

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

**Respirační stav kolonií kvasinek rodu
Saccharomyces cerevisiae s delecemi v genech
CCR4, *CAF40* a *RIM15*.**

Lucie Kraidlová

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce:
doc. RNDr. Blanka Janderová, CSc.

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

V Praze 31. 8. 2006

Lucie Kraidlová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit své poděkování všem, kteří mi při zpracovávání diplomové práce pomáhali.

Nejvíce paní doc. RNDr. Blance Janderové, CSc., pod jejímž vedením diplomová práce vznikla. Děkuji jí za odborné vedení a pomoc v průběhu zpracování diplomové práce a za věnovanou trpělivost a podporu, kterou mi po celou dobu dodávala.

Doc. RNDr. Zdeně Palkové, RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za cenné rady a inspirativní postřehy.

Svým kolegům z laboratoře, Mgr. Jaroslavu Lvovi, Mgr. Vratislavu Šťovíčkovi, Mgr. Martinu Kuthanovi, Mgr. Ditě Strachotové, Lucii Bartoníčkové, Pavlíně Ptáčkové a dalším kolegům za pomoc a rady při mých experimentech a za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Blance Majšajdrové a Vladimíře Haislové za zajištění chodu laboratoře.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a svému příteli za materiální a morální podporu, kterou mi po celý čas studia dodávali.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2004 – 2006 v rámci grantového projektu GAČR 204/05/0294 a v rámci centra LC531.

Abstrakt

Respiration State of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Colonies with Deletions in Genes *CCR4*, *CAF40* and *RIM15*.

The topic of my graduation theses has been the yeast colonies of *Saccharomyces cerevisiae* genus with deletions in genes *CCR4*, *CAF40* and *RIM15*. Our laboratory began interested in study of these genes because of their assumed influence on yeast colony morphology. The Ccr4 and Caf40 proteins form part of Ccr4-NOT complex, which is involved in genetic expression regulation, participates on RNA degradation, a stress response and a cell cycle regulation. The Rim15p influences entering into the stationary phase and adaptation to respiratory growth; *RIM15* gene deletions cause the thermo tolerance loss, sporulation failures, defect of trehalose accumulation and glycogen synthesis.

I studied the effect of *RIM15* gene deletions on colony morphology. Comparing it to the original parental strain I found that rather than the *RIM15* deletions it is the conditions under which the colony is growing that influence the morphology (temperature 28°C or 37°C, media glucose content 0,5%, 1% or 2%, carbon source 1% glucose or 3% glycerol). I found out the adverse effect of the deletion on stressful conditions adaptation, demonstrating itself by delayed or nonexistent ammonia production on media containing glycerol compared to parental strain.

Further, I detected the respiratory metabolism in colonies of parental strain and deletants in *CCR4*, *CAF40* and *RIM15* genes using TTC (2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chloride). With functional respiratory chain, TTC is reduced by dehydrogenases to red formazane and enables the detection of functionality of the respiratory chain. I found that the powerful respiration can be detected in giant colonies not only on GM media, but also on glucose containing media (though somewhat later), and further that the respiration efficiency decreases in old colonies and also that both the giant colonies and mono-colonies *ccr4Δ* a *caf40Δ* create sectors with decreased or non-existent respiration.

In the final part of my graduation thesis I identified respiratory deficient (rd) mutants, which exhibit the inability to make use of unfermentable carbon sources and in the media containing limited amount of glucose they grow in the form of small (petit) colonies. Studied strains revealed high percentage of spontaneous rd mutants

getting formed in colonies, with the larger portion of them in less TTC colored areas of colonies.

Key words: yeast, *S. cerevisiae*, *RIM15*, colony morphology , TTC, respiratory deficient mutants, respiratory metabolism, alkalization.

Klíčová slova: kvasinka, *S. cerevisiae*, *RIM15*, morfologie kolonií, TTC, respirační metabolismus, respiračně deficientní mutanti, alkalizace.

Obsah

Seznam zkratk	13
1. Úvod	14
2. Literární úvod	16
2. 1. Rim15 protein kináza.....	17
2. 1. 1. Rim15 jako regulátor meiózy.....	17
2. 1. 2. Rim15 jako efektor PKA.....	18
2. 1. 3. Propojení nutričních signálů přes Rim15.....	18
2. 1. 3. 1. Dráha TOR.....	19
2. 1. 3. 2. Dráha FGM.....	20
2. 1. 3. 3. Fosfátová signalizace.....	21
2. 1. 4. Rim15 jako člen PAS kinázová rodiny.....	21
2. 2. Respirace a fermentace u kvasinek.....	23
2. 2. 1. Obecná charakteristika dýchání.....	23
2. 2. 2. Obecná charakteristika kvašení.....	23
2. 2. 3. Metabolismus ethanolu.....	24
2. 2. 3. 1. Alkohol dehydrogenázy.....	24
2. 2. 3. 2. Aldehyd dehydrogenázy.....	24
2. 2. 4. <i>S. cerevisiae</i> a nekonvenční kvasinky.....	25
2. 2. 5. Kyslík jako faktor regulace metabolismu cukrů u kvasinek.....	25
2. 2. 6. Crabtree efekt.....	26
2. 2. 7. Crabtree negativní kvasinky vs. Crabtree pozitivní kvasinky.....	26
2. 2. 8. Růstová křivka kvasinkové kultury.....	27
2. 2. 9. Nefermentativní metabolismus u <i>S. cerevisiae</i>	28
2. 2. 10. Příjem nefermentovatelných substrátů a jeho genová regulace.....	29
2. 2. 10. 1. Genová determinace utilizace glycerolu.....	30
2. 2. 10. 2. Genová determinace utilizace laktátu.....	30
2. 2. 10. 3. Genová regulace absorpce ethanolu a acetátu.....	30
2. 3. Respiračně deficientní mutanti u <i>S. cerevisiae</i>	31
2. 3. 1. Obecná charakteristika respiračně deficientních mutantů.....	31
2. 3. 2. Historie.....	31

2. 3. 3. Indukce respiračně deficientních mutantů.....	32
2. 4. 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid.....	34
2. 4. 1. Mechanismus redukce TTC.....	34
2. 4. 2. Použití TTC v mikrobiologii.....	35
2. 4. 3. Faktory ovlivňující použití TTC v mikrobiologii.....	37
3. Materiál a metody.....	39
3. 1. Materiál.....	40
3. 1. 1. Použité mikroorganismy.....	40
3. 1. 2. Materiál pro práci s DNA a elektroforézu.....	40
3. 1. 3. Přístroje.....	41
3. 1. 4. Kultivační média.....	41
3. 1. 4. 1. Tekutá média.....	42
3. 1. 4. 2. Pevná média.....	42
3. 1. 5. Roztoky.....	44
3. 1. 5. 1. Jednoduché roztoky.....	44
3. 1. 5. 2. Složené roztoky.....	45
3. 1. 6. Enzymy.....	48
3. 1. 7. Aminokyseliny.....	48
3. 1. 8. Barvy.....	48
3. 1. 9. Počítačové programy a databáze.....	48
3. 2. Metody.....	49
3. 2. 1. Sterilizace.....	49
3. 2. 2. Kultivace.....	49
3. 2. 2. 1. Kultivace v tekutém médiu.....	49
3. 2. 2. 2. Kultivace na pevném médiu.....	49
3. 2. 3. Skladování mikroorganismů.....	50
3. 2. 3. 1. Krátkodobé skladování.....	50
3. 2. 3. 2. Dlouhodobé skladování.....	50
3. 2. 4. Stanovení počtu buněk.....	50
3. 2. 5. Stanovení optické denzity.....	50
3. 2. 6. Stanovení růstové rychlosti kultury.....	51
3. 2. 7. Barvení.....	51
3. 2. 7. 1. Barvení stop po kultivaci kolonií.....	51

3. 2. 7. 2. Barvení kolonií pomocí TTC.....	51
3. 2. 7. 3. Barvení buněk fluorescenčním barvivem DiOC ₆	52
3. 2. 8. Práce s DNA.....	52
3. 2. 8. 1. Izolace chromozomální DNA.....	52
3. 2. 8. 2. Čištění a srážení DNA.....	52
3. 2. 8. 3. Přečištění RNázou.....	53
3. 2. 8. 4. Polymerázová řetězová reakce.....	53
3. 2. 8. 5. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu.....	54
3. 2. 9. Stanovení počtu respiračně deficientních mutant v kolonii.....	55
3. 2. 10. Ověření respirační deficiencie/suficiencie.....	55
3. 2. 11. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy.....	55
3. 2. 11. 1. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu NOACK.....	55
3. 2. 11. 2. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu GLU-GOD.....	57
3. 2. 12. Stanovení obsahu ethanolu pomocí kitu NOACK.....	57
4. Výsledky.....	60
4. 1. Charakterizace kmene <i>rim15Δ</i>	61
4. 1. 1. Ověření delece genu RIM15.....	62
4. 1. 2. Morfologie kolonií kmene <i>rim15Δ</i> v závislosti na zdroji uhlíku.....	63
4. 1. 3. Morfologie kolonií kmene <i>rim15Δ</i> v závislosti na teplotě.....	66
4. 1. 4. Morfologie kolonií kmene <i>rim15Δ</i> v závislosti na množství glukosy.....	66
4. 1. 5. Alkalizace GM média.....	68
4. 1. 5. 1. Chování mutant <i>rim15Δ</i> z hlediska alkalizace a acidifikace média....	69
4. 1. 5. 2. Rozdíly ve zbarvení kolonií deletantů <i>rim15Δ</i>	70
4. 2. Detekce respiračního metabolismu v koloniích <i>S. cerevisiae</i> pomocí TTC.....	72
4. 2. 1. Faktory ovlivňující barvení pomocí TTC.....	73
4. 2. 2. Řezy kolonií.....	76
4. 2. 3. Barvení řezů kolonií.....	76
4. 2. 4. Respirační metabolismus monokolonií různých kmenů <i>S. cerevisiae</i> rostoucích na médiu s glukosou.....	77
4. 2. 5. Respirační metabolismus monokolonií různých kmenů <i>S. cerevisiae</i> rostoucích na médiu s glycerolem.....	84
4. 2. 6. Respirační metabolismus obřích kolonií různých kmenů <i>S. cerevisiae</i> rostoucích na médiu s glukosou.....	85

4. 2. 7. Respirační metabolismus obřích kolonií různých kmenů <i>S. cerevisiae</i> rostoucích na médiu s glycerolem.....	86
4. 2. 8. Šestice obřích kolonií.....	87
4. 2. 9. Ranná stádia.....	88
4. 2. 10. Zarůstání buněk do agaru.....	90
4. 2. 11. Fluorescenční barvení DiOC ₆	91
4. 3. Detekce respiračně deficientních mutantů.....	94
4. 3. 1. Podíl respiračně deficientních mutantů v koloniích různých kmenů.....	94
4. 3. 2. Podíl respiračně deficientních mutantů v koloniích v rámci kmene.....	97
4. 3. 3. Růstová rychlost respiračně deficientních mutantů.....	99
4. 4. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy a ethanolu v pevném médiu po růstu kolonií.....	102
4. 4. 1. Příprava vzorků pro stanovování obsahu glukosy v agaru.....	102
4. 4. 2. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu NOACK.....	103
4. 4. 3. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu GLU GOD 250.....	105
4. 4. 4. Stanovení obsahu ethanolu v koloniích kvasinek.....	107
4. 4. 4. 1. Příprava vzorků pro stanovení obsahu ethanolu v koloniích kvasinek.....	107
4. 4. 4. 2. Stanovení obsahu ethanolu pomocí kitu NOACK.....	108
5. Diskuze.....	110
5. 1. Vliv delece genu <i>RIM15</i> na morfologii a přizpůsobení se stresovým podmínkám.....	111
5. 2. Respirace a fermentace v koloniích <i>S. cerevisiae</i>	113
6. Souhrn.....	118
7. Seznam citované literatury.....	120

Seznam zkratek

- A...absorbance
BFM...bromfenolová modř
BKP...bromkresolový purpur
bp...pár bází
CBB...Coomassie Brilliant Blue
DiOC₆...3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid – fluorescenční barva
EDTA...kyselina etylendiamintetraoctová
EtBr...ethidium bromid
FGM...fermentable growth medium
INT...2-(p-jodofenyl)-3-(p-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid
KDM...komplexní definované médium
MAT...expresní lokus nesoucí geny specifické pro daný párovací typ (a nebo α)
NAD⁺... nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH...nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
OD...optická denzita
PCR...polymerázová řetězová reakce
PKA...cAMP dependentní protein kináza A
pH...-log₁₀
rd...respiračně deficientní
rs...respiračně suficientní
SDS...dodecylsulfát sodný
TBE...tris-borát-EDTA
TE...tris-EDTA
TTC...2, 3, 5 – trifenyltetrazolium chlorid
UV...ultrafialový
YNB...yeast nitrogen base
w/v...objemová procenta

1. Úvod.

Již velice dlouhou dobu provázejí život člověka malé jednobuněčné eukaryotické organizmy, kvasinky. Některé druhy kvasinek se projevují jako potenciální lidské patogeny, jiné jsou zase nepostradatelné pro výrobu piva, vína, pekařského droždí, používají se například k produkci některých enzymů nebo k získávání prekurzorů některých vitamínů, slouží i jako významné modelové organizmy.

V naší laboratoři se pracuje s nejznámější cukernou houbou, Zuckerpilz, *Saccharomyces cerevisiae*, která slouží jako nejdůležitější modelový organizmus. V současné době je považována za obecný model eukaryotické buňky. K tomuto postu také výrazně přispěla například schopnost rychlého množení, snadné manipulace nebo střídání diploidní a haploidní životní fáze, což značně ulehčilo mutační analýzy, které vedly k objevu velkého množství jednotlivých funkcí proteinů zapojených téměř do všech životních dějů buňky.

Kvasinky vytvářejí při růstu na pevném médiu organizované mnohobuněčné útvary – kolonie. Morfologie kvasinkových kolonií je za daných podmínek charakteristická pro daný rod, druh i kmen, může se však lišit i v rámci kmene samotného v závislosti na různých kultivačních podmínkách. Z tohoto důvodu jsem se v první části své diplomové práce zaměřila na morfologii kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY a jeho delečních mutantů, na vliv těchto mutací na morfologii a na adaptaci na stresové podmínky.

Druhá část této práce je zaměřena na zjišťování respirační aktivity v koloniích našich kmenů. K tomu jsme využili barvení kvasinkových kolonií trifenyltetrazolium chloridem (TTC). TTC se používá již dlouhou dobu v mnoha biologických odvětvích, například v lékařství k rozeznávání atrofovaných tkání nebo v půdní biologii k odhadům mikrobiální diverzity.

Poslední část diplomové práce je zaměřena na sledování výskytu respiračně deficientních mutantů v koloniích našich kmenů. Respiračně deficientní mutanti neboli petit mutanti se projevují neschopností využívat takové zdroje uhlíku, které mohou být využity pouze respirací. Tedy například glycerol nebo laktát. Na médiích s limitovaným množstvím glukosy tyto mutanti rostou ve formě malých kolonií (petit).

2. Literární úvod.

2. 1. Rim15 protein kináza.

(SWIMMEN *et al.* 2006)

Všechny organizmy, jak prokaryotní tak eukaryotní, jak mnohobuněčné tak jednobuněčné, vyžadují živiny a energii ke správnému chodu jejich metabolismu a k syntéze nezbytných buněčných komponent. Některé živiny hrají klíčovou roli v metabolismu jako potenciální regulátory signálních drah a tyto živinami indukované signální dráhy zajišťují optimální spotřebu živin díky adaptacím metabolismu a přizpůsobení růstových vlastností.

Obzvlášť u jednobuněčných organismů je monitorování a signalizace velice důležitá, protože jsou velice často vystaveni dramatickým změnám prostředí, kde se období dostatku živin střídají s dlouhými obdobími nedostatku. Mikroorganizmy rychle rostou a dělí se v příznivých podmínkách, ale začnou se rychle připravovat na vstup do stacionární fáze (G_0), začne-li živin ubývat (WERNER - WASHBURNE *et al.* 1996).

Původně byl gen *RIM15* identifikován jako regulátor meiózy v diploidních buňkách, další studie ukázaly, že je nezbytný pro správný vstup buněk do G_0 , během níž se děje mnoho transkripčních a metabolických změn. Některé z nich, jako třeba indukce na stres reagujících genů a akumulace rezervní trehalosy, slouží k získání odolnosti ke stresujícím podmínkám a zabezpečují optimálního přežití během období hladovění. Také bylo zjištěno, že Rim15 spojuje signály z několika rozdílných kináz (*PAK*, *TORC1*, Sch9 a Pho85-Pho80), které přenášejí informace o dostupnosti různých živin.

2. 1. 1. Rim15 jako regulátor meiózy.

Diploidní buňky podstupují meiózu za podmínek vyčerpání dusíku a v přítomnosti nezkvasitelného zdroje uhlíku. Na počátku meiózy jsou přechodně exprimovány geny *EMG* (early meiotic-specific genes). Indukce těchto genů závisí na přepnutí funkce transkripčního faktoru Ume6. Ume6 blokuje promotory genů *EMG* prostřednictvím histon deacetyláz (*HDAC*) Rpd3 a Sin3. Při indukci meiózy jsou Rpd3 a Sin3 odstraněny z promotoru genů *EMG* a Ume6 spolu s Ime1 vytvářejí komplex, který funguje jako transkripční aktivátor, což má za následek acetylaci

histonů a transkripci genů *EMG* i *IME2* (kóduje proteinkinázu, která zpětnovazebně ovlivňuje hladinu Ime1).

Gen *RIM15* (Regulator of *IME2*) funguje jako regulátor *IME2*. Mutanti v genu *RIM15* mají sníženou schopnost podstoupit meiózu díky redukci exprese genů *IME1* a *EMG*. Exprese genu *RIM15* je potlačena v přítomnosti glukosy (VIDAN a MITSCHHELL 1997).

2. 1. 2. Rim15 jako efektor PKA.

Rim15 je ser-thr protein kináza (1770 AK), která pozitivně ovlivňuje interakci mezi Ume6 a Ime1, tím že stimuluje odstranění Rdp3 a Sin3 z promotorů. V cytoplazmě je lokalizovaná ve formě vázané s proteinem 14-3-3 (obr. 2. 1. 1.).

Rim15 je bezprostředně negativně regulován protein kinázou A (PKA). Fosforylovaný Rim15 se nachází v neaktivní formě v cytoplazmě, defosforylovaný může vstupovat do jádra, kde může ovlivňovat transkripci (obr. 2. 1. 1.). Přesný mechanismus ovlivnění transkripce není znám (možná přímou fosforylací). Byla ale prokázána kontrola funkcí a aktivity Gis1 a Msn2/4 prostřednictvím proteinu Rim15. Rim15 je definován jako pozitivní regulátor vstupu do stacionární fáze.

PKA reguluje vstup do stacionární fáze přes transkripční faktory Gis1, Msn2 a Msn4. Gis1 je transkripční faktor, který se váže na elementy postdiauxického shiftu (PDS) v promotoru genů, které jsou dereprimovány při vyčerpání glukosy při diauxickém shiftu. Jádro PDS elementů se podobá konsensus sekvenci STRE elementů v promotorech, které indukují transkripci jako odpověď na různé stresující vlivy, jako je limitace živin, oxidativní, teplotní a osmotický stres. Kontrola exprese genů ze STRE elementů je zprostředkována PKA přes transkripční faktory Msn2 a Msn4. Gis1 a Msn2/4 vykazují pravděpodobné částečné funkční překrytí a mutace v těchto genech se projevují poruchami růstu na nezkvasitelných zdrojích uhlíku.

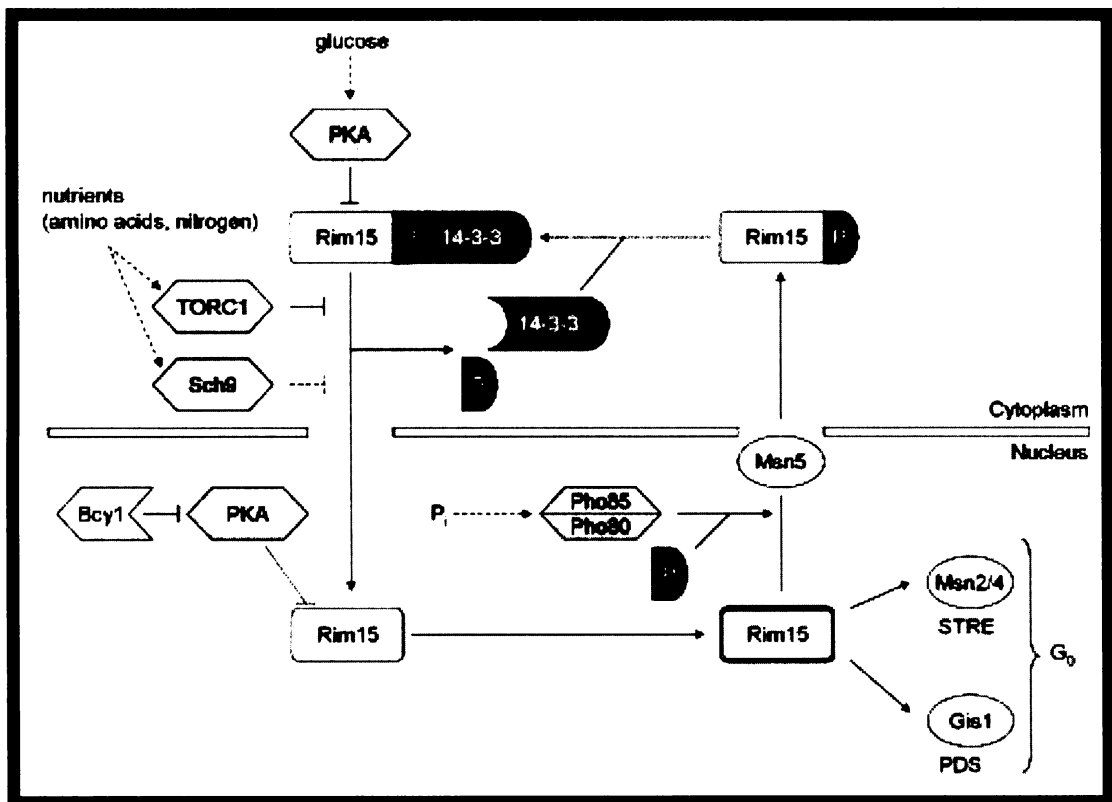
2. 1. 3. Propojení nutričních signálů přes Rim15.

Rim15 spojuje signály z nejméně čtyř proteinkináz, které jsou citlivé na hladinu živin. Kromě PKA sem patří cytoplazmatické *TORC1* a Sch9 a jaderný komplex Pho85-Pho80. (obr. 2. 1. 1. a obr. 2. 1. 2.).

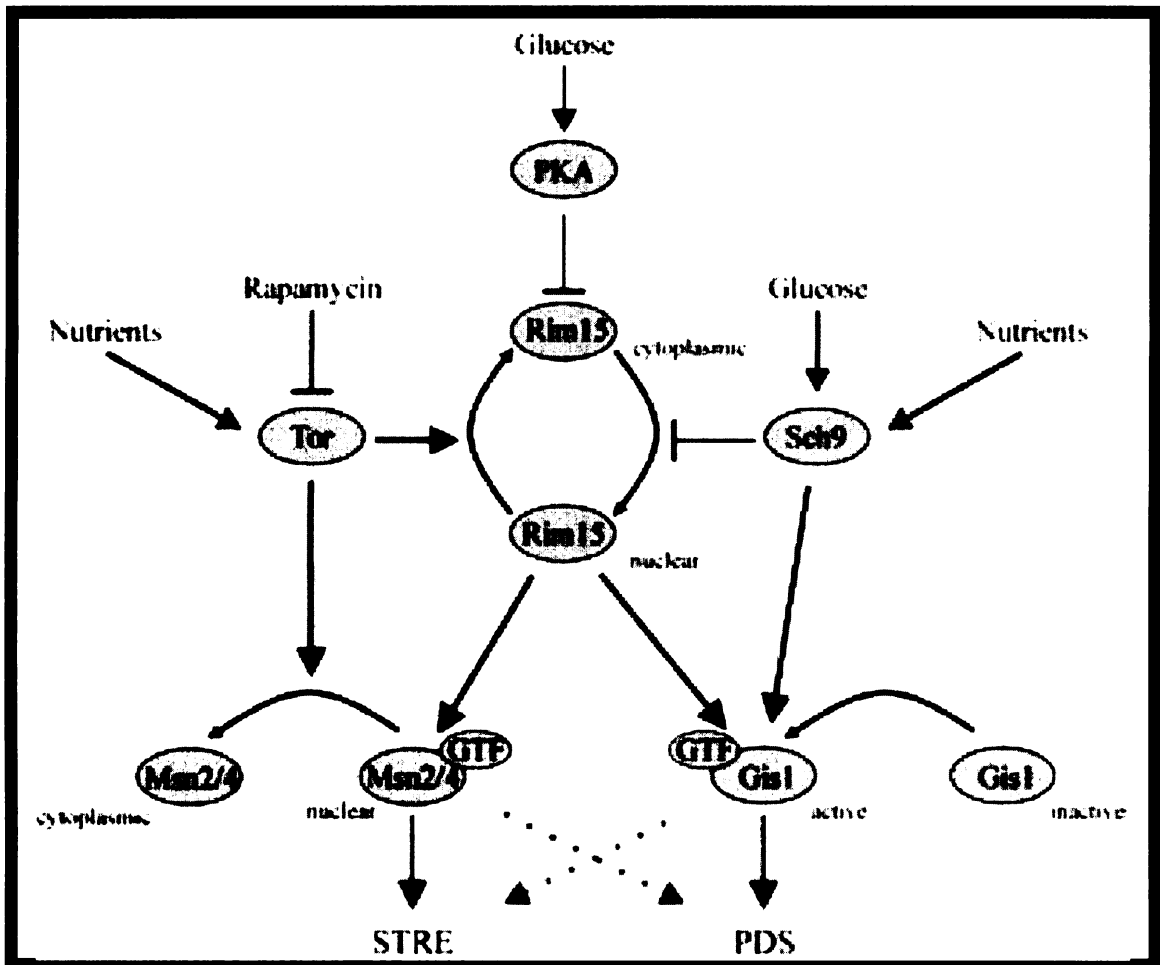
2. 1. 3. 1. Dráha TOR.

TOR dráha představuje signální dráhu, která reaguje na dva nutriční podněty (obsah a typ zdroje uhlíku a dusíku).

Hlavními složkami této dráhy (obr. 2. 1. 1.) jsou vysoce konzervované protein kinázy Tor1 a Tor2, které jsou přítomné ve dvou odlišných komplexech. *TORC2* kontroluje organizaci cytoskeletárního aktinu a *TORC1* mimo jiné kontroluje transkripci genů specifických pro hladovění a je inhibován rapamycinem. Buňky, ke kterým je přidán rapamycin zastavují růst a přecházejí do G_0 fáze, čímž se podobají hladovějícím buňkám. Stejně tak mutanti s chybějícím genem *RIM15* selhávají při vstupu do G_0 fáze a vykazují podobné defekty (chybná indukce transkripce genů s PDS a STRE, chybná indukce termotolerance, defekt v rezistenci na hladovění, v akumulaci trehalosy a glykogenu). Při inhibici *TOR1* je Rim15 defosforylován a je uvolněn z cytoplazmy a přemísťuje se do jádra. Při dostatku živin Tor1 fosforyluje Rim15, který se tímto přemísťuje do cytoplazmy.



Obr. 2. 1. 1. Schéma možného propojení nutričních signálů přes Rim15 (SWINNEN *et al.* 2006).



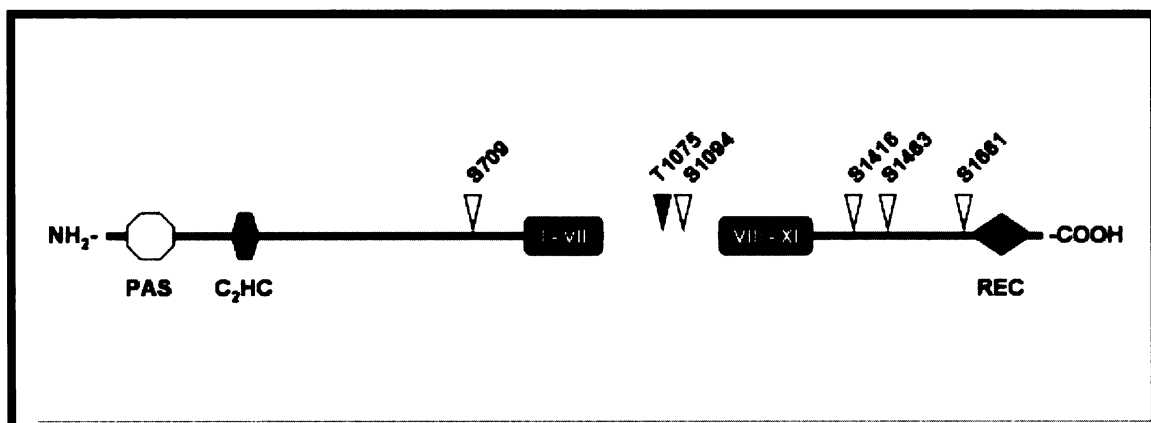
Obr. 2. 1. 2. Možné schéma interakcí signálních drah TOR a FGM (ROOSEN *et al.* 2005).

2. 1. 3. 2. Dráha FGM.

Další dráha, která je zapojena do signalizace o přítomnosti glukosy a dusíku ve kvasinkových buňkách, je FGM dráha (fermentable growth medium) (obr. 2. 1. 2.). Klíčovou složkou této dráhy je protein kináza Sch9, což je nutriční regulátor s homologií ke katalytické podjednotce Tph protein kinázy A (PKA). Sch9 je stejně jako TORC1 vyžadována pro udržení Rim15 v cytoplazmě během exponenciální fáze na médiu s glukosou. Sch9 zřejmě fosforyluje druhé vazebné místo Rim15 a proteinu 14-3-3.

2. 1. 3. 3. Fosfátová signalizace.

Kromě role Rim15 v signalizaci závislé na zdroji glukosy a dusíku, kontroluje Rim15 i vstup do G_0 fáze jako odpověď na nedostatek fosfátů v médiu. Signál o hladovění na fosfát je zprostředkován PHO dráhou (obr. 2. 1. 1.), která je lokalizovaná v jádře a obsahuje cyklin dependentní kinázy Pho85 a Pho80, inhibitor cyklin dependentní kinázy Pho81 a transkripční faktor Pho4. Při vysoké koncentraci fosfátů se Pho85-Pho80 fosforylují, a tím deaktivují Pho4 transkripční faktor. Při nedostatku fosfátů Pho81 inhibuje kinázový komplex Pho85-Pho80, čímž se může aktivovat Pho4 a transkripce genů zajišťujících absorpci a uskladnění fosfátů. Při hladovění na fosfát se indukují G_0 podobného charakteru jako v případě hladovění na glukosu a dusík. Rim15 v této dráze představuje cíl kinázového komplexu Pho85-Pho80, jímž je fosforylován v poloze Thr¹⁰⁷⁵ uvnitř vazebného místa proteinu Rim15 k proteinu 14-3-3.



Obr. 2. 1. 3. Schéma architektury domén proteinu Rim15. Domény jsou znázorněny přibližně v měřítku.

2. 1. 4. Rim15 jako člen PAS kinázové rodiny.

Protein kináza Rim15 patří mezi skupinu konzervovaných proteinů hub, které vykazují stejnou organizaci domén (obr. 2. 1. 3.), zahrnující C_2HC doménu zinkových prstů a N-koncovou PAS doménu, díky níž se Rim15 řadí do rodiny PAS kináz. PAS domény jsou malé regulační moduly, které mohou reagovat na široké spektrum podnětů (např. změny v redox potenciálu, celkové hladiny energie v buňce, na kyslík). Dále obsahuje C-koncovou REC doménu, centrální katalytické domény

kináz (I – VII, VIII – XI), vložku 188 AK mezi VII. a VIII. doménou, která obsahuje předpokládané vazebné místo pro protein 14-3-3, díky němuž je Rim15 zadržován v cytoplazmě v podmínkách dostatku živin.

2. 2. Respirace a fermentace u kvasinek.

2. 2. 1. Obecná charakteristika dýchání.

Dýchání představuje nejdůležitější sled katabolických reakcí, nezbytných pro uvolnění chemické energie, která je obsažena v organických sloučeninách. Dýchání probíhá po etapách a celý komplex procesů dýchání lze rozdělit do 4 fází:

1. Glykolýza – degradace glukosy až na kyselinu pyrohroznovou, přičemž směr a charakter dalších změn závisí na podmínkách v buňce, hlavně na dostupnosti kyslíku. (Za nepřítomnosti kyslíku dochází k anaerobním přeměnám, ke kvašení. V aerobních podmínkách dochází k oxidaci za účasti kyslíku.)
2. Oxidace acetyl-CoA v tzv. citrátovém cyklu (Krebsově cyklu) až na dvě molekuly CO_2 .
3. Přenos elektronů z $\text{NADH} + \text{H}^+$ v dýchacím řetězci až na kyslík, který je takto redukován na H_2O .
4. Oxidační fosforylace, při níž je volná energie přenosu elektronů spřažena se syntézou ATP.

2. 2. 2. Obecná charakteristika kvašení.

Při kvašení neprobíhá oxidace glukosy až na konečné produkty, tj. oxid uhličitý a vodu. V anaerobních podmínkách nabývá proces rozkladu glukosy charakteru kvašení. Zatímco za přítomnosti kyslíku probíhá přeměna pyruvátu, jako konečného produktu glykolýzy, pyruvátdehydrogenázou na acetyl-CoA, který poté vstupuje do citrátového cyklu, tak v nepřítomnosti kyslíku je pyruvát účinkem pyruvátdekarboxylázy dekarboxylován na acetaldehyd, který se redukuje alkoholdehydrogenázou na ethanol, konečný produkt kvašení.

Kvašením se však ve srovnání s aerobním dýcháním uvolňuje mnohem méně energie (2 ATP na jednu přeměněnou molekulu glukosy), poněvadž její značná část zůstává vázaná v konečných produktech.

2. 2. 3. Metabolizmus ethanolu.

2. 2. 3. 1. Alkohol dehydrogenázy.

Ústřední pro produkci nebo využití ethanolu, hlavního produktu kvašení, jsou alkohol dehydrogenázy, enzymy, které katalyzují reverzibilní redukci acetaldehydu na ethanol (FLORES *et. al.* 2000).

V *S. cerevisiae* existují čtyři geny kódující enzymy alkohol dehydrogenázy. Alkohol dehydrogenáza I. (Adh1), která se podílí hlavně na vzniku ethanolu je lokalizovaná v cytoplazmě. Přepis genu *ADH1* se děje přednostně během fermentace glukosy a je indukován glukosou (DENIS *et al.* 1983). Další alkohol dehydrogenázy se účastní především utilizace ethanolu. Adh II je také lokalizovaná v cytoplazmě, je reprimovaná glukosou. Adh III a Adh IV se nacházejí v mitochondriích a jejich role není ještě zcela jasná (FLORES *et. al.* 2000).

2. 2. 3. 2. Aldehyd dehydrogenázy.

Aldehyd dehydrogenázy jsou enzymy důležité pro metabolismus acetaldehydu, který vznikl oxidací ethanolu. Ethanol, produkovaný při alkoholovém kvašení, může být znovu použit při respiračním metabolismu přes jeho oxidaci a následnou syntézu acetyl-CoA.

Informace o mnoha těchto enzymech v *S. cerevisiae* nejsou příliš přehledné, byl ale navržen logický systém. V *S. cerevisiae* existuje pět genů – *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* a *ALD6*, které kódují aldehyd dehydrogenázy. Ald2p, Ald3p a Ald6 jsou lokalizované v cytoplazmě, zatímco Ald3 a Ald5 jsou mitochondriální. Ald2 a Ald3p jsou indukované stresovými podmínkami a reprimovány glukosou, Ald4 je reprimován glukosou. Zdá se, že Ald4p a Ald6 jsou důležité pro růst na ethanolu (NAVARRO-AVIÑO *et al.* 1999).

2. 2. 4. *S. cerevisiae* a nekonvenční kvasinky.

Z historických důvodů se druh *S. cerevisiae* stal synonymem pro kvasinku, i když tento druh je jen jeden z 800 popsaných kvasinkových druhů (KURTZMAN a FELL 1998). O *S. cerevisiae* bylo nashromážděno množství informací, o kterých se tiše předpokládá, že platí i pro ostatní druhy kvasinek. Ačkoli například dráhy využití cukrů jsou rámcově stejné, tak zde existují důležité biochemické a genetické variace. Např. většina ostatních druhů kvasinek (nekonvenční kvasinky) oproti *S. cerevisiae* upřednostňuje v přítomnosti kyslíku respirační metabolismus (FLORES *et. al.* 2000).

Mezi druhy kvasinek, které upřednostňují fermentační metabolismus, patří *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a rod *Brettanomyces*. I v aerobních podmínkách převážně fermentují a respirace při kultivaci na glukose představuje pouze asi 10% uhlíkatého metabolismu, protože glukosa a další fermentovatelné cukry způsobují silné zhoršení respirační kapacity (Crabtree efekt) (FIECHTER 1981). Při kultivaci na jiných cukrech se podíl respirace zvyšuje.

2. 2. 5. Kyslík jako faktor regulace metabolismu cukrů u kvasinek.

V přítomnosti kyslíku mohou prakticky všechny kvasinky respirovat cukry na CO₂ a vodu. Mnoho kvasinek je ale schopných fermentovat cukry na ethanol a oxid uhličitý v případě nepřítomnosti kyslíku. Většina těchto fakultativně anaerobních druhů kvasinek však není schopná růst za nepřítomnosti kyslíku příliš dobře, dokonce i na komplexním médiu (VISSER *et al.* 1990).

Přítomnost kyslíku může mít u kvasinek několik účinků, které závisejí na druhu kvasinky a na použitém substrátu.

S faktem, že využití cukru respirací je energeticky nesrovnatelně výhodnější než fermentace, souvisí Pasteurův efekt, kdy se zpomaluje glykolýza a snižuje spotřeba cukru, když začne být kultura dostatečně zásobovaná kyslíkem. Tento efekt je málo výrazný u převážně fermentující kvasinky *S. cerevisiae* (LLOYD a JAMES 1987).

V kontrastu s Pasteurovým efektem byl popsán Custersův efekt, kdy je fermentační metabolismus indukován v přítomnosti kyslíku. Tento efekt se u kvasinky *S. cerevisiae* nevyskytuje.

Dalším efektem, o kterém se dlouho předpokládalo, že je ovlivněný koncentrací kyslíku, je Kluyverův efekt, který je rozšířený mezi fakultativně anaerobními kvasinkami, opět s výjimkou *S. cerevisiae*. Týká se zhoršené schopnosti metabolizovat disacharidy za anaerobních podmínek. Zjistilo se, že Kluyverův efekt není koncentrací kyslíku ovlivněný (WEUSTHUIS *et al.* 1994).

Poslední efekt ovlivněný přítomností kyslíku je Crabtree efekt (viz. kap. 2. 2. 6.).

2. 2. 6. Crabtree efekt.

Jednoduše využitelný cukr způsobuje v metabolismu *S. cerevisiae* potlačení transkripce genů, které kódují enzymy nezbytné pro využití alternativních zdrojů uhlíku. Tento proces je znám jako katabolická represe nebo Crabtree efekt. O mechanismu katabolické represe u kvasinky *S. cerevisiae* je známo mnoho, u nekonvenčních kvasinek nejsou téměř žádné informace (GANCEDO 1998).

S. cerevisiae má limitovanou respirační kapacitu, která způsobuje zvýšení vnitrobuněčné koncentrace pyruvátu. A až po akumulaci pyruvátu může působit enzym pyruvát dekarboxyláza, protože jeho afinita k pyruvátu je mnohem nižší než afinita pyruvát dehydrogenázy, klíčového enzymu respiračního metabolismu (URK *et al.* 1989).

2. 2. 7. Crabtree negativní kvasinky vs. Crabtree pozitivní kvasinky.

Bylo zjištěno, že rychlost fermentace při přechodu organismů z prostředí s limitovaným množstvím glukosy do prostředí s dostatkem glukosy pozitivně koreluje s množstvím pyruvát dekarboxylázy.

U Crabtree negativních kvasinek byla zjištěna nízká aktivita pyruvát dekarboxylázy a k jejímu zvýšení nedošlo ani při nadbytku glukosy. Na rozdíl od toho byla u Crabtree pozitivních kvasinek zjištěna zvýšená aktivita tohoto enzymu a zvyšovala se po dodání glukosy.

Crabtree negativní druhy ale kromě nízké aktivity pyruvát dekarboxylázy, vykazují relativně vysokou aktivitu acetaldehyd dehydrogenázy a acetyl koenzym

A syntetázy. Takto může být v těchto kvasinkách oxidován acetaldehyd a je vynechána redukce acetaldehydu na ethanol.

Hlavní rozdíly mezi Crabtree pozitivními a Crabtree negativními kvasinkami jsou zřejmě způsobeny rozdílnou kinetikou absorpce glukosy, syntézou zásobních karbohydrátů, metabolismem pyruvátu (URK *et al.* 1989).

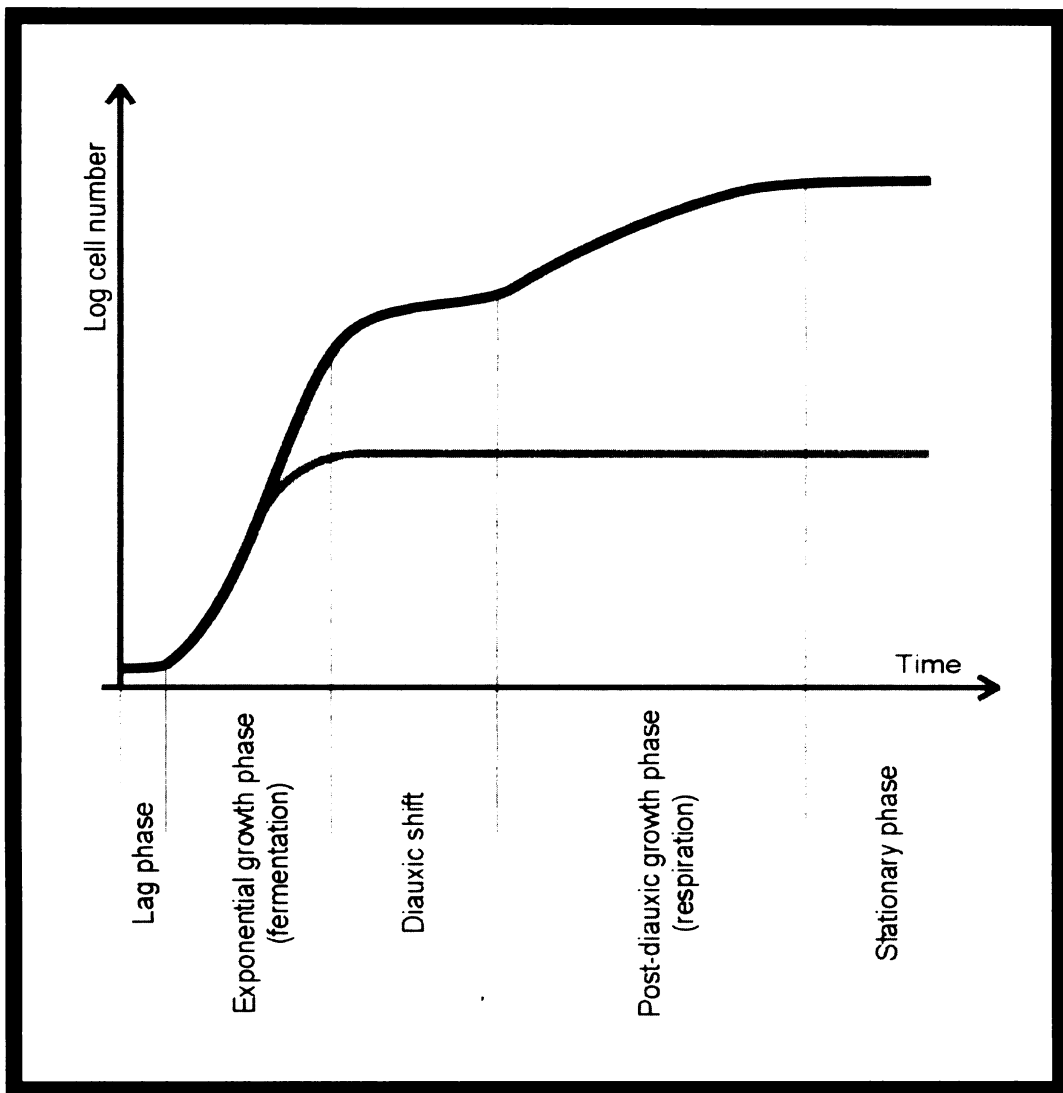
2. 2. 8. Růstová křivka kvasinkové kultury.

Pro kvasinky *S. cerevisiae*, které fermentují, jsou preferovaným zdrojem uhlíku a energie cukry. Když se přidá k buňkám rostoucím na nezkrasitelném zdroji uhlíku např. glukosa, začnou rychle adaptovat svůj metabolismus na fermentativní během krátké lag-fáze, aby zajistily optimální využití tohoto bohatého zdroje uhlíku. Tato adaptace vyžaduje rozdílné signální dráhy jako je dráha katabolické represe a signální dráha Ras-cAMP. Růstová rychlost v této fázi je nulová.

Po tomto iniciálním přechodném stádiu začnou buňky spotřebovávat a fermentovat cukr během exponenciální fáze, během níž také nejrychleji rostou (obr. 2. 2. 1.). V této fázi mají buňky k dispozici nadbytek substrátu a jejich rychlost metabolismu a růstu závisí jen na schopnosti zpracovávat substrát. Jakmile začne glukosa docházet, kvasinkové buňky vstupují do druhé lag-fáze, známé jako diauxický shift, během kterého přepínají svůj metabolismus z fermentačního na respirační. Toto přepnutí metabolismu je následováno druhou fází růstu, ale pomalejší než během exponenciální fáze. Rychlost růstu se snižuje v důsledku omezeného množství substrátu. Během této fáze jsou spotřebovávány jako zdroj uhlíku ethanol, acetát a další produkty iniciálních fermentačních procesů. A když jsou vyčerpány i tyto zdroje uhlíku, buňky vstupují do stacionární fáze (G_0), kde je opět růstová rychlost nulová. Během vstupu do G_0 fáze se v kvasinkové buňce odehrává mnoho transkripčních a metabolických změn (SWINNEN *et al.* 2006).

2. 2. 9. Nefermentativní metabolismus u *S. cerevisiae*.

Kvasinkové buňky *S. cerevisiae* musí po vyčerpání glukosy (při fermentativním metabolismu) běžně využívat nefermentovatelné zdroje uhlíku, jako je ethanol a glycerol, které jsou produkovány při nadbytku glukosy.



Obr. 2. 2. 1. Růstový profil kvasinkové kultury. Lag phase - krátká fáze adaptace, rychlost růstu nulová, exponential growth phase - exponenciální růstová fáze, nejvyšší růstová rychlost, fermentativní metabolismus, diauxic shift - při počínající limitaci živin, přepnutí z fermentativního metabolismu na respirační, post-diauxic growth phase - nižší růstová rychlost, respirační metabolismus, spotřeba produktů iniciální fermentace jako zdrojů uhlíku, stationary phase - klidová stacionární fáze, růstová rychlost nulová, vyčerpání zdrojů uhlíku. Černá křivka: růst počtu buněk v tekuté kultuře kmene *S. cerevisiae* na médiu s bohatým zdrojem uhlíku. Šedá křivka: růst počtu buněk tekuté kultury kmene *S. cerevisiae* na médiu s bohatým zdrojem uhlíku, ale s nedostatkem dusíku a fosfátů.

Studie ukázaly důležitost respiračního metabolismu pro prodloužení života buněk *S. cerevisiae*. Buňkám s funkčním genem *SIR2* rostoucím na 0,5% glukose, se prodloužila životnost o 25% v porovnání s kultivací na 2% glukose. Tedy že přepnutí z fermentačního na respirační metabolismus způsobuje kalorické omezení, které pozitivně ovlivňuje délku života buněk (LIN *et al.* 2002).

Pro adaptaci buněk při přechodu z fermentativního růstu na respirační je vyžadována genová kontrola. Komplex protein kinázy Snf1 (Cat1) spolu s regulační podjednotkou Snf4 (Cat3) a alternativními β -podjednotkami Sip1, Sip2 a Gal83 hrají roli v aktivaci strukturních genů, které byly potlačeny v přítomnosti vysoké koncentrace glukosy. Jednou z funkcí komplexu Snf1 je deaktivace hlavního transkripčního represoru Mig1, který reguluje transkripci genů pro proteiny umožňující fermentaci alternativních cukerných zdrojů uhlíku *SUC*, *MAL* a *GAL*, pro utilizaci sacharosy, maltosy a galaktosy (KLEIN *et al.* 1998). Další funkcí komplexu Snf1 je vliv na aktivaci respirace a glukoneogenezi. Geny *SNF1* a *SNF4* jsou nepostradatelné pro přepnutí metabolismu po vyčerpání glukosy v médiu a pro aktivaci glukosou reprimovaných strukturních genů, které jsou potřeba pro adaptaci na alternativní substrát.

Alternativní nefermentovatelný substrát musí být použit pro oxidativní metabolismus mitochondrií, tedy pro produkci ATP, a pro glukoneogenezi (SCHÜLLER 2003).

2. 2. 10. Příjem nefermentovatelných substrátů a její genová regulace.

Růst *S. cerevisiae* na nefermentovatelném substrátu jako je glycerol, laktát, ethanol nebo acetát vyžaduje jejich oxidativní přeměnu (pro získání energie) a vytvoření cukerných fosfátů a jiných uhlíkatých metabolitů (pro vytvoření biomasy) a to je zajišťováno geny respiračních enzymů a geny glukoneogeneze, které vykazují jejich značnou spolupráci (DERISI *et al.* 1997).

2. 2. 10. 1. Genová regulace absorpce glycerolu.

Glycerol je transportován do buňky proton symportním mechanismem vyžadujícím produkt *GUP1* (HOLST *et al.* 2000), přeměněn na dihydroxyaceton fosfát (DHAP) produkty genů *GUT1* (kóduje cytoplazmatickou glycerol kinázu) a *GUT2* (kóduje FAD dependentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázu). DHAP následně vstupuje do glykolytické a glukoneogenetické dráhy. *GUT1* a *GUT2* jsou transkripčně regulovány zdrojem uhlíku (SCHÜLLER 2003).

2. 2. 10. 2. Genová determinace utilizace laktátu.

První krok v metabolismu laktátu je jeho příjem přes permeázu Jen1 (CASAL *et al.* 1999), která je také schopná transportovat pyruvát. Oxidace laktátu na pyruvát vyžaduje mitochondriální laktát cytochrom c oxidoreduktázy, které jsou kódované *CYB2* (oxidoreduktáza L-laktátu) nebo *DLD1* (oxidoreduktáza D-laktátu). Oba geny reduktáz vykazují závislost na kyslíku, jsou aktivovány Hap1, a závislost na zdroji uhlíku, jsou regulovány pomocí Hap2 – Hap5, které také ovlivňují *JEN1*. Kromě genů respirace je laktátový metabolismus kontrolován také aktivátory glukoneogeneze Adr1 a Cat8 (SCHÜLLER 2003).

2. 2. 10. 3. Genová determinace utilizace ethanolu a acetátu.

Příjem ethanolu a acetátu může být pasivní difúzí. Acetát může být přenášen i permeázou Ace8 (CASAL *et al.* 1996). Metabolická přeměna acetátu nebo ethanolu může být rozdělena do tří drah (jednak nejdříve produkce acetyl-CoA, a dále produkce oxalacetátu v citrátovém cyklu a glukoneogeneze). Po změně vysoké koncentrace cukrů na růst na nefermentovatelném substrátu se 50x – 100x zvýší transkripce strukturálních genů *ADH2* (kódující glukosou reprimovatelnou alkohol dehydrogenázu), *ACSI* (kódující acetyl-CoA syntetázu), *ICLI* (kóduje izocitrát lyázu), *MLS1* (kóduje malát syntetázu), *PCK1* (kóduje fosfoenolpyruvát karboxylázu) a *FBP1* (kódující fruktosu-1,6-bisfosfatázu) (SCHÜLLER 2003).

2. 3. Respiračně deficientní mutanti u kmene *S. cerevisiae*.

2. 3. 1. Obecná charakteristika respiračně deficientních mutantů.

Respirační deficiencie, což je narušení správné funkce respiračního řetězce, je nejčastějším fenotypovým projevem při mutacích mitochondriálních genů, jež jsou lokalizovány nejen v mitochondriální DNA (mtDNA), ale i v DNA jaderné. Přičemž mutace v mitochondriální DNA se vyskytuje s vyšší frekvencí v porovnání s mutacemi jadernými a bylo odhadnuto, že fixace mutací v mitochondriální DNA jsou 10 – 12x rychlejší než u jaderné DNA (WALLACE 1989).

Respiračně deficientní mutanti nejsou schopni využívat nezkvasitelné zdroje uhlíku jako je např. glycerol nebo laktát a možností jejich detekce je výsev buněčné suspenze na agar s vyšším obsahem glycerolu a minimálním množstvím glukosy, kde se respiračně deficientní mutanti projeví růstem malých kolonií, díky omezenému obsahu pro ně využitelné glukosy v médiu.

Respiračně deficientní mutanti jsou proto někdy nazýváni petit (malí) mutanti nebo také rd mutanti (respiračně deficientní). Další možná terminologie respiračně deficientních mutantů je odvozena od míry mutací v mitochondriální DNA. Kmeny s normálně fungujícími mitochondriemi se označují ρ^+ , mutanti s defektním mitochondriálním řetězcem ρ^- a mutanti, kteří zcela postrádají mitochondriální DNA ρ^0 (FERGUSON a BORSTEL 1992).

Existují značné rozdíly mezi různými kvasinkami ve vytváření respiračně deficientních mutantů. Většina kvasinek patří mezi tzv. petit negativní (např. *K. lactis*), u nichž nebyly detekovány velké mutace v mtDNA, na rozdíl od kvasinky *S. cerevisiae*, kde tyto mutace vznikají s vysokou frekvencí (často se jedná o velmi rozsáhlé delece, které u petit negativních kvasinek neprobíhají. Tyto mutace jsou nereverzibilní), a proto je řazena mezi petit pozitivní (CHEN a CLARK-WALKER 1999).

2. 3. 2. Historie.

V roce 1949 Boris Ephrussi a jeho kolegové v Paříži identifikovali a charakterizovali mutantní 'petit' kolonie u kvasinkového kmene *S. cerevisiae*. Tito

mutanti byli indukováni chemicky na základě výzkumu působení akriflavinu na kvasinkové buňky, což mělo za následek vysoký podíl velmi malých kolonií při růstu na miskách s nízkým obsahem glukosy a vyšším obsahem glycerolu jako zdroje uhlíku. Petit mutanti byli tedy charakterizováni jako respiračně-deficientní a jejich charakteristický fenotyp malých kolonií plyne primárně z pomalejšího růstu, když jsou tyto buňky porovnány s normálními buňkami (při růstu na YEPG médiu) (FERGUSON a BORSTEL 1992).

V několika dalších letech byly popsány hlavní genetické a biochemické vlastnosti petit mutantů a následně se ukázalo, že genotyp těchto malých kolonií nevykazuje Mendelovskou dědičnost (FERGUSON a BORSTEL 1992).

Výzkumy dále ukázaly, že se jedná o dědičnost mitochondriální, a v důsledku toho hráli v následujících letech petit mutanti důležitou roli v sestavování genových map mitochondriálního genomu *S. cerevisiae*, a byla studována replikace a transkripce mitochondriální DNA (mtDNA) (CHEN a CLARK-WALKER 1999).

2. 3. 3. Indukce respiračně deficientních mutantů.

Mutace, při nichž vznikají respiračně deficientní mutanti, jsou spontánní, ale mohou být i jednoduše indukovány mnoha fyzikálními a chemickými mutageny (FERGUSON a BORSTEL 1992).

Rychlost spontánních petit mutací se pohybuje kolem 10^{-1} (občas až 10^{-2}) na jednu generaci v závislosti na druhu kvasinek (LINNANE *et al.* 1989) a frekvence petit mutací se značně zvyšuje po přidání chemických mutagenů, které působí rozdílně u rozdílných druhů kvasinek (WILKIE a GOONESWERA 1980). Každý kmen také není senzitivní ke všem mutagenům, a zdá se, že existuje několik genů zahrnutých do indukce spontánních a indukovaných petit mutací (CHERRY a DENIS 1989).

Mutageny jsou schopné vázat se k DNA. Některé zasahují do DNA syntézy a indukují petit mutace jen v rostoucích buňkách, jiné fyzikální i chemické mutageny způsobující poruchy DNA jsou více efektivní v nerostoucích buňkách. Zda bude chemikálie působit jako mutagen nebo ne, může být částečně způsobeno schopností koncentrovat se v mitochondriích (FERGUSON a BORSTEL 1992).

U kvasinkových druhů, které patří k petit negativním, se může petit mutace vytvořit pouze následkem mutagenu, u petit pozitivní *S. cerevisiae* vznikají petit mutace i bez exogenní aktivace.

Mezi nejsilnější mutagen indukující petit mutace patří ethidium bromid (SLINIMSKI *et al.* 1968), což je velice efektivní mutagen způsobující inserce, mnohonásobné delece a sekvenční přeskupení (LEWIN *et al.* 1978) u rostoucích i u nerostoucích buněk a ke svému účinku potřebuje jen krátkou dobu působení, při které dosahuje až téměř 100% přeměny buněk na respiračně deficientní mutanty. Se zvyšující se dobou působení nastává snížení frekvence petit mutací a tato částečná reverzibilita je způsobena opravnými procesy DNA (FERGUSON *et al.* 1989).

Dalším velice silným mutagenem je berenil, který působí podobně jako ethidium bromid u rostoucích i nerostoucích buněk, a také potřebuje jen krátkou dobu působení, při které dosahuje vysoké procento mutací (FERGUSON a BORSTEL 1992).

Dále byl studován např. akridin, akriflavin a anilinoakridin, což jsou petit mutageny, působící jen na buňky, které při jejich působení rostou a jako mutageny působí jen pokud je jejich koncentrace dostatečná k redukci růstové rychlosti a přežití buněk. Petit mutace jsou indukovány jen u dceřiných buněk. U těchto mutagenů je nutné dlouhé působení (2h a více) a frekvence indukce petit mutací je mezi 10% (anilinoakridin) a 97% (akriflavin). Tato skupina mutagenů se váže fyzikálně, ale ne chemicky k DNA (FERGUSON a BAGULEY 1981) a může způsobit až úplnou ztrátu DNA (FERGUSON a BORSTEL 1992).

Existuje i mnoho jiných petit mutagenů, například antibiotika erytromycin a chloramfenikol, které inhibují syntézu proteinů v mitochondriích (WILLIAMSON *et al.* 1971).

Mnoho studií mitochondriálního genomu různě indukovaných petitů mutantů naznačuje, že ztráty sekvencí mtDNA se nedějí náhodou. Například ethidium bromid indukuje ztrátu určitého úseku s geny a ztráta stejného úseku je indukována i UV radiací (FERGUSON a BORSTEL 1992).

2. 4. 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid.

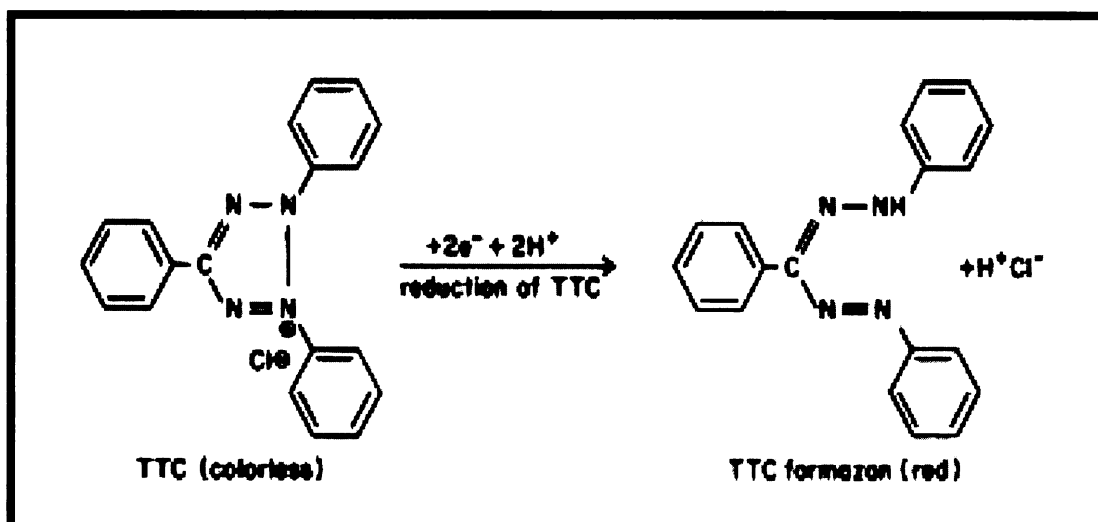
Historie solí tetrazolia a formazánů sahá více než sto let zpátky, kdy byl v roce 1875 zreagován benzen diazolum nitrát s nitromethanem, a tak vytvořen první formazán. V roce 1894 byla oxidací formazánu vyprodukována první sůl tetrazolia a v následujících letech bylo připraveno mnoho set solí tetrazolia a formazánů, ale jen u několika z nich byla zjištěna možnost aplikace v biologickém výzkumu (ALTMAN 1976).

2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC) je podtřída solí tetrazolia a byl syntetizován roku 1894. V roce 1941 bylo demonstrováno, že bakterie, kvasinky a rostliny jsou schopné redukovat toto barvivo (GUNZ 1949) a jedna z prvních aplikací TTC bylo ověřit klíčící schopnost semen (BREVER 1949). Od té doby bylo ohlášeno mnoho jiných aplikací v mnoha různých oborech. Například v medicíně se použitím TTC barvení měří místa infarktu myokardu nebo riziková místa pro vznik infarktu (DELLSERGER *et al.* 1991) a velice rozsáhlé je použití TTC v mikrobiologii, takže TTC dnes slouží jako jakýsi indikátor – velice užitečný nástroj v mikrobiální genetice, metabolismu a taxonomii.

2. 4. 1. Mechanismus redukce TTC.

2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC) je ve vodě rozpustná sloučenina, která je v oxidované formě bezbarvá nebo slabě žlutá v roztoku. Po redukci přechází na červeně zbarvenou sloučeninu trifenyl formazán (TPF) nerozpustný ve vodě, a tato reakce je v podstatě nevratná (JAMBOR 1954) (obr. 2. 4. 1.). TTC potřebuje ke své úplné redukci přes nestabilní meziprodukt na stabilní formazán 2 elektrony (BOCHNER a SAVEGEAU 1977).

Často se předpokládá (MUSSEER a OSEROFF 1994), podle obsáhlých studií řady solí tetrazolia, že TTC soutěží s kyslíkem o redukční ekvivalenty z cytochrom c oxidázy (SLATER *et al.* 1963). Na druhou stranu je ale dobře známo, že hem, který je centrem cytochromoxidázy je dosažitelný jenom pro molekuly menší, než je TTC (MOODY 1996). A kromě toho redoxní potenciál TTC je menší (pohybuje se v záporných hodnotách), než aby byl redukovatelný tímto centrem přiměřenou rychlostí (obr. 2. 4. 2.).



Obr. 2. 4. 1. Struktura a redukce TTC (BOCHNER a SAVEGEAU, 1977)

Bylo potvrzeno, že TTC není redukován cytochrom c oxidázou, ale místo toho je redukováno v koncentračně závislém množství mitochondriálními dehydrogenázami, nejrychleji komplexem I a pomaleji jinými dehydrogenázami. (ITO *et al.* 1997, RICH *et al.* 2001).

TTC se neredukuje v aerobních podmínkách, ale jen ve striktně anaerobních. Přijímá sice elektrony z respiračního řetězce i v aerobním stavu, ale místo produkce formazánu je rychle oxidován zpět molekulárním kyslíkem (ALTMAN 1976). Cytochromoxidáza sice TTC neredukuje, ale má velice vysokou afinitu ke kyslíku (BABCOCK a WIKSTRÖM 1992) a anaerobní podmínky pro redukci TTC vytváří tím způsobem, že při běžící respiraci rychle redukuje molekulární kyslík, který takto neoxiduje přechodnou nestabilní formu formazánu a může se vytvořit stabilní formazán. Buňky kolonií rostoucích na agarových miskách a respirující přes cytochromoxidázu, jsou anaerobní u centru kolonie, kde je také akumulován červený formazán při přelití kolonií TTC agarem (RICH *et al.* 2001).

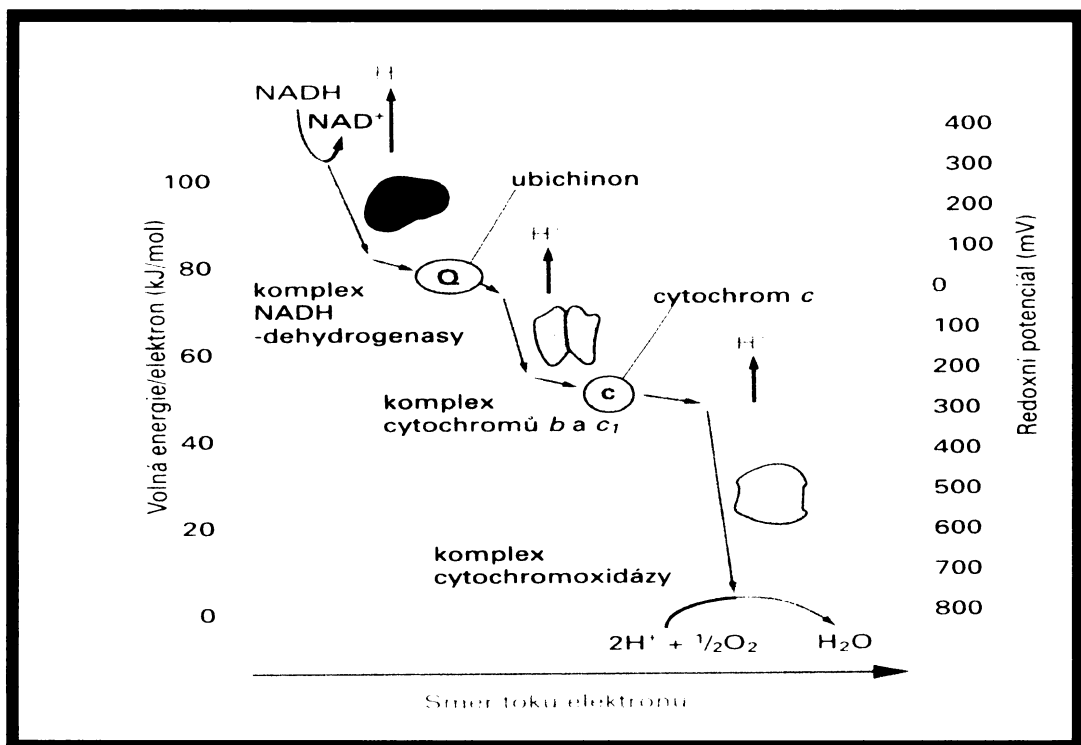
2. 4. 2. Použití TTC v mikrobiologii.

Bylo pozorováno, že kolonie rozdílných mikrobiálních druhů mohou vyvinout několik odstínů červené, když jsou pěstovány na médiu s TTC (HUDDLESSON a BALTZER 1950). Soli tetrazolia jsou tedy vzhledem k rozdílům v kapacitě redukce

různými mikroorganismy používány pro odhad mikrobiální diverzity (GARLAND a MILLS 1991) a mohou být prospěšné i pro diferenciaci mikroorganismů (BELOTI *et al.* 1999).

Toto barvivo může být proto použito pro sčítání mikrobiálních kolonií na pevném médiu a dovoluje rozeznat metabolické odlišnosti mezi organismy barvou kolonií, kterou produkují (BOCHNER a SAVEGEAU 1977). Nedostatek červené barvy v některých koloniích může být způsoben neschopností použít tento akceptor elektronů mikroorganismy nebo inaktivním stavem těchto kolonií (TARAFDAR 2003).

Některé metabolicky aktivní kolonie nemusí být schopny použít TTC jako akceptor elektronů. Může to být způsobeno tím, že odlišné mikroorganismy mají odlišné systémy dehydrogenáz, nebo je možné, že ne všechny systémy dehydrogenáz jsou schopné použít TTC jako akceptor elektronů. Jiná hypotéza vysvětluje nižší redukci TTC houbami než bakteriemi, nižší difúzí této složky uvnitř buněk hub, díky struktuře buněčné stěny a buněčné membrány (TARAFDAR 2003).



Obr. 2. 4. 2. Elektrontransportní řetězec. Přenos elektronů přes dýchací enzymové komplexy ve vnitřní mitochondriální membráně (ALBERTS *et al.* 1998).

Produkce formazánu může být použita také jako míra aktivity elektrontransportního řetězce (TREVORS 1984).

Neschopnost buněk a mikroorganismů redukovat TTC na červený formazán je také používáno jako prostředek ke zjištění nefunkčnosti respiračního řetězce. Tato detekce byla úspěšně použita k identifikaci řady mutantů defektních v cytochromoxidáze (BOCHNER a SAVEGEAU 1977). Tyto mutanty nevytvářejí vhodné anaerobní podmínky, které by dovolily produkci stabilního formazánu a z tohoto důvodu může být TTC používáno k detekci těchto mutantů (RICH *et al.* 2001), ačkoli samo TTC je redukováno dehydrogenázami.

Detekce respiračně deficientních mutantů kvasinek *S. cerevisiae* byla poprvé demonstrována na monokoloniích rostoucích na pevném komplexním médiu s 1% glukosy, které byly přelity agarem (pH 7) s 0,1% TTC. Kolonie s funkčním respiračním řetězcem se obarvily červeně, zatímco kolonie a nefunkčním zůstaly bílé (OGUR *et al.* 1957).

Byly zkoušeny i různé doby barvení kolonií (2, 3, 6, 24 hodin). Kolonie respiračně suficientních buněk se vzrůstajícím časem barvení tmavly a po 24 hodinách byly velice tmavé. Kolonie respiračně deficientních buněk, byly zpočátku bílé a po 24 hodinách velice slabě růžové (OGUR *et al.* 1957).

2. 4. 3. Faktory ovlivňující použití TTC v mikrobiologii.

Existuje mnoho faktorů, které zasahují do redukce TTC. Redukce TTC závisí na změnách pH, které omezují rozsah rozrůznění organismů, a je více intenzivní ve vyšším pH (BELOTI *et al.* 1999). Se zvyšujícím se pH se rychle zvyšuje míra obarvení až do pH 7, a dále se ještě zvyšuje pomalu až do pH 9 (OGUR *et al.* 1957).

Dále je redukce TTC ovlivňována některými substráty, obzvláště dikarboxylovými kyselinami, které jsou velice kyselé ve vysoké koncentraci a inhibují růst, když je použita volná forma kyselin, a z toho důvodu mohou být použity sodné nebo draselné soli, nebo mohou být volné kyseliny neutralizovány NaOH a dalším klíčovým faktorem ovlivňujícím redukcí TTC je koncentrace živin v prostředí (BELOTI *et al.* 1999).

Koncentrace TTC přidaná do média je také velice důležitá, protože vysoká hladina může působit inhibičně na růst mikroorganismů (SANYK *et al.* 1987).

Koncentrace TTC použitá v médiu by tedy měla být dost nízká na to, aby se vyhnulo inhibicím růstu, ale dost vysoká na to, aby dovolila barevný rozvoj (HURWITZ a CARTHY 1986).

Vědci se neshodnou v tom, jaká by měla být ideální koncentrace TTC. Podle některých by měla stačit koncentrace 0,005% (SANYK *et al.* 1987), podle jiných (OHARA 1992) až 2%.

Z těchto důvodů se někdy TTC nepřidává do média, na kterém mikroorganismy rostou, ale do média, kterým se mikroorganismy dodatečně přelévají nebo přestříkají (BELOTI *et al.* 1999).

Další problém při použití TTC je, že některé soli tetrazolia (TTC, MTT, INT) spontánně redukují, když jsou smíchány s horkým pepton-agarem, a agar tedy musí být zchlazen na teplotu kolem 50°C před smícháním (BOCHNER a SAVEGEAU 1977).

3. Materiál a metody.

3. 1. Materiál.

3. 1. 1. Použité mikroorganismy.

Polyploidní pivovarský kmen *Saccharomyces cerevisiae* P2

Rodičovské kmeny *Saccharomyces cerevisiae*:

BY4742 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)

BY4741(MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)

BY4743 (MATa/MATa *his3Δ1/his3a1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0*)

BY4739 (MATa *leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)

Od rodičovských kmenů byly odvozeny haploidní a diploidní homozygotní deleční kmeny: *ccr4Δ*, *caf40Δ*, *rim15Δ*, nahrazením genů *CCR4*, *CAF40*, *RIM15* kazetou kanMX4.

- získány ze sbírky EUROSCARF (sbírka kmenů s deletovanými geny), Germany (<http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>)

3. 1. 2. Materiál pro práci s DNA a elektroforézou.

PPP PCR mix (Top-Bio):

150 mM Tris pH 8,8

40 mM (NH₄)₂SO₄

0,02% Tween 20

5 mM MgCl₂

400 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

100 U/ml Taq purple DNA polymerázy

stabilizátory, barviva

Hmotnostní marker pro elektroforézu – λ DNA / Eco 130I (MBI Fermentas)

Primery – přímý a reverzní (viz. kap. 4. 1. 3.)

3. 1. 3. Přístroje.

Mikroskopy: Leika DMR fluorescenční mikroskop (Leica microsystem) (objektivy 10x, 20x, 40x, imerzní objektiv 100x; Nomarského kontrast, filtr BP 340-380) + lampa ebq 100 isolated lamp (Leistungselektronik Jena GmbH)
Carl Weiss Jena (objektivy 10x, 20x, 40x)

Vortex Genie 2 (Scientific Industrie)

PCR MiniCycler (MJ Research)

pH metr (Labio)

Třepačky (Pagnet, Lab-Therm)

Termostaty (Laboratorní přístroje Praha)

Kamera barevná Hitachi HV-C20, objektiv Navita

Kamera monochromatická (Cohu)

Osvětlovací systém Fiber-Lite PL-800 (Dolan Jenner)

Centrifugy: Biofuge 13 (Heraeus SEPATECH): úhlový rotor pro 24 mikrozkušavek

Mikro 20 (Hettlich): úhlový rotor pro 24 mikrozkušavek Eppendorf

Počítáčka kolonií: Colony counter (IUL instruments)

Zdroj pro elektroforézu (Labio)

UV transluminátor (Ultra-Lum)

Analytické váhy (Techniprot)

Digitální předvážky (Mettler)

Laminární box (Esco)

Spektrofotometr (Beckman)

Drtička (Fast Prep)

3. 1. 4. Kultivační média.

Kultivační média a roztoky byly připravovány v destilované vodě, která byla vyrobena v aparatuře Rowapur (Watrex). Demi - H₂O je destilovaná voda deionizovaná v aparatuře Ultrapur (Watrex). Většina chemikálií je od firmy Láchema Brno, případný jiný výrobce je uveden v závorce.

3. 1. 4. 1. Tekutá média.

YEPG (komplexní médium s glukosou):

2% glukosa

1% pepton (Imuna)

0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)

GM (komplexní médium s glycerolem):

3% glycerol

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

S-médium:

10% glukosa

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% pepton (Imuna)

60% glycerol

- glycerol sterilizovat odděleně

Médium pro testy kvašení cukrů (YEG):

0,4% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% testovaný cukr

3. 1. 4. 2. Pevná média.

YEPG (komplexní médium s glukosou):

1% (0,5%, 2%) glukosa

1% pepton (Imuna)

0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% agar (Sanitas)

GM (komplexní médium s glycerolem):

3% glycerol

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% agar (Sanitas)

GM + BKP:

3% glycerol

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

2% agar (Sanitas)

30mM CaCl₂ (Sigma)

0,01% BKP (bromkresolový purpur)

- CaCl₂ se sterilizuje zvlášť a přidává se po částečném zchlazení média

- BKP je barevný indikátor pH: žlutá barva při pH < 5,2 a fialová při pH > 6,8, sterilizuje se zvlášť a přidává se po částečném zchlazení média

- před sterilizací upravíme pH 5 pomocí 1M HCl

Přelévací TTC agar:

1,5% agar (Sanitas)

0,5% glukosa

Po sterilizaci se po částečném zchlazení média přidá stejný objem TTC pufru s 0,1% 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridem.

Agar s 2% glycerolu a 0,1% glukosy:

2% glycerol

0,1% glukosa

1% kvasničný autolyzát (Imuna)

1% pepton (Imuna)

2% agar (Sanitas)

Laktátový agar:

0,3% kvasničný autolyzát (Imuna)

0,35% pepton (Imuna)

0,2% KH₂PO₄ (1)

0,1% (NH₄)₂SO₄ (2)

0,1% MgSO₄ · 7H₂O (3)

1% laktát sodný

2% agar (Sanitas)

Sterilizace 1+2 a 3 zvlášť.

MM (minimální médium):

2% glukosa

0,5% (NH₄)₂SO₄

0,1% KH₂PO₄

0,05% MgSO₄ · 7 H₂O

0,1% Wickerhamův roztok

2% agar (Sanitas)

- auxotrofním kmenům se do média přidávají potřebné aminokyseliny

- všechny soli, Wickerhamův roztok a aminokyseliny se sterilizují zvlášť a do média se přidávají až po sterilizaci.

Komplexní definované médium (KDM):

1% glukosa

0,5% (NH₄)₂SO₄

0,1% KH₂PO₄

0,05% MgSO₄ · 7 H₂O

0,1% Wickerhamův roztok

0,1% CaCl₂

0,05% Casamino acids

0,03% adenin

0,03% tryptofan

- auxotrofním kmenům se do média přidávají potřebné aminokyseliny

- všechny soli, Wickerhamův roztok a aminokyseliny se sterilizují zvlášť a do média se přidávají až po sterilizaci.

3. 1. 5. Roztoky.

3. 1. 5. 1. Jednoduché roztoky.

1% agarosový gel:

0,5g agarosy do 50 ml 1x TBE

1000x EtBr:

10mg ethidium bromidu (Sigma) /1 ml H₂O

0,5M EDTA-NaOH:

18,6g Na₃EDTA (Serva) /100 ml H₂O

pH upravit 1M NaOH na pH 8

1M Tris-HCl:

12,1g Tris báze (Serva) /100 ml H₂O

pH upravit podle potřeby

1M NaOH:

4g NaOH /100 ml H₂O

Fyziologický roztok:

8,5g NaCl /1000 ml H₂O

10% SDS:

10g SDS (Sigma) /100 ml H₂O

7,5 M octan amonný:

57,7 g CH₂COONH₄/ 100 ml H₂O

3. 1. 5. 2. Složené roztoky.

10x TBE:

40 mM Tris-HCl

2 mM EDTA-NaOH

90 mM kyselina boritá

TE:

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

Wickerhamův roztok:

0,2 mg biotinu (Serva)

200 mg inositolu

20 mg riboflavinu
40 mg thiaminu-HCl
40 mg pyridoxinu-HCl
20 mg p-aminobenzoové kyseliny
40 mg pantothenátu vápenatého (Sigma)
40 mg kyseliny nikotinové
0,2 mg kyseliny listové
100 ml H₂O

Barvicí roztok CBB:

0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
40% methanol
10% kyselina octová

Odbarvovací roztok:

5% methanolu
7,5% kyselina octová

TTC pufr:

A = 4,8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O

100 ml H₂O

B = 1,82 g KH₂PO₄

100 ml H₂O

- Slít 61 ml A a 35, 5 ml B

RNáza:

1% Ribonukleáza A (Sigma)

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

15 mM NaCl

- pro inaktivaci DNáz se roztok zahřeje 15 minut na 100°C

- skladuje se při -20°C

Roztok pro izolaci chromozomální DNA:

- 50 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8)
- 20 μ l 0,5 M EDTA-NaOH (pH 8)
- 3 μ l markaptoethanol
- 1 mg zymolýza (20 tis. U/G, INC Biochemicals)

Upravený fenol:

Fenol několikrát protřepat s 1M Tris-HCl (pH 8) a jednou s 0,1 M Tris-HCl (pH 8), pak upravit pH na 7,0 a uskladnit při -20°C.

Upravený chloroform:

- 24 dílů chloroformu
- 1 díl isoamylalkoholu

Roztoky pro spektrofotometrické stanovení ethanolu (NOACK ČR – Megazyme):

1. 1,5 M pufr s pyrofosfátem draselným (pH 9), azid sodný (0,02% w/v)
2. NAD⁺ (155 mg), H₂O (12,4 ml)
3. Aldehyd dehydrogenáza (7,9 U/ ml)
4. Alkohol dehydrogenáza (167 U/ ml)

Roztoky pro spektrofotometrické stanovení glukosy (NOACK ČR – Megazyme):

1. 2 M imidazolový pufr, 100 mM chlorid hořečnatý, azid sodný (0,02% w/v)
2. NADP⁺ (150 mg), ATP (440 mg), H₂O (12 ml)
3. Hexokináza (425 U/ ml) + suspenze glukoso-6-fosfát dehydrogenázy (212 U/ ml)

Inkubační směs pro spektrofotometrické stanovení glukosy (GLU GOD 250):

- Enzymy (glukosaoxidáza > 166 smol/l.s, 4-aminoantipyrin (1 mmol/l), peroxidáza > 16 μ mol/l.s)
- Fosforečnanový pufr (pH 8) (140 mmol/l)
- 3-methyl-fenol (10 mmol/l)

Roztok Carrez I:

- 3,6 g K₄[Fe(CN)₆] . 3 H₂O (Sigma)
- 100 ml H₂O

Roztok Carrez II:

7,2 g ZnSO₄ · 7 H₂O (Sigma)

100 ml H₂O

BFM:

50% glycerol

0,13 M EDTA-NaOH (pH 8)

0,12% bromfenolová modř

3. 1. 6. Enzymy.

Ribonukleáza A z hovězího pankreatu (Sigma)

Zymolyáza (20 tis. U/G, INC Biochemicals)

- dále enzymy, které jsou součástí kitů pro stanovení obsahu glukosy a ethanolu.

3. 1. 7. Aminokyseliny.

Aminokyseliny leucin, lysin, uracil, histidin - Sigma, L-formy – používány v koncentraci 30 – 50 µg/ml média

3. 1. 8. Barvy.

DioC₆ – 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid (Molecular probes) – použití pro fluorescenční barvení v koncentraci 10 µg/ml.

3. 1. 9. Počítačové programy a databáze.

Software pro analýzu obrazu:

LUCIA G/F (Laboratory Imaging)

Databáze:

Saccharomyces Geonome Databáze (SGD)

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

Pubmed Medline

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

Yeast proteome databáze (YPD)

<http://www.incyte.com/proteome/YPD>

EUROSCARF (sbírka kmenů s deletovanými geny), Germany

<http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>

3. 2. Metody.

3. 2. 1. Sterilizace.

Laboratorní sklo bylo sterilizováno suchým teplem v sušárně při teplotě 160°C po dobu minimálně 120 minut.

Roztoky, média, špičky k mikropipetám, párátko a mikrozkmavky Eppendorf byly sterilizovány vodní párou v autoklávu 20 minut při teplotě 127,6°C a tlaku 150 kPa.

Mikrobiologické kličky a hokejky byly sterilizovány žiháním po namočení v ethanolu.

Všechny manipulace s buňkami určenými pro další kultivaci byly prováděny pouze se sterilním materiálem a v místnosti sterilizované UV zářením (UV box) nebo ve sterilním laminárním boxu.

3. 2. 2. Kultivace.

3. 2. 2. 1. Kultivace v tekutém médiu.

Kultivace buněk v tekutém médiu (GM nebo YEPG) byla prováděna aerobně na třepačce v Erlenmayerových baňkách o vhodném objemu (objem kultury maximálně 1/5 objemu baňky).

Buňky byly zaočkovány mikrobiologickou kličkou a kultivovány při teplotě 28°C.

3. 2. 2. 2. Kultivace na pevném médiu.

Kvasinky byly kultivovány v termostatu při teplotě 28°C nebo 37°C jako nátěr, obří kolonie nebo monokolonie.

Obří kolonie (makrokolonie) vznikají z většího počtu buněk. Na požadované místo na agaru byly mikropipetou nanесeny 10 μ l kapky suspenze buněk připravené v destilované vodě (hustota suspenze $10^6 - 10^7$ buněk / ml). Obří kolonie byly kultivovány jako jednotlivé kolonie, dvojice nebo šestice kolonií (ve dvou řadách po třech). Vzdálenost sousedních kolonií byla 2 cm.

Monokolonie vznikají rozetřením naředěné suspenze buněk připravené v destilované vodě (hustota suspenze $10^2 - 10^3$ buněk / ml) na povrch agaru.

Požadovaná hustota suspenze byla vytvořena ve zkumavkách pomocí ředící řady (hustota suspenze v první zkumavce 10^7 / ml, v poslední $10^2 - 10^3$ / ml). Z poslední zkumavky ředící řady bylo vyseto 100 μ l na misku.

3. 2. 3. Skladování mikroorganismů.

3. 2. 3. 1. Krátkodobé skladování.

Krátkodobě (1 měsíc) byly kvasinky skladovány na pevném komplexním médiu s glukosou v Petriho miskách v chladničce při teplotě 4°C.

3. 2. 3. 2. Dlouhodobé skladování.

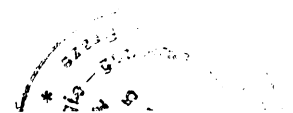
Pro dlouhodobé skladování byla čerstvě narostlá kultura kvasinek resuspendována v 1 ml komplexního skladovacího média (S-médium) a uložena v deep-freezu při teplotě -80°C.

3. 2. 4. Stanovení počtu buněk.

Počet buněk v suspenzi byl stanovován pomocí Thomovy počítací komůrky a mikroskopu při zvětšení 15x20.

3. 2. 5. Stanovení optické denzity (OD).

Optická denzita kvasinkové kultury byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm ve skleněných kyvetách a optickou dráhou 10 mm. Jako srovnávací vzorek (blank) bylo použito příslušné kultivační médium.



Při překročení hodnoty OD 0,3 musela být kultura před měřením naředěna kultivačním médiem, protože přestává platit lineární vztah mezi naměřenou hodnotou OD a biomasou buněk.

3. 2. 6. Stanovení růstové rychlosti kultury.

Příslušná kultura kvasinek byla nejprve aerobně kultivována přes noc v tekutém médiu (GM 3% nebo YEPG 2%) na třepačce v Erlenmayerových baňkách při teplotě 28°C. Buňky byly zaočkovány tak, aby byla druhý den ráno kultura v exponenciální fázi, tedy aby hodnoty OD byly maximálně do 0,3.

Druhý den byla tato kultura použita jako inokulum pro zaočkování do nového média, tak aby výchozí naměřené hodnoty OD byly minimálně 0,02. Tato zaočkováná kultura byla dále aerobně kultivována a každých 60 minut byl odebrán vzorek a byla změřena jeho optická denzita na spektrofotometru. Odběry byly opakovány 10x – 12x.. Od hodnot OD kolem 0,3 musely být vzorky určené k měření naředěny

Získané hodnoty byly vyneseny do růstové křivky, zlogaritmovány, byla určena směrnice přímky, ze které byla vypočítána délka jedné generační doby.

3. 2. 7. Barvení.

3. 2. 7. 1. Barvení stop po kultivaci kolonií.

Kolonie kvasinek byly opatrně spláchnuty z agarů pomocí proudu vody. Zbytek vody byl vylit a povrch agarů byl přelit barvicím roztokem CBB. Po jedné hodině byl barvicí roztok vyměněn za odbarvovací roztok, který se nechal působit přes noc. Buňky vrostlé do agarů se barví modře a lze je tak lépe pozorovat mikroskopicky.

3. 2. 7. 2. Barvení kolonií pomocí TTC.

Kolonie kvasinek v různých stádiích vývoje byly barveny 2, 3, 5 – trifenylnitroimidazolium chloridem. Kolonie vyrostlé na pevném médiu byly přelity částečně vychladlým TTC agarem tak, aby byly úplně zalité v TTC agaru. Při použití

0,1% TTC v TTC agaru trvá barvení kolonií na červeno zhruba hodinu. Poté bylo obarvení kolonií zdokumentováno vyfotografováním.

3. 2. 7. 3. Barvení buněk fluorescenčním barvivem DiOC₆.

Buňky určené k fluorescenčnímu barvení DioC₆ byly resuspendovány ve 20 µl ethanolu a 80 µl vody, bylo přidáno barvivo c koncentrací 10 µg/ ml. Po 15 - 30 minutách byla suspenze buněk nanesena na podložní sklíčko a pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Leica DMP s filtrem na fluorescenci – 5.

Fotografie byly zaznamenány integrační kamerou Cohu a obraz zpracován pomocí software Lucia.

3. 2. 8. Práce s DNA.

3. 2. 8. 1. Izolace chromozomální DNA zymolýzou.

Všechny kmeny určené pro izolaci chromozomální DNA byly kultivovány aerobně přes noc v tekutém YEPG médiu ve třepačce při teplotě 28°C. Druhý den byly v mikrozkuhavce Eppendorf zcentrifugovány postupně 2 ml narostlé suspenze (4 min., 2500 ot./ min., 4°C). Supernatant byl slit a pelet byl promyt destilovanou vodou a resuspendován ve 150 µl roztoku pro izolaci chromozomální DNA, a poté inkubován 1 hodinu ve vodní lázni při teplotě 37°C.

Poté bylo přidáno 20 µl 10% SDS a 100 µl 7,5 M octanu amonného, vzorky byly zvortexovány a na 15 minut vloženy do teploty -80°C. Poté byly zcentrifugovány (15 min., 15 000 ot./ min.) a byl odebrán supernatant, který byl dále přečištěn fenol-chloroformovou extrakcí (kapitola 4. 2. 8. 2.).

3. 2. 8. 2. Čištění a srážení DNA.

Vzorky byly upravovány fenol-chloroformovou extrakcí přidáním 150 µl upraveného fenolu a 150 µl upraveného chloroformu, zcentrifugovány (5 min., 5 000 ot./ min., 4°C), a poté byla odebrána horní vodná fáze, ke které bylo přidáno 300 µl upraveného chloroformu. Vzorky byly zvortexovány a opět zcentrifugovány (5 min.,

5 000 ot./ min., 4°C) a opět byla odebrána horní vodná fáze obsahující rozpuštěnou DNA.

K roztoku DNA bylo přidáno 0,6 objemu izopropanolu, vzorky byly zvotexovány, na 15 minut vloženy do teploty -80°C, a poté zcentrifugovány (15 min., 15 000 ot./ min., 4°C). Poté byl odebrán supernatant a pelet na dně (DNA) byl vysušen.

Nakonec byla DNA resuspendována ve 100 -150 µl TE pro další přečištění RNázou.

3. 2. 8. 3. Přečištění RNázou.

Vzorek DNA resuspendovaný v TE byl doplněn TE na 200 µl, pak byla přidána 1/100 objemu RNázy. Vzorek byl posléze inkubován 30 minut při teplotě 37°C.

Ke vzorku bylo přidáno 100 µl fenolu a 100 µl chloroformu (fenol-chloroformová extrakce) a byl zcentrifugován (5 min., 5 000 ot./ min., 4°C). Poté byla odebrána horní vodná fáze a proces se opakoval s 200 µl chloroformu. K odebrané vodné fázi byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 objemu 98% ethanolu nebo 1 objem izopropanolu.

Vzorek byl vložen na 15 minut do teploty -80°C, pak zcentrifugován (15 min., 15 000 ot./ min., 4°C), a potom byl odebrán supernatant, který se nechal vysušit a nakonec bylo přidáno 20 µl TE.

3. 2. 8. 3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).

Reakční směs pro amplifikaci zvoleného úseku DNA byla připravena na ledu v 0,2 ml tenkostěnných mikrozkuvkách pro PCR následujícím způsobem:

7,5 µl – PPP Master Mixu

1 µl – templátové DNA

1 µl – 10x přímého primeru (100 pmol/µl)

1 µl – 10x reverzního primeru (100 pmol/µl)

4,5 µl – sterilní demi H₂O

15 µl

Reakční směs byla zamíchána na vortexu, krátce zcentrifugována a inkubována v PCR cycleru podle zvoleného programu. Výtěžek amplifikovaného úseku byl analyzován elektroforeticky.

Pro amplifikaci genu RIM15 byl použit program:

1. 94°C (start reakce) – 5 min.
2. 94°C (denaturace dsDNA) – 1 min.
3. 65°C (připojení primerů) – 1 min.
4. 72°C (extenze) – 2,5 min.
5. 35x zpět na krok 2.
6. 72°C (dosyntetizování) – 12 min.
7. 4°C (ukončení reakce) - ∞

Pro amplifikaci genu ACT1 (kontrola) byl použit program:

1. 94°C (start reakce) – 5 min.
2. 94°C (denaturace dsDNA) – 1 min.
3. 50°C (připojení primerů) – 45 s
4. 72°C (extenze) – 1,5 min.
5. 35x zpět na krok 2.
6. 72°C (dosyntetizování) – 12 min.
7. 4°C (ukončení reakce) - ∞

3. 2. 8. 4. Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu.

Analýza fragmentů DNA po amplifikaci byla prováděna pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. Ten byl připraven rozehrátím 0,5 g agarosy v 50 ml TBE pufru a posléze nalit do plexisklového bločku s předem vloženým hřebenem zhruba 1 cm od okraje.

Po ochlazení ztuhnutí agarosového gelu byly odstraněny postranice a hřeben a bloček byl přenesen do elektroforetické vany a přelit 450 ml TBE pufru, tak aby hladina sahala nad povrch gelu.

Do vzniklých jamek po hřebenu byly mikropipetou naneseny vzorky DNA smíchané s roztokem bromfenolové modří (BFM).

Aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí o velikosti 60-65 V, což při vzdálenosti elektrod asi 12 cm znamená intenzitu elektrického pole zhruba 5 V/cm.

Po doputování BFM přibližně 1 cm od okraje byl gel následně obarven 1x EtBr a pozorován pomocí UV-transiluminátoru.

3. 2. 9. Stanovení počtu rd mutant v kolonii.

Kolonie kvasinek požadovaného stáří byla pomocí sterilního párátko přenesena do mikrokumavky Eppendorf, resuspendována ve vodě a byla spočítána koncentrace buněk v Thomově počítací komůrce. Poté byla v ředící řadě naředěna na 10^3 buněk/ml a buňky byly vysety na pevné médium s 0,1% glukosy a 2% glycerolu, na kterém rostou rd matantní kolonie jen do vyčerpání malého množství glukózy, kdežto respiračně suficientní kolonie pokračují v růstu díky spotřebě glycerolu jako zdroje uhlíku.

Po pěti dnech růstu kolonií v termostatu při teplotě 28°C bylo spočítáno procento rd mutantních kolonií na misce a tím i procento malých mutantních buněk v původní kolonii.

3. 2. 10. Ověření respirační deficiencie/suficiencie.

Z ověřovaného kmene byla připravena mírně zakalená suspenze, z níž byla nanášeno po kapce na laktátový agar a YEPG agar. Po několika dnech kultivace při 28°C byl pozorován nárůst jednotlivých kolonií. Ty buňky, které vytvořily kolonii na YEPG agaru, ale nevytvořily kolonii na laktátovém agaru jsou respiračně deficientní.

3. 2. 11. Spektrofotometrické stanovení glukosy.

3. 2. 11. 1. Stanovení glukosy pomocí kitu NOACK.

Vzorek (příprava vzorku viz. kap. 4. 4. 1.) s roztokem glukosy byl podle potřeby naředěn vodou a pokud bylo třeba, byly k projasnění vzorků použity Carrez roztoky a hydroxid sodný:

100 μl vzorku
 700 μl H₂O
 50 μl roztoku Carrez I.
 50 μl roztoku Carrez II.
 100 μl NaOH (100 mM)

Poté byl vzorek zvortexován a zcentrifugován (2 min., 5000 ot./ min.) a byla odebrána horní vodná suspenze, ze které byly připraveny vzorky k měření absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 340 nm. Jako srovnávací vzorek (blank) byla použita voda.

Pipetáž do kyvet o objemu 100 μl:

	slepý vzorek (blank)	vzorek
voda	100 μl	90 μl
vzorek	0 μl	10 μl
roztok 1	5 μl	5 μl
roztok 2	5 μl	5 μl
roztok 3	1 μl	1 μl

Po přidání roztoku 1 a roztoku 2, byl vzorek lehce promíchán a přesně po 3 minutách byla měřena absorbance (A1). Poté byl přidán roztok 3 a opět přesně po 5 minutách byla odečtena absorbance (A2). Byl stanoven rozdíl absorbancí (A2 – A1) pro slepý vzorek a vodu, a odečten rozdíl absorbancí slepého vzorku od rozdílu absorbancí vzorku. Tak byl získán $\Delta A_{\text{glukosy}}$.

Následně byla vypočítána koncentrace glukosy podle:

$$c = 0,6634 \times \Delta A_{\text{glukosy}} \text{ (g/l)}$$

Při výpočtu je nutné počítat s ředěním vzorku během experimentu a výsledek vynásobit koeficientem ředění.

3. 2. 11. 2. Stanovení glukosy pomocí kitu GLU-GOD 250.

Nejprve bylo 5 minut při teplotě 37°C ve tmě inkubováno 400 µl inkubační směsi pro stanovení obsahu glukosy, poté k ní bylo přidáno 200 µl vzorku s glukosou. Roztok byl zvortexován a inkubován 15 minut při teplotě 37°C. Opět ve tmě.

Po 15 minutách byla měřena absorbance vzorku na spektrofotometru při vlnové délce 498 nm.

3. 2. 12. Stanovení ethanolu pomocí kitu NOACK.

Vzorek určený ke stanovení ethanolu byl podle potřeby naředěn, k jeho projasnění byly použity Carrez roztoky a 100 µmol hydroxid sodný (viz. kap. 3. 2. 11. 1.) a následně byl použit k přípravě vzorků k měření absorbance při vlnové délce 340 nm. Jako srovnávací vzorek (blank) byla použita voda.

Pipetáž do kyvet o objemu 2,54 ml:

	slepý vzorek (blank)	vzorek
voda	420 µl	400 µl
vzorek	0 µl	20 µl
roztok 1	40 µl	40 µl
roztok 2	40 µl	40 µl
roztok 3	4 µl	4 µl
roztok 4	4 µl	4 µl

Nejprve byl do kyvety napipetován vzorek s vodou a k němu byl přidán roztok 1 a roztok 2. Vzorek byl lehce promíchán a 3 minuty běžela enzymatická reakce, poté byla na spektrofotometru odečtena první hodnota absorbance (A1), následně byl přidán roztok 3 a roztok 4, a opět se po jemném promíchání nechala běžet enzymatická reakce. Po 5 minutách byla opět na spektrofotometru odečtena druhá hodnota absorbance (A2). Byl stanoven rozdíl absorbancí (A2 – A1) pro slepý vzorek a vzorek, a odečten rozdíl absorbancí slepého vzorku od rozdílu absorbancí vzorku. Tak byl získán $\Delta A_{\text{ethanolu}}$.

Následně byla vypočítána koncentrace ethanolu podle:

$$c = 0,09287 \times \Delta A_{\text{ethanolu}} \text{ (g/l)}$$

Jelikož je ethanol těkavý, tak byly všechny manipulace se vzorky v tomto experimentu prováděny velice opatrně. Reagenční lahvičky byly okamžitě po odebrání požadovaného objemu uzavřeny, z důvodu ochrany vzorků před možnou kontaminací parami ethanolu ze vzduchu. Kyvety byly před každým použitím 3x promyty destilovanou vodou neobsahující ethanol a vysušeny.

Zásobníky s reakčními roztoky byly po celou dobu přípravy vzorků uloženy na ledu.

Další důležitý okamžik při zpracování vzorků bylo jejich míchání. Vzorky nesměly být třepány, ale musely být jemně míchány špičkou k mikropipetám.

Cíle diplomové práce:

1. charakterizace kmene *S. cerevisiae rim15Δ*.
2. detekce respiračního metabolismu v koloniích *S. cerevisiae* pomocí TTC.
3. detekce respiračně deficientních mutant.
4. spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy a ethanolu v pevném médiu po růstu kolonií.

4. Výsledky.

4. 1. Charakterizace kmene *S. cerevisiae rim15Δ*.

První část této kapitoly se převážně zabývá morfologií kvasinkových kolonií rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Porovnává především morfologii kolonií rodičovského kmene BY4742a a kmene *rim15Δ*.

Rim15p protein kináza byla popsána jako stimulátor genové exprese, je vyžadována pro správný vstup do stacionární fáze a pro adaptaci na respirační růst. *Rim15Δ* buňky jsou defektní v akumulaci glykogenu a trehalosy, indukci termotolerance a mají sníženou schopnost sporulace (REINDERS *et al.* 1998).

Gen *RIM15* byl pro experimenty v této práci vybrán na základě jeho funkční interakce s Ccr4-Not komplexem, jehož vliv na morfologii kolonií kvasinek *S. cerevisiae* se sleduje v naší laboratoři a pro jeho předpokládaný vliv na morfologii kvasinkových kolonií.

Kvasinkové kolonie jsou mnohobuněčné útvary, vznikající při růstu kvasinkových buněk na pevném substrátu.

Za standardních podmínek je typ kolonie charakteristický pro daný rod, druh i kmen. Zajímavý je rozdíl mezi koloniemi laboratorních a přírodních druhů. Různé vinařské izoláty kvasinek *S. cerevisiae* tvoří kolonie s charakteristickou strukturovanou morfologií (CAVALIERI *et al.* 2000) na rozdíl od laboratorních kmenů, které tvoří převážně hladké kolonie.

Na druhé straně se však může tvorba kolonií lišit i v rámci kmene samotného v závislosti na různých růstových podmínkách. Například koncentrace agarů v pevném médiu má výrazný vliv na velikost a tvar kvasinkových kolonií. S růstem koncentrace agarů dochází ke zmenšování průměru kolonií, zatímco výška vzrůstá. Kolonie na řidším agaru (1-2%) mají tvar velkých plochých disků, na vyšších koncentracích dochází k jejich zužování a zvyšování (SCHERZ *et al.* 2001).

Tato část práce se zabývá vlivem delece genu *RIM15* na morfologii kvasinkových kolonií v závislosti na zdroji uhlíku, na teplotě a na množství glukosy v porovnání s rodičovským kmenem *S. cerevisiae* BY4742.

4. 1. 1. Ověření delece genu *RIM15*.

Delece genu *RIM15* byla provedena tak, že došlo k nahrazení deletovaného genu genem *KanMX* pro rezistenci ke geneticinu (vlození kanamycinové kazety).

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit nepřítomnost genu *RIM15* v genomu delečního kmene *rim15Δ* pomocí PCR, i když šlo o zakoupenou mutantu, jejíž delece byla podle distributora řádně ověřena a u které neměl být důvod pochybovat o správnosti provedení a ověření delece. PCR byla provedena z genomové DNA izolované z rodičovského kmene BY4742a a mutantního kmene *rim15Δ* různých párovacích typů (*rim15Δa*, *rim15Δa*, *rim15Δdi*) za použití primerů pro gen *RIM15* a programu uvedeného v metodách (viz. kap. 3. 2. 8. 3.)

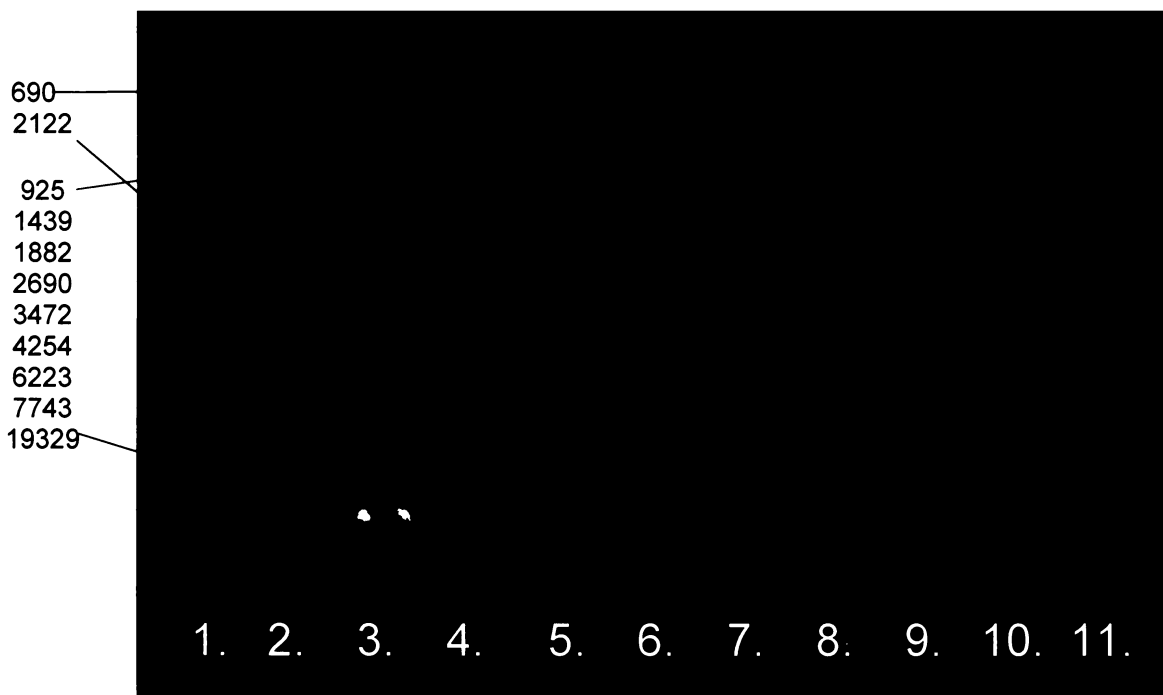
Přítomnost genomové DNA a její způsobilost pro PCR byla ověřena pomocí PCR za použití primerů pro aktinový gen *ACT1* při podmínkách uvedených v metodách (viz. kap. 3. 2. 8. 3.). Jako další kontrola byly použity primery pro gen *CAF40* (obr. 4. 1. 2.), který by deleční kmeny měly mít neporušený. Velikost tohoto PCR produktu je 690 bp.

Pro ověření nepřítomnosti genu *RIM15* byly původně byly použity primery A a B, ale amplifikovaný úsek byl pro PCR příliš dlouhý (2624 pb), takže byl vybrán jiný přímý primer C, a tím se délka amplifikovaného úseku snížila na 2122 pb.

	primery	
<i>RIM15</i>	přímý A	5'- TGTGTCAGGACGCCATAGAT - 3'
	přímý C	5'- CAACAACCAGAAGCCGAGAA - 3'
	reverzní B	5'- GTATCCTCCATTCCATGCAG - 3'
<i>CAF40</i>	přímý	5'- ACGGCGGTAACGATGCTA - 3'
	reverzní	5'- GCTCACGGTCAAGTGCTC - 3'

Při hledání vhodného programu pro amplifikaci hledaného úseku DNA byly postupně měněny teploty a časy pro připojení primerů a časy extenze, až se jako nejvhodnější ukázal program pro amplifikaci genu *RIM15* uvedený v metodách.

Výsledkem tohoto experimentu bylo zjištění, že mutantům všech párovacích typů chybí v jejich chromozomální DNA gen *RIM15*.



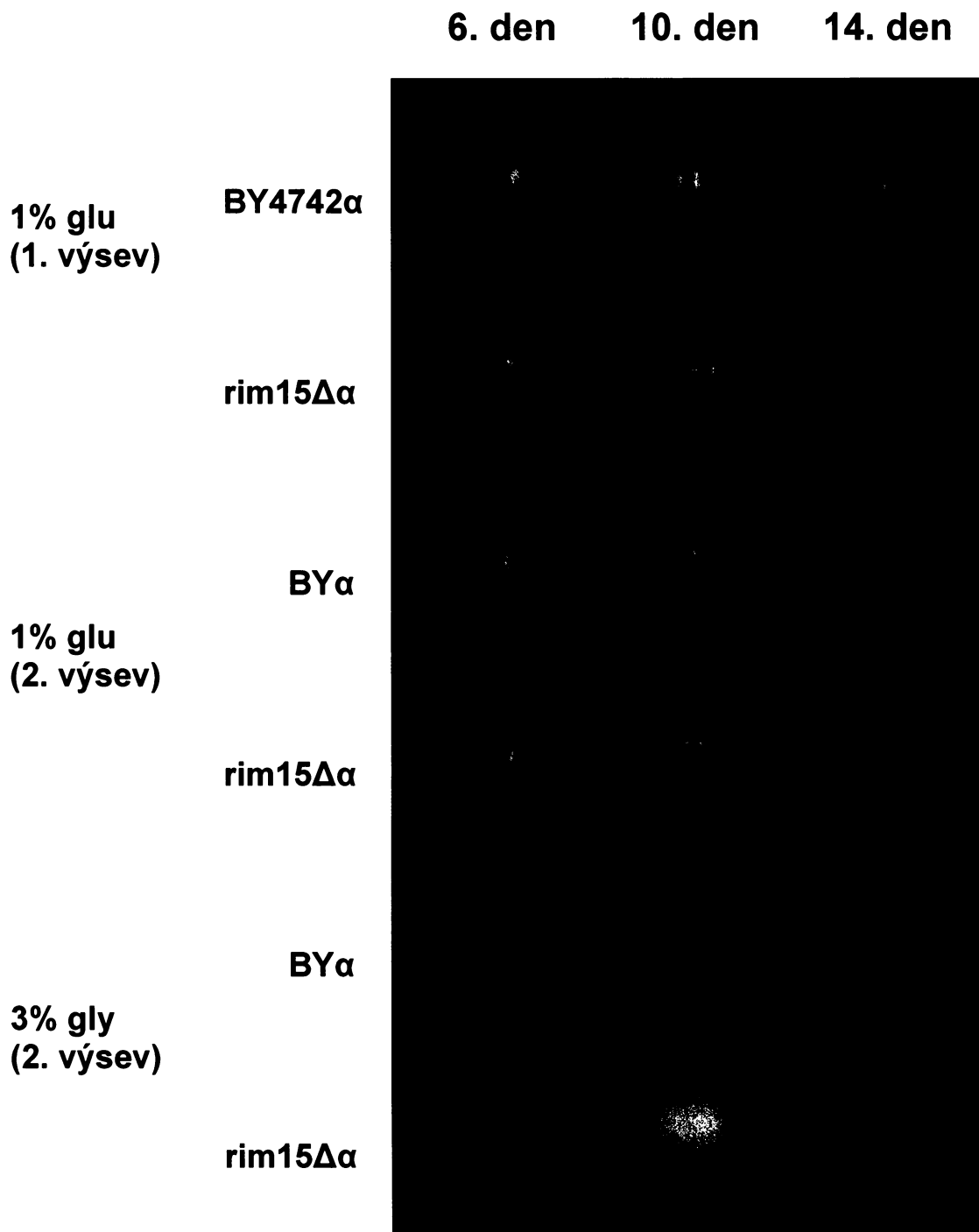
Obr. 4. 1. 1. Kontrola delece genu *RIM15* na elektroforetogramu. 1. BY4742 α + *caf40* primery, 2. BY4742 α + *rim15* primery, 3. Standard molekulových hmotností – λ DNA/ Eco 130I Marker, 4. *rim15* $\Delta\alpha$ + *rim15* primery, 5. *rim15* $\Delta\alpha$ + *caf40* primery, 6. *rim15* $\Delta\alpha$ + *rim15* primery, 7. *rim15* $\Delta\alpha$ + *caf40* primery, 8. *rim15* Δdi + *rim15* primery, 9. *rim15* Δdi + *caf40* primery, 10. BY4742 α + *rim15* primery, 11. BY4742 α + *caf40* primery.

4. 1. 2. Morfologie kolonií kmene *rim15* Δ v závislosti na zdroji uhlíku.

Tento experiment byl prováděn na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) a na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%) při teplotě 28°C a jeho cílem bylo zjištění ovlivnění morfologie kvasinkových kolonií delecí genu *RIM15* při růstu na médiích s různým zdrojem uhlíku – glycerolem nebo glukosou.

Morfologie byla porovnávána u kvasinkových monokolonií, které byly vysety na médium v počtu jen zhruba 40 kolonií na misku, a to z toho důvodu, aby měly kolonie na misce dostatek prostoru k růstu. Misky s koloniemi byly kultivovány v termostatu při teplotě 28°C, a v průběhu času (6., 10. a 14. den) byly fotografovány.

Experiment byl proveden dvakrát (výsev 1. jen na YEPG, výsev 2. na YEPG a GM), a to stejným způsobem jen s různými šaržemi peptonu. Z obrázku 4. 1. 1. je patrné, že výrazněji než mutace, ovlivňují morfologii kolonií složky kultivačního média.

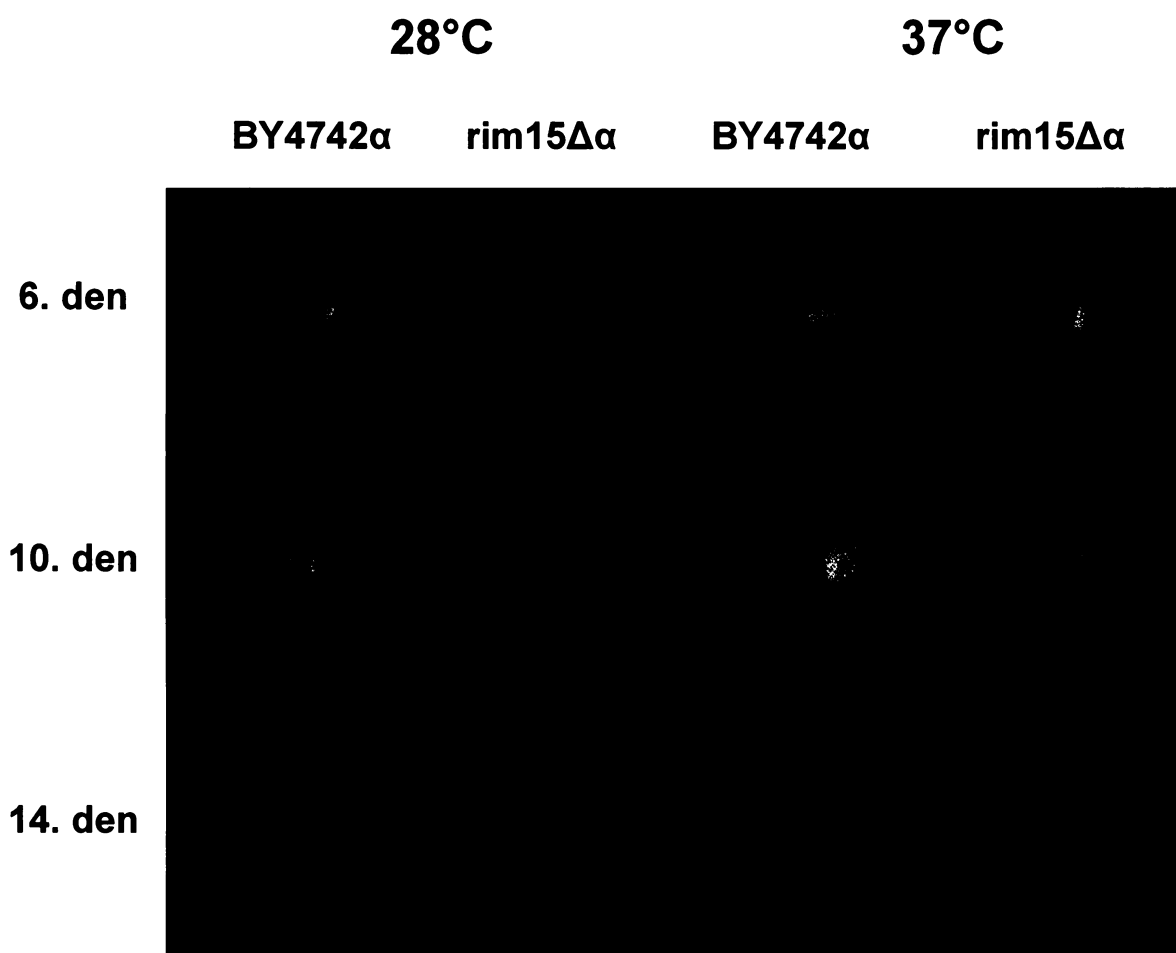


Obr. 4. 1. 1. Morfologie monoklonií rodičovského kmene BY4742 α a kmene *rim15 $\Delta\alpha$* v závislosti na zdroji uhlíku při růstu na YEPG (1%) a GM (3%) médiu při teplotě 28°C.

Výrazný rozdíl v morfologii proti koloniím rostoucím na médiu s glukosou je vidět při porovnání kolonií rostoucích na médiu s glycerolem. Na tomto médiu jsou kolonie hladké, dokonale kulaté, bez jakéhokoli náznaku vytváření sektorů nebo laloků, a to jak u rodičovského kmene BY4742, tak u delečního kmene $\Delta rim15$.

Oproti tomu na médiu s glukosou jsou na koloniích patrné jasné sektory, ovšem se zachováním kruhového tvaru kolonie, a morfologie rodičovského kmene BY4742 i delečního kmene $\Delta rim15$, je opět velice podobná. Co není na obrázcích vidět je rozdíl ve výšce kolonií. Na glukosovém mediu rostou kolonie znatelně více do výšky než kolonie na glycerolovém médiu.

Při porovnání kolonií z 1. a 2. výsevu při růstu na médiu s glukosou, tedy při použití různých šarží peptonu je vidět, že šarže použité při druhém výsevu způsobuje jak u kontrolního kmene BY4742 α , tak u kmene $rim15\Delta\alpha$ ztrátu kruhového tvaru a vznik výraznějších laloků.



Obr. 4. 1. 2. Morfologie monokolonií kmenů BY4742 α a $rim15\Delta\alpha$ v závislosti na teplotě – růst na komplexním médiu s 1% glukosou.

4. 1. 3. Morfologie kolonií kmene *rim15Δ* v závislosti na teplotě.

Tento experiment byl prováděn na pevném komplexním médiu s 1% glukosou (YEPG) při různých teplotách - 28°C a 37°C a jeho cílem bylo zjistit vliv delecí genu *RIM15* na morfologie kvasinkových kolonií rostoucích při různé teplotě.

Morfologie byla porovnávána u kvasinkových monokolonií, které byly vysety na médium opět v počtu zhruba 40 kolonií na misku (viz. kap. 4. 2. 1.). Dvě supiny misek s koloniemi byly kultivovány v termostatech paralelně při teplotách 28°C a 37°C, a v průběhu času (6., 10. a 14. den) byly fotografovány.

Z obrázku 4. 1. 2. je patrné ovlivnění morfologie kolonií teplotou. Kontrolní kmen BY4742α i deleční kmen *rim15Δα* vykazují při růstu při stejné teplotě podobnou morfologii. Kolonie se při růstu při teplotě 37°C částečně podobají koloniím rostoucím na komplexním médiu s glycerolem při teplotě 28°C.

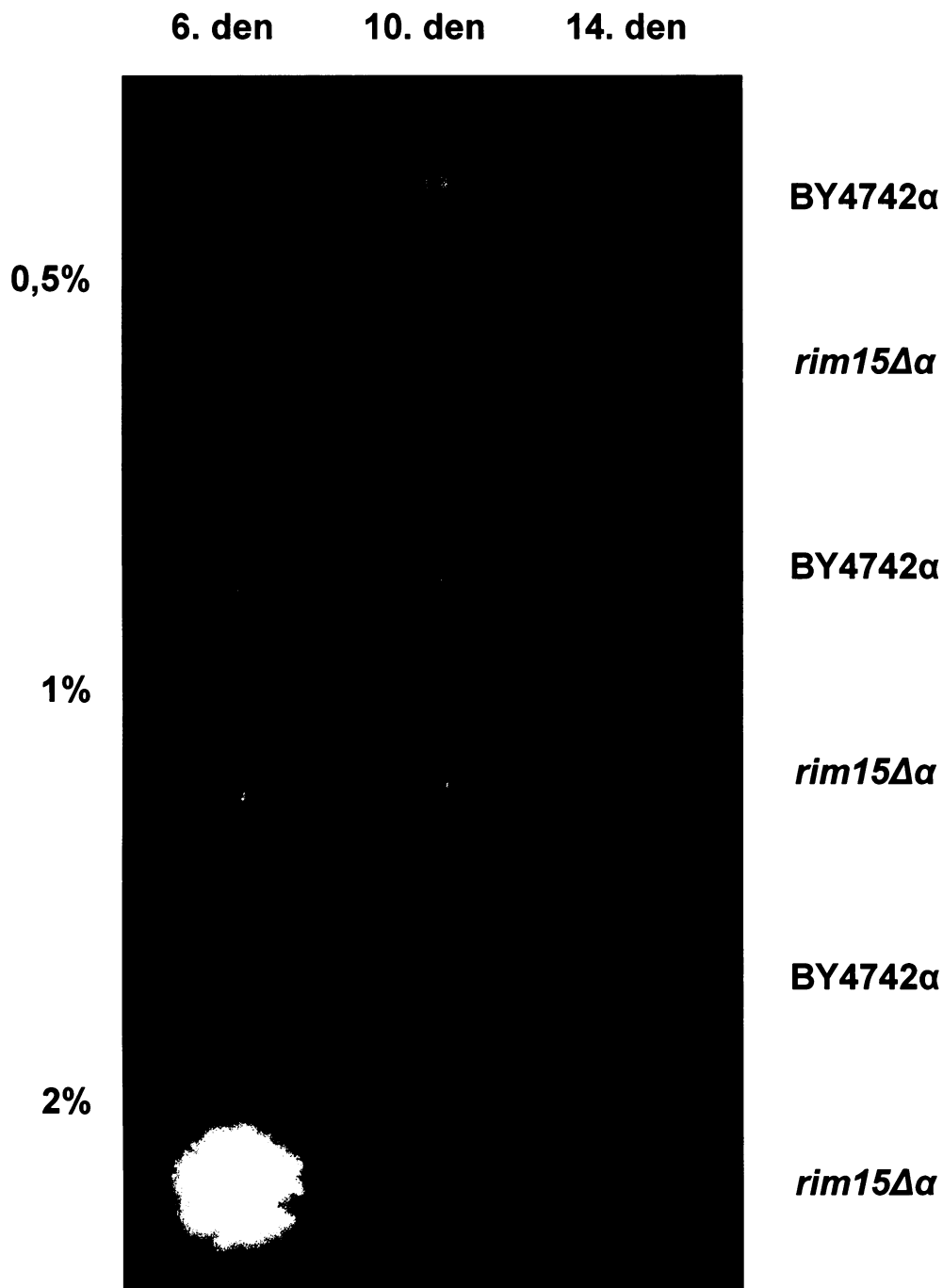
To znamená, že jsou téměř hladké a dokonale kulatého tvaru, a i když jsou zde opět patrné náznaky sektorů, je to zanedbatelné v porovnání s koloniemi rostoucími ve 28°C a vytvářejícími výrazné sektory a nerovný okraj.

Co se týče výšky kolonií, rostou kolonie více do výšky při pěstování ve 28°C než kolonie ze 37°C.

4. 1. 4. Morfologie kolonií kmene *rim15Δ* v závislosti na množství glukosy.

Tento experiment byl prováděn na pevném komplexním médiu s rozdílným obsahem glukosy (YEPG 0,5%, 1%, 2%) při teplotě 28°C a jeho cílem bylo zjištění vlivu delecí genu *RIM15* na morfologii kolonií rostoucích na médiu s různým množstvím glukosy v porovnání s rodičovským kmenem BY4742α.

Morfologie byla porovnávána u kvasinkových monokolonií, které byly vysety na médium v počtu zhruba 40 kolonií na misku (viz. kap. 4. 2. 1.) s podílem glukosy 0,5%, 1% a 2% v pevném komplexním médiu (YEPG). Misky s koloniemi byly kultivovány v termostatu při teplotě 28°C, a v průběhu času (6., 10. a 14. den) byly fotografovány.



Obr. 4. 1. 3. Morfologie monoklonií rodičovského kmene BY4742 α a delečního kmene *rim15* $\Delta\alpha$ v závislosti na množství glukosy při teplotě 28°C.

Z obrázku 4. 1. 3. je jasně patrné ovlivnění morfologie kvasinkové kolonie procentem glukosy v kultivačním médiu, a to tak že s rostoucím procentem glukosy se kolonie stává pravidelnější, s rovňejším okrajem. Při porovnání kolonií rostoucích na 0,5% a 1% médiu s koloniemi rostoucími na 2% médiu, vytvářejí kolonie

v prvním případě výrazné sektory a laloky (nejvíce patrné na 0,5% médiu). Morfologie kolonií delečního kmene *rim15Δa* je ve stejných podmínkách srovnatelná s morfologií rodičovského kmene BY4742a.

4. 1. 5. Alkalizace GM média.

Kolonie kvasinek při růstu na pevném komplexním glycerolovém médiu periodicky okyselují a alkalizují okolní médium. Bylo zjištěno, že alkalizace média je způsobená uvolňováním plynného amoniaku z buněk. Produkce amoniaku a alkalizace média probíhají v pulsech oddělených okyselením média (PALKOVÁ *et al.* 1997).

První puls produkce amoniaku nastává hned po nanesení suspenze buněk (obří kolonie) na médium. Je krátký, slabý a je následován acidifikací média. Oproti tomu druhý puls produkce amoniaku a s tím spojené alkalizace je delší, silnější a orientovaný proti sousední kolonii. Pak následuje opět acidifikace, a poté další amoniakový puls. Amoniak způsobuje zastavení růstu té části kolonie, která je nejbližší k sousední kolonii produkující amoniakový signál. Změny pH spojené s produkcí amoniaku byly pozorovány u mnoha druhů kvasinek z rodů *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* a dalších (PALKOVÁ *et al.* 1997). U různých druhů, různých kmenů a na různých médiích trvají alkalická a acidická fáze různě dlouhou.

Kolonie dokáží na amoniakový signál odpovědět tím, že samy začnou produkovat amoniak a zastaví růst směrem ke zdroji amoniaku (PALKOVÁ a FORSTOVÁ 2000). Tím, že kolonie může být amoniakovým signálem naindukovaná k tvorbě amoniaku, dochází k synchronizaci vývoje kolonií, které rostou v blízkosti u sebe.

Pravděpodobným zdrojem amoniaku jsou deaminační reakce aminokyselin uvnitř buňky, protože amoniakové pulsy jsou závislé na přítomnosti aminokyselin v médiu (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002). Na minimálním médiu, na rozdíl od komplexního média, k žádné produkci amoniaku nedochází a tato produkce může být obnovena přidáním směsi aminokyselin do minimálního média. Různé aminokyseliny mají různý vliv na množství vyprodukovaného amoniaku (ZIKÁNOVÁ *et al.* 2002).

Velmi málo je známo o způsobu, jakým se amoniak dostává z buňky. Může to být pasivní difúzí neprotonovaného amoniaku přes plasmatickou membránu, nebo přenosem buď amoniaku nebo jeho protonované formy – amonného iontu – za účasti nějakého membránového transportéru. Uvažovanými transportéry jsou Ato1-3 proteiny (PALKOVÁ *et al.* 2002).

Není také zcela jasné jak buňky kolonie získávají informaci o přítomnosti amoniaku, ale nejpravděpodobnější je přítomnost cytoplazmatického receptoru uvnitř buňky, který snímá intracelulární koncentraci amoniaku (PALKOVÁ *et al.* 2003) (amoniak může pronikat do buněk difúzí).

4. 1. 5. 1. Chování mutant *rim15Δ* z hlediska alkalizace a acidifikace média.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jaký vliv má delece *rim15Δ* na průběh alkalizace média.

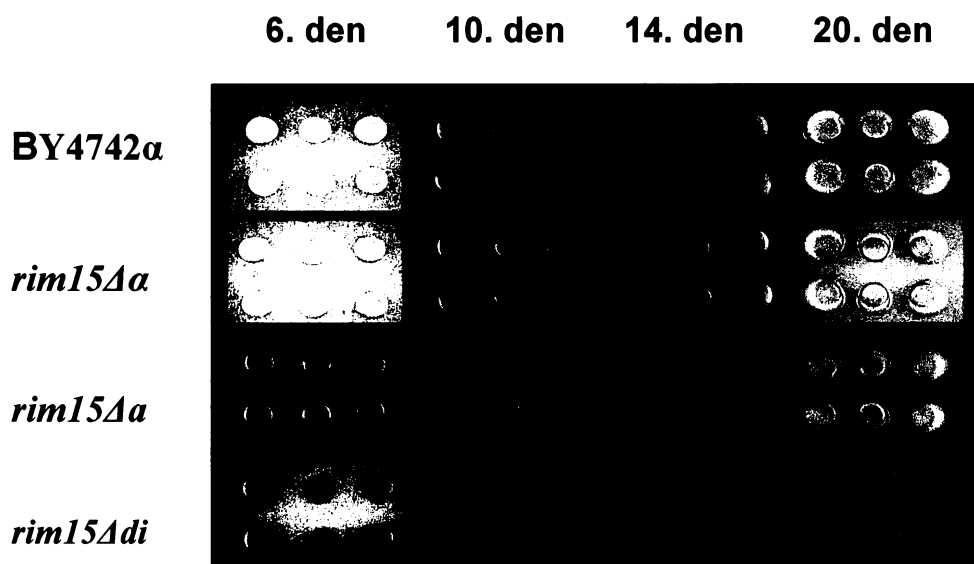
Na pevné komplexní médium s glycerolem (GM) s BKP byly nakapány obří kolonie rodičovského kmene BY4742α a delečních kmenů *rim15Δa*, *rim15Δa*, *rim15Δdi*. Kolonie byly uspořádány v šestcích nebo ve dvojicích, přičemž mezi středy sousedních kolonií bylo vždy rozmezí 2 cm. Misky s koloniemi byly po celý čas růstu inkubovány v termostatu při 28°C.

Kolonie byly sledovány během vývoje v čase s ohledem na alkalizaci a acidifikaci média a fotografováním zdokumentovány. Změny pH média byly zviditelněny pH indikátorem bromkresolovou modří (BKP), která je fialová při pH vyšším než 6,8 a žlutá při pH nižším než 5,2 .

První puls produkce amoniaku byl pozorován pouze u rodičovského kmene BY4742α a delečního kmene *rim15Δa*.

Druhá silnější alkalická fáze nastala u všech testovaných kmenů, ale s různou intenzitou (obr. 4. 1. 5.). Alkalizace média rodičovským kmenem nastala 10. den a maxima dosáhla kolem 14. dne, poté začala klesat až nebylo fialové zbarvení vidět (nastoupila acidická fáze). Deleční kmen *rim15Δa* začal alkalizovat médium 11. den, ale alkalizace byla slabší než u rodičovského kmene. Odeznění alkalizace nastalo po 20. dni, tedy ve stejný čas jako u rodičovského kmene. Kmeny *rim15Δa* a *rim15Δdi* alkalizovaly také, ale jen velice krátce a výrazně slaběji než rodičovský kmen.

Obdobný průběh měla alkalizace u dvojic obřích kolonií. Nástup alkalizace byl ale později než u šestic. Alkalizace média rodičovským kmenem nastala v tomto případě 12. den, delečným kmenem *rim15Δa* 13. den a deleční kmeny *rim15Δa* a *rim15Δdi* začaly alkalizovat médium jen krátce a slabě až kolem 15. dne.



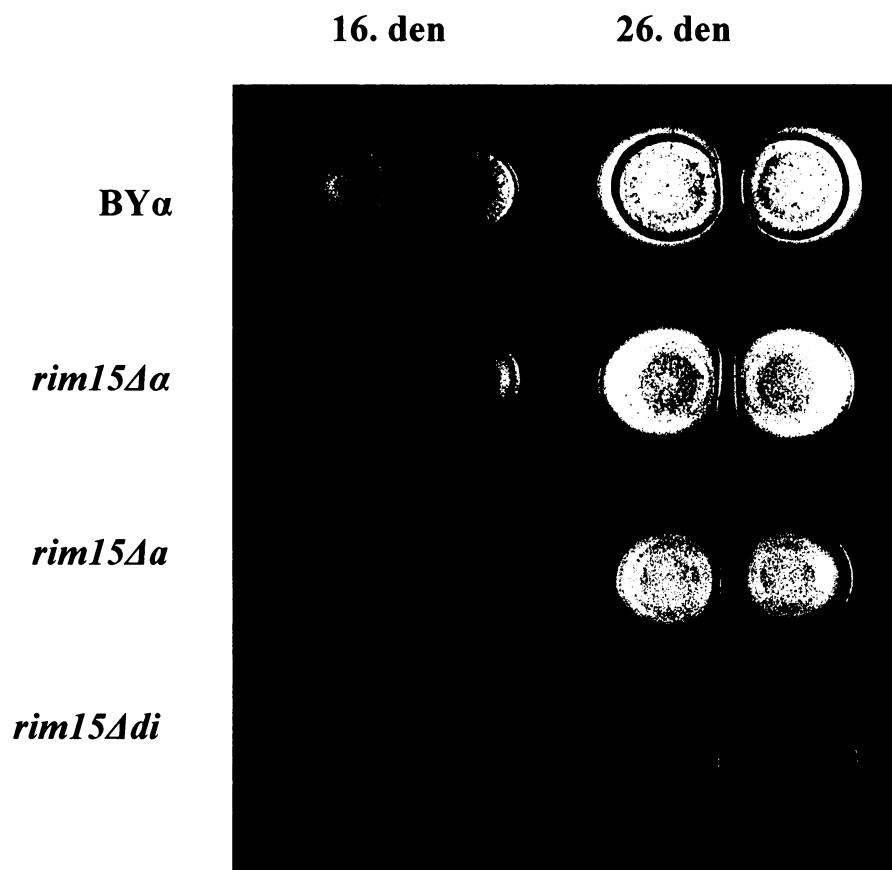
Obr. 4. 1. 5. Vývoj šestic obřích kolonií delečních kmenů *rim15Δa*, *rim15Δa*, *rim15Δdi* a rodičovského kmene BY4742α na GM médiu s BKP od 6. do 20. dne. Fialová barva pH indikátoru je způsobena alkalizací média, žlutá acidifikací.

4. 1. 4. 2. Rozdíly ve zbarvení kolonií deletantů *rim15Δ*.

Na pevném komplexním médiu s glycerolem a s BKP byly zjištěny rozdíly ve zbarvení kolonií u deletantů různých párovacích typů (obr. 4. 1. 6.).

Jako první se začaly hned po několika dnech růstu lišit kolonie delečního kmene *rim15Δdi*. Po celý čas růstu se vyznačovaly fialovým zbarvením na spodu kolonie (i v acidické fázi) a na povrchu byly barevně prstencovitě strukturované se žlutým středem a tmavě fialovým okrajem.

Kmen *rim15Δa* se vyznačoval téměř po celou dobu trvání alkalické fáze přítomností malých tmavě zbarvených sektorů, kmen *rim15Δa* měl žlutě zbarvený střed a bílý okraj a rodičovský kmen BY4742α sice nebyl barevně strukturován, ale zhruba kolem 18. dne se na jeho koloniích začal vytvářet tmavý prsteneček.



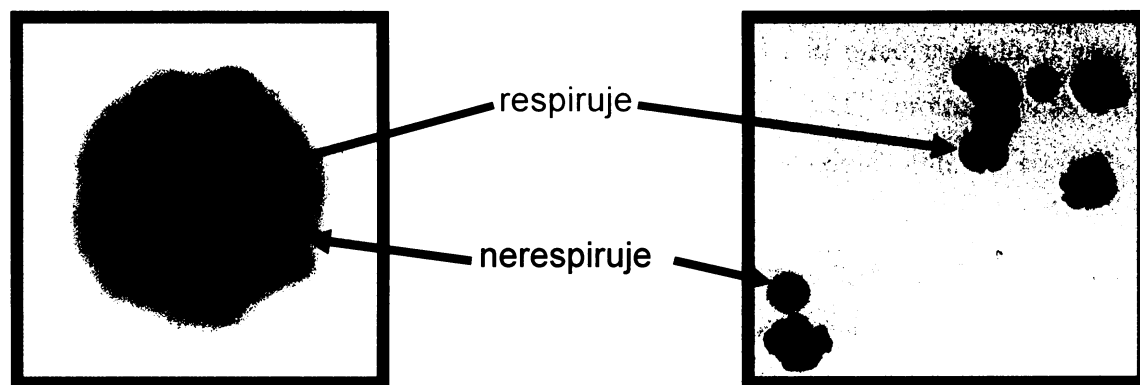
Obr. 4. 1. 6. Detail 16-ti a 26-ti denních obřích kolonií delečních kmenů *rim15 $\Delta\alpha$* , *rim15 Δa* , *rim15 Δdi* a rodičovského kmene BY4742 α na GM médiu s BKP. Vliv párovacího typu na morfologii.

4. 2. Detekce respiračního metabolismu v koloniích *S. cerevisiae* pomocí TTC.

Tato kapitola se převážně zabývá detekcí respiračního metabolismu v koloniích rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY a deletantů v genech *CCR4*, *CAF40* a *RIM15* pomocí TTC (2, 3, 5 – trifenyltetrazolium chlorid). TTC je při fungujícím respiračním řetězci redukován dehydrogenázami na červený formazán a umožňuje zjištění funkčnosti respiračního řetězce (OGUR *et al.* 1957, RICH *et al.* 2001) (obr. 4. 2. 1.).

Deleční kmeny *caf40Δ* a *ccr4Δ* byly pro tento experiment vybrány, jelikož jsou součástí Ccr4-NOT komplexu, jehož vliv na chování kolonií se studuje v naší laboratoři. Ccr4-NOT komplex působí jako regulátor genové exprese, ovlivňuje průběh buněčného cyklu, degradaci RNA a odpověď na stres. Komplex existuje *in vivo* ve dvou formách o různé velikosti: 1,0 a 1,9 MDa. Menší základní komplex je tvořen devíti podjednotkami: Ccr4p, Caf1p, pěti Not proteiny (Not1p – Not5p), Caf40p, Caf130p, z nichž většina byla popsána samostatně, a až později se zjistilo, že tvoří komplex (COLLART 2003). Lokalizace všech proteinů byla potvrzena v jádře i v cytoplasmě (DENIS *et al.* 2003).

Gen *CCR4* (Carbon Catabolite Repression) byl identifikován při hledání regulátorů exprese *ADH2* (Denis, 1984). Alkohol dehydrogenáza 2 umožňuje kvasinkám využít ethanol jako zdroj energie a uhlíku. Její syntéza je reprimována přítomností glukosy. K regulaci dochází na transkripční úrovni. Caf40p (Ccr4 Associated Factor) byl identifikován spektrometrickou analýzou teprve nedávno (CHEN *et al.* 2001).



Obr. 4. 2. 1. Červený formazán detekující kolonie nebo oblasti kolonií s respiračním metabolismem.

4. 2. 1. Faktory ovlivňující barvení kolonií pomocí TTC.

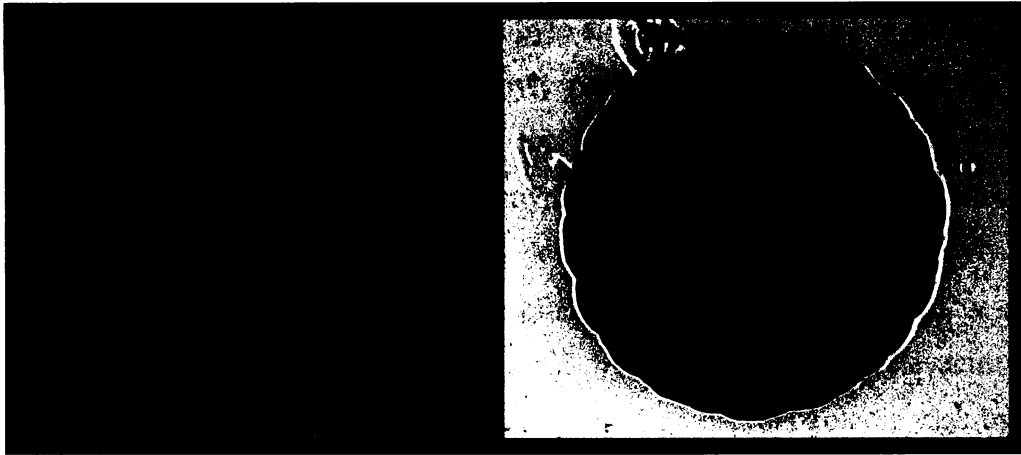
Barvení kolonií kvasinek se děje přelitím kolonií TTC agarem smíchaným s TTC pufrem (OGUR et al. 1957). TTC agar musí být před smícháním zchlazen minimálně na teplotu kolem 50°C, protože jinak se TTC při smíchání s horkým agarem spontánně redukuje na červený formazán ještě před nalitím na kolonie (BOCHNER a SAVEGEAU 1976).

Ke správné funkci metody byla kritická pufrací kapacita použitého pufru, proto bylo ke každému barvení vždy nutné používat relativně čerstvý TTC pufr, ne starší než měsíc, jinak nedocházelo k redukci TTC na červený formazán.

V tomto experimentu byl zjišťován vliv jednotlivých složek TTC přelévacího agaru (TTC, agaru a glukosy) na obarvení kolonií. Nejdříve byl sledován vliv koncentrace TTC na obarvení. K experimentu byla použita 10 dní stará dvojice obřích kolonií delečního kmene *rimΔa*, přičemž jedna obří kolonie byla barvena TTC přelévacím agarem s 0,1% TTC a druhá obří kolonie byla barvena TTC přelévacím agarem s 1% TTC. Obě kolonie byly vyfotografovány po 60-ti minutách barvení a byla pozorována závislost sytosti červeného obarvení kolonií na koncentraci TTC v přelévacím agaru. Se zvyšující se koncentrací TTC při stejném čase barvení byla sytější červená barva sledována u kolonie s vyšší koncentrací TTC (obr. 4. 2. 2.), ta ale neumožnila sledovat případné jemnější rozdíly v zabarvení různých sektorů. Proto byla v těchto experimentech používána 0,1% koncentrace TTC a dodržován byl čas barvení 60 minut.

V případě starších kolonií, například 24 dní starých šestic kolonií delečního kmene *ccr4Δa*, však nestačila k dostatečnému obarvení kolonií a obarvení sektorů jen 1 hodina barvení, ale až téměř 8 hodin (obr. 4. 2. 3.). U mladých kolonií však nesměl být překročen ani čas barvení ani koncentrace TTC, protože v těchto případech došlo k přebarvení kolonií a detaily na struktuře kolonií se staly nerozeznatelné.

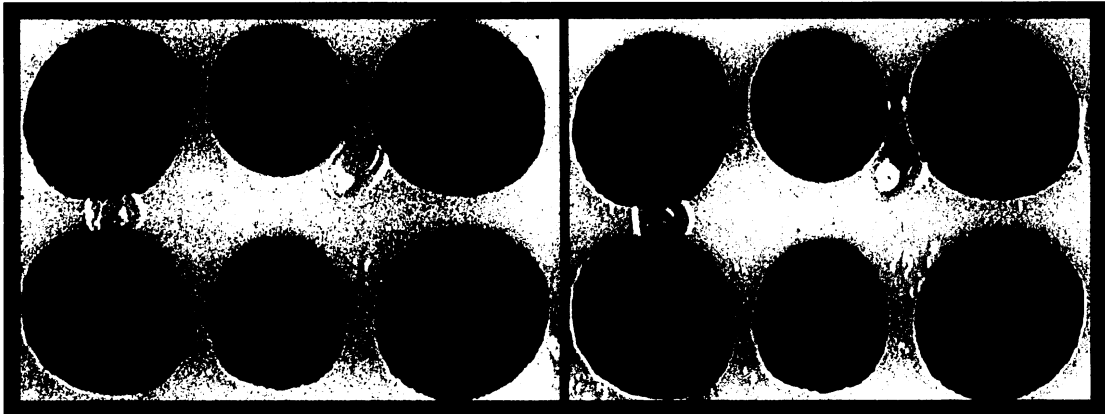
Zkoušelo se také barvení kolonií pouze TTC pufrem s 0,1% TTC bez přidání agaru. V tomto případě sice docházelo k redukci TTC na červený formazán, ovšem vzhledem ke konzistenci kvasinkových kolonií a jejich přelití TTC bez pevného nosiče (agaru) došlo k vymývání kolonií (obr. 4. 2. 4.)



a)

b)

Obr. 4. 2. 2. Závislost obarvení TTC na koncentraci TTC (60 minut): a) 0,1% TTC, b) 1% TTC.



a)

b)

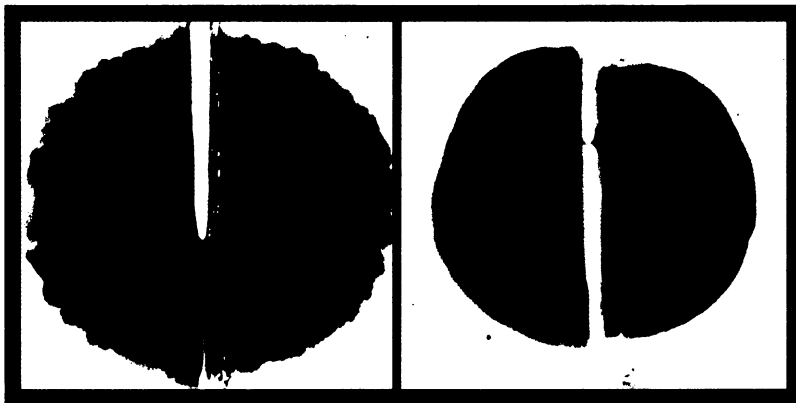
Obr. 4. 2. 3. Závislost obarvení TTC na čase (0,1% TTC): a) 1 hodina, b) 8 hodin.



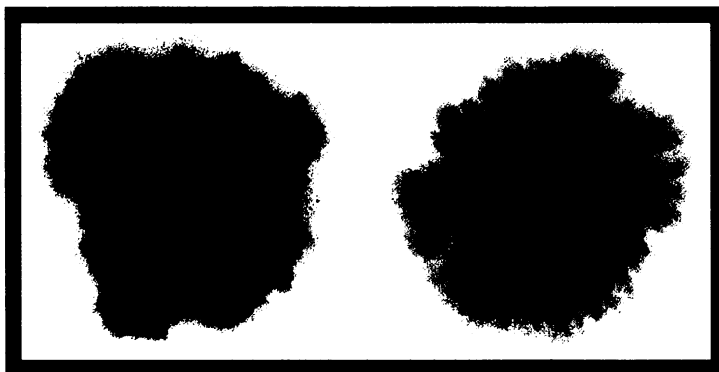
Obr. 4. 2. 4. Barvení obří kolonie TTC pufrem.

Dalším předmětem experimentu bylo sledování vlivu glukosy přidané do TTC přelévacího agaru. V tomto případě byly použity 8 dní staré obří kolonie různých kmenů. Miska byla přesně v polovině obří kolonie přeříznuta podložním sklíčkem, a každá polovina misky byla přelita různým TTC přelévacím agarem (0,1%TTC). Do jedné poloviny byla přidána glukosa, do druhé nikoli. Obě poloviny byly barveny standardních 60 minut a bylo pozorováno jasnější probarvení detailů ve struktuře kolonie u poloviny obří kolonie, která byla přelita TTC přelévacím agarem s přidáním glukosy (obr. 4. 2. 5.). Celkový obraz probarvení kolonie však byl v obou případech shodný.

Pokud jsou při barvení TTC dodržovány stále stejné podmínky, je možno tuto metodu použít k porovnání respiračního metabolismu také mezi různými stejně starými koloniemi stejného kmene. Na obrázku obr. 4. 2. 6. jsou vidět různě respirující monokolonie rodičovského kmene BY4742 α stejného stáří rostoucí vedle sebe na stejném médiu.



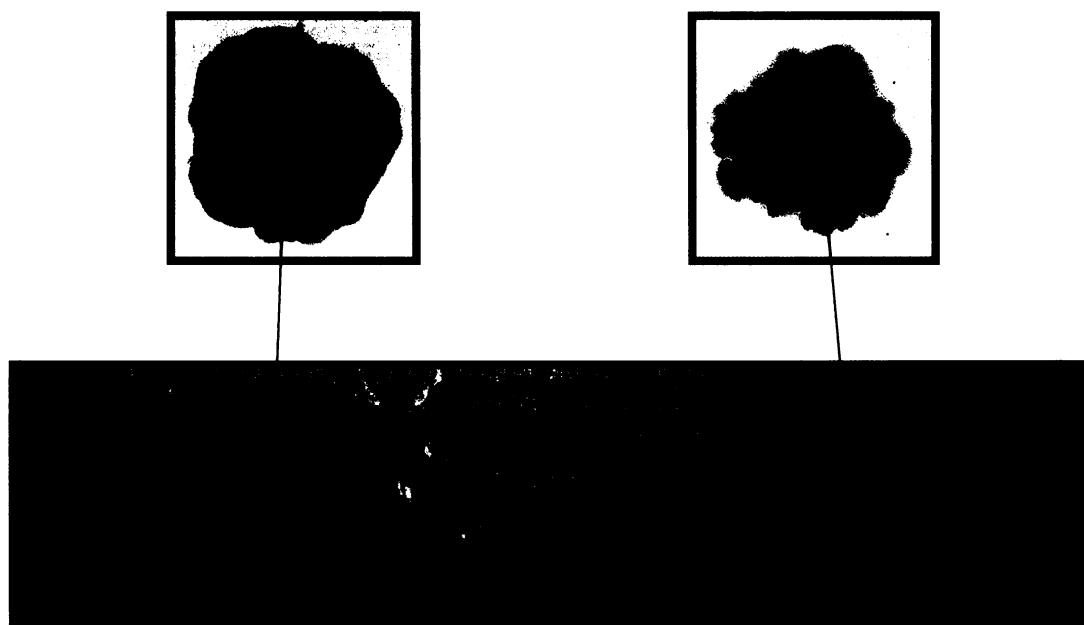
Obr. 4. 2. 5. Barvení kolonií TTC agarem s přidáním glukosy (pravé strany kolonií) a bez přidání glukosy (levé strany kolonií).



Obr. 4. 2. 6. Různé obarvení stejně starých monokolonií stejného kmene.

4. 2. 2. Řezy kolonií.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda lze po obarvení kolonií hodnotit respirační stav uvnitř kolonie, tedy zjistit, jestli TTC barvení umožňuje barvení jen povrchové vrstvy kolonie nebo je kolonie obarvena v celém průřezu. Byly použity 6 dní staré monokolonie rodičovského kmene BY4742 přelité TTC agarem s 0,1% TTC. Po 60-ti minutách barvení byly monokolonie zalité do agarů rozříznuty velice ostrým skalpelem na poloviny jedním rychlým řezem, aby bylo docíleno rovného povrchu řezu, což je důležité pro fotografování pod zvětšením. Jak je patrné na obr. 4. 2. 7., TTC obarvil kolonii jen do určité hloubky.



Obr. 4. 2. 7. Řezy monokolonií (rodičovský kmen BY4742 v 6. dni růstu) po barvení TTC.

4. 2. 3. Barvení řezů kolonií.

Tento experiment byl proveden na základě výsledků experimentu popsaného v kap. 4. 2. 2. a jeho cílem bylo zjistit, zda to, že se kolonie barví pouze na povrchu, je způsobeno tím, že TTC není schopno proniknout do podpovrchových vrstev nebo zda je příčinou rozdílný respirační metabolismus v různých vrstvách kolonie.

Bylo tedy provedeno barvení řezů 6 dní starých monokolonií rodičovského kmene BY4742 α a delečního kmene *caf40* $\Delta\alpha$. Nejprve byly monokolonie přelity 2%

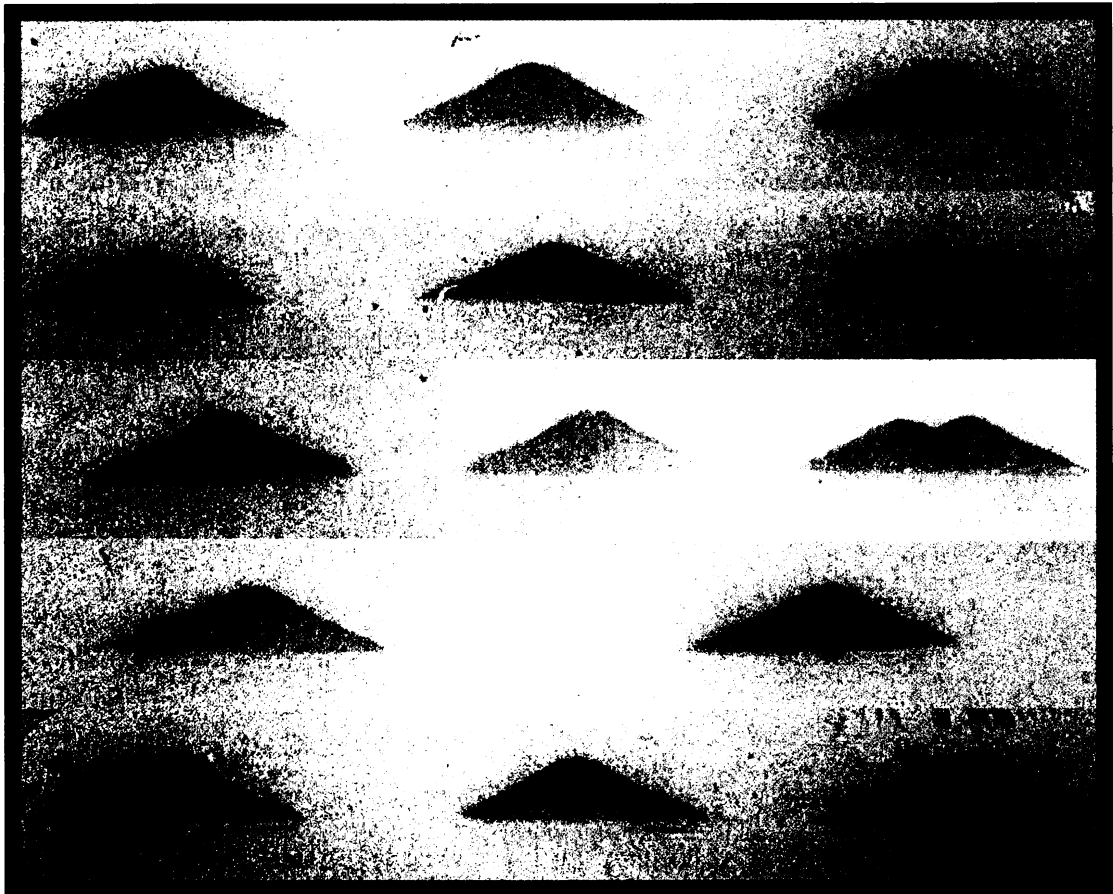
agarem (bez TTC) a po jeho ztuhnutí byly pomocí velice ostrého skalpelu vyrobeny řezy kolonií, které byly posléze umístěny na prázdnou misku řezem nahoru. Poté byla celá miska i spolu s řezy zalita TTC přelévacím agarem (0,1% TTC). Po hodině byly obarvené řezy kolonií fotograficky zdokumentovány (obr. 4. 2. 8., obr. 4. 2. 9.) a bylo pozorováno, že řezy kolonií se sice barví v celém jejich průřezu, ale slaběji než při barvení shora. V některých případech je vidět sytější obarvení povrchu kolonií a slabší obarvení dolní části kolonií.

4. 2. 4. Respirační metabolismus monokolonií různých kmenů *S. cerevisiae* rostoucích na médiu s glukosou.

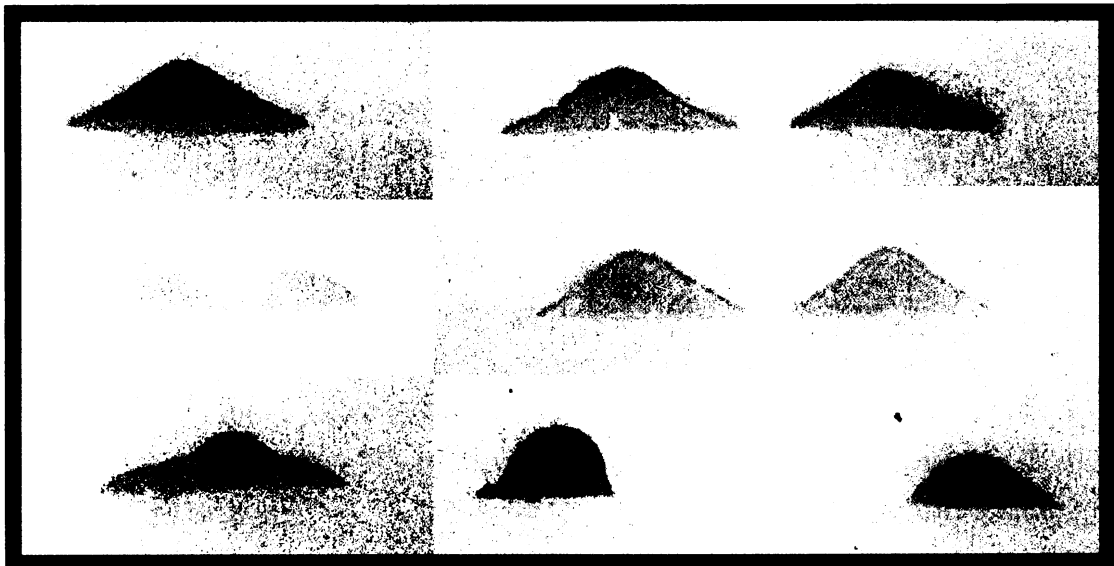
Pro tento experiment byly vysety monokolonie různých párovacích typů rodičovského kmene (BY4741a, BY4742a) a monokolonie různých párovacích typů delečních kmenů (*ccr4Δa*, *ccr4Δa*, *caf40Δa*, *caf40Δa*, *rim15Δa*, *rim15Δa*) na pevné komplexní médium s glukosou (YEPG 1%), v různých dnech byly barveny TTC po dobu 60-ti minut a fotografovány.

Monokolonie byly vysety jen v počtu asi 20 kolonií na misku, a to z toho důvodu, aby kolem sebe každá kolonie měla dostatek prostoru a nebyla ovlivňována ostatními. Hustší vysetí kolonií mělo vliv na respirační metabolismus, a tedy na TTC barvení. V části misky s vyšší hustotou kolonií se kolonie barvily méně než kolonie, které měly okolo sebe při růstu dostatek prostoru.

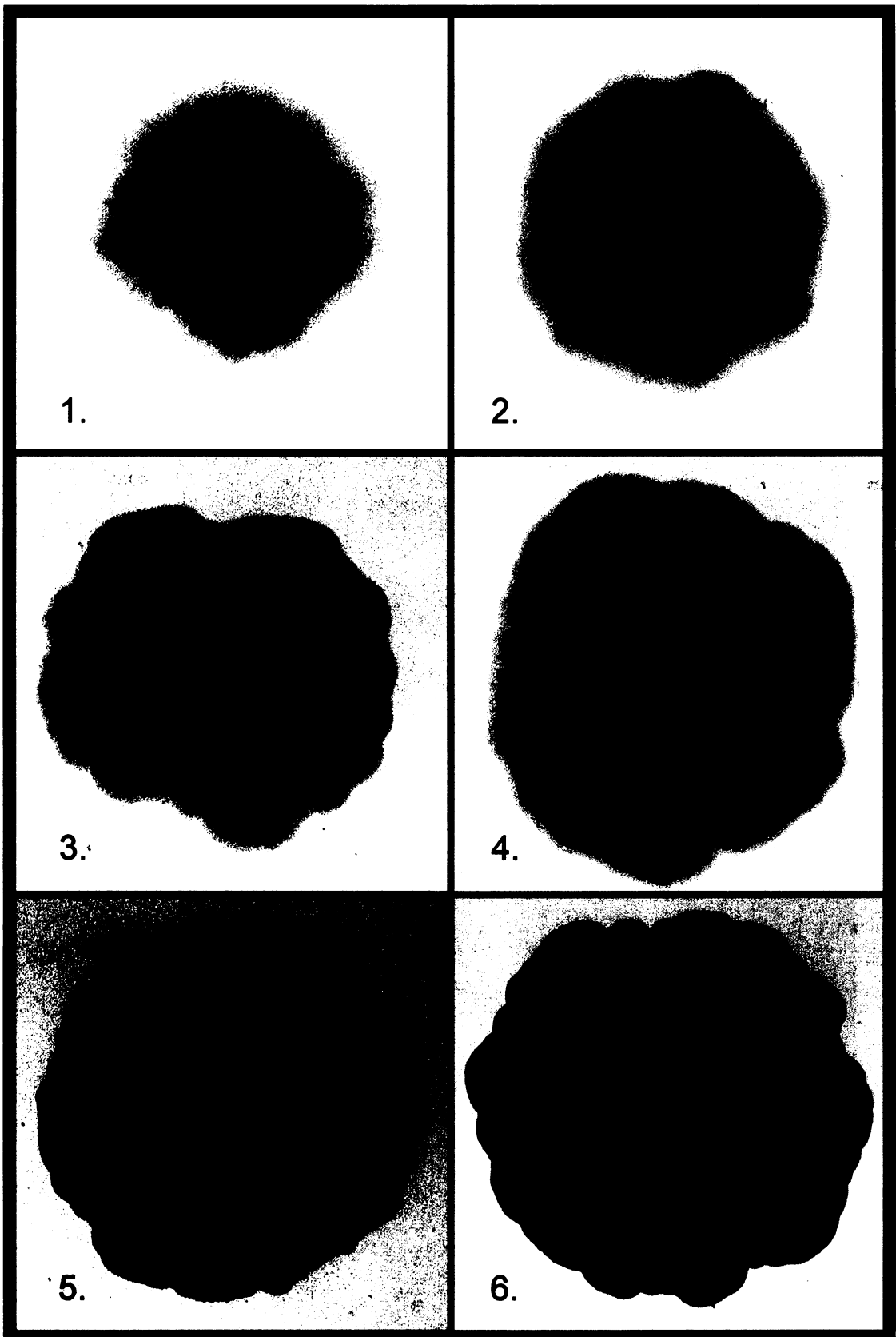
Cílem pokusu bylo zjištění vývoje respiračního metabolismu v čase, rozdílů respiračního metabolismu mezi rodičovským kmenem BY a delečními kmeny a dále mezi jednotlivými párovacími typy. Na obr. 4. 2. 10. je ukázán průběh barvení většiny monokolonií v čase. Velice mladé, pouze několikadenní monokolonie, se barví nejprve od středu monokolonie v oddělených sektorech, kdežto okraje kolonie se nebarví. Sektory se postupem času, se stárnutím monokolonie, spojují, až je červeně obarvena celá monokolonie s výjimkou jejího okraje. S dalším stárnutím se kolonie obarvuje po celém jejím povrchu včetně okrajů, ale snižuje se sytost obarvení. V poslední fázi, u hodně starých monokolonií (21 dní), se už monokolonie nebarví kromě jejich okraje, ve kterém ještě probíhá respirační metabolismus.



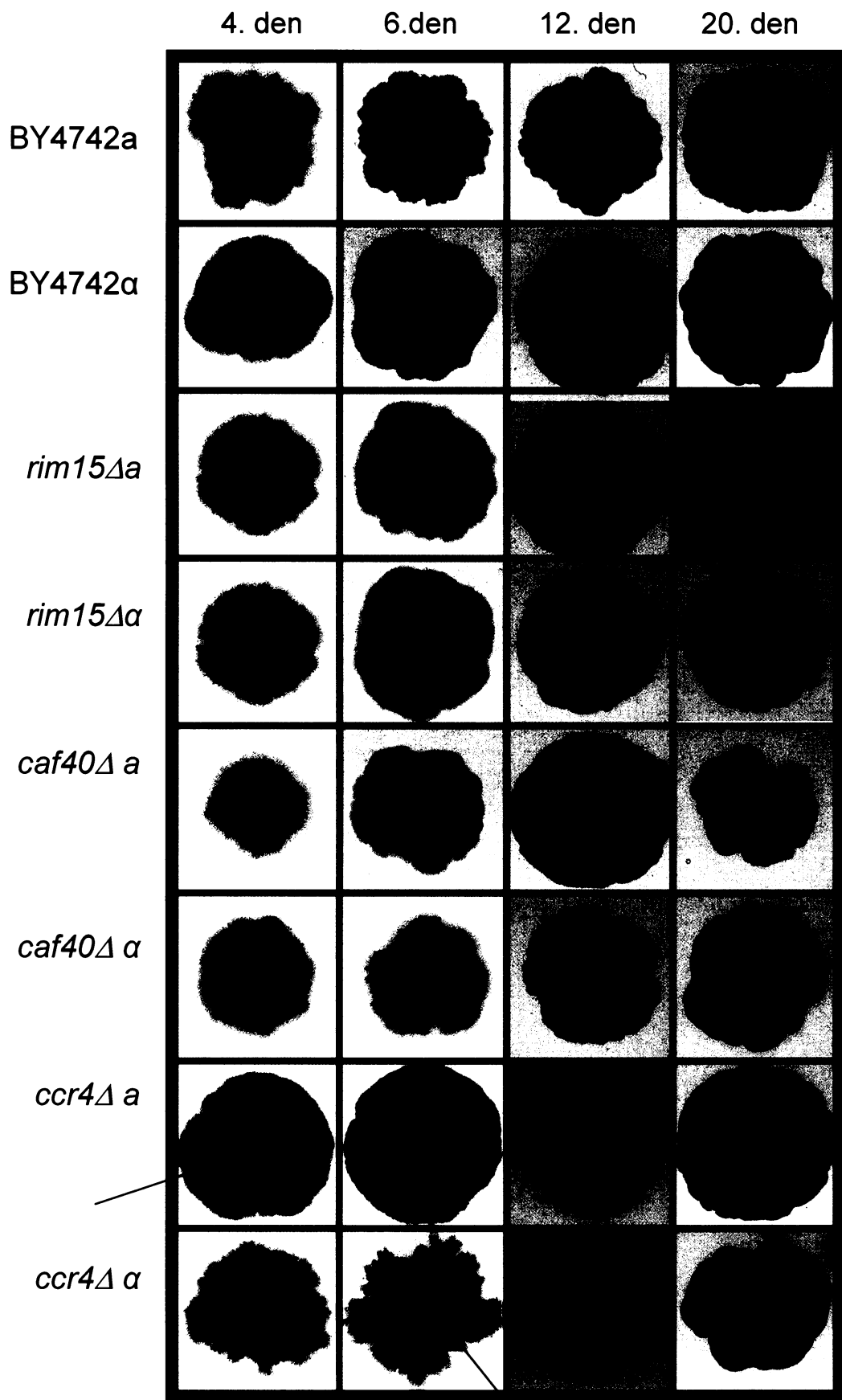
Obr. 4. 2. 8. Barvení řezů kolonií TTC (6 dní staré monokolonie BY4742 α).



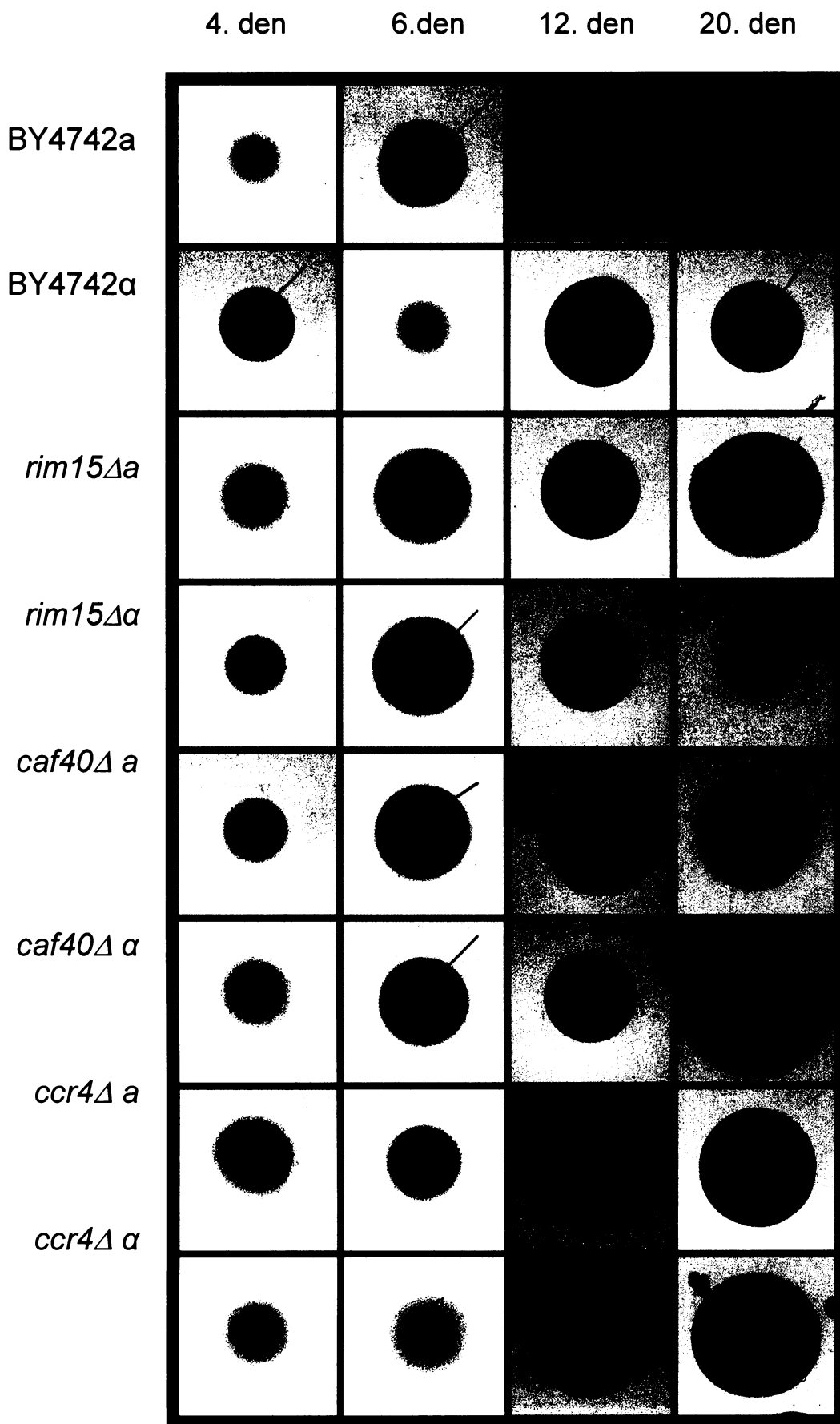
Obr. 4. 2. 9. Barvení řezů kolonií TTC (6 dní staré monokolonie *caf40 $\Delta\alpha$*).



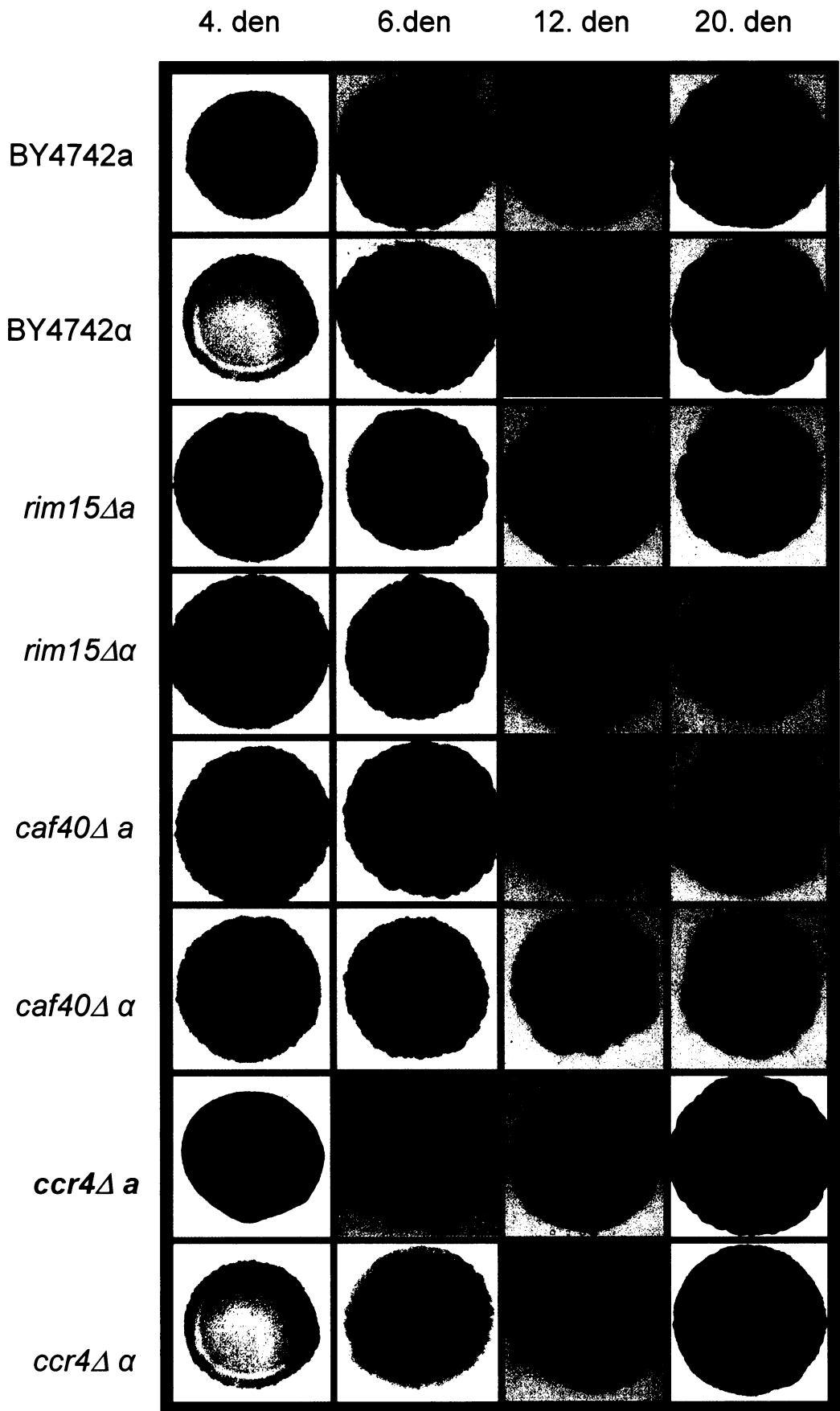
Obr. 4. 2. 10. Obarvení kolonií TTC v závislosti na stáří kolonií. Průběh barvení od 4. do 20. dne.



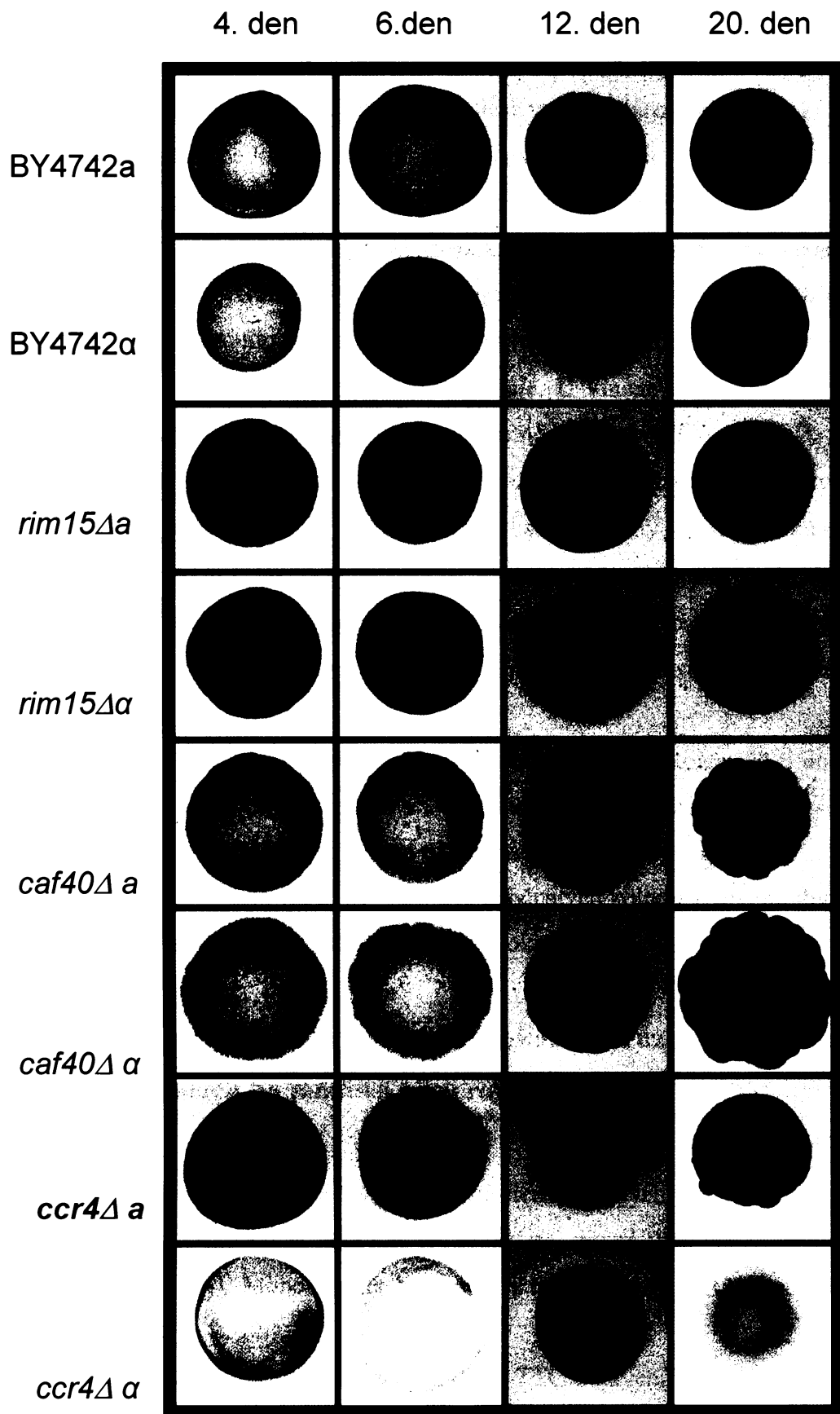
Obr. 4. 2. 11. Barvení monokoloníí rostoucích na komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) pomocí TTC. Kolonie byly barveny 60 minut.



Obr. 4. 2. 12. Barvení monoklonií rostoucích na komplexním médiu s glycerolem (GM 3%) pomocí TTC. Kolonie byly barveny 60 minut.



Obr. 4. 2. 13. Barvení obřích koloniř rostouřich na komplexnřm mřdiu s glukosou (YEPG 1%) pomocř TTC. Kolonie byly barveny 60 minut.



Obr. 4. 2. 14. Barvení obřích kolonií rostoučích na komplexním médiu s glycerolem (GM 3%) pomocí TTC. Kolonie byly barveny 60 minut.

Z obrázku 4. 2. 11. jsou patrné poměrně malé rozdíly mezi pokusnými kmeny mezi různými párovacími typy. Výjimku ovšem tvořil deleční kmen *ccrΔ*, jenž se lišil nejen od ostatních zkoumaných kmenů, ale i v rámci párovacích typů kmene. Zatímco *ccr4Δa* se podobal ostatním zkoumaným kmenům, tak *ccr4Δa* se od ostatních kmenů velice lišil. Tento kmen se již v prvních dnech růstu barvil po celém povrchu monokolonie, a to paprscitě až k okraji kolonie, zatímco u ostatních kmenů se zpočátku vytvářely pouze malé červeně obarvené respirující ostrůvky, které se s růstem a stárnutím kolonií postupně slévaly, až byl kolem 6. dne obarven téměř celý povrch monokolonie s výjimkou okraje. U kmene *ccr4Δa* byl 6. den rovnoměrně obarven celý povrch monokolonie včetně jejích okrajů.

Rozdíl mezi tímto kmenem a ostatními pozorovanými kmeny je i v sytosti obarvení. Kmen *ccr4Δa* respiruje intenzivněji než ostatní kmeny již od počátku růstu monokolonií, a respiruje také mnohem déle. Zatímco ostatní kmeny měly vrchol v obarvení TTC mezi 6. a 12. dnem, tak *ccr4Δa* s intenzivněji barvil už v prvních dnech a intenzivně respiroval i 16. den, kdy už respirační schopnost ostatních kmenů klesala.

Při porovnání respirační schopnosti velmi starých kolonií (kolem 20-ti dní) se jednotlivé zkoumané kmeny ani párovací typy nelišily. Staré monokolonie se už téměř nebarvily a byly schopné respirovat už jen na jejich okrajích.

Z obr. 4. 2. 11. je také vidět, že v případě laločnatých kolonií zbarvení obvykle zasahuje do vybíhajících laloků (někdy až k jejich okrajům).

4. 2. 5. Respirační metabolismus monokolonií různých kmenů *S. cerevisiae* rostoucích na médiu s glycerolem.

Pro tento experiment byly vysety monokolonie stejných kmenů a stejným způsobem jako v kap. 4. 2. 4., ale tentokrát na pevné komplexní médium s glycerolem (GM 3%). Monokolonie byly opět v čase barveny TTC, a poté opět fotografovány (obr. 4. 2. 12.).

V tomto případě byly pozorovány rozdíly v TTC obarvení mezi jednotlivými kmeny. Všechny kmeny se ale na tomto médiu (GM 3%) barví mnohem méně intenzivně než kolonie na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%).

U rodičovského kmene BY byly v prvních dnech růstu a po obarvení TTC na koloniích pozorovány prstence různě sytých odstínů červené barvy, tedy zřejmě různě intenzivně respirující oblasti. Se stárnutím kolonií tyto prstence zmizely, až se kolonie nebarvily téměř vůbec kromě malých červených skvrnek na středu kolonií.

Stejně obarvení jako rodičovský kmen BY měl deleční kmen *rim15Δ*. Kolonie delečního kmene *caf40Δ* měly v počátečních dnech stejný průběh barvení jako rodičovský kmen BY, tvořily také různě sytě červené prstence, které se se stárnutím kolonií postupně ztratily. Staré kolonie tohoto kmene se nebarvily téměř vůbec a v porovnání s rodičovským kmenem netvořily na svém povrchu malé červené respirující oblasti. Největší rozdíly byly pozorovány u delečního kmene *ccr4Δ*, jehož kolonie nevytvářely při barvení TTC žádné různě barevné prstence ani skvrny. U tohoto kmene byly pozorovány i rozdíly mezi párovacími typy na rozdíl od ostatních použitých kmenů. Deleční kmen párovacího typu *ccr4Δa* se v porovnání s delečním kmenem párovacího kmene *ccr4Δa* barví mnohem výrazněji, a to nejvíce kolem 12. dne stáří monokolonií.

4. 2. 6. Respirační metabolismus obřích kolonií různých kmenů *S. cerevisiae* rostoucích na médiu s glukosou.

Pro tento experiment byly vysety jednotlivé obří kolonie různých párovacích typů rodičovského kmene (BY4741a, BY4742a) a jednotlivé obří kolonie různých párovacích typů delečních kmenů (*ccr4Δa*, *ccr4Δa*, *caf40Δa*, *caf40Δa*, *rim15Δa*, *rim15Δa*) na pevné komplexní médium s glukosou (YEPG 1%). Tyto kolonie byly ve vybraných dnech barveny TTC a fotografovány.

Cílem pokusu bylo opět zjištění rozdílů respiračního metabolismu mezi rodičovským kmenem BY a delečními kmeny, a dále mezi jednotlivými párovacími typy. Z obrázku 4. 2. 13. jsou patrné rozdíly v TTC obarvení mezi jednotlivými kmeny avšak ne mezi párovacími typy jednotlivých kmenů. Výjimku ovšem opět tvořil deleční kmen *ccrΔ*, jenž se lišil nejen od ostatních zkoumaných kmenů, ale i v rámci párovacích typů kmene.

Obří kolonie rodičovského kmene BY tvořily při obarvení TTC již v prvních dnech (4. den) na svém okraji červeně a bíle obarvené sektory, střed kolonie se téměř nebarvil. Se stárnutím kolonií se zvětšoval lem s různě barevnými sektory a začal

respirovat i střed kolonie (12. den). U úplně starých kolonií tohoto kmene (20 dní) postupně klesala respirační schopnost a opět se nebarvil střed kolonie.

Nejvíce podobný rodičovskému kmeni byl deleční kmen *caf40Δ*, jež také vytvářel již od prvních dnů červeně a bíle zbarvené sektory na okraji kolonií a měl také nerespirující střed. Se stárnutím kolonií se postupně zvětšoval lem s barevnými sektory, ale oproti rodičovskému kmeni zůstal střed kolonií po celou dobu vývoje kolonie světlý kromě malých respirujících oblastí. Světlejší sektory tohoto delečního kmene převažovaly nad červenými na rozdíl od rodičovského kmene, celkově tedy více respiroval rodičovský kmen. Deleční kmen *rim15Δ* sektory téměř nevytvářel a středy kolonií respirovaly celou dobu vývoje kolonií stejně intenzivně jako okraje. Deleční kmen *ccr4Δ* nevytvářel vůbec žádné sektory a celá kolonie se po celou dobu barvila stejnoměrně, přičemž byly pozorovány rozdíly mezi párovacími typy tohoto kmene. U kmene párovacího typu *ccr4Δa* se intenzita zbarvení měnila v závislosti na stáří kolonií. Nejintenzivněji se tento kmen barvil mezi 6. a 15. dnem. Kmen párovacího typu *ccr4Δa* respiroval málo intenzivně po celou dobu.

Vrchol v sytosti barvení byl u všech zkoumaných kmenů kolem 9. – 12. dne. Výjimkou byl opět deleční kmen *ccrΔa*, jež respiroval výrazněji již od 6. dne.

4. 2. 7. Respirační metabolismus obřích kolonií různých kmenů *S. cerevisiae* rostoucích na médiu s glycerolem.

Pro tento experiment byly vysety obří kolonie stejných kmenů a stejným způsobem jako v kap. 4. 2. 6., ale tentokrát na pevné komplexní médium s glycerolem (GM 3%). Obří kolonie byly opět v čase barveny TTC, a poté opět fotografovány (obr. 4. 2. 14.).

V tomto případě byly pozorovány rozdíly v TTC obarvení mezi obřími koloniemi jednotlivých kmenů, ne však mezi koloniemi různých párovacích typů těchto kmenů, stejně jako to bylo pozorováno u kolonií kmenů rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%). Všechny kmeny se ale na tomto médiu (GM 3%) barví mnohem méně, než kolonie na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%).

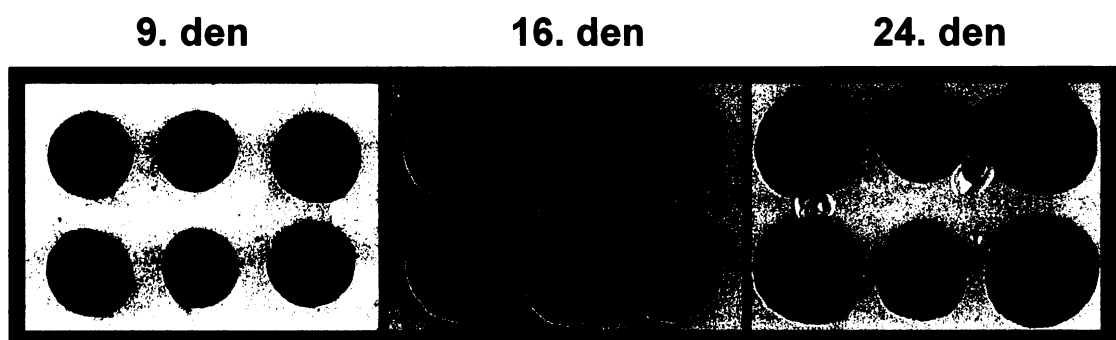
Žádný ze sledovaných kmenů, kromě delečního kmene *caf40Δ* nevytvářel na tomto médiu barevné sektory. Tento kmen ovšem vytvářel již od prvních dnů vývoje

kolonie červeně a bíle zbarvené sektory na okraji kolonií a měl nerespirující střed. Se stárnutím kolonií se postupně zvětšoval lem s barevnými sektory. Střed kolonií nerespiroval téměř po celou dobu vývoje kolonie. Kolonie rodičovského kmene BY se barvily po celém povrchu stejně slabě až přibližně do 12. dne, kdy se objevil výrazně respirující okraj a malé respirující oblasti uprostřed kolonií, které přetrvávaly i u velice starých kolonií. Deleční kmen *rim15Δ* se barvil podobně jako rodičovský kmen rovnoměrně po celém povrchu kolonií a po celou dobu vývoje nevytvářel jakékoli barevné sektory. Největší rozdíly se projevíly opět u delečního kmene *ccr4Δ*. Zatímco kolonie delečního kmene *ccr4Δa* se po celou dobu vývoje nebarví téměř vůbec a nevytvářejí ani žádné sektory, tak deleční kmen *ccr4Δa* respiruje již od prvních dnů velice intenzivně. Mladé kolonie tohoto kmene nerespirují na okraji kolonie, kolonie kolem 12. dne stáří se barví po celém povrchu a úplně staré kolonie respirují jen na okrajích kolonií.

Vrchol v obarvení všech sledovaných kmenů nastal obvykle kolem 12. dne, opět s výjimkou delečního kmene *ccr4Δa*, který respiroval déle více intenzivně než ostatní kmeny s vrcholem mezi 6. a 12. dnem.

4. 2. 8. Šestice obřích kolonií.

Obří kolonie stejných kmenů jako v předchozí kapitole byly vysety na pevné komplexní médium s glukosou (YEPG 1%) do šestic tak, že středy kolonií byly od sebe vzdálené 2 cm. Kolonie byly opět barveny v čase a poté fotografovány (obr. 4. 2. 15.).



Obr. 4. 2. 15. Barvení TTC – obří kolonie – šestice, deleční kmen *ccr4Δa*.

Bylo pozorováno, že obří kolonie rostoucí v šesticích nevytvářejí na rozdíl od obřích kolonií rostoucích jednotlivě žádné barevné sektory při barvení TTC. Vrchol v intenzitě barvení těchto kolonií nastal přibližně ve stejnou dobu jako jednotlivé obří kolonie. Mladé kolonie, které se navzájem neovlivňovaly, se barvily stejně intenzivně po celém svém povrchu. Čím byly kolonie starší a větší, tak přestávaly respirovat v těch částech, kterými byly nejbližší k ostatním koloniím a úplně staré kolonie (20. dní) respirovaly už jen na okrajích odvrácených od sousedních kolonií.

4. 2. 9. Ranná stádia.

I přes to, že je využití cukru respirací energeticky nesrovnatelně výhodnější než fermentace, upřednostňuje kvasinka rodu *S. cerevisiae* fermentaci před respirací.

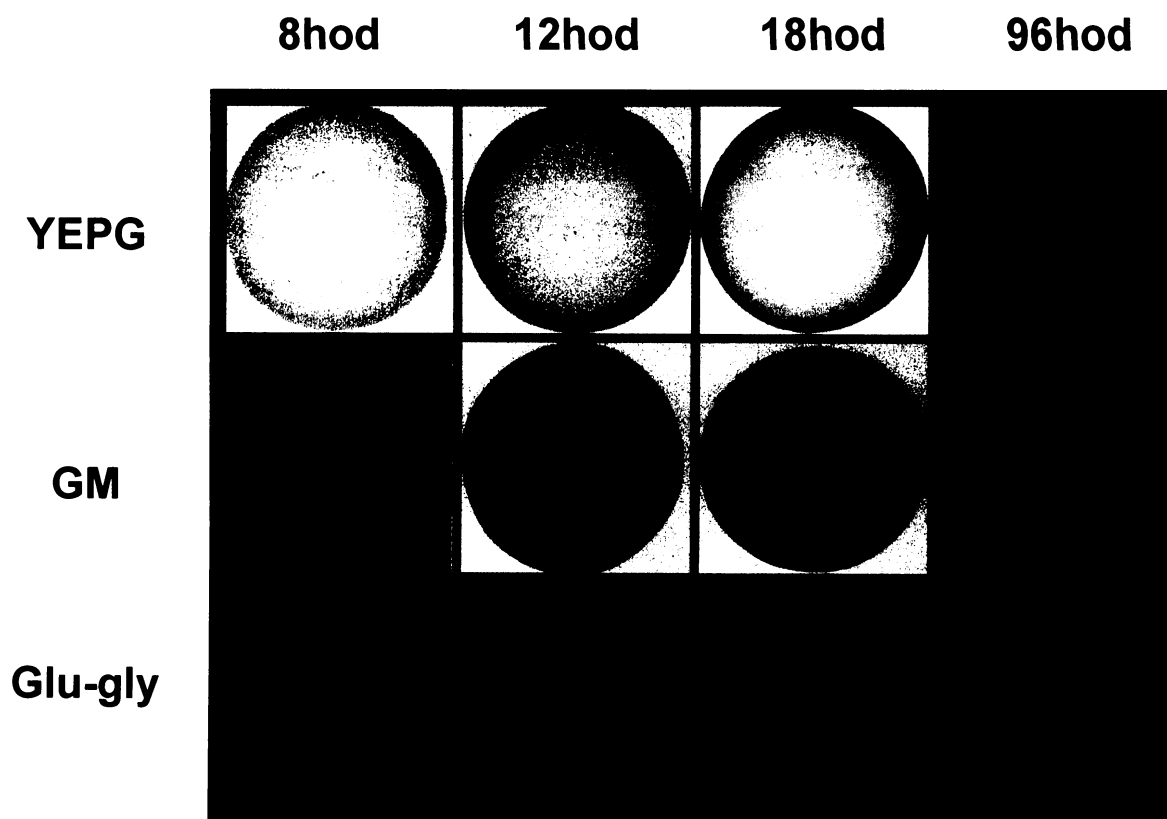
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, v jakém čase od nanesení kolonie na médium přepnou buňky kolonie z fermentativního metabolismu na respirační metabolismus.

Buňky krátkodobě kultivované na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%), byly zaočkovány do tekutého komplexního média s glycerolem (3% GM) a přes noc inkubovány ve třepačce při 28°C. Druhý den byla narostlá kultura v exponenciální fázi použita k výsevu obřích kolonií na různá média: pevné komplexní médium s glukosou (YEPG 1%), pevné komplexní médium s glycerolem (GM 3%), minimální médium s glukosou s upraveným pH (MM 2%, pH6, pH7, pH8), komplexní agar s 2% glycerolu a 0,1% glukosy a YNB. Buňky použité k výsevu musely být předem kultivovány v GM médiu a musely být v exponenciální fázi, z toho důvodu, aby při výsevu neměly zásoby glukosy. Dále byly obří kolonie po 8, 12, 18 a 36 hodinách barveny TTC, a poté fotografovány.

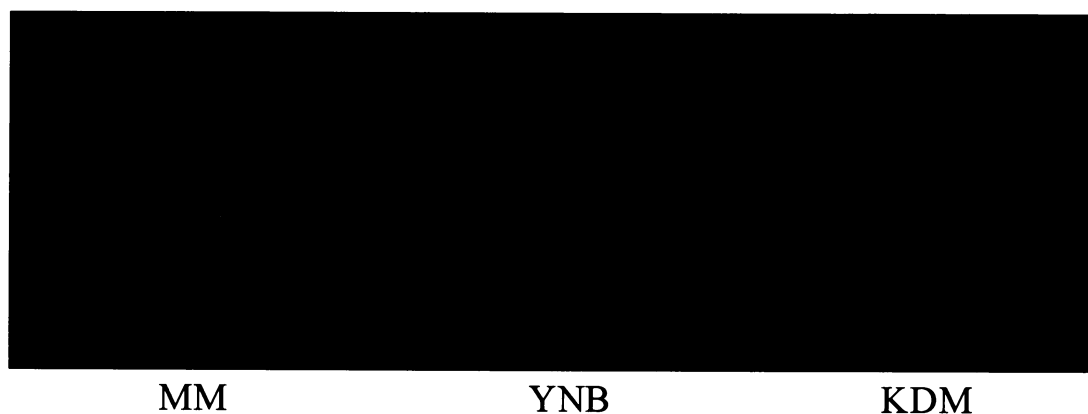
Na obrázku 4. 2. 16. je vidět, že buňky kolonií rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) v ranných stádiích vývoje fermentují a respirovat začnou až zhruba po jednom dni růstu. Buňky kolonií rostoucích na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%) fermentují hned v počátečních stádiích, protože glycerol je nezkrasitelný zdroj uhlíku. Kolonie rostoucí na agaru s 2% glycerolu a 0,1% glukosy, respiroují již od prvního barvení (8. hodina).

Na minimálním pufrovaném médiu s glukosou (MM 2%), na YNB ani na KDM se kolonie nebarvily ani v ranných fázích, ani po celý čas vývoje kolonie. Minimální

médium bylo pro tento experiment vybráno, protože se s ním naší laboratoři pracuje a jsou na něm zjišťovány další vlastnosti kmenů *ccr4Δ*, *caf40Δ*, *rim15Δ* v porovnání s rodičovským kmenem BY.



Obr. 4. 2. 16. Vliv média na TTC barvení časných stádií vývoje kolonie.



Obr. 4. 2. 17. Vliv média na TTC barvení kolonie.

4. 2. 10. Zarůstání buněk do agaru.

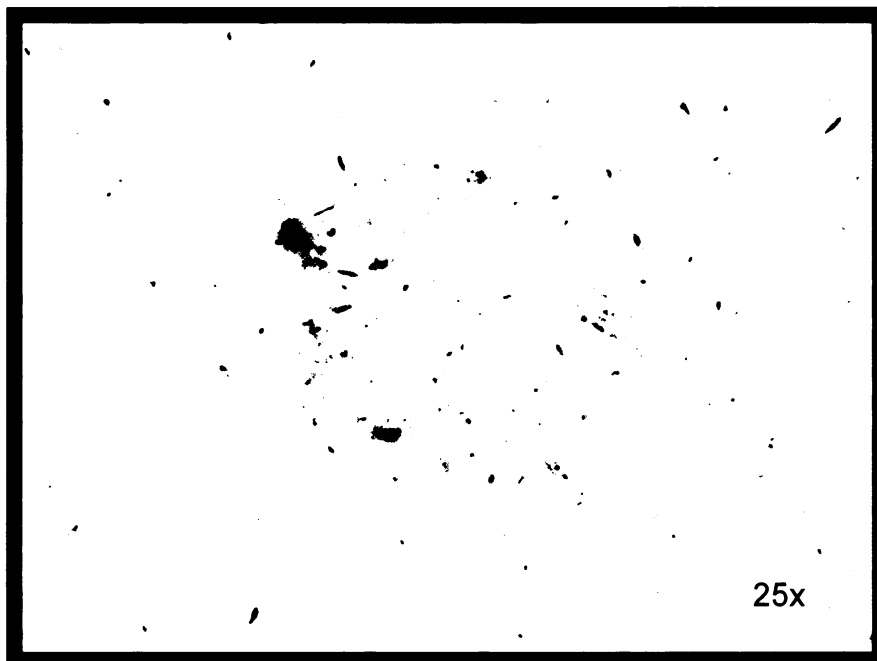
Jako doplňkový experiment bylo zjišťování, jestli buňky zkoumaných kmenů (*ccr4Δ*, *caf40Δ* a *rim15Δ*) a rodičovského kmene BY4742 zarůstají do agaru.

21 dní staré obří kolonie rostoucí na pevném komplexním médiu s glukosou byly smyty pod proudem vody, a buňky které zůstaly v agaru, byly obarveny pomocí CBB roztoku.

Ze zkoumaných kmenů byly zarůstající buňky pozorovány pouze u delečního kmene *ccr4Δα*. Z obrázku 4. 2. 17. je patrné, že zarůstající buňky jsou kulovité, a že nevytvářejí se pseudohyfy.



Obr. 4. 2. 17a. Zarůstání buněk do agaru. Barvení vymytých kolonií Coomasie Blue Brilliant (*ccr4Δα*).



Obr. 4. 2. 17b. Zarůstání buněk do agaru. Barvení vymytých kolonií Coomassie Blue Brilliant (*ccr4Δa*).

4. 2. 11. Fluorescenční barvení mitochondrií pomocí DiOC₆.

Tento experiment byl prováděn s cílem zjištění rozdílů v mitochondriích u buněk respiračně deficientního kmene a kmene respiračně suficientního, a dále zjištění rozdílů v mitochondriích buněk mladých kolonií (3 dny) a kolonií starých (20 dní). Experiment byl proveden pouze jednou s malým počtem vyhodnocených buněk. Výsledky jsou proto jen orientační.

Na komplexní médium s glukosou (YEPG 1%) byly vysety obří kolonie delečního kmene *caf40Δa* ze suspenze tvořené respiračně deficientními buňkami (malé kolonie sebrané z agaru s 2% glycerolem a 0,1% glukosou) a na laktátový agar byly vysety obří kolonie ze suspenze tvořené z respiračně suficientních buněk (velké kolonie sebrané z agaru s 2% glycerolem a 0,1% glukosou). 3. a 20. den byly kolonie z obou médií odebírány, byla z nich vytvořena suspenze, která byla následně obarvena fluorescenčním barvivem DiOC₆ a obarvené buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem pod imerzním objektivem 100x a fotografovány pod filtrem pro zelenou fluorescenci, a také při procházejícím světle s filtry pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast. Byla používána integrace 10x (pro barvení starých kolonií 20x).



4. 2. 18. Fluorescenční barvení mitochondrií pomocí DiOC₆. Buňky pozorovány fluorescenčním mikroskopem pod imerzním objektivem 100x a fotografovány pod filtrem pro zelenou fluorescenci. 3. den použita integrace 10x, pro 20. den 20x.

DiOC₆ se do mitochondrií dostává a udržuje se v nich na základě negativního membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. Do jisté míry tak odráží barvení touto barvou i hodnotu membránového potenciálu a tím i aktivitu mitochondrií. Přesto je toto stanovení membránového potenciálu pouze orientační, protože hromadění této barvy v mitochondriích neodpovídá přesně hodnotě membránového potenciálu.

Jelikož byl tento experiment prováděn pouze jednou a k jeho vyhodnocování bylo jen použito malé množství fotografií, nezjišťoval se rozdíl v počtu a velikosti mitochondrií mezi kmeny respiračně deficientními a respiračně suficientními ani u starých a mladých kolonií. Porovnávána byla pouze intenzita fluorescence. Rozdíl mezi kmeny spočíval v tom, že u respiračně deficientního kmene byl při stejné integraci jakou byl pozorován i respiračně suficientní kmen slabší signál.

I při porovnání mitochondrií z mladých a starých kolonií se také pravděpodobně projevil rozdíl v membránovém potenciálu mitochondrií. Pro buňky ze starých kolonií obou kmenů musela být použita vyšší integrace (20x) a u buněk

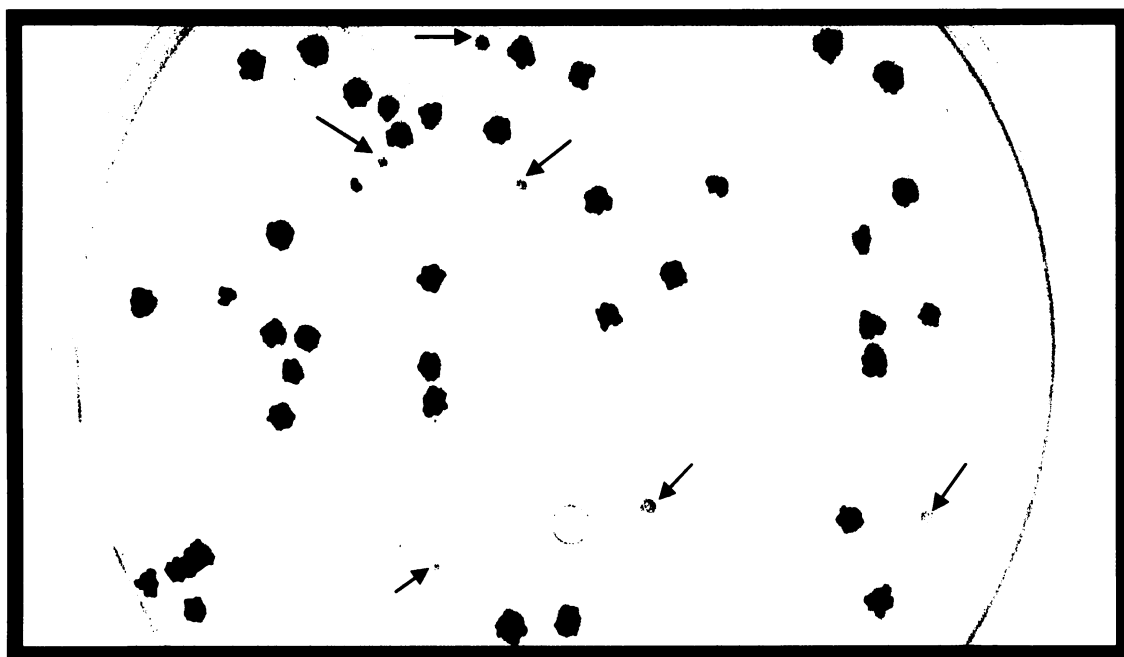
respiračně deficientního kmene byl signál DiOC₆ natolik nízký, že při použité integraci nebyly někde mitochondrie téměř vidět.

Také se projevily rozdíly v obarvení mitochondrií u různých buněk kolonií ve stejný den a u stejného kmene způsobené tím, že byla barvena směs různě starých populací buněk a buněk v různých růstových fázích (rostoucí a stacionární buňky).

U obou kmenů tedy docházelo v průběhu stárnutí kolonie ke snižování aktivity mitochondrií (snižování membránového potenciálu) podle probarvení DiOC₆.

4. 3. Detekce respiračně deficientních mutantů.

Tato kapitola se zabývá detekcí těchto respiračně deficientních mutantů, jelikož při práci s rodičovským kmenem BY4742 a jeho delečními kmeny *ccr4Δ*, *caf40Δ* a *rim15Δ* byly při barvení monoklonií pomocí TTC pozorovány malé nebarvící se, a tedy zřejmě nerespirující bílé kolonie menšího vzrůstu na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) (obr. 4. 3. 1). Buňky těchto kolonií byly tedy vyzkoušeny při růstu na médiu s nezkrasitelným zdrojem uhlíku a zjistilo se, že jsou opravdu respiračně deficientní. Tento první jednoduchý test zjištění respirační deficiencie podezřelých kolonií byl proveden tak, že zkoumaná kolonie byla přečárkována na laktátový agar a i po několikadenní inkubaci v termostatu při 28°C zůstala miska prázdná.

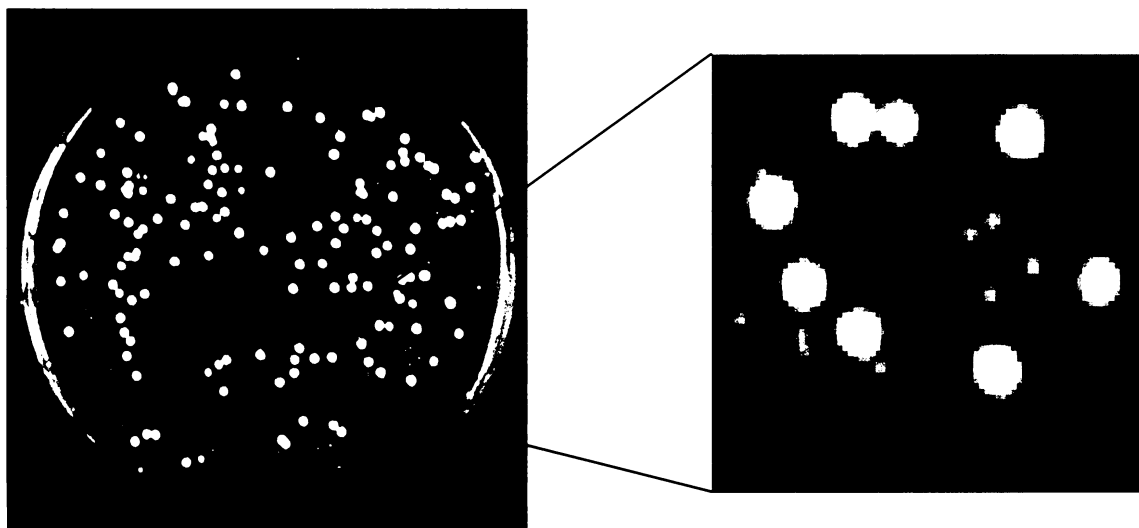


Obr. 4. 3. 1. Detekce respiračně deficientních mutantů pomocí TTC.

4. 3. 1. Podíl respiračně deficientních mutantů v koloniích různých kmenů.

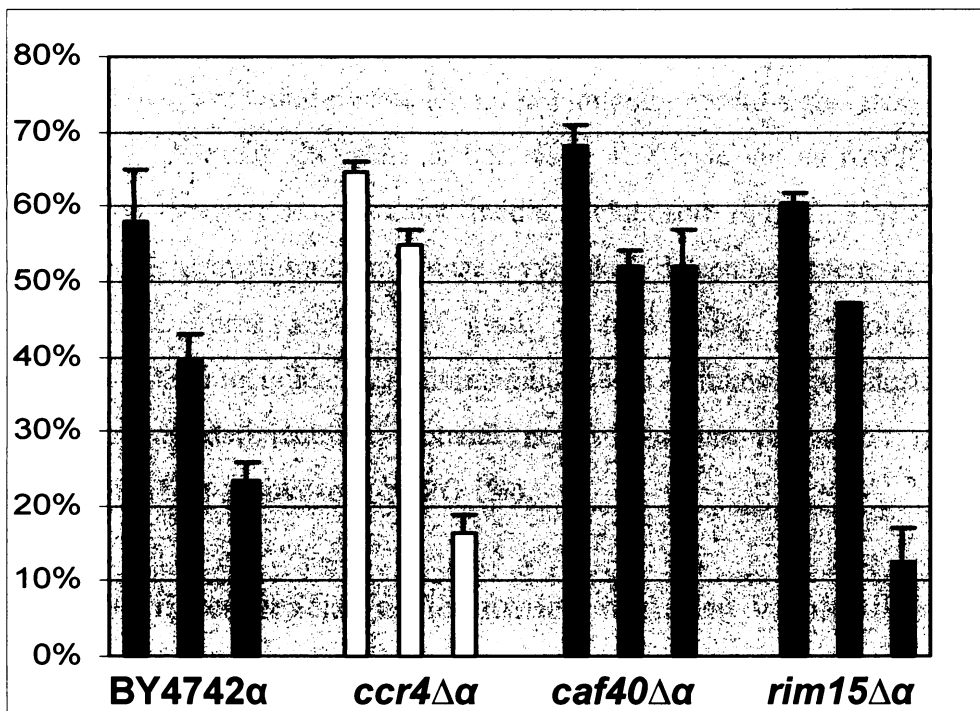
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit výskyt a procentuální zastoupení respiračně deficientních mutantů v různě starých koloniích rodičovského kmene

BY4742a a jeho delečních kmenů *ccr4Δa*, *caf40Δa* a *rim15Δa*. Za tím účelem byly vysety buňky těchto kmenů na pevné komplexní médium s glukosou (YEPG 1%) o hustotě přibližně 40 kolonií na misku a inkubovány v termostatu při teplotě 28°C. Monokolonie pak byly v čase sbírány (3., 10., 20. den), každý den odběru byly od každého zkoumaného kmene sebrány z misek 3 monokolonie. Z každé monokolonie byla udělána suspenze o hustotě 10^3 buněk, ze které byly vysety buňky na 3 misky s komplexním agarem s 2% glycerolem a 0,1% glukosou o hustotě přibližně 150 – 200 monokolonií na misku (obr. 4. 3. 2.). Po pěti dnech bylo spočítáno procento malých (petit) kolonií, představujících respiračně deficientní mutanty, byly spočítány průměrné hodnoty pro každý den a každý kmen a vyneseny do grafu (obr. 4. 3. 3.).

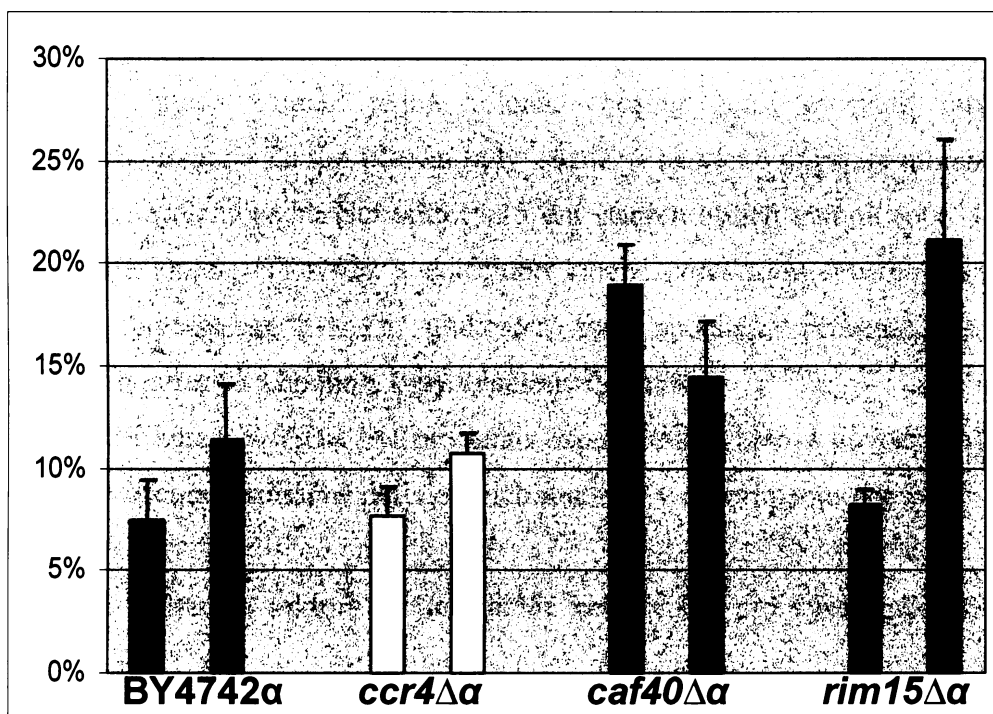


Obr. 4. 3. 2. Detekce respiračně deficientních mutantů na médiu s 0.1% glukosy a 2% glycerolu.

Z grafu je patrné velice vysoké procento respiračně deficientních mutantů u všech sledovaných kmenů a dále je patrný pokles respiračně deficientních mutantů v čase ve zkoumaných koloniích všech kmenů. Nejnižší pokles je vidět u delečního kmene *caf40Δa*, kde procento respiračně deficientních mutantů klesnul od 3. do 20. dne z přibližně 70% pouze o 15 – 20%. U ostatních sledovaných kmenů byl pokles mnohem výraznější, z přibližně 60% na 15 – 25%.



Obr. 4. 3. 3. Procentuální zastoupení respiračně deficientních mutantů v koloniích rostoucích na komplexním médiu s glukosou v čase: 3., 10., 20. den.



Obr. 4. 3. 4. Procentuální zastoupení respiračně deficientních mutantů v koloniích rostoucích na minimálním médiu v čase: 3., 10. den.

Obdobný experiment byl proveden i pro monokolonie stejných kmenů jako v předchozím experimentu, rostoucích na minimálním médiu s glukosou (MM 2%). Hodnoty jsou vyneseny do grafu na obr. 4. 3. 4. Zde je ale na rozdíl od kolonií rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) patrný růst respiračně deficientních mutantů v čase s výjimkou delečního kmene *caf40Δα*, kde hodnoty v čase mírně klesají. Na grafu je také vidět, že v koloniích všech testovaných kmenů rostoucích na minimálním médiu s glukosou je o desítky procent méně respiračně deficientních mutantů než v koloniích rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%).

4. 3. 2. Podíl respiračně deficientních mutantů v koloniích v rámci kmene.

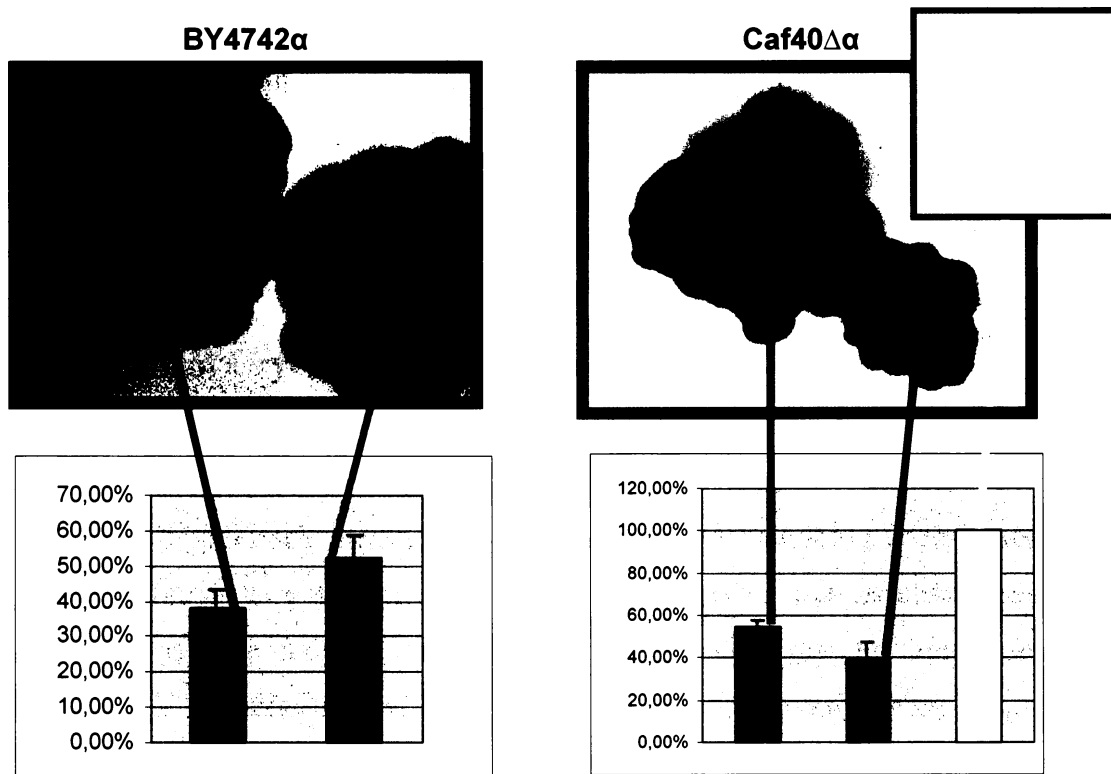
Při experimentech s TTC barvením byly v rámci jednoho kmene na jedné misce pozorovány různě se barvící stejně staré monokolonie, a také byly pozorovány různě se barvící sektory v rámci jedné obří kolonie.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli více se barvící kolonie nebo více se barvící sektory v rámci jedné kolonie obsahují nižší procento respiračně deficientních mutantů. Za tím účelem byly různě se barvící 6 dní staré monokolonie (obr. 4. 3. 5) a různě se barvící sektory 15 dní starých obřích kolonií (obr. 4. 3. 6.) rodičovského kmene BY4742α a delečního kmene *caf40Δα* vysety na komplexní agar s 2% glycerolem a 0,1% glukosou, bylo spočítáno procento respiračně deficientních mutantů a hodnoty byly vyneseny do grafů.

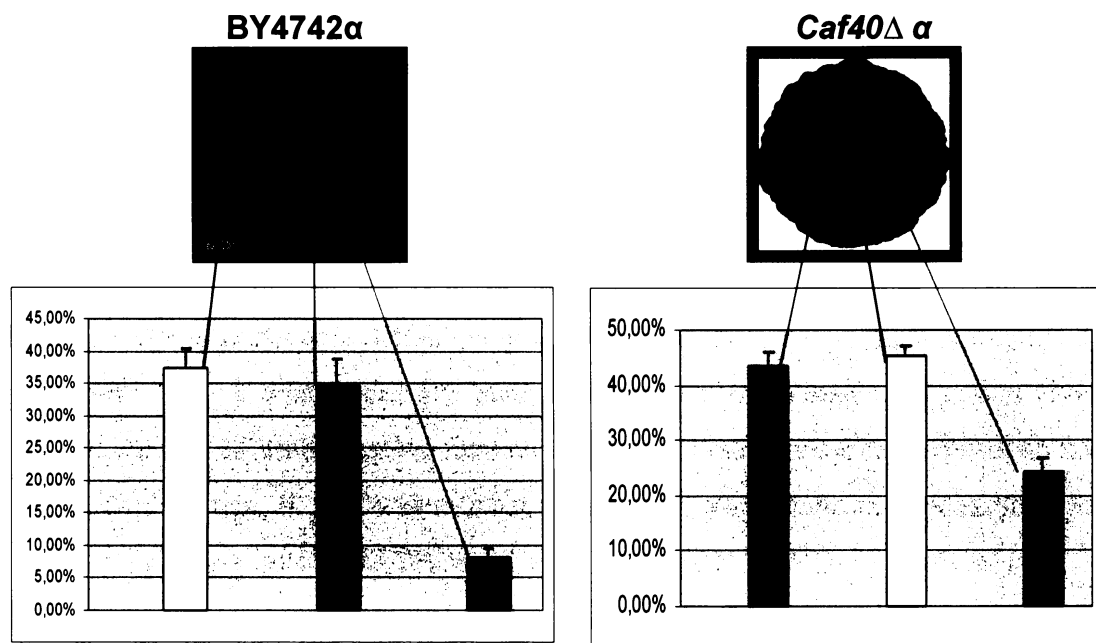
Deleční kmen *caf40Δα* byl pro tento experiment vybrán z důvodu zjištěného vysokého procenta respiračně deficientních mutantů v experimentu popsaném v kap. 4. 3. 1.

Odběr kolonií a sektorů v rámci jedné kolonie byl pro výsev prováděn před obarvením TTC, a proto byly pro výsev odebírány jen části sledovaných kolonií a sektorů a zbylé části byly obarveny TTC pro zjištění intenzity obarvení. Obr. 3. 4. 5. a 3. 4. 6. jsou proto pouze informativní.

Z obr. 4. 3. 5. je u obou sledovaných kmenů patrné vyšší procento respiračně deficientních mutantů v koloniích, které se více barví TTC a na obr. 4. 3. 6. je



Obr. 4. 3. 5. Procentuální zastoupení rd mutantů v různě se barvicích monokloniích (stáří 6 dní).



Obr. 4. 3. 6. Procentuální zastoupení respiračně deficientních mutantů v různě se barvicích sektorech oběh kolonií (stáří 15 dní).

vidět snížené procento respiračně deficientních mutantů ve středech obřích kolonií obou sledovaných kmenů, ale není vidět předpokládaný rozdíl v obsahu respiračně deficientních mutantů v různě se barvících sektorech. Je možné, že jsou tyto výsledky ovlivněné tím, že části sektorů pro výsev byly z obřích kolonií odebírány až 15 den, protože 6. den nebyly sektory na obřích koloniích ještě patrné.

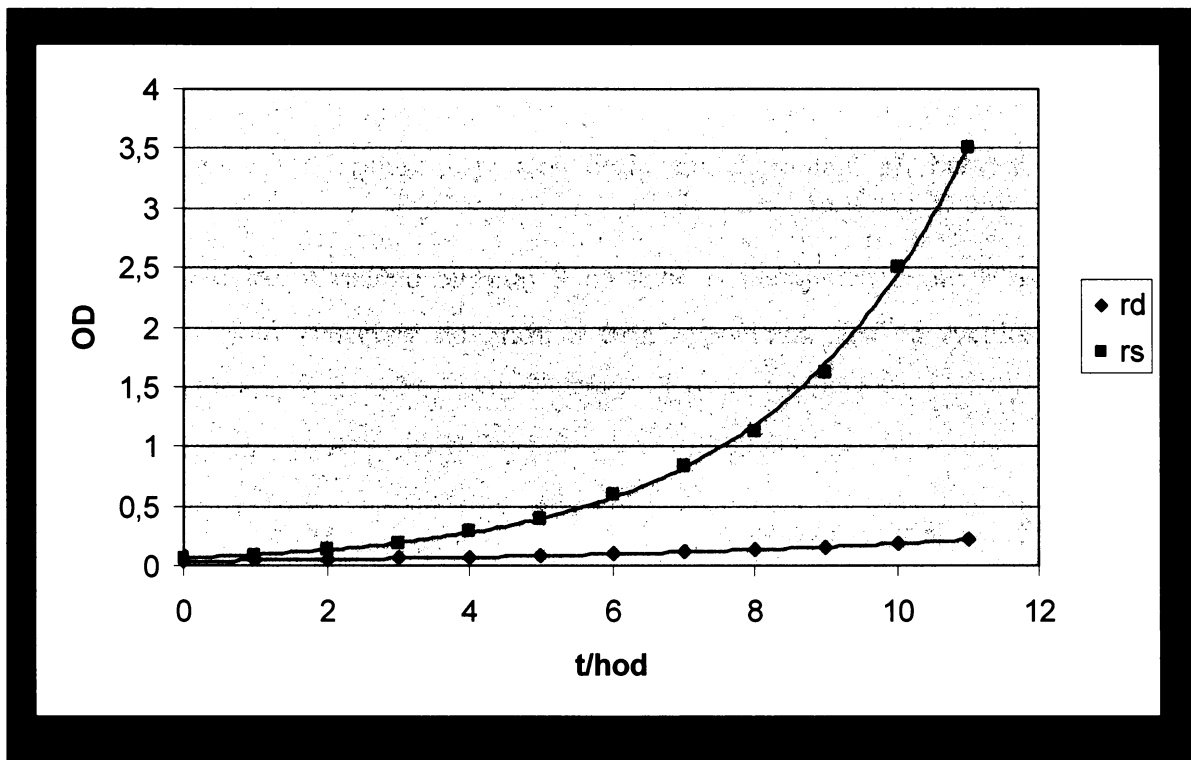
4. 3. 3. Růstová rychlost respiračně deficientních mutantů.

Chování populace mikroorganismů lze za snadno reprodukovatelných laboratorních podmínek předvídat. Zaočkujeme-li malé množství z dobře rostoucí výchozí kultury do dobře míchané tekuté živné půdy, kultura chvíli stagnuje, adaptuje se na nové podmínky, a pak začne exponenciálně růst. Po určité době růst opět zpomalí a posléze zastaví, zpravidla proto, že spotřebovala živiny nebo kvůli produktům vlastního metabolismu.

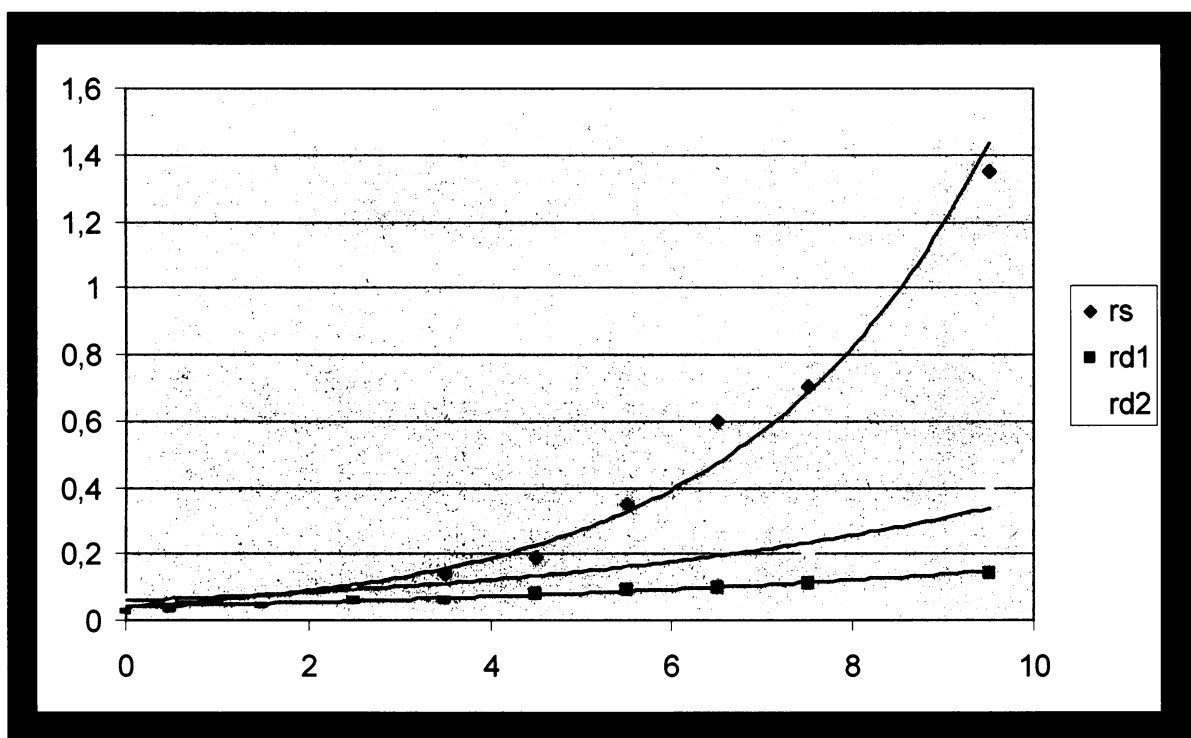
Jedním z hlavních rozdílů růstu v tekuté kultuře a na pevném podkladě je dostupnost živin. Zatímco v tekutém médiu dochází po celý čas k rovnoměrnému rozložení živin, v průběhu růstu kolonie se vytváří jejich gradient. V pozdějších fázích růstu navíc dochází k postupnému hromadění buněk, které nejsou v přímém kontaktu se živinami (MEUNIER a CHODER 1999).

Podobně jako v tekuté kultuře dochází v koloniích k růstu minimálně ve dvou základních fázích. Víceméně podobná růstu v tekuté kultuře je pouze první exponenciální fáze, kdy dochází k intenzivnímu dělení buněk. Avšak druhá fáze vývoje kolonie je poznamenána dříve vzniklým gradientem živin a metabolitů, a dochází v ní k zastavení dělení buněk uprostřed kolonie (buňky vstupují do stacionární fáze), a dále se dělí jen buňky na periferii, které mají lepší přísun živin. Přejít z první do druhé růstové fáze na pevném podkladě zjevně není způsoben tzv. diauxickým shiftem, tj. přechodem mezi anaerobním a aerobním metabolismem, jak je tomu v kultuře tekuté (MEUNIER a CHODER 1999).

Cílem tohoto experimentu bylo porovnání růstové rychlosti respiračně sufficientního kmene a kmene respiračně deficientního v tekuté třepané kultuře.



Obr. 4. 3. 7. Růstová křivka respiračně deficientního a respiračně suficientního kmene *caf40Δα*. Výchozí hodnota OD pro rd kulturu 0,037, výchozí hodnota pro rs kulturu 0,067.



Obr. 4. 3. 8. Růstová křivka respiračně deficientního a respiračně suficientního kmene *BY4742α*. Výchozí hodnoty OD: pro rd1 kulturu 0,035, pro rd2 kulturu 0,06, pro rs kulturu 0,045.

Růstová rychlost byla měřena u rodičovského kmene BY4742 α a u delečního kmene *caf40 Δ* α . Deleční kmen *caf40 Δ* α byl pro tento experiment vybrán, protože u něj byl zjištěn vysoký podíl respiračně deficientních mutant při barvení kolonií pomocí TTC.

Měření bylo prováděno alespoň 8 po sobě následujících hodin a naměřené hodnoty byly poté vyneseny do grafů a byla vypočítána růstová rychlost všech sledovaných kmenů.

kmeny		růstová rychlost	
		min	hod
<i>caf40Δ</i> α	rd	255	4,24
	rs	115	1,92
BY4742 α	rd1	285	4,75
	rd2	208	3,47
	rs	116	1,93

Růstová rychlost obou sledovaných respiračně suficientních kmenů byla podle očekávání přibližně 2 hodiny. Růstová rychlost respiračně deficientních kmenů byla více než dvojnásobná na rozdíl od kmenů respiračně suficientních, tedy více než 4 hodiny.

4. 4. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy a ethanolu v pevném médiu po růstu kolonií.

Kvasinky využívají jako zdroj uhlíku a energie různé monosacharidy (glukosu, fruktosu), disacharidy (laktosu, trehalosu). Některé kvasinky produkují extracelulární enzymy, které jim umožňují hydrolyzovat polysacharidy (škrob, celulosa) a jako zdroj uhlíku mohou sloužit i další látky (glycerol, laktát, ethanol).

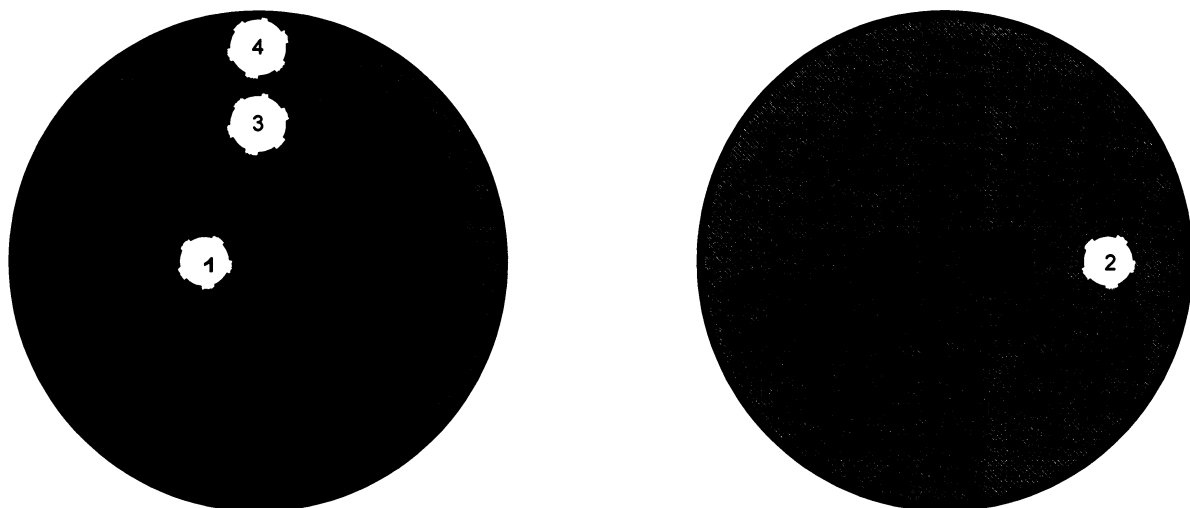
Ethanol využívají kvasinky zvláště fermentativních rodů při růstu na glukose poté, co byla glukosa vyčerpána a v médiu se kvašením nahromadil ethanol jako metabolický produkt. Tento zdroj uhlíku je pro kvasinky sice využitelný, ale málo ekonomický. Část této práce byla tedy zaměřena na sledování produkce ethanolu v kvasinkových koloniích při jejich růstu na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG) a na sledování úbytku glukosy z média, na kterém rostly různě dlouhou dobu kolonie kvasinek.

4. 4. 1. Příprava vzorků pro stanovování obsahu glukosy v agaru.

Kity pro spektrofotometrické stanovování glukosy, které byly při tomto experimentu použity (NOACK, GLU GOD), jsou určené pro stanovení obsahu glukosy hlavně v potravinách (NOACK), a tedy převážně pro kapalné vzorky (pivo, víno) nebo pro vzorky, které se dají rozpustit ve vodě nebo homogenizovat (čokoláda).

V tomto experimentu byla ovšem potřeba stanovit obsah glukosy v pevném médiu, a proto bylo tedy zapotřebí připravit vzorky vhodné pro použití kitů. Byl proto navržen a vyzkoušen postup, jímž by získán z agaru tekutý vzorek. Na obrázku 4. 3. 1. je zakresleno schéma odběru vzorků agarů určeného pro stanovení glukosy.

Odběry vzorků agarů byly prováděny vedle i pod různě starými (0 – 15 dní) obřími koloniemi kmene BY4742 α uspořádanými do dvojic nebo do šestic. V obou případech byla mezi jednotlivými koloniemi vzdálenost 2 cm. Pro kontrolu byly paralelně prováděny odběry i na stejně starých prázdných miskách. Kolonie rostly v termostatu při 28°C na 2% YEPG. Dvojice obřích kolonií byly vysévány na misky z jiného nalévání než šestice obřích kolonií.



Obr. 4. 3. 1. Schéma pro odběr vzorků pro spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy. Čísly jsou označeny odebírané vzorky, oranžová kolečka značí kolonie.

Nejprve byl vyříznut korkovrtem o průměru 0,5 cm vzorek agar, poté byl umístěn do předem zvážené mikroskopické Eppendorf, zvážen a bylo k němu přidáno 3 díly vody.

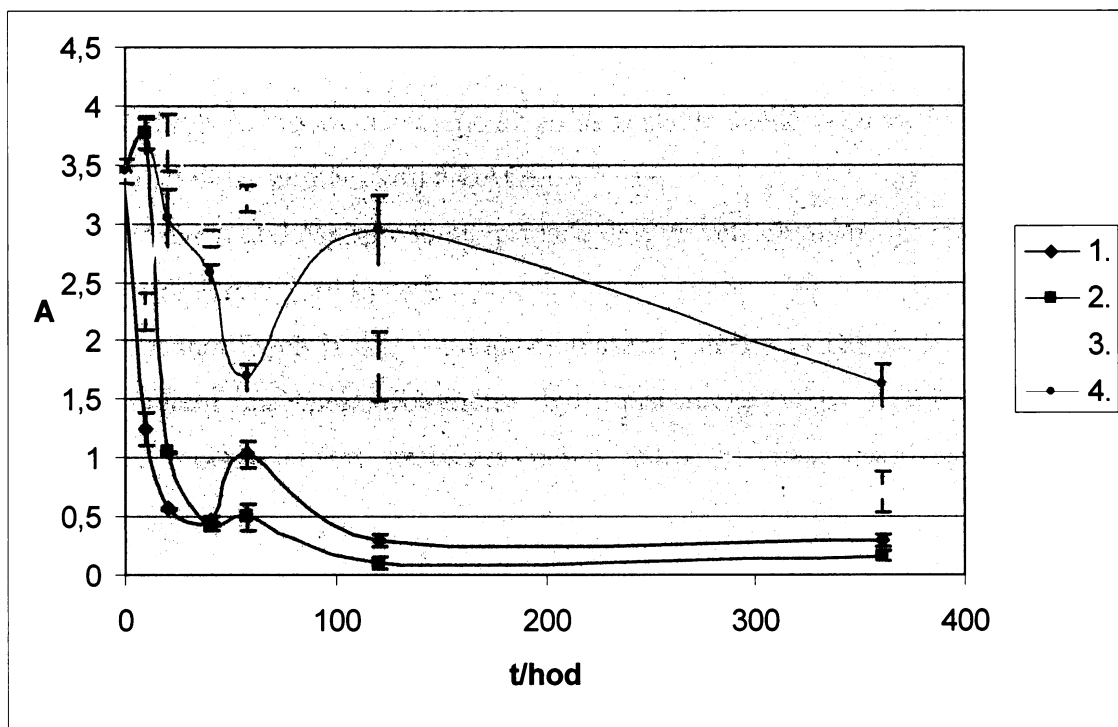
Ke vzorku byly přidány skleněné kuličky o průměru 425 – 600 μm (Sigma, pro izolaci DNA) a byl opakovaně (obvykle 3x) mražen dusíkem a drcen skleněnými kuličkami v drtičce (FastPrep) přibližně 60s, dokud se nevytvořila homogenní suspenze, která byla posléze zcentrifugována (2 min., 13000 ot./ min.). Nakonec bylo odebráno 50 μl vodné suspenze, která obsahovala glukosu a bylo přidáno 50 μl vody.

Vzorek byl použit ke stanovení glukosy.

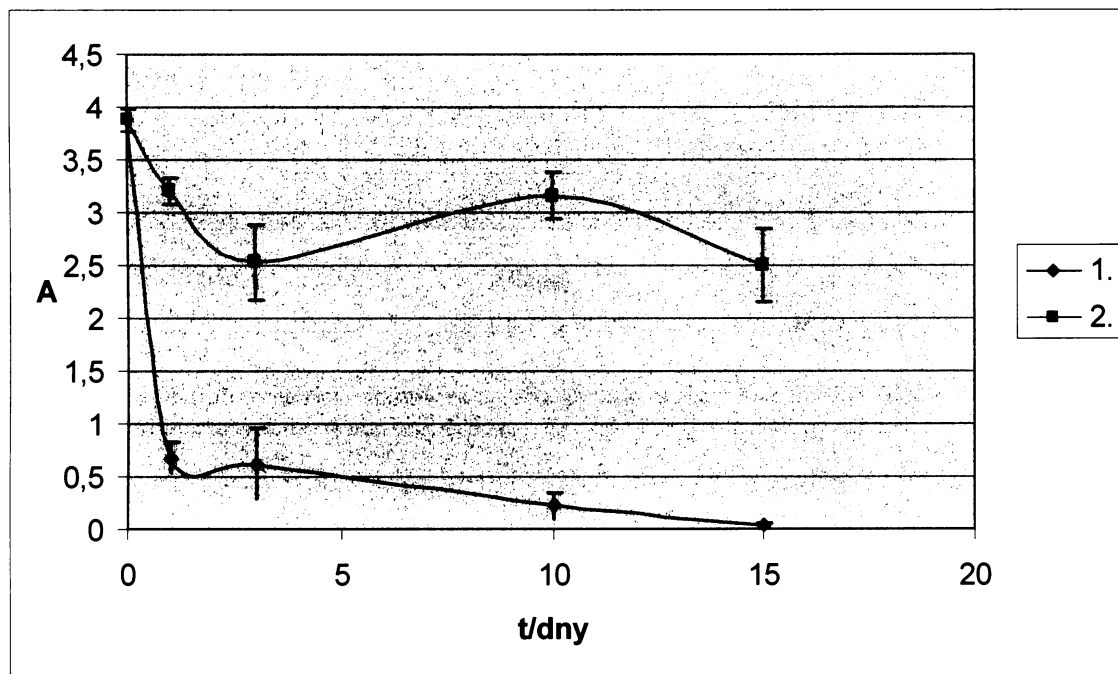
4. 4. 2. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu NOACK.

S ohledem na cenu kitu, bylo stanovení glukosy pomocí tohoto kitu prováděno ve 20x menších objemech, než bylo doporučeno výrobcem. Místo doporučené 3 ml kyvety byla použita mikrokyveta (100 μl).

Vzorky byly pro kontrolu měřeny několikrát, s občas kolísavými výsledky. Do grafů na obr. 4. 3. 2. a 4. 3. 3. byly vyneseny průměrné hodnoty z měření každého vzorku. Z grafů vyplývá jasné snižování obsahu glukosy v čase a pomalejší pokles obsahu glukosy u vzorků odebraných mimo kolonii.



Obr. 4. 3. 2. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy pomocí kitu NOACK. Obří kolonie – šestice. Obsah glukosy v agaru pro $A=4$ je přibližně 21,2 g/l, pro $A=0,5$ přibližně 2,65 g/l. Označení křivek 1 – 4 viz. obr. 4. 3. 1.



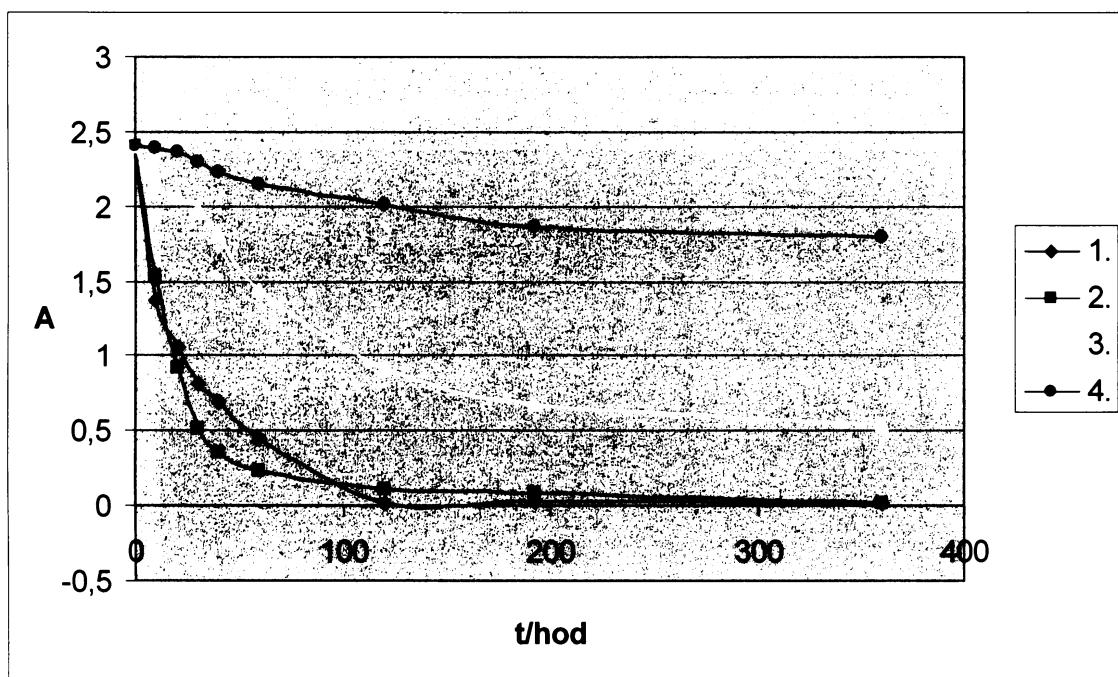
Obr. 4. 3. 3. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy pomocí kitu NOACK. Obří kolonie – dvojice. Obsah glukosy v agaru pro $A=4$ je přibližně 21,2 g/l, pro $A=0,5$ přibližně 2,65 g/l. Označení křivek 1 a 2 viz. obr. 4. 3. 1.

4. 4. 3. Stanovení obsahu glukosy pomocí kitu GLU GOD 250.

Použití tohoto kitu bylo zvoleno až po ne zcela přesvědčivých výsledcích při stanovování glukosy pomocí kitu NOACK.

Stanovování glukosy se v tomto případě děje ve větších objemech (600 μ l) a používá se standardní 3 ml kyveta.

Časy jednotlivých reakcí – inkubace reakční směsi a enzymatické reakce – a následné měření na spektrofotometru byly prováděny vždy v přesně stejných intervalech, protože reakce probíhaly pořád dál a hodnota absorbance se déle zvyšovala.

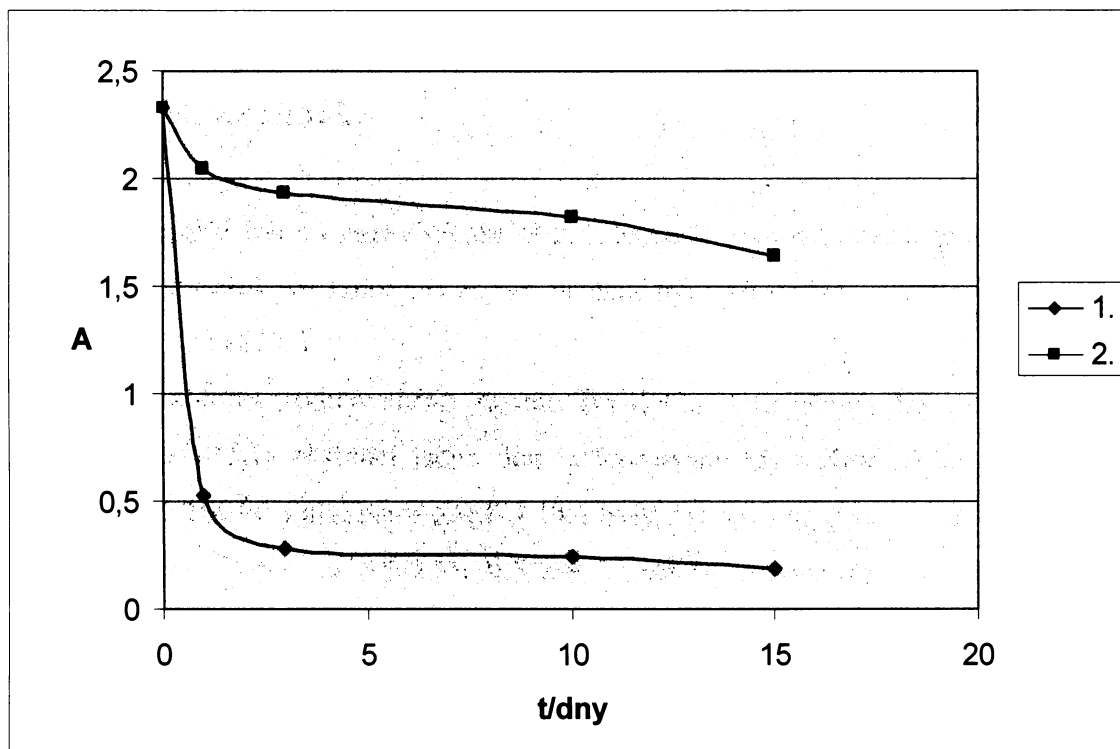


Obr. 4. 3. 4. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy pomocí kitu GLU GOD 250. Obří kolonie - šestice. Označení křivek 1 – 4 viz. obr. 4. 3. 1.

Na grafech na obrázcích 4. 3. 4. a 4. 3. 5. je vidět průběh poklesu obsahu glukosy v agaru v čase. Graf 4. 3. 4. znázorňuje průběh poklesu obsahu glukosy ve vzorcích odebraných z misek, na kterých rostly šestice obřích kolonií. První měření bylo prováděno na prázdné misce bez vysetých kolonií a obsah glukosy by měl přibližně odpovídat 20 g/ l. Ve vzorcích odebraných mezi a pod koloniemi poklesl obsah glukosy za tři dny zhruba na desetinu původního obsahu a po 15 dnech byla

koncentrace glukosy v těchto vzorcích už jen asi 0,2 g/l. Vzorky odebrané 1 cm od kraje kolonií obsahovaly i po 15-ti dnech zhruba 50% původní koncentrace glukosy a vzorky odebrané z okraje misky dosahovaly 75% původní koncentrace glukosy.

Graf 4. 3. 5. znázorňuje průběh poklesu obsahu glukosy ve vzorcích odebraných z misek, na kterých rostly dvojice obří kolonií. První měření bylo opět prováděno na prázdné misce bez vysetých kolonií a obsah glukosy byl přibližně 20 g/l. Ve vzorcích odebraných pod koloniemi prudce poklesl obsah glukosy za tři dny na pouhých 10% původního obsahu glukosy, poté už obsah glukosy klesal jen pozvolna až byl po 15-ti dnech přibližně kolem 8% původního obsahu. Ve vzorcích odebraných 1 cm od okraje kolonie postupoval pokles obsahu glukosy jen velice pozvolna a i po 15-ti dnech bylo naměřeno téměř 75% původního obsahu glukosy.



Obr. 4. 3. 5. Spektrofotometrické stanovení obsahu glukosy pomocí kitu GLU GOD 250. Obří kolonie - dvojice. Označení křivek 1 a 2 viz. obr. 4. 3. 1.

4. 4. 4. Stanovení obsahu ethanolu v koloniích kvasinek.

Kit pro spektrofotometrické stanovování ethanolu, který byl při tomto experimentu použit (NOACK), je určený pro stanovení obsahu ethanolu hlavně v potravinách: pro kapaliny (pivo, víno, lihoviny, ocet, ovocné džusy) nebo pro vzorky, které se dají rozpustit ve vodě (med) nebo homogenizovat (likérové čokolády).

Experiment je založen na faktu, že kvasinkové buňky *S. cerevisiae* upřednostňující fermentaci před respirací produkují kvašením ethanol. Cílem experimentu bylo zjistit, zda se tento produkt fermentativního metabolismu hromadí mezi buňkami v kvasinkové kolonii, a zda-li je možné nahromaděné množství detekovat.

4. 4. 4. 1. Příprava vzorků pro stanovení obsahu ethanolu v koloniích kvasinek.

V případě tohoto experimentu bylo zapotřebí stanovit obsah ethanolu mezi buňkami v kvasinkové kolonii a za tím účelem byly připraveny vzorky vhodné pro použití kitů (NOACK).

Obří kolonie rodičovského kmene BY4742a a delečních kmenů *ccr4ΔαΔ*, *caf40αΔ* a *rim15Δα* rostoucí jeden den v termostatu při teplotě 28°C na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) byly i spolu s agarem, na kterém rostly, vyříznuty korkovrtem o průměru 0,5 cm. Agar byl přemístěn do definovaného objemu vody v mikrozkuhavce Eppendorf a kolonie z něj byla smyta. Tímto způsobem byla připravena suspenze buněk o hustotě přibližně 10⁹ buněk/ml. Vzorek byl zcentrifugován a vodná fáze bez buněk byla použita ke stanovování ethanolu pomocí kitu.

Jako pozitivní kontrola byl použit polyploidní pivovarský kmen *S. cerevisiae* P2, který byl zaočkován: 1. do média pro testy kvašení cukrů ve kvasných trubičkách a jeden den inkubován při pokojové teplotě (důkazem probíhajícího kvašení byl vznik bubliny, vzniklé hromadícím se CO₂) a 2. do stejného média do zkumavek a jeden den inkubován v termostatu při teplotě 28°C. Druhý den byly

vzorky zcentrifugovány a vodná fáze bez buněk byla použita ke stanovení obsahu ethanolu pomocí kitu.

Pro negativní kontrolu byly zvoleny obří kolonie kmene BY4742 α rostoucí jeden den na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%), kde buňky nemohou kvasit a produkovat ethanol. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako v případě obřích kolonií rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%).

4. 4. 4. 2. Stanovení ethanolu pomocí kitu NOACK.

Z hodnot absorbance získaných při stanoveních, byla vypočtena koncentrace ethanolu v 1 ml neředěného vzorku a následně přepočtena na stejné množství buněk.

	médium	obsah ethanolu	obsah buněk/ml
P2 – kvasná trubička	YEG 2%	930 $\mu\text{g/ml}$	10^8
P2 - zkumavka	YEG 2%	540 $\mu\text{g/ml}$	10^8
BY4742 α – kvasná trubička	YEG 2%	640 $\mu\text{g/ml}$	10^8
BY4742 α - zkumavka	YEG 2%	870 $\mu\text{g/ml}$	10^8
BY4742 α - kolonie	YEPG 1%	50 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>ccr4</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	YEPG 1%	40 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>caf40</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	YEPG 1%	40 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>rim15</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	YEPG 1%	50 $\mu\text{g/ml}$	10^9
BY4742 α - kolonie	GM 3%	0 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>ccr4</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	GM 3%	1 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>caf40</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	GM 3%	0 $\mu\text{g/ml}$	10^9
<i>rim15</i> $\Delta\alpha$ - kolonie	GM 3%	2 $\mu\text{g/ml}$	10^9

Experiment potvrdil, že v kvasící tekuté kultuře pivovarského kmene i kmene BY4742 α lze použitou metodou detekovat ethanol. Jeho koncentrace u obou kmenů a

v obou provedeních byly přibližně srovnatelné a pohybovaly se v řádu desetin procenta.

Mezi buňkami obřích kolonií rostoucích na pevném komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%) byla přítomnost ethanolu také zjištěna. Jeho množství oproti tekuté kultuře bylo asi 10 x nižší. Pohybovalo se však v hodnotách minimálně 30 x vyšších, než byly hodnoty zjištěné ve dvou případech negativní kontroly (deleční kmeny kmeny *ccr4Δa* a *rim15Δa*) rostoucí na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%). U rodičovského kmene BY4742a a delečního kmene *caf40Δa* rostoucích na pevném komplexním médiu s glycerolem (GM 3%) nebyla přítomnost ethanolu detekována vůbec.

5. Diskuze.

5. 1. Vliv delece genu *RIM15* na morfologii a přizpůsobení se stresovým podmínkám.

Protein kináza Rim15, která je definována jako stimulátor genové exprese genu *IME2* a sporulace, je nutná pro správný vstup do stacionární fáze a pro adaptaci na respirační růst. Kmeny s delecí v tomto genu mají defekt v akumulaci glykogenu a trehalosy a v indukci termotolerance. U delečního kmene *rim15Δ* byly tedy oproti rodičovskému kmeni BY4742 očekávány změny v morfologii kolonií a rozdíly v růstu na GM médiu s BKP. V první části práce, kde byla porovnávána morfologie delečního kmene *rim15Δ* s rodičovským kmenem BY4742, nebyly zjištěny téměř žádné rozdíly. Byla sice zjištěna závislost morfologie delečního kmene *rim15Δ* na zdroji uhlíku (YEPG 1%, GM 3%), na teplotě (28°C, 37°C), na množství glukosy (0,5%, 1%, 2%) a dokonce na šarži peptonu, ale všechny tyto morfologické závislosti se stejným způsobem projevovaly i u rodičovského kmene BY4742.

V další fázi byl zjišťován vliv delece *RIM15* na růst kolonií na GM médiu s BKP, kde jsou díky barvivu v médiu sledovány změny pH média (ty mohou být způsobeny produkovaným amoniakem nebo může jít o okyselování nebo alkalizaci média vylučováním nějakých látek z kolonie nebo jejich zvýšený příjem buňkami kolonie). Byly zjištěny značné rozdíly v alkalizaci média mezi rodičovským kmenem BY4742 a delečním kmenem *rim15Δ*. Navíc se rozdíly projevíly i mezi jednotlivými párovacími typy delečního kmene *rim15Δ*. Přejít kolonií z alkalické do acidické fáze odráží snahu kolonií uniknout kumulaci faktorů oxidativního stresu, zřejmě způsobené hladověním v předchozí acidické fázi (PALKOVÁ et al. 2002). Kolonie adaptují svůj metabolismus na ekonomičtější, jako je glyoxalátový cyklus, a jsou využívány buněčné rezervy, jako reakce na nastávající nepříznivé podmínky ještě před překročením jejich únosné míry (PALKOVÁ a VÁCHOVÁ 2003). Gen *RIM15* má vliv na transkripční a metabolické změny, jako je například indukce na stres reagujících genů nebo vliv na akumulaci rezervních látek (SWIMMEN et al. 2006) může se tedy podílet na odolnosti ke stresovým podmínkám a zajištění optimálního přežití během hladovění. Podle dosavadních znalostí protein kinázy Rim15 se signálními drahami a dalšími regulačními proteiny (LENSSSEN et al. 2002) by u buněk s delecí v genu *RIM15* měla být snížena indukce genů stresové odpovědi. S tím zřejmě souvisí to, delece v genu *RIM15* způsobila u testovaných kmenů pozdější a kratší alkalickou fázi u delečního kmene *rim15Δa* a velice slabou

alkalickou fází u delečních kmenů *rim15Δα* a *rim15Δdi*. Toto zjištění tedy potvrzuje, že delece v genu *RIM15* způsobuje sníženou adaptaci na stresové podmínky, což je dobře vidět i při porovnání časů nástupu alkalické fáze u dvojic a šestic obřích kolonií. U dvojic obřích kolonií nastupuje alkalická fáze později než u šestic obřích kolonií, což koresponduje s domněnkou, že produkce amoniaku a nástup alkalické fáze odráží snahu kolonií uniknout kumulaci stresových faktorů, zřejmě způsobené hladověním v předchozí acidické fázi. Jak je vidět z grafů na obrázcích 4. 3. 4. a 4. 3. 5., zachycujících úbytek glukosy v médiu, na kterém rostou dvojice nebo šestice obřích kolonií, klesá obsah glukosy v médiu, na kterém rostly dvojice obřích kolonií sice prudce, ale přeci jen zůstává v médiu po celou dobu měření vyšší, než v médiu na kterém rostly šestice obřích kolonií. Šestice obřích kolonií nejen rychleji využívají médium, na kterém rostou, ale probíhá zde nepochybně i rychlejší akumulace stresových faktorů, a díky tomu tedy proběhne nástup alkalické fáze dříve, než u dvojic obřích kolonií.

V experimentech nebyly hodnoceny rozdíly mezi jednotlivými párovacími typy delečního kmene *rim15Δ* a rodičovského kmene BY4742, protože se původně žádné rozdíly mezi párovacími typy nepředpokládaly. Jako kontrola byl tedy použit jen rodičovský kmen párovacího typu *α*.

5. 2. Respirace a fermentace v koloniích *S. cerevisiae*.

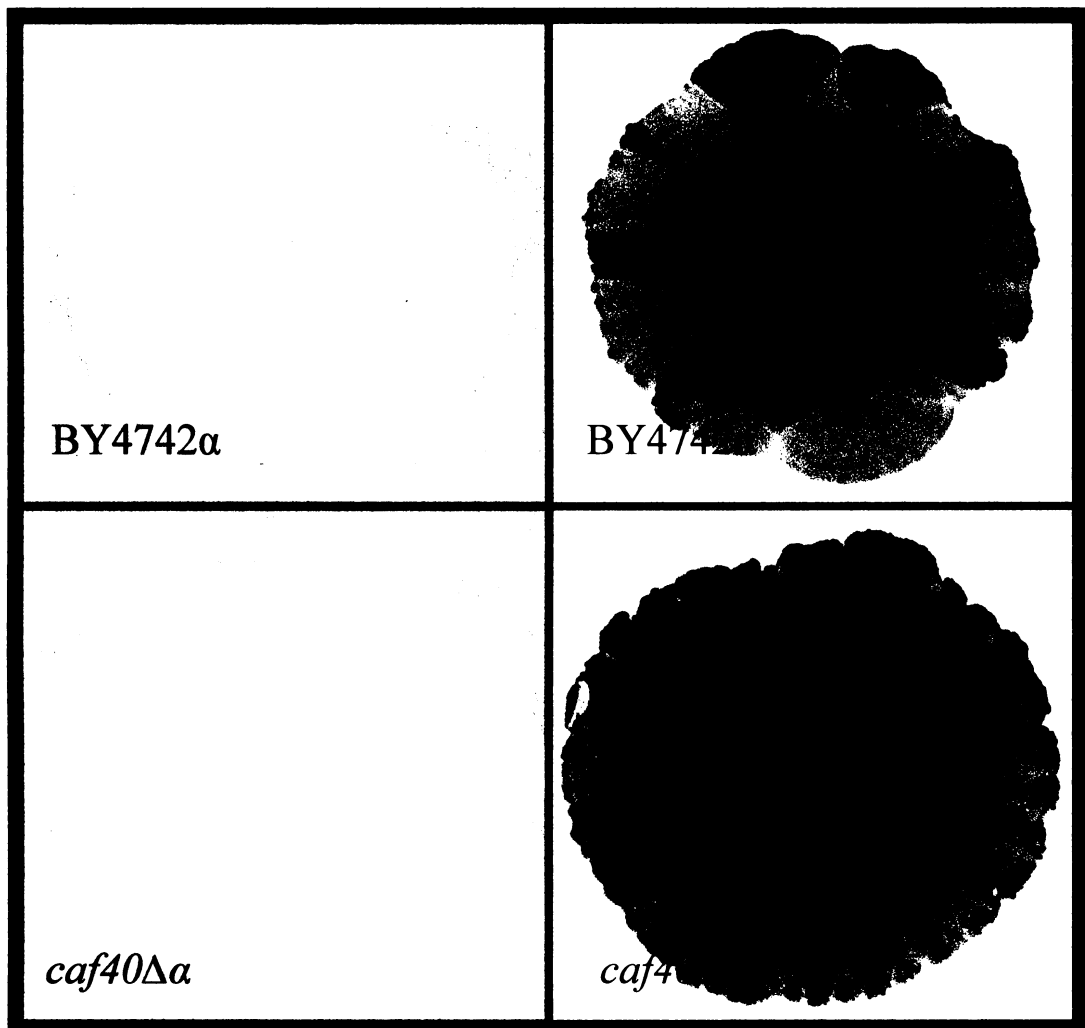
Detekce respiračního metabolismu v koloniích rodičovského kmene BY4742 a deletantů v genech *CCR4*, *CAF40* a *RIM15* pomocí 2,3,5–trifenyltetrazolium chloridu (TTC), který je při fungujícím respiračním řetězci redukován dehydrogenázami na červený formazán, umožnila zjistit nejen funkčnost respiračního řetězce při detekci respiračně deficientních mutantů, ale i stav aktuálního metabolismu, jak je zdokumentováno na obrázku 4. 2. 10. Bylo zjištěno, že výkonnou respiraci je možno zaznamenat nejen na GM médiu, ale i na médiu s glukosou (i když o něco později), dále že respirační výkonnost klesá u kolonií starých, a také že obří kolonie některých kmenů vytvářejí sektory se sníženou respirací nebo nevykazující žádnou respiraci.

Jedním z hlavních rozdílů mezi růstem *S. cerevisiae* v tekutém nebo na pevném médiu je povaha dostupnosti živin. Zatímco ve třepané tekuté kultuře jsou všechny buňky neustále vystaveny potřebným živinám a svým metabolickým produktům, u buněk kolonií rostoucích na pevném médiu je situace odlišná, protože během růstu kolonie je vytvářen gradient živin a metabolitů kolem kolonie přímo postupnou spotřebou živin a sekrecí metabolitů a difúzí obou (PALKOVÁ *et al.* 1997).

Situace při distribuci živin u buněk rostoucích na pevném médiu s glukosou se stává složitější, když se začnou při růstu kolonie buňky vrstvit na sebe, takže pak ne všechny buňky jsou v přímém kontaktu s živinami. V raných stádiích vývoje kolonie se dělí buňky převážně na okraji (MEUNIER a CHODER 1999) a jelikož buňky v této části mají dostatečný přísun živin, lze předpokládat, že zde převládá fermentační metabolismus. Tomu odpovídá zjištění, že okraj kolonie se v prvních dnech růstu nebarví pomocí TTC, buňky na okraji tedy zůstávají bílé, jak je vidět na obrázku 2. 4. 10. (1.) Buňky v centru kolonie jsou zřejmě již od počátku zásobeny živinami hůře, takže se už od druhého dne růstu kolonie začínají při barvení TTC na povrchu objevovat červené respirující oblasti, které se se stárnutím kolonií postupně slévají, až je následkem respiračního metabolismu obarven téměř celý povrch kolonie a fermentující okraj je stále užší.

Přechod z první rychlé fáze růstu (podobá se exponenciální růstové fázi u buněk v tekutém médiu a převažuje zde fermentační metabolismus) do druhé pomalé růstové fáze (která se od druhé růstové fáze u buněk v tekutém médiu značně liší a

může zde probíhat jak respirační, tak fermentační metabolismus) kvasinkové kolonie rostoucí na pevném médiu se projevuje postupným vstupem buněk v centru kolonie do stacionární fáze (MEUNIER a CHODER 1999), což se projevuje slábnoucím obarvením těchto buněk TTC. Tento projev aktuálního metabolismu signalizuje vyčerpání živin a přechod buněk do klidového stavu. Další růst a dělení buněk probíhá primárně na okraji kolonie. Kde je v tomto případě už snížená hladina živin a buňky v těchto místech přešly na respirační metabolismus.



Obr. 5. 2. 1. 17 dní staré obří rodičovského kmene BY4742α a delečního kmene *caf40Δα* před a po obarvení TTC.

Na obrázcích 5. 2. 1. a 5. 2. 2., kde jsou zachyceny poměrně staré obří kolonie rodičovského kmene BY4742 a delečních kmenů *caf40Δ* a *ccr4Δ*, jsou ve středech těchto kolonií vidět intenzivně červeně obarvené respirující papily obklopené méně se barvícími buňkami ve stacionární fázi, což dokazuje, že i když tyto respirující

buňky nejsou v přímém kontaktu s živinami v agaru, musí existovat mechanismus účinného přísunu živin buňkám po celé kolonii. Jedna možnost je pasivní kapilární pohyb živin z agaru až k vrchním vrstvám kolonie díky pórům v buněčné stěně (MEUNIER a CHODER 1999).

Na obrázcích je rovněž vidět, že zřejmě existuje souvislost mezi morfologií, barvou kolonií a schopností buněk kolonií barvit se TTC. Při růstu kolonie se buňky různě vrství a vytvářejí různě barevné sektory, které se při barvení TTC barví různými odstíny červené. Sektory, které jsou na neobarvené kolonii béžové, tak vykazují při barvení TTC respirační metabolismus.



Obr. 5. 2. 2. 20 dní staré obří kolonie delečních kmene *ccr4Δa* před a po obarvení TTC.

Sektory, které jsou na kolonii slaběji obarvené, naznačují zřejmě u takto starých kolonií přítomnost buněk ve stacionární fázi. Z porovnání vzhledu sektorů na neobarvené kolonii a intenzity barvení je vidět, že intenzivně zabarvené sektory odrážejí spíše než větší nahromadění buněk, místo s intenzivnější respirací. Sektory tedy vykazují rozdílný metabolismus.

Růst kolonií rodičovského kmene BY4742 i delečních kmenů probíhá ve dvou až třech fázích, rychlé, přechodné a pomalé (BARTONÍČKOVÁ 2006, PTÁČKOVÁ 2006), obdobně jako bylo popsáno v práci Meuniera a Chodera, 1999. Barvení kolonií pomocí TTC ukázalo, že v prvních dnech (asi 2 – 3 dny), kdy probíhá rychlé

exponenciální množení buněk, probíhá fermentativní metabolismus, ale ve střední části už začínají buňky respirovat. Pak následuje období asi do 6. dne, kdy na okrajích kolonií pokračuje fermentativní metabolismus, ale v centrální části už kolonie intenzivně respirují. Toto období odpovídá fázi zpomalení růstu, kdy kolonie obsahuje už 10^8 buněk, ale buňky se ještě množí. Pak od 6. do 12. dne je pozorován maximální respirační metabolismus, a tedy i pomalá růstová fáze. Je zajímavé, že přibližně ve stejné době (12. – 16. den) probíhá u kolonií alkalizace, zapříčiněná, jak již bylo řečeno v kap. 5. 1. pravděpodobně velkým oxidativním stresem.

Dále byl sledován pokles obsahu glukosy v komplexním médiu s glukosou (YEPG 2%), na kterém rostly různě dlouhou dobu obří kolonie kvasinek a z výsledků měření vyplývá (obr. 4. 3. 4. a 4. 3. 5.), že již třetí den je pokles glukosy takový, že už by se neměla projevovat katabolická represe respirace. Z těchto výsledků tedy také vyplývá, že s klesajícím obsahem glukosy stoupá v koloniích podíl respiračního metabolismu. Ranná vývojová stádia kolonií tedy fermentují, jak prokázalo nižší barvení TTC v ranných stádiích vývoje kolonií.

Přechod fermentativního metabolismu na metabolismus respirační je patrný i při barvení ranných vývojových stádií kolonií na různých médiích (obr. 4. 2. 16.). Obří kolonie vyseté na komplexní médium s glukosou (YEPG 1%) se vyznačují první den převážně fermentativním metabolismem, který je poté nahrazen respiračním. Při růstu na agaru s 2% glycerolu a 0,1% glukosy a na komplexním médiu s glycerolem (GM 3%), byl z důvodů nezkvasitelnosti média sledován respirační metabolismus již od začátku.

Jak již bylo řečeno, pomocí TTC se nezjišťuje jen respirační nebo aktuální metabolismus, ale i funkčnost respiračního řetězce a je možné jím tedy detekovat respiračně deficientní mutanty. Při experimentech byla zjištěna překvapivá skutečnost, že laboratorní kmen BY4247 vytváří velké množství respiračně deficientních mutantů při růstu na komplexním médiu s glukosou (YEPG 1%). A podobné procento respiračně deficientních mutantů vzniká i u delečních kmenů *caf40Δ*, *ccr4Δ*, *rim15Δ*. Ve tři dny starých koloniích je zastoupení respiračně deficientních mutantů až 75% a se stárnutím kolonií toto procento postupně klesá až průměrně na 15%. Tento pokles poměru respiračně deficientních mutantů v čase je zřejmě způsoben jejich více než dvakrát nižší růstovou rychlostí oproti respiračně suficientním buňkám (obr. 4. 3. 7. a 4. 3. 8.).

U různých delečních kmenů byly zaznamenány rozdíly v morfologii probarvení TTC. Na GM médiu se u monoklonií obvykle projevuje prstencovité zbarvení, které zřejmě svědčí o růstu kolonie v jakýchsi pulzech. Kolonie deletantů v genu CCR4 se ale barví homogenně. Koncentričnost barvení monoklonií se však neprojevuje při růstu na YEPG médiu, což může být způsobeno nejen rozdílnými přechody mezi respiračním a fermentačním metabolismem, ale i vysokým zastoupením respiračně deficientních mutantů. Je možné, že červeně obarvené sektory v časných vývojových stádiích, které postupně s růstem kolonie splývají, až je obarven celý povrch kolonie, obsahují respiračně suficientní buňky a bílé sektory respiračně deficientní buňky. A jelikož je růstová rychlost respiračně suficientního kmene dvakrát větší než u respiračně deficientního kmene, tak červeně obarvené sektory postupně překryjí bílé oblasti.

Zaznamenané rozdíly v TTC barvení u různých párovacích typů delečního kmene *ccr4Δ*, mohou souviset s rozdílným vnímáním stresu. *Ccr4a* se barví méně intenzivně TTC než deleční kmen *ccrΔa*. Vstup kmene *ccrΔa* do pomalejší růstové fáze s respiračním metabolismem nastal rychleji pravděpodobně z důvodů citlivějšího vnímání stresových signálů.

6. Souhrn.

V této diplomové práci, která se zabývá koloniemi kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* s delecemi v genech *CCR4*, *CAF40* a *RIM15*, bylo dosaženo těchto výsledků:

I.) Byl zjištěn vliv delece genu *RIM15* na morfologii kolonií. Ve srovnání s původním rodičovským kmenem bylo zjištěno, že spíše než delece *RIM15* mají na morfologii vliv podmínky, za kterých kolonie roste (teplota 28°C nebo 37°C, množství glukózy v médiu 0,5%, 1% nebo 2%, zdroj uhlíku 1% glukóza nebo 3% glycerol).

II.) Byl sledován nepříznivý vliv delece na adaptaci na stresové podmínky, projevující se opožděnou nebo téměř žádnou produkcí amoniaku na médiu s glycerolem oproti rodičovskému kmeni.

III.) Dále byl detekován respirační metabolismus v koloniích rodičovského kmene BY a deletantů v genech *CCR4*, *CAF40* a *RIM15* pomocí TTC (2, 3, 5 – trifenylnitrotetrazolium chlorid). TTC je při fungujícím respiračním řetězci redukován dehydrogenázami na červený formazán a umožňuje zjištění funkčnosti respiračního řetězce nebo aktuálního metabolismu. Bylo zjištěno, že výkonnou respiraci je možno zaznamenat nejen na glycerolovém médiu (GM), ale i na médiu s glukosou (YEPG) (i když o něco později), a že respirační výkonnost klesá u kolonií starších než 12 dnů. Obří kolonie rodičovského kmene BY a delečního kmene *caf40Δ* vytvářejí na YEPG médiu vytvářejí sektory se sníženou respirací nebo nevykazují žádnou respiraci, kdežto kolonie *ccr4Δ* a *rim15Δ* se barví homogenně. Na GM médiu se monokolonie kmene *ccr4Δ* barví homogenně, kdežto ostatní prstencovitě. Kmen *ccr4Δa* se barví výrazněji a déle než ostatní kmeny.

IV.) Byli detekováni respiračně deficientní mutanti, kteří se projevují neschopností využívat nezkvasitelné zdroje uhlíku a na médiu s limitovaným množstvím glukosy rostou ve formě malých kolonií (petit). U sledovaných kmenů bylo zjištěno vysoké procento vzniku spontánních rd mutací v koloniích (50 – 70%), přičemž vyšší procento bylo v TTC méně se barvících oblastech kolonií.

V.) Byl sledován pokles obsahu glukosy v komplexním médiu s glukosou (YEPG), na kterém rostly různě dlouhou dobu kolonie kvasinek a byl zaznamenán obsah ethanolu mezi buňkami kolonií rostoucích na tomto médiu.

7. Seznam citované literatury.

Altman, F.P. (1976): Tetrazolium salts and fomazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* 9 (3): 1 – 56.

Babcock, G. T., Wickström, M. (1992): Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356: 301 – 309.

Benefield, C. B., Howard, P. J. A., Howard, D. M. (1977): The estimation of dehydrogenase activity in soil. *Soil. Biol. Biochem.* 9: 67 – 70.

Bochner, B. R., Savegeau M. A. (1977): Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with Microorganism. *Appl. Environ. Microbiol. USA* 33: 434 – 444.

Brewer, H. E. (1949): Tetrazolium chloride as a test for damane in artificially cured peanuts. *Science.* 110 (2861): 451 – 452.

Casal, M., Cardovo, H., Leao, C. (1996): Mechanisms regulating the transport of acetin acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142: 1385 – 1390.

Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C., Leao, C. (1999): The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* 181: 2620 – 2623.

Cavalieri, D., Townsend, J. P., Hartl, D. L. (2000): Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate *Sacharomyes cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12369 – 12374.

Collart, M. A. (2003): Global kontrol of gene expression in yeast by the Ccr4-NOT complex. *Gene* 313: 1 – 16.

Dellsperger, C. K., Clothier J. L., Koyanagi, S., Inou, T., Marcus, M. L. (1991): Effects of coronary Artury occlusion in animals with hypertension and left ventricular hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (2): 40 – 45.

Denis, C. L., Ferguson, J., Zouny, E. T. (1983): mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. *J. Biol. Chem.* 258, 1164 – 1171.

Denis, C. L. (1984): Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* 108: 833 – 844.

Denis, C. L., Chen, J. (2003): The Ccr4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 73: 221 – 250.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680 – 686.

Ferguson, L. R., Baguley, B. C. (1981): Induction of petite formation in *Saccharomyces cerevisiae*, by experimental antitumour agents: structure-activity relationships for 9-anilinoacridines. *Mutation Res.* 90: 411 – 423.

Ferguson, L. R., von Borstel, R. C. (1992): Induction of cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 265: 103 – 148.

Ferguson, L. R., Turner, P. M., Gourdie, T. A., Valu, K. K., Denny, W. A. (1989): 'Petite' mutagenesis and mitotic crossing-over in yeast by DNA directed alkylators. *Mutation Res.* 215: 213 – 222.

Fiechter, A. (1981): Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Mikrob. Physiol.* 22, 123 – 183.

Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C. (2000): *Mikrob. Rev.* 24: 507 – 529.

Gancedo, J. M. (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334 – 361.

Garland, J. L., Mills A. L. (1991): Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351 – 2359.

Gunz, F. W. (1949): Reduction of tetrazolium salts by some biological agents. *Nature (London)*. 163: 98.

Holst, B., Lunde, C., Latex, F., Oliveira R., Lucas C., Kielland-Brandt, M. C. (2000): GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 37: 108 – 124.

Huddleson, F., Baltzer, B. (1950): Differentiation of bacterial species and variation within species by means of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in culture medium. *Science*. 112 (2918): 651 – 652.

Hurwitz, C. N., Mc Carthy, T. J. (1986): 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a novel tool in germicide dynamics. *J. Pharm. Sci.* 75 (9): 912 – 916.

Chen, X. J., Clark-Walker, G. D. (1999): The petite mutation in yeasts: 50 years on. *International Review of Cytology*. 194: 197 – 238.

Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, J.-C., Russell, P., Mann, M., Denis, C. D. (2001): Purification and characterization of the 1,0 MDa Ccr4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J. Mol. Biol.* 314: 683 – 694.

Cherry, J. R., Denis, C. L. (1989): Overexpression of the yeast transcriptional activator ADR1 induces mutation of the mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 15: 311 – 317.

Ito, W. D., Klask, R., Schaarschmidt, Hansen, S., Schafer, H. J., Mathey, D., Bhakdi, S. (1997): Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 2169 – 2175.

- Jambor, B. (1954): Reduction of tetrazolium salt. *Nature (London)* 173: 774 – 775.
- Klein, C. J., Olsson, L., Nielsen, J. (1998): Glucose kontrol in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* 144: 13 – 24.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (1998): *The Yeasts. A taxonomic study.* Elsevier Science. Amsterdam.
- Lessen, E., Oberholzer, U., Labarre, J., De Virgilio, C., Collart, M. A. (2002): *Saccharomyces cerevisiae* Ccr4-not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway. *Mol Microbiol.* 43(4):1023-1037.
- Lewin, A., Morimoto, R., Rabinowitz, M., Fukuhara, H. (1978): Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutant sof yeast: classification of petites and deletion mapping of mitochondrial genes. *Mol. Gen. Genet.* 163: 257 – 275.
- Lin, S. J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P. A., Culotta, V. C., Fink, G. R., Guarente, L. (2002): Calorie restriction extense *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344 – 348.
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T., Tanaka, M. (1989): Mitochondrial DNA mutations as an important contribution to aging and degenerative diseases. *Lancet.* 643 – 644.
- Lloyd, D., James, C. J. (1987): The Pasteur effect in yeasts: mass spectrometric monitoring of oxygen uptáme, and carbon dioxide and ethanol production. *FEMS Microbiol. Lett.* 42: 27 – 31.
- May, P. S., Winter, J. W., Fried, G. H., Antopol, W. (1960): Effect of tetrazolium salts on selected bacterial species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105 (2): 364 – 365.

Meunier, J. R., Choder, M. (1999): *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast*. 15 (12): 1159 – 1169.

Moody, A. J. (1996): 'As prepared 'forms of fully oxidised haem/Cu terminal oxidases. *Biochem. Biophys. Acta*. 1276: 6 – 20.

Musser, D. A., Oseroff, A. R. (1994): The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with photofin II. *Photochem. Photobiol.* 59: 621 – 626.

Navarro-Aviño, J. P., Prasad, R., Miralles, V. J., Benito, R. M., Serrano, R. (1999): A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast* 15: 829 – 842.

Ogur, M., John ST. R., Nagai, S. (1957): Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* 125: 928 – 929.

Palková, Z., Devaux, F., Řičicová, M., Mináriková, L., LeCrom, S., Jacq, C. (2002): Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development, *Mol. Biol. Cell*. 13 (11): 3901 - 3914

Palková, Z., Váchová, L. (2003): Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int. Rev. Cytol.* 225:229-72. Review.

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

Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390: 532 – 536.

Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S., Wiskich, J. T. (2001): The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiology Letters* 202: 181 – 187.

Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J. M., de Virgulko, C., de Moor, B., Winderickx, J. (2005): PAK and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular Microbiology* 55 (3): 862 – 880.

Senyk, G. F., Kozlowski, S. M., Noar, P. S., Shipe, W. F., Bandler, D. K. (1987): Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 70: 1152 – 1158.

Scherzo, R., Shinder, V., Engelberg, D. (2001): Anatomical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* stalk-like structure reveals spatial organization and cell specialization. *J. Bacteriol.* 183: 5402-5413.

Schüller, H.-J. (2003): Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43: 139 – 160.

Schwinnen, E., Wanke, V., Roosen, J., Smets, B., Dubouloz, F., Pedruzzi, I., Cameroni, E., Virgulko, C., Winderickx, J. (2006): Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Cell Division*.

Slonimski, P. P., Perodin, G., Drift, J. H. (1968): Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: Complete transformation of cells into respiratory deficient nonchromosomal 'petites'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30: 232 – 239.

Smith, F. E. (1951): Tetrazolium salt. *Science* 113: 751 – 754.

Tarafdar, J. C. (2003): 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biol. Fertil. Soils.* 38: 186 – 189.

Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A., Dijken, J. P. (1989): Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 281 - 287.

Wallace, D. C. (1989): Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. *TIG* 5: 9 – 13.

Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A., Dijken, J. P. (1994): Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiol.* 140: 703 – 715.

Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford M. E., Peck, V. M. (1996): Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 19: 1159 – 1166.

Wilkie, D., Gooneswera, G. (1980): The yeast mitochondrial system in carcinogen testing. *Chem. Ind. (London)* 21: 847 – 850.

Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., Dijken, J. P. (1990): Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3785 – 3792.

Zikánová, B., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z. (2002): Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Mol. Biol. Cell.* 294: 962 – 967.

