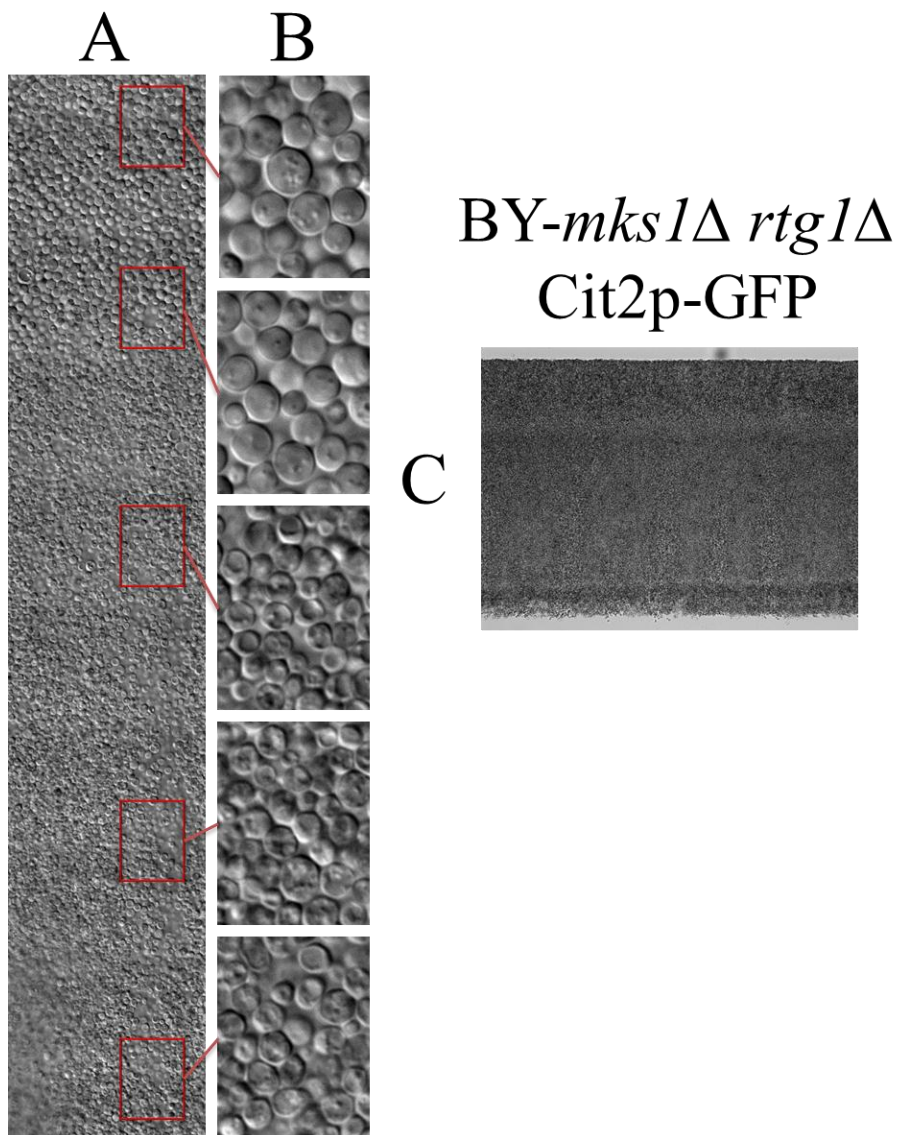




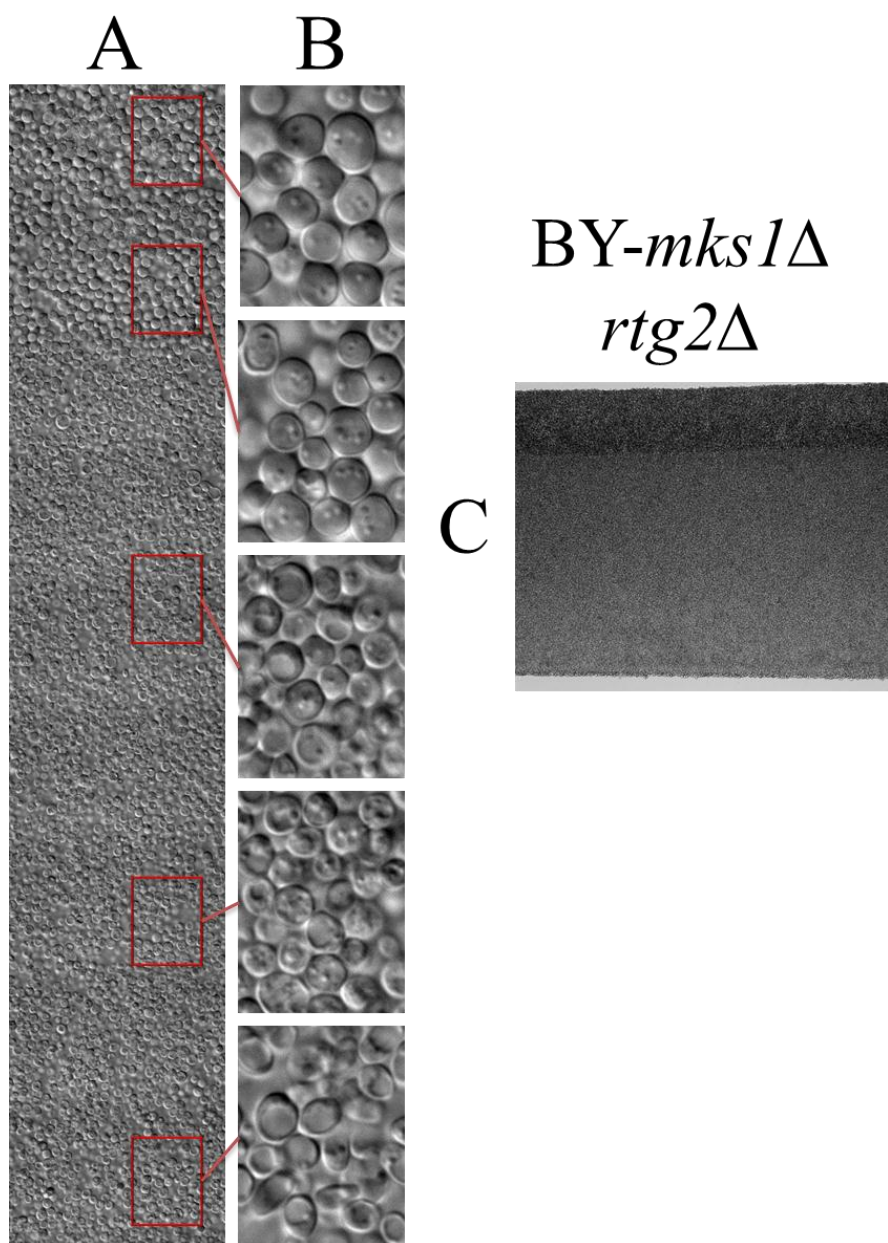
Obr. 78. Řez kolonií kmene *BY-mks1Δ Rtg1p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP.



Obr. 79. Řez kolonií kmene BY-*mks1*Δ *rtg1*Δ. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen BY-*mks1*Δ *rtg1*Δ je morfologicky podobný kmeni BY-*rtg1*Δ. U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene BY4742.

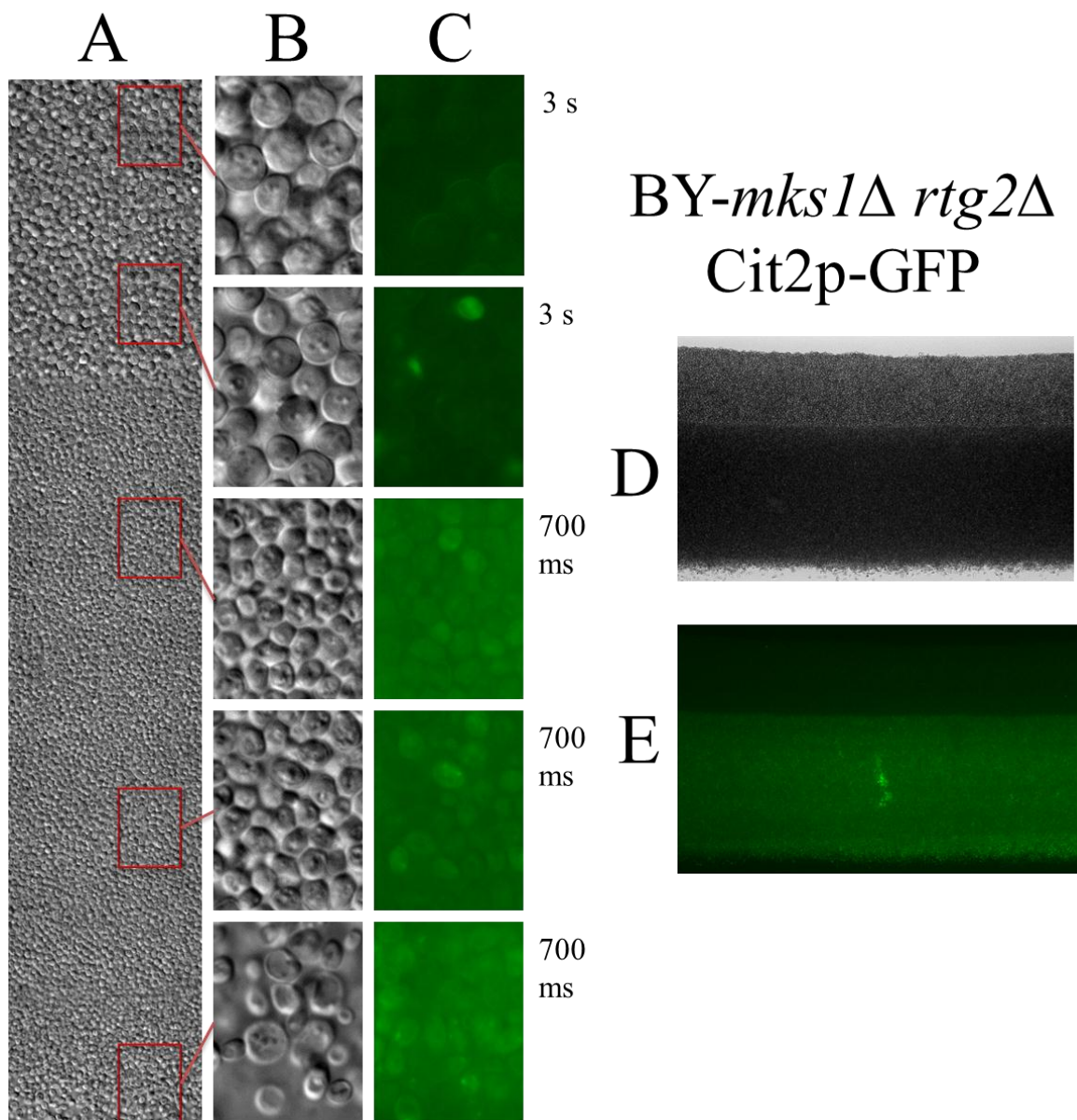


Obr. 80. Řez kolonií kmene *BY-mks1Δ rtg1Δ Cit2p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-mks1Δ rtg1Δ Cit2p-GFP* je morfologicky podobný kmeni *rtg1Δ*. U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene *BY4742*.



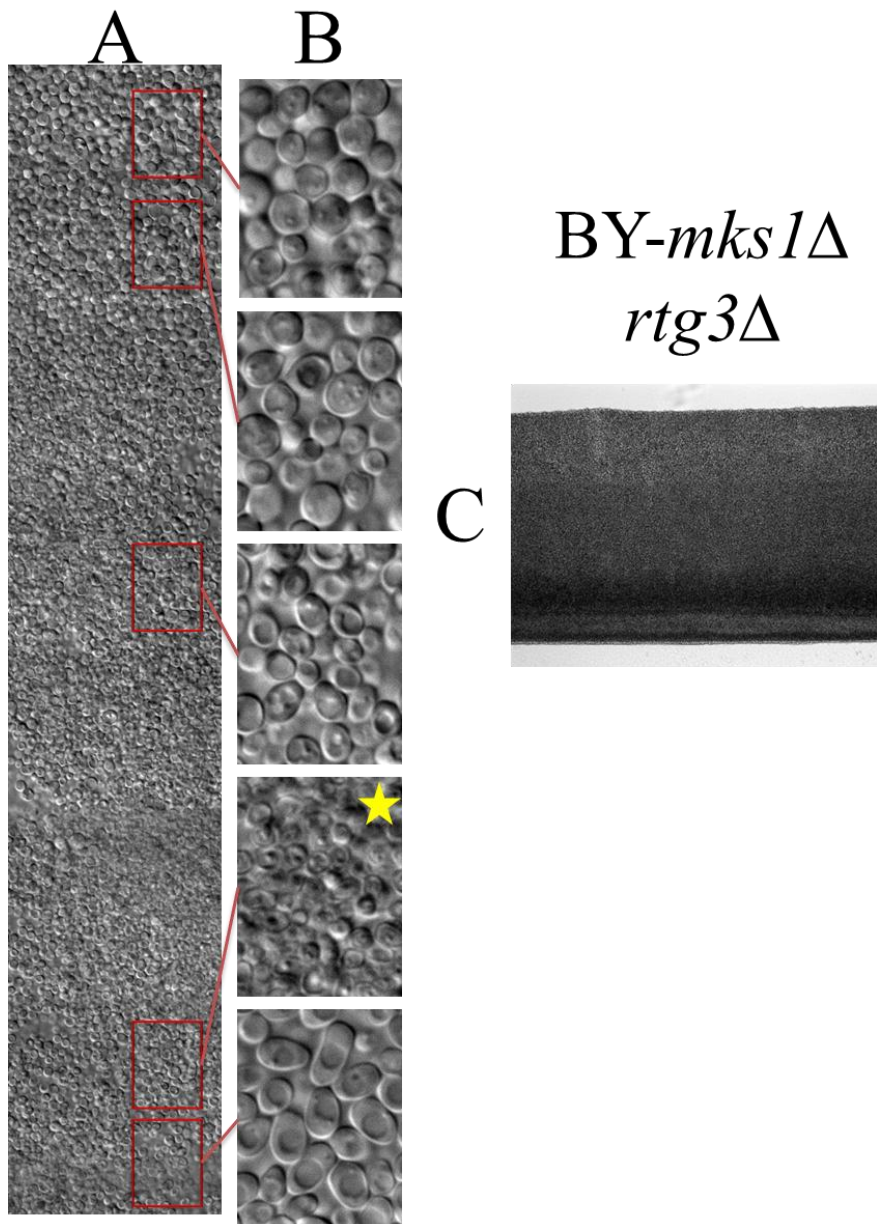
Obr. 81. Řez kolonií kmene *BY-mks1Δ rtg2Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-mks1Δ rtg2Δ* je morfologicky podobný kmeni *BY-rtg2Δ*. U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene *BY4742*.



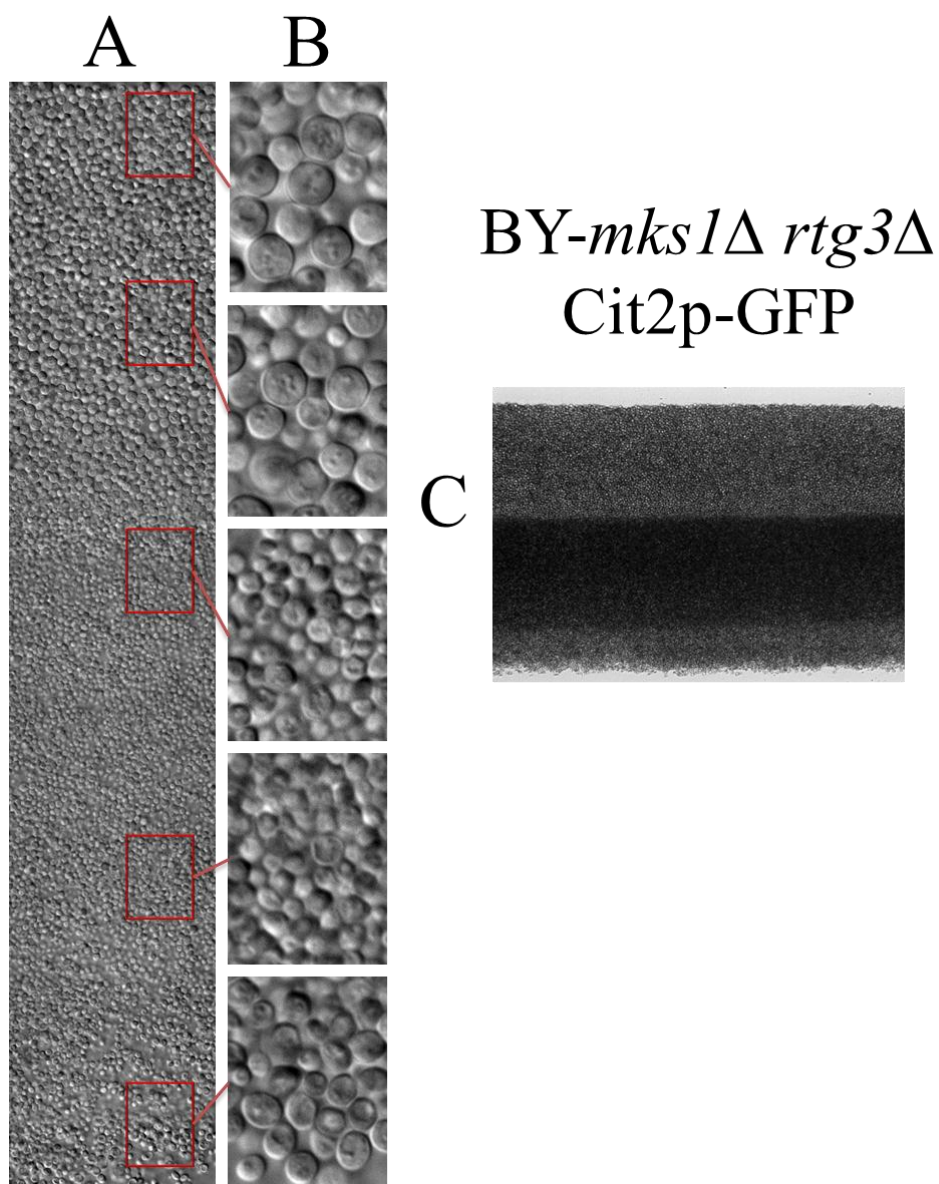


Obr. 82. Řez kolonií kmene *BY-mks1*Δ *rtg2*Δ Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Kmen *BY-mks1*Δ *rtg2*Δ Cit2p-GFP je morfologicky podobný kmeni *BY-rtg2*Δ. U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene *BY4742*. Expresí genu *CIT2* je kmen totožný s expresí v kmeni *BY-mks1*Δ Cit2-GFP. Shodně pozorujeme silný GFP signál ve spodních buňkách.

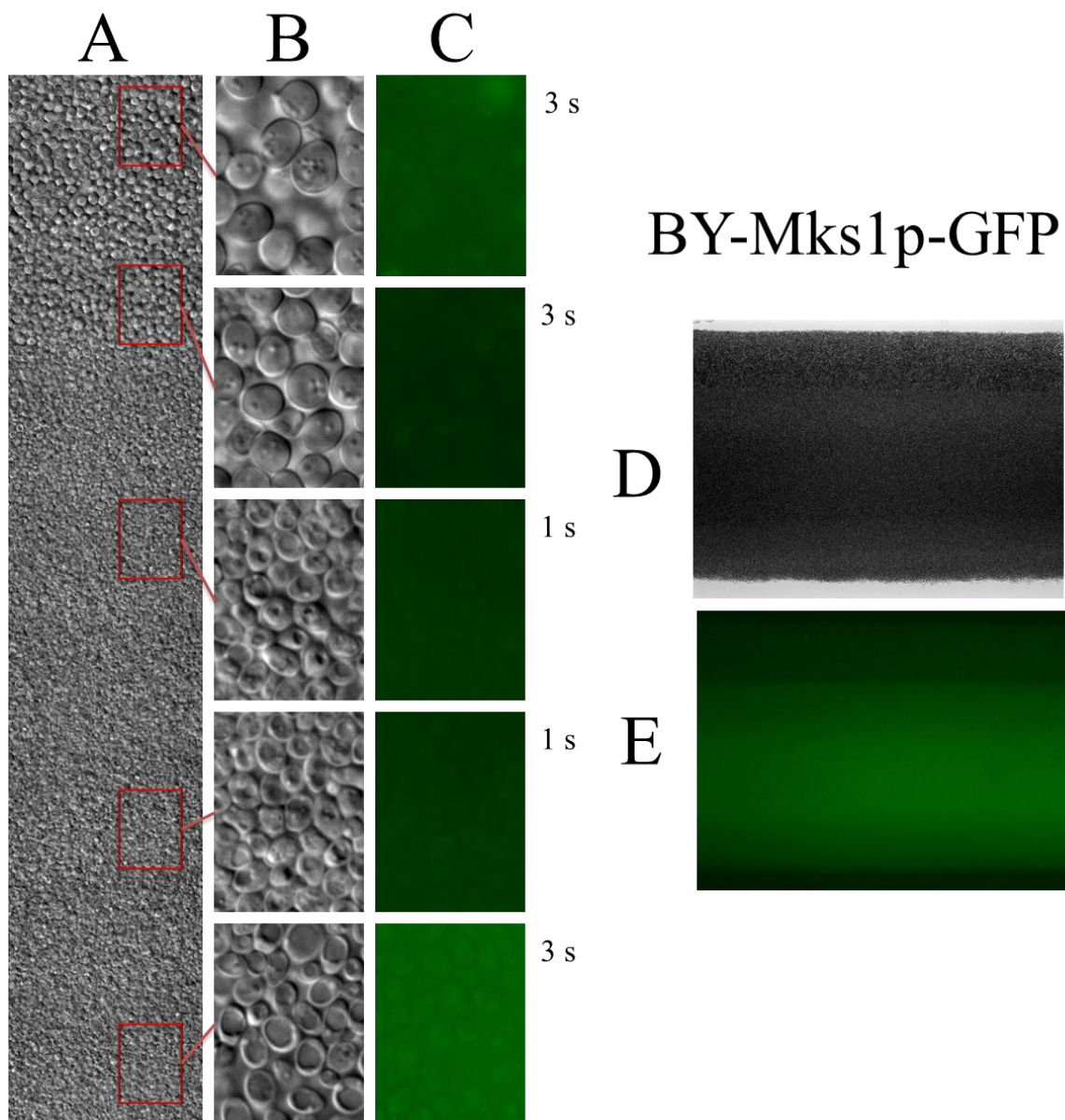




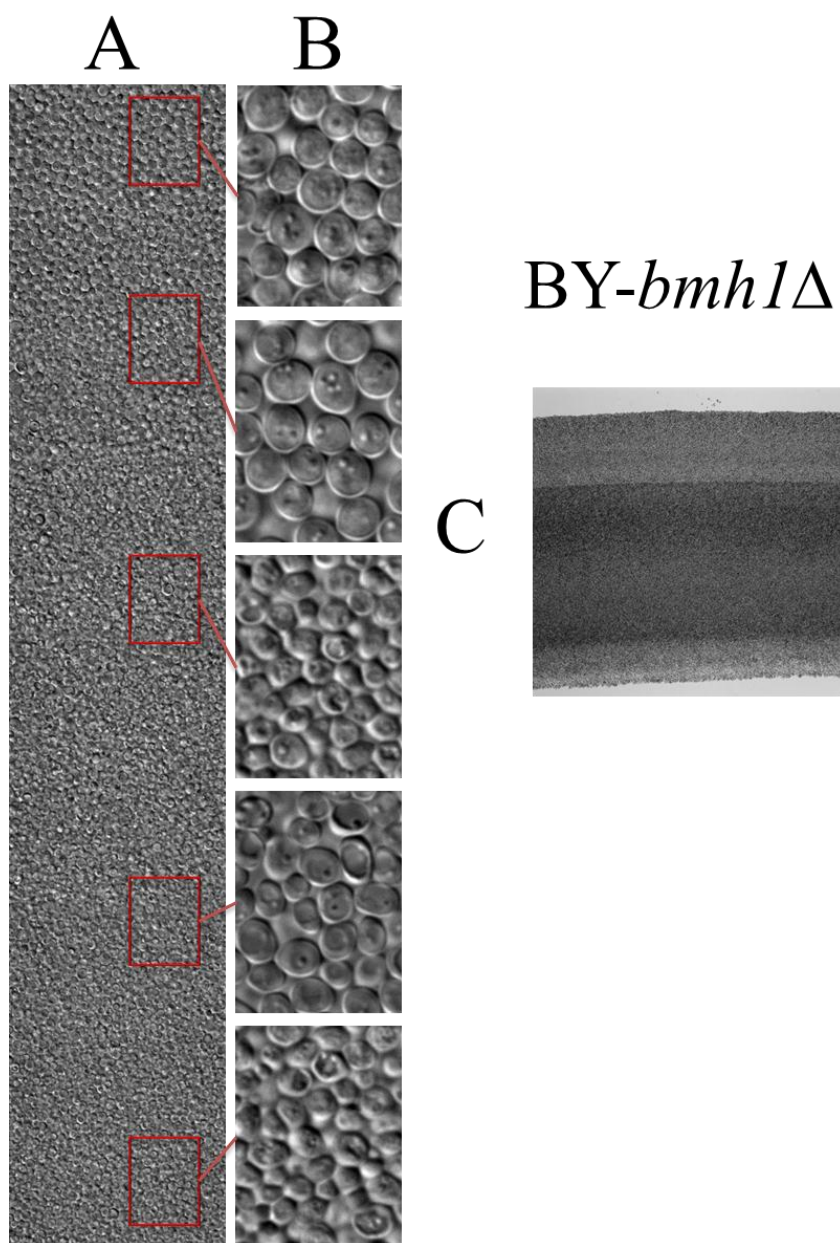
Obr. 83. Řez kolonií kmene *BY-mks1Δ rtg3Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-mks1Δ rtg3Δ* je morfologicky podobný kmeni *BY-rtg3Δ*, včetně vrstvy mrtvých buněk typické právě pro kmény s delecí jednoho z RTG proteinů (4. obrázek ve sloupci B, označeno hvězdičkou). U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene *BY4742*.



Obr. 84. Řez kolonií kmene BY-*mks1*Δ*rtg3*Δ Cit2p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen BY-*mks1*Δ*rtg3*Δ je morfologicky podobný kmeni BY-*rtg3*Δ. U buňky mají stejnou velikost jako u rodičovského kmene BY4742.

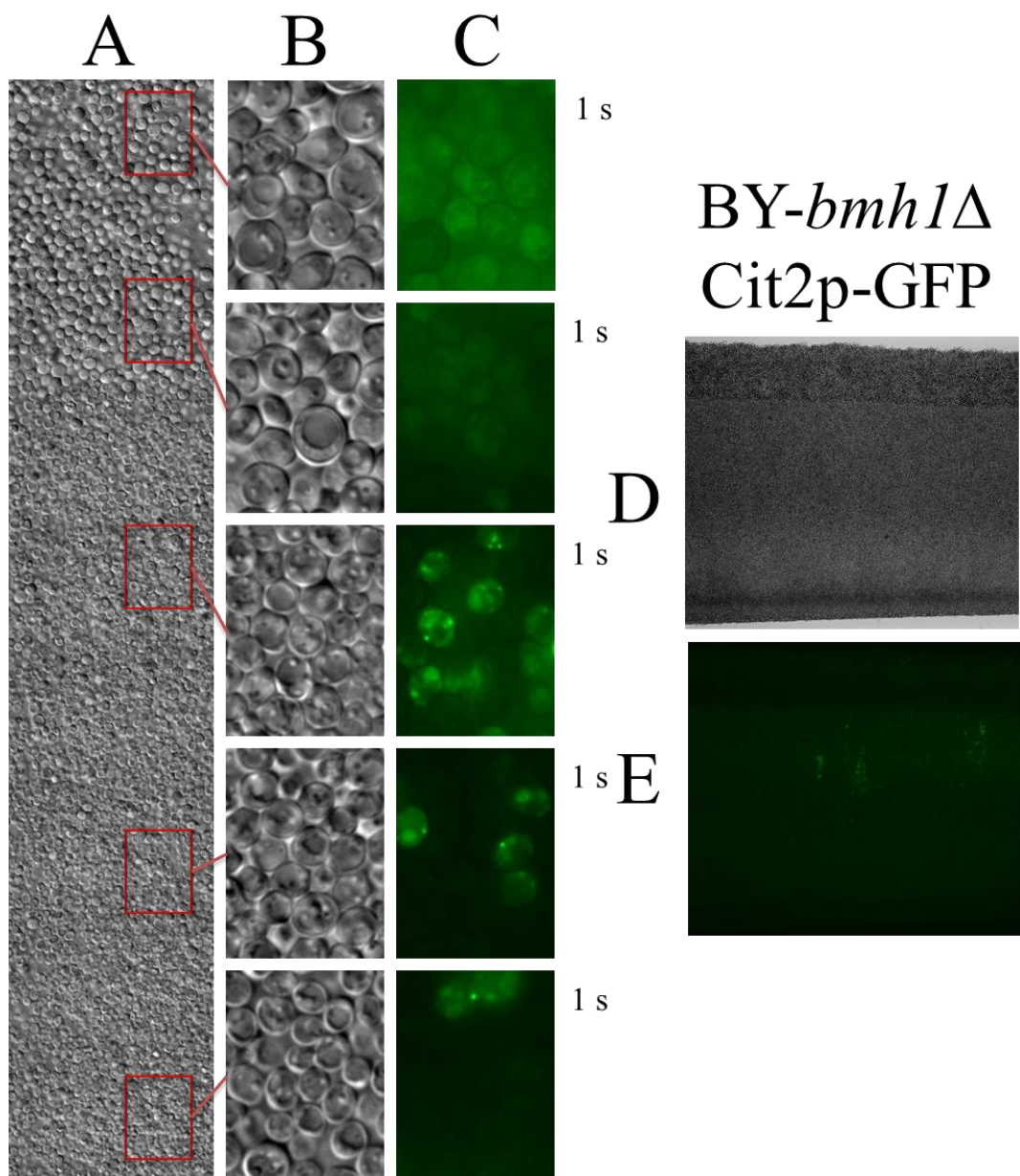


Obr. 85. Řez kolonií kmene BY-Mks1p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. U kmene BY-Mks1p-GFP můžeme pozorovat slabý signál v U buňkách a silnější signál v horní a střední části L buněk (3. a 4. obrázek ve sloupci C) a opět slabý signál u L buněk nacházející se u agaru.

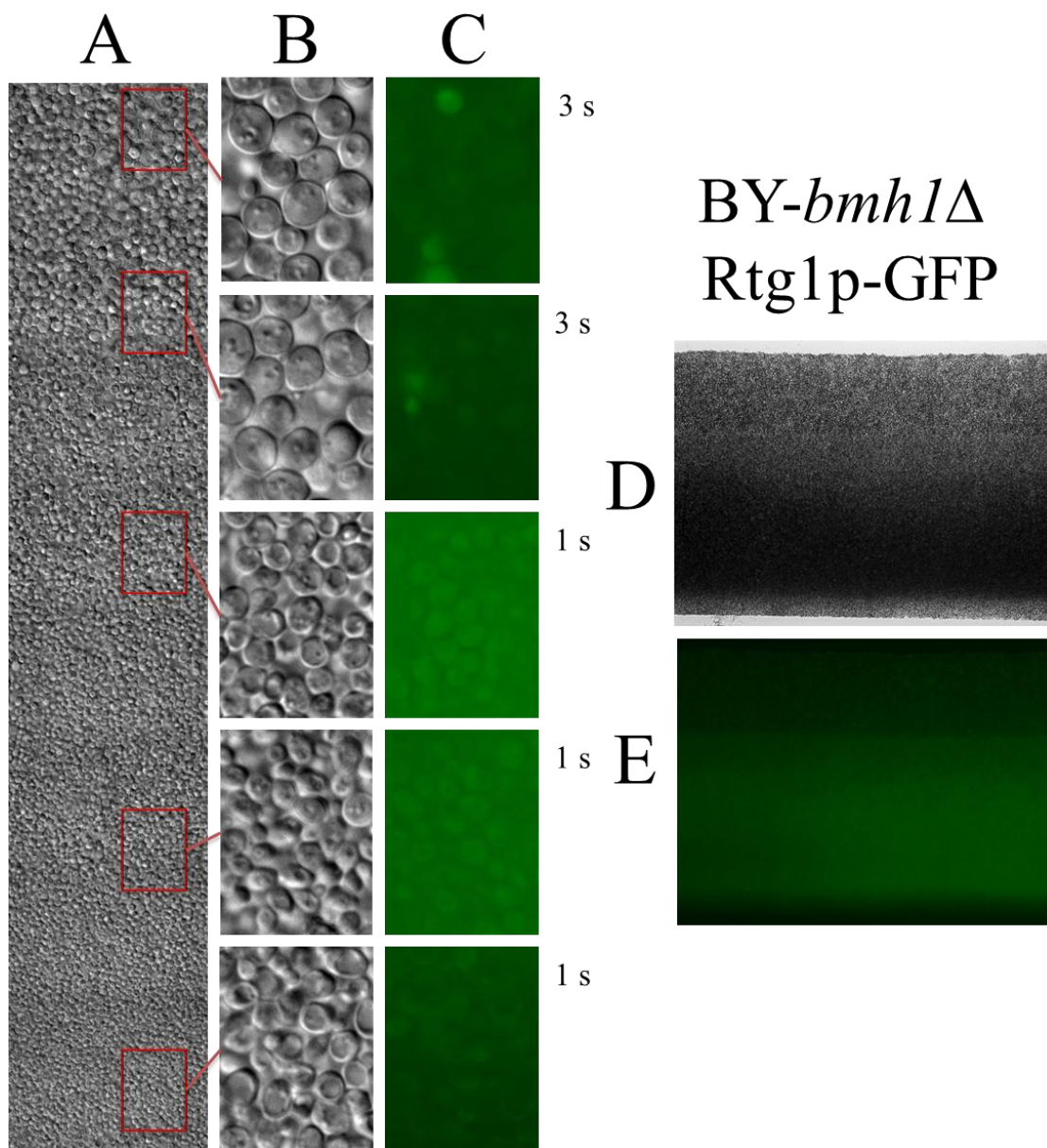


Obr. 86. Řez kolonií kmene *BY-bmh1Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-bmh1Δ* je morfologicky velmi podobný rodičovskému kmeni *BY4742*. Delece genu *BMH1* nemá žádný vliv na morfologii kolonie nebo buněk.

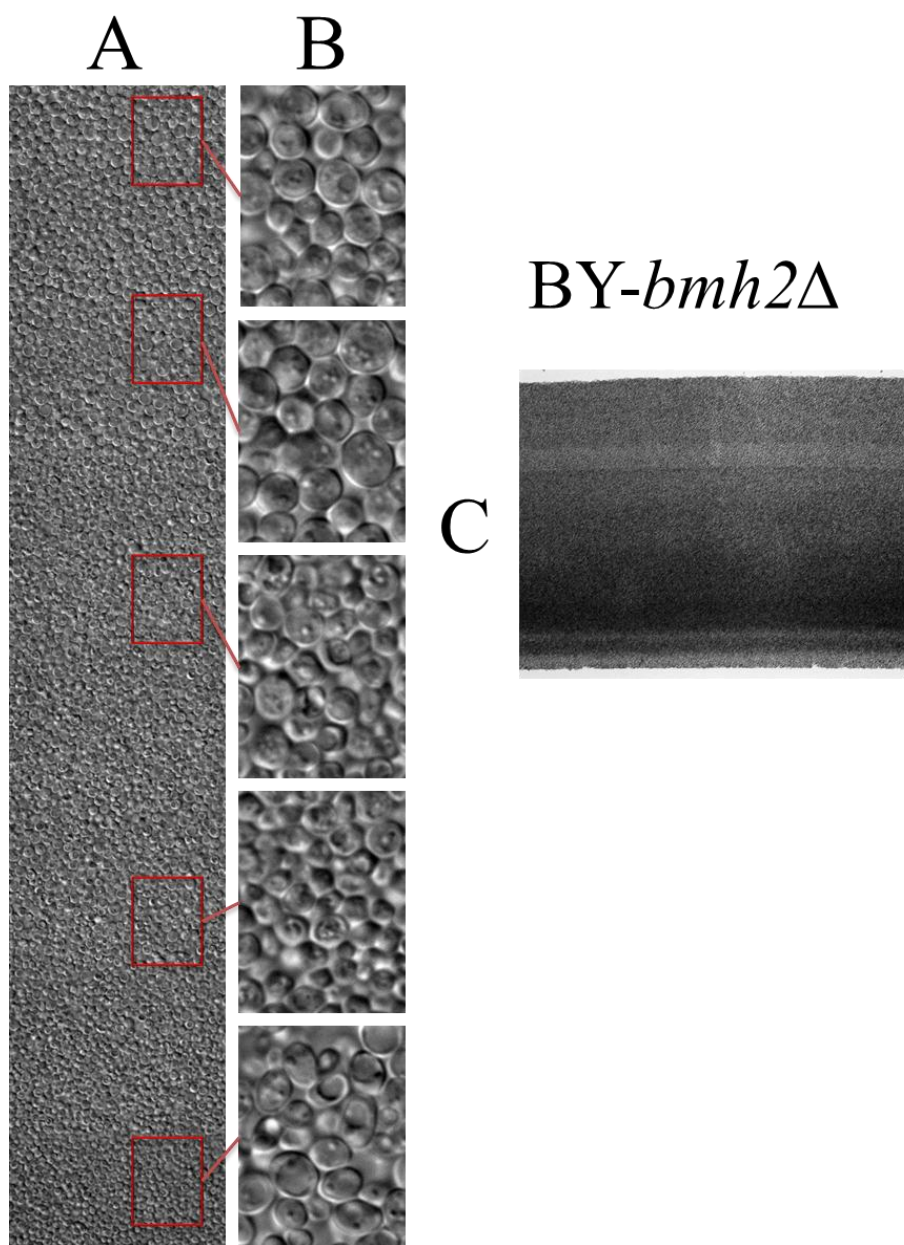




Obr. 87. Řez kolonií kmene *BY-bmh1Δ Cit2p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Delece genu *BMH1* nemá významný vliv na expresi genu *CIT2* ani na morfologii kmene. V horních buňkách došlo ke zvýšení exprese genu *CIT2*, u spodních L buněk je exprese nepatrně zvýšená.

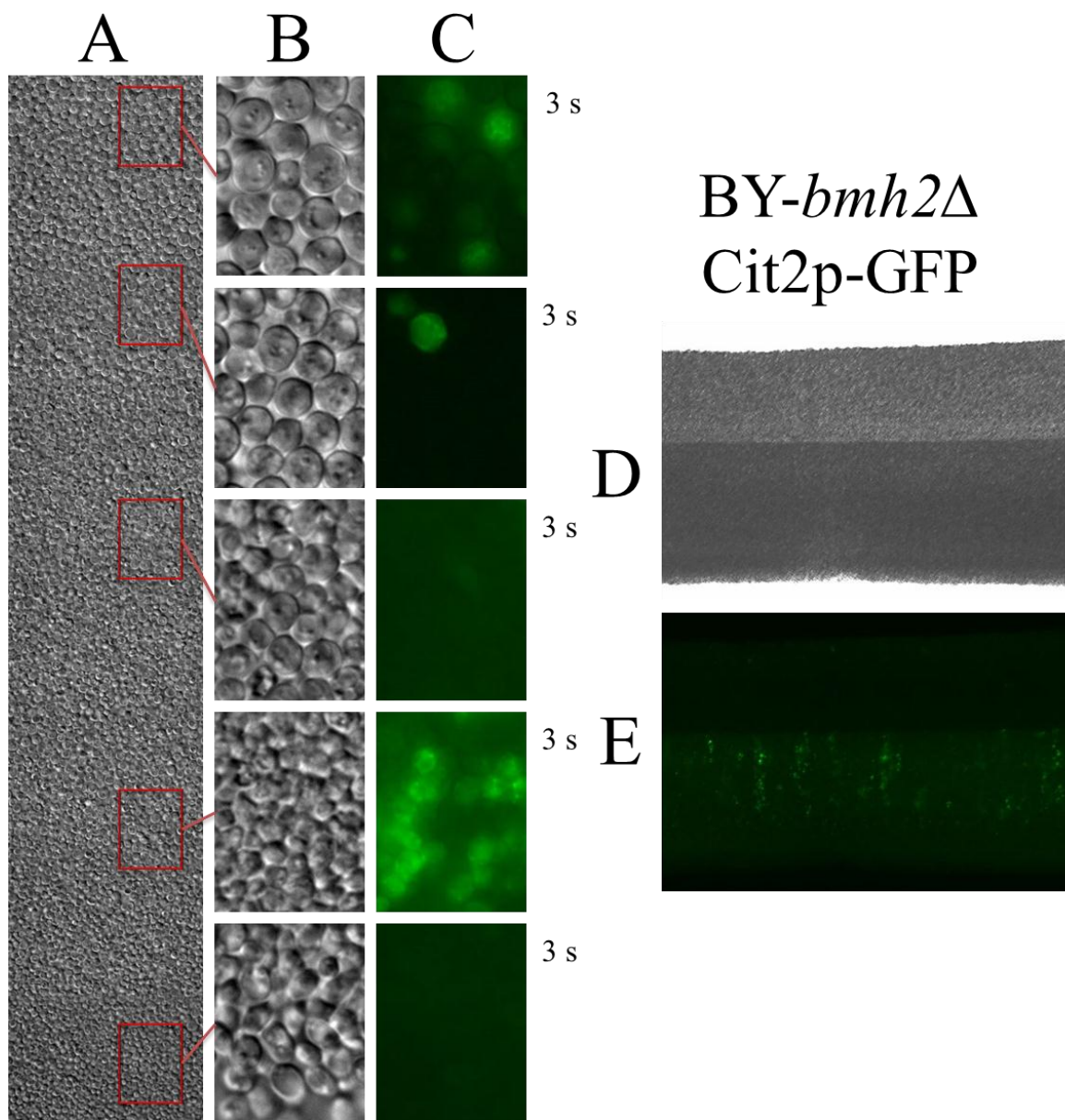


Obr. 88. Řez kolonií kmene BY-*bmh1*Δ Rtg1p-GFP. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Delece genu *BMH1* nemá významný vliv na expresi genu *RTG1* ani na morfologii kmene. V horních U buňkách se nemění exprese genu *RTG1*, ve spodních buňkách se lehce zvedla. Morfologicky je kmen BY-*bmh1*Δ Rtg1p-GFP velmi podobný rodičovskému kmeni BY4742.

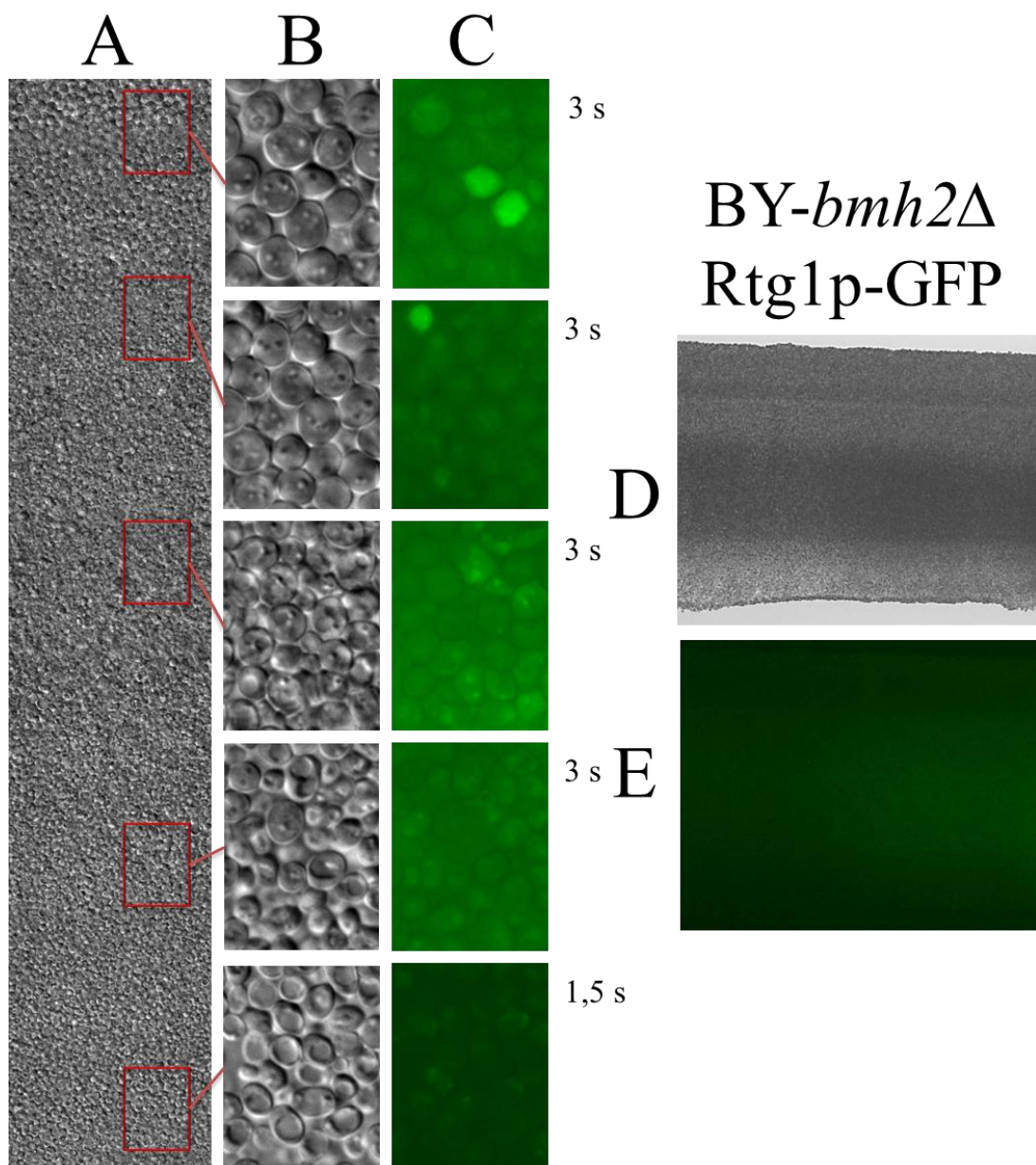


Obr. 89. Řez kolonií kmene *BY-bmh2Δ*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. Kmen *BY-bmh2Δ* je rovněž morfologicky velmi podobný rodičovskému kmeni *BY4742*. Delece genu *BMH2* nemá žádný vliv na morfologii kolonie nebo buněk.





Obr. 90. Řez kolonií kmene *BY-bmh2Δ Cit2p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Delece genu *BMH2* nemá významný vliv na expresi genu *CIT2* ani na morfologii kmene.



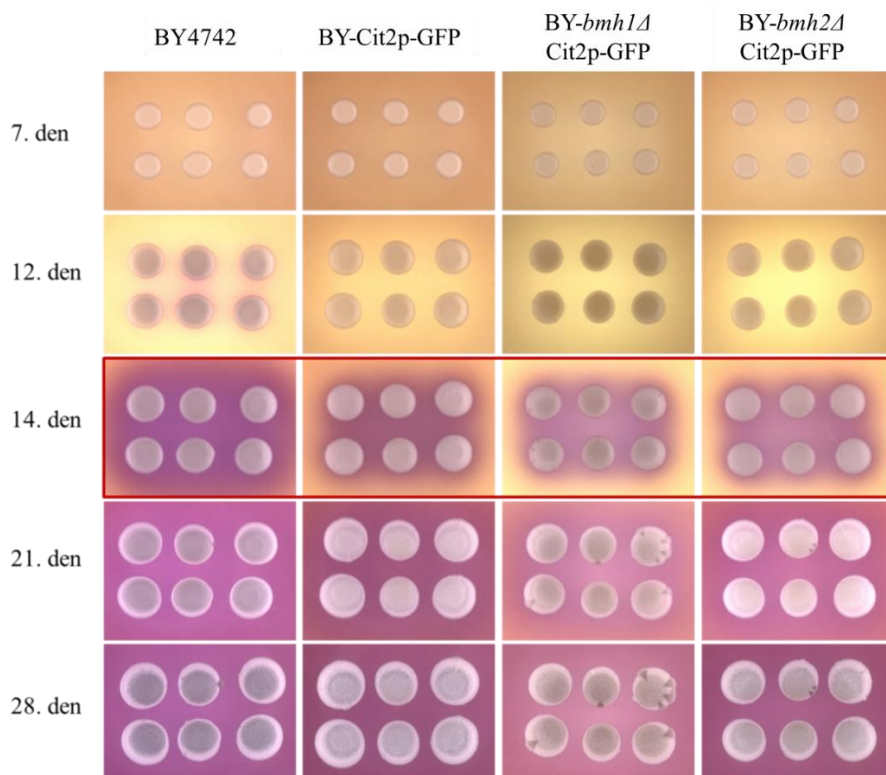
Obr. 91. Řez kolonií kmene *BY-bmh2Δ Rtg1p-GFP*. A, ukazuje uspořádání populací buněk U a L v kolonii. B, ukazuje detail buněk z kolonie zobrazený pomocí Nomarski kontrastu (1000 x zvětšeno). C, zobrazuje tytéž buňky zobrazené pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. D, zobrazuje řez kolonií, kdy v horní části je patrná vrstva U buněk, ve spodní části se nalézá vrstva L buněk. E, zobrazuje řez kolonií zobrazený pomocí fluorescenčního filtru pro GFP. Delece genu *BMH2* nemá významný vliv na expresi genu *RTG1* ani na morfologii kmene. Expresí genu *RTG1* se významně nemění. Morfologicky je kmen *BY-bmh1Δ Rtg1p-GFP* velmi podobný rodičovskému kmeni *BY4742*.

## 5.7 Sběr biomasy pro Western blot a imunodetekci

Biomasa pro porovnání produkce proteinů značených GFP pomocí imunodetekce byla získána z obřích kolonií kultivovaných na GMA médiu s BKP. Kolonie byly rozebrány 14. den kultivace na pět vrstev. První vzorek obsahoval vrchní U buňky, druhý vzorek obsahoval spodnější U buňky, třetí

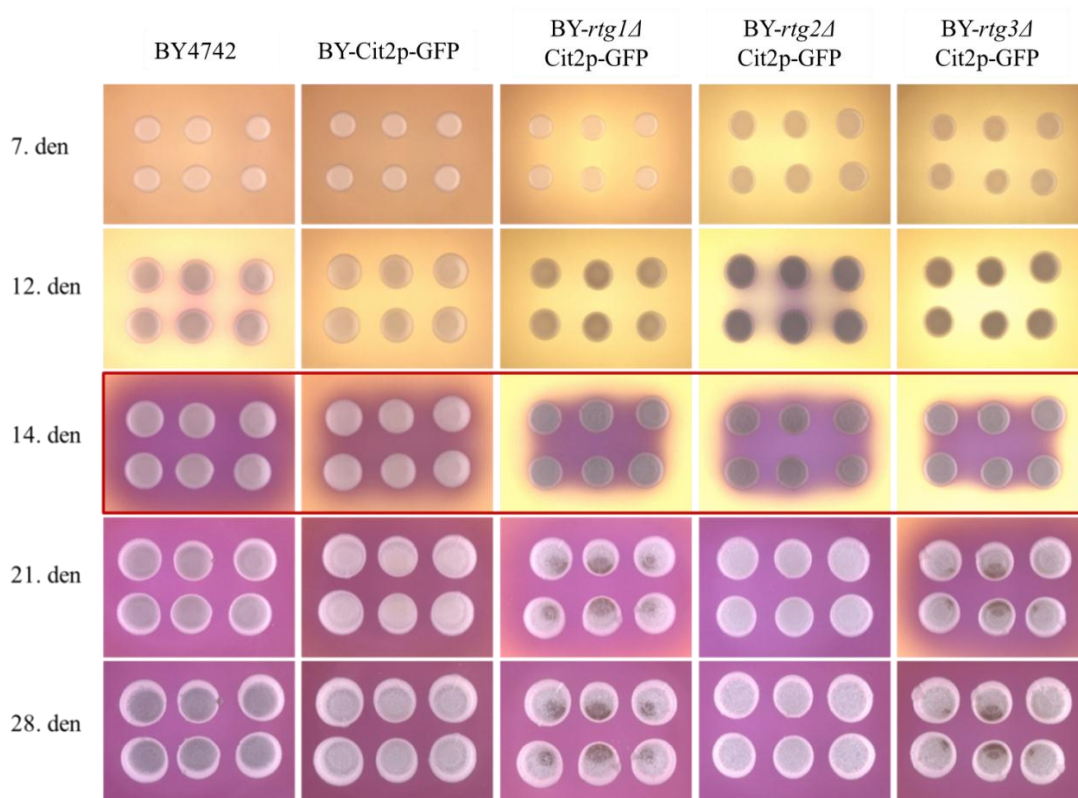
vzorek obsahoval spodní U buňky namíchané s nejvrchnější vrstvou L buněk přibližně v poměru 1:1. Čtvrtý vzorek obsahoval již čisté L buňky a pátý vzorek L buňky nalézající se u agaru.

Jednotlivé vzorky biomasy (60 – 100 mg na vzorek) byly uskladněny v -80 °C. Pro kontrolu správnosti a čistoty odebrání jednotlivých vrstev byly buňky zkontrolovány pomocí mikroskopu. Vizualizace byla provedena pomocí Nomarského kontrastu. Průběh alkalizace testovaných kmenů zobrazují Obr. 92-94. Jednotlivé buňky z kolonie zobrazují Obr. 95-97. Další zpracování odebraných biomas a Western blot analýza byly provedeno Dr. H. Kučerovou; výsledky jsou součástí publikace (Příloha 1).

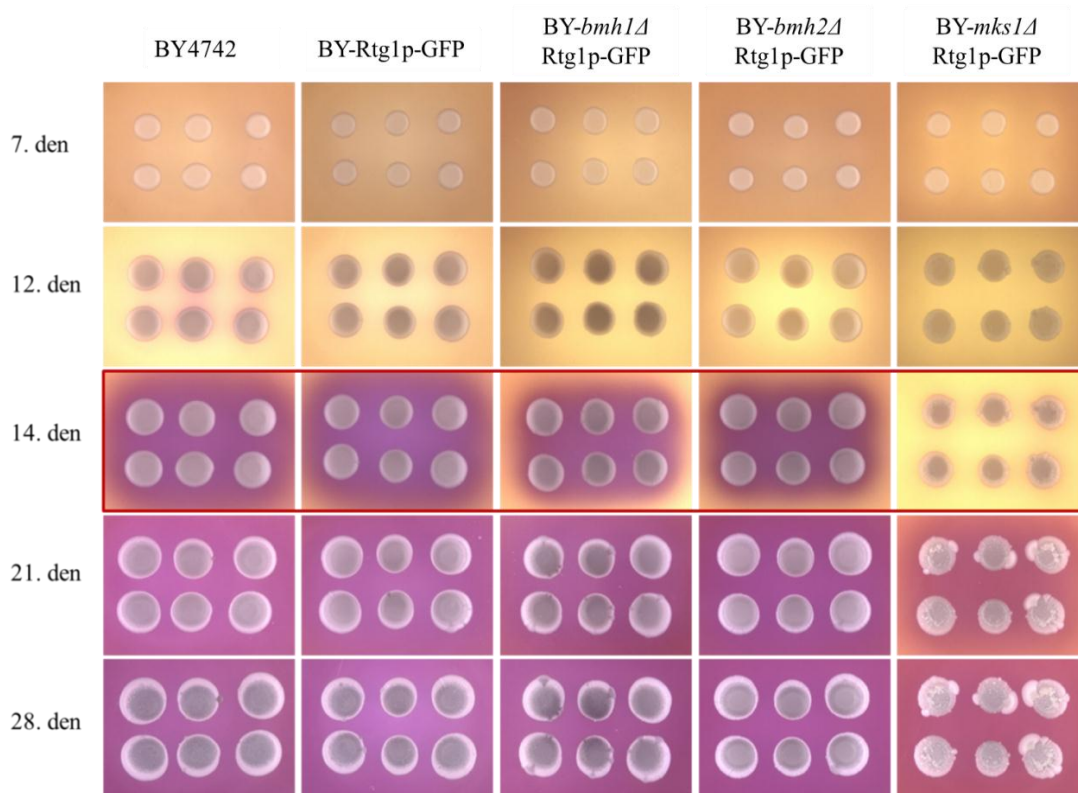


Obr. 92. Průběh alkalizace kolonií kmenů BY-Cit2p-GFP, BY-*bmh1*Δ Cit2p-GFP a BY-*bmh2*Δ Cit2p-GFP. Odběry byly provedeny 14. den.

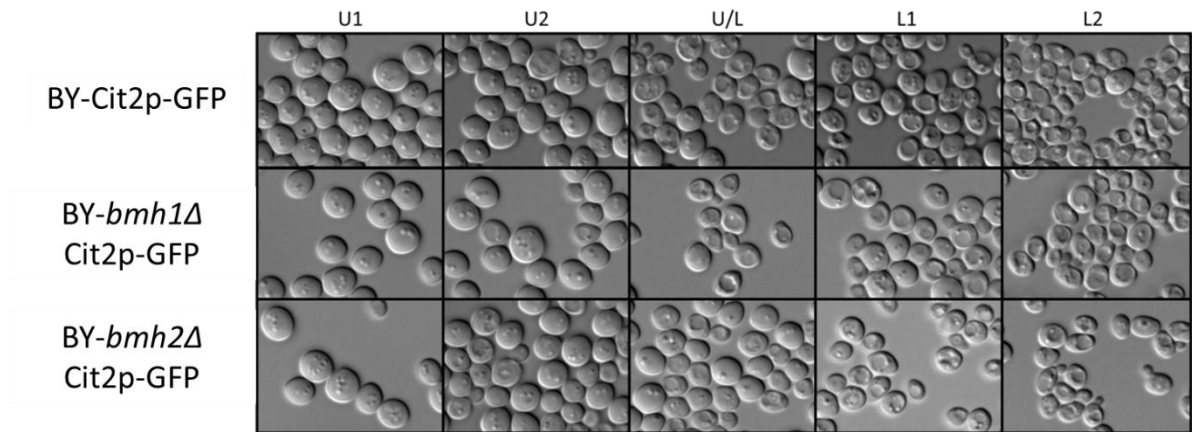




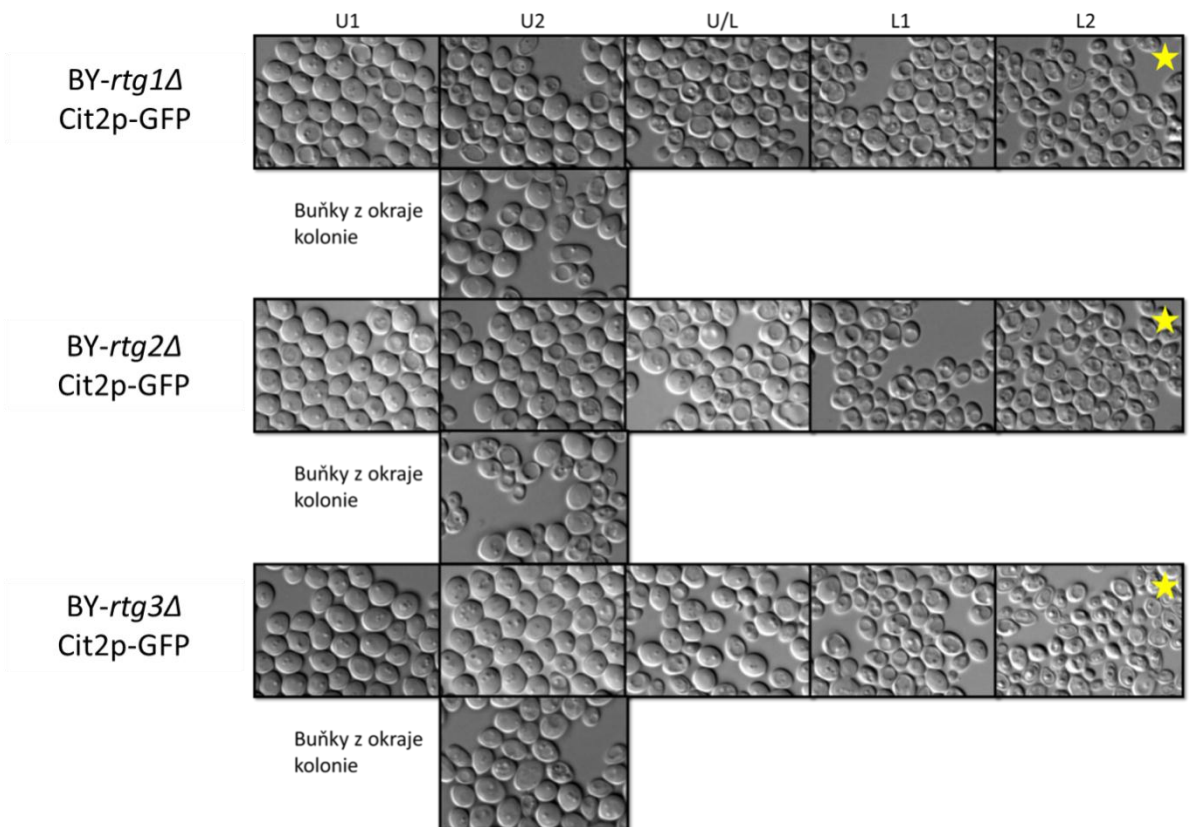
Obr. 93. Průběh alkalizace kolonií kmenů BY-Cit2p-GFP, BY-*rtg1Δ* Cit2p-GFP, BY-*rtg2Δ* Cit2p-GFP a BY-*rtg3Δ* Cit2p-GFP. Odběry byly provedeny 14. den.



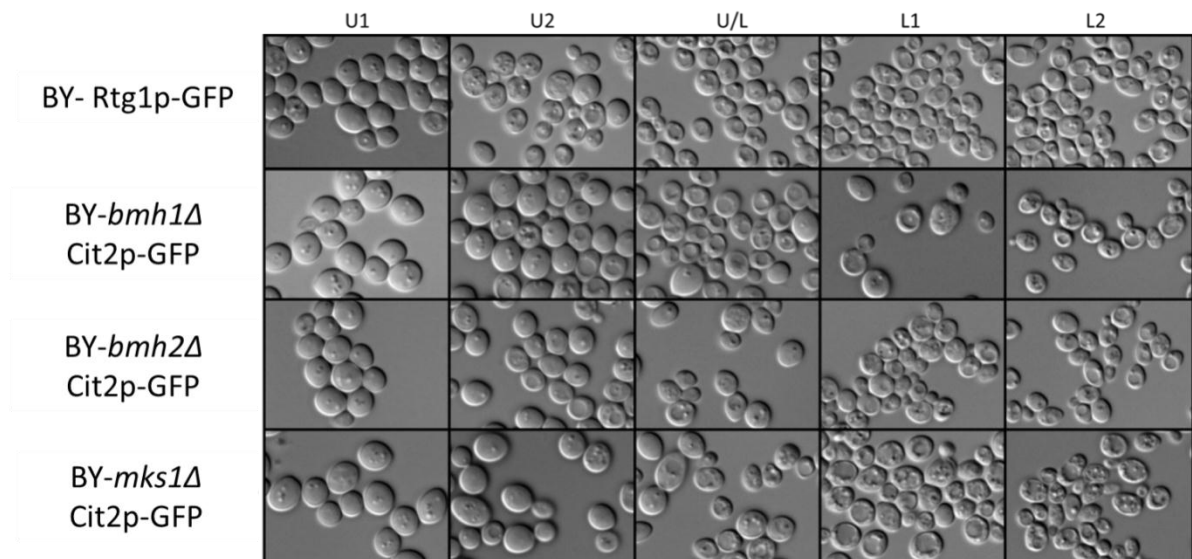
Obr. 94. Průběh alkalizace kolonií kmenů BY-Rtg1p-GFP, BY-*bmh1Δ* Rtg1p-GFP, BY-*bmh2Δ* Rtg1p-GFP, BY-*mks1Δ* Rtg1p-GFP. Odběry byly provedeny 14. den.



Obr. 95. Jednotlivé vrstvy odebrané z obřích kolonií kmenů BY-Cit2p-GFP, BY-*bmh1* $\Delta$  Cit2p-GFP, BY-*bmh2* $\Delta$  Cit2p-GFP. Buňky jsou zobrazeny pomocí Nomarského kontrastu (1000x zvětšeno).



Obr. 96. Jednotlivé vrstvy buněk odebrané z obřích kolonií kmenů BY-*rtg1* $\Delta$  Cit2p-GFP, BY-*rtg2* $\Delta$  Cit2p-GFP a BY-*rtg3* $\Delta$  Cit2p-GFP. Buňky jsou zobrazeny pomocí Nomarského kontrastu (1000x zvětšeno). Hvězdičkou jsou označeny mrtvé buňky typické pro kolonie kmenů s delecí RTG genů.



Obr. 97. Jednotlivé vrstvy buněk odebrané z obřích kolonií kmenů BY-Rtg1p-GFP, BY-*bmh1*Δ Rtg1p-GFP, BY-*bmh2*Δ Rtg1p-GFP a BY-*mks1*Δ Rtg1p-GFP. Buňky jsou zobrazeny pomocí Nomarského kontrastu (1000x zvětšeno).

## 6 Diskuze

Kvasinkové kolonie jsou schopné tvořit mnohobuněčné útvary – kolonie nebo filmy, které jsou výhodné z hlediska dlouhodobého přežívání populace v nepříznivých podmínkách (Palková and Váchová, 2006). Kolonie jsou schopné spolu komunikovat pomocí plynného amoniaku, který je produkován buňkami kolonií nejspíše za účelem informovat ostatní kolonie o blížícím se nedostatku živin a potřeby úzpůsobit změnám svůj metabolismus (Palková et al., 1997; Palková and Forstová 2000).

Diplomová práce Role mitochondrií a retrográdní signalizace při vývoji kvasinkových kolonií přispěla k poznání o vlivu retrográdní dráhy na kvasinkovou kolonii. Všechny cíle diplomové práce byly splněny. Diplomová práce je inovativní ve změně přístupu ke studiu signalizačních drah na modelovém organismu *S. cerevisiae* kultivované v koloniích nikoliv v třepaných kulturách. Oba přístupy studia se mohou lišit svými výstupy (Čáp et al., 2012). Výsledky se staly součástí publikace (Podholová et al., 2016).

### 6.1 Příprava mutantních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

V rámci diplomové práce bylo připraveno celkem 31 kmenů, jejichž seznam je v Tab. 13. Kmeny s delecí jednoho a více genů byly ověřeny sérií PCR reakcí, při kterých byla testována přítomnost správné deleční kazety a naopak nepřítomnost genu, který byl deletován. U kmenů s fúzí vybraného genu s reportérovým genem GFP byla pomocí PCR testována přítomnost kazety s proteinem GFP a správná funkce byla ověřena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Všechny připravené konstrukty byly sekvenovány. Kmeny pak byly postupně podrobeny alkalizačnímu testu, kdy od každého kmene byly na GMA médiu pěstovány 2-4 klony. Po alkalizaci byl z klonů vybrán 1 průměrný klon tak, aby se podobal co nejvíce ostatním klonům a výchozímu kmeni BY4742. Vybraný kmen byl zálohován a uložen ve storovacím médiu při -80 °C. Dále se pak pracovalo právě s vybraným kmenem.

### 6.2 Popis morfologie kmenů pomocí speciálních technik a exprese genu *CIT2*

Vybrané kmeny byly podrobeny speciální technice pro studium kvasinkových kolonií – byly připraveny tenké řezy obřích kolonií na mikrotonu a jejich struktura analyzována mikroskopicky. Pomocí této techniky byla sledována morfologie kolonií kvasinkových kmenů a exprese genů v rámci jednotlivých subpopulací kolonie.



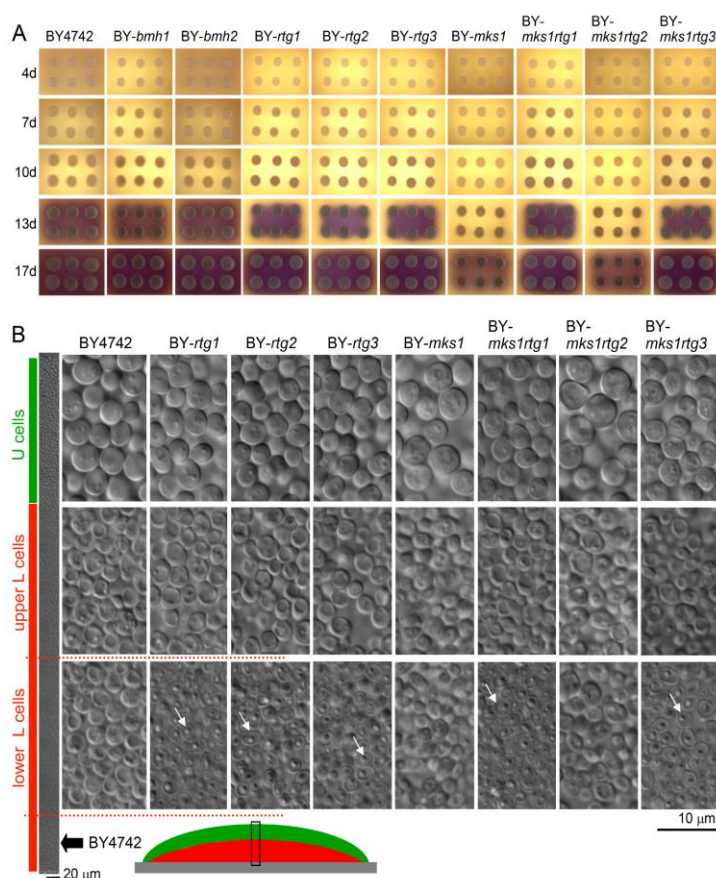
Zajímavý, ale předpokládaný výsledek přinesla delece genu *MKS1* kódující negativní regulátor Mks1p (Dilova et al., 2004, 2002; Tate et al., 2002). Tato delece vedla k specifickému fenotypu. Kmen *BY-mks1Δ* má růstové problémy, tvoří nízké kolonie, které jsou oproti výchozímu kmeni *BY4742* podstatně menší a sektorovitější. Rovněž má sníženou schopnost alkalizace média. U buňky kmene jsou typicky větší s většími mezibuněčnými prostory a s množstvím mrtvých buněk. Delece *MKS1* rovněž vede ke zvýšení exprese genu *CIT2* několikanásobně (Dilova et al., 2002; Podholová et al., 2016). Retrogradní dráha je v tomto kmeni permanentně aktivní (Ünlü et al., 2013).

Jedním z dalších cílů bylo ověření, zda se v rámci kvasinkové kolonie exprimuje gen *CIT2* a jestli je zcela regulován RTG dráhou v rámci celé kolonie. Podle dřívějších studií je exprese genu *CIT2* plně závislá na RTG dráze v třepáných kulturách (Dilova et al., 2002; Rothermel et al., 1997). V rámci celé kolonie *S. cerevisiae*, rostoucí na GMA médiu, nedochází k expresi genu *CIT2* v kmenech *BY-rtg1Δ Cit2p-GFP*, *BY-rtg2Δ Cit2p-GFP*, *BY-rtg3Δ Cit2p-GFP*, *BY-mks1Δ rtg1Δ Cit2p-GFP* a *BY-mks1Δ rtg3Δ Cit2p-GFP*. Pozorování růstu kmenů na YEPGA médiu přineslo stejný výsledek. Z těchto výsledků vyplývá, že i v koloniích je exprese genu *CIT2* plně závislá na RTG dráze. Toto zjištění potvrzuje výsledek experimentu, kdy kombinace delece genů *MKS1* a *RTG2* vedla k expresi genu *CIT2* a to na stejné úrovni jako u kmene s delecí *MKS1 – BY-mks1Δ Cit2p-GFP*. Gen *RTG2* kóduje cytoplazmatický protein, jež v případě potřeby, aktivuje RTG dráhu prostřednictvím inhibice negativního regulátoru Mks1p (Rothermel et al., 1997). Pokud odstraníme negativní regulátor Mks1p, Rtg2p již není potřeba k aktivaci RTG dráhy, protože RTG dráha je konstitutivně aktivovaná (Ünlü et al., 2013). Tento výsledek koreluje s výsledkem Dilová et al., 2002, že při delecí genu *MKS1* protein Rtg2p nehraje žádnou roli (Dilova et al., 2002; Podholová et al., 2016).

Při pozorování tenkých plátek bylo zjištěno, že u spodních L buněk se vyskytuje vrstva mrtvých buněk a u deletant RTG proteinů dochází ke snížení životaschopnosti L buněk. Retrogradní dráha tedy zjevně přispívá k prodloužení životaschopnosti spodních buněk (Podholová et al., 2016). Vrstva mrtvých buněk se tvořila u kmenů *BY-rtg1Δ*, *BY-rtg1Δ Cit2p-GFP*, *BY-rtg3Δ*, *BY-rtg3Δ Cit2p-GFP* a *BY-mks1Δ rtg3Δ* (Obr. 70, 71, 74, 75 a 83). Tato vrstva zcela chyběla u kmenů *BY-rtg2Δ*, *BY-rtg2Δ Cit2p-GFP*, *BY-mks1Δ rtg1Δ*, *BY-mks1Δ rtg1Δ Cit2p-GFP*, *BY-mks1Δ rtg2Δ*, *BY-mks1Δ rtg2Δ Cit2p-GFP* a *BY-mks1Δ rtg3Δ Cit2p-GFP* (Obr. 72, 73, 79, 80, 81, 82 a 84). Při opakování experimentů se vrstva mrtvých buněk objevila u všech kmenů s delecí jednoho ze tří RTG genů (Obr. 98). Při odběrech se rovněž potvrdila přítomnost vrstvy mrtvých buněk (Obr. 96). Na základě těchto pozorování bylo vyvozeno, že na tvorbu mrtvé vrstvy buněk má vliv doba od začátku přechodu kolonií do stádia alkalizace. Pokud by stejné kolonie, u kterých vrstva mrtvých buněk ještě nebyla pozorována, byly mikroskopovány v pozdějším čase, pravděpodobně by již byla tato vrstva přítomná. V koloniích kmenů s kombinovanými delecemi *MKS1* a RTG genů docházelo k tvorbě vrstvy mrtvých buněk u kmenů *BY-mks1Δ rtg1Δ*, *BY-mks1Δrtg1Δ Cit2p-GFP*, *BY-mks1Δ rtg3Δ* respektive *BY-mks1Δrtg3Δ Cit2p-GFP*. Nikoliv však u kmenů *BY-mks1Δ rtg2Δ* a *BY-mks1Δ rtg2Δ*

Cit2p-GFP. U kmenů s delecí *MKS1* a *RTG2* je RTG dráha aktivní a má zjevně pozitivní vliv na prodloužení života L buněk, tudíž se vrstva mrtvých buněk netvoří (Podholová et al., 2016).

Ostatní kmeny nebyly významně morfologicky odlišné od výchozího kmene BY4742.



Obr. 98. Srovnání morfologie buněk v subpopulaci kolonií jednotlivých kmenů. V 3. řádce je patrná vrstva mrtvých buněk (Podholová et al., 2016).

### 6.3 Role retrogradní dráhy v subpopulacích kvasinkové kolonie

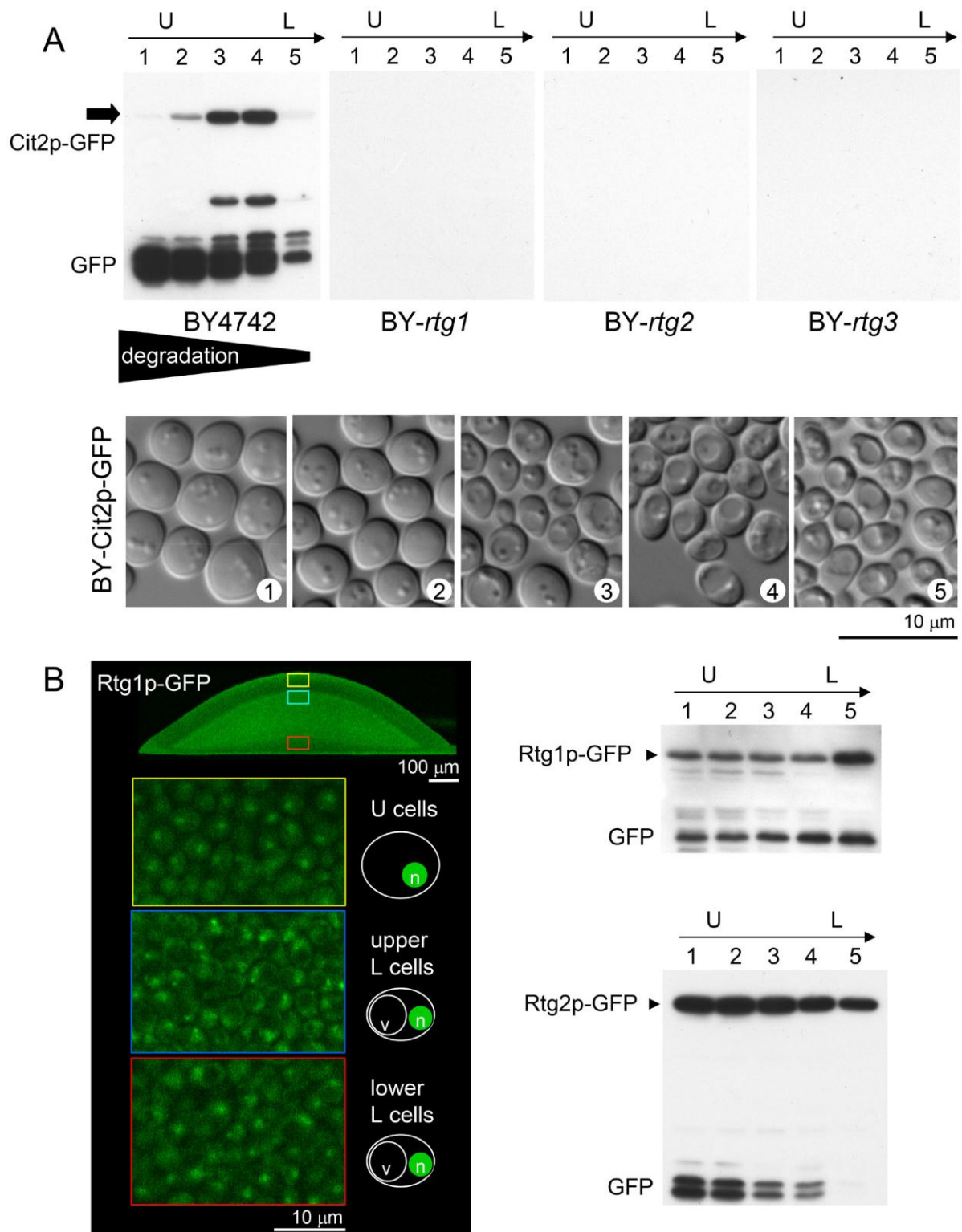
Změny exprese *CIT2* genu v obřích koloniích pozorované v této práci byly potvrzeny dalšími metodami, především analýzou mikrokolonií pomocí konfokální mikroskopie (Vachova et al., 2009) a analýzou obřích kolonií i mikrokolonií pomocí Western blotů. Konfokální mikroskopie (Obr. 100) prokázala, že změny pozorované v obřích koloniích jsou spojeny s diferenciací kolonie a do jisté míry nezávislé na chronologickém stárnutí kolonií. (Podholová et al., 2016). Western blot analýza exprese genu *CIT2* (Obr. 99 A), potvrdila výsledky mikroskopických analýz kolonií kmene BY-Cit2p-GFP. Poměrně nízkou úroveň exprese *CIT2* v U buňkách (1. a 2. frakce), silnou expresi v dolních L buňkách (3. a 4. frakce) a opět velmi nízkou expresi u tenké vrstvy buněk nacházející se u agaru (5. frakce). Dobře je tato tmavá vrstva vidět na řezu z konfokálního mikroskopu na Obr. 100. Na Obr. 99 A je dobře patrná míra degradace GFP v horních buňkách a postupně klesá. Degradace je typická pro U buňky s aktivovanou autofagií (Čáp et al., 2012; Podholová et al., 2016).

Analýza Western blot kmenů *BY-rtg1Δ Cit2-GFP*, *BY-rtg2Δ Cit2-GFP* a *BY-rtg3Δ Cit2-GFP* i konfokální mikroskopie potvrdila nulovou úroveň produkce Cit2p-GFP u kolonií těchto kmenů. Exprese genu *CIT2* je plně závislá na aktivaci retrográdní drahou (Chelstowska et al., 1999; Podholová et al., 2016).

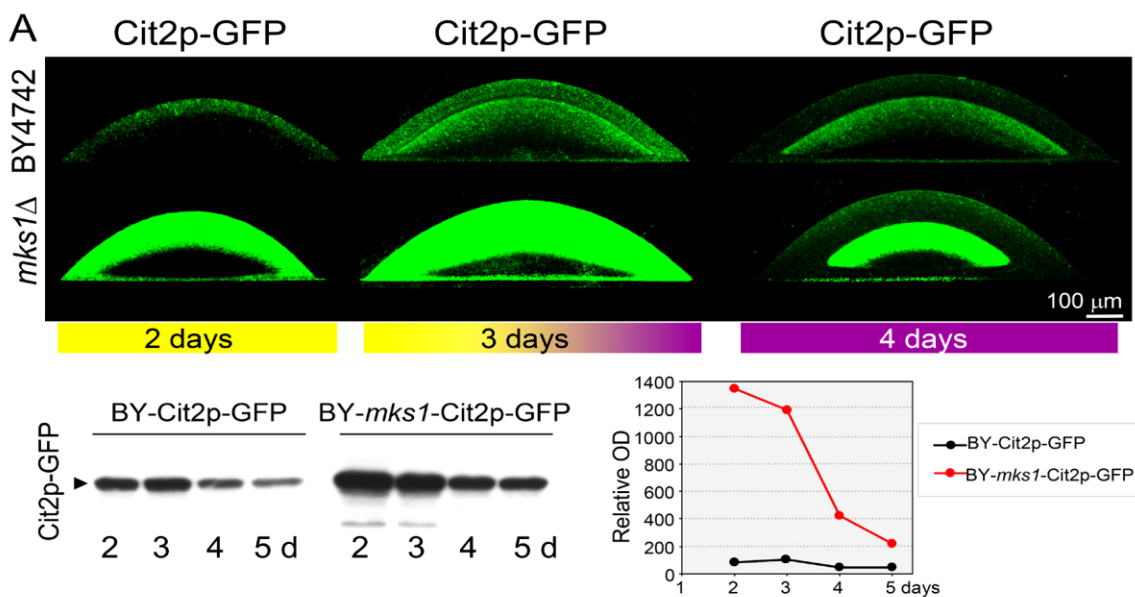
Jak již bylo uvedeno delece *MKS1* vedla ke zvýšení exprese genu *CIT2* u obřích kolonií. I toto zjištění bylo prokázáno i na úrovni chronologicky mladších mikrokolonií pomocí konfokálním mikroskopu a změny produkce Cit2p v čase zjištěny analýzou pomocí Western blotu (Obr. 100). Konfokální mikroskopie rovněž ukázala dynamiku změn lokalizace Cit2p-GFP při přechodu kolonií z acidické do alkalické fáze vývoje. Mikrokolonie se ukázaly být vhodnějším modelem pro studium exprese genu *CIT2* v čase. U mikrokolonií oproti obřím koloniím je snadněji odhadnutelná fáze, ve které se zrovna nacházejí a tak lze přesněji zachytit dynamické změny. Na Obr. 100 je patrné, že před diferenciací kolonie se *CIT2* exprimuje v horní části kolonie. V průběhu začátku alkalizace dochází k „přesunu“ exprese z vrchní části kolonie do horní vrstvy dolních buněk. V plně alkalické a diferenciované kolonii je exprese jen v horní vrstvě L buněk. V čase docházelo k postupnému úbytku exprese u obou kmenů *BY-Cit2p-GFP* i *BY-mks1Δ Cit2p-GFP* (Podholová et al., 2016).

Pro pozorování lokalizace transkripčního *Rtg1p/Rtg3p* byl v rámci této diplomové práce připraven kmen *BY-Rtg1p-GFP* a zjištěna úroveň jeho exprese v rámci obřích koloniích, která byla ve všech vrstvách přibližně stejná, což odpovídá literárním údajům - gen *RTG1* je konstitutivně aktivovaný (Sekito et al., 2000). Rozlišení, zda je fluorescenční signál v jádrech nebo jen v cytoplasmě nebyl u řezů obřích kolonií zcela jasný. Nabízí se vysvětlení, že signál z jádra byl překryt signálem z cytoplazmy nebo byl příliš slabý na detekci pomocí standardního fluorescenčního mikroskopu.. Důležité výsledky proto přinesly metody konfokální mikroskopie s využitím připraveného kmene, doplněné i metodou western blot (Podholová et al., 2016). Konfokální mikroskopie mikrokolonií ukázala, že v buňkách ve všech vrstvách mikrokolonií kromě cytoplazmy GFP svítilo i v jádře (Obr. 99 B). Tedy, že dimer *Rtg1p/Rtg3p* se nachází ve všech buňkách v jádře, kde aktivuje genovou expresi. Toto zjištění koreluje s dalším objevem naší laboratoře, v rámci kterého bylo prokázáno, že retrográdní dráha reguluje expresi genů *ATO1* a *ATO2* v U buňkách kolonií (Podholová et al., 2016). *Rtg1p/Rtg3p* tedy prokazatelně aktivuje odlišné geny v U i L buňkách kolonií. V U buňkách reguluje expresi genů *ATO1* a *ATO2* a v L buňkách aktivuje expresi genu *CIT2*. Analýzou Western blot byla potvrzena přibližně stejná úroveň exprese genu *RTG1* v obou subpopulacích kolonie (Obr. 99) (Podholová et al., 2016).

U delece *MKS1* dochází k translokaci dimeru *Rtg1p/Rtg3p* do jádra i na bohatých médiích (Dilova et al., 2002). U kmene *BY-mks1Δ Rtg1p-GFP* na glukózovém YEPGA médiu je skutečně nepatrný signál i v jádře buňky. Nicméně signál je poměrně slabý a je překryt silnější fluorescencí z cytoplazmy.



Obr. 99. (A) Expresse genu *CIT2* v jednotlivých subpopulacích kvasinkové kolonie. Ve frakci 1 a 2 v U buňkách nedocházelo k expresi *CIT2*. Ve frakcích 3 a 4 (L buňky) byla exprese *CIT2* nejsilnější, zatímco ve frakci 5 (buňky u agaru) byla exprese minimální. Pro U buňky je typická autofágie a ní spojená degradace (Čáp et al., 2012), která je patrná na spodní části filmu. Jednotlivé frakce kmene BY-Cit2p-GFP jsou ve druhém řádku označeny 1-5. (B) U kmene Rtg1p-GFP se značený protein nachází v jádře ve všech subpopulacích. Jeho exprese je v rámci celé kolonie stejná. U kmene Rtg2p-GFP je exprese v celé kolonii rovněž na stejné úrovni (Podholová et al., 2016).



Obr. 100. Produkce proteinu Cit2p-GFP v krátkém časovém úseku. Obrázek ukazuje produkce genu Cit2p-GFP ve výchozím kmeni BY4742 a kmeni s delecí genu MKS1. Nejprve byla pozorována exprese CIT2 na mikrokoloniích pomocí konfokálního mikroskopu. Po té byl výsledek potvrzen pomocí analýzy western blot a imunodetekce (Podholová et al., 2016).

Dalším kmenem podrobeným zkoumání byl BY-Rtg2p-GFP. Protein Rtg2p je lokalizován v cytoplazmě a jak prokázala analýza pomocí Western blot je jeho hladina exprese z RTG genů nejvyšší (Obr. 99) (Podholová et al., 2016; Sekito et al., 2000).

Kmen BY-Mks1p-GFP byl podroben pouze pozorování na obřích koloniích. Expresce genu *MKS1* je v U buňkách nižší oproti L buňkám. Odlišná exprese od *RTG2* může být dána pleiotrofním účinkem Mks1p (Matsuura and Anraku, 1993).

## 7 Souhrn

V rámci diplomové práce bylo připraveno celkem 31 mutantních kmenů, které posloužily k rozšíření poznání retrogradní dráhy a její funkce v rámci obřích kvasinkových kolonií *S. cerevisiae*.

Obří kolonie připravených kmenů byly analyzovány metodou tenkých řezů, pomocí Nomarského kontrastu a fluoresceční mikroskopie.

Výsledky ukázaly, že kmeny s delecí RTG proteinů tvoří o něco menší kolonie a mají výrazný přechod mezi první acidickou a alkalickou fází. Ve spodní části kolonií se nachází vrstva mrtvých buněk.

Kmen *BY-mks1Δ* měl nejvýraznější růstový defekt. Tento kmen tvoří menší a nižší kolonie. Jednotlivé buňky jsou naopak větší a mezi U buňkami se nacházejí buňky mrtvé a velké mezibuněčné prostory.

Bylo zjištěno, že gen *CIT2* se v diferencovaných koloniích produkuje pouze v dolních buňkách a jeho produkce je plně regulována RTG dráhou. V kmenech s delecí kteréhokoli z RTG genů se gen *CIT2* neexprimoval. Naopak delece negativního regulátoru *Mks1p* vedla nadprodukcí genu *CIT2*. Delece genů *BMH1* a *BMH2* nevedla k významné změně exprese.

Gen *RTG1*, který je konstitutivně exprimovaný v tekutých kulturách (Sekito et al., 2000), je v rámci kolonie rovněž rovnoměrně exprimován. Delece *MKS1* vedla ke zvýšení exprese *RTG1* rovnoměrně v celé kolonii. Delece *BMH1* pak pouze ke zvýšení exprese ve spodních buňkách. Naopak delece *BMH2* neměla žádný vliv.

V rámci práce byly rovněž připraveny vzorky obřích kolonií pro imunodetekci Cit2p-GFP pomocí Western blotů a mikrokolonie Cit2p-GFP kmenů pro konfokální mikroskopie. Vlastní analýzy Western blot a konfokální mikroskopie byly provedeny dalšími autory publikace Podholová et al (2016).



## 8 Literární zdroje

Amuthan, G., Biswas, G., Ananatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Shephard, H.M., Avadhani, N.G., 2002. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21, 7839–7849. doi:10.1038/sj.onc.1205983

Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S.-Y., Klein-Szanto, A., Vijayasathy, C., Avadhani, N.G., 2001. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* 20, 1910–1920.

Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J., Raes, M., 2002. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J.* 21, 53–63.

Baeuerle, P., Baltimore, D., 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988. doi:10.1126/science.3140380

Biswas, G., 2003. Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J. Cell Biol.* 161, 507–519. doi:10.1083/jcb.200211104

Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Ananatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., Avadhani, N.G., 1999. Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J.* 18, 522–533. doi:10.1093/emboj/18.3.522

Biswas, G., Ananatheerthavarada, H.K., Avadhani, N.G., 2005. Mechanism of mitochondrial stress-induced resistance to apoptosis in mitochondrial DNA-depleted C2C12 myocytes. *Cell Death Differ.* 12, 266–278. doi:10.1038/sj.cdd.4401553

Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., Siebenlist, U., 1995. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267, 1485–1488. doi:10.1126/science.7878466

Bruckmann, A., STEENSMA, H., TEIXEIRA, de M.M., van HEUSDEN, G., 2004. Regulation of transcription by *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins. *Biochem J* 382, 867–875.

Čáp, M., Štěpánek, 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, 436–448. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.001

Čáp, M., Vachova, L., Palkova, Z., 2009. Yeast Colony Survival Depends on Metabolic Adaptation and Cell Differentiation Rather Than on Stress Defense. *J. Biol. Chem.* 284, 32572–32581. doi:10.1074/jbc.M109.022871

Cavalli, L.R., Varella-Garcia, M., Liang, B.C., 1997. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ.-Publ. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 1189–1198.

Chelstowska, A., Butow, R.A., 1995. RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J. Biol. Chem.*

Chelstowska, A., Liu, Z., Jia, Y., Amberg, D., Butow, R.A., 1999. Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new d-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*, 13 15, 1377–1391. doi:10.1002/(SICI)1097-0061

Chen, E.J., Kaiser, C.A., 2003. LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J. Cell Biol.* 161, 333–347. doi:10.1083/jcb.200210141

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M., 1999. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 45, 7–17.

Chu, Z.-L., McKinsey, T.A., Liu, L., Qi, X., Ballard, D.W., 1996. Basal phosphorylation of the PEST domain in the I ( $\kappa$ ) B ( $\beta$ ) regulates its functional interaction with the c-rel proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5974–5984.

Cogswell, P.C., Kashatus, D.F., Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Reuther, J.Y., Bristow, C., Roy, S., Nicholson, D.W., Baldwin, A.S., 2003. NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Are Found in the Mitochondria: EVIDENCE FOR REGULATION OF MITOCHONDRIAL GENE EXPRESSION BY NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 278, 2963–2968. doi:10.1074/jbc.M209995200

Dillin, A., Hsu, A.-L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C., 2002. Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. *Science* 298, 2398–2401. doi:10.1126/science.1077780

Dilova, I., Aronova, S., Chen, J., Powers, T., 2004. Tor Signaling and Nutrient-based Signals Converge on Mks1p Phosphorylation to Regulate Expression of Rtg1p{middle dot}Rtg3p-dependent Target Genes. *J. Biol. Chem.* 279, 46527–46535. doi:10.1074/jbc.M409012200

Dilova, I., Chen, C.-Y., Powers, T., 2002. Mks1 in Concert with TOR Signaling Negatively Regulates RTG Target Gene Expression in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 389–395.

Dilova, I., Powers, T., 2006. Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 112–119. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00008.x

Donahue, T.F., Henry, S.A., 1981. myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J. Biol. Chem.* 256, 7077–7085.

Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R., Butow, R.A., 2001. Genome-wide Responses to Mitochondrial Dysfunction. *Mol. Biol. Cell* 12, 297–308. doi:10.1091/mbc.12.2.297

Gelperin, D., Weigle, J., Nelson, K., Roseboom, P., Irie, K., Matsumoto, K., Lemmon, S., 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11539–11543.

- Ghosh, S., Baltimore, D., 1990. Activation in vitro of NF- $\kappa$ B<sup>α</sup> by phosphorylation of its inhibitor I $\kappa$ B. Nature 344, 678–682. doi:10.1038/344678a0
- Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A., 2005. Retrograde Response to Mitochondrial Dysfunction Is Separable from TOR1/2 Regulation of Retrograde Gene Expression. J. Biol. Chem. 280, 42528–42535. doi:10.1074/jbc.M509187200
- Gross, J.D., 1994. Developmental decisions in Dictyostelium discoideum. Microbiol. Rev. 58, 330–351.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., Hegemann, J.H., 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Res. 30, e23–e23.
- Guerini, D., Klee, C.B., 1989. Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 9183–9187.
- Guha, M., Srinivasan, S., Koenigstein, A., Zaidi, M., Avadhani, N.G., 2015. Enhanced osteoclastogenesis by mitochondrial retrograde signaling through transcriptional activation of the cathepsin K gene. Ann. N. Y. Acad. Sci. n/a-n/a. doi:10.1111/nyas.12709
- Heddi, A., Lestienne, P., Wallace, D.C., Stepien, G., 1993. Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production. J. Biol. Chem. 268, 12156–12163.
- Heusden, G.P.H., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Schrader, P.A., Carr, A.M., Steensma, H.Y., 1995. The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast Saccharomyces cerevisiae and Can be Replaced by a Plant Homologue. Eur. J. Biochem. 229, 45–53.
- Heusden, G.P.H. van, Wenzel, T.J., Lagendijk, E.L., Steensma, H.Y. de, Berg, J.A. van den, 1992. Characterization of the yeast {BMH1} gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase {II} activators and protein kinase C inhibitors. FEBS Lett. 302, 145–150. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80426-H
- Jazwinski, S.M., 2013. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1833, 400–409. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.010
- Jia, Y., Rothermel, B.A., Thornton, J., 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. Mol. Cell. Biol.
- Johnson, C., Van Antwerp, D., Hope, T.J., 1999. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I $\kappa$ B $\alpha$ . EMBO J. 18, 6682–6693.
- Klee, C.B., Draetta, G.F., Hubbard, M.J., 1988. Calcineurin, in: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., pp. 149–200.

Komeili, A., Wedaman, K.P., O'Shea, E.K., Powers, T., 2000. Mechanism of Metabolic Control Target of Rapamycin Signaling Links Nitrogen Quality to the Activity of the Rtg1 and Rtg3 Transcription Factors. *J. Cell Biol.* 151, 863–878.

Lee, S.S., Lee, R.Y.N., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G., 2003. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* 33, 40–48. doi:10.1038/ng1056

Liao, X., Butow, R.A., 1993. Rtg1 and RTG2 two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell.*

Lin, L., Ghosh, S., 1996. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2248–2254.

Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., Hiscott, J., 1996. Phosphorylation of I kappa B alpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1401–1409.

Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E., Hekimi, S., 2005. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev.* 19, 2424–2434. doi:10.1101/gad.1352905

Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J., Butow, R.A., 2003. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell* 12, 401–411.

Liu, Z., Spirek, M., Thornton, J., Butow, R.A., 2005. A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCFGrr1. *Mol. Biol. Cell* 16, 4893–4904.

Marini, A.-M., Vissers, S., Urrestarazu, A., Andre, B., 1994. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 13, 3456.

Martinou, J.-C., Youle, R.J., 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev. Cell* 21, 92–101. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.017

Matsuura, A., Anraku, Y., 1993. Characterization of the MKS1 gene, a new negative regulator of the Ras-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 238, 6–16. doi:10.1007/BF00279524

McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N., Paya, C.V., 1996. Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 899–906. doi:10.1128/MCB.16.3.899

McKinsey, T.A., Chu, Z.-L., Ballard, D.W., 1997. Phosphorylation of the PEST Domain of I kappa B beta Regulates the Function of NF-kappaB/I kappa B beta Complexes. *J. Biol. Chem.* 272, 22377–22380. doi:10.1074/jbc.272.36.22377

Menssen, A., Hermeking, H., 2002. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6274–6279.

Miceli, M.V., Jazwinski, S.M., 2005. Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Exp. Cell Res.* 302, 270–280. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.006

Miceli, M.V., Jiang, J.C., Tiwari, A., Rodriguez-Quiñones, J.F., Jazwinski, S.M., 2012. Loss of Mitochondrial Membrane Potential Triggers the Retrograde Response Extending Yeast Replicative Lifespan. *Front. Genet.* 2. doi:10.3389/fgene.2011.00102

Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E.R., McKeon, F., 1994. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79, 437–447. doi:10.1016/0092-8674(94)90253-4

Morais, R., Zinkewich-Péotti, K., Parent, M., Wang, H., Babai, F., Zollinger, M., 1994. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer Res.* 54, 3889–3896.

Nair, S.K., Burley, S.K., 2003. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112, 193–205.

Norris, J.L., Baldwin, A.S., 1999. Oncogenic Ras enhances NF- $\kappa$ B transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 13841–13846.

Palková, Z., Devaux, F., Ricicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C., 2002a. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* 13, 3901–3914.

Palková, Z., Devaux, F., Řičicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C., 2002b. Ammonia Pulses and Metabolic Oscillations Guide Yeast Colony Development. *Mol. Biol. Cell* 13, 3901–3914. doi:10.1091/mbc.E01-12-0149

Palková, Z., Forstová, J., 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. *J. Cell Sci.* 113, 1923–1928.

Palková, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., Forstova, J., 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532–536. doi:10.1038/37398

Palková, Z., Palková, Z., Váchová, L., Palková, Z., Váchová, L., Gášková, D., Kučerová, H., 2009. Synchronous plasma membrane electrochemical potential oscillations during yeast colony development and aging. *Mol. Membr. Biol.* 26, 228–235. doi:10.1080/09687680902893130

Palková, Z., Váchová, L., 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 806–824. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00034.x

Parikh, V., Morgan, M., Scott, R., Clements, L., Butow, R., 1987. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235, 576–580. doi:10.1126/science.3027892

Paz, I., Meunier, J.-R., Choder, M., 1999. Monitoring dynamics of gene expression in yeast during stationary phase. *Gene* 236, 33–42. doi:10.1016/S0378-1119(99)00264-4

Podholová, K., Plocek, V., Rešetárová, S., Kučerová, H., Hlaváček, O., Váchová, L., Palková, Z., 2016a. Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget* Vol 7 No 13.

Podholová, K., Plocek, V., Rešetárová, S., Kučerová, H., Hlaváček, O., Váchová, L., Palková, Z., 2016b. Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget* Vol 7 No 13.

Ravindranath, S.D., Fridovich, I., 1975. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J. Biol. Chem.* 250, 6107–6112.

Roerg, K.J., Bickel, S., Rowley, N., Kaiser, C.A., 1997. Control of Amino Acid Permease Sorting in the Late Secretory Pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST78. *Genetics* 147, 1569–1584.

Roberts, R.L., Mösch, H.-U., Fink, G.R., 1997. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* 89, 1055–1065.

Rothermel, B.A., Thornton, J.L., Ronald A. Butow, 1997. Rtg3p, a Basic Helix-Loop-Helix/Leucine Zipper Protein that Functions in Mitochondrial-induced Changes in Gene Expression, Contains Independent Activation Domains. *J. Biol. Chem.* 272, 19801–19807. doi:10.1074/jbc.272.32.19801

Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F., de Nadal, E., 2012. The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol. Biol. Cell* 23, 4286–4296.

Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Verma, I.M., 1996. Constitutive phosphorylation of IkappaBalpha by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free IkappaBalpha. *Mol. Cell Biol.* 16, 3554–3559.

Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J., Butow, R.A., 2002. RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell* 13, 795–804.

Sekito, T., Thornton, J., Butow, R.A., 2000. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Sci. Signal.* 11, 2103.

Sheff, M.A., Thorn, K.S., 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661–670. doi:10.1002/yea.1130

Shibasaki, F., Price, E.R., Milan, D., McKeon, F., 1996. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382, 370–373. doi:10.1038/382370a0

Srinivasan, V., Kriete, A., Sacan, A., Michal Jazwinski, S., 2010. Comparing the yeast retrograde response and NF-κB stress responses: implications for aging: Comparing the yeast retrograde response and NF-κB stress responses. *Aging Cell* 9, 933–941. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00622.x

Strachotová, D., Holoubek, A., Kučerová, H., Benda, A., Humpolíčková, J., Váchová, L., Palková, Z., 2012. Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence



lifetime imaging (FLIM). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818, 2126–2134. doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005

Szerb, J.C., Butterworth, R.F., 1992. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 39, 135–153. doi:10.1016/0301-0082(92)90008-3

Tate, J.J., Cox, K.H., Rai, R., Cooper, T.G., 2002. Mks1p Is Required for Negative Regulation of Retrograde Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* but Does Not Affect Nitrogen Catabolite Repression-sensitive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 277, 20477–20482. doi:10.1074/jbc.M200962200

Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S., Baeuerle, P.A., 1995. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 14, 2876.

Traven, A., Wong, J.M.S., Xu, D., Sopta, M., Ingles, C.J., 2001. Interorganellar Communication. ALTERED NUCLEAR GENE EXPRESSION PROFILES IN A YEAST MITOCHONDRIAL DNA MUTANT. *J. Biol. Chem.* 276, 4020–4027. doi:10.1074/jbc.M006807200

Ünlü, E.S., Narayanan, L., Gordon, D.M., 2013. Characterization of fungal *RTG2* genes in retrograde signaling of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 13, 495–503. doi:10.1111/1567-1364.12055

Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Ferčíková, I., Kubínová, L., Palková, Z., 2009. Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* 11, 1866–1877. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01911.x

Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C., Palkova, Z., 2004. Sok2p Transcription Factor Is Involved in Adaptive Program Relevant for Long Term Survival of *Saccharomyces cerevisiae* Colonies. *J. Biol. Chem.* 279, 37973–37981. doi:10.1074/jbc.M404594200

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, 1–9. doi:10.1155/2013/102485

Váchová, L., Palková, Z., 2005. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J. Cell Biol.* 169, 711–717. doi:10.1083/jcb.200410064

van Heusden, G.P.H., Steensma, H.Y., 2001. 14-3-3 Proteins are essential for regulation of RTG3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 1479–1491.

Wang, C., Youle, R.J., 2009. The Role of Mitochondria in Apoptosis\*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 95–118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850

Wu, K.-J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., Dalla-Favera, R., 1999. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 21, 220–224.

Zhang, F., Pracheil, T., Thornton, J., Liu, Z., 2013. Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. *Genes* 4, 86–100. doi:10.3390/genes4010086

Zikánová, B., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z., 2002. Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 962–967.

## **9 Další zdroje**

PODHOLOVÁ, Kristýna. Retrográdní signalizace mezi mitochondriemi a jádrem u kvasinek. Praha, 2004. (bakalářská práce)