

Universita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

**Produkce fluorescenčně značených Ato proteinů  
u vybraných mutantních kmenů a u divokých  
kmenů kvasinky *S. cerevisiae***

**IVANA FERČÍKOVÁ**

**PRAHA 2007**

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:

doc. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce, pouze s použitím citované literatury.

Tato práce vznikla pod vedením doc. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc a podnětné připomínky při konzultaci a interpretaci výsledků, ale také za trpělivost a vlídnost po celou dobu mé práce. Můj dík patří i RNDr. Libuši Váchové, která se ochotně podílela na řešení mnoha problémů.

Celému kolektivu naší laboratoře patří dík za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí, zejména pak Mgr. Ditě Strachotové, která mi pomáhala hlavně v počátcích mé laboratorní práce. Laborantce paní Alexandře Pokorné děkuji za pomoc při stanovování aktivit enzymů, laborantkám paní Vladimíře Haislové a paní Hanke Žďárské za výborné zajištění chodu laboratoře.

Velmi děkuji své mámě za trpělivost a morální i finanční podporu během studia a v neposledním řadě také přátelům, bez jejichž pomoci by bylo dokončení studia mnohem těžší.

**MOTTO:**

*„Murder of the living is tragic, but murder of the idea is unforgivable.“*

**Tato práce byla vypracována v letech 2004-2007 za podpory grantů GAČR 204/05/0294 a 525/05/0297 a Centrem základního výzkumu LC06063.**



## **Production of fluorescent labelled Ato proteins in selected mutant and wild strains of *Saccharomyces cerevisiae***

### **Abstract**

Investigation of yeast colonies revealed the existence of NH<sub>3</sub> signalling involved in colony development (Palková et al., Nature 1997). Unprotonated volatile ammonia is produced by colonies in pulses and evokes changes that are important for long-term survival of colonies (e.g. Palková et al., MBC, 2002, Vachova & Palkova, JCB, 2005). Besides yeasts, ammonia regulates several steps of the multicellular development of *Dictyostelium discoideum* (e.g. Gross, Microbiol Rev, 1994) and evidence indicates that ammonia/ammonium plays a role in neural tissues of higher eukaryotes. (e.g. Marcaggi & Coles, Prog. Neurobiol, 2001)

Ato proteins (Ato1p, Ato2p, Ato3p) are proteins with unknown function but previous experiments and sequence analysis suggested that they could function as transporters of ammonium (Ammonium Transport Outwards). It is supposed that Ato proteins have an important role in ammonia signalling between yeast colonies. (Palková et al, 2002)

To prove hypothesis that production of Ato proteins hangs together with ammonia signalling, I constructed 18 *S. cerevisiae* strains containing *ATO* genes fused with the gene for a fluorescent protein in their genome. Selected mutant strains (exhibiting changes in ammonia signalling) producing Ato-GFP proteins were constructed with the aim to analyse production of Ato-GFP proteins in different parts of colonies in different times of their development. Obtained results show significant correlation between ammonia production and production of Ato-GFP proteins in colonies of particular strains (mutants). Ato1p protein of wild *S. cerevisiae* strain isolated from nature and of its domesticated form was also GFP-labelled. This allows us to correlate ammonia release and Ato1p-GFP production and localisation in structured fluffy colonies of the wild strain and in smooth colonies of its domesticated derivative.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, ammonia signalling, communication, Ato proteins

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, amoniaková signalizace, komunikace, Ato proteiny

# **OBSAH:**

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	11
SEZNAM GENŮ UVEDENÝCH V TÉTO PRÁCI	13
<b>1. ÚVOD</b>	<b>15</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Plasmatická membrána</b>	<b>17</b>
2.1.1 Membránové lipidy	18
2.1.2 Membránové proteiny	19
<b>2.2 Transport přes plazmatickou membránu</b>	<b>21</b>
2.2.1 Difúze	21
2.2.2 Usnadněná difúze	21
2.2.3 Aktivní transport	22
2.2.3.1 Primární aktivní transport	22
2.2.3.2 Sekundární aktivní transport	23
<b>2.3 Transportéry u kvasinek</b>	<b>23</b>
2.3.1 MDR transportéry	25
2.3.2 Transportéry amonných iontů (AMTs)	27
2.3.2.1 Mep transportéry amonných iontů	28
2.3.2.1.1 Mep1p	30
2.3.2.1.2 Mep2p	31
2.3.2.1.2.1 Mep2p a pseudohyfální růst kvasinek	31
2.3.2.1.3 Mep3p	32
<b>2.4 Mnohobuněčné struktury mikroorganismů</b>	<b>32</b>
<b>2.5 Biologické hodiny</b>	<b>33</b>
2.5.1 NH <sub>3</sub> signalizace kolonií kvasinek	34
2.5.1.1 Analýza vývojových stádií přechodu z acidické do alkalické fáze	35
2.5.1.2 Zdroj amoniaku	38
2.5.1.3 Role jednotlivých aminokyselin a amoniakové signalizaci	39
2.5.1.4 Programovaná buněčná smrt v koloniích a role NH <sub>3</sub>	41
2.5.1.5 Ato proteiny	43
2.5.1.5.1 Exprese <i>ATO1</i> genu je závislá na Cat8p	45

2.5.1.5.2	Exprese <i>ATO3</i> genu je zvýšená v $\rho^0$ petit kmenech	45
2.5.1.6	Role Pma1p a Pma2p	46
2.6	Divoké kmeny kvasinek	47
2.7	GFP protein a jeho analogy	49
2.7.1	Historie GFP	51
2.7.2	Struktura GFP	52
2.7.3	Varianty GFP	53
2.7.3.1	„Red Fluorescent Protein“ RFP z koralu <i>Discosoma</i> sp.	54
2.7.4	Metoda FRET	55
3.	MATERIÁL A METODY	57
3.1	Materiál	57
3.1.1	Použité mikroorganizmy	57
3.1.2	Použité plazmidy	57
3.1.3	Materiál pro práci s DNA	59
3.1.4	Antibiotika a ostatní	60
3.2	Přístroje	60
3.3	Použité internetové databáze a počítačové programy	61
3.4	Roztoky a média	61
3.4.1	Roztoky	61
3.4.2	Média	64
3.5	Metody	67
3.5.1.	Sterilizace	67
3.5.2	Kultivace	67
3.5.3	Uchovávání kmenů	67
3.5.4	Nakapání obřích kolonií	67
3.5.5	Počítání buněk	68
3.5.5.1	Počítání buněk v Thomově komůrce	68
3.5.5.2	Počítání buněk stanovením optické denzity	68
3.5.6	Transformace kvasinek LiAc metodou	68
3.5.6.1	Příprava kompetentních buněk	68
3.5.6.2	Vlastní transformace	69
3.5.6.3	Alternativní protokol transformace kvasinek	69
3.5.7	Příprava kompetentních buněk <i>E.coli</i>	70

3.5.8 Elektroporace	70
3.5.9 Izolace plasmidové DNA z bakterií (midipreparace)	71
3.5.10 Přečištění plasmidové DNA fenol-chloroformovou extrakcí a srážením ethanolem	71
3.5.11 Izolace chromozomální DNA kvasinek pomocí zymolyázy	72
3.5.12 Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu	72
3.5.13 PCR	72
3.5.14 Nativní PAGE	74
3.5.15 Nanášení vzorků pro detekci SOD a CTT	75
3.5.16 Rozbíjení buněk	76
3.5.17 Stanovení bílkovin metodou podle Bradfordové	76
3.5.18 Stanovení superoxididizmutázy (SOD)	77
3.5.19 Stanovení cytozolické katalázy (CTT)	77
3.5.20 Mikroskopie fúzních proteinů s GFP a RFP	78
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>79</b>
4.1 Fluorescenční značení Ato-proteinů	79
4.1.1 Plasmidy pro fluorescenční značení Ato proteinů	79
4.1.2 Příprava integračních kaset pomocí PCR (podmínky a primery)	80
4.1.3 Výběr transformant a sledování produkce a lokalizace Ato-GFP nebo Ato-RFP proteinů	82
4.2 Fluorescenční značení Ato proteinů rodičovského kmene <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742	84
4.2.1 Transformace kmene BY4742	84
4.2.2 Průběh vývoje kolonií transformant kmene BY4742	85
4.2.3 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonie BY4742	87
4.2.4 Produkce Ato1p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742	91
4.2.5 Produkce Ato2p-GFP v průběhu vývoje kolonií BY4742	93
4.2.6 Produkce Ato2p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742	95
4.2.7 Produkce Ato3p-GFP v průběhu vývoje kolonií BY4742	96
4.2.8 Produkce Ato3p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742	98
4.3 Fluorescenční značení Ato proteinů kmene <i>S. cerevisiae</i> s defektem v transkripčním faktoru Sok2p	100
4.3.1 Transkripční faktor Sok2p (YMR016C)	100
4.3.2 Transformace kmene <i>sok2</i>	100

4.3.3	Ověření <i>sok2</i> mutace u připravených konstruktů <i>sok2</i> -Ato-GFP	101
4.3.4	Průběh vývoje kolonií <i>sok2</i> -Ato-GFP kmenů	102
4.3.5	Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií <i>sok2</i>	104
4.3.6	Produkce Ato2p-GFP v průběhu vývoje kolonií <i>sok2</i>	107
4.3.7	Produkce Ato3p-GFP v průběhu vývoje kolonií <i>sok2</i>	108
4.4	Fluorescenční značení Ato proteinů kmene <i>S. cerevisiae</i> s defektem v cytosolické superoxid dismutáze Sod1p	109
4.4.1	Superoxid dismutáza Sod1p (YJR104C)	109
4.4.2	Transformace kmene <i>sod1</i>	110
4.4.3	Ověření <i>SOD1</i> mutace u transformovaného kmene <i>sod1</i> -Ato1p-GFP	111
4.4.4	Průběh vývoje kolonií <i>sod1</i> -Ato1p-GFP kmene	111
4.4.5	Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií <i>sod1</i>	112
4.5	Fluorescenční značení Ato proteinů kmene <i>S. cerevisiae</i> s defektem v mitochondriální superoxid dismutáze Sod2p	115
4.5.1	Mitochondriální superoxid dismutáza Sod2p	115
4.5.2	Transformace <i>sod2</i> kmene	115
4.6	Fluorescenční značení Ato proteinů kmene <i>S. cerevisiae</i> s defektem v cytosolické kataláze Ctt1p	117
4.6.1	Kataláza Ctt1p (YGR088W)	117
4.6.2	Transformace kmene <i>ctt1</i>	118
4.6.3	Ověření <i>CTT1</i> mutace u transformovaného kmene <i>ctt1</i> -Ato1p-GFP	118
4.6.4	Průběh vývoje kolonií <i>sod2</i> -Ato1p-GFP kmene	119
4.6.5	Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií <i>ctt1</i>	120
4.7	Fluorescenční značení Ato proteinů kmenů <i>S. cerevisiae</i> s modifikovanou produkcí PDR transporterů	124
4.7.1	PDR transportéry	124
4.7.2	Transformace kmene EMO1/3 a US50-18c	125
4.7.3	Průběh vývoje kolonií kmenů EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP	125
4.7.4	Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií kmene EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP	126
4.8	Fluorescenční značení Ato proteinů divokých kmenů <i>S. cerevisiae</i>	131
4.8.1	Divoký kmen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-F-Ato1p-GFP	131
4.8.2	Selekční koncentrace kanamycinu pro kmeny BR-F a BR-S	131
4.8.3	Transformace kmene <i>S.cerevisiae</i> BR-F	132

4.8.4	Produkce Ato1p-GFP u kmene BR-F-Ato1p-GFP	133
4.8.5	Domestikovaný kmen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-S-Ato1p-GFP	133
4.8.6	Transformace kmene <i>S.cerevisiae</i> BR-S	134
4.8.7	Průběh vývoje kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP	134
4.8.8	Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP	135
4.9	Změny produkce fluorescenčně značených Ato-proteinů u odlišně se vyvíjejících obřích kolonií	138
4.9.1	Produkce Ato-GFP v průběhu vývoje alterovaných kolonií	139
5.	<b>DISKUSE</b>	143
5.1	Rozdíly produkce a lokalizace Ato-GFP a Ato-RFP v koloniích kmene BY4742	143
5.2	Ato proteiny u kolonií kmene s defektem v Sok2p transkripčním faktoru	145
5.3	Ato proteiny u kolonií kmene s defektem v enzimech antistresové obrany	147
5.4	Ato1p protein u kolonií kmene s modifikovanou produkcí PDR transporterů	148
5.5	Změny produkce Ato proteinů u odlišně se vyvíjejících obřích kolonií	150
5.6	Ato1p protein u kolonií divokých kmenů kvasinek	150
6.	<b>SOUHRN</b>	152
7.	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b>	154

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK – aminokyselina

Ala - alanin

Amt - protein transportující amonný kation (Ammonium Transporter)

Arg - arginin

Asn – asparagin

Asp – kyselina asparágová

ATP – adenosintrifosfát

AzC - azetidine-2-karboxylát

b - báze

BKP - bromkresolová modř

bp - pár bází (base pair)

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát

CFP - modrý fluorescenční protein (Cyan Fluorescent Protein)

GABA – gama aminobutyrová kyselina

GFP - zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)

Gln – kyselina glutamová

Glu - glutamin

Gly – glycin

His - histidin

Ile - isoleucin

kbp - tisíc párů bází (kilo base pair)

kDa – tisíc Daltonů

$K_M$  - Michaelisova konstanta

Lys - lysin

Mep - permeáza methylamonného kationtu (Methylammonium Permease)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid

PCD – programovaná buněčná smrt

PCR - polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PDR – pleiotropic drug resistance

Phe – fenylalanin

PKA – protein kináza A

Pro - prolin

RFP – červený fluorescenční protein (Red Fluorescent Protein)

Ser – serin

Trp - tryptofan

$V_{\max}$  – maximální rychlost reakce

YFP - žlutý fluorescenční protein (Yellow Fluorescent Protein)



## SEZNAM GENŮ UVEDENÝCH V TĚTO PRÁCI

Pozn.: Není-li uvedeno jinak, jedná se o gen *S.cerevisiae*

Gen	Protein	Funkce
AAT1	aspartát aminotransferáza	konverze oxalacetátu na aspartát
AIF1	indukční faktor	pozitivní regulace apoptózy
AMT1	permeáza ( <i>Synechococcus</i> sp., <i>Arabidopsis thaliana</i> )	příjem NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
ATO1-3	možné permeázy amoniaku/amonného kationtu z buňky	neznámá
ATX1	Cu chaperon	transport mědi
ATX2	membránový protein	homeostáze Mn
BSD2	cytoplasmatický protein	transport těžkých kovů
CAT8	transkripční faktor	glukoneogenese
FLO11	adhezin	nevyhnutný pro pseudohyální růst
GAP1	aminoacid permeáza	transport AK
GCN4	transkripční faktor	transkripční aktivátor genů biosyntézy AK
GCV1	T podjednotka glycin dekarboxylázového komplexu	katabolizmus glycinu
GLN3	transkripční faktor	aktivace exprese dusíkem regulovaných genů
HIS3	imidazoleglycerol-phosphát dehydratáza	katalyzuje 6. krok syntézy histidinu
ISU1	scaffold protein	scaffold mitochondriální matrix
LEU2	Beta-isopropylmalát dehydrogenáza	katalyzuje 3. krok syntézy leucinu
LYS2	α – aminoacidipát reductáza	katalyzuje 5. krok syntézy lyzinu
MBP1	transkripční faktor	regulace buněčného cyklu, přechod z G1 do S fáze
MCA1	cystein proteáza	regulace apoptózy
MEP1-3	transportéry amoniaku/amonného	transport amoniaku/amonného

	kationtu	kationtu do buňky
<b>NIL1</b>	transkripční faktor	aktivace Ntr genů
<b>PDR1</b>	transkripční faktor	regulace PDR
<b>PHD1</b>	transkripční faktor	reguluje expresi FLO11
<b>PMA1</b>	H <sup>+</sup> -ATPáza	regulace pH a potenciálu plasmatické membrány
<b>PMA2</b>	H <sup>+</sup> -ATPáza	regulace pH a potenciálu plasmatické membrány
<b>PMR1</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPáza	transport Ca <sup>2+</sup> a Mn <sup>2+</sup> do Golgi
<b>PTR3</b>	komponenta SPS systému sensorů extracelulárních aminokyselin	nutriční signalizace
<b>PUT4</b>	prolinová permeáza	transport prolinu a AzC
<b>RAS2</b>	malá signalační GTPasa	regulace cAMP/PKA dráhy
<b>RTG1,3</b>	transkripční faktory	regulace exprese genů
<b>RTG2</b>	regulační protein	signalizace
<b>SAC1</b>	phosphoinositide fosfatáza	transport proteinů a sekrece
<b>SRY1</b>	3-hydroxyaspartát dehydratáza,	katabolismus hydroxyaspartátu
<b>SSQ1</b>	mitochondriální chaperon	skládání Fe/S proteinů
<b>SSY1</b>	komponenta SPS systému sensorů extracelulárních aminokyselin	nutriční signalizace
<b>SSY5</b>	komponenta SPS systému sensorů extracelulárních aminokyselin	nutriční signalizace
<b>SWI4</b>	transkripční faktor	reguluje G1 specifickou transkripci
<b>TKL1</b>	transketoláza	syntéza aromatických AK
<b>UGA4</b>	transportér GABA	transport GABA
<b>URA3</b>	orotidine-5'-phosphát dekarboxyláza	katalyzuje 6. krok biosyntézy pyrimidinů
<b>XBP1</b>	transkripční represor	regulace cyklínových genů

# 1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá tématy spadajícími do projektu řešeného Laboratoří biologie kvasinkových kolonií na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty University Karlovy, který se věnuje amoniakové signalizaci mezi kvasinkovými koloniemi a vývoji morfologie kvasinkových kolonií. Tento projekt je řešen ve spolupráci s Laboratoří buněčné biologie MBÚ AVČR v rámci společného pracoviště a společných grantů. Moje diplomová práce byla podporována granty GAČR 204/05/0294 a 525/05/0297 a Centrem základního výzkumu LC06063.

Kvasinky jsou sice jednobuněčné mikroorganismy, na pevném podkladu jsou ale schopny vytvářet organizované struktury, kolonie. Kolonie jsou specifické pro daný druh a kmen a v jistých ohledech mohou připomínat mnohobuněčné organismy.

Při sledování vývoje kvasinkových kolonií v čase bylo zjištěno, že kolonie periodicky mění pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. (PALKOVÁ et al. 1997) Pro acidickou fázi je typický růst kolonií, zatímco v alkalické fázi je růst přechodně inhibován. Přepnutí z acidické do alkalické fáze je spojeno s produkcí amoniaku, který funguje jako signál mezi sousedními koloniemi a který ovlivňuje periodicitu přepínání. Jedním z důsledků amoniakové signalizace je inhibice růstu kolonie na straně přivrácené ke koloniím sousedním a její expanze do volného prostoru. Celkový počet přepnutí závisí na množství živin a prostoru, který je k dispozici. (PALKOVÁ et al. 1997) Přepínání vývojových fází a produkce amoniaku jsou známy nejen u *Saccharomyces cerevisiae*, ale i u dalších druhů kvasinek, jako jsou například *Candida mogii* nebo *Rhodotorula glutinis*. (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000)

Experimentální data získaná v naší laboratoři nasvědčují, že za produkci amoniaku do okolí by mohly být zodpovědné tři homologní proteiny kódované geny *ADY2* (*YNR010c*, *ATO1*), *FUN34* (*YNR002c*, *ATO2*) a *ATO3* (*YDR384c*). Lokalizaci těchto proteinů za využití stabilní genomové fúze s GFP proteinem v laboratorních kmenech BY4742 sledovala již Mgr. Markéta Řičicová a Mgr. Dita Strachotová. Abychom o těchto proteinech získali detailnější informace, bylo mým úkolem vytvořit mutantní a divoké kmeny *S.cerevisiae*, jež by měly Ato proteiny značené fluorescenčními proteiny (FP) a sledovat produkci Ato-FP proteinů v průběhu vývoje kolonií těchto kmenů. Položili jsme si přitom otázku, jaká je produkce Ato proteinů v kmenech, které vykazují změny ve vývoji a signalizaci kolonií a na základě toho jsme vybrali příslušné mutantní kmeny. Z dřívějších experimentů víme, že za určitých podmínek dochází k posunu vývojových fází kolonií (změněm časování amoniakové

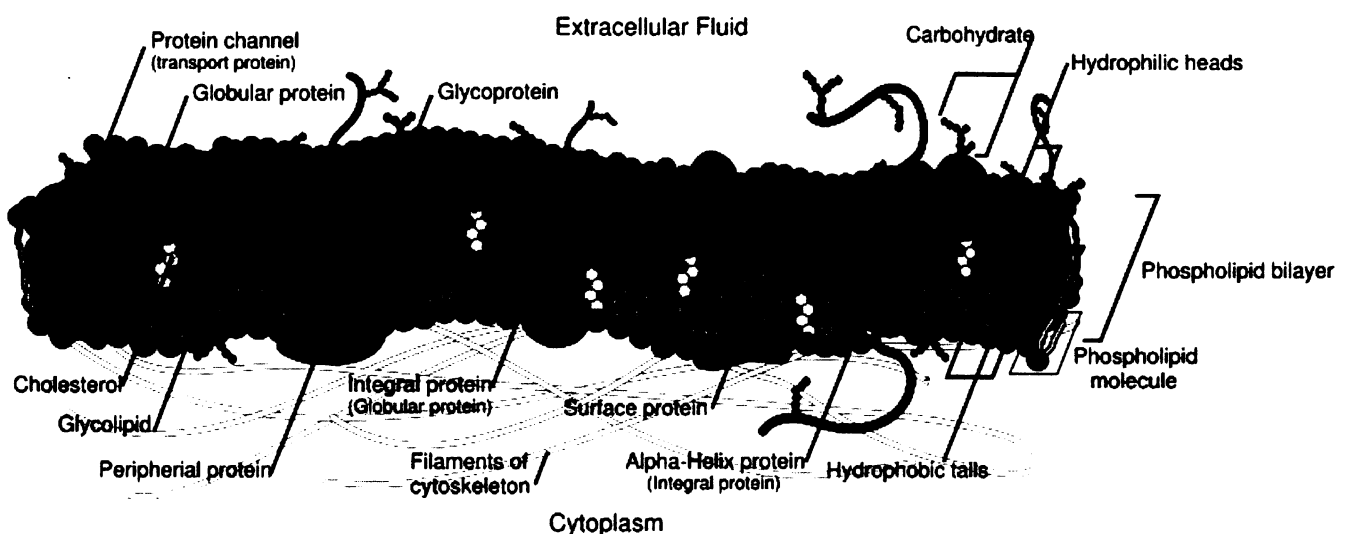
signalisace) a dalším mým úkolem bylo proto sledovat časový vývoj kolonií fluorescenčně značených kmenů za nestandardních podmínek. Třetím úkolem bylo připravit fluorescenčně značené kmeny a sledovat produkci Ato1p-FP proteinů u strukturovaných kolonií divokého kmene kvasinek BR-F a u kolonií jeho domestikované varianty BR-S. Všechny tyto experimenty by mohly přinést nové poznatky týkající se funkce Ato proteinů ve vztahu k amoniakové signalizaci.

Mým posledním úkolem bylo zpracovat literární údaje týkající se amoniakové signalizace u kolonií kvasinek, údaje o MEP/Amt rodině transportních proteinů, které transportují amonný kation/amoniak do buňky, a dále dostupné literární údaje o Ato transportérech, které by mohly transportovat amonné kationty z buňky ven a hrát tak důležitou roli při amoniakové signalizaci, již se v naší laboratoři zabýváme.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Plasmatická membrána

Buněčná membrána (nazývaná také plasmatická membrána nebo plazmalema) je ve všech živých buňkách polopropustná lipidová dvouvrstva. Obklopuje cytoplasmu buňky a separuje vnitrobuněčné komponenty od vnějšího prostředí. Reguluje kvalitu a kvantitu molekul vstupujících do buňky a molekul buňku opouštějících. V membráně se nachází množství proteinových receptorů, které přijímají signály z okolí a převádějí ho do formy, kterou může buňka zpracovat. Jiné proteiny na povrchu membrány slouží jako „značky“, které identifikují danou buňku pro jiné buňky. Interakce těchto značek a jejich příslušných receptorů tvoří základ buněčných interakcí v imunitním systému organismů. (viz Obr. 2.1)



Obr. 2.1: Buněčná membrána je lipidová dvouvrstva, která obsahuje množství proteinů s různou funkcí. Rovněž slouží pro upevnění buněčného cytoskeletu.

Zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Cell\\_membrane\\_detailed\\_diagram.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Cell_membrane_detailed_diagram.svg)

Buněčná membrána se skládá z tenké vrstvy amfipatických (majících hydrofobní i hydrofilní vlastnosti) lipidů, které se spontánně samouspořádají tak, že hydrofobní „ocásky“ jsou chráněny před polárním charakterem okolí tím, že hydrofilní „hlavičky“ jsou v kontaktu s cytosolem a extracelulárním prostorem. Tím se vytváří sférická dvouvrstva přibližně 7 nm

tlustá, která je stěží rozeznatelná elektronovým mikroskopem. Toto uspořádání membrány chrání buňku před spontánní difúzí hydrofobních látek a umožňuje jejich kontrolovaný transport pomocí transmembránových přenašečů.

S.J.Singer a Nicholson prezentovali model tzv. „tekuté mozaiky“ podle kterého může být biologická membrána považována za dvojdimenzionální tekutinu, v rámci které mohou všechny molekuly lipidů a proteinů více méně volně difundovat. (SINGER a NICHOLSON 1972) Plasmatická membrána však obsahuje mnoho rigidních struktur, jako jsou velké proteinové komplexy, lipidické rafty, synapse, desmozómy.

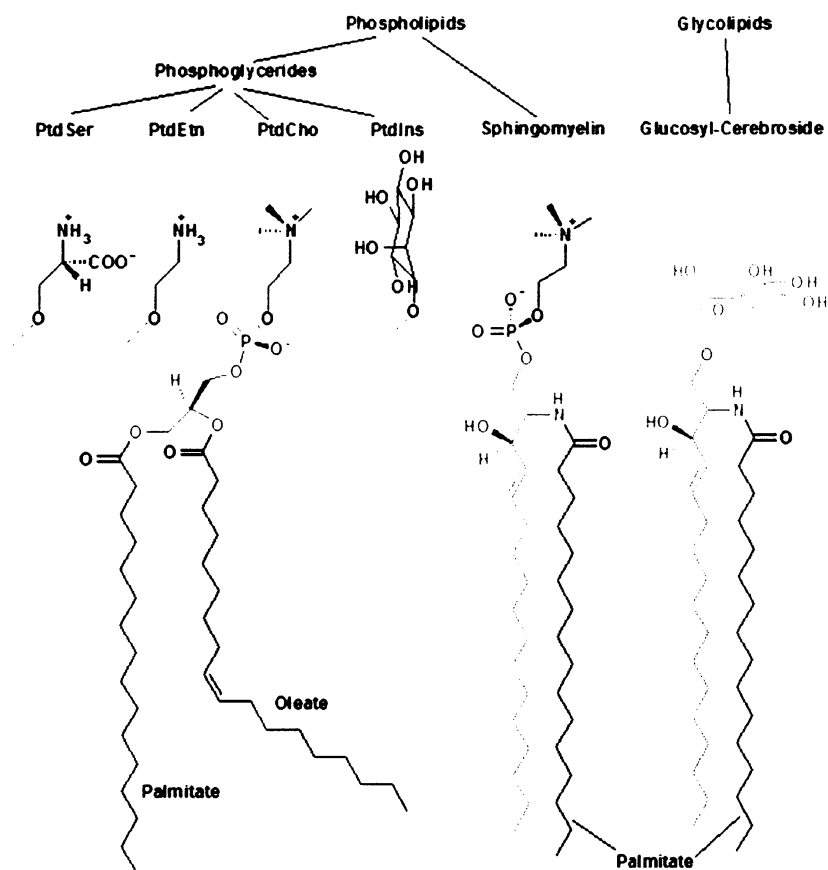
Funkcí plasmatické membrány je oddělit vnitřní prostředí od vnějšího, kontrolovat vstup a výstup molekul, upevňovat cytoskelet a udržovat tak tvar buňky, uchycovat extracelulární matrix a pomáhat buňkám formovat tkáň a pomocí receptorů přijímat signály z prostředí. Plasmatická membrána také obsahuje důležité enzymy buněčného metabolismu a participuje na imunitních reakcích.

### **2.1.1 Membránové lipidy**

Membrána je složena ze tří hlavních skupin amfipatických lipidů: fosfolipidy, glykolipidy a steroidy. Jejich relativní zastoupení závisí na buněčném typu, ale obecně lze říct, že fosfolipidy jsou nejrozšířenější. (LODISH et al. 2004)

Řetězce mastných kyselin ve fosfolipidech a glykolipidech obvykle obsahují lichý počet uhlíkových atomů, typicky 14-24, nejčastější jsou 16-18 lipidy s 16-18 uhlíky. Mastné kyseliny mohou být nasycené nebo nenasycené, s konfigurací dvojných vazeb *cis*. Délka a počet dvojných vazeb mastných kyselin má zásadní vliv na tekutost membrány. (GRAY et al. 2002).

Přehledné znázornění hlavních lipidů plasmatické membrány je na Obr.2.2



Obr.2.2: Hlavní membránové lipidy

Zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Membrane\\_lipids.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Membrane_lipids.png)

### 2.1.2 Membránové proteiny

Množství proteinů v buněčné membráně se liší v závislosti na buněčném typu, typické množství je kolem 50%. (GRAY et al. 2002)

O důležitosti těchto proteinů svědčí i fakt, že membránové proteiny kóduje přibližně třetina genů *S.cerevisiae*. V mnohobuněčných organizmech je toto číslo ještě vyšší. (viz. Tab 2.1) (LODISH et al. 2004)

Typ	Popis	Příklady
Integrální (transmembránové) proteiny	Přecházejí membránou, mají hydrofilní cytosolickou doménu, která interaguje s	Iontové kanály, protonové pumpy, receptory asociované s G-proteiny

	<p>molekulami uvnitř buňky, hydrofobní doménu, která prochází membránou a hydrofilní doménu vně buňky. Hydrofobní doména se skládá z jednoho nebo více <math>\alpha</math>-helixů nebo <math>\beta</math>-listů.</p>	
Lipidem ukotvené proteiny	<p>Proteiny jsou v plasmatické membráně ukotveny pomocí kovalentně vázané hydrofobní lipidové kotvy. Protein sám není v kontaktu s membránou.</p>	G proteiny
Periferní proteiny	<p>Jsou připevněny k integrálním membránovým proteinům nebo jsou asociovány s periferní oblasti lipidové dvouvrstvy. S biologickou membránou mají tyto proteiny jenom přechodné interakce. Po přijetí signálu disociují molekuly do cytoplasmatického prostoru.</p>	Některé enzymy a hormony

Tab. 2.1: Skupiny membránových proteinů (LODISH et al. 2004)



## 2.2 Transport přes plazmatickou membránu

Všechny buňky mají obrovské množství systémů k detekci podnětů prostředí a pro adekvátní odpověď. Nespočet receptorů a signálních drah reguluje metabolismus, růst a vývoj.

Transport přes plazmatickou membránu je prvním krokem v metabolismu každé živiny a proto mají transportní systémy důležitou roli v rozpoznání a importu substrátů. Všechny eukaryotické buňky mají v plazmatické membráně specifické, vysokoafinitní permeázy pro mnoho různých substrátů. ( VAN NULAND et al. 2006)

Obecně může být transport pasivní (bez buněčné energie) nebo aktivní (vyžaduje energii buňky). Mezi pasivní transport patří difúze a usnadněná difúze, mezi aktivní transport počítáme primární a sekundární aktivní transport.

### 2.2.1 Difúze

Difúze je poháněná náhodným pohybem molekul v roztoku, výsledkem je čistý pohyb molekul z míst s vyšší koncentrací na místa s nižší koncentrací dané látky. Různé molekuly mezi sebou neinterferují (není mezi nimi kompetice). Rychlost pohybu je přímo úměrná rozdílu koncentrací a permeabilitě membrány. Molekuly mohou projít membránou pokud mají schopnost disociovat v hydrofobním prostředí mastných kyselin. Difúze vody podél koncentračního gradientu se nazývá osmóza.

### 2.2.2 Usnadněná difúze

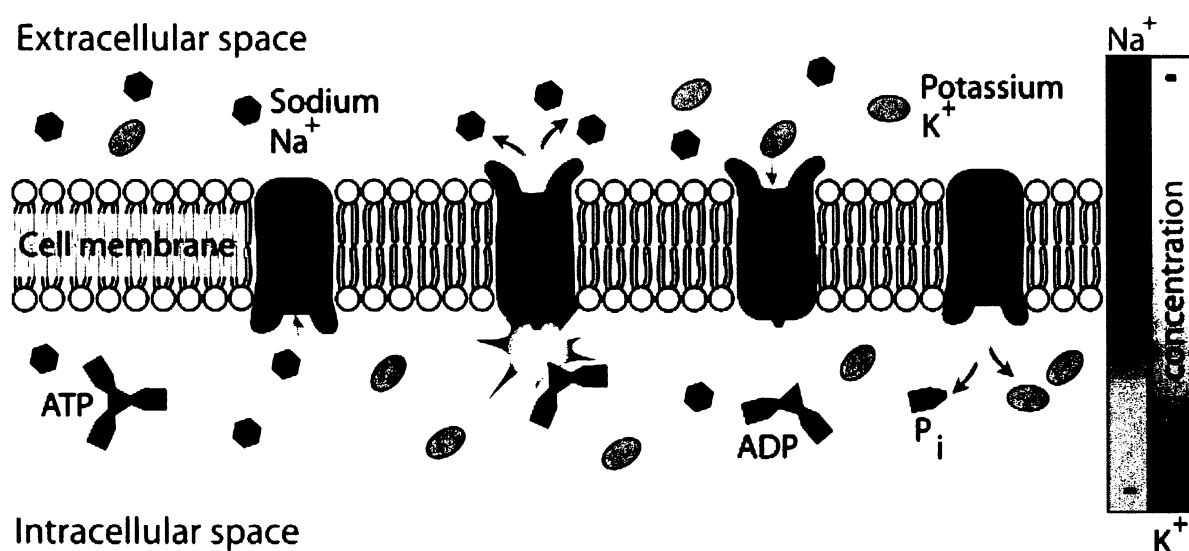
Molekuly, které nemohou difundovat přes lipidickou složku membrány, mohou procházet přes proteinové přenašeče nebo póry. Pohyb je stejně jako u difúze pasivní, od míst s nižší koncentrací k místům s koncentrací vyšší. Je saturován při vysoké koncentraci substrátu kvůli nedostatku dostupného proteinu v membráně. Maximální rychlost plně saturovaného transportu se označuje  $T_m$ , „transport maximum“. Příbuzné molekuly mohou soutěžit o stejný přenašeč nebo pór.

### 2.2.3 Aktivní transport

Aktivní transport je zprostředkovaný transport molekul přes membránu. Na rozdíl od pasivního transportu vyžaduje energii buňky pro pohyb molekul proti koncentračnímu spádu (elektrickému a/nebo chemickému gradientu). Transport malých molekul je obvykle zprostředkován transportními proteiny, které se nacházejí v membráně. Větší molekuly, jako je například škrob jsou aktivně transportovány procesem známým jako endocytóza, případně exocytóza.

#### 2.2.3.1 Primární aktivní transport

Primární aktivní transport je spojen s činností proteinů, které nazýváme proteinové pumpy, které umožňují pohyb iontů nebo malých molekul proti jejich koncentračnímu spádu. Pro svoji činnost vyžadují buněčnou energii, obvykle ATP. Transport je při vysokých koncentracích satureován z důvodu nedostatku volného proteinu. Příkladem je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza, přítomná téměř ve všech buňkách. Za cenu 1 molekuly ATP pumpuje 3  $\text{Na}^+$  ven z buňky výměnou za 2  $\text{K}^+$ . (viz Obr. 2.3) Do této skupiny patří i  $\text{Ca}^+$ -ATPázy a  $\text{H}^+$ -ATPázy a další.

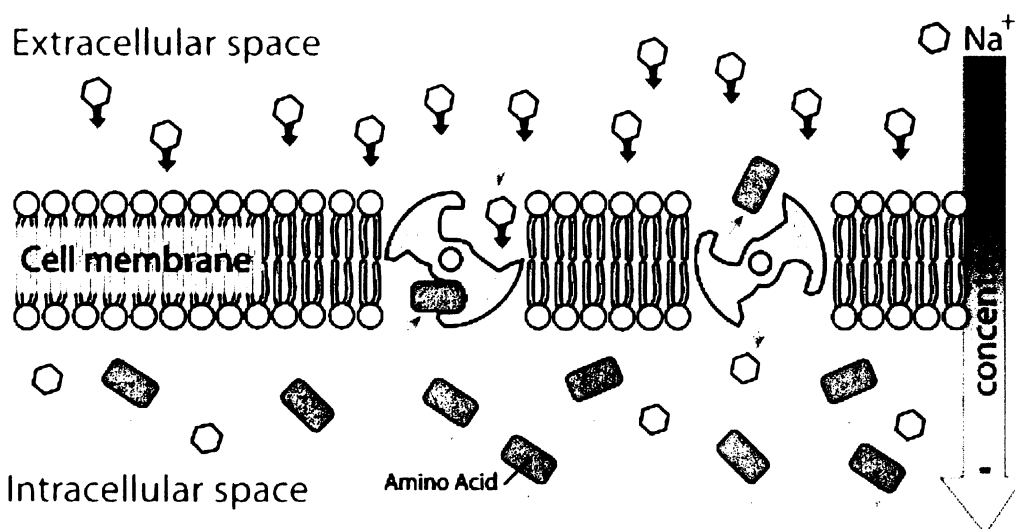


Obr. 2.3: Příklad aktivního primárního transportu, kde energie z hydrolyzy ATP je přímo spřažena s pohybem iontů přes plazmatickou membránu.

Zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Sodium-Potassium\\_pump.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Sodium-Potassium_pump.svg)

### 2.2.3.2 Sekundární aktivní transport

Sekundární aktivní transport využívá proteiny podobné proteinům pro usnadněnou difúzi. V každém cykle je spřažen pohyb několika různých typů molekul. Při vysokých koncentracích je z nedostatku volného proteinu transport saturován. Kotransportní systémy transportují přes membránu 2 nebo více molekul ve stejném směru. Některé transportéry naopak přenášejí substráty v opačném směru. Vytvořený gradient jedné látky slouží pro transport jiné látky. Příkladem je  $\text{Na}^+$ -glukózový kotransportér:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou je vytvořen gradient  $\text{Na}^+$ , který pak pohání transport glukózy. (viz Obr. 2.4)



Obr. 2.4: V sekundárním aktivním transportu, energie je poskytována ve formě koncentračního gradientu. Obvykle byl koncentrační gradient vytvořen primárním aktivním transportem. Sekundární aktivní transport pak pohání difúze.

Zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Sodium-Potassium\\_pump.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Sodium-Potassium_pump.svg)

## 2.3 Transportéry u kvasinek

Genetické studie a sekvenace genomu ukazují, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* má velké množství transmembránových transportních proteinů. (viz Tab. 2.2) (ANDRÉ 1995) Tyto transportní systémy jsou značně odlišné a často jsou vzájemně zastupitelné, t.j. stejný substrát může být transportován několika různými systémy s rozličnou kinetikou, specifitami

a regulací. Jako příklad je možné uvést permeázy transport  $\gamma$ -aminobutyátu (GABA), aminokyseliny, která může sloužit jako jediný zdroj dusíku. GABA příjem do buňky je zabezpečován aminokyselinovou permeázou Gap1p, prolinovou permeázou Put4p a GABA-specifickou permeázou Uga4p. (ANDRÉ et al. 1993, GRENSON et al. 1987) Dalším příkladem je HXT rodina transportérů hexózy, kdo které patří ne méně než 17 proteinů (BISSON et al. 1993). Tyto vícenásobné transportní systémy s rozličnými kinetikami a odlišnou regulací umožňují buňce adaptovat se za mnoha rozličných růstových podmínek (GRENSON 1992).

Jméno genu	ORF jméno	Stručný popis
PMC1	YGL006W	Vakuolární ATPáza P-typu, transportuje $\text{Ca}^{2+}$ do vakuol
PMR1	YGL167C	ATPáza P-typu transportující $\text{Ca}^{2+}$ v Golgiho aparátu
ENA1	YDR040C	ATPáza P-typu v plazmatický membráně, export $\text{Na}^+$ a $\text{Li}^+$
ENA2	YDR039C	ATPáza P-typu v plazmatický membráně, export $\text{Na}^+$ a $\text{Li}^+$
ENA5	YDR038C	ATPáza P-typu v plazmatický membráně, export $\text{Na}^+$ a $\text{Li}^+$
PMA1	YGL008C	ATPáza P-typu v plazmatický membráně, transport $\text{H}^+$
PMA2	YPL036W	ATPáza P-typu v plazmatický membráně, transport $\text{H}^+$ , velmi slabá exprese
CCC2	YDR270W	ATPáza P-typu, export $\text{Cu}^{2+}$ z cytozolu do vnitrobuněčných sekretorických kompartmentů
PCA1	YDR295W	ATPáza P-typu, podobná Ccc2p, export Cd
DRS2	YAL026C	ATPáza P-typu, aminofosfolipid translokáza (flipáza)
TRK1	YJL129C	Transportér $\text{K}^+$
TRK2	YKR050W	Transportér $\text{K}^+$
MEP1	YGR121C	$\text{NH}_4^+$ permeáza
MEP2	YNL142W	$\text{NH}_4^+$ permeáza
MEP3	YPR138C	$\text{NH}_4^+$ permeáza

SUL1	YBR294W	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> permeáza
SUL2	YLR092W	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> permeáza
VCX1	YDL128W	Vakuolární Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
ALR1	YOL130W	Transportér Mg <sup>2+</sup> a jiných dvoumocných iontů
ALR2	YFL050C	Transportér Mg <sup>2+</sup> a jiných dvoumocných iontů
PHO84	YML123C	Permeáza anorganického fosfátu
PHO89	YBR296C	Kotransportér Na <sup>+</sup> /PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
NHA1	YLR138W	N <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter plazmatické membrány
NHX1	YDR456W	N <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter v prevakuolárních kompartmentech, role v toleranci k solím

Tab. 2.2: Příklady známých kvasinkových ATPáz a transportérů iontů

Zdroj: [http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol)

### 2.3.1 MDR transportéry

Brzy po objevu prvních antibiotik a kancerostatik se zjistilo, že buňky přijímající léky jsou schopny exportovat lék zpět do vnějšího prostředí prostřednictvím transportních systémů, které jsou tak zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci (transportéry MDR, „multidrug resistance“). Proteiny odpovědné za tuto funkci lze rozdělit do čtyř skupin:

1. ABC transportéry (podle „ATP binding cassette“, viz dále) obsahují 12  $\alpha$  –helixů a vazebné místo pro ATP, který je během exportu hydrolyzován (viz Tab. 2.3)
2. RND transportéry (podle „resistance nodulation division“) jsou trimery obsahující 36  $\alpha$  –helixů a využívají energii protonového gradientu
3. SMR transportéry (podle „small multidrug resistance“) jsou antiparalelní diméry s 8  $\alpha$  –helixy a využívají také energii protonového gradientu
4. MFS transportéry (podle major facilitator superfamily) jsou monomery s 12  $\alpha$  –helixy, též poháněné protonovým gradientem

Přestože jsou některé tyto přenašeče detailně zkoumány, nepodařilo se dosud zjistit, proč se určitá látka transportuje tím či oním přenašečem, když strukturně podobná látka vyžaduje

přenašeč odlišný. Nejnovější výzkumy ukazují, že v přenašečích existuje flexibilní kapsa, která se tvaru cizorodé látky přizpůsobuje. (podle /www.gate2biotech.cz)

V roce 1987 byl identifikován gen odpovědný za fenotyp nazývaný „pleiotropic drug resistance“. Byl pojmenován *PDR1* a kóduje protein patřící do rodiny  $Zn_2Cys_6$  transkripčních faktorů. V následujících letech byla identifikována řada genů kódujících proteiny patřících do rodiny ABC transportérů (DECOTTIGNIES a GOFFEAU 1997), které pumpují ven z buňky široké spektrum amfipatických cizorodých látek. Jejich exprese je pod kontrolou *Pdr1p*, případně pod kontrolou dalšího podobného transkripčního faktoru *Pdr3p*.

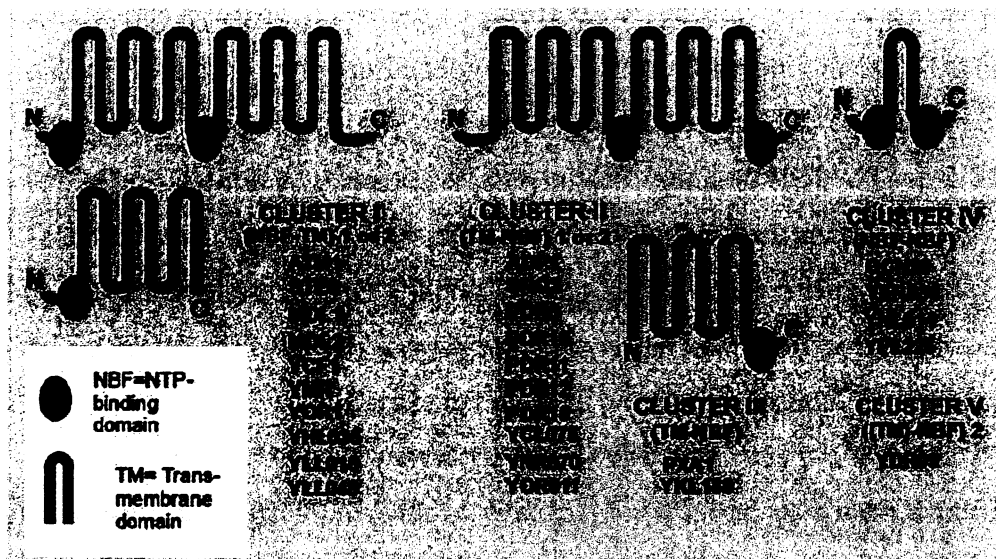
Tým Goffeaua identifikoval 26 kvasinkových ABC transportérů (viz Obr. 2.5), které jsou obecně homologní k ABC transportérům v bakteriích i v jiných eukaryotických buňkách. Homology můžeme najít i u člověka a jejich dysfunkce vede k vážným nemocím, např. cystická fibróza, adrenoleukodystrofie, Zellwegerův syndrom.

ABC transportéry jsou charakteristické tím, že obsahují transmembránové domény a jejich aktivita je závislá na ATP hydrolyze, kterou zabezpečuje „ATP-binding cassette“ doména.

Jméno genu	ORF jméno	Krátký popis
YOR1	YGR281W	Role v toleranci k toxickým organickým anionům
YCF1	YDR135C	Vakuolární, odpovědný za vakuolární uchovávání glutathion-S-konjugátů
BAT1	YLL048C	Vakuolární, transportuje žlučové kyseliny
STE6	YKL209C	Transportuje „a“ faktor mating feromonů
ATM1	YMR301C	Vnitřní mitochondriální membrána, role v maturaci cytozolických proteinů obsahujících Fe/S klustry
PXA1	YPL147C	Import mastných kyselin s dlouhými řetězci do peroxizomů
PXA2	YKL188C	Import mastných kyselin s dlouhými řetězci do peroxizomů
PDR5	YOR153W	Role v multidrug rezistenci
SNQ2	YDR011W	Role v multidrug rezistenci
PDR12	YPL058C	Plazmatická membrána, odstraňuje slabé organické kyseliny
ADP1	YCR011C	Funkce neznámá
YOL075C	YOL075C	Funkce neznámá

Tab. 2.3: Příklady kvasinkových ABC transportérů

Zdroj: (DECOTTIGNIES a GOFFEAU 1997)



Obr.2.5: Typy ABC transportérů v kvasinkách

Zdroj: (DECOTTIGNIES a GOFFEAU 1997)

### 2.3.2 Transportéry amonných iontů (AMTs)

Transport amonných iontů/amoniaku přes buněčné membrány je proces vyskytující se u naprosté většiny (ne-li u všech) organismů. (KLEINER 1981) Mnoho bakterií a hub je schopných odebrat amonné ionty ze svého prostředí jako zdroj dusíku. (KLEINER 1985) Amonné ionty mají v metabolismu kvasinek klíčovou roli a mohou sloužit jako jediný zdroj dusíku. Spolu s glutaminem a asparaginem patří amonné ionty do skupiny tzv. „dobrých“ zdrojů dusíku, t.j. zdrojů schopných zabezpečit optimální růst. (COOPER 1982) Když *Saccharomyces cerevisiae* hladoví na dusík při růstu na glukózovém médiu, vstoupí do G0 fáze a deaktivují se komponenty dráhy protein kinázy A (PKA). Přidání dusíku v přítomnosti glukózy způsobí rychlou re-aktivaci této dráhy a aktivaci trehalázy. (VAN NULAND et al. 2006) U rostlin je dusík absorbován z půdy ve formě nitrátů nebo amonných iontů, přičemž příjem amonných iontů je preferován, hlavně v případě dusíkového hladovění. (MARINI et al. 2000)

Bakterie schopné fixovat plyný dusík žijící v symbióze s některými rostlinami čeledi *Fabaceae* poskytují rostlině dusík ve formě amonných iontů (BERGENSEN a TURNER 1967) U živočichů je transport amonných iontů odpovědný za aktivní příjem těchto iontů

v renálních tubulech epiteliálních buněk. (GARVIN et al. 1988) Vysokoaktivní transportéry  $\text{NH}_4^+$  obsahují i játra, orgán kde se  $\text{NH}_4^+$  vychytává z krve. (KNEPPER 1989)

Příjem amonných iontů je u většiny organismů katalyzován členy rodiny transportérů AMT/MEP/Rh, kam patří například proteiny erytrocytů skupiny rhesus (Rh) faktor jejichž fyziologická funkce není zatím jasná. AMT/MEP/Rh jsou membránové proteiny o velikosti cca 50 kDa s 11 nebo 12 transmembránovými doménami. (LUDEWIG et al. 2003)

Některé aminokyseliny jsou vysoce konzervovány u všech známých Mep/Amt proteinů, např. Gly v cytoplazmatickém C-konci, jehož záměna vede k totální inaktivaci transportu  $\text{NH}_4^+$  (MARINI et al 2000) V kvasinkách, oocytech a rostlinách jsou tyto transportéry schopné oligomerizovat, což může být důležité pro regulaci příjmu amonných iontů.

Genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje geny pro tři vysokoafinitní transportéry amonných iontů (Mep1p, Mep2p, Mep3p). Interakce mezi těmito homologními proteiny byla prokázána detailní analýzou různých kombinací *mep* mutantů. (VON WIRÉN et al. 2003)

### 2.3.2.1 Mep transportéry amonných iontů

U *S.cerevisiae* je příjem methylaminu/amonných iontů zprostředkovaný třemi homologními, funkčně odlišnými systémy Mep1p, Mep2p a Mep3p. Byly klasifikovány jako členové TC 2.A.49 Amt rodiny (<http://tcd.db.ucsd.edu/tcdb/background.php>)

Každý z těchto proteinů má centrální hydrofobické jádro – 10 až 12 transmembránových domén. Proteiny se liší v aminokyselinové sekvenci hlavně v oblasti hydrofilního C a N konce. Pro Mep1p a Mep3p byl předikován motiv leucinového zipu. Tento motiv se objevuje i u Mep2p, jenom leucin nebo isoleucin na čtvrtém AK zbytku je substituován methioninem. Není jasné jestli se tyto motivy podílejí na transportu, ale bylo prokázáno, že se podílejí na oligomerizaci proteinů. (BISSON et al. 1993)

Mep1p poskytuje nízkoafinitní, vysoko kapacitní přenos, Mep2p naopak vysokoafinitní a nízko kapacitní. Mep3p má nejnižší afinitu a nejvyšší kapacitu. Kmen nesoucí dvojitou mutaci *mep1 mep2* roste na médiu obsahujícím amonné ionty jako jediný zdroj dusíku velmi pomalu. Odstraňování amonných iontů z média je 25 až 30 krát nižší než u rodičovského nemutovaného kmene. Na médiu s vysokou koncentrací amonných iontů (20 mM) roste dvojitá *mep1mep2* mutanta ovšem téměř normálně. Růst jednoduchých mutant, *mep1* nebo *mep2*, je ovlivněn nepatrně. (MARINI et al.1994) Na médiu s vysokou koncentrací  $\text{NH}_4^+$  (>20 mM) není pro růst kvasinkových buněk nezbytný ani jeden z Mep proteinů. (MARINI et



al. 1997a) Je zajímavé, že aktivita přenašečů u nemutovaného kmene není součtem aktivit všech tří individuálních Mep proteinů. Buňky produkující jenom Mep1p (t.j. kmen *mep2 mep3*) vykazovaly rychlost odebrání  $\text{NH}_4^+$  z média podobnou nemutovanému kmenu. (MARINI et al. 1997a)

Všechny tři *MEP* geny jsou pod kontrolou represe dusíkatým katabolismem (NCR, „nitrogen catabolite repression“). *MEP2* má mnohem vyšší hladinu exprese než *MEP1* a *MEP3*. NCR je v *S. cerevisiae* zprostředkována přinejmenším dvěma obecnými faktory z GATA rodiny; Gln3p a Nil1p. (COFFMAN et al. 1996) GATA proteiny jsou u eukaryot konzervovány. Mají společnou DNA vazebnou doménu, která rozeznává 5' - GAT(A/T)A-3' sekvenci. „Upstream“ oblast kvasinkového genu odpovědná za NCR regulaci má typicky několik 5' - GAT(A/T)A-3' sekvencí, což je splněno i v případě všech tří *MEP* genů. Experimenty prokázaly, že pro expresi *MEP2* na prolinovém médiu je potřebný alespoň jeden GATA faktor (Nil1p nebo Gln3p). Při růstu na glutamátu je nezbytný Gln3p. Zajímavé bylo zjištění, že růst na médiu s vysokým obsahem  $\text{NH}_4^+$  vyžaduje faktory oba. Za těchto podmínek tyto pozitivní regulátory nejsou schopny kompenzovat absenci druhého regulátoru, jako k tomu dochází na prolinovém médiu. (MARINI et al. 1997a)

Mechanismus regulace exprese *MEP1* a *MEP3* je odlišný. Nezávisle na druhu růstového média (prolin, glutamát,  $\text{NH}_4^+$ ) exprese vyžaduje nezbytně Gln3p. Navíc delece *NIL1* vede k zvýšení exprese *MEP1* a *MEP3* až 7krát při růstu na prolinovém nebo glutamátovém médiu (efekt nebyl pozorován při růstu na glutaminu nebo při vysokých koncentracích  $\text{NH}_4^+$ ). Nil1p má proto roli přímého nebo nepřímého negativního transkripčního faktoru. (MARINI et al. 1997a)

Když buňky hladovějí na dusík 24 hodin na médiu obsahujícím glukózu, po přidání 10 mM  $\text{NH}_4^+$  se aktivuje enzym trehaláza. K aktivaci dochází během několika minut. V mutantních kmenech *mep1mep2mep3* k aktivaci trehalázy nedochází. V kmenech produkujících jenom Mep2p je aktivace trehalázy podobná její aktivaci u nemutovaného kmene, přítomnost Mep1p umožňuje o něco nižší aktivaci a přítomnost Mep3p neumožňuje aktivaci trehalázy o moc víc než trojitá mutanta. (VAN NULAND et al. 2006) Methylamin, nemetabolizovatelný analog amonných iontů, také způsobuje aktivaci trehalázy, v případě, že je transportován prostřednictvím Mep2p, k aktivaci nedochází při transportu jeho nenabitě formy difuzí.

Experimenty naznačují, že signalizace a transport můžou být odděleny. (VAN NULAND et al. 2006)

Byly prokázány i přímé interakce mezi Mep proteiny. Tyto interakce se můžou odehrávat na plasmatické membráně v komplexech proteinů, jako je tomu v případě proteinů Rh skupiny, které asociují do multimerních komplexů přítomných na membráně erytrocytů. (MOORE a GREEN 1987).

Mep proteiny jsou homologní s proteiny neznámé funkce v *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (WRAY et al. 1994), *Corynebacterium glutamicum* (O`REGAN et al. 1989), *Mycobacterium smegmatis* (GenBank entry:Z17372), *Rhodobacter capsulatus* (JONES a HASELKORN 1989), *Synechocystis* sp. (KANEKO et al. 1996), v archebakterii *Metanococcus jannaschii* (BULT et al. 1996) a v *Caenorhabditis elegans* (GenBank entry:M89248). Rovněž rostlinný transportér AMT1 (*Arabidopsis thaliana* a *Lycopersicon esculentum*) je homologní k Mep. (LAUTER et al. 1996, NINNEMANN et al. 1994)

### 2.3.2.1.1 Mep1p

Mep1p protein se skládá z 492 aminokyselin s molekulární hmotností 54.2 kDa. Codon bias index pro *MEP1* gen byl vypočítán na 0,08. (BENNETZEN a HALL 1982) CBI (codon bias index) je číselná hodnota (0-1), vyjadřující preferenční využívání kodonů jednotlivých genů. Čím je hodnota vyšší, tím je exprese daného genu vyšší. Hodnota 0,08 pro *MEP1* vypovídá o tom, že protein Mep1p se v porovnání s ostatními kvasinkovými transportéry vyskytuje v malém množství. Protein obsahuje 11 hydrofobních domén délky dostačující k tomu, aby mohli být považovány za transmembránové domény. (KYTE a DOOLITTLE 1982). Sekundární struktura Mep1p byla předikována PHD algoritmem (viz poznámka) (ROST a SANDER 1993). Výsledky naznačují že velká část těchto transmembránových domén má spíš konformaci  $\beta$ -listu než  $\alpha$ -helixu. C-konec je relativně dlouhý (cca 98 aminokyselin) a vysoce hydrofilní. Obsahuje 2 vazebné místa pro cAMP-dependentní kinázu. (MARINI et al. 1994)

Northern blot analýzy ukázaly, že se *MEP1* mRNA akumuluje ve velkých množstvích v buňkách vyrostlých na médiu chudém na dusík (prolin, močovina). Při růstu na asparaginu, glutaminu nebo při vysokých koncentracích amonných iontů (20 mM) byly hladiny *MEP1* mRNA nízké. Množství *MEP1* mRNA se zvedlo při snížení koncentrace amonných iontů v médiu na 0,5 mM.

Hlavní fyziologickou rolí Mep1p je zřejmě umožnit buňkám růst při nízké koncentraci dusíku inkorporací amonných iontů do buněk. (MARINI et al. 1994)

*Poznámka: PHD algoritmus slouží k predikci sekundární struktury proteinu, jako jsou například transmembránové domény. Pracuje na principu neuronových sítí. Pracuje s relativní hydrofobii/hydrofilii aminokyselin a předpovídá vodíkové vazby mezi jednotlivými aminokyselinami.*

### 2.3.2.1.2 Mep2p

Mep2p vykazuje nejvyšší afinitu k  $\text{NH}_4^+$  v porovnání s ostatními Mep proteiny.  $K_m$  pro Mep2p se udává 1-2  $\mu\text{M}$  (Mep1p  $K_m = 5-10 \mu\text{M}$  a Mep3p  $K_m = 1,4-2,1 \text{ mM}$ ).

Mep2p je N-glykosylován, podobně jako Rh50, s kterým vykazuje nejvyšší podobnost. (MARINI et al. 1997b) Mep1p ani Mep3p glykosylovány nejsou.

Na médiu s nízkou koncentrací dusíku je exprese Mep2p mnohem vyšší než exprese Mep1p a Mep3p. Jeho nízká  $V_{\text{max}}$  se ovšem zdá být limitujícím faktorem a proto buňky eprodukcující jenom Mep2p rostou pomaleji než buňky produkující Mep1p. (MARINI et al. 1997a)

#### 2.3.2.1.2.1 Mep2p a pseudohyfální růst kvasinek

Mnoho hub je schopno měnit výrazně růstové vlastnosti včetně morfologie buněk v závislosti na podmínkách. Například změna na filamentární růst může umožnit těmto nepohyblivým organizmům prorůst do více vyhovujícího prostředí. Jako odpověď na dusíkové hladovění, diploidní buňky *S. cerevisiae* diferencují na filamentární, pseudohyfální formu. (GIMENO et al. 1992) Tato změna je regulována Gpa2p,  $\alpha$  podjednotkou guanin-nukleotid vazebního proteinu (KUBLER et al. 1997), malým G proteinem Ras2p (GIMENO et al. 1992) a elementy MAP kinázové kaskády, odpovídající na hladiny feromonů. Pro pseudohyfální diferenciaci je rovněž důležitý transporter Mep2p, jehož defekt vede za určitých podmínek (hladovění na amonné ionty) k defektu v pseudohyfálním růstu. Zjistilo se, že pseudohyfální defekt *mep2* mutant může být potlačen overexpesí *GPA2* nebo *RAS2* a přidáním cAMP. Naopak, aktivace alel Map kinázové dráhy neměla u *mep2* mutanty žádný efekt. (LORENZ a HEITMAN 1998)

Důležitou roli v pseudohyfálním růstu má malá intracelulární smyčka Mep2p. Na regulaci této kvasinkové diferenciaci se pravděpodobně podílejí i proteiny Gln3p, Ure2p a Npr1p. Předpokládá se, že Mep2 funguje jako  $\text{NH}_4^+$  senzor a generuje signál pro regulaci filamentárního růstu v závislosti na dusíkovém hladovění.

### 2.3.2.1.3 Mep3p

MEP3 kóduje třetí, nízkoafinitní  $\text{NH}_4^+$  transportér. Jeho  $V_{\max}$  je ovšem větší než rychlost Mep1p a Mep2p (cca 70 nmol/min/mg proteinu). Byl objeven pomocí oligonukleotidové sondy v cDNA po zjištění faktu, že i dvojitá mutanta *mep1 mep2* roste na médiu s koncentrací  $\text{NH}_4^+$  1mM srovnatelně s nemutovaným kmenem. Mep3p je tvořen 489 aminokyselinami (Mw 53,7 kDa) a vykazuje velkou podobnost k sekvencím Mep1p (79% identity) a Mep2p (39% identity). (MARINI et al. 1997a) Mep3p podporuje optimální růst na médiích s dostatečnou koncentrací  $\text{NH}_4^+$ , je ale nejcitlivější k snižování koncentrace  $\text{NH}_4^+$  pod 1mM.

## 2.4 Mnohobuněčné struktury mikroorganismů

Tradiční definice mikroorganismů od Roberta Kocha pocházející ještě z devatenáctého století, charakterizuje bakterii jako jednoduchý jednobuněčný organizmus vykazující limitovanou schopnost odpovídat na změny podmínek prostředí. Tato definice, pořád ještě někdy akceptována (GERSHON a GERSHON 2000), nebere v potaz fakt, že mikroorganismy v přírodě skoro nikdy nenajdeme jako individua nebo rostoucí exponenciálně v suspenzích analogických kulturám používaným v laboratorních podmínkách. Mnoho našich znalostí jednobuněčných organismů pochází ze zkoumání kultur rostoucích v tekutém médiu. Za těchto podmínek rostou mikroorganismy exponenciálně, což je situace kterou v přírodě můžeme pozorovat velice zřídka.

Naopak, mikroorganismy v přírodě mají tendence shlukovat se do mnohobuněčných struktur (*Myxobacteria*, *Myxomycetes*) nebo růstem zformují vysoce organizované mnohobuněčné struktury (kolonie nebo biofilmy). (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2006) Toto přednostní formování mnohobuněčných struktur je dáno tím, že za přirozených podmínek má mikroorganismus větší šanci na přežití v „komunitách“ než jako individuální organizmus. Buňky uvnitř mnohobuněčné populace mají víc možností vzájemné komunikace a diferenciace ve specializované buněčné typy. Některé z nich se mohou obětovat, aby poskytly živiny pro zbytek populace. Příkladem takového „altruistického“ chování jsou *Myxobacterie*. (KAISER 1999) Další výhodou života v mnohobuněčné kolonii je možnost ochrany celé struktury extracelulární matrix, která je produkována buňkami kolonie. Toto dovoluje formaci mikroprostředí s „komůrkami“ mikrokolonií oddělených kanály umožňujícími proudění vody

a živin k individuálním buňkám. Tato struktura (vysoce rezistentní vůči antibiotikům) byla popsána v mikrobiálních biofilmech. (LEWIS 2001)

Na příkladě vývoje a chování kolonií kvasinek můžeme pozorovat schopnost mikroorganismů odpovídat na změny vnějšího prostředí, schopnost diferenciaci a adaptace. (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003)

Mnohobuněčné struktury, které mikroorganismy tvoří, jsou zajímavé podobností procesů, které můžeme pozorovat ve tkáních vyšších eukaryot. To může zahrnovat procesy morfogeneze a vývoje mnohobuněčných struktur, stejně jako změny vyvolány stresem, hladověním nebo stárnutím.

Kolonie kvasinek vykazují pravidelnou morfologii, která je charakteristická pro jednotlivé druhy kvasinek. Buňky v rámci kolonie se mohou lišit tvarem, typem pučení a adhezivitou a mohou mít i rozdílnou mRNA expresi. (ODDS 1997)

V kontrastu s dobře strukturovanými koloniemi tzv. „netradičních“ kvasinek (*Candida*, *Kluyveromyces*), kolonie laboratorních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (zdaleka nejstudovanější kvasinka) nevykazují na první pohled složitě strukturovanou morfologii. Strukturované kolonie tvoří jenom divoké kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, které produkují hodně extracelulární matrix. V laboratorních podmínkách se tzv. „fluffy“ morfologie přepíná na morfologii hladkou, nerozeznatelnou od morfologie laboratorních kmenů. Tuto „domestifikaci“ provázejí specifické změny exprese. (KUTHAN et al. 2003)

Růst solitérní kolonie laboratorní *Saccharomyces cerevisiae* má dvě fáze. První je fáze rychlého růstu (cca 24 dělení) podobná exponenciální fázi při růstu v tekutých kulturách. Pak následuje pomalejší fáze, buňky v centru kolonie vstoupí do stacionární fáze a růst pokračuje jenom na periférii. Elektronová mikroskopie prokázala, že v mladých koloniích se buňky dělí náhodně a jejich hustota je nízká. V pozdějších fázích hustota stoupá a růst je víc orientován. (VARON a CHODER 2000)

## 2.5 Biologické hodiny

Živé organismy často vykazují různé typy rytmických změn, vyznačujících se přesným načasováním a periodicitou, tzv. „biologické hodiny“. Biologické hodiny způsobují, že se daný jev objeví ve stanoveném čase. Obvykle jsou regulovány vnějšími faktory, např. světlem a teplotou v případě cirkadiánních rytmů a mohou kontrolovat třeba rychlost činnosti enzymů

nebo aktivitu genů. V organismu můžeme pozorovat oscilační nebo nesměrové procesy (oscilační nebo přesýpací hodiny). (RENSING et al. 2001)

Oscilační procesy zahrnují periodické změny opakující se v přesné periodě. Podle délky periody je dělíme na ultradiánní (perioda kratší než 1 den), cirkadiánní (perioda 1 den) a infradiánní (perioda delší než 1 den). Nesměrové procesy obvykle udávají trvání časových intervalů a hrají klíčovou roli ve vývoji a stárnutí organismů.

Pro buňky žijící ve tkáních, koloniích nebo jiných seskupeních je důležitá synchronizace biologických hodin, kterou dosahují používáním různých signálů. U bakteriálních kolonií byla pozorována existence ultrazvukových signálů. (MATSUHASHI et al. 1995) U kvasinek a mnohých jiných druhů živočichů byla popsána chemická signalizace. (PALKOVÁ et al. 1997)

### 2.5.1 NH<sub>3</sub> signalizace kolonií kvasinek

Kvasinkové kolonie produkují plynný amoniak, který působí jako signální molekula s dlouhým dosahem. Bylo zjištěno, že jednotlivé kolonie vykazují periodickou změnu pH substrátu z acidické na téměř alkalickou a naopak. V „acidické“ fázi kolonie roste, v „alkalické“ je růst pozastaven. Během alkalické fáze se uvolňuje amoniak, který má roli signální molekuly s velkým dosahem a ovlivňuje periodicitu a růst kolonií. (PALKOVÁ et al. 1997) Tento jev můžeme pozorovat u různých druhů kvasinek.

K prvnímu pulsu uvolnění amoniaku dochází krátce po inokulaci. Je nesměrovaný, neovlivňuje sousední kolonie a ihned je následován acidifikací média. Druhý, silnější puls je orientován směrem k sousedním koloniím. Tato signalizace způsobí inhibici růstu sousedních kolonií a jejich asymetrický růst do volného prostoru. Tento vzorec chování můžeme pozorovat u mnoha druhů kvasinek, např. *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* a jiných. Jednotlivé druhy se liší časováním pulsů, což je způsobeno rozdílnou růstovou rychlostí. (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003)

V závislosti na podmínkách prostředí (prostor, živiny) může po acidické fázi následovat třetí puls. (PALKOVÁ A FORSTOVÁ 2000)

Kolonie vystavené plynnému amoniaku odpovídají zvýšenou produkcí vlastního amoniaku bez ohledu na to, v jaké vývojové fázi se nacházejí. V sousedních koloniích se acidické/alkalické pulsy synchronizují a růst se orientuje do volného prostoru. (PALKOVÁ et al. 2002) Tímto způsobem je vývoj kolonií koordinován. Indukce metabolických změn vedoucích k produkci amoniaku je relativně rychlý proces (několik hodin), který vede

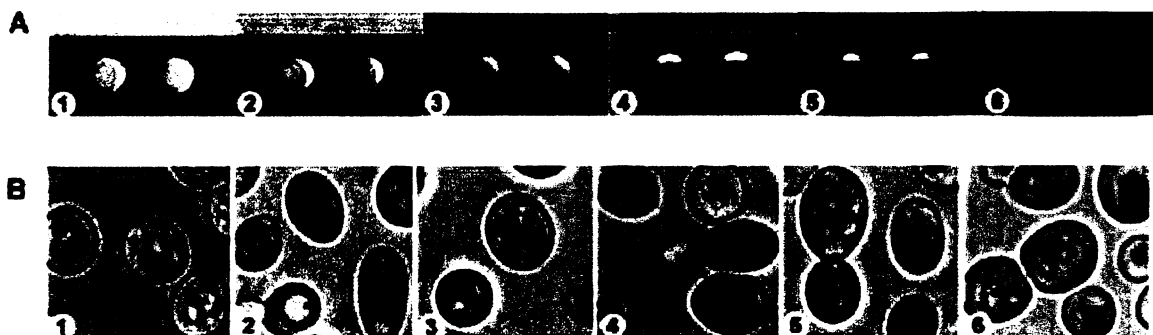
k vysoce efektivnímu přepnutí celé „populace“ kolonií v daném teritoriu do fáze produkce amoniaku a přechodné inhibice růstu. Později, když produkce amoniaku klesá, kolonie začínají znovu růst a společně vstoupí do další acidické vývojové fáze. (PALKOVÁ A FORSTOVÁ 2000)

Vyskytují-li se v blízkosti kolonie různých kvasinkových druhů, rostoucích různou rychlostí a teda vykazujících proto nestejně časování produkce amoniaku, je jejich vývoj též synchronizován. Obecně platí, že kolonie druhů, které dosahují fáze produkce amoniaku dříve, indikují amoniakovou odpověď u druhů rostoucích v sousedství. Tyto výsledky potvrzují univerzálnost amoniakové signalizace a fakt, že kvasinky jsou schopné nezávisle na druhu koordinovat svůj vývoj. (PALKOVÁ A FORSTOVÁ 2000)

Podobnou synchronizaci nacházíme i u *Dictyostelium discoideum*. Když pohyblivé améby hladovějí, začnou sekretovat signální cAMP, který indukuje svoji vlastní produkci v sousedních buňkách. Signál od první hladovějí buňky se rozšíří na ostatní a koordinuje jejich chování (agregaci) před kompletním vyčerpáním živin. (AUBRY a FIRTEL 1999) Podobným principem detekují svoji densitu bakterie přes posttranslačně modifikované peptidy. (LAZZAZERA 2000)

### **2.5.1.1 Analýza vývojových stádií přechodu z acidické do alkalické fáze**

Při přechodu obřích kolonií *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 z acidické do alkalické fáze vývoje můžeme pozorovat šest stádií, od první „plně acidické“ po šestou „plně alkalickou“. (PALKOVÁ et al. 1997) Kromě monitorování pH změn byly pozorovány dvě další fyziologické charakteristiky: 1. změny vakuol po barvení neutrální červení a 2. změny vnitrobuněčných koncentrací aminokyselin a jejich distribuce mezi vakuolou a cytoplasmou. Přítomnost neutrální červení v intracelulárních váčcích (případně vakuole) znamená rozdíl pH (protonový gradient) mezi váčkem a cytoplasmou. Výsledky ukazují, že kolonie první a druhé fáze (acidické vývojové fáze, „plně acidická“ a „pozdně acidická“) nebyly neutrální červení obarveny. Na začátku přechodu do alkalické fáze (třetí, „neutrální“ fáze) se objevují první malé červeně obarvené váčky, t.j. váčky kyselejší než cytoplasma. Počet váčků naroste ve čtvrté fázi, tzv. „ranná alkalická“ (v této fázi jsou nejvíc viditelné), ve které můžeme pozorovat počátek alkalizace kolonií. V pozdních alkalických fázích (pátá a šestá), můžeme pozorovat velké červené váčky. (viz Obr. 2.6) (PALKOVÁ et al. 2002)



Obr 2.6: Kinetika změn v koloniích během acidicko-alkalické tranzice

A- Obří kolonie *S. cerevisiae* rostoucí na GM-BKP

B- Buňky po barvení neutrální červení

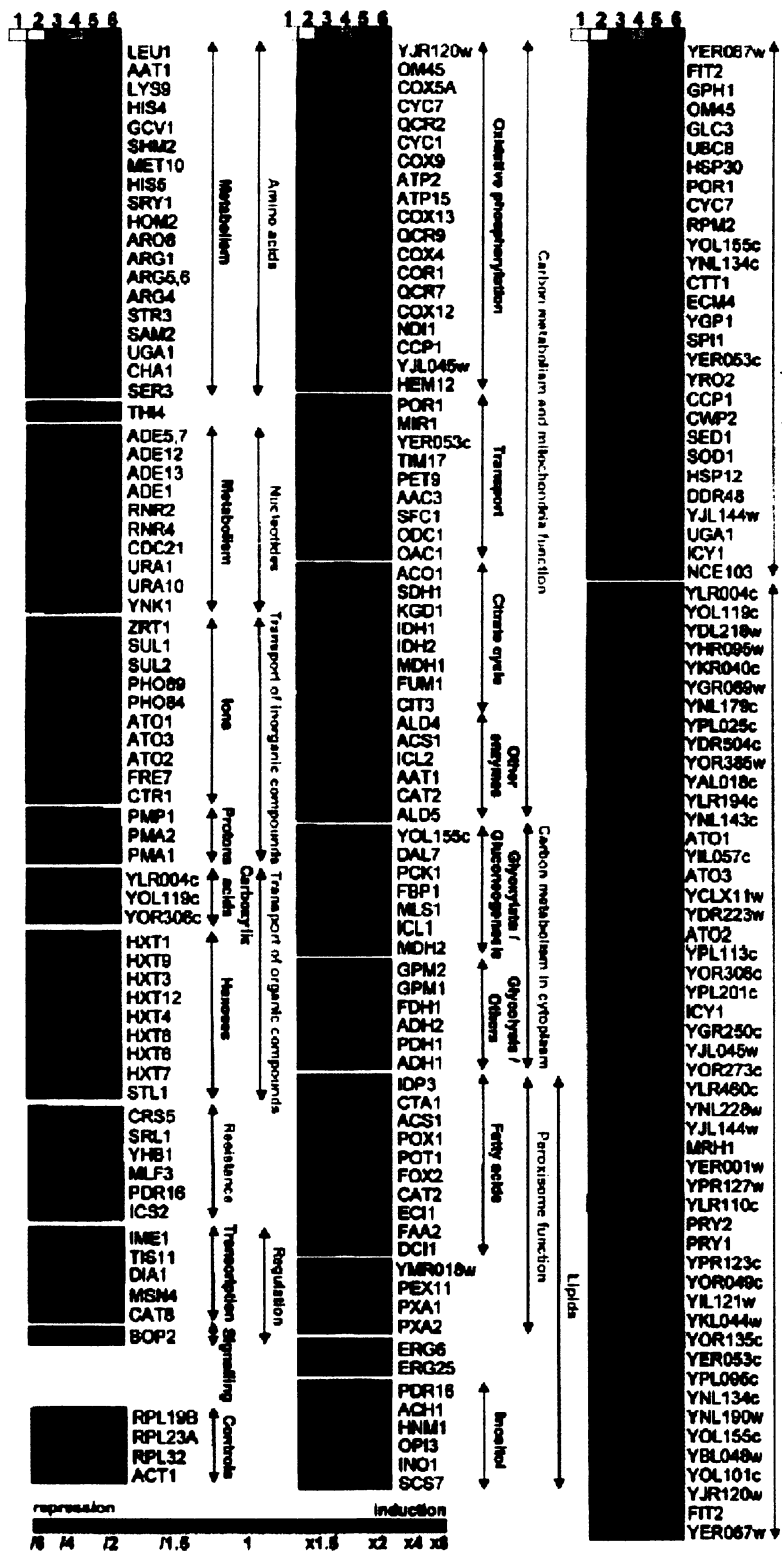
Zdroj: (PALKOVÁ et al. 2002)

Intracelulární zásoba aminokyselin ve vakuolách se snižuje ve třetí fázi, pak nastává zvýšení v pozdních fázích (pátá, šestá). Koncentrace aminokyselin v cytoplasmě zůstala téměř nezměněna po celou dobu přechodu.

Rovněž byla sledována kinetika změn genové exprese. Exprese cca 200 genů z 5885 sledovaných byla alespoň v jedné fázi průkazně změněna. (viz Obr. 2.7) Zajímavé bylo, že změny byly analogické v obřích koloniích i monokoloniích, jenom jejich časování bylo posunuto.

Skupina genů aktivovaná mezi první a druhou fází zahrnovala geny podílející se na degradaci/biosyntéze různých aminokyselin. Například exprese *GCVI* (glycin dekarboxyláza, která se podílí na uvolňování  $\text{NH}_3$  z glycinu) (McNEIL et al.1996)) se zvýšila 2,5krát. Existuje předpoklad, že by to mohlo mít roli v amoniakové signalizaci. Druhý gen, který by mohl přímo participovat v  $\text{NH}_3$  produkci (viz dále) je *SRYI*, který vykazoval 2,1krát zvýšenou produkci a kóduje protein analogický threonin dehydratáze *E. coli*. *AAT1* gen, kódující mitochondriální aspartát aminotransferázu byl indukován ve čtvrté fázi a jeho produkce vrcholila v páté.





Obr. 2.7: Změny exprese v koloniích během přechodu a acidické do alkalické fáze. 200 genů, kterých exprese se významně změnila jsou seřazeny podle funkce. Čtverce odpovídají pěti fázím. Změny v expresi označuje barevná mřížka vlevo dole.

Podle: (PALKOVÁ et al. 2002)

### 2.5.1.2 Zdroj amoniaku

V principu může amoniak/amonné ionty v kvasinkových buňkách pocházet ze dvou zdrojů: i)  $\text{NH}_4^+$  je importován do buněk z vnějšího prostředí nebo ii) se uvolňuje během katabolizmu a transaminace aminokyselin.

i) *S. cerevisiae* má pro příjem amonných iontů tři transportéry – Mep1p, Mep2p a Mep3p (viz kapitola ...). (MARINI et al. 1994). Výsledky experimentů však ukazují, že produkce amoniaku v koloniích není závislá na transportu vnějších amonných iontů ani na přítomnosti amonných iontů v prostředí (ZIKÁNOVÁ et al. 2002). Změny koncentrace amonných iontů v agaru nemají významný vliv na produkci amoniaku. Periodická produkce amoniaku v kmenech defektních ve všech třech Mep permeázách se neliší od produkce rodičovského kmene.

ii) Byla prokázána závislost mezi schopností kolonií produkovat amoniak a příjmem aminokyselin z prostředí. Aminokyseliny mohou být do buněk transportovány velkou rodinou fylogeneticky příbuzných aminokyselinových permeáz. Do této rodiny, klasifikované jako 2.A.3.10. YAT rodina v TC názvosloví (<http://tcdb.ucsd.edu/tcdb/background.php>) patří i nízkoafinitní permeáza Gap1p (která s velkou účinností transportuje většinu aminokyselin) a několik vysokoafinitních nízkokapacitních permeáz, které jsou specifické pro jednotlivé aminokyseliny. (ANDRÉ 1995) Ssy1p, také člen této rodiny, nemá funkci transportéru. Spolu s proteiny Ptr3p a Ssy5p, které jsou periferně asociovány s plazmatickou membránou má roli senzoru extracelulárních a/nebo intracelulárních aminokyselin („SPS amino acid senzor“). Ssy1p má unikátní 200-aminokyselinový N-konec, který je nevyhnutný pro tuto funkci. (FORSBERG a LJUNGDAHL 2001) Jako odpověď na extracelulární (nebo intracelulární) aminokyseliny, SPS senzor spouští signální dráhu regulující expresi několika enzymů podílejících se na metabolismu aminokyselin a expresi řady permeáz aminokyselin. (FORSBERG et al. 2001)

Mutanty permeáz aminokyselin (např. *gap1*) produkují výrazně snížené množství amoniaku, mutanty SPS senzoru jej neprodukují vůbec. Dále bylo zjištěno, že kolonie *S. cerevisiae* a *C. mogii* rostoucí na médiu bez aminokyselin neprodukují amoniak.

(ZIKÁNOVÁ et al. 2002) Např. při růstu na minimálním médiu kolonie amoniak neprodukují a přidání aminokyselin do tohoto média produkci plně obnoví. (PALKOVÁ et al. 1997)

HPLC měření množství jednotlivých aminokyselin extrahovaných z vakuol nebo z cytozolu buněk kolonií v rozdílných fázích vývoje ukazují, že celkové množství aminokyselin se snižuje na začátku produkce amoniaku. Tyto změny se týkají hlavně

vakuolární koncentrace aminokyselin. V pozdějších fázích produkce amoniaku se aminokyseliny opět hromadí ve vakuolách. V časných fázích jsou zřejmě aminokyseliny z vakuol uvolňovány a metabolizovány jako zdroj amoniaku. (PALKOVÁ et al. 2002)

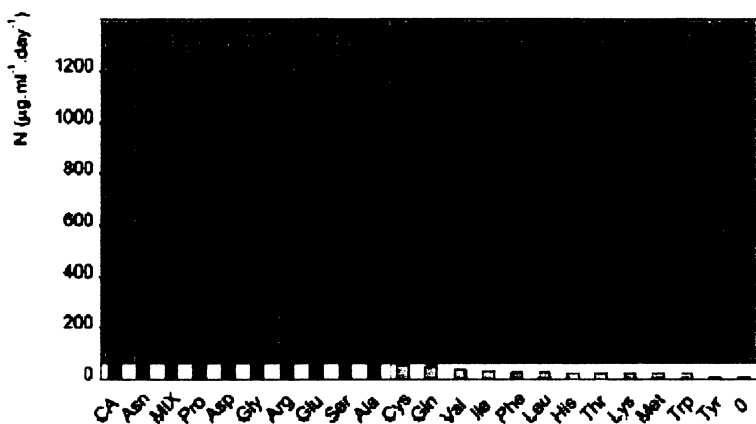
Výzkumy podílu jednotlivých aminokyselin na amoniakové signalizaci komplikuje skutečnost, že metabolické dráhy různých aminokyselin jsou vzájemně propojeny. (PALKOVÁ et al. 2002)

### 2.5.1.3 Role jednotlivých aminokyselin a amoniakové signalizaci

Experimenty s růstem kolonií na minimálním médiu s přidáním jednotlivých aminokyselin (10 mM koncentrace) ukázaly dvě skupiny aminokyselin. (viz. Obr. 2.8) Do první skupiny patří Asn, Pro, Asp, Gly, Arg, Glu, Ser a Ala. Přítomnost libovolné z těchto aminokyselin umožní koloniím *C.mogii* produkci amoniaku v čase druhého pulsu. Ostatních 12 aminokyselin produkci amoniaku neumožní. (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)

Katabolická dráha mnoha indukujících aminokyselin ( Pro, Asp, Gly, Arg..) zahrnuje krok produkce  $\text{NH}_4^+$  (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). „Mikroarray“ analýzy ukazují, že některé geny kódující katabolické enzymy aminokyselin, které produkují  $\text{NH}_4^+$  nebo  $\text{NH}_3$  se indukují během přepnutí kolonií z acidické do alkalické fáze. (PALKOVÁ et al. 2002) Například se indukuje *GCVI* gen kódující glycin dekarboxylázu, která z glycinu uvolňuje  $\text{NH}_4^+$ .

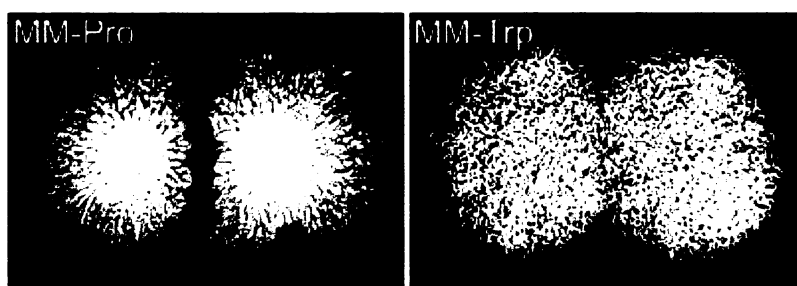
Morfologie kolonií rostoucích na minimálním médiu s jednotlivými aminokyselinami vykazovala dva morfotypy. Hladké kolonie, podobné koloniím rostoucím na mimimálním médiu s přidáním směsi aminokyselin („casamino acids“), byly pozorovány na médiích s přidáním jakékoliv indukující aminokyseliny. Drsnější kolonie byly pozorovány na médiích s neindukujícími aminokyselinami. Tyto kolonie byly podobné koloniím rostoucím na mimimálním médiu bez aminokyselin. Kolonie rostoucí na médiu s indukujícími aminokyselinami si průkazně mezi sebou udržovaly vzdálenost, kolonie rostoucí na médiu neumožňující amoniakovou signalizaci se vzájemně prorůstaly, hlavně v pozdějších vývojových stádiích. (viz Obr. 2.9) Tyto dva typy kolonií se rovněž lišily morfologií buněk. Kolonie rostoucí na indukujících aminokyselinách obsahovaly hlavně typické kvasinkové buňky, zatímco ostatní obsahovaly buňky rosoucí hyfálně a pseudohyfálně. (viz Obr 2.10) Krom dvou hlavních morfologických skupin, přítomnost Gln, Ile, His a Lys v agaru vedla k „intermediálnímu“ typu kolonií. Tyto kolonie obsahovaly směs typických kvasinkových buněk a hyfálních buněk. (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)



Obr 2.8: Přítomnost určitých aminokyselin v médiu umožňuje produkci amoniaku. Graf ukazuje množství amoniaku v médiu při dodání dané aminokyseliny do média.

CA - casamino kyseliny (hydrolyzát kaseinu), MIX – mix všech 20 aminokyselin

Podle: (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)



Obr 2.9: Morfologie kolonií *Candida mogii* při růstu na minimálním médiu s přidáním prolinu a tryptofánu

Podle: (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)



A

B

Obr 2.10: Tvar buněk kvasinky *Candida mogii* při růstu na minimálním médiu s přidáním A. prolinu B. tryptofánu

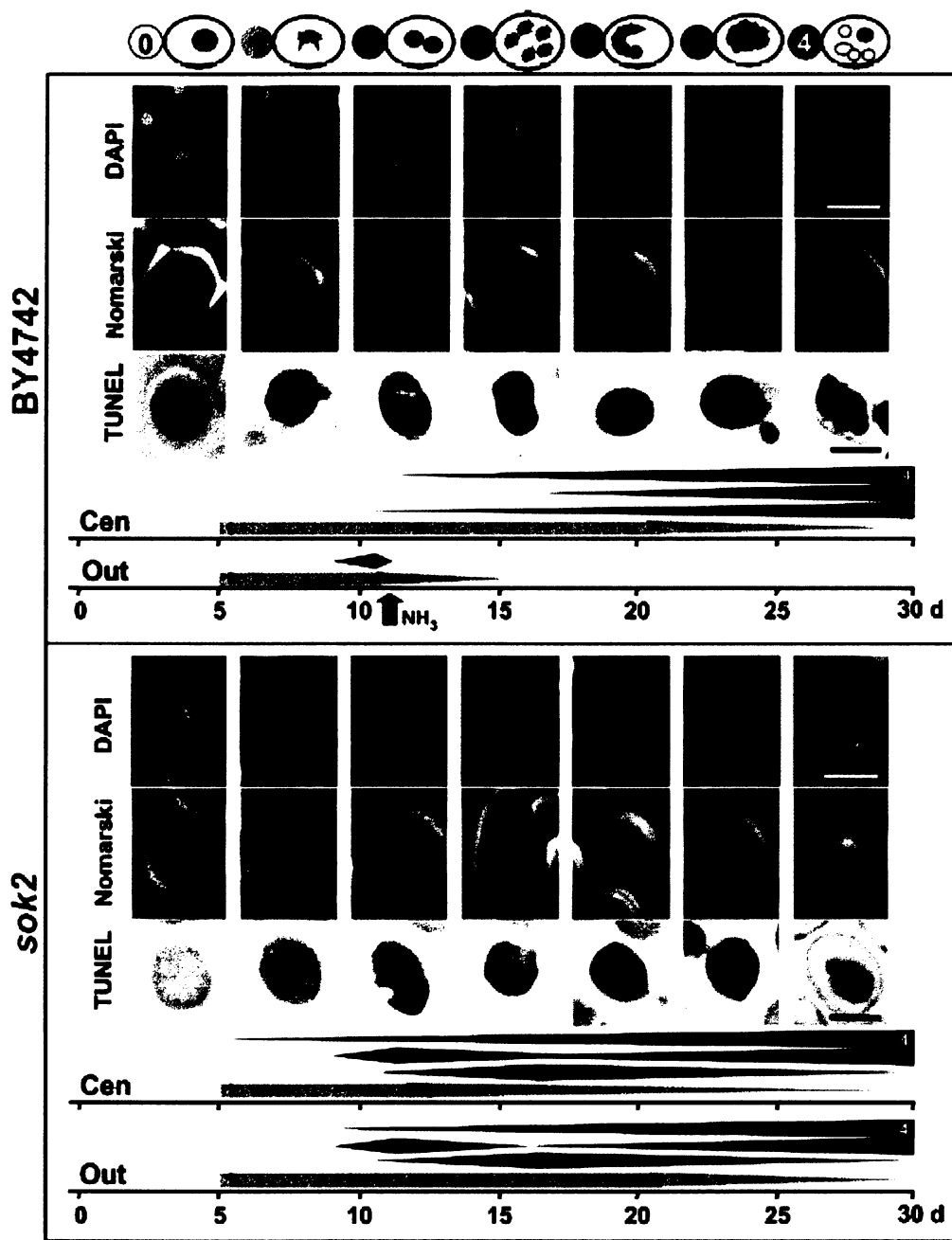
Podle: (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)

#### 2.5.1.4 Programovaná buněčná smrt v koloniích a role NH<sub>3</sub>

Programovaná buněčná smrt (PCD) v mnohobuněčných organizmech je nezbytná pro vývoj tkání a pro odstranění starých a poškozených buněk. Existence PCD bývá u jednobuněčných organismů často zpochybňována. Námitky ale neberou v potaz fakt, že mikroorganismy rostou v přirozeném prostředí v rámci strukturovaných mnohobuněčných kolonií schopných diferenciace, ve kterých může být přežití individuální buňky podřízeno přežití celé populace. Zdá se, že přinejmenším některé biochemické změny typické pro savčí PCD existují také v kvasinkách. Relokalizace fosfatidylserinu, DNA zlomy a fragmentace chromatinu byly popsány v kvasinkách které byly vystavené extracelulárním stresům, např. kyselině octové nebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MADEO et al. 1999, LUDOVICO et al. 2001). Kvasinky také produkují některé proteiny homologní s apoptotickými proteiny vyšších eukaryot. (SHIMIZU et al. 2000)

Regulovaná smrt kvasinek (YCD – „Yeast cellular death“) má některé znaky PCD a hraje důležitou roli při vývoji a dlouhodobém přežívání kvasinkových kolonií. Na rozdíl od homogenních kultur rostoucích v tekutých médiích, populace rostoucí na pevných médiích mají více možností se diferencovat a vytvářet specializované buněčné typy ve prospěch celé kolonie. Z tohoto pohledu lze kvasinkové kolonie považovat za jednoduchou analogii mnohobuněčného organismu (PALKOVÁ 2004).

V kolonii jsou staré a nově vzniklé buňky lokalizované v různých oblastech – staré nacházíme v centru kolonie a nové na vnějších okrajích. Ve vzorcích odebraných z centra a okraje kolonie byla stanovena: přítomnost reaktivních kyslíkových druhů (ROS – „reactive oxygen species“), relokalizace fosfatidylserinu, přítomnost proteáz hydrolyzujících (aspartat)<sub>2</sub>-rodamin (D<sub>2</sub>R – substrát vytvořený pro detekci kaspázové aktivity v savčích buňkách, (HUG et al. 1999), DNA zlomy, změny v kondenzaci a integritě chromatinu a změny morfologie buněk. Ze začátku (do cca 12tého dne vývoje kolonie) jsou časné znaky YCD (ROS, proteáza štěpící D<sub>2</sub>R, zlomy DNA) patrné v centru i na okrajích kolonie. Později zůstávají v centrálních oblastech a z okraje vymizí. Změny chromatinu (pokročilý znak PCD) se objevují jenom v centru kolonie. Navíc procento mrtvých buněk je v 21 den na okrajích nízké (2,5 ± 0,7%) v porovnání s desetinásobně procentem mrtvých buněk v centru (26,2 ± 3,3%). (viz Obr. 2.11)



Obr.2.11: Změny buněčné morfologie a jádra v BY4742 a *sok2* mutantě. 0: normální jádro, 1-3: kondenzace a fragmentace chromatinu vizualizovaná DAPI a TUNEL (viz. poznámka), 4: poslední stadium YCD – scvrklé buňky. Schéma nahoře ukazuje jednotlivé buněčné typy (chromatin je černý, cytosol žlutý). Diagram ukazuje přibližné časování změn jednotlivých buněčných typů. Fialová šipka označuje začátek produkce amoniaku.

Zdroj: (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005)

*Poznámka: DAPI je metoda využívající barvení fluorescenčním barvivem, které po navázání na DNA a ozáření ultrafialovým světlem modře fluoreskuje. Metoda může být použita na živé nebo mrtvé buňky.*

*TUNEL (Terminal transferase dUTP nick end labeling) je metoda pro detekci fragmentace DNA způsobenou apoptózou. Metoda využívá přítomnost přerušení v DNA („nicks“), které jsou rozpoznány terminální transferázou, enzymem který katalyzuje přidání sekundárně značených dUTP.*

Kvasinková metakaspáza Mca1p a kvasinkový Aif1p protein mají funkci regulátorů YCD. (MADEO et al. 2002, WISSING et al. 2004) Zajímavé je, že absence *MCA1* nebo *AIF1* genů nemá na normální vývoj kolonií nebo lokalizaci YCD žádný vliv. Naopak, YCD lokalizace závisí na amoniakové signalizaci. Schopnost mladých buněk uniknout YCD po cca 12tém dnu růstu kolonie, přesně koreluje s přechodem do fáze, kdy kolonie začíná produkovat amoniak (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003), t.j. do fáze která je spojena s reprogramováním buněčného metabolismu umožňujícím uniknout oxidativnímu stresu. (PALKOVÁ et al. 2002) Experimenty s koloniemi Sok2p mutant (defekt transkripčního faktoru Sok2p, kolonie vykazují sníženou produkci amoniaku) ukazují, že buňky z okrajů těchto kolonií nemají schopnost uniknout YCD. V *sok2* koloniích dochází k rychlejší smrti ve všech oblastech kolonie, např. 21. den, jenom  $38,5 \pm 6,2\%$  *sok2* buněk je schopno dát vznik nové kolonii v porovnání s koloniemi rodičovského kmene stejného stáří. (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2005)

### **2.5.1.5 Ato proteiny**

Během prvních 12 hodin produkce amoniaku se nejrychleji a nejvýrazněji aktivují i tři geny (*ATO1*, *ATO2*, *ATO3*), kódující proteiny patřící do YaaH rodiny membránových proteinů. YaaH je 188 aminokyselin dlouhý protein *E.coli* K-12, u kterého byla predikována existence 6ti transmembránových domén. Jeho funkce je prozatím neznámá. Má homology v jiných bakteriích, v archea, u několika druhů kvasinek a u Protozoa (*Leishmania*, *Chlamydomonas*). Analýzou aminokyselinové sekvence 17 členů YaaH rodiny se zjistilo, že sdílejí tři konzervované domény. Druhá z nich je oblast 25 aminokyselin, ve které Ato1p vykazuje homologii s amonným transportérem *C.elegans*. V rámci této oblasti aminokyseliny Phe a Trp v pozici 14 a 15 jsou konzervovány u všech proteinů. U *S.cerevisiae* existují tři paralogy - *YCR010c*, *YNR002c* a *YDR384c*, které byly nazvány *ATO* geny („Amonium

Transport Outward“): *YCR010c – ATO1*, *YNR002c – ATO2* a *YDR384c – ATO3*. Základní charakteristiky Ato proteinů, které tyto geny kódují, jsou shrnuty v tabulce 2.4.

Ato1p a Ato2p vykazují velkou podobnost aminokyselinové sekvence (78%). Ato3p je míň homologní (35%) a je spíš příbuzný k homologu z kvasinek *Kluyveromyces lactis* (40,2%). Ato1p má nízkou homologii s předpokládaným transportérem amoniálních iontů u *Caenorhabditis elegans*. (PALKOVÁ et al. 2002) Ato homolog Grp1p byl identifikován v kvasince *Yarrowia lipolytica* (KUJAU et al 1992). *Grp1* mutace způsobuje změny v buňkách a morfologii kolonií, v membránách a organelách (zvětšené mitochondrie, redukované endoplazmatické retikulum, velké vakuoly) a při růstu na glukóze vyvolá předčasnou smrt. (TZSCHOPPE et al. 1999)

Gen, protein	<i>ATO1</i> , Ato1p	<i>ATO2</i> , Ato2p	<i>ATO3</i> , Ato3p
Další názvy	<i>ADY2</i>	<i>FUN34</i>	
Systematický název	<i>YCR010C</i>	<i>YNR002C</i>	<i>YDR384C</i>
Délka (AK)	283	282	275
Molekulová hmotnost	30,726	30,701	30,028
pI	4,88	5,09	4,42

Tab.2.4 Základní charakteristiky Ato proteinů.

Zdroj: SGD

Mutanty v jednotlivých genech *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* jsou životaschopné a při růstu v tekutém médiu se fenotypicky neodlišují. Kolonie těchto mutant však produkují během druhé alkalické fáze výrazně menší množství amoniaku než rodičovský kmen. Aby byla vyloučena možnost, že absence *ATO* genů ovlivňuje extracelulární pH a ne amoniakovou produkci, byly buňky odebrány z kolonií v různých vývojových fázích a byla zkoumána jejich schopnost produkovat amoniak při stejných pH podmínkách. Buňky odebrané z kolonií ve fázi, kde buňky silně exprimují *ATO* geny, produkovaly víc amoniaku než buňky odebrané z druhé, acidické fáze. Buňky z alkalických kolonií jednotlivých *ato* mutant produkovaly méně amoniaku než buňky alkalických kolonií rodičovského kmene. (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003) Tyto výsledky vylučují možnost, že by byl defekt v produkci amoniaku způsoben jenom rozličným externím pH.

Dále byl zkoumán vliv externího pH (pH rozsah 4-7) na produkci amoniaku rodičovským kmenem odebraným z kolonií v alkalické fázi. Po prvních 10 minutách inkubace v pH 4,0



byla produkce amoniaku výrazně větší v porovnání s buňkami které byly inkubovány při pH 7,0. Tento efekt může být způsoben tím, že export  $\text{NH}_4^+$  je spřažen s importem protonů (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003)

#### 2.5.1.5.1 Exprese *ATO1* genu je závislá na *Cat8p*

*Cat8p* (*Ymr280cp*), nazývaný také *Dil1p* nebo *Msp8p* je aktivátor transkripce nezbytný pro derepresi mnoha genů za podmínek oxidativního růstu (nefermentačního metabolismu). Aktivuje se v návaznosti na diauxický shift (přepnutí z fermentativního na oxidativní metabolismus). Když kvasinky rostou na glukóze, není *CAT8* exprimován. (HAURIE et al. 2001)

Bylo objeveno 25 genů, jejichž exprese je při absenci *Cat8p* změněna. Mezi těmito geny byly také *ATO1* a *ATO2*. Exprese *ATO1* nebyla u *cat8Δ* kmene vůbec detekovatelná. *ATO2* mRNA byla naopak přítomna v trojnásobně větším množství v porovnání s kontrolním kmenem (byl to jediný pozorovaný gen, jehož exprese se zvýšila). Je možné, že vyšší exprese *ATO2* genu byla způsobena úplnou ztrátou exprese *ATO1* genu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že v promotoru genu *ATO2* chybí aktivační konsenzus sekvence, která se nachází ve všech genech, jejichž exprese je závislá na *Cat8p* (včetně *ATO1*). Tato sekvence je označována CRSE („carbon source responsive element“). (HAURIE et al. 2001)

#### 2.5.1.5.2 Exprese *ATO3* genu je zvýšená v $\rho^0$ petit kmenech

$\rho^0$  „petit“ kmeny jsou respiračně deficientní kmeny postrádající mitochondriální DNA. *ATO3* gen vykazuje v těchto kmenech zvýšenou expresi. (GUARAGNELLA a BUTOW 2003)

U respiračně deficientních kmenů kvasinek jako jsou  $\rho^0$  petit je aktivována meziorganelová signální dráha nazývaná retrográdní regulace. Její aktivace znamená změnu v expresi mnoha genů, které umožňují buňce přizpůsobit se respiračně deficientnímu stavu. U více než 40 genů se exprese zvýší minimálně 2krát při mitochondriální dysfunkci (v  $\rho^0$  při porovnání s  $\rho^+$  buňkami) u buněk kultivovaných na rafinóze (fermentovatelný nereprimující zdroj uhlíku). Je známo, že exprese většiny genů nezbytných pro přestavbu metabolismu u respiračně deficientních kmenů je pod kontrolou *Rtg1p*, *Rtg2p* a *Rtg3p* pozitivních regulátorů.

Expresí genu *ATO3* je však na Rtg proteinech nezávislá. (GUARAGNELLA a BUTOW 2003)

Předpokládá se, že zvýšená expresí *ATO3* v  $\rho^0$  petit buňkách pomáhá předcházet toxickým účinkům nadbytku amoniaku, který by mohl v respiračně deficientních buňkách vznikat jako důsledek možného defektu v asimilaci amoniaku. Expresí tohoto genu je regulována na dvou úrovních. Vlastní expresí *ATO3* genu je závislá na transkripčním aktivátoru Gcn4p. Pro zvýšenou expresí *ATO3* genu při retrográdní regulaci u  $\rho^0$ -petit buněk je požadován Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS) systém sensorů extracelulárních aminokyselin. (FORSBERG et al. 2001) Produkce amoniaku u kolonií v kmenech s defektním SPS systémem je skutečně snižená. (ZIKÁNOVÁ et al. 2002)

### 2.5.1.6 Role Pma1p a Pma2p

Změny extracelulárního pH během vývoje kolonií jsou důležitým faktorem pro ustálení poměru protonovaného  $\text{NH}_4^+$  a neprotonovaného plynného  $\text{NH}_3$ . „Mikroarray“ studie ukázaly změny v genech kódující různé transportéry plazmatické membrány, které se podílejí na fluktuaci externího pH. (PALKOVÁ et al. 2002)

Hlavní  $\text{H}^+$ -ATPáza plazmatické membrány Pma1p se může podílet na snižování extracelulárního pH během acidické vývojové fáze. Její hlavní funkcí je transport protonů ven z buňky a udržování membránového potenciálu. (VIEGAS et al. 1994) Během přechodu z acidické do alkalické fáze expresí *PMA1* postupně klesá.

*PMA1* a *PMA2* geny kódují enzymy, které mají zásadní fyziologickou roli za přítomnosti enviromentálního stresu stejně jako při jeho absenci. Pma1p a Pma2p izoformy se liší v biochemických charakteristikách, ale za růstových podmínek které byly dosud zkoumány, expresí *PMA2* je zanedbatelná a celou  $\text{H}^+$ -ATPázovou aktivitu obstarává Pma1p.

(FERNANDES a SA-CORREIA 2003)

Hladina expresí *PMA1* a *PMA2* je 2,5-4,5krát vyšší v buňkách kultivovaných za podmínek respiračního metabolismu (ethanolové médium) než v buňkách kultivovaných za růstu na médiu s nízkým obsahem glukózy.

Zvýšená aktivace *PMA2* genu (8krát) byla pozorována během diauxického růstu. Diauxie je francouzské slovo znamenající dvojí růst. V buněčné biologii popisuje růst kolonií v přítomnosti směsi sacharidů. Během první fáze buňky přednostně metabolizují cukry, jejichž katabolismus je metabolicky nejefektivnější (glukóza). Až po vyčerpání prvního primárního zdroje nastává „diauxický shift“ a buňky začínají metabolizovat sekundární zdroj.

Během diauxického shiftu se buňky obvykle nacházejí v tzv. „lag periodě“ během níž syntetizují novou sadu enzymů. I když transkripce *PMA2* zůstává pořád nízká (20krát nižší než transkripce *Pma1*), výsledky napovídají, že tato izoforma hraje důležitou roli během dusíkového hladovění. (FERNANDES a SA-CORREIA 2003)

Aktivita  $H^+$ -ATPáz ve velké míře závisí na hodnotě pH média. Testování při růstu na médiích s pH v rozmezí hodnot 2.5-6.0 ukázalo, že aktivita  $H^+$ -ATPáz je největší při pH 6,0. Při nižších hodnotách pH (nad 2.5) dosahovala ATP-ázová aktivita 62-83% maximální aktivity, což pořád umožňovalo optimální růst. Při pH 2.5 aktivita dosáhla 30% maximální aktivity a růst byl negativně ovlivněn. Množství proteinu  $H^+$ -ATPázy na membránách buněk bylo při všech hodnotách pH podobné, jenom při pH 2.5 bylo množství proteinu poloviční. *PMA2* promotor byl při pH 6.0 osmkrát účinnější na buňkách vypěstovaných při pH 2.5, zůstával ovšem pořád víc než stonásobně méně účinný než promotor *PMA1*. (CARMELO et al. 1996)

*Pma1p* a *Pma2p* mají také roli během růstu v médiu se zvýšenou koncentrací měďnatých kationů. Kultivace kvasinek za těchto podmínek vede k zvýšené aktivitě *Pma1p* a *Pma2p*. Při extrémních koncentracích mědi (blízko maxima, které ještě umožňuje růst) se aktivita těchto  $H^+$ -ATPáz snižuje, přičemž snižování aktivity je méně výrazné u *Pma2p*. Uměle připravený kmen syntetizující pouze *Pma2p* měl v porovnání s kmenem syntetizujícím pouze *Pma1p* nižší citlivost ke zhoubným efektům vysokých koncentrací mědi v médiu. (Comparative effects of *Saccharomyces cerevisiae* cultivation under copper stress on the activity and kinetic parameters of plasma-membrane-bound  $H(+)$ -ATPases *PMA1* and *PMA2*., fernandes)

Aktivita  $H^+$ -ATPáz rovněž závisí na kultivační teplotě. Aktivita ATPáz se zvyšuje se zvyšující se teplotou (30-39 °C). Optimální teplota pro aktivitu byla stanovena na 42 °C. Zvýšení aktivity nebylo výsledkem zvýšené syntézy proteinu *Pma1p*. Naopak, experimenty prokázaly, že při teplotě 40 °C množství proteinu na membráně klesá. U *PMA2* platí, že účinnost promotoru se ze zvyšující se teplotou zvyšuje, hladina exprese ovšem zůstává pořád cca stokrát nižší než exprese *PMA1*. (VIEGAS et al. 1995)

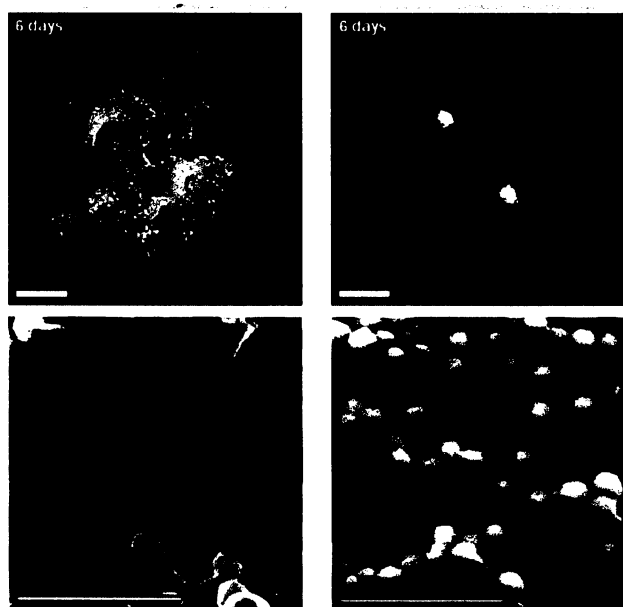
## 2.6 Divoké kmeny kvasinek

V přírodě jednobuněčné organizmy tvoří biofilmy nebo kolonie. Tento fenomén je naprosto převažující, avšak ví se o něm stále poměrně málo. Život v mnohobuněčných strukturách pomáhá mikroorganizmům přežít hladovění a jiné škodlivé vlivy prostředí, např.

dobře vypracovaný extracelulární materiál pokrývající biofilmy zvyšuje resistenci celé populace k antibiotikům. (LEWIS 2001)

Kolonie kvasinek *Candida* a *Kluyveromyces* vykazují mnohem strukturovanější morfologii kolonií než laboratorní kmeny *S. cerevisiae*. Elektronová mikroskopie odhalila u *Candida albicans* několik vrstev buněk s různou morfologií. Některé buňky jsou propojeny fibrilárními strukturami. (RADFORD et al. 1994) *C. albicans* je schopna procházet mnohými morfologickými změnami buněk a kolonií (tzv. fenotypické přepínání). Změny v organizaci kolonie spojené se změnami adhezivity a invazivního růstu ovlivňují virulenci tohoto klinického patogenu. (STAIB et al. 2001)

Laboratorní kmeny *S. cerevisiae* vykazují hladkou, nepatrně strukturovanou morfologii. V koloniích kvasinky *S. cerevisiae* můžeme pozorovat jakési tenké fibrily pouze v pozdějších stádiích vývoje u hladovějících kolonií v stacionární fázi. (VARON a CHODER 2000) Kmeny izolované z přírody mají tzv. „fluffy“ morfologii, t.j. kolonie jsou drsné, vrásčité. Buňky v těchto vrásčitých koloniích jsou spojeny velkým množstvím extracelulární matrix. Tato extracelulární matrix, podobně jako v případě biofilmů, může vytvářet malé kanály pro proudění vody a živin a tvoří jakési mikroprostředí pro nové generace buněk. Vrásčité strukturované kolonie jsou schopny expandovat do nového prostředí rychleji než kolonie hladké. (viz Obr. 2.12)



A.

B.

Obr. 2.12: Rozdíly mezi laboratorním (A.) a divokým kmenem (B.) *S. cerevisiae*. Celkový pohled na kolonie a ultrastruktura 6 dnů starých kolonií. Zdroj: (KUTHAN et al. 2003)

Po několika pasážích na médiu bohatém živinami se drsné kolonie „přepnou“ na „domestikovanou“ hladkou formu. Tuto domestikaci provází ztráta extracelulární matrix a analýzy pomocí „mikroarrays“ odhalily výrazné změny genové exprese, které tuto domestikaci provázejí (byla změněna exprese cca 320 genů). Hlavní změny se týkají metabolismu sacharidů, buněčné stěny, vodních kanálů, Ty-transpozonů a subtelomerických genů, homeostáze železa, metabolismu vitaminů, buněčného cyklu a polarity buňky. Růst buněk ve vrásčitých koloniích pravděpodobně reprezentuje metabolickou strategii, která pomáhá přežívání populace kolonie v nepříznivých podmínkách. Tato strategie je zřejmě zbytečná v optimalizovaných laboratorních podmínkách. (KUTHAN et al. 2003)

## 2.7 GFP protein a jeho analogy

Zelený fluorescenční protein („Green Fluorescent Protein“) se skládá z 238 aminokyselin (Mw 23 kDa). Byl izolován z medúzy *Aequorea victoria*, která při ozáření modrým světlem fluoreskuje. (PRENDERGAST a MANN 1978)

V buněčné a molekulární biologii se GFP často využívá ke zjišťování exprese vybraného genu. V mnoha modifikovaných formách byl již vložen do mnoha organismů a poté využit k průkazu produkce a lokalizace daného proteinu. Vlastnosti GFP a jeho derivátů umožnily velký rozvoj fluorescenční mikroskopie v biologii. Mnoho malých fluorescenčních molekul, jako například FITC (fluorescein isothiocyanate) jsou pro živé buňky vysoce toxické. GFP je naopak vysoce stabilní a netoxická molekula, která může být fúzována jak s N- tak s C-koncem proteinu. Po fúzi si protein obvykle udrží svoji nativní funkci.

Fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorovat expresi proteinu v různých typech buněk (využívá se pro optickou detekci konkrétního buněčného typu *in vitro* nebo *in vivo*- viz obr.A-A), různých časech a za různých podmínek, přičemž jedna buňka může nést i víc označených proteinů. Fluorescenčního značení přispělo k objasňování mnoha biologických procesů, včetně skládání proteinů, transportu proteinů, dynamiky RNA, kde se v minulosti mohli využívat pouze fixované, mrtvé buňky.

Příklady produkce proteinů značených GFP v různých organizmech jsou na Obr 2.13.



A.



B.

C.

D.

Obr. 2.13: Příklady produkce GFP:

A. Transgenní myš se značeným aktinem.

B. Larvy komárů se značenými varlaty

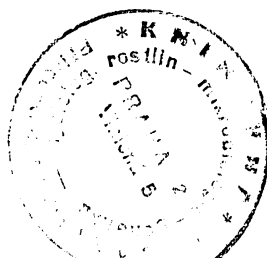
C. Značené spermie

D. Myš s různě značenými neurony podle zdědění od daného rodiče.

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/>

Fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorovat expresi proteinu v různých typech buněk (využívá se pro optickou detekci konkrétního buněčného typu *in vitro* nebo *in vivo*- viz obr.A-A), různých časech a za různých podmínek, přičemž jedna buňka může nést i víc označených proteinů. Fluorescenčního značení přispělo k objasňování mnoha biologických procesů, včetně skládání proteinů, transportu proteinů, dynamiky RNA, kde se v minulosti mohli využívat pouze fixované, mrtvé buňky.

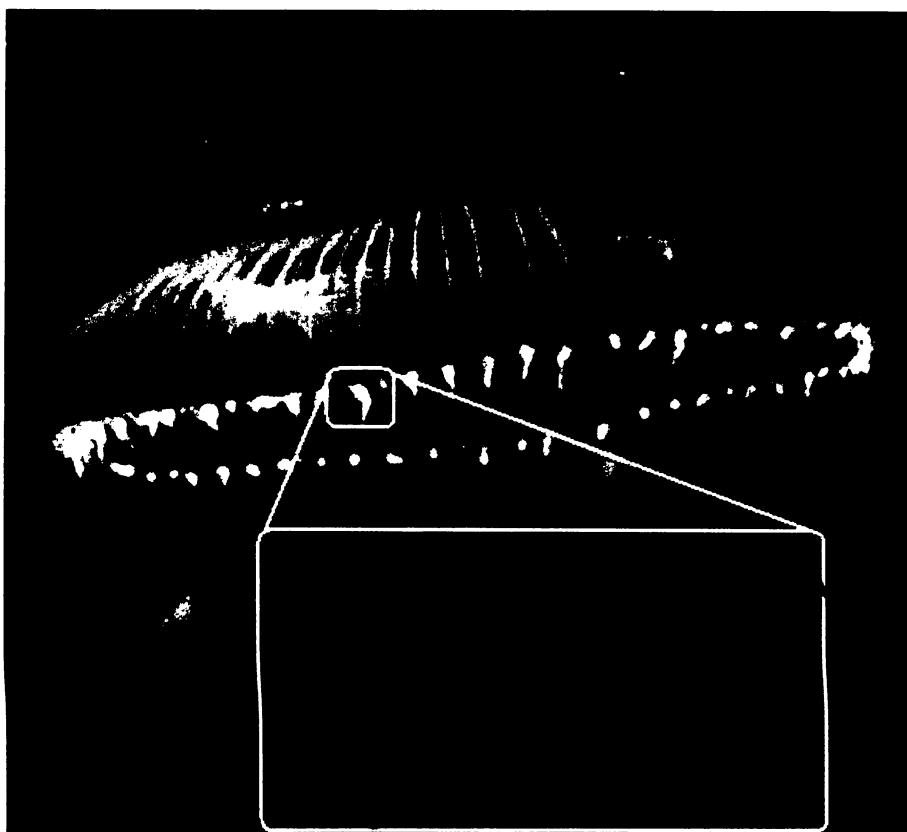
Příklady produkce proteinů značených GFP v různých organizmech jsou na Obr 2.13.



### 2.7.1 Historie GFP

První GFP proteiny byly izolovány z *Aequorea victoria* v šedesátých a sedmdesátých letech minulého století. První data pocházejí od Osamu Shimomury. (SHIMOMURA et al. 1962) V *A. victoria* se fluorescence (modrý záblesk) objeví když luminiscenční protein aequorin interaguje s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Část této luminiscenční energie se přenáší na GFP a vyvolá zelenou fluorescence. (viz Obr. 2.14) (MORISE et al. 1974)

Pro účely molekulární biologie začala být proteinová fluorescence využívána v roce 1992, kdy Douglas Prasher naklonoval a osekvenoval GFP gen. Brzo byl GFP exprimován v *E. coli* a *C. elegans*. (INOUE a TSUJI 1994) V roce 1996 byla pozorována krystalická struktura GFP; struktura chromoforu a interakce sousedních aminokyselinových zbytků. Modifikací těchto zbytků cílenou nebo náhodnou mutagenezí bylo vytvořeno velké množství GFP variant, které se dnes v molekulární biologii využívají.

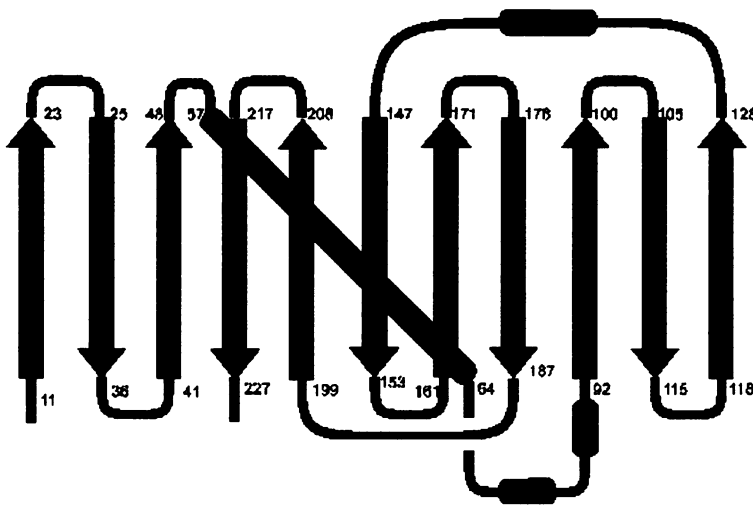


Obr. 2.14: Aby došlo k bioluminiscenci, musí *Aequorea* uvolnit vápenaté kationy. Tyto se vážou na protein aequorin, který po navázání vyzáří modré světlo. Modré světlo je absorbováno zeleným fluorescenčním proteinem, který vyzářuje zelené světlo.

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/>

## 2.7.2 Struktura GFP

GFP má tvar soudku, který je složený z 11  $\beta$ -barelů a jednoho  $\alpha$ -helixu nacházejícího se v centru (viz obr.1), který nese chromofor.(Obr.2) (YANG et al. 1996) "The molecular structure of green fluorescent protein". Nat Biotechnol 14 (10): 1246-51) Barel umožňuje správné složení chromoforu a chrání ho před zhášením vlivem mikroprostředí. (viz Obr. 2.15)

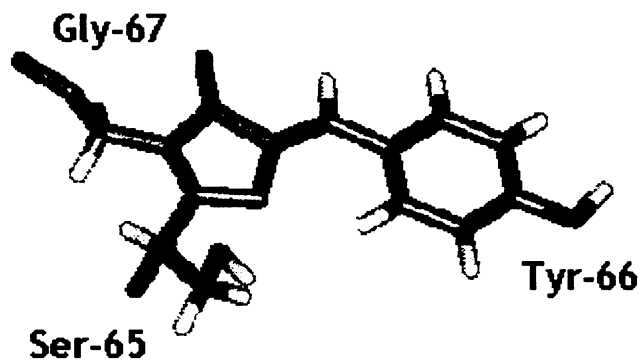


Obr. 2.15: Schéma GFP  $\beta$ -barrelu.  $\beta$ -listy jsou zeleně,  $\alpha$ -helixy červeně a spojovací smyčky černě.

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/>

Fluorofor GFP se skládá z vnitřní sekvence tří aminokyselin: serin, tyrozin a glycin, která je posttranslačně modifikována na 4-(*p*-hydroxybenzylidene)-imidazolidin-5-one strukturu. Pro správnou třídimenzionální strukturu GFP a fluorescenci jsou důležité ještě kontakty s dalšími aminokyselinami: Tyr66 se váže s His148 a Arg96 a Gln94 se vážou s imidazolinovým kruhem. (viz Obr. 2.16)





Obr. 2.16: Struktura GFP fluoroforu. Pozostává z tří zbytků aminokyselin Ser65-dehydroTyr66-Gly67 proteinu. Cyklizovaná forma zbytků tvoří imidazolinový kruh.

Zdroj: <http://dwb.unl.edu/>

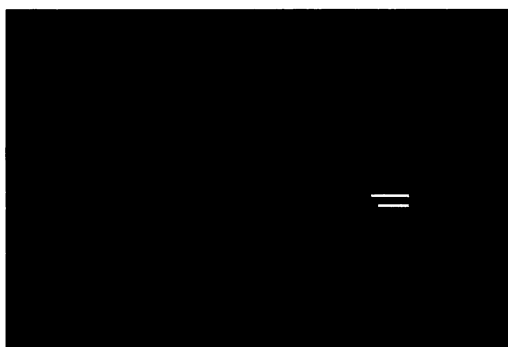
### 2.7.3 Varianty GFP

Potřeby molekulárních biologů vedly k vývoji mnoha variant GFP. První mutace vedoucí k zlepšení vlastností byla jednobodová záměna (S65T: serin zaměnen za threonin) provedená v roce 1995. (HEIM et al.1995) Tato změna vedla k výraznému zlepšení spektrální charakteristiky GFP, zvýšila se fluorescence, fotostabilita a hlavní excitační vrchol se posunul ze 488 nm na 509 nm. Bodová mutace F64L (fenylalanin zaměnen za leucin) umožnila skládání proteinů při 37 °C (enhanced GFP – EGFP). V roce 2006 se několika mutacemi podařilo vyvinout variantu GFP s extrémně rychlou maturací. (PÉDELACQ et al. 2006)

Po excitaci modrým světlem s excitačním maximem při vlnové délce 475 nm emituje GFP fluorofor zelenou fluorescenci o vlnové délce 509 nm. Tato fluorescence může být následně detekována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Vlnové délky excitačního a emisního světla jsou dány aminokyselinovým složením chromoforu a jeho blízkého okolí (i v rámci terciární struktury proteinu). Proto může aminokyselinová substituce v těchto oblastech způsobit velkou změnu ve fluorescenci. Tímto způsobem byly získány různé barevné varianty GFP: modrý fluorescenční protein (“blue” EBFP, EBFP2, Azurite), cyan fluorescenční protein (ECFP, Cerulean, CyPet) a žlutý fluorescenční protein (“yellow” YFP, Citrine, Venus, YPet). BFP deriváty obsahují Y66H (tyrozin zaměnen za histidin) substituci, pro cyan deriváty je kritická Y66W (tyrozin zaměnen za tryptofan) substituce, která způsobí že součástí

chromoforu není fenol, ale indol. YFP deriváty nesou T203Y (threonin zaměnen za tyrozin) mutaci. Analog GFP - RFP se liší hlavně strukturou chromoforu. (viz Obr. 2.17)

Další mutace vedly k pH senzitivním mutantám GFP známým jako pHluoriny. Tyto varianty dokážou rychle a reverzibilně reagovat na změny pH. Podstatou jsou změny v H-H vazbách na chromoforu (citlivost na změnu pH vyplývá z protonace chromoforového fenolátu). Jednou z největších výhod GFP oproti jiným molekulám schopným poskytovat informace o pH je možnost je zacílit do buněčných organel *in vivo*, v reálném čase a jejich rozlišení ve fluorescenčním mikroskopu je prostorové. Proto se s oblibou používají např. při studiích vývoje buněk (např. se měří pH gradienty ustalující polaritu buňky). GFP je vysoce stabilní a netoxická molekula, pKa chromoforu rozličných variant GFP leží v rozmezí 6-8 a to nám umožňuje měřit pH 5-9, tedy i alkalických organel jako jsou mitochondrie.



Obr. 2.17: GFP analog – DsRed proteinu má dvojitou vazbu navíc (vyznačená žlutě).

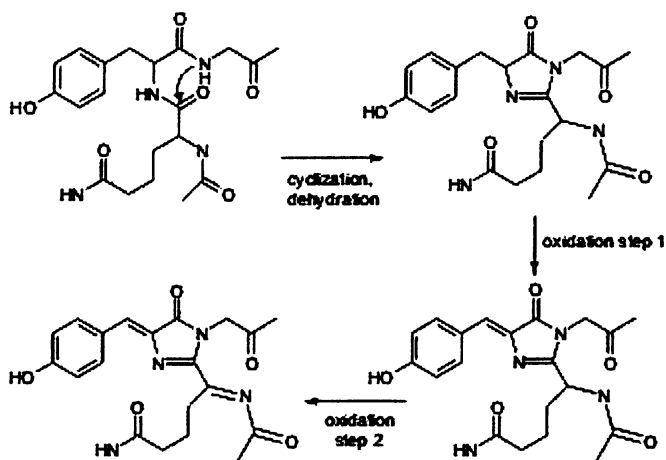
### 2.7.3.1 „Red Fluorescent Protein“ RFP z koralu *Discosoma* sp.

Červený fluorescenční protein („red fluorescent protein“, RFP) nazývaný DsRed byl izolován z korálu *Discosoma* sp. Ačkoliv molekula pochází z nepříbuzného organismu, má stejný tvar soudku složený z  $\beta$ -listů a stejnou velikost jako GFP, liší se strukturou chromoforu (viz Obr. 2.17).

Princip fluorescence je u RFP značně podobný fluorescenci zelené varianty, avšak funkční protein tvoří 4 identické podjednotky. Chromofor je vytvořen cyklizací glutaminu<sup>66</sup>, tyrozinu<sup>67</sup> a glycinu<sup>68</sup> podle schématu na obrázku 2.18.

Fluorescence je výsledkem postupných kroků autokatalytického procesu, který nevyžaduje žádné kofaktory ani enzymy. (MIYAWAKI et al. 2003)

Během zrání tetrameru RFP se v druhém kroku oxiduje jenom část chromoforů, takže ve skutečnosti dostáváme směs zelené a červené fluorescenční barvy.



Obr. 2.18: Schéma tvorby chromoforu u DsRFP. Amidový uhlík tyrozinu67 se váže s glutaminem66 (tuto reakci provází vyloučení molekuly vody) za tvorby imidazolového kruhu. Oxidační krok 1 (adice  $O_2 + H^+$  a eliminace  $H_2O$ ) tvoří zelenou fluorescenční strukturu. Oxidační krok 2 zahrnuje tvorbu červeného fluoreskujícího chromoforu (amidový dusík fenylalaninu65 vytvoří navíc  $\Pi$ -vazbu).

## 2.7.4 Metoda FRET

Pro studium interakce dvou proteinů, které jsou v těsném kontaktu se používá metoda FRET (Förster resonance energy transfer). Je založená na jevu, při kterém dochází k přenosu energie mezi dvěma chromofory.

Molekula donoru je excitována při specifické excitační vlnové délce. Prostřednictvím dipól-dipólové interakce se tento excitovaný stav přeneše na druhou molekulu, tzv. akceptor. Donor se vrátí do stavu o nejnižší elektrické energii.

Když jsou donor i akceptor fluorescenční molekuly, používá se často termín "fluorescence resonance energy transfer", i když energie není přenášena fluorescencí.

Účinnost FRET závisí na třech parametrech: i.) na vzdálenost mezi donorem a akceptorem ii.) na překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru a iii.) na relativní orientaci emisního dipólového momentu donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru.

Platí následující vztah:

$$E = 1/(1 + (r/R_0)^6)$$

E – efektivita FRET

r – vzdálenost donoru a akceptoru

$R_0$  – Försterova vzdálenost donoru a akceptoru, při které je efektivita FRET 50%

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použité mikroorganismy

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ :

F<sup>-</sup>, recA1, endA1, gyrA96, thi<sup>-</sup>, supE44, relA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub>),  $\lambda^-$ ,  $\Delta$  (argF-lacZya), U169,  $\Phi$ 80 lac ZM15

*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 ze sbírky EUROSCARF

MAT $\alpha$ , HIS3, URA3, LEU2, LYS2

Divoké kmeny *Saccharomyces cerevisiae* BR-F z Chemického ústavu Akademie věd v Bratislavě (kat.č. CCY21-4-97) a domestikovaný kmen BR-S (isolovaný v naší laboratoři)

Mutantní kmeny *Saccharomyces cerevisiae*: (zakoupené ze sbírky EUROSCARF)

*sok2*: BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR016c::kanMX4

*ctt1*: BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR088w::kanMX4

*sod1*: BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YJR104c::kanMX4

*sod2*: BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YHR008c::kanMX4

Kmen EMO1/3 (*PDR1*, *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1*) je rodičovský kmen, z kterého bylo vytvořeno několik mutant, které nesou místo původního genu *PDR1* jeho alelu *PDR1-3* (CARVAJAL et al. 1997), která kóduje Pdr1-3p transkripční faktor, která způsobuje heperexpresi řady genů včetně skupiny *PDR* transportérů. (viz. kapitola). Jedním z těchto kmenů je kmen US50-18c (*PDR1-3*, *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1*) použitý v této práci.

#### 3.1.2 Použité plazmidy

Všechny použité vektory sloužily jako templát pro PCR integračních kazet pro následnou transformaci kvasinkových buněk a fluorescenční značení C-konce zvoleného proteinu (vytvoření fúzních proteinů s různými fluorescenčními proteiny). Umožňují udržení, replikaci

a selekci v buňkách *E.coli*, selekčním markerem pro buňky *E.coli* je ve všech případech ampicilinová rezistence Amp<sup>r</sup>.

### pKT209 plazmid (Obr. 3.1)

Transformované buňky *E.coli* jsou rezistentní k ampicilinu. Jako selekční znak pro transformaci kvasinek obsahuje plazmid pKT209 URA3 gen z *Candida albicans*. CaURA3 komplementuje mutaci *ura3* *S.cerevisiae*. V integrační kazetě protein našeho zájmu fúzuje svým C koncem s yEGFP.

Plazmid byl zakoupen ze sbírky EUROSCARF.

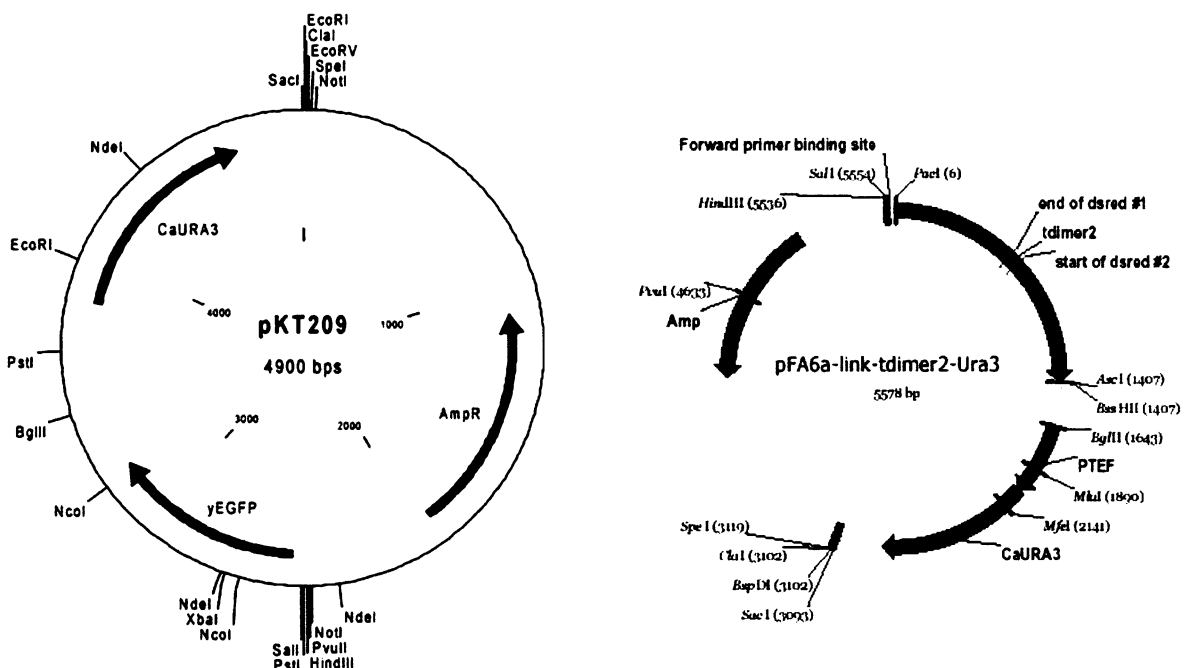
### pKT176 plazmid (Obr. 3.1)

Délka 5578 bp, nese gen tdimer2 s promotorem PTEF, gen pro ampicilinovou rezistenci a CaURA3 pro selekci v kvasinkách.

### pMK199

pFA6a-6A5-GFP-kanMX 6, poskytnutý K. Malinskou (MBU, Praha)

Plazmid nese gen pro kanamycinovou rezistenci a yEGFP protein.



Obr. 3.1: Plazmidy pKT209 a pKT176 využívané pro přípravu PCR kazet obsahujících gen pro fluorescenční protein a selekční znak pro kvasinkové buňky.

### 3.1.3 Materiál pro práci s DNA

Salmon sperm ssDNA (BioLabs)

PPP Master Mix (TopBio)

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 u/ml Taq Purple DNA polymerasa

stabilizátory, barviva

Primery (KRD):

*ATO1-pKT forward*

tat gta ctg gct cgt cca ttc cca tta cca tct act gaa agg gta atc ttt ggt gac ggt gct ggt tta

*ATO1-pKT reverse*

aaa act act ctt ttt tat ttc aat agt tct cgt tat tag tag gtc gtc ctc tcg atg aat tcg agc tcg

*ATO2-pKT forward*

tac att atg gtc cat cca ttc gca tta cct agc aat gat aag gtg ttc ttc ggt gac ggt gct ggt tta

*ATO2-pKT reverse*

tta gaa tat ata ata ggg gta aaa gtt att tta gcc tgc act ttt gtg ttt tcg atg aat tcg agc tcg

*ATO3-pKT forward*

cct tca aat tct tat tta gcc ttc agg gcg cac aca atg cca aat gct cct ggt gac ggt gct ggt tta

*ATO3-pKT reverse*

tta tta aat cat ttt aat gtt tta taa gtt ttg ttt ttc att tca tac cct tcg atg aat tcg agc tcg

*ATO1-pMK199 forward*

tat gta ctg gct cgt cca ttc cca tta cca tct act gaa agg gta atc ttt gga gca ggt gct ggt gct  
ggt gct gga gca

*ATO1-pMK199 reverse*

aaa act act ctt ttt tat ttc aat agt tct cgt tat tag tag gtc gtg ctc tca atc gat gaa ttc gag ctc  
gtt taa ac

### 3.1.4 Antibiotika a ostatní

Ampicilin (BIOTICA)

G418 (Amersam LIFE SCIENCE)

BKP (bromkresolový purpur) (Sigma)

## 3.2 Přístroje

analytické váhy Metter AE200

fluorescenční mikroskop Leica DMR

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

horkovzdušná třepačka (Lab-Therm, Kühner, Switzerland)

kamera barevná Hitachi HV-C20

kamera monochromatická Cohu

konfokální mikroskop Leica

mikrocentrifuga a centrifuga s výkyvným rotorem BOECO, Germany

mikrocentrifuga Micro20 (Hettich)

PCR termocycler „Minicycler“ (MS Research)

PCR termocycler XP cyclor (Bioer)

pH-metr (Labio, a.s.)

spektrofotometr SPEKOL11 (Carl Zeiss, Jena)

spektrofotometr SPEKTROMOM (Budapest, Hungary)

termostaty

UV transiluminátor „Electronic Dual light<sup>TM</sup>“ transilluminator (Ultra Lum)

vodní lázeň (Grant Instruments)

vortex Genie 2 (Scientific Industries)

zdroj pro elektroforézu (E-C Apparatus Corporation)



### 3.3 Použité internetové databáze a počítačové programy

Saccharomyces Genome Database (SGD)

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

Sequence Manipulation Suite

<http://bioinformatics.org/sms>

Oligo Calculator

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

NCBI Blast

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

Macaw

TMHMM

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

LUCIA G/F (Laboratory Imaging)-software pro analýzu obrazu

NIS ELEMENTS (Laboratory Imaging) – software pro analýzu obrazu

### 3.4 Roztoky a média

Pozn.: Demineralizovaná a destilovaná voda do médií byla upravená přístrojem Ultrapur (Waltrex). Pokud není uvedeno jinak pochází chemiálie od firmy Lachema Brno.

#### 3.4.1 Roztoky

1M LiAc                    10,2 g CH<sub>3</sub>COOLi (Serva) na 100 ml H<sub>2</sub>O

3M NaAc                    24,6 g CH<sub>3</sub>COONa na 100 ml H<sub>2</sub>O

1000x EtBr                10 mg ethidium bromidu (Serva) na 1 ml H<sub>2</sub>O

1M Tris-HCl                12,1 g Tris báze (Serva) na 100 ml H<sub>2</sub>O  
pH upraveno HCl dle potřeby

0,5M EDTA-NaOH	18,6 g Na <sub>3</sub> EDTA (Serva) na 100 ml H <sub>2</sub> O pH upraveno NaOH dle potřeby
5M NaCl	29,3 g NaCl na 100 ml H <sub>2</sub> O
1% agarosový gel	0,25 g agarosy rozvařeno v 25 ml 0,5x TBE pufru
20x BKP	2 mg BKP (brom kresolového purpuru) (Sigma) na 1 ml H <sub>2</sub> O
TBE 0,5x	20 mM Tris (Serva) 1 mM EDTA (Sigma) 45 mM kyselina boritá
RI	1% glukosa 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) (Serva) 10 mM EDTA-NaOH (pH 8,0) (Sigma)
RII	0,2 M NaOH 1% SDS (Serva)
RIII	29,44 g CH <sub>3</sub> COOK 11,5 ml ledové CH <sub>3</sub> COOH doplnit H <sub>2</sub> O na 100 ml
TE	10 mM Tris-HCl (pH=7,5) (Serva) 1 mM EDTA-NaOH (pH=8,0) (Sigma)
TE/LiAc	10 mM Tris-HCl (pH=7,5) (Serva) 1 mM EDTA-NaOH (pH=7,5) (Sigma) 100 mM LiAc (SIGMA)
PEG/TE/LiAc	40% PEG (Sigma) 10 mM Tris-HCl (pH=7,5) (Serva) 1 mM EDTA-NaOH (pH=7,5) (Sigma) 100 mM LiAc (SIGMA)

T mix (pro jednu transformaci)	PEG (50%) (Sigma)	240 $\mu$ l
	LiAc 1M (Sigma)	36 $\mu$ l
	salmon sperm ssDNA (2 mg/ml)(Sigma)	300 $\mu$ l
	plazmidová DNA + H <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l

10mM MES pufr pH 6,0 (Sigma) (pH upravené pomocí NaOH) (Sigma)

Bradfordovo činidlo 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml 96% etanolu a 100 ml  
85% kyseliny fosforečné

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

Upravený chloroform smíchan s isoamylalkoholem v poměru 24:1

2,45 mM NBT (nitrobluetetrazolium)

20 mg NBT/10 ml vody – uchovávat v temnu

36 mM fosfátový pufr pH 7,8

36mM hydrofosforečnan draselný (0,627g/100ml) pH 9

36mM dihydrofosforečnan draselný (0,490g/100ml) pH 4.

Roztokem hydrofosforečnanu draselného titrujeme roztok dihydrofosforečnanu draselného na  
pH 7,8.

50 mM fosfátový pufr pH 7

50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,8705 g/100 ml)

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( 0,68045 g/100 ml)

Roztokem K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> titrujeme roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na pátřičné pH.

TEMED s riboflavínem

10,6 mg riboflavínu na 10 ml fosfátového pufru pH 7,8; 36  $\mu$ l TEMED (Serva)

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin

5% zaostřovací gel: 1,48 ml destilovaná voda  
0,25 ml 40% směs akrylamidu a bisakrylamidu (Serva)  
0,25 ml 1M Tris-HCl pufr pH 6,8  
20 µl 10% roztoku peroxidisíranu amonného  
2 µl TEMED (Serva)

12% separační gel: 4,3 ml destilovaná voda  
3 ml 40% směs akrylamidu a bisakrylamidu (Serva)  
2,5 ml 1,5 M Tris - HCl pufr, pH 8,8 (Sigma)  
100 µl 10% roztoku peroxidisíranu amonného (Serva)  
4 µl TEMED (Serva)

DAB (diaminobenzidin): 3,5 mg DAB/7,5 ml vody  
roztok peroxidázy: 750 µg peroxidázy/15 ml 50 mM fosfátový pufr pH 7

Mix I.                    50 µl 1M Tris pH 8 (Serva)  
                              20 µl 0,5 M EDTA pH 8 (Sigma)  
                              3 µl merkptoetanol (Sigma)  
                              1 mg zymolyáza (Sigma)  
                              1 ml vody

### 3.4.2 Médiá

TPN                    0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)  
                              0,5% NaCl  
                              1% baktopepton (Imuna)  
                              1% baktotrypton (Imuna)

SOC                    0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)  
                              2% baktopepton (Imuna)  
                              10 mM NaCl  
                              2,5 mM KCl  
                              20 mM glukosa

sterilizováno odděleně

10 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

10 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

- ŽBAmp 2,5% živný bujón č.2 (Imuna)  
po sterilizaci přidáme 50-100 µg ampicilinu (BIOTICA) na 1 ml média
- GM tekuté 1% kvasničný autolyzát (Imuna) (před sterilizací upravíme pH na 5,  
sterilizujeme odděleně)  
3% glycerol  
30 mM CaCl<sub>2</sub> (sterilizujeme odděleně)
- YEPG tekuté 1% kvasničný autolyzát (Imuna)  
1% pepton (Imuna)  
2% glukosa (sterilizujeme odděleně)
- Skladovací médium pro bakterie  
2,5% živný bujón č.2 (Imuna)  
15% glycerol
- Skladovací médium pro kvasinky  
1% kvasničný autolyzát (Imuna)  
2% pepton (Imuna)  
10% glukosa (sterilizujeme odděleně)  
60% glycerol
- ŽA s ampicilinem 4% živný agar č.2 (Imuna)  
po sterilizaci přidáme 50-100 µg ampicilinu (BIOTICA) na 1 ml média
- YEPG 1% kvasničný autolyzát (Imuna)  
1% pepton (Imuna)  
2% agar (fa KULICH HK)  
2% glukosa (sterilizujeme odděleně)

GM 1% kvasničný autolyzát (Imuna) (před sterilizací upravíme pH na 5, sterilizujeme odděleně)  
2% agar (fa KULICH HK)  
3% glycerol  
30 mM CaCl<sub>2</sub> (sterilizujeme odděleně)

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

MM (minimální médium pro kvasinky)-všechny složky sterilizujeme zvlášť

2% agar (fa KULICH HK)

2% glukosa

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

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

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

20 µg aminokyseliny\*) na 1 ml média

50 µg báze\*) na 1 ml média

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

Wickerhamův roztok:

0,2 mg biotin

200 mg inositol

20 mg riboflavin

40 mg thiamin

20 mg kyselina p-aminobenzoová

40 mg pantotenát vápenatý

40 mg kyselina nikotinová

0,2 mg kyselina listová

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

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

## **3.5 Metody**

### **3.5.1 Sterilizace**

Chemické sklo, roztoky, médiá, párátko, špičky k mikropipetám a mikrozskumavky jsem sterilizovala suchým teplem v autoklávu při 160 °C 180 minut. Plastové centrifugační zkumavky a kyvety pro elektroporaci byly sterilizovány nejméně 24 hodin parami kyseliny peroctové v uzavřeném igelitovém sáčku. Drobné předměty jsem sterilizovala namočením do etanolu a žíháním nad plamenem kahanu.

### **3.5.2 Kultivace**

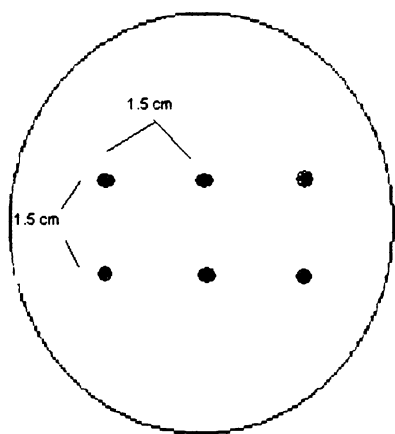
Buňky v tekutých médiích jsem kultivovala aerobně v horkovzdušné třepačce, buňky na pevných médiích v termostatu při 28 C (kvasinkové kmeny) nebo při 37 C (bakteriální kmeny).

### **3.5.3 Uchovávání kmenů**

Bakteriální i kvasinkové kmeny jsem krátkodobě uchovávala na Petriho miskách v lednici při 4 °C. Pro dlouhodobé uchovávání jsem pro kvasinky použila skladovací médium a kmeny uchovávala v hlubokomrazícím boxu při –80 °C. Bakteriální kmeny jsem uchovávala též při –80 °C, jako médium jsem použila živný bujón č.2 s 10% glycerolem.

### **3.5.4 Nakapání obřích kolonií**

Při experimentech s kvasinkovými koloniemi jsem pracovala s obřimi koloniemi. Biomasu jsem naředila v destilované vodě na OD cca 10. Kapala jsem 6x 10 µl suspenze podle obr. 3.2.



Obr. 3.2: Nanášení obřích kolonií Na Petriho misky s agarem. Vzdálenost kapek (10  $\mu$ l suspenze) je 1,5 cm.

### 3.5.5 Počítání buněk

#### 3.5.5.1 Počítání buněk v Thomově komůrce

Počet buněk na 1 ml kultury či suspenze jsem stanovovala pomocí Thomovy počítací komůrky a světelného mikroskopu při zvětšení 10 x 15. Pro počítací komůrku platí, že nejmenší čtvereček má plochu  $1/400 \text{ mm}^2$ , objem nad ním je  $1/4000 \text{ mm}^3$ .

#### 3.5.5.2 Počítání buněk stanovením optické denzity

Optickou densitu kultury jsem měřila na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. K měření jsem používala kyvety s optickou dráhou 1 cm, jako blank jsem použila příslušné médium. Optická denzita 0,1 odpovídala  $1 \cdot 10^6$  buněk/ml.

### 3.5.6 Transformace kvasinek LiAc metodou

#### 3.5.6.1 Příprava kompetentních buněk

Kompetentní buňky je potřeba připravit těsně před transformací. Používají se zásadně čerstvě připravené, nelze je skladovat. Při práci jsem striktně dodržovala sterilní postup. Z konzervy jsem zaočkovala kmeny na YEPG plotny a nechala přes noc růst v termostatu při  $28^\circ\text{C}$ . Na druhý den jsem kmeny zaočkovala do tekutého YEPG (250 ml baňka, cca 50 ml média) a nechala přes noc růst na třepačce ( $28^\circ\text{C}$ ).



Ráno jsem spočítala buňky a naředila jsem je do 50 ml YEPG na výslednou koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml a dala na třepačku. Nechala jsem je růst 2 generační doby (2-4 hodiny) a opět spočítala. Buňky jsem nalila do 50 ml falkonky a stočila 10 minut, 5000 ot/min, 22 °C. 2x jsem promývala demi H<sub>2</sub>O (10 ml) (10 minut, 5000 ot/min, 22 °C) a 1x jsem promývala v 10 ml Te/LiAc (10 minut, 5000 ot/min, 22 °C) Sediment jsem resuspendovala v Te/LiAc tak, abych získala koncentraci  $2 \cdot 10^9$  buněk/ml.

### 3.5.6.2 Vlastní transformace

Buňky jsem inkubovala 15 minut při 28°C. 50 µl suspenze (obsahuje  $10^8$  kompetentních buněk) jsem smíchala s 50 µg salmon sperm ssDNA (předem krátce povařeně), plazmidovou DNA (množství dle odhadu) a 300 µl PEG/TE/LiAc a opatrně promíchala. Pak jsem buňky inkubovala 30 minut při 28°C a poté 20 minut v 42°C lázni. 15 sekund jsem je centrifugovala a pak odstranila supernatant. Buňky jsem resuspendovala v cca 400 µl vody a vysela na selekční plotny po 10, 100 µl a 290 µl . Pokud byla jako selekční znak využívána rezistence na antibiotikum, buňky jsem po stočení nechala 2 hod v YEPG (1ml) v termostatu, pak jsem je teprve vysela na selekční plotny. Buňky byly kultivovány při 28°C 3-4 dny.

### 3.5.6.3 Alternativní protokol transformace kvasinek

Z konzervy jsem zaočkovala kmeny na YEPG plotny a nechala přes noc růst v termostatu při 28°C. Druhý den jsem inokulem buněk zaočkovala 5 ml tekutého YEPG média a inkubovala přes noc při 28 °C. Ráno jsem spočítala buňky a naředila jsem je do 50 ml YEPG na výslednou koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml a dala na třepačku. Nechala jsem je růst 2 generační doby (2-4 hodiny). Buňky jsem centrifugovala 10 minut, 5000 ot/min, 22 °C. 2x jsem promývala demi H<sub>2</sub>O (20 ml) (10 minut, 5000 ot/min, 22 °C). Pak jsem buňky přenesla do 1 ml demi H<sub>2</sub>O a opět centrifugovala (5 minut, 6000 ot/min, 22 °C). 100 µl směsi ( $10^8$  buněk) jsem přenesla do 1,5 ml eppendorfky a opět centrifugovala (3 minut, 8000 ot/min, 22 °C). Odsála jsem supernatant. Přidala jsem 360 µl T mix a opatrně resuspendovala. Buňky jsem inkubovala v 42°C lázni 40 minut. 15 sekund jsem je centrifugovala a pak odstranila supernatant. Buňky jsem resuspendovala v cca 400 µl vody a vysela na selekční plotny po 10, 100 µl a 290 µl . Pokud byla jako selekční znak využívána rezistence na antibiotikum, buňky jsem po stočení nechala 2 hod v YEPG (1ml) v termostatu, pak jsem je teprve vysela na selekční plotny. Buňky byly kultivovány při 28°C 3-4 dny.

### 3.5.7 Příprava kompetentních buněk *E.coli*

Kompetentní bakteriální buňky slouží jako nástroj pro následnou práci s plazmidy – tzv. transformaci bakteriálních buněk, při které je plazmid vnesen do bakteriální buňky a může být dále pomnožen. Kvalitu kompetentních buněk (a tedy jejich možnost využití při transformaci) snižuje přítomnost iontů, proto jsem je velmi důkladně promývala (viz dále). Vytvořené buňky se mohou skladovat po neomezeně dlouhou dobu v hlubokomrazícím boxu ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a jsou tak připravené k okamžitému použití.

Bakteriální buňky jsem zaočkovala z konzervy do 30 ml TPN média (dbala jsem na to, aby aerace byla alespoň pětinasobná). Inkubovala jsem je přes noc v horkovzdušné třepačce při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inokulem jsem následující ráno zaočkovala požadované množství TPN média na  $\text{OD}_{560}$  0,1-0,2 a inkubovala v horkovzdušné třepačce při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dokud se  $\text{OD}_{560}$  nepohybovalo v rozmezí 0,7-0,8. Pak jsem dala buňky na led a dále jsem již pracovala pokud možno při  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Narostlou kulturu jsem dala do ledové lázně, přelila do falkonek a stočila v předchlazené centrifuze ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min., 4000 ot./min). Narostlou kulturu jsem dala na led, přelila do falkonek a stočila v předchlazené centrifuze ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min., 4000 ot./min). Supernatant jsem slila a pelet v každé falkonce jsem resuspendovala v 50 ml předchlazené demi vody. Buňky jsem opět stočila ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min., 4000 ot./min) a opět slila supernatant. Pelet v každé falkonce jsem resuspendovala v takovém objemu chlazeného 10% glycerolu, aby po spojení peletů ze všech falkonek byl výsledný objem 10 ml. Po resuspendování jsem pelety spojila do jedné falkonky a stočila ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min., 4000 ot./min). Hustou suspenzi buněk jsem rozplnila po 50  $\mu\text{l}$  do mikrozkuhavek a ty jsem hned umístila do vymrazovacího stojánku. Ve stojánku jsem je na chvíli (cca 20-30 min) umístila do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mrazáku, dokud suspenze nezmrzla. Eppendorfy jsem přemístila do papírové krabičky a přenesla do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mrazáku pro dlouhodobé skladování. 10  $\mu\text{l}$  suspenze buněk jsem vysela na plotnu ŽAmp pro kontrolní ověření, že buňky nejsou kontaminované buňkami rezistentními k ampicilinu a umístila jsem je na 24 hodinovou kultivaci do termostatu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.8 Elektroporace

Roztoky i použité laboratorní sklo byly sterilní a dbala jsem na to, aby elektroporace proběhla co nejrychleji.

Elektroporátor jsem nastavila na hodnoty 25  $\mu\text{F}$ , 2,5 kV a  $200\Omega$ . Kompetentní buňky jsem držela v ledové lázni. K 50  $\mu\text{l}$  kompetentních buněk *E.coli* DH5 $\alpha$  jsem přidala 1-2  $\mu\text{l}$

(asi 100-150 ng) příslušného roztoku DNA, promíchala a inkubovala 1 minutu na ledu. Směs jsem přenesla do předchlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm), kyvetu vložila do přístroje pro elektroporaci a aplikovala puls stejnosměrného napětí. Poté jsem do kyvety rychle přidala 1 ml SOC média a směs převedla do Erlenmayerovy baňky. Buňky jsem aerobně kultivovala 1 hodinu v horkovzdušné třepačce při 37°C. 10 µl, 100 µl a zbytek buněčné suspenze jsem vysela na pevné selekční médium (ŽAmp) a kultivovala v termostatu přes noc při 37°C.

### **3.5.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií (midipreparace)**

Bakteriemi nesoucími příslušný plazmid jsem zaočkovala 100 ml ŽB s ampicilinem a kultivovala přes noc v horkovzdušné třepačce při 37°C. Narostlou kulturu jsem převedla do centrifugačních zkumavek (50 ml) a centrifugovala (10 min., 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). K peletu jsem přidala 4 ml roztoku I (do každé zkumavky jsem přidala 2 ml roztoku RI, pelety spojila a vortexovala) a 8 ml čerstvě připraveného roztoku RII, opatrným převrácením zkumavky jsem směs promíchala a inkubovala 5 min. při laboratorní teplotě. Poté jsem přidala 6 ml chlazeného roztoku RIII, opět opatrně promíchala a inkubovala 30 min v ledové lázni. Směs jsem centrifugovala (30 min, 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Supernatant jsem přefiltrovala přes gázu, přidala 0,8 objemu isopropanolu, krátce vortexovala a centrifugovala (30 min, 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). K sedimentu jsem přidala 2 ml 80 % ethanolu, krátce vortexovala a opět centrifugovala (10 min, 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Pelet jsem resuspendovala ve 400 µl TE, přidala 0,01 objemu RNázyA a inkubovala 30-60 min. při laboratorní teplotě. Roztok DNA jsem přečistila fenol-chloroformovou extrakcí. (kap. 10)

### **3.5.10 Přečištění plazmidové DNA fenol-chloroformovou extrakcí a srážením ethanolom**

K roztoku DNA jsem přidala stejný objem upraveného fenolu a centrifugovala jsem 10 min. při 5500 ot.min<sup>-1</sup>. Odebrala jsem horní vodnou fázi, přidala k ní 0,5 objemu upraveného fenolu a 0,5 objemu upraveného chloroformu a centrifugovala (10 min., 5500 ot.min<sup>-1</sup>); tento krok jsem opakovala, dokud nezmizela bílá mezifáze vysrážených proteinů. Poté jsem k odebrané horní fázi přidala stejný objem upraveného chloroformu a opět centrifugovala (10 min., 5500 ot.min<sup>-1</sup>). DNA v odebrané vodné fázi jsem srážela 96% ethanolom: K roztoku DNA jsem přidala 2,5 objemu ledově studeného 96% ethanolu a 0,1 výsledného objemu 3M NaAc. DNA jsem srážela přes noc při -20°C. Druhý den jsem sraženinu centrifugovala (40

min., 4°C, 14 000 ot.min<sup>-1</sup>), pelet jsem vysušila při laboratorní teplotě a poté resuspendovala v TE pufru nebo demiH<sub>2</sub>O (objem jsem volila dle očekávaného množství DNA). Dále jsem roztok DNA skladovala při -20°C.

### **3.5.11 Izolace chromozomální DNA kvasinek pomocí zymolyázy**

Inokulum kvasinek jsem zaočkovala do tekutého YEPG a třápala přes noc při 28°C. Ráno jsem 2 minuty stočila (4000 ot.min<sup>-1</sup>) 2 ml narostlé kultury. Sediment jsem resuspendovala ve 150 µl Mixu I. a inkubovala 1 hodinu ve 37°C. Pak jsem přidala 20 µl 10% SDS a 100 µl 7,5 M octanu amonného. Vzorky jsem umístila na 16 minut do -80°C. Pak jsem je 15 minut stočila (15 000 rpm) a supernatant přečistila fenol-chloroformovou extrakcí (kap. 3.5.10)

### **3.5.12 Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu**

Přítomnost příslušné DNA (PCR produktu, plazmidu) ve vzorku jsem zjišťovala pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. Používala jsem 1% agarosový gel. Potřebné množství agarosu jsem rozehrála ve 25 ml TBE pufru a po částečném ochlazení (přibližně na 60°C) přidala tisícinu objemu ethidium bromidu. Agarosu jsem nalila do bločku z plexiskla a do vzdálenosti 0,5-1 cm od okraje umístila hřeben. Když gel ztuhl, umístila jsem jej i s bločkem do elektroforetické vaničky a přelila TBE pufrem tak, aby hladina sahala nad povrch gelu. Poté jsem vyjmula hřeben a do vzniklých jamek nanášela vzorky DNA smíchané s bromfenolovou modří. Aparaturu jsem připojila ke zdroji stejnosměrného napětí a velikost vloženého napětí nastavila tak, aby odpovídalo hodnotě přibližně 5 V.cm<sup>-1</sup>. Když byla hranice tvořená bromfenolovou modří asi 1 cm od okraje gelu, odpojila jsem zdroj napětí. Gel jsem prohlížela pod UV transiluminátorem.

### **3.5.13 PCR**

Do mikrozkušavek pro PCR jsem pipetovala jednotlivé složky nezbytné pro proběhnutí PCR. Jako optimální se v mém případě ukázala být následující kombinace:

Pro pKT176 - ATO1,2,3-GFP:

12,5 µl PCR premix

1,5 µl přímý primer (10x ředěný 100pmol/µl)

1,5 µl reverzní primer (10x ředěný 100pmol/µl)

1 µl templátová DNA (120x ředená)

8,5 µl PCR H<sub>2</sub>O

Po vložení do PCR přístroje jsem spustila následující program:

1. 5 min 94°C

2. 30 sec 94°C

3. 30 sec 55°C(Ato1) 58°C(Ato2,3)

4. 2,5 min 72°C

5. krok 2-4 opakovat 8x

6. 30 sec 94°C

7. 2,5 min 72°C

8. krok 6-7 opakovat 25x

9. 12 min 72°C

Pro pMK199 – Ato1:

12,5 µl PCR premix

1 µl přímý primer (10x ředěný 100pmol/µl)

1 µl reverzní primer (10x ředěný 100pmol/µl)

0,5 µl templátová DNA (100x ředená)

10 µl PCR H<sub>2</sub>O

Po vložení do PCR přístroje jsem spustila následující program:

1. 5 min 94°C

2. 30 sec 94°C

3. 30 sec 48°C

4. 2,5 min 72°C

5. krok 2-4 opakovat 8x

- 6. 30 sec 94°C
- 7. 2,5 min 72°C
- 8. krok 6-7 opakovat 25x
- 9. 12 min 72°C

Pro pKT176 – Ato1,2,3-RFP:

- 12,5 µl PCR premix
- 1 µl přímý primer (40x ředěný 100pmol/µl)
- 1 µl reverzní primer (40x ředěný 100pmol/µl)
- 1 µl templátová DNA (25x ředená)
- 9,5 µl PCR H<sub>2</sub>O

Po vložení do PCR přístroje jsem spustila následující program:

- 1. 5 min 94°C
- 2. 30 sec 94°C
- 3. 45 sec 64°C
- 4. 3 min 72°C
- 5. krok 2-5 opakovat 35x
- 6. 12 min 72°C

### 3.5.14 Nativní PAGE

Pomocí alkoholu a čistícího prostředku jsem dobře odmastila a očistila hřebínky a skla pro nalévání gelů. Do stojánku umístěného na rovné ploše jsem vložila delší sklo opatřené spacery a následně na vnitřní stranu kratší sklo tak, aby vznikla kazeta. Separační gel jsem používala 12%. Směs pro separační gel jsem nalila mezi dvě skla tak, aby hladina dosahovala cca 0,25 cm pod hroty zasunutého hřebínku. Opatrně jsem gel převrstvila destilovanou vodou. Po skončení polymerace (cca 30 minut) jsem destilovanou vodu slila a nakonec odsála proužkem filtračního papíru.

Zaostřovací gel jsem používala 5%. Směs pro zaostřovací gel jsem napipetovala na separační gel a opatrně vsunula hřebínek tak, aby na spodní hraně jednotlivých hrotů nezůstaly žádné vzduchové bublinky. Po skončení polymerace (cca 20 minut) jsem hřebínek odstranila.

Skla s připravenými zpolymerovanými gely jsem uvolnila ze stojánku a vložila do elektroforetické aparatury. Po nanesení vzorků jsem aparaturu zapojila na napětí 125 V. Elektroforetické dělení jsem nechala probíhat tak dlouho, až bromfenolová modř doputovala na úroveň dolního okraje skel (cca 80 minut). Pro elektroforézu jsem používala elektrodotový pufr bez SDS.

### 3.5.15 Nanášení vzorků pro detekci SOD a CTT

Na připravený gel jsem nanášela různé koncentrace standardní SOD a CTT jako standard pro kvantitativní vyhodnocení. Jedna jednotka komerční SOD (SIGMA) je definována jako takové množství, které inhibuje rychlost redukce cytochromu C z 50% ve spojení se systémem xantin+xantin oxidasa při pH 7,8 a 25 °C ve 3 ml

Roztok SOD 3 000U/ml jsem ředila následujícím způsobem (VP – vzorkový pufr):

A) 10x zředěn vodou - tedy koncentrace zde byla 300U/ml ve 12  $\mu$ l

B) 5  $\mu$ l A + 45  $\mu$ l MES => 30  $\mu$ l B + 10  $\mu$ l VP = B1 - 10  $\mu$ l B1 + 50  $\mu$ l X = **e** (45,00mU)

C) 10  $\mu$ l B + 90  $\mu$ l MES => 60  $\mu$ l C + 10  $\mu$ l VP = C1-10  $\mu$ l C1 + 50  $\mu$ l X = **b** (4,50mU)

20  $\mu$ l C1 + 40  $\mu$ l X = **c** (9,00mU)

20  $\mu$ l C1 + 4  $\mu$ l X = **d** (22,50mU)

X) 300  $\mu$ l MES + 100  $\mu$ l VP

Na gel jsem nanášela **e, c a d** ředení. Ve 12  $\mu$ l **e** je 45 mU, v **c** 9 mU a v **d** 22,5 mU.

12  $\mu$ l (objem včetně vzorkového pufru) nanášené směsi obsahuje 10  $\mu$ g enzymu.

Ředění komerční katalázy (fa Boehringer Mannheim GmbH, 65 000 U/mg)

A) zásobní roztok 50 x zředěn 10 mM MESem (ph 6)

B) 10  $\mu$ l A + 90  $\mu$ l MESu => 30  $\mu$ l B

C)  $10 \mu\text{l B} + 90 \mu\text{l MESu} \Rightarrow 30 \mu\text{l C} + 10 \mu\text{l VP} = \text{C1} \Rightarrow 10 \mu\text{l C1} + 50 \mu\text{l X} = \text{d}$

$\Rightarrow 20 \mu\text{l C1} + 40 \mu\text{l X} = \text{e}$

D)  $10 \mu\text{l C} + 90 \mu\text{l MESu} \Rightarrow 30 \mu\text{l D} + 10 \mu\text{l VP} = \text{D1} \Rightarrow 20 \mu\text{l D1} + 4 \mu\text{l X} = \text{c}$

X)  $300 \mu\text{l MES} + 100 \mu\text{l VP}$

Na gel jsem nanášela **e, c a d** ředení. Ve **12  $\mu\text{l}$  e** je **0,78 U**, v **c** **0,195 U** a v **d** **0,39 U**.

**12  $\mu\text{l}$**  (objem včetně vzorkového pufru) nanášené směsi obsahuje **17,5  $\mu\text{g}$  enzymu**.

Samotné vzorky jsem nanášela po **5, 7,5 a 12  $\mu\text{l}$** .

### 3.5.16 Rozbívání buněk

Kolonie narostlé na pevném médiu (YEPG) jsem posbírala do eppendorfky a zvážila. Podle váhy jsem přidala 200-300  $\mu\text{l}$  MES pufru s inhibitory proteáz (PIC, AEBSF, PMSF). Resuspendováním vznikla hustá suspenze do které jsem přidala balotinu (Glas beads, acid-washed Sigma G8772-100G) cca 2mm pod hladinu pufru.

Pro rozbíjení buněk jsem používala FASTPREP desintegrátor. 5x jsem buňky rozbíjela 20 vteřin na stupni intenzity 4, mezitím jsem je chladila minimálně 2 minuty na ledu. Lyzát jsem odsála do sterilní eppendorfky, balotiny jsem 2x dekantovala malým množstvím MESu (100  $\mu\text{l}$ ) a přidávala k výtěžku. Buňky jsem centrifugovala 1 min při 1000g a 4°C. Pak jsem supernatant opatrně odebrala do nové eppendorfky a opět centrifugovala (5 min, 1890g, 4°C). Supernatant tvořil hrubý lyzát se kterým jsem pracovala dál (stanovení bílkovin, viz kapitola 3.5.17).

### 3.5.17 Stanovení bílkovin metodou podle Bradfordové

#### *Princip metody*

Při vazbě Coomassie Brilliant Blue G250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 464 na 595 nm. Vzrůst absorbance na 595 nm může být použit jako měřítko koncentrace bílkovin. K posunu maxima dochází velmi rychle (2-5 minut) a vybarvení je stabilní nejméně jednu hodinu. Metoda je vhodná pro všechny proteiny, ačkoliv počet vazeb s barvivem může být proměnlivý v závislosti na obsahu bazických aminokyselin.



### *Vlastní postup*

Nejdřív jsem si udělala první „zkušební stanovení“. K 1  $\mu$ l vzorku jsem přidala do 800  $\mu$ l vody a 200  $\mu$ l Bradfordového činidla. Po deseti minutách jsem změřila absorbanci při 595 nm proti blanku (800  $\mu$ l vody a 200  $\mu$ l Bradfordového činidla). 0-10  $\mu$ g bílkoviny odpovídá absorbanci 0-0,600. Podle naměřených hodnot jsem vzorek doředita pufrem tak, aby bylo ve vzorcích přibližně stejné množství bílkovin, nejlépe 0,300 – tj. 5  $\mu$ g bílkovin.

Pak jsem lyzáty naředila 50x (980 $\mu$ l deionizované vody a 20 $\mu$ l lyzátu). Pro měření jsem používala 750  $\mu$ l vody, 50 $\mu$ l ředeného vzorku a 200  $\mu$ l činidla. po deseti minutách jsem změřila vzorky i blank (podle něj jsem přístroj vynulovala). Nakonec jsem spočítala koncentraci vzorků podle vzorce: Absorbance vzorku x 16666,6667 (koeficient pro stanovení z 50  $\mu$ l vzorku 50x ředeného) = mg bílkoviny/ml.

### **3.5.18 Stanovení superoxiddizmutázy (SOD)**

Z gelu po PAGE jsem opatrně sejmula horní sklo, odřízla zaostřovací gel a označila horní levý roh odkrojením jako počátek čtení vzorků. Gel jsem přenesla do nádoby s 10 ml roztoku NBT a za mírného třepání jsem inkubovala 20 minut v temnu. Po této fázi jsem gel jednou rychle opláchla vodou a ponořila do roztoku TEMEDu s riboflavinem. Gel jsem inkubovala dalších 15 minut v temnu. Pak jsem gel opláchla vodou, umístila mezi průhledné folie (gel jsem neustále uchovávala v co největším temnu) a potom vystavila dennímu světlu. Čím bylo intenzivnější světlo, tím rychleji se fialová barva vyvíjela. Gel jsem naskenovala a ihned zakryla. Gel jsem pak sušila mezi celofány v temnu.

### **3.5.19 Stanovení cytozolické katalázy (CTT)**

Z gelu po PAGE jsem opatrně sejmula horní sklo, odřízla zaostřovací gel a označila horní levý roh odkrojením jako počátek čtení vzorků. Potom jsem gel opatrně přemístila do 10 ml roztoku peroxidázy. Inkubovala jsem 45 minut při velice jemném míchání. Po 10 minutách jsem roztok peroxidázy slila, opláchla gel 2x destilovanou vodou a zalila 7,5 ml DABu. Inkubovala jsem za mírného míchání asi 5 minut (do dosažení dostatečného kontrastu). Gel jsem omyla vodou a zamokra skenovala mezi 2 průhlednými foliemi. Gel jsem pak sušila mezi celofány.

### **3.5.20 Mikroskopie fúzních proteinů s GFP a RFP**

Při mikroskopování a fotografování lokalizace fúzních proteinů s GFP a RFP jsem používala podložní sklíčka s kapkou vody. Buňky jsem pozorovala pod imerzním objektivem se zvětšením 100x. Využívala jsem filtry pro fluorescenci GFP (excitace modrá/emise zelená) a RFP (excitace zelená/emise červená).

Číslo v závorce uvedené u všech snímků fluorescenčně značených kvasinkových buněk označuje dobu snímání signálu (integraci signálu) a ukazuje tedy intenzitu fluorescence v daném vzorku. Pokud je u jednoho obrázku uvedeno víc částí kolonie (např. „vnější a střední část kolonie“) byla intenzita fluorescenčního signálu ve všech uvedených částech kolonie stejná a na obrázku jsou buňky reprezentativní pro všechny uvedené části.

Fluorescenční signál byl na fotografiích barevně upraven pomocí programu IrfanView.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Fluorescenční značení Ato proteinů

Cíl práce: Vytvořit kmeny různých mutantů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které by měly Ato transportéry značené fluorescenčními proteiny (GFP nebo RFP).

Předpokládaná funkce Ato proteinů je transport amonného kationtu ven z buňky (viz kapitola). Indukcí exprese a lokalizací Ato proteinů v koloniích rodičovského kmene BY4742 se již dříve zabývaly Mgr. Dita Strachotová (D. Strachotová, diplomová práce) a Mgr. Markéta Řicicová (M. Řicicová, dizertační práce). Za tímto účelem vytvořily kmeny BY4742 s Ato-proteiny značenými GFP (ŘICICOVÁ et al. 2007), YFP a CFP (D. Strachotová, diplomová práce). Gen pro daný fluorescenční protein byl pomocí homologní rekombinace vždy vložen přímo za příslušný Ato gen. Získané výsledky ukázaly, že všechny Ato proteiny jsou lokalizovány na plazmatické membráně. V menší míře je možné pozorovat i jejich vnitrobuněčnou lokalizaci ve váčcích neznámého původu, hlavně u Ato2p a Ato3p proteinů. K produkci Ato proteinů dochází současně se vstupem kvasinkových kolonií do druhé alkalické fáze. Indukce exprese *ATO* genů je velmi rychlá (PALKOVÁ et al. 2002) a produkce proteinů hned od začátku vysoká. (ŘICICOVÁ et al. 2007)

Cílem mojí práce bylo připravit kmeny vybraných mutant *S.cerevisiae* nesoucí Ato proteiny značené GFP a tyto kmeny použít pro zjištění produkce a lokalizace Ato proteinů během vývoje kolonií těchto mutant. Dalším úkolem bylo připravit kmeny nesoucí Ato proteiny značené fluorescenčním proteinem RFP a porovnat produkci a lokalizaci Ato-RFP s Ato-GFP. Konstruované Ato-RFP kmeny budou základem pro kolokalizační studie.

#### 4.1.1 Plazmidy pro fluorescenční značení Ato proteinů

Cílem mé práce bylo vytvořit kmeny *S. cerevisiae* nesoucí *ATO* geny fúzované s geny pro fluorescenční protein (GFP nebo RFP) přímo v kvasinkovém genomu. Fluorescenční gen bylo proto nutné integrovat do kvasinkového genomu za příslušný *ATO* gen pomocí homologní rekombinace. Takto značené kmeny jsou na rozdíl od kmenů značených pomocí transformace replikativním plazmidem stabilní a exprese *ATO-GFP* genů je regulována stejně jako exprese původních *ATO* genů.

Kmen *S.cerevisie* BY4742 a mutanty od něj odvozené jsou auxotrofní pro histidin, uracil, leucin a lyzin. Proto jsem pro přípravu integračních kazet mohla použít plazmidy, které mají jako selekční marker geny *HIS3*, *URA3*, *LEU2* nebo *LYS2* geny. Rozhodla jsem se pro plazmid pKT209 (zakoupený ze sbírky EUROSCARF, viz kapitola 3.1.2), který nese gen yEGFP (GFP varianta upravená pro kvasinky se zesílenou fluorescencí) a gen *URA3* umožňující selekci transformant v kmenech *ura3.URA3* gen *Candida albicans* nesený plasmidem pKT209 komplementuje *ura3* mutaci kmenů *S.cerevisiae*. Pro RFP značení jsem zvolila plazmid pKT176, který kromě genu pro DsRFP nese také gen *URA3* (viz Obr. 3.1). Pro značení prototrofních divokých kmenů kvasinek jsem nemohla použít plazmidy s auxotrofními geny. Musela jsem využít citlivost těchto kmenů k antibiotikům. Zvolila jsem proto plazmid pMK199, který nese gen pro yEGFP (EGFP- „Enhanced Green Fluorescent Protein“ ) v kombinaci s genem pro kanamycinovou rezistenci.

Vybranými plazmidy jsem transformovala kompetentní bakteriální buňky (viz kapitola 3.5.8). Po kultivaci transformantů jsem plazmidovou DNA vyizolovala (viz kapitola 3.5.9). Tuto DNA jsem dále použila jako templátovou DNA pro PCR.

#### 4.1.2 Příprava integračních kazet pomocí PCR (podmínky a primery)

Pro integraci genů pro GFP nebo RFP do specifického místa genomu kvasinky je potřeba připravit lineární fragment, který obsahuje gen pro fluorescenční protein a selekční marker použitelný v dané kvasinkové buňce (viz kapitola 3.5.13). Jeho oba konce musí být homologní s koncovou oblastí příslušného genu kam má být fragment vložen. Transformací se fragment dostane do buňky kde následnou homologní rekombinací vzniká fúzní gen, který má na 3' konci gen pro fluorescenční protein. Expres fluorescenčního genu se tak dostává pod kontrolu regulačních oblastí genu, za něž byl vložen.

Primery pro PCR jsem navrhovala tak, aby obsahovaly přibližně 20 b dlouhou část komplementární k plazmidové sekvenci a přibližně 50 b dlouhou část, která je homologní k místu kvasinkového genomu, do kterého jsem chtěla vložit kazetu nesoucí geny pro fluorescenční protein, tj. za příslušný *ATO* gen. V případě úseků primerů komplementárních k sekvenci plazmidu jsem se řídila doporučením dodavatelů uvedených plazmidů. Nástavce homologní k *ATO* genům byly následující:

*Ato1-forward*: tat gta ctg gct cgt cca ttc cca tta cca tct act gaa agg gta atc ttt ggt gac ggt gct ggt tta

*Ato1-reverz*: aaa act act ctt ttt tat ttc aat agt tct cgt tat tag tag gtc gtc ctc tcg atg aat tcg agc tcg

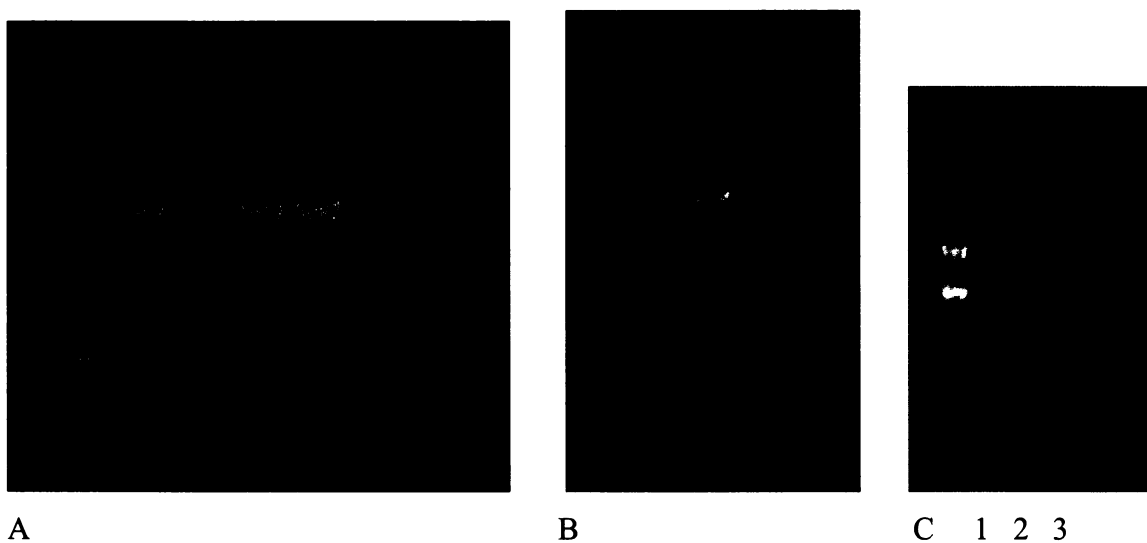
*Ato2-forward*: tac att atg gtc cat cca ttc gca tta cct agc aat gat aag gtg ttc ttc ggt gac ggt gct ggt tta

*Ato2-reverz*: tta gaa tat ata ata ggg gta aaa gtt att tta gcc tgc act ttt gtg ttt tcg atg aat tcg agc tcg

*Ato3-forward*: cct tca aat tct tat tta gcc ttc agg gcg cac aca atg cca aat gct cct ggt gac ggt gct ggt tta

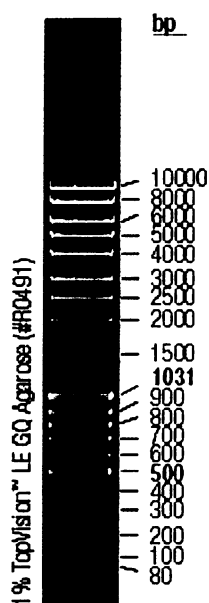
*Ato3-reverz*: tta tta aat cat ttt aat gtt tta taa gtt ttg ttt ttc att tca tac cct tcg atg aat tcg agc tcg

Pro zvýšení výtěžku jsem optimalizovala teplotu nasedání primerů, koncentraci templátové DNA a koncentraci primerů. Optimální programy pro konstrukci daných transformačních kazet jsou uvedeny v kapitole 3.5.13. Příklady transformačních kazet jsou na obr. 4.1.



Obr. 4.1: Transformační kazety připravené pomocí PCR A. pKT209-*ATO1* za různých podmínek PCR (nanáška vždy 5  $\mu$ l) B. 1  $\mu$ l pMK199-*ATO1* C 1  $\mu$ l pKT176-*ATO1*(1), *ATO2*(2), *ATO3*(3). Jako marker byl použit DNA Ladder Mix (GeneRuler)- viz Obr. 4.2

Připravené integrační kazety byly použity pro transformaci (viz kapitola 3.5.6) příslušných kvasinkových kmenů (viz kapitola 3.1.1).

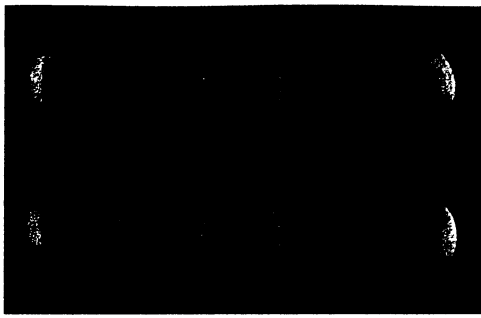


Obr. 4.2: Používaný marker DNA Ladder Mix (GeneRuler)

#### 4.1.3 Výběr transformant a sledování produkce a lokalizace Ato-GFP nebo Ato-RFP proteinů

U získaných transformovaných kmenů selektovaných na základě komplementace auxotrofie (kmen BY4742 a od něj odvozené mutanty), respektive získání resistance k antibiotiku G418 (divoké kmeny *S.cerevisiae*) jsem nejprve ověřila, zda dochází k produkci a správné membránové lokalizaci fluorescenčně značených Ato proteinů pomocí fluorescenčního mikroskopu. U vybraných transformant jsem poté pozorovala intenzitu produkce Ato proteinů v průběhu časového vývoje obřích kolonií příslušných kmenů pomocí fluorescenčního mikroskopu. V jednotlivých fázích vývoje kolonií jsem odebírala vzorky buněk ze tří oblastí kolonie (vnitřní a vnější okraj, střed kolonie) (viz Obr. 4.3) a zjišťovala přítomnost a lokalizaci Ato proteinů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Vzorky pro pozorování jsem odebírala v intervalech během celého průběhu přechodu kolonií z acidické do alkalické fáze a zpět do 2. acidické fáze.

Vzorky jsem pozorovala pod 100 násobným zvětšením za použití příslušných barevných filtrů (viz kapitola 3.5.20). Jako software pro analýzu obrazu jsem používala NIS ELEMENTS (Laboratory Imaging).



Obr. 4.3: Oblasti kvasinkové kolonie ze kterých jsem odebírala vzorky pro mikroskopování. Černá šipka označuje vnitřní okraj kolonie, červená střed a zelená vnější okraj kolonie.

## 4.2 Fluorescenční značení Ato proteinů rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742

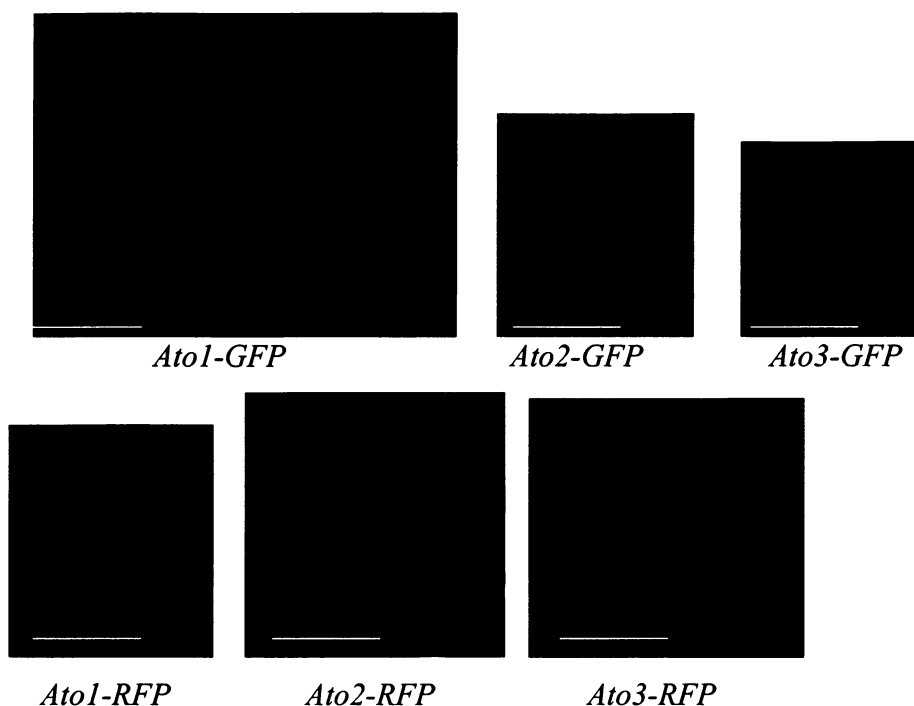
*Cíl: Zjištění lokalizace jednotlivých Ato transportérů značených buď zeleným fluorescenčním proteinem GFP nebo červeným fluorescenčním proteinem RFP v rámci kvasinkové buňky. Porovnání jejich produkce ve vnitřní, vnější a střední části kolonie v průběhu časového vývoje kolonie. Porovnání vývoje fluorescence GFP a RFP variant Ato proteinů.*

Kmen *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 je rodičovským kmenem pro všechny mutanty používané v další práci. Je to haploid (MAT $\alpha$ ), deleční v genech *HIS3*, *URA3*, *LEU2* a *LYS2*.

### 4.2.1 Transformace kmene BY4742

Laboratorní kmen *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 jsem použila pro vytvoření šesti kmenů se značenými Ato proteiny. Cílem byla konstrukce kmenů Ato1p-GFP, Ato2p-GFP, Ato3p-GFP, Ato1p-RFP, Ato2p-RFP a Ato3p-RFP. Kmeny pro značení GFP jsem transformovala vždy příslušným PCR produktem GFP-*URA3* (připraven pomocí plazmidu pKT209, viz kapitola). Kmeny pro značení RFP jsem transformovala příslušným PCR produktem RFP-*URA3* (připraven pomocí plazmidu pKT176, viz kapitola 3.1.2). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. *URA3* gen *Candida albicans* komplementuje *ura3* mutaci kmenů *S.cerevisiae*. Potenciální transformanty (kolonie narostlé na selekčním médiu) jsem přečárkovala na GM médium s BKP a po začátku alkalizace, která byla pozorovatelná jako barevná změna média jsem pomocí fluorescenční mikroskopie našla klony, u nichž k transformaci PCR produktem skutečně došlo. Jednotlivé transformanty jsou na obr. 4.4.





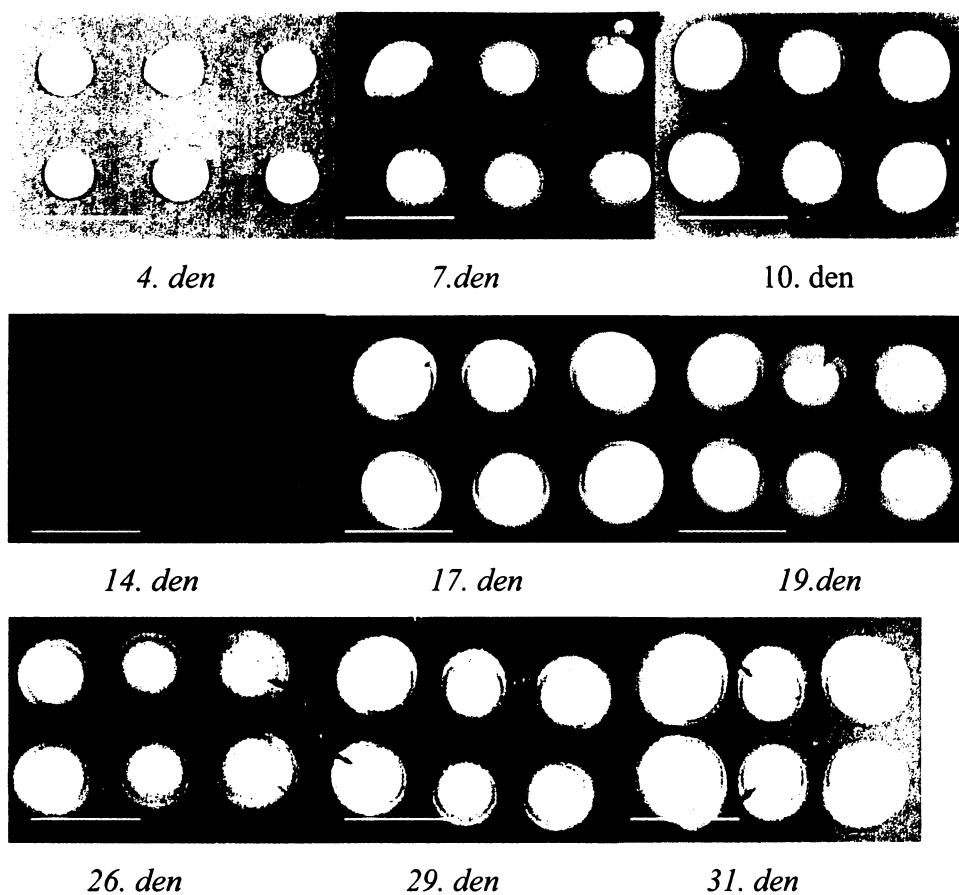
Obr. 4.4: Transformanty kmene BY4742 nesoucí značené Ato proteiny. Meřítko je 5  $\mu$ m.

#### 4.2.2 Průběh vývoje kolonií transformant kmene BY4742

Průběh vývoje kolonií transformant kmene BY4742 je na obr. 4.5. Průběh změn alkalizace a acidifikace jsem pozorovala u cca 15 paralel pro každý kmen.

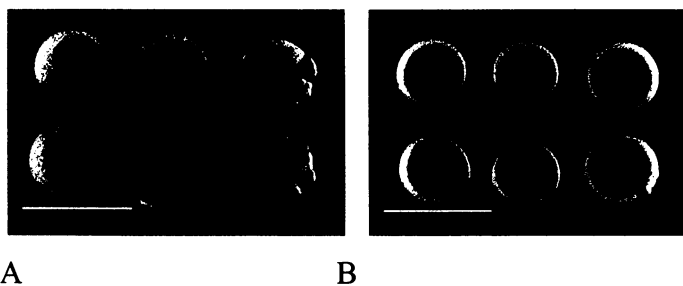
Alkalizace média, tj. přechod kolonií do fáze produkce amoniaku, začínala standardně kolem 9-10. dne a vrcholila kolem 15.dne. Pak kolonie přecházely do druhé acidické fáze. Kolem 20. dne se ve druhé acidické fázi objevovalo tmavší zabarvení okolního média, které jsem nazvala „acidická subfáze“. Zabavení média bylo mnohem méně výrazné než zabarvení média u alkalické fáze, nicméně tato subfáze byla dobře odlišitelná.

Morfologie makrokolonií BY4742 se u jednotlivých transformant BY4742 někdy lišila. Důvodem může být skutečnost, že transformované kmeny vznikly původně z jediné transformované buňky, která se mohla od původního kmene mírně odlišovat. Tento fenomén je možné pozorovat i při vysetí původního netransformovaného kmene BY4742 na monokolonie. Jednotlivé klony narostlé z jediné buňky se ode sebe mírně liší (D. Strachotová, osobní sdělení). (viz Obr. 4.6)



Obr. 4.5: Průběh alkalizace a acidifikace média transformant BY4742. Měřítka je 1,5 cm.

Průběh vývoje kolonií a časování jednotlivých fází se může lišit v závislosti na stáří misek a použité šarži média (viz též kapitola 4.9), proto jsem jednotně používala misky 4 týdny staré, šarže yeast extraktu 71.



Obr. 4.6: Příklady různých morfologií 16-dnů starých kolonií transformantů kmene BY4742. A. Kolonie tvoří na okrajích sektory B. Kolonie téměř bez sektorů, v centrální části vzniká během intenzivní alkalické fáze strážena s  $\text{CaCl}_2$ . Měřítka je 1,5 cm.

### 4.2.3 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonie BY4742

Ato1p-GFP jsem sledovala u tří paralelních kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítko u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 7. den (1. acidická fáze)

Do sedmého dne vývoje kolonie jsem expresi *ATO1*-GFP nepozorovala v žádné části kolonie.

#### 10. den (začátek alkalické fáze)



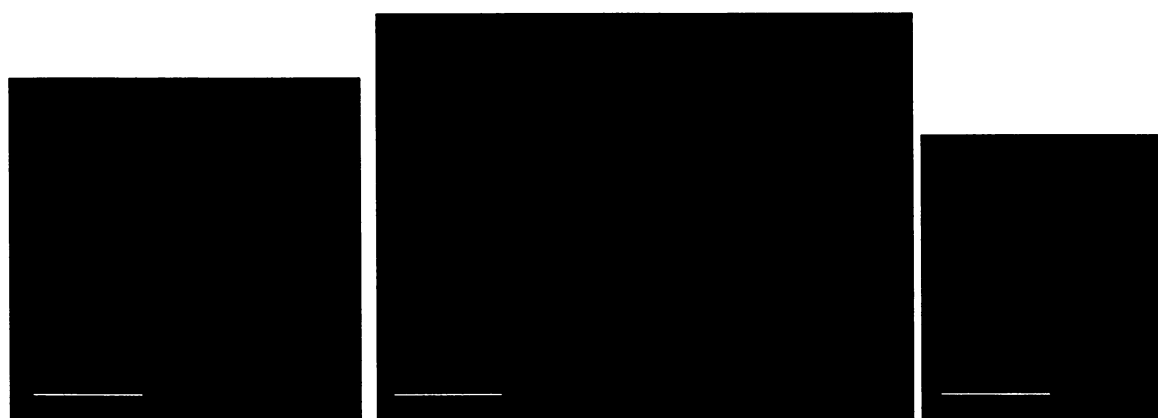
*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

Na začátku alkalizace začala produkce Ato1p-GFP ve vnější a střední části kolonie. Ve vnitřní části byla produkce proteinu velmi slabá. Krom membránové lokalizace Ato1p jsem často pozorovala i vnitrobuněčnou lokalizaci v blíže neurčených váčcích.

#### 12. den (pokračující alkalická fáze)



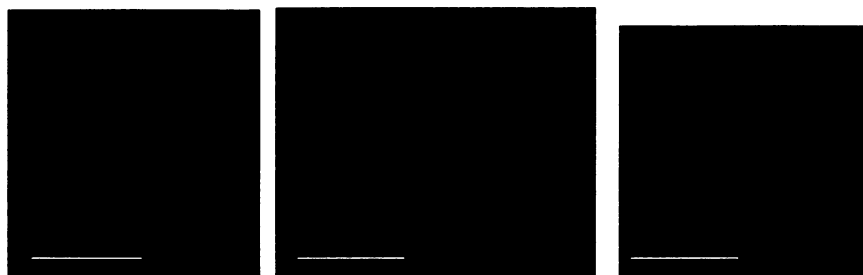
*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

Během pokračující alkalizace se signál zesiloval. Ve vnější části kolonie zůstal výrazně silnější. Ato1p-GFP se na membráně vyskytoval v rámci shluků, jež by mohly být tvořeny membránovými rafty (Řicicová et al.,2007). Tyto raftové shluky byly dobře pozorovatelné během celého vývoje kolonií. Fluorescenční signál buněk ze střední části kolonie byl srovnatelný se signálem buněk z vnitřní části kolonie.

#### 14. den (končící alkalická fáze)



*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

Během pokračující alkalizace už dále nedošlo k zesílení fluorescenčního signálu, produkce Ato1p-GFP proteinu zůstala na stejné, vysoké hladině.

#### 17. den (2. acidická fáze)



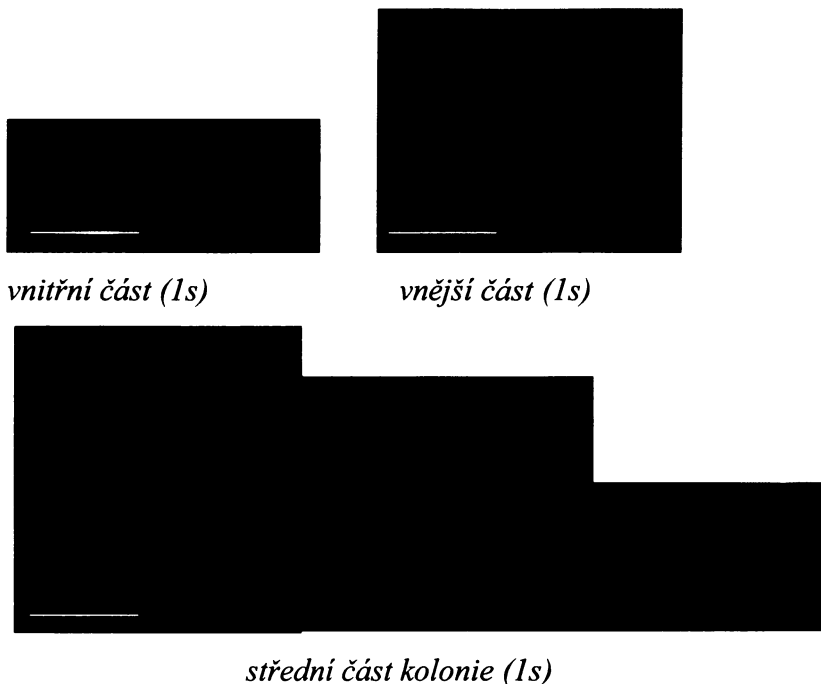
*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

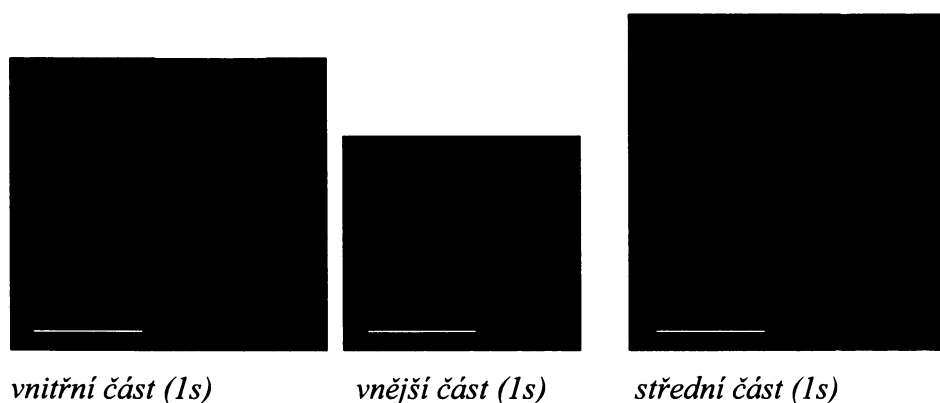
Při přechodu do acidické fáze se produkce Ato1p-GFP ve vnější části výrazně zeslabil, signál byl nyní silný ve vnitřní části kolonie. Ve střední části se také produkce Ato1p-GFP zeslabil.

19. den (pokračování 2. acidické fáze)



S pokračující acidickou fází fluorescence (a tedy patrně produkce) Ato1p-GFP znovu zesílila a byla stále výraznější ve vnitřní části kolonie, i když rozdíl mezi vnitřní a vnější částí byl méně zřetelný. Ve střední části kolonie se vyskytovaly buňky s fluorescenčním signálem různé intenzity, od silného signálu připomínajícího buňky vnitřní část kolonie až po signál, který byl slabší než signál buněk vnější části. Toto pozorování odpovídá skutečnosti, že v této fázi vývoje kolonie se ve středu vyskytují výrazně diferencované buňky. (VÁCHOVÁ a PALKOVÁ 2005)

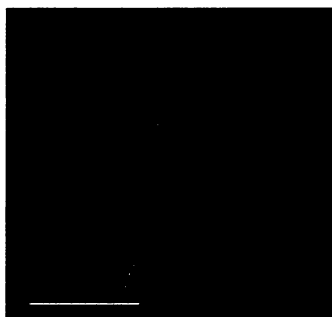
21. den (pokračování 2. acidické fáze, „acidická subfáze“)



V „acidické subfázi“ fluorescence Ato1p-GFP ještě zesiluje, hlavně u buněk ve vnější části kolonie. Rozdíly mezi vnější a vnitřní částí kolonií se začínají stírat, přestože signál buněk

z vnitřní části kolonie zůstává pořád nejsilnější. Ve střední části kolonie jsou opět buňky různorodé, celkově je fluorescence Ato1p-GFP ve střední oblasti kolonie o něco slabší.

#### 24. den (pokračování 2. acidické fáze)



*vnitřní část (1s)*



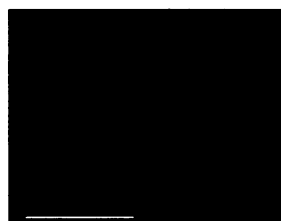
*vnější a střední část (1s)*

Ato1p-GFP fluorescence zůstává, ovšem u části buněk (cca polovina) byl signál mnohem slabší. Podíl buněk s vnitrobuněčnou mimomembránovou GFP lokalizací stoupá.

#### 31. den (pokračování druhé acidické fáze)



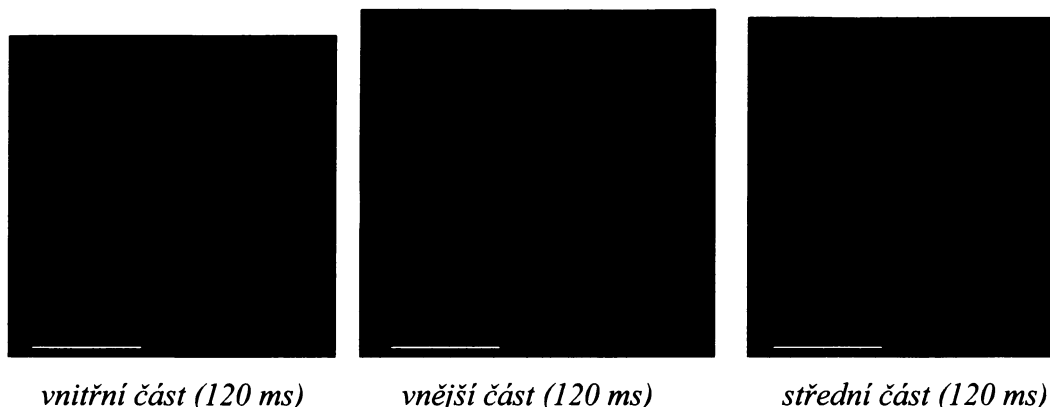
*vnitřní část (120 ms)*



*vnější a střední část (1s)*

Trendy z předchozích dnů zůstávají zachovány (uvedené obrázky jsou snímány při výrazně kratší expozici), fluorescence Ato1p-GFP zůstává ve vnitřní části kolonie pořád vysoká. GFP protein je ve větší míře přítomen také uvnitř buňky.

### 35. den (pokračování 2. acidické fáze)

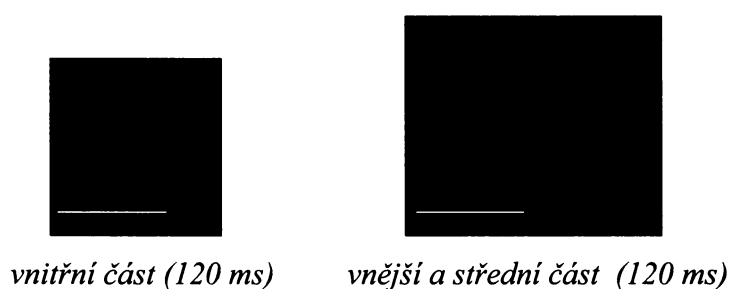


Fluorescenční signál, který jsem pozorovala u buněk ze všech částí kolonie ještě zesílil (uvedené obrázky jsou snímány při výrazně kratší expozici). U buněk z vnitřní části kolonie byl výrazně silnější než u buněk z vnější oblasti. Ve střední části kolonie jsem opět nacházela buňky s fluorescenčním signálem podobným vnější i vnitřní části kolonie.

#### **4.2.4 Produkce Ato1p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742**

Ato1p-RFP jsem sledovala u dvou paralelních kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

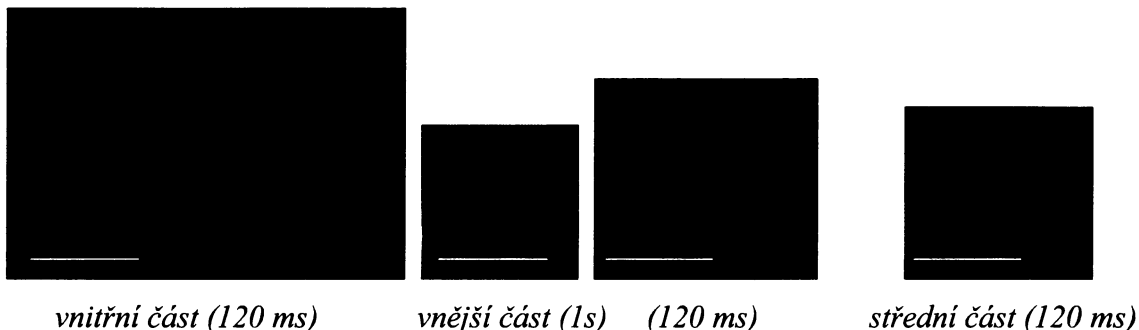
### 12. den (pokračující alkalická fáze)



RFP protein maturuje mnohem pomaleji než protein GFP. V prvním kroku maturace RFP se vytváří zelená fluorescenční struktura (viz. kap.). Kolem 10. dne (začátek alkalické fáze) byl Ato protein skutečně pozorovatelný jako zeleně fluoreskující. Červený fluorescenční signál byl pozorovatelný o něco později (od cca 12. dne) než zelený signál u Ato1p-GFP značených kmenů, intenzita jeho fluorescence byla však větší. Lokalizace Ato1p-RFP byla téměř

výhradně membránová, lipidové rafty nebyly na rozdíl od od kmenů s Ato1p-GFP dobře pozorovatelné.

#### 16. den (končící alkalická fáze)



Trendy, které jsem pozorovala u kolonií Ato1p-GFP značeného kmene zůstaly zachovány i v případě kolonií kmene nesoucího Ato1p-RFP. S končící alkalickou fází se fluorescenční signál buněk z vnější části kolonie zeslabil, výraznější signál zůstal u buněk ze střední a vnitřní části. Celková fluorescence však zůstávala u Ato1p-RFP kmenů mnohem vyšší. (viz porovnání délky expozice 1s u buněk z vnější části kolonie, střed panelu a buněk Ato1p-GFP z vnější části kolonie končící alkalické fáze).

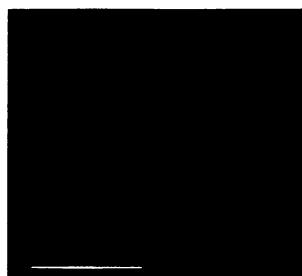
#### 20. den (druhá acidická fáze, „acidická subfáze“)



Stějně jako v případě Ato1p-GFP se po vstupu kolonií do „acidické subfáze“ fluorescenční signál Ato1p-RFP ještě zesílil a rozdíly mezi buňkami vnější a vnitřní oblasti kolonie se začaly stírat. Začínala se objevovat i výraznější vnitrobuněčná lokalizace Ato1p. Fluorescenční signál Ato1p-RFP byl i nadále intenzivnější a lépe pozorovatelný než Ato1p-GFP.



27. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*



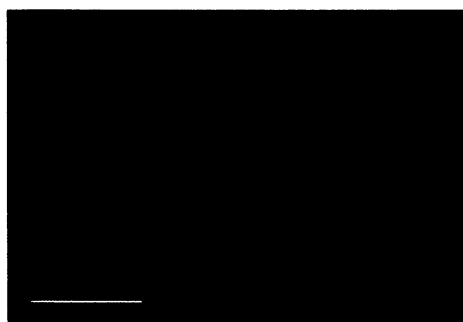
*střední část (120 ms)*

V pozdních acidických fázích zůstává Ato1p-RFP signál zřetelný, nejvýraznější u buněk ve vnitřních oblastech kolonií.

#### **4.2.5 Produkce Ato2p-GFP v průběhu vývoje kolonií BY4742**

Ato1p-GFP jsem sledovala u tří paralelních kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítko u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

12. den (pokračující alkalická fáze)



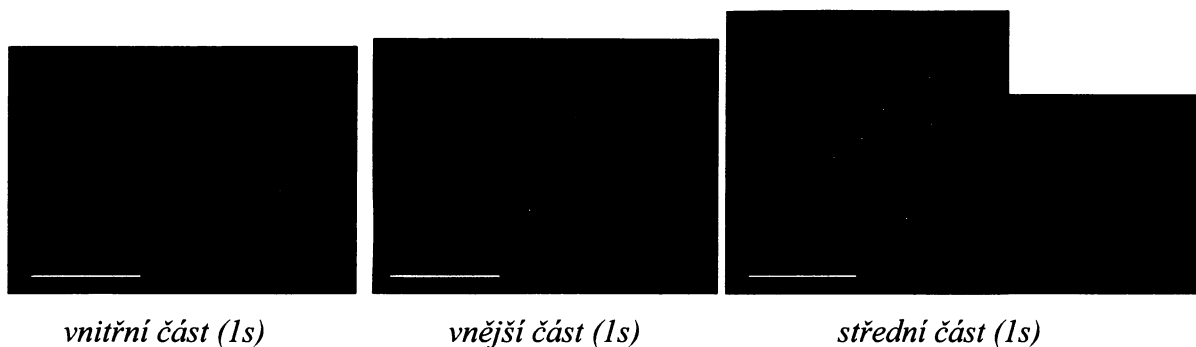
*vnitřní část (1s)*



*vnější a střední část (1s)*

Začátek fluorescence Ato2p-GFP proteinu jsem pozorovala o něco později než Ato1p-GFP proteinu. Množství proteinu Ato2p-GFP bylo v porovnání s Ato1p menší. Pozorovala jsem častěji vnitrobuněčnou lokalizaci. Nepozorovala jsem žádný rozdíl v produkci Ato2p-GFP mezi jednotlivými částmi kolonie.

#### 14. den (končící alkalická fáze)



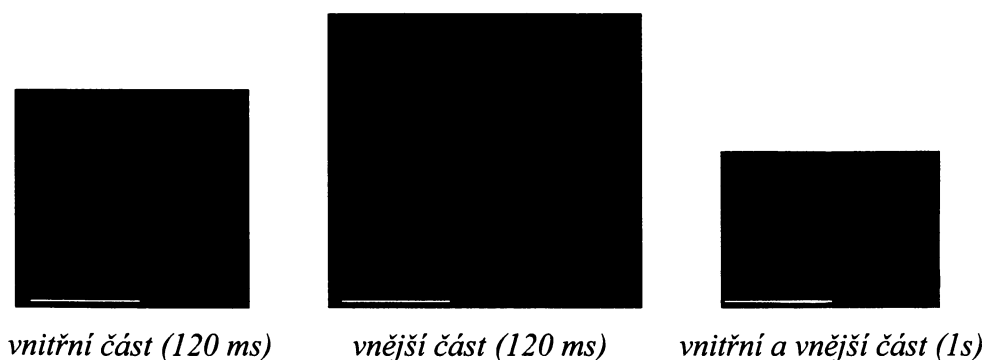
S pokračující alkalickou fází se fluorescence (a tedy patrně i produkce) Ato2p-GFP ještě mírně zvýšila. Žádné výrazné rozdíly v produkci Ato2p-GFP proteinu jsem mezi jednotlivými částmi kolonie nepozorovala.

#### 17. den (2. acidická fáze)



V acidické fázi fluorescence Ato2p-GFP proteinu mírně poklesla. Fluorescence proteinu buněk ve vnitřní části kolonie byla o něco výraznější.

#### 21.-26.den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



V „acidické subfázi“ se fluorescence Ato2p-GFP zvýšila (viz porovnání při délce expozice 1s). Na rozdíl od produkce Ato1p-GFP proteinu však nebyla fluorescence buněk výraznější v žádné oblasti kolonie (viz porovnání buněk vnější a vnitřní části kolonie při expozici 120 ms). Tato zvýšená produkce přetrvávala i během dalšího vývoje (do 26. dne).

#### 4.2.6 Produkce Ato2p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742

Ato2p-RFP jsem sledovala u dvou paralelních kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

##### 10.den (začátek alkalické fáze)



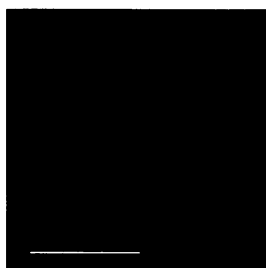
*vnitřní část (1s)*



*střední část (1s)*

Fluorescenční signál Ato2p-RFP jsem zachytila na začátku přechodu kolonií do alkalické fáze, byl však velmi slabý. Signál byl podobně jako u proteinu Ato1p-RFP pozorovatelný i v zelené fluorescenční oblasti.

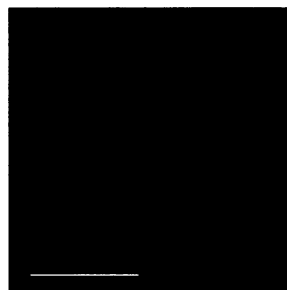
##### 14. den (pokračující alkalická fáze)



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (1s) (120 ms)*



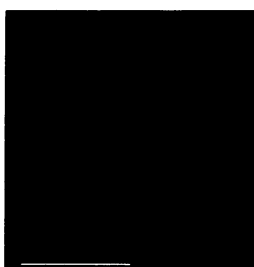
*střední část (1s)*

V pozdějších fázích alkalické fáze začal být fluorescenční signál Ato2p-RFP zřetelnější. Nicméně i v tomto případě byla fluorescence Ato2p-RFP proteinu menší než fluorescence Ato1p-RFP (podobně jako u dvojice Ato1p-GFP a Ato2p-GFP). Výrazné rozdíly mezi jednotlivými částmi kolonie jsem nepozorovala.

17. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*



*vnější část (1s)*



*střední část (1s)*

V 2. acidické fázi fluorescence Ato2p-RFP proteinu mírně poklesla. Signál buněk z vnitřní části kolonie byl o něco výraznější.

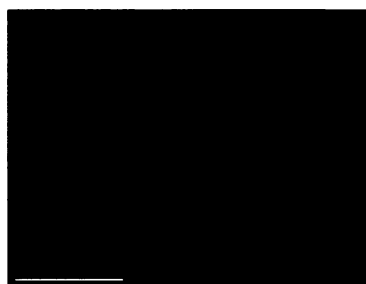
21.-26. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*



*střední část (120 ms)*

Se vstupem buněk do „acidické subfáze“ se fluorescence Ato2p-RFP proteinu zvyšuje podobně jako tomu bylo u Ato1p-RFP proteinu. Tato zesílená produkce přetrvává i v dalším vývoji (až do 26. dne).

#### **4.2.7 Produkce Ato3p-GFP v průběhu vývoje kolonií BY4742**

Ato1p-GFP jsem sledovala u dvou paralelních kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 10. den (začátek alkalické fáze)



*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*



*střední část (1s)*

Produkce Ato3p-GFP proteinu začala se začátkem alkalické fáze. Na membránách jsem velmi zřetelně pozorovala raftové shluky. Krom membránové lokalizace jsem pozorovala také lokalizaci vnitrobuněčnou. V počátečních fázích alkalizace byla Ato3p-GFP fluorescence silnější než Ato1p-GFP fluorescence.

#### 14. den (pokračující alkalická fáze)

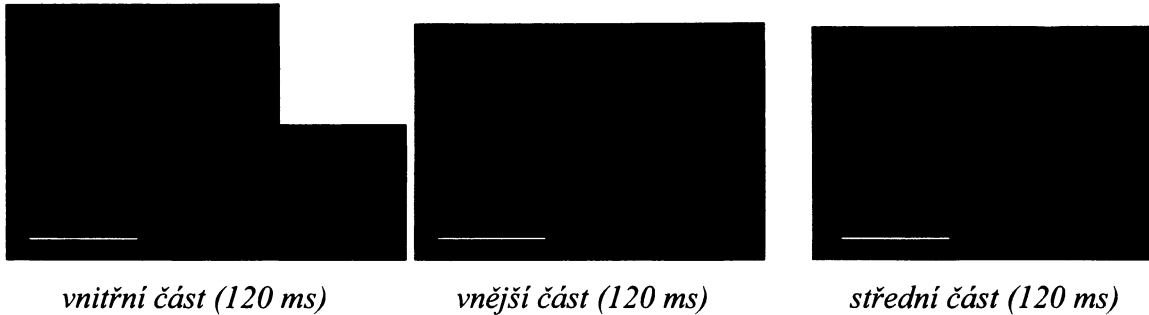


*vnitřní a střední část(1s)*

*vnější část (1s)*

V alkalické fázi byl stejně jako u Ato1p-GFP proteinu fluorescenční signál Ato3p-GFP silnější u buněk ve vnější části kolonie. Fluorescence Ato3p-GFP se jevila jako největší ze všech tří Ato-GFP proteinů.

20.–26.den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



S nástupem „acidické subfáze“ se fluorescence Ato3p-GFP proteinu zesílila, podobně jako v případě proteinu Ato1p-GFP. Rozdíly mezi vnitřní a vnější částí kolonie nebyly výrazné, signál byl o něco silnější u buněk ve vnitřní části kolonie.

#### 4.2.8 Produkce Ato3p-RFP v průběhu vývoje kolonií BY4742

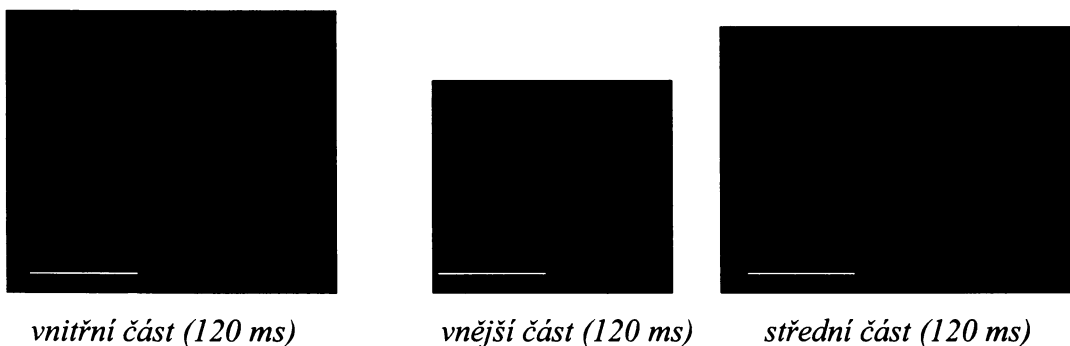
10. den (začátek alkalické fáze)



*střední část (1s)*

Ato3p-RFP signál byl na začátku alkalické fáze velmi slabý, podobně jako u jiných kmenů značených RFP.

15.den (alkalická fáze)



V pozdější alkalické fázi byl fluorescenční signál Ato3p-RFP velmi zřetelný. Výraznější byl ve vnitřní části kolonie. Celkovou intenzitou byl srovnatelný se signálem Ato1p-RFP

proteinu. Podobně jako v případě Ato1p-RFP i u Ato3p-RFP nebyly raftové shluky jasně pozorovatelné.

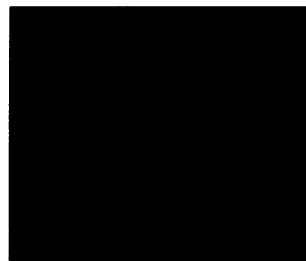
20. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*



*střední část (120 ms)*

V pozdějších fázích jsem pozorovala převážně vnitrobuněčnou lokalizaci. Výraznější zesílení fluorescence membránově lokalizovaného Ato3p-RFP proteinu (typické pro ostatní Ato proteiny) v buňkách v „acidické subfázi“ jsem ale nepozorovala.

26. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*



*střední část (120 ms)*

Vysoká fluorescence Ato3p-RFP proteinu přetrvávala do pozdních fází, hlavně u buněk ve vnitřní části kolonie.

### 4.3 Fluorescenční značení Ato proteinů kmene *S. cerevisiae* s defektem v transkripčním faktoru Sok2p

*Cíl: Zjištění produkce a lokalizace jednotlivých Ato transportérů značených zeleným fluorescenčním proteinem GFP v jednotlivých částech kolonií mutantního kmene sok2 v průběhu jejich vývoje. Porovnání s rodičovským kmenem BY4742.*

#### 4.3.1 Transkripční faktor Sok2p (YMR016C)

Sok2p (Ymr016) protein je transkripční regulátor lokalizující do jádra kvasinky *S. cerevisiae*, který má značně pleiotropní funkci. Např. se uplatňuje v PKA (cAMP-dependentní protein kináza) signální transdukční dráze, která je důležitá pro růst buněk a správný průběh buněčného cyklu a negativně reguluje pseudohyální růst (inhibuje přepínání růstu z jednobuněčného na filamentární) (WARD et al. 1995), je zapojený do procesu akumulace glykogenu a mechanismu rezistence k teplotnímu šoku („heat shock rezistence“). (LIN a LIS 1999) Protein je dlouhý 785 aminokyselin (Mw 85,6 kDa) a jeho isoelektrický bod je 9,18. Obsahuje několik DNA-vazebních domén (homologních proteinům Swi4p, Mbp1p, Xbp1p, Phd1p) a je homologní k několika dalším transkripčním faktorům jiných kvasinek (např. *Candida albicans*). (SHENHAR a KASSIR 2001) Delece *SOK2* není letální, ale vede k určitým růstovým defektům, hlavně v kmenech s oslabenou PKA aktivitou. (WARD et al. 1995)

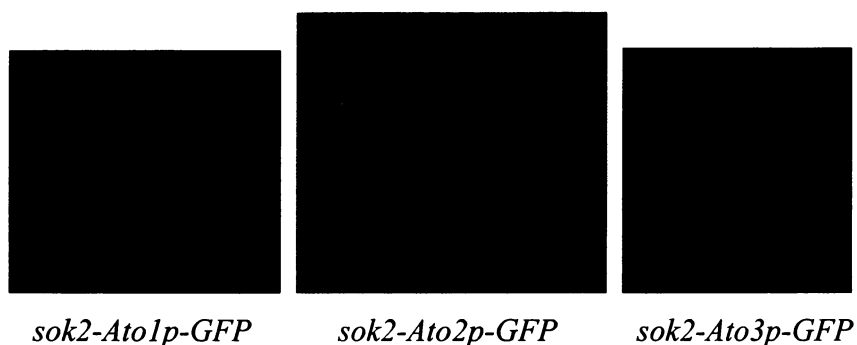
Bylo rovněž prokázáno, že delece *SOK2* genu vede k výrazným změnám ve vývoji a signalizaci kolonií. *sok2* kolonie nejsou schopny produkovat amoniak a účinně zapínat příslušné metabolické geny. Kolonie nejsou schopny správné diferenciaci a buňky odumírají v celé kolonii výrazně rychleji než v kolonii rodičovského kmene. (VÁCHOVÁ et al. 2004)

#### 4.3.2 Transformace kmene *sok2*

Kmen *sok2* zakoupený ze sbírky EUROSCARF byl vytvořen vnesením genu pro kanamycinovou rezistenci do genomu rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 výměnou za gen *SOK2*. (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YMR016c.html>) Mým úkolem bylo modifikovat tento *sok2* kmen tak, aby obsahoval Ato proteiny značené GFP. Kmen *sok2* jsem transformovala PCR produktem GFP-*URA3*, který



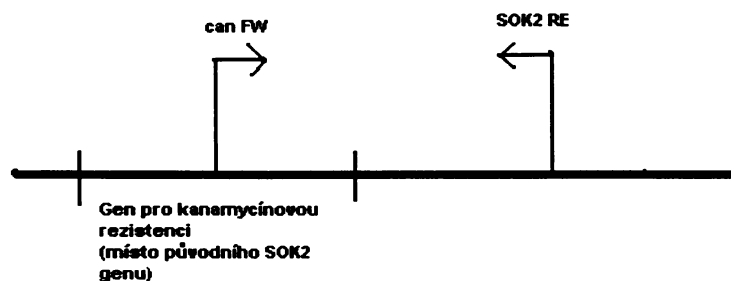
byl vytvořen pomocí plazmidu pKT209 (viz kapitola 3.1.2.). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. Úspěšnost transformace jsem ověřovala přítomností fluorescenčního signálu u buněk kolonií narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila tři stabilní kmeny *sok2-Ato1p-GFP*, *sok2-Ato2p-GFP* a *sok2-Ato3p-GFP*. (viz Obr. 4.7)



Obr. 4.7: Transformanty kmene *sok2* se značenými Ato proteiny

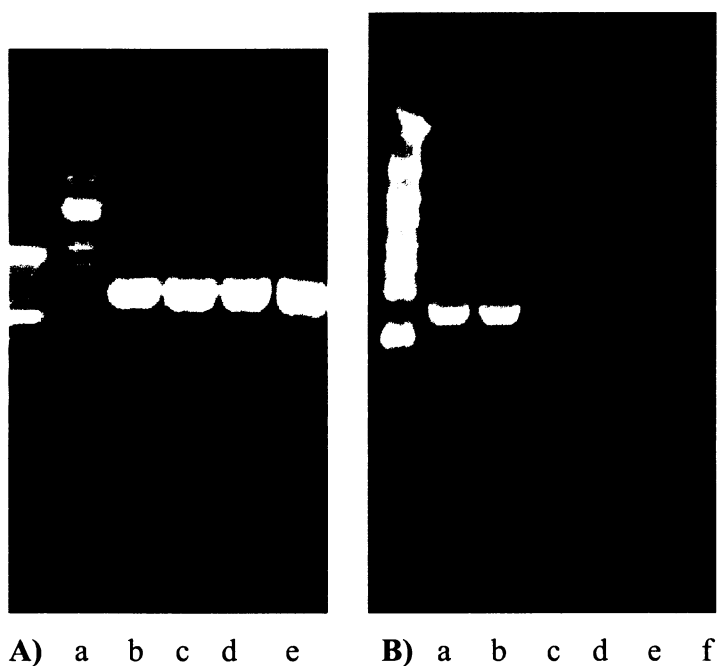
#### 4.3.3 Ověření *sok2* mutace u připravených konstruktů *sok2-Ato-GFP*

Pro ověření delece *SOK2* genu v transformovaných kmenech jsem vyizolovala chromozomální DNA z původního rodičovského kmene BY4742 jako negativní kontrolu, chromozomální DNA z kmene *SOK2* jako pozitivní kontrolu a pak chromozomální DNA z kmenů se značenými Ato proteiny (*SOK2-Ato1GFP*, *SOK2-Ato2GFP*, *SOK2-Ato3GFP*). Vyizolovanou DNA jsem použila jako templátovou DNA pro PCR amplifikaci úseku DNA nacházející se pouze u kmene *sok2*. (viz. Obr. 4.8)



Obr. 4.8: Původní *SOK2* gen byl u *sok2* mutanty nahrazen genem pro kanamycinovou rezistenci.

Pro PCR amplifikaci jsem použila „forward“ primer z oblasti genu pro kanamycinovou rezistenci a „reverse“ primer z oblasti genomu za původním *SOK2* genem. Očekávaný PCR produkt by měl mít velikost cca 600 bp. Z Obr. je vidět, že u kmenů obsahujících místo *SOK2* genu gen pro kanamycinovou rezistenci se majoritně amplifikoval fragment o velikosti 600 bp, který není přítomen v genomové DNA rodičovského kmene BY4742.



Obr. 4.9: PCR amplifikace, primery viz obr. 4.8. Templátová DNA:

A. a – BY4742, b- *SOK2*-Ato1GFP, c- *SOK2*-Ato2GFP, d - *SOK2*-Ato3GFP e – *SOK2* (EUROSCARF)

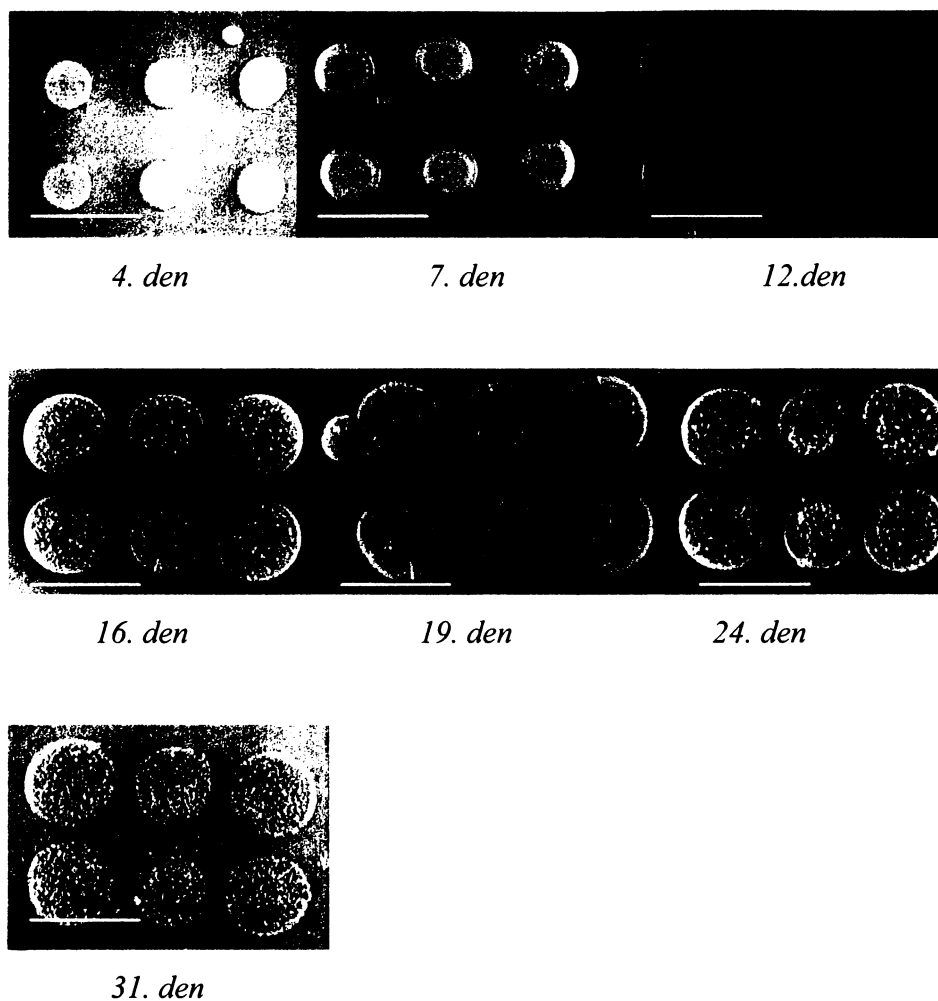
B. a - *SOK2* (EUROSCARF), b - *SOK2*-Ato1GFP, c,d,e,f - BY4742

Použitý marker: DNA Ladder Mix (GeneRuler) viz obr. 4.2

Z Obr. 4.9 je vidět, že se naamplifikoval pouze úsek podle templátové DNA z kmenů obsahujících místo *SOK2* genu gen pro kanamycinovou rezistenci. Na Obr 4.9 A byla použita DNA z kmene BY4742 patrně kontaminována, na obr. 4.9 B je proveden stejný experiment s použitým přečistěných kmenů BY4742.

#### 4.3.4 Průběh vývoje kolonií *sok2*-Ato-GFP kmenů

Průběh alkalizace a acidifikace jsem pozorovala u cca 20 paralel pro každý kmen.



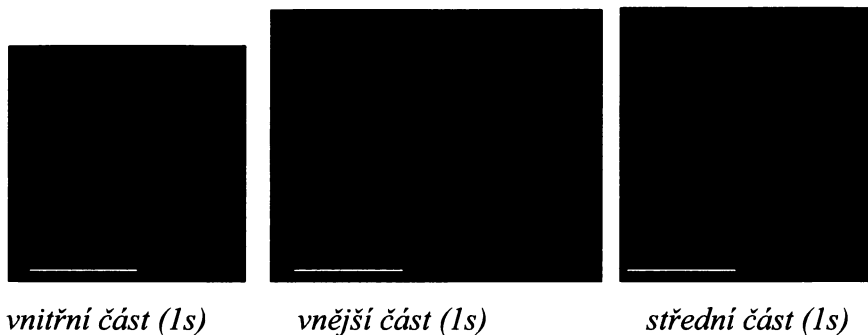
Obr.4.10: Průběh vývoje kolonií kmene *sok2-Ato1-GFP*. Měřítko je 1,5 cm.

Průběh vývoje kolonií kmenů *sok2-Ato-GFP* se, stejně jako vývoj kolonií původního kmene *sok2*, lišil od vývoje kolonií rodičovského kmene BY4742, resp. kolonií kmenů BY-Ato-GFP. Nástup nevýrazné alkalické fáze byl patrný kolem 11. dne, o něco později než u BY4742. Alkalizace média koloniemi *sok2-Ato-GFP* byla výrazně slabší, což je dáno skutečností, že *sok2* kmeny neprodukují zjizitelné množství amoniaku. (VÁCHOVÁ et al. 2004) “Acidická subfáze“ pozorovatelná u rodičovského kmene byla pozorovatelná jenom u některých paralel a intenzita zbarvení okolního média byla velmi slabá. Kolonie *sok2-Ato-GFP* „stárly“ výrazně rychleji než kolonie kmene BY4742 a stejně jako u kolonií původního kmene *sok2* na nich začaly vyrůstat papily. (viz Obr. 4.10)

### 4.3.5 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií *sok2*

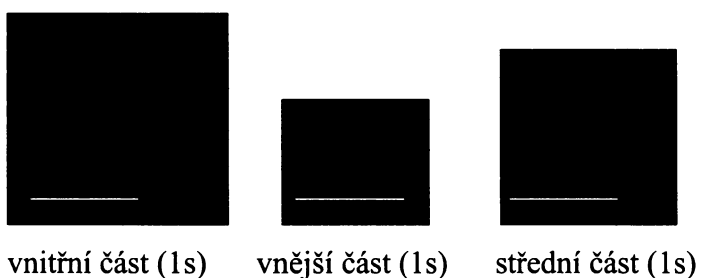
Ato1p-GFP jsem sledovala u dvou paralelních *sok2* kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítko u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 12. den (začínající slabá alkalizace)



Produkce Ato1p-GFP začínala u *sok2* kmene stejně jako u rodičovského kmene u buněk ve vnější části kolonie. Vnitrobuněčná lokalizace Ato1p-GFP byla u *sok2* kmene výraznější než u BY4742, membránová lokalizace byla též pozorovatelná v raftových shlucích. Celková hladina fluorescence Ato1p-GFP u kolonií *sok2* byla výrazně nižší než u kolonií rodičovského kmene.

#### 14. den (slabá „alkalická fáze“)



S pokračující slabou „alkalickou“ fází se produkce Ato1p-GFP u kolonií *sok2* kmene nezesílila tak jak tomu bylo v případě kolonií kmene BY4742. Fluorescenční signál byl ve všech částech kolonie slabý, pouze ve vnitřní a střední části jsem našla buňky s výraznějším signálem. Mimomembránová lokalizace byla výrazným jevem.

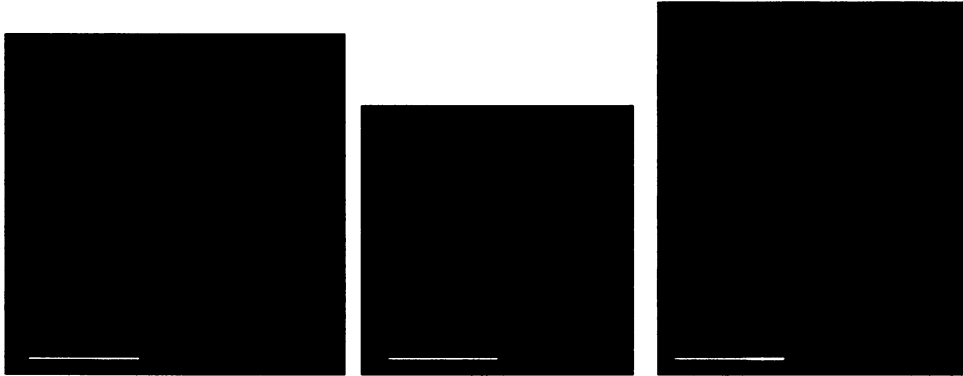
17. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*

Po přechodu do 2. acidické fáze byla produkce Ato1p-GFP stěží detekovatelná, hlavně ve vnější a střední oblasti byl fluorescenční signál velice slabý. Ato1p-GFP fluorescence byla relativně největší ve vnitřní části, ovšem v porovnání s rodičovským kmenem téměř zanedbatelná. Většina Ato1p-GFP byla lokalizována ve větších či menších váčcích uvnitř buňky.

19. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



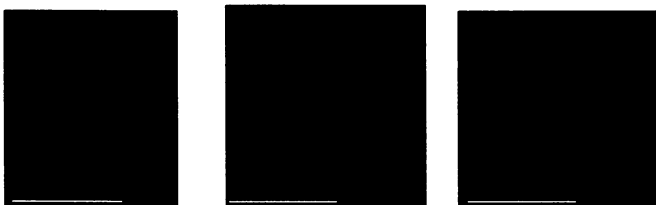
*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

S nastupující „acidickou subfází“ se produkce Ato1p-GFP ve vnitřní a střední části kolonie transientně zvedla. Hladiny Ato1p-GFP fluorescence však stále nedosahovaly Ato1p-GFP fluorescence u rodičovského kmene.

21. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

Produkce Ato1p-GFP opět poklesla. Nejvýraznější zůstává u buněk ve vnitřní oblasti kolonie. Ve vnější části kolonie byl Ato1p-GFP signál přítomen převážně v malých váčcích uvnitř buňky.

#### 24. den (2. acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*

*vnější část (1s)*

*střední část (1s)*

Produkce Ato1p-GFP proteinu zůstávala nízká, u buněk ve vnější a střední části detekovatelná prakticky jenom ve vnitrobuněčných kompartmentech. U buněk ve vnitřní části se zachovávala membránová lokalizace, pořád byla pozorovatelná i lokalizace v raftových shlucích. Oproti rodičovskému kmenu byla Ato1p-GFP fluorescence ve všech částech kolonie nízká a méně lokalizovaná na membráně.

#### 31.-35. den (2. acidická fáze)



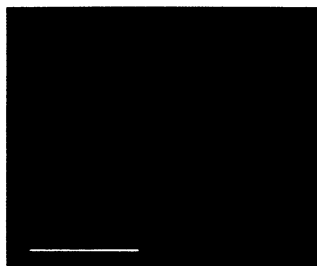
*vnitřní a střední část (1s)*

Produkce Ato1p-GFP nebyla ve vnější části kolonie vůbec detekovatelná. Ve střední a vnitřní části jsem pozorovala poměrně silnou Ato1p fluorescenci (relativně vzhledem k předchozím fázím vývoje *sok2* mutanty, v porovnání s Ato1p-GFP fluorescencí rodičovského kmene BY4742 byla stále výrazně slabší).

#### 4.3.6 Produkce Ato2p-GFP v průběhu vývoje kolonií *sok2*

Ato2p-GFP jsem sledovala u dvou paralelních *sok2* kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

10. den (začátek slabé „alkalické“ fáze)



*vnitřní část (3s)*

Na začátku slabé „alkalické“ fáze se fluorescenční signál Ato2p-GFP proteinu objevil podobně jako u rodičovského kmene ve vnitřní části kolonie, byl však mnohem slabší. Také byla v porovnání s rodičovským kmenem výraznější vnitrobuněčná lokalizace fluorescence.

12. den (slabá „alkalická“ fáze)

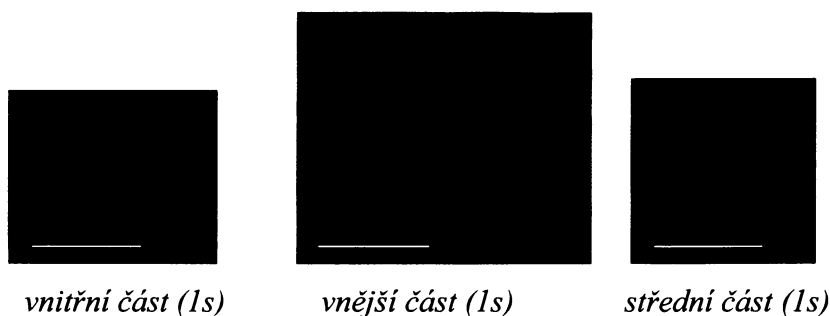


*vnitřní část (3s)*

*vnější část (3s)*

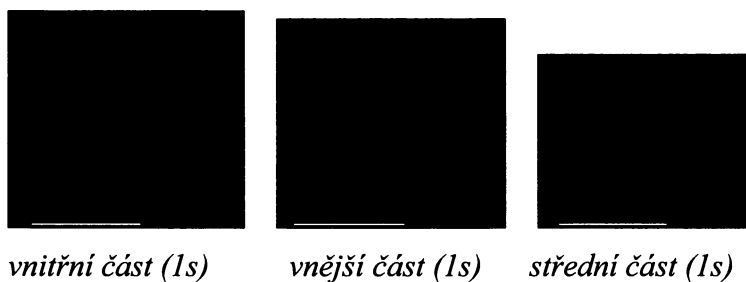
S pokračující slabou „alkalickou“ fází se fluorescence Ato2p-GFP proteinu nezvyšovala, výraznější fluorescenci jsem pozorovala u buněk z vnitřní části kolonie. Naprostá většina fluorescenčního signálu pocházela z vnitrobuněčných váčků.

#### 18. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



Fluorescence Ato2p-GFP proteinu se zvýšila v „acidické subfázi“, podobně jako u rodičovského kmene. V porovnání s rodičovským kmenem BY4742 byla však fluorescence Ato2p-GFP proteinu velmi nízká a signál lokalizován převážně uvnitř buněk.

#### 22. den (2. acidická fáze)



V pozdějších fázích fluorescenční signál na membráně téměř úplně vymizel. Nejvýraznější zůstával u buněk ze střední části kolonie. Po cca 25. dni vývoje *sok2* kolonií už nebyl Ato2p-GFP fluorescenční signál vůbec pozorovatelný.

#### **4.3.7 Produkce Ato3p-GFP v průběhu vývoje kolonií *sok2***

Fluorescenční signál u kolonií kmene *sok2*-Ato3p-GFP byl analogický signálu Ato3p-GFP u nemutovaného rodičovského kmene BY4742, jenom výrazně slabší. Produkce Ato3p-GFP byla u kmene *sok2* větší než produkce Ato2p-GFP a větší nebo srovnatelná s produkcí Ato1p-GFP. Na začátku slabé „alkalické“ fáze *sok2* kolonií byl Ato3p-GFP signál silnější ve vnější části kolonie, po přechodu do acidické fáze (cca 16. den) byl silnější ve vnitřní části. Fluorescenční signál *sok2*-Ato3p-GFP kmene jsem velmi často pozorovala uvnitř buněk, proteiny nacházející se na buněčné membráně byly soustředěny do shluků lipidických raftů.



## 4.4 Fluorescenční značení Ato proteinů kmene *S. cerevisiae* s defektem v cytosolické superoxid dismutáze Sod1p

*Cíl: Zjištění produkce a lokalizace Ato1p transportér značeného zeleným fluorescenčním proteinem GFP v jednotlivých částech kolonií mutantního kmene sod1 v průběhu jejich vývoje. Porovnání s rodičovským kmenem BY4742.*

### 4.4.1 Superoxid dismutáza Sod1p (YJR104C)

Prokaryota mají dvě formy superoxid dismutáz, jedna z nich obsahuje železo a druhá mangan. Eukaryota mají manganovou variantu v mitochondriích a v cytoplazmě mají enzym obsahující měď a zinek. Mn a Fe proteiny jsou si vzájemně podobné, Cu-Zn proteiny tvoří samostatnou skupinu. (BERMINGHAM-MC DONOGH et al. 1998) Superoxiddizmutázy (SODs) jsou enzymy hojně rozšířené u mnoha prokaryot i eukaryot. *SOD1* gen je u lidí umístěn na dlouhém ramenu 21. chromozomu a jeho mutace způsobuje amyotrofickou laterální sklerózu (nazývanou také Lou Gehrigova nemoc). Je to degenerativní onemocnění motorických neuronů, které je způsobeno nahromaděním volných kyslíkových radikálů. (GUNTHER et al. 2004) *SOD1* (YJR104C) gen kvasinek *S.cerevisiae* kóduje enzym superoxiddizmutázu, objevenou Fridovichem (FRIDOVICH 1975). Tato dizmutáza neutralizuje superoxidové radikály, které při vyšších hladinách mohou způsobit poškození buňky. Superoxidové radikály vznikají jako produkty normálního buněčného metabolismu, hlavně reakcemi produkujícími energii v mitochondriích. Superoxid dismutáza proměňuje tyto radikály na kyslík a peroxid vodíku. (BERMINGHAM-MC DONOGH et al. 1998) Superoxiddizmutáza Sod1p váže pro správné fungování měď a zinek. Je to rozpustný cytoplazmatický protein fungující jako homodimer. Jeho dvě 32 kDa podjednotky obě vážou  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Pro správnou funkci enzymu je kritická disulfidická vazba těchto monomerů. Specifický měďnatý chaperon Ccs1p poskytuje Sod1p měďnatý iont a usnadňuje formaci intramolekulární disulfidické vazby. (FURUKAWA et al. 2004) Kromě detoxifikační funkce má Sod1p také roli v udržování rovnováhy  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

Kvasinky mutantní v tomto genu jsou životaschopné, vykazují však růstové defekty na médiích s nefermentovatelným zdrojem uhlíku (laktát), jsou citlivé k oxidačnímu stresu a také vykazují zvýšenou senzitivitu k mědi. Dále mají kratší proliferační čas kvůli prodloužené G1 fázi. Sod1p je nutný pro sporulaci buněk. Mutanty jsou auxotrofní k metioninu a lyzinu a

částečně k leucinu. Tento defekt je vyvolán oxidativním poškozením odpovídajících enzymů. (WALLACE et al. 2004) Sod1p mutanty mají také mitochondriální defekty; nedostatek mitochondriální akonitázy, a typická je pro ně rychlá smrt po přechodu do stacionární fáze. Zvýšená citlivost k oxidativnímu stresu může být potlačena overexpresí *ATX1* nebo *ATX2*, nebo mutací genů *PMR1* a *BSD2* (přes alteraci homeostáze kovových iontů). Overexprese genu *TKL1* může mít potlačující efekt díky zvýšené produkci NADPH. (SLEKAR et al. 1996) Mutace v *SSQ1*, *JAC1*, *NFS11* a *ISU1* potlačují auxotrofie *sod1* mutanty. (JENSEN et al. 2004)

#### 4.4.2 Transformace kmene *sod1*

Kmen *sod1* zakoupený ze sbírky EUROSCARF byl vytvořen vnesením genu pro kanamycinovou rezistenci do genomu rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 výměnou za gen *SOD1*. (<http://web.uni-frankfurt.de/b15/mikro/euroscarf/data/YJR104c.html>) Mým úkolem bylo modifikovat tento *sod1* kmen tak, aby obsahoval Ato1p protein značený GFP. Kmen *sod1* jsem transformovala PCR produktem GFP-*URA3*. Tento produkt byl vytvořen pomocí plazmidu pKT209 (viz kapitola 3.1.2.). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. Úspěšnost transformace jsem ověřovala přítomností fluorescenčního signálu u buněk kolonií transformant narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmen *sod1*-Ato1p-GFP. (viz Obr. 4.11)



*sod1*-Ato1p-GFP

Obr. 4.11: Transformanta *sod1* mutanty se značeným Ato1p-GFP. Měřítko je 5  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Ověření *SOD1* mutace u transformovaného kmene *sod1-Ato1p-GFP*

Pro ověření delece *SOD1* genu v transformovaném kmeni *sod1-Ato1p-GFP* jsem připravila proteinový lyzát z buněk narostlých na pevném médiu (viz kapitola 3.5.16), ve kterém jsem zjišťovala přítomnost Sod1p aktivity metodami popsány v kapitole 3.5.18 a 3.5.19. Paralelně jsem připravila lyzáty kmenů nesoucích funkční Sod1p jako pozitivní kontrolu. Výsledek ověření absence Sod1p aktivity v kmeni *sod1-Ato1p-GFP* je na obr.4.12. Z obrázku je patrné, že transformovaný kmen *sod1-Ato1p-GFP* nevykazoval aktivitu cytosolické superoxid dismutasy Sod1p, pouze aktivitu mitochondriální superoxid dismutázy Sod2p.



e *sod1\_SOD1* *SOD1* *sod1* *SOD1* *SOD1* *sod1* *SOD1* *SOD1* *sod1* *SOD1* *d*

Obr. 4.12: Detekce aktivity superoxid dismutáz Sod1p a Sod2p. *sod1* označuje nanesený vzorek lyzátu kmene *sod1-Ato1p-GFP*, *SOD1* označuje vzorek kontrolního kmene s aktivní Sod1p, d,e jsou standardy křenuvé superoxid dismutasy.

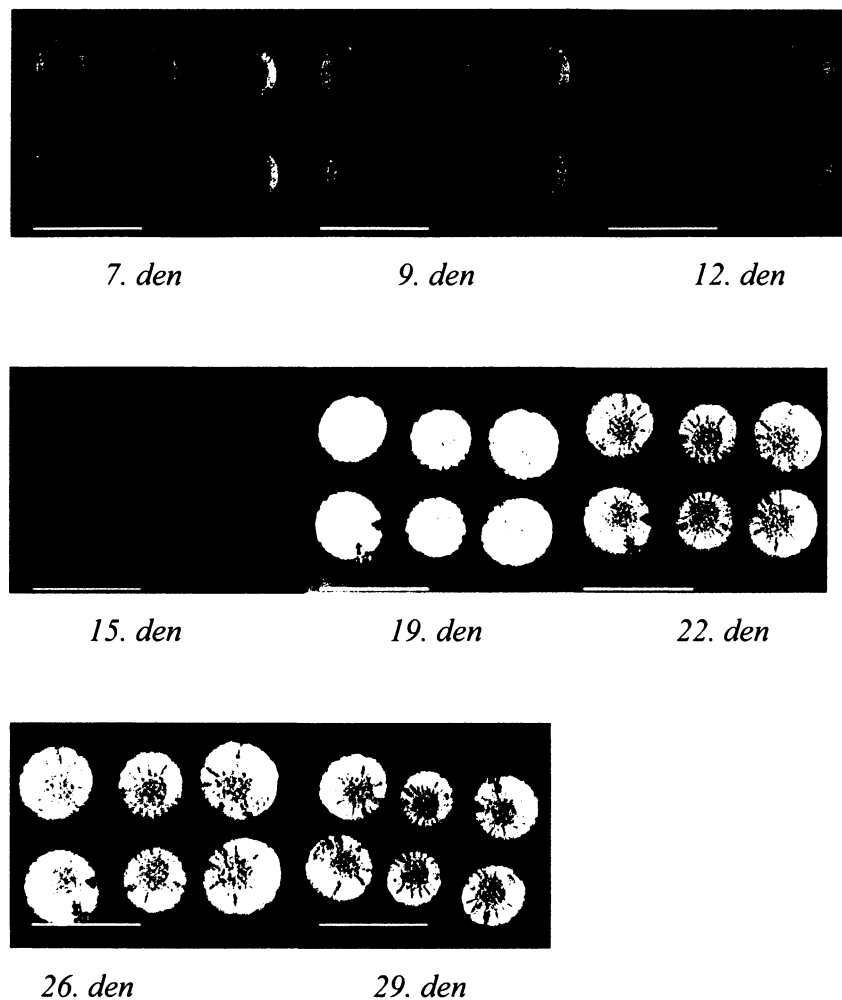
#### 4.4.4 Průběh vývoje kolonií *sod1-Ato1p-GFP* kmene

Průběh vývoje kolonií *sod1-Ato1p-GFP* kmene jsem pozorovala u cca 40 paralel ve dvou nezávislých experimentech. Měřítka je 1,5 cm.

Průběh změn alkalizace a acidifikace média se u kolonií kmene *sod1-Ato1p-GFP* na začátku v zásadě nelišil od kolonií rodičovského kmene, ani od kolonií původního kmene *sod1*.

Nástup alkalické fáze byl kolem 10-11. dne, alkalická fáze vrcholila kolem 15. dne. Intenzita alkalizace média koloniemi *sod1-Ato1p-GFP* byla srovnatelná s alkalizací média koloniemi kmene BY4742 (u některých paralel o něco méně výrazná). Morfologie kolonií se u jednotlivých paralel se částečně lišila, pozorovala jsem více či méně sektorované kolonie. U

kolonií kmene *sod1*-Ato1p-GFP byla výrazně slabší „acidická subfáze“ ve srovnání s koloniemi rodičovského kmene BY4742. (viz obr. 4.13)



Obr. 4.13: Průběh vývoje kolonií kmene *sod1*-Ato1p-GFP

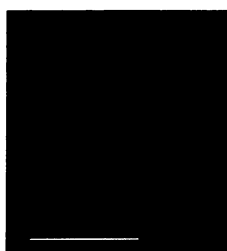
#### 4.4.5 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií *sod1*

Ato1p-GFP jsem sledovala u dvou paralelních *sod1* kolonií. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

7. den (acidická fáze)



*vnitřní a střední část (1s)*



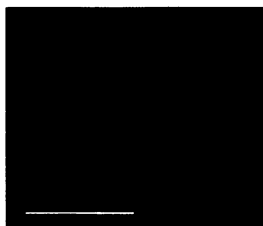
*vnější část (1s)*

Na rozdíl od rodičovského kmene byl slabý fluorescenční signál Ato1p-GFP detekovatelný u *sodI* kolonií ještě před začátkem jejich alkalizace. Ve vnější části kolonie byl fluorescenční signál slabě, ale jednoznačně přítomen i na membráně, ve vnitřní a střední části kolonie byl signál jenom uvnitř buňky ve velkých váčcích blíže neurčeného původu.

12. den (alkalická fáze)



*vnitřní a střední část (1s)*



*vnější část (1s)*

Po vstupu kolonie do alkalické fáze se produkce Ato1p-GFP proteinu zvýšila. Na rozdíl od rodičovského kmene byla zřetelnější ve vnitřní části kolonie (výrazná produkce byla i ve střední části, podobně jako u BY4742). Lokalizace GFP signálu byla ve velké míře také vnitrobuněčná. Signál na membráně byl stejně jako u rodičovského kmene přítomen v raftových shlucích.

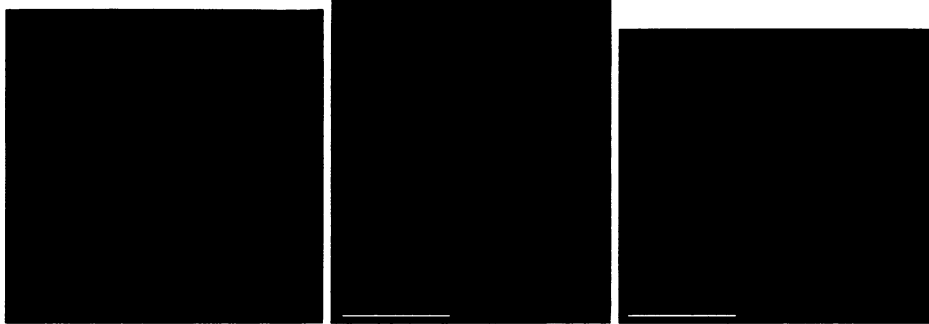
15. den (končící alkalické fáze)



*vnější, vnitřní a střední část (240 ms)*

Fluorescence (a tedy patrně i produkce) Ato1p-GFP proteinu se s pokračující alkalizací média výrazně zvýšila. Hladina fluorescence Ato1p-GFP byla v porovnání s rodičovským kmenem BY4742 vyšší. Na rozdíl od rodičovského kmene jsem žádné rozdíly mezi jednotlivými částmi kolonie nepozorovala. Na membránách byly pozorovatelné zřetelné raftové shluky.

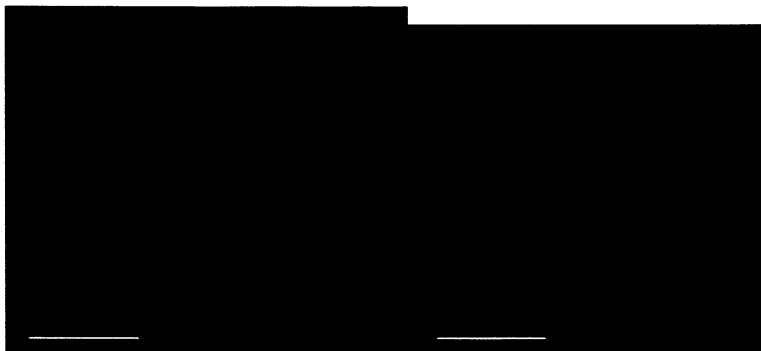
19.-22. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



*vnější, vnitřní a střední část (240 ms)*

Během následujícího období vývoje kolonií *sod1* se fluorescence Ato1p-GFP proteinu slabě zvýšila nezávisle na fázi, ve které se kolonie nacházely. Mezi jednotlivými částmi kolonie jsem nepozorovala žádné rozdíly.

26.-29. den (2. acidická fáze)



*vnější, vnitřní a střední část (240 ms)*

V pozdních fázích vývoje kolonie *sod1* se produkce Ato1p-GFP podobně jako u kmene BY4742 držela na vysoké hladině. Na rozdíl od rodičovského kmene však nebyly pozorovatelné žádné rozdíly mezi částmi kolonie *sod1* (u rodičovského kmene BY4742 byl signál Ato1p-GFP přítomen víc ve vnitřní části kolonie).

## 4.5 Fluorescenční značení Ato1p proteinů kmene *S. cerevisiae* s defektem v mitochondriální superoxid dismutáze Sod2p

*Cíl: Zjištění produkce a lokalizace Ato1p transportéru značeného zeleným fluorescenčním proteinem GFP v jednotlivých částech kolonií mutantního kmene sod2 v průběhu jejich vývoje. Porovnání s rodičovským kmenem BY4742.*

### 4.5.1 Mitochondriální superoxid dismutáza Sod2p

*SOD2 (YHR008C)* gen kóduje mitochondriální superoxid dismutázu. Protein se skládá z 222 aminokyselin a má Mw 24,7 kDa. Pro svou funkci vyžaduje  $Mn^{2+}$  ionty jako kofaktor. Patří do rodiny Mn/Fe superoxid dismutáz. Formuje homotetramery a váže jeden  $Mn^{2+}$  na každou podjednotku. Podobně jako Sod1p má roli v detoxifikaci volných radikálů. (VAN LOON et al. 1986) Váže superoxidové vedlejší produkty oxidativní fosforylace a převádí je na  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Také slouží jako modifikátor toxicity železa.

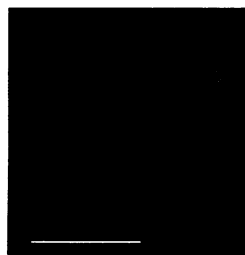
U lidí se nachází na dlouhém rameni 6.chromozomu (u myši např. na 17.). Mutace v tomto genu se spojují s idiopatickou kardiomyopatií (IDC), předčasným stárnutím a rakovinou.

Mutanty kvasinek defektní v tomto genu jsou životaschopné, vykazují však růstové defekty na médiích s nefermentovatelným zdrojem uhlíku. Také se u nich objevuje snížená akumulace glykogenu. Sod2p je nevyhnutný pro sporulaci.

### 4.5.2 Transformace *sod2* kmene

Kmen *sod2* zakoupený ze sbírky EUROSCARF byl vytvořen vnesením genu pro kanamycinovou rezistenci do genomu rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 výměnou za gen *SOD2*. (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YHR008c.html>) Mým úkolem bylo modifikovat tento *sod2* kmen tak, aby obsahoval Ato1p protein značený GFP. Kmen *sod2* jsem transformovala PCR produktem GFP-*URA3*. Tento produkt byl vytvořen pomocí plazmidu pKT209 (viz kapitola 3.1.2.). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. Úspěšnost transformace jsem ověřovala přítomností fluorescenčního signálu u kolonií transformant narostlých na GM

médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmen *sod2*-Ato1p-GFP. (viz Obr. 4.13)



*sod2*-Ato1p-GFP

Obr. 4.13: Transformanta *sod2* mutanty se značeným Ato1p-GFP. Měřítka je 5  $\mu$ m.

Vzhledem k tomu, že se mi z časových důvodů nepodařilo dokončit ověření *sod2* mutace v připraveném kmeni *sod2*-Ato1p-GFP, neprováděla jsem s ním zatím další fyziologické experimenty.



## 4.6 Fluorescenční značení Ato proteinů kmene *S. cerevisiae* s defektem v cytosolické kataláze Ctt1p

*Cíl: Zjištění produkce a lokalizace Ato1p transportéru značeného zeleným fluorescenčním proteinem GFP v jednotlivých částech kolonií mutantního kmene ctt1 v průběhu jejich vývoje. Porovnání s rodičovským kmenem BY4742.*

### 4.6.1 Kataláza Ctt1p (YGR088W)

CTT1 (YGR088W) gen kóduje cytosolickou katalázu (nazývanou též kataláza T), která má funkci v ochraně buňky před oxidativním poškozením peroxidem vodíku. (GRANT et al. 1998)

V *S. cerevisiae* způsobuje nedostatek živin pleiotropní odpověď charakteristickou akumulací zásobních uhlovodíků, předčasným zastavením v G1 fázi a sporulaci a/α diploidů. Studie mutantů defektních v RAS-cAMP dráze *rca1* mutant (viz poznámka) s dodáním externího cAMP ukázaly, že exprese *CTT1* je pod negativní kontrolou cAMP-dependentní protein kinázy a kontrola exprese genu v závislosti na koncentraci živin je zprostředkována touto dráhou. (BISSINGER et al. 1989) Nedostatek dusíku, síry nebo fosforu způsobuje zvýšenou expresi genu *CTT1*. Exprese je kontrolována také pomocí O<sub>2</sub> přes hem, a teplotním šokem. Northern blot analýzy exprese *CTT1* v přítomnosti nebo absenci hemu v RAS2+ (vysoká hladina cAMP) a v *ras2* mutante (nízká hladina cAMP) a v buňkách rostoucích při nízké teplotě (23 °C) a při teplotním šoku (37 °C) ukazují, že *CTT1* gen je ve významné míře indukován pouze v případě, že alespoň dva ze tří faktorů (oxidativní stres signalizující přes hem, hladovění – nízká hladina cAMP a teplotní stres) aktivují CTT1 promotor. (BELLAZZI et al. 1991)

Mutanty v tomto genu jsou životaschopné a vykazují teplotní senzitivitu.

*Poznámka: Rca1 inhibuje Cdh1<sup>Fz</sup>-dependentní anaphase-promoting complex/cyclosome (APC) a zabraňuje degradaci cyklinu v G2 fázi.*

#### 4.6.2 Transformace kmene *ctt1*

Kmen *ctt1* zakoupený ze sbírky EUROSCARF byl vytvořen vnesením genu pro kanamycinovou rezistenci do genomu rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 výměnou za gen *CTT1*. (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YGR088w.html>) Mým úkolem bylo modifikovat tento *ctt1* kmen tak, aby obsahoval Ato1p protein značený GFP. Kmen *ctt1* jsem transformovala PCR produktem GFP-*URA3*. Tento produkt byl vytvořen pomocí plazmidu pKT209 (viz kapitola 3.1.2.). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. Úspěšnost transformace jsem ověřovala přítomností fluorescenčního signálu u kolonií transformant narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmen *ctt1*-Ato1p-GFP. (viz Obr. 4.14)



Obr. 4.14: Transformanta *ctt1* mutanty se značeným Ato1p-GFP. Měřítka je 5  $\mu$ m.

#### 4.6.3 Ověření *ctt1* mutace u transformovaného kmene *ctt1*-Ato1p-GFP

Pro ověření delece *CTT1* genu v transformovaném kmeni *ctt1*-Ato1p-GFP jsem připravila proteinový lyzát z buněk narostlých na pevném médiu, ve kterém jsem zjišťovala přítomnost Ctt1p aktivity metodami popsanými v kapitole 3.5.18 a 3.5.19. Paralelně jsem připravila lyzáty kmenů nesoucích funkční Ctt1p jako pozitivní kontrolu. Výsledek ověření absence Ctt1p aktivity v kmeni *ctt1*-Ato1p-GFP je na obr. 4.15. Z obrázku je patrné, že transformovaný kmen *ctt1*-Ato1p-GFP nevykazoval aktivitu cytosolické katalázy Ctt1p, pouze aktivitu peroxisomální katalázy Cta1p.



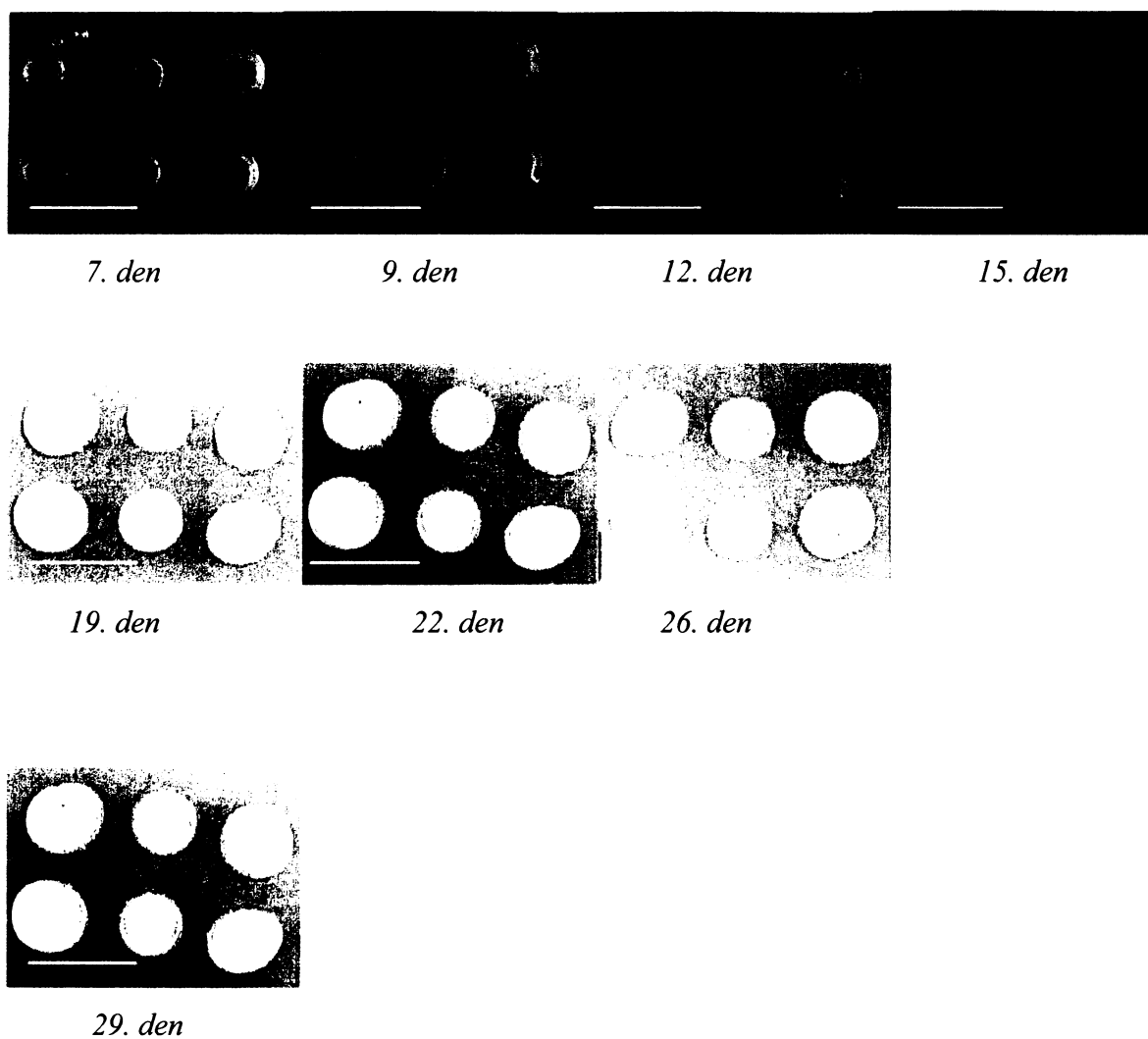
e c *ctl1* CTT1 TT1 *ctl1* CTT1 CTT1 *ctl1* CTT1 CTT1 *ctl1* CTT1 CTT1 d

Obr. 4.15: Detekce aktivity kataláz Ctt1p a Cta1p. Ctt1p reprezentuje spodní proužek, Cta1p horní proužek. *ctl1* označuje nanesený vzorek lyzátu kmene *ctl1*-Ato1p-GFP, *CTT1* označuje vzorek kontrolního kmene s aktivní Ctt1p, c,d,e jsou standardy křenové katalázy

#### 4.6.4 Průběh vývoje kolonií *ctl1*-Ato1p-GFP kmene

Vývoj kolonií kmene *ctl1*-Ato1p-GFP jsem pozorovala u cca 60 paralel ve dvou nezávislých experimentech.

Alkalická fáze vývoje kolonií *ctl1*-Ato1p-GFP začínala v průměru o něco později než u kolonií rodičovského kmene BY4742 a byla méně výrazná (podobněj ako u kolonií původního kmene *ctl1*) „Acidická subfáze“ vyznačující se tmavším zbarvením okolního média byla také méně intenzivní.



Obr. 4.16: Průběh vývoje kolonií kmene *ctt1-Ato1p-GFP*. Měřítka je 1,5 cm.

#### 4.6.5 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií *ctt1*

Ato1p-GFP jsem sledovala u tří paralelních *ctt1* kolonií ve dvou nezávislých experimentech. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

7. den (1. acidická fáze)



vnější část (1s)

Fluorescenční signál Ato1p-GFP proteinu byl detekovatelný ještě před začátkem alkalizace ve vnější části kolonie, ovšem v převážné míře uvnitř buněk v organelách blíže neurčeného původu. Pokud byl protein lokalizován na membráně, byl soustředěný do shluků lipidových raftů.

12. den (pozdní 1. acidická fáze resp. počáteční fáze alkalizace)



*A*

*B*

*vnější a střední část kolonie (1s)*

Na rozdíl od nemutovaného kmene BY4742 byla produkce Ato1p-GFP proteinu pozorovatelná ještě před začátkem alkalizace. Obrázek A pochází z kolonie, která měla fázi alkalizace média posunutou na 14. den. Obrázek B byl pořízený z kolonie z jiného pokusu, kde se 12. den už objevoval náznak začátku alkalizace.

15. den (alkalická fáze)



*vnější a střední část (360 ms)*

*vnitřní část (360 ms)*

Se začátkem fáze alkalizace média se výrazně zvýšila i fluorescence (t.j. produkce) Ato1p-GFP proteinu. Intenzita fluorescenčního signálu Ato1p-GFP v *ctt1* kolonii byla srovnatelná (nebo jen o něco slabší) s fluorescencí Ato1p-GFP v koloniích rodičovského kmene. Na rozdíl od kolonií kmene BY4742 byla však fluorescence Ato1p-GFP proteinu silnější ve vnitřní části, jak je vidět při použití kratších časů snímání fluorescenčního signálu.

19.-22. den (2. acidická fáze, „acidická subfáze“)



*vnější část (360 ms)    vnitřní část (360 ms)*

S nástupem 2. acidické fáze se fluorescence Ato1p-GFP proteinu v buňkách kolonií *ctt1* snížila. Na rozdíl od kmene BY4742, vstupem kolonií do „acidické subfáze“ jsem nezaznamenala žádnou změnu v intenzitě fluorescence Ato1p-GFP. Fluorescence Ato1p-GFP proteinu u buněk kolonií *ctt1* byla nižší než u buněk kolonií rodičovského kmene (srovnání při použití stejného času snímání fluorescence).

26. – 29. den (2. acidická fáze)



*vnější a vnitřní část (1s)*

Na obrázku je příklad buněk z vnější a vnitřní části *ctt1* kolonie. Buňky ze střední části kolonie *ctt1* podobně jako buňky kolonií rodičovského kmene vykazovaly slabší Ato1p-GFP fluorescenci. Fluorescence Ato1p-GFP proteinu zůstává u buněk *ctt1* kolonií zřetelně nižší než u buněk nemutovaného kmene.

40. den (2. acidická fáze)



*vnitřní a střední část (360 ms)    vnější část (360 ms)*

Ato1p-GFP fluorescenční signál u stárnoucích *ctt1* kolonií dále klesal. Silnější zůstal u buněk ve vnitřní části kolonie, u buněk ve vnější části byla GFP fluorescence převážně uvnitř buňky.

## 4.7 Fluorescenční značení Ato proteinů kmenů *S. cerevisiae* s modifikovanou produkcí PDR transporterů

*Cíl: : Příprava kmenů a zjištění produkce a lokalizace Ato1p transportéru značeného zeleným fluorescenčním proteinem GFP v kmenech s modifikovanou produkcí transporterů mnohonásobné lékové resistance („pleiotropic drug resistance“, PDR).*

### 4.7.1 PDR transportéry

**PDR1** (*YGL013C*)- gen kóduje transkripční regulátor Pdr1p obsahující motiv zinkového klastru, který je hlavním aktivátorem exprese řady genů kódujících proteiny s rolí v mnohočetné lékové rezistenci („pleiotropic drug resistance“). Příkladem jsou geny *PDR5* a *SNQ2*. Pdr1p protein je dlouhý 1068 aminokyselin, s Mw 121,8 kDa. Jeho isoelektrický bod je 6,91. Kvasinky mutantní v tomto genu vykazují defektní růst na médiu s nízkým obsahem železa i přes to, že je funkční vysokoafinitní transportní systém železa. (TUTTLE et al. 2003) Dále mají zvýšenou citlivost k širokému spektru extracelulárních jedů.

**Snq2p** (*Ydr011*) je transportní protein patřící do skupiny ABC transporterů (viz kapitola 2.3.1), který se podílí na mnohočetné lékové rezistenci a rezistenci k „singlet kyslíkové druhy“. (VERVERIDIS et al. 2001) Protein je 1501 aminokyselin dlouhý, s molekulární hmotností 168,8 kDa. Jeho isoelektrický bod je 7,57.

**Pdr5p** (*Yor153*) je rovněž ABC transportér s nízkým poločasem existence v buňce, který aktivně transportuje ven z buněk široké spektrum látek. Má také roli v transportu steroidů, v rezistenci ke kationtům a v buněčné detoxifikaci během exponenciální fáze. Exprese *PDR5* je regulována prostřednictvím Pdr1p.

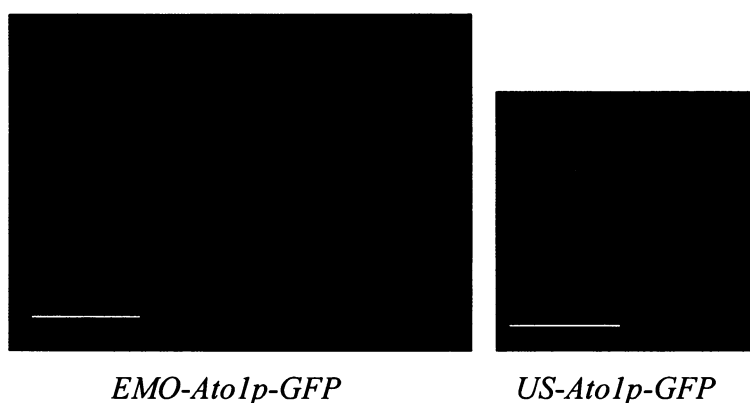
**Yor1p** (*Ygr281*) je transportér plazmatické membrány patřící rovněž mezi ABC transportery plazmatické membrány. Zprostředkovává export mnoha rozdílných organických aniontů včetně oligomycinu. Protein je dlouhý 1477 aminokyselin a má hmotnost 166, 73 kDa. Jeho isoelektrický bod je 7,65.



Mutanty Yor1 jsou životaschopné, mají prodloužené telomery a vykazují mírné růstové defekty. Yor1p vykazuje značnou sekvenční podobnost k proteinu Ycf1p.

#### 4.7.2 Transformace kmene EMO1/3 a US50-18c

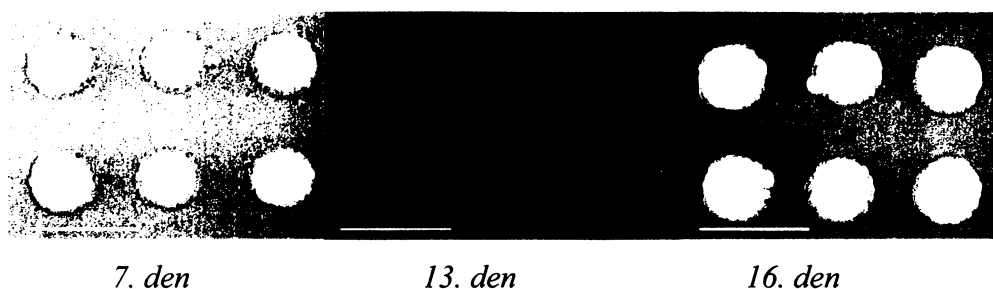
Kmen EMO1/3 a kmen US50-18c jsem transformovala PCR produktem GFP-URA3, který byl vytvořen pomocí plazmidu pKT209 (viz. kapitola 3.1.2). Transformanty jsem selektovala na MM s lysinem, leucinem a histidinem bez uracilu. Úspěšnost transformace jsem ověřovala přítomností fluorescenčního signálu u buněk kolonií transformant narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmeny EMO1/3-Ato1p-GFP (dále EMO-Ato1-GFP) a US50-18c-Ato1p-GFP (dále US-Ato1p-GFP) (viz Obr. 4.16)



Obr. 4.16: Transformanty kmenů EMO1/3 a US50-18c se značenými Ato1p-GFP proteiny. Měřítka u obrázků je 5  $\mu$ m.

#### 4.7.3 Průběh vývoje kolonií kmenů EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP

Kolonie kmenů EMO-Ato1p-GFP a *US-Ato1p-GFP* alkalizovaly médium o něco slaběji než kolonie kmene BY4742. Alkalická fáze začínala kolem 11. dne, vrcholila kolem 14.dne. Subfáze acidické fáze vyznačující se tmavším zabarvením okolního média, kterou jsem pozorovala u kmene BY4742, nebyla patrná. Kolonie kmenů US50-18c a US-Ato1p-GFP vypadaly stejně jako kolonie původních kmenů EMO1/3 a US50-18c a stejný byl i průběh jejich vývoje. (viz Obr. 4.17)



Obr. 4.17: Fáze vývoje makrokolonií kmene EMO-Ato1p-GFP. Měřítko je 1,5 cm.

#### 4.7.4 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií kmene EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP

Ato1p-GFP fluorescenci kolonií kmenů EMO1/3 a US50-18c jsem sledovala ve dvou nezávislých experimentech. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítko u všech obrázků je 5  $\mu$ m.

8. den (1. acidická fáze)

**kmen US-Ato1p-GFP**



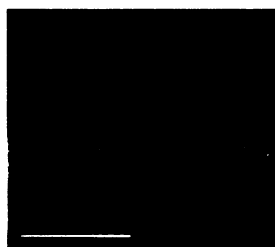
*vnitřní část (1s)*



*vnitřní část(120 ms)*

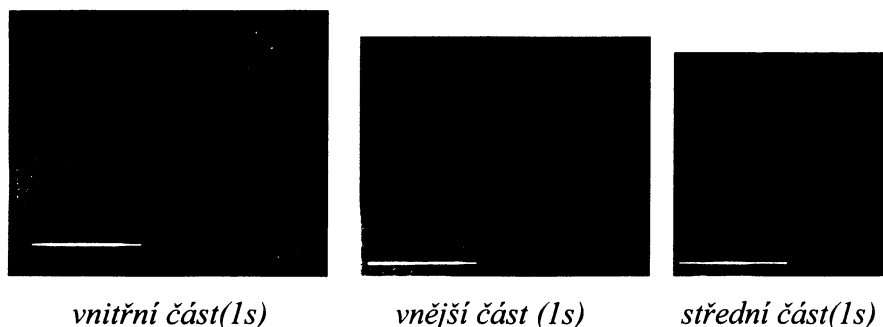


*vnější část(1s) (120 ms)*



*střední část (1s)*

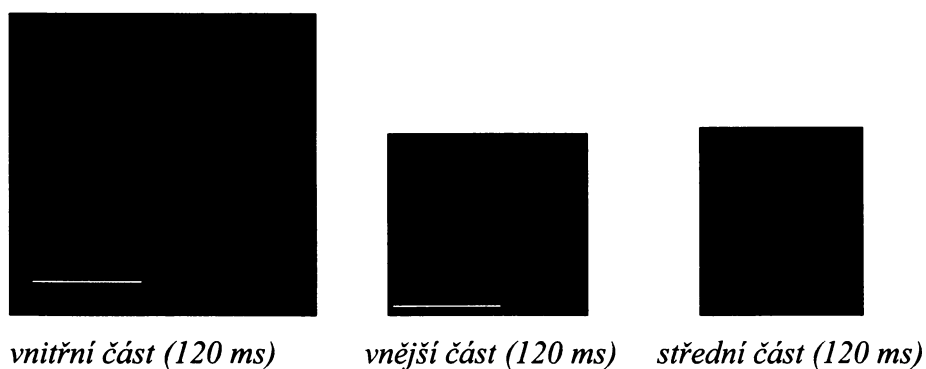
### Kmen *EMO-Ato1p-GFP*



Produkce Ato-GFP proteinu začala u kolonií obou kmenů ještě před začátkem alkalické fáze. Srovnáním obrázků kmene BY-Ato1p-GFP a kmenů EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP při integraci signálu 1s je patrné, že produkce Ato1p-GFP je u kmene BY4742 výrazně méně intenzivní. Porovnání fluorescence kmenů EM-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP při kratší době snímání fluorescenčního signálu ukázalo, že produkce Ato1p byla ve všech částech kolonie přibližně stejná. Lokalizace Ato1p-GFP byla výrazně membránová. Raftové shluky na membráně nebyly tak zřetelné jako u kmene BY-Ato1p-GFP. Fluorescence (a tedy patrně produkce) Ato1p-GFP proteinu u kmene EM-Ato1p-GFP byla větší než u kmene US-Ato1p-GFP.

12. den (začátek alkalické fáze)

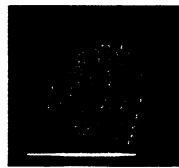
### kmen *US-Ato1p-GFP*



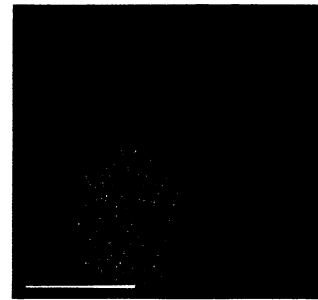
### kmen EMO-Ato1p-GFP



*vnitřní část (1s) (120 ms)*



*vnější část (1s)*



*střední část(1s)*

S nástupem alkalické fáze jsem výraznější změny v Ato1p-GFP fluorescenci, která zůstávala na vysoké hladině, nepozorovala. S počátkem alkalizace pouze začal být fluorescenční signál výraznější z vnitřní oblasti kolonie. Produkce Ato1p-GFP proteinu byla u kmene *EMO-Ato1p-GFP* a *US-Ato1p-GFP* srovnatelná.

16. den (končící alkalická fáze)

### kmen US-Ato1p-GFP



*vnitřní část (120 ms)*

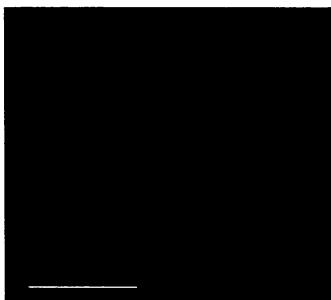


*vnější část (120 ms)*

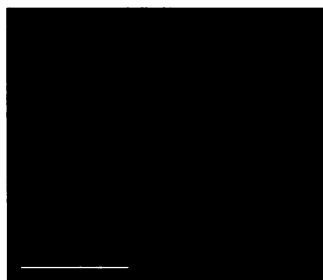


*střední část (120 ms)*

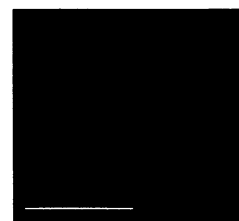
### kmen *EMO-Ato1p-GFP*



*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*

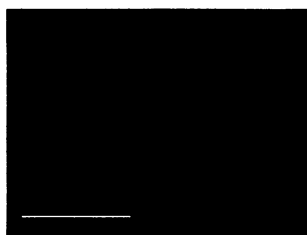


*střední část (120 ms)*

Během pokračující alkalické fáze Ato1p-GFP fluorescence stoupla. Fluorescenční signál byl i nadále větší u buněk ve vnitřní části kolonií. Pozorovala jsem i výraznou vnitrobuněčnou lokalizaci. Ato1p-GFP fluorescence byla silnější u kmene US-Ato1p-GFP.

20.den (2.acidická fáze)

#### **kmen US-Ato1p-GFP**

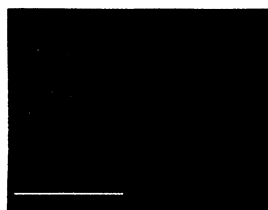


*vnitřní část (120 ms)*



*vnější část (120 ms)*

#### **kmen EMO-Ato1p-GFP**



*vnitřní část (1s)*

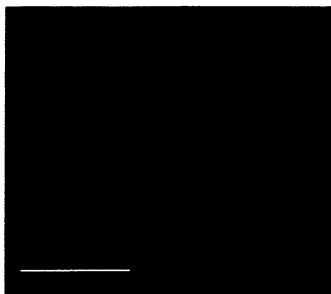


*vnější část (1s)*

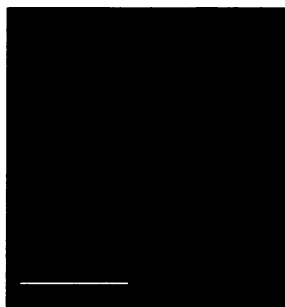
Po cca 20 dni vývoje kolonií intenzita fluorescenčního signálu mírně poklesla, hlavně u kmene EMO-Ato1p-GFP, nicméně zůstávala pořád vysoká. Ato1p-GFP fluorescence byla i nadále vyšší u kmene US-Ato1p-GFP.

26.den (pozdní acidická fáze)

**kmen US-Ato1p-GFP**



*vnější část (120 ms)*



*vnitřní část (120ms)*



*střední část (120 ms)*

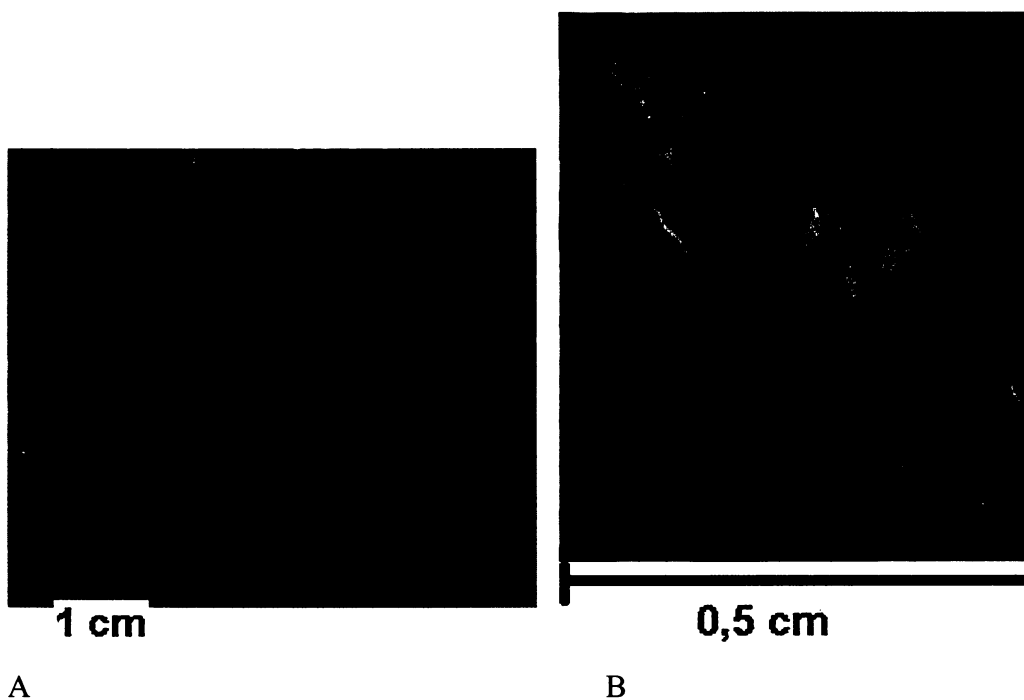
Ato1-GFP fluorescence zůstávala u kmene US-Ato1p-GFP vysoká do pozdních dnů vývoje kolonie (cca 30. den). U buněk kolonií kmene EMO-Ato1p-GFP fluorescenční signál postupně slábnul. Lokalizace Ato1p-GFP v membránových raftových shlucích nebyla patrná.

## 4.8 Fluorescenční značení Ato proteinů divokých kmenů *S. cerevisiae*

*Cíl: Příprava divokých kmenů Saccharomyces cerevisiae nesoucích Ato1p transporter značený zeleným fluorescenčním proteinem GFP. Připravit Ato1p-GFP kmeny odvozené jak od původního divokého kmene BR-F tvořícího strukturované kolonie, tak od jeho domestikované varianty BR-S tvořící kolonie hladké*

### 4.8.1 Divoký kmen *Saccharomyces cerevisiae* BR-F-Ato1p-GFP

Kmen *S.cerevisiae* BR-F je divoký prototrofní diploidní kmen kvasinek, vytvářející drsné, strukturované kolonie (viz Obr. 4.18) (viz kapitola 2.6)

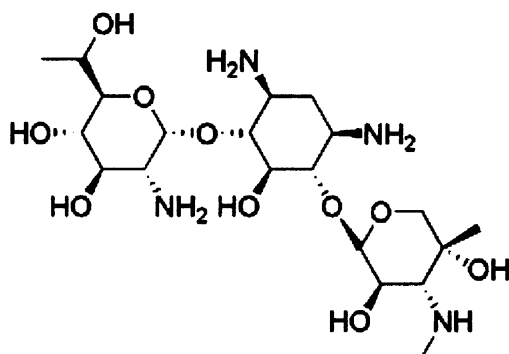


Obr. 4.18: 3 dny staré monokolonie BR-F B: 15 dnů staré monokolonie BR-F

### 4.8.2 Selekční koncentrace kanamycinu pro kmeny BR-F a BR-S

Plazmid pMK199 nese jako selekční marker rezistenci pro kanamycin. Místo kanamycinu jsem používala jeho analog – antibiotikum G418 (viz Obr. 4.19). Látka G418 je aminoglykosidové antibiotikum, popsané původně pro své antibiotické účinky na prvoky a

červy. (LOEBENBERG et al. 1975) Později bylo zjištěno, že inhibuje elongaci polypeptidů při proteosyntéze u eukaryontů. (BAR-NUN et al. 1983) Protože toto antibiotikum může být inaktivováno fosforylací bakteriálním enzymem neomycin fosfotransferázou, bylo navrženo použití genu, kódujícího tento enzym, jako selekčního markeru v genetických studiích. (DAVIES a JIMENEZ 1980) Dělicí se buňky jsou na G418 citlivější. Od té doby je tento selekční systém široce používán ve všech eukaryontních buňkách, včetně kvasinek.



Obr. 4.19: Strukturální vzorec G418 ( $C_{20}H_{40}N_4O_{10} \cdot 2H_2SO_4$ ). Zdroj: <http://www.invivogen.com>

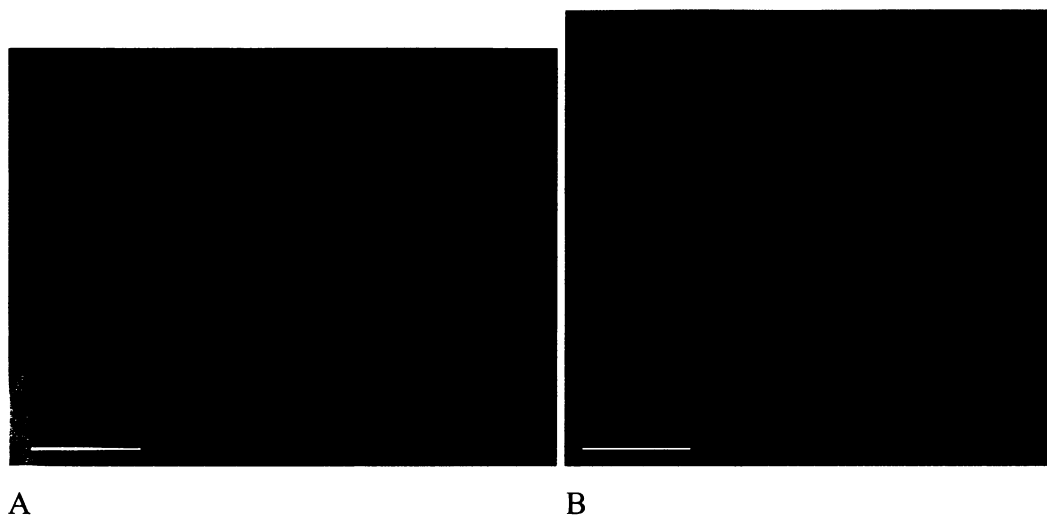
Doporučená koncentraci G418 pro laboratorní kmeny je 160 mg/l. Divoké kmeny by měly být na G418 ještě citlivější. Po snížení koncentrace antibiotika nebylo ovšem možné rozpoznat transformanty divokého kmene BR-F. Vhodnou koncentraci jsem hledala vyséváním naředěné suspenze (na koncentraci  $10 - 10^3$  buněk na misku) na YEPG s různou koncentrací G418. Jako dostačující se v mém případě ukázala koncentrace 200 mg/l.

#### 4.8.3 Transformace kmene *S.cerevisiae* BR-F

Divoký kmen *Saccharomyces cerevisiae* BR-F jsem použila pro vytvoření kmene se značeným Ato1p-GFP proteinem. Kmen jsem transformovala PCR produktem GFP-kan (konstruovaný pomocí plazmidu pMK199) (viz kapitola 3.1.2). Pro transformaci jsem použila alternativní protokol (viz kapitola 3.5.6.3). Po transformaci jsem vybrala kolonie narostlé na médiu s kanamycinem. Úspěšnost transformace jsem ověřovala zjišťováním přítomnosti fluorescenčního signálu u transformant narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmen BR-F-Ato1p-GFP.



#### 4.8.4 Produkce Ato1p-GFP u kmene BR-F-Ato1p-GFP



Obr. 4.20: Fluorescenční signál z A 8 dnů starých monokolonií BR-F-Ato1p-GFP, B 16 dnů starých monokolonií BR-F-Ato1p-GFP. Měřítka u obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

Pozorování dokazují, že i divoký kmen BR-F-Ato1p-GFP produkuje Ato1p-GFP s membránovou lokalizací (viz Obr. 4.20). Od laboratorního kmene se BR-F liší rozmanitým tvarem buněk a různou hladinou fluorescence (a tedy patrně produkce) Ato1p-GFP proteinu u různých buněk nacházejících se ve stejný čas a ve stejné části kolonie. Také se liší méně zřetelnými raftovými shluky na membráně. Pro detailní porovnání intenzity fluorescence a lokalizace Ato1p-GFP u kolonií divokých a laboratorních kmenů kvasinek budou zapotřebí další experimenty, které již z časových důvodů nebylo možné provést.

#### 4.8.5 Domestikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae* BR-S-Ato1p-GFP

BR-S kmen je domestikovanou formou původního BR-F kmene, který v laboratorních podmínkách změnil svoji fyziologii a začal tvořit kolonie s hladkou morfologií (viz kapitola 2.6), podobnou morfologii kolonií laboratorního kmene BY4742. Kmen BR-S má zachovanou prototrofii a je diploidní. (V. Šťovíček, diplomová práce)

#### 4.8.6 Transformace kmene *S.cerevisiae* BR-S

Domestifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae* BR-S jsem použila pro vytvoření kmene se značeným Ato1p-GFP proteinem. Kmen jsem transformovala PCR produktem GFP-kan (konstruovaný pomocí plazmidu pMK199). (viz kapitola 3.1.2) Pro transformaci jsem použila alternativní protokol (viz kapitola 3.5.6.3). Po transformaci jsem vybrala kolonie narostlé na médiu s kanamycinem. Úspěšnost transformace jsem ověřovala zjišťováním přítomností fluorescenčního signálu u transformant narostlých na GM médiu do fáze alkalizace. Takto jsem vytvořila stabilní kmen BR-S-Ato1p-GFP. (viz Obr. 4.21)



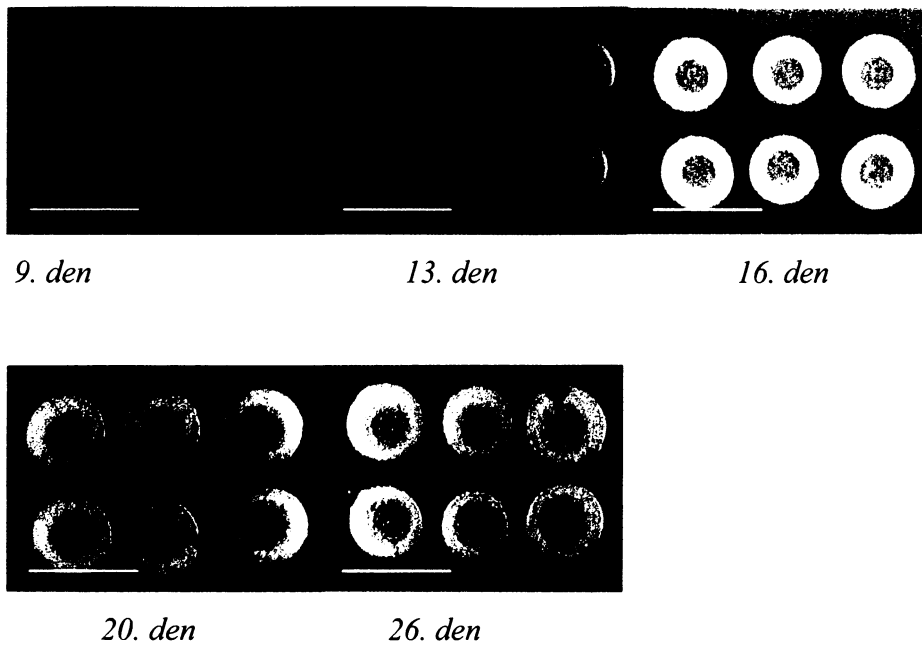
BR-S-Ato1p-GFP

Obr. 4.21: Transformanta kmene BR-S se značeným Ato1p-GFP. Měřítka je 5  $\mu$ m.

#### 4.8.7 Průběh vývoje kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP

Průběh vývoje kolonií kmenem BR-S-Ato1p-GFP. alkalizaci a acidifikaci média jsem pozorovala u kolonií na cca 10ti paralelních miskách.

Kolonie domestikovaného kmene BR-S-Ato1p-GFP vstupovaly do alkalické fáze dřív než kolonie laboratorního kmene BY4742, alkalizace média začínala kolem 8. dne a byla méně intenzivní než u kolonií laboratorního kmene BY4742. Alkalická fáze odeznívala již kolem 13. dne vývoje kolonií. Subfáze acidické fáze vyznačující se tmavším zabarvením okolního média, kterou jsem pozorovala u kmene BY4742 nebyla u kolonií BR-S-Ato1p-GFP patrná. (viz Obr. 4.22)



Obr. 4.22: Průběh vývoje kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP. Měřítka je 1,5 cm.

#### 4.8.8 Produkce Ato1p-GFP v průběhu vývoje kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP

Ato1p-GFP fluorescenci kolonií kmene BR-S-Ato1p-GFP jsem sledovala ve dvou nezávislých experimentech. Uvedené obrázky ukazují reprezentativní buňky, které tvořily majoritní frakci populace. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

##### 8. den (začátek alkalizace)

Obě kolonie domestikovaného kmene BR-S-Ato1p-GFP začaly alkalizovat poměrně brzo, tato alkalizace média však nebyla provázena produkcí Ato1p-GFP proteinu v žádné oblasti kolonie.

##### 12. den (alkalická fáze)



vnitřní část (1s)

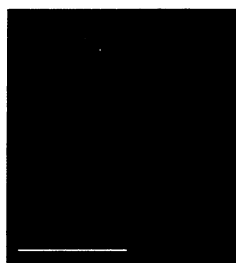
střední část (1s)

Produkcí Ato1p-GFP proteinu jsem zaznamenala 12. dne ve vnitřní a střední části kolonie. Ve vnější části kolonie byla produkce Ato1p-GFP velmi slabá. Na rozdíl od laboratorního kmene jsem pozorovala výraznou vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu.

#### 16. den (acidická fáze)



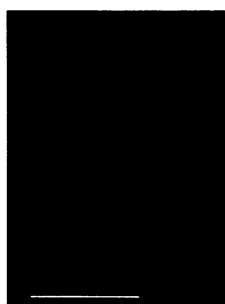
*vnitřní a střední část (1s)*



*vnější část (1s)*

Laboratorní kmen BY-Ato1p-GFP do skončení alkalické fáze produkoval Ato1p převážně ve vnější oblasti kolonie. Divoký kmen BR-S-Ato1p-GFP měl ze začátku výraznější produkci ve vnitřní části kolonie, po skončení alkalické fáze se fluorescenční signál z vnější části kolonie vyrovnal signálu z vnitřní části. Intenzita fluorescenčního signálu vnitřní a střední oblasti kolonie byla podobná, jak ukazuje společný obrázek. Lokalizace proteinu byla velmi výrazně vnitrobuněčná, v malých váčcích uspořádaných do tvaru podkovy (nebo kruhu).

#### 20. den (acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*



*vnější část (1s)*



*střední část (1s)*

Nejvýraznější fluorescence Ato1p-GFP proteinu byla ve střední části kolonie, u větších buněk. Fluorescenční signál v ostatních částech kolonie klesal, stále převažovala vnitrobuněčná lokalizace.

26. den (pokročilá acidická fáze)



*vnitřní část (1s)*      *střední část (1s)*

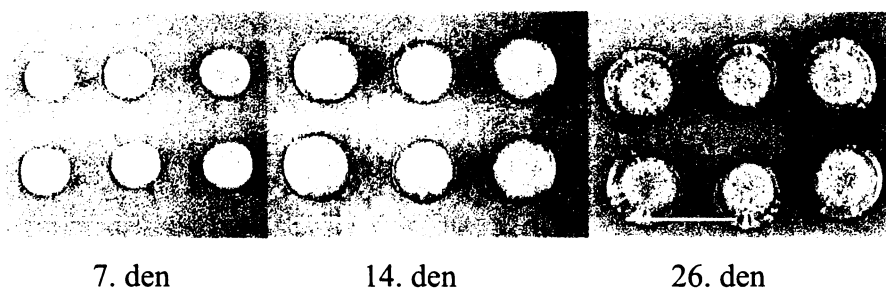
V pozdních acidických fázích byla intenzita fluorescenčního signálu velmi nízká. Ve vnější oblasti kolonie byla stěží detekovatelná, ve vnitřní oblasti byla viditelná, ovšem mnohem slabší než u laboratorního kmene BY-Ato1p-GFP. Kolem 30. dne fluorescenční signál vymizel ze všech oblastí kolonie.

## 4.9 Změny produkce fluorescenčně značených Ato-proteinů u odlišně se vyvíjejících obřích kolonií

*Cíl: Zjistit produkci Ato-GFP proteinů u obřích kolonií s alterovaným vývojem (s posunem vývojových fází) rostoucích na nestandardním kultivačním médiu*

Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že nestandardní příprava ploten s kultivačním agarem (např. použití ploten příliš vlhkých) vede k výraznému posunu růstových fází kolonií. Typickým příkladem je situace, kdy kolonie neprocházejí standardní fází alkalizace začínající mezi cca 8-11 dnem, ale začínají slabě alkalizovat mnohem později, přibližně kol 24.- 28 dne vývoje (viz Obr. 4.23). V některých experimentech alkalizace nebyla téměř viditelná. Měření produkce plynného amoniaku u takto alterovaných kolonií (slabě pozdně alkalizujících nebo i viditelně nealkalizujících) kmene BY4742 i některých mutant ukázalo, že je v takové případě výrazně zvýšena a hlavně prodloužena (na několik dní) 1. fáze produkce amoniaku, která u „normálně“ se vyvíjejících se kolonií odeznívá během cca 24 hod. Pozdní alkalizace je, stejně jako alkalizace „normálních“ kolonií provázena prudkým nárůstem produkce amoniaku. K produkci amoniaku v přibližně stejné době dochází i v případě, kdy alkalizace není viditelná (Haislová, nepublikované výsledky). Vzhledem k tomu, že se Ato transportéry podle našeho předpokladu podílejí na exportu amonných iontů, bylo zajímavé zjistit, jaký bude průběh jejich produkce a lokalizace v alterovaných koloniích různých kmenů, rostoucích na nestandardních plotnách.

Následující obrázky ukazují příklady Ato-GFP proteinů v buňkách kolonií rodičovského kmene a vybraných mutant v různých fázích vývoje, rostoucích za podmínek, kdy nedocházelo k viditelné alkalizaci média. Vzorky na mikroskopování byly odebírány stejně jako u standardně rostoucích kolonií (viz předchozí kapitoly).



Obr. 4.23: Průběh vývoje kolonií kmene *ctt1*-Ato1p-GFP. Měřítko je 1,5 cm.

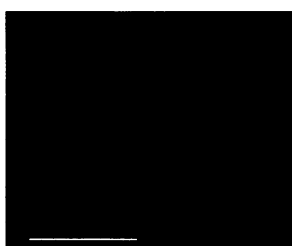
#### 4.9.1 Produkce Ato-GFP v průběhu vývoje alterovaných kolonií

Ato-GFP fluorescenci kolonií u jednotlivých kmenů rostoucích na nestandardních plotnách jsem sledovala ve třech nezávislých experimentech. Měřítka u všech obrázků je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 7.-13. den vývoje kolonií

Během 11. dne, kdy obří kolonie vyseté na standardní agarové médium vstupovaly do alkalické fáze (viz předchozí kapitoly) jsem u alterovaných kolonií kmene BY-Ato-GFP a jeho GFP značených mutant *sok2*, *sod1*, *sod2* a *ctt1* nepozorovala žádnou produkci Ato-GFP-proteinů. Výjimkou byly kolonie kmenů US-Ato1p-GFP a EMO-Ato1p-GFP, kde jsem pozorovala fluorescenci Ato1p-GFP proteinu od cca 8. dne jejich vývoje.

#### Kmen US-Ato1p-GFP



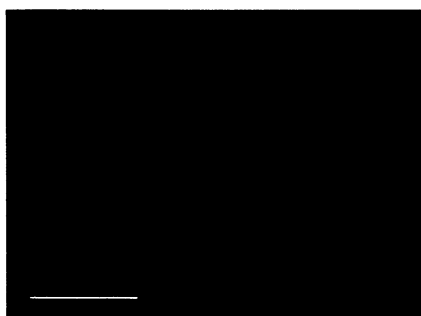
8. den: vnitřní část (3s)



8.den: vnější (3s)



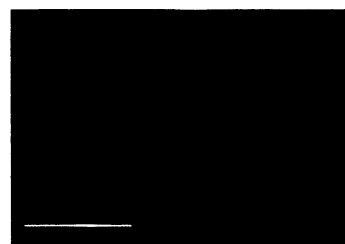
8.den: střední část (3s)



11.den: vnitřní část (3s)



11. den: vnější část(3s)

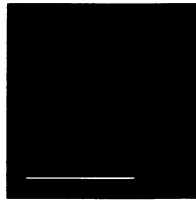


11. den: střední část (3s)

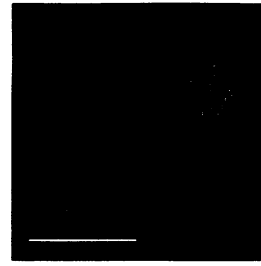
### kmen EMO-Ato1p-GFP



8.den: vnější část (3s)



11.den: vnitřní část (3s)



11.den: vnější část (3s)

Kmeny US-Ato1p-GFP a EMO-Ato1p-GFP produkovaly Ato1p-GFP proteiny od cca 8. dne, kmen US-Ato1p-GFP výrazněji než kmen EMO-Ato1p-GFP. Fluorescence Ato1p-GFP proteinu byla podstatně slabší než u buněk z kolonií, které médium standardně alkalizovaly. V počátečních dnech byl fluorescenční signál silnější ve vnější části kolonií. S pokračujícím vývojem se fluorescenční signál ve všech částech kolonie dál zesiloval. V porovnání s buňkami z alkalizujících kolonií byl signál ve větší míře i vnitrobuněčný. Ato1p-GFP protein na membráně byl soustředěn ve shlucích lipidových raftů.

### 14. den vývoje kolonií

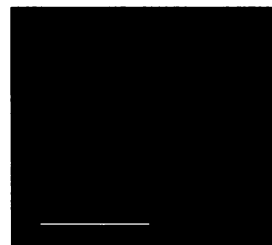
Na fotografiích jsou příklady Ato-GFP proteinů různých kmenů během 14. dne vývoje jejich kolonií rostoucích na nestandardním médiu. Lokalizace byla výrazně vnitrobuněčná, membránové raftové shluky v případě Ato1p-GFP a Ato3p-GFP nebyly dobře pozorovatelné. Kmen BY-Ato1p-GFP produkoval Ato-GFP proteiny o něco víc než jeho mutanty *sod1*, *sod2* a *ctt*. Produkce Ato-GFP proteinů byla nižší než u buněk „normálních“ alkalizujících kolonií.



*sod2-Ato1p-GFP*  
střední část (3s)



*sod2-Ato1p-GFP*  
vnitřní část (3s)



*ctt1-Ato1p-GFP*  
střední část (3s)

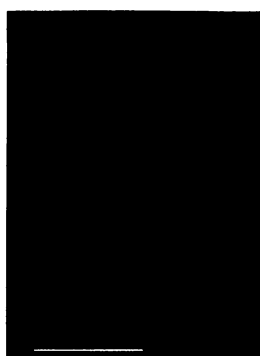


*BY-Ato3p-GFP*  
vnější část (3s)





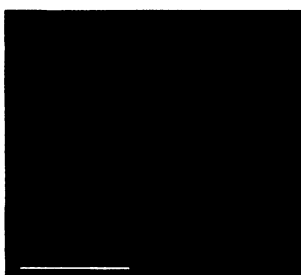
*BY Ato3p-GFP*  
*střední část (3s)*



*BY Ato1p-GFP*  
*vnější část (3s)*

### 19. den vývoje kolonií

V průběhu dalšího vývoje alterovaných kolonií zůstával fluorescenční signál buněk kolonií kmenů BY-Ato1p-GFP a mutant *sok2*, *sod1*, *sod2* a *ctt1* stejný. Rozdíl jsem pozorovala jenom u kmenů EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP, kde došlo k výraznému nárůstu fluorescence (a tedy patrně produkce) Ato1p-GFP proteinu. Signál byl výraznější ve vnější části kolonie. Fluorescenční signál byl u kmenů EMO-Ato1p-GFP a US-Ato1p-GFP srovnatelný.



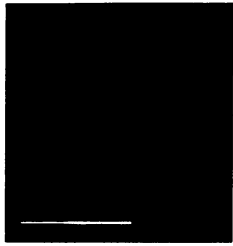
19.den: *vnitřní část (400ms)*



19.den: *vnější část (400ms)*

### 26. den vývoje kolonií

Kolem 26. dne vývoje kolonií nastala výrazná změna. Buňky kolonií všech kmenů začaly ve všech částech kolonie produkovat Ato-GFP proteiny ve velkém množství. Fluorescence Ato-GFP proteinů byla srovnatelná s fluorescencí buněk kolonií, které prošly standardním vývojem (viz předchozí kapitoly). Na fotografiích jsou příklady Ato-GFP proteinů buněk z různých částí kolonií různých kmenů.



*sok2-Ato2p-GFP*  
vnější část (1s)



*Sok2-Ato2p-GFP*  
vnitřní část (400ms)



*sod2-Ato1p-GFP*  
střední část (400ms)



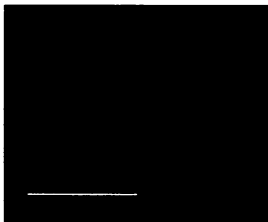
*sod1-Ato1p-GFP*  
vnitřní část (400ms)



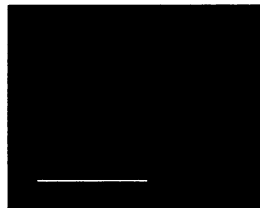
*sod1-Ato1p-GFP*  
střední část (400ms)



*BY-Ato2p-GFP*  
vnější část (400ms)



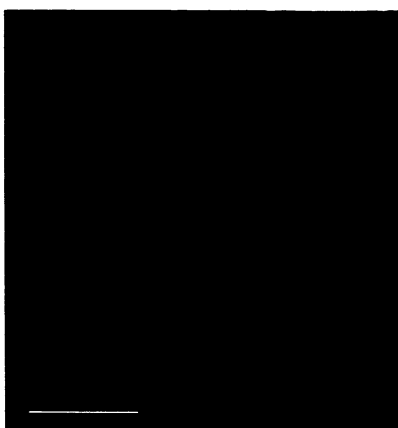
*ctt1-Ato1p-GFP*  
vnější část (400ms)



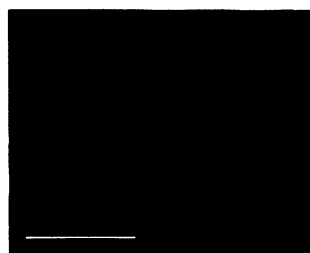
*BY-Ato3p-GFP*  
střední část (400ms)



*BY-Ato2p-GFP*  
střední část (400ms)



*BY-Ato2p-GFP*  
vnitřní část (400ms)



*BY-Ato1p-GFP*  
vnější část (400ms)

## 5. DISKUSE

Předchozí znalosti o struktuře Ato proteinů a chování kmenů s defektem v těchto proteinech napovídají, že Ato proteiny (proteiny s dosud neznámou funkcí) by mohly mít funkci transportéru amoniaku/amonného kationu ven z kvasinkových buněk (PALKOVÁ et al. 2002) (viz též kapitola 2.5.1.5) a uplatňovat se při amoniakové signalizaci kvasinkových kolonií (viz kapitola 2.5.1). Tato signalizace je v popředí zájmu naší laboratoře a proto jsem se ve své diplomové práci zaměřila na experimenty, které mohou přispět k poznání role Ato proteinů právě při amoniakové signalizaci kolonií kvasinek. Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, jak se Ato proteiny produkují v průběhu vývoje kolonií tvořených kmeny, u kterých byla dříve zjištěna změna (např. porucha) amoniakové signalizace a kde v buňkách i koloniích těchto kmenů jsou Ato proteiny lokalizovány. Druhým cílem bylo porovnat produkci a lokalizaci Ato proteinů značených alternativně GFP nebo RFP v koloniích rodičovského kmene BY4742. Tato porovnání by měla přispět k znalostem o možnostech a limitacích využití těchto dvou fluorescenčních proteinů. Získané Ato-GFP a Ato-RFP kmeny budou základem pro další konstrukce kmenů pro kolokalizační studie. Třetím cílem bylo připravit kmeny „divokých“ kmenů *S.cerevisiae*, které by umožnily zjistit produkci a lokalizaci Ato proteinů u strukturovaných kolonií, u nichž lze předpokládat vývoj odlišný od vývoje kolonií kmenů laboratorních..

### 5.1 Rozdíly produkce a lokalizace Ato-GFP a Ato-RFP v koloniích kmene BY4742

Tato část mé práce navazovala na předchozí experimenty M.Řičicové s D.Strachotové, které již dříve zjišťovaly produkci a lokalizaci Ato-GFP proteinů v kvasinkových koloniích (M. Řičicová, dizertační práce). Nicméně, vzhledem k tomu, že hlavním cílem mé práce bylo zjistit Ato-GFP produkci u mutantních kmenů, které jsem plánovala připravit pomocí integrační kasety nesoucí *URA3* gen jako selekční znak, připravila jsem si stejným způsobem i rodičovský kmen (kmeny konstruované M.Řičicovou byly připravené pomocí integrační kasety s genem *KAN<sup>r</sup>* jako selekčním znakem). Dále jsem připravila i BY4742 kmeny s Ato proteiny značenými RFP. U všech šesti kmenů jsem nejprve zkontrolovala, že průběh vývoje jejich kolonií je srovnatelný s vývojem kolonií rodičovského kmene BY4742. Ve svých experimentech jsem u kolonií tvořených kmenem BY4742 nebo jeho Ato-GFP deriváty obvykle pozorovala krátký alkalický puls trvající cca 20 hodin. Pak vstupovaly kolonie do první acidické fáze, následované první alkalickou fází (cca 10<sup>1</sup> – 16. den). Od cca 17. dne

kolonie přešly do druhé acidické fáze, v rámci které jsem pozorovala ještě tzv. acidickou subfázi, charakteristickou tmavším zbarvením okolního média (obvykle 20. den).

V souladu s předchozími výsledky M.Řičicové a D.Strachotové začínala produkce Ato1p-GFP proteinu v BY4742 koloniích (stejně jako produkce ostatních Ato proteinů) se vstupem kolonií do první alkalické fáze. Během prvního krátkého alkalického pulsu (prvních 20 hod vývoje kolonie) se Ato proteiny nepodařilo fluorescenčně detekovat. Nástup zvyšující se produkce Ato proteinů při vstupu kolonií do alkalické fáze je poměrně rychlý. Do skončení alkalické fáze (cca 15. den) jsem pozorovala produkci Ato1p-GFP proteinu výrazněji ve vnější části kolonie. V druhé acidické fázi docházelo k mírnému poklesu fluorescence Ato1p-GFP proteinu, kterou jsem od této fáze pozorovala převážně ve vnitřní části kolonií. Přibližně 20.den, v době „acidické subfáze“ došlo k výraznému nárůstu fluorescence a signál zůstal velmi výrazný až do pozdních fází vývoje kolonií (cca 40. den). S přibývajícím věkem kolonií je možné pozorovat častěji i vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu ve váčcích neznámého původu. Protein lokalizovaný na membránách byl lokalizován v membránových raftových shlucích (Ricicova, 2007) během celého vývoje kolonie. Tato lokalizace byla výraznější hlavně v pozdějších vývojových fázích.

Produkce (fluorescence) Ato2p-GFP proteinu byla během celého období vývoje kolonií zřetelně nižší. Rozdíly mezi vnější a vnitřní části kolonie nebyly tak výrazné jako u Ato1p-GFP proteinu. Kolem 17. dne jsem pozorovala větší produkci ve vnitřní části kolonie, tato diference však brzo vymizela. V porovnání s Ato1p-GFP měl Ato2p-GFP protein častěji vnitrobuněčnou lokalizaci, která byla zřetelná už od počátku produkce Ato2p-GFP. Na rozdíl od Ato1p-GFP jsem u proteinů Ato2p-GFP lokalizovaných v membráně pozorovala shluky, jež by mohli být raftovými shluky zřídka a nezřetelně.

Produkce (fluorescence) Ato3p-GFP proteinu byla výrazně vyšší než produkce Ato2p-GFP proteinu. Srovnání produkce Ato1p a Ato3p proteinu nebylo jednoznačné. Statisticky lze říct, že ve větším množství případů byla fluorescence větší u Ato3p-GFP proteinu. Protein Ato3p-GFP byl již od časných fází své produkce lokalizován ve velké míře i uvnitř buněk (více než protein Ato1p-GFP a Ato2p-GFP). Průběh produkce Ato3p-GFP kopíroval produkci Ato1p-GFP, ze začátku byl fluorescenční signál silnější ve vnějších částech kolonie, po skončení první alkalické fáze byl signál přítomen převážně ve vnitřní části. Lokalizace proteinů v membránových raftových shlucích byla nejlépe pozorovatelná právě u proteinu Ato3p-GFP a to již od začátku produkce.

Při sledování průběhu produkce, respektive fluorescence Ato proteinů, které byly značeny červeným fluorescenčním proteinem (RFP) jsem zjistila několik podstatných rozdílů.

Nejvýraznějším rozdílem byla opožděná detekce fluorescenčního signálu. U buněk produkujících Ato proteiny značené GFP proteinem jsem pozorovala fluorescenční signál v okamžiku vstupu obřích kolonií do alkalické fáze. U buněk produkujících Ato proteiny s značené RFP proteinem jsem pozorovala fluorescenční signál se zpožděním cca 2 dny. Toto zpoždění lze vysvětlit delší dobou nutnou pro maturaci RFP proteinu (viz kapitola). Na začátku produkce fuzního proteinu je mnoho molekul RFP chromoforu ještě v ne plně v maturované formě. Během tohoto období bylo možné pozorovat fluorescenční signál i v zelené oblasti, protože během maturace prochází RFP konformací, která tvoří zelenou fluorescenční strukturu. Kolem 12. dne vývoje kolonie je maturace RFP proteinu dokončena a červený fluorescenční signál je výraznější a lépe pozorovatelný než zelený fluorescenční signál z GFP. Buňky produkující RFP značené Ato proteiny bylo možné snímat s mnohem kratší expozicí než buňky značené GFP proteinem. V pozdních vývojových fázích (po cca 25. dni) byl fluorescenční signál opět výraznější u buněk s GFP fúzním proteinem. To může indikovat novou syntézu Ato proteinů, jejichž RFP značená varianta opět déle maturuje. Dalším výrazným rozdílem mezi Ato-GFP a Ato-RFP variantami bylo, že proteiny značené RFP nebyly viditelně lokalizované na membráně ve shlucích. Naproti tomu u Ato1p a Ato3p proteinů značených GFP byla lokalizace v raftových shlucích dobře patrná. Kromě těchto rozdílů byly průběhy produkce i lokalizace (buněčná i v rámci kolonie) Ato-GFP a Ato-RFP proteinů v podstatě shodné.

## 5.2 Ato proteiny u kolonií kmene s defektem v Sok2p transkripčním faktoru

Již dříve bylo zjištěno, že kmen s defektem v transkripčním faktoru Sok2p má výrazně alterovaný vývoj kolonií, které neprodukují amoniak, nejsou schopny přejít do plně vyvinuté alkalické fáze a zapnout metabolické změny s amoniakovou signalizací související (Váchová et al, JBC). Navíc bylo zjištěno, že buňky *sok2* kolonií správně nediferencují a kolonie předčasně masivně odumírají (Váchova Palkova, JCB2005). Vzhledem k tomu, že exprese *ATO* genů je u *sok2* kolonií alterovaná, zapíná se ve stejném čase jako u kolonií rodičovského kmene, ale nedochází k její další indukci, bylo velmi zajímavé zjistit, jak vypadá produkce všech tří Ato proteinů v různých fázích vývoje *sok2* kolonií a kde v koloniích (i buňkách) jsou Ato proteiny lokalizovány.

U kmenů *sok2*-Ato1p-GFP, *sok2*-Ato2p-GFP a *sok2*-Ato3p-GFP, které jsem připravila, jsem nejprve ověřila, že morfologie a pH změny při vývoji jejich kolonií odpovídají morfologii a pH změnám kolonií původního *sok2* kmene. Zjistila jsem, že jak morfologie, tak

průběh slabé a opožděné alkalizace média koloniemi *sok2*-Ato-GFP je srovnatelný s kmenem *sok2*. Podobně jako *sok2* kolonie, i kolonie *sok2*-Ato-GFP vykazují fenotyp předčasného stárnutí a odumírání buněk. Těmito experimenty jsem potvrdila, že připravené *sok2*-Ato-GFP kmeny jsou použitelné pro studium změn produkce a lokalizace Ato proteinů.

Pozorování fluorescenčně značených Ato proteinů v různých oblastech *sok2* kolonií (vnitřní a vnější okraj, střed kolonie) ukázalo, že produkce Ato1p-GFP, Ato2p-GFP i Ato3p-GFP je výrazně menší než u nemutovaného kmene. Detekovaný fluorescenční signál byl mnohem slabší, ale trendy rozložení signálu v rámci jednotlivých částí kolonie zůstaly zachovány stejné jako v případě kolonií rodičovského kmene BY-Ato-GFP. Začátek produkce Ato1p-GFP proteinu koreloval s pozorovanou slabou alkalizací média a signál byl zřetelnější ve vnějších oblastech kolonie. Po přechodu do acidické fáze byl fluorescenční signál silnější ve vnitřní části kolonie, podobně jako jsem to pozorovala u kolonií rodičovského kmene.

„Acidická subfáze“ nebyla u *sok2* kolonií dobře pozorovatelná, nicméně v odpovídajícím čase docházelo k nepřehlédnutelnému zvýšení produkce (fluorescence) Ato1p-GFP proteinu. Produkce Ato1p-GFP proteinu zůstávala výraznější ve vnitřní oblasti až do pozdních dnů vývoje kolonie, zatímco ve vnější části od 24. dne vývoje kolonií nebyl žádný signál patrný. Oproti tomu kolonie rodičovského kmene BY4742 měly fluorescenční signál ve vnějších oblastech patrný až do pozdních fází (poslední sledovaný čas odpovídal 35.dni vývoje kolonie). V porovnání s kmenem BY4742 měla *sok2* mutanta Ato1p-GFP protein častěji lokalizován uvnitř buňky. Tato vnitrobuněčná lokalizace byla ještě výraznější u Ato2p-GFP proteinu. Lokalizace Ato2p-GFP na membráně *sok2* buněk byla dobře pozorovatelná jen v období první a druhé alkalické fáze a to jenom ve vnitřní oblasti kolonie. Fluorescenční signál Ato2p-GFP proteinu již nebyl patrný po cca 25. dni vývoje kolonií.

Dynamika produkce Ato3p-GFP v koloniích *sok2* mutanty byla analogická produkci Ato3p-GFP u rodičovského kmene, jenom fluorescenční signál byl opět výrazně slabší. Na začátku alkalické fáze byla produkce větší ve vnější oblasti, po jejím skončení byla produkce větší ve vnitřní oblasti. Stejně jako u rodičovského kmene byla produkce Ato3p-GFP největší z Ato proteinů (nebo alespoň stejná jako Ato1p-GFP). Lokalizaci Ato proteinů v membránových raftových shlucích jsem pozorovala, stejně jako u rodičovského kmene, hlavně u Ato1p-GFP a Ato3p-GFP a to po celou dobu vývoje kolonie.

Výsledky potvrzují již dříve zjištěné změny v expresi *ATO* genů o kolonií *sok2* mutanty. Navíc ukazují, že nejen exprese, ale i stabilita a membránová lokalizace Ato proteinů je u *sok2* mutanty snižena a proteiny jsou mnohem rychleji degradovány ve vakuole (pozorování vnitrobuněčné lokalizace). Rovněž všechny tři Ato proteiny již nejsou v detekovatelném

množství přítomny v předčasně stárnoucích *sok2* koloniích. Výsledky rovněž potvrzují, že u *sok2* mutanty není ovlivněno časování produkce Ato proteinu.

Nově získaná data, která ukazují, že mutantní kolonie, které mají poruchu v produkci amoniaku, mají též sníženou produkci Ato proteinů podporují teorii, že Ato proteiny jsou důležité pro amoniakovou signalizaci. Nicméně skutečnost, že i v buňkách *sok2* mutanty existuje frakce Ato proteinů lokalizovaných na membráně svědčí o tom, že absence produkce amoniaku u kolonií *sok2* je dána kombinací více defektů, nejen poruchou funkce exportérů amonných iontů (například absence intracelulárního  $\text{NH}_4^+$  substrátu). Nelze samozřejmě vyloučit ani možnost, že Ato proteiny lokalizované na membráně buněk *sok2* kolonií nejsou funkční.

### 5.3 Ato proteiny u kolonií kmene s defektem v enzimech antistresové obrany

Další set mutant, u kterých jsem připravila deriváty nesoucí Ato1p protein fluorescenčně značný GFP byly kmeny s defektem v některém z enzymů antistresové obrany (cytosolická kataláza Ctt1p, cytosolická superoxid dismutáza Sod1p a mitochondriální superoxid dismutáza Sod2p). Důvodem, proč jsou mutanty *ctt1*, *sod1* a *sod2* zajímavé z hlediska amoniakové signalizace (a tedy produkce Ato proteinů) jsou experimenty naší laboratoře (M.Čáp, diplomová práce + nepublikované výsledky) ukazující, že kolonie těchto kmenů mají různým způsobem alterovanou amoniakovou signalizaci a s ní spojený metabolismus. Zjednodušeně, nejvýraznější defekt v produkci amoniaku byl pozorován u kolonií *sod2*, méně výrazný pak u kolonií *ctt1*. Naopak kolonie *sod1* kmene se chovají nejpodobněji koloniím rodičovského kmene a dokonce u nich byla zaznamenána výraznější alkalizace a produkce amoniaku (M.Čáp, diplomová práce).

S cílem zjistit změny v Ato1p proteinech v koloniích kmenů s defektem ve výše uvedených enzimech jsem připravila kmeny *sod1*-Ato1p-GFP, *sod2*-Ato1p-GFP a *ctt1*-Ato1p-GFP. Vzhledem k tomu, že se mi z časových důvodů nepodařilo dokončit ověření *sod2* mutace v připraveném kmeni *sod2*-Ato1p-GFP, neprováděla jsem s ním zatím další fyziologické experimenty. U kolonií obou dalších kmenů jsem provedla stejná pozorování jako v předchozích případech.

Nejdříve jsem pomocí zjištění aktivity anti-stresových enzymů ověřila, že kmeny *sod1*-Ato1p-GFP a *ctt1*-Ato1p-GFP mají skutečně delecí *SOD1* a *CTT1*. Také jsem ověřila, že nově připravené konstrukty tvoří obří kolonie s morfologií shodnou s morfologií kolonií původních

kmenů *sodI* a *cttI*, od kterých byly odvozeny, a že pH změny při vývoji jejich kolonií odpovídají pH změnám kolonií původních kmenů.

Porovnání vývoje kolonií transformovaných kmenů s rodičovským kmenem BY4742 podle očekávání potvrdilo, že průběh alkalizace média u kmene *sodI*-Ato1p-GFP odpovídá rodičovskému kmenu BY4742, v mých experimentech alkalizace média začínala kolem 10.-11. dne, končila kolem 16. dne. Pak následovala druhá acidická fáze. Rozdílem byla intenzivnější alkalická fáze u některých paralelních kolonií *sodI*-Ato1p-GFP a jejich méně intenzivní „acidická subfáze“. Kolonie *cttI*-Ato1p-GFP kmene se rovněž podle předpokladu vyznačovaly slabší alkalickou fází oproti rodičovskému kmenu BY4742.

Pozorování fluorescenčně značených Ato proteinů ukázalo, že produkce Ato1p-GFP u kmene *sodI*-Ato1p-GFP je v porovnání s rodičovským kmenem větší a u kmene *cttI*-Ato1p-GFP naopak menší. Detekovaný fluorescenční signál u buněk *sodI*-Ato1p-GFP byl intenzivnější ve všech částech kolonie. Mezi jednotlivými částmi kolonie nebyly pozorované žádné rozdíly. Slabý fluorescenční signál byl zachytitelný ještě před vstupem buněk do alkalické fáze, byl však téměř výhradně uvnitř buňky. Podobný vnitrobuněčný signál v předalkalické fázi byl pozorovatelný i u *cttI*-Ato1p-GFP kolonií. Fluorescenční signál u buněk kmene *cttI*-Ato1p-GFP byl do skončení alkalické fáze výraznější ve vnější oblasti kolonie, od cca 16. dne byl intenzivnější ve vnitřní části, což odpovídá lokalizaci fluorescenčního signálu u rodičovského kmene. Kolem 21. dne se intenzita fluorescence Ato1p-GFP proteinu snížila a signál byl stejně intenzivní ve všech částech kolonie.

Výsledky potvrzují korelaci mezi alkalizací média (a jak dříve zjištěno i produkcí amoniaku) a produkcí Ato1p-GFP proteinu. Kmeny, které mají intenzivnější alkalickou fází se také vyznačují intenzivnější produkcí Ato1p-GFP. U kmenů kde je alkalická fáze méně intenzivní je pozorována také menší produkce Ato1p-GFP.

#### **5.4 Ato1p protein u kolonií kmene s modifikovanou produkcí PDR transporterů**

Ve své diplomové práci jsem se dále zabývala kmenem US50-18c, který má změněnou *PDR1* alelu transkripčního faktoru Pdr1p. Mutace *PDR1-3* způsobuje produkci hyperaktivního Pdr1-3 faktoru a tím hyperexpresi řady PDR transporterů. Vzhledem k tomu, že dřívější studie naznačily možnost nadměrného uvolňování  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  v tekutých kulturách kmenů s *PDR1-3* alelou (*Váchová, Palková, ústní sdělení*), bylo zajímavé zjistit, zda tato mutace nějakým způsobem ovlivní produkci Ato1p proteinu.



Rodičovským kmenem pro US50-18c je kmen EMO1/3, který je odvozen od *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b kmene. U kmene  $\Sigma$ 1278b kmen byla nalezena řada rozdílů oproti jiným laboratorním kmenům (např. kmeni BY4742). Krom jiného má změněné geny pro N-acetyltransferázu (*MPRI* gen), která má roli v rezistenci L-azetidine-2-karboxylové kyselině (analog L-prolinu) (TAKAGI et al. 2000) a změněnou odpověď Gap1p permeázy na NH<sub>3</sub> (Gap1p permeáza je obecná aminokyselinová permeáza, jejíž lokalizace na membráně je regulovaná dusíkatými sloučeninami). ([http://wiki.yeastgenome.org/index.php/History\\_of\\_Sigma](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/History_of_Sigma)). Kolonie různých kmenů odvozených od  $\Sigma$ 1278b v porovnání s laboratorním kmenem BY4742 vykazují obvykle méně intenzivní alkalickou fázi, u které je obtížněji rozeznatelný její nástup (Palková, ústní sdělení).

Pro sledování produkce Ato1p proteinu jsem připravila kmeny US-Ato1p-GFP a EMO-Ato1p-GFP, u kterých jsem ověřila, že, stejně jako původní kmeny US50-18c a EMO1/3, tvoří kolonie, skutečně procházejí méně intenzivní alkalickou fází. Kolonie všech 4 kmenů vykazovaly shodnou morfologii a průběh vývoje. Kromě těchto kmenů jsem připravila ještě Ato1p-GFP kmeny odvozené od dalších dvou, *PDR1-3* kmenů, které mají defekt v různých PDR transporterech. Vzhledem k tomu, že u nich z časových důvodů nebyla dokončeno ověření a zjištění průběhu produkce, ve výsledkové části je neuvádím.

Při sledování průběhu produkce, respektive fluorescence Ato1p-GFP proteinu u rodičovského kmene EMO1/3 jsem pozorovala hladinu produkce Ato1p-GFP během celého vývoje kolonie, která byla výrazně vyšší než u kolonií kmenů odvozených od BY4742. Silná produkce Ato1p-GFP začínala ještě před viditelným nástupem alkalické fáze. Rozdíly v intenzitě fluorescence mezi jednotlivými částmi kolonie se také lišily od kmenů BY4742, fluorescenční signál byl silnější ve vnitřní části kolonie po celou dobu jejich vývoje. Kolem 15. dne (pozorováno jako vrchol alkalické fáze) došlo k výraznému vzestupu fluorescence (produkce) Ato1p. Ve druhé acidické fázi jsem opět pozorovala pokles fluorescence, nicméně fluorescenční signál zůstal výrazný do pozdních dnů vývoje kolonie (cca 30. den). Kmen US50-18c s hyperexpresí PDR transportérů měl stejný průběh Ato1p fluorescence jako rodičovský kmen EMO1/3, začátek produkce Ato1p-GFP před viditelnou alkalizací média, silnější fluorescenci ve vnitřní části kolonií, neintenzivnější produkci Ato1p-GFP v alkalické fázi, za kterou následoval pokles produkce ve druhé acidické fázi. Rozdílem byla ještě intenzivnější fluorescence (produkce) Ato1p-GFP.

Lokalizace Ato1p-GFP v raftových shlucích, kterou jsem pozorovala u kmene BY4742 nebyla u buněk těchto kmenů tak výrazná, u kmene US-Ato1p-GFP byla o něco patrnější než u kmene EMO-Ato1p-GFP.

## 5.5 Změny produkce Ato proteinů u odlišně se vyvíjejících obřích kolonií

V této části mé diplomové práce jsem se zaměřila na kolonie, které neprocházely standardním vývojem (nástup fáze alkalizace cca 10. den), ale začínaly slabě alkalizovat mnohem později (cca 26. den). Z dřívějších měření produkce plynného amoniaku (Haislová, nepublikované výsledky) přitom víme, že tato pozdní alkalizace je, stejně jako alkalizace „normálních“ kolonií, provázena prudkým nárůstem produkce amoniaku.

Pozorování fluorescence Ato-GFP proteinů ukázalo, že u kmenů BY4742-Ato1p-GFP, BY4742-Ato2p-GFP, BY4742-Ato3p-GFP, *sok2*-Ato1p-GFP, *sok2*-Ato2p-GFP a *sok2*-Ato3p-GFP *sod1*-Ato1p-GFP a *ctl1*-Ato1p-GFP byl za těchto podmínek pozorován mnohem slabší fluorescencenční signál. Tento signál se objevoval kolem 14. dne a byl také ve větší míře vnitrobuněčný. Kolem 26. dne, kdy byla u některých kolonií pozorovatelná velmi slabá alkalizace, se produkce Ato-GFP proteinů u kolonií všech kmenů prudce zvýšila. Intenzita signálu dosahovala intenzity signálu u stejně *starých* kolonií, které prošly standardním vývojem.

Výjimkou byly kmeny US-Ato1p-GFP a EMO-Ato1p-GFP, jejichž kolonie měly za těchto růstových podmínek jen částečně sníženou produkci Ato1p-GFP. Fluorescencní signál se objevoval kolem 8. dne, kolem 19. dne došlo k jeho výraznému nárůstu. V těchto dnech se intenzita signálu vyrovnala signálu pozorovanému u standardně se vyvíjejících kolonií. Zajímavostí bylo, že u všech kmenů docházelo k výraznějšímu seskupování proteinů do raftových shluků. Tyto raftové shluky byly u buněk nestandardně se vyvíjejících kolonií pozorovatelné i u Ato2p-GFP proteinu, kde byly za standardních vývojových podmínek pozorovatelné nanejvýš jen nepatrně.

Tyto experimenty rovněž podporují hypotézu spojení Ato proteinů s amoniakovou signalizací. Množství produkce Ato proteinů koreluje s produkcí amoniaku v koloniích.

## 5.6 Ato1p protein u kolonií divokých kmenů kvasinek

V poslední části mé diplomové práce jsem se zaměřila na divoké kmeny kvasinek, které byly izolovány z volné přírody. Tyto kmeny tvoří výrazně strukturované kolonie (viz kapitola 2.6) a zajímalo nás kde a kdy se u nich objeví produkce Ato1p-GFP proteinu. Připravila jsem proto divoký kmen *Saccharomyces cerevisiae* BR-F a jeho domestikovanou formu BR-S nesoucí značeným Ato1p-GFP protein.



Z časových důvodů jsem produkci Ato1p-GFP u kmene BR-F-Ato1p-GFP pozorovala jenom u monoklonií. Pro detailní porovnání intenzity fluorescence a lokalizace Ato1p-GFP u kolonií divokých a laboratorních kmenů kvasinek budou zapotřebí další experimenty. Nicméně i tato první pozorování ukázala, že i divoké kmeny produkují membránově lokalizovaný Ato1p-GFP, který se vyskytuje v raftových shlucích. Při odebrání velmi malého množství biomasy z jednotlivých částí monoklonií jsem pozorovala buňky s rozmanitým tvarem a různou hladinou fluorescence (a tedy patrně produkce) Ato1p-GFP. Tato různá hladina fluorescence Ato1p-GFP ve stejný čas a na stejném místě byla pozorovatelná 8-20 den vývoje monokolonie.

Ato1p-GFP u kmene BR-S-Ato1p-GFP jsem pozorovala standardně odebráním biomasy z obřích kolonií. Tyto kolonie alkalizovaly méně než kolonie laboratorního kmene BY4742. Také fluorescenční signál Ato1p-GFP proteinu byl slabší než u laboratorních kmenů. Intenzita produkce v jednotlivých částech kolonie se významně nelišila, měla spíš tendenci být silnější ve vnitřní a střední části kolonie po celou dobu vývoje. Protein byl často lokalizován i uvnitř buňky v malých váčcích tvaru podkovy nebo kruhu (případně by mohly odpovídat endoplazmatickému retikulu) spíš než ve váčcích typu vakuol, které převažovaly u laboratorních kmenů. Tato lokalizace by mohla znamenat, že část Ato1p-GFP zůstává zadrženo v sekretorické dráze. Shlukování Ato1p-GFP do membránových raftů bylo dobře pozorovatelné.

## 6. SOUHRN

V rámci své diplomové práce zaměřené na amoniakovou signalizaci kvasinkových kolonií a produkci Ato proteinů v průběhu časového vývoje u kolonií jsem získala následující výsledky:

1. Za využití homologní rekombinace jsem vytvořila 18 stabilních kmenů se značenými Ato proteiny (viz tabulka 6.1).

2. Nově připravené fluorescenčně značené rodičovské, mutantní a divoké kmeny jsem použila při sledování lokalizace a produkce Ato proteinů v různých částech obřích kolonií v závislosti na amoniakové signalizaci v průběhu vývoje kolonií. Zjistila jsem, že produkce Ato proteinů koreluje s různou schopností kolonií mutantních kmenů přepínat do alkalické fáze a produkce amoniaku. U jednotlivých kmenů byly rovněž patrné rozdíly v lokalizaci Ato proteinů v rámci jejich kolonií. Produkci Ato proteinů u kolonií připravených kmenů jsem sledovala také za nestandardních podmínek vývoje kolonií, za kterých dochází k posunu vývojových fází a produkce amoniaku. Zjistila jsem, že stejným způsobem dochází i k časovému posunu produkce Ato proteinů. Všechny tyto výsledky podporují hypotézu o možné roli Ato proteinů jako exporterů amonných iontů uplatňujících se při amoniakové signalizaci.

3. Nově připravený divoký kmen BR-F nesoucí GFP značený Ato1p jsem použila pro předběžná pozorování lokalizace Ato1p-GFP v rámci jeho strukturovaných monokolonií. Již první výsledky ukázaly přítomnost buněk různého morfortypu produkujících různou hladinu Ato1p-GFP. Kmen bude využit pro další studium amoniakové signalizace u strukturovaných kolonií přírodních kmenů kvasinek.

4. U kolonií rodičovského kmene BY4742 jsem porovnála produkci všech tří Ato proteinů značených GFP s produkcí Ato proteinů značených RFP. Získané výsledky dokumentují rozdíly v maturaci obou fluorescenčních proteinů a ukazují výhody a nevýhody obou značení. Získané kmeny budou použity pro další konstrukce a kolokalizační studie.

<b>Název kmene</b>	<b>Značený Ato protein</b>
<i>Rodičovské kmény:</i>	
BY4742	Ato1p-GFP
BY4742	Ato2p-GFP
BY4742	Ato3p-GFP
BY4742	Ato1p-RFP
BY4742	Ato2p-RFP
BY4742	Ato3p-RFP
EMO1/3	Ato1p-GFP
<i>Mutantní kmény:</i>	
<i>sod1</i>	Ato1p-GFP
<i>sod2</i>	Ato1p-GFP
<i>cct1</i>	Ato1p-GFP
<i>sok2</i>	Ato1p-GFP
<i>sok2</i>	Ato2p-GFP
<i>sok2</i>	Ato3p-GFP
US50-18c	Ato1p-GFP
AD13	Ato1p-GFP
AD23	Ato1p-GFP
<i>Divoké kmény:</i>	
BR-F	Ato1p-GFP
BR-S	Ato1p-GFP

Tab. 6.1: Přehled vytvořených fluorescenčně značených konstruktů.

## 7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

André, B., C. Hein, M. Grenson, J.C. Jauniaux (1993) – Cloning and expression of the *UGA4* gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.*; 237:17-25

André, B. (1995) – An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*; 11:1575-1611

Aubry, L., R. Firtel (1999) - Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation, *Annu Rev Cell Dev Biol*; 15:469-517

Bar-Nun, S., Y. Shneyour, J.S. Beckmann (1983) - G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes, *Biochim Biophys Acta.*; Oct 13;741(1):123-7

Bellazzi, T., A. Wagner, R. Wieser, M. Schanz, G. Adam, A. Hartig, H. Ruis (1991) - Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element, *EMBO J.*; Mar;10(3):585-92

Bennetzen, J.L., B.D. Hall (1982) *J. Biol. Chem.*; 257:3026-3031

Bergensen, F.J., G.L. Turner (1967) *Biochim. Biophys. Acta*; 41:507-515

Bermingham-McDonogh, O., E.B. Gralla, J.S. Valentine (1998) - The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Jul;85(13):4789-93

Bissinger, P.H., R. Wieser, B. Hamilton, H. Ruis (1989) - Control of *Saccharomyces cerevisiae* catalase T gene (CTT1) expression by nutrient supply via the RAS-cyclic AMP pathway, *Mol Cell Biol.*; Mar;9(3):1309-15

Bisson, L.F., D.M. Coons, A.L. Kruckerberg, D.A. Lewis (1993) – Yeast sugar transporters, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 28:259-308

Bult, C., O. White, G.J. Olsen, L. Zhou, R.D. Fleischmann et al. (1996) – Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, Science; 273:1058-1073

Carmelo, V., P. Bogaerts, I. Sa-Correia (1996) - Activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH, Arch. Microbiol.; Nov;166(5):315-20

Carvajal, E., H.B. van den Hazel, A. Cybularz-Kolaczowska, E. Balzi, A. Goffeau (1997) - Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes, Mol. Gen. Genet.; Oct;256(4):406-15

Coffman, J.A., R. Rai, T.S. Cunningham, V. Svetlov, T.G. Cooper (1996) – Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol.; 16:847-858

Cooper, T.G. (1982) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 39-99

Čáp, M. (2004) - Změny mitochondrií a kyslíkových radikálů během vývoje kolonie *Saccharomyces cerevisiae*

Davies, J., A. Jimenez (1980) - A new selective agent for eukaryotic cloning vectors, Am J Trop Med Hyg.; Sep;29(5 Suppl):1089-92

Decottignies, A., A.Goffeau (1997) - Complete inventory of the yeast ABC proteins, Nat Genet.15; 137-145.

Fernandes, A.R., I. Sa-Correia (2003) - Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase, Yeast; Feb;20(3):207-19

Forsberg, H., P.O. Ljungdahl (2001) - Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids, *Mol. Cell Biol.*; Feb;21(3):814-26.

Forsberg, H., C.F. Gilstring, A. Zargari, P. Martinez, P.O. Ljungdahl (2001) - The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids, *Mol. Microbiol.*; Oct;42(1):215-28

Fridovich, I. (1975) - Superoxide dismutases, *Annu Rev Biochem.*; 44:147-59

Furukawa, Y., A.S. Torres, T.V. O'Halloran (2004) - Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS, *EMBO J.*; Jul 21;23(14):2872-81

Garvin, J.L., M.B. Burg, M.A. Knepper (1988) – *Am. J. Physiol.*; 255:F57-F65

Gershon, H., D. Gershon (2000) – The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: A critical review, *Mech. Aging. Dev.*; 120:1-22

Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, G.R. Fink (1992) – Unipolar cell division in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth; regulation by starvation and RAS, *Cell*; 68:1077-1090

Grant, C.M., G. Perrone, I.W. Dawes (1998) - Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Biophys Res Commun.*; Dec 30;253(3):893-8

Gray J., S. Groeschler, T. Le, Z. Gonzales (2002) – *Membrane Structure*, Davidson College

Grenson, M., F. Muyldermans, K. Broman, S. Vissers (1987) – 4-Aminobutyric acid (GABA) uptake in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino acid permease, the proline permease and a GABA-specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway, *Life. Sci.Adv.Ser.*;C 6:35-39



Grenson, M. (1992) – Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation, Molecular aspects of transport proteins. Elsevier Science, New York p. 219-245

Guaragnella, N., R.A. Butow (2003) - ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensor system, J. Biol. Chem.; Nov 14;278(46):45882-7

Gunther, M.R., R. Vangilder, J. Fang, D.S. Beattie (2004) - Expression of a familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant human superoxide dismutase in yeast leads to decreased mitochondrial electron transport, Arch Biochem Biophys.; Nov 15;431(2):207-14

Haurie, V., M. Perrot, T. Mini, P. Jenö, F. Sogliocco, H. Boucherie (2001) - The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem.; Jan 5;276(1):76-85

Heim, R., A.B. Cubitt, R.Y. Tsien (1995) - Improved green fluorescence, Nature; Feb 23;373(6516):663-4

Hug, H., M. Los, W. Hirt, K.M. Debatin (1999) - Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells, Biochemistry; Oct 19;38(42):13906-11

Inouye, S., F.I. Tsuji (1994) - Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein, FEBS Lett.; Mar 21;341(2-3):277-80

Jensen, L.T., R.J. Sanchez, C. Srinivasan, J.S. Valentine, V.C. Culotta (2004) - Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase, J Biol Chem.; Jul 16;279(29):29938-43

Jones, R., R. Haselkorn (1989) Mol. Gen. Genet.; 215:507-516

Kaiser, D. (1999) – Cell fate and organogenesis in bacteria, Trends. Genet.; 15: 273-277

Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu et al. (1996) – Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions, DNA Res; 3:109-136

Kleiner, D. (1981) Biochim. Biophys. Acta; 639:41-52

Kleiner, D. (1985) FEMS Microbiol. Rev.; 32:87-100

Knepper, M.A. (1989) Physiol. Rev.; 69:179-429

Kübler, E., H.U. Mösch, S. Rupp, M.P. Lisanti (1997) – Gpa2p, a G protein  $\alpha$ -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism, J. Biol. Chem.; 272:20321-20323

Kujau, M., H. Weber, G. Barth (1992) - Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase, Yeast; Mar;8(3):193-203

Kuthan, M., F. Devaux, B. Janderová, I. Slaninová, C. Jacq, Z. Palková (2003) – Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* colonies is accompanied by changes in gene expression and colony morphology, Mol. Microbiol.; Feb;47(3):745-54.

Kyte, J., R.F. Doolittle (1982) - A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol.; May 5;157(1):105–132

Lauter, F., O. Ninnemann, M. Bucher, J.W. Riesmaier, W.B. Frommer (1996) – Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporters in root hairs of tomato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 93:8139-8144

Lazzazera, B.A. (2000) - Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase, Curr Opin Microbiol; Apr;3(2):177-82

Lewis, K. (2001) – Riddle of biofilm resistance, Antimicrob. Agents Chemother.; 45: 999-1007

Lin, J.T., J.T. Lis (1999) - Glycogen synthase phosphatase interacts with heat shock factor to activate CUP1 gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol.*; May;19(5):3237-45

Loenenberg D., M. Counels, J.A. Waitz (1975) - Antibiotic G418, a new micromomospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: antiparasitic activity, *Antimicrob Agents Chemother.*; Jun;7(6):811-5

Lodish, H., A. Berk, L.S. Zipursky, et al. (2004) – *Mol. Cell Biol.*, 4th ed.. ISBN 0-7167-3136-31986

Lorenz, M.C., J. Heitman (1998) – The Mep2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO Journal* Vol. 17 No.5 pp. 1236-1247

Ludewig, U. et al. (2003) - Homo- and Hetero-oligomerization of Ammonium Transporter-1 NH<sub>4</sub> Uniporters, *The Journal of Biological Chemistry*; Vol 278, No.46, 45603-45610

Ludovico, P., M.J. Sousa, M.T. Silva, C. Leao, M. Corte-Real (2001) – *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid, *Microbiol.*; Sep;147(Pt 9):2409-15

Madeo, F., E. Frohlich, M. Ligr, M.Grey, S.J. Sigrist, D.H. Wolf, K.U. Frohlich (1999) - Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast, *J. Cell. Biol.*; May 17;145(4):757-67

Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg, K.U. Frohlich (2002) - A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, *Mol. Cell*; Apr;9(4):911-7

Marini, A.M., S. Vissers, A. Urrestarazu, B. André (1994) – Cloning and expression of the *Mep1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO Journal* vol. 13 no. 15 pp 3456-3463

Marini, A.M., S. Soussi-Boudekou, S. Vissers, B. André (1997a) – A Family of Ammonium Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*; Aug, p. 4282-4293

Marini, A.M., A. Urrestarazu, R. Beauwens, B. André (1997b) - The Rh (Rhesus) blood group polypeptides are related to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters, *Trends Biochem. Sci.*; 22: 460–461

Marini, A.M., J. Springael, W.B. Frommer, B. André (2000) - Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein, *Mol Microbiol.*; Jan;35(2):378-85.

Matsuhashi, M., A.N. Pankrushina, K. Endoh, H. Watanabe, Y. Mano, M. Hyodo, T. Fujita, K. Kunugita, T. Kaneko, S. Otani (1995) - Studies on carbon material requirements for bacterial proliferation and spore germination under stress conditions: a new mechanism involving transmission of physical signals, *J. Bacteriol.*; Feb;177(3):688-93

McNeil, J.B., A.L. Bognar, R.E. Pearlman (1996) - In vivo analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics.*; Feb;142(2):371-81

Moore, S., C. Green (1987) - The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane, *Biochem J.*; Jun 15;244(3):735-41

Morise, H., O. Shimomura, F.H. Johnson, J. Winant (1974) - Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*, *Biochemistry*; Jun 4;13(12):2656-62

Miyawaki, A., T.Nagai, H.Mizuno (2003)-Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering, *Curr Opin Chem Biol.*; 7(5):557-62.

Ninnemann, O., J. Jauniaux, W.B. Frommer (1994) – identification of a high affinity ammonium transporter from plants, *EMBO J.*; 13:3464-3471

O'Regan, M., G. Thierbach, B. Bachmann, D. Villeval, P. Lepage, J.F. Viret, Y. Lemoine - Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Gene*; Apr 30;77(2):237–251

Odds, E.C. (1997) – Switch of phenotype as an escape mechanism for the intruder, *Mycoses.*; 40:9-12

- Palková, Z., B. Janderová, J. Gabriel, B. Zikánová, M. Pospíšek, J. Forstová (1997) - Ammonia mediates communication between yeast colonies, *Nature*; Dec 4;390(6659):532-6.
- Palková, Z., J. Forstová (2000) - Yeast colonies synchronise their growth and development, *J. Cell Sci.*; Jun;113 ( Pt 11):1923-8.
- Palková, Z., F. Devaux, M. Řídicová, L. Mináriková, S. Le Crom, C. Jacq (2002) - Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development, *Mol. Biol. Cell*; Nov;13(11):3901-14
- Palková, Z., L. Váchová (2003) - Ammonia signaling in yeast colony formation, *Int Rev Cytol.*; 225:229-72
- Palková, Z. (2004) - Multicellular microorganisms: laboratory versus nature, *EMBO Rep.*; May;5(5):470-6
- Palková, Z., L. Váchová (2006) - Life within a community: benefit to yeast long-term survival, *FEMS Microbiol Rev*; Sep;30(5):806-24.
- Pédelacq, J.D., S. Cabantous, T. Tran, T.C. Terwilliger, G.S. Waldo (2006) - Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*; Jan;24(1):79-88
- Prendergast, F.G., K.G. Mann (1978) - Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*, *Biochemistry*; Aug 22;17(17):3448-53
- Radford, D.R., S.J. Challacombe, J.D. Walter (1994) - A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*, *J. Med. Microbiol.*; Jun;40(6):416-23
- Rensing, L., U. Meyer-Grahe, P. Ruoff (2001) – Biological timing and clock metaphor: Oscillatory and hourglass mechanism, *Chronobiol. Int.*; 18:329-369

Rost, B., C. Sander (1993) - Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy, *J. Mol. Biol.*; Jul 20;232(2):584–599

Řicicová, M. (2003) – Signalizace a vývoj kvasinkových kolonií

Řicicová, M., H. Kučerová, L. Váchová, Z. Palková (2007) - Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches, *Biochim Biophys Acta*; May;1768(5):1170-8

Shenhar, G., Y. Kassir (2001) - A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol.*; Mar;21(5):1603-12

Shimizu, S., Y. Shinohara, Y. Tsujimoto (2000) - Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator, *Oncogene.*; Sep 7;19(38):4309-18

Shimomura, O., F.H. Johnson, Y. Saiga (1962) - Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J Cell Comp Physiol.*; Jun;59:223-39

Singer, S.J., and G.L. Nicholson (1972) - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175: 720-731

Slekar, K.H., D.J. Kosman, V.C. Culotta (1996) - The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection, *J Biol Chem.*; Nov 15;271(46):28831-6

Staib, P., S. Wirsching, A. Strauss, J. Morschhäuser (2001) - Gene regulation and host adaptation mechanisms in *Candida albicans*, *Int J Med Microbiol*; May;291(2):183-8

Šťovíček, V. (2004) - Morfologická a fyziologická analýza kolonií divokých kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

Strachotová, D. (2004) – Změny produkce a exprese Ato transportérů v průběhu vývoje kvasinkových kolonií a tekutých kultur

Takagi, H., M. Shichiri, M. Takemura, M. Mohri, S. Nakamori (2000) - *Saccharomyces cerevisiae* sigma 1278b has novel genes of the N-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance, *J Bacteriol.*; Aug;182(15):4249-56

Tuttle, M.S., D. Radisky, L. Li, J. Kaplan (2003) – A dominant allele of PDR1 alters transition metal resistance in yeast, *J Biol Chem.*; Jan 10;278(2):1273-80

Tzschoppe, K., A. Augstein, R. Bauer, S.D. Kohlwein, G. Barth (1999) - Trans-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast*; Nov;15(15):1645-56

Váchová, L., F. Devaux, H. Kucerová, M. Řídicová, C. Jacq, Z. Palková (2004) - Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies, *J Biol Chem.*; Sep 3;279(36):37973-81

Váchová, L., Z. Palková (2005) - Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia, *J. Cell Biol.*; Jun 6;169(5):711-7

Van Loon, A.P., B. Pesold-Hurt, G. Schatz (1986) - A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Jun;83(11):3820-4

Van Nuland A., P. Vandormael, M. Donaton, M. Alenquer, A. Lourenco, E. Quintino, M. Versele, J.M. Thevelein (2006) - Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast, *Mol Microbiol.*; Mar;59(5):1485-505

Varon, M., M. Choder (2000) – Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies, *J. Bacteriol.*; 182:3877-3880

Ververidis, P., F. Davrazou, G. Diallinas, D. Georgakopoulos, A.K. Kanellis, N. Panopoulos (2001) - A novel putative reductase (Cpd1p) and the multidrug exporter Snq2p are involved in resistance to cercosporin and other singlet oxygen-generating photosensitizers in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr Genet.*; May;39(3):127-36

Viegas, C.A., P. Supply, E. Capieaux, L. Van Dyck, A. Goffeau, I. Sá-Correia (1994) - Regulation of the expression of the H(+)-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth and effects of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta*; Jan 18;1217(1):74-80

Viegas, C.A., P.B. Sebastiao, A.G. Nunes, I. Sa-Correia (1995) - Activation of plasma membrane H(+)-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures, *Appl Environ Microbiol.*; May;61(5):1904-9

Von Wirén, N., S. Gazzarrini, A. Gojon, W.B. Frommer (2003) *Curr. Opin. Plant Biol.*; 3, 254-261

Wallace, M.A., L.L. Liou, J. Martins, M.H. Clement, S. Bailey, V.D. Longo, J.S. Valentine, E.B. Gralla (2004) - Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase, *J Biol Chem.*; Jul 30;279(31):32055-62

Ward, M.P., C.J. Gimeno, G.R. Fink, S. Garrett (1995) - SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription, *Mol Cell Biol.*; Dec;15(12):6854-63

Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Büttner, S.M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real et al. (2004) - An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.*; Sep 27;166(7):969-74

Wray, L.V.Jr, M.R. Atkinson, S.H. Fisher (1994) - The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* nrgAB operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* glnB-encoded PII protein, *J. Bacteriol.*; Jan;176(1):108-114



Yang, F., L.G. Moss, G.N. Phillips Jr. (1996) - The molecular structure of green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*; Oct;14(10):1246-51

Zikánová, B., M. Kuthan, M. Řicicová, J. Forstová, Z. Palková (2002) - Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies, *Biochem Biophys Res Commun.*; Jun 28;294(5):962-7

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