

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Dita Strachotová

## **Studium mechanismů produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur**

Study of mechanisms of ammonia production in yeast colonies and liquid cultures

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Libuše Váchová, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 18.05.2012

Podpis

Tato práce byla vypracována za podpory následujících grantů: GAČR 204/08/0718, UNCE 204013, SVV-2012-265202.

Tato práce vznikla pod vedením školitelky RNDr. Libuše Váchové, CSc. a školitelky-konzultantky prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., kterým bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc, trpělivost a podnětné diskuse.

Děkuji všem spoluautorům, kteří se podíleli na vzniku publikací, zejména členům skupiny prof. Martina Hofa za technickou asistenci při měření FLIM-FRET, Mgr. Onřeji Šebestovi za asistenci při měření FRAP, Heleně Kučerové za provedení Western blot analýz, Sandře Paiva a prof. Margaridě Casal za uvedení do problematiky měření transportních kinetik.

Svým mnohaletým kolegům a přátelům Vráťovi, Karlovi, Michalovi, Ludřkovi, Martinovi a Alešovi za soustavnou nejen odbornou podporu, všem bývalým i současným členům pracovní skupiny za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Rodině, přátelům a Ludřkovi za vytvoření zázemí nezbytného pro překonání stresu a těžkostí.

Sandře za starostlivost o mé pohodlí a pohodu během pracovních stáží v Portugalsku a za její elán a pracovní nasazení.

Vladěce Haislové, Hance Žďárské a Saše Pokorné za zajištění chodu laboratoře.

## Obsah

Seznam zkratek.....	8
Abstrakt .....	9
Abstract.....	10
1 ÚVOD.....	11
2 CÍLE PRÁCE .....	13
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	14
3.1 Růst kvasinek a pH okolí .....	14
3.1.1 Vnitrobuněčné pH u kvasinek .....	15
3.1.2 Kontrola vnitrobuněčného pH u kvasinek a její význam .....	18
3.1.3 Růst <i>S.cerevisiae</i> v zásaditém pH.....	19
3.2 Amoniaková signalizace .....	28
3.2.1 Plynné signalizační molekuly.....	28
3.2.1.1 Oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík.....	28
3.2.1.2 Oxid uhličitý.....	29
3.2.1.3 Amoniak a signalizace bakterií .....	30
3.2.1.4 Další látky .....	30
3.2.2 Amoniaková signalizace u kvasinkových kolonií .....	31
3.2.2.1 Amoniak jako zdroj dusíku .....	31
3.2.2.2 Amoniaková signalizace a diferenciacie kvasinkových kolonií.....	32
3.2.2.3 Vliv delece vybraných genů na amoniakovou signalizaci .....	33
3.2.2.4 Role Ato proteinů v amoniakové signalizaci .....	34
3.2.2.5 Funkce homologů Ato proteinů.....	39
3.2.2.6 Expres Ato proteinů v "microarray" analýzách.....	39
4 MATERIÁL A METODY.....	42
4.1 Materiál.....	42
4.1.1 Použité mikroorganismy.....	42
4.1.2 Použité plazmidy .....	42



4.1.3	Použité primery (tab. 2)	44
4.1.4	Materiál pro práci s DNA a RNA	45
4.1.5	Antibiotika	45
4.1.6	Ostatní	45
4.1.7	Přístroje	46
4.1.8	Použité internetové databáze a počítačové programy	47
4.1.9	Roztoky a média	48
4.1.9.1	Jednoduché roztoky	48
4.1.9.2	Složené roztoky	49
4.1.9.3	Tekutá média	50
4.1.9.4	Pevná média	51
4.2	Metody	52
4.2.1	Sterilizace	52
4.2.2	Uchovávání kvasinkových a bakteriálních kmenů	52
4.2.3	Kultivace buněk	52
4.2.4	Stanovení počtu buněk a optické density kultury	53
4.2.5	Nanášení obřích kolonií	53
4.2.6	Příprava kompetentních buněk <i>E.coli</i>	54
4.2.7	Elektroporace	54
4.2.8	Srážení DNA ethanolem	54
4.2.9	Fenol-chloroformová extrakce	54
4.2.10	Izolace plazmidové DNA z bakterií (midipreparace)	55
4.2.11	Restrikční štěpení plazmidové DNA	55
4.2.12	PCR kazet	55
4.2.13	"Colony PCR"	56
4.2.14	Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu	57
4.2.15	Izolace z agarosového gelu a přečištění roztoku DNA	57
4.2.16	Odběr buněk pro Northern blot a Western blot analýzu	57
4.2.17	Izolace RNA pro Northern analýzu a stanovení koncentrace RNA	57

4.2.18	Příprava radioaktivně značené sondy .....	58
4.2.19	Northern blot analýza .....	58
4.2.20	Transformace kvasinek LiAc.....	59
4.2.21	Odstranění markerů pomocí plazmidu pSH65 .....	59
4.2.22	Párování kvasinek.....	59
4.2.23	Barvení mrtvých buněk pomocí BKP.....	60
4.2.24	Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku produkovaného při aerobní kultivaci.....	60
4.2.25	Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku produkovaného koloniemi	61
4.2.26	Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku v médiu .....	61
4.2.27	Stanovení množství amoniaku pomocí Nesslerova činidla .....	61
4.2.28	Měření vstupu radioaktivně značené ( <sup>14</sup> C) kyseliny mléčné do buněk .....	61
4.2.29	Spektrofluorimetrické stanovení intenzity fluorescence .....	62
4.2.30	Fluorescenční mikroskopie.....	62
4.2.31	Příprava preparátu pro konfokální mikroskopii .....	62
4.2.32	Měření FRET za využití měření poločasu života fluorescenčních proteinů .....	62
4.2.33	Měření FRAP.....	63
4.2.34	Statistické zpracování výsledků.....	64
4.2.35	Připravené kmeny .....	64
4.3	Seznam dalších osvojených metod .....	64
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	67
5.1	Indukce alkalizace pomocí aminů.....	67
5.2	Diskuse 1.....	70
5.3	Aerobní kultivace různých kmenů <i>S.cerevisiae</i> v tekutém médiu (ve třepaných kulturách).....	71
5.3.1	Aerobní kultivace rodičovského kmene BY4742.....	71
5.3.2	Chování vybraných delečních kmenů.....	74
5.3.3	Změna pH okolního média u kmene <i>stl1</i> .....	77
5.4	Statická kultivace <i>S.cerevisiae</i> a produkce amoniaku .....	78
5.5	Diskuse 2.....	80

5.6	Příprava a základní charakterizace kmene se současnou delecí genů <i>ATO1</i> , <i>ATO2</i> a <i>ATO3</i> .....	84
5.7	Produkce Ato-GFP proteinů v různých médiích.....	89
5.7.1	Vliv pH na produkci Ato-GFP proteinů .....	89
5.7.2	Vliv zdroje uhlíku na produkci Ato-GFP proteinů .....	92
5.7.3	Vliv pH a zdroje uhlíku na produkci Ato proteinů .....	95
5.8	Diskuse 3.....	98
5.9	Zjišťování možných interakcí mezi Ato proteiny .....	101
5.10	Diskuse 4 .....	105
5.11	Měření transportu laktátu v průběhu vývoje kvasinkových kolonií.....	107
5.12	Diskuse 5 .....	112
5.13	Prostorové uspořádání produkce Ato1p-FP proteinu v kvasinkové mikrokolonii .....	115
5.14	Publikace I.....	117
5.15	Publikace II .....	130
5.16	Publikace III (rukopis) .....	140
6	SOUHRNNÁ DISKUSE .....	156
7	ZÁVĚR.....	159
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	160

## Seznam zkratek

3D	třírozměrný (3 dimensional)
ATP	adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)
bp	párů bazí (base pairs)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosin-monophosphate)
CFP	modrý (azurově modrý) fluorescenční protein (cyan fluorescent protein)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FLIM	monitorování poločasu dohasínání fluorescence (fluorescence lifetime imaging)
FP	fluorescenční protein (fluorescent protein)
FRAP	obnovení fluorescence po fotovybělení (fluorescence recovery after photobleaching)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
$K_d$	difuzní koeficient (diffusion coefficient)
kDa	tisíce Daltonů (kilodalton)
$K_m$	konstanta Michaelis-Mentenové (Michaelis-Menten constant)
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkinasa (mitogen activated protein kinase)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
OD	optická densita (optical density)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PKA	proteinkinasa A (proteinkinase A)
PKC	proteinkinasa C (proteinkinase C)
SO	směrodatná odchylka (standard deviation)
$v_{max}$	maximální rychlost reakce (maximum reaction rate)
YE	kvasničný autolyzát (yeast extract)
YFP	žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein)

## Abstrakt

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, na pevném podkladu jsou však schopny vytvářet organizované struktury, kolonie, které mohou v jistých ohledech připomínat mnohobuněčné organismy. Při sledování vývoje kvasinkových kolonií v čase bylo zjištěno, že kolonie periodicky mění pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. Přepnutí z acidické do alkalické fáze je spojeno s produkcí amoniaku, který funguje jako signál mezi sousedními koloniemi. Data z analýz využívajících DNA čipy a další experimentální data nasvědčují, že za produkci amoniaku do okolí by mohly být zodpovědné tři homologní proteiny kódované geny *ATO1* (*YNR010c*, *ADY2*), *ATO2* (*YNR002c*, *FUN34*) a *ATO3* (*YDR384c*). Cílem této práce je prohloubení znalostí jak o amoniakové signalizaci mezi kvasinkovými buňkami, tak o možných exportérech amonného kationtu - Ato proteinech. Práce přináší poznatky o dalších těkavých látkách - methylaminu a propylaminu - které jsou (vedle amoniaku) schopny indukovat vstup kvasinkové kolonie do alkalické fáze vývoje. Z hlediska amoniakové signalizace dále popisuje významný vliv transportu karboxylových kyselin na průběh vývoje kvasinkové kolonie, kdy omezený transport těchto slabých organických kyselin do buněk vybraných delečních kmenů patrně znemožňuje správný průběh amoniakové signalizace a diferenciaci kvasinkových kolonií. Vedle již zavedeného modelu kvasinkových kolonií jsou testovány další dva modely kvasinkových populací - aerobně a staticky kultivované tekuté kultury *S.cerevisiae*. Výsledky ukazují, že změna okolního pH spojená s produkcí Ato proteinů a amoniaku je typická i pro aerobně a staticky kultivované tekuté kultury *S.cerevisiae*, amoniak tak zřejmě může sloužit jako obecný signál upozorňující na blížící se nedostatek živin v okolí, a tedy na nutnost změn v genové expresi. Nové poznatky o Ato proteinech svědčí o jejich nezbytnosti pro růst v prostředí s neutrálním až alkalickým pH. Některé z Ato proteinů (konkrétně Ato1p a Ato2p, Ato1p a Ato1p a Ato3p a Ato3p) jsou zároveň schopny fyzické interakce. Tohoto výsledku bylo dosaženo za využití nových přístupů k hledání interakcí mezi kvasinkovými membránovými proteiny, jež jsou založeny na měření změn poločasu dohasínání fluorescence v důsledku FRET (fluorescenčního rezonančního přenosu energie).

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, amoniak, amoniaková signalizace, diferenciaci, Ato1p, Ato2p, Ato3p, pH, Sok2p, Jen1p, karboxylové kyseliny, FLIM-FRET

## Abstract

Yeast, although non-motile and unicellular organisms can create organized structures, colonies, in which cells communicate and cooperate and which in some ways resemble multicellular organisms. Our previous studies on yeast colony development revealed that colonies periodically change pH of their surroundings. Alkalization of an agar medium is accompanied by production of volatile ammonia that acts as the long-range signal. Microarray analysis of the expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* colonies during their transition from acid to alkali phase revealed significant changes in yeast transcriptome. Among others, strong induction of expression of three homologous genes *ATO1* (*YNR010c*, *ADY2*), *ATO2* (*YNR002c*, *FUN34*) and *ATO3* (*YDR384c*) at the beginning of the alkali phase was found. These genes encode membrane proteins that may function as ammonium/H<sup>+</sup> antiporters. This work contributes to better understanding of both the ammonia signaling and the role of putative ammonium exporters - Ato proteins. It was revealed, that other volatile compounds - methylamine and propylamine - are (in addition to ammonia) able to induce entry into the alkali phase of yeast colony development. Moreover, the significant impact of the transport of monocarboxylic acids on ammonia production and yeast colony development was shown. Limited transport of weak organic acids into the cells of selected deletion strains apparently prevented the proper ammonia signaling and subsequent developmental changes. In addition to the established model of giant yeast colonies, another two types of yeast populations were introduced - static and shaken (aerobically cultivated) liquid cultures of *S.cerevisiae*. Among others, we found that during growth of both types of cultures, pH of the media changes and pH increase is associated with ammonia and Ato proteins production. Thus, ammonia can probably act as a general warning signal of the approaching shortage of nutrients in the environment. Data concerning Ato proteins suggest that these proteins are necessary for growth in ambient neutral to alkaline pH. Moreover, some of Ato proteins (Ato1p and Ato2p, Ato1p and Ato1p and Ato3p and Ato3p) are able to interact. The results were achieved using new approaches suited to measure interactions between yeast membrane proteins, which are based on monitoring changes in fluorescence lifetime due to FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, ammonia, ammonia signaling, differentiation, Ato1p, Ato2p, Ato3p, pH, Sok2p, Jen1p, monocarboxylic acids, FLIM-FRET

# 1 ÚVOD

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, na pevném podkladu mohou nicméně vytvářet organizované struktury, kolonie, které v jistých ohledech připomínají mnohobuněčné organismy.

V naší laboratoři bylo při sledování vývoje kvasinkových kolonií v čase zjištěno, že kolonie jsou schopny produkovat amoniak jako signální molekulu. Kvasinkové kolonie periodicky mění pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. Pro acidickou fázi je typický růst kolonií, v alkalické fázi je růst přechodně inhibován. Počátek produkce amoniaku nastává právě se vstupem kolonií do alkalické fáze (PALKOVA, *et al.*, 1997).

V důsledku vyslání a přijetí amoniakového signálu dochází v buňkách kolonie k řadě změn v expresi proteinů. Tyto změny byly u *S.cerevisiae* zjišťovány sledováním transkriptomových změn metodou DNA čipů (PALKOVA, *et al.*, 2002). V případě tří genů *YNR010c*, *YNR002c* a *YDR384c* kódujících homologní membránové proteiny s neznámou funkcí byla zjištěna silná indukce exprese korelující s počátkem produkce amoniaku. Další biologické experimenty vedly k hypotéze, že by tyto geny mohly kódovat exportéry amonných iontů (PALKOVA, *et al.*, 2002). Jelikož je produkce Ato-GFP proteinů v mladých koloniích nacházejících se v acidické fázi indukována amoniakem produkovaným staršími koloniemi (RICICOVA, *et al.*, 2007), má produkce amoniaku patrně přímý či nepřímý vliv na expresi *ATO* genů. Všechny tři Ato-GFP fúzní proteiny jsou lokalizovány na plazmatické membráně v raftech, jež se nicméně liší svými vlastnostmi. Zatímco Ato2p-GFP protein je rozmístěn spíše rovnoměrně v drobných mikrodoménách, Ato1p-GFP a Ato3p-GFP proteiny jsou na membráně přítomny ve velkých shlucích. Stabilita Ato1p-GFP raftů je navíc závislá na pH (RICICOVA, *et al.*, 2007).

Tato disertační práce navazuje na poznatky, jež byly o Ato1p, Ato2p a Ato3p proteinech v naší laboratoři získány v předchozích letech. Práce přináší nové poznatky o prostorovém rozložení buněk produkujících Ato1p protein v rámci 3D uspořádání kolonie, podmínkách produkce všech tří Ato proteinů při aerobní kultivaci v tekutém médiu a fyzických interakcích mezi jednotlivými Ato proteiny, další části práce se zabývají amoniakovou signalizací mezi kvasinkovými koloniemi, a to jednak rolí Jen1p transportéru karboxylových kyselin v amoniakové signalizaci, jednak možnými analogy amoniaku spouštějícími vstup kvasinkové kolonie do alkalické fáze. Práce je vypracována v plném rozsahu. Výsledková část je prezentována ve formě stručného souhrnu publikovaných i

nepublikovaných výsledků. Za každou výsledkovou částí následuje diskuse konkrétní kapitoly, práce je uzavřena diskusí souhrnnou. Dále práce obsahuje 2 články uveřejněné v recenzovaných mezinárodních časopisech, a jeden rukopis, jež byl zaslán do impaktovaného časopisu a v současné době je připravována jeho revidovaná verze.

Práce „Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter“ (VACHOVA, *et al.*, 2009a) přináší bližší pohled na strukturalizaci kvasinkové kolonie. Za využití dvoufotonové mikroskopie řezů kvasinkovou mikrokolonií ukazuje, že kolonie je na povrchu kryta tenkou vrstvou buněk, jež plní ochrannou funkci a zabraňuje průniku škodlivých látek k buňkám vnitřní masy kolonie.

Předmětem publikace „Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM)“ (STRACHOTOVA, *et al.*, 2012) je zavedení techniky pro zjišťování interakcí membránových proteinů *S.cerevisiae* kombinující fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET – Fluorescence resonance Energy Transfer) s monitorováním poločasu dohasínání fluorescence (FLIM - Fluorescence Lifetime IMaging). Pomocí této techniky byla prokázána interakce mezi Ato1p a Ato2p proteiny a rovněž heterodi-/oligomerizace Ato1p a Ato3p proteinů.

Rukopis „Transport of carboxylic acids and important role of Jen1p transporter during development of yeast colonies“ přináší poznatky o roli transportu karboxylových kyselin při amoniakové signalizaci a diferenciaci kvasinkových kolonií. Ukazuje, že na vstupu karboxylových kyselin do buněk kvasinkových kolonií se podílejí dva mechanismy – aktivní transport a difuze. Oba tyto mechanismy vstupu jsou navíc negativně ovlivněny delecí *SOK2* genu kódujícího pleiotropní transkripční faktor Sok2p.



## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této disertační práce je rozšířit znalosti o amoniakové signalizaci u kvasinek, zejména:

- v literárním přehledu zpracovat relevantní literaturu týkající se růstu *S.cerevisiae* v prostředí s alkalickým pH a dále literaturu týkající se amoniakové signalizace a možných exportérů amoniaku u *S.cerevisiae* – Ato proteinů.
- nalézt - vedle amoniaku - další možné látky spouštějící vstup kvasinkové kolonie do alkalické fáze.
- v návaznosti na práci diplomovou navrhnout způsob měření produkce amoniaku při aerobní kultivaci v tekutém médiu a podrobněji charakterizovat produkci amoniaku za těchto růstových podmínek. Dále pak charakterizovat chování vybraných delečních kmenů při aerobní kultivaci v tekutém médiu.
- získat další poznatky o Ato proteinech, zvláště pak o možných interakcích mezi nimi. Dále pak připravit a charakterizovat kmen s delecí všech *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* genů.
- objasnit roli transportu karboxylových kyselin v amoniakové signalizaci a diferenciaci kvasinkových kolonií.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Komunikace mezi jednotlivými buňkami, a to jak u jednobuněčných, tak u mnohobuněčných organismů, je klíčová pro jejich správnou funkci a přežívání. Tato komunikace může probíhat nejen pomocí přímého kontaktu, ale i na delší vzdálenosti pomocí signálních molekul uvolňovaných do okolního prostředí. Jednou ze signálních molekul je i amoniak. Signalizace pomocí amoniaku byla potvrzena u hlenky *Dictyostelium discoideum* (zde inhibuje agregaci buněk, kulminaci a tvorbu plodnice a podílí se na regulaci diferenciaci buněk hlenky (DAVIES, *et al.*, 1993)) či v nervových tkáních (na sítnici včely (MARCAGGI a COLES, 2001), amoniak byl identifikován rovněž jako molekula účastnící se signalizace mezi kvasinkovými koloniemi (PALKOVA, *et al.*, 1997).

Pokud kvasinkové kolonie rostou na glycerolovém médiu, mění periodicky pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. Počátek produkce amoniaku koreluje se vstupem kolonií do alkalické fáze (PALKOVA a FORSTOVA, 2000). Amoniakový signál indukuje ve vyvíjející se kolonii řadu změn. Správný průběh signalizace pomocí amoniaku umožňuje diferenciaci buněk kvasinkové kolonie, jež zvyšuje odolnost celé struktury, a tedy i schopnost přežít v nepříznivých podmínkách (PALKOVA, *et al.*, 2002).

Jelikož je modelový systém růstu kvasinkových kolonií spjat nejen s produkcí amoniaku jako signální molekuly, ale i se zvýšením pH okolního média, následující kapitoly budou věnovány vlivu pH na růst kvasinky *S.cerevisiae*, zejména pak růstu v alkalickém pH, a dále signální molekule amoniaku, jeho možným exportérům - proteinům Ato1p, Ato2p a Ato3p a jejich homologům.

#### 3.1 Růst kvasinek a pH okolí

Kyselé pH je pro růst kvasinek vhodnější než pH neutrální či alkalické. Obecně se dá říci, že kvasinky dobře prosperují v prostředí s hodnotami pH mezi 3 a 7,5. Některé druhy ale rostou i ve výrazně zásaditějším prostředí (*Rhodotorula glutinis* při hodnotách pH do 9, *Debariomyces hansenii* dokonce ještě při hodnotách pH 10,3) (KURITA a YAMAZAKI, 2002). V každém případě musí mikroorganismy, jež se mohou během růstu setkat se širokým rozmezím hodnot okolního pH, účinně regulovat expresi genů právě s ohledem na pH okolí.

### 3.1.1 Vnitrobuněčné pH u kvasinek

Téměř všechny procesy probíhající v buňkách jsou pH závislé. pH výrazně ovlivňuje činnost enzymů, při optimální hodnotě pH dosahuje enzymatická aktivita svého maxima, naopak vystavení extrémně nízkým či vysokým hodnotám pH vede u většiny enzymů k úplné ztrátě aktivity. Proto je u většiny eukaryotických buněk vnitrobuněčné pH přísně regulováno (totéž platí i pro pH buněčných kompartmentů). U kvasinek je však vnitrobuněčné pH do jisté míry závislé na vnějších podmínkách, například na dostupnosti živin. Příkladem může být rychlé snížení intracelulárního pH o 0,45 jednotky po přidání glukosu k na glukosu hladovějším buňkám (EILAM, *et al.*, 1990).

Marešová a kolektiv (MARESOVA, *et al.*, 2010) stanovili pomocí GFP (zeleného fluorescenčního proteinu) senzitivního ke změně pH (modifikované verze klasického zeleného fluorescenčního proteinu, jež byla nazvána pHluorin (MIESENBOCK, *et al.*, 1998)), vnitrobuněčné pH u několika z běžně používaných laboratorních rodičovských kmenů *S.cerevisiae*. Vnitrobuněčné pH se u různých rodičovských kmenů (při kultivaci na glukosovém komplexním médiu na hodnotu OD přibližně 0,5, tj. u buněk v exponenciální fázi růstu) lišilo a pohybovalo se přibližně v rozmezí 6,5-7. Orii a kolektiv (ORII, *et al.*, 2009) stanovili stejným způsobem (nicméně při odlišných kultivačních podmínkách) vnitrobuněčné pH kvasinkové buňky na 7,2. Dá se tedy říci, že pH cytosolu kvasinkové buňky se za běžných kultivačních podmínek pohybuje okolo neutrality.

Následující úvaha podává představu o tom, kolik volných protonů se přibližně vyskytuje v cytosolu kvasinkové buňky. Jedna ze studií zabývající se velikostí kvasinkové buňky uvádí, že průměrný objem haploidní buňky v exponenciálně rostoucí kultuře činí 42 femptolitřů (JORGENSEN, *et al.*, 2002). Pokud bychom považovali celý objem kvasinkové buňky za vodný roztok o pH 7, vyskytovalo by se v něm přibližně 2500 protonů ( $6,0^{22} \cdot 10^{23}$  krát  $10^{-7}$  krát  $42 \cdot 10^{-15} \approx 2500$ ). Toto číslo je překvapivě poměrně nízké, vnitřek buňky však zároveň obsahuje o mnoho řádů vyšší počet protonovatelných/deprotonovatelných skupin – například kyselých a bazických aminokyselin jako součástí proteinů (počet molekul proteinů v kvasinkové buňce se odhaduje na desítky milionů (FUTCHER, *et al.*, 1999)). K pufrací kapacitě cytosolu přispívá významnou měrou například také fosfát ( $P_i$ ) s hodnotami  $pK_a$  2,1, 7,2 a 12,7. Na udržování vnitrobuněčného pH se pak aktivně podílí řada transportních proteinů plazmatické membrány.

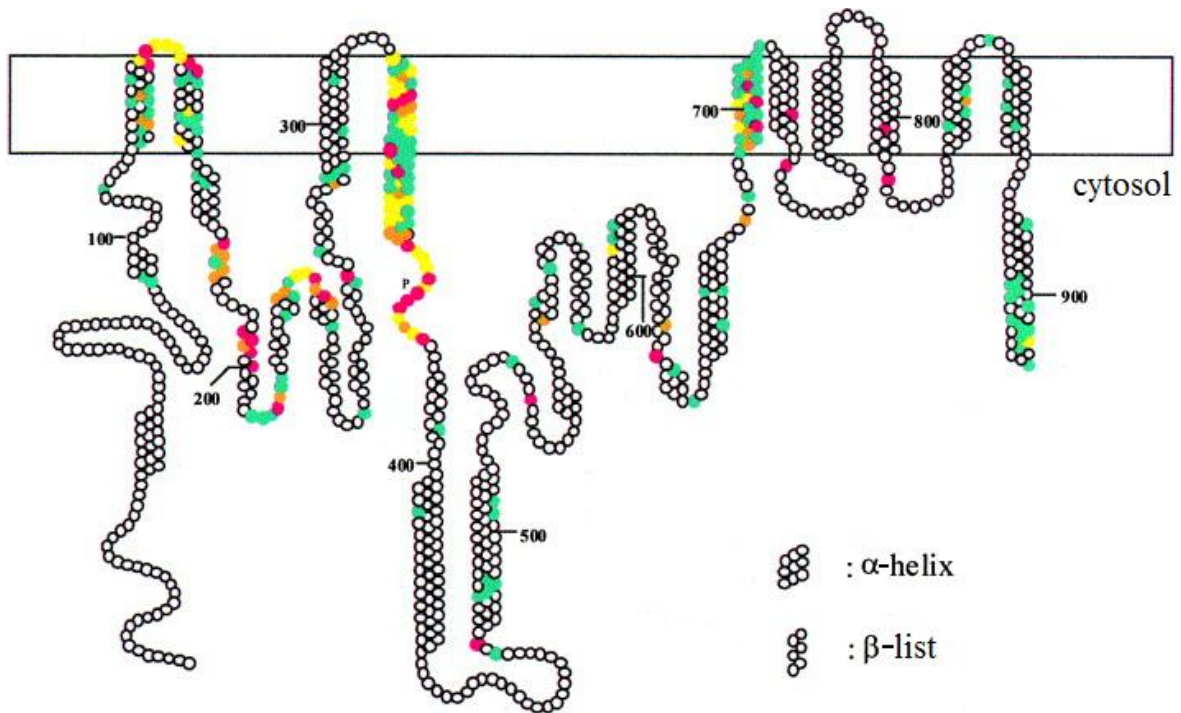
Za udržování vnitrobuněčného pH (a do značné míry i membránového potenciálu) u kvasinky *S.cerevisiae* je zodpovědná zejména  $H^+$ -ATPasa Pma1p, jež je jedním

z nejhodnějších proteinů kvasinkové buňky a která pumpuje protony ven z buňky. Aktivita tohoto pro buňku esenciálního proteinu (SERRANO, *et al.*, 1986) se zvyšuje při acidifikaci cytosolu, což umožňuje udržovat cytosolické pH v poměrně úzkém rozmezí relativně nezávisle na pH okolí (ERASO a GANCEDO, 1987).

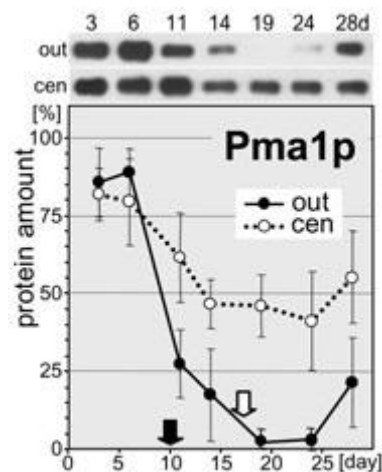
Pma1p je protein o velikosti 100 kDa s 10 transmembránovými doménami a N- i C-koncem orientovaným do cytosolu (AUER, *et al.*, 1998). V membráně je Pma1p membránová ATPasa lokalizována v tzv. membránových raftech (BAGNAT, *et al.*, 2000).

Jako esenciální protein je Pma1p protein dlouhodobě podrobován intenzivnímu studiu věnovanému vlivu záměn konkrétních aminokyselin na aktivitu proteinu. Velké množství informací tohoto typu shrnuli například Morsomme a kolektiv (MORSOMME, *et al.*, 2000) (obr. 1). Mutagenézí byly a jsou vytvářeny a charakterizovány kmeny se sníženou aktivitou H<sup>+</sup>-ATPasy, nezbytné pro detailní studium role a mechanismu funkce tohoto proteinu (např. (PETROV, 2010; VALLEJO a SERRANO, 1989).

Ač se jedná o protein pro buňku esenciální, dochází k výraznému snížení hladiny Pma1p proteinu (obr. 2) v buňkách okraje kolonie v druhé acidické fázi vývoje kvasinkových kolonií, a to i přesto, že se jedná o zdravé dělící se buňky (je tedy možné, že u těchto buněk existuje ještě nějaký další mechanismus udržování membránového potenciálu) (VACHOVA, *et al.*, 2009b). Kvasinka *S.cerevisiae* kóduje vedle Pma1p proteinu ve svém genomu ještě druhou membránovou H<sup>+</sup>-ATPasu, Pma2p protein (SCHLESSER, *et al.*, 1988), jež není esenciálním proteinem a jehož množství v buňce je velice nízké. Ačkoliv dochází k jistému zvýšení exprese *PMA2* genu při kultivaci za vysoké teploty (39°C), je jeho exprese stále několikrát slabší než v případě *PMA1* genu (VIEGAS, *et al.*, 1994). Z hlediska aminokyselinové sekvence jsou přitom Pma1p a Pma2p proteiny z 89% identické, největší rozdíly v sekvenci nalezneme v N-koncové oblasti proteinů (N-konec Pma2p proteinu je zároveň o přibližně 30 aminokyselin delší).



Obr. 1: Schéma kvasinkové  $H^+$ -ATPasy Pma1p. Každá aminokyselina je reprezentována kroužkem, barvy označují vliv záměny konkrétní aminokyseliny na funkci Pma1p. Zeleně jsou označeny mutace bez zjevného vlivu na funkci Pma1p, žlutě mutace snižující aktivitu Pma1p nejméně 2x, oranžově mutace snižující aktivitu na méně než 10%, červeně mutace mající stejný efekt jako delece *PMA1* genu (převzato z (MORSOMME, *et al.*, 2000)).



Obr. 2: Změny v produkci Pma1p proteinu během vývoje kvasinkových obřích kolonií v buňkách centra kolonie a vnějšího okraje kolonie. (Převzato z (VACHOVA, *et al.*, 2009b))

### 3.1.2 Kontrola vnitrobuněčného pH u kvasinek a její význam

Jak již bylo zmíněno, vnitrobuněčné pH kvasinkové buňky není regulováno tak přísně jako například vnitrobuněčné pH lidských buněk. Určité stresové situace mohou způsobit změny ve vnitrobuněčném pH o více než dvě jednotky bez ztráty životaschopnosti (ORII, *et al.*, 2009).

V některých případech je změna vnitrobuněčného pH žádoucí. V průběhu buněčného cyklu byly cyklické změny pH pozorovány u řady eukaryot. Například u hlenky *D.discoideum* je vnitrobuněčné pH nejvyšší v S fázi buněčného cyklu a toto zvýšení přetrvává až do M fáze (AERTS, *et al.*, 1985), Anand a Prasad (ANAND a PRASAD, 1989) pozorovali zvýšení pH u *S.cerevisiae* při průchodu startem buněčného cyklu. U *S.pombe* je zase udržení vnitrobuněčného pH na stabilní hodnotě (7,25-7,35) klíčové pro správný průběh buněčného cyklu (KARAGIANNIS a YOUNG, 2001).

Naopak právě narušení pH homeostáze (acidifikace cytosolu) působením slabých organických kyselin při nízkém okolním pH (kdy nenabitá – protonovaná - forma může volně difundovat membránou, nicméně v cytosolu o neutrálním pH dojde k deprotonaci nenabitě formy a k akumulaci této nabitě formy) je principem antimikrobiálního působení slabých organických kyselin. Na druhou stranu by produkce slabých kyselin, zejména kyseliny mléčné a octové, mohla být klíčová pro schopnost růstu *Rhodotorula glutinis* či *Debariomyces hansenii* při extrémních hodnotách pH (9 a vyšší) (KURITA a YAMAZAKI, 2002).

Na podobném principu jako antimikrobiální působení slabých organických kyselin je založeno i antimikrobiální působení dusitanů. Tolerance k dusitanům může být (podobně jako je tomu u slabých organických kyselin) závislá na pH homeostázi a pufrční kapacitě cytosolu, jak bylo ukázáno např. u *Debaryomyces hansenii* či *Candida zeylanoides* (MORTENSEN, *et al.*, 2008).

Mortensen a kolektiv (MORTENSEN, *et al.*, 2006) zjistili, že lepší pufrční kapacita cytosolu v bodě blízkém běžnému intracelulárnímu pH zlepšuje toleranci k solnému stresu. Regulace intracelulárního pH tak patrně hraje roli i ve schopnosti kvasinek snášet hyperosmotický stres. Při hyperosmotickém stresu se snižuje vnitrobuněčné pH, a to jednak inhibicí aktivity Pma1p (MARTINEZ DE MARANON, *et al.*, 2001), jednak pasivním zvyšováním koncentrace protonů (VINDELOV a ARNEBORG, 2002). K inhibici aktivity Pma1p by mohlo docházet v důsledku deformace membrány (a s tím spojených konformačních změn Pma1p proteinu) při smršťování objemu u buňky vystavené solnému stresu. Aktivita Pma1p proteinu

by tak mohla být regulována strukturou lipidické dvojvrstvy (MARTINEZ DE MARANON, *et al.*, 2001). Spojení lipidického složení s aktivitou membránové H<sup>+</sup>-ATPasy uvádí i Aguilera a kolektiv (AGUILERA, *et al.*, 2006), podle nichž aktivita závisí zejména na poměru sterolů a fosfolipidů v lipidické dvojvrstvě.

Role membrány a transportu protonů je známá i při ethanolovém stresu. Kmeny lépe adaptované na ethanolový stres obsahují v membráně více ergosterolu a nenasycených mastných kyselin obsahujících jednu dvojnou vazbu a mají rovněž vyšší aktivitu H<sup>+</sup>-ATPasy (AGUILERA, *et al.*, 2006).

Ukazuje se, že membrána hraje roli také ve vnímání změn okolního pH. Změna intracelulárního pH u kvasinek vlivem změny dostupnosti živin může být vnímána signálním lipidem kyselinou fosfatidovou, jež funguje jako biosenzor pH a jejíž protonace/deprotonace ovlivňuje vazbu určitých proteinů (například transkripčního faktoru Opi1) na membránu, a nepřímě tedy i genovou expresi (YOUNG, *et al.*, 2010).

### 3.1.3 Růst *S.cerevisiae* v zásaditém pH

Jak již bylo zmíněno, pH okolního prostředí posunutě směrem ke kyselejším hodnotám je pro růst kvasinky *S.cerevisiae* vhodnější než pH neutrální či alkalické, přičemž k okyselování vnějšího prostředí dochází zejména činností Pma1p protonové ATPasy pumpující protony ven z buňky. Protonový gradient vytvořený tímto proteinem je využívám k příjmu řady živin pomocí sekundárního transportu (SERRANO, *et al.*, 2006; VAN DER REST, *et al.*, 1995).

Zásadité pH okolního prostředí představuje pro kvasinku *S.cerevisiae* stresovou situaci – dochází například ke snížení dostupnosti některých živin (fosfátu či kationtů mědi a železa) a zvyšuje se rovněž míra oxidativního stresu (SERRANO, *et al.*, 2006). V určitých fázích životního cyklu se ale *S.cerevisiae* bez zásaditého pH okolí neobejde - je potřebné například pro správný průběh sporulace, kdy funguje jako signál stimulující sporulaci (OHKUNI, *et al.*, 1998). Alkalické pH jako signál „buňka-buňka“ potřebný pro sporulaci buněk v koloniích uvádí i Piccirillo a kolektiv (PICCIRILLO, *et al.*, 2010).

Byla nalezena řada proteinů, jejichž činnost je pro růst v alkalickém pH zcela zásadní. Při růstu v zásaditém pH je nezbytná správná činnost vakuolární H<sup>+</sup>-ATPasy, která musí

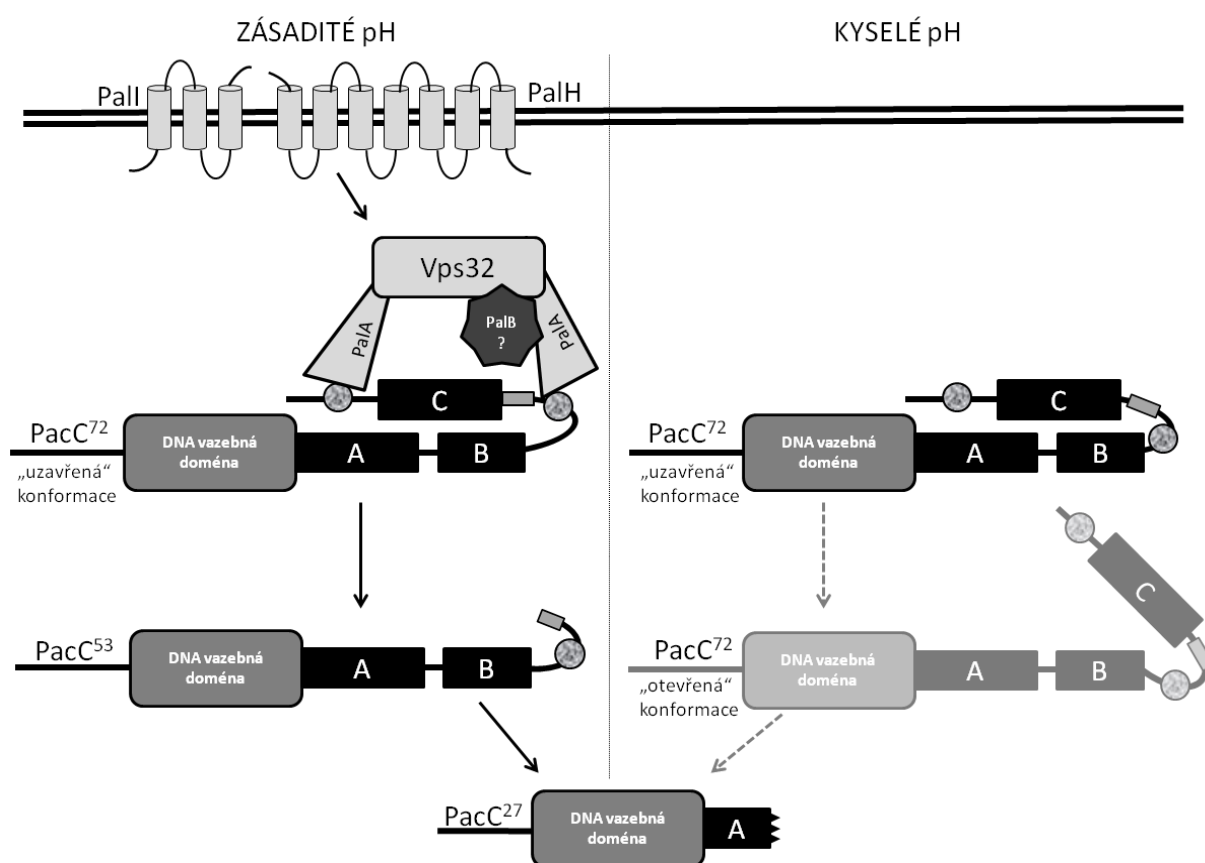
intenzivněji okyselovat vnitřní prostředí vakuoly při endocytóze v zásaditém prostředí. Delece některého z genů, jež kódují jednotlivé podjednotky vakuolární  $H^+$ -ATPasy (na rozdíl od membránové  $H^+$ -ATPasy Pma1p je kvasinková vakuolární  $H^+$ -ATPasa tvořena mnoha podjednotkami a strukturou připomíná mitochondriální  $F_0F_1$  ATP-syntasu), vede k citlivosti výsledných kmenů k vysokému pH, nejvíce senzitivní jsou kmeny s delecí některého z genů *VMA2*, *VMA4*, *VMA5*, *VMA6*, *VMA7* a *VMA22* (SERRANO, *et al.*, 2004). Klíčová je také činnost membránové  $Na^+$ -ATPasy Ena1p (její produkce rapidně vzrůstá při osmotickém či alkalickém stresu) (LAMB, *et al.*, 2001; PLATARA, *et al.*, 2006). Růstový defekt při kultivaci v médiu s alkalickým pH vykazují rovněž kmeny s delecí genů kódujících proteiny zajišťující homeostázi kovových iontů, metabolismus aminokyselin, fosfátu a lipidů či biogenezi vakuol (GIAEVER, *et al.*, 2002; SERRANO, *et al.*, 2004). Hledáním genů zásadních pro růst v alkalickém pH se zabývali Serrano a kolektiv (SERRANO, *et al.*, 2004). Provedli transformaci buněk *S.cerevisiae* genomovou knihovnou nesenou vysokokopiovými plazmidy. Cílem bylo vytipovat geny, jejichž zvýšená exprese povede k vyšší toleranci k alkalickému pH. Toleranci k alkalickému pH se podařilo zvýšit při zvýšené expresi genů *FET4* a *CTR1* – tyto geny byly zároveň jediné s kýženým účinkem (Serrano 2004). *FET4* gen přitom kóduje nízkoafinitní transportér železa (DIX, *et al.*, 1994), *CTR1* gen pak vysokoafinitní transportér mědi (DANCIS, *et al.*, 1994), jedná se tedy o geny pro transportéry kationtů, jejichž dostupnost je v alkalickém pH snižena.

### *Rim101/PacC dráha*

Regulace genové exprese při zvýšení okolního pH je nejlépe prostudována u *Aspergillus nidulans* (PENALVA a ARST, 2004). Odpověď na pH média je zde zprostředkována transkripčním aktivátorem PacC, jehož translací vzniká neaktivní 674 aminokyselin dlouhý produkt PacC72 o velikosti 72 kDa (MINGOT, *et al.*, 1999; OREJAS, *et al.*, 1995). PacC aktivuje expresi „alkalických“ genů a inhibuje expresi genů „acidických“ (TILBURN, *et al.*, 1995). Na kontrole genové exprese se podílejí různě dlouhé fragmenty PacC (obr. 3). Přítomnost fragmentu PacC27 (o velikosti 27 kDa) je nezávislá na pH, fragment PacC53 (o velikosti 53 kDa) není při růstu v kyselém pH detekovatelný, jeho přítomnost je tedy podmíněna neutrálním či alkalickým okolním pH. Obě zkrácené formy PacC jsou lokalizovány v jádře a vážou DNA, nicméně zatímco PacC27 se prokazatelně účastní regulace transkripce, zůstává funkčnost PacC53 při regulaci transkripce otázkou (DIEZ, *et al.*, 2002).



Informaci o neutrálním či alkalickém okolním pH přenášejí produkty 6 genů: *pala*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, a *pall*. PalH a Pall proteiny (Pall obsahuje 3 a PalH 7 transmembránových domén, oba tyto proteiny jsou lokalizovány na plazmatické membráně (PENALVA, *et al.*, 2008)) jsou patrně zodpovědné za přijetí signálu o alkalickém pH, kdy Pall zřejmě napomáhá lokalizaci PalH protein do cytoplazmatické membrány a PalH je vlastním senzorem (PENALVA a ARST, 2004; PENALVA, *et al.*, 2008).



Obr. 3: Regulace odpovědi *Aspergillus nidulans* na pH. Pokud je pH okolí alkalické, odštěpí s největší pravděpodobností protéza PalB C-konec uzavřené formy PacC72 proteinu za vzniku fragmentu PacC53. PacC53 fragment je snadno přístupný dalšímu proteolytickému štěpení - vzniká PacC27 forma proteinu, jež je vlastním regulátorem genové exprese. Nicméně i v situaci, kdy je pH okolí kyselého, vyskytuje se část molekul PacC72 proteinu v tzv. otevřené konformaci, která může být štěpena za vzniku PacC27. (upraveno a zjednodušeno podle (PENALVA, *et al.*, 2008))

Orthologem PacC proteinu u kvasinek *S.cerevisiae* a *C.albicans* je Rim101p protein. Na rozdíl od PacC je Rim101p protein *S.cerevisiae* štěpen pouze na jednom místě a odpověď na vysoké pH zprostředkovává nepřímo (PENALVA a ARST, 2002) tím, že reprimuje expresi genů *NRG1* a *SMP1* pro transkripční represory Nrg1p a Smp1p. Právě delece *NRG1* a *SMP1* genů potlačuje vliv delece *RIM101* genu z hlediska invazivního růstu, sporulace i tolerance k sodným a lithným iontům (LAMB a MITCHELL, 2003). Nrg1p protein se podílí na glukosové represi (PARK, *et al.*, 1999; ZHOU a WINSTON, 2001) a reguluje rovněž odpověď na alkalické pH a filamentární růst (KUCHIN, *et al.*, 2002), Smp1p protein hraje rovněž roli v odpovědi na alkalické pH (LAMB a MITCHELL, 2003). Regulační dráhy vedoucí přes Rim101p (a tedy i přes Nrg1p a Smp1p proteiny) jsou nicméně nezbytné jen pro expresi některých genů odpovědi na alkalické pH (LAMB, *et al.*, 2001).

Mezi geny aktivované Rim101/PacC drahou patří i geny požadované pro sporulaci - Rim101p protein funguje jako represor negativního regulátoru sporulace a invazivního růstu - již zmiňovaného Smp1p proteinu (LAMB a MITCHELL, 2003). Sporulace sama o sobě je v rozmezí pH 7,5-8,5 výrazně závislá na pH, podíl sporulujících buněk se s rostoucím pH zvyšuje. Jelikož kmeny *rim101* a *rim13* s delecí genů kódujících proteiny Rim101p a Rim13p mají míru sporulace sniženu, je Rim101/PacC dráha patrně zodpovědná za zahájení odpovědi na alkalické pH a sporulace (PICCIRILLO, *et al.*, 2010).

U patogenní kvasinky *C.albicans* zajišťuje expresi genů nezbytných pro adaptaci na neutrální až alkalické pH rovněž Rim101p, a to přímo vazbou na promotory příslušných genů (KULLAS, *et al.*, 2007). U tohoto patogenního organismu je schopnost odpovědi na pH okolního prostředí klíčová, jelikož *C.albicans* se v těle hostitele setkává s prostředím o různém pH od kyselého v žaludku či pochvě až po neutrální v tlustém střevě. Zároveň se ukazuje, že udržování pH homeostáze v buňce *C.albicans* je klíčové pro patogenitu tohoto mikroorganismu – například vyřazení vakuolární ATPasy z funkce vede k avirulenci *C.albicans* (ZHANG, *et al.*, 2010). Spojení pH s patogenitou je dokumentováno i u *Aspergillus fumigatus*, kdy delece genu *pacC* vede ke ztrátě infekčnosti kmene (BIGNELL, *et al.*, 2005).

### *Mds3p protein*

Vedle Rim101p proteinu je dalším proteinem, jež hraje roli v regulaci odpovědi na alkalické pH u *C.albicans* (a to nezávisle na Rim101p), Mds3p protein (DAVIS, *et al.*, 2002).

Mds1p protein je nezbytný pro interakci hostitele s patogenem - myši infikované *mds3/mds3* kmenem s delecí obou alel *MDS3* genu přežívaly průměrně delší dobu než myši infikované divokým kmenem (5 dní namísto 3 dní), zatímco u myši infikovaných kmenem *mds3/mds3* s mimochromozomální kopíí *MDS3* genu byla průměrná doba přežívání stejná jako u kmene rodičovského. U kmene *rim101/rim101* byla doba přežívání myši oproti rodičovskému kmeni dokonce výrazně delší (12 dní namísto 3 dní), nejdéle přežívaly myši infikované kmenem *mds3/mds3 rim101/rim101* (24 dní). Toto zjištění podporuje nezávislou funkci Mds3p a Rim101p proteinů (DAVIS, *et al.*, 2002). V genomu *S.cerevisiae* jsou kódovány 2 homology Mds3p proteinu, Mds3p (také Rim11p) a Pmd1p, jež hrají roli v regulaci meiosis (BENNI a NEIGEBORN, 1997). Kmen *S.cerevisiae mds3/pmd1* s delecí obou těchto genů není schopen růstu na médiu o pH 9, role Mds3p proteinu v adaptaci na vysoké okolní pH je tedy patrně zachována u různých druhů (DAVIS, *et al.*, 2002).

### *Kalcineurin*

Dalším proteinem hrajícím roli v toleranci k alkalickému pH je kalcineurin. Bylo zjištěno, že blokování funkce této vápníkem aktivované proteinové fosfatasy sestávající ze dvou podjednotek (KLEE, *et al.*, 1979) pomocí inhibitoru FK506 (jiným názvem také takrolimus nebo fujimycin) brání expresi některých genů hrajících roli při odpovědi na alkalické pH (*ENA1, PHO89*) (SERRANO, *et al.*, 2002). Vystavení buněk alkalickému pH způsobuje zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě, jež vede k aktivaci kalcineurinu a tím pádem i kalcineuremem regulovaného transkripčního faktoru Crz1p aktivujícího transkripci genů zahrnutých v odpovědi na stres (VILADEVALL, *et al.*, 2004).

### *cAMP/PKA dráha*

Roli v reakci na alkalický stres hraje rovněž cAMP/PKA dráha. Po přemístění buněk z média o pH 5,5 do média o hodnotě pH 8 došlo v prvních 5-15 minutách k výraznému snížení hladiny cAMP, původní hladina byla obnovena po 30 minutách (CASADO, *et al.*, 2011). (Naopak bylo pozorováno zvýšení hladiny cAMP při náhlém okyselení cytosolu (COLOMBO, *et al.*, 1998). Snížení hladiny cAMP po vystavení alkalickému stresu je v souladu se zjištěním, že zavedení mutací spojených se zvýšenou hladinou cAMP v buňce vede ke zhoršenému růstu na médiu o vysokém pH (CASADO, *et al.*, 2011). Citlivost k vysokému pH

je zvýšena rovněž u mutant se zvýšenou aktivitou PKA (citlivost k vysokému pH byla zjištěna např. u *bcy1* kmene s delecí regulační podjednotky cAMP dependentní proteinkinasy, a tudíž s konstitutivní aktivací PKA dráhy).

cAMP/PKA dráha hraje důležitou roli v regulaci metabolismu a proliferace, cílem jejího působení je řada transkripčních faktorů. Mezi nimi figurují i Msn2p a Msn4p proteiny, jež umožňují transkripci genů majících ve svém promotoru STRE (stress response element) element a jejichž delece vede ke zvýšené senzitivě v řadě stresových situací (MARTINEZ-PASTOR, *et al.*, 1996). Přitom Msn2p protein vstupuje téměř okamžitě po vystavení buňky alkalickému pH do buněčného jádra (CASADO, *et al.*, 2011). Jadernou lokalizaci vykazují hypofosforylované formy Msn2p a Msn4p proteinů – v této formě se pak vyskytují po vyčerpání glukosy či za stresových podmínek (např. při osmotickém či oxidativním stresu). PKA přitom udržuje Msn2p a Msn4p transkripční faktory ve fosforylovaném stavu (regulace lokalizace Msn2p protein aktivitou cAMP/PKA dráhy je výraznější než u Msn4p proteinu, buňka má tak patrně dva senzory s různou citlivostí (JACQUET, *et al.*, 2003). Vstup Msn2p do jádra při alkalickém stresu je tedy s největší pravděpodobností způsoben sníženou aktivitou PKA (CASADO, *et al.*, 2011).

PKA se rovněž podílí na fosforylaci již zmiňovaného Crz1p proteinu (KAFADAR a CYERT, 2004). Jelikož fosforylovaná forma tohoto proteinu má cytosolickou lokalizaci, může snížení aktivity PKA podporovat signalizaci přes calcineurin/Crz1p protein. Pomocí Crz1p proteinu je aktivována také exprese *ENA1* genu (v oblasti promotoru se nacházejí 2 kontrolní elementy: sekvence v -821 až -813 (5'-GAATGGCTG-3') váže Crz1p s nízkou afinitou a je zodpovědná za bazální transkripci *ENA1* genu, sekvence -727 až -719 (5'-GGGTGGCTG-3') je pak zodpovědná za vazbu Crz1p proteinu v rámci odpovědi na uvolnění vápníku) (MENDIZABAL, *et al.*, 2001).

### *Transportéry kationtů alkalických kovů*

Na udržování vnitrobuněčného pH se významnou měrou podílí také transportéry kationtů alkalických kovů, zejména pak  $K^+$  a  $Na^+$ . Transport kationtů alkalických kovů z buňky a do buňky je v řadě případů spojena s antiportem  $H^+$ , a právě protonmotivní síla slouží jako mechanismus umožňující transport těchto kationtů proti koncentračnímu gradientu. (ARINO, *et al.*, 2010). Zatímco vysoká vnitrobuněčná koncentrace  $Na^+$  je pro buňku

toxická, koncentrace  $K^+$  uvnitř buňky je udržována na poměrně vysoké hladině okolo 250 mM (RAMOS, *et al.*, 1990). Pokud je pH okolí vysoké a dojde k alkalizaci cytosolu, mohou buňky využívat gradient draselných kationtů na membráně k transportu  $H^+$  proti gradientu, tedy do buňky (BANUELOS, *et al.*, 1998).

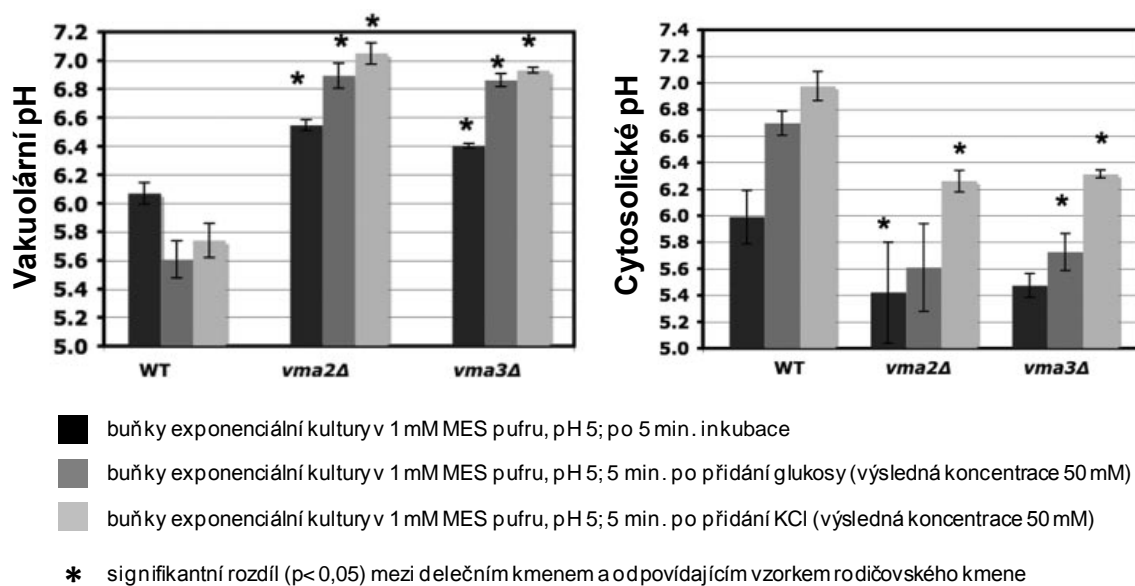
S antiportem vodíku je spojen transport kationtů alkalických kovů zprostředkovaný následujícími proteiny. Na cytoplazmatické membráně je lokalizován Nha1p protein,  $Na^+/H^+$  resp.  $K^+/H^+$  antiporter, jež zprostředkovává export  $Na^+/K^+$  ven z buňky za současného transportu  $H^+$  do cytosolu (BANUELOS, *et al.*, 1998; PRIOR, *et al.*, 1996). Na membráně pozdních endozómů se nachází Nhx1p, který transportuje  $H^+$  do cytosolu výměnou za  $Na^+$  či  $K^+$  (BRETT, *et al.*, 2005; DARLEY, *et al.*, 2000), stejnou funkci ve vakuolární membráně vykonává Vnx1p protein (CAGNAC, *et al.*, 2007).  $K^+/H^+$  antiporter Kha1p (RAMIREZ, *et al.*, 1998) je lokalizován uvnitř buňky (ne na cytoplazmatické membráně); je tak patrně důležitý hlavně pro udržování rovnováhy v iontovém složení uvnitř buňky a nehraje roli v exportu  $K^+$  ven z buňky (MARESOVA a SYCHROVA, 2005),  $K^+$  do Golgiho aparátu vstupují výměnou s  $H^+$  právě díky činnosti tohoto proteinu.

Právě s delecí řady z genů kódujících transporéry kationtů alkalických kovů je spojena porucha regulace vnitrobuněčného pH nebo pH organel. Zatímco *nha1* deleční kmen má cytosol alkaličtější než příslušný kmen rodičovský (SYCHROVA, *et al.*, 1999), cytosolické pH u *nhx1* delečního kmene je nižší než u rodičovského (BRETT, *et al.*, 2005). Akumulace  $Na^+$  iontů ve vakuole zprostředkovaná činností Nhx1p je závislá na gradientu pH (DARLEY, *et al.*, 2000). Činností Nhx1p tak dochází k alkalizaci endozómů a vakuol (NASS a RAO, 1998). Právě nadměrná kyselost vakuol by mohla způsobovat senzitivitu k nízkému pH u *nhx1* delečního kmene.

### *Vakuolární ATPasa*

Ukazuje se, že vakuolární ATPasa hraje vedle role v regulaci pH vakuolárního i důležitou roli v regulaci pH cytosolického. U kvasinek jsou kmeny bez V-ATPasové aktivity (*vma* mutanty) životaschopné (GIAEVER, *et al.*, 2002) (ačkoliv vykazují například menší přizpůsobivost z hlediska extracelulárního pH (SERRANO, *et al.*, 2004)), což umožňuje měření vnitrobuněčného pH v *vma* kmenech. Martinez-Munoz a Kane (MARTINEZ-MUNOZ a KANE, 2008) monitorovali vakuolární a cytosolické pH v rodičovském kmeni a kmenech *vma2* a

*vma3* s delecí genů *VMA2* a *VMA3* kódujících podjednotky V-ATPasy. Přidání glukosy nebo KCl k exponenciální kultuře rodičovského kmene (krátce hladovějící na glukosu) vedlo ke snížení pH ve vakuole a zvýšení pH cytosolu, u mutant *vma2* a *vma3* byl zaznamenán nárůst pH v obou případech, nicméně zvýšení cytosolického pH po přidání glukosy bylo u delečních kmenů na rozdíl od rodičovského kmene minimální a cytosolické pH bylo v těchto kmenech celkově nižší (obr. 4). U *vma* mutant byl navíc Pma1p protein přítomen na membráně v nižší míře než u rodičovského kmene. V-ATPasa a cytoplazmatická ATPasa Pma1p tak patrně spolupracují v udržování pH homeostáze v cytosolu (MARTINEZ-MUNOZ a KANE, 2008).



Obr. 4: Rozdíly ve vakuolárním a cytosolickém pH u buněk rodičovského kmene a *vma2* a *vma3* (černý sloupec) a vliv přidání glukosy (tmavě šedý sloupec) a KCl (světle šedý sloupec) na změnu vakuolárního a cytosolického pH. (Převzato z (MARTINEZ-MUNOZ a KANE, 2008) a upraveno.)

### *Wsc1* jako senzor pH

Citlivost k alkalickému stresu vykazuje také kmen s delecí genu *WSC1* (jehož proteinový produkt byl charakterizován jako transmembránový senzor, který reguluje *PKC1*-MAP kinasovou dráhu a je důležitý pro odpověď na tepelný šok a udržení integrity buněčné stěny (LODDER, *et al.*, 1999). Pokud ve *wsc1* kmeni došlo ke konstitutivní aktivaci Slt2p serin/threoninové MAP kinasy (jež hraje roli právě v udržení integrity buněčné stěny), byla jeho tolerance k vysokému pH zvýšená. K aktivaci exprese řady genů kódujících proteiny

buněčné stěny při vystavení vysokému pH dochází právě prostřednictvím Slt2p proteinu – alkalické prostředí pravděpodobně představuje pro buněčnou stěnu stresovou situaci. Právě Wsc1p protein by mohl fungovat jako senzor tohoto alkalického stresu na membráně a předávat signál dále do buňky. Pro správnou funkci Wsc1p proteinu je zároveň klíčová jeho manosylace – mutace v genech *PMT1* a *PMT2* (jež kódují proteiny ovlivňující manosylaci Wsc1p proteinu) rovněž vedly ke snížené toleranci k alkalickému pH (SERRANO, *et al.*, 2006).

## 3.2 Amoniaková signalizace

### 3.2.1 Plynné signalizační molekuly

Jak bylo uvedeno výše, komunikace mezi buňkami jednobuněčných i mnohobuněčných organismů probíhá nejen na základě fyzického kontaktu jednotlivých buněk, ale i na dlouhou vzdálenost pomocí molekul, které jsou uvolňovány do prostředí. Patrně nejznámějšími signálními molekulami jsou feromony (skupina biologicky aktivních látek sekretovaných organismem do okolí a sloužících ke komunikaci mezi jedinci) (KARLSON a LUSCHER, 1959)), které hrají důležitou roli například při rozmnožování u všech organismů od kvasinek až po savce včetně člověka. Role difuzibilního faktoru při párování kvasinek byla popsána na počátku 70. let (DUNTZE, *et al.*, 1970).

Vhodnými kandidáty na přenos signálu na dlouhou vzdálenost jsou molekuly plynů. Amoniak patří spolu s oxidem dusnatým, oxidem uhelnatým, sirovodíkem či ethylenem mezi plynné signalizační molekuly. Aby mohl plyn fungovat jako signalizační molekula, měl by být schopen difundovat přes biologické membrány, jeho produkce buňkou by měla probíhat regulovaně, mít specifický cíl působnosti a ovlivňovat biologické procesy ve fyziologických koncentracích (PUN, *et al.*, 2010). Důležité fyziologické role plní tyto plyny i přes jejich zjevnou toxicitu ve vyšších koncentracích.

#### 3.2.1.1 Oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík

Oxid dusnatý byl jako bioaktivní signální molekula poprvé popsán u savců. Roli zde hraje nejen v relaxaci hladké svaloviny, ale například i v apoptóze či imunitní odpovědi (viz níže). Existence difuzibilní substance hrající roli v relaxaci hladké svaloviny byla předpovězena již na začátku 80. let (FURCHGOTT a ZAWADZKI, 1980). V roce 1986 pánové Furchgott a Ignarro nezávisle navrhli, že by touto substancí mohl být oxid dusnatý či podobná molekula (MONCADA, *et al.*, 1988), a tato domněnka byla následně potvrzena (IGNARRO, *et al.*, 1987). V roce 1998 pak byla pánům Furchgottovi, Ignarrově a Muradovi za objevy související s vlivem oxidu dusnatého (NO) na kardiovaskulární systém udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu. Relaxace hladké svaloviny je vedle NO zprostředkována i oxidem uhelnatým (CO) a sirovodíkem (H<sub>2</sub>S), CO je však méně účinným relaxantem (FURCHGOTT a JOTHIANANDAN, 1991), H<sub>2</sub>S zase na rozdíl od NO a CO nepůsobí přes cGMP



či cAMP, ale způsobuje otevření draselných kanálů v buňkách hladké svaloviny cév (ZHAO a WANG, 2002).

Hladká svalovina cév není jediným cílem působnosti těchto plynů. Oxid dusnatý se vedle své role ve vasorelaxaci uplatňuje i v buněčné proliferaci (MOOCHHALA a RAJNAKOVA, 1999), nervové soustavě (MEFFERT, *et al.*, 1994), jeho hladina je také zvýšena při zánětlivé reakci a jeho neregulovaná syntéza je příčinou některých autoimunitních onemocnění (SCHMIDT a WALTER, 1994). Role NO v řadě vývojových procesů byla prokázána - podobně jako u živočichů - i u rostlin, u nichž se podílí na kontrole a regulaci široké škály buněčných funkcí. (SIROVA, *et al.*, 2011)

Oxid uhelnatý hraje rovněž roli v kardiovaskulárním systému a neurotransmisi (VERMA, *et al.*, 1993; ZAKHARY, *et al.*, 1996). Dále je známý svými protizánětlivými účinky, kdy podporuje tvorbu protizánětlivých a inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů (OTTERBEIN, *et al.*, 2000).

H<sub>2</sub>S může stimulovat zakončení senzoričkových neuronů a - podobně jako CO či NO - způsobovat uvolnění některých neurotransmiterů, konkrétně tachykininů (např. substance P) (LI, *et al.*, 2005). Sirovodík podporuje rovněž apoptózu buněk hladké svaloviny aorty (YANG, *et al.*, 2004), má vliv na funkci leukocytů (LI, *et al.*, 2005) a bylo prokázáno i jeho prozánětlivé působení *in vivo* (TREVISANI, *et al.*, 2005).

## Ethylen

Další známou plynnou signalizační molekulou je ethylen, rostlinný hormon s účinky na dozrávání ovoce, klíčení semen, opad listů a další děje. Za normálních podmínek, kdy je koncentrace tohoto hormonu nízká, je u *Arabidopsis thaliana* odpověď na účinky hormonu potlačena přímou interakcí receptorů ethylenu s proteinem CTR1 - komponentou mitogenem aktivované protein kinasové kaskády. CTR1 protein je touto přímou vazbou aktivován a zprostředkovává potlačení exprese genů potřebných pro odpověď na ethylen (CLARK, *et al.*, 1998), k uvolnění suprese pak dochází vazbou ethylenu na transmembránovou doménu ethylenového receptoru (WANG, *et al.*, 2006).

### 3.2.1.2 Oxid uhličitý

Jistým druhem signálu může být i oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>), jenž je ve vzduchu přítomen ve stálé koncentraci pohybující se mezi 0,036% a 0,039%. Gradient CO<sub>2</sub> může například

napomáhat živočichům k lokalizaci kořisti (GAUGLER, *et al.*, 1980). Dráha pro detekci CO<sub>2</sub> byla popsána i u kvasinek, přičemž vnímání CO<sub>2</sub> by mohlo hrát roli ve virulenci patogenních kvasinek *Cryptococcus neoformans* (MOGENSEN, *et al.*, 2006) a *Candida albicans* (KLENGEL, *et al.*, 2005) (zde reguluje přepínání fenotypu z tzv. "white" na tzv. "opaque" (HUANG, *et al.*, 2009). CO<sub>2</sub> je u kvasinek patrně detekován dvěma nezávislými drahami. Jedna z nich zahrnuje adenylát cyklastu a cAMP (MOGENSEN, *et al.*, 2006), za detekci CO<sub>2</sub> je zodpovědný Cyr1p protein, konkrétně Lys1373 jeho katalytické domény (HALL, *et al.*, 2010). Druhá dráha zahrnuje Rca1p transkripční regulátor (zprostředkovávající přeprogramování metabolismu dle dostupnosti CO<sub>2</sub> v prostředí) (COTTIER, *et al.*, 2012).

### 3.2.1.3 Amoniak a signalizace bakterií

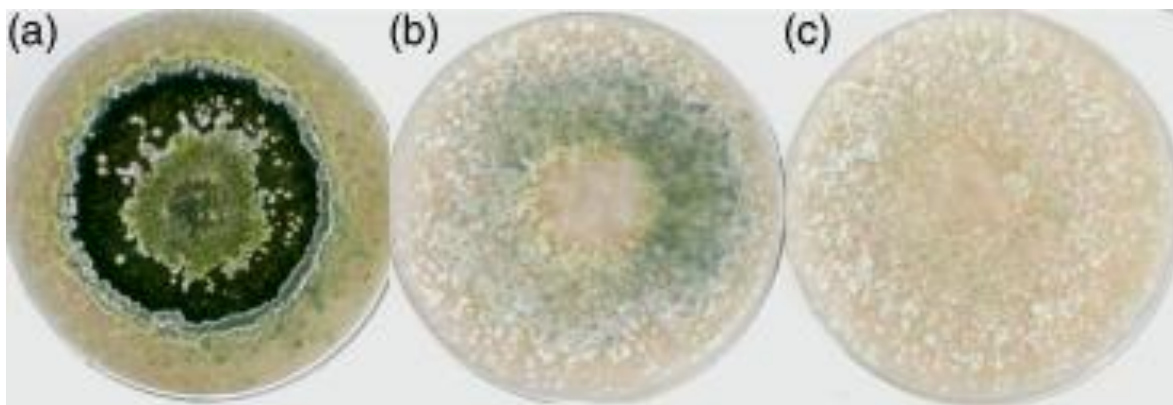
První zprávou o vnitrodruhové komunikaci mezi bakteriemi pomocí plynné molekuly je sdělení Nijlanda a Burgesse (NIJLAND a BURGESS, 2010), kteří zjistili indukci tvorby biofilmu u *Bacillus licheniformis*, pokud v blízkosti rostla jiná bakteriální kultura. Jako indukční molekulu pak identifikovali plynný amoniak. Tvorbu biofilmu u *B. licheniformis* byly schopny indukovat i v blízkosti rostoucí druhy *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* a *Escherichia coli*, odpověď na amoniakový signál byla funkční i při nadbytku dusíku v kultivačním médiu. Bakterie jsou tak schopny "cítit" jiné bakterie ve svém okolí a na tuto informaci odpovědět, molekulární mechanismus zatím zůstává neznámý (NIJLAND a BURGESS, 2010).

### 3.2.1.4 Další látky

Řada těkavých nízkomolekulárních organických látek (jako jsou alkoholy, aldehydy a ketony či uhlovodíky) funguje jako atraktanty či repelenty u různých druhů organismů (ORTIZ-CASTRO, *et al.*, 2009). Je známo, že čichový systém savců může rozpoznávat tisíce těchto molekul. Například 2,3-butandiol a 3-hydroxybutanon slouží i při komunikaci mezi rostlinou a mikroorganismy rhizosféry. Některé plynné látky produkované bakteriemi (jako je kyanovodík nebo amoniak) mohou ovlivňovat růst mycelia či sporulaci hub v rhizosféře (ORTIZ-CASTRO, *et al.*, 2009).

U půdní mikromycety rodu *Trichoderma* byla známa indukce tvorby konidií účinkem světla nebo hladověním. Nedávno byly jako signální molekuly spouštějící tvorbu konidií identifikovány osmiuhlíkaté látky 1-okten, 1-okten-3-ol a 3-oktanon, které byly schopny

navodit tvorbu konidií u kolonií rostoucích ve tmě. Navíc kolonie s již indukovanou tvorbou konidií byly schopny navodit jejich tvorbu u kolonií kultivovaných v neindukčních podmínkách (NEMCOVIC, *et al.*, 2008) (obr. 5).



Obr. 5: Indukce tvorby konidií u *Trichoderma atroviridae*. Kolonie, u níž byla tvorba konidií indukována světlem (a) byla kultivována v blízkosti jiné kolonie kultivované ve tmě (b), u níž rovněž spustila tvorbu konidií. U negativní kontroly (c) kultivované ve tmě izolovaně od indukující kolonie ke tvorbě konidií nedochází. (Převzato z (NEMCOVIC, *et al.*, 2008).)

### 3.2.2 Amoniaková signalizace u kvasinkových kolonií

#### 3.2.2.1 Amoniak jako zdroj dusíku

Amoniak je bezbarvý ve vodě dobře rozpustný plyn o souhrnném vzorci  $\text{NH}_3$  a molární hmotnosti  $17,031 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . pKa amoniaku je 9,23 ( $20^\circ\text{C}$ , 101,325 kPa). Při pH 9,23 je tedy poměr nabitě ( $\text{NH}_4^+$ ) a nenabitě formy ( $\text{NH}_3$ ) roven jedné. Pro kvasinku *S.cerevisiae* představují amonné ionty podobně jako asparagin či glutamin bohatý (a tedy preferovaný, pokud je v okolí přítomen) zdroj dusíku (HOFMAN-BANG, 1999). Příjem amonných kationtů zajišťují u kvasinek tři homologní proteiny Mep1p, Mep2p a Mep3p s rozdílnými kinetickými parametry. Své jméno (MEP=methylammonium permease) získaly tyto proteiny pro schopnost transportovat methylammonný kation ( $\text{CH}_3\text{NH}_4^+$ ), jež je analogem  $\text{NH}_4^+$ . Vysokoafinitní transportéry Mep1p a Mep2p ( $K_M$  po řadě 5-10  $\mu\text{M}$  a 1-2  $\mu\text{M}$ ) byly prvními objevenými transportéry amonných iontů u *S.cerevisiae*. Přítomnost třetí – nízkoafinitní - methylammonium permeasy u *S.cerevisiae*, Mep3p proteinu ( $K_M$  1,4-2,1 mM), byla zjištěna až později na základě sekvenční homologie. (MARINI a ANDRE, 2000; MARINI, *et al.*, 1997)

### 3.2.2.2 Amoniaková signalizace a diferenciacie kvasinkových kolonií

Jak již bylo uvedeno, jsou kolonie *S.cerevisiae* (ale i jiných druhů kvasinek, např. *Candida mogii* či *Rhodotorula glutinis*) po určité době růstu na médiu (jehož pH bylo zpočátku v oblasti kyselých hodnot) alkalizovat své okolí a produkovat signální molekulu - amoniak (PALKOVA a FORSTOVA, 2000; PALKOVA, *et al.*, 1997). Při dalším studiu tohoto jevu bylo ukázáno, že produkce amoniaku je závislá na přítomnosti aminokyselin v médiu a na přítomnosti transportérů aminokyselin (ZIKANOVÁ, *et al.*, 2002). Analýzou transkriptomu metodou "microarrays" bylo dále prokázáno, že vstup do alkalické fáze růstu spojené s produkcí amoniaku je spojen s rozsáhlými změnami v transkripci (PALKOVA, *et al.*, 2002). Nejvýraznější skupinou genů měnících expresi při přechodu z acidické do alkalické fáze vývoje kvasinkových kolonií byly geny pro metabolické enzymy: docházelo k potlačení exprese genů pro citrátový cyklus, oxidativní fosforylaci a další mitochondriální funkce, naopak indukována byla exprese řady genů metabolismu aminokyselin a nukleotidů, peroxizomální oxidace mastných kyselin a glyoxylátového cyklu. Dalším výrazným znakem u kolonií v alkalické fázi růstu byly změny v expresi genů pro membránové transportéry. Docházelo k represi exprese hexosových transportérů z *HXT* rodiny a genů *PMA1* i *PMA2* pro membránové  $H^+$ -ATPasy, zvýšila se i míra exprese transportérů fosfátových (*PHO84*, *PHO89*), sirných (*SUL1*, *SUL2*) a zinečnatých (*ZRT1*) iontů (PALKOVA, *et al.*, 2002). Tato data tak prokázala rozsáhlé přeprogramování metabolismu ve spojení s přechodem do alkalické fáze vývoje a s produkcí amoniaku.

Správný průběh signalizace pomocí amoniaku vede k diferenciaci buněk v kvasinkové kolonii. První experimenty zabývající se diferenciací ukázaly, že po vstupu do alkalické fáze vývoje se buňky zejména vnějšího okraje kolonie (jež je orientován do volného prostoru) začínají výrazně lišit od buněk středu kolonie (VACHOVA a PALKOVA, 2005). Staré a nově vznikající buňky jsou od sebe v rámci kolonie prostorově odděleny. Zatímco staré buňky zůstávají spíše ve středu kolonie, nově vznikající buňky jsou vytlačovány k okrajům, tedy místům s lepší dostupností živin. V průběhu první acidické fáze jsou buňky vystaveny zvyšujícímu se oxidativnímu stresu (PALKOVA, *et al.*, 2002). Díky signalizace pomocí amoniaku jsou při vstupu kolonií do alkalické fáze navozeny významné metabolické změny, které umožní alespoň některým buňkám kolonie snížit hladinu stresu: jsou to právě buňky okraje kolonie (VACHOVA a PALKOVA, 2005). Buňky středu kolonie naopak vykazují některé znaky dříve popsané pro kvasinkové apoptotické buňky (MADEO, *et al.*, 1997), jejich

regulovaná smrt by tak mohla hrát roli ve vyživování prosperujících buněk okraje kolonie (VACHOVA a PALKOVA, 2005).

Další získaná data o diferenciaci kvasinkových kolonií nicméně naznačují, že situace je složitější a rozlišení diferenciované kvasinkové kolonie pouze na centrální a okrajovou část je příliš zjednodušující. Pomocí dvoufotonové konfokální mikroskopie kvasinkových mikrokolonií bylo zjištěno, že kolonie je na povrchu kryta tenkou vrstvou buněk s ochrannou funkcí, jež zabraňuje v průniku škodlivých látek k buňkám vnitřní masy kolonie. Na příkladu prostorového uspořádání buněk produkujících/neprodukujících Ato1p-GFP protein na řezu kvasinkovou kolonií pak byla demonstrována přítomnost různých vrstev buněk v rámci kolonie (VACHOVA, *et al.*, 2009a). Detailnější analýza buněk na řezu kvasinkovou kolonií v alkalické fázi prokázala existenci 2 typů buněk snadno oddělitelných pomocí centrifugace v sacharosovém gradientu. Tzv. U (upper) buňky tvoří přibližně 150  $\mu\text{m}$  silnou horní vrstvu kolonie, tzv. L (lower) buňky pak přibližně 200  $\mu\text{m}$  silnou spodní vrstvu. Buňky těchto vrstev se výrazně liší v mnoha ohledech. U buňky jsou větší, odolnější ke stresu a schopné exportovat amoniak do okolního média, analýza transkriptomu u nich prokázala zvýšenou míru exprese zejména genů zahrnutých v metabolismu aminokyselin, translaci, transportu živin, iontů či vitaminů. Naopak L buňky jsou menší, ke stresu méně odolné, míra exportu amoniaku je u nich snižena a daly by se charakterizovat jako hladovějící buňky (CAP, *et al.*, 2012). Původní rozdělení kolonie na centrální a okrajovou část je tudíž do jisté míry zjednodušující.

### 3.2.2.3 Vliv delece vybraných genů na amoniakovou signalizaci

Jedním z genů, jejichž delece významně ovlivňuje signalizaci pomocí amoniaku u kvasinkových kolonií, je gen *SOK2* pro pleiotropní transkripční faktor Sok2p. Sok2p protein byl původně charakterizován jako supresor mutací v cAMP/PKA dráze (WARD a GARRETT, 1994). Je rovněž negativním regulátorem sporulace (SHENHAR a KASSIR, 2001). Dále se Sok2p účastní přepínání na pseudohyfální růst - je negativním regulátorem pseudohyfálního růstu v podmínkách, kdy je dusík limitujícím zdrojem (WARD, *et al.*, 1995), a toto patrně činí prostřednictvím kaskády transkripčních faktorů regulujících buněčnou adhezi (PAN a HEITMAN, 2000).

Možná role Sok2p proteinu v amoniakové signalizaci byla predikována na základě transkriptomové analýzy náhodnou mutagenézí vzniklého kmene, jež produkoval zvýšené množství amoniaku (PALKOVA, *et al.*, 2002). Následná charakterizace kmene s delecí *SOK2* genu ukázala, že tento kmen není schopen produkovat amoniak, a transkriptomová analýza tohoto kmene odhalila řadu změn (zejména metabolických změn a změn v expresi genů odpovědi na stres při vstupu do alkalické fáze vývoje) v porovnání s kmenem rodičovským (VACHOVA, *et al.*, 2004).

Vliv na amoniakovou signalizaci má rovněž delece některých genů podílejících se na obraně kvasinkové buňky před oxidativním stresem. Kolonie kmene *sod1* s delecí genu *SOD1* pro cytosolickou superoxiddismutasu mají morfologii srovnatelnou s kmenem rodičovským, kolonie kmenů *sod2* a *ctt1* s delecemi genu *SOD2* pro mitochondriální superoxiddismutasu, respektive *CTT1* pro cytosolickou katalasu, však v porovnání s rodičovským kmenem vykazují vážné problémy v amoniakové signalizaci a ve správném vývoji kvasinkové kolonie (CAP, *et al.*, 2009).

#### **3.2.2.4 Role Ato proteinů v amoniakové signalizaci**

##### *ATO1, ATO2 a ATO3 geny*

Když byla v roce 2002 provedena analýza transkriptomových změn metodou DNA čipů zaměřená na změny v genové expresi během přechodu kvasinkové kolonie z acidické do alkalické fáze vývoje, byly v té době nepojmenované geny kódované otevřenými čtecími rámci *YCR010c*, *YNR002c* a *YDR384c* jedněmi z nejvíce indukovaných genů v alkalické fázi (PALKOVA, *et al.*, 2002). Jelikož se jednalo o geny kódující proteiny s predikcí transmembránových domén a neznámou funkcí, staly se logicky předmětem zájmu pro další výzkum.

##### *Ato proteiny*

Ato1p (Ady2p), Ato2p (Fun34p) a Ato3p proteiny kódované *ATO* geny (*ATO1=YCR010c*, *ATO2=YN002c* a *ATO3=YDR384c*) patří do málo charakterizované Gpr1/Fun34/YaaH rodiny proteinů. Tato rodina zahrnuje homology YaaH proteinu bakterie *E. coli*, které se vyskytují u dalších bakterií, archeí, protozoí a některých hub. U vyšších eukaryot nebyly proteiny Gpr1/Fun34/YaaH rodiny nalezeny. Proteiny Gpr1/Fun34/YaaH

rodiny obsahují konsensus sekvenci NP(A/V/G)P(L/F/V)GL (vlastní rovněž členům MIP (major intrinsic protein) rodiny proteinů transportujícím vodu a rozpuštěné látky-soluty), která se u proteinů Gpr1/Fun34/YaaH rodiny nachází v jedné kopii v N-koncové části proteinu. Další konsensus sekvencí je sekvence (Y/F)G(X)FW (AUGSTEIN, *et al.*, 2003).

Sekvenční homologie je vysoká zejména u Ato1p a Ato2p proteinů, které se zcela shodují v 77% aminokyselinové sekvence, Ato3p protein se s ostatními dvěma proteiny shoduje méně: s Ato1p proteinem ve 30% a s Ato2p proteinem ve 29% aminokyselinové sekvence (obr. 6).

Genomová fúze *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* genů s genem pro zelený fluorescenční protein (GFP) potvrdila jejich predikovanou lokalizaci v cytoplazmatické membráně (GUARAGNELLA a BUTOW, 2003; RICICOVA, *et al.*, 2007). Zatímco rozmístění Ato2p-GFP proteinu v membráně je poměrně homogenní, objevuje se u Ato1p-GFP a Ato3p-GFP proteinů lokalizace připomínající lokalizaci v mikrodoménách bohatých na ergosterol a sfingolipidy (lokalizaci kvasinkových membránových proteinů v tomto typu mikrodomén popsali například Malínská a kolektiv (MALINSKA, *et al.*, 2003)). I přes mikroskopicky pozorované rozdíly v lokalizaci Ato-GFP proteinů byla potvrzena lokalizace všech Ato proteinů v membránových mikrodoménách (RICICOVA, *et al.*, 2007). Přítomnost Ato1p-GFP proteinu v mikrodoménách je navíc závislá na pH. Narozdíl od ostatních Ato-GFP proteinů je shlukování Ato1p-GFP proteinu patrné pouze v alkalické fázi vývoje kolonií. V *in vitro* experimentech přetrvává mikrodoménová lokalizace Ato1p-GFP pouze při  $\text{pH} \geq 6$ , v kyselém pH se shluky Ato1p-GFP proteinů rozpouštějí. To by mohlo souviset s pH regulací funkce Ato1p proteinu (RICICOVA, *et al.*, 2007).

### *Možné funkce Ato proteinů*

Byly publikovány dvě alternativní hypotézy navrhuující možnou funkci Ato1 proteinu. První z nich navrhuje roli tohoto proteinu v příjmu monokarboxylových kyselin - acetátu (PAIVA, *et al.*, 2004) a laktátu (PACHECO, *et al.*, 2012), de Kok a kolektiv (DE KOK, *et al.*, 2012) nicméně uvádějí, že k efektivnímu transportu laktátu do buněk pomocí Ato1p proteinu dochází až po záměně některých aminokyselin (konkrétně Leu219Val nebo Ala252Gly), a že nemutovaný Ato1p může sice patrně transportovat laktát, ale jen ve velmi omezené míře. Druhá hypotéza navrhuje roli Ato1p proteinu v exportu amonného kationtu ven z buňky (PALKOVA, *et al.*, 2002), Palková a kolektiv (PALKOVA, *et al.*, 2002) navíc navrhují shodnou

funkci i pro Ato2p a Ato3p proteiny. Pro Ato2p a Ato3p proteiny je to zároveň jediná doposud navržená funkce, poněvadž role Ato2p a Ato3p proteinů v transportu acetátu nebyla prokázána (PAIVA, *et al.*, 2004).

```

FUN34      MSDREQSSGNTAFE-NPKALDSSEGEFISENNDQSRHSQESICKIYTAGKNNEYIYIGRQ
ADY2      MSDKEQTSGNTDLENAPAGYYSSHDNDUNGUAEDEP SHDSLKGIYTG GDNNEYIYIGRQ
AT03      -----MTSSASSPQDLEKGVNTLENIETLPQQGSIAGUSQGFNP IQEIYSDRDFITLSS
           :*. : : . : .. . :. : * . :. : * .
           :. : * * :*. . : . * . * : * * * . * * * : . * * : * * * : * * * : * *

FUN34      KFLRDDLFEAFG--GTLNPLGAPAPVHKFANPAPLGLSGFALTTFULSMFNARAQGITIP
ADY2      KFLKSDLYQAFG--GTLNPLGAPAPVHKFANPAPLGLSAFALTTFULSMFNARAQGITUP
AT03      TYRRDLLNALDRGDGEEGNCAKYTPHQFANPUPLGLASFSL SCLVLSLINANVRGVTDG
           . : : * * :*. . : . * . * : * * * . * * * : . * * : * * * : * * * : * *

FUN34      NUUUGCAMFYGGLUQLIAGIWEIALENTFGGTALCSYGGFWLSFGAIYIPWFGILDAYKD
ADY2      NUUUGCAMFYGGLUQLIAGIWEIALENTFGGTALCSYGGFWLSFAAIYIPWFGILEAYED
AT03      KWALS LFMFFGGAIELFAGLLCFVIGD TYAMTUFSSFGGFWICYGYGLTDTDNLUSGYTD
           : . : . * * : * * : * * * * : . : : * . * : * * * * : . . . . . * *

FUN34      KESDLGNALGFYLLGWALFTFGLSUCTMKSTIMFFALFFLLAUTFLLLSIANFTGEUGUT
ADY2      NESDLNNA LGFYLLGWAI FTFGLTUCTMKSTUMFFLLFFLLALTFLLLSIGHFANRLGUT
AT03      P-TMLNNUIGFFLAGWTVFTFLMLMCTLKSTWGLFLLLTFLDLTFLLLCIGTFIDNNLK
           : * . * . : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * *

FUN34      RAGGULGUIVAFIAWYNAYAGIATRQNSYIMUHPFALPSNDKUFF
ADY2      RAGGULGUVUAFIAWYNAYAGUATKQNSYULARPFPLPSTERUIF
AT03      MAGGYFGILSSCCGWYSLYCSVUSPNSYLA FRAHTMPNAP----
           * * * : * : : : . * * . * . : : : . * * * : : . : : * .

ADY2      MSDKEQTSGNTDLENAPAGYYSSHDNDUNGUAEDEP SHDSLKGIYTG GDNNEYIYIGRQ
FUN34     MSDREQSSGNTAFE-NPKALDSSEGEFISENNDQSRHSQESICKIYTAGKNNEYIYIGRQ
           * * * : * * * * * * * : * * * . * * . : : . : : * * : * * : * * * . * * * * * * *

ADY2      KFLKSDLYQAFGGTLNPLGAPAPVHKFANPAPLGLSAFALTTFULSMFNARAQGITUPNU
FUN34     KFLRDDLFEAFGGTLNPLGAPAPVHKFANPAPLGLSGFALTTFULSMFNARAQGITIPNU
           * * * : . * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ADY2      UUGCAMFYGGLUQLIAGIWEIALENTFGGTALCSYGGFWLSFAAIYIPWFGILEAYEDNE
FUN34     UUGCAMFYGGLUQLIAGIWEIALENTFGGTALCSYGGFWLSFGAIYIPWFGILDAYKDKE
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ADY2      SDLNNA LGFYLLGWAI FTFGLTUCTMKSTUMFFLLFFLLALTFLLLSIGHFANRLGUTRA
FUN34     SDLGNALGFYLLGWALFTFGLSUCTMKSTIMFFALFFLLAUTFLLLSIANFTGEUGUTRA
           * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ADY2      GGULGUVUAFIAWYNAYAGUATKQNSYULARPFPLPSTERUIF
FUN34     GGULGUIVAFIAWYNAYAGIATRQNSYIMUHPFALPSNDKUFF
           * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : . : * * . * * * . : : * *

```

Obr. 6: Porovnání sekvencí Ato1p (Ady2), Ato2p (Fun34) a Ato3p proteinů



### *Amoniak/amonný kation*

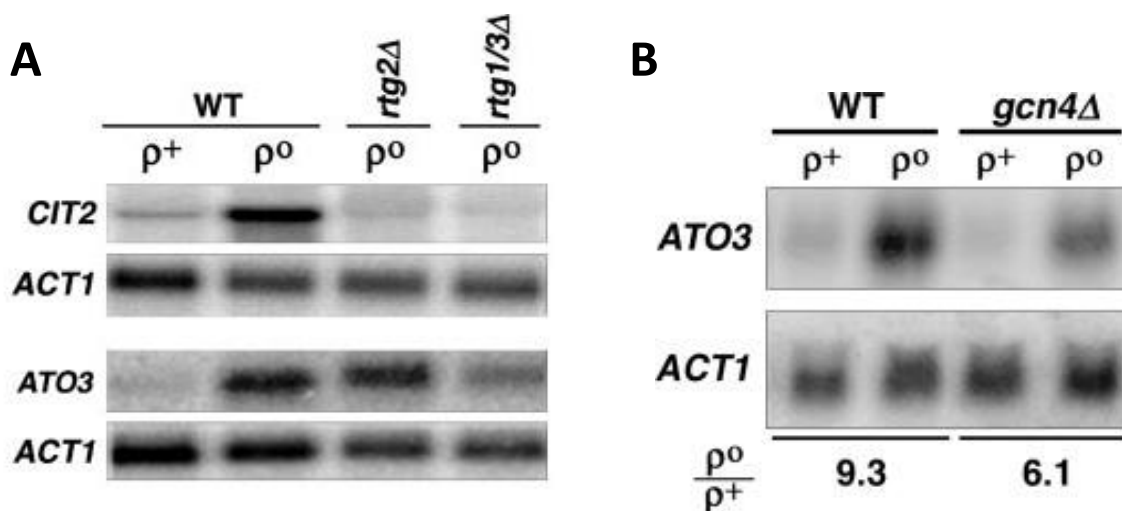
Gradient  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ani gradient  $\text{NaOH}$  nebyl na rozdíl od gradientu plynného amoniaku schopen indukovat produkci amoniaku u kolonií *C.mogii* (PALKOVA a FORSTOVA, 2000), pro efektivní indukci produkce amoniaku u kvasinkových kolonií je tedy zřejmě nutné dostatečné množství plynného amoniaku, který patrně na buňku působí poté, co do buňky penetruje difuzí skrze cytoplazmatickou membránu (viz níže) (PALKOVA a FORSTOVA, 2000; PALKOVA a VACHOVA, 2003). Ačkoliv vlastní signální molekulou je plynný amoniak, dle stávajícího modelu je pravděpodobné, že Ato proteiny transportují jeho protonovanou formu – amonný kation  $\text{NH}_4^+$ . Zvýšení pH v okolí kvasinkové kolonie v alkalické fázi (které může být dané jednak zvýšenou expresí některých symportérů živin a sníženou expresí Pma1p protonové pumpy před vstupem kvasinkové kolonie do alkalické fáze, jednak aktivací Ato proteinů, jež by svou činností mohly dále zvyšovat okolní pH (PALKOVA, *et al.*, 2002)) pak vede ke konverzi  $\text{NH}_4^+$  exportovaného do okolí na  $\text{NH}_3$  a k uvolňování amoniaku do okolní atmosféry (PALKOVA a VACHOVA, 2003).

Jednou z hypotéz bylo, že receptorem hrajícím roli v amoniakové signalizaci by mohl být Mep2p, o němž bylo známo, že monitoruje hladinu extracelulárního  $\text{NH}_4^+$  (LORENZ a HEITMAN, 1998). Navíc se objevila i hypotéza, že substrátem Mep proteinů by nemusel být amonný kation, ale plynný amoniak (SOUPENE, *et al.*, 2001). Delece libovolné kombinace Mep1p, Mep2p a Mep3p (ať už se jednalo o delece jednoduché a dvojité či deleci trojitou) nicméně nijak neovlivnila alkalizaci okolního média ani produkci amoniaku při porovnání s kmenem rodičovským (ZIKANOVÁ, *et al.*, 2002). Nelze vyloučit roli jiného receptoru ve zprostředkování signálu  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ , přímý efekt amoniaku se ale zdá být pravděpodobnější (arteficiální zdroj plynného amoniaku spolehlivě indukuje produkci amoniaku a přechod do alkalické fáze vývoje (PALKOVA a FORSTOVA, 2000)), mechanismus působení amoniaku však není znám.

### *Role Ato3p v respiračně deficientních kmenech*

U respiračně deficientních kmenů kvasinek (tzv.  $\rho^0$  petit kmenů postrádajících mitochondriální DNA) je aktivována meziorganelová signální dráha nazývaná dráha retrogradní regulace. V důsledku její aktivace dochází ke změnám exprese u řady genů, které umožňují buňce přizpůsobit se respiračně deficientnímu stavu. Ačkoliv exprese většiny genů nezbytných pro přestavbu metabolismu je u respiračně deficientních kmenů pod kontrolou

Rtg1p, Rtg2p a Rtg3p regulačních proteinů (Rtg1p a Rtg3p jsou transkripční faktory, Rtg2p reguluje jejich lokalizaci v rámci buňky (SEKITO, *et al.*, 2000); exprese skupiny genů důležitých pro respiračně deficientní buňku je na Rtg proteinech nezávislá, a do této skupiny byly zařazeny i geny *ATO1* a *ATO3* (EPSTEIN, *et al.*, 2001). Příčina zvýšené exprese *ATO3* genu v  $\rho^0$  petit kmenech byla dále studována (GUARAGNELLA a BUTOW, 2003). Nezávislost exprese *ATO3* genu na Rtg proteinech byla ověřena pomocí Northern blot analýzy (obr. 7A), ukázáno bylo naopak, že exprese *ATO3* genu je pod kontrolou transkripčního aktivátoru Gcn4p (jež je nezbytný pro plnou expresi *ATO3* genu, ale nehraje roli při zvýšení exprese *ATO3* genu v  $\rho^0$  kmenech) (obr. 7B). Dále byla potvrzena kontrola exprese *ATO3* genu Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS) systémem senzorů extracelulárních aminokyselin, jež je požadován pro zvýšenou expresi *ATO3* genu u  $\rho^0$ -petit buněk (FORSBERG, *et al.*, 2001; GUARAGNELLA a BUTOW, 2003). Závislost exprese *ATO3* genu na SPS systému je navíc v souladu se zjištěním, že produkce amoniaku u kolonií kmenů s defektem v SPS systému je snižena (ZIKANOVÁ, *et al.*, 2002). Guaragnella a Butow (GUARAGNELLA a BUTOW, 2003) předpokládají, že výrazné zvýšení exprese *ATO3* genu v  $\rho^0$  petit buňkách by mohlo pomoci předejít toxickým účinkům nadbytku amoniaku, který v respiračně deficientních buňkách může vznikat v důsledku defektu v asimilaci amoniaku. (GUARAGNELLA a BUTOW, 2003)



Obr. 7: A) Exprese *CIT2* genu (gen jehož exprese je závislá na Rtg proteinech) a *ATO3* genu v  $\rho^0$  a  $\rho^+$  rodičovském kmeni a kmenech a  $\rho^0$  kmenech *rtg2Δ* s delecí *RTG2* genu a *rtg1/3Δ* s delecí *RTG1/RTG3* genů. B) Exprese *ATO3* genu v  $\rho^0$  a  $\rho^+$  rodičovském a *gcn4Δ* kmeni a kmen, v obou případech srovnávána s expresí kontrolního genu *ACT1* pro aktin (převzato z (GUARAGNELLA a BUTOW, 2003) a upraveno).

### 3.2.2.5 Funkce homologů Ato proteinů

Homologii s Ato1p, Ato2p a Ato3p proteiny vykazují proteiny Gpr1/Fun34/YaaH rodiny. Ačkoliv u proteinů zařazených do této rodiny není konkrétní role v buňce dosud uspokojivě vyřešena, některé z nich jsou spojovány s transportem acetátu či rolí v adaptaci k růstu na kyselině octové jako zdroji uhlíku.

AcpA protein vláknité houby *Aspergillus nidulans* byl v nedávné době identifikován jako permeasa pro acetát (ROBELLET, *et al.*, 2008). Po Ady2p (Ato1p) je to tak další protein z Gpr1/Fun34/YaaH rodiny, jemuž je přisuzována role v transportu acetátu do buňky.

S acetátem/kyselinou octovou je spojován i další z homologů Ato proteinů – Gpr1p protein z *Yarrowia lipolytica*. Dle Augsteina a kolektivu (AUGSTEIN, *et al.*, 2003) potlačuje tento membránově lokalizovaný protein adaptační procesy pro růst na kyselině octové, pokud tento zdroj uhlíku není v médiu přítomen. Za přítomnosti kyseliny octové je pak Gpr1p inaktivován, což vede k aktivaci adaptačních mechanismů. Bylo zjištěno, že určité mutace v rámci Gpr1p zabraňují jeho deaktivaci, a tím i spuštění adaptačních procesů. Tyto mutace vedou k nadměrné senzitivě kmenů ke kyselině octové, která se projevuje neschopností růstu na kyselině octové za sníženého pH (pH=4) (GENTSCH, *et al.*, 2007). Molekulární mechanismus, kterým působí Gpr1p v rámci adaptačních procesů, zůstává neznámý.

Gpr1p protein se v buňce vyskytuje ve fosforylované i defosforylované formě, k fosforylaci dochází na N-koncovém serinu Ser37 (GENTSCH a BARTH, 2005). Vzhledem k tomu, že vyčerpání zdroje uhlíku vede k defosforylaci Gpr1p proteinu, a naopak přidání nového zdroje uhlíku k opětné fosforylaci určité frakce buněčného Gpr1p (v případě přidání acetátu jako zdroje uhlíku dokonce k fosforylaci všech molekul Gpr1p), mohl by tento protein vedle adaptace na růst na kyselině octové hrát roli i v adaptaci na nové zdroje uhlíku (GENTSCH a BARTH, 2005).

### 3.2.2.6 Exprese Ato proteinů v "microarray" analýzách

Před několika lety byla metoda sledování genové exprese pomocí mikročipů aneb „microarrays“ teprve v počátcích. V současné době je hojně využívána, nicméně ve srovnání s dobou nedávno minulou nebývají data získaná metodou „microarrays“ považována za samonosná. Změna (signifikantní zvýšení či snížení exprese v porovnání s kontrolou) exprese *ATO* genů byla pozorována v řadě experimentálních podmínek. Následuje tedy krátké shrnutí změn v expresi *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* genů za různých podmínek (zejména změn zajímavých z hlediska této práce).

## *Gen ATO1*

Exprese *ATO1* genu je zvýšená za podmínek růstu na glycerolu, oleátu či ethanolu (tedy na nezkvasitelných zdrojích uhlíku) v porovnání s růstem na glukose (LEVY, *et al.*, 2007; ROBERTS a HUDSON, 2006; SMITH a KRUGLYAK, 2008; SMITH, *et al.*, 2002). (Velmi výrazná transkripce *ATO1* genu na oleátu byla zjištěna také metodou SAGE (=Serial Analysis of Gene Expression) (KAL, *et al.*, 1999)). Exprese *ATO1* genu byla snížena po přidání glukosy k buňkám rostoucím v médiu s limitující koncentrací glukosy (LEVY, *et al.*, 2007) a zvýšena (v průběhu celého sledovaného intervalu 8 hodin) při hladovění na uhlík (BRADLEY, *et al.*, 2009). Tato zjištění jsou v souladu s informací o zvýšené expresi *ATO1* genu při “diauxickém shiftu“ (DERISI, *et al.*, 1997) a s faktem, že exprese *ATO1* genu je závislá na Cat8p transkripčním faktoru. Cat8p protein je nezbytný pro derepresi řady genů za podmínek oxidativního metabolismu, a tedy pro růst kvasinek na nefermentovatelném zdroji uhlíku. Během růstu na glukose není gen *CAT8* exprimován (HAURIE, *et al.*, 2001). Zvýšená exprese byla dále zjištěna ve stacionární fázi - jednak ve všech sledovaných časech (12 hodin až 13 dní) při sledování transkriptomových změn během progresu stacionární fáze (GASCH, *et al.*, 2000), jednak při vstupu buněk do stacionární fáze (SEGAL, *et al.*, 2003). Změny v expresi *ATO1* proteinu (indukce exprese) byly zaznamenány při sporulaci (FRIEDLANDER, *et al.*, 2006; CHU, *et al.*, 1998).

Zvýšená exprese byla zjištěna také při odpovědi na alfa-faktor (feromon hrající roli při párování kvasinek), indukce exprese se projevila v rozmezí 5-500 nM koncentrace alfa-faktoru (ROBERTS, *et al.*, 2000). Exprese *ATO1* genu je zvýšená při nedostatku zinku a ve kmeni *zap1* s delecí *ZAPI* genu pro transkripční faktor regulovaný hladinou zinku. (LYONS, *et al.*, 2000). K mírnému zvýšení exprese *ATO1* genu dochází za podmínek teplotního šoku (při přesunu z 25°C do 37°C) (GASCH, *et al.*, 2000; MATSUMOTO, *et al.*, 2005). Exprese *ATO1* genu je snížena za limitace fosfátem (výrazné snížení exprese) či sírou (mírné snížení exprese) (BRAUER, *et al.*, 2008).

## *Geny ATO2 a ATO3*

Expresní profily u *ATO2* a *ATO3* genů jsou v řadě podmínek totožné s expresním profilem genu *ATO1*, u genu *ATO2* nalezneme spíše mírné odlišnosti, exprese genu *ATO3* se liší častěji.

Expresí *ATO2* a *ATO3* genů je s expresí *ATO1* genu totožná za podmínek limitace fosfátem a sírou (BRAUER, *et al.*, 2008), při růstu na glycerolu v porovnání s růstem na glukose (LEVY, *et al.*, 2007) a při hladovění na uhlík (BRADLEY, *et al.*, 2009).

Stejně jako u *ATO1* genu je exprese *ATO2* genu zvýšená při nedostatku zinku a ve kmeni *zap1* s delecí *ZAP1* genu pro transkripční faktor regulovaný hladinou zinku, zatímco exprese *ATO3* genu zůstává za těchto podmínek v podstatě nezměněna (LYONS, *et al.*, 2000). Stejně tak v průběhu stacionární fáze se v expresním profilu shodují pouze geny *ATO1* a *ATO2*, u *ATO3* genu k výrazným změnám během progresu stacionární fáze nedochází (GASCH, *et al.*, 2000) či dochází k represí exprese během progresu stacionární fáze (SEGAL, *et al.*, 2003). Za podmínek teplotního šoku dochází (na rozdíl od *ATO1* a *ATO2* genů) k represí exprese genu *ATO3* (MATSUMOTO, *et al.*, 2005).

Zvýšená exprese *ATO2* a *ATO3* genů nebyla na rozdíl od *ATO1* genu zjištěna při sporulaci, naopak dochází spíše k represí těchto genů v pozdějších fázích průběhu sporulace (FRIEDLANDER, *et al.*, 2006; CHU, *et al.*, 1998). Co se týče odpovědi na alfa-faktor, není u exprese *ATO2* genu zjevná žádná odpověď, u *ATO3* genu dochází k mírné represí exprese se zvyšující se koncentrací alfa-faktoru (ROBERTS, *et al.*, 2000).

K výraznému snížení *ATO3* genu dochází u buněk vystavených působení peroxidu vodíku (BERRY a GASCH, 2008) (expresní data pro *ATO1* gen za těchto podmínek chybí).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité mikroorganismy

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>, recA1, endA1, gyrA96, thi<sup>-</sup>, supE44, relA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub>),  $\lambda$ <sup>-</sup>,  $\Delta$ (argF-lacZya), U169,  $\Phi$ 80 lac ZM15)

*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (MAT $\alpha$ , his3, ura3, leu2, lys2)

*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MAT $\alpha$ , his3, ura3, leu2, met15)

deleční kmeny ze sbírky Euroscarf:

*ato1* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YCR010c::kanMX4

*ato2* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNR002c::kanMX4

*ato3* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YDR384c::kanMX4

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

*jen1* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0;; YKL217w::kanMX4

*cat8* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0;; YMR280c::kanMX4

*stl1* BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0;; YDR536w::kanMX4

#### 4.1.2 Použité plazmidy

Plazmidy pKT209, pKT103, pKT128, pKT176 a pKT174 (Euroscarf) sloužily jako PCR templát k vytvoření kazety pro fluorescenční značení C-konce zvoleného proteinu (vytvoření fúzních proteinů s různými fluorescenčními proteiny) (tab. 1). Umožňují udržení, replikaci a selekci v buňkách *E.coli*, selekčním markerem pro buňky *E.coli* je ve všech případech ampicilinová rezistence Amp<sup>r</sup>.

<b>plazmid</b>	<b>aplikace</b>	<b>Marker pro selekci v <i>S.cerevisiae</i></b>	<b>reference</b>
pKT103	C-koncové značení YFP	kanamycin	(SHEFF a THORN, 2004)
pKT128	C-koncové značení GFP	<i>SpHIS5</i>	(SHEFF a THORN, 2004)
pKT174	C-koncové značení CFP	<i>CaURA3</i>	(SHEFF a THORN, 2004)
pKT176	C-koncové značení FP tdimer2	<i>CaURA3</i>	(SHEFF a THORN, 2004)
pKT209	C-koncové značení GFP	<i>CaURA3</i>	(SHEFF a THORN, 2004)
pUG27	delece genu	<i>SpHIS5</i>	(GUELDENER, <i>et al.</i> , 2002)
pUG72	delece genu	<i>KIURA3</i>	(GUELDENER, <i>et al.</i> , 2002)
pSH65	odstranění selekčních markerů	phleomycin	(GUELDENER, <i>et al.</i> , 2002)

Tabulka 1: Seznam plazmidů využitých pro konstrukci kmenů *S.cerevisiae* použitých v této práci. *Sp* = *Schizosaccharomyces pombe*, *Ca* = *Candida albicans*, *Kl* = *Kluyveromyces lactis*.

Plazmidy pUG27 a pUG72 jsem použila jako PCR templát pro přípravu delečních kazet. Tyto plazmidy umožňují udržení, replikaci a selekci v buňkách *E.coli*, selekčním markerem pro buňky *E.coli* je ve všech případech ampicilinová rezistence Amp<sup>r</sup>.

Plazmid pSH65 nesoucí gen pro *cre* rekombinasy byl využit k odstranění selekčních genů, pokud přítomnost těchto genů bránila dalším manipulacím se vzniklým kmenem. Gen pro *cre* rekombinasy se nachází pod kontrolou *GAL* promotoru, kvasinky transformované tímto plazmidem jsou rezistentní k phleomycinu. Selekčním markerem pro buňky *E.coli* je ampicilinová rezistence Amp<sup>r</sup>.

### 4.1.3 Použité primery (tab. 2)

primer	sekvence (5'→3')	použití
ATO1-FP-fw	TATGTA CTGGCTCGTCCATTCCCATTACCATCTACTG AAAGGGTA ATCTTTGGTGACGGTGCTGGTTTA	C-koncová fúze <i>ATO1</i> genu s FP
ATO1-FP-rev	AAA ACTACTCTTTTTATTTCAATAGTTCTCGTTATT AGTAGGTCGTCCTCTCGATGAATTCGAGCTCG	C-koncová fúze <i>ATO1</i> genu s FP
ATO2-FP-fw	TACATTATGGTCCATCCATTCGCATTACCTAGCAAT GATAAGGTGTTCTTCGGTGACGGTGCTGGTTTA	C-koncová fúze <i>ATO2</i> genu s FP
ATO2-FP-rev	TTAGAATATATAATAGGGGTA AAAAGTTATTTTAGCC TGCAC TTTTGTGTTTTTCGATGAATTCGAGCTCG	C-koncová fúze <i>ATO2</i> genu s FP
ATO3-FP-fw	CCTTCAAATTCTTATTTAGCCTTCAGGGCGCACACA ATGCCAAATGCTCCTGGTGACGGTGCTGGTTTA	C-koncová fúze <i>ATO3</i> genu s FP
ATO3-FP-rev	TTATTA AATCATTTTTAATGTTTTATAAGTTTTGTTTT CATTTTCATACCCTTCGATGAATTCGAGCTCG	C-koncová fúze <i>ATO3</i> genu s FP
JEN1-FP-fw	ATTGATT CGAACGTCTCAAAGACATATGAGGAGCAT ATTGAGACCGTTGGTGACGGTGCTGGTTTA	C-koncová fúze <i>JEN1</i> genu s FP
JEN1-FP-rev	GCAGTTACATAGAGAAGCGAACACGCCCTAGAGAG CAATGAAAAGTGATCGATGAATTCGAGCTCG	C-koncová fúze <i>JEN1</i> genu s FP
ATO1del-fw	GCACCAGCAGGATACTATAGTTCCCATGATAACGAC GTTAATGGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	delece <i>ATO1</i> genu
ATO1del-rev	GTCTATTAGCAAAGTGACCAATAGACAACAGTAGG AAAGTTAATGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	delece <i>ATO1</i> genu
ATO2del-fw	GCACCAGCAGGATACTATAGTTCCCATGATAACGAC GTTAATGGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	delece <i>ATO2</i> genu
ATO2del-rev	CTTCGCCTGTGAAGTTTGCAATGGATAGAAGTAAGA AGGTCACTGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	delece <i>ATO2</i> genu
ATO1prom-fw	ATGTGAGCAAGCCAAACAAG	ověřování delece, FP fúze
ATO2prom-fw	TTTGAAGTTCTTGACTACCCC	ověřování delece, FP fúze
ATO3prom-fw	CGGCTACAAACATAACTCCA	ověřování delece, FP fúze
ATO1-rev	CGTTGCCTTTCAATTACATGA	ověřování delece
ATO2-rev	TTAGCTTCATGGCAAGGCTT	ověřování delece
ATO3-rev	GTTTCTGTGCACATTTACCAA	ověřování delece
GFP-rev	CGGAGACAGAAAATTTGTGAC	ověřování GFP fúze
tdimer2-rev	GCGCATGAACTCTTTGATG	ověřování tdimer2 fúze
<i>KIURA3</i> -rev	CAAGTTCTTGATATTTGAGGAC	ověřování delece
KanMX4-rev	CGTGAGTCTTTTCCTTACCC	ověřování FP fúze
<i>CaURA3</i> -rev	GGTATCAACGTCAATTGATG	ověřování FP fúze
<i>SpHIS5</i> -rev	GTGGACAATAAGCATGTCC	ověřování delece
sonda ATO1-fw	GAATGCACCAGCAGGATACTA	sonda pro Northern blot
sonda ATO1-rev	GGACGAGCCAGTACATATGAA	sonda pro Northern blot
sonda RDN18-1-fw	TCCTGCCAGTAGTCATATGCT	sonda pro Northern blot
sonda RDN18-1-rev	TAATGATCCTTCCGCAGGTT	sonda pro Northern blot

Tabulka 2: Seznam primerů využitých pro přípravu a ověření delečních a fluorescenčně značených kmenů a sond pro Northern blot analýzu.



#### 4.1.4 Materiál pro práci s DNA a RNA

1x TBE pufr (ICN Biomedicals)

DECAprime II Ambion Kit

Ethidiumbromid

Fenol (DNA, Sigma)

Fenol:Chloroform 5:1 (RNA, Sigma)

NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)

PPP Master Mix (TopBio)

(150 mM Tris-HCl (pH 8,8), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 u/ml Taq Purple DNA polymerasa, stabilizátory, barviva)

Restrikční enzymy (MBI Fermentas)

Restrikční pufry (MBI Fermentas)

Ribonukleasa A (Sigma)

Salmon sperm ssDNA (BioLabs)

Skleněné kuličky (Sigma)

#### 4.1.5 Antibiotika

Ampicilin (Duchefa)

G418 (Duchefa)

Phleomycin (InvivoGen)

Hygromycin B (Duchefa)

#### 4.1.6 Ostatní

[U-<sup>14</sup>C] kyselina mléčná (sodná sůl; Amersham)

$\alpha$  <sup>32</sup>P dCTP-25  $\mu$ Ci (MGP)

autoradiografické štítky (Stratagene)

BKP (bromkresolový purpur) (Sigma)

GF/C filtry ze skelného mikrovlákná (Whatman)

laboratorní plastik (P-LAB a.s.)

Nesslerovo činidlo (PENTA)

scintilační kapalina (Opti-Phase HiSafe II; LKB FSA Laboratory Supplies)

vyvíjecí kazety (Cawo ABS cassette)

#### **4.1.7 Přístroje**

analytické váhy Metter AE200

ESCO horizontální laminární box

fluorescenční lupa Leica MZ 16F

fluorescenční mikroskop Leica DMR

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

horkovzdušná třepačka (Lab-Therm, Kühner, Switzerland)

hybridizační pec ProBlot (Labnet International)

kamera barevná Hitachi HV-C20

kamera barevná JENOPTIK ProgRes CT3

kamera monochromatická Cohu

kamera monochromatická JENOPTIK ProgRes MFcool

konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS

konfokální mikroskop Microtime 200 (PicoQuant, Berlin, Germany)

mikrocentrifuga a centrifuga s výkyvným rotorem Schoeller UNIVERSAL 320R

mikrocentrifuga Micro20 (Hettich)

mikrocentrifuga Spectrafuge 24D (Labnet International)

NANODROP1000 spektrofotometr (Thermo Scientific)

Packard Tri-Carb 2200 CA scintilační spektrofotometr

PCR termocycler „Minicycler“ (MS Research)

PCR termocycler gradientový BIOER XP cycler

pH-metr (Mettler Toledo)

předvážky KERN PCB

spektrofotometr S1200 (WPA Spectrawave Biochrom)

spektrofluorimetr FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon)

termostaty TERMOBOX LBT 168

UV stratalinker

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

vodní lázeň (Grant Instruments)

vortex Genie 2 (Scientific Industries)

vyhřívavý bloček (Torrey Pines Scientific INC)

zdroj pro elektroforézu (E-C Apparatus Corporation)

#### **4.1.8 Použité internetové databáze a počítačové programy**

GraphPAD software; San Diego, CA, U.S.A.

NCBI Blast

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>

Oligo Calculator

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

Saccharomyces Genome Database (SGD)

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

Sequence Manipulation Suite

<http://www.bioinformatics.org/sms2/>

SPELL

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

Yeasttrack

<http://www.yeastract.com/>

YeTFaSCo

<http://yetfasco.cabr.utoronto.ca/index.php>

#### 4.1.9 Roztoky a média

*Pozn.: Roztoky a média byly připravovány z destilované vody upravené přístrojem Ultrapur (Watrex). Demineralizovaná voda byla upravena stejným přístrojem. Základní chemikálie a aminokyseliny pocházejí v naprosté většině od společnosti Lachema Neratovice, ethidiumbromid, CaCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOLi, PEG, SDS a pufrů od společnosti SERVA, živné půdy od společnosti Imuna, agar od Kulich Pharma, aminy od společnosti FLUKA, BSA od ICN Biomedicals)*

##### 4.1.9.1 Jednoduché roztoky

1M LiAc	10,2 g CH <sub>3</sub> COOLi na 100 ml H <sub>2</sub> O
3M NaAc	24,6 g CH <sub>3</sub> COONa na 100 ml H <sub>2</sub> O
1000x EtBr	10 mg ethidium bromidu na 1 ml H <sub>2</sub> O
1M Tris-HCl	12,1 g Tris na 100 ml H <sub>2</sub> O pH upraveno HCl dle potřeby
0,5M EDTA-NaOH	18,6 g Na <sub>3</sub> EDTA na 100 ml H <sub>2</sub> O, pH 8 (popřípadě upraveno NaOH dle potřeby)
5M NaCl	29,3 g NaCl na 100 ml H <sub>2</sub> O
0,7% agarosa	70 mg agarosy rozvařeno v 10 ml H <sub>2</sub> O
1% agarosový gel	300 mg agarosy rozvařeno v 30 ml 0,5x TBE pufru
20x BKP	2 mg BKP (brom kresolového purpuru) na 1 ml H <sub>2</sub> O
50% PEG	10g PEG (doplnit H <sub>2</sub> O do 20 ml)
Vodný roztok amoniaku, methylaminu, propylaminu, oktylaminu, imidazolu, chloroquinu	v koncentraci dle potřeby
1M MOPSO	pH upraveno HCl dle potřeby
10% kys. citronová	10 g kys. Citronové na 100 ml H <sub>2</sub> O

0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$       pH upraveno NaOH na 5,0

#### 4.1.9.2 Složené roztoky

TBE 0,5x              (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 45 mM kyselina boritá)

RI                      (1% glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA-NaOH)

RII                     (0,2 M NaOH, 1% SDS)

RIII                    (29,44 g  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 11,5 ml ledové  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 100 ml)

Upravený chloroform (chloroform smíchan s isoamylalkoholem v poměru 24:1)

TES pufr              (10 mM Tris-HCl pH7,5, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS)

20x SSC              (175,3g NaCl, 88,2 g bezvodého citrátu sodného, upravit pH na 7, doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml,)

fosfátový pufr 0,5 M (46,3 ml 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 53,7 ml 1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

prehybridizační pufr (2g BSA, 180 ml 0,5M fosfátového pufru, 400  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA, 7 % SDS, doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 200 ml)

W1                     (0,5g BSA, 8 ml 0,5M fosfátového pufru, 200  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA, 5% SDS, doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 100 ml)

W2                     (16 ml 0,5M fosfátového pufru, 200  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA, 1% SDS, doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 100 ml)

BFM                    (50% glycerol, 0,13 M EDTA-NaOH, 0,12% bromfenolová modř)

Roztok RNasy        (10 mg ribonukleasy A, 10  $\mu\text{l}$  1 M Tris-HCl (pH 7,5), 3,5  $\mu\text{l}$  5 M NaCl, doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 1 ml; takto připravený roztok byl 15 min. povařen, pomalu ochlazen a dále skladován při teplotě  $-20^\circ\text{C}$ )

## Wickerhamův roztok

(0,2 mg biotin, 200 mg inositol, 20 mg riboflavin, 40 mg thiamin, 20 mg kyselina p-aminobenzoová, 40 mg pantothenát vápenatý, 40 mg kyselina nikotinová, 0,2 mg kyselina listová, 100 ml H<sub>2</sub>O)

### 4.1.9.3 Tekutá média

TPN	(0,5% kvasničný autolyzát, 0,5% NaCl, 1% baktopepton, 1% baktotrypton)
SOC	(0,5% kvasničný autolyzát, 2% baktopepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glukosa, odděleně sterilizujeme: 10 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 10 mM MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)
ŽBAmp	(2,5% živný bujón č.2 , po sterilizaci přidáme 50-100 µg ampicilinu na 1 ml média)
GM tekuté	(1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravíme pH na požadovanou hodnotu, sterilizujeme odděleně), 3% (v/v) glycerol)
YEPG tekuté	(1% kvasničný autolyzát, 1% pepton, 2% glukosa (sterilizujeme odděleně))

#### Tekuté médium s kyselinou octovou

(1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravíme pH na požadovanou hodnotu, sterilizujeme odděleně), 0,5% kys. octová (v/v), pH kys. octové upraveno na 5 pomocí NaOH, sterilizace filtrací)

#### Tekuté médium s kyselinou mléčnou

(1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravíme pH na požadovanou hodnotu, sterilizujeme odděleně), 0,5% kys. mléčná (v/v), pH kyseliny mléčné upraveno na 5 pomocí NaOH, sterilizace filtrací)

Tekuté médium s ethanolem

(1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravíme pH na požadovanou hodnotu, sterilizujeme odděleně), 1% ethanol (v/v), 96 % ethanol v potřebném množství přidán po sterilizaci)

Tekuté médium s glukózou

(1% kvasničný autolyzát, 2% glukosa (sterilizujeme odděleně))

Skladovací médium pro bakterie

(2,5% živný bujón č.2, 15% glycerol)

Skladovací médium pro kvasinky

(1% kvasničný autolyzát, 2% pepton, 10% glukosa (sterilizujeme odděleně), 60% glycerol)

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

(2% glukosa, 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05%  $\text{MgSO}_4$ , 20  $\mu\text{g}$  aminokyseliny\*) na 1 ml média, 50  $\mu\text{g}$  báze\*) na 1 ml média, 0,1% Wickerhamův roztok (přidáváme po sterilizaci)

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

#### 4.1.9.4 Pevná média

YEPG (1% kvasničný autolyzát, 1% pepton, 2% agar, 2% glukosa (sterilizujeme odděleně))

YEPG s antibiotikem (jako YEPG, po sterilizaci přidáme potřebné množství antibiotika, pro BY4742 jsem standardně používala:

400  $\mu\text{g}$  G418 na 1 ml média

400  $\mu\text{g}$  hygromycinu B na 1 ml média

50  $\mu\text{g}$  phleomycinu na 1 ml média (selekce při  $\text{pH} > 6$ )

- ŽA s ampicilinem (4% živný agar č.2, po sterilizaci přidáme 50-100 µg ampicilinu na 1 ml média)
- GM (1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravíme pH na 5, sterilizujeme odděleně), 2% agar, 3% glycerol, 30 mM CaCl<sub>2</sub> (sterilizujeme odděleně))
- GM + BKP (jako GM, po sterilizaci přidáme 0,01% BKP, který rozpustíme předem v 96% ethanolu (v 1/100 výsledného objemu média))

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

(2% agar, 2% glukosa, 0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 20 µg aminokyseliny\*) na 1 ml média, 50 µg báze\*) na 1 ml média, 0,1% Wickerhamův roztok (přidáváme po sterilizaci)

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

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sterilizace

Roztoky, média, párátko, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky jsem sterilizovala v autoklávu 20 min. při 120 kPa. Plastové centrifugační zkumavky a kyvety pro elektroporaci jsem sterilizovala parami kyseliny peroctové minimálně 24 hodin v uzavřeném igelitovém sáčku. Chemické sklo bylo sterilizováno suchým teplem při 160°C 180 min., drobné předměty žíháním nebo zapálením po namočení do ethanolu.

### 4.2.2 Uchování kvasinkových a bakteriálních kmenů

Kvasinkové kmeny jsem dlouhodobě uchovávala ve skladovacím médiu pro kvasinky při -80°C, bakteriální kmeny ve skladovacím médiu pro bakterie taktéž při -80°C.

### 4.2.3 Kultivace buněk

Při zahájení práce s příslušným kmenem jsem malé množství směsi skladovacího média s buňkami sterilně přenesla na agarovou plotnu (YEPG pro kvasinkové, ŽA pro



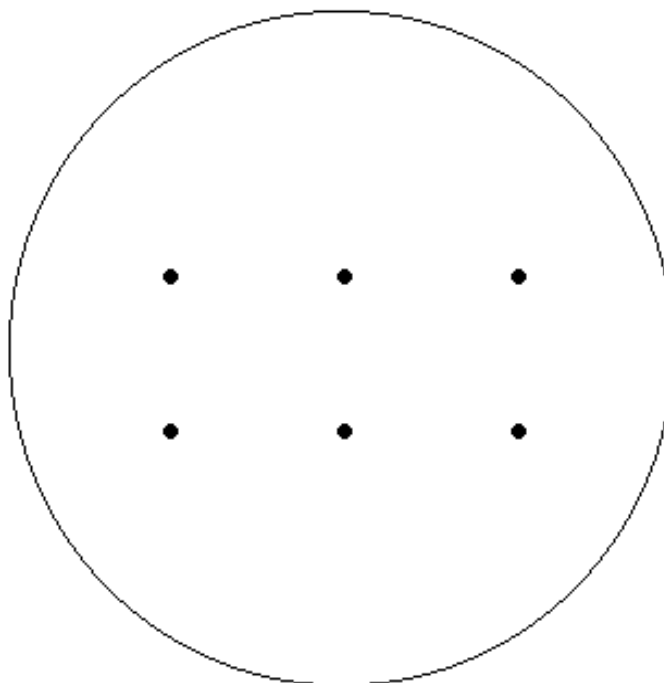
bakteriální buňky) a kultivovala pře noc. Buňky na pevných médiích jsem kultivovala v termostatu. Buňky v tekutých médiích byly aerobně kultivovány v horkovzdušné třepačce. Kvasinkové kultury jsem kultivovala při 28°C, bakteriální při 37°C.

#### 4.2.4 Stanovení počtu buněk a optické density kultury

Počet buněk v 1 mililitr kultury či buněčné suspenze jsem stanovovala pomocí Thomovy počítací komůrky a světelného mikroskopu při zvětšení 10 x 15. Optickou densitu kultury jsem měřila na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. K měření jsem používala jednorázové plastové kyvety s optickou dráhou 1 cm, jako blank jsem vždy použila příslušné médium.

#### 4.2.5 Nanášení obřích kolonií

Při experimentech na agarových médiích jsem většinou pracovala s obřími koloniemi *S.cerevisiae*. Standardně jsem kapala 6krát 10 µl suspenze (množství biomasy bylo přibližně 12 mg na 1 ml destilované vody) kvasinkových buněk tak, aby se kapky nacházely ve vzdálenosti 1,5 cm od sebe (obr. 8).



Obr. 8: Nanášení obřích kolonií na Petriho misku s pevným agarem. Vzdálenost kapek je vždy 1,5 cm.

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

Kulturu *E.coli* DH5 $\alpha$  jsem zaočkovala do 30 ml TPN média a aerobně kultivovala přes noc v horkovzdušné třepačce při teplotě 37°C, inokulem jsem následující den zaočkovala 400 ml TPN média na optickou densitu (OD) 0,1-0,2 a kultivovala při 37°C, dokud OD nedosáhla hodnoty mezi 0,7 a 0,8. Kulturu jsem přemístila do ledové lázně, převedla do centrifugačních zkumavek a centrifugovala 10 minut při 4°C a 4000 ot.min<sup>-1</sup>. Pelet v každé centrifugační zkumavce jsem promyla dvakrát 50 ml ledově studené demineralizované H<sub>2</sub>O. Sloučené pelety jsem resuspendovala v 10 ml chlazeného glycerolu (připraveného v demiH<sub>2</sub>O) a opět centrifugovala. Takto promyté buňky jsem resuspendovala v 1 ml chlazeného 10% glycerolu. Suspenzi buněk jsem rozplnila po 50  $\mu$ l a zmrazila v tekutém dusíku. Aliquoty kompetentních buněk jsem skladovala při -80°C.

#### 4.2.7 Elektroporace

K 50  $\mu$ l kompetentních buněk *E.coli* DH5 $\alpha$  jsem přidala 1-2  $\mu$ l (přibližně 100-150 ng) roztoku plazmidové DNA, promíchala a inkubovala 1 minutu na ledu. Směs jsem přenesla do sterilní předchlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm), kyvetu vložila do přístroje pro elektroporaci a aplikovala puls stejnosměrného napětí (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 2,5 kV). Bezprostředně po pulsu jsem do kyvety přidala 1 ml SOC média a směs převedla do Erlenmayerovy baňky. Buňky jsem kultivovala 1 hodinu v horkovzdušné třepačce při 37°C. Buněčnou suspenzi jsem vysela na pevné selekční médium (ŽA s ampicilinem) a kultivovala v termostatu přes noc při 37°C.

#### 4.2.8 Srážení DNA ethanolem

K roztoku DNA jsem přidala 2,5 objemu ledově studeného 96% ethanolu a 0,1 výsledného objemu 3M NaAc. DNA jsem srážela přes noc při -20°C. Druhý den jsem centrifugovala (30 min., 4°C, 14 000 ot.min<sup>-1</sup>), pelet opláchla 80% ethanolem, vysušila při laboratorní teplotě a resuspendovala v TE pufru či demiH<sub>2</sub>O (dle zamýšleného použití, objem jsem volila dle očekávaného množství DNA). Roztok DNA jsem následně skladovala při -20°C.

#### 4.2.9 Fenol-chloroformová extrakce

K roztoku DNA jsem přidala stejný objem upraveného fenolu a centrifugovala jsem 10 min. při 13000 ot.min<sup>-1</sup>. K odebrané vodné fázi jsem přidala 0,5 objemu upraveného fenolu a 0,5 objemu upraveného chloroformu a opět centrifugovala; tento krok jsem opakovala, dokud

nezmizela bílá mezifáze vysrážených proteinů. Poté jsem k odebrané vodné fázi přidala stejný objem upraveného chloroformu a centrifugovala (10 min., 5500 ot.min<sup>-1</sup>). DNA jsem srážela 96% ethanolem.

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

Bakteriemi nesoucími příslušný plazmid jsem zaočkovala 50 ml ŽB s ampicilinem a kultivovala přes noc v horkovzdušné třepačce při 37°C. Narostlou kulturu jsem centrifugovala (10 min., 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>), k peletu přidala 2 ml roztoku I a 4 ml čerstvě připraveného roztoku II, opatrným převrácením zkumavky směs promíchala a inkubovala 5 min. při laboratorní teplotě. Poté jsem přidala 3 ml chlazeného roztoku III, opět opatrně promíchala, inkubovala 30 min. v ledové lázni a centrifugovala (30 min., 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Supernatant jsem přefiltrovala přes gázu, přidala 0,8 objemu isopropanolu, krátce vortexovala a centrifugovala (15 min., 22°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). K sedimentu jsem přidala 2 ml 80% ethanolu, krátce vortexovala a opět centrifugovala (10 min, 4°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Pelet jsem resuspendovala ve 400 µl TE, přidala 0,01 objemu RNasyA a inkubovala 60 min. při laboratorní teplotě. Roztok DNA jsem přečistila fenol-chloroformovou extrakcí.

#### **4.2.11 Restrikční štěpení plazmidové DNA**

K 1-3 µl plazmidové DNA (maximálně 1 µg DNA) jsem přidala 1 µl příslušného pufru (10x koncentrovaného), 0,5 µl restrikčního enzymu (5-10 jednotek, přidáván jako poslední) a tolik demiH<sub>2</sub>O, aby byl výsledný objem směsi 10 µl. Směs jsem inkubovala 2 hodiny při 37°C.

#### **4.2.12 PCR kazet**

Do mikrozkuvek pro PCR jsem pipetovala jednotlivé složky nezbytné pro proběhnutí PCR. Pro přípravu delečních kazet a kazet určených pro značení fluorescenčními proteiny byla obvykle optimální kombinace:

12,5 µl	PCR premix
11 µl	demiH <sub>2</sub> O
0,5 µl	přímý primer (10x ředěný 100pmol/µl)
0,5 µl	reversní primer (10x ředěný 100pmol/µl)
0,5 µl	templátová DNA (přibližně 10-20 ng)

a následující PCR program:

<u>94°C</u>	<u>5:00</u>	min.
94°C	0:30	
55°C	0:30	8x
<u>72°C</u>	<u>2:30</u>	
94°C	0:30	25x
<u>72°C</u>	<u>2:30</u>	
72°C	12:00	
4°C	∞	

Přítomnost PCR produktu jsem ověřila pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu a následně uchovávala při -20°C.

#### 4.2.13 "Colony PCR"

Pro ověření konstruktů jsem používala tzv. "colony PCR". Nejprve jsem malé množství (přibližně 2 mg) biomasy čerstvě přeočkovaného (o stáří maximálně 24 hodin) testovaného kmene resuspenzovala ve 20 mM NaOH, poté inkubovala 15 minut při 95°C a centrifugovala. Supernatant s uvolněnou DNA jsem použila pro přípravu PCR směsi:

5 µl	PCR premix
2 µl	demiH <sub>2</sub> O
1 µl	přímý primer (10x ředěný 100pmol/µl)
1 µl	reversní primer (10x ředěný 100pmol/µl)
1 µl	templátová DNA

a spustila následující PCR program:

<u>94°C</u>	<u>5:00</u>	min.
94°C	0:30	
52°C	0:30	35x
<u>72°C</u>	<u>dle předpokládané délky produktu (1:00-2:30)</u>	
72°C	12:00	
4°C	∞	

Přítomnost či nepřítomnost PCR produktu jsem ověřila pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu.

#### **4.2.14 Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu**

Přítomnost příslušné DNA (PCR produktu, plazmidu) ve vzorku jsem zjišťovala pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. Používala jsem 1% agarosový gel, pro zviditelnění DNA jsem přidávala ethidiumbromid (0,1 µg/ml gelu). Aparaturu jsem připojila ke zdroji stejnosměrného napětí a velikost vloženého napětí nastavila tak, aby odpovídalo hodnotě přibližně 5 V.cm<sup>-1</sup>. Gel jsem prohlížela pod UV transiluminátorem.

#### **4.2.15 Izolace z agarosového gelu a přečištění roztoku DNA**

Pro izolaci z agarosového gelu či přečištění PCR produktu či plazmidu (například pro následnou sekvenaci) jsem používala kit NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL). Postupovala jsem dle přiložené manuálu.

#### **4.2.16 Odběr buněk pro Northern blot a Western blot analýzu**

Potřebné množství kultury buněk jsem stočila v centrifugačních zkumavkách (5 min., 4°C, 5000 ot./min), přenesla do předvážené mikrozukmavky, opět stočila (2 min., 4°C, 13000 ot./min), odebrala veškerou přebytečnou tekutinu, zvažila množství biomasy a zmrazila v tekutém dusíku. Vzorky jsem skladovala při -80°C.

#### **4.2.17 Izolace RNA pro Northern analýzu a stanovení koncentrace RNA**

*Pozn.: Všechny roztoky a plastik pro práci s RNA byly 2x sterilizované.*

Buňky jsem resuspendovala v TES pufru (1,6 ml pufru na 10<sup>9</sup> buněk) a suspenzi rozdělila po 400 µl do mikrozukmavek obsahujících cca 200 µl skleněných kuliček. Do každé mikrozukmavky jsem přidala 400 µl směsi fenol:chloroform (5:1), inkubovala 30 minut ve vodní lázni při teplotě 65°C a každých 5 minut vortexovala 30 s. Poté jsem vzorky umístil na 30 minut do -80°C a následně centrifugovala (15 min., 22°C, 13000 ot./min). K odebrané vodné fázi jsem přidala stejný objem směsi fenol:chloroform (5:1), vzorky 3x promíchala (30s) a centrifugovala; tento krok jsem opakovala 3x. K vodné fázi jsem přidala 300 µl chloroformu, 3x promíchala (20 s) a centrifugovala (2 min., 22°C, 13000 ot./min.). K vodné fázi jsem přidala 30 µl 3M NaAc a 600 µl 96% ethanolu a srážela přes noc v -20°C.

Centrifugovala jsem (15 min., 4°C, 13000 ot./min.), pelet vysušila a resuspendovala ve 30 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O.

Koncentraci celkové RNA jsem stanovila pomocí přístroje Nanodrop1000 (jako průměr 3 paralelních měření), vzorky o známé koncentraci celkové RNA jsem posléze naředila na požadovanou koncentraci pro Northern analýzu ve směsi destilované vody a formamidu 1:3.

#### **4.2.18 Příprava radioaktivně značené sondy**

Pro značení dsDNA sondy radionuklidem  $\alpha$  <sup>32</sup>P dCTP-25 µCi jsem použila DECAprime II Ambion Kit, přičemž jsem postupovala dle přiložené manuálu.

#### **4.2.19 Northern blot analýza**

Za použití 1x TBE pufru jsem připravila jsem 1,5 % agarosový gel (bez EtBr). Vzorky RNA naředěné na potřebnou koncentraci jsem inkubovala 10 minut při 65°C, umístila na led, přidala 1 µl barvičky (6x Loading dye) a nanesla do jamek gelu. Elektroforetickou aparaturu jsem připojila ke zdroji stejnosměrného napětí a velikost vloženého napětí nastavila tak, aby odpovídalo hodnotě přibližně 5 V.cm<sup>-1</sup>.

Přes misku s roztokem 20x SSC (cca 0,5 cm) jsem položila sklo s pruhem filtračního papíru Whatman, tak aby konce papíru byly namočeny v roztoku. Na pruh jsem položila obdélník filtračního papíru (namočeného v 20x SSC) o velikosti agarosového gelu, umístila na něj gel (lícem vzhůru) a posléze nitrocelulosovou membránu. Na membránu jsem umístila další filtrační papír, navršila vrstvu buničité vaty a zatížila nádobou s vodou. Po přibližně 5 hodinách přesávání jsem vyňala nitrocelulosovou membránu, lícem vzhůru ji umístila do přístroje UV Stratalinker a fixovala RNA na membránu působením UV záření. Membránu jsem poté vložila do hybridizačního válce, přidala 20 ml prehybridizačního pufru a inkubovala 2 hodiny při 65°C. Poté jsem přidala značenou denaturovanou DNA sondu a hybridizovala přes noc při 65°C.

Membránu s hybridizovanou sondou jsem promyla 2x 50 ml promývacího roztoku W1 a poté 2x 50 ml roztoku W2 (vždy 10 minut), zabalila do celofánové fólie, opatřila autoradiografickým štítkem a umístila do vyvíjecí kazety. Na membránu jsem mezi zvýrazňovací vložky přiložila film, kazetu uzavřela, umístila do -80°C a nechala exponovat do druhého dne. V temné komoře jsem exponovaný film umístila do vývojky a po dostatečném zviditelnění autoradiografického štítku přesunula do ustalovače. Po zprůhlednění filmu jsem

film opláchla vodou a nechala oschnout. Pokud byl signál slabý, nechala jsem exponovat s novým filmem po delší časový interval.

#### **4.2.20 Transformace kvasinek LiAc**

Zaočkovala jsem 10 ml tekutého YEPG a kultivovala v horkovzdušné třepačce přes noc při 28°C. Inokulum jsem naředila do čerstvého YEPG média tak, aby výsledná hustota kultury činila  $5 \cdot 10^6$  buněk na ml, aerobně kultivovala 2 generační doby (přibližně 4,5 h), buňky jsem spočítala a kulturu centrifugovala (5 min., 22°C, 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Pelet jsem promyla dvakrát 10 ml destilované vody a resuspendovala ve vodě tak, aby výsledná hustota byla  $1 \cdot 10^9$  buněk na ml. 100 µl získané suspenze buněk jsem krátce stočila, odebrala přebytečnou vodu a přidala 50 µl roztoku (2mg/ml) předem povařené salmon sperm ssDNA (po povaření jsem salmon sperm ssDNA umístila ihned do ledové vodní lázně (0°C)), 240 µl 50% PEG, 36 µl 1M LiAc a 34 µl roztoku DNA (obsahující přibližně 1 µg DNA). Směs jsem opatrně promíchala a inkubovala 40 min. při 42°C. Směs jsem krátce centrifugovala (15 s, 13 000 ot.min<sup>-1</sup>), pelet resuspendovala v 300 µl destilované vody a vysela na selekční médium.\*<sup>)</sup> Inkubovala jsem 3-5 dnů v termostatu při 28°C.

\*<sup>)</sup>Při transformaci PCR produktem nesoucím jako selekční marker rezistenci k antibiotku je nezbytné buňky před vysetím na selekční médium inkubovat 2 h v 1 ml YEPG média při teplotě 28°C.

#### **4.2.21 Odstranění markerů pomocí plazmidu pSH65**

Po klasické transformaci kvasinek pSH65 plazmidem jsem buňky vysela na GM s phleomycinem (50 µg/ml, pH 6,2). Po 5 dnech kultivace jsem přeočkovala stěr několika kolonií do 8 ml tekutého YEPG s phleomycinem (50 µg/ml) a kultivovala přes noc. Buňky z tohoto inokula jsem zaočkovala do 8 ml tekutého MM s 2% galaktózou a phleomycinem (50 µg/ml) na  $OD_{600} = 0,5$ , kultivala 4 hodiny a vysela (v hustotě 50-100 kolonií na 1 plotnu) na 3 YEPG plotny. Po 3 dnech kultivace jsem narostlé kolonie přerazítkovala na plotny s MM bez suplementace příslušnou aminokyselinou či bází a na základě negativní selekce vybrala klony s odstraněnými selekčními geny.

#### **4.2.22 Párování kvasinek**

Diploidní kmeny jsem vytvořila párováním kmenů haploidních kmenů BY4741 (párovací typ a) a BY4742 (párovací typ  $\alpha$ ). Vodnou suspenzi příslušných haploidních kmenů

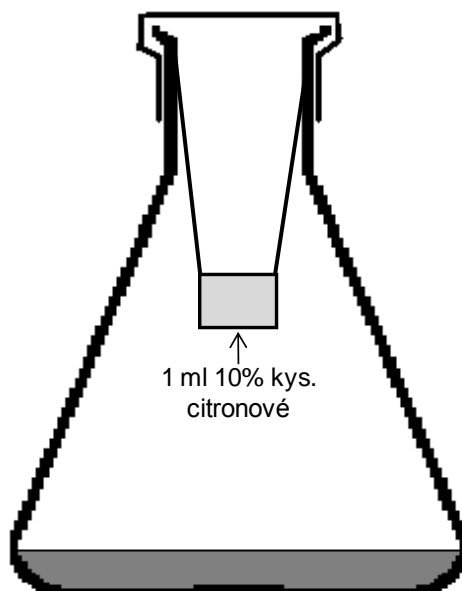
jsem smísila a kapku směsi nanasla na YEPG médium. Po jednodenní kultivaci jsem vzniklé diploidní kmeny selektovala na minimálním médiu doplněném o příslušné aminokyseliny a báze.

#### 4.2.23 Barvení mrtvých buněk pomocí BKP

Při barvení bromkresolový purpurem (BKP) vykazují mrtvé nebo těžce poškozené buňky po excitaci zeleným světlem červenou fluorescenci. (KURZWEILOVA a SIGLER, 1993) K suspenzi buněk jsem přidala koncentrovaný roztok BKP (2 mg/ml 96% ethanolu) tak, aby výsledná koncentrace byla 100  $\mu\text{g/ml}$ . Po 5 minutách jsem pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu. Procento mrtvých buněk jsem stanovovala z 1000 (900-1200) spočítaných buněk.

#### 4.2.24 Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku produkovaného při aerobní kultivaci

Do sterilní mističky zavěšené v hrdle Erlenmayerovy baňky jsem pipetovala 1 ml 10% kyseliny citrónové (obr. 9). Kyselinu citronovou jsem pravidelně odebírala, mističku poté vypláchla sterilní destilovanou vodou a opět naplnila kyselinou citrónovou.



Obr. 9: Schéma zařízení pro stanovení množství amoniaku produkovaného při aerobní kultivaci.



#### **4.2.25 Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku produkovaného koloniemi**

Do sterilní mističky umístěné pod obří kolonií jsem pipetovala 150  $\mu\text{l}$  10% kyseliny citronové. Kyselinu citronovou jsem pravidelně odebírala, mističku poté vypláchla sterilní destilovanou vodou a opět naplnila kyselinou citronovou.

#### **4.2.26 Příprava vzorků pro stanovení množství amoniaku v médiu**

Do víčka mikrozkušavky jsem stočila malý kousek vaty a nasýtila jej 200  $\mu\text{l}$  10% kyseliny citronové. Ke 1 ml média v mikrozkušavce jsem přidala 200  $\mu\text{l}$  množství 5M NaOH, mezi vzorek a víčko umístila čtvereček nylonové záclony a zkumavku rychle uzavřela. Unikající amoniak jsem jímala 10 min, poté víčko s nasycenou vatou (včetně záclonky) přemístila na prázdnou zkumavku a centrifugovala 2 min. při 5000  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Obsah dusíku ve vzorku jsem stanovila pomocí Nesslerova činidla. Pokud jsem nestanovovala obsah dusíku okamžitě, přechovávala jsem vzorky při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.27 Stanovení množství amoniaku pomocí Nesslerova činidla**

Obsah dusíku ve vzorku jsem stanovovala spektrofotometricky pomocí Nesslerova činidla (při stanovování amoniaku Nesslerovým činidlem reagují kationty  $\text{NH}_4^+$  v alkalickém prostředí s komplexním  $\text{K}_2(\text{HgI}_4)$  za vzniku žlutého až červenohnědého zabarvení). Ke 100  $\mu\text{l}$  vzorku jsem přidala 400  $\mu\text{l}$  vody a 500  $\mu\text{l}$  Nesslerova činidla. Po 24 minutové inkubaci jsem měřila  $A_{430}$  (spektrofotometr S1200, WPA Spectrawave Biochrom). Jako blank jsem používala směs, v níž byl vzorek nahrazen 100  $\mu\text{l}$  10% kyseliny citronové. Jelikož je závislost absorbance  $A_{430}$  na koncentraci amonných kationtů lineární přibližně do hodnoty 0,6, opakovala jsem v případě dosažení vyšších hodnot měření s naředěným vzorkem (proti adekvátně naředěnému blanku).

#### **4.2.28 Měření vstupu radioaktivně značené ( $^{14}\text{C}$ ) kyseliny mléčné do buněk**

Buňky jsem dvakrát promyla ledově studenou vodou a resuspendovala na výslednou hustotu 25-40 mg suché váhy na 1 ml suspenze. 10  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze jsem přidala ke 30  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,0) a inkubovala 2 minuty ve vodní lázni o teplotě  $25^{\circ}\text{C}$ . Poté jsem přidala 10  $\mu\text{l}$  vodného roztoku radioaktivně značené  $^{14}\text{C}$ -kyseliny mléčné (o specifické aktivitě 4000 d.p.m./nmol) v příslušné koncentraci (0,01-4 mM). Reakci jsem zastavila po 5 s přidáním 5 ml ledově studené  $\text{H}_2\text{O}$ , směs jsem okamžitě přefiltrovala přes GF/C membránu,

membránu promyla 10 ml ledově studené vody a umístila do scintilační kapaliny. Radioaktivitu jsem měřila na scintilačním spektrofotometru. Ke slepým vzorkům byla radioaktivně značená  $^{14}\text{C}$ -kyselina mléčné přidávána po naředění buněčné suspenze 5 ml ledově studené vody. Pro následné určení mechanismu vstupu laktátu do buňky a kinetických parametrů vstupu jsem využila program GraphPAD (GraphPAD software; San Diego, CA, U.S.A.).

#### **4.2.29 Spektrofluorimetrické stanovení intenzity fluorescence**

Pro stanovení intenzity fluorescence fúzních proteinů s GFP pomocí spektrofluorimetru FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon) jsem vždy používala suspenzi buněk o  $\text{OD}_{600}$   $0,500 \pm 0,010$ , jež byla předtím dvakrát promyta destilovanou vodou. GFP jsem excitovala světlem o vlnové délce 480-490 nm, před detektor umístila emisní filtr (LP490) a emisní spektrum snímala v rozsahu 490-560 nm (s krokem 2 nm).

#### **4.2.30 Fluorescenční mikroskopie**

Při mikroskopování a fotografování lokalizace fúzních proteinů s různými variantami fluorescenčních proteinů fluorescenčním mikroskopem Leica jsem buňky pozorovala pod imerzním objektivem se zvětšením 100x. Využívala jsem fluorescenční kostky GFP (BP470/40, BP525/50) a N2.1 (BP515-560, LP590). Buňky z tekutého média byly před pozorováním vždy dvakrát promyty destilovanou vodou.

#### **4.2.31 Příprava preparátu pro konfokální mikroskopii**

3  $\mu\text{l}$  hustší buněčné suspenze byly naneseny na krycí sklíčko a překryty čtvercem (cca 1x1 cm) vyříznutým z tenké vrstvy 0,7% agarosy. Buňky z tekutého média byly před pozorováním vždy dvakrát promyty destilovanou vodou.

#### **4.2.32 Měření FRET za využití měření poločasu života fluorescenčních proteinů**

Data jsem získávala za využití invertovaného konfokálního mikroskopu Microtime 200 (PicoQuant, Berlin, Germany) (WAHL, *et al.*, 2004) vybaveného 60x objektivem,  $\text{NA}=1,2$  (Olympus, Hamburg). Fluorescenční donor a akceptor byly excitovány simultánně (přibližně 80 ps dlouhými pulsy, s 25 ns dlouhým zpožděním excitačních pulsů pro donor a akceptor) za využití následujících laserů (Picoquant, Berlín): pro CFP 440 nm (LDH-D-C-440), pro GFP 470 nm (LDH-P-C-470) a pro Venus a tdimer2 532 nm (PicoTa). Sestava dichroických

zrcadel a emisních filtrů byla následující: dichroická zrcadla (Chroma, Rockingham) před objektivem: Z442/532 RPC pro pár CFP-Venus a Z473/532 RPC pro pár GFP-tdimer2, dichroické zrcadlo za konfokální štěrbinou 50- $\mu\text{m}$ : 535 DCXC, emisní filtry: 465/40 pro CFP, 505/30 pro GFP a 565/40 pro Venus a tdimer2. Detekce probíhala pomocí SPADs (=single photon avalanche diodes, PDMs, Microphoton Devices, Bolzano, Italy). Získaná data byla proložena křivkou odpovídající dvouexponenciálnímu modelu dohasínání fluorescence:  $I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$ , kde  $\tau$  je poločas dohasínání fluorescence a  $A$  je amplituda. Průměrný poločas dohasínání fluorescence  $\tau$  byl pak vypočítán jako:  $\tau_{\text{av}} = (A_1 \cdot \tau_1^2 + A_2 \cdot \tau_2^2) / (A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2)$

#### a. Přístup založený na vybělení poloviny buňky

Nejprve jsem změřila a zobrazila poločas dohasínání fluorescence u celé zvolené kvasinkové buňky. Poté jsem provedla vybělení fluorescenčního donoru (při maximálním výkonu laseru (200  $\mu\text{W}$ )) v polovině zvolené buňky a následně opět změřila a zobrazila poločas dohasínání fluorescence u celé kvasinkové buňky. Následně jsem použila získaná data pro vyhodnocení průměrných poločasů dohasínání fluorescence ve všech oblastech zájmu (kontrolní a vybělovaná polovina buňky před vybělením a po vybělení).

#### b. Přístup založený na poměru donor/akceptor

Nejprve jsem změřila poločas dohasínání fluorescence u většího množství buněk. Následně jsem určila poměr intenzity fluorescence donoru a akceptoru u každé jednotlivé zobrazené buňky. Získané hodnoty (podíl intenzit fluorescence akceptoru a donoru ( $R$ )) vůči poločasu dohasínání fluorescence ( $\tau$ ) jsem vynesla do grafu a body proložila empirickou křivkou  $\tau_D = \tau_{D0} - \Delta\tau \cdot R / (b + R)$ , kde  $\tau_{D0}$  je poločas dohasínání donoru v nepřítomnosti akceptoru,  $\Delta\tau$  je maximální posun poločasu dohasínání v důsledku FRET, a  $b$  je škálovací faktor.

#### 4.2.33 Měření FRAP

Pro FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) analýzu jsem využila invertovaný konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS s objektivem 63 $\times$  1.2 NA za využití vody jako imerze. Pro excitaci GFP jsem využila argonový laser (488 nm), emisi jsem snímala v rozmezí vlnových délek 500-550 nm. V každém okamžiku měření jsem zaznamenávala intenzitu fluorescence ve všech oblastech zájmu (pozadí, vybělená část

membrány a kontrolní část membrány), měření obnovy fluorescence probíhalo 5 min. Mobilní frakci ( $F_m$ ) příslušných proteinů značených GFP jsem odhadla na základě rovnosti  $F_m = (I_E - I_0) / (1 - I_0)$ , kde  $I_E$  značí finální hodnotu intenzity fluorescence ve vybělené části membrány na konci měřeného intervalu a  $I_0$  intenzitu fluorescence bezprostředně po vybělení.

#### **4.2.34 Statistické zpracování výsledků**

Vedle programu GraphPAD jsem ke statistickému zpracování dat běžně využívala Microsoft Office Excel (funkce ttest, typ testu byl zvolen dle povahy hodnocených dat).

#### **4.2.35 Připravené kmeny**

Seznam kmenů použitých pro účely této práce je shrnut v tabulkách 3A a B.

### **4.3 Seznam dalších osvojených metod**

Seznam dalších osvojených metod, jež nebyly využity pro účely této práce:

Stanovení frakcí buněk pomocí průtokové cytometrie

Kapkové testy

Izolace mRNA

Stanovení transkriptomových rozdílů metodou microarrays a vyhodnocení dat

Značení kvasinkových buněk membránovými sondami

<b>Název kmene</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Kmen vytvořil *)</b>
Ato1p-GFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	DS
Ato2p-GFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-yEGFP-CaURA3</i>	DS
Ato3p-GFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-yEGFP-CaURA3</i>	DS
Ato1p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	DS + IF
Ato2p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	DS + IF
Ato3p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	DS + IF
Ato1p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yEGFP-SpHIS5, ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato1p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yEGFP-SpHIS5, ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato2p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-yEGFP-SpHIS5, ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato2p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-yEGFP-SpHIS5, ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato3p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-yEGFP-SpHIS5, ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato3p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-yEGFP-SpHIS5, ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Ato1p-CFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yECFP-CaURA3</i>	DS
Ato2p-CFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-yECFP-CaURA3</i>	DS
Ato3p-CFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-yECFP-CaURA3</i>	DS
Ato1p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato2p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO2-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato3p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO3-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato1p-CFP/Ato2p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yECFP-CaURA3, ATO1-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato2p-CFP/Ato1p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yECFP-CaURA3, ATO1-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato3p-CFP/Ato1p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yECFP-CaURA3, ATO1-yEVENUS-Kan</i>	DS
Ato3p-CFP/Ato2p-YFP	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, ATO1-yECFP-CaURA3, ATO2-yEVENUS-Kan</i>	DS

Tabulka 3A: Seznam kmenů použitých v této práci. \*) DS=Dita strachotová, IF=Ivana Ferčíková

Název kmene	Genotyp	Kmen vytvořil *)
Fet3p-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, FET3-yEGFP-CaURA3</i>	OŠ
Ftr1p-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, FTR1-yEGFP-CaURA3</i>	OŠ
Fet3p-GFP/Ftr1p-tdimer2	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, FET3-yEGFP-CaURA3, FTR1-tdimer2-CaURA3</i>	OŠ
Fet3p-tdimer2/Ftr1p-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, FET3-tdimer2-CaURA3, FTR1-yEGFP-CaURA3</i>	OŠ
Jen1p-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, JEN1-yEGFP-SpHIS5</i>	DS
Jen1p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, JEN1-yEGFP-SpHIS5, ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Jen1p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, JEN1-yEGFP-SpHIS5, ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	DS
Met17-GFP	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, MET17-yEGFP-Kan</i>	LŠ
Ato1p-GFP (BY4741)	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	AH
Ato2p-GFP (BY4741)	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, ATO2-yEGFP-CaURA3</i>	AH
Ato3p-GFP (BY4741)	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, ATO3-yEGFP-CaURA3</i>	AH
Ato1p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATa/MATα; his3Δ1/ his3Δ1; leu2Δ0/ leu2Δ0; met15Δ0/MET15;LYS2/ lys2Δ0; ura3Δ0/ ura3Δ0, ATO1-yEGFP-CaURA3/ ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	AH + DS
Ato2p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATa/MATα; his3Δ1/ his3Δ1; leu2Δ0/ leu2Δ0; met15Δ0/MET15;LYS2/ lys2Δ0; ura3Δ0/ ura3Δ0, ATO2-yEGFP-CaURA3/ ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	AH + DS
Ato3p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MATa/MATα; his3Δ1/ his3Δ1; leu2Δ0/ leu2Δ0; met15Δ0/MET15;LYS2/ lys2Δ0; ura3Δ0/ ura3Δ0, ATO3-yEGFP-CaURA3/ ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	AH + DS
<i>sok2/Ato1p-GFP</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2::kanMX4, ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	DS
<i>cat8/Ato1p-GFP</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, cat8::kanMX4, ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	DS
<i>ato1/ato2/ato3</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, ato3::kanMX4, ato1Δ, ato2Δ</i>	DS + KH
Jen1p-GFP **)	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, JEN1-GFP-Kanr</i>	SP
<i>sok2/Jen1p-GFP</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2::hphMX4, JEN1-GFP-Kanr</i>	SP
<i>sok2/jen1</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, sok2::hphMX4, jen1::kanMX4</i>	SP

Tabulka 3B: Seznam kmenů použitých v této práci. \*) DS=Dita strachotová, OŠ=Ondřej Štěpánek, LŠ=Luděk Štěpánek, AH=Aleš Holoubek, KH=Karel Harant, SP=Sandra Paiva \*\*) Kmen používaný pro mikroskopii v části práce týkající se transportu laktátu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Indukce alkalizace pomocí aminů

*Cíl:*

*Za standardních podmínek vývoje obřích kolonií *S.cerevisiae* dochází (po krátkém - 24hodinovém - počátečním alkalickém pulsu) k acidifikaci okolního média. Po přibližně 9 až 12 dní trvající acidické fázi vstoupí kolonie do alkalické fáze vývoje spojené s produkcí amoniaku. Cílem této části práce bylo ověřit možnosti předčasné indukce alkalizace kolonií *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 a *Candida mogii* pomocí různých aminů.*

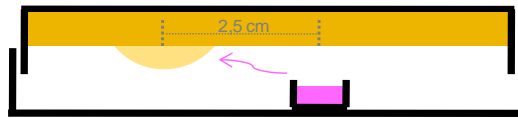
Z hlediska schopnosti indukce alkalizace byly testovány následující látky (aminy): amoniak, methylamin, propylamin, oktylamin, imidazol a chloroquin (tab. 4).

Látka	pKa	pKa <sub>2</sub>	M <sub>m</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )
Amoniak	9,25		17,03
Methylamin	10,66		31,06
Propylamin	10,62		59,11
Oktylamin	10,65		129,25
Imidazol	6,99		68,08
Chloroquin	8,10	9,9	319,87

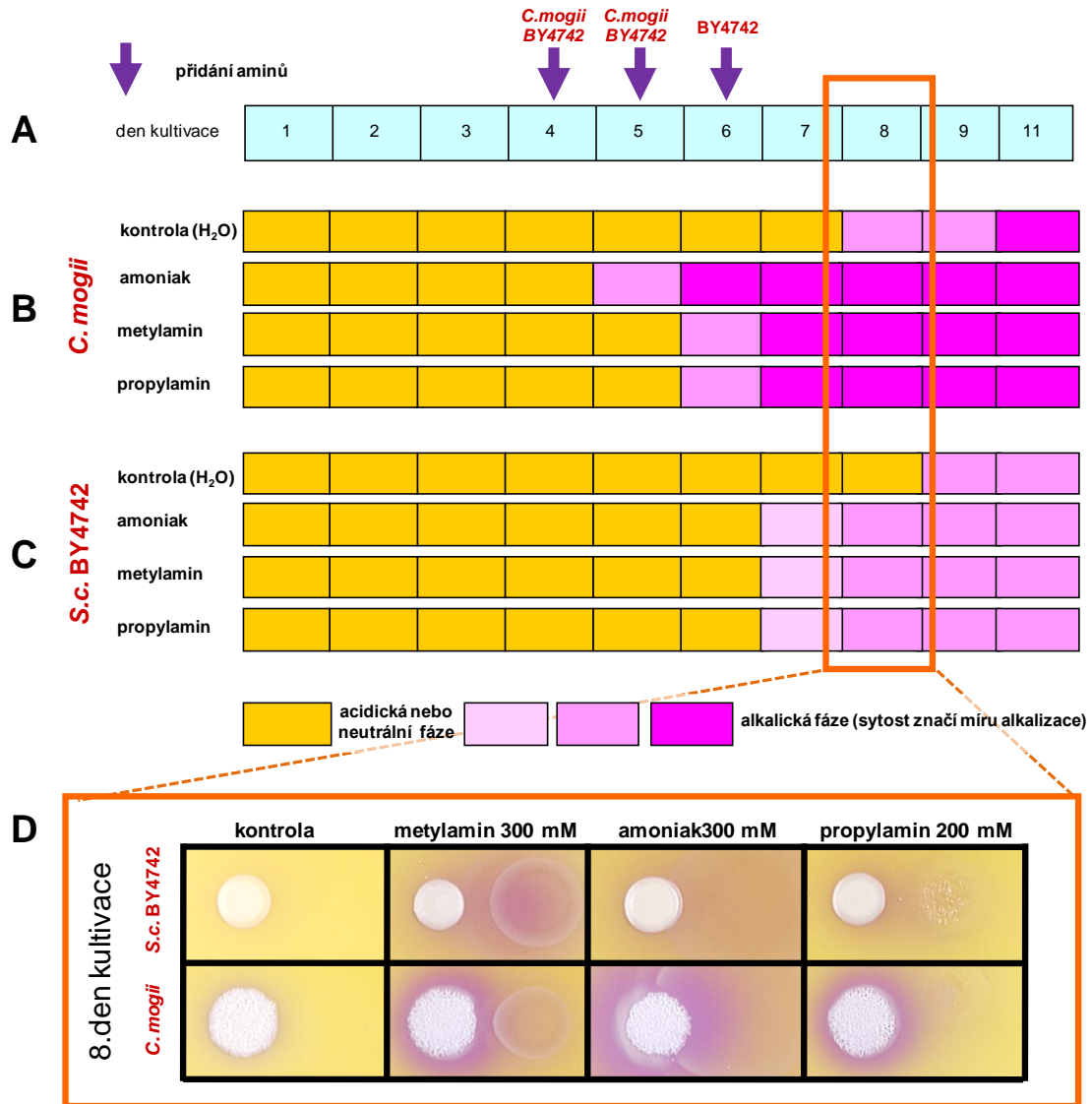
Tabulka 4: Přehled látek testovaných z hlediska schopnosti indukce alkalizace.

*Testování indukce alkalizace při šíření aminů vzduchem*

100 µl různě koncentrovaného (testováno bylo rozmezí 100 - 1000 mM) vodného roztoku každé z testovaných látek bylo naneseno do mističky umístěné na víčku Petriho misky, vzdálenost středu mističky od středu kolonie byla ve standardním uspořádání 2,5 cm. (obr. 10). Pulsy byly opakovány v různých intervalech a s různou četností. Příklad úspěšného uspořádání experimentu je znázorněn na obr. 11A. Kýženého účinku jsem typicky dosáhla, pokud jsem první puls aplikovala 4.-5. den po nanesení obří kolonie (tedy v druhé polovině první acidické fáze vývoje kolonie) a následně aplikovala další 1 puls (pro *C.mogii*) či 2 pulsy (pro *S.cerevisiae* BY4742) v intervalu/intervalech 24 hodin. Poté jsem sledovala průběh alkalizace v porovnání s kontrolou (kdy v mističce byla místo testované látky destilovaná voda).



Obr. 10: Schéma experimentálního uspořádání pro testování indukce alkalizace při šíření aminů vzduchem.



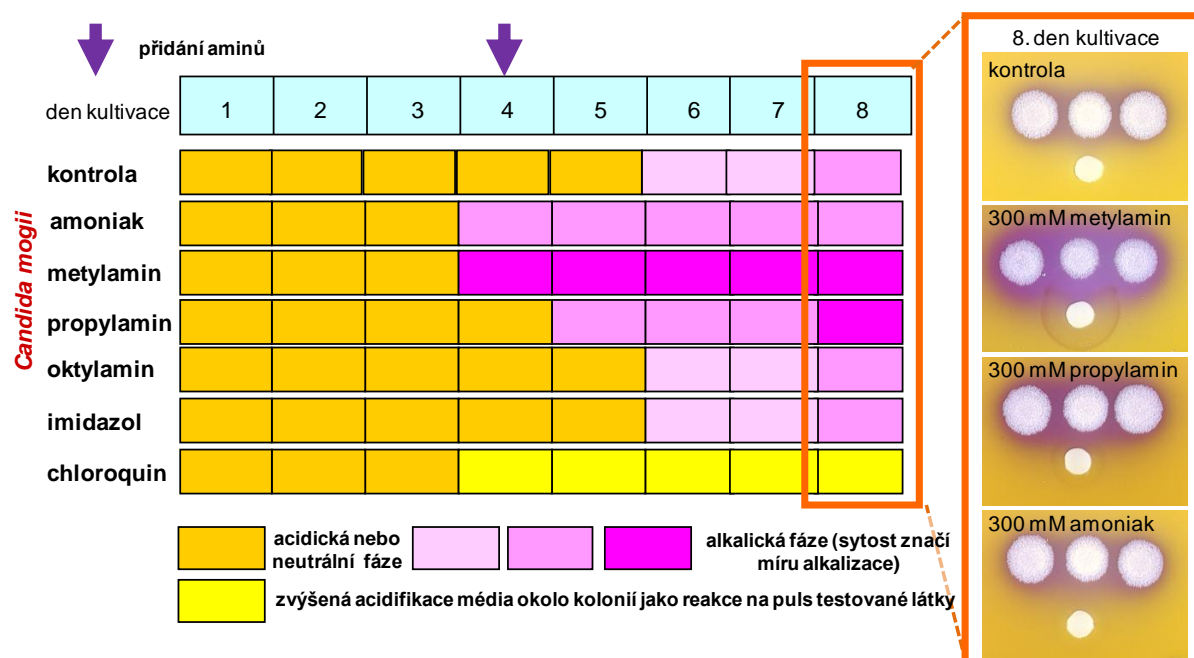
Obr. 11: A) Příklad časování pulsů aminů u *C.mogii* a *S.cerevisiae* v úspěšném experimentu. B) Schématické znázornění průběhu experimentu u *C.mogii* a C) schématické znázornění průběhu experimentu u *S.cerevisiae*. Barva pole značí fázi vývoje kvasinkové kolonie. D) Fotografie obřích kolonií na kontrolní plotně a po indukci příslušnými aminy 8. den kultivace.



Při šíření aminů vzduchem se mi alkalizaci okolního média podařilo navodit pomocí amoniaku (200 a 300 mM roztok), methylaminu (200 a 300 mM roztok) a propylaminu (200 mM roztok) jak u *C.mogii*, tak u *S.cerevisiae* (obr. 11B, C a D) Pro oktylamin se mi nepodařilo nalézt indukční podmínky, rovněž tak pro látky imidazol a chloroquin, jež jsou ovšem těkavé minimálně.

#### Testování šíření aminů médiem

100 µl různě koncentrovaného (testováno bylo opět rozmezí 100 - 1000 mM) vodného roztoku každé z testovaných látek bylo nanášeno do otvoru v agaru vytvořeného sterilním korkovrtem. Na kontrolní misku byla místo testované látky aplikována destilovaná voda. Aplikován byl vždy jeden puls látky. Tento přístup poměrně dobře fungoval při indukci obřích kolonií *C.mogii* (obr. 12). V případě *C.mogii* se mi - stejně jako u uspořádání pro testování indukce alkalizace při šíření aminů vzduchem - podařilo alkalizaci indukovat pomocí amoniaku, methylaminu a propylaminu. Průběh alkalizace při indukci pomocí oktylaminu a imidazolu se nelišil od kontroly. Aplikace chloroquinu zcela zabránila alkalizaci u obřích kolonií *C.mogii*. Kolonie naopak v reakci na tuto látku silněji acidifikovaly své okolí a do alkalické fáze vůbec nevstoupily. U obřích kolonií *S.cerevisiae* se mi tímto způsobem alkalizaci prokazatelně indukovat nepodařilo.



Obr. 12: Indukce alkalizace u obřích kolonií *C.mogii* pomocí aplikace aminů do jamky v agaru.

## 5.2 Diskuse 1

Role amoniaku jako signalizační molekuly byla prokázána vedle *S.cerevisiae* například u hlenky *Dictyostelium discoideum*. Amoniak zde blokuje kulminaci a klíčení spor (DAVIES, *et al.*, 1993) (alkalizace kyselých intracelulárních váčků amoniakem je přitom během dormance spor důležitá, poněvadž k aktivaci lysozomálních cysteinproteinás, jež se uplatňují při klíčení, zřejmě dochází v kyselém pH (NORTH, *et al.*, 1996)). Signalizační efekt amoniaku u *D.discoideum* může být mimikován například propylaminem, oktylaminem, imidazolem či chloroquinem (GROSS, *et al.*, 1983). Podobně se zdá, že účinky plynného amoniaku na průběh vývoje kvasinkových kolonií lze mimikovat methylnaminem či propylaminem – jak u obřích kolonií *C.mogii*, tak u obřích kolonií *S.cerevisiae* se podařilo indukovat alkalizaci při šíření amoniaku, methylnaminu a propylaminu vzduchem. Bylo ukázáno, že u buněk v alkalické fázi vývoje kvasinkových kolonií dochází v cytosolu ke vzniku gradientu pH (PINEDA RODO, *et al.*, 2012), a právě vlastní změna pH cytosolu nebo vznik gradientu pH působením amoniaku by mohla spouštět odpověď na alkalický puls. Za vznik takového gradientu musí být zodpovědný plynný amoniak či příbuzná molekula, jelikož indukce produkce amoniaku u obřích kolonií *C.mogii* působením gradientu chloridu amonného či hydroxidu sodného (ve snaze odlišit, zda pro indukci produkce amoniaku není postačující gradient zásadité látky a zda je signální molekulou amoniak či amonný kation) nebyla v předchozích experimentech prokázána (PALKOVA a FORSTOVA, 2000).

Při testování šíření aminů médiem se nejsilnějším induktorem alkalizace kolonií *C.mogii* ukázal být methylnamin. To by mohlo být důsledkem faktu, že permeabilita  $\text{NH}_3$  v membránách je nižší než permeabilita některých větších (ale více hydrofobních) aminů, jako je například právě methylnamin (RITCHIE a GIBSON, 1987), zároveň tato skutečnost podporuje hypotézu intracelulárního působení amoniakového signálu (PALKOVA a VACHOVA, 2003). V případě obřích kolonií *S.cerevisiae* se při testování šíření aminů médiem alkalizaci prokazatelně indukovat nepodařilo. Je možné, že podobně jako u šíření aminů vzduchem by bylo zapotřebí použít u *S.cerevisiae* více následných pulsů aminů, opakované nanášení roztoku aminu nicméně způsobovalo výraznou barevnou změnu glycerolového agaru (jež obsahoval pH indikátor bromkresolový purpur), která znemožňovala spolehlivé hodnocení indukce alkalizace.

### **5.3 Aerobní kultivace různých kmenů *S.cerevisiae* v tekutém médiu (ve třepaných kulturách)**

*Cíl:*

*Jak již bylo zmíněno, pokud jsou kolonie kvasinky *S.cerevisiae* kultivovány na pevném glycerolovém médiu s výchozím pH upraveným na hodnotu 5, dochází po určité době ke vstupu kvasinkových kolonií do tzv. alkalické fáze (ať už se jedná o mikrokolonie mající původ v jediné kvasinkové buňce či obří kolonie vzniklé nanesením buněčné suspenze na povrch pevného agarového média). Se vstupem do alkalické fáze se pH okolního média zvyšuje. Tato fáze je zároveň spojena s produkcí amoniaku a Ato proteinů. V alkalické fázi vývoje setrvávají kvasinkové kolonie několik dní, následuje opětá acidifikace média a vstup kolonií do tzv. druhé acidické fáze. Na modelu kvasinkových kolonií bylo zjištěno, že řada delečních kmenů odvozených od rodičovského kmene BY4742 má problémy se vstupem do alkalické fáze a produkcí amoniaku. Cílem této části práce bylo charakterizovat chování rodičovského kmene a vybraných delečních kmenů *S.cerevisiae* při aerobní kultivaci.*

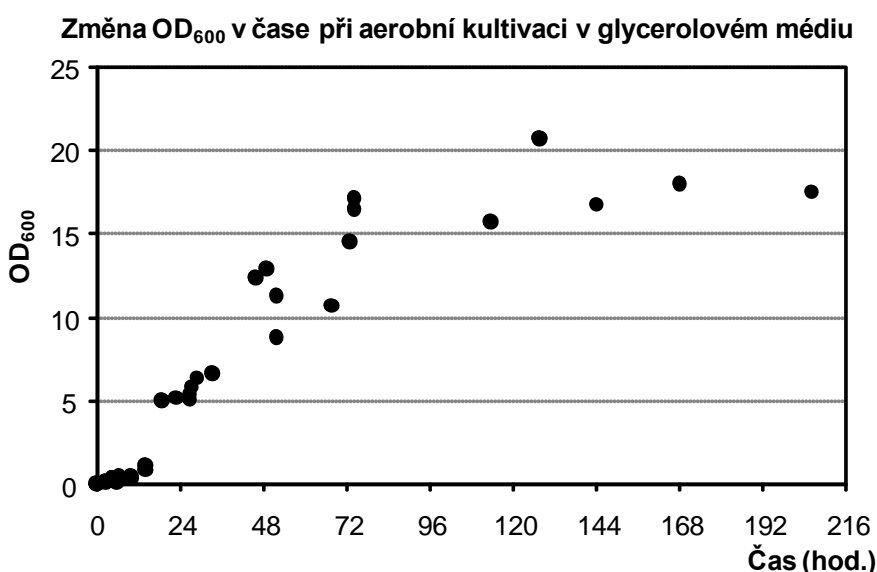
#### **5.3.1 Aerobní kultivace rodičovského kmene BY4742**

Růst kvasinkové kultury při aerobní kultivaci v tekutém glycerolovém médiu (GM tekuté) probíhá odlišně v porovnání s růstem kvasinkové kolonie. I za těchto růstových podmínek však dochází ke změně pH okolního média. Průběh změn je podobný průběhu u kolonií na pevném médiu, nicméně vzhledem k rychlejšímu růstu populace buněk při aerobní kultivaci probíhají tyto změny v kratším časovém horizontu.

*Změny pH média při aerobní kultivaci*

Buňky rodičovského kmene BY4742 jsem zaočkovala na hodnotu OD<sub>600</sub> přibližně 0,15 a v pravidelných intervalech jsem zaznamenávala hodnoty OD<sub>600</sub> a pH. Co se týče růstové rychlosti, rychlý (exponenciální) růst kultury s dobou zdvojení okolo 4,5 hodiny přetrvával prvních 24 hodin kultivace, následně se růst zpomalil a buňky dělily přibližně jednou za 24 hodin, mezi 72.-96. hodinou (3.-4. dnem) kultivace se pak růst kultury téměř zastavil a hodnota OD<sub>600</sub> se zvyšovala již jen minimálně (obr. 13). K alkalizaci média docházelo po přibližně 12-18 hodinách od začátku kultivace, kdy se hodnota pH média v průběhu přibližně deseti hodin prudce zvýšila (o 2-2,5 jednotky pH). Maximální dosažené

hodnoty pH se pohybovaly typicky v rozmezí 7 - 7,5. K opětovnému mírnému poklesu hodnot pH pak začalo docházet po přibližně 120 hodinách (5 dnech) aerobní kultivace. (obr. 14A)



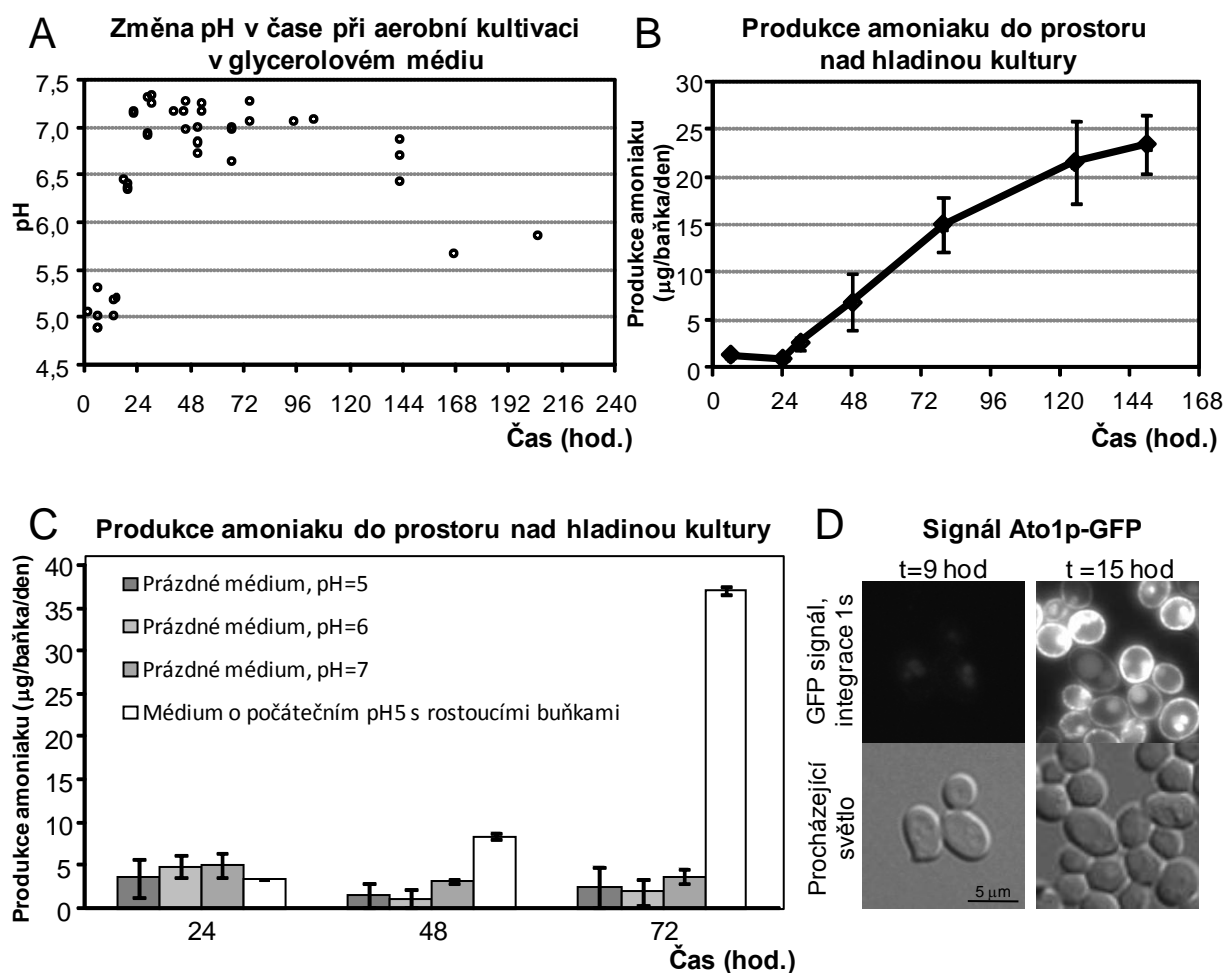
Obr. 13: Změna OD<sub>600</sub> v čase při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu, sumarizace několika (4) experimentů.

#### *Produkce amoniaku při aerobní kultivaci*

Amoniak produkovaný kvasinkovými kolonie je v naší laboratoři standardně jímán do mističek naplněných 10% kyselinou citrónovou. Abych zjistila, zda je do i prostoru nad hladinou tekutého kultivačního média uvolňován amoniak, zavěsila jsem do hrdla Erlenmayerovy baňky (v baňce o objemu 250 ml bylo vždy 30 ml média zaočkovaného na výchozí hodnotu OD<sub>600</sub>=0,15) mističku obsahující 1 ml kyseliny citrónové, již jsem v pravidelných intervalech vyměňovala. V získaných vzorcích jsem poté měřila obsah amoniaku pomocí Nesslerova činidla. Tímto způsobem jsem prokázala, že stejně jako u kolonií dochází při aerobní kultivaci k produkci amoniaku. Počátek produkce amoniaku při aerobní kultivaci následoval bezprostředně po alkalizaci média (obr. 14B) a v pozdějších časech kultivace se produkce amoniaku stávala intenzivnější.

Abych ověřila, že produkce amoniaku do prostoru nad kultivačním médiem není jen důsledkem zvýšení pH média (čímž by došlo k uvolnění NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> přítomných ve výchozím médiu), provedla jsem kontrolní měření obsahu amoniaku nad médii s různými hodnotami pH: 5, 6 a 7 (média o pH 6 a 7 byla připravena přidáním předem stanoveného množství 1M NaOH do média o výchozím pH 5 v okamžiku instalace mističek s kyselinou citrónovou). Současně byla provedena kultivace buněk rodičovského kmene v médiu o hodnotě pH 5.

Odběry kyseliny citrónové jsem provedla v časech 24, 48 a 72 hodin. Pouze v čase 24 hodin byl obsah amoniaku nad médiem srovnatelný ve všech systémech, následně byla dokumentována produkce amoniaku pouze v kultivačním uspořádání s buňkami (obr. 14C). To ukazuje, že produkce amoniaku je skutečně dána činností buněk *S.cerevisiae*.



Obr. 14: A) Změny pH v čase při aerobní kultivaci rodičovského kmene BY4742 v tekutém glycerolovém médiu s počáteční hodnotou pH upravenou na 5, sumarizace několika (4) experimentů. B) Produkce amoniaku do prostoru nad hladinou kultury při aerobní kultivaci u rodičovského kmene BY4742. Graf ukazuje průměr tří paralelních měření v rámci vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO. C) Rozdíl v produkci amoniaku do prostoru nad hladinou nezaočkovaného média o různém pH a média s rostoucími buňkami při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu. Graf ukazuje průměr tří paralelních měření v rámci vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO. D) Fluorescenční signál Ato1p-GFP proteinu při aerobní kultivaci Ato1p-GFP kmene v časech 9 a 15 hodin po inokulaci. V horní řadě je signál Ato1p-GFP při integraci 1s, v dolní řadě mikrofotografie pořízená za využití Nomarského diferenciálního kontrastu.

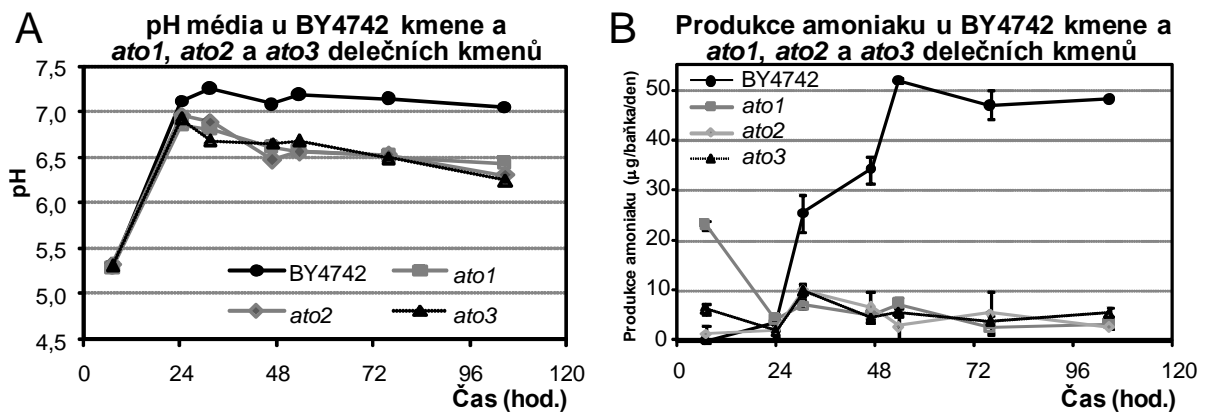
### *Produkce Ato proteinů při aerobní kultivaci koreluje s alkalizací média a produkcí amoniaku*

Při aerobní kultivaci byla produkce Ato proteinů mikroskopicky prokazatelná po přibližně 15 hodinách kultivace (obr. 14D). (Časování produkce Ato proteinů a jejich lokalizaci při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu jsem předběžně testovala již v rámci diplomové práce (STRACHOTOVÁ, Diplomová práce 2004), trendy zjištěné v experimentech v rámci diplomové práce jsem potvrdila.) Ato-GFP signál se na cytoplazmatické membráně objevil v době, kdy se pH média začínalo prudce zvyšovat (obr. 14A a D), krátce poté jsem byla schopná zaznamenat počátky produkce amoniaku. Dá se tedy říci, že počátek produkce Ato proteinů při aerobní kultivaci koreluje s počátkem alkalizace média a počátkem produkce amoniaku.

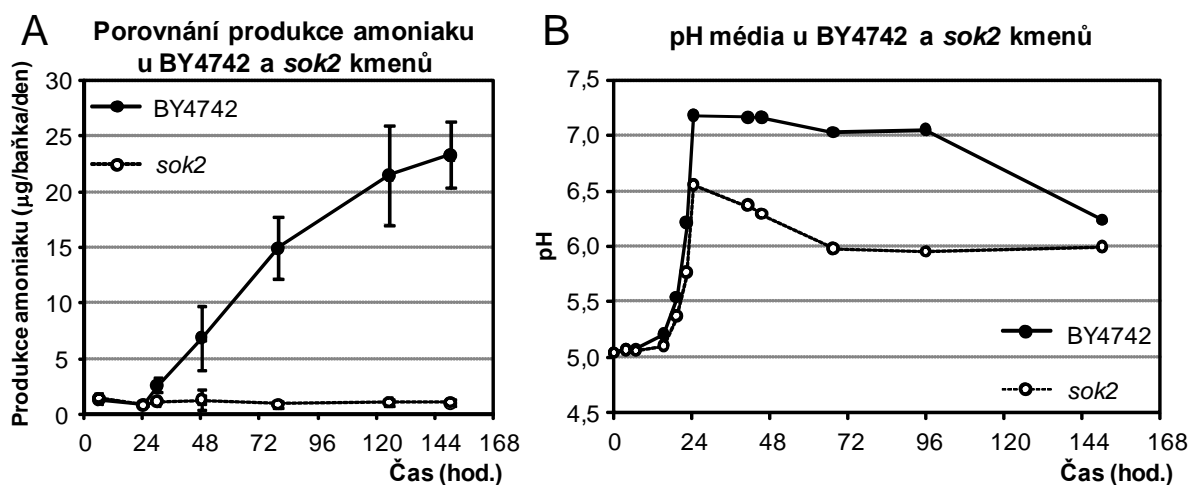
#### **5.3.2 Chování vybraných delečních kmenů**

Již dříve bylo zjištěno, že kolonie kmenů s delecí v kterémkoliv z *ATO* genů mají sníženou schopnost alkalizovat okolní pevné médium a produkovat amoniak (PALKOVA, *et al.*, 2002). Testovala jsem proto chování tří kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3* s delecemi (po řadě) genů *ATO1*, *ATO2* a *ATO3*. Zjistila jsem, že základní parametry pozorované na modelu obřích kolonií jsou u těchto kmenů podobné i při aerobní kultivaci v tekutém médiu. pH okolního tekutého glycerolového média u kultur *ato1*, *ato2* i *ato3* kmene dosahovalo nižších hodnot, než tomu bylo u kmene rodičovského (obr. 15A), a zároveň *ato1*, *ato2* i *ato3* kmene shodně vykazovaly výrazně nižší produkci amoniaku do okolního média (obr. 15B). Delece kteréhokoliv z *ATO* genů pak měla shodný vliv na průběh alkalizace a produkci amoniaku při aerobní kultivaci.

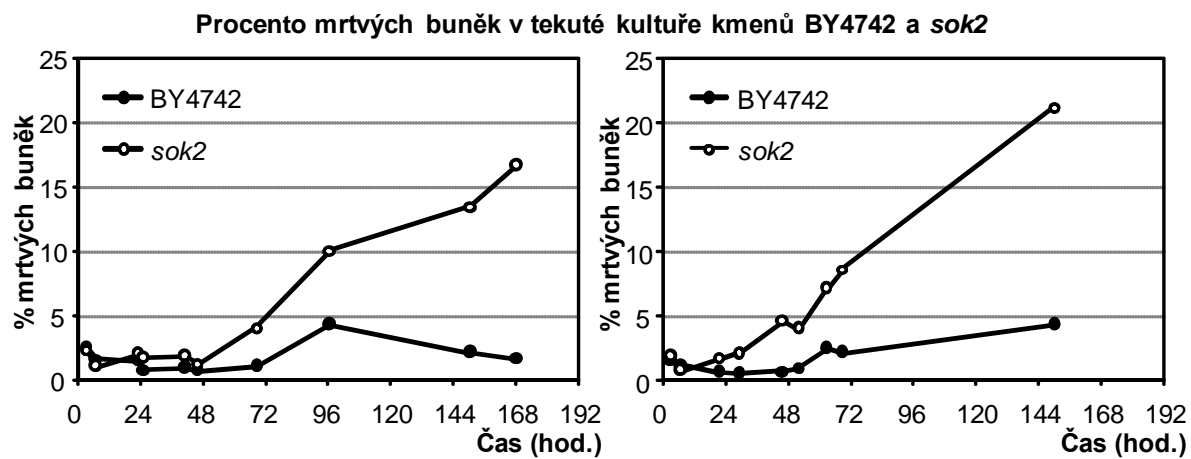
Problémy se vstupem do alkalické fáze a s produkcí amoniaku byly na modelu kvasinkových kolonií zjištěny i u delečního kmene *sok2* (VACHOVA, *et al.*, 2004). Obdobné chování tohoto kmene jsem zjistila při aerobní kultivaci, kdy se maximální hodnoty pH okolního média pohybovaly přibližně o 1 jednotku pH níže než u rodičovského kmene a k poklesu pH okolního média docházelo záhy po dosažení maximální hodnoty (obr. 16B). Produkce amoniaku pak byla (podobně jako u *ato1*, *ato2* a *ato3* kmenů) zanedbatelná v porovnání s rodičovským kmenem BY4742 (obr. 16A). *sok2* deleční kmen během růstu v tekutém glycerolovém médiu vykazoval rovněž zhoršené přežívání oproti kmeni rodičovskému, a to v pozdějších fázích aerobní kultivace (obr.17).



Obr. 15: A) Změny pH v čase při aerobní kultivaci rodičovského kmene BY4742 a tří delečních kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3* v tekutém glycerolovém médiu u vybraného reprezentativního experimentu. B) Produkce amoniaku do prostoru nad hladinou kultury při aerobní kultivaci u rodičovského kmene BY4742 a delečních kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3*. Graf ukazuje průměr tří paralelních měření v rámci vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO.



Obr. 16: A) Produkce amoniaku do prostoru nad hladinou kultury při aerobní kultivaci u rodičovského kmene BY4742 a delečního kmene *sok2*. Graf ukazuje průměr tří paralelních měření v rámci vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO. B) Změny pH v čase při aerobní kultivaci rodičovského kmene BY4742 a delečního kmene *sok2* v tekutém glycerolovém médiu u vybraného reprezentativního experimentu.



Obr. 17: Procento mrtvých buněk při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu u kmenů BY4742 a *sok2*, výsledky dvou nezávislých experimentů.

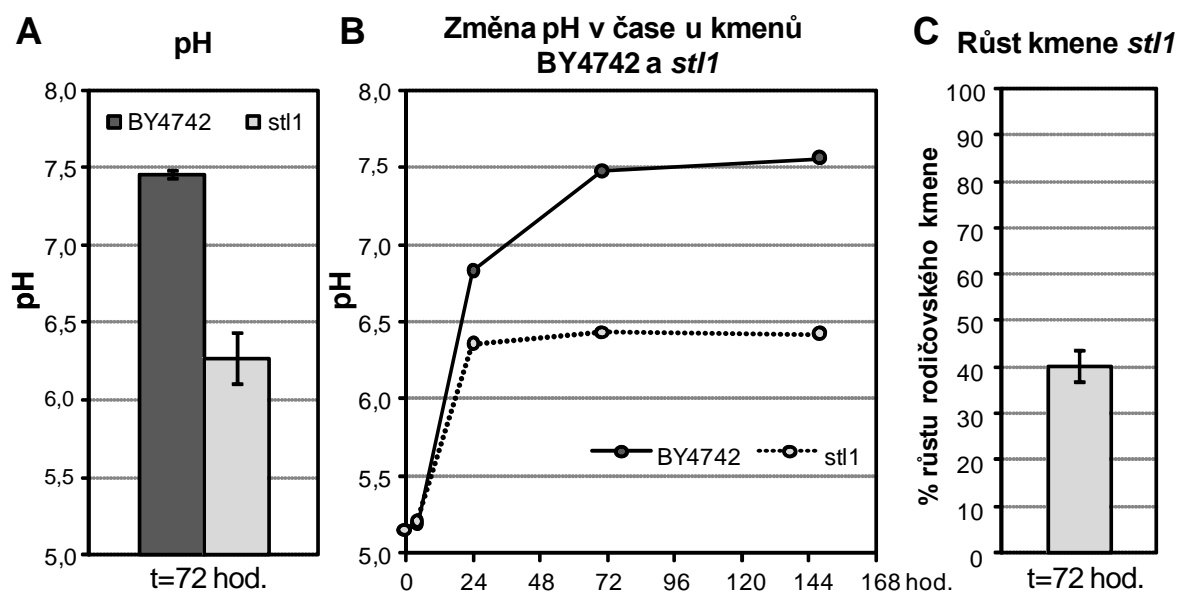


### 5.3.3 Změna pH okolního média u kmene *stl1*

Cíl:

*STL1* gen kóduje symportér glycerolu a  $H^+$  (protonu) lokalizovaný na cytoplazmatické membráně kvasinkové buňky (FERREIRA, et al., 2005). Cílem bylo zjistit, jak delece tohoto genu ovlivňuje vývoj pH okolního média při aerobní kultivaci v tekutém glycerolovém médiu.

Buňky kmene *stl1* postrádajícího *STL1* symportér glycerolu a  $H^+$ , se při růstu na glycerolu jako zdroji uhlíku musí spolehnout na difuzi/usnadněnou difuzi molekul glycerolu přes plazmatickou membránu. pH okolního média je při růstu *stl1* kmene v glycerolovém médiu ve srovnání s rodičovským kmenem snižené (obr. 18A). Nicméně i u kmene *stl1* dochází v průběhu kultivace ke zvýšení pH o více než 1 jednotku (obr. 18B), a to i přesto, že růst tohoto kmene na glycerolovém médiu je oproti rodičovskému kmeni výrazně zhoršený (obr. 18C).



Obr. 18: A) pH okolního média u kmenů BY4742 a *stl1* v čase 72 hodin po inokulaci. Graf ukazuje průměr tří nezávislých měření  $\pm$  SO. B) Vybraný reprezentativní experiment ukazující změny pH v průběhu kultivace kmenů BY4742 a *stl1* v glycerolovém médiu. C) Růst kmene *stl1* v 72. hodině kultivace vztažený k rodičovskému kmeni BY4742. Graf ukazuje průměr tří nezávislých měření  $\pm$  SO.

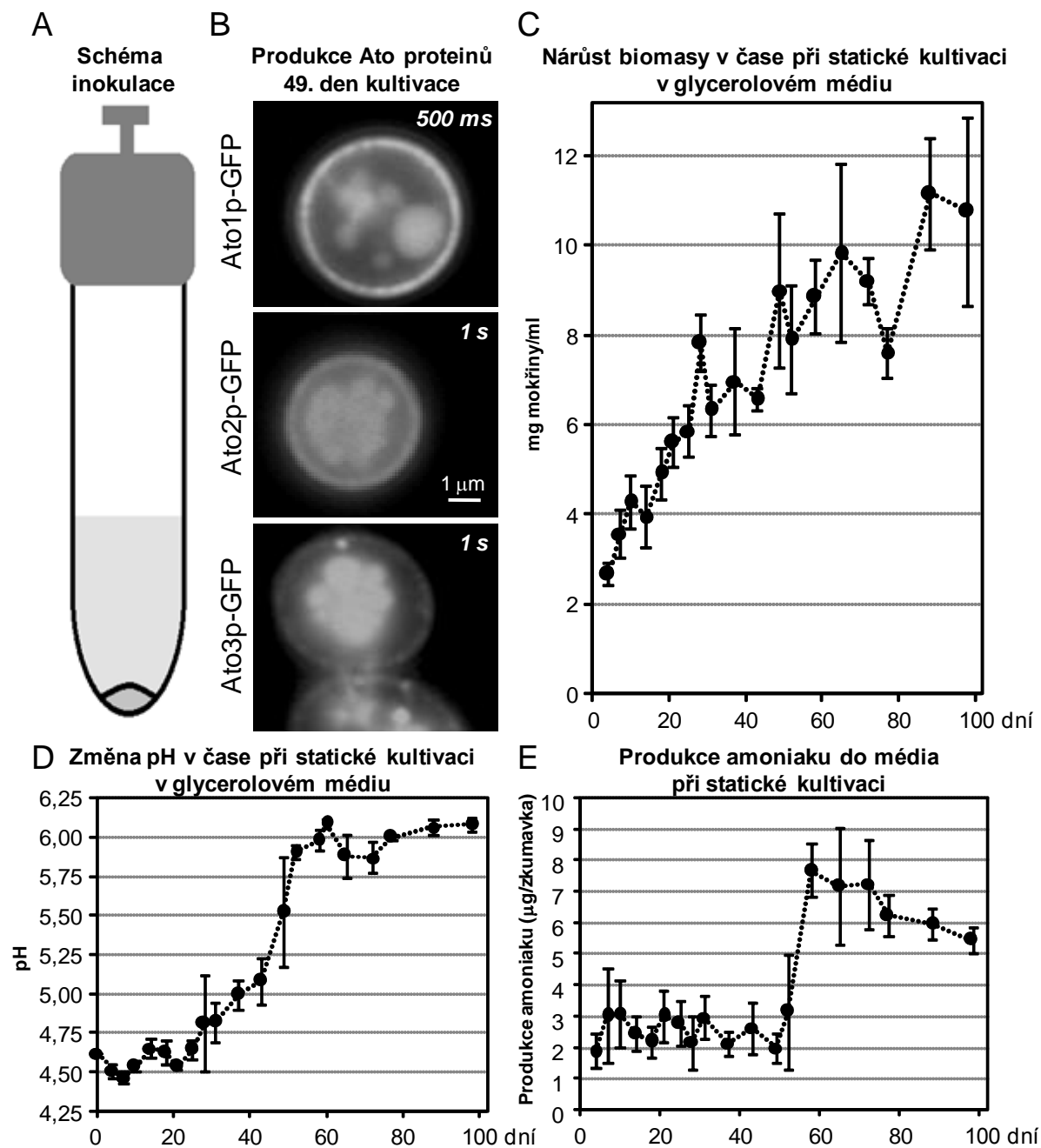
## 5.4 Statická kultivace *S.cerevisiae* a produkce amoniaku

*Cíl:*

*Cílem bylo charakterizovat chování rodičovského kmene (respektive Ato-GFP kmenů) S.cerevisiae při statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu.*

Tekuté glycerolové médium jsem zaočkovala na výslednou hodnotu OD<sub>600</sub> přibližně 0,5, buněčnou suspenzi rozdělila do 10 cm vysokých skleněných zkumavek po 4,2 ml, uzavřela Kapsenbergovými uzávěry (obr. 19A) a kultivovala staticky (tj. bez třepání či promíchání) v termostatu při 28°C. Následně jsem v různých časech měřila OD<sub>600</sub> a hmotnost mokřiny v 1 ml média, pH média, produkci amoniaku do okolního média a produkci Ato-GFP proteinů.

Rychlost růstu populace při statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu spíše odpovídá růstu populace v rámci kvasinkové kolonie: nárůst OD<sub>600</sub> i mokřiny je přibližně lineární (obr. 19C) (stejně jako lineární přírůstek biomasy v případě růstu kvasinkových kolonií). Produkce Ato proteinů (obr. 19B), produkce amoniaku (obr. 19E) i změny pH okolního média (obr. 19D) byly v porovnání s koloniemi značně opožděny, docházelo k nim až několik týdnů po inokulaci. První zvýšení pH média a viditelnou produkci Ato proteinů jsem u statických kultur pozorovala okolo 40. dne kultivace, nárůst množství amoniaku v okolním médiu pak mezi 50. a 60. dnem kultivace. Experiment byl proveden dvakrát s Ato1p-GFP, Ato2p-GFP a Ato3p-GFP kmeny a dvakrát s BY4742 kmenem, kdy byly měřeny pouze některé parametry.

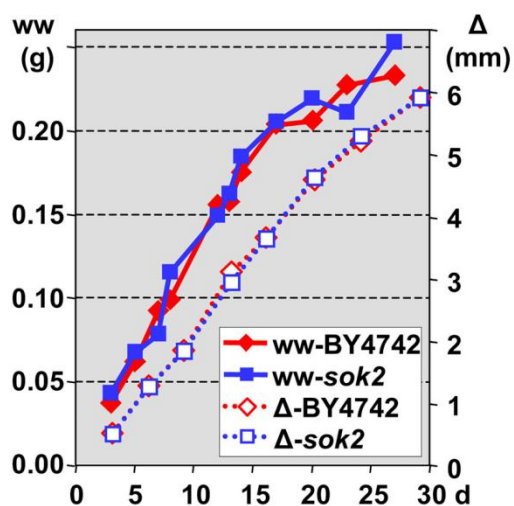


Obr. 19: A) Schéma inokulace kultury do skleněných zkumavek. B) Produkce Ato-GFP proteinů a jejich lokalizace v buňce 49. den po inokulaci. C) Nárůst biomasy (v mg mokřiny v 1 ml média) při statické kultivaci v glycerolovém médiu, průměr ze 4-6 hodnot u vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO. D) Změna pH v čase při statické kultivaci v glycerolovém médiu, průměr ze 3 hodnot u vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO. E) Produkce amoniaku do okolního média při statické kultivaci v glycerolovém médiu, průměr ze 4-6 hodnot u vybraného reprezentativního experimentu  $\pm$  SO.

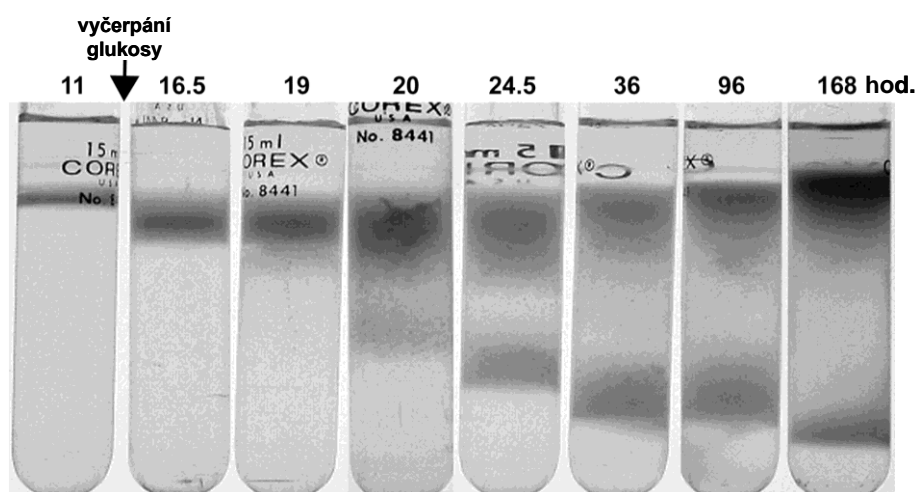
## 5.5 Diskuse 2

Při aerobní kultivaci v tekutém glycerolovém médiu dochází k produkci amoniaku do vzduchu nad kvasinkovou kulturou. Vzhledem ke zcela odlišným kultivačním podmínkám (v porovnání s růstem v podobě kolonií) se může produkce amoniaku buňkami při aerobní kultivaci zdát překvapivá. Odlišná je růstová rychlost - zatímco v tekuté kultuře rychlost přibývání biomasy roste nejprve exponenciálně, později se zpomalí a nakonec úplně zastaví (viz kap. 5.3.1), je přírůstek biomasy u obřích kolonií víceméně lineární po celou sledovanou dobu vývoje (obr. 20), při aerobní kultivaci ve třepané kultuře je zároveň v každém okamžiku zaručena stejná dostupnost kyslíku i živin pro každou jednotlivou buňku. Dalo by se tedy předpokládat, že - na rozdíl od kolonií - bude populace buněk v třepané kultuře homogenní. Ukazuje se ale, že i v tekuté kultuře dochází ve stacionární fázi k určitému rozdělení kultury na výrazně odlišné subpopulace buněk. Allen a kolektiv (ALLEN, *et al.*, 2006) oddělili (na glukosovém médiu po vyčerpání glukosy jako zdroje uhlíku) dvě subpopulace buněk lišících se svou vznášivou hustotou. Zatímco u exponenciálně rostoucí kultury byla populace buněk homogenní a po centrifugaci v hustotním gradientu se vytvořil jediný ostře ohraničený proužek (jediná frakce buněk), po vyčerpání glukosy se začal tento ostrý proužek „rozmývat“ a přibližně mezi 20. a 25. hodinou kultivace bylo již dobře pozorovatelné rozdělení populace na dvě frakce (obr. 21) (ALLEN, *et al.*, 2006). Spodní frakci přitom tvořily velice homogenní klidové buňky, svrchní frakce obsahovala heterogenní populaci buněk tvořenou nejméně dvěma různými typy buněk. Allen a kolektiv (ALLEN, *et al.*, 2006; ARAGON, *et al.*, 2008) navrhli rovněž model vzniku dvou populací v homogenním prostředí třepané kultury, podle nějž vznikají klidové buňky z dečinných buněk oddělených od buněk mateřských až po vyčerpání zdroje živin, a jsou tudíž přizpůsobené k přežití v podmínkách s nízkou koncentrací živin. Uvolnění amoniaku v tekutých kulturách by tak mohlo hrát podobně jako u kolonií (PALKOVA a FORSTOVA, 2000) roli v signalizaci blížícího se vyčerpání určitých živin.

Pomocí metody DNA čipů ("microarrays") byl zjištěn výrazný nárůst exprese *ATO1,2,3* genů při vstupu kvasinkové kolonie do alkalické fáze vývoje (PALKOVA, *et al.*, 2002). Ve stejné době se zvýšila i produkce Ato1p, Ato2p a Ato3p (RICICOVA, *et al.*, 2007). Zvýšení pH okolního média při aerobní kultivaci je rovněž spojeno s výraznou produkcí Ato proteinů v buňkách třepaných kultur (STRACHOTOVÁ, Diplomová práce 2004) a stejně jako u kolonií (PALKOVA, *et al.*, 2002) je zde korelace mezi časováním produkce amoniaku a Ato proteinů. V každém případě jsou Ato proteiny vzhledem k míře jejich produkce při vstupu do alkalické fáze a během ní zřejmě nezbytné pro správný vstup do alkalické fáze a její průběh.



Obr. 20: Přírůstek biomasy (mokřiny, plná čára) a přírůstek poloměru kolonie v oblasti směřující k jejímu vnějšímu okraji (přerušovaná čára) u obřích koloniím kmenů BY4742 a *sok2*. (Převzato z (VACHOVA a PALKOVA, 2005))



Obr. 21: Při centrifugaci v hustotním gradientu se populace aerobně kultivovaných buněk po určité době kultivace dělí na dvě frakce. Šipka značí okamžik vyčerpání glukosy jako zdroje uhlíku. (Převzato a upraveno podle (ALLEN, *et al.*, 2006))

U obřích kolonií tvořených buňkami kmene *sok2* byla již dříve popsána snížená exprese *ATO* genů v atypické alkalické fázi jejich vývoje stejně jako nedostatečná produkce amoniaku (VACHOVA, *et al.*, 2004). Totéž pak platí pro vývoj obřích kolonií kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3*. (PALKOVA, *et al.*, 2002) Nyní jsem prokázala, že (stejně jako kolonie) i tekuté kultury těchto kmenů vykazují sníženou produkci amoniaku ve srovnání s kmenem rodičovským. Tyto výsledky naznačují, že i přes odlišné kultivační podmínky by alespoň některé mechanismy kontroly růstu či genové exprese mohly být pro kolonie a aerobně kultivované

tekuté kultury společné. Horší přežívání buněk kmene *sok2* v pozdějších časech aerobní kultivace v tekutém glycerolovém médiu je rovněž paralelou ke zhoršenému přežívání *sok2* kmene v pozdějších fázích (zejména na konci alkalické fáze a v druhé acidické fázi) vývoje kvasinkových kolonií (VACHOVA, *et al.*, 2004). Jelikož kolonie *sok2* kmene nejsou schopné (patrně v důsledku nedostatečné produkce amoniaku) adaptivních metabolických změn a dostatečné vertikální ani horizontální diferenciaci při vstupu do alkalické fáze vývoje (CAP, *et al.*, 2012; VACHOVA, *et al.*, 2004; VACHOVA a PALKOVA, 2005), může mít zhoršené přežívání *sok2* kmene při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu podobné příčiny.

Přidání glycerolu do média vede ke vzestupu pH média, což je přičítáno jednomu z mechanismů vstupu glycerolu do buňky - symportu s  $H^+$  (LAGES a LUCAS, 1997). Ke vstupu glycerolu do buňky za současného vstupu protonu dochází činností Stl1p proteinu. (FERREIRA, *et al.*, 2005). (Gut1p a Gut2p proteiny, jež byly původně identifikovány jako proteiny aktivně transportující glycerol do buňky (HOLST, *et al.*, 2000), mají patrně jinou funkci (NEVES, *et al.*, 2004)). Vstup glycerolu do kvasinkové buňky zprostředkovává rovněž Fps1p protein - kanál zodpovědný za podstatnou část pasivní difuze glycerolu do buňky (OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Při testování pH média při aerobní kultivaci *stl1* kmene v tekutém glycerolovém médiu jsem zjistila, že pH okolního média je u *stl1* kmene po 24 hodinách kultivace nižší než u kmene rodičovského. Zvýšení pH okolního média při růstu na glycerolu jako jediném zdroji uhlíku se nicméně nedá vysvětlit pouze symportem molekuly glycerolu s  $H^+$ . I u kmene *stl1* totiž dochází v průběhu kultivace k poměrně výraznému zvýšení pH (viz kap. 5.3.3 a obr. 18B). Ke zvýšení pH okolního glycerolového média při růstu *stl1* kmene dochází i přesto, že růst kmene na glycerolu jako jediném zdroji uhlíku je oproti rodičovskému kmeni dle očekávání výrazně zhoršený. Ačkoliv tedy aktivní transport glycerolu patrně přispívá k alkalizaci okolního média, je za ni zodpovědný pouze částečně. Z hlediska transkriptomových změn u rodičovského kmene BY4742 během přechodu kvasinkových kolonií do alkalické fáze je alkalizace okolního média vysvětlitelná například snížením exprese genu *PMA1* pro membránovou  $H^+$ -ATPasu či aktivací řady genů kódujících transportní systémy pro různé ionty (například *PHO84*, *PHO89*, *SUL1*, *SUL2*, *ZRT1*) a *ATO* genů (PALKOVA, *et al.*, 2002). Expresе mnohých z genů kódujících transportní systémy pro různé ionty (například *SUL1*, *PHO89*, *ZRT1*, *ATO* geny) je u *sok2* kmene snižená, změny v expresi *STL1* genu zaznamenány nebyly (VACHOVA, *et al.*, 2004). V modelovém uspořádání aerobně kultivovaných (třepaných) kultur *S.cerevisiae* má delece *SOK2* a *STL1* genu na pH

okolního média při aerobní kultivaci obdobný vliv, nedostatečná alkalizace okolního pH u *sok2* a *stl1* kmenů má ale spíše různé příčiny.

Při statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu je nárůst biomasy v čase podobně jako u modelu obřích kolonií lineární, nicméně výrazně pomalejší. Navíc, na rozdíl od modelu aerobně kultivovaných kultur může při statické kultivaci (za absence promíchávání média třepáním) docházet k tvorbě gradientů. V každém případě dochází ve statických tekutých kulturách - stejně jako u kolonií - ke zvyšování pH okolního média a současné produkci amoniaku a Ato proteinů. Podobnost tohoto modelového uspořádání s modelem obřích kolonií je zajímavá, poněvadž může rovněž představovat model populace kvasinkových buněk přežívajících dlouhodobě v přírodě za podmínek nedostatku živin.

Celkově lze říci, že ve všech zavedených modelech, tedy při růstu kvasinkových obřích kolonií na pevném glycerolovém médiu, a při aerobní i statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu, koreluje zvýšení pH okolního média s produkcí amoniaku a Ato proteinů.

## 5.6 Příprava a základní charakterizace kmene se současnou delecí genů *ATO1*, *ATO2* a *ATO3*

*Cíl:*

*Cílem této části práce bylo připravit a charakterizovat kmen *ato1/ato2/ato3*, tedy kmen s delecí ve všech třech genech pro Ato proteiny, a porovnat jeho chování za různých podmínek s chováním kmene rodičovského.*

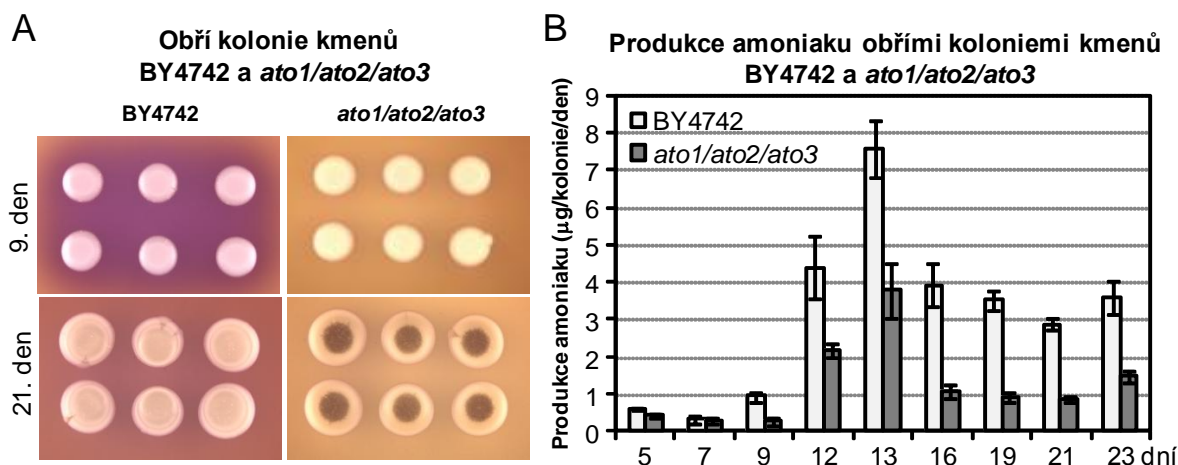
*Příprava kmene *ato1/ato2/ato3**

Ve spolupráci s Mgr. Karlem Harantem jsem připravila kmen *ato1/ato2/ato3* s delecí ve všech třech genech pro možné transportéry amonného kationtu. Výchozím kmenem byl *ato3* deleční kmen ze sbírky Euroscarf. Ten byl po řadě transformován delečními kazetami, jež zajistily nahrazení genu *ATO1* genem *SpHIS3* a genu *ATO2* genem *KIURA3*. Jelikož geny *SpHIS3* i *KIURA3* jsou ohraničeny LoxP místy, bylo následně možno tyto geny odstranit pomocí *cre* rekombinasy kódované na plazmidu pSH65 (viz kap. 4.1, Materiál, a kap. 4.2., Metody). Následně jsem provedla základní fyziologickou charakterizaci tohoto kmene, a to jak na modelu obřích kolonií, tak při aerobní kultivaci v tekutém médiu.

*Základní charakterizace obřích kolonií kmene *ato1/ato2/ato3**

Sledovala jsem průběh alkalizace a míru produkce amoniaku (který jsem jímala do mističek s 10% kyselinou citronovou instalovaných pod každou z kolonií na misce (viz kap. 4.2, Metody) u obřích kolonií kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3*. Alkalizace okolního média byla minimální a i produkce amoniaku byla u *ato1/ato2/ato3* kmene v porovnání s kmenem rodičovským výrazně snižena. (obr. 22)

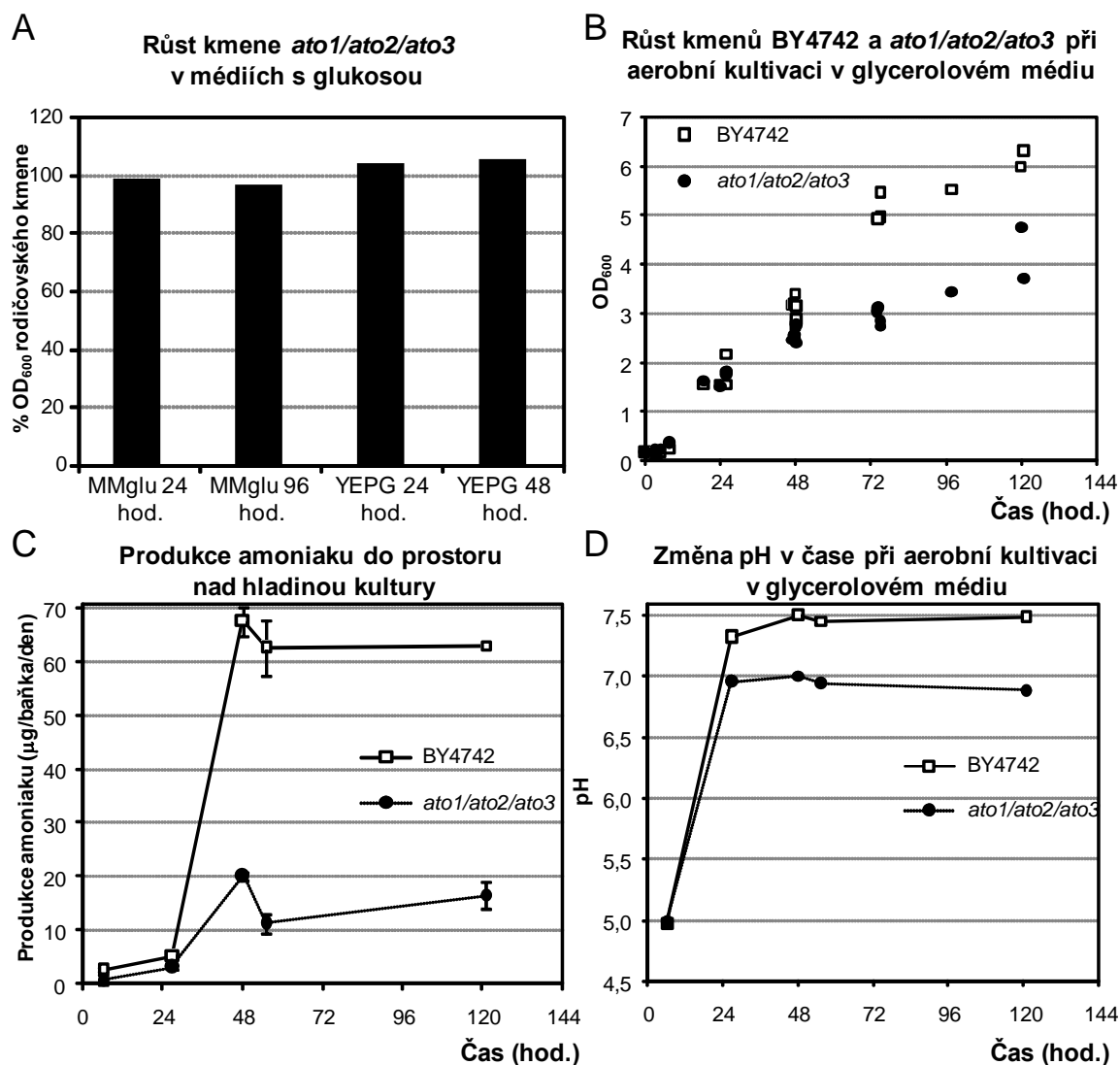




Obr. 22: A) Obří kolonie kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3* na počátku alkalické fáze (9.den vývoje obřích kolonií) a při vstupu do druhé acidické fáze (21. den vývoje) u vybraného reprezentativního experimentu. B) Produkce amoniaku obřími koloniemi kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3*, průměr z 6 hodnot  $\pm$  SO ve vybraném reprezentativním experimentu.

#### Základní charakterizace kmene *ato1/ato2/ato3* při kultivaci v tekutém médiu

Růstová rychlost rodičovského a *ato1/ato2/ato3* kmene v tekutém YEPG médiu byla dle očekávání shodná (obr. 23A), jelikož k expresi Ato proteinů za přítomnosti glukosy v médiu nedochází (viz kap. 5.7.2 a 5.7.3). Růstová rychlost se zpočátku (cca prvních 24 hodin) nelišila ani při aerobní kultivaci v tekutém glycerolovém médiu, nicméně v pozdějších časech kultivace bylo u *ato1/ato2/ato3* kmene patrné zpomalení růstu (obr. 23B). To koresponduje se situací u obřích kolonií, kdy kolonie *ato1/ato2/ato3* kmene v druhé acidické fázi (u nichž je alkalická fáze velice slabá nebo zcela chybí) prosperují hůře než kolonie kmene rodičovského (obr. 22A). Obdobně jako u kmenů s delecí jednotlivých *ATO* genů jsem i u *ato1/ato2/ato3* kmene dle očekávání zaznamenala sníženou míru alkalizace média (obr. 23D) a sníženou produkci amoniaku (obr. 23C). Průběh vývoje pH média a míra produkce amoniaku byly ovlivněny obdobně jako u kmenů s delecí jednoho konkrétního *ATO* genu. (obr.15A a B a 23C a D.)

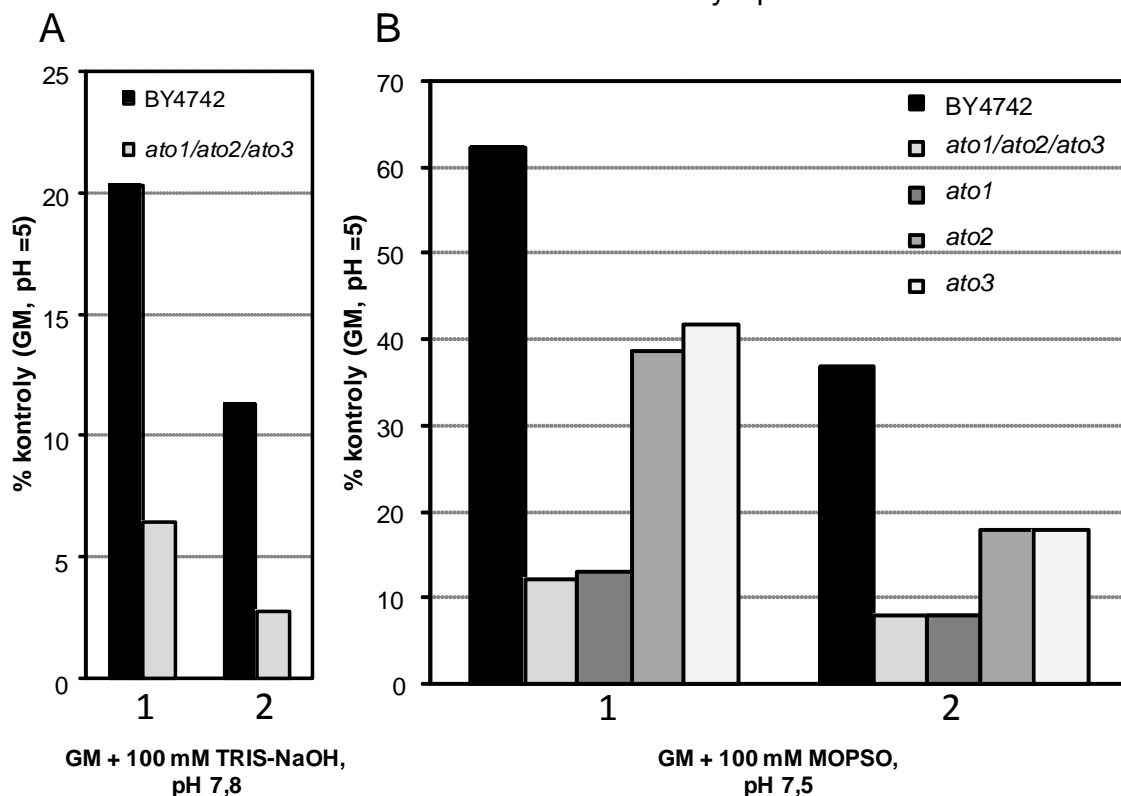


Obr. 23: A) Růst kmene *ato1/ato2/ato3* v minimálním (MMglu) a komplexním (YEPG) médiu s glukosou jako zdrojem uhlíku v % OD<sub>600</sub> rodičovského kmene. B) Vývoj OD<sub>600</sub> v čase při aerobní kultivaci kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3* v glycerolovém médiu, sumarizace několika (3) experimentů. C) Produkce amoniaku v kulturách kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3* do prostoru nad hladinou kultury při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu, průměr ze 3 hodnot u vybraného reprezentativního experimentu ± SO. D) Změna pH v čase u kmenů BY4742 a *ato1/ato2/ato3* při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu.

### *Růst kmenů s delecí ATO genů v médiu s mírně alkalickým pH*

Jelikož je počátek produkce Ato proteinů spojen s růstem pH kultury k mírně alkalickým hodnotám a jelikož růst *ato1/ato2/ato3* se po alkalizaci okolního média oproti růstu rodičovského kmene zpomaluje, testovala jsem při charakterizaci *ato1/ato2/ato3* kmene jeho růst rovněž v GM médiu, jehož počáteční pH bylo vyšší než 5 (tedy vyšší než u standardního GM s počátečním pH upraveným na hodnotu 5, které bylo používáno jako médium kontrolní). Prvotní experimenty jsem prováděla v GM médiu, jehož pH jsem upravila na hodnotu 7,8 pomocí 100 mM TRIS-NaOH pufru. Zjistila jsem, že *ato1/ato2/ato3* kmen není v porovnání s rodičovským kmenem za těchto podmínek téměř schopen růstu (obr. 24A). (Následující podrobnější experimenty ukázaly, že již při pH 6,8 je možné pozorovat mírný rozdíl v růstu mezi BY4742 a *ato1/ato2/ato3* kmenem. V porovnání s kontrolním médiem dosahoval nárůst po 24 hodinách kultivace v GM médiu o hodnotě pH 6,8 u kmene BY4742  $74,8 \pm 7,9$  % kontroly, u kmene *ato1/ato2/ato3* pak  $53,7 \pm 11,4$  % kontroly (průměr ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SO)). Když jsem následně testování rozšířila i na *ato1*, *ato2* a *ato3* kmeny, zjistila jsem stejný fenotyp i u těchto kmenů, nicméně s tím rozdílem, že růst kmenů s delecí *ATO2* nebo *ATO3* genů byl v alkalickém pH ovlivněn méně výrazně (obr. 24B).

Porovnání růstu rodičovského kmene a *ato1/ato2/ato3*, *ato1*, *ato2* a *ato3* delečních kmenů v médiích s alkalickým pH



Obr. 24: A) Porovnání růstu rodičovského kmene BY4742 a kmene *ato1/ato2/ato3* při aerobní kultivaci v GM médiu o pH 7,8 v čase 24 h po inokulaci. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech příslušné hodnoty dosažené na kontrolním médiu (GM, pH=5). B) Porovnání růstu rodičovského kmene BY4742 a kmeň *ato1/ato2/ato*, *ato1*, *ato2* a *ato3* při aerobní kultivaci v GM médiu o pH 7,5 v čase 24 h po inokulaci. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech příslušné hodnoty dosažené na kontrolním médiu (GM, pH=5). V obou případech grafy ukazují výsledky dvou nezávislých experimentů (1 a 2).

## 5.7 Produkce Ato-GFP proteinů v různých médiích

*Cíl:*

*Zájem pracovní skupiny o Ato proteiny má kořeny v z našeho hlediska klíčovém časování počátku exprese ATO genů při vývoji kvasinkových kolonií (exprese začíná při vstupu kolonií do alkalické fáze) a v neschopnosti obřích kolonií delečních kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3* produkovat v dostatečné míře amoniak. Cílem této části práce bylo podrobněji charakterizovat podmínky produkce Ato proteinů.*

Jelikož růst všech kmenů s delecí některého z *ATO* genů je ovlivněn při vyšším pH média, rozhodla jsem se tedy podrobněji charakterizovat vliv pH na expresi *ATO* genů.

Pro sledování produkce Ato-GFP proteinů v různých médiích byly použity *Ato1p-GFP*, *Ato2p-GFP* a *Ato3p-GFP* kmeny odvozené od rodičovského kmene *S.cerevisiae* BY4742. Pro přípravu kmenů jsem použila plazmid pKT209, jež nese gen pro GFP s kodonovou optimalizací pro *S.cerevisiae*.

### 5.7.1 Vliv pH na produkci Ato-GFP proteinů

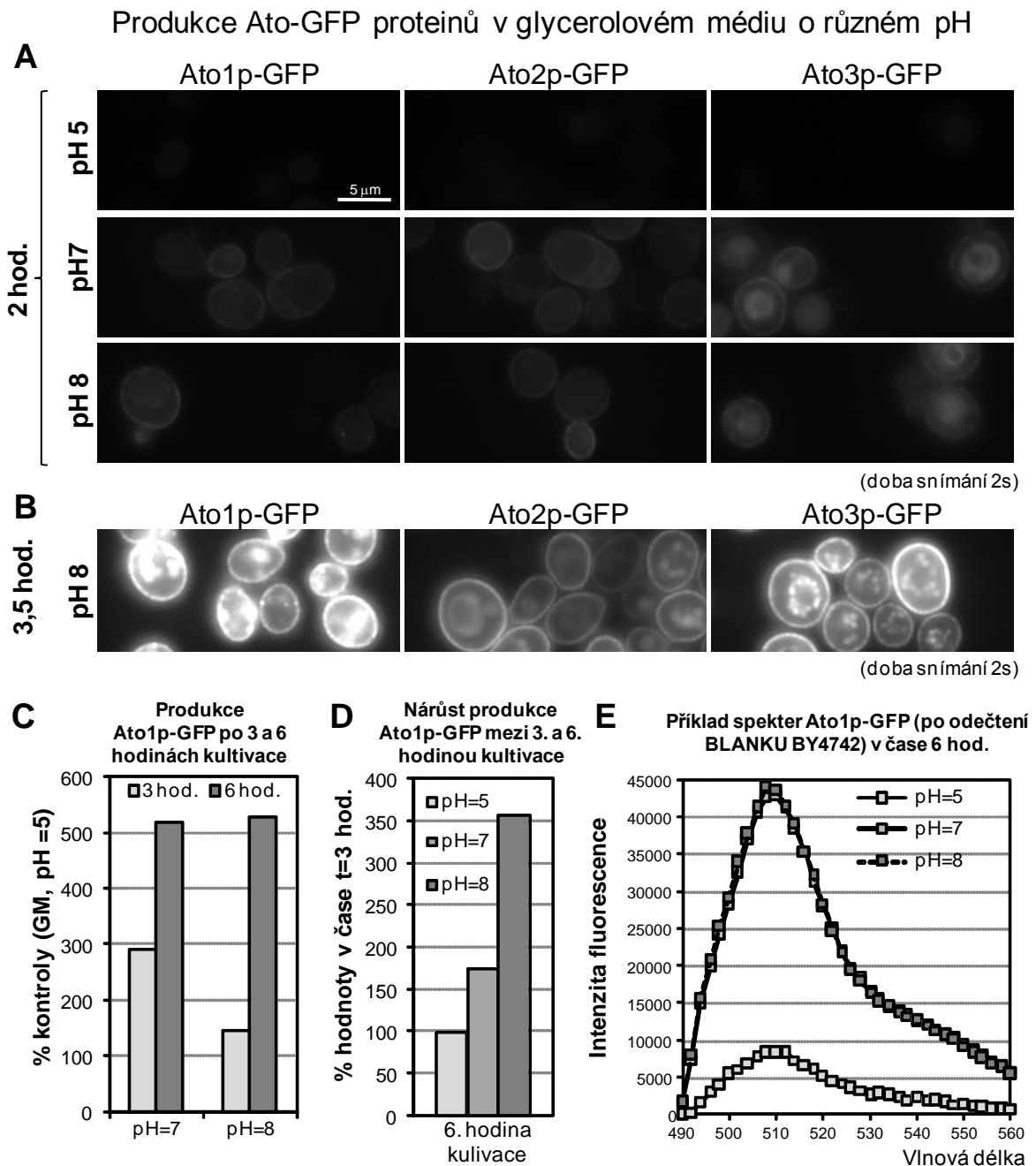
*Produkce Ato-GFP proteinů při aerobní kultivaci v médiích o různém pH*

Pro sledování míry produkce Ato-GFP proteinů při aerobní kultivaci v médiích o různém pH jsem zvolila několik experimentálních přístupů: fluorescenční mikroskopii a fluorescenční spektroskopii. Jako inokulum jsem používala vždy kultury kmenů *Ato1p-GFP*, *Ato2p-GFP* a *Ato3p-GFP*, u nichž dosud nezapočala produkce Ato proteinů (získané krátkodobou kultivací v YEPG médiu nebo GM médiu, nepřítomnost fluorescenčního signálu GFP v buňkách inokula jsem vždy ověřila příslušným přístupem).

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsem dokumentovala téměř okamžité započetí produkce (dobře pozorovatelný signál v čase  $t = 2$  hodiny) u všech *Ato1,2,3p-GFP* proteinů po přenesení z GM média o pH 5 do média s alkalickým pH (pH 7,7). Detailnější analýza ukázala, že již v čase 2 hodiny po inokulaci se objevila produkce všech Ato-GFP proteinů v médiu s pH o hodnotě 6,8 a vyšší. Ato-GFP proteiny jsou lokalizovány téměř výhradně na plazmatické membráně (popřípadě v endoplazmatickém retikulu), což svědčí pro započetí

intenzivní exprese *ATO* genů po přenosu do média s alkalickým pH (obr. 25A). V kontrolním médiu (GM, pH = 5) není fluorescenční signál GFP v tomto čase pozorovatelný. K nejméně výrazným změnám v produkci dochází u Ato1p-GFP proteinu, následuje Ato3p-GFP protein, nejslabší je reakce Ato2p-GFP proteinu - tyto výrazné rozdíly jsou dobře pozorovatelné přibližně v čase 3 hodiny po inokulaci (obr. 25B) a později.

Vedle mikroskopie jsem pro porovnání produkce Ato-GFP proteinů při různém pH (pH = 5, 7 a 8) použila fluorescenční spektroskopii (obr. 25C, D a E). Jako inokulum jsem v tomto případě používala buňky kultivované přes noc v tekutém YEPG médiu. Měřila jsem vždy celé emisní spektrum GFP v rozmezí 490-560 nm při excitaci světlem o vlnové délce  $484 \pm 5$  nm. Po odečtení pozadí, tedy spektra získaného pro rodičovský kmen BY4742 kultivovaný v odpovídajícím médiu, v každém bodě křivky jsem stanovila hodnoty signálu v emisním maximu GFP (510 nm), jež jsem následně porovnávala. Tento přístup potvrdil výsledky získané pomocí mikroskopie. V reakci na zvýšené pH okolního média reaguje buňka zejména zvýšením produkce Ato1p-GFP proteinu (obr. 25C), výrazné zvýšení produkce Ato1p-GFP proteinu je pozorovatelné již po 3 hodinách kultivace a produkce ještě dále stoupá (obr. 25A a B). Zvýšenou míru produkce při kultivaci v glycerolovém médiu o hodnotě pH 7 jsem za využití této metody zjistila i u Ato2p-GFP (115% kontroly v čase 3 h a 120% v čase 6 h) a Ato3p-GFP proteinů (při pH 7: 122% kontroly v čase 3 h a 171% v čase 6 h). Jako kontrola sloužila hodnota intenzity fluorescence buněk v odpovídající kultuře rostoucí v kontrolním médiu (GM, pH = 5).



Obr. 25: A) Mikrofotografie buněk kmenů Ato1p-GFP, Ato2p-GFP a Ato3p-GFP při kultivaci v kontrolním médiu (pH = 5) a médiích s alkalickým pH (pH = 7 a 8) v čase 2 hodiny po inokulaci. B) Rozdíly v produkci Ato1p-GFP, Ato2p-GFP a Ato3p-GFP proteinů v médiu o pH=8 v čase 3,5 hodiny po inokulaci. C) Spektrofluorometrické stanovení míry produkce Ato1p-GFP proteinu v médiích s alkalickým pH (pH = 7 a 8) (míra produkce je vztažena k hodnotám v kontrolním médiu o pH=5) v časech 3 a 6 hodin po inokulaci. D) Spektrofluorometrické stanovení nárůstu produkce Ato1p-GFP proteinu mezi 3. a 6. hodinou kultivace v médiích o pH = 5, 7 a 8. E) Příklad spekter naměřených pro Ato1p-GFP po odečtení blanku (hodnot obdrženy pro rodičovský kmen BY4742) v čase 6 hodin.

### 5.7.2 Vliv zdroje uhlíku na produkci Ato-GFP proteinů

*Cíl:*

*Jelikož je Ato1p proteinu přisuzována role v transportu acetátu (PAIVA, et al., 2004) do buňky, testovala jsem míru jeho produkce v médiích s různými zdroji uhlíku.*

Míru produkce Ato-GFP proteinů jsem testovala jednak v komplexním tekutém médiu (obsahujícím 1% YE) s následujícími zdroji uhlíku: glycerolem (3%), ethanolem (1%), kyselinou octovou (0,5% a 2%), kyselinou mléčnou (0,5% a 2%) nebo glukosou (2%), jednak v minimálním tekutém médiu s glycerolem (3%), kyselinou octovou (0,5%), kyselinou mléčnou (0,5%) a glukosou (2%). Počáteční pH média jsem ve všech případech upravila na hodnotu 5, médium nebylo v tomto případě pufrováno. Jako inokulum byly použity kultury příslušných kmenů kultivované přes noc v tekutém YEPG médiu a před inokulací dvakrát promyté destilovanou vodou (pomocí fluorescenční mikroskopie byla vždy ověřena nepřítomnost fluorescenčního signálu GFP u buněk inokula). Výsledky dosažené v komplexním a minimálním médiu se výrazně nelišily, následující odstavce proto shrnují výsledky získané při kultivacích v komplexních médiích s příslušným zdrojem uhlíku a jejich porovnání se situací ve standardně používaném komplexním glycerolovém médiu (1% YE, 3% glycerol, pH5).

#### *Produkce Ato1p-GFP proteinu na nezkvasitelných zdrojích uhlíku*

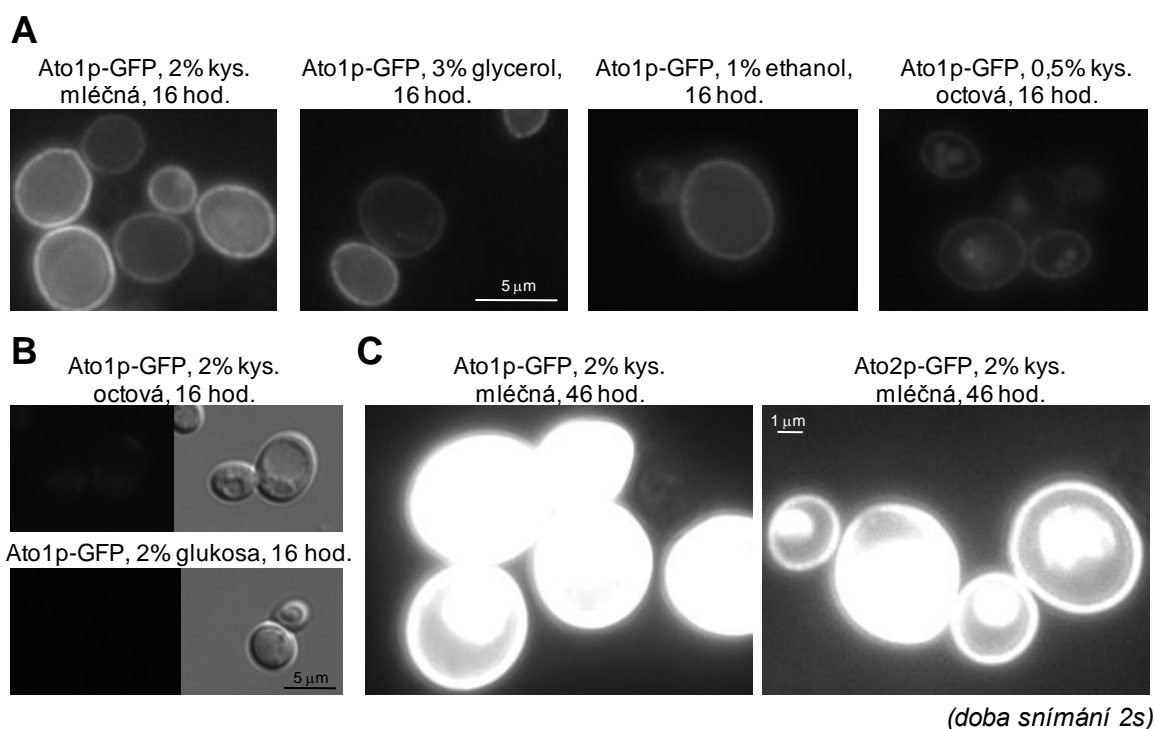
Po 16 hodinách kultivace (tedy v době, kdy je standardně dobře pozorovatelná produkce Ato1p-GFP v médiu s glycerolem) byl signál Ato1p-GFP nejsilnější na médiu s kyselinou mléčnou jako zdrojem uhlíku (při obou použitých koncentracích, tedy 0,5% i 2%), následovala média s glycerolem a ethanolem. Slabá exprese byla pozorovatelná na médiu s 0,5% kyselinou octovou (obr. 26A). Na médiích s 2% kyselinou octovou a glukosou nebyl membránový signál Ato1p-GFP pozorovatelný (Obr. 26B).



## Produkce Ato2p-GFP a Ato3p-GFP proteinů na nezkrasitelných zdrojích uhlíku

Produkce proteinu Ato2p-GFP na různých zdrojích uhlíku se podobala produkci proteinu Ato1p-GFP. Vůbec nejsilnější fluorescenční signál Ato1p-GFP i Ato2p-GFP jsem pozorovala po dvoudenní kultivaci v médiu s 2% kyselinou mléčnou (obr. 26C).

Vliv zdroje uhlíku na produkci Ato3p-GFP proteinu jsem testovala méně detailně. Dá se říci, že produkce Ato3p-GFP proteinu je ve srovnání s produkcí Ato1p-GFP a Ato2p-GFP proteinů obdobná, pouze míra produkce je nižší na médiu s ethanolem a glukosa funguje v represi jeho produkce méně efektivně (dochází k "prokluzování" promotoru) Při některých stanoveních intenzity fluorescenčního signálu Ato3p-GFP proteinu byl totiž, a to zejména při měřeních za využití fluorescenčního spektrometru, porozován slabý fluorescenční signál GFP u inokula kultivovaného přes noc v YEPG. U kmenů Ato1p-GFP a Ato2p-GFP fluorescenční signál v inokulu nikdy pozorován nebyl.



Obr. 26: A) Produkce Ato1p-GFP na médiích s různým zdrojem uhlíku na mikrofotografiích buněk kmene Ato1p-GFP v čase 16 hodin po inokulaci. B) Mikrofotografie buněk kmene Ato1p-GFP v médiích s 2% kyselinou octovou či glukosou v čase 16 hodin po inokulaci. C) Mikrofotografie buněk kmenů Ato1p-GFP a Ato2p-GFP v čase 46 hodin po inokulaci. Doba snímání signálu byla v všech případech 2s.

### *pH okolního média při růstu na různých zdrojích uhlíku*

Po 24 hodinách kultivace dosahovalo pH okolního média při kultivaci v médiu: s 0,5% kyselinou mléčnou hodnot okolo 8, s 0,5% kyselinou octovou hodnot okolo 7,5, s 3% glycerolem hodnot okolo 7, s 1% ethanolem hodnot okolo 6,5 a 2% glukosou hodnot nižších než 5. S výjimkou kultivace v médiu s kyselinou octovou tak byla míra produkce Ato proteinů přímo úměrná výšce hodnoty pH okolního média.

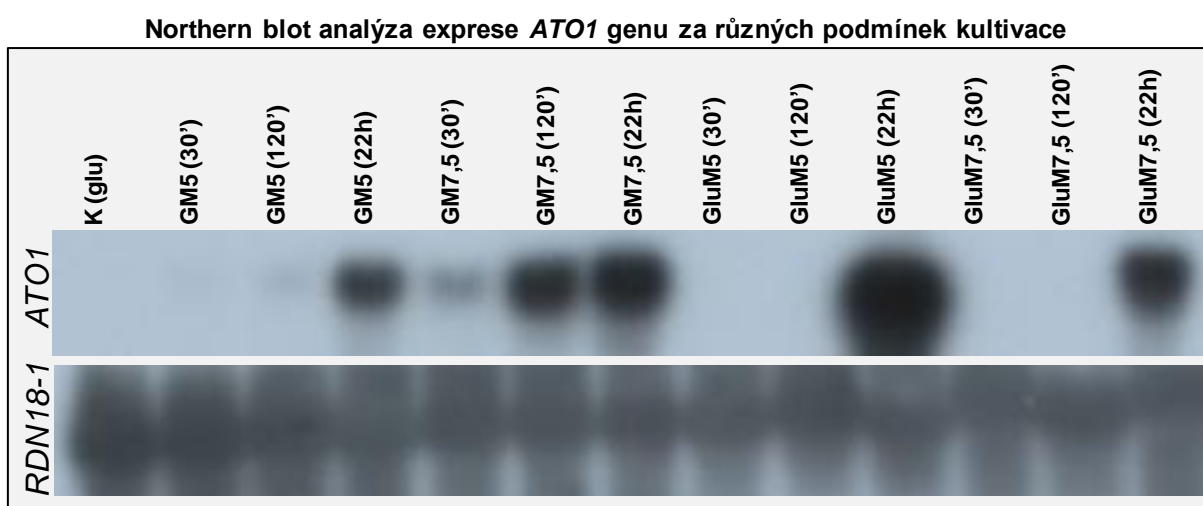
### 5.7.3 Vliv pH a zdroje uhlíku na produkci Ato proteinů

Cíl:

*Alkalické pH okolního média a/nebo přítomnost nefermentovatelného zdroje uhlíku vede k produkci proteinů Ato1p, Ato2p a Ato3p. Cílem bylo zjistit, zda je indukce exprese ATO1 genu alkalickým pH nadřazena glukosové represí či zda je tomu naopak.*

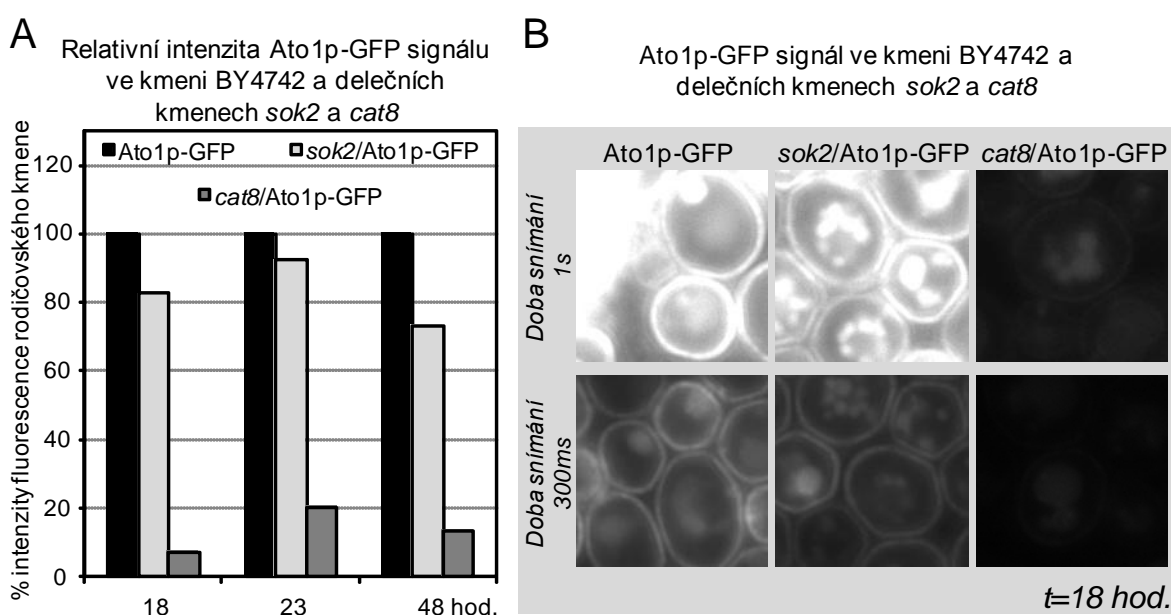
#### *Regulace produkce a stability Ato1p proteinu*

Provedla jsem Northern blot analýzu exprese *ATO1* genu při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu o pH 5 a 7,5 a v glukosovém médiu o pH 5 a 7,5 v časech 30 minut, 120 minut a 22 hodin po inokulaci. (Média nebyla pufrována, přítomnost glukosy v médiu v čase 22 hodin jsem zkontrolovala za použití diagnostického proužku DP GlukoPhan s negativním výsledkem ve všech případech). V glycerolovém médiu o pH 5 jsem dle očekávání zaznamenala expresi v čase 22 hodin, v glycerolovém médiu o pH 7,5 byla exprese dobře patrná již 30 minut po inokulaci a 120 minut po inokulaci byla exprese *ATO1* genu velice silná. V glukosovém médiu naopak ani zvýšené pH média nevedlo k expresi *ATO1* genu. K expresi *ATO1* genu došlo v obou testovaných médiích (pH 5 a pH 7,5) až po vyčerpání glukosy jako zdroje uhlíku (obr. 27).



Obr. 27: Northern blot analýza exprese genu *ATO1* u inokula (= K(glu) - buňky kultivované aerobně pře noc v YEPG médiu) a při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu o pH 5 a 7,5 a v glukosovém médiu o pH 5 a 7,5 v časech 30 minut, 120 minut a 22 hodin po inokulaci.

Dále jsem zjišťovala vliv nepřítomnosti Cat8p a Sok2p transkripčních faktorů na expresi *ATO1* genu (Cat8p je nezbytný pro derepresi řady genů při růstu na nefermentovatelném zdroji uhlíku, u *sok2* kmene byla dokumentována snížená exprese *ATO* genů). Měření jsem prováděla pomocí spektrofluorimetru u připravených kmenů *cat8/Ato1p-GFP* a *sok2/Ato1p-GFP* v časech 18, 23 a 48 hodin ve standardním glycerolovém médiu. Rozdíl v intenzitě Ato1p-GFP signálu při mikroskopickém pozorování kmenů BY4742 a *sok2/Ato1p-GFP* nebyl výrazný, nicméně u *sok2* kmene je výraznější lokalizace signálu uvnitř buňky, kdy se patrně jedná o degradační produkty ve vakuole (obr. 28B). Spektrofluorimetrické měření intenzity fluorescence ukázalo mírný rozdíl v intenzitě signálu při porovnání *sok2/Ato1p-GFP* kmene s kmenem rodičovským (obr. 28A). Intenzita fluorescence Ato1p-GFP proteinu v *cat8/Ato1p-GFP* kmeni je velice slabá (obr. 28B), toto bylo potvrzeno i při měření intenzity fluorescence za využití spektrofluorimetru (obr. 28A).

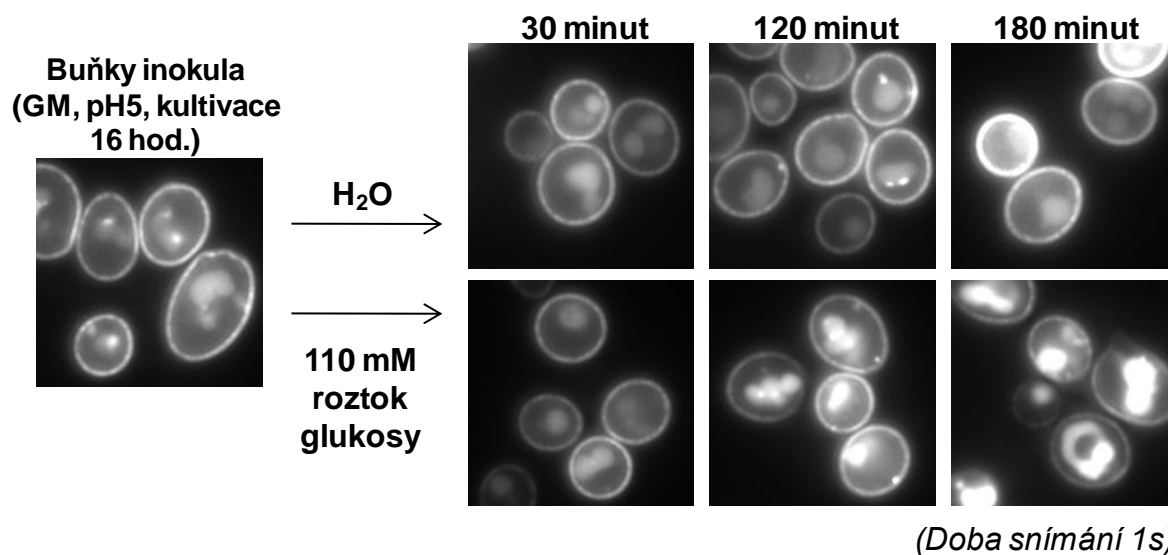


Obr. 28: A) Spektrofluorimetrické měření intenzity fluorescence a B) mikrofotografie buněk kmenů Ato1p-GFP, *sok2/Ato1p-GFP* a *cat8/Ato1p-GFP*.

Orientačně jsem rovněž testovala, co se stane, přenesu-li buňky Ato1p-GFP kmene aerobně kultivované 16 hodin v glycerolovém médiu o počáteční hodnotě pH 5 (tedy buňky s výraznou lokalizací Ato1p-GFP proteinu na cytoplazmatické membráně) do 110 mM roztoku glukosy. Jako kontrolu jsem použila buňky přenesené do vody. Mikrofotografie jsem pořizovala 30, 120 a 180 minut po přenesení do vody či roztoku glukosy. Z obrázku je patrné, že zatímco u buněk přenesených do vody přetrvává membránová lokalizace Ato1p-GFP, u

buněk přenesených do roztoku glukosy dochází zejména v časech 120 a 180 minut po přenesení k relokaci do té doby membránově lokalizovaného Ato1p-GFP fluorescenčního signálu do vakuol (obr. 29).

### Působení glukosy na degradaci Ato1p-GFP proteinu



Obr. 29: Mikrofotografie buněk Ato1p-GFP kmene u inokula ( $t=0$ ) a buněk přenesených do roztoku glukosy či vody ( $t= 30, 120$  a  $180$  minut).

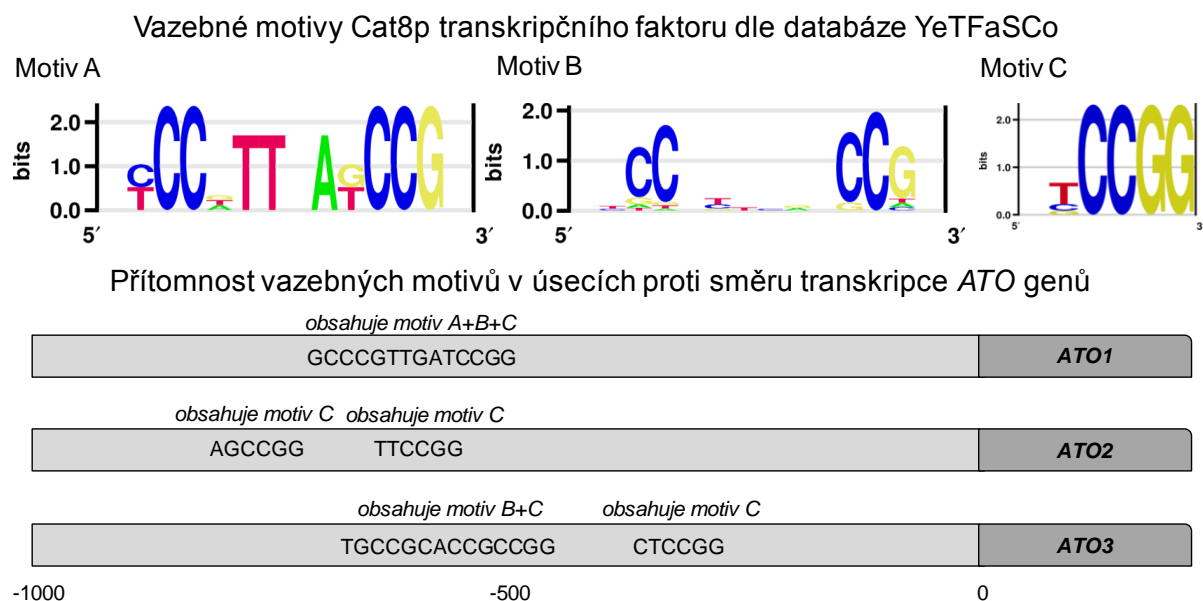
## 5.8 Diskuse 3

Charakterizace *ato1/ato2/ato3* kmene přinesla dle očekávání výsledky prokazující sníženou míru alkalizace média a sníženou produkci amoniaku (jak u buněk obřích kolonií, tak u buněk aerobně kultivovaných v tekutém glycerolovém médiu). Vzhledem ke skutečnosti, že růst *ato1/ato2/ato3* kmene se při aerobní kultivaci v glycerolovém médiu po zvýšení pH okolního média oproti růstu rodičovského kmene zpomaluje, testovala jsem podrobně i růst *ato1*, *ato2*, *ato3* a *ato1/ato2/ato3* kmenů v glycerolovém médiu, jehož počáteční hodnoty pH se pohybovaly v oblasti neutrality a výše. Všechny uvedené kmeny rostly při mírně alkalických hodnotách okolního pH hůře než kmen rodičovský, růst kmenů *ato1* a *ato1/ato2/ato3* byl nicméně ovlivněn výrazněji než růst kmenů s delecí *ATO2* nebo *ATO3* genů (produkce amoniaku do prostoru nad hladinou kultury je nicméně ovlivněna u všech těchto kmenů stejně). Alkalické pH navíc indukovalo silnou všech *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* genů. Dohromady tyto výsledky svědčí pro roli Ato proteinů při růstu na médiu s vysokým pH.

V literatuře se vyskytuje několik zmínek o tom, že exprese *ATO1* genu významnou měrou podléhá glukosové represí. Byla prokázána závislost exprese *ATO1* genu na Cat8p transkripčním faktoru, jenž je nezbytný pro derepresi řady genů za podmínek oxidativního metabolismu (a tedy pro růst kvasinek na nefermentovatelném zdroji uhlíku) a jenž není při růstu na glukose exprimován (HAURIE, *et al.*, 2001). Závislost exprese *ATO1* na Cat8p transkripčním faktoru byla potvrzena pomocí metody ChIP (chromatinové imunoprecipitace) (TACHIBANA, *et al.*, 2007), jakožto cíl Cat8p proteinu autoři identifikovali rovněž *ATO3* gen. Dle databáze YeTFaSCo (DE BOER a HUGHES, 2012) se vazebný motiv pro Cat8p transkripční faktor nachází asi 500 bp proti směru transkripce od iniciačního kodonu *ATO1* genu, kratší vazebné motivy se nacházejí i před *ATO2* a *ATO3* geny (obr. 30). Nízká produkce Ato1p-GFP proteinu v *cat8* kmeni je tedy v souladu s publikovanými daty. Glukosová represe *ATO1* genu se pak zdá být nadřazena působení alkalického pH, neboť předčasná indukce exprese *ATO1* genu v glukosovém médiu o hodnotě pH 7,5 nebyla prokázána.

Na druhou stranu nedocházelo v žádné z modelových situací (kolonie, tekuté médium, nebo statická kultivace, při počáteční hodnotě pH média 5) k měřitelné/pozorovatelné produkci Ato proteinů od začátku kultivace, a to i přesto, že v kultivačním médiu se nenacházela glukosa. Následný vzestup pH tak přispěl k výraznému zesílení exprese *ATO*

genů/produkce Ato-GFP proteinů. Přítomnost/nepřítomnost glukosy tedy není jediný podnět, který expresi těchto genů reguluje.



Obr. 30: Vazebné motivy transkripčního faktoru Cat8p dle databáze YeTFaSCo (<http://yetfasco.ccbr.utoronto.ca/> (DE BOER a HUGHES, 2012)) a jejich přítomnost v úsecích 1000 bp proti směru transkripce *ATO* genů.

Vedle možné funkce exportéru amonných iontů (PALKOVA, *et al.*, 2002) je Ato1p proteinu přisuzována role v transportu acetátu do buňky (PAIVA, *et al.*, 2004). K produkci Ato1p proteinu v médiu s kyselinou octovou jako zdrojem dusíku (kdy je Ato1p-GFP protein lokalizovaný na cytoplazmatické membráně) sice dochází, nicméně míra produkce je nižší než například v médiu s glycerolem či kyselinou mléčnou. Navíc u buněk pocházejících z kolonií BY4742 kmene v alkalické fázi vývoje, a tudíž produkujících velké množství Ato1p proteinu (a rovněž i Ato2p a Ato3p proteinů), nedocházelo ke vstupu acetátu do buňky mechanismem transportu (Mgr. Markéta Řiřicová, PhD., nepublikovaná data). Z tohoto pohledu se role Ato1p proteinu v transportu acetátu zdá být málo pravděpodobná. Jen1p protein je dosud jediný identifikovaný transportér laktátu (CASAL, *et al.*, 1999), proto de Kok a kolektiv (DE KOK, *et al.*, 2012) pátrali po dalším možném transportéru laktátu do buňky. Pracovali s *jen1* delečním kmenem (s delecí *JEN1* genu) odvozeným od CEN.PK113-7D rodičovského kmene, který dlouhodobě kultivovali v médiu s laktátem. Když následně charakterizovali klony s obnovenou schopností růstu na laktátu jako zdroji uhlíku, zjistili, že za Jen1p-nezávislý růst na laktátu by mohly být zodpovědné vzniklé aminokyselinové záměny v sekvenci Ato1p proteinu, konkrétně záměny Leu219Val a Ala252Gly (DE KOK, *et al.*,

2012). Ve kmeni BY4742 je v každém případě u Ato1p proteinu na pozici 219 leucin a na pozici 252 alanin (Mgr. Zuzana Moráňová, ústní sdělení). Dále, Kawahata a kolektiv (KAWAHATA, *et al.*, 2006) při hledání genů zahrnutých v odpovědi na přidání kyseliny mléčné či octové pomocí transkriptomové analýzy nezaznamenali žádné změny v expresi *ATO1* genu a u genu *ATO3* docházelo dokonce k represi exprese. Naproti tomu exprese *JEN1* genu byla zvýšená. Hodnoty pH okolního média, z něžž byla biomasa použita pro transkriptomovou analýzu odebírána, byly nicméně velmi nízké (okolo pH 3) (KAWAHATA, *et al.*, 2006).



## 5.9 Zjišťování možných interakcí mezi Ato proteiny

*Cíl:*

*Jelikož delece každého jednotlivého ATO genu vede ke snížení produkce amoniaku (jak u kolonií, tak při aerobní kultivaci), bylo cílem této části práce zjistit, zda jsou Ato proteiny schopné fyzicky interagovat. Pro zjišťování interakcí jsme se v rámci spolupráce s pracovní skupinou prof. Martina Hofa rozhodli využít metodu FLIM-FRET, založenou na monitorování změn poločasu dohasínání fluorescence (FLIM) fluorescenčního donoru v případě, že dochází k fluorescenčnímu rezonančnímu přenosu energie (FRET) z fluorescenčního donoru na akceptor. Pokud dochází k rezonančnímu přenosu energie mezi fluorescenčním donorem a akceptorem, poločas dohasínání fluorescence se snižuje.*

*Připravené kmeny*

Za účelem zjištění případné interakce mezi dvojicemi Ato1p, Ato2p a Ato3p proteinů jsem vytvořila kmeny schopné produkovat různé kombinace fúzních Ato-FP proteinů, a to v kombinacích Ato-CFP, Ato-Venus/Ato-CFP (Venus je varianta žlutého fluorescenčního proteinu), Ato-GFP a Ato-GFP/Ato-tdimer2 (tdimer2 je varianta červeného fluorescenčního proteinu). Pro vytvoření konstruktů byly použity plazmidy nesoucí geny pro fluorescenční proteiny kodonově optimalizované pro kvasinkovou buňku. Vytvořená sada kmenů se stabilní genomovou fúzí genů pro různé FP s ATO geny umožňovala několikanásobnou možnost kontroly při měření možných interakcí.

Pro měření interakcí mezi Ato1p a Ato1p, Ato2p a Ato2p a Ato3p a Ato3p jsem párováním Ato-FP rodičovských kmenů BY4741 a BY4742 vytvořila diploidní kmeny s kombinací alel Ato-GFP a Ato-tdimer2.

Jako pozitivní kontrolu jsem zvolila dvojici proteinů Fet3p a Ftr1p, u nichž byla interakce již dříve prokázána, a to pomocí FRET (SINGH, *et al.*, 2006) (konstrukty připravil Ondřej Štěpánek). Jako negativní kontrola sloužily kmeny Jen1p-GFP/Ato1p-tdimer2 a Jen1p-GFP/Ato2p-tdimer2. K dalším kontrolním měřením jsem využila rovněž kmen Met17p-GFP připravený Lud'kem Štěpánkem.

Použité plazmidy jsou uvedeny v tabulce 1, primery v tabulce 2, kmeny vytvořené pro účely zjišťování možných interakcí mezi Ato proteiny jsou detailně popsány v tabulkách 3A a

3B v kapitole 4.1, Materiál. Stručný přehled základní sady kmenů používané pro měření je znázorněn na obr.31.

Jednoduše značené kmeny:

Ato1p-GFP	
Ato2p-GFP	
Ato3p-GFP	

Ato1p-CFP	
Ato2p-CFP	
Ato3p-CFP	

Jen1p-GFP	
Met17p-GFP	

Ftr1p-GFP	
Fet3p-GFP	

Dvojitě značené kmeny:

	Ato1p-tdimer2	Ato2p-tdimer2	Ato3p-tdimer2
Ato1p-GFP	xxx		
Ato2p-GFP		xxx	
Ato3p-GFP			xxx

	Ato1p-Venus	Ato2p-Venus
Ato1p-CFP	xxx	
Ato2p-CFP		xxx
Ato3p-CFP		

	Ato1p-tdimer2	Ato2p-tdimer2
Jen1p-GFP		

	Ftr1p-tdimer2	Fet3p-tdimer2
Ftr1p-GFP	xxx	
Fet3p-GFP		xxx

Diploidní dvojitě značené kmeny:

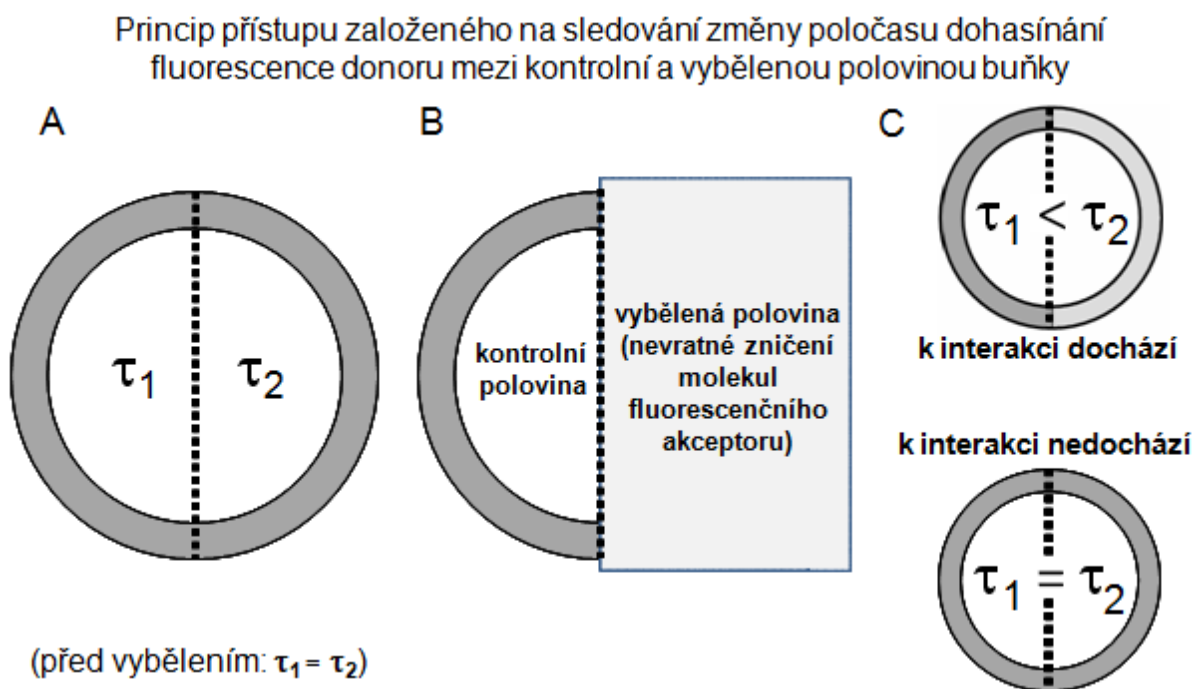
Ato1p-GFP/Ato1p-tdimer2	
Ato2p-GFP/Ato2p-tdimer2	
Ato3p-GFP/Ato3p-tdimer2	

Obr. 31: Stručný přehled kmenů použitých pro zjišťování interakcí membránových proteinů kvasinek na základě monitorování poločasu dohasínání fluorescence.

### Souhrn výsledků

Zavedla jsem a testovala dva přístupy pro zjišťování interakcí membránových proteinů u *S.cerevisiae* založené na monitorování poločasu dohasínání fluorescence. První přístup je založen na sledování rozdílu poločasu dohasínání fluorescence fluorescenčního donoru na membráně mezi kontrolní a vybělenou (z hlediska signálu fluorescenčního akceptoru) polovinou buňky (obr. 32). Druhý přístup je založen na variabilitě míry exprese proteinů našeho zájmu v populaci buněk *S.cerevisiae*. Pokud monitorujeme u většího množství buněk poločas dohasínání fluorescence fluorescenčního donoru a zároveň intenzitu fluorescence donoru a akceptoru, můžeme z průběhu křivky závislosti poločasu dohasínání fluorescence na

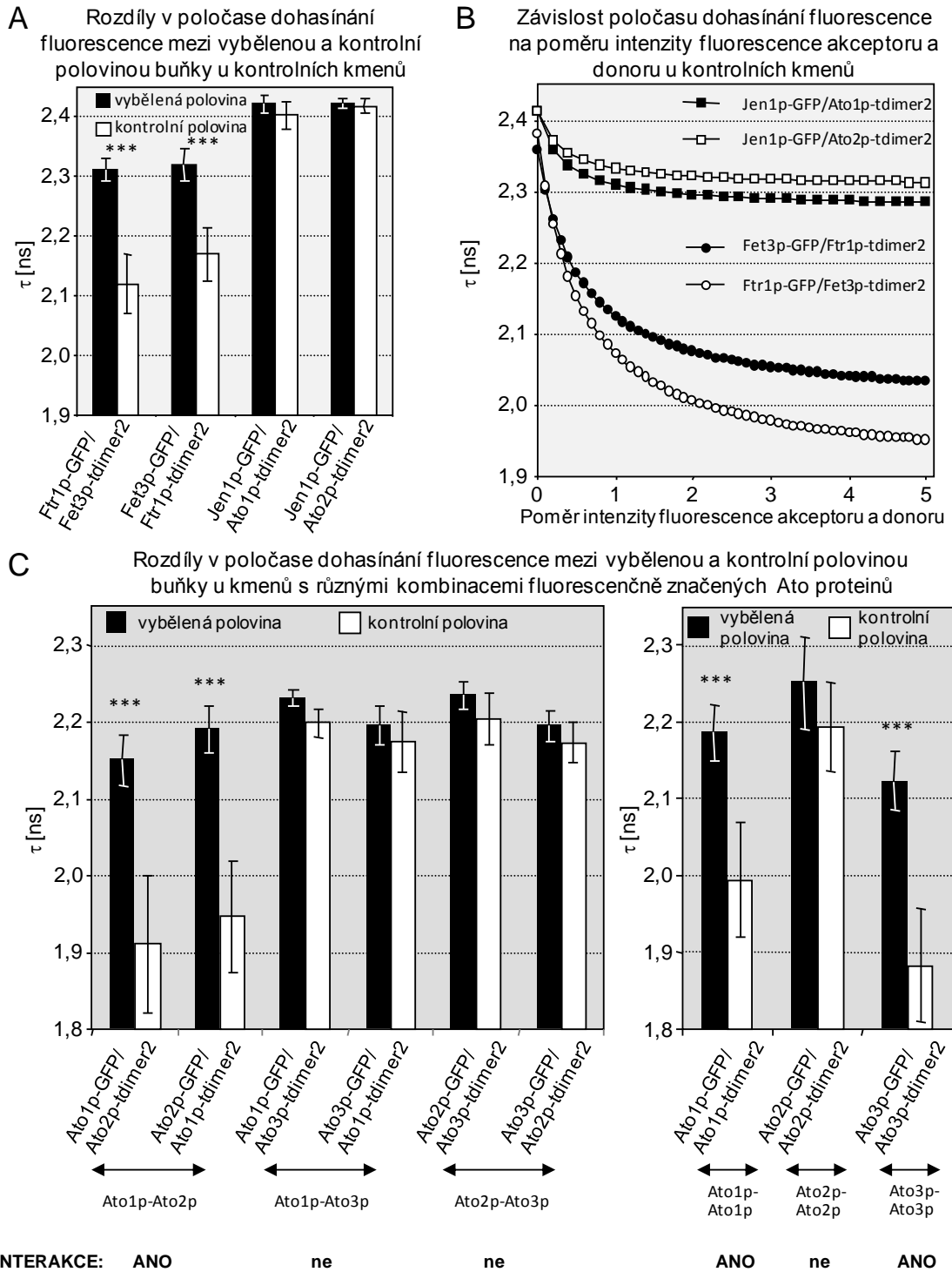
podílu intenzity akceptoru a donoru vyvodit, zda spolu proteiny našeho zájmu fyzicky interagují. Při použití tohoto přístupu je nutné předem stanovit hodnotu poločasu dohasínání fluorescence donoru u buněk exprimujících pouze fluorescenční donor.



Obr. 32: Princip zjišťování interakcí membránových proteinů *S.cerevisiae* založený na sledování změny poločasu dohasínání fluorescence ( $\tau$ ) fluorescenčního donoru mezi kontrolní a vybělenou polovinou buňky. Nejprve provedeme měření poločasu dohasínání fluorescence na membráně celé zvolené kvasinkové buňky (A). Poté provedeme vybělení fluorescenčního donoru v polovině zvolené buňky (B) a následně změříme poločas dohasínání fluorescence u celé kvasinkové buňky. Získané hodnoty porovnáme. (C)

Použitelnost obou přístupů jsem ověřila na dvojicích proteinů Fet3p a Ftr1p (pozitivní kontrola) a Jen1p a Ato1p či Jen1p a Ato2p (negativní kontrola) V obou případech jsem získala jasný pozitivní, respektive negativní výsledek (obr. 33A a B).

Pomocí výše popsaných přístupů jsem dále prokázala fyzickou interakci Ato1p a Ato2p proteinů (obr. 33C) a homodi-/oligomerizaci Ato1p proteinu a Ato3p proteinu (obr. 33D) Dochází tedy k fyzické interakci mezi Ato1p a Ato2p proteiny, mezi Ato1p a Ato1p proteinem a mezi Ato3p a Ato3p proteinem.



Obr. 33: Ověření A) přístupu založeného na sledování změny poločasu dohasínání fluorescence fluorescenčního donoru mezi kontrolní a vybělenou polovinou buňky a B) přístupu založeného na variabilitě míry exprese proteinů našeho zájmu v populaci buněk u kontrolních kmenů. C) Příklad výsledků měření získaných v případě sledování interakcí Ato proteinů. Míra významnosti rozdílu byla hodnocena pomocí jednostranného ttestu, počet hvězdiček značí míru významnosti: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ .

## 5.10 Diskuse 4

Byly zavedeny dva nové přístupy využitelné pro zjišťování interakcí membránových proteinů u *S.cerevisiae* založené na monitorování poločasu dohasínání fluorescence (STRACHOTOVA, *et al.*, 2012).

Přístup založený na monitorování poločasu dohasínání fluorescence pro zjišťování proteinových interakcí byl u *S.cerevisiae* již použit, a to při prokázání interakce mezi Sic1p proteinem a B-cykliny, v tomto případě byl nicméně použit pouze jeden pár fluorescenčního donoru a akceptoru - Cerulean (modrá varianta fluorescenčního proteinu) a YFP (SCHREIBER, *et al.*, 2012). Schreiber a kol (SCHREIBER, *et al.*, 2012) prokázali interakci mezi proteiny s možnou lokalizací v cytosolu a jádře. Námí navrhovaný přístup založený na sledování změny poločasu dohasínání fluorescence fluorescenčního donoru mezi kontrolní a vybělenou polovinou buňky je vhodný pro zjišťování interakcí mezi membránovými proteiny *S.cerevisiae*. Membránové proteiny kvasinek vykazují v porovnání s membránovými proteiny savčích buněk nízkou mobilitu (GANGULY, *et al.*, 2009; VALDEZ-TAUBAS a PELHAM, 2003). (Nízkou mobilitu membránových proteinů Ato1p, Ato2p, Ato3p a Jen1p jsme rovněž ověřili pomocí FRAP (STRACHOTOVÁ, *et al.*, 2012)) Navrhovaný přístup je proveditelný dostatečně rychle, aby pohyb proteinů v membráně neovlivnil významně výsledek experimentu. Měření na konkrétní buňce navíc skýtá možnost vnitřní kontroly. Proto může být tento přístup vhodný i například pro rychlé testování většího množství kmenů, kdy může poskytnout základní informaci o interakci v rozumném čase.

Druhý přístup je založen na variabilitě míry exprese proteinů našeho zájmu v populaci buněk *S.cerevisiae*. K této variabilitě dochází u kvasinkových kolonií zcela přirozeně (jak je patrné z konfokální (VACHOVA, *et al.*, 2009a) či fluorescenční (CAP, *et al.*, 2012) mikroskopie řezů kvasinkovými koloniemi), nicméně variabilita je pozorovatelná i při aerobní kultivaci. Nehomogenita populace je v tomto případě výhodou - zatímco poločas dohasínání fluorescence donoru u buněk s minimální mírou produkce akceptoru nebude téměř ovlivněn, bude se u buněk s výraznou produkcí blížit určité limitní hodnotě, která bude nižší, než hodnota poločasu dohasínání fluorescence donoru u buněk exprimujících pouze fluorescenční donor. Závislost účinnosti FRET na intenzitě fluorescenčního akceptoru byla již dříve dokumentována například při sledování dynamiky lipidů v MDCK buňkách (ZACHARIAS, *et al.*, 2002), a to opět na páru fluorescenčního donoru a akceptoru CFP/YFP.

Možnost oligomerizace na membráně buňky byly nedávno navržena (GENTSCH, *et al.*, 2007) pro Gpr1p protein, ortholog Ato proteinů kvasinky z *Yarrowia lipolytica*, jež by mohl hrát roli v adaptaci *Y.lipolytica* pro růst na kyselině octové jako zdroji uhlíku (AUGSTEIN, *et al.*, 2003), popřípadě roli v adaptaci na nové zdroje uhlíku (GENTSCH a BARTH, 2005). Roli v oligomerizaci Proteinu Gpr1p by mohl hrát YNAYA motiv na C-konci proteinu, jež se vyskytuje i v C-koncové oblasti Ato proteinů. Data získaná při testování senzitivity ke kyselině octové u kmenů kódujících současně mutované (bez C-koncové části) i "zdravé" alely *ATO1* a *ATO2* genů sice homodi-/oligomerizaci Ato1p, respektive Ato2p, nenasvědčovala, autoři nicméně tuto možnost zcela nevylučují (GENTSCH, *et al.*, 2007).

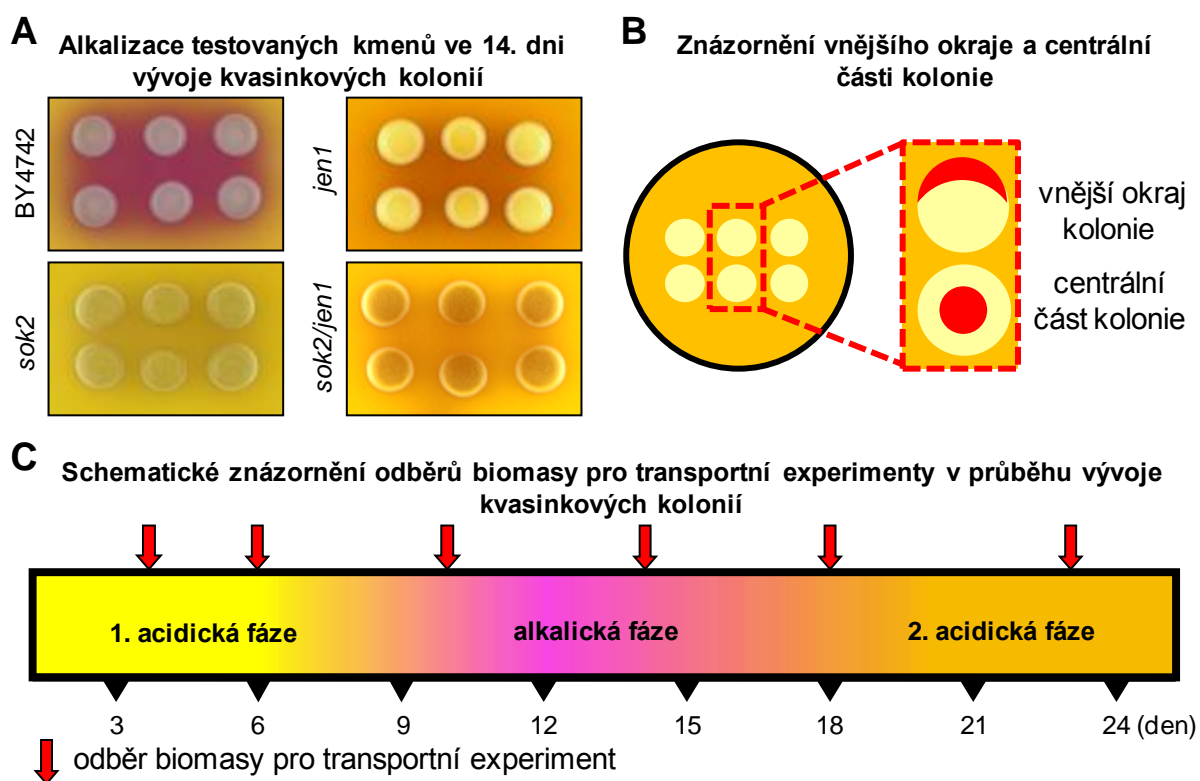
## 5.11 Měření transportu laktátu v průběhu vývoje kvasinkových kolonií

*Cíl:*

*Pro kmen sok2 s delecí SOK2 genu kódujícího pleiotropní transkripční faktor Sok2p je typická snížená schopnost alkalizace okolního média a produkce amoniaku, v důsledku čehož dochází ke snížení životaschopnosti buněk v pozdějších stádiích vývoje kvasinkových kolonií. Bylo ukázáno, že hladina JEN1 mRNA je u sok2 kmene snížena (VACHOVA, et al., 2004). Jen1p je přitom jediným spolehlivě potvrzeným transportním systémem umožňujícím vstup laktátu do kvasinkové buňky (CASAL, et al., 1999). Kromě laktátu je Jen1p protein schopen transportovat do buňky rovněž pyruvát, acetát a propionát. Ve spolupráci s laboratoří prof. Margaridy Casal (Univerzita Minho, Braga, Portugalsko) jsme se snažili zjistit, zda hrají karboxylové kyseliny roli v dlouhodobém vývoji a přežívání kvasinkových kolonií aneb do jaké míry ovlivňuje delece SOK2 genu schopnost kolonií využívat karboxylové kyseliny (či jejich soli) jako zdroj uhlíku.*

*Testované kmeny*

Transportní kinetiku příjmu laktátu/kyseliny mléčné v průběhu vývoje kvasinkových kolonií jsme měřili u rodičovského kmene BY4742 a dále u delečních kmenů *sok2* (s delecí genu *SOK2*), *jen1* (s delecí genu *JEN1*) a *sok2/jen1* (s delecí genů *JEN1* a *SOK2*). Kmeny BY4742, *sok2* a *jen1* pocházely z kolekce kmenů Euroscarf, kmen *sok2/jen1* připravila S. Paiva. Dále byly připraveny kmeny Jen1p-GFP a *sok2/Jen1p-GFP* použité pro monitorování lokalizace Jen1p-GFP proteinu v buňce v průběhu vývoje kvasinkových kolonií. Při testování růstu obřích kolonií vybraných kmenů jsem zjistila, že u kmene *jen1* je alkalizace média oproti rodičovskému kmeni snížena, u *sok2* kmene jsem potvrdila sníženou schopnost alkalizace okolního média, kmen *sok2/jen1* se z hlediska alkalizace dle očekávání choval stejně jako kmen *sok2* (obr. 34A). Buňky jsem odebírala jednak z centrální části kolonie, jednak z vnějšího okraje kolonie (obr. 34B). Experimentální schéma je znázorněno na obr. 34C, pro odběr jsem volila vždy po 2 časech z 1. acidické, alkalické a 2. acidické fáze.



Obr. 34: A) Porovnání alkalizace testovaných kmenů v plně rozvinuté alkalické fázi (14. den vývoje kvasinkových kolonií). B) Schematické znázornění oblastí kvasinkové kolonie, z nichž byla odebírána biomasa pro následné transportní experimenty. C) Schematické znázornění časování odběrů biomasy pro transportní experimenty z hlediska fáze vývoje kvasinkových kolonií.

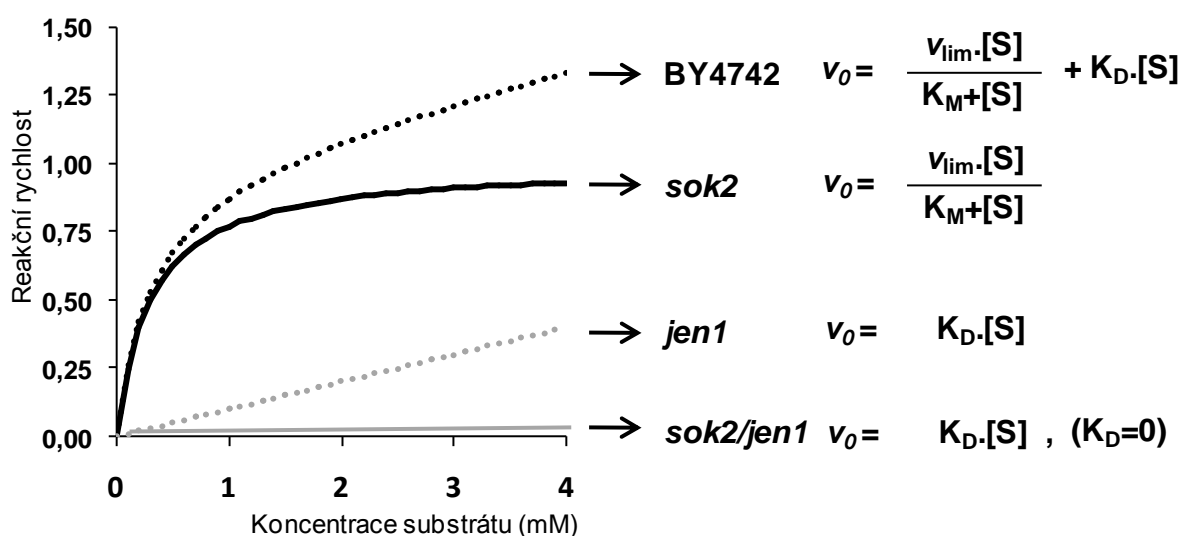
#### *Určování mechanismu vstupu laktátu do buňky*

Při získávání dat sloužících k určení mechanismu vstupu laktátu do buňky jsme používali následující koncentrace radioaktivně značeného laktátu: 0,03, 0,1, 0,3, 1, 2 a 4 mM. V první řadě jsme u kmene BY4742 za využití statistického programu GraphPad (GraphPAD software; San Diego, CA, U.S.A.) stanovili hodnotu Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) pro Jen1p protein, a to jako  $0,29 \pm 0,13$  mM (výsledek byl stanoven z 5 nezávislých měření poté, co byly buňky kmene BY4742 aerobně kultivovány 4 hodiny v minimálním médiu s laktátem jako zdrojem uhlíku). U všech kmenů (BY4742, sok2, jen1 a sok2/jen1) jsme následně u buněk z centrální části kolonie a vnějšího okraje kvasinkové kolonie měřili vstup laktátu do buňky v 6 zvolených časech. Zároveň byly v každém čase, pro každý kmen a každou koncentraci laktátu měřeny slepé vzorky pro stanovení radioaktivního pozadí.



Získané hodnoty jsme použili pro určení mechanismu vstupu laktátu do buňky u každého konkrétního kmene - hodnotili jsme, zda dochází k prosté difuzi přes membránu, zda je laktát do buňky aktivně transportován či zda se jedná o kombinaci obou mechanismů - a kinetických parametrů (difuzního koeficientu  $K_D$  a limitní rychlosti reakce  $V_{max}$ ) při pevně dané hodnotě  $K_m$  (předem určené hodnotě 0,29 mM, viz výše). Zjednodušeně lze říci, že křivka vstupu laktátu do buňky sestávala u rodičovského kmene z transportní a difuzní složky, u *sok2* kmene pouze ze složky transportní, u *jen1* kmene pouze ze složky difuzní a u *sok2/jen1* kmene obě složky chyběly (obr. 35).

Schématické znázornění mechanismu vstupu laktátu do buněk testovaných kmenů

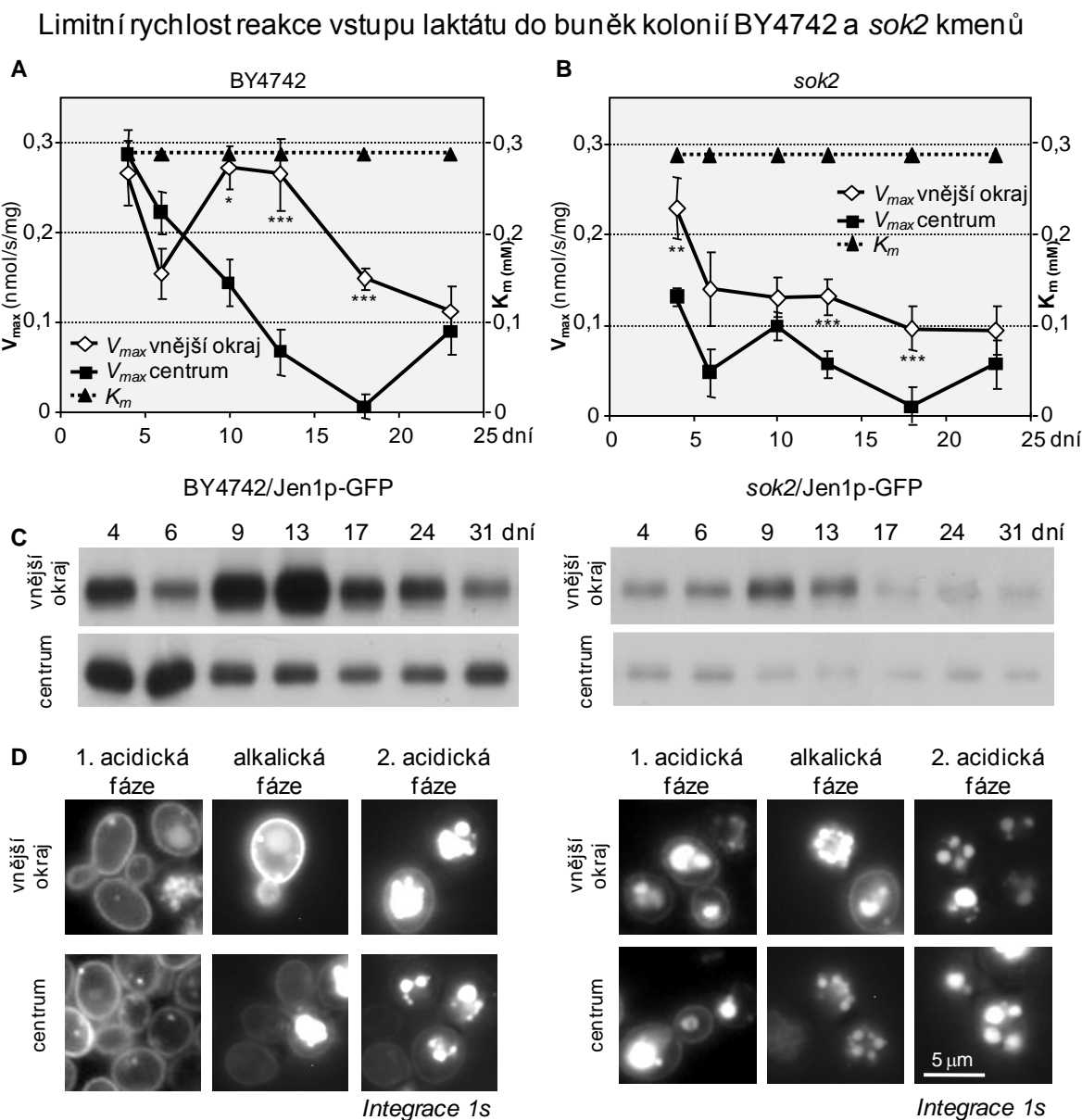


Obr. 35: Tvary teoretických křivek znázorňujících mechanismus vstupu laktátu/kyseliny mléčné do buněk testovaných kmenů BY4742 (transportní + difuzní složka), *sok2* (pouze transportní složka), *jen1* (pouze difuzní složka) a *sok2/jen1* (ani transportní, ani difuzní složka).

#### Souhrn výsledků

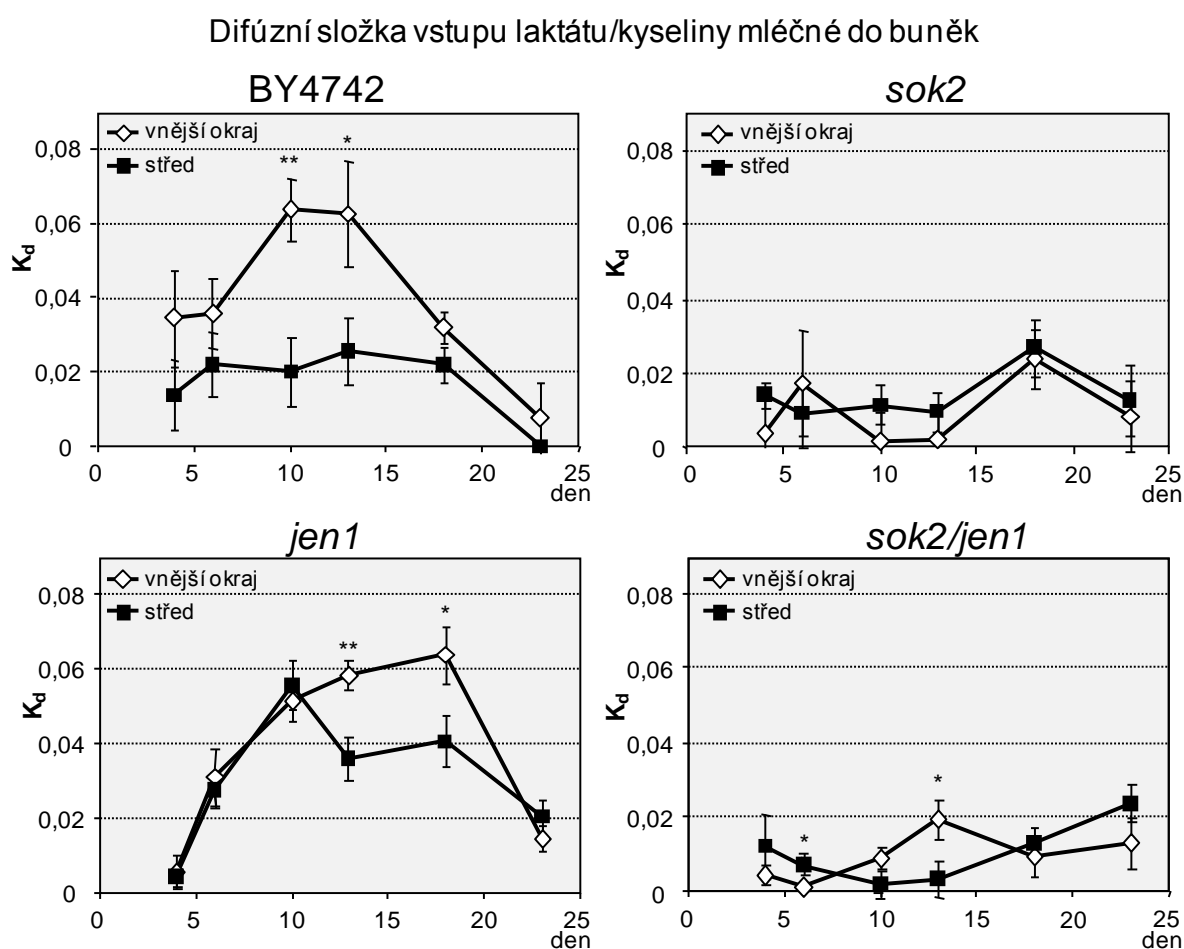
Transportní složku křivky vstupu laktátu do buňky lze charakterizovat parametry  $K_m$  a  $V_{max}$ . Při znalosti  $K_m$  pro transport laktátu do buňky by pak měla  $V_{max}$  odpovídat aktivitě transportu. Aktivita transportu byla u kmene BY4742 nejvyšší v první acidické fázi u buněk centrální části a vnějšího okraje kolonie (4. den kultivace), následně (6. den kultivace) došlo k mírnému snížení aktivity transportu. Po vstupu do alkalické fáze vývoje jsem u kmene BY4742 pozorovala výrazný rozdíl mezi centrální částí a vnějším okrajem kolonie - zatímco v centrální části kolonie aktivita transportu i nadále klesala, buňky vnějšího okraje vykazovaly

v průběhu alkalické fáze vysokou aktivitu transportu (obr. 36A). U *sok2* kmene pak docházelo ke kontinuálnímu poklesu aktivity transportu v průběhu vývoje kvasinkových kolonií (obr. 36B) a aktivita transportu byla nižší než u rodičovského kmene BY4742 (obr. 36A a B). Toto zjištění je v souladu s daty získanými pomocí Western blot analýzy a fluorescenční mikroskopie (obr. 36C a D).



Obr. 36: Aktivita transportu laktátu u buněk pocházejících z vnějšího okraje a centra kolonií A) rodičovského kmene BY4742 a B) *sok2* kmene v průběhu vývoje kvasinkových kolonií. C) Stanovení množství Jen1p-GFP pomocí Western blot analýzy a D) mikrofotografie lokalizace Jen1p-GFP proteinu u buněk pocházejících z vnějšího okraje a centra kolonií Jen1p-GFP a *sok2*/Jen1p-GFP kmenů v průběhu vývoje kvasinkových kolonií.

Difuzní složka vstupu laktátu/kyseliny mléčné do buněk byla přítomna pouze u BY4742 a *jen1* kmene. Zejména v alkalické fázi vývoje navíc k difuzi docházelo v různé míře, pokud jsem porovnávala vnější okraj kolonie s centrální částí kolonií těchto kmenů. Difuzní koeficienty  $K_d$  jsou u kmenů BY4742 a *jen1* srovnatelné, nicméně u *jen1* kmene, jenž má oproti kmeni BY4742 problémy s alkalizací okolního média, jsem rozdíl v  $K_d$  mezi okrajem kolonie a centrální částí kolonie pozorovala později a diferenciace buněk okraje a centra kolonie nebyla tak výrazná. U kmenů s delecí *SOK2* genu difuzní část transportní křivky chyběla (obr. 37).



Obr. 37: Míra difuze ( $K_d$  v nmol/s/mg sušiny) kyseliny mléčné u buněk centrální části (středu) a vnějšího okraje kolonie u kmenů BY4742, *jen1*, *sok2* a *sok2/jen1*. Míra významnosti rozdílu mezi středem a vnějším okrajem kolonie byla hodnocena pomocí dvoustranného ttestu, počet hvězdiček značí míru významnosti: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ .

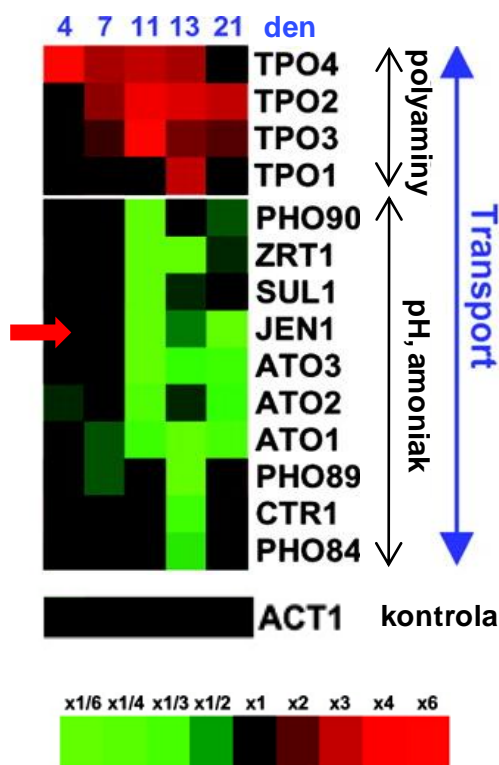
## 5.12 Diskuse 5

Z porovnání výsledků měření transportních kinetik u BY4742 a *jen1* kmenů lze jednoznačně říci, že za transportní složku příjmu laktátu do buněk je zodpovědný Jen1p protein. Přitom substráty Jen1p transportéru jsou vedle laktátu také pyruvát, acetát a propionát (CASAL, *et al.*, 1999), v nedávné době byla prokázána rovněž schopnost Jen1p proteinu transportovat do buňky seleničitan (MCDERMOTT, *et al.*, 2010). Transport karboxylových kyselin pomocí Jen1p proteinu je realizován mechanismem symportu s protonem H<sup>+</sup>, pH závislost vstupu seleničitanu do buňky hovoří pro stejný mechanismus i v tomto případě. Přitom některé karboxylové kyseliny by jako možné produkty metabolismu vznikající v raných fázích vývoje kvasinkových kolonií mohly hrát roli živin v pozdějších fázích vývoje kvasinkových kolonií (PALKOVA, *et al.*, 2002). Jelikož kmen s delecí *JEN1* genu není schopen alkalizace okolního média ani produkce amoniaku ve stejné míře jako kmen rodičovský, je přítomnost Jen1p proteinu zřejmě důležitá pro správný průběh alkalizace. Se vzrůstajícím pH klesá frakce protonovaných (a tedy nenabitých) forem karboxylových kyselin, jež mohou vstupovat do buňky difuzí (hodnota pKa kyseliny mléčné je 3,86), přitom pH v okolí kolonií v alkalické fázi dosahuje hodnot minimálně okolo 6,5 (RICICOVA, *et al.*, 2007), proto se dá předpokládat, že hlavním mechanismem vstupu karboxylových kyselin do buněk zejména u kolonií v alkalické fázi vývoje bude aktivní transport.

Aktivita Jen1p je nižší u *sok2* kmene ve srovnání s kmenem rodičovským, výsledky získané za využití fluorescenční mikroskopie a stanovení množství proteinu pomocí Western blot analýzy ukazují na přítomnost menšího množství Jen1p-GFP proteinu v buňkách příslušných kmenů. Toto zjištění je v souladu s výsledky analýzy transkriptomů BY4742 a *sok2* kmenů (VACHOVA, *et al.*, 2004), kdy byla zjištěna snížená exprese *JEN1* genu u *sok2* kmene po vstupu do alkalické fáze vývoje kvasinkových kolonií (obr. 38).

Aktivita Jen1p proteinu se lišila mezi jednotlivými částmi kolonie a rovněž v jednotlivých fázích vývoje kvasinkových kolonií. Rozdílná aktivita Jen1p proteinu v jednotlivých částech kolonie - nižší v centru a vyšší u buněk vnějšího okraje kolonie - po vstupu rodičovského kmene do alkalické fáze vývoje je v souladu s pozorovanou diferenciací kvasinkových kolonií, kdy buňky v centrální části kolonie vykazují znaky svědčící o probíhající programované buněčné smrti (jako je vysoká produkce ROS či vysoký výskyt buněk s fragmentovanými jádry). Naopak na okraji kolonií se tento typ buněk v podstatě nevyskytuje. (VACHOVA a PALKOVA, 2005). U kolonií kmene *sok2* se fyziologické důsledky

absence amoniakové signalizace projevují nedostatečnou diferenciací mezi centrální a okrajovou částí kolonie. Buňky vykazující apoptotické znaky či buňky mrtvé se pak ve zvýšené míře vyskytují i na okraji kolonie (VACHOVA a PALKOVA, 2005).



Obr. 38: Porovnání změn v expresi některých transportérů v průběhu vývoje kvasinkových *sok2* a rodičovského kmene. Změny v expresi JEN1 genu jsou označeny červenou šipkou. (Převzato a upraveno podle (VACHOVA, *et al.*, 2004))

Diferenciace mezi vnějším okrajem a centrem kolonie byla pozorována i pro difuzní složku ( $K_d$ ) u BY4742 kmene. U *jen1* kmene, jež má oproti kmeni BY4742 problémy s alkalizací okolního média, docházelo k odlišení míry difuze mezi okrajem kolonie a centrální částí kolonie později.

Novým, a o to zajímavějším zjištěním bylo, že u kmenů s delecí genu *SOK2* dochází v porovnání s BY4742 a *jen1* kmeny k téměř úplnému vymizení difuzní složky kinetiky příjmu laktátu/kyseliny mléčné. Jedním možným vysvětlením by mohly být změny membrány u *sok2* a *sok2/jen1* kmenů. Další alternativou je nepřítomnost případného dalšího proteinem kódovaného transportního systému, který by mohl být regulován Sok2p transkripčním faktorem.

Dynamika v míře produkce Jen1p-GFP proteinu pozorovaná v průběhu vývoje kvasinkových kolonií je zajímavá i z hlediska dostupných informací o podmínkách exprese *JEN1* genu. Represe exprese *JEN1* genu je totiž závislá téměř výhradně na zdroji uhlíku (mezi nereprimující zdroje uhlíku patří galaktosa, rafinosa, ethanol, laktát či glycerol) a neměla by být ovlivněna tepelným ani chladovým šokem, oxidativním stresem, poškozením DNA či hladověním na dusík (CHAMBERS, *et al.*, 2004). Membránová lokalizace Jen1p-GFP proteinu je přitom na modelu kolonií dobře patrná zejména u Jen1p-GFP kmene v 1. acidické a alkalické fázi vývoje kolonií (v alkalické fázi pak ve větší míře u buněk vnějšího okraje kolonie). Dále je u Jen1p-GFP kmene v alkalické a 2. acidické fázi a u *sok2*/Jen1p-GFP kmene po celou dobu sledování vývoje kvasinkových kolonií pozorovatelný silný vakuolární signál svědčící pro rychlý obrat Jen1p-GFP proteinu v buňce a jeho degradaci ve vakuole.

### 5.13 Prostorové uspořádání produkce Ato1p-FP proteinu v kvasinkové mikrokolonii

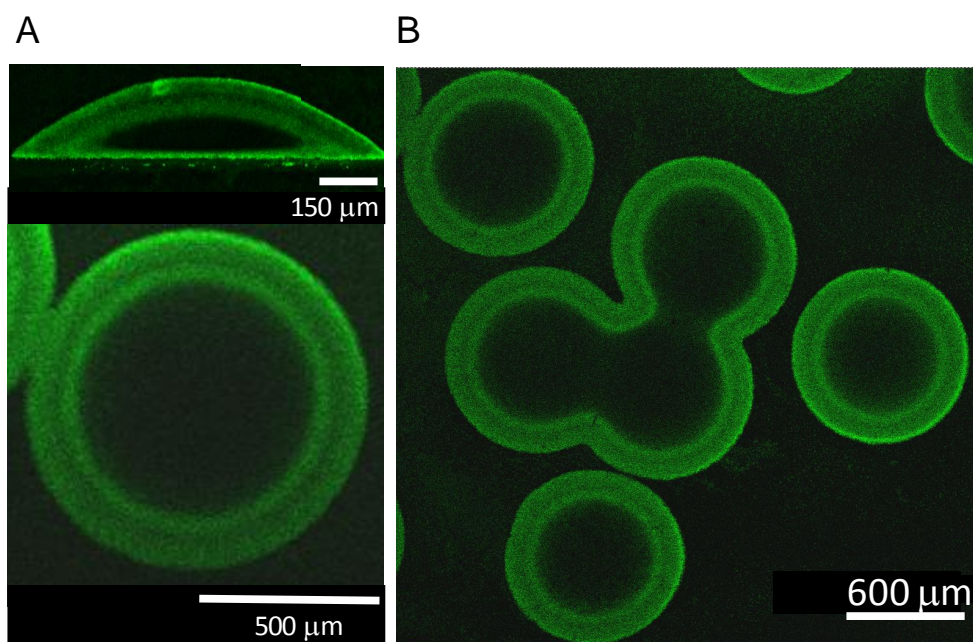
#### *Souhrn výsledků*

U mikrokolonií (kvasinkových kolonií vzniklých z jediné buňky) kmene Ato1p-GFP v alkalické fázi vývoje (jichž bylo při výsevu přibližně 1000 buněk na miskou pevného glycerolového média dosaženo zpravidla 3. den kultivace) byly na příčném řezu patrně dvě zřetelně odlišitelné vrstvy, na řezu vedeném kolmo na svislou osu kolonie se tyto vrstvy jevily jako soustředné kružnice (obr. 39A). Vnitřní masa kolonie nevykazovala signál Ato1p-GFP (obr. 39A a B). Týchž výsledků bylo dosaženo za použití kmene Ato1p-tdimer2. Ato1p-FP signál byl přítomen v cytoplazmatické membráně, určitá frakce pak ve vakuolách.

Velice zajímavé bylo pozorování vzniku soustředných kruhů společných pro těsně sousedící mikrokolonie (obr. 39B). To jakým způsobem se vytvoří systém soustředných prstenců buněk produkujících Ato1p-GFP protein záviselo na tom, v jaké fázi vývoje došlo ke srůstu těsně sousedících kolonií. Vznik uspořádaných vzorů buněk produkujících Ato1p-GFP v rámci mikrokolonie je dalším důkazem synchronizovaného chování kolonií, jež se nachází v těsné blízkosti (podobně jako synchronizace produkce amoniaku (PALKOVA a FORSTOVA, 2000) a exprese některých genů (MINARIKOVA, *et al.*, 2001)). Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě kmene Ato1p-tdimer2.

Svrchní vrstva mikrokolonií (omezená pouze na velice tenkou povrchovou vrstvu tvořenou jednou či dvěma vrstvami buněk) vykazuje sníženou prostupnost například pro konkanavalin A. Hraje tak patrně roli jakési ochranné vrstvy.

Data byla získána za použití dvoufotonové konfokální mikroskopie, jež se z tohoto hlediska jeví jako dobrý nástroj pro sledování detailů struktury kvasinkové kolonie.



Obr. 39: 3D uspořádání buněk produkujících Ato1p-GFP protein A) na příčném řezu a na řezu vedeném kolmo na svislou osu kolonie a B) u těsně sousedících kolonií. (Převzato z (VACHOVA, *et al.*, 2009a))



## 5.14 Publikace I

### **Architektura vyvíjejících se kvasinkových kolonií: exprese Ato1p exportéru amonného kationtu v prostoru a čase**

*Libuše Váchová, Oleksandr Chernyavskiy, Dita Strachotová, Paolo Bianchini, Zuzana Burdíková, Ivana Ferčíková, Lucie Kubínová and Zdena Palková*

### **Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p amonium exporter**

Kvasinkové buňky vytváří při růstu na pevném podkladu kolonie. Kolonie nejsou jen beztvárovou masou buněk, ale organizovanými útvary, v nichž se buňky diferencují a zastávají specifické funkce. Přístup využívající snímání řezů kvasinkovou mikrokolonií pomocí dvoufotonové konfokální mikroskopie umožňuje získat lepší přehled o vnitřní struktuře kvasinkové kolonie a diferenciaci buněk *in situ*. Využití proteinů s možnou rolí v diferenciaci kvasinkové kolonie značených GFP pak poskytuje užitečný nástroj k monitorování specifických buněčných procesů v rámci časoprostorového vývoje kolonie. Podobně tomu může být při využití přídavku specifických fluorescenčních barviv, například bromkresolového purpuru (který neovlivňuje vývoj kolonií), do kultivačního média, nebo následné dobarvení kolonie např. konkanavalinem A.

Pomocí dvoufotonové konfokální mikroskopie kvasinkových mikrokolonií bylo zjištěno, že kolonie je na povrchu kryta tenkou vrstvou buněk s ochrannou funkcí, jež zabraňuje průniku škodlivých látek k buňkám vnitřní masy kolonie.

Na příkladu prostorového uspořádání buněk produkujících/neprodukujících Ato1p-GFP protein byla demonstrována přítomnost různých vrstev buněk v rámci kvasinkové mikrokolonie. Zároveň bylo ukázáno, že sousedící kolonie koordinují produkci Ato1p-GFP proteinu.

Ač je velikost kolonie, která může být tímto způsobem monitorována, omezená (na mikrokolonie o průměru přibližně 0,5-2 mm), umožňuje dvoufotonový konfokální mikroskop detailní analýzu kvasinkové kolonie a poskytuje tak řadu informací o její vnitřní struktuře.

# Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter

Libuše Váchová,<sup>1,2</sup> Oleksandr Chernyavskiy,<sup>3</sup>  
Dita Strachotová,<sup>1,2</sup> Paolo Bianchini,<sup>3,4</sup>  
Zuzana Burdíkova,<sup>3</sup> Ivana Ferčíková,<sup>2</sup>  
Lucie Kubínová<sup>3</sup> and Zdena Palková<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

<sup>3</sup>Institute of Physiology, AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.

<sup>4</sup>LAMBS, Department of Physics, University of Genoa, Via Dodecaneso 33, 16146 Genoa, Italy.

## Summary

**Yeasts, when growing on solid surfaces, form organized multicellular structures, colonies, in which cells differentiate and thus possess different functions and undergo dissimilar fate. Understanding the principles involved in the formation of these structures requires new approaches that allow the study of individual cells directly *in situ* without needing to remove them from the microbial community. Here we introduced a new approach to the analysis of whole yeast microcolonies either containing specific proteins labelled by fluorescent proteins or stained with specific dyes, by two-photon excitation confocal microscopy. It revealed that the colonies are covered with a thin protective skin-like surface cell layer which blocks penetration of harmful compounds. The cells forming the layer are tightly connected via cell walls, the presence of which is essential for keeping of protective layer function. Viewing the colonies from different angles allowed us to reconstruct a three-dimensional profile of the cells producing ammonium exporter Ato1p within developing microcolonies growing either as individuals or within a group of microcolonies. We show that neighbouring microcolonies coordinate production of Ato1p-GFP. Ato1p itself appears**

**synchronously in cells, which do not originate from the same ancestor, but occupy specific position within the colony.**

## Introduction

Yeast cells developing within multicellular communities (colonies, biofilms) exhibit various specific features and properties that are absent in individual cells growing in liquid cultures. These include cell–cell communication, long-distance signalling and developmental changes linked to the stress adaptation and long-term survival of the population as well as differentiation and the formation of specialized cell variants (Palkova and Vachova, 2006). Previously, we showed that yeast colonies growing on solid medium pass through specific developmental phases characterized by changes in external pH from acidic to alkali and *vice versa*. The transition of colonies from the acidic to alkali phase is accompanied by the production of volatile ammonia functioning as the signalling molecule, important for the induction of adaptive metabolic changes in colonies and their subsequent development and survival (Palkova *et al.*, 1997; 2002). Moreover, ammonia signalling and related metabolic changes appear to be important for the differentiation of cells within colonies and their different fates (Vachova and Palkova, 2005; Vachova *et al.*, 2009). Ammonia signalling is dependent on three putative ammonium exporters Ato, the production of which is highly induced at the beginning of ammonia production (Riccova *et al.*, 2007).

Yeast cells are quite homogeneous when growing exponentially in liquid cultures and the information obtained from one or several cells can often be approximated to the whole culture. In contrast, as indicated above, different cell variants are formed during the development of multicellular yeast structures, each of them exhibiting specific properties and differing in their fate according to their position within the structure during a particular developmental phase. Hence, studies on the behaviour and fate of cells within organized multicellular communities during their ageing and long-term development require the introduction of new approaches that allow the investigation of yeast cells directly *in situ* within a multicellular structure. These should avoid the necessity

Received 12 December, 2008; accepted 19 February, 2009.  
\*For correspondence. E-mail zdenap@natur.cuni.cz; Tel. (+420) 2 21951721; Fax (+420) 2 21951724.

© 2009 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd



of taking cells out of the structure, which could lead to artefactual changes in their properties. Moreover, *in situ* techniques could allow the possible functional importance of a particular cell location and orientation within the structure to be determined.

Here, we describe the new approach enabling the monitoring of the presence and spatial location of fluorescently labelled proteins as well as structures stained with specific fluorescent dyes within *Saccharomyces cerevisiae* microcolonies by use of two-photon excitation (2PE) confocal microscopy. The new technique allowed us to reveal spatial location of cells producing the transmembrane protein Ato1p within developing yeast microcolonies. Moreover, we show how the Ato1p production pattern can be influenced by colony development or by the presence of neighbouring colonies. In addition, we show that cells located in surface layer of *S. cerevisiae* microcolonies are tightly joined via thick cell wall and form a thin protective cell layer.

## Results

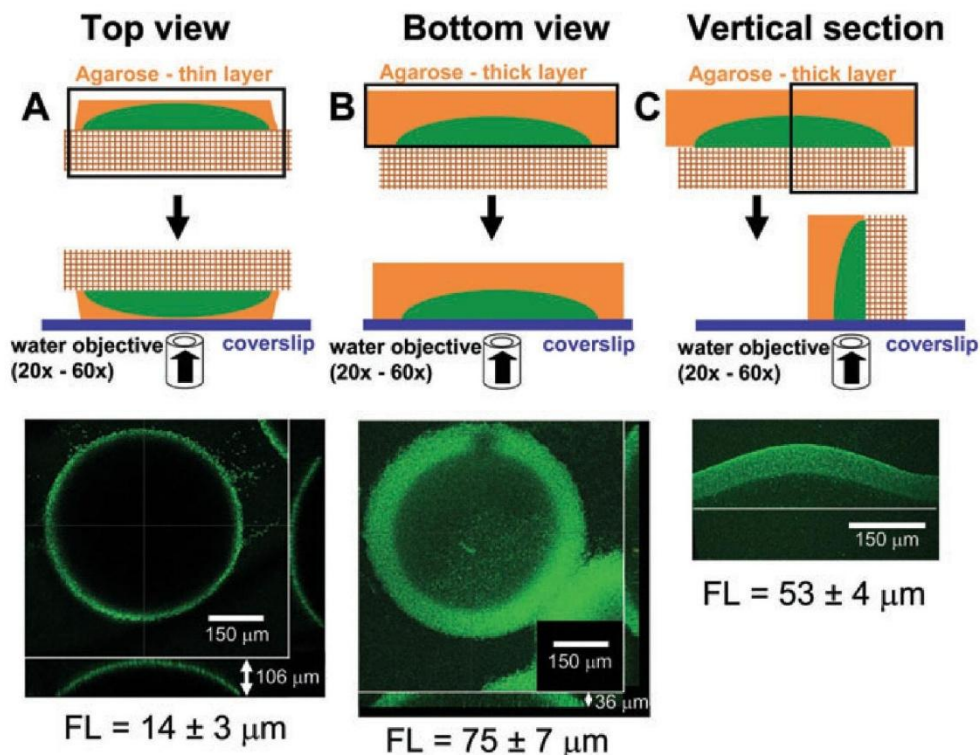
### *How to look inside a yeast colony using confocal microscopy*

To be able to monitor production and localization of specific proteins within yeast colonies, two key problems had to be solved. The first was connected with the rather low penetration of the laser beam into the colony, due to the low transparency of yeast cells covered by optically dense cell wall. This causes a rapid decrease in the detected signal intensity in deeper cell layers, which becomes the main limiting factor of the *in situ* usage of confocal microscopy approach. The second concerns the necessity of preparing samples of yeast colonies (which are less rigid than the bodies of metazoa) without disrupting or significantly influencing the colony structure. This also includes the factor of the time required to prepare the sample of a colony containing living cells, the gene expression of which can change when manipulation is prolonged. For the experiments described here, we used yeast microcolonies (colonies growing from one cell) of the BY-Ato1p-GFP strain containing the *ATO1* gene (encoding the putative ammonium transporter Ato1p) fused with the GFP gene in the yeast genome (Riccova *et al.*, 2007). This strain exhibits the natural regulation and level of Ato1p-GFP protein production. Microcolonies were plated at densities of  $10^3$ – $10^4$  on GM-bromocresol purple (BKP) or GM agar and grown for 2–7 days (Fig. S1). The initiation of Ato1p-GFP production correlates with the first visible alkalization of the agar medium around colonies. Besides detecting the pH changes, BKP when present in the plates allowed us to monitor cell viability during the experiments. This dye efficiently penetrates cells that exhibit an

increased permeability of their plasma membrane. Thus cells which were already dead before the experiment or those, which were damaged by the laser beam during image acquisition turned red via BKP fluorescence (Fig. S2).

The experimental set-up for image acquisition is shown in Fig. S3 and described in a detail in the *Experimental procedures*. The microscopic images were acquired using one-photon excitation (1PE) or 2PE; the latter enables the fluorescence signal to be detected from greater depths in thick specimens (Svoboda *et al.*, 1997; Vroom *et al.*, 1999). The brief initial screen performed on yeast biomass taken from alkali-phase colonies producing GFP-labelled Ato1p protein revealed that in contrast to 1PE confocal microscopy, which only allowed us to observe the outermost surface cell layer of the yeast, the 2PE approach enabled us to also obtain a fluorescent signal from several internal layers without damaging the cells (data not shown). In all experiments described in this paper, we therefore focused exclusively on the 2PE confocal microscopy approach. All observations were performed with a Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope equipped with Ti:Sapphire Chameleon Ultra laser as described in *Experimental procedures*. We applied objectives with various magnifications, depending on the required resolution. The excitation wavelengths and detection wavelength ranges were determined after optimization using lambda scans to get as strong a fluorescence signal as possible. We acquired either images of individual optical sections or a series of optical sections (z-series), usually 2.5–3.5  $\mu\text{m}$  apart (details in *Experimental procedures*).

The optimized approach for the preparation of samples of yeast colonies is depicted in Fig. 1. We used BY-Ato1p-GFP microcolonies of average diameter 0.5–2 mm just entering the alkali phase and prepared the samples, which allowed either the view from the top (Fig. 1A and Fig. S4) or from the bottom of the colony (Fig. 1B and Fig. S5) (details in *Experimental procedures*). We supposed that these two approaches would allow us to analyse the deeper layers of the yeast colony either from the top (top-view) or from the bottom (bottom-view). However, surprisingly, the top and bottom confocal microscopy scanning gave a completely different picture. While the top-view allowed us to detect Ato1p-GFP fluorescence as a layer of only  $14 \pm 3 \mu\text{m}$  over the whole colony surface (Fig. 1A and Fig. S4), the bottom view enabled the presence of the Ato1p-GFP protein to be monitored in a layer as deep as 50  $\mu\text{m}$  into the colony, i.e. at a depth which corresponds to about 10–20 layers of yeast cells. Thus, the top-view scanning enabled us to reconstruct the whole colony upper surface, marked by Ato1p-GFP, but it did not tell us anything about the Ato1p-GFP in inner regions. On the other hand, the bottom-view



**Fig. 1.** A. Top-, B. bottom- and C. side-view of Ato1p-GFP microcolonies (3 days old) and experimental set-up. FL, average thickness of the fluorescent layer of cells producing Ato1p-GFP protein, calculated from at least 20 independent colonies. Colonies visualized using 20 $\times$  objective.

revealed that Ato1p-GFP is present in a distinct layer, which stretches from the surface to colony interior, reaching a depth of about  $75 \pm 7 \mu\text{m}$  (Fig. 1B and Fig. S5). Scanning the colony in the Z-direction revealed that this layer is still present in stacks up to  $50 \mu\text{m}$  from the bottom. To complete the view of the colony and to prove that the bottom-view of Ato1p-GFP profile reflects reality, we prepared a sample of the vertical section of the microcolony by cutting it down the middle (Fig. 1C). This sample scanned with 2PE revealed a side-view of the microcolony. The result clearly confirmed that Ato1p-GFP localizes to an approximately  $53 \pm 4 \mu\text{m}$  thick surface layer over the whole colony, i.e. the bottom-view showed the correct Ato1p-GFP pattern, while the top-view approach did not allow the laser beam to penetrate into internal cell layers.

To check whether the difference between the top- and bottom-view could be caused by the presence of the agarose layer between the cover glass and the colony surface in the case of the top-view samples (Fig. 1A), we prepared an altered bottom-view colony sample with an additional agarose layer placed between the colony bottom and the objective (Fig. S6). The resulting Ato1p-GFP pattern was the same as without

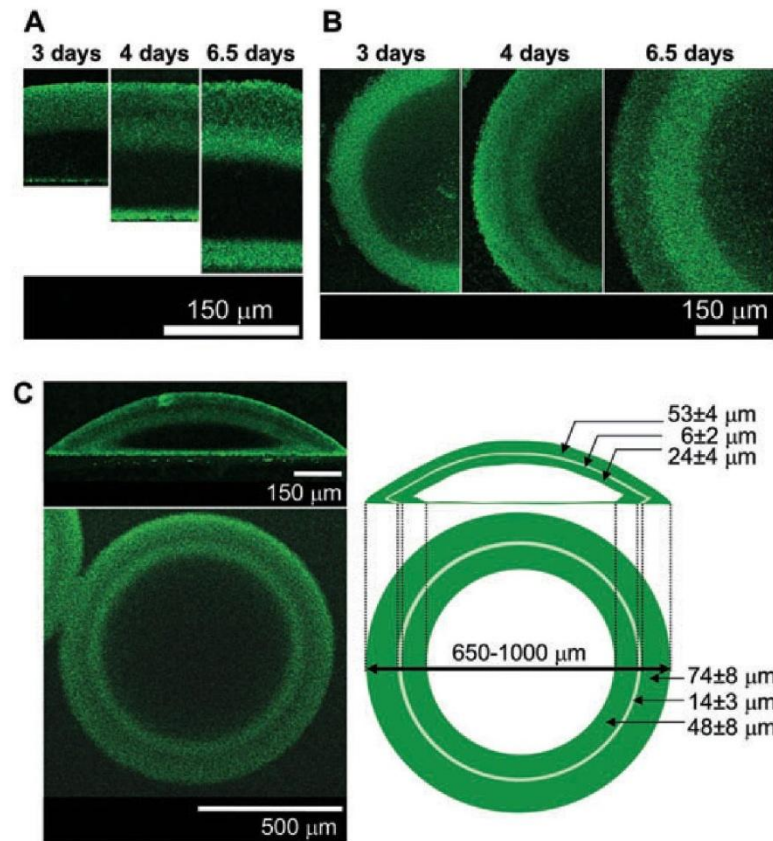
the agarose layer, indicating that observed difference between the top- and bottom-view was not simply caused by the difference in the method of sample preparation. On the other hand, it suggests that the upper surface cell layer of the colony is less transparent to the laser beam than the cell layer located at the bottom of the colony (see below).

The absence of the Ato1p-GFP fluorescence in internal colony layers is not caused by a defect in GFP maturation (e.g. due to decreased oxygen level) as microcolonies formed by strains containing other proteins tagged with GFP (e.g. Arg1p-GFP) exhibited uniform GFP fluorescence within the whole colony (data not shown).

#### *Ato1p-GFP production profile in a solitary microcolony*

Using the optimized protocol, we surveyed the Ato1p-GFP profile in microcolonies in more detail with the aim to reconstruct the fluorescent protein production pattern within the whole microcolony. In most the cases, we used the bottom- (Fig. 1B) and side-view (Fig. 1C) of BY-Ato1p-GFP microcolonies of various ages and plating densities.





**Fig. 2.** Spatio-temporal changes in Ato1p-GFP layer and its pattern in 4-day-old microcolony.

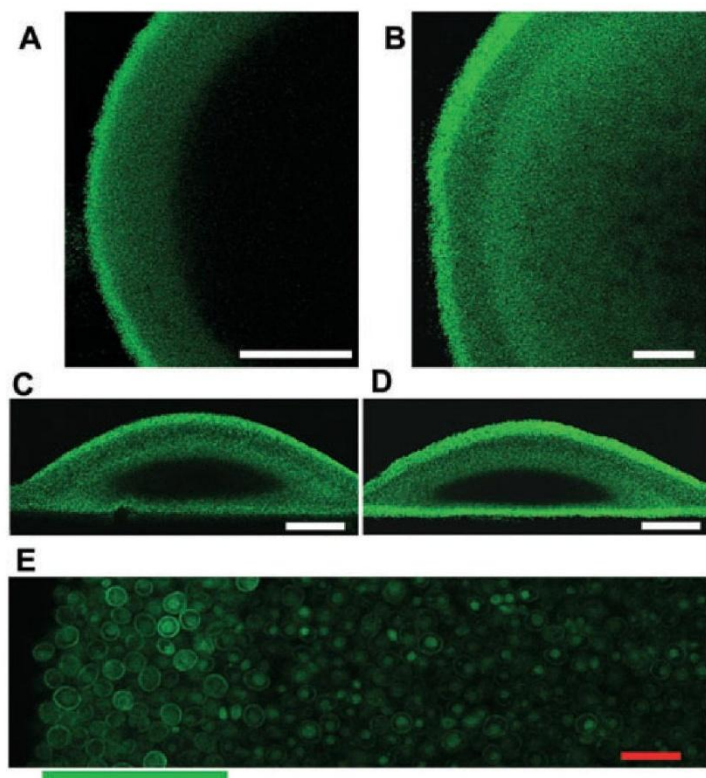
A and B. Changes in depth of Ato1p-GFP layer during microcolony development. From the left: 3-, 4- and 6.5-day-old colonies. (A) Side-view and (B) bottom-view (objective 20 $\times$ ).

C. Reconstruction of Ato1p-GFP pattern in 4-day-old microcolony on the basis of bottom- and side-view pictures. Colonies visualized using 20 $\times$  (upper) and 10 $\times$  (bottom) objective. Thicknesses of particular fluorescent cell layers were calculated as average of at least 30 colonies.

The bottom- and side-view revealed that the Ato1p-GFP protein starts to appear synchronously in cells located in a distinct layer ( $53 \pm 4 \mu\text{m}$ ) on the surface of the whole colony (3 days old, plating density  $10^4$ ) and the fluorescence intensity of the protein in this layer sharply increases, while there is no detectable Ato1p-GFP in inner colony regions (Fig. 2B). Colonies in the fully alkaline-phase (4 days old) already exhibit two distinct Ato1p-GFP fluorescent cell layers, which form concentric rings visible in the bottom-view expanding from the colony surface to the colony centre (Fig. 2). These are separated by the thin layer of cells of less intense Ato1p-GFP fluorescence (Fig. 2B and C). As colonies age, cell layers located in more interior areas also begin to exhibit Ato1p-GFP fluorescence (usually separated from the surface by a less-fluorescent cell layer). In addition, there is a layer of fluorescent cells at the very bottom of the colony, which is very thin ( $7 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ) in young colonies and becomes thicker ( $19 \pm 7 \mu\text{m}$ ) as colonies age, particularly at colony margin regions (Fig. 2A). As the very bottom cell layer(s) can be smeared during the preparation of bottom-view samples, the bottom-view revealed thicker and structured layers particularly in older colonies, but the vertical sections were crucial for the detection of

the initial thin fluorescent layer at the bottom of young colonies. The model of the 3-D pattern of Ato1p-GFP fluorescence within a 4-day-old microcolony is depicted in Fig. 2C. The dimensions of individual colony areas were calculated as an average of at least 30 colonies of the same age and size range (650–1000  $\mu\text{m}$  in diameter). This model also explains the difference in thickness of Ato1-GFP layer measured at bottom- and side-view in the Fig. 1B and C.

The optimized protocol allows quick sample preparation and microscope observation (few minutes) which is of great importance as shown in Fig. 3. Forty to sixty minutes after the sample preparation, a new thin very brightly fluorescent cell layer begins to appear on the surface of the BY-Ato1p-GFP colony. The thickness of this layer corresponds to about two cells, but it can expand up to about 10 cells during next 60 min. In this layer, strong Ato1p-GFP fluorescence appears on the cell membrane, as it was visible with higher magnification (Fig. 3E). This layer appears more quickly in colonies coming from the alkali developmental phase at the time of high ammonia production. The ammonia accumulating in the covering agarose layer can affect the resulting picture in two ways. First, the pH sensitive



**Fig. 3.** Increase in GFP fluorescence in peripheral layer of microcolonies after prolonged microscopy. (A and B) Bottom- and (C and D) side-view of microcolony 1 h (A and C) and 2 h (B and D) after sample preparation (20× objective).

E. Detail of cells in this layer (marked by green bar, 63× objective). Microcolonies were 3 days (A), 4 days (C, D, E) or 7 days (B) old. White bar, 100 μm; red bar, 10 μm.

fluorescence of GFP would increase spontaneously at higher pH, elicited by ammonia alkalinizing the agarose in tight proximity to the colony surface. Alternatively, ammonia can induce additional Ato1p-GFP production in cells as shown previously (Riccova *et al.*, 2007). In both cases, prolonged treatment would lead to the intensification and expansion of the artificial bright fluorescent layer towards the colony centre (compare Fig. 3A and C with Fig. 3B and D, respectively).

#### *Ato1p protein production in a group of microcolonies*

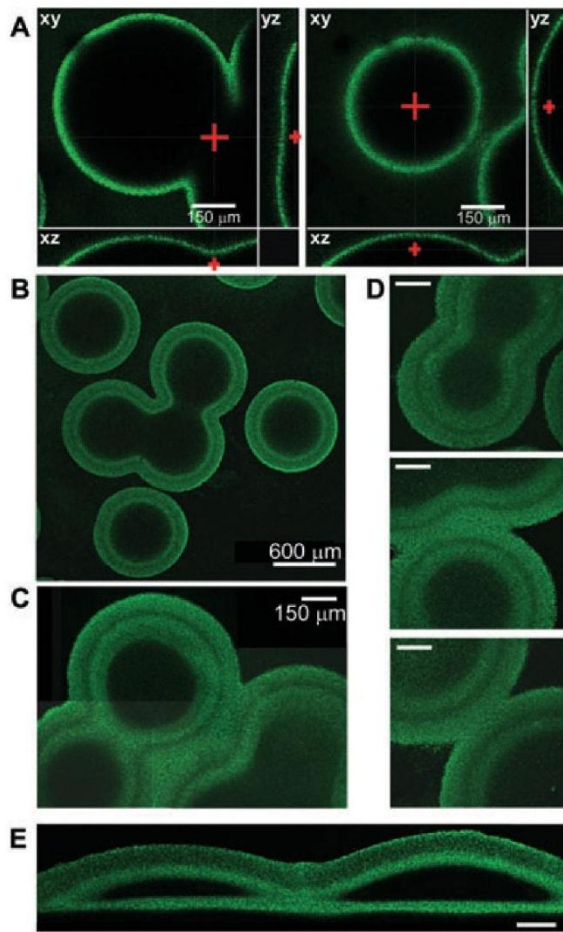
Besides monitoring Ato1p-GFP in solitary colonies, new approach allowed us to analyse the presence of the fluorescent protein in two or more colonies growing in close proximity. The top-view scanning together with spatial reconstruction allows to obtain information whether and where the two adjacent colonies are attached (Fig. 4A), but as suspected, it does not say anything about their internal Ato1p localization. On the other hand, the bottom-view (Fig. 4B–D) supplemented with the side-view (Fig. 4E) revealed that even colonies within a relatively large group, which are tightly attached, maintain their individual Ato1p-GFP pattern to some extent. As shown in Fig. 4C and D, this depends on the distance between the individual colonies. In contrast to the more

distant ones, which only join their outermost surface cell layers, the more proximal ones share both surface concentric rings.

#### *Ato1p-GFP cellular localization*

Ato1p is a plasma membrane protein which, when unneeded, is gradually degraded in the vacuole. The GFP itself, having the  $\beta$ -barrel chromophore structure, is (in contrast to Ato1p itself) rather resistant to proteolytic degradation. It can thus persist in the vacuole even after hydrolysis of the covalently attached Ato1p, visible therein as a bright green fluorescent signal. When analysing the Ato1p-GFP pattern (see above), a 20× magnification objective was usually used, which is not sufficient to distinguish fluorescent protein localization within the cells. Therefore, we also set up confocal microscopy conditions, which allowed us to analyse cells in deeper layers in more detail using the 63× magnification water objective and 2PE imaging in non-descanned (ND) mode (see *Experimental procedures*). This set-up allowed us to clearly distinguish cell membrane and vacuolar GFP fluorescence localization in both bottom-view (Fig. 5) and side-view (Fig. S7) samples at a depth of up to approximately 15 μm from the sample surface. This analysis revealed that when present, Ato1p localizes to the plasma membrane, but a





**Fig. 4.** Structure of Ato1p-GFP layers in various microcolony groups.

A. Orthogonal views of colonies showing sections in xy, xz, and yz directions with their positions within the stack given by the red crosses. Left panel shows that two adjacent colonies are joined at their base, right panel shows that the top parts of the same colonies are separated. Objective 20 $\times$ .

B. Overview of 4-day-old group of colonies, objective 10 $\times$ .

C and D. Differences in pattern of Ato1p-GFP according to microcolony distance; (C, composed picture of three microscopic images); 4-day-old microcolonies. Objective 20 $\times$ . Bar, 150  $\mu$ m.

E. Side-view of two 6-day-old adjacent colonies. Objective 20 $\times$ . Bar, 150  $\mu$ m.

portion of this protein is also directed to the vacuole for degradation.

#### Other fluorescent proteins can be used

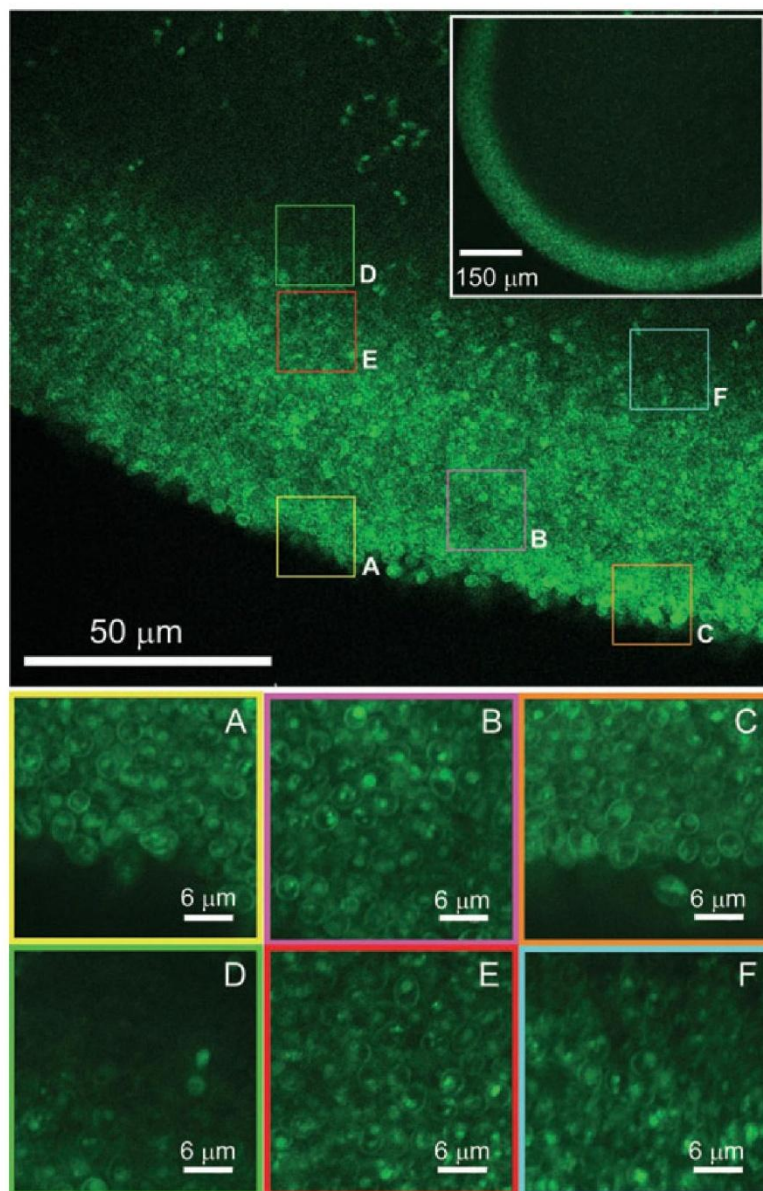
To prove that the observed pattern of Ato1p presence is not influenced by the GFP-tag, we repeated the experiments with microcolonies formed by a newly prepared strain Ato1p-DsRed containing Ato1p fused with tdimer2 (Sheff and Thorn, 2004) containing two copies of the red

fluorescent protein DsRed (i.e. with a protein exhibiting a quite different sequence and properties). The localization pattern of Ato1p-DsRed was mostly the same as that of Ato1p-GFP, thus confirming the Ato1p-GFP profile, the model of which is depicted in Fig. 2C. The only observed difference concerns the fluorescence of the very bottom colony cell layer in older BY-Ato1p-DsRed colonies (Fig. S8). This Ato1p-DsRed bottom layer was thinner than the Ato1p-GFP layer, particularly in central colony areas. This difference may be caused by the fact that in general the DsRed protein matures more slowly than GFP. In contrast to the bright GFP fluorescence at surface cells that appears 40–60 min after the sample preparation, no such a fluorescence was observed with the more slowly maturing DsRed protein. Thus, DsRed could exhibit a more stable production pattern, which, however, is delayed after the particular protein synthesis.

#### Microcolony surface is composed of cells tightly attached via cell wall proteins

The finding of low transparency of the microcolony to the laser beam (Fig. 1A) suggested a presence of a surface cell layer differing in properties from the internal cells. A brief look at Ato1p-GFP containing cells (Fig. 6C) and at the vertical samples of BY4742 colonies stained with selected dyes (4',6-diamidino-2-phenylindole: DAPI; MDY-64) (data not shown) did not reveal any visible difference in morphology of cells located just on the very surface and those located in deeper layers. The surface layer did not show any accumulation of cells with disrupted nuclei (dying cells) or highly vacuolated cells (data not shown) as described previously for yeast stalks (Scherz *et al.*, 2001). On the other hand, staining of colony from the top clearly showed that some dyes [e.g. Concanavalin A – Alexa Fluor 488 (ConA-AF), see below] were not able to penetrate inside the colony, staining thus only the surface cell layer (Fig. 6A).

In search for the root of the surface barrier, we asked the question, whether yeast cell wall (composed mainly of polysaccharides, i.e. glucans and mannans with minor percentage of chitin, and diverse proteins) could influence specific properties of the colony surface. First, we stained colonies with Concanavalin A (the lectin binding to branched  $\alpha$ -mannans within *S. cerevisiae* cell wall) (Tkacz *et al.*, 1971), conjugated with Alexa Fluor 488 (ConA-AF). ConA-AF was applied either to the intact microcolony from the top (top-staining) or to the cutting surface of the vertical microcolony section (side-staining). Then we observed vertical microcolony samples from the side (Fig. 6A and B) and checked the spatial arrangement of stained cells within the colony. The top-staining showed that only cells located in the very surface layer were



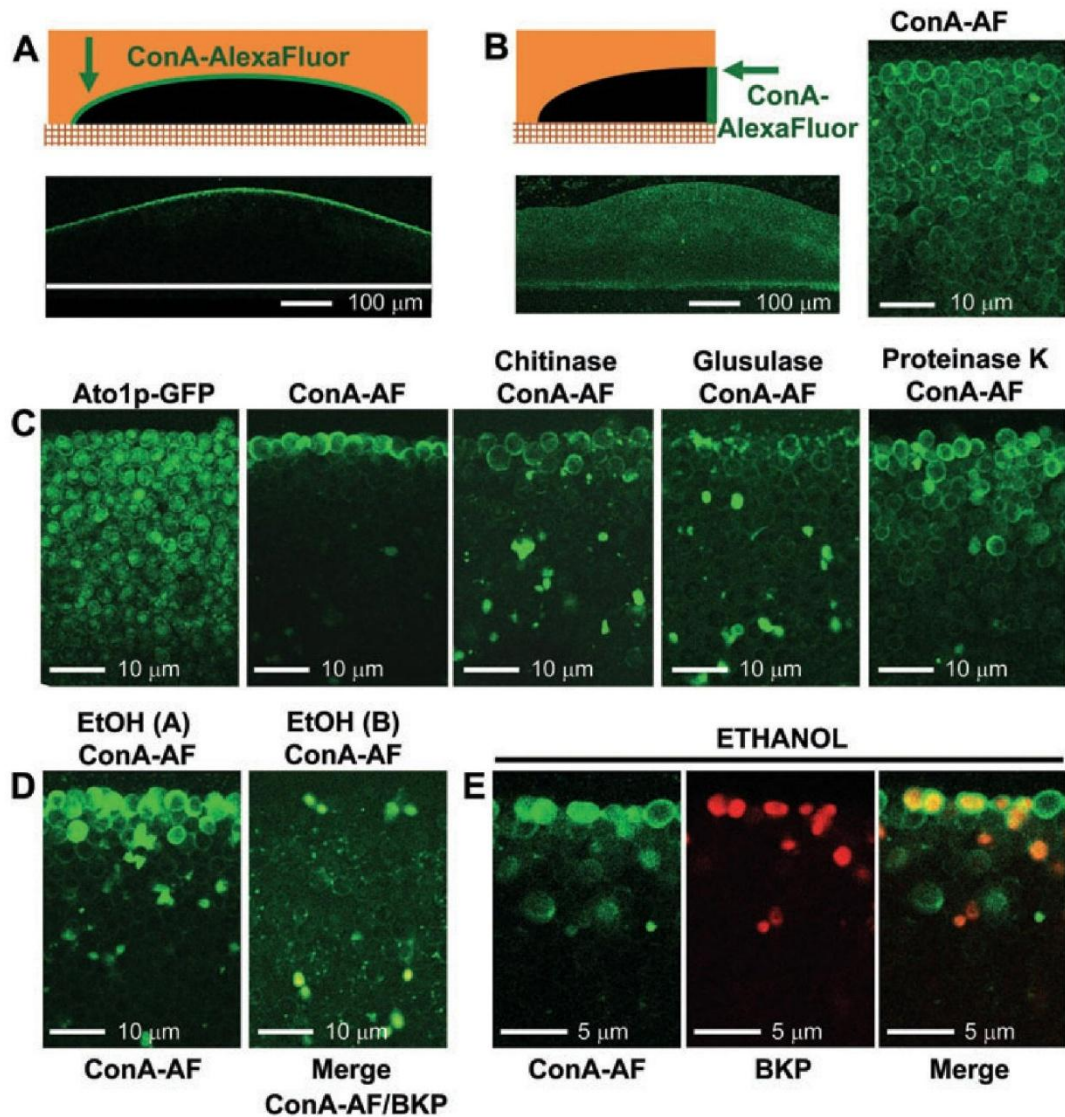
**Fig. 5.** Details of Ato1p-GFP localization in cells located at different places in fluorescent layer of 3-day-old Ato1p-GFP colonies. Upper section, the coloured squares (A–F) mark the position of colony areas shown in detail in lower section (colour of square and lettering match respective detailed image), visualized using 63× objective. Inset, global bottom-view of a colony (objective 10×).

stained and they were tightly attached via brightly fluorescent cell walls (Fig. 6A and C). The side-staining proved that the cell wall of internal cells is also stainable by ConA-AF, although lower fluorescence intensity was detected in bottom-central colony regions (Fig. 6B). Partial digestion of the cell wall polysaccharides by enzymes glucosylase and chitinase applied to the top of the colony simultaneously with ConA-AF significantly increased the penetrability of this dye to deeper colony layers (Fig. 6C). As expected, the fluorescent signal of ConA-AF partially decreased because ConA-AF was bound only to residual cell wall material after its partial

digestion with the enzymes. Moreover, a noticeable ConA-AF penetration was observed after proteinase K treatment (Fig. 6C), which does not affect ConA-AF binding to the cell wall.

To investigate whether the surface cell layer indeed protects the colony against harmful compounds, we applied 50% ethanol either from the top to the unpaired microcolony surface or to the cutting surface of the vertical microcolony section. We checked the efficiency of the ethanol treatment by monitoring of ConA-AF penetration to deeper layers and the cell membrane integrity using BKP. Figure 6D (left) and E show that the surface cell





**Fig. 6.** Cells on the microcolony surface are tightly attached by their cell wall and form protective cell layer.

A. Top-staining of the intact microcolonies by ConA-AF. Upper section, scheme of the staining; bottom, side-view on top-stained microcolony. B. Side-staining of the vertical colony sample. Upper left, scheme of the staining; bottom, side-view of side-stained microcolony; right, detailed view of the upper part of the colony showing that cell wall of internal cell layers is stainable by ConA-AF. C. Side-view of Ato1p-GFP colonies (very left) and of ConA-AF top-stained colonies (scheme of the staining in A) untreated or treated with different enzymes as indicated. D. Effect of 50% ethanol applied from the top to intact microcolony (left) or to the cutting surface of the vertical microcolony sample (right). Ethanol application and ConA-AF staining were performed as indicated in A and B respectively. Left, image from green (ConA-AF) channel. Right, merged image from green (ConA-AF) and red (BKP) channels. E. Left, detailed view of the surface cell layer after simultaneous ethanol application and ConA-AF staining (both from the top on the intact microcolony), shown in green channel. Middle, membrane permeabilization by ethanol, demonstrated by BKP staining, in red channel. Right, merged image from green and red channels. Objective 20 $\times$  (A, B-left). Objective 63 $\times$  (B-right, C–E).

layer protected the cells inside the intact microcolony from almost complete cell disruption by ethanol, which was clearly seen after the treatment of unprotected vertical section (Fig. 6D, right). Ethanol applied from above caused nothing more than partial impairment of mem-

branes of cells in the surface layer, which became permeable for BKP (Fig. 6E) and partially increased the ConA-AF penetrability. In contrast, unprotected cells were so damaged that they were not even stainable by BKP (Fig. 6D, right).

## Discussion

The development of multicellular microbial structures is accompanied by cell differentiation and specialization, which can be important for the long-term survival of the whole microbial community (Palkova and Vachova, 2006). Here, we show a new approach that allows the monitoring of changes in cells (e.g. presence of a specific protein or other characteristics) located in particular areas within a developing yeast microcolony when passing through particular phases. Proteins tagged with a fluorescent protein forming an intrinsic fluorescent probe produced by the cells themselves under natural conditions and in a natural position within the multicellular structure (Fig. 2), as well as fluorescent dyes, which can be present in the agar plates and which do not influence proper colony development (Fig. S2), are especially suitable for this purpose. The additional staining with other fluorescent dyes specific for particular cellular structures is also feasible (Fig. 6).

One of the advantages of the new approach is the speed of the colony sample preparation and microscopy analysis, which makes it possible to prevent artefacts connected with artificial gene expression, which could appear during prolonged manipulations as shown in Fig. 3 for Ato1p-GFP production. It also preserves cells in colonies in very good shape (as controlled by parallel monitoring of BKP). Combining the bottom and vertical section side-view makes it possible to obtain a complete picture of the spatial arrangement of particular protein (e.g. Ato1p-GFP) within the microcolony at any point in its development. Moreover, the 2PE microscopy entering deeper layers allows avoiding possible problems caused by damage to the surface cell layer during manipulation of the colony sample, which could occur for example when vertical sections are prepared. The fact that not only solitary colonies, but also groups of colonies of different plating densities can be analysed provides a unique opportunity to monitor the relationships and possible consequences of interactions and communications between the individual colonies during their development. On the other hand, the main limit is the size of colonies, which can be analysed, because of the limits in terms of the penetration of the laser beam and the working distance (WD) of the objective. Thus, only small (0.5–2 mm diameter) microcolonies (Fig. S1) can be studied by this approach. Another technical limitation is linked to the fact that the depth of laser beam penetration is lower for objectives with a higher magnification and numerical aperture (NA), yielding higher resolution, than for those with a lower NA. Thus, while we can quite easily obtain information from a depth of 50 µm with a 20× objective (NA = 0.7), a depth of about 15 µm is limiting for the analysis of individual cells with a magnification of 63× using a water immersion planapochromat

objective with high NA (1.2) to provide sufficiently high resolution.

As shown before for giant colonies (Riccova *et al.*, 2007), Ato1p-GFP production is initiated when the colony switches to the alkali developmental phase. Here, we demonstrate that Ato1p-GFP production starts synchronously in cells located in the outermost surface layer over the whole microcolony, being thus regulated according to the exact position of cells within the colony. This layer exhibits a uniform thickness over the whole colony surface and is independent of the diameter of the colony over a relatively wide range of at least 650–1000 µm. During later colony development, new fluorescent layer(s) are visible under the first layer, i.e. in areas more distant from the surface, again synchronously over the whole colony. These new layers are separated from the first by thin layers (of 8–20 µm) of less fluorescent cells. Thus, when looking from the bird view, the margin of colony entering the alkali phase is composed mostly of Ato1p-GFP producing cells, while Ato1p-GFP surface layer forms only about 1/2 of the whole deepness of the colony central region. This agrees with observed higher level of Ato1p-GFP protein in cells picked up from the outer colony areas as compared with those of central regions as well as with higher capability of outer cells to produce ammonium (Vachova *et al.*, 2009).

The localization of Ato1p-GFP in a group of microcolonies resembles that in a solitary one. Even those microcolonies, which are quite tightly joined, still keep to some extent Ato1p-GFP fluorescence as concentric ring(s) (e.g. Fig. 4C and D, bottom). Only those colonies, which partially unified before the alkali phase started, did not share any fluorescent protein at their junction. Hence, the fluorescence pattern visible from the bottom view reflects the timing of physical interaction between neighbouring microcolonies. Moreover, synchronous appearance of new concentric rings in colonies growing in a group represents another support for hypothesis of synchronized behaviour of individual colonies at respective territory (Palkova and Forstova, 2000).

The surface cell layer of microcolonies exhibiting low transparency in terms of penetration of the laser beam and low penetrability for different dyes (e.g. ConA-AF) appears to fulfil a skin-like function protecting the colony against environmental impacts. This hypothesis is supported by the finding that high concentration of ethanol applied to the cutting surface of a vertical colony sample damages most of the cells, while ethanol of the same concentration when applied on the intact microcolony surface, attacks only membranes of skin cells and cannot damage cells inside the colony. The presence of a layer of thick-walled dead cells was previously detected on the surface of a yeast stalk by transmission electron microscopy (Scherz *et al.*, 2001). In contrast to this layer, surface



skin-like layer covering yeast microcolonies is thinner (one to two cell layers) and composed of thick-walled cells, which, however, do not exhibit dying features. According to the observed cell morphology, the thick-walled cells in the cover layer are alive and tightly stuck one to each other forming leak-proof barrier. The finding that ConA-AF penetrates deeper into the colony structure after partial hydrolysis of the cell wall polysaccharides or proteins (Fig. 6C) suggests that the cell wall composition can be responsible for the surface layer properties. Even proteolytic treatment (non-disrupting the cell wall polysaccharides) is sufficient to release attached cells and break down the barrier. This implies an important role of cell-surface proteins in cell-cell attachment and the layer formation.

The finding that 2PE confocal microscopy provides much more information on colony structure when observing it either from the bottom or from the side into the structure also indicates an interesting possibility of using similar method for investigation of other microbial multicellular communities including natural biofilms. So our new approaches could also contribute to new insights on these structures and to the reconstruction of spatio-temporal changes in the presence of particular proteins connected with cell differentiation as well as other changes, which can reveal specificities of cells located at particular positions within microbial multicellular structures.

## Experimental procedures

### Strains and media

BY-Ato1-GFP (Riccova *et al.*, 2007) and BY-Ato1-DsRed (this article) are derived from the *S. cerevisiae* BY4742 strain (*MAT $\alpha$* , *his3 $\Delta$ 1*, *leu2 $\Delta$ 0*, *lys2 $\Delta$ 0*, *ura3 $\Delta$ 0*) obtained from the EUROSCARF collection. Cells were plated on GM (1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar, 30 mM CaCl<sub>2</sub>) or GM-BKP agar (GM, 0.01% BKP), in densities of 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> per plate and microcolonies were grown at 28°C for 2–7 days. SD medium (2% glucose, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.15% Wickerham's yeast nitrogen base supplemented with 150 mg l<sup>-1</sup> of histidine, leucine, lysine) was used for selection of the transformants.

### Construction of BY-Ato1-DsRed strain

DsRed fluorescent tag was fused (Wach, 1996) to the C terminus of the *ATO1* gene directly in the chromosome. In this construct, we used tdimer2(12) DsRed variant containing tandem dimer of DsRed joined with the linker of 12 amino acids (Sheff and Thorn, 2004). A tdimer2(12)-CaURA3 (Sheff and Thorn, 2004) cassette was provided with its 5'-end homologous to the end of the *ATO1* gene (without a stop codon) and 3'-end homologous to the downstream region of the *ATO1* gene. For amplification of the construct, we used

A1D and A1R primers and the pFA6a-link-tdimer2(12)-CaURA3 plasmid as a template. The constructed cassette was transformed (Gietz *et al.*, 1995) into BY4742 cells and positive transformants were selected on SD agar medium. Correct integrations of the cassette were verified by PCR using the G1 and GR primers. Primers used: A1D (5'-tatgtactggctcgtccattcccattaccatctactgaaagggaatcttggtagcggtgctggttta-3'), A1R (5'-aaaactactctttttattcaatagttctcgtatttagtaggtcgtgctcgcgatgaattcgagctcg-3'), GR (5'-tccagtaattccttgggtt-3'), G1 (5'-atgtgagcaagccaacaag-3').

### Microscopic sample preparation

Colonies were embedded in low-gelling agarose (Sigma-Aldrich) directly on the plates. After gelling, a piece of agar with agarose-embedded colonies (an area of approximately 10 × 10 mm) was cut out. For the bottom-view, the agarose layer was about 2–3 mm and embedded colonies were gently cut out of the agar and carefully transferred to the cover glass (colony bottom to the glass) as shown in Fig. 1B. The same procedure was used for the side-view, only the embedded colonies were cut vertically down the middle (Fig. 1C). For the top-view sample, the agarose layer was only 1 mm thick and the colonies still sitting on the agar were placed upside-down on the coverslip (Fig. 1A). All samples on the coverslip were covered with a thick agarose layer to prevent them from drying during the microscopic image acquisition.

### Staining and treatment of the samples

For the top staining, intact microcolonies on the plates were embedded in low-gelling agarose containing ConA-Alexa Fluor 488 (30 µg ml<sup>-1</sup>) and, if appropriate, containing particular enzyme (i.e. 2.5% glusulase from *Helix pomatia*, Perkin Elmer; 0.05 mg ml<sup>-1</sup> chitinase from *Trichoderma viridae*, Sigma; 20 mAU ml<sup>-1</sup> proteinase K, Qiagen) and incubated 60 min at 28°C. Alternatively, agarose in 50% ethanol was used. Side-view samples were prepared as described above and observed under the 2PE microscope. For the side-staining, side-view samples were prepared and placed on thin agarose layer containing ConA-Alexa Fluor 488, and, if appropriate 50% ethanol on the coverslip. Alternatively, DAPI (10 µg ml<sup>-1</sup> in 50% ethanol) for DNA staining, or MDY-64 (20 µM) for vacuole staining were present in thin agarose layer. Samples were incubated 15–30 min and observed under the 2PE microscope.

### Image acquisition

A Leica TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope based on a Leica DM IRE2 inverted microscope and equipped with an argon laser (458 nm/5 mW, 476 nm/5 mW, 488 nm/20 mW, 514 nm/20 mW) as well as green (543 nm/1.2 mW) and red (633 nm/10 mW) HeNe lasers was used for initial 1PE experiments. For 2PE excitation, we used a mode-locked Ti:Sapphire Chameleon Ultra laser (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA), tunable from 690 nm to 1040 nm, coupled to the microscope. For the acquisition of relatively large colonies, an HC PL FLUOTAR 5× dry objective with a WD of 12.2 mm and an NA of 0.15 or an HC PL



APO CS 10× dry planapochromat objective (WD = 2.2 mm, NA = 0.40) were used. In most cases we used an HC PL APO CS 20× water immersion planapochromat objective (WD = 250 μm, NA = 0.7), often yielding sufficient resolution while offering a relatively large field of view. For imaging cell details we used an HCX PL APO CS 63× water immersion planapochromat objective (WD = 220 μm, NA = 1.2).

The experimental set-up for image acquisition is shown in Fig. S3. For the acquisition of a GFP fluorescence signal using 1PE, a wavelength of 488 nm was used for excitation and wavelength range from 500 nm to 540 nm for detection. The two-photon fluorescence signal was usually collected in descanned (D) mode, i.e. via internal detectors placed inside the scanning head (see Fig. S3). For the acquisition of GFP and ConA-Alexa Fluor 488 we used a wavelength of 900 nm for excitation and wavelength range for detection from 470 to 540 nm and 510 to 555 nm respectively. BKP was simultaneously detected in a second channel, with detection wavelengths ranging from 640 nm to 700 nm. For the acquisition of DsRed we used an excitation wavelength of 960 nm and detection wavelength range from 570 to 695 nm. In some cases, when the GFP signal was too weak for proper detection in D mode, we applied 2PE in ND mode, using an external detector. In this way we could get an improved signal-to-noise ratio in the acquired images. In ND configuration, the external detector (PMT4 in Fig. S3) was placed behind a 700 nm short pass filter (F1) to remove reflected light of wavelengths over 700 nm, preventing detector damage by reflected high power IR light, followed by a 525 nm band pass filter (F2) with a bandwidth of 50 nm. The same excitation wavelength was used as in D mode, i.e. 900 nm. This setting improved detection of the GFP signal; however, we found that the ND configuration using a narrow red bandpass filter was not optimal for the detection of BKP, therefore the BKP signal was acquired in D mode, using a wide detection range from 600 to 750 nm.

Using the above microscope settings, we acquired either images of individual optical sections in different layers of colonies, or 20–50 μm thick stacks of a series of optical sections (z-series), usually 2.5–3.5 μm apart. For noise reduction, we applied line or frame averaging during the acquisition of images. To compensate for light attenuation with depth, which is common in confocal and 2PE microscopy (Capek *et al.*, 2006) and which we often encountered during the acquisition of the z-series of colonies, we usually used the Intensity Compensation feature of Leica Confocal Software, Version 2.61 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) in 'Linear by Gain' mode.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718, from the Ministry of Education LC06063 and Research Concepts MSM0021620858, AV0Z50200510 and AV0Z50110509, from IAA500200506 and by the Howard Hughes Medical Institute International Research Award (#55005623 to Z.P.).

### References

Capek, M., Janacek, J., and Kubinova, L. (2006) Methods for compensation of the light attenuation with depth of images

captured by a confocal microscope. *Microsc Res Tech* **69**: 624–635.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355–360.

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

Palkova, Z., and Vachova, L. (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 806–824.

Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., and Forstova, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**: 532–536.

Palkova, Z., Devaux, F., Rivicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* **13**: 3901–3914.

Rivicova, M., Kucerova, H., Vachova, L., and Palkova, Z. (2007) Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1170–1178.

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

Sheff, M.A., and Thorn, K.S. (2004) Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661–670.

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., and Tank, D.W. (1997) *In vivo* dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* **385**: 161–165.

Tkacz, J.S., Cybulska, E.B., and Lampen, J.O. (1971) Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *J Bacteriol* **105**: 1–5.

Vachova, L., and Palkova, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* **169**: 711–717.

Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M., and Palkova, Z. (2009) Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* **11**: 494–504.

Vroom, J.M., De Grauw, K.J., Gerritsen, H.C., Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K., *et al.* (1999) Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3502–3511.

Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259–265.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Four-day-old microcolonies of BY-Ato1-GFP strain on GM agar. Cell density  $10^3$ – $10^4$  cells per plate.

**Fig. S2.** GFP and BKP co-staining. Parallel detection of BKP-stained cells allows cell dying to be monitored during image acquisition.

**Fig. S3.** Schematic view of the experimental set-up. Leica TCS SP2 AOBs Confocal laser scanning microscope coupled with Chameleon Ultra IR pulsed laser for two-photon excitation. For imaging the GFP fluorescence signal by 1PE excitation, the 488 nm line of a visible Ar laser was used for excitation and photomultiplier 1 (PMT1) for detection. BKP signal was simultaneously collected by a PMT2 detector. 2PE fluorescence was recorded in descanned or non-descanned mode. In descanned mode, an excitation wavelength of 900 nm was used and the signal was collected by PMT1 for the visualization of GFP, BKP was simultaneously detected by PMT3. Two-photon excitation of 960 nm and detection by PMT3 was used for the visualization of RFP. In the non-descanned configuration, the light was collected directly behind the objective by the external PMT4 detector after passing through an E700SP short pass filter (F1), followed by a 525DF25 band pass filter (F2).

**Fig. S4.** Top-view of colonies.

A. Scheme of the 'top-view' sample.

B. 'Top-view' z-scanned images. Position of the sections in  $\mu\text{m}$  is indicated. Green arrow indicates direction of 2PE scanning (from the top of the colony).

**Fig. S5.** Bottom-view of colonies.

A. Scheme of the 'bottom-view' sample.

B. 'Bottom-view' z-scanned images. Position of the sections in  $\mu\text{m}$  is indicated. Green arrow indicates direction of 2PE scanning (from the bottom of the colony).

**Fig. S6.** Bottom-view of colonies through the agarose layer.

A. Scheme of the 'bottom-view' sample. Thin agarose layer placed between the coverslip and the bottom of the colony is indicated by the arrow.

B. 'Bottom-view' z-scanned images. Position of the sections is indicated in  $\mu\text{m}$ . Green arrow indicates direction of 2PE scanning (from the bottom of the colony).

**Fig. S7.** Details of Ato1p-GFP protein localization in cells located at different places at the junction of 4-day-old micro-colonies. Positions of detailed pictures within the global side-view are marked with coloured squares (objective 63 $\times$ ). Inset, objective 20 $\times$ .

**Fig. S8.** Comparison of localization of Ato1p marked by DsRed (A) and GFP (B). Scheme on the left side shows the position of vertical sections used for the side-view. 1, section in the middle and 2, secant section of microcolony.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## 5.15 Publikace II

### **Interakce Ato proteinů v plazmatické membráně objevena pomocí techniky FLIM**

*Dita Strachotová, Aleš Holoubek, Helena Kucerova, Aleš Benda, Jana Humpolíčková, Libuše Váchová, and Zdena Palková*

#### **Ato protein interactions in the yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM)**

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer - fluorescenční rezonanční přenos energie - je děj, jehož je možno využít ke zjišťování přímé interakce mezi dvěma proteiny. Principem je rezonanční přenos energie mezi molekulami fluorescenčního donoru a akceptoru, jež jsou navázány na proteiny našeho zájmu. Jako donor a akceptor mohou sloužit například různě barevné varianty fluorescenčních proteinů (FP). Při měření FRET mezi fúzními proteiny našeho zájmu bylo využito skutečnosti, že při rezonančním přenosu energie mezi fluorescenčním donorem a akceptorem dochází současně ke snížení poločasu života (fluorescence lifetime) fluorescenčního donoru. Pozorování změn poločasu života fluorescenčního donoru bylo uskutečněno *in vivo* pomocí FLIM (Fluorescence Lifetime IMaging) mikroskopie.

Za účelem zjištění případné interakce mezi Ato1p, Ato2p a Ato3p proteiny byly vytvořeny stabilní konstrukty s různými kombinacemi fúzních Ato-FP proteinů. Vytvořeny byly rovněž kmeny sloužící jako pozitivní a negativní kontrola k ověření spolehlivosti použité metody.

Výsledky ukazují, že dochází k interakci mezi Ato1p-FP a Ato2p-FP proteiny a dále mezi Ato1p-FP/Ato1p-FP a Ato3p-FP/Ato3p-FP proteiny. Interakce mezi Ato1p-FP a Ato3p-FP, Ato2p-FP a Ato3p-FP proteiny a interakce Ato2p-FP/Ato2p-FP proteinů nebyla prokázána.





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamem](http://www.elsevier.com/locate/bbamem)

## Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM)

Dita Strachotová<sup>a,b</sup>, Aleš Holoubek<sup>b,1</sup>, Helena Kučerová<sup>a,b</sup>, Aleš Benda<sup>c</sup>, Jana Humpolíčková<sup>c</sup>,  
Libuše Váňová<sup>a</sup>, Zdena Palková<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the ASCR, v. v. i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 January 2012

Received in revised form 29 April 2012

Accepted 4 May 2012

Available online xxxxx

#### Keywords:

Ammonium exporters Ato1p, Ato2p and Ato3p

FLIM-photobleaching technique

Homo/hetero di(oligo)mers

Plasma membrane protein interaction

Donor lifetime

### ABSTRACT

Each of the three plasma membrane Ato proteins is involved in ammonium signalling and the development of yeast colonies. This suggests that although these proteins are homologous, they do not functionally substitute for each other, but may form a functional complex. Here, we present a detailed combined FRET, FLIM and photobleaching study, which enabled us to detect interactions between Ato proteins found in distinct compartments of yeast cells. We thus show that the proteins Ato1p and Ato2p interact and can form complexes when present in the plasma membrane. No interaction was detected between Ato1p and Ato3p or Ato2p and Ato3p. In addition, using specially prepared strains, we were able to detect an interaction between molecules of the same Ato protein, namely Ato1p–Ato1p and Ato3p–Ato3p, but not Ato2p–Ato2p.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

When growing on solid media, yeast colonies undergo developmental changes accompanied by pH changes to their surroundings from acid-to-alkali and vice versa. The ammonia released during the alkali phase acts as a long-range signal, influencing the development of neighbouring colonies [1,2]. Three transmembrane proteins Ato1p (Ycr010p, Ady2p), Ato2p (Ynr002p, Fun34p) and Ato3p (Ydr384p), the expression of which increases sharply during acid-to-alkali colony transitions, play an important role in yeast colony development [3]. These proteins belong to the highly conserved Gpr1/Fun34/YaaH family, the members of which are present in prokaryotes and lower eukaryotes (mainly fungi) and their precise function is still unknown. Several findings suggest that Ato proteins play a role in ammonium export, although no direct evidence of their ammonium transporter function has been found so far. i) The production and membrane localisation of Ato proteins correlate with ammonia production and ATO gene

expression can be prematurely induced by ammonia from an artificial source [4]. ii) The production of Ato proteins is significantly diminished in the colonies of various strains exhibiting a lack of ammonia signalling [5]. iii) Respiration-deficient  $p^0$  cells increase their production of Ato3p that is thought to remove an excess of ammonium [6]. Other data indicate that Ato1p and Ato2p are involved in acetic acid sensitivity [7] and Ato1p (but not the other Ato proteins) is involved in acetate uptake in *S. cerevisiae* cells grown in liquid cultures [8].

Although all three Ato proteins were found in the ergosterol-rich fraction of the plasma membrane, each of them exhibits different membrane distribution. Ato1p and Ato3p were found in “raft” patches, differing in their properties. Ato1p, but not Ato3p patch formation is pH-dependent. Ato2p exhibits the most uniform distribution in the membrane [4]. Ato1p and Ato2p are highly homologous (70% amino acid identity), while Ato3p is less similar (33–34% amino acid identity). The absence of any of the three Ato proteins causes a decrease in ammonia production, suggesting that these proteins cannot mutually complement each others' functions [3]. This finding raises the question of whether Ato proteins could function in a cooperative manner, possibly forming complex(es) in the plasma membrane. This possibility is supported by recent data suggesting that the Ato protein orthologue Gpr1p from *Yarrowia lipolytica* may exist in an oligomeric state [7].

FRET (fluorescence resonance energy transfer) is a technique frequently used to confirm protein–protein interactions within living cells [9–11]. Proteins of interest are genetically labelled with fluorescent proteins (FP) forming a FRET pair. If the molecules carrying the

**Abbreviations:** DRLP, dichroic long pass; FLIM, fluorescence lifetime imaging; FP, fluorescent protein; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GM, glycerol medium; LDH, laser diode heads; NA, numerical aperture; PCR, polymerase chain reaction; SPAD, single-photon avalanche diode; TCSPC, time-correlated single-photon counting; tdimer2, tandem dimer of DsRed

\* Corresponding author. Tel.: +420 221951721; fax: +420 221951724.

E-mail address: [zdenap@natur.cuni.cz](mailto:zdenap@natur.cuni.cz) (Z. Palková).

<sup>1</sup> Current address: The Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 2094/1, 12820 Prague 2, Czech Republic.

0005-2736/\$ – see front matter © 2012 Published by Elsevier B.V.  
doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), *Biochim. Biophys. Acta* (2012), doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005

79 fluorophores are close enough (1–10 nm), the excited state energy of  
80 the donor can be transferred nonradiatively to the acceptor. Due to  
81 that energy transfer, the fluorescence of the acceptor is enhanced at  
82 the expense of the fluorescence of the donor. These changes in fluores-  
83 cence intensities are often used for FRET detection [10,11]. Intensity-  
84 based fluorescence measurements are, however, complicated due to  
85 bleed-through of the donor fluorescence into an acceptor detection  
86 channel in addition to direct excitation of the acceptor fluorescence,  
87 which limits the reliability of this approach. The intensity-based  
88 measurements can be improved e.g. by methods using acceptor photo-  
89 bleaching, but even here attention should be paid to avoid possible  
90 artefacts [12]. Another approach to FRET measurements uses the fact  
91 that the quenching of donor fluorescence is also manifested as  
92 shortening of its fluorescence lifetime, which can be monitored at mi-  
93 croscopic resolution using FLIM (fluorescence lifetime imaging), en-  
94 abling protein–protein interaction to be localised directly in living  
95 cells [13–17]. TCSPC (time-correlated single-photon counting)-based  
96 FLIM instruments are preferentially used for this kind of studies  
97 [18–20]. In yeast, FLIM-FRET approach based on monitoring of a  
98 Cerulean fluorescence donor lifetime (a variant of the cyan fluorescent  
99 protein with improved quantum yield [21]) was successfully used to  
100 measure interaction of cyclin dependent kinase with B-type cyclins  
101 with cytosolic and nuclear localization [22].

102 Here we combine FRET-FLIM and acceptor photobleaching based  
103 FRET to detect interactions between proteins localised to distinct com-  
104 partments of yeast cells. We show that Ato proteins form complexes  
105 in the yeast plasma membrane, in which interaction between specific

Ato proteins as well as between the same molecules of a particular  
Ato protein can occur.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and media

The strains used in this study (Table 1) are derived from *Saccharo-*  
*myces cerevisiae* BY4742 (*MATα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*) and  
BY4741 (*MATα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*), obtained from the  
EUROSCARF collection. Cells were grown at 28 °C either on GM-BKP  
agar (1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01%  
bromocresol purple, pH 5) for 12–13 days (fully developed alkali  
phase) or in liquid GM media (1% yeast extract, 3% glycerol, pH 5) for  
approximately 24 h.

### 2.2. Construction of strains containing fluorescent fusion proteins

A fluorescent protein (FP) gene-tag (GFP, tdimer2, CFP, Venus) was  
fused to the appropriate gene directly in the chromosome. A “FP-  
selection marker” cassette was provided with its 5'-end homologous  
to the end of the appropriate gene (without a stop codon) and 3'-end  
homologous to the downstream region of the appropriate gene. For  
amplification of the cassette, we used the primers for the *ATO1*, *ATO2*,  
*ATO3*, *JEN1*, *MET17*, *FET3* and *FTR1* genes (Table S1) and the appropriate  
plasmid as the template. Single-labelled strains were prepared using  
the pKT209 plasmid (GFP, “green” strains), pKT176 (tdimer2, “red”

Table 1  
Strains.

Name	Genotype	Source
BY-Ato1p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	Váchová et al., 2009
BY-Ato2p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-CFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yECFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-CFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yECFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-CFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yECFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato2p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato3p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato1p-CFP/Ato2p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yECFP-CaURA3</i> , <i>ATO2-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato2p-CFP/Ato1p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yECFP-CaURA3</i> , <i>ATO1-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato3p-CFP/Ato1p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yECFP-CaURA3</i> , <i>ATO1-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Ato3p-CFP/Ato2p-Venus	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yECFP-CaURA3</i> , <i>ATO2-yEVenus-Kan</i>	This study
BY-Fet3p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>FET3-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ftr1p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>FTR1-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Fet3p-GFP/Ftr1p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>FET3-yEGFP-CaURA3</i> , <i>FTR1-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Fet3p-tdimer2/Ftr1p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>FET3-tdimer2-CaURA3</i> , <i>FTR1-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Jen1p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>JEN1-yEGFP-SpHIS5</i>	This study
BY-Jen1p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>JEN1-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Jen1p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>JEN1-yEGFP-SpHIS5</i> , <i>ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Met17p-GFP	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>MET17-yEGFP-Kan</i>	This study
BY-Ato1p-GFP (BY4741)	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-GFP (BY4741)	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-GFP (BY4741)	<i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEGFP-CaURA3</i>	This study
BY-Ato1p-GFP/Ato1p-tdimer2	<i>MATα/MATα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> , <i>ATO1-yEGFP-CaURA3/ATO1-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato2p-GFP/Ato2p-tdimer2	<i>MATα/MATα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> , <i>ATO2-yEGFP-CaURA3/ATO2-tdimer2-CaURA3</i>	This study
BY-Ato3p-GFP/Ato3p-tdimer2	<i>MATα/MATα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> , <i>ATO3-yEGFP-CaURA3/ATO3-tdimer2-CaURA3</i>	This study

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), *Biochim. Biophys. Acta* (2012), doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005



128 strains), pKT174 (CFP, “blue” strains) and pKT103 (Venus, “yellow”  
 129 strains). Double-labelled strains were prepared using pKT128/pKT176  
 130 (GFP–tdimer2, “green–red” strains) and pKT174/pKT103 (CFP–Venus,  
 131 “blue–yellow” strains). The constructed cassettes were transformed  
 132 [23] into BY4742 cells and positive transformants were selected either  
 133 on SD agar medium with auxotrophic supplements or on YPD medium  
 134 with the appropriate concentration of antibiotic. Correct integration of  
 135 the cassette was verified by PCR. The diploid strains were constructed  
 136 by mating (crossing) the BY4741 and BY4742 strains with ATO–GFP  
 137 and ATO–tdimer2 fusions, respectively.

### 138 2.3. Microscopy sample preparation

139 Cells taken from the inner rim of the colony (Fig. S1) were  
 140 resuspended in distilled water, spotted onto a cover slip and covered  
 141 with a rectangular piece of agarose cut out of a thin 0.8% agarose  
 142 layer. Cells from the liquid culture were washed twice with distilled  
 143 water before microscopy sample preparation.

### 144 2.4. Cell fractionation and GFP detection

145 Cell lysates from alkali-phase colonies and liquid GM medium, re-  
 146 spectively, were prepared [24] and separated to the membrane [4]  
 147 and soluble fractions (includes also vacuolar lumen). Proteins from  
 148 each fraction were analysed by SDS–PAGE and subsequent immuno-  
 149 blotting. To detect Ato–GFP and free GFP proteins, we used mouse  
 150 monoclonal anti–GFP antibody, horseradish peroxidase (HRP) conju-  
 151 gate (Santa Cruz). The Pma1p, marker of plasma membrane, was  
 152 detected by specific goat anti–Pma1 antibodies (Santa Cruz Biotechnol-  
 153 ogy) in combination with rabbit anti–goat IgG–peroxidase (Sigma) as  
 154 the secondary antibody [24].

### 155 2.5. Fluorescence lifetime imaging

#### 156 2.5.1. Instrumental setup

157 We studied two FRET pairs: GFP–tdimer2 and CFP–Venus. Data for  
 158 both the pairs were acquired with Microtime 200 inverted confocal  
 159 microscope (PicoQuant, Berlin, Germany) [25]. Donors and acceptors  
 160 were excited quasi-simultaneously with alternatively pulsing laser  
 161 beams [26]. The pulsed interleaved excitation (PIE) allows for indepen-  
 162 dent mapping of the acceptor signal, which was used for construction of  
 163 the saturation curves.

164 For excitation we used the following excitation wavelengths:  
 165 440 nm (LDH–D–C–440) for CFP, 470 nm (LDH–P–C–470) for GFP, and  
 166 532 nm (PicoTa) for tdimer2 and Venus. All the used lasers were  
 167 from Picoquant (Berlin, Germany) providing ~80 ps pulses. When ap-  
 168 plied in the PIE mode, the repetition rate was 20 MHz for each of the  
 169 two =lasers with the delay between the donor and the acceptor excita-  
 170 tion pulse of approximately 25 ns.

171 The excitation pulses were reflected to the objective (60×,  
 172 NA = 1.2, Olympus, Hamburg, Germany) with Z442/532 RPC (CFP–  
 173 Venus) and Z473/532 RPC (GFP–tdimer2) dichroic mirrors (Chroma,  
 174 Rockingham, VT). In the detection path, the 50–µm pinhole was placed  
 175 to reduce non-focal fluorescence. Behind the pinhole, a fluorescence  
 176 signal was split with a 535 DCXC dichroic mirror, and the residual excita-  
 177 tion and scattered light were removed with emission filters: 465/40  
 178 (CFP), 505/30 (GFP), and 565/40 (Venus and tdimer2). Eventually, the  
 179 light was focused on two single photon avalanche diodes (SPADs,  
 180 PDMS, Microphoton Devices, Bolzano, Italy).

181 Pixel acquisition time was adjusted to acquire the entire image in a  
 182 reasonably short time (5 min or less) with sufficiently good photon statis-  
 183 tics. The laser power (at the back aperture of the objective) kept  
 184 below 4 µW was chosen to minimise photobleaching and saturation  
 185 [27]. In the case of the GFP–tdimer pair, the excitation intensity was  
 186 3–5 times lower compared to CFP–Venus constructs in order to avoid  
 187 pile-up effects.

### 188 2.5.2. Data acquisition and processing, lifetime analysis

189 Photon arrival times were stored using fast electronics (PicoHarp  
 190 300, PicoQuant, Berlin, Germany) in a time-tagged time resolved  
 191 (TTTR) recording mode. In this mode, arrival time with respect to the  
 192 previous laser pulse is assigned to every photon event. FLIM images  
 193 were reconstructed using a robust fitting-free fast-FLIM approach, in  
 194 which photons' average arrival time is displayed for every given pixel.  
 195 For regions of interest (plasma membrane, vacuoles), integral decay  
 196 histograms were calculated and subsequently they were tail-fitted.  
 197 Since the fluorescence decay of CFP is reported to be bi-exponential  
 198 [28], our data were fitted with a two-exponential model:  $I(t) =$   
 199  $A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$ , where  $\tau$  stands for fluorescence life-  
 200 time and  $A$  for amplitude of individual contribution. An average lifetime  
 201 was calculated using the following equation:  $\tau_{av} = (A_1 \cdot \tau_1^2 + A_2 \cdot \tau_2^2) /$   
 202  $(A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2)$  [29]. A satisfying fit was typically obtained for fluore-  
 203 scence decays counting more than a thousand registered photons in  
 204 the peak.

### 205 2.6. FRET analysis

#### 206 2.6.1. Half-cell photobleaching approach

207 First, we measured and imaged fluorescence lifetimes within  
 208 whole yeast cells so that we could analyse fluorescence lifetimes in  
 209 their plasma membranes. Then, we photobleached the acceptor in a  
 210 limited area of a living yeast cell with a strong incident light. Photo-  
 211 bleaching was performed by raising the power of the scanning laser  
 212 to its maximum (200 µW) and by prolonging the illumination time  
 213 per pixel (typically 4 × or 5 ×). This enabled us to photobleach both  
 214 acceptors, whether Venus or tdimer2 was used. Finally, we visualised  
 215 the possible presence of FRET directly by comparing donor lifetimes  
 216 detected in a photobleached and non-photobleached part of the cell.

#### 217 2.6.2. Lifetime dependence on acceptor/donor ratio

218 For interacting proteins, shortening of the donor lifetime depends  
 219 on the relative amount of acceptor available. The experimentally ob-  
 220 served lifetime consists of the non-interacting donor lifetime and the  
 221 donor lifetime shortened due to FRET. The higher the acceptor-to-  
 222 donor ratio ( $R$ ), the shorter the observed lifetime is. The dependence  
 223 of the observed overall lifetime on  $R$  can be fitted with an empirical  
 224 formula:  $\tau_D = \tau_{D0} - \Delta\tau \cdot R / (b + R)$ , where  $\tau_{D0}$  is the lifetime of a non-  
 225 interacting donor,  $\Delta\tau$  is the maximum shift in lifetimes due to FRET,  
 226 and  $b$  is the scaling factor. The lifetime dependence on  $R$  was generated  
 227 from a heterogeneous set of at least 20 fluorescent cells.  $R$  was calculat-  
 228 ed as the amplitude ratio of membrane-integrated decays for the donor  
 229 and the acceptor.

#### 230 2.6.3. Fluorescence recovery after photobleaching measurement

231 Samples for fluorescence recovery after photobleaching measure-  
 232 ment (FRAP) were prepared as described above. FRAP analysis was per-  
 233 formed using a Leica TCS SP2 AOBs inverted confocal microscope with a  
 234 63 × 1.2 numerical aperture water objective. The 488 argon laser line  
 235 was used to excite GFP and the fluorescence emission between  
 236 500 nm and 550 nm was recorded. Fluorescence intensities in the re-  
 237 spective ROIs (background, bleached part of a membrane and control  
 238 part of a membrane) were recorded in each time-point (two different  
 239 setups were used: either 3 pre-bleach and 20 post-bleach scans in the  
 240 interval of 0.5 s or 6 pre-bleach and 60 post-bleach scans in the interval  
 241 of 5 s were done). At least 8 cells of each strain were measured. The  
 242 mobile fraction  $F_m$  of Ato–GFP proteins was estimated using normalised  
 243 data (where pre-bleach intensity was assigned a value 1) and the equa-  
 244 tion  $F_m = (I_e - I_0) / (1 - I_0)$ , where  $I_e$  stands for the end value of the  
 245 recovered fluorescence intensity and  $I_0$  stands for the first post-bleach  
 246 fluorescence intensity.

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), Biochim. Biophys. Acta (2012), doi:10.1016/j.bbame.2012.05.005

247 **3. Results and discussion**248 **3.1. Fluorophore lifetime is influenced by fusion to particular Ato protein**

249 We used two different pairs of fluorescent donor and acceptor, CFP-  
250 Venus [27,30] and GFP–tdimer2 (tandem dimer mutant of dsRed) [31].  
251 We prepared two sets of *S. cerevisiae* strains containing *ATO* genes indi-  
252 vidualy fused with genes coding for the respective fluorescent proteins  
253 directly in the chromosome (Table 1). The resulting strains were pheno-  
254 typically comparable with the parental BY4742 strain, thus confirming  
255 that individual Ato proteins with any of the four C-terminal fluorophore  
256 tags are fully functional. For all measurements described below, we  
257 used cells from 12 to 13-day-old colonies occurring in alkali phase  
258 and producing high quantities of Ato proteins.

259 Using cells containing single Ato proteins labelled with the particu-  
260 lar donor fluorophore (CFP or GFP, respectively), we first determined  
261 the lifetime of the protein-fluorophore fraction localised to the plasma  
262 membrane, i.e. of the fluorophore fused with membrane-localised Ato  
263 protein. Fluorescence data were obtained from a large section of the  
264 plasma membrane (from at least half of the cell) and the average  
265 membrane donor lifetime was calculated. Analysis of smaller yeast  
266 membrane areas (e.g. raft patches) was beyond the resolution of the  
267 method used. The precise fluorescence lifetime value of either CFP or  
268 GFP was dependent on the particular labelled Ato-protein (Fig. 1). Com-  
269 pared to other GFP-labelled membrane proteins used in the study  
270 (Jen1p, Fet3p and Ftr1p) and to the GFP-labelled cytosolic Met17p,  
271 the lifetime of all GFP-labelled Ato-proteins was shorter (Fig. 1). There  
272 are several possible reasons for these differences in FP lifetimes. Trivi-  
273 ally, the FP could slightly change its conformation when attached to  
274 different proteins and/or in a different probe microenvironment.  
275 Another explanation might be pseudo-homo FRET (i.e. FRET between  
276 two different emissive forms of the same FPs), which was described  
277 for CFP fused with fluorescent proteins crowding inside the cytoplasm  
278 [32]. By analogy, the lifetime shortening observed in the yeast mem-  
279 brane can correspond to a local increase in the concentration of any of  
280 the Ato proteins. Such a shortening of lifetime attributed to energy  
281 migration has already been reported for CFP [33]. The fact that we  
282 found a stronger FP lifetime shortening in Ato1p and Ato3p constructs  
283 accumulating in the raft patches [4] than in Ato2p supports the hypoth-  
284 esis of lifetime shortening due to FP crowding.

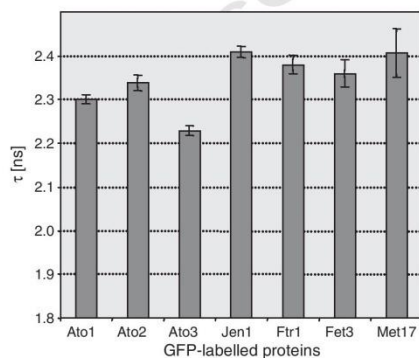


Fig. 1. Lifetimes of GFP fused with different proteins. Lifetimes were measured using BY4742 cells producing a particular protein fused with GFP. The values are the mean of at least 15 cells; bars, SD.

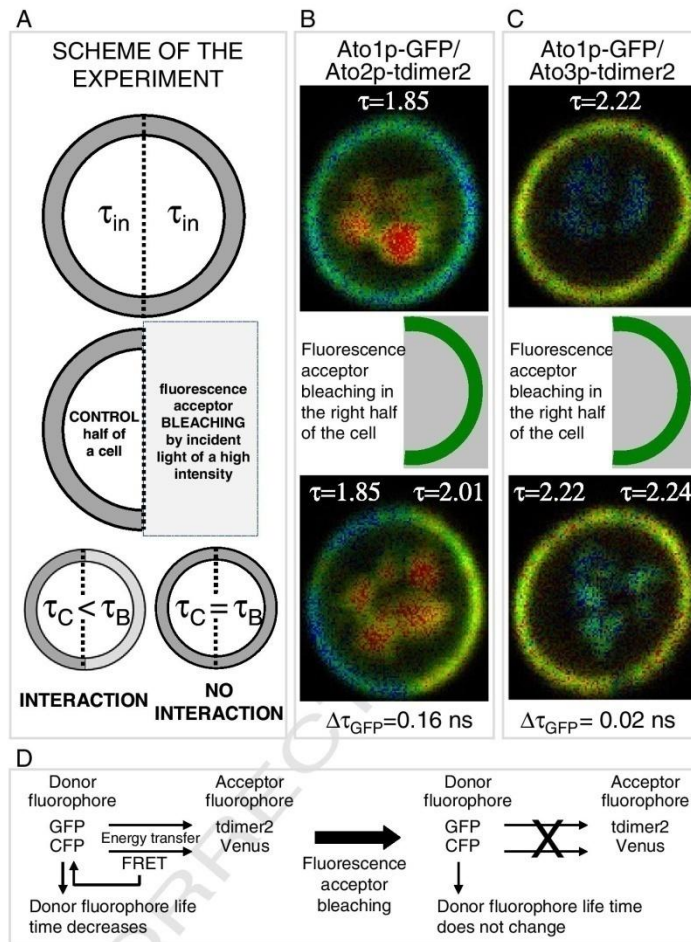
## 3.2. Ato1p and Ato2p interact in the plasma membrane of cells from alkali-phase colonies 285 286

287 After determining the fluorescent lifetimes of donors fused with  
288 each of the three individual Ato proteins, we analysed donor lifetimes  
289 in double-labelled cells containing any pair of Ato proteins (Table 1)  
290 labelled either with CFP–Venus or GFP–tdimer2 FRET pairs. To avoid  
291 possible artefacts caused by variations in the protein level in a distinct  
292 cell, we devised the following (Fig. 2, details in Section 2.4 and 2.5)  
293 approach: i) measurement of the fluorophore lifetime within the  
294 whole cell membrane to control the homogeneity of protein distribu-  
295 tion, ii) photo-bleaching of the acceptor molecules in half of a particu-  
296 lar cell (the time needed for acceptor photobleaching was 90–120 s  
297 depending on cell size) and iii) FLIM measurement in both halves of  
298 the cell. When interaction between donor- and acceptor-fused plasma  
299 membrane proteins occurs, the fluorescence lifetime of the donor  
300 becomes shorter in the non-photobleached compared to the photo-  
301 bleached half of the cell. On the other hand, the donor fluorescence life-  
302 time remains the same in both halves of the cell when proteins do not  
303 interact. By using this approach, FRET becomes visible directly in FLIM  
304 images of individual cells. As shown in Fig. 3, a significant decrease in  
305 donor lifetime was detected in the membrane-localised Ato1p  
306 and Ato2p labelled with either of the fluorophore pairs in both combi-  
307 nations (i.e. the donor fluorophore fused with either Ato1p or Ato2p).  
308 The average shift in donor lifetime was about 0.15 ns for CFP–Venus  
309 labelling (Fig. S2) and 0.25 ns for GFP–tdimer2 labelling of Ato1p–  
310 Ato2p proteins (Fig. 3A). In contrast, such a decrease in lifetimes was  
311 not observed for combinations of either Ato1p and Ato3p or Ato2p  
312 and Ato3p. Photobleaching control experiments using cells where  
313 only the donor fluorophore was present did not show any significant  
314 difference in donor lifetimes when comparing the photo-bleached and  
315 non-photobleached halves of one cell (Fig. S3). This confirmed that  
316 donor fluorescence is not artificially affected by the incident light used  
317 for the acceptor photobleaching.

318 As the time window in between the subsequent FLIM measure-  
319 ments was typically 90–120 s, lateral diffusion of bleached proteins dur-  
320 ing this period of time could influence the measurement. Specifically, it  
321 would lead to lowering of the difference between the bleached and  
322 unbleached half of the cell. However, proteins of the yeast plasma mem-  
323 brane were shown to exhibit very slow mobility when compared to that  
324 of mammalian cells [34,35]. Additionally, Pma1p–GFP, which is an inte-  
325 gral membrane protein with ten membrane spanning domains, showed  
326 significantly lower mobility when compared to lipid anchored protein  
327 Ras2p–GFP [36]. To check the extent of the lateral diffusion of Ato–GFP  
328 proteins, we performed a FRAP (fluorescence recovery after photo-  
329 bleaching) experiment taking 5 min. No significant recovery of fluores-  
330 cence signal was seen neither in 2 min after photobleaching (the  
331 maximum time window of the subsequent FLIM measurements) nor  
332 in 5 min at the end of the FRAP experiment (Fig. S4). Using normalised  
333 FRAP data, mobile fraction  $F_m$  of all Ato–GFP was estimated, giving the  
334 following values: for Ato1p–GFP  $7.3 \pm 2.7\%$ , for Ato2p–GFP  $8.9 \pm 2.9\%$   
335 and for Ato3p–GFP  $5.2 \pm 3.3\%$ .

336 As we have already shown, Ato proteins are targeted to the vacu-  
337 oles for degradation [4]. Compared to plasma membrane-localised  
338 fluorophores fused with Ato, when vacuolar lumen in the cells was se-  
339 lectively photobleached, donor lifetimes were shifted non-specifically  
340 by approximately 0.06 ns in each of the strains carrying any pair of fluo-  
341 rescent proteins (Fig. 3B). In addition, the donor lifetimes exhibited a  
342 wider range of fluctuations than the lifetimes of donors fused with  
343 Ato proteins present in the membrane. The reason is a rapid degrada-  
344 tion of Ato proteins in vacuoles, while relatively stable molecules of  
345 fluorescent protein in the vacuoles accumulate in high concentrations  
346 (Fig. 4) and can potentially interact randomly. These data proved that  
347 donor lifetime shifts detected in the membranes reflect specific interac-  
348 tion of particular Ato proteins. Such interaction disappears when an Ato  
349 protein part is removed from the fusion protein.





**Fig. 2.** Measurement of protein–protein interaction in individual living cells. (A) Scheme of the experimental design. Examples of results showing interacting (B) and non-interacting (C) proteins. (D) Principle of FRET using acceptor photobleaching technique.

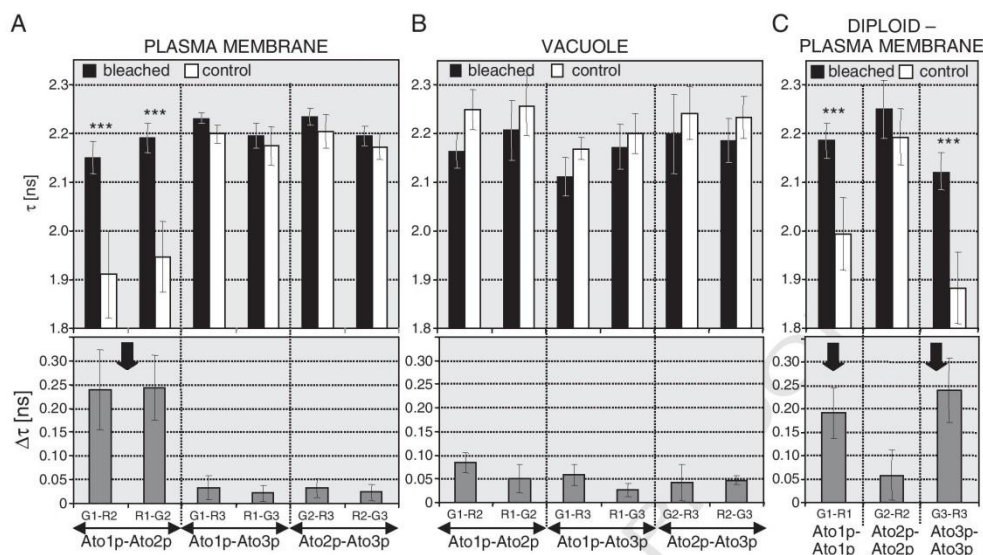
350 Each of the fluorophore pairs used has some advantages and disad-  
 351 vantages. The acceptor Venus is easier to photobleach, but exposure to  
 352 the scanning beam even during standard FLIM imaging can markedly  
 353 reduce the fluorescence of both Venus and donor CFP. This could  
 354 cause acceptor photobleaching even during the initial scan, which will  
 355 reduce FRET and diminish the contrast between photo-bleached and  
 356 non-photobleached cells. It was observed that the lifetime of CFP-like  
 357 fluorescent proteins can be shortened due to light exposure [37,38].  
 358 For these reasons, the low intensity of an excitation laser beam should  
 359 be used and repetitive scanning of the same cell should be avoided.  
 360 In combination with the low quantum yield of the CFP and Venus  
 361 fluorophores, the fluorescence data thus have to be collected from  
 362 larger areas of the sample (e.g. larger areas of the plasma membrane).  
 363 Half-cell photobleaching turned out to be the optimal approach, as it  
 364 guarantees the registration of CFP lifetimes from areas of comparable  
 365 size and fluorophore intensity. The quantum yield of GFP and tdimer2  
 366 is generally much higher and less affected by the excitation light. This  
 367 even allows lifetimes to be compared on a whole cell before and after

photobleaching, without risking artificial lifetime shortening due to 368  
 exposure of the fluorophore to incident light during the initial scanning, 369  
 as mentioned above. Sufficient photobleaching of the tdimer2 acceptor, 370  
 however, requires higher intensities of incident light. Overall, the GFP– 371  
 tdimer2 better than the CFP–Venus pair distinguishes differences in life- 372  
 times between interacting and non-interacting fusion proteins. Donor 373  
 lifetimes measured for the GFP–tdimer2 pair are also less variable 374  
 than those measured for the CFP–Venus pair because of higher fluores- 375  
 cence signals, enabling a higher accuracy of lifetime calculation. 376

### 3.3. Analysis of variation in lifetimes over the cell population confirmed 377 Ato1p–Ato2p interaction 378

A yeast colony is composed of differentiated cell subpopulations 379  
 with their own specific gene expression and properties [24,39]. Cells 380  
 harvested from the colony are therefore heterogeneous and the amount 381  
 of individual Ato proteins in the plasma membrane of individual 382  
 cells varies. We therefore applied a second donor FLIM measurement 383

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), Biochim. Biophys. Acta (2012), doi:10.1016/j.bbame.2012.05.005

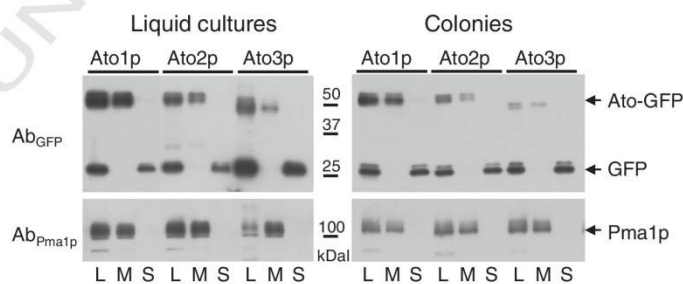


**Fig. 3.** Interactions of Ato proteins. Donor lifetime measured on FP-labelled proteins in the plasma membrane of double-labelled haploid cells (A), in the vacuole of double-labelled haploid cells (B) and in the plasma membrane of diploid cells with a double-labelled particular Ato protein (C). Arrows indicate the interacting protein pairs. Donor lifetime values before (control) and after (bleached) photobleaching (upper panels), and differences between these two values (lower panels) are shown. G1, G2 and G3-GFP fused with Ato1p, Ato2p and Ato3p, respectively; R1, R2 and R3-timer2 fused with Ato1p, Ato2p and Ato3p, respectively. Values from a representative experiment of the three are calculated using at least 5 cells  $\pm$  SD. Data significance was determined using the one-tailed paired *t* test. *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant: \*\*\**p* < 0.005.

384 approach, taking into account the varying levels of proteins produced in  
 385 a heterogeneous yeast population. This approach is based on the as-  
 386 sumption that changes in the concentration ratio between acceptor-  
 387 and donor-fused interacting proteins in the membrane of individual  
 388 cells will be reflected in the extent of overall donor lifetime shift. With  
 389 a low concentration of the acceptor relative to the concentration of  
 390 donor, there is a relatively low number of donor/acceptor pairs in con-  
 391 tact and the fluorescence of free donor prevails in the overall fluores-  
 392 cence signal. However when the acceptor is in excess, the portion of  
 393 donors in contact is much higher, the fluorescence of quenched donors  
 394 prevails and the mean fluorescence lifetime detected from the  
 395 membrane is markedly shortened. Thus, when proteins interact, a  
 396 donor fluorescence lifetime markedly decreases with increased accep-  
 397 tor/donor fluorescence intensity ratio. On the other hand, in the absence  
 398 of protein–protein interaction, a donor fluorescence lifetime is either  
 399 independent of acceptor/donor fluorescence intensity ratio or partially

400 shortened due to an excitation transfer occurring at high concentrations  
 401 of the fused proteins in the membrane (see Section 3.1). However, these  
 402 situations are clearly distinguishable (see the dependencies measured  
 403 for interacting and non-interacting proteins in Fig. 6B). Dependence of  
 404 FRET efficiency on acceptor intensity behaving accordingly to saturable  
 405 kinetics was previously shown in [40] where CFP and YFP were attached  
 406 to modified lipids to visualise lipid dynamics in plasma membrane of  
 407 live Madin–Darby canine kidney cells.

408 We randomly selected a set of 20–30 yeast cells from the respec-  
 409 tive population and, in parallel, recorded an overall donor and accep-  
 410 tor fluorescence intensity from the membrane of each cell. We  
 411 calculated an acceptor/donor intensity ratio, analysed an appropriate  
 412 donor fluorescence lifetime and fit the dependence of donor lifetimes  
 413 on the acceptor/donor ratio (*R*) (see Section 2.5.2). Fig. 5 shows the  
 414 dependence of lifetimes on the intensity ratios for all combinations  
 415 of Ato-GFP/Ato-timer2 fusion proteins. The plots exhibit saturation



**Fig. 4.** Ato-GFP fusion proteins and free GFP in plasma membrane and soluble cell fraction. Cell lysates (L), membrane (M) and soluble (S) fractions isolated from cells producing Ato1p-GFP, Ato2p-GFP and Ato3p-GFP, respectively, grown in colonies or liquid cultures. GFP in Ato-GFP fusions or free GFP was detected by anti-GFP antibody ( $Ab_{GFP}$ ). Pma1p detected by anti-Pma1p antibody ( $Ab_{Pma1p}$ ) was used as a marker of plasma membrane.

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), *Biochim. Biophys. Acta* (2012), doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005



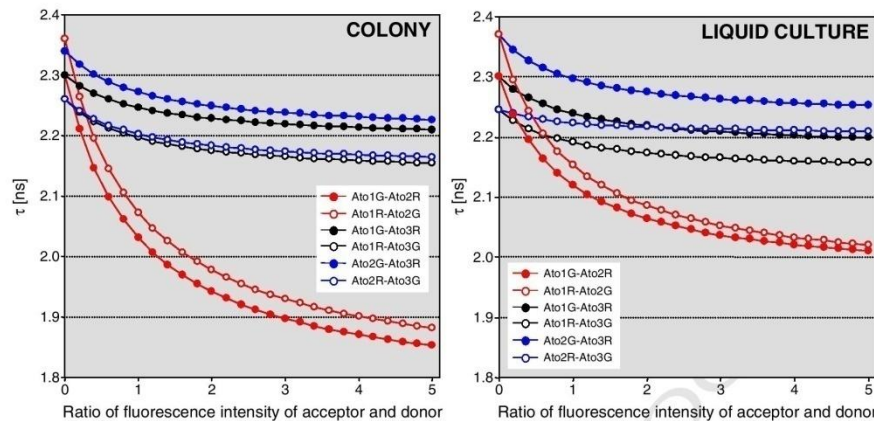


Fig. 5. Determination of protein interactions by measurement of donor lifetime in terms of their dependence on acceptor/donor ratios. Cells were harvested from 12-day-old colonies (left), or from liquid glycerol complete medium (right). G, GFP; R, tdimer2. Real data are shown in Fig. S5 (colonies) and Fig. S6 (liquid cultures).

behaviour, which is in a good agreement with the expectation that the donor molecules should be gradually fully occupied by the interacting acceptor molecules with their increasing concentration. The mean donor lifetime cannot be shorter than the lifetime of an individual donor molecule interacting with the acceptor molecule. The acceptor/donor ratios were in a comparable range for all of our double-fluorophore constructs (Fig. S5). This excludes the possibility that for certain combinations we could only observe FRET stemming from a high concentration of acceptor molecules in the vicinity of donor molecules. In the photo-bleaching-based method, this situation is not taken into account.

The approach presented here is convenient for the detection of new protein–protein interactions in living yeast cells by means of fluorescence lifetime imaging. It avoids the negative impact of natural variation in cell populations (that is often present in biological samples) on the result of FRET measurement when only a randomly chosen individual cell is analysed. In contrast, it takes advantage of this variability and avoids the necessity of acceptor photobleaching. As for Ato proteins, this approach fully confirmed the specific Ato1p–Ato2p interaction observed by the photobleaching method (see Section 3.2).

### 3.4. Ato1p and Ato3p form homodimers in the membrane

Differences in the lifetime of a donor fluorophore fused with individual Ato proteins (see above) together with the formation of Ato raft patches observed previously [4] raised the question of whether molecules of a particular Ato protein are able to mutually interact. To analyse this possibility, we developed an approach based on the donor FLIM measurement of diploid yeast strains containing the two copies of the same *ATO* gene labelled differently (with a donor and acceptor fluorophore pair) in the two paired chromosomes. To achieve this, we prepared three diploid strains (Ato1p-GFP/Ato1p-tdimer2, Ato2p-GFP/Ato2p-tdimer2, Ato3p-GFP/Ato3p-tdimer2) and measured individual Ato protein interactions using the half-cell photobleaching method (see Section 3.2). As shown in Fig. 3C, a significant decrease in donor lifetime was detected with Ato1p and Ato3p diploids, while the difference between the photobleached and non-photobleached half of the cell was not significant in Ato2p diploids. Ato1p and Ato3p are thus able to form homodimers or homooligomers in the yeast plasma membrane.

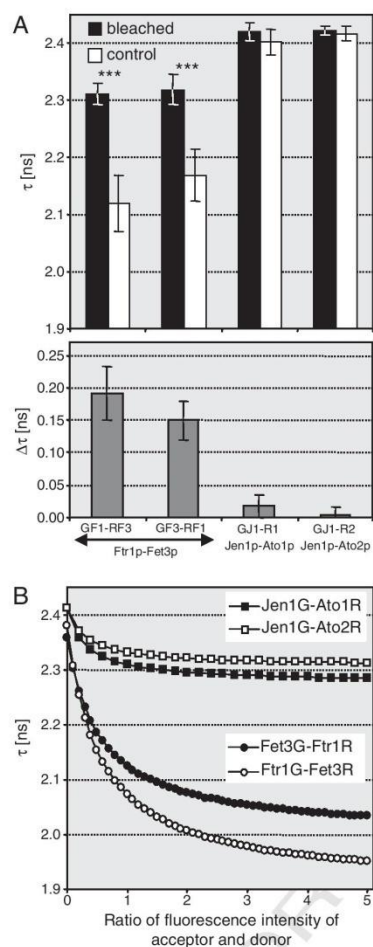
### 3.5. The reliability of approaches was tested using proteins exhibiting a known interaction

To confirm the functionality of these established FLIM approaches, proteins with a known interaction were examined. We chose multi-copper oxidase Fet3p and iron permease Ftr1p [41] which physically interact and which were shown to exhibit positive FRET [42]. Both these proteins are involved in high-affinity  $Fe^{II}$  uptake and are thought to form heterodimeric or higher-order oligomeric complexes in the yeast plasma membrane [43]. We analysed cells producing Fet3p and Ftr1p proteins labelled with GFP and tdimer2 fluorophores by both approaches. We measured GFP donor lifetimes in the membranes of a representative set of cells to gauge their dependence on the acceptor/donor fluorophore ratio (Fig. 6B) and we examined the changes in donor fluorophore lifetime after photobleaching (Fig. 6A). Both results clearly confirmed a Fet3p–Ftr1p interaction (Fig. 6).

As a negative control, we used the Jen1p protein, involved in lactate uptake [44]. This protein is produced in the cells of GM-grown liquid cultures together with Ato proteins, but there is no structural or functional reason to presume a physical interaction between Jen1p-GFP and Ato1p-tdimer2, as well as between Jen1p-GFP and Ato2p-tdimer2 was confirmed by lifetime measurement of the donor fluorophore (Fig. 6). In parallel, we monitored donor lifetime changes in cells containing labelled Ato1p and Ato2p proteins, which revealed an Ato1p–Ato2p interaction, even in cells growing in liquid GM (Fig. 5).

## 4. Conclusions

Here we present two approaches for monitoring protein–protein interaction in yeast cells and, particularly, in distinct cellular compartments. The measurement of donor lifetime without and after photobleaching enables protein–protein interaction monitoring in one cell, thus eliminating possible artefacts caused by unequal production of the proteins in different cells. This is particularly useful when a differentiated cell population is analysed and a particular protein–protein interaction needs to be correlated with a particular cell function. In addition, by using this approach, differences in protein–protein interaction in different cellular compartments can be characterised. Correlating fluorophore ratios with donor fluorophore lifetimes in individual



**Fig. 6.** Measurement of protein–protein interaction using interacting and non-interacting control proteins. (A) Donor lifetime values before and after photobleaching (upper panels), and the difference between these two values (lower panels) are shown. (B) Dependence of donor lifetimes on acceptor/donor ratios. GF1, GF3 and GJ1, Rr1p, Fet3p and Jen1p fused with GFP, respectively; RF1, RF3, R1 and R2, Ftr1p, Fet3p, Ato1p and Ato2p fused with tdimer2, respectively. Values from a representative experiment of the three are calculated from at least 5 cells  $\pm$  SD. Data significance was determined using the one-tailed paired *t* test. *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant: \*\*\**p* < 0.005.

492 cells proved to be useful for monitoring the overall interaction over the  
493 whole cell population, composed of cells with various ratios of the pro-  
494 duction of both proteins. Both acceptor photobleaching-based approach  
495 and acceptor/donor intensity ratio approach led to the same results.

496 Using these approaches, we show that the proteins Ato1p and Ato2p  
497 can physically interact when present in the membrane of yeast cells,  
498 probably forming complexes. In addition, we show that Ato1p and  
499 Ato3p with non-uniform distribution in the membrane [4] can form  
500 homodimers and/or oligomers. Neither an interaction between Ato1p  
501 and Ato3p, nor between Ato2p and Ato3p, nor homodimerization of  
502 Ato2p that exhibits dispersed plasma membrane localisation was  
503 observed using our approach. Molecular interaction between these

504 proteins, however, cannot be entirely excluded. These results fully  
505 support our hypothesis that Ato proteins form complex(es) and are in  
506 accordance with our previous findings that each of the three Ato pro-  
507 teins is necessary for sufficient ammonia production and healthy develop-  
508 ment of yeast colonies [3]. One can speculate that homo-Ato1p- or  
509 Ato3p-complexes are formed within the membrane raft microdomain  
510 patches. Of those proteins, only Ato1p that is (in contrast to Ato3p)  
511 able to change membrane distribution according to the extracellular  
512 pH [4] can interact with Ato2p monomers that are dispersed in the  
513 membrane.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to M. Hof for valuable comments on the  
515 manuscript. This study was supported by grants from the Grant Agency  
516 of the Czech Republic (204/08/0718) and from the Ministry of Educa-  
517 tion (LC06063, LC531 and MSM0021620858, GAUK 261214, UNCE  
518 204013, RVO 61388971) and by the Howard Hughes Medical Institute  
519 International Research Award (#55005623 to Z.P.).  
520

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.005>.  
522  
523

#### References

- 524 [1] Z. Palkova, B. Janderova, J. Gabriel, B. Zikanova, M. Pospisek, J. Forstova, Ammonia  
525 mediates communication between yeast colonies, *Nature* 390 (1997) 532–536.  
526
- [2] Z. Palkova, J. Forstova, Yeast colonies synchronise their growth and development,  
527 *J. Cell Sci.* 113 (2000) 1923–1928.  
528
- [3] Z. Palkova, F. Devaux, M. Ricicova, L. Minarikova, S. Le Crom, C. Jacq, Ammonia pulses  
529 and metabolic oscillations guide yeast colony development, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002)  
530 3901–3914.  
531
- [4] M. Ricicova, H. Kucerova, L. Vachova, Z. Palkova, Association of putative ammonium  
532 exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during  
533 yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches, *Biochim.*  
534 *Biophys. Acta* 1768 (2007) 1170–1178.  
535
- [5] L. Vachova, F. Devaux, H. Kucerova, M. Ricicova, C. Jacq, Z. Palkova, Sok2p tran-  
536 scription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival  
537 of *Saccharomyces cerevisiae* colonies, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 37973–37981.  
538
- [6] N. Guaragnella, R.A. Butow, ATO3 encoding a putative outward ammonium trans-  
539 porter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and  
540 the Ssy1–Ptr3–Ssy5 amino acid sensor system, *J. Biol. Chem.* 278 (2003)  
541 45882–45887.  
542
- [7] M. Gentsch, M. Kuschel, S. Schlegel, G. Barth, Mutations at different sites in members  
543 of the Gpr1/Fun34/YaaH protein family cause hypersensitivity to acetic acid in  
544 *Saccharomyces cerevisiae* as well as in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* 7 (2007)  
545 380–390.  
546
- [8] S. Paiva, F. Devaux, S. Barbosa, C. Jacq, M. Casal, Ady2p is essential for the acetate per-  
547 mease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 21 (2004) 201–210.  
548
- [9] S. Shibasaki, K. Kuroda, H. Duc Nguyen, T. Mori, W. Zou, M. Ueda, Detection of  
549 protein–protein interactions by a combination of a novel cytoplasmic membrane  
550 targeting system of recombinant proteins and fluorescence resonance energy  
551 transfer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 451–457.  
552
- [10] B. Camuzeaux, C. Spriet, L. Heliot, J. Coll, M. Duterque-Coquillaud, Imaging Erg and  
553 Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance en-  
554 ergy transfer analyses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005) 1107–1114.  
555
- [11] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, FRET imaging, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1387–1395.  
556
- [12] T.S. Karpova, C.T. Baumann, L. He, X. Wu, A. Grammer, P. Lipsky, G.L. Hager, J.G.  
557 McNally, Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent  
558 protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a  
559 single laser, *J. Microsc.* 209 (2003) 56–70.  
560
- [13] L. Albertazzi, D. Arosio, L. Marchetti, F. Ricci, F. Beltram, Quantitative FRET analysis  
561 with the EGFP–mCherry fluorescent protein pair, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009)  
562 287–297.  
563
- [14] D. Lleres, S. Swift, A.I. Lamond, Detecting protein–protein interactions in vivo  
564 with FRET using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM),  
565 *Curr. Protoc. Cytom.* (2007) (Chapter 12, Unit 12.10).  
566
- [15] H. Wallrabe, A. Periasamy, Imaging protein molecules using FRET and FLIM micro-  
567 scopy, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 19–27.  
568
- [16] F. Festy, S.M. Ameer-Beg, T. Ng, K. Suhling, Imaging proteins in vivo using fluores-  
569 cence lifetime microscopy, *Mol. Biosyst.* 3 (2007) 381–391.  
570
- [17] J.A. Levitt, D.R. Matthews, S.M. Ameer-Beg, K. Suhling, Fluorescence lifetime and  
571 polarization-resolved imaging in cell biology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (2009)  
572 28–36.  
573

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), *Biochim. Biophys. Acta* (2012), doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005



- 574 [18] R.R. Duncan, A. Bergmann, M.A. Cousin, D.K. Apps, M.J. Shipston, Multi-dimensional  
575 time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging  
576 microscopy (FLIM) to detect FRET in cells, *J. Microsc.* 215 (2004) 1–12.
- 577 [19] W. Becker, A. Bergmann, M.A. Hink, K. König, K. Benndorf, C. Biskup, Fluorescence  
578 lifetime imaging by time-correlated single-photon counting, *Microsc. Res. Tech.*  
579 63 (2004) 58–66.
- 580 [20] W. Becker, A. Bergmann, C. Biskup, Multispectral fluorescence lifetime imaging by  
581 TCSPC, *Microsc. Res. Tech.* 70 (2007) 403–409.
- 582 [21] M.A. Rizzo, G.H. Springer, B. Granada, D.W. Piston, An improved cyan fluorescent  
583 protein variant useful for FRET, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 445–449.
- 584 [22] G. Schreiber, M. Barberis, S. Scolari, C. Klaus, A. Herrmann, E. Klipp, Unraveling  
585 interactions of cell cycle-regulating proteins Sic1 and B-type cyclins in living  
Q3 586 yeast cells: a FLIM-FRET approach, *FASEB J.* 26 546–554.
- 587 [23] R.D. Gietz, R.H. Schiestl, A.R. Willems, R.A. Woods, Studies on the transformation  
588 of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure, *Yeast* 11 (1995) 355–360.
- 589 [24] L. Vachova, H. Kucerova, F. Devaux, M. Ulehlova, Z. Palkova, Metabolic diversification  
590 of cells during the development of yeast colonies, *Environ. Microbiol.* 11 (2009)  
591 494–504.
- 592 [25] M. Wahl, F. Koberling, M. Patting, H. Rahn, R. Erdmann, Time-resolved confocal  
593 fluorescence imaging and spectroscopy system with single molecule sensitivity  
594 and sub-micrometer resolution, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5 (2004) 299–308.
- 595 [26] B.K. Müller, E. Zaychikov, C. Brauchle, D.C. Lamb, Pulsed interleaved excitation,  
596 *Biophys. J.* 89 (2005) 3508–3522.
- 597 [27] M. Millington, G.J. Grindlay, K. Altenbach, R.K. Neely, W. Kolch, M. Bencina, N.D.  
598 Read, A.C. Jones, D.T. Dryden, S.W. Magennis, High-precision FLIM-FRET in fixed  
599 and living cells reveals heterogeneity in a simple CFP-YFP fusion protein, *Biophys.*  
600 *Chem.* 127 (2007) 155–164.
- 601 [28] A. Villoing, M. Ridhoir, B. Cinquin, M. Erard, L. Alvarez, G. Vallverdu, P. Pernot, R.  
602 Grailhe, F. Merola, H. Pasquier, Complex fluorescence of the cyan fluorescent  
603 protein: comparisons with the H148D variant and consequences for quantitative  
604 cell imaging, *Biochemistry* 47 (2008) 12483–12492.
- 605 [29] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York,  
606 2006.
- 607 [30] M.A. Rizzo, G. Springer, K. Segawa, W.R. Zipfel, D.W. Piston, Optimization of  
608 pairings and detection conditions for measurement of FRET between cyan and  
609 yellow fluorescent proteins, *Microsc. Microanal.* 12 (2006) 238–254.
- 610 [31] X. Yang, P. Xu, T. Xu, A new pair for inter- and intra-molecular FRET measure-  
611 ment, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 914–920.
- 612 [32] R. Grailhe, F. Merola, J. Ridard, S. Couvignou, C. Le Poupon, J.P. Changeux, H.  
613 Laguitton-Pasquier, Monitoring protein interactions in the living cell through the  
fluorescence decays of the cyan fluorescent protein, *Chemphyschem* 7 (2006) 614  
1442–1454.
- 615 [33] S.V. Koushik, S.S. Vogel, Energy migration alters the fluorescence lifetime of Ceru-  
616 lean: implications for fluorescence lifetime imaging Forster resonance energy  
617 transfer measurements, *J. Biomed. Opt.* 13 (2008) 031204.
- 618 [34] J. Valdez-Taubas, H.R. Pelham, Slow diffusion of proteins in the yeast plasma  
619 membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling, *Curr. Biol.* 13  
620 (2003) 1636–1640.
- 621 [35] S. Ganguly, P. Singh, R. Manoharlal, R. Prasad, A. Chattopadhyay, Differential dy-  
622 namics of membrane proteins in yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387  
623 (2009) 661–665.
- 624 [36] K.C. Vinnakota, D.A. Mitchell, R.J. Deschenes, T. Wakatsuki, D.A. Beard, Analysis of  
625 the diffusion of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae* using fluorescence recovery after  
626 photobleaching, *Phys. Biol.* 7 026011.
- 627 Q4 [37] B. Hoffmann, T. Zimmer, N. Klocker, L. Kelbauskas, K. König, K. Benndorf, C.  
628 Biskup, Prolonged irradiation of enhanced cyan fluorescent protein or Cerulean  
629 can invalidate Forster resonance energy transfer measurements, *J. Biomed. Opt.*  
630 13 (2008) 031205.
- 631 [38] M. Tramier, M. Zahid, J.C. Mevel, M.J. Masse, M. Coppey-Moisan, Sensitivity of  
632 CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination  
633 by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells, *Microsc. Res. Tech.* 69  
634 (2006) 933–939.
- 635 [39] L. Vachova, O. Chernyavskiy, D. Strachotova, P. Bianchini, Z. Burdikova, I. Fercikova, L.  
636 Kubinova, Z. Palkova, Architecture of developing multicellular yeast colony:  
637 spatio-temporal expression of At01p ammonium exporter, *Environ. Microbiol.*  
638 (2009).
- 639 Q5 [40] D.A. Zacharias, J.D. Violin, A.C. Newton, R.Y. Tsien, Partitioning of lipid-modified  
640 monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science* 296 (2002)  
641 913–916.
- 642 [41] R. Stearman, D.S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R.D. Klausner, A. Dancis, A permease-  
643 oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast, *Science* 271  
644 (1996) 1552–1557.
- 645 [42] A. Singh, S. Severance, N. Kaur, W. Wiltsie, D.J. Kosman, Assembly, activation, and  
646 trafficking of the Fet3p-Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces*  
647 *cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13355–13364.
- 648 [43] E.Y. Kwok, S. Severance, D.J. Kosman, Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p  
649 high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane, *Biochemistry* 45  
650 (2006) 6317–6327.
- 651 [44] M. Casal, S. Paiva, R.P. Andrade, C. Gancedo, C. Leao, The lactate-proton symport of  
652 *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2620–2623.  
653  
654

Please cite this article as: D. Strachotová, et al., Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM), *Biochim. Biophys. Acta* (2012), doi:10.1016/j.bbame.2012.05.005

## 5.16 Publikace III (rukopis)

### Transport karboxylových kyselin a důležitá role Jen1p transportéru během vývoje kvasinkových kolonií

Sandra Paiva<sup>1</sup>, Dita Strachotová<sup>1</sup>, Helena Kučerová, Margarida Casal, Zdena Palková and Libuše Váchová

<sup>1</sup> Autorky přispěly ke vzniku práce rovným dílem

#### The transport of carboxylic acids and important role of Jen1p transporter during the development of yeast colonies

Produkce amoniaku a správný průběh tzv. alkalické fáze jsou důležité faktory ovlivňující dlouhodobé přežívání buněk tvořících vyvíjející se kvasinkovou kolonii. Již dříve bylo popsáno, že u kmene *S. cerevisiae* BY4742 s delecí genu *SOK2* pro transkripční faktor Sok2p neprobíhá vstup do adaptivní alkalické fáze optimálně. (VACHOVA, *et al.*, 2004) Produkce amoniaku i alkalizace okolního média je u *sok2* kmene snížena. Následkem je zhoršené přežívání buněk v koloniích tohoto kmene. Porovnání genové exprese kolonií *sok2* a rodičovského kmene ukázalo, že *sok2* kolonie dostatečně neaktivují geny nutné pro produkci amoniaku a pro adaptivní metabolismus, naopak v porovnání s kmenem rodičovským silně exprimují geny související se stresem (VACHOVA, *et al.*, 2004). Sok2p transkripční faktor hraje tedy důležitou roli ve vývoji kvasinkových kolonií.

Byla vyslovena hypotéza, že některé karboxylové kyseliny vznikající jako možné produkty metabolismu v raných fázích vývoje kvasinkových kolonií by mohly hrát roli živin v pozdějších fázích vývoje kvasinkových kolonií (PALKOVA, *et al.*, 2002).

Získaná data ukazují, že na vstupu karboxylových kyselin do buněk kvasinkových kolonií se podílejí dva mechanismy – aktivní transport a difuze. Oba tyto mechanismy vstupu jsou navíc negativně ovlivněny delecí *SOK2* genu kódujícího pleiotropní transkripční faktor Sok2p. Za transportní složku příjmu laktátu do buněk je zodpovědný Jen1p protein, jehož produkce je u *sok2* kmene snížena. Rozdíly v difuzní složce transportní kinetiky by mohly být dány změnami membrány u kmenů s delecí *SOK2* genu, popřípadě nepřítomností dalšího dosud neidentifikovaného proteinem kódovaného transportního systému, který by mohl být regulován Sok2p transkripčním faktorem.



Následující rukopis byl zaslán do impaktovaného časopisu *Biochemical Journal*, v současné době je připravována jeho revidovaná verze.

## The transport of carboxylic acids and important role of Jen1p transporter during the development of yeast colonies

Sandra Paiva<sup>\*1</sup>, Dita Strachotová<sup>†‡1</sup>, Helena Kučerová<sup>†‡</sup>, Margarida Casal<sup>\*2</sup>, Zdena Palková<sup>‡2</sup> and Libuše Váchová<sup>†‡2</sup>

\* Molecular and Environmental Biology Centre (CBMA), Department of Biology, Campus de Gualtar, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal.

† Institute of Microbiology of the AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

‡ Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

Short title: Transport of lactate in yeast colonies

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work

<sup>2</sup> Correspondence may be addressed to either of these authors (email: [vachova@biomed.cas.cz](mailto:vachova@biomed.cas.cz), [zdenap@natur.cuni.cz](mailto:zdenap@natur.cuni.cz) or [mcasal@bio.uminho.pt](mailto:mcasal@bio.uminho.pt))

Key words: yeast colony development, monocarboxylic acid import, Jen1p protein, ammonia production, *Saccharomyces cerevisiae*

Abbreviation used: GFP, green fluorescent protein; BKP, bromcresol purple; d.w., dry weight

## SYNOPSIS

When growing within colonies, yeast cells start to produce ammonia, functioning as a quorum sensing molecule inducing the reprogramming of cell metabolism in the alkali phase of colony development. Such reprogramming includes among others the activation of several plasma membrane transporters and is connected with centre-outer colony differentiation. In this study, we show that colony cells can use two transport mechanisms to import lactic acid: second order kinetics mechanism, which requires the presence of functional Jen1p transporter and first order kinetics mechanism (diffusion) that is independent of Jen1p. During colony development, the efficiency of both mechanisms changes similarly in central and outer colonial cells. While the lactate uptake capacity of central cells gradually decreases during colony development, the lactate uptake capacity of outer cells peaks during the alkali phase and is also kept relatively high in the 2<sup>nd</sup> acidic phase. This lactate uptake profile correlates with the localisation of the Jen1p transporter to the plasma membrane of colony cells. Both lactic acid uptake mechanisms are diminished in *sok2* colonies where *JEN1* expression is decreased. The Sok2p transcription factor may therefore be involved in the regulation of the first order kinetics mechanism of lactic acid uptake in yeast colonies.

## INTRODUCTION

Yeast colonies growing on solid medium periodically acidify and alkalinize their surroundings. The alkali developmental phase is accompanied by the production of volatile ammonia, which induces adaptive metabolic changes and is important for long-term colony survival [1]. This metabolic adaptation includes the repression of genes involved in mitochondrial oxidative phosphorylation and stress-response as well as the activation of genes for amino acid metabolism, peroxisome biogenesis and fatty acid  $\beta$ -oxidation and the glyoxylate cycle. In addition to metabolic changes, colonies increase their expression of several genes coding for plasma membrane transporters during the acid-to-alkali transition. These include the *ATO1*, *ATO2* and *ATO3* genes for putative ammonium exporters and the *JEN1* gene, encoding a monocarboxylate/proton symporter [1]. Jen1p substrates include lactate, pyruvate, acetate and propionate [2], as well as selenite [3]. This transporter is subjected to glucose repression, being expressed in cells grown on non-fermentable carbon sources [4][5]. It has been proposed that carboxylic acids (the possible products of early phase colony metabolism) may function as a carbon source for starving colonies in the latter phases of their development. Thus the uptake of monocarboxylates coupled with protons could lead to the initial increase in extracellular pH, which is an important precondition for the release of volatile ammonia during the alkali phase [1]. *Saccharomyces cerevisiae* colony development depends on the proper function of the transcriptional regulator Sok2p. BY-*sok2* colonies lacking this regulator are not able either to release a sufficient amount of ammonia or to activate adaptive metabolism and exhibit survival defect [6]. Among others, expression of the *JEN1* gene is diminished in *sok2* colonies compared to the parental strain.

Ammonia-guided metabolic changes do not occur throughout the whole colony. They preferentially localize to distinct colony regions, mainly to the outer rim of the colony, composed of younger cells producing new healthy progeny. In addition to the increase in the amount of adaptive metabolic enzymes (e.g. Cit3p, Icl2p and Cta1p), the changes in the outer cells include an increase in the protein level of all three ammonium exporters (Ato1p, Ato2p and Ato3p) and concomitant drop in the level of Pma1p [7]. In contrast, the metabolism remains relatively unchanged in the colony centre [7][8], where the level of reactive oxygen species (an indicator of oxidative stress) increases and some cells undergo programmed cell death [9]. The described centre-outer diversification is absent in *sok2* colonies, in which cell dying occurs throughout the whole colony.

The aim of this work was to elucidate the possible role of the Jen1p monocarboxylate transporter in the long-term development and differentiation of the *S. cerevisiae* colony. Analysis of the Jen1p protein level and its activity, as well as the behaviour of the BY-*jen1* knockout strain revealed the important role of this transporter in the alkali phase of colony development. In addition, lactic acid uptake analysis revealed the presence of the two transport mechanisms: one with second order kinetics (always associated with Jen1p activity) and the other with first order kinetics (diffusion). The data found for the diffusion rates in the colonies of knockout strains are consistent with the existence of a currently unidentified lactic acid facilitator in yeast cells.

## EXPERIMENTAL

### Strains, plasmids and growth conditions

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Colonies were grown on GMA-BKP (3% glycerol, 1% yeast extract, and 2% agar with 0.01% BKP (supplemented as 1 % solution in ethanol)) at 28°C. In each experiment, parallel plates were inoculated with six giant colonies per plate (Figure 1C). Liquid cultures were grown in YPD media (1% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose) overnight. Cells were harvested in the exponential phase ( $OD_{640nm} = 0.5$ ), washed twice and transferred to synthetic minimal (SML) medium (0.67% YNB, Difco, with auxotrophic requirements) supplemented with lactic acid (0.5 %), pH 5.0, for 4 hrs for the induction of *JEN1* gene expression.

### Transport assays

Labelled lactic acid uptake was determined as described previously (Casal, 1999 #31). Cells from central and outer colony regions were collected and after ice-cold water washing, diluted to a final concentration of about 25-40 mg dry weight  $ml^{-1}$ . 10  $\mu l$  of the cell suspension was added to 30  $\mu l$  of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 5.0, and incubated for 2 min at 25 °C. The reaction was started by adding 10  $\mu l$  of [ $U$ - $^{14}C$ ]lactic acid (sodium salt; Amersham) (4000 dpm/nmol), pH 5.0, and stopped after 5 s by diluting with 5

ml of ice-cold water. Cells were collected and washed immediately through GF/C filters (Whatman, Inc., Clifton, N.J.) and radioactivity was measured in scintillation fluid (Opti-Phase HiSafe II; LKB FSA Laboratory Supplies, Loughborough, U.K.) in a Packard Tri-Carb 2200 CA liquid scintillation spectrophotometer with disintegrations per minute correction. To determine the non-specific  $^{14}\text{C}$  adsorption, the labelled lactic acid was added at time zero after the addition of cold water. To determine the best fitting transport kinetics to the experimental values of initial lactate uptake rates and estimate the kinetic parameters, a computer-assisted non-linear regression analysis was used (GraphPAD software, San Diego CA, USA). By iterative calculations we determined the best fitting curve, either to a second-order kinetics (fitting to a saturable mechanism described by the equation  $Y=(V_{max} * x)/(K_m+x)$ ), first-order kinetics (fitting to a diffusion mechanism, equation  $Y=K_d * x$ ) or kinetics with both components present (saturable plus diffusion mechanism, equation  $Y=((V_{max} * x)/(K_m+x))+K_d * x$ ), in which  $x$  represents lactic acid concentration,  $K_m$ , Michaelis-Menten constant,  $V_{max}$ , maximum velocity and  $K_d$ , diffusion constant. All experiments were repeated at least three times and the data reported here represent the average values.

#### **Ammonia production measurement**

Ammonia released by growing colonies was absorbed into acidic traps as described ([10], [www.natur.cuni.cz/~zdenap](http://www.natur.cuni.cz/~zdenap)) at intervals of two or three days during the experiment. The amount of ammonia in each sample was determined using the Nessler reagent.

#### **Transformation of *S. cerevisiae* cells**

Transformation was done by the LiAc/SS-DNA/PEG method [11]. The transformed cells were plated on YPD solid medium containing either 200  $\mu\text{g/ml}$  geneticin (G418 from Life Technologies) and/or 30  $\mu\text{g/ml}$  hygromycin (CAYLA, Toulouse, France). The transformants obtained were verified by analytical PCR as described by Kruckeberg *et al.* [12].

#### **Construction of strains harbouring *JEN1* fused with GFP in the chromosome**

The KanMX4 gene in the *sok2* deletion strain (EUROSCARF Y10591, BY4742 *sok2::KanMX4*) was replaced by the HphMX gene from plasmid pAG32 [13] by homologous recombination between the promoter and terminator regions. The resulting strain was designated SD2. The *JEN1*-GFP-KanMX4 construct was amplified by PCR (primers W303-1A forward and W303.1A reverse) from the U2 strain [5] carrying a chromosomal C-terminal GFP tag on the *JEN1* gene. Strains BY4742 and SD2 were transformed with this PCR product, resulting in strains Jen1p-GFP (BY4742 *JEN1::GFP Kanr*) and *sok2*-Jen1p-GFP (MAT $\alpha$ , *his3 $\Delta$ 1*, *leu2 $\Delta$ 0*, *lys2 $\Delta$ 0*, *ura3 $\Delta$ 0 sok2::HphMX4 JEN1::GFP Kanr*), respectively.

#### **Construction of the *sok2/jen1* double knockout strain**

The SD2 strain was transformed with the PCR product of *jen1::KanMX4* of the *S. cerevisiae* strain *jen1*. The selection was done with hygromycin and G418. The double mutant strain BY-*sok2jen1* (BY4742 *sok2::HphMX4 jen1::KanMX4*) was verified by PCR.

#### **Determination of Jen1p level**

We used the method described previously [7]. Briefly, total-cell lysates were prepared from cells taken from the outer margin and centre of colonies grown on GMA-BKP, broken with glass beads in 10 mM MES buffer, pH 6, supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and 1 mM AEBSF (Sigma) in a FastPrep (Qbiogene). After cell debris removal, the proteins of cell lysates were subjected to SDS-PAGE (6  $\mu\text{g}$  per slot) and transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore). GFP-tagged Jen1p was detected by mouse monoclonal anti-GFP antibody - horseradish peroxidase conjugate (Santa Cruz). The peroxidase signal was visualized with Super Signal West Pico (Pierce) on Super RX medical X-ray film (Fuji).

#### **Photography of colonies and cells**

Colonies were photographed with a Hitachi HV-C20 colour camera with Cosmicar or Navitar lenses, Kaiser Prolite illumination system and NIS Elements software (Laboratory Imaging). Cells were photographed with a high performance CCD camera (Cohu 4912) using a Leica DMR microscope with a 100 $\times$ /1.3 oil objective (Leica HCX PL fluotar), a GFP filter or under Nomarski contrast and NIS Elements.

## RESULTS

### *Jen1p transporter is important for colony development and ammonia signalling*

It has been previously shown that *JEN1* expression is strongly induced during the switch of *S. cerevisiae* BY4742 colonies from the acidic to alkali phase of their development [1]. The characterization of colonies formed by the isogenic BY-*jen1* strain showed that the absence of the Jen1p transporter affects ammonia signalling and colony development. As shown in Figure 1A,B, colonies of the BY-*jen1* strain significantly diminished ammonia production compared to the wild-type isogenic strain, and they were unable to undergo the transition to the alkali phase.

### *Cells in different colony regions produce different levels of Jen1p transporter*

Ammonia signalling failure was shown to be linked to a lack of centre-outer colony differentiation [9][7]. We therefore asked the question of whether the amount of Jen1p differs in the central and outer colony areas. We constructed the BY-Jen1p-GFP strain, harbouring a chimeric fusion between *JEN1* and GFP genes directly in the chromosome. This not only guarantees the stability of the construct but also the native regulation of *JEN1* gene expression and thus of the amount of protein produced. Jen1p-GFP protein properly localised to the plasma membrane of BY-Jen1p-GFP cells and the import of lactate was similar to that observed for the parental strain, when cells were cultivated under standard conditions (data not shown). This proved that Jen1p with the C-terminal GFP-tag is fully functional in the BY4742 background, a result that agrees with previous data [5]. BY-Jen1p-GFP colony development on GMA-BKP and the course of ammonia production were also comparable to wt colonies (data not shown).

BY-Jen1p-GFP colonies grown on GMA were then used to monitor changes in the amount (Figure 2B) and subcellular localization (Figure 2A) of the Jen1p protein in the colony centre and margin. In the first acidic phase of colony development, the amount of Jen1p-GFP determined by Western blot was relatively high (Figure 2B, 4<sup>th</sup> day) and most of the Jen1p-GFP localized to the plasma membrane (Figure 2A), both in central and outer colony cells. In the late acidic phase, the central cells maintained a relatively high Jen1p-GFP level, while a transient decrease in Jen1p-GFP level in the outer cells was visible (Figure 2B, 6<sup>th</sup> day). After the transition to the alkali phase, the centre-outer diversification became the most prominent. From this transition point on, the amount of Jen1p-GFP in the central cells gradually decreased whereas a substantial increase was found in the outer cells (Figure 2C, 9<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup> days). Accordingly, a strong GFP fluorescence at the plasma membrane of the alkali-phase outer cells was detected. In addition, these cells exhibited bright GFP fluorescence within their vacuoles, suggesting a high rate of Jen1p-GFP protein turnover during the alkali phase. This corresponds to the high level of free GFP (Mw of about 27 kDa) detected in the corresponding samples in the western blot (data not shown). The high Jen1p level in outer cells persisted throughout the whole of the alkali phase (Figure 2C, 9<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup> days). Later, in the late alkali and the second acidic phases, the level of Jen1p-GFP also gradually decreased in outer cells (Figure 2C, 17<sup>th</sup> – 31<sup>st</sup> days) and the intensity of the GFP fluorescence at the plasma membrane was also lowered. Overall, these results clearly show that Jen1p is differentially produced during colony development.

### *Ability of cells from colonies to import lactic acid by Jen1p-mediated active transport and by diffusion*

First, lactic acid transport assays were carried out in BY4742 cells, grown in SML liquid medium, to estimate their kinetic parameters at pH 5.0, 25°C (not shown). The determined  $K_m = 0.29 \pm 0.13$  mM was in accordance with what had been previously reported for other *S. cerevisiae* strains [2][14]. This  $K_m$  was an fixed parameter when performing kinetics analysis for lactate transport in colonies. On the other hand, the  $V_{max}$  values, being a function of the activity of the transporter and proportional to its quantity, served as a direct measure of Jen1p activity/level in central and outer colony cells.

A computer-assisted non-linear regression analysis applied to the initial uptake rates of lactic acid (see Experimental) measured in cells from colonies revealed biphasic kinetics: second order kinetics superimposed with a linear component (first order kinetics) (Figure S1). The saturable component is associated with the transporter, characterized by the  $V_{max}$  and  $K_m$  parameters; the linear component is characterized by the diffusion constant ( $K_d$ ), estimated from the slope of the first order kinetics curve. In colonies, we found a clear correlation of the profile of Jen1p-GFP protein level determined by fluorescence microscopy and Western-blot (Figure 2A and B) and the  $V_{max}$  for lactate uptake (Figure 2C). Central and outer cells from the wt colonies occurring in the first acidic phase exhibited a  $V_{max}$  of  $0.29 \pm 0.03$ , and  $0.27 \pm 0.04$  nmol/s/mg d.w., respectively. In the later phases, the transporter activity ( $V_{max}$ ) gradually decreased in central cells, while the increase in activity was found in outer cells, reaching a peak between day 10 and 14



of colony development (i.e. in the alkali phase). During the transition to the second acidic phase, the Jen1p activity in outer cells decreased as  $V_{max}$  exhibited similar low values in both colony regions (approximately 0.1 nmol/s/mg d.w. at the day 24). These data support the involvement of Jen1p in the second-order kinetics for lactate uptake in colonies.

The  $K_d$  values representing the first order kinetics component of uptake found in the wt central cells were low (typically about 0.02  $\mu\text{L/s/mg d.w.}$ ) throughout the colony development. However in the outer cells, the  $K_d$  increased between day 10 and 14 of colony development (in parallel with the mediated transport) and reached values threefold higher than the central cells (Figure 3).

We further measured the initial rates of labelled lactic acid uptake in cells from both parts of BY-*jen1* colonies. As expected, the kinetics found fitted with a first order kinetics (not shown), indicating that Jen1p is the only transporter responsible for the mediated transport of lactate under these conditions. When comparing the diffusion constants, we found that the time course changes in  $K_d$  of outer BY-*jen1* cells resembled those of outer wt cells:  $K_d$  increased during the first acidic phase (until 10<sup>th</sup> day), remained unaltered during the abortive alkali phase, and a subsequent drop in its values was observed upon transition to the 2<sup>nd</sup> acidic phase (Figure 3). The maximal values in both strains reached about 0.06  $\mu\text{L/s/mg d.w.}$  In contrast to the wt, the  $K_d$  of BY-*jen1* central cells followed the higher values of outer cells, until the colonies entered the abortive alkali phase; thereafter the  $K_d$  of BY-*jen1* central cells slightly decreased. This indicates that BY-*jen1* colonies may be incapable of centre-margin diversification, like other mutant strains lacking ammonia production (e.g. BY-*sok2*, BY-*sod2* and BY-*ctt1*) [8].

#### ***Lactic acid transport in colonies is diminished when Sok2p transcription factor is absent***

As shown previously [6], colonies formed by the strain with the gene for Sok2p transcription factor deleted are unable to produce ammonia and undergo the transition to the alkali phase. In addition, BY-*sok2* colonies exhibit a decreased level of *JEN1* expression. To be able to monitor Jen1p-GFP protein level during the development of BY-*sok2* colonies, a BY-*sok2*-Jen1p-GFP strain containing *JEN1*-GFP genomic fusion was constructed. Figure 2B shows that BY-*sok2*-Jen1p-GFP colonies produced a markedly lower overall level of Jen1p-GFP than wt colonies. The Jen1p-GFP profile in outer and central cells, however, still followed that of the wt cells, exhibiting a gradual decrease in Jen1p in central cells and its transient increase in outer cells during the transition to the abortive alkali phase of BY-*sok2* colonies. In terms of subcellular localisation, the Jen1p-GFP fluorescence at the plasma membrane of *sok2* cells was significantly weaker than that of the wt cells (Figure 2A). As early as the first acidic phase, a strong vacuolar signal appeared in cells from BY-*sok2*-Jen1p-GFP colonies, suggesting that in addition to lower *JEN1* expression, Jen1p degradation is accelerated in BY-*sok2* colonies compared to wt colonies.

In accordance with their decreased Jen1p-GFP protein level in the membrane, cells from BY-*sok2* colonies had only a weak ability to transport labelled lactic acid. The mediated component of lactate uptake was low at nearly all time points of colony development, being lowest in the central cells (Figure 2C). Unexpectedly, only negligible values of the first order kinetics component of lactic acid uptake were observed in BY-*sok2* colonies. The  $K_d$  of BY-*sok2* central cells was on average 2 and 4-fold lower than that of the wt and BY-*jen1* central cells, respectively. The differences in outer cells during the first acidic and alkali developmental phases (days 6-13) were even higher: the  $K_d$  of BY-*sok2* outer cells was on average almost 27 and 23-fold lower than the highest  $K_d$  values of the wt and BY-*jen1* outer cells, respectively. This led us to speculate that the first order kinetics transport for lactic acid across the plasma membrane that participates in the acid import in both wt and BY-*jen1* colonies is absent in the BY-*sok2* mutant. To explore this hypothesis, we also measured lactic acid uptake in the cells of BY-*sok2jen1* colonies. In this strain, any possible effect of the Jen1p transporter is eliminated. The  $K_d$  values measured in BY-*sok2jen1* colonies were as low as those determined for BY-*sok2* colonies, both in central and outer cells (Figure 3) and sharply contrasted with those found for BY-*jen1* colonies. Measuring the lactic acid uptake by cells from BY-*jen1*, BY-*sok2* and BY-*jen1sok2* colonies thus clearly proved that the absence of Sok2p transcription factor significantly decreases the ability of cells from colonies to import lactic acid, not only via the Jen1p transporter, but also by the other mechanism mediating the entry of the acid by diffusion.

## **DISCUSSION**

As proposed previously, carboxylic acids may function as important carbon sources for the alternative adaptive metabolism activated in *S. cerevisiae* colonies after their entry to the alkali, ammonia-producing

period of their development [1]. Carboxylic acids may be then metabolised and form oxaloacetate, one of the substrates important for driving the glyoxylate cycle [1]. In this study, we show that the Jen1p transporter is important for proper ammonia signalling and colony development, since BY-*jen1* colonies neither alkalinize their surroundings efficiently nor produce a sufficient amount of ammonia. Jen1p is able to actively transport monocarboxylates, e.g. lactate, pyruvate, acetate and propionate [2] that in their unprotonated, negatively charged form cannot enter the cells by passive diffusion. As the charged lactate and other monocarboxylates should highly predominate over the protonated (uncharged) form at the pH present in alkali-phase colonies [15], these cells most likely acquire these compounds almost exclusively via the Jen1p transporter.

The level of Jen1p-GFP as well as the cell ability to transport lactate steeply increases in the outer cells of wt colonies just after their entry to the alkali developmental phase. The Jen1p protein level is kept high in outer cells during the alkali phase and decreases during the colony transition to the second acidic phase. In contrast, central cells gradually decrease their Jen1p-GFP level and Jen1p transporter activity after entering the alkali phase (scheme in Fig. 4). This centre-outer diversification in Jen1p level and transport activity fully corresponds to the previously observed increase in the amount of adaptive metabolic proteins in outer cells when colonies enter the alkali phase [7]. This finding strongly supports our hypothesis on the role of carboxylic acids as a source of substrates for the essential adaptive metabolism. In yeast colonies, Jen1p appears to be the sole transporter responsible for lactate uptake, since its deletion completely abolishes the saturable uptake kinetics. One can hypothesize that Jen1p could either import monocarboxylates released by the colony during the 1<sup>st</sup> acidic phase [1], or possibly those released during the regulated cell death of central cells later in the alkali phase [9].

In addition to Jen1p-protein-mediated transport, colony cells display the ability to import lactic acid via a first order kinetics mechanism, i.e. either by simple diffusion through the membrane lipid bilayer or by a facilitated diffusion (e.g. via a channel). The first order kinetics, quantified by the diffusion constant ( $K_d$ ), differs in cells coming from different colony areas and developmental phases, reaching its highest values in outer cells from alkali-phase colonies.  $K_d$  is significantly diminished when the Sok2p transcription factor is absent (Figure 3), which suggests that the entry of lactic acid by means of the first order kinetics mechanism (diffusion) is somehow regulated during colony development; either the membrane properties change or an additional transporter system could be involved. Transcription factor Sok2p has been shown to influence colony development from the early phases of colony growth [6]. The absence of Sok2p transcription factor could thus lead to a modification of the cell membrane, compromising the simple diffusion. Alternatively, a hypothetical channel-like transporter system responsible for the linear part of the uptake kinetics of lactic acid in the wild type strain is not produced in BY-*sok2* colonies. What are the pros and cons of both possibilities? The microarrays data on the transcriptomes of wt colonies showed that the expression of genes connected with ergosterol biosynthesis (e.g. *ERG6*, *ERG24*, *ERG25*, *CYB5*, and later in the alkali phase also *ERG5*) increases during the transition from the 1<sup>st</sup> acidic to alkali developmental phase [7], i.e. at the time when lactic acid uptake via first-order kinetics intensifies (Figure 3). The higher sterol concentration would, however, decrease membrane fluidity and thus also its permeability [16][17]. Moreover, the expression level of *ERG* genes is similar or even lower (in the case of *ERG5*) in BY-*sok2* colonies when comparing with wt colonies [9]. These observations, together with the fact that most of the monocarboxylate substrate should be in unprotonated, negatively charged form (see above), argue against the simple diffusion through the membrane in alkali-phase colonies. On the contrary, the fact that sterols can activate most of the transporters [17] supports the possible participation of a hypothetical channel in lactic acid transport in alkali-phase colonies. Its synthesis could be under the control of the transcriptional regulator Sok2p and thus absent in *sok2* colonies. The identity of this hypothetical monocarboxylate channel remains to be elucidated as well as its natural substrate. Such a channel is not very likely to be identical to the lactic acid exporter predicted in the *S. cerevisiae* strain engineered for lactic acid production [18]. This putative exporter was predicted to use ATP or proton-motive force for driving the transport, which does not correlate with the first order kinetics for lactic acid import found in alkali colony cells.

## FUNDING

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718, Ministry of Education of the Czech Republic LC531, MSM0021620858 and by the Portuguese grant POCI/BIA-BCM/57812/2004 (Eixo 2, Medida 2.3, QCAIII - FEDER).

## REFERENCES



- 1 Palkova, Z., Devaux, F., Icicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S. and Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell*. **13**, 3901-3914
- 2 Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C. and Leao, C. (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J Bacteriol*. **181**, 2620-2623
- 3 McDermott, J. R., Rosen, B. P. and Liu, Z. Jen1p: a high affinity selenite transporter in yeast. *Mol Biol Cell*. **21**, 3934-3941
- 4 Andrade, R. P. and Casal, M. (2001) Expression of the lactate permease gene JEN1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol*. **32**, 105-111
- 5 Paiva, S., Kruckeberg, A. L. and Casal, M. (2002) Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **363**, 737-744
- 6 Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C. and Palkova, Z. (2004) Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem*. **279**, 37973-37981
- 7 Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M. and Palkova, Z. (2009) Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol*. **11**, 494-504
- 8 Cap, M., Vachova, L. and Palkova, Z. (2009) Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem*. **284**, 32572-32581
- 9 Vachova, L. and Palkova, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol*. **169**, 711-717
- 10 Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M. and Forstova, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*. **390**, 532-536
- 11 Gietz, R. D. and Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*. **350**, 87-96
- 12 Kruckeberg, A. L., Ye, L., Berden, J. A. and van Dam, K. (1999) Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem J*. **339 ( Pt 2)**, 299-307
- 13 Goldstein, A. L. and McCusker, J. H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **15**, 1541-1553
- 14 Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Kramer, R., Andre, B., Casal, M., Leao, C. and Boles, E. (2001) The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast*. **18**, 1131-1143
- 15 Ricicova, M., Kucerova, H., Vachova, L. and Palkova, Z. (2007) Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta*. **1768**, 1170-1178
- 16 Lande, M. B., Donovan, J. M. and Zeidel, M. L. (1995) The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J Gen Physiol*. **106**, 67-84
- 17 Bastiaanse, E. M., Hold, K. M. and Van der Laarse, A. (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc Res*. **33**, 272-283
- 18 van Maris, A. J., Winkler, A. A., Porro, D., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T. (2004) Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export. *Appl Environ Microbiol*. **70**, 2898-2905

## Figure legends

### Figure 1. Alkalization and ammonia production

Giant colonies were grown on GMA-BKP agar. (A) The amount of volatile ammonia produced by BY4742 (wt) and BY-*jen1* colonies was determined. (B) Colony alkalization was monitored as a yellow to violet change in the pH dye indicator BKP. (C) Schema of cell samples harvested from central and outer colony regions (in red) for analyses in Figures 2 and 3.

### Figure 2. Changes in Jen1p localization, amount and activity during wt and *sok2* colony development

The scale shows the timing of the 1<sup>st</sup> acidic, alkali and 2<sup>nd</sup> acidic phases of wt colony development. (A) Localization of Jen1p-GFP fluorescence within cells taken from outer and central colony regions (shown in Figure 1C) of 1<sup>st</sup> acidic (day 4), alkali (day 13) and 2<sup>nd</sup> acidic (day 22) colonies. The typical cellular localization in wt and BY-*sok2* colonies is shown. Bar: 5  $\mu$ m. (B) Time-line of Jen1p protein level in outer and central cells of wt and BY-*sok2* colonies. (C) Changes in Jen1p activity to import lactate at pH 5.0 (determined as  $V_{max}$  expressed in nmoles/s/mg of cell dry weight) in outer and central cells over the course of the development of wt and BY-*sok2* colonies. The representative result (A and B) and average values (C) of three independent experiments are shown. Bars represent standard deviation. Data significance was determined using the two-tailed *t* test. *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant: \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ \*\*\*,  $p < 0.005$ .

### Figure 3. First order kinetics of lactic acid uptake by central and outer cells from colonies

Diffusion of lactic acid determined as  $K_d$  (see Experimental and Results) in  $\mu$ l/s/mg d.w. for outer and central cells of wt, BY-*sok2*, BY-*jen1* and BY-*sok2jen1* strains. The average values of three independent experiments are shown. Bars represent standard deviation. Data significance was determined using the two-tailed *t* test. *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant: \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ \*\*\*,  $p < 0.005$ .

### Figure 4. Schema depicting presence of the two lactic acid transport mechanisms over the course of colony development

(A) Differences in the activity as well as in the amount and plasma membrane localization of the Jen1p transporter. (B) Differences in the level of the diffusion component. The circles represent colonies; the level of determined features in the central and outer colony areas is indicated in grey; darker colour indicates a higher level of uptake mechanism activity.

**Table 1.** Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BY4742 (wt)	BY4742 MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0	Euroscarf (Y1000)
BY- <i>jen1</i>	BY4742 <i>jen1::KanMX4</i>	Euroscarf (Y15067)
BY- <i>sok2</i>	BY4742 <i>sok2::KanMX4</i>	Euroscarf (Y10591)
U2	CEN.PK; MAT $\alpha$ his3 leu2 lys2 ura3; <i>JEN1::GFP Kan<sup>r</sup></i>	Paiva <i>et al.</i> , 2002
BY-Jen1p-GFP	BY4742 <i>JEN1::GFP Kan<sup>r</sup></i>	This work
SD2	BY4742 <i>sok2::HphMX4</i>	This work
BY- <i>sok2</i> -Jen1p-GFP	MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0 <i>sok2::HphMX4 JEN1::GFP Kan<sup>r</sup></i>	This work
BY- <i>sok2jen1</i>	BY4742 <i>sok2::HphMX4 jen1::KanMX4</i>	This work

Figure 1

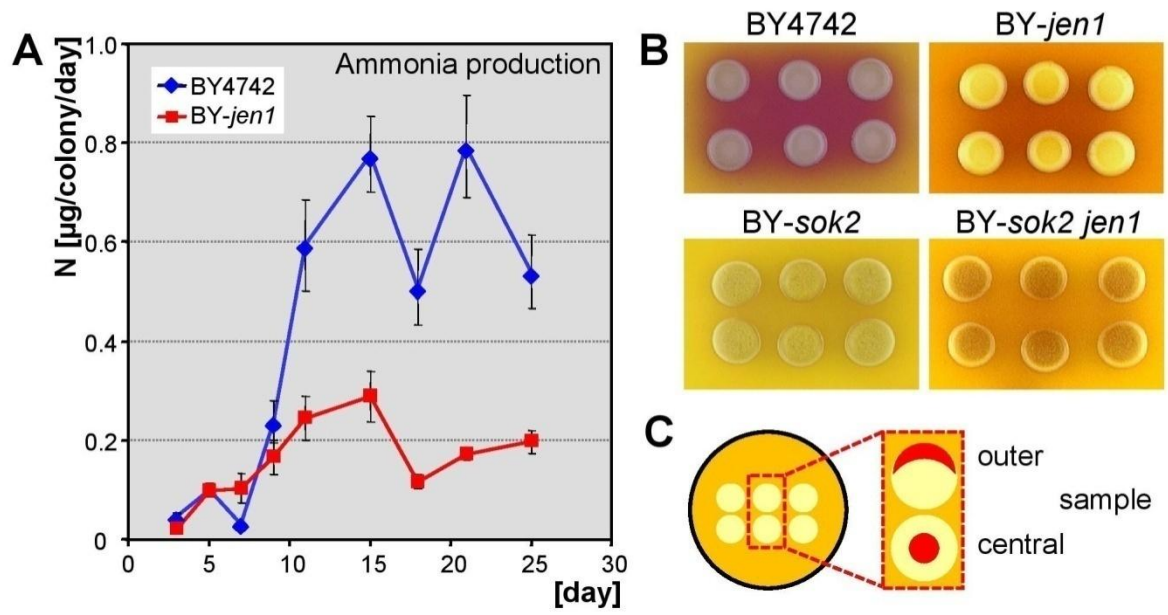


Figure 2

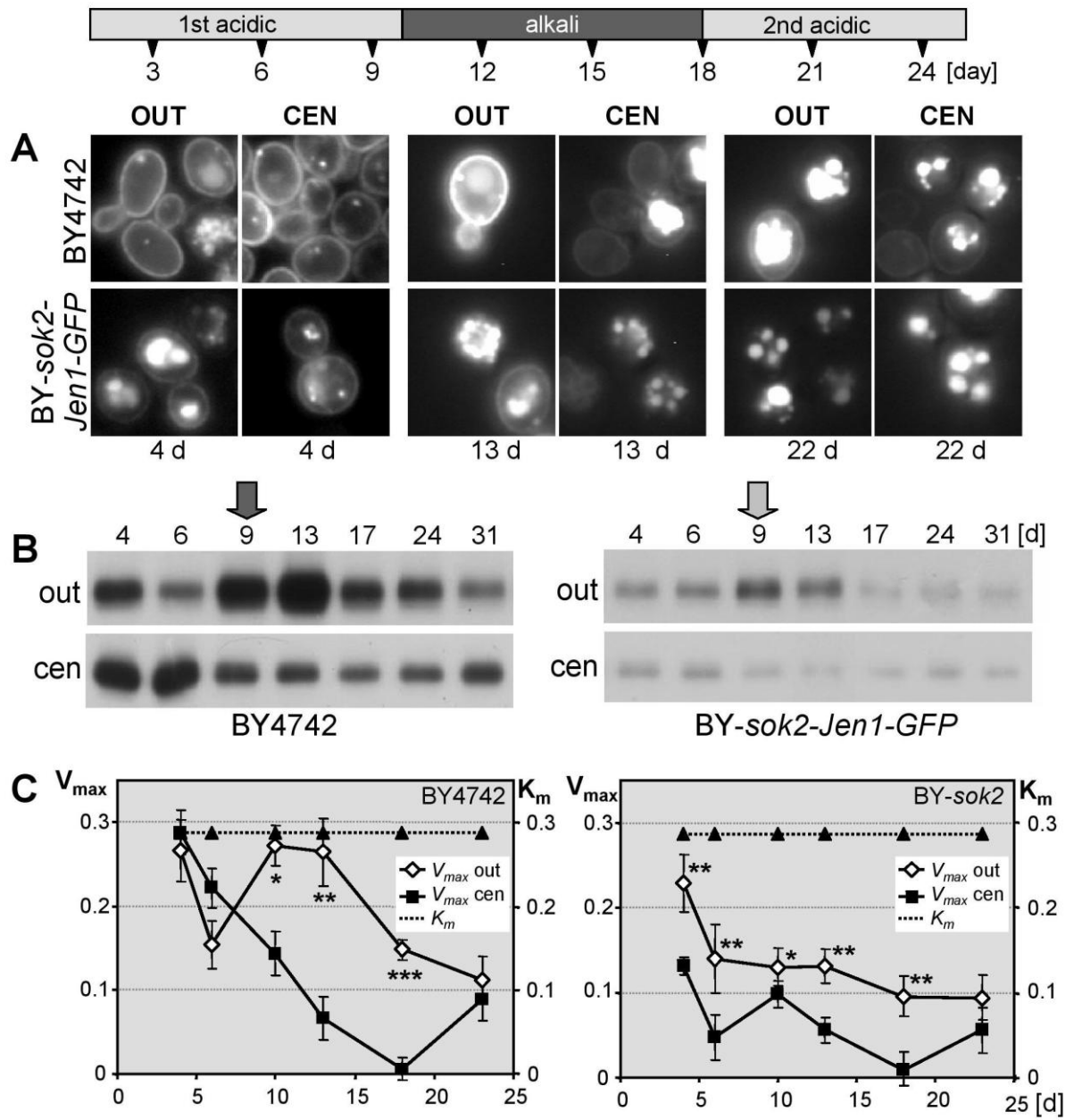


Figure 3

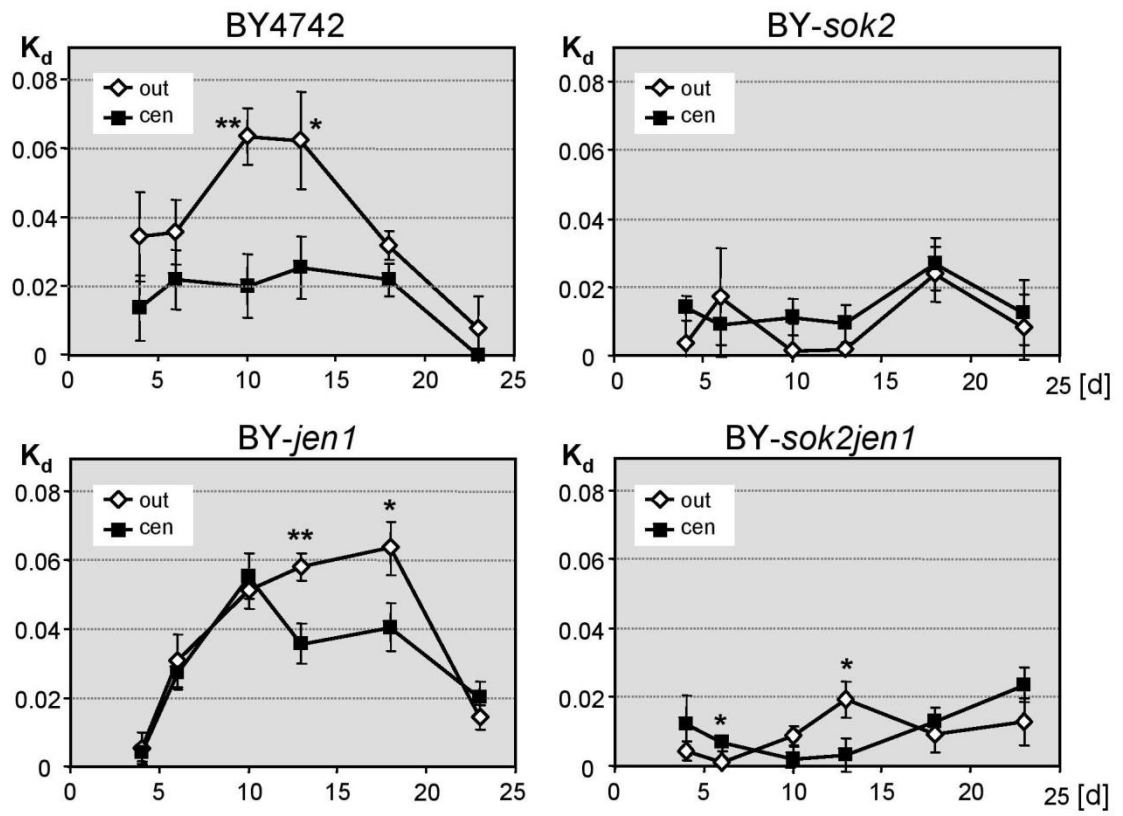
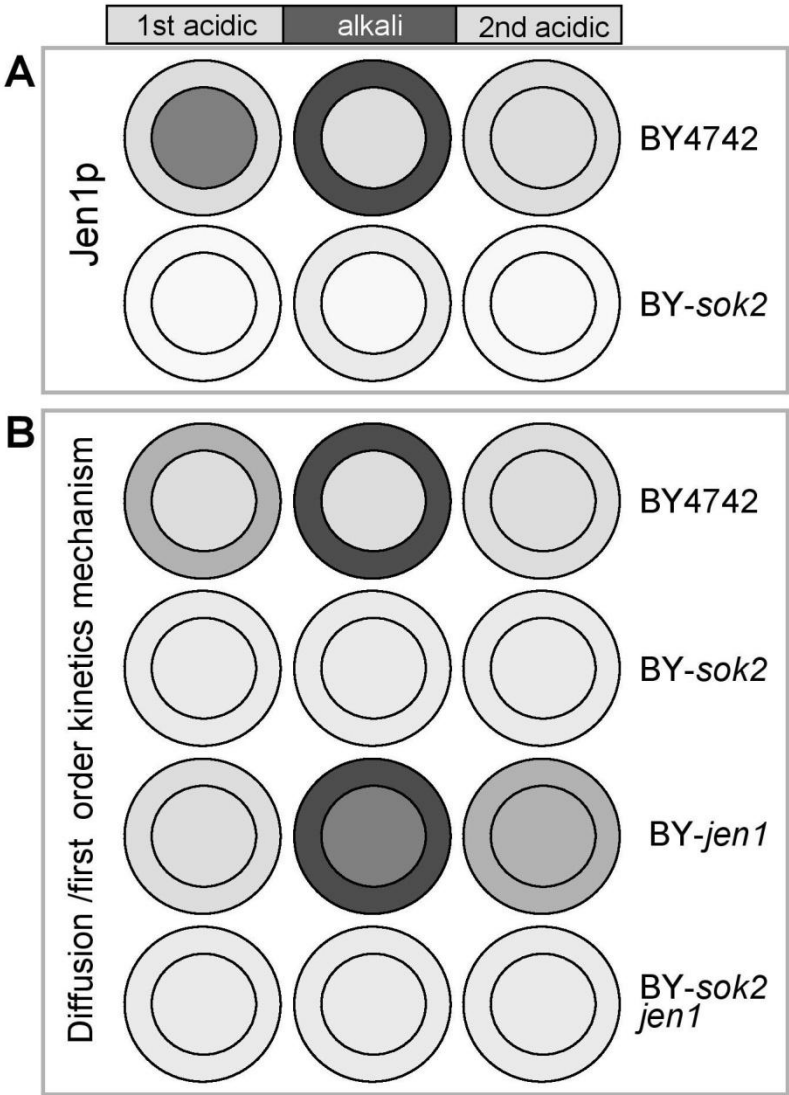


Figure 4



## 6 SOUHRNNÁ DISKUSE

Kvasinky jsou schopné tvořit při růstu na rozhraní dvou skupenství mnohobuněčná společenství - biofilmy či kolonie. Existence v rámci mnohobuněčných útvarů je v přirozeném prostředí upřednostňována, neboť poskytuje řadu výhod pro přežívání v nepříznivých podmínkách (PALKOVA a VACHOVA, 2006). Naše pracovní skupina se dlouhodobě zabývá diferenciací buněk v rámci kvasinkové kolonie a rolí této diferenciace v dlouhodobém přežívání kvasinek. Přeprogramování metabolismu a diferenciace kolonie vedoucí ke zlepšení vyhlídek kolonie z hlediska přežívání se děje v důsledku amoniakové signalizace - fenoménu objeveného v naší laboratoři (PALKOVA, *et al.*, 2002; PALKOVA, *et al.*, 1997). Prvotní data o diferenciaci kolonií ukázala, že mezi okrajem a středem kolonie existují rozdíly co se týče například počtu mrtvých buněk nebo počtu buněk vykazujících znaky programované buněčné smrti, a že tyto rozdíly pozorované u kolonií rodičovského kmene jsou mnohem méně patrné u *sok2* kmene s delecí genu *SOK2*, který není schopen alkalizace okolního média a produkce amoniaku (VACHOVA, *et al.*, 2004; VACHOVA a PALKOVA, 2005).

Amoniak je signálem produkovaným kvasinkovou kolonií patrně za účelem informovat okolní kolonie o blížícím se vyčerpání dosavadních zdrojů živin v okolí (PALKOVA a FORSTOVA, 2000). Není však jedinou plynnou molekulou, která může vyvolat vstup kvasinkových kolonií do alkalické fáze. Signalizační efekt amoniaku lze mimikovat methylaminem či propylaminem (podobně jako se podařilo mimikovat signalizační účinky amoniaku u *Dictyostelium discoideum* (GROSS, *et al.*, 1983)).

Na základě dat získaných analýzou transkriptomu v průběhu vstupu kvasinkové kolonie do alkalické fáze vývoje byla vyslovena hypotéza, že roli živin v pozdějších fázích vývoje kvasinkových kolonií by mohly hrát některé karboxylové kyseliny, možné produkty metabolismu uvolňované z buněk do okolí v raných fázích vývoje kvasinkových kolonií (PALKOVA, *et al.*, 2002). Tyto metabolity by mohly zpět do kvasinkových buněk vstupovat pomocí Jen1p transportéru karboxylových kyselin (laktátu, pyruvátu, acetátu a propionátu) (CASAL, *et al.*, 1999). U kmene *sok2*, u něž byla prokázána snížená produkce Jen1p proteinu (VACHOVA, *et al.*, 2004), kmene *jen1* s delecí *JEN1* genu a kmene *sok2/jen1* s delecí *SOK2* a *JEN1* genů neprobíhá transport karboxylových kyselin do buňky zjevně v plné míře a všechny tyto kmeny shodně vykazují sníženou míru alkalizace okolního média a sníženou produkci amoniaku. Nepoškozený transport karboxylových kyselin se tak zdá být důležitý pro správný vstup kvasinkových kolonií do alkalické fáze i jejich další vývoj.



Klíčovým modelem naší pracovní skupiny jsou kvasinkové obří kolonie. Produkce amoniaku však byla prokázána rovněž v dalších modelových uspořádáních - při aerobní (ve třepané kultuře) a statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu, amoniak tak zřejmě může sloužit jako obecný signál upozorňující na blížící se nedostatek živin v okolí, a tedy na nutnost metabolického reprogramování provázeného výraznými změnami v genové expresi.

Na amoniakové signalizaci se významnou měrou podílí proteinové produkty *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* genů. Jedním z cílů práce bylo rozšířit poznatky o Ato proteinech, které by mohly hrát roli v transportu amonného kationtu ven z buňky (mechanismem antiportu s protonem H<sup>+</sup>) (PALKOVA, *et al.*, 2002). Skutečná funkce těchto proteinů je stále nejasná. Zejména v případě Ato1p proteinu se množí indicie, že by mohl tento protein být spojen se vstupem některých karboxylových kyselin - ať už jde o acetát (PAIVA, *et al.*, 2004) či laktát (DE KOK, *et al.*, 2012; PACHECO, *et al.*, 2012) - do buňky. Při měření vstupu acetátu do buněk pocházejících z kolonií nacházejících se v alkalické fázi vývoje, a tudíž produkujících velké množství Ato proteinů, nicméně nedocházelo ke vstupu acetátu do buňky mechanismem transportu (Mgr. Markéta Řiřicová, PhD., ústní sdělení). Rovněž tak u kolonií *jen1* kmene vstupoval laktát do buněk z kolonií v alkalické fázi pouze mechanismem difuze. Data získaná při měření vstupu karboxylových kyselin do buněk pocházejících z kolonií v alkalické fázi tak roli Ato proteinů v transportu karboxylových kyselin nenasvědčují. Naopak ve všech modelových uspořádáních testovaných v naší laboratoři byla pozorována zjevná korelace mezi vzestupem pH (alkalizací) okolního média, produkcí amoniaku a produkcí Ato proteinů.

Výrazná produkce Ato proteinů na médiu s vysokým pH a výrazně snížená schopnost růstu kmene *ato1/ato2/ato3* s delecí všech tří *ATO* genů v médiu s alkalickým pH svědčí pro důležitou roli Ato proteinů v prostředí s alkalickým pH. Za předpokladu, že se v případě Ato proteinů jedná o transportéry kationtů, je možné, že snížená schopnost růstu kmene *ato1/ato2/ato3* v médiu s alkalickým pH je důsledkem porušené rovnováhy cytosolického pH (podobně, jako je s poruchou regulace vnitrobuněčného pH nebo pH organel spojena porucha některých z genů kódujících transportéry kationtů alkalických kovů (BRETT, *et al.*, 2005; SYCHROVA, *et al.*, 1999)).

Kmeny *ato1*, *ato2* a *ato3* s delecí jednotlivých *ATO* genů vykazovaly shodně sníženou produkci amoniaku (PALKOVA, *et al.*, 2002). Snížená produkce amoniaku u kmenů *ato1*, *ato2* a *ato3* byla následně prokázána i při aerobní kultivaci v tekutém glycerolovém médiu. Právě skutečnost, že delece každého jednotlivého *ATO* genu má značné účinky na produkci

amoniaku a průběh alkalické fáze (tudíž Ato proteiny nejsou schopny se vzájemně plně nahradit) nás vedla k hypotéze, že by Ato proteiny mohly fyzicky interagovat. Za využití nových přístupů zjišťování interakcí mezi kvasinkovými proteiny (založených na měření poločasu dohasínání fluorescence) byla prokázána fyzická interakce jednak mezi Ato1p a Ato2p proteiny, jednak mezi Ato1p a Ato3p proteiny. Přístup nicméně neumožňuje rozhodnout, zda se jedná o dimerizaci či oligomerizaci proteinů. Právě Ato1p a Ato3p proteiny, u nichž byla prokázána homodi-/oligomerizace, se v membráně vyskytují ve velkých shlucích (RICICOVA, *et al.*, 2007), čímž se odlišují od Ato2p proteinu, jehož lokalizace v rámci plazmatické membrány je více homogenní. Experimentální data naznačují, že Gpr1p protein kvasinky *Yarrowia lipolytica*, který je homologem Ato proteinů, by se na membráně buňky mohl vyskytovat v oligomerním stavu (GENTSCH, *et al.*, 2007).

Na příkladu prostorového uspořádání buněk produkujících/neprodukujících Ato1p-GFP protein byla dokumentována přítomnost různých vrstev buněk v rámci kvasinkové mikrokolonie (VACHOVA, *et al.*, 2009a). Nejnovější data ukazují, že kvasinková obří kolonie je ve vertikálním směru tvořena dvěma výrazně odlišnými vrstvami buněk: buňky horní vrstvy jsou velké, kulaté, mají silnou buněčnou stěnou, obsahují četné vakuoly a menší počet mitochondrií, naopak buňky spodní vrstvy menší a protáhlé, mají jedinou vakuolu a velké množství mitochondrií. Při sledování stratifikace kolonií kmenů s vybranými proteiny značenými GFP se ukázalo, že řada těchto proteinů se vyskytuje typicky v jedné ze dvou hlavních vrstev buněk. Například Ato3p-GFP protein je typickým proteinem produkovaným buňkami horní vrstvy (CAP, *et al.*, 2012). Podobně jako se buňky produkující Ato3p-GFP protein vyskytovaly zejména v buňkách horní vrstvy obřích kolonií, byl i fluorescenční signál Ato1p-GFP dokumentován téměř výhradně v horních vrstvách buněk mikrokolonie (VACHOVA, *et al.*, 2009a). Ato proteiny tak zřejmě plní svoji roli na konkrétním místě kolonie v konkrétním typu buněk.

Závěrem je možné říci, že současné poznatky přinášejí stále více důkazů o složitosti světa kvasinky *S.cerevisiae* - jednoho z oblíbených modelových mikroorganismů. K diferenciaci buněk populace dochází zjevně nejen při růstu na pevném pokladu v rámci kolonie, ale i při kultivaci v tekutém médiu (ALLEN, *et al.*, 2006; WERNER-WASHBURNE, *et al.*, 2012) - tedy za podmínek, ve kterých byly buňky dlouho považovány za rovnocenné. Právě amoniak by mohl být klíčovou molekulou hrající roli v rozrůžňování kvasinkové populace. Geny *ATO1*, *ATO2*, *ATO3*, *SOK2* a *JEN1* zmiňované v této práci pak do značné míry produkci amoniaku, a tedy i diferenciaci populace, ovlivňují.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá studiem příčin a důsledků produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur. Předkládaná práce doplňuje a rozšiřuje znalosti o amoniakové signalizaci u kvasinek a znalosti o Ato proteinech, jež by mohly hrát roli v exportu amonného kationtu z buňky. Nejdůležitější výsledky, jež práce přináší, jsou následující:

- Prokázání přítomnosti různých vrstev buněk v rámci kvasinkové mikrokolonie (na příkladu prostorového uspořádání buněk produkujících/neprodukujících Ato1p-GFP protein).
- Zjištění významné role *SOK2* genu, *JEN1* genu a transportu karboxylových kyselin v amoniakové signalizaci a diferenciaci kvasinkových kolonií.
- Zjištění, že působení methylaminu a propylaminu na obří kolonie *S.cerevisiae* a *C.mogii* v acidické fázi spouští jejich vstup do alkalické fáze.
- Prokázání produkce amoniaku při aerobní kultivaci *S.cerevisiae* v tekutém glycerolovém médiu (ve třepaných kulturách) a při statické kultivaci v tekutém glycerolovém médiu.
- Zjištění vlivu různých kultivačních podmínek na expresi *ATO* genů a zjištění výrazné exprese *ATO* genů v médiu alkalickým pH v nepřítomnosti glukosy.
- Příprava a charakterizace kmene *ato1/ato2/ato3* s delecí všech *ATO* genů. Zjištění, že delece *ATO* genů způsobuje neschopnost růstu v médiu s alkalickým pH.
- Prokázání interakce mezi Ato1p-FP a Ato2p-FP proteiny a dále mezi Ato1p-FP/Ato1p-FP a Ato3p-FP/Ato3p-FP proteiny, a to pomocí nově zavedených metod vyhledávání interakcí mezi kvasinkovými proteiny, založených na měření poločasu dohasínání fluorescence.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aerts, R. J., Durston, A. J. a Moolenaar, W. H. (1985). Cytoplasmic pH and the regulation of the *Dictyostelium* cell cycle. *Cell* 43, 653-657.
- Aguilera, F., Peinado, R. A., Millan, C., Ortega, J. M. a Mauricio, J. C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* 110, 34-42.
- Allen, C., Buttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F. a Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol* 174, 89-100.
- Anand, S. a Prasad, R. (1989). Rise in intracellular pH is concurrent with 'start' progression of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 135, 2173-2179.
- Aragon, A. D., Rodriguez, A. L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, G. S., Tapia, P. H., Allen, C., Joe, R., Benn, D. a Werner-Washburne, M. (2008). Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Mol Biol Cell* 19, 1271-1280.
- Arino, J., Ramos, J. a Sychrova, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 95-120.
- Auer, M., Scarborough, G. A. a Kuhlbrandt, W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the open conformation. *Nature* 392, 840-843.
- Augstein, A., Barth, K., Gentsch, M., Kohlwein, S. D. a Barth, G. (2003). Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 149, 589-600.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. a Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3254-3259.
- Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. a Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 ( Pt 10), 2749-2758.
- Benni, M. L. a Neigeborn, L. (1997). Identification of a new class of negative regulators affecting sporulation-specific gene expression in yeast. *Genetics* 147, 1351-1366.

- Berry, D. B. a Gasch, A. P. (2008). Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell* *19*, 4580-4587.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A. M., Haynes, K., Arst, H. N. a Rogers, T. (2005). The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Molecular Microbiology* *55*, 1072-1084.
- Bradley, P. H., Brauer, M. J., Rabinowitz, J. D. a Troyanskaya, O. G. (2009). Coordinated concentration changes of transcripts and metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Comput Biol* *5*, e1000270.
- Brauer, M. J., Huttenhower, C., Airoidi, E. M., Rosenstein, R., Matese, J. C., Gresham, D., Boer, V. M., Troyanskaya, O. G. a Botstein, D. (2008). Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Mol Biol Cell* *19*, 352-367.
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. a Rao, R. (2005). The yeast endosomal Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* *16*, 1396-1405.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M. a Blumwald, E. (2007). Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *282*, 24284-24293.
- Cap, M., Stepanek, L., Harant, K., Vachova, L. a Palkova, Z. (2012). Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Mol Cell*.
- Cap, M., Vachova, L. a Palkova, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem* *284*, 32572-32581.
- Casado, C., Gonzalez, A., Platara, M., Ruiz, A. a Arino, J. (2011). The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochem J* *438*, 523-533.
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C. a Leao, C. (1999). The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J Bacteriol* *181*, 2620-2623.
- Clark, K. L., Larsen, P. B., Wang, X. a Chang, C. (1998). Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5401-5406.

- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J. H., Gorwa, M. F., Colavizza, D. a Thevelein, J. M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17, 3326-3341.
- Cottier, F., Raymond, M., Kurzai, O., Bolstad, M., Leewattanapasuk, W., Jimenez-Lopez, C., Lorenz, M. C., Sanglard, D., Vachova, L., Pavelka, N., Palkova, Z. a Muhlschlegel, F. A. (2012). The bZIP Transcription Factor Rca1p Is a Central Regulator of a Novel CO(2) Sensing Pathway in Yeast. *PLoS Pathog* 8, e1002485.
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. a Klausner, R. D. (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76, 393-402.
- Darley, C. P., van Wuytswinkel, O. C., van der Woude, K., Mager, W. H. a de Boer, A. H. (2000). *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Biochem J* 351, 241-249.
- Davies, L., Satre, M., Martin, J. B. a Gross, J. D. (1993). The target of ammonia action in *dictyostelium*. *Cell* 75, 321-327.
- Davis, D. A., Bruno, V. M., Loza, L., Filler, S. G. a Mitchell, A. P. (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162, 1573-1581.
- de Boer, C. G. a Hughes, T. R. (2012). YeTFaSCo: a database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. *Nucleic Acids Res* 40, D169-179.
- de Kok, S., Nijkamp, J. F., Oud, B., Roque, F. C., de Ridder, D., Daran, J. M., Pronk, J. T. a van Maris, A. J. (2012). Laboratory evolution of new lactate transporter genes in a *jen1Delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and their identification as ADY2 alleles by whole-genome resequencing and transcriptome analysis. *FEMS Yeast Res.*
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. a Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E. A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. a Penalva, M. A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* 21, 1350-1359.

- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. a Eide, D. J. (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 26092-26099.
- Duntze, W., MacKay, V. a Manney, T. R. (1970). *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science* 168, 1472-1473.
- Eilam, Y., Othman, M. a Halachmi, D. (1990). Transient Increase in Ca<sup>2+</sup> Influx in *Saccharomyces-Cerevisiae* in Response to Glucose - Effects of Intracellular Acidification and Camp Levels. *Journal of General Microbiology* 136, 2537-2543.
- Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R. a Butow, R. A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.
- Eraso, P. a Gancedo, C. (1987). Activation of Yeast Plasma-Membrane Atpase by Acid Ph during Growth. *Febs Letters* 224, 187-192.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C. a Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, St11p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 2068-2076.
- Forsberg, H., Gilstring, C. F., Zargari, A., Martinez, P. a Ljungdahl, P. O. (2001). The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol* 42, 215-228.
- Friedlander, G., Joseph-Strauss, D., Carmi, M., Zenvirth, D., Simchen, G. a Barkai, N. (2006). Modulation of the transcription regulatory program in yeast cells committed to sporulation. *Genome Biol* 7, R20.
- Furchgott, R. F. a Jothianandan, D. (1991). Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28, 52-61.
- Furchgott, R. F. a Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Futcher, B., Latter, G. I., Monardo, P., McLaughlin, C. S. a Garrels, J. I. (1999). A sampling of the yeast proteome. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7357-7368.

- Ganguly, S., Singh, P., Manoharlal, R., Prasad, R. a Chattopadhyay, A. (2009). Differential dynamics of membrane proteins in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 661-665.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. a Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.
- Gaugler, R., Lebeck, L., Nakagaki, B. a Boush, G. M. (1980). Orientation of the Entomogenous Nematode *Neoplectana-Carpocapsae* to Carbon-Dioxide. *Environmental Entomology* 9, 649-652.
- Gentsch, M. a Barth, G. (2005). Carbon source dependent phosphorylation of the Gpr1 protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 5, 909-917.
- Gentsch, M., Kuschel, M., Schlegel, S. a Barth, G. (2007). Mutations at different sites in members of the Gpr1/Fun34/YaaH protein family cause hypersensitivity to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* as well as in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 7, 380-390.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. a Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.
- Gross, J. D., Bradbury, J., Kay, R. R. a Peacey, M. J. (1983). Intracellular pH and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 303, 244-245.
- Guaragnella, N. a Butow, R. A. (2003). ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensor system. *J Biol Chem* 278, 45882-45887.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. a Hegemann, J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.



- Hall, R. A., De Sordi, L., Maccallum, D. M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J. W., Robinson, G. K., Levin, L. R., Buck, J., Wang, Y., Gow, N. A., Steegborn, C. a Muhlschlegel, F. A. (2010). CO<sub>2</sub> acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* *6*, e1001193.
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sogliocco, F. a Boucherie, H. (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *276*, 76-85.
- Hofman-Bang, J. (1999). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* *12*, 35-73.
- Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C. a 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.
- Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S. a Soll, D. R. (2009). CO<sub>2</sub> regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* *19*, 330-334.
- Chambers, P., Issaka, A. a Palecek, S. P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* JEN1 promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar. *Appl Environ Microbiol* *70*, 8-17.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. a Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* *282*, 699-705.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. a Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric-Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 9265-9269.
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J. a Goldbeter, A. (2003). Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *161*, 497-505.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Bretkreutz, B. J. a Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* *297*, 395-400.

- Kafadar, K. A. a Cyert, M. S. (2004). Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell* 3, 1147-1153.
- Kal, A. J., van Zonneveld, A. J., Benes, V., van den Berg, M., Koerkamp, M. G., Albermann, K., Strack, N., Ruijter, J. M., Richter, A., Dujon, B., Ansorge, W. a Tabak, H. F. (1999). Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol Biol Cell* 10, 1859-1872.
- Karagiannis, J. a Young, P. G. (2001). Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 114, 2929-2941.
- Karlson, P. a Luscher, M. (1959). Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55-56.
- Kawahata, M., Masaki, K., Fujii, T. a Iefuji, H. (2006). Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS Yeast Res* 6, 924-936.
- Klee, C. B., Crouch, T. H. a Krinks, M. H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6270-6273.
- Klengel, T., Liang, W. J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J. R., Eckert, S. E., Mogensen, E. G., Haynes, K., Tuite, M. F., Levin, L. R., Buck, J. a Muhlschlegel, F. A. (2005). Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* 15, 2021-2026.
- Kuchin, S., Vyas, V. K. a Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 22, 3994-4000.
- Kullas, A. L., Martin, S. J. a Davis, D. (2007). Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Mol Microbiol* 66, 858-871.
- Kurita, O. a Yamazaki, E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Curr Microbiol* 45, 277-280.
- Kurzweilova, H. a Sigler, K. (1993). Fluorescent staining with bromocresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity. *Yeast* 9, 1207-1211.

- Lages, F. a Lucas, C. (1997). Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1322*, 8-18.
- Lamb, T. M. a Mitchell, A. P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 677-686.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. a Mitchell, A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* *276*, 1850-1856.
- Levy, S., Ihmels, J., Carmi, M., Weinberger, A., Friedlander, G. a Barkai, N. (2007). Strategy of transcription regulation in the budding yeast. *PLoS One* *2*, e250.
- Li, L., Bhatia, M., Zhu, Y. Z., Zhu, Y. C., Ramnath, R. D., Wang, Z. J., Anuar, F. B., Whiteman, M., Salto-Tellez, M. a Moore, P. K. (2005). Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* *19*, 1196-1198.
- Lodder, A. L., Lee, T. K. a Ballester, R. (1999). Characterization of the *Wsc1* protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *152*, 1487-1499.
- Lorenz, M. C. a Heitman, J. (1998). The *MEP2* ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* *17*, 1236-1247.
- Lyons, T. J., Gasch, A. P., Gaither, L. A., Botstein, D., Brown, P. O. a Eide, D. J. (2000). Genome-wide characterization of the *Zap1p* zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 7957-7962.
- Madeo, F., Frohlich, E. a Frohlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* *139*, 729-734.
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M. a Tanner, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* *14*, 4427-4436.
- Marcaggi, P. a Coles, J. A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling (vol 64, pg 157, 2001). *Progress in Neurobiology* *65*, 209-210.

- Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R. a Sychrova, H. (2010). New applications of pHluorin--measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* 27, 317-325.
- Maresova, L. a Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol* 55, 588-600.
- Marini, A. M. a Andre, B. (2000). In vivo N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol Microbiol* 38, 552-564.
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. a Andre, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 4282-4293.
- Martinez-Munoz, G. A. a Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 283, 20309-20319.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. a Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15, 2227-2235.
- Martinez de Maranon, I., Tourdot-Marechal, R. a Gervais, P. (2001). Involvement of osmotic cell shrinkage on the proton extrusion rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 67, 241-246.
- Matsumoto, R., Akama, K., Rakwal, R. a Iwahashi, H. (2005). The stress response against denatured proteins in the deletion of cytosolic chaperones SSA1/2 is different from heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 6, 141.
- McDermott, J. R., Rosen, B. P. a Liu, Z. (2010). Jen1p: a high affinity selenite transporter in yeast. *Mol Biol Cell* 21, 3934-3941.
- Meffert, M. K., Premack, B. A. a Schulman, H. (1994). Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12, 1235-1244.
- Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Serrano, R. a de Larrinoa, I. F. (2001). Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol Genet Genomics* 265, 801-811.

- Miesenbock, G., De Angelis, D. A. a Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* *394*, 192-195.
- Minarikova, L., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. a Palkova, Z. (2001). Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res* *271*, 296-304.
- Mingot, J. M., Tilburn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, M., Widdick, D. A., Sarkar, S., Brown, C. V., Caddick, M. X., Espeso, E. A., Arst, H. N. a Penalva, M. A. (1999). Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 1390-1400.
- Mogensen, E. G., Janbon, G., Chaloupka, J., Steegborn, C., Fu, M. S., Moyrand, F., Klengel, T., Pearson, D. S., Geeves, M. A., Buck, J., Levin, L. R. a Muhlschlegel, F. A. (2006). *Cryptococcus neoformans* senses CO<sub>2</sub> through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell* *5*, 103-111.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. a Higgs, E. A. (1988). The Discovery of Nitric-Oxide as the Endogenous Nitrovasodilator. *Hypertension* *12*, 365-372.
- Moochhala, S. a Rajnakova, A. (1999). Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radic Res* *31*, 671-679.
- Morsomme, P., Slayman, C. W. a Goffeau, A. (2000). Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* *1469*, 133-157.
- Mortensen, H. D., Gori, K., Siegumfeldt, H., Nissen, P., Jespersen, L. a Arneborg, N. (2006). Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* *71*, 713-719.
- Mortensen, H. D., Jacobsen, T., Koch, A. G. a Arneborg, N. (2008). Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Appl Environ Microbiol* *74*, 4835-4840.
- Nass, R. a Rao, R. (1998). Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* *273*, 21054-21060.
- Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I. a Farkas, V. (2008). Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol Lett* *284*, 231-236.

- Neves, L., Lages, F. a Lucas, C. (2004). New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 565, 160-162.
- Nijland, R. a Burgess, J. G. (2010). Bacterial olfaction. *Biotechnol J* 5, 974-977.
- North, M. J., Nicol, K., Sands, T. W. a Cotter, D. A. (1996). Acid-activatable cysteine proteinases in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 271, 14462-14467.
- Ohkuni, K., Hayashi, M. a Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 623-631.
- Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graca, M. a Lucas, C. (2003). Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochim Biophys Acta* 1613, 57-71.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N. a Penalva, M. A. (1995). Activation of the *Aspergillus Pacc* Transcription Factor in Response to Alkaline Ambient Ph Requires Proteolysis of the Carboxy-Terminal Moiety. *Genes & Development* 9, 1622-1632.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S. a Smits, G. J. (2009). In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* 155, 268-278.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macias-Rodriguez, L. a Lopez-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4, 701-712.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. a Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6, 422-428.
- Pacheco, A., Talaia, G., Sa-Pessoa, J., Bessa, D., Goncalves, M. J., Moreira, R., Paiva, S., Casal, M. a Queiros, O. (2012). Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by the expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. *FEMS Yeast Res.*
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C. a Casal, M. (2004). Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 201-210.

- Palkova, Z., Devaux, F., Icovova, M., Minarikova, L., Le Crom, S. a Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* 13, 3901-3914.
- Palkova, Z. a Forstova, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11), 1923-1928.
- Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M. a Forstova, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.
- Palkova, Z. a Vachova, L. (2003). Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol* 225, 229-272.
- Palkova, Z. a Vachova, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* 30, 806-824.
- Pan, X. W. a Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Molecular and Cellular Biology* 20, 8364-8372.
- Park, S. H., Koh, S. S., Chun, J. H., Hwang, H. J. a Kang, H. S. (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 2044-2050.
- Penalva, M. A. a Arst, H. N., Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 426-446, table of contents.
- Penalva, M. A. a Arst, H. N., Jr. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58, 425-451.
- Penalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E. a Arst, H. N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16, 291-300.
- Petrov, V. V. (2010). Point mutations in Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: influence on its expression and activity. *Biochemistry (Mosc)* 75, 1055-1063.
- Piccirillo, S., White, M. G., Murphy, J. C., Law, D. J. a Honigberg, S. M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics* 184, 707-716.

- Pineda Rodo, A., Vachova, L. a Palkova, Z. (2012). In Vivo Determination of Organellar pH Using a Universal Wavelength-Based Confocal Microscopy Approach. *PLoS One* 7, e33229.
- Plataru, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F. a Arino, J. (2006). The transcriptional response of the yeast Na<sup>(+)</sup>-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* 281, 36632-36642.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J. L. a Sychrova, H. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387, 89-93.
- Pun, P. B., Lu, J., Kan, E. M. a Moochhala, S. (2010). Gases in the mitochondria. *Mitochondrion* 10, 83-93.
- Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Coria, R. a Pena, A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Bacteriol* 180, 5860-5865.
- Ramos, J., Haro, R. a Rodriguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1029, 211-217.
- Ricicova, M., Kucerova, H., Vachova, L. a Palkova, Z. (2007). Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1170-1178.
- Ritchie, R. J. a Gibson, J. (1987). Permeability of ammonia and amines in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bacillus firmus*. *Arch Biochem Biophys* 258, 332-341.
- Robellet, X., Flipphi, M., Pegot, S., Maccabe, A. P. a Velot, C. (2008). AcpA, a member of the GPR1/FUN34/YaaH membrane protein family, is essential for acetate permease activity in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 412, 485-493.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. a Friend, S. H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* 287, 873-880.
- Roberts, G. G. a Hudson, A. P. (2006). Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. *Mol Genet Genomics* 276, 170-186.



- Segal, E., Shapira, M., Regev, A., Pe'er, D., Botstein, D., Koller, D. a Friedman, N. (2003). Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet* *34*, 166-176.
- Sekito, T., Thornton, J. a Butow, R. A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell* *11*, 2103-2115.
- Serrano, R., Bernal, D., Simon, E. a Arino, J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* *279*, 19698-19704.
- Serrano, R., Kiellandbrandt, M. C. a Fink, G. R. (1986). Yeast Plasma-Membrane Atpase Is Essential for Growth and Has Homology with (Na<sup>++</sup>K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>-2+</sup>-Atpases. *Nature* *319*, 689-693.
- Serrano, R., Martin, H., Casamayor, A. a Arino, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slf2 MAPK pathway. *J Biol Chem* *281*, 39785-39795.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R. a Arino, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology* *46*, 1319-1333.
- Sheff, M. A. a Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *21*, 661-670.
- Shenhar, G. a Kassir, Y. (2001). A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *21*, 1603-1612.
- Schlessner, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M. a Goffeau, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *263*, 19480-19487.
- Schmidt, H. H. a Walter, U. (1994). NO at work. *Cell* *78*, 919-925.
- Schreiber, G., Barberis, M., Scolari, S., Klaus, C., Herrmann, A. a Klipp, E. (2012). Unraveling interactions of cell cycle-regulating proteins Sic1 and B-type cyclins in living yeast cells: a FLIM-FRET approach. *FASEB J* *26*, 546-554.
- Singh, A., Severance, S., Kaur, N., Wiltsie, W. a Kosman, D. J. (2006). Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *281*, 13355-13364.

- Sirova, J., Sedlarova, M., Piterkova, J., Luhova, L. a Petrivalsky, M. (2011). The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci* 181, 560-572.
- Smith, E. N. a Kruglyak, L. (2008). Gene-environment interaction in yeast gene expression. *PLoS Biol* 6, e83.
- Smith, J. J., Marelli, M., Christmas, R. H., Vizeacoumar, F. J., Dilworth, D. J., Ideker, T., Galitski, T., Dimitrov, K., Rachubinski, R. A. a Aitchison, J. D. (2002). Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J Cell Biol* 158, 259-271.
- Soupe, E., Ramirez, R. M. a Kustu, S. (2001). Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH<sub>3</sub> across the cytoplasmic membrane. *Mol Cell Biol* 21, 5733-5741.
- Strachotová, D. (Diplomová práce 2004). Změny produkce a exprese Ato transportérů v průběhu vývoje kvasinkových kolonií a tekutých kultur
- Strachotova, D., Holoubek, A., Kucerova, H., Benda, A., Humpolickova, J., Vachova, L. a Palkova, Z. (2012). Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM). *Biochim Biophys Acta.*, doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.005
- Sychrova, H., Ramirez, J. a Pena, A. (1999). Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 171, 167-172.
- Tachibana, C., Biddick, R., Law, G. L. a Young, E. T. (2007). A poised initiation complex is activated by SNF1. *J Biol Chem* 282, 37308-37315.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. a Arst, H. N. (1995). The *Aspergillus* Pacc Zinc-Finger Transcription Factor Mediates Regulation of Both Acid-Expressed and Alkaline-Expressed Genes by Ambient Ph. *Embo Journal* 14, 779-790.
- Trevisani, M., Patacchini, R., Nicoletti, P., Gatti, R., Gazzieri, D., Lissi, N., Zagli, G., Creminon, C., Geppetti, P. a Harrison, S. (2005). Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol* 145, 1123-1131.
- Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C. a Palkova, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem* 279, 37973-37981.

- Vachova, L., Chernyavskiy, O., Strachotova, D., Bianchini, P., Burdikova, Z., Fercikova, I., Kubinova, L. a Palkova, Z. (2009a). Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ Microbiol* *11*, 1866-1877.
- Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M. a Palkova, Z. (2009b). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* *11*, 494-504.
- Vachova, L. a Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* *169*, 711-717.
- Valdez-Taubas, J. a Pelham, H. R. (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* *13*, 1636-1640.
- Vallejo, C. G. a Serrano, R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast* *5*, 307-319.
- van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. a Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* *59*, 304-322.
- Verma, A., Hirsch, D. J., Glatt, C. E., Ronnett, G. V. a Snyder, S. H. (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* *259*, 381-384.
- Viegas, C. A., Supply, P., Capieaux, E., Van Dyck, L., Goffeau, A. a Sa-Correia, I. (1994). Regulation of the expression of the H<sup>(+)</sup>-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth and effects of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1217*, 74-80.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A. a Arino, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *279*, 43614-43624.
- Vindelov, J. a Arneborg, N. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast* *19*, 429-439.
- Wahl, M., Koberling, F., Patting, M., Rahn, H. a Erdmann, R. (2004). Time-resolved confocal fluorescence imaging and spectroscopy system with single molecule sensitivity and sub-micrometer resolution. *Curr Pharm Biotechnol* *5*, 299-308.

- Wang, W., Esch, J. J., Shiu, S. H., Agula, H., Binder, B. M., Chang, C., Patterson, S. E. & Bleeker, A. B. (2006). Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3429-3442.
- Ward, M. P. & Garrett, S. (1994). Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of SOK1, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Mol Cell Biol* 14, 5619-5627.
- Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R. & Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15, 6854-6863.
- Werner-Washburne, M., Roy, S. & Davidson, G. S. (2012). Aging and the Survival of Quiescent and Non-quiescent Cells in Yeast Stationary-Phase Cultures. *Subcell Biochem* 57, 123-143.
- Yang, G., Sun, X. & Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J* 18, 1782-1784.
- Young, B. P., Shin, J. J. H., Orij, R., Chao, J. T., Li, S. C., Guan, X. L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M. R., Prinz, W. A., Smits, G. J. & Loewen, C. J. R. (2010). Phosphatidic Acid Is a pH Biosensor That Links Membrane Biogenesis to Metabolism. *Science* 329, 1085-1088.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.
- Zakhary, R., Gaine, S. P., Dinerman, J. L., Ruat, M., Flavahan, N. A. & Snyder, S. H. (1996). Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 795-798.
- Zhang, Y. Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D. S. & Rao, R. (2010). Requirement for Ergosterol in V-ATPase Function Underlies Antifungal Activity of Azole Drugs. *Plos Pathogens* 6.
- Zhao, W. & Wang, R. (2002). H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H474-480.

Zhou, H. a Winston, F. (2001). NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* 2, 5.

Zikanova, B., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. a Palkova, Z. (2002). Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 962-967.