

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

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jana Mikešová

Role Sch9p a Rim15p signálních drah při vývoji kolonií kvasinek
Sch9p and Rim15p signaling pathways in yeast colony development

Diplomová práce

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

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 01.05.2015

Podpis

Tato práce vznikla v letech 2012-2015 za finanční podpory grantů GAČR 15-08225S, SVV-2015-260209 a BIOCEV – Biotechnologické a Biomedicinské Centrum ASCR a Karlovy University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za odborné vedení a cenné rady během mé práce. Velké poděkování za odborné vedení v laboratoři, trpělivost a mnoho inspirativních postřehů patří RNDr. Michalovi Čápkovi Ph.D.. Kolektivu Laboratoře biologie kvasinkových kolonií bych ráda poděkovala za vstřícné přijetí a vytvoření přátelského kolektivu a v neposlední řadě děkuji rodičům za morální a materiální podporu během celého studia.

Abstrakt

Laboratorní kmen kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 vytváří na pevném médiu kolonie, které jsou horizontálně a vertikálně diferencované. Vertikálně diferencovanou centrální část kolonie tvoří dvě morfologicky i fyziologicky odlišné populace buněk, které jsou výrazně oddělené. V horní části kolonie se vyskytují takzvané U buňky, v dolních částech se nachází takzvané L buňky. Molekulární mechanismy vertikální diferenciace jsou z velké části neznámé. Hlavním cílem této práce bylo analyzovat, zda a jak změněná hladina vybraných proteinů signálních drah monitorujících dostupnost živin ovlivňuje vývoj a diferenciaci kvasinkových kolonií a především přežívání jejich U a L subpopulací. Zaměřila jsem se na kinázy Sch9p a Rim15p s centrálním postavením v signalizaci, transkripční aktivátory stresové odpovědi Msn2p a Msn4p a transkripční faktor Gis1p, který je důležitý pro přechod na respirační metabolismus. Mikroskopie tenkých řezů kolonií odhalila změnu ve vertikální diferenciaci kolonií kmene *rim15Δ* a částečně P_{TEF} -*SCH9* a změněnou morfologii U a L buněk kolonií ostatních analyzovaných kmenů. Změněná hladina Sch9p, Rim15p, Msn2/4p a Gis1p výrazně ovlivnila schopnost přežívání U i L buněk v čase. Morfologické a fyziologické změny vyvolané změnami hladin zmíněných proteinů poukazují na fakt, že rozdílná dostupnost živin a tím vyvolaná signalizace hraje důležitou roli ve vývoji kolonií kvasinek.

Klíčová slova: kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, kolonie, živiny, signalizace, Sch9p, Rim15p, Msn2p, Msn4p, Gis1p

Abstract

On solid surfaces, laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 forms horizontally and vertically stratified colonies. Central part of the colony differentiates into U and L cells occupying upper and lower colony regions, respectively. There are many morphological and physiological differences between these two cell types. However, molecular mechanisms of the vertical stratification are still largely unknown. In this study, I analyzed effects of the deletion and overexpression of Sch9p a Rim15p kinases with crucial role in nutrient sensing pathways, of transcription activators Msn2p and Msn4p involved in stress response and of post-diauxic shift transcription factor Gis1p in yeast colony differentiation and U and L cell survival. Microscopic analyses showed changes in morphology of cells in colonies of these strains and decreased ability of vertical stratification in colonies of the strain *rim15Δ* and partially in colonies of the strain P_{TEF}-*SCH9*. Moreover, changed level of these proteins significantly affected long-term survival of U and L cells. Obtained data suggest an involvement of nutrient sensing pathways in colony formation and development.

Keywords: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, colony, nutrients, signaling, Sch9p, Rim15p, Msn2p, Msn4p, Gis1p

Obsah

1	Úvod	12
2	Přehled literatury	14
2.1	Růst a vývoj buněčných populací v tekutých kulturách	14
2.2	Růst a vývoj buněčných populací v koloniích	16
2.2.1	Horizontální diferenciacie buněk kolonie	17
2.2.2	Vertikální diferenciacie buněk kolonie	18
2.3	Dráhy snímající dostupnost živin	20
2.4	Snf1p kináza	20
2.4.1	Struktura	20
2.4.2	Regulace	21
2.4.3	Substráty	22
2.5	Protein kináza A	23
2.5.1	Struktura	23
2.5.2	Regulace	24
2.5.3	Substráty	28
2.6	TOR komplex	28
2.6.1	Struktura	29
2.6.2	Regulace	29
2.6.3	Substráty	30
2.6.4	PP2A fosfatáza	31
2.6.5	Sch9p kináza	32
2.7	Rim15 kináza	34
2.7.1	Struktura	34
2.7.2	Regulace	35
2.7.3	Substráty	37
2.8	Hlavní buněčné procesy ovlivněné dostupností živin	37
2.8.1	Autofágie	37
2.8.2	Přechod na respirační metabolismus	38
2.8.3	Odpověď na stres	40
2.8.4	Buněčná proliferace	41
2.8.5	Translační kapacita buněk	42

3	Cíle práce	44
4	Materiál a metody	45
4.1	Materiál.....	45
4.1.1	Použité mikroorganismy.....	45
4.1.2	Seznam připravených kvasinkových kmenů.....	45
4.1.3	Plasmidy.....	45
4.1.4	Chemikálie a enzymy.....	47
4.1.5	Roztoky.....	48
4.1.6	Média.....	49
4.1.7	Počítačové programy a databáze.....	51
4.2	Metody.....	52
4.2.1	Sterilizace.....	52
4.2.2	Práce s bakteriemi.....	52
4.2.3	Práce s kvasinkovými kulturami.....	54
5	Výsledky	68
5.1	Příprava kmenů.....	68
5.2	Morfologická charakteristika kolonií připravených kmenů.....	75
5.2.1	Morfologie obřích kolonií a produkce amoniaku.....	75
5.2.2	Vertikální diferenciacie kolonií a morfologie buněk centrální části kolonie.....	78
5.2.3	Změny morfologie U a L buněk v čase.....	84
5.3	Hmotnostní poměr U a L buněk.....	92
5.4	Přežívání U a L buněk v čase.....	104
6	Diskuze	118
6.1	Morfologie obřích kolonií.....	118
6.2	Morfologie U a L buněk.....	119
6.3	Vertikální diferenciacie.....	119
6.4	Přežívání buněk v horních a dolních vrstvách během vývoje kolonie.....	120
7	Souhrn	125
8	Seznam použité literatury	126

Seznam zkratek

AMK	aminokyseliny
AMP	5'-adenosinmonofosfát
ASC	doména Sip1p, Sip2p a Gal83p podjednotek vázající Snf4p
Atg	proteiny regulující autofagii (autophagy related proteins)
Atg13p	protein zapojený v regulaci formování autofagosomu, reguluje aktivitu Atg1p
Atg17p	protein zapojený v regulaci formování autofagosomu, reguluje aktivitu Atg1p
Atg1p	protein kináza zapojená v regulaci formování autofagosomu
<i>BCY1</i>	gen kódující regulační podjednotku Bcy1 protein kinázy A
Bcy1p	regulační podjednotka Bcy1 protein kinázy A
<i>bcy1Δ</i>	kmen s delecí v genu pro regulační podjednotku protein kinázy A
Bmh1p	cytoplasmaticky lokalizovaný 14-3-3 protein
Bmh2p	cytoplasmaticky lokalizovaný 14-3-3 protein
C2H2	motiv dvou cysteinů a dvou histidinů obsažený v „zinc finger“ doménách
cAMP	cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát
Cdc25p	faktor katalyzující výměnu GTP za GDP na Ras proteinech
Cdc55p	regulační podjednotka fosfatázového komplexu PP2A
Cdc60p	leucyl-tRNA syntetáza
Cyr1p	adenylátcykláza
Dhh1	protein, který slouží jako označení mRNA, z které má být odstraněna 5' čepička
Ego1p	podjednotka nutná pro vakuolární lokalizaci EGO C
Ego3p	strukturní podjednotka EGO komplexu
EGOC	komplex regulující funkci TORC1 (exit from rapamycin-induced growth arrest)
Elm1p	kináza aktivující Snf1p
FGM	fermentovatelný zdroj uhlíku (fermentable growth medium)
<i>GAL2</i>	gen kódující hexózový transportér
Gal83p	regulační jednotka Snf1p kinázy
GAP	faktor aktivující GTPázovou aktivitu Ras proteinů (GTPase activating protein)
GDP	5'-guanosindifosfát
GEF	faktor katalyzující výměnu GTP za GDP (guanine nucleotide exchange factor)
<i>GIS1</i>	gen kódující Gis1p transkripční faktor
Gis1p	transkripční faktor Gis1
Glc7p	fosfatáza, inaktivuje Snf1p
Glk1P	glukokináza
Gpa2p	heterotrimerní G protein
Gpr1p	glukózový receptor na plazmatické membráně
GTP	5'-guanosintrifosfát
Gtr1p	G protein, podjednotka EGOC, reguluje TORC1
Gtr2p	G protein, podjednotka EGOC, reguluje TORC1
Hsf1p	transkripční faktor, vyvolává odpověď na stres
Hxk1p	hexokináza
Hxk2p	hexokináza
<i>HXT1-17</i>	geny kódující transportéry hexóz
Igo1p	protein inhibující 5'-3' degradaci mRNA, efektor Rim15p
Igo2p	protein inhibující 5'-3' degradaci mRNA, efektor Rim15p
Ira1p	faktor aktivující GTPázovou aktivitu Ras proteinů
Ira2p	faktor aktivující GTPázovou aktivitu Ras proteinů
KIS	doména Sip1p, Sip2p a Gal83p podjednotek vázající Snf1p
Kog1p	protein obsažený v TORC1, reguluje lokalizaci a afinitu k substrátu Tor1/2p
L	buňky spodní vrstvy kolonie (lower cells)
Lst8p	protein obsažený v TORC1, reguluje lokalizaci a afinitu k substrátu Tor1/2p
Maf1p	transkripční faktor, ovlivňuje transkripci zprostředkovanou RNA polymerázou III
Mig1p	transkripční faktor Mig1
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
<i>MSN2</i>	gen kódující Msn2p transkripční faktor
Msn2p	transkripční faktor Msn2
<i>msn2Δ</i>	kmen s delecí genu <i>MSN2</i>

<i>msn2Δ/msn4Δ</i>	kmen s delecí genu <i>MSN2</i> a <i>MSN4</i>
<i>MSN4</i>	gen kódující Msn4p transkripční faktor
Msn4p	transkripční faktor Msn4
<i>msn4Δ</i>	kmen s delecí genu <i>MSN4</i>
Msn5p	exportin Msn5
NQ	typ buněk tekuté kultury (nonquiescent cells)
<i>PDE1</i>	gen kódující nízkoafinitní fosfodiesterázu 1
Pde1p	nízkoafinitní fosfodiesteráza 1, štěpí cAMP
<i>pde1Δ</i>	kmen s delecí genu <i>PDE1</i>
<i>PDE2</i>	gen kódující vysokoafinitní fosfodiesterázu 2
Pde2p	vysokoafinitní fosfodiesteráza 2, štěpí cAMP
PDK1	savčí protein kináza regulovaná ????
PDS	post-diauxický shift
Pho80p	cyklin, váže Pho85p
Pho85p	cyklin dependentní kináza
PIIK	kinázy fosfatidylinositolových kináz (phosphatidylinositol kinase-related kinase)
PKA	protein kináza A
PKB	savčí protein kináza B
Pkh1p	kináza zapojená do sfingolipidy spouštěné signalizace
Pkh2p	kináza zapojená do sfingolipidy spouštěné signalizace
PP2A	komplex proteinových fosfatáz, regulovaný TORC1
<i>PPH21</i>	gen kódující katalytickou podjednotku fosfatázového komplexu PP2A
Pph21p	katalytická podjednotka fosfatázového komplexu PP2A
<i>PPH22</i>	gen kódující katalytickou podjednotku fosfatázového komplexu PP2A
Pph22p	katalytická podjednotka fosfatázového komplexu PP2A
Q	klidové buňky v tekuté kultuře (quiescent cells)
Ras1p	Ras protein 1 zapojený v glukózové signalizaci
Ras2p	Ras protein 2 zapojený v glukózové signalizaci
rDNA	ribozomální deoxyribonukleová kyselina (ribosomal deoxyribonucleic acid)
Reg1p	fosfatáza, inaktivuje Snf1p
Rgs2p	aktivátor GTPázové aktivity Gpa2p
<i>RGT2</i>	gen kódující hexózový transportér
<i>RIM15</i>	gen kódující Rim15p kinázu
Rim15p	protein kináza Rim15
Rrd1p	regulační protein Pph21p katalytické podjednotky fosfatázového komplexu PP2A
Rrd2p	regulační protein Sit4p fosfatázy
Rrn3p	transkripční faktor, ovlivňuje transkripci zprostředkovanou RNA polymerázou I
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
Rts1p	regulační podjednotku fosfatázového komplexu PP2A
Sak1p	kináza aktivující Snf1p,
Sap155p	regulační podjednotka Sit4p fosfatázy
Sap185p	regulační podjednotka Sit4p fosfatázy
Sap4p	regulační podjednotka Sit4p fosfatázy
Sfp1p	transkripční faktor, reguluje transkripci ribozomálních proteinů
<i>SCH9</i>	gen kódující Sch9p kinázu
Sch9p	protein kináza Sch9
<i>sch9Δ</i>	kmen s delecí genu <i>SCH9</i>
Sip1p	regulační podjednotka Snf1p kinázy
Sip2p	regulační podjednotka Snf1p kinázy
<i>SIT4</i>	gen kódující katalytickou podjednotku Sit4p fosfatázy
Sit4p	protein fosfatáza regulována TORC1
Snf1p	katalytická jednotka protein kinázy Snf1
<i>SNF3</i>	gen kódující hexózový transportér
Snf4p	aktivační podjednotka Snf1p kinázy
STRE	oblast v promotoru genů stresové odpovědi (stress response element)
Tap42p	regulační protein fosfatáz PP2A a Sit4p
Tco89p	protein obsažený v TORC1, reguluje lokalizaci a afinitu k substrátu Tor1/2p
Tor1p	protein kináza Tor1, je součástí TORC1
Tor2p	protein kináza Tor2, je součástí TORC1 i TORC2
TORC1	TOR komplex 1

TORC2	TOR komplex 2
Tos3p	kináza aktivující Snf1p
<i>TPK1</i>	gen kódující katalytickou podjednotku Tpk1p protein kinázy A
Tpk1p	katalytická podjednotka Tpk1 protein kinázy A
<i>TPK2</i>	gen kódující katalytickou podjednotku Tpk2p protein kinázy A
Tpk2p	katalytická podjednotka Tpk2 protein kinázy A
<i>TPK3</i>	gen kódující katalytickou podjednotku Tpk3p protein kinázy A
Tpk3p	katalytická podjednotka Tpk3 protein kinázy A
U	buňky horní vrstvy kolonie (upper cells)
Vam6p	faktor katalyzující vazbu GTP na G proteiny Gtr1p a Gtr2p
Yak1p	protein kináza zapojená v signalizaci vyvolané dostupností živin

1 Úvod

Kvasinkové buňky jsou důležitým modelem molekulární biologie, proto je jejich fyziologie a morfologie laboratořemi studována dlouhou dobu. Většina dosavadních prací se zaměřovala na charakterizaci kvasinek kultivovaných v tekutých třepaných kulturách. Výzkum kvasinek jako individuálních buněk umožnil odhalit mnohé základní regulační mechanismy a charakterizovat dělení a růst buněk, nicméně během růstu kvasinek v tekuté třepané kultuře není možné vytvoření gradientu živin, signálních molekul a pozičního efektu, všechny buňky mají přibližně stejné podmínky a vzniká relativně homogenní populace. V buněčné suspenzi, která se nachází ve stacionární fázi růstu, je možné nalézt dva odlišné typy buněk, buňky Q („quiescent“) a NQ („nonquiescent“). Pokud kvasinkové buňky rostou na pevném podkladu, vytváří mnohobuněčné struktury, v rámci kterých se vznikají nejrůznější gradienty a mikroprostředí, buňky mohou komunikovat pomocí signálních molekul a diferencovat se na jednotlivé přesně lokalizované subpopulace.

Obří kolonie tvořené laboratorním kmenem kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 prochází během růstu fázemi acidifikace a alkalizace média. Alkalizace je provázána uvolňováním plynného amoniaku koloniemi. Amoniak slouží jako signální molekula, která hraje roli v synchronizaci vývoje kolonií, a při metabolických změnách a diferenciaci buněk v rámci kolonie. Diferenciace buněk v kolonii probíhá v horizontálním i vertikálním směru, umožňuje dlouhodobé přežití některých buněčných subpopulací a zvyšuje jejich odolnost vůči stresovým podmínkám. V horizontálním směru se buňky, které jsou lokalizované v centrální části kolonie, liší od buněk lokalizovaných na periférii např. schopností dělit se, metabolickou aktivitou a výskytem buněk s charakteristikami programované buněčné smrti. V centrální části kolonie dochází k vertikální diferenciaci, buňky horní vrstvy (U buňky, „upper“) a spodní vrstvy (L buňky, „lower“) se odlišují v mnoha aspektech, včetně životaschopnosti, odolnosti vůči stresovým podmínkám, morfologie a metabolismu. Zjednodušeně lze říci, že buňky spodní vrstvy slouží jako výživa pro buňky, které jsou lokalizované v horní vrstvě kolonie, a tedy že U buňky prospívají na úkor L buněk.

V roce 2012 publikovala Laboratoř biologie kvasinkových kolonií článek, ve kterém jsou detailně popsány některé vlastnosti horních a spodních buněk centrální části kolonie. Publikace také popisuje metabolické a regulační paralely mezi těmito dvěma subpopulacemi buněk a buňkami organismu a nádoru. Výsledky naznačily, že významnou regulační roli ve vzniku dvou hlavních subpopulací buněk a jejich vzájemném vztahu hrají dráhy, které

signalizují na základě dostupnosti živin. Mnoho drah regulovaných dostupností živin je evolučně konzervovaných od kvasinek po savčí organismy, proto lze předpokládat, že odhalení jejich role ve formování kvasinkových kolonií by mohlo přispět k odhalení regulačních mechanismů v buňkách rakovinných.

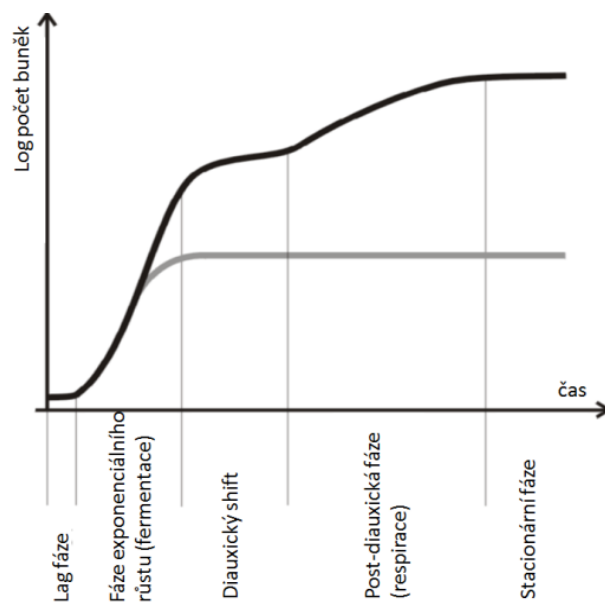
Regulace vyvolané dostupností živin zahrnuje mnoho drah a buněčných pochodů. Pokud buňky rostou na komplexním médiu, které obsahuje fermentovatelný zdroj uhlíku, aktivní protein kináza A (PKA) a TOR komplex 1 (TORC1) spouští signální kaskádu, jejímž výsledkem je růst, dělení a metabolismus založený na fermentaci. Pokud dojde k vyčerpání některé z esenciálních živin, protein kináza A a TOR komplex 1 jsou inhibovány. Signalizaci v nepříznivých podmínkách obstarává Snf1p kináza, výsledkem je zpomalení růstu, dělení, přechod na respirační metabolismus a všeobecná odpověď na stres.

Ve své práci jsem se zaměřila na vliv kináz Rim15p a Sch9p. Obě mají centrální roli v signalizaci spouštěnou dostupností živin, jejich regulace je založena na kombinaci signálů pocházejících od hlavních drah monitorujících živiny. Dále jsem se věnovala vlivu transkripčních faktorů Msn2p a Msn4p, které jsou známé jako aktivátory obecné odpovědi na stres a vlivu transkripčního faktoru Gis1p, který je nezbytný pro přechod z metabolismu založeného na fermentaci na metabolismus respirační. Regulace a vliv těchto proteinů je známý v případě kvasinek kultivovaných v tekutém médiu. Na základě výskytu gradientů živin a signálních molekul v rámci kolonie je pravděpodobné, že aktivita a kombinace účinků těchto drah se liší v různých buněčných subpopulacích a hraje roli ve vývoji kolonie.

2 Přehled literatury

2.1 Růst a vývoj buněčných populací v tekutých kulturách

Během růstu kvasinkových buněk v tekutých kulturách dochází neustále k míchání média a nemohou proto vznikat gradienty živin ani signálních molekul. Kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae* v komplexním tekutém médiu, které obsahuje jako zdroj uhlíku glukózu, vykazují několik fází růstu. Jak je patrné z obrázku 1, první je tzv. „lag“ fáze, během které se buňky adaptují na nové podmínky. Poté následuje fáze exponenciálního růstu, dochází k fermentaci glukózy, buňky pučí a jejich počet exponenciálně roste. Během exponenciální fáze růstu se v kultuře vyskytuje pouze jeden typ buněk, při centrifugaci v hustotním gradientu nedochází k jejich rozdělení. Po vyčerpání glukózy dochází k takzvanému „diauxickému shiftu“, během kterého buňky mění metabolismus uhlíku z fermentace na respiraci. V následné „post-diauxické fázi“ jsou jako zdroje uhlíku využívány produkty dřívější fermentace, jako například etanol nebo acetát, využity mohou být i jiné nefermentovatelné zdroje, jako je glycerol. I v tomto stádiu buňky rostou a pučí, ale ne v takové míře jako v případě exponenciální fáze. Pokud dojde k vyčerpání i těchto zdrojů uhlíku, buňky vstupují do stacionární fáze, která je nezbytná pro dlouhodobé přežití v nepříznivých podmínkách. I v této fázi buňky mohou růst a pučet, a pokud je stejná rychlost pučení a umírání buněk, celkový počet buněk v kultuře se nemění (Stahl, Salem et al. 2004). Pokud dojde během exponenciálního růstu k vyčerpání jiného esenciálního prvku, například dusíku nebo fosfátu, buňky přechází do stacionární fáze i v přítomnosti glukózy (Swinnen, Wanke et al. 2006)



Obr. 1 Růstová křivka buněk v tekuté kultuře. Osa x znázorňuje čas kultivace buněk a popisy jednotlivých fází růstu, osa y logaritmickejší počet buněk. Černě je vynesena růstová křivka buněk v komplexním médiu s glukózou, šedě růstová křivka buněk v glukózovém komplexním médiu, ve kterém chybí některý z esenciálních zdrojů živin. Překresleno podle (Swinnen, Wanke et al. 2006).

V buněčných kulturách v tekutém médiu, které se nachází ve stacionární fázi, je možné pomocí centrifugace v hustotním gradientu nalézt dvě populace buněk, „Q“ (quiescent) a „NQ“ (nonquiescent). Buňky, které vykazují vyšší hustotu (po hustotní centrifugaci se nachází ve spodní frakci), neboli Q buňky, jsou stejně velké ($4,6 \pm 0,33 \mu\text{m}$), nepučí, obsahují velké množství glykogenu, malou vakuolu a stěží detekovatelné endoplasmatické retikulum a mitochondrii. Naproti tomu buňky obsažené v horní frakci (označovány také jako NQ), tedy méně husté buňky, jsou menší ($4,1 \pm 0,34 \mu\text{m}$), některé pučí a neobsahují velké množství glykogenu. Liší se i morfologií organel, obsahují velkou vakuolu, řadu mitochondrií a dobře vyvinuté endoplasmatické retikulum. Vakuola buněk z horní frakce obsahuje množství váčků, které poukazují na autofágii (Allen, Buttner et al. 2006).

Buňky pocházející z horní a spodní frakce se liší i ve fyziologických aspektech. Spodní buňky mají schopnost dlouhodobého přežívání, po 28 denní kultivaci jich je více než 85% životaschopných, naopak spodní buňky vykazují po stejně dlouhé kultivaci pouze 47% přežívání. Prakticky všechny buňky spodní frakce jsou po 7 dnech kultivace schopné vytvořit kolonii, po 28 dnech kolonii vytvoří 12% buněk. Pouze 36% buněk z horní frakce je schopných po 7 dnech kultivace vytvořit kolonii, po 28 dnech už jsou to pouze 3%. Testy zabývající se tolerancí vůči teplotnímu šoku ukázaly, že buňky spodní frakce jsou odolnější než buňky frakce horní (Allen, Buttner et al. 2006).

Rozdíly mezi Q a NQ populací buněk jsou patrné i v akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) a programované buněčné smrti. Q buňky, tedy spodní buňky, na rozdíl od NQ buněk neakumulují ROS. Velké rozdíly je také možné najít v programované buněčné smrti, neboli apoptóze. Jenom malé procento Q buněk vykazuje některé znaky apoptózy a to i v pozdějších dnech. Naopak procento NQ buňky, které vykazují znaky apoptózy a nekrózy, je vysoké a s delším časem kultivace výrazně rostou (Allen, Buttner et al. 2006).

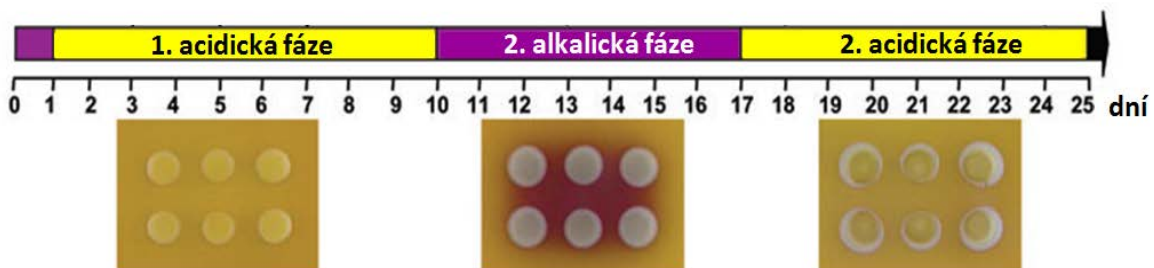
Transkripční analýza odhalila 68 transkriptů, které jsou typické pro Q buňky a 266 transkriptů typických pro NQ buňky, z nichž 65 je typických pro rekombinace DNA. Další transkripty typické pro NQ buňky jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a replikace DNA. NQ buňky tak s největší pravděpodobností nejsou schopné zastavit buněčný cyklus v G0 fázi a S fáze buněčného cyklu v kombinaci s nedostatkem glukózy způsobuje jejich rychlejší odumírání. Q buňky exprimovaly mnoho genů zapojených do odpovědi na zvýšenou hladinu ROS, které se vyskytují během respirace a mnoho genů zapojených do energetického metabolismu (Allen, Buttner et al. 2006).

2.2 Růst a vývoj buněčných populací v koloniích

Saccharomyces cerevisiae tvoří během růstu na pevném médiu kolonie. Mikrokolonie vznikají z jedné buňky, obří kolonie, neboli makrokolonie vznikají z kapky buněčné suspenze. Růst kolonií na pevném médiu doprovází vznik gradientu živin a signálních molekul, které mají na vývoj kolonií zásadní vliv. Kolonie prochází dvěma fázemi růstu. První fáze je velice podobná exponenciální fázi růstu v tekutém médiu, dochází k rychlému růstu, naprostá většina buněk pučí. Během následující fáze většina buněk z centrální části kolonie vstoupí do stacionární fáze, buňky na periferních oblastech kolonie jsou i nadále schopné růst a pučet. V tekutých kulturách je přechod z exponenciální fáze růstu do post-diauxické fáze závislý na zdroji uhlíku a je provázen změnou metabolismu z fermentativního na respirační. Pokud je hlavním zdrojem uhlíku etanol (nebo jiný zdroj, který kvasinky nemohou fermentovat), k přechodům mezi respiračním a fermentačním metabolismem nedochází. K přechodu buněk kolonií z exponenciální fáze růstu do fáze lineárního růstu dochází vždy, tedy v případě růstu na fermentačním i respiračním médiu (Meunier and Choder 1999).

Kolonie mnoha kvasinek, včetně *Saccharomyces cerevisiae*, během růstu na pevném glycerolovém komplexním médiu vzájemně komunikují pomocí amoniaku (Palkova, Janderova et al. 1997). Amoniak je koloniemi uvolňován v pulsech, způsobuje synchronizaci růstu, vývoje a metabolismu kolonií, které rostou ve vzájemné blízkosti. Fáze uvolňování

amoniaku jsou vystřídány fázemi, během kterých dochází k okyselení okolního média. Z obrázku číslo 2 je patrné, že první fáze alkalizace je velice krátká a je provázena uvolňováním amoniaku. Po přibližně 24 hodinách následuje takzvaná první acidická fáze, pevné médium je kvasinkami okyselováno na pH cca 5. Po první acidické fázi začne docházet k uvolňování amoniaku jednou či více koloniemi. Amoniak působí indukčně na okolní kolonie, které také zvýší produkci amoniaku a tak dochází ke koordinaci vývoje a metabolických změn všech sousedních kolonií. Fáze uvolňování amoniaku je doprovázena zvýšením pH média na hodnoty 6,5-7,5, proto se tato fáze růstu nazývá alkalická. Periodické střídání acidických a alkalických fází je provázeno střídáním fází růstu kolonie (fáze acidická) a fází, kdy je růst částečně inhibován (alkalická) (Palkova and Forstova 2000).



Obr. 2 Střídání acidické a alkalické fáze během růstu kolonií *S.cerevisiae*. Na horní liště jsou fialově znázorněny fáze uvolňování amoniaku, žlutě je znázorněna fáze okyselení média. Osa pod lištou ukazuje počet dní růstu kolonií. Fotografie zachycují obří kolonie *S.cerevisiae* BY4742 během acidické a alkalické fáze růstu na GM+BKP. Překresleno podle (Vachova, Kucerova et al. 2009).

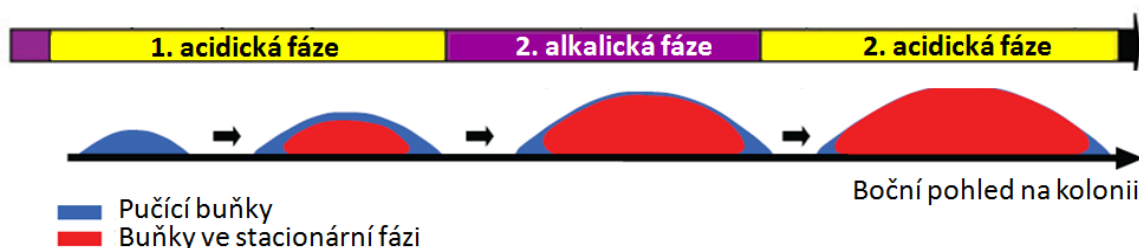
Fáze uvolňování amoniaku a okyselování média jsou spojeny se změnami genové exprese. Největší rozdíly se vyskytují v případě genů, které kódují metabolické enzymy. Geny pro citrátový cyklus a oxidativní fosforylaci jsou během přechodu z acidické do alkalické fáze reprimovány, naopak dochází k indukci genů metabolismu aminokyselin, nukleotidů a mastných kyselin. Reprimovány jsou také geny stresové odpovědi a různé transportéry organických sloučenin, včetně transportérů hexózy. Některé transportéry iontů jsou naopak indukovány (Palkova, Devaux et al. 2002).

Amoniaková signalizace má za následek vznik různých buněčných typů v rámci kolonie. Buňky se liší v horizontálním i vertikálním směru.

2.2.1 Horizontální diference buněk kolonie

Rozrůzněni buněk ve středové a okrajové části kolonie je závislé na amoniakové signalizaci. Před amoniakovou signalizací se středové a okrajové buňky příliš neliší, ve všech částech kolonie je možné najít stejně malé množství buněk, které mají znaky typické pro

programovanou buněčnou smrt, jako je zvýšená hladina reaktivních forem kyslíku, fragmentované DNA a zvýšené hladiny proteáz. Po amoniakové signalizaci přestanou buňky lokalizované na okrajích kolonie tyto znaky jevit, naopak ve středové části kolonie je programovaná buněčná smrt hojnější. Z obrázku číslo 3 je patrné, že buňky, které se vyskytují na okrajích, jsou především mladé buňky, které jsou schopné pučet, naopak centrální část je tvořena starými buňkami (Vachova and Palkova 2005).



Obr. 3 Horizontální diferenciaci buněk kolonie v čase. Lišta zobrazuje střídání alkalické (fialová) a alkalické (žlutá) fáze růstu. Boční pohled na kolonii modře zobrazuje pučící buňky, červeně buňky ve stacionární fázi. Překresleno podle (Vachova, Cap et al. 2012)

Buňky, které se vyskytují v periferiích kolonie, se od buněk lokalizovaných centrálně odlišují i množstvím a aktivitou různých enzymů. V okrajových buňkách vykazují vyšší aktivitu enzymy peroxisomu, jako je například kataláza, mitochondriální enzymy zapojené do metabolismu uhlíku a exportéry amoniaku. Buňky v centrální části kolonie produkují více enzymů zapojených do obrany proti stresovým podmínkám, jako například superoxidodismutáza. Hlavními producenti amoniaku jsou buňky lokalizované v okrajových částech kolonie, buňky pocházející z centrální části amoniak produkují výrazně méně (Vachova, Kucerova et al. 2009).

2.2.2 Vertikální diferenciaci buněk kolonie

Kolonie, které prošly alkalickou fází, jsou v centrální části vertikálně rozděleny ostrým přechodem na dvě hlavní vrstvy, horní a spodní. Horní vrstva, která se skládá z takzvaných U (upper) buněk, je tenčí, v koloniích starých 15 dní dosahuje tloušťky $150 \pm 30 \mu\text{m}$. Spodní vrstva, která je složená z L (lower) buněk, má po 15 denním růstu kolonií na glycerolovém médiu tloušťku $200 \pm 50 \mu\text{m}$.

Buňky, které se nachází v horní a ve spodní vrstvě kolonie, se liší. U buňky jsou větší ($3.92 \pm 0.79 \mu\text{m}$), pučí a obsahují mnoho malých vakuol a velké mitochondrie, které neobsahují prakticky žádné krysty, horní buňky mají sníženou respiraci. Buňky horní vrstvy

obsahují také mnoho lipidických tělísek a akumulují glykogen. L buňky jsou menší ($2,87 \pm 0,46 \mu\text{m}$), nepučí, nesou jednu velkou vakuolu a mnoho malých mitochondrií s dobře vyvinutým systémem krist, které umožňují respirační metabolismus. Na rozdíl od L buněk obsahují často jen jedno malé lipidické tělísko a neakumulují glykogen (Cap, Stepanek et al. 2012).

Rozdíly mezi buňkami, které se v rámci kolonie vyskytují v horní a spodní vrstvě, jsou zřejmé i při odpovědi na stres a při dlouhodobém přežívání. Až polovina U buněk pocházejících z 50 dní staré kolonie je schopná vytvořit další kolonii, v případě L buněk má tuto schopnost pouze 10% buněk. Pro schopnost dlouhodobého přežívání buněk horní vrstvy je důležitá autofagie, schopnost přežití L buněk autofágií ovlivněna není. U buňky v porovnání s L buňkami vykazují vyšší odolnost vůči stresovým podmínkám, jako je vysoká teplota a působení etanolu. Reaktivní formy kyslíku (ROS) se tvoří především v buňkách spodní vrstvy, L buňky obsahují až třikrát větší množství ROS než U buňky (Cap, Stepanek et al. 2012).

Transkripční analýza 15 a 20 dní starých kolonií odhalila rozdílný přepis genů v U a L buňkách. Transkripce v rámci jedné vrstvy buněk se liší i v závislosti na čase, nicméně hlavní kategorie přepisovaných genů zůstávají mezi 15 a 20 dnem zachovány. U buňky přepisují převážně geny translačního aparátu a geny kódující metabolické enzymy, transportéry živin nebo iontů a geny, které kódují glykolytické enzymy a enzymy zapojené do metabolismu aminokyselin, nukleotidů a vitamínů. Zvýšená transkripce v L buňkách se týká především genů zapojených do biogeneze mitochondrií, genů kódujících enzymy nezbytné pro oxidativní fosforylaci, chaperony, komponenty ubiquitin-proteazomové degradační dráhy a transkripční faktory spouštějící odpověď na stres. Zvýšená transkripce se vyskytuje také v případě některých genů ovlivňujících metabolismus lipidů (Cap, Stepanek et al. 2012).

Buňky horní vrstvy vykazují některé znaky typické pro buňky, které rostou na bohatém zdroji živin, jako je například exprese glykolytických genů a vysoká translační kapacita buněk. Tyto znaky jsou spojovány s aktivní protein kinázou A a TOR komplexem 1. Na druhou stranu, horní buňky vykazují některé vlastnosti typické pro hladovějící buňky, jako je akumulace glykogenu a autofagie (Loewith, Jacinto et al. 2002) (Wang, Pierce et al. 2004). Horní buňky tedy mají speciální metabolismus, který jim s největší pravděpodobností umožňuje dlouhodobé přežití. L buňky jsou typicky hladovějící buňky, metabolismus uhlíku

mají založený na respiraci, produkují velké množství transkripčních faktorů, které spouští odpověď na stres (Nehlin and Ronne 1990).

2.3 Dráhy snímající dostupnost živin

Kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae*, které rostou v komplexním tekutém médiu s glukózou nebo s jiným preferovaným fermentovatelným zdrojem uhlíku, se od hladovějících buněk liší v mnoha fyziologických aspektech. Dobře charakterizovány jsou změny v akumulaci glykogenu a trehalózy, odolnosti proti stresovým podmínkám, růstu a dělení. Rozdíly jsou způsobeny signálními drahami, které snímají dostupnost živin, především Snf1p dráhou, dráhou protein kinázy A a TOR komplexem 1.

V buňkách rostoucích na médiu, které obsahuje všechny důležité živiny, včetně fermentovatelného zdroje uhlíku (především glukózy), je aktivní protein kináza A a TOR komplex 1. Pokud dojde k limitaci některé z živin, dochází i v přítomnosti glukózy k přechodu buněk do stacionární fáze. Během hladovění je protein kináza A a TOR komplex 1 neaktivní, velkou roli hraje signalizace vyvolaná Snf1p komplexem (Nehlin and Ronne 1990). Pokud je limitující živina navrácena do média, buňky opustí stacionární fázi a opět získají fenotyp buněk rostoucích na fermentovatelném komplexním médiu. Během signalizace po přidání limitující živiny hraje důležitou roli takzvaná FGM dráha (fermentable growth medium-induced pathway, dráha indukovaná fermentovatelným médiem), která zajišťuje propojení signálů drah snímajících dostupnost glukózy a ostatních živin. Velice důležitou složkou FGM dráhy je protein kináza Sch9p (Crauwels, Donaton et al. 1997), (Kraakman, Lemaire et al. 1999), (Binda, Peli-Gulli et al. 2009).

2.4 Snf1p kináza

Dráha AMP (5'-adenosinmonofosfát) Snf1p kináza se uplatňuje především v podmínkách, kdy buňky *Saccharomyces cerevisiae* rostou na médiu, které jako zdroj uhlíku neobsahuje glukózu. Signalizace způsobená Snf1p kinázou spouští transkripci glukózou inhibovaných genů, ovlivňuje tak mnoho buněčných procesů, včetně respirace, akumulace glykogenu a růstu (Nehlin and Ronne 1990).

2.4.1 Struktura

Snf1p serin/treoninová kináza patří do rodiny takzvaných AMPK (adenosinmonofosfátem aktivované kinázy). V buňkách se vyskytuje jako heterotrimerní

protein, obsahuje α katalytickou podjednotku Snf1p, β regulační a zároveň „scaffold“ podjednotku, kterou tvoří jeden ze tří proteinů Gal83p, Sip1p nebo Sip2p, a γ aktivační podjednotku Snf4p (Celenza and Carlson 1984), (Celenza, Eng et al. 1989), (Yang, Jiang et al. 1994).

Beta podjednotku mohou tvořit tři různé proteiny: Sip1p, Sip2p nebo Gal83p. Všechny tři obsahují v C-koncové části „KIS“ doménu, na kterou se váže Snf1p a „ASC“ doménu, která váže Snf4p. Delece tří genů kódujících proteiny beta podjednotky je pro buňky letální, životaschopné jsou buňky s alespoň jedním funkčním genem. Analýzou kmenů, které měly deletované dva geny beta podjednotky a jeden měly funkční, bylo zjištěno, že Snf1p kináza s různými beta podjednotkami vykazuje různou substrátovou specifitu. Substrátovou specifitu může zprostředkovávat beta podjednotka přímou interakcí se substrátem, jako je to v případě Gal83p, který přímo váže Sip4p transkripční faktor. Druhou možností regulace specifity je různá lokalizace Snf1p kinázy v rámci buňky. Pokud buňky rostou na médiu s glukózou a Snf1p kináza je neaktivní, Sip1p, Sip2p a Gal83p jsou lokalizovány v cytoplasmě buněk. Na nefermentovatelném zdroji uhlíku se lokalizace mezi jednotlivými proteiny liší. V hladovějících buňkách je Sip1p převážně lokalizována ve vakuole, Sip2p zůstává v cytoplasmě a Gal83p je transportován do jádra (Vincent and Carlson 1999), (Schmidt and McCartney 2000), (Vincent, Townley et al. 2001).

2.4.2 Regulace

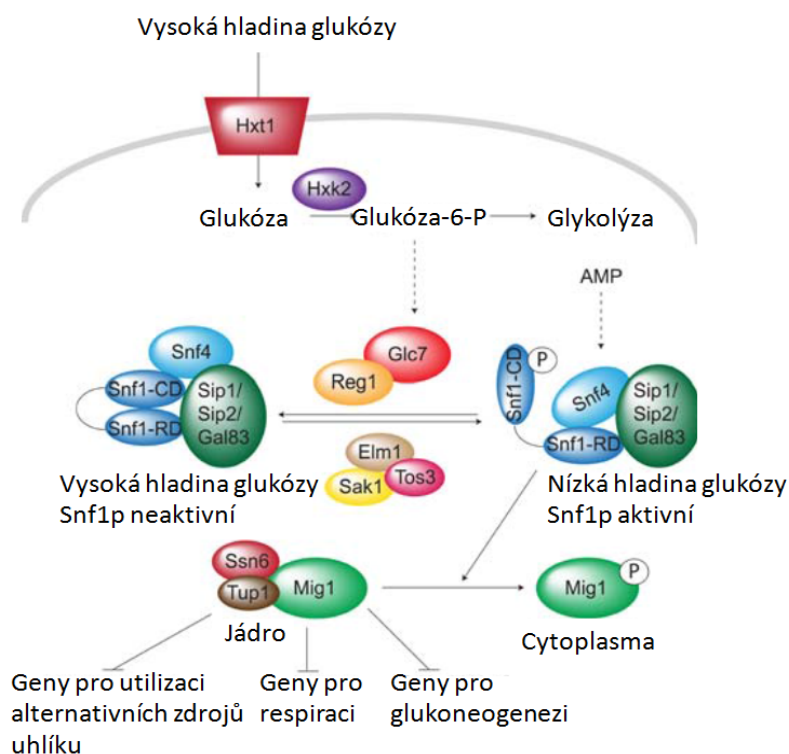
Interakce Snf1p katalytické podjednotky a aktivační podjednotky Snf4p je silně ovlivňována přítomností glukózy. Snf1p podjednotka nese na C-koncové části regulační doménu a na N-terminální části katalytickou doménu. Pokud má buňka dostatek glukózy, C-koncová a N-koncová část spolu interagují, Snf1p se tak inaktivuje autoinhibicí. Pokud je buňka vystavena podmínkám, ve kterých hladoví, Snf4p aktivační podjednotka se váže do C-koncové části Snf1p, zabrání tak interakci s katalytickou doménou Snf1p a kináza je aktivní (Jiang and Carlson 1996), (Celenza, Eng et al. 1989).

Pokud buňka hladoví a vykazuje tak vysokou hladinu AMP (5'-adenosinmonofosfátu), protein kináza Snf1P je aktivní. Snf1p nedokáže sama o sobě snímat množství AMP v buňce, regulaci zajišťují tři kinázy a fosfatáza. Z obrázku číslo 4 je patrné, že aktivaci Snf1p zajišťují kinázy Tos3p, Sak1p a Elm1p, které fosforylují Snf1p threoninový zbytek v pozici 210 v aktivační smyčce, naopak inaktivaci zajišťuje Glc7p-Reg1p fosfatázový komplex, který

tento zbytek defosforyluje (Nath, McCartney et al. 2003), (Sutherland, Hawley et al. 2003), (Ludin, Jiang et al. 1998).

2.4.3 Substráty

Mig1p je transkripční represor. Jeho struktura obsahuje dva „zinc finger“ motivy v N-terminální části a C-terminální doménu, přes kterou se váže na korepresory. V kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* se během růstu na glukóze účastní glukózové represe, Mig1p působí jako inhibitor transkripce genů, které jsou zapojené do zpracování alternativních zdrojů uhlíku, jako je sacharóza, galaktóza, maltóza a melibióza, a genů, které se přepisují při respiraci a glukoneogenezi (Nehlin and Ronne 1990). Mig1p represor je regulován změnami lokalizace v buňce. Pokud buňky používají jako zdroj uhlíku glukózu, Mig1p je lokalizován v jádře a negativně reguluje transkripci genů pro zpracování alternativních zdrojů uhlíku, po vyčerpání glukózy je Mig1p translokován do cytoplasmy a k inhibici transkripce nedochází. Lokalizace je závislá na fosforylaci zprostředkované Snf1p kinázou v místě jaderného exportního signálu. Toto místo je po fosforylaci rozeznáno Msn5p exportinem a Mig1p je translokován do cytoplasmy. Fosforylace způsobená Snf1p kinázou má také za následek neschopnost Mig1p vázat korepresory, které jsou konstitutivně vázány v promotorových oblastech genů nepřepisovaných v přítomnosti glukózy, a tak nedochází k jejich inhibici (De Vit, Waddle et al. 1997), (DeVit and Johnston 1999), (Papamichos-Chronakis, Gligoris et al. 2004).



Obr. 4 Regulace a substráty Snf1p dráhy. Vysoká hladina glukózy způsobuje defosforylaci zprostředkovanou Glc7-Reg1 fosfatázovým komplexem a tím i inhibici Snf1p kinázy. Transkripční faktor Mig1p je lokalizován v jádře, kde inhibuje transkripci genů pro glukoneogenezi, respiraci a utilizaci alternativních zdrojů uhlíku. Snížení hladiny glukózy způsobí aktivaci kináz Ekm1p, Sak1p a Tos3p, které fosforylují a tím aktivují Snf1p, která dále fosforyluje Mig1p a tím spouští jeho translokaci do cytoplasmy. Překresleno podle (Smets, Ghillebert et al. 2010)

2.5 Protein kináza A

Dráha cAMP (cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát) – PKA (protein kináza A) je hlavní dráhou regulovanou dostupností zdroje uhlíku. Ovlivňuje mnoho buněčných pochodů, včetně růstu, pučení, odpovědi na stres, autofágie a metabolismu (Gorner, Durchschlag et al. 2002), (Budovskaya, Stephan et al. 2004), (Lee, Cho et al. 2008).

2.5.1 Struktura

Protein kináza A je heterotetramer složený ze dvou katalytických a dvou regulačních podjednotek. Genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje tři geny kódující katalytické podjednotky: *TPK1*, *TPK2* a *TPK3*. Katalytické podjednotky vykazují vysoké procento homologie v C-terminální části, naopak N-terminální domény jsou vysoce heterogenní, liší se sekvencí aminokyselinových zbytků i délkou. Kmeny, které nesou delecii ve všech třech genech kódujících katalytické podjednotky, nejsou životaschopné. Přestože pro růst a pučení je dostatečná přítomnost pouze jedné (jakékoli) katalytické podjednotky PKA, každá z těchto podjednotek má svůj unikátní substrátovou specifitu. Podjednotka Tpk1p

rozpoznává 256 substrátů, Tpk2p 29 substrátů, podjednotka Tpk3p 79 substrátů, pouze 8 substrátů je rozpoznáváno všemi podjednotkami (Toda, Cameron et al. 1987), (Ptacek, Devgan et al. 2005). Regulační podjednotku protein kinázy A tvoří homodimer podjednotek kódovaných genem *BCY1*. Kmeny s delecí v genu kódujícím Bcy1p rostou i na chudém médiu a vykazují zvýšenou citlivost k teplotnímu šoku (Toda, Cameron et al. 1987).

Během exponenciálního růstu na glukóze jsou regulační podjednotky Bcy1p a katalytická podjednotka Tpk2p lokalizovány v jádře, Tpk1p a Tpk3p se vyskytují v jádře i v cytoplasmě. Ve stacionární fázi růstu a během růstu na glycerolu jsou katalytické i regulační podjednotky lokalizovány především v cytoplasmě buněk (Tudisca, Recouvreux et al. 2010).

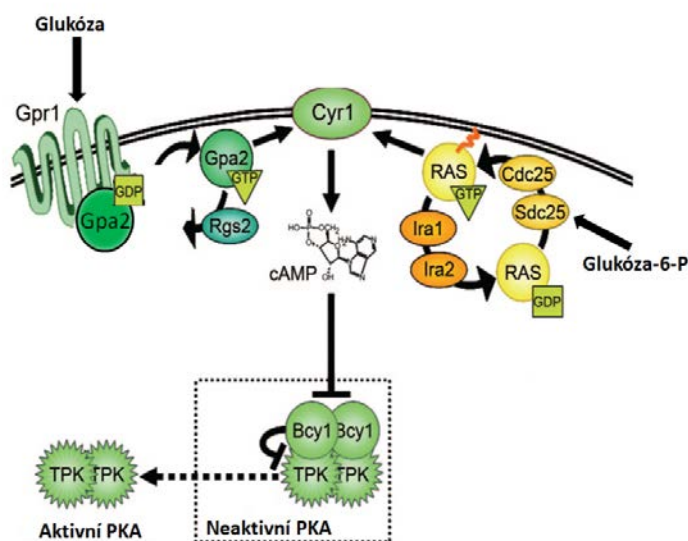
2.5.2 Regulace

2.5.2.1 Regulace extracelulárním zdrojem uhlíku

Aktivita protein kinázy A je regulována dostupností fermentovatelného zdroje uhlíku ve vnějším prostředí pomocí transmembránového receptoru spřaženého s G-proteinem. Tato dráha reaguje především na vyšší koncentrace D-glukózy a sacharózy v okolním prostředí (Rolland, De Winde et al. 2000). Receptor Gpr1p sedmkrát prochází cytoplasmatickou membránou, dlouhá třetí smyčka a C-koncová doména směřují do cytosolu a interagují s heterotrimerním G-proteinem Gpa2p. K interakci C-koncové domény s Gpa2p dochází po změně konformace vyvolané navázáním glukózy nebo jiného fermentovatelného zdroje na receptor (Yun, Tamaki et al. 1997), (Yun, Tamaki et al. 1998). Konformační změna má za následek navázání GTP (5'-guanosintrifosfát) na místo GDP (5'-guanosindifosfát) na Gpa2p. Podjednotka α Gpa2p aktivuje adenylátcyklázu Cyr1p, podjednotky β a γ zůstávají v komplexu. Aktivovaná Cyr1p katalyzuje reakci, při níž z ATP vzniká cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát cAMP (Kraakman, Lemaire et al. 1999), (Colombo, Ma et al. 1998), (Xue, Battle et al. 1998). Na obě regulační podjednotky protein kinázy A se naváží dva cAMP, dojde ke konformační změně a rozpadu heterotetrameru na homodimer Bcy1p a dva monomery Tpk1-3p (Cooper 2003). Ukončení signalizace vyvolané vazbou GTP na Gpa2p zajišťuje protein Rgs2p. Protein Rgs2p se váže na α podjednotku Gpa2p a stimuluje její GTPázovou aktivitu, dochází k hydrolýze GTP a inaktivaci Gpa2p (Versele, de Winde et al. 1999).

2.5.2.2 Regulace vnitrobuněčným zdrojem uhlíku

Regulaci aktivity protein kinázy A v závislosti na vnitrobuněčném množství glukózy nebo jiného fermentovatelného zdroje uhlíku zprostředkovávají Ras proteiny. Na rozdíl od dráhy Gpr1p-Gpa2p dochází k aktivaci dráhy snímající vnitrobuněčnou dostupnost živin i za přítomnosti malého množství glukózy nebo jiných fermentovatelných monosacharidů (Rolland, De Winde et al. 2000). Genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje dvacet genů pro hexózové transportéry: *HXT1-17*, *GAL2*, *SNF3* a *RGT2*, liší především ve specifitě a afinitě vůči substrátu (Boles and Hollenberg 1997). Transport glukózy nebo jiného fermentovatelného zdroje je nutný pro aktivaci dráhy, zapojení různých transportérů nehraje specifickou roli v aktivaci dráhy vyvolávající zvýšení množství cAMP (Rolland, Wanke et al. 2001). Prvním procesem probíhajícím po vstupu hexózy do buňky je fosforylace. V kvasinkových buňkách jí zajišťují tři hexokinázy: glukokináza Glk1p a hexokinázy Hxk1p a Hxk2p (Lobo and Maitra 1977), (Maitra 1970). Přítomnost fosforylovaného fermentovatelného zdroje uhlíku má za následek aktivaci Cdc25p, který funguje jako takzvaný GEF faktor, tedy faktor katalyzující výměnu GDP za GTP na Ras proteinech (Munder and Kuntzel 1989), (van Aelst, Jans et al. 1991). Ras proteiny Ras1p a Ras2p po navázání GTP aktivují Cyr1p adenylátcyklázu (Breviario, Hinnebusch et al. 1986), (Colombo, Ronchetti et al. 2004). Aktivace adenylátcyklázy vede ke vzniku cAMP, který výše zmíněným mechanismem aktivuje PKA. Inhibici Ras1p a Ras2p zajišťují Ira1p a Ira2p proteiny, takzvané GAP faktory, které katalyzují hydrolýzu GTP navázaného na Ras proteinech (Tanaka, Matsumoto et al. 1989), (Tanaka, Nakafuku et al. 1990). Regulace protein kinázy A dostupností glukózy je znázorněna na obrázku 5.



Obr. 5 Regulace protein kinázy A dostupností extracelulární a vnitrobuněčné glukózy. Přítomnost extracelulární glukózy je snímána receptorem Gpr1p. Po navázání glukózy Gpr1p iniciuje výměnu GTP za GDP na Gpa2p proteinu. Gpa2p ve formě s navázaným GTP aktivuje Cyr1p adenylátcyklázu. Protein Rgs2p podporuje hydrolyzu GTP a zajišťuje tak ukončení signalizace. Vnitrobuněčná přítomnost glukózy-6-P aktivuje Cdc25p, který iniciuje výměnu GTP za GDP na Ras proteinu. Ras protein ve formě s GTP aktivuje Cyr1p adenylátcyklázu. Ira1p a Ira2p proteiny podporují hydrolyzu GTP na Ras proteinu a ukončení signalizace. Aktivovaná Cyr1p katalyzuje reakci, při které vzniká cAMP, který se váže na regulační podjednotky Bcy1p protein kinázy A. Po navázání cAMP na Bcy1p dochází k uvolnění a aktivaci katalytických podjednotek Tpk. Překresleno podle (Santangelo 2006).

2.5.2.3 Regulace kinázami

Sch9p kináza

Sch9p kináza je centrální komponentou FGM dráhy. Na nefermentovatelném zdroji uhlíku negativně reguluje protein kinázu A tím, že fosfosforyluje N-koncovou doménu Bcy1p regulační podjednotky a spouští tak její translokaci z jádra do cytoplasmy. Negativní regulace působí také na Tpk2p katalytickou podjednotku. Kmeny *sch9Δ* mají několikanásobně zvýšené množství Tpk2p v případě růstu na glukóze i glycerolu, množství transkriptu genu *TPK2* se nemění. Tyto data naznačují, že Sch9p negativně působí na stabilitu Tpk2p proteinu. Jestli je stabilita ovlivněna fosforylací samotné Tpk2p nebo aktivací protězy štěpící Tpk2p není zřejmé (Zhang, Shen et al. 2011).

Pkh1p a Pkh2p kinázy

Katalytická podjednotka Tpk1p obsahuje v C-koncové části místo rozeznávané Pkh1p a Pkh2p kinázami. K fosforylaci dochází během syntézy nebo krátce po nesyntetizování Tpk1p. Tato extrémně stabilní fosforylace hraje důležitou roli během skládání Tpk1p do aktivní konformace (Voordeckers, Kimpe et al. 2011).

2.5.2.4 Regulace negativní zpětnovazebnou smyčkou

Protein kináza A ovlivňuje mnoho buněčných procesů, proto je nezbytně nutné jí přesně regulovat. Proti výše zmíněným aktivačním regulačním mechanismům působí autoinhibiční regulační procesy, které spouští aktivovaná PKA, a má za následek především změny v hladině druhého posla cAMP.

Regulace fosfodiesterázami

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kóduje dvě cAMP fosfodiesterázy: Pde1p a Pde2p. Zatímco Pde1p je nízkoafinitní fosfodiesteráza a její vliv na snižování hladiny cAMP během cAMP-PKA signalizace je zřejmý, Pde2p vykazuje vysokou afinitu k substrátu a její

vliv na snižování hladiny cAMP během signalizace není jasný (Ma, Wera et al. 1999), (Sass, Field et al. 1986), (Londesborough 1982).

Dlouhou dobu nebyla známá fyziologická role fosfodiesterázy 1, protože afinita Pde1p k substrátu je nižší, než bazální hladina cAMP v buňkách (Londesborough 1982). Po stimulaci buněk glukózou dochází k aktivaci adenylátcyklázy Cyr1p, která hladinu cAMP v buňkách výrazně zvýší. Za těchto podmínek zřejmě hraje Pde1p důležitou roli v ukončení signalizace. Kmen s delecí genu *PDE1* má vyšší hladinu cAMP, naopak kmen s nadprodukcí tohoto genu vykazuje snížené hladiny cAMP během signalizace cAMP-PKA. Protein kináza A fosforyluje Pde1p na serinu v pozici 252, čímž jí aktivuje a zajišťuje tak negativní zpětnou regulaci. Působení fosfodiesterázy Pde1p zřejmě není hlavním zpětnovazebným mechanismem, deleční kmen *pde1Δ* má pouze třikrát zvýšenou hladinu cAMP oproti kmenu rodičovskému (Ma, Wera et al. 1999).

Fosfodiesteráza 2 je vysokoafinitní enzym (Londesborough 1982). Hlavní funkcí Pde2p je udržování bazální hladiny cAMP, delece ani nadprodukce genu *PDE2* nemá v buňkách opůsobených glukózou vliv na množství cAMP (Ma, Wera et al. 1999). Přesto se ukazuje, že Pde2p je také regulována protein kinázou A. Pde2p je v buňkách rostoucích na nefermentovatelném zdroji uhlíku lokalizována v cytosolu, v případě růstu na glukóze je lokalizována v jádře. Během růstu na glukóze má fosfodiesteráza 2 zvýšenou stabilitu a vyskytuje se ve větším množství. Dynamická lokalizace i zvýšená stabilita Pde2p je závislé na PKA, funkce Pde2p ve zpětnovazebné inhibici zůstává nejasná (Hu, Liu et al. 2010).

Regulace Cdc25p, Ras1/2p, Ira1/2p

Protein Cdc25p v přítomnosti fermentovatelného zdroje uhlíku katalyzuje výměnu GTP za GDP na Ras1p a Ras2p, čímž nepřímě zvyšuje množství cAMP v buňce (van Aelst, Jans et al. 1991). Cdc25p se skládá ze tří domén: N-koncové α domény, $\beta 1$ domény ve středové části a malé $\beta 2$ domény lokalizované na C-konci proteinu. Domény α a $\beta 1$ jsou katalytické domény nezbytné při aktivaci Ras1/2p, $\beta 2$ doména hraje důležitou roli při negativní zpětné regulaci. Katalytická podjednotka Tpk2p protein kinázy A fosforyluje treoninové nebo serinové aminokyselinové zbytky a tím inhibuje celý Cdc25p protein (Munder and Kuntzel 1989), (Zhang, Shen et al. 2011).

Kvasinkové proteiny Ras1p a Ras2p po navázání GTP aktivují adenylátcyklázu Cyr1p a způsobují tak zvýšení hladiny cAMP. Oba proteiny jsou fosforylovány protein kinázou A a

to především na serinových zbytcích aminokyselin, v případě Ras2p je preferován serinový zbytek v pozici 214. Fosforylace probíhá převážně u Ras proteinů lokalizovaných v cytoplasmatické membráně a je velice dynamická. Všechny výše zmíněné poznatky poukazují na zapojení Ras1p a Ras2p do negativní zpětné smyčky, přesný mechanismus účinku fosforylace na tyto proteiny není známý (Cobitz, Yim et al. 1989), (Whistler and Rine 1997), (Xiaojia and Jian 2010).

Ira1p a Ira2p podporuje aktivaci GTPázové aktivity Ras proteinů, nepřímo tak působí inhibičně na adenylátcyklázu a tím i na hladinu buněčného cAMP. V sekvenci Ira1p se vyskytují dvě místa, které by mohly být potenciálně fosforylována protein kinázou A, fyziologická role je zatím neznámá (Tanaka, Matsumoto et al. 1989).

2.5.3 Substráty

Přidání glukózy do média hladovějících buněk má za následek rozsáhlé změny přepisu genů. Protein kináza A je zodpovědná za 90% těchto změn, zajišťuje je inhibicí nebo aktivací svých substrátů, tedy různých kináz a transkripčních faktorů (Wang, Pierce et al. 2004). Protein kináza A je po přidavku glukózy do média také zodpovědná za změny v buněčných procesech týkajících se aktivity metabolických enzymů a autofágie. Přesné mechanismy jsou popsány v souhrnné kapitole (Budovskaya, Stephan et al. 2004).

2.6 TOR komplex

TOR komplex („target of rapamycin“) byl objeven jako komplex, který je inhibován rapamycinem. Rapamycin (také nazývaný sirolimus) je produkován mikroorganismem *Streptomyces hygroscopicus*. V kvasinkových buňkách se Rapamycin váže na vnitrobuněčný Fpr1p receptor, vytváří toxický komplex, inhibuje Tor1p a Tor2p a působí tak jako antifugální antibiotikum. Kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae* obsahují dva TOR komplexy, TOR komplex 1 (TORC1) a TOR komplex 2 (TORC2). TORC1 se vyskytuje převážně na membráně vakuoly, v závislosti na živinách ovlivňuje buněčný růst, transkripci, translaci a autofáгии, je inhibován rapamycinem. TORC2 je lokalizován převážně na cytoplasmatické membráně a je zapojen především do organizace aktinu v rámci buňky, není inhibován rapamycinem. TORC1 může obsahovat Tor1p nebo Tor2p kinázu, TORC2 pouze Tor2p kinázu. Tyto dva komplexy se mezi sebou liší také proteiny, se kterými kinázy vytváří komplex. TOR komplex je evolučně konzervovaná dráha, savčí a kvasinkový TOR vykazuje

velkou sekvenční i funkční podobnost (Vezina, Kudelski et al. 1975), (Heitman, Movva et al. 1991), (Kunz, Schneider et al. 2000), (Loewith, Jacinto et al. 2002).

2.6.1 Struktura

Genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nese dva geny kódující Tor kinázu: *TOR1* a *TOR2*. Delece *TOR1* genu umožňuje buňkám prodloužení chronologického přežívání, delece *TOR2* způsobuje narušenou distribuci aktinu (Bonawitz, Chatenay-Lapointe et al. 2007), (Schmidt, Kunz et al. 1996). Tor1p a Tor2p patří do PIKK („phosphatidylinositol kinase-related kinase“) rodiny. C-koncová katalytická doména je konzervovaná, u Tor1p a Tor2p vykazuje 80% homologii. N-koncová doména obsahuje mnoho repetice a zprostředkovává proteinové interakce (Helliwell, Wagner et al. 1994), (Kunz, Schneider et al. 2000).

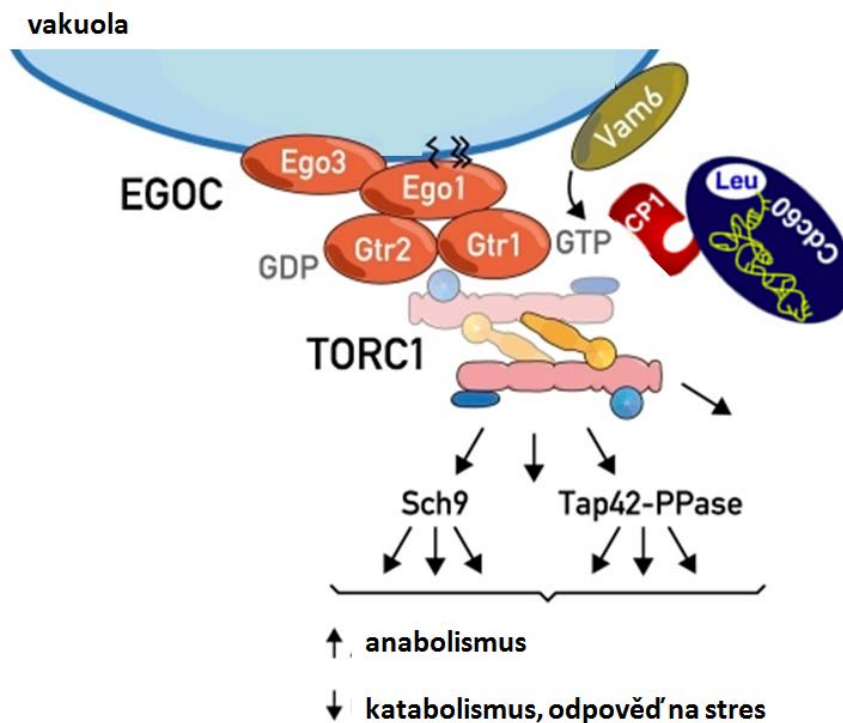
TOR komplex 1 obsahuje buď Tor1p nebo Tor2p a asociované proteiny Kog1p, Lst8p a Tco89p. Funkce asociovaných proteinů není dobře charakterizována, hrají roli v lokalizaci TORC1 a jsou důležité pro interakci Tor1/2p se substráty (Loewith, Jacinto et al. 2002), (Reinke, Anderson et al. 2004).

2.6.2 Regulace

TOR komplex 1 je regulován dostupností a kvalitou zdroje uhlíku a dusíku, především glukózy a leucinu (Shamji, Kuruvilla et al. 2000). Prozatím nebyl u kvasinkových buněk identifikován mechanismus, kterým by TORC1 dokázal snímat extracelulární živiny. Naopak snímání množství vnitrobuněčných zdrojů aminokyselin, především leucinu, je zřejmě důležitým regulačním krokem v aktivaci TORC1 (Bonfils, Jaquenoud et al. 2012).

TORC1 je převážně lokalizován na membránách vakuol (Kunz, Schneider et al. 2000). Tam také dochází k regulaci jeho funkce zprostředkované EGO komplexem (EGOC, exit from rapamycin-induced growth arrest). Regulace je schematicky znázorněna na obrázku číslo 6. Komplex EGO se skládá ze čtyř proteinů: Ego1p, Ego3p, Gtr1p a Gtr2p. Ego1p má N-koncovou část posttranslačně modifikovanou připojením zbytku kyseliny myristové a připojením zbytku kyseliny palmitové, slouží jako kotva EGOC do vakuolární membrány. Homodimer Ego3p je nezbytný pro správné poskládání EGO komplexu a aktivaci TORC1. Váže Ego1p a na N-terminální konec váže Gtr1p a Gtr2p. Gtr1p a Gtr2p jsou G proteiny, v komplexu se vyskytují ve formě heterodimeru (Nakashima, Noguchi et al. 1999), (Dubouloz, Deloche et al. 2005), (Zhang, Peli-Gulli et al. 2012). Aktivace nebo inhibice TOR

komplexu 1 je závislá na vazbě GTP/GDP na heterodimer Gtr1p-Gtr2p. Aktivačně působí kombinace, kdy Gtr1p váže GTP a Gtr2p váže GDP, naopak inhibičně působí vazba GDP na Gtr1p a vazba GTP na Gtr2p. V případě vazby GTP na Gtr1p dochází k přímé interakci Tco89p TOR komplexu 1 s Gtr1p. Vazba GTP/GDP na Gtr1p je regulována Vam6p, který působí jako takzvaný „GEF“ (guanine nucleotide exchange factor), mohl by tak být složkou odpovídající na změny v dostupnosti aminokyselin (Binda, Peli-Gulli et al. 2009). Zásadní vliv na regulaci funkce TORC1 má enzym Cdc60p (leucyl-tRNA syntetáza). Po navázání leucinu na Cdc60p dochází k interakci CP1 domény Cdc60p s Gtr1p. Vazba zabraňuje hydrolýze GTP, Gtr1p je aktivní a pozitivně reguluje TORC1 (Bonfils, Jaquenoud et al. 2012).



Obr. 6 Regulace TOR komplexu 1 EGO komplexem. Hlavní regulátor TORC1 je vakuolárně lokalizovaný EGO. EGO se skládá ze čtyř proteinů, Ego1 proteinu, který kotví komplex do vakuolární membrány, transmembránového Ego3p a dvou Ras proteinů, Gtr1p a Gtr2p. Vam6p katalyzuje vazbu GTP na Gtr1p, jeho aktivita je pravděpodobně ovlivněna množstvím aminokyselin ve vakuole. Kombinace Gtr1p-GTP a Gtr2p-GDP působí aktivačně na TORC1. TORC1 aktivuje Sch9p kinázu a inhibuje PP2A fosfatázu, čímž inhibuje katabolické procesy a reakci na stres a aktivuje anabolismus a buněčný růst. Překresleno podle (Loewith and Hall 2011).

2.6.3 Substráty

Již z obrázku číslo 6 je patrné, že signalizace TOR komplexem 1 je zprostředkována především přes dvě hlavní dráhy: Sch9p kinázovou dráhu a Tap42p proteinem, který ovlivňuje funkci PP2A fosfatázy a PP2A příbuzných fosfatáz. Kináza Sch9p je v případě

časné odpovědi (30 minut) na opůsobení rapamycinem zodpovědná za změnu exprese 181 genů z 272, v případě odpovědi buňky 90 minut po opůsobení rapamycinem je zodpovědná za změněnou expresi 113 genů z 308 (Urban, Soulard et al. 2007). Důležitost signalizace zprostředkované Tap42p dokazuje fakt, že kmeny, které nesou deleci v některém z genů zapojených do této regulace, jsou částečně rezistentní na rapamycin (Jiang and Broach 1999).

2.6.4 PP2A fosfatáza

PP2A serin/treoninová fosfatáza je heterotrimerický komplex. Obsahuje katalytickou, takzvanou C podjednotku, kódovanou buď *PPH21* genem nebo *PPH22* genem. Pph21p a Pph22p vykazují 90% homologii v sekvenci aminokyselin, delece jedné z nich nemá výrazný efekt na fenotyp, delece v obou genech je letální (Sneddon, Cohen et al. 1990). Regulační podjednotku tvoří buď Cdc55p (nazývá se také B podjednotka) nebo Rts1p (nazývaná také B'). Regulační podjednotky nejsou homology, jejich přítomnost v komplexu PP2A mění afinitu k substrátu a buněčnou lokalizaci (Healy, Zolnierowicz et al. 1991), (Zhao, Boguslawski et al. 1997). Takzvanou A nebo „scaffold“ podjednotku důležitou pro vazbu všech částí komplexu tvoří protein Tpd3p (van Zyl, Huang et al. 1992).

PP2A příbuzné fosfatázy jsou zpravidla složeny z katalytické části kódované *SIT4* genem a regulační části tvořené jedním ze čtyř proteinů Sap4p, Sap155p, Sap185p a nebo Sap190p (Arndt, Styles et al. 1989), (Luke, Della Seta et al. 1996).

Fosfatáza PP2A a jí příbuzné fosfatázy jsou regulovány TOR komplexem 1 pomocí Tap42p proteinu. Pokud buňky rostou v dobrých výživových podmínkách, TORC1 fosforyluje Tap42p. Fosforylovaný Tap42p kompetuje o místo s regulačními podjednotkami Cdc55p a Rts1p, vytváří komplex s katalytickou podjednotkou Pph21p nebo Pph22p v případě PP2A fosfatázy, v případě PP2A příbuzných fosfatáz vytváří komplex se Sit4p. V komplexu Tap42p s C podjednotkou není obsažena ani A „scaffold“ podjednotka ani regulační B podjednotka, vzniká tak nová forma fosfatázy. Na komplex Tap42p-fosfatáza se váží Rrd proteiny. Rrd1p a Rrd2p jsou aktivátory fosfotyrosinových fosfatáz, pro funkci komplexu jako fosfatázy jsou nezbytné. Přestože tyto dva aktivátory vykazují vysokou míru homologie, každý z nich má jinou specifitu. Rrd1p se váže na komplex Tap42p-Pph21p, Rrd2p se váže na komplex Tap42p-Sit4p (Di Como and Arndt 1996), (Jiang and Broach 1999), (Zheng and Jiang 2005).

Vazba Tap42p, Rrd1p nebo Rrd2p na fosfatázu má vliv na substrátovou specifitu. Pokud je Tap42p inaktivní (například ve stresových podmínkách), dojde ke zvýšení hladiny transkripce genů stresové odpovědi. Naopak aktivní Tap42p má za následek, že fosfatázy nerozeznávají transkripční faktory zodpovědné za stresovou odpověď a aktivují transkripční faktory zapojené do biogeneze translačního aparátu (Duvel, Santhanam et al. 2003).

Funkce PP2A fosfatázy je závislá na přítomnosti regulační podjednotky. V přítomnosti Cdc55p reguluje přechod z G2 fáze do M fáze buněčného cyklu a reguluje geny transkripční faktory stresové odpovědi Msn2p a Msn4p (Wang and Burke 1997), (Reiter, Klopff et al. 2013). Pokud fosfatáza PPA2 obsahuje Rts1p, reguluje především septiny a buněčné dělení (Dobbelaere, Gentry et al. 2003).

Fosfatáza s katalytickým centrem Sit4p je zapojena do mnoha procesů, včetně regulace G1/S přechodu buněčného cyklu, transportu váčků mezi endoplasmatickým retikulem a golgiho aparátem a integrity buněčné stěny (Di Como and Arndt 1996), (Bhandari, Zhang et al. 2013), (Angeles de la Torre-Ruiz, Torres et al. 2002).

2.6.5 Sch9p kináza

Serin/treoninová kináza Sch9p hraje centrální roli v signalizaci vyvolané drahami, které snímají dostupnost živin. Sch9p integruje signály o dostupnosti živin a podmínkách vyvolávajících stres, fosforyluje své substráty a zprostředkovává tak odpověď buňky na různé podmínky (Urban, Soulard et al. 2007).

Kináza Sch9p je homolog savčí protein kinázy B (PKB). Primární struktura je ze 44% identická, nejvíce jsou si podobné C-koncové domény a katalytické domény. Funkční homologii těchto dvou kináz dokazuje fakt, že exprese PKB v kmenech *sch9Δ* dokáže částečně nahradit funkci Sch9p. Sch9p je lokalizována na vakuolární membráně, opůsobení buněk rapamycinem nemá na lokalizaci vliv (Geyskens I 2001), (Urban, Soulard et al. 2007).

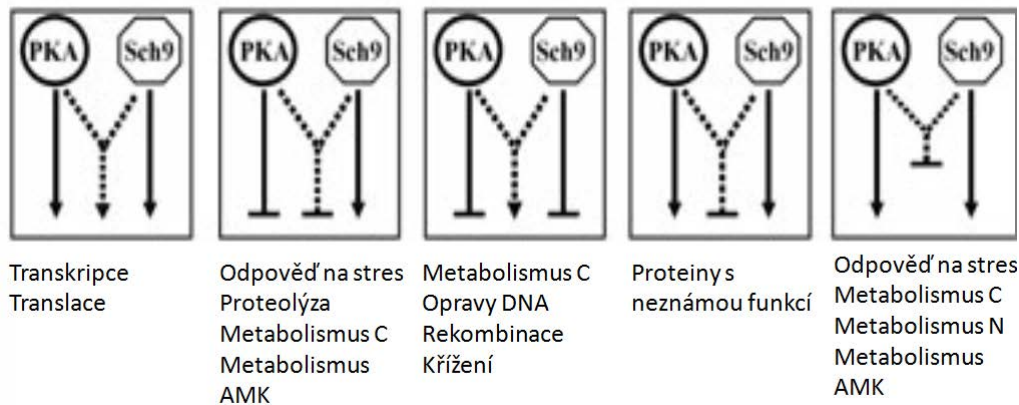
Aktivita Sch9p kinázy je regulována TORC1 vyvolanou fosforylací šesti aminokyselinových zbytků v C-koncové části. Množství fosforylovaných zbytků serinu nebo treoninu je závislé na kvalitě dostupných zdrojů uhlíku a dusíku. Buňky rostoucí v komplexním médiu s glukózou mají všech šest míst fosforylovaných, pokud jako zdroj uhlíku v komplexním médiu slouží etanol nebo glycerol, všechny aminokyselinové zbytky fosforylovány nejsou. Jednotlivé serinové a treoninové zbytky mohou být fosforylovány nezávisle na sobě, jejich fosforylace vždy pozitivně reguluje Sch9p. K fosforylaci Sch9p

dochází na vakuolární membráně a je pro její funkci nezbytná. K defosforylaci Sch9p kinázy dochází po opůsobení TORC1 rapamycinem nebo hladověním na uhlík, dusík nebo fosfát (Urban, Soulard et al. 2007).

Nezbytná je také fosforylace treoninového zbytku Sch9p v aktivační smyčce. V kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* jí zajišťují kinázy Pkh1p a Pkh2p, které jsou aktivovány sfingolipidy. Tyto dvě kinázy jsou homology savčí PDK1 kinázy, která je zapojena do signalizace vyvolané růstovým faktorem a účastní se tak buněčného růstu. Kvasinkové Pkh1p a Pkh2p fosforylují Sch9p v závislosti na dostupnosti dusíku a jsou pro buňku esenciální (Casamayor, Torrance et al. 1999), (Liu, Zhang et al. 2005), (Voordeckers, Kimpe et al. 2011).

Sch9p kináza negativně reguluje kinázu Rim15p a inhibuje vstup do G0 fáze. Dále částečně zprostředkovává transkripci genů translačního aparátu buněk a ovlivňuje iniciaci translace, má vliv na metabolické procesy v buňce a neposlední řadě na regulaci funkce protein kinázy A. Substrátům a dějům ovlivněným Sch9p signalizací se věnuje kapitola 2.8 (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003), (Urban, Soulard et al. 2007), (Zhang, Shen et al. 2011).

Vzájemný vztah Sch9p a protein kinázy A není přesně znám. Obě kinázy mají své specifické substráty, ovšem mnohem větší je skupina substrátů, na které působí kinázy obě (obr. 7). V některých případech je regulace protein kinázou A a kinázou Sch9p paralelní, v některých případech má efekt opačný. Inhibiční nebo regulační efekt kináz na substráty se liší i v závislosti na aktivitě kinázy druhé, Sch9p nebo PKA mají jiný regulační vliv na substráty v buňkách, kde signalizují samy bez přítomnosti kinázy druhé v porovnání s buňkami, kde jsou aktivní obě kinázy. Sch9p kináza nezávisle na protein kináze A kontroluje expresi genů zapojených do metabolismu aminokyselin a metabolických drah jako je glykolýza a glukoneogeneze. Naopak PKA nezávisle na Sch9p reguluje geny zapojené do regulace buněčného cyklu, DNA úprav a některých genů odpovědi na stres (Roosen, Engelen et al. 2005).



Obr 7 Vzájemné vztah PKA a Sch9p a vliv na substráty. Pokud je PKA i Sch9p aktivní, pozitivně regulují transkripci a translaci, inhibují odpověď na stres a geny pro metabolismus a využití chudých zdrojů uhlíku, dusíku a aminokyselin. Pokud jsou obě kinázy inhibovány, jsou aktivovány mechanismy pro opravu DNA, alternativní metabolismus uhlíku, rekombinaci a křížení. Kombinace aktivní Sch9p a inhibované PKA má za následek inhibici stresové odpovědi, inhibici proteolýzy a exprese genů pro metabolismus alternativních zdrojů uhlíku a aminokyselin. Překresleno podle (Roosen, Engelen et al. 2005).

2.7 Rim15 kináza

Rim15p kináza integruje signály zprostředkované hlavními drahami snímající dostupnost živin a signály vyvolané stresovými podmínkami. Původně byla objevena jako kináza zodpovědná za přepis časných meiotických genů diploidních buněk. Poté bylo dokázáno, že i v případě haploidních buněk hraje důležitou roli v regulaci růstu a dělení. Pokud jsou výživové nebo jiné podmínky nevhodné pro buněčné dělení, Rim15p kináza aktivuje transkripční faktory spouštějící stresovou odpověď, přechod na respirační metabolismus a vstup buněk do stacionární fáze, která buňkám zajišťuje přežití nepříznivých podmínek (Vidan and Mitchell 1997), (Cameroni, Hulo et al. 2004).

2.7.1 Struktura

Rim15p je serin/treoninová protein kináza, která patří do AGC rodiny kináz (protein kinases A, G and C). Nese dlouhou N-koncovou i C-koncovou částí, které umožňují přesnější regulaci kinázy. V N-koncové části je obsažena takzvaná PAS doména. PAS doména je evolučně velice konzervovaná a je známá svojí schopností integrovat různé signály, včetně těch o dostupnosti živin, oxidativním stresu a celkovém energetickém stavu buňky. C-koncová část je vysoce homologní s C-koncovou částí protein kinázy A. Důležitou regulační roli má také inzert mezi VII a VIII subdoménou kinázy (Vidan and Mitchell 1997), (Cameroni, Hulo et al. 2004).

2.7.2 Regulace

Rim15p kináza je regulována čtyřmi kinázami zapojenými do snímání živin: protein kinázou A snímající množství glukózy, TOR komplexem 1, který je regulován dostupností zdroje uhlíku, Pho80p-Pho85p komplexem reagujícím na dostupnost zdroje fosfátu a Sch9p, hlavní kinázou FGM dráhy. U Rim15p je známá autofosforylace, negativně tak reguluje i sama sebe. Dráhy zapojené do regulace schematicky znázorňuje obrázek 7 (Reinders, Burckert et al. 1998), (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003), (Wanke, Pedruzzi et al. 2005).

Rim15p obsahuje pět míst, které jsou rozeznávány protein kinázou A. Fosforylace těchto míst má inhibiční vliv. Vzájemný vztah Rim15p a protein kinázy A byl také intenzivně studován pomocí delečních a nadprodukcčních kmenů. Kmeny, které obsahují delecii všech tří genů *TPK1-3* kódujících katalytické podjednotky protein kinázy A, nejsou životaschopné. Pokud je v těchto kmenech deletovaný i gen *RIM15*, životaschopné jsou. Kmeny *rim15Δ* vykazují během přechodu do stacionární fáze a odpovědi na limitující živiny stejné chování jako buňky s konstitutivně aktivní protein kinázou A, včetně snížené akumulace trehalózy a glykogenu, snížené termotolerance a neschopnosti opustit buněčný cyklus z G1 do G0 fáze. Naopak nadprodukce Rim15p kinázy má za následek transkripci genů odpovědi na stres i během růstu v bohatém médiu (Reinders, Burckert et al. 1998).

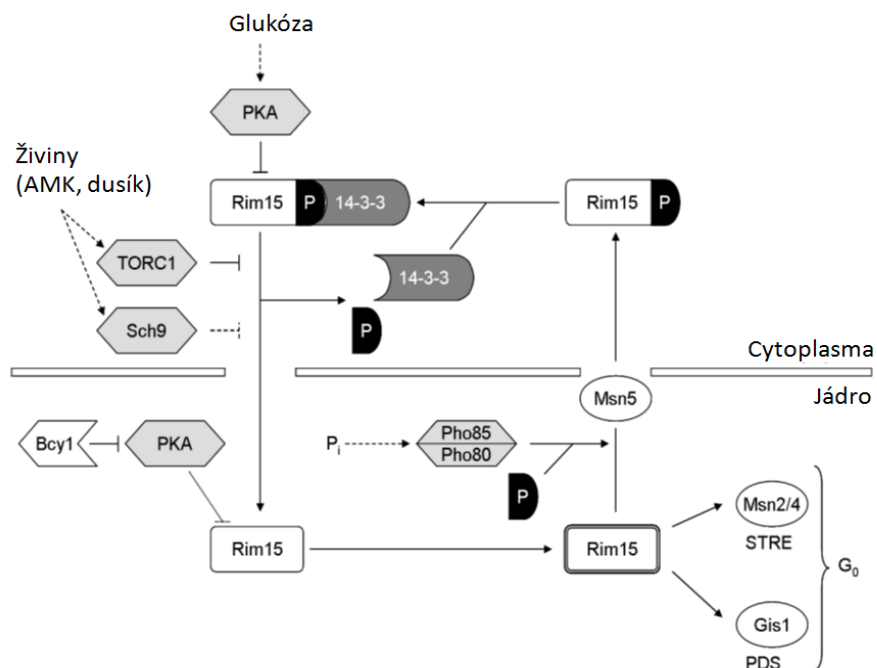
Přestože TOR komplex 1 reguluje buněčný růst i nezávisle na Rim15p kináze, účastní se regulace její funkce. Rim15p aktivačně fosforyluje transkripční faktory v jádře, proto je pro její funkci nezbytná jaderná lokalizace. TORC1 během růstu na bohatém médiu fosforyluje Rim15p ve vazebném místě 14-3-3 proteinů Bmh1p a Bmh2p. Fosforylace má za následek vazbu na cytoplasmaticky lokalizovaný 14-3-3 protein a zabraňuje tak translokaci Rim15p z cytoplasmy. Zablokování funkce TORC1 přidáním rapamycinu má za následek defosforylaci Rim15p, zrušení vazby s 14-3-3 proteinem a je umožněn její přesun do jádra. Defosforylace kinázy není závislá na fosfatázovém komplexu PP2A ani na Sit4p fosfatáze, mechanismus je neznámý (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003), (Wanke, Pedruzzi et al. 2005).

Podobný účinek jako TORC1 může mít na Rim15p i fosforylace kinázou Sch9p. Kmeny *sch9Δ* mají převážně jaderně lokalizovanou Rim15p kinázu, tyto výsledky naznačují, že Sch9p působí jako negativní regulátor vstupu do G0 fáze. Naproti tomuto zjištění hovoří fakt, že Sch9p kináza byla identifikována jako pozitivní regulátor transkripce některých genů, které pozitivně reguluje také kináza Rim15p. Navíc Sch9p kináza může negativně regulovat

protein kinázu A, která slouží také jako inhibitor Rim15p (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003), (Zhang, Shen et al. 2011).

Komplex cyklin-cyklin dependentní kináza Pho80p-Pho85p je hlavní drahou snímající dostupnost fosfátu. Pokud buňky rostou na bohatém zdroji fosfátu, cyklin Pho80p a kináza Pho85p se vyskytují v komplexu a dochází k fosforylaci substrátů, v hladovějících buňkách se tento komplex nevytvoří a k fosforylaci nedochází (Carroll and O'Shea 2002). Komplex Pho80p-Pho85p stejně jako TORC1 regulují lokalizaci Rim15p. Fosforylace Pho85p kinázou v místě vazby Bmh1/2p vyvolá vazbu těchto 14-3-3 proteiny na Rim15p a tím i její zadržení v cytoplasmě (Wanke, Pedruzzi et al. 2005).

Lokalizace je také regulována samotnou Rim15p kinázou. Pokud se nachází v jádře v aktivní formě, vykazuje autofosforylační aktivitu, která je nezbytná pro export do cytoplasmy. V exportu hraje nepostradatelnou roli Msn5p exportin (Wanke, Pedruzzi et al. 2005).



Obr. 7 Regulace Rim15p kinázy. Vysoká hladina glukózy spouští inhibici zprostředkovanou protein kinázou A. Dobrá dostupnost bohatého zdroje dusíku aktivuje TORC1 a Sch9p. Obě tyto kinázy fosforylují Rim15p ve vazebném místě pro 14-3-3 protein, fosforylace způsobí jejich vazbu a cytoplasmatickou lokalizaci Rim15p. Stejný efekt má i fosforylace zprostředkovaná Pho80-Pho85p komplexem, který je aktivován vysokou hladinou fosfátu. Aktivní Rim15p má autofosforylační aktivitu, zajišťuje tak ukončení signalizace. Hlavními substráty Rim15p kinázy jsou transkripční faktory obecné stresové odpovědi Msn2p a Msn4p a Gis1p faktor, který spouští přechod z fermentace na respiraci. Překresleno podle (Swinnen, Wanke et al. 2006).

2.7.3 Substráty

Substrátem Rim15p kinázy jsou transkripční faktory Gis1p a Msn2p, Msn4p. Pozitivně je reguluje a tím spouští přechod z fermentačního metabolismu na metabolismus respirační, přechod do stacionární fáze, odpověď na stres a zajišťuje dlouhodobé přežití v nepříznivých podmínkách. Podrobnější mechanismus účinku je probrán v kapitole 2.8 (Lee, Kim et al. 2013).

2.8 Hlavní buněčné procesy ovlivněné dostupností živin

2.8.1 Autofágie

Makroautofágie je proces degradace proteinů a jiných složek cytosolu. Buněčný materiál určený k degradaci je nejprve obalen dvojvrstvou membránou, vznikne tak autofagosom. Vnější membrána autofagosomu splyne s membránou vakuoly, kde je buněčný materiál štěpen. V kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* k ní dochází především v hladovějících buňkách ve stacionární fázi (Baba, Takeshige et al. 1994), v přítomnosti glukózy je autofágie inhibována protein kinázou A, Sch9p kinázou a TORC1. Inhibice různými kinázami je navzájem nezávislá, probíhá paralelně (Budovskaya, Stephan et al. 2004), (Yorimitsu, Zaman et al. 2007). Proces autofágie je regulován Atg proteiny (autophagy related proteins, s autofagií spřažené proteiny) (Tsukada and Ohsumi 1993).

Ve fázi vzniku autofagozómu hraje důležitou roli protein kináza Atg1p a proteiny Atg13p a Atg17p. V hladovějících buňkách dochází vazbě Atg1p-Atg13p, k Atg13p se váže Atg17p, vznikne tak Atg1p-Atg13p-Atg17p komplex. Vznik komplexu je nezbytný pro zvýšení aktivity Atg1p kinázy a iniciaci makroautofágie (Kamada, Funakoshi et al. 2000), (Kabeya, Kamada et al. 2005). Vznik komplexu je hlavním předmětem regulace zprostředkované drahami snímající dostupnost živin.

Jedním z regulátorů procesu makroautofágie je TOR komplex 1. Během růstu na bohatém médiu hyperfosforyluje Atg13p a zabraňuje tak vytvoření komplexu s Atg1p. Pokud buňka hladoví, k fosforylaci nedochází, zvýší se afinita Atg13p k Atg1p a dojde k iniciaci autofágie. Proces defosforylace není závislý na PP2A a Sit4p fosfatázách, fosforylace není zprostředkována dalšími kinázami, TORC1 komplex ji zajišťuje přímo (Kamada, Funakoshi et al. 2000).

Proteomická analýza odhalila, že sekvence tři Atg proteinů, konkrétně Atg1p, Atg13p a Atg18p, obsahují místa rozeznávaná protein kinázou A. Fosforylace *in vivo* je potvrzená v případě protein kinázy Atg1p, fosforylace na dvou místech má za následek neschopnost kinázy lokalizovat do místa formování autofagosomu. Díky tomuto mechanismu PKA reguluje autofágii v jejím iniciačním bodě (Budovskaya, Stephan et al. 2005). *In vivo* fosforylace se vyskytuje také v případě Atg13p. Protein kináza A fosforyluje Atg13p na třech aminokyselinových zbytcích. Místa se liší od těch, které jsou rozeznávány TORC1. Stejně jako v případě Atg1p, fosforylace zamezuje lokalizaci Atg13p do místa vzniku autofagozomu (Stephan, Yeh et al. 2009). Sch9p kináza inhibuje autofágii paralelně s protein kinátou A, přesný mechanismus není známý (Yorimitsu, Zaman et al. 2007).

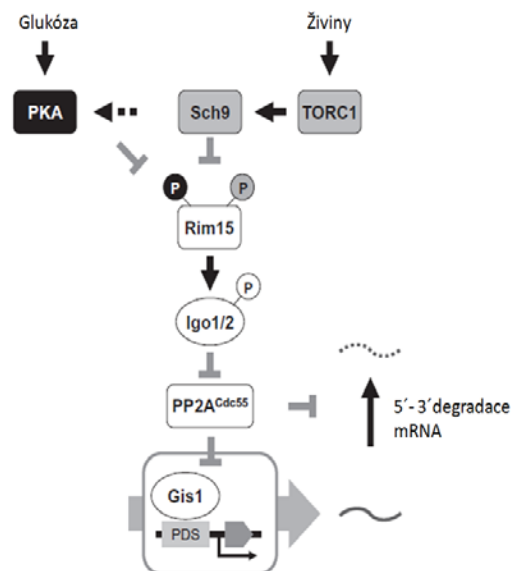
2.8.2 Přechod na respirační metabolismus

Gis1p pozitivně reguluje geny zapojené v přechodu z fermentačního na respirační metabolismus. Na C-koncové doméně nese „C2H2 zinc finger“ motiv následovaný C2HC motivem. (Za „zinc finger“ motiv je považována sekvence přibližně třiceti aminokyselin, která je schopná vazby na DNA. Vyskytují se v různém počtu opakování a uspořádány jsou okolo centrálního iontu zinku. V kvasinkových buňkách se nejčastěji vyskytuje C2H2 motiv, tedy dva cysteiny a dva histidiny na konzervované pozici v rámci zinc finger motivu. Na rozdíl od savčích buněk, ve kterých se častokrát motiv vyskytuje v mnoha kopiích, v kvasinkových buňkách je nečastější opakování dvou motivů, vícenásobné je velice vzácné) (Bohm, Frishman et al. 1997). Po vyčerpání glukózy z média se Gis1p váže do tzv. PDS (post-diauxic shift element) promotorových oblastí genů, které jsou nezbytné pro přechod buněk do stacionární fáze, respirační metabolismus a dlouhodobé přežití v podmínkách s omezeným zdrojem živin. Funkčně se částečně překrývá s Msn2p a Msn4p transkripčními faktory, regulují mnoho společných substrátů. (Pedruzzi, Burckert et al. 2000), (Cameroni, Hulo et al. 2004), (Zhang, Wu et al. 2009).

Delece genu *GIS1* (podobně jako delece genu *RIM15*) nemá na růst kvasinek na bohatém glukózovém médiu pozorovatelný efekt. Naopak na chudém zdroji uhlíku výrazně snižuje schopnost dlouhodobého přežívání buněk, efekt není tak výrazný jako v případě delece *RIM15*. Přestože funkce Gis1p není ve všech případech závislá na Rim15p kináze, většina genů regulovaných Gis1p je závislá na aktivaci tohoto transkripčního faktoru Rim15p kinázou. Během růstu na glukózovém médiu se Gis1p v buňkách vyskytuje ve velice malém množství, po vyčerpání glukózy dochází k jeho velkému navýšení. Regulace probíhá na post-

transkripční úrovni. Gis1p není přímým substrátem Rim15p kinázy, v regulaci se uplatňují další proteiny (Pedruzzi, Burckert et al. 2000), (Zhang, Wu et al. 2009), (Lee, Kim et al. 2013).

Paralogy Igo1p a Igo2p se po fosforylaci velice konzervovaného serinového zbytku vyvolané Rim15p kinázou váží na Dhh1p protein, který v buňkách působí jako signál k odstranění čepičky z mRNA. Vazba Igo1p nebo Igo2p s Dhh1p má za následek ochranu specifických (dostupností živin regulovaných) mRNA před 5'-3' degradací, zvyšuje jejich stabilitu a umožňuje jejich translaci a následný přechod buněk do stacionární fáze (Talarek, Cameroni et al. 2010), (Luo, Talarek et al. 2011). Fosforylace Igo1p má také vliv na funkci PP2A fosfatázy. Substrátem PP2A fosfatázy je i Gis1p transkripční faktor, vyvolává defosforylaci a má za následek neschopnost Gis1p vázat se do promotorových oblastí. Fosforylací aktivovaný Igo1p inhibuje PP2A a zabraňuje tak inhibici Gis1p transkripčního faktoru (Bontron, Jaquenoud et al. 2013). Rim15p kináza tak působí na dvou úrovních, nepřímě aktivuje Gis1p transkripční faktor a nepřímě zajišťuje stabilitu transkriptů z Gis1p regulovaných promotorů. Gis1p je regulován Sch9p kinázou nezávisle na funkci Rim15p kinázy, mechanismus působení není známý (Roosen, Engelen et al. 2005). Regulace transkripčního faktoru Gis1p je znázorněna na obrázku 8.



Obr. 8 Regulace transkripčního faktoru Gis1p. V podmínkách bohatých na živiny je Rim15p kináza inhibována Sch9p, PKA a TORC1. K této inhibici nedochází v podmínkách s chudým zdrojem živin, aktivovaná Rim15p fosforyluje Igo1p a Igo2p. Igo1/2p chrání před degradací mRNA, které mají v promotorových oblastech PDS element, jejich transkripce je tedy aktivována Gis1p. Fosforylované Igo1/2p inhibují PP2A fosfatázu, která nemůže defosforylovat a tím inhibovat Gis1p transkripční faktor. Překresleno podle (Lee, Kim et al. 2013).

2.8.3 Odpověď na stres

Homologní proteiny Msn2p a Msn4p jsou transkripční aktivátory genů stresové odpovědi. N-terminální doména nese jaderný exportní signál a transkripční aktivátor, na C-terminální doméně jsou dva „C₂H₂ zinc finger“ motivy a jaderný lokalizační signál (Martinez-Pastor, Marchler et al. 1996), (Gorner, Durchschlag et al. 2002). Msn2p a Msn4p jsou navzájem zastupitelné pouze částečně. Deleční kmen *msn2Δ* vykazuje sníženou hladinu transkripce genů stresové odpovědi, transkripční faktor Msn4p není schopen plně nahradit funkci Msn2p, proto je Msn2p považován za významnější a většina výzkumu se zaměřuje na jeho funkci a regulaci (Schmitt and McEntee 1996).

Na základě zvýšené citlivosti delečního kmene *msn2Δmsn4Δ* vůči oxidativnímu, teplotnímu a osmotickému šoku a faktu, že deleční kmen *msn2Δmsn4Δ* má sníženou schopnost růstu na nefermentovatelném zdroji uhlíku, bylo zjištěno, že Msn2p a Msn4p se během stresové odpovědi buněk váží do takzvané „STRE oblasti“ (stress response element, elementy stresové odpovědi) promotorových sekvencí některých genů. „STRE oblasti“ jsou obsaženy v celé řadě genů, jejichž produkty se účastní ochrany a odpovědi na stres (Martinez-Pastor, Marchler et al. 1996). Rozsáhlé expresní analýzy ukazují, že odpovědi na změnu teploty, pH, osmolarity, oxidačních a výživových podmínek se účastní až dvě třetiny genů kódovaných *Saccharomyces cerevisiae*. Deset procent genů má změněnou transkripci nezávisle na druhu stresu, jsou tedy obecnou odpovědí na stres. Msn2p a Msn4p kontroluje transkripci většiny genů obecné odpovědi, proto jsou považovány za hlavní transkripční aktivátory stresové odpovědi (Causton, Ren et al. 2001).

Oblasti „STRE“ se vyskytují i v genech enzymů zapojených do syntézy glykogenu a trehalózy. Buňky, které rostou na bohatém médiu glykogen a trehalózu neakumulují, naopak buňky rostoucí na chudém zdroji uhlíku obsahují velké množství těchto látek. Transkripce enzymů nezbytných pro syntézu glykogenu a trehalózy je kontrolována Msn2p a Msn4p transkripčními faktory, proto je jejich akumulace považována za „marker“ stresovaných buněk (Schmitt and McEntee 1996), (Smith, Ward et al. 1998).

Množství transkripčních aktivátorů Msn2p a Msn4p je ve stresovaných a nestresovaných buňkách stejné, při změně podmínek nedochází k výrazné degradaci ani syntéze. Hlavní regulace je dána lokalizací těchto transkripčních faktorů v buňce. Msn2p a Msn4p mají v C-koncové části jaderný lokalizační signál. Během přítomnosti glukózy protein kináza A fosforyluje Msn2p a Msn4p v oblasti tohoto signálu a tak zajišťuje jejich

cytoplasmatickou lokalizaci. Během růstu na fermentovatelném zdroji uhlíku jsou buňky citlivé na přítomnost glukózy, při jejím nedostatku velice rychle dojde k inhibici protein kinázy A, defosforylaci Msn2p a Msn4p v místě jaderného lokalizačního signálu a přesunu do jádra. Pokud je přítomná glukóza, k fosforylaci a cytoplasmatické lokalizaci stresových transkripčních aktivátorů dochází i za podmínek, kdy na buňku působí jiný stresový faktor, například vysoká teplota nebo nízké pH. Přesun Msn2/4p z jádra do cytoplasmy nebo naopak je velice rychlý a dynamický proces, během pěti minut po změně podmínek je naprostá většina transkripčního faktoru relokalizována. Nová data ukazují, že lokalizace Msn2p a Msn4p je závislá na intenzitě stresového faktoru. Mírný stres jadernou lokalizaci nevyvolá, vysoký stres má za následek lokalizaci transkripčních aktivátorů v jádře a střední intenzita vyvolá periodické střídání lokalizace v cytoplasmě a v jádře. Pro export z jádra do cytoplasmy je nezbytný exportní protein Msn5p (Gorner, Durchschlag et al. 1998), (Gorner, Durchschlag et al. 2002), (Jacquet, Renault et al. 2003).

Aktivita Msn2p a Msn4p je regulována na více úrovních. Kináza Rim15p, která je v přítomnosti glukózy a bohatého zdroje dusíku inhibována protein kinázou A, TOR1 komplexem a Sch9p kinázou, pozitivně reguluje transkripční aktivátory stresové odpovědi. Fosforylace probíhá na několika místech v N-koncové i C-koncové doméně Msn2/4p. (Cameroni, Hulo et al. 2004), (Lee, Kim et al. 2013). V regulaci je také zapojena Yak1p kináza. Stejně jako kináza Rim15p, Yak1p pozitivně reguluje Msn2p a Msn4p (Lee, Cho et al. 2008). TOR komplex 1 působí na Msn2p a Msn4p inhibičně, způsobuje jejich vazbu na Bmh2p 14-3-3 protein v cytosolu (Beck and Hall 1999).

2.8.4 Buněčná proliferace

Protein kináza Yak1p inhibuje buněčný růst a proliferaci. V buňkách je regulováno její množství a její aktivita. Pokud se buňka nachází v prostředí bohatém na živiny, protein kináza A fosforyluje Yak1p, zabraňuje tak její translokaci do jádra a aktivaci transkripčních faktorů, které spouští stresovou odpověď. Naopak v buňkách rostoucích na chudém zdroji živin není Yak1p inhibována PKA a zvýší se její množství. Promotorová oblast Yak1p obsahuje „STRE“ sekvenci, do které se váží transkripční aktivátory Msn2p a Msn4p a způsobují tak zvýšení hladiny Yak1p v buňkách. Msn2p a Msn4p jsou aktivovány Yak1p kinázou, regulace funguje na principu takzvané pozitivní zpětnovazebné smyčky (Garrett, Menold et al. 1991), (Lee, Cho et al. 2008), (Smith, Ward et al. 1998).

Substrátem Yak1p kinázy je také transkripční faktor Hsf1p. Hsf1p se účastí především odpovědi buňky na teplotní stres, promotorovu oblast rozeznávanou Hsf1p obsahují i geny zapojené do odpovědi na jiné stresové podmínky, včetně hladovění. Hsf1p způsobuje nadprodukcii i snížený přepis stovek genů, včetně genů zapojených do syntézy makromolekul, jejich skládání a degradace, reorganizace buněčné stěny a enzymů zapojených v energetických drahách. Jeho delece je pro buňky *Saccharomyces cerevisiae* letální, nadprodukce způsobuje zastavení buněčného cyklu a růstu (Hahn, Hu et al. 2004). Regulace na rozdíl od Msn2/4p není dána změnou lokalizace v buňce, je zajištěna místně specifickou hyperfosforylací v závislosti na stresu, mění se tak specifita k určitým promotorovým oblastem (Hashikawa, Mizukami et al. 2006). Yak1p kináza a Snf1p kináza hyperfosforylují Hsf1p v C-koncové doméně a taky zvyšují její afinitu k DNA (Hahn, Hu et al. 2004), (Hahn and Thiele 2004). Stejný efekt má fosforylace vyvolaná Rim15p kinázou (Lee, Kim et al. 2013).

2.8.5 Translační kapacita buněk

Ribozom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je složen ze 79 proteinů a 4 rRNA (5S, 5,8S, 18S a 25S). Proteiny jsou kódovány 138 geny v takzvaném „RP regulonu“, rRNA je kódována rDNA, které se v genomu kvasinky vyskytuje přibližně ve 150 kopiích. Procesu translace se navíc účastní mnoho neribozomálních proteinů, například RNA polymerázy, tRNA syntetázy a translační faktory, kódovány jsou 236 geny takzvaného „Ribi regionu“. Syntéza translačního aparátu je velice energeticky náročná, proto je kontrolována v závislosti na dostupnosti živin (Nomura 2001).

Regulace transkripce genů Ribi regulonu a RP regulonu v závislosti na množství dostupných živin je zprostředkována transkripčním faktorem Sfp1p. Množství Sfp1p v buňkách se v čase nemění, jeho aktivita je dána buněčnou lokalizací. Stresové podmínky včetně hladovění mají za následek cytoplasmatickou lokalizaci Sfp1p, naopak za dobrých podmínek a na bohatém médiu je Sfp1p lokalizován v jádře. Kmeny *bcy1Δ* vykazují zvýšenou aktivitu protein kinázy A, která má mimo jiné za následek jadernou lokalizaci Sfp1p i v případě zablokování TORC1 rapamycinem. Kmeny, které nemají aktivní PKA, mohou vykazovat v přítomnosti aktivního TOR komplexu 1 jadernou lokalizaci Sfp1p také. Ze zmíněné analýzy kmenů vyplývá, že lokalizace Sfp1p je regulována nezávisle TOR komplexem 1 i protein kinázou A (Marion, Regev et al. 2004), (Budovskaya, Stephan et al. 2005).

Rrn3p je esenciální transkripční faktor pro RNA polymerázu I. S RNA polymerázou interaguje především ve fázi iniciace transkripce, ale není součástí stabilního pre-iniciačního komplexu v promotorové oblasti rDNA (Yamamoto, Nogi et al. 1996). Rrn3p obsahuje doménu, která je zodpovědná za vazbu do promotorové oblasti rDNA, tato doména, stejně jako doména vázající RNA polymerázu I, je pro iniciaci transkripce nezbytná (Stepanchick, Zhi et al. 2013). Schopnost Rrn3p vázat RNA polymerázu I je ovlivněná fosforylací. Zatímco mezi hyperfosforylovaným nebo slabě fosforylovaným Rrn3p a RNA polymerázou I k vazbě nedochází, nefosforylovaný Rrn3p váže RNA polymerázu I velice silně (Cavanaugh, Hirschler-Laszkiewicz et al. 2002), (Blattner, Jennebach et al. 2011). Buňky, které mají po opůsobení rapamycinem inhibovaný TOR komplex I, vykazují sníženou transkripci rDNA způsobenou zablokováním tvorby komplexu RNA polymerázy I a Rrn3p transkripčního faktoru. Tato pozorování napovídají, že TOR komplex 1 je zapojen do regulace transkripce translačního aparátu buňky, přesný mechanismus je neznámý (Claypool, French et al. 2004).

Maf1p negativně reguluje iniciaci transkripce genů přepisovaných RNA polymerázou III (Vannini, Ringel et al. 2010). Regulován je v závislosti na stresových podmínkách a dostupnosti glukózy a ostatních živin v médiu. Maf1p mění jadernou a cytoplasmatickou lokalizaci. Represor Maf1p nese dva jaderné lokalizační signály, jeden na C-koncové doméně a druhý na N-koncové doméně. Pokud buňka roste v prostředí bohatém na živiny, protein kináza A fosforyluje jaderný lokalizační signál v N-koncové části a zabraňuje vstupu Maf1p do jádra a následné inhibici RNA polymerázy III. Sekvence Maf1p obsahuje šest míst rozeznávaných protein kinázou A. Tyto místa se překrývají s místy, které fosforyluje Sch9p kináza. Fosforylace různých míst má různé regulační následky. Buňky, které se vyskytují v prostředí chudém na živiny, mají jaderně lokalizovaný, v N-koncové části nefosforylovaný Maf1p. Pouze jaderná lokalizace není dostatečná, aby Maf1p fungoval jako represor iniciace transkripce, důležitou regulační roli hrají s velkou pravděpodobností i fosforylace, podrobnosti tohoto mechanismu jsou zatím neznámé (Moir, Lee et al. 2006), (Lee, Moir et al. 2009).

3 Cíle práce

- Příprava kmenů *S. cerevisiae* s delecí resp. zvýšenou expresí genů *SCH9*, *RIM15*, *MSN2*, *MSN4*, *GIS1* a dvojitou delecí v genech *MSN2* a *MSN4*
- Sledování morfologie kolonií a buněk připravených kmenů
- Sledování vertikální diferenciace buněk kolonií tvořených modifikovanými kmeny
- Zjištění přežívání buněk v jednotlivých vrstvách během vývoje kolonií tvořených modifikovanými kmeny

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganismy

Escherichia coli DH5 α

F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi⁻, supE44, relA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k), λ ⁻, Δ (argF-laczya), U169, Φ 80 lac ZM15

Saccharomyces cerevisiae BY4742

MAT α , his3, ura3, leu2, lys2; laboratorní haploidní kmen ze sbírky Euroscarf

4.1.2 Seznam připravených kvasinkových kmenů

Název kmene	Genotyp
BY4742- <i>gis1</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>gis1</i> Δ ::hph
BY4742-P _{TEF} - <i>GIS1</i>	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, P _{TEF} - <i>GIS1</i> -kanMX
BY4742- <i>msn2</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>msn2</i> Δ ::hph
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN2</i>	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, P _{TEF} - <i>MSN2</i> -kanMX
BY4742- <i>msn4</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>msn4</i> Δ ::hph
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN4</i>	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, P _{TEF} - <i>MSN4</i> -kanMX
BY4742- <i>msn2</i> Δ / <i>msn4</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>msn2</i> Δ ::hph, <i>msn4</i> Δ ::nat
BY4742- <i>rim15</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>rim15</i> Δ ::hph
BY4742-P _{TEF} - <i>RIM15</i>	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, P _{TEF} - <i>RIM15</i> -kanMX
BY4742- <i>sch9</i> Δ	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, <i>sch9</i> Δ ::hph
BY4742-P _{TEF} - <i>SCH9</i>	BY4742, MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, P _{TEF} - <i>SCH9</i> -kanMX

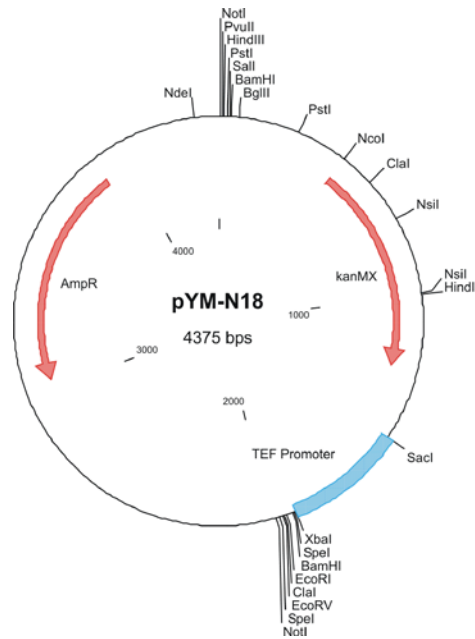
Tab. 1 Seznam kmenů, které jsem připravila a použila v diplomové práci.

4.1.3 Plasmidy

Plasmidy sloužily jako templát pro PCR reakci, vzniklé kazety jsem použila pro transformaci kvasinkových buněk. Všechny použité plasmidy obsahují gen, jehož produkt zajišťuje buňkám *Escherichia coli* rezistenci na Ampicilin a umožňuje tak jejich selekci a gen zajišťující selekci buněk *Saccharomyces cerevisiae*. Plasmidy byly získány ze sbírky Euroscarf.

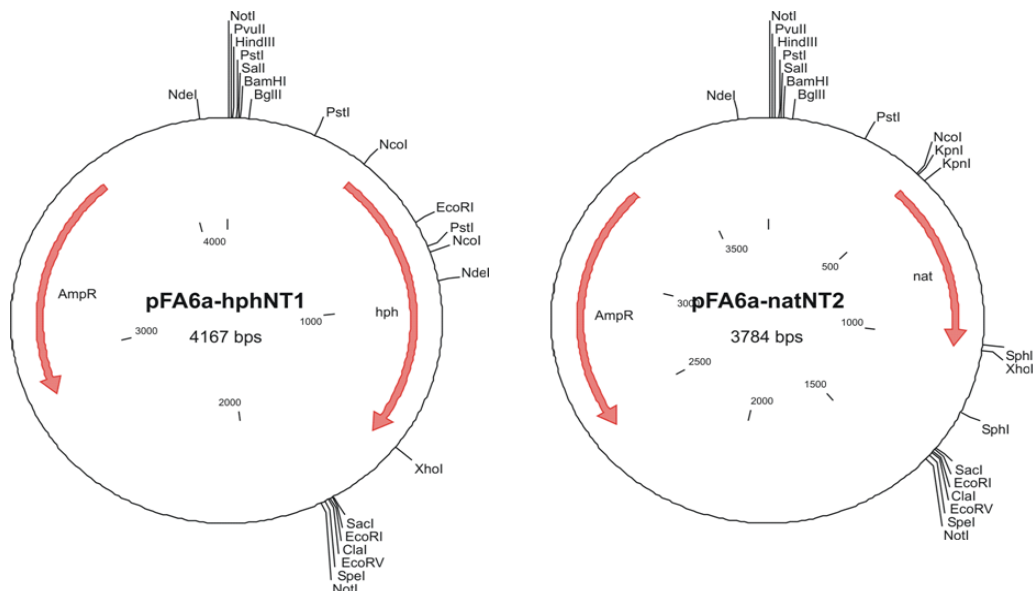
Plasmid pYM-N18 (Obr. 9) jsem použila pro přípravu kazety na vnášení silného konstitutivního promotoru před gen zájmu, plasmid pFA6a-hphNT1 pro přípravu kazety na

deleci genu zájmu a plasmid pFA6a-natNT2 (Obr. 10) pro přípravu kazety na deleci druhého genu v kmenu s dvojitou delecí.



Obr. 9 Schéma plasmidu pYM-N18 s vyznačenými místy pro restriční endonukleázy. Plasmid pYM-N18 obsahuje gen pro selekci bakteriálních buněk („AmpR“, rezistence na ampicilin), gen pro selekci kvasinkových buněk („kanMX“, rezistence na kanamycin) a konstitutivní silný promotor TEF.

Převzaté z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pYM-N18.html>



Obr. 10 Schéma plasmidu pFA6a-hphNT1 a pFA6a-natNT2s vyznačenými místy pro restriční endonukleázy. Plasmid pFA6a-hphNT1 i pFA6a-natNT2 obsahuje gen pro selekci bakteriálních buněk („AmpR“, rezistence na ampicilin), a gen pro selekci kvasinkových buněk, v případě pFA6a-hphNT1 gen „hph“ (rezistence na hygromycin), v případě pFA6a-natNT2 gen „nat“ (rezistence na nourseothricin).

Převzaté z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pFA6hphNT1.html>
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pFA6natNT2.html>

4.1.4 Chemikálie a enzypy

NÁZEV	ZKRATKA	DODAVATEL
2-deoxy-D-glukóza	Glu	Sigma
6x DNA Loading Dye		MBA Fermentas
Agar		Dr. Kulich Pharma
Agaróza		Sigma
Baktopepton		Imuna
Dimetyl sulfoxid	DMSO	Top-Bio
DL-Dithiotreitol	DTT	Sigma
Dodecylsulfát sodný	SDS	Sigma
Emerald Amp GT PCR Master Mix		TaKaRa
Emerald Amp Max PCR Master Mix		TaKaRa
Ethanol 96% (v/v)	EtOH	Penta
Ethidium bromid	EtBr	Serva
Ethyléndiamíntetraacetát	EDTA	Serva
Fenol		Sigma
Formaldehyd	CH ₂ O	Lach-Ner
Glycerol bezvodný	C ₃ H ₈ O ₃	Lach-Ner
Hydroxid draselný	KOH	Lachema
Hydroxid sodný	NaOH	Lachema
Chlorid draselný	KCl	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Chloroform	CHCl ₃	Lachema
Kvasničný autolyzát (šarže 43)		Imuna
Kvasničný autolyzát (šarže 90)		Imuna
Kyselina boritá	H ₃ BO ₃	Lachema
Kyselina octová	CH ₃ COOH	Penta
Kyselina peroctová (35%) Persteril®36	C ₂ H ₄ O ₃	OVERLACK
Methanol	MetOH	Merck KGaA

Peptón (pro bakteriologii)		Imuna
Polyethylén glykol	PEG	Serva
PCR H ₂ O		Top-Bio
Ribonukleáza A	RNáza A	Sigma
Salmon sperm DNA	ssDNA	BioLabs
Tris(hydroxymetyl)aminomethan	Tris	Sigma, Serva
Živný bujón č.2		Imuna

4.1.5 Roztoky

TBE 0,5x

1mM EDTA

20 mM Tris

45 mM kyselina boritá

RI

1% glukosa

10 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

25 mM Tris-HCl (pH 7,5)

RII

0,2 M NaOH

1% SDS (Serva)

RIII

11,5 ml ledové CH₃COOH

29,44 g CH₃COOK

doplňit H₂O na 100 ml

TE

1 mM EDTA-NaOH (pH=8,0)

10 mM Tris-HCl (pH=7,5)

Upravený fenol

fenol byl několikrát protřepáný s 1 M Tris-HCl (pH = 8) a jednou s 0,1 M Tris-HCl (pH = 8), pH bylo upraveno na hodnotu 7 a byl uchováván při teplotě -20 °C

Upravený chloroform

chloroform byl smíchán s izoamylalkoholem v poměru 24:1

Roztok RNasy

10 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5)

10 mg ribonukleasy A

3,5 µl 5 M NaCl

doplnit demiH₂O do 1 ml

takto připravený roztok byl 15 min. povařen, pomalu ochlazen a dále skladován při teplotě -20°C

4.1.6 Média

Pozn.: Média byly připravované z destilované vody vyrobené pomocí aparatury Ultrapur (Watrex). Glukóza byla vždy klávována samostatně.

4.1.6.1 Média pro práci s kvasinkami

4.1.6.1.1 Pevná média

GM médium + BKP

1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže 41, před sterilizací pH srovnané na 5, klávováno zvlášť)

2% (w/v) agar

3 % (v/v) glycerol

po sterilizaci přidáno:

30 mM CaCl₂

2x10⁻⁵ % (w/v) uracil

0,01 % (w/v) BKP předem rozpuštěný v 1/100 výsledného objemu média v 96 % EtOH

YEPG médium

1 % (w/v) kvasničný autolyzát (šarže 90)

1 % (w/v) peptón

2 % (w/v) agar

2% glukóza

selekční média

jako YEPG médium, po sterilizaci podle potřeby přidáno

0,04 % (w/v) G418 (kanamycin)

0,04 % (w/v) HPH (hygromycin)

0,05 % (v/v) NAT (nourseothricin)

4.1.6.1.2 Tekutá média

YEPG médium

1 % (w/v) kvasničný autolyzát (šarže 90)

1 % (w/v) peptón

2% glukóza

Skladovací médium

1 % (w/v) kvasničný autolyzát (šarže 90)

10 % (w/v) glukóza

2 % (w/v) peptón

60 % (v/v) glycerol

4.1.6.2 Média pro práci s bakteriemi

4.1.6.2.1 Pevná média

ŽAmp

4 % (w/v) živný agar č. 2

0,04 % (w/v) ampicilin (přidáno po klávkování)

4.1.6.2.2 Tekutá média

ŽBAmp

2,5 % (w/v) živný bujon č. 2

TPN

0,5% (w/v) kvasničný autolyzát

0,5% (w/v) NaCl

1% (w/v) baktopepton

1% (w/v) baktotrypton

SOC

0,5% (w/v) kvasničný autolyzát

10 mM NaCl

2% (w/v) baktotrypton

2,5 mM KCl

20 mM glukóza

10 mM MgCl₂ (přidáno po klávkování)

10 mM MgSO₄ (přidáno po klávkování)

4.1.7 Počítačové programy a databáze

Analýza obazu

CellCounter (Náhlík 2014)

Colony Counter (Schier a Kovář 2013)

Práce s DNA sekvencemi

NCBI Blast

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

Saccharomyces Genome Database (SGD) <http://www.yeastgenome.org/>

Databáze

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

Saccharomyces Genome Database (SGD) <http://www.yeastgenome.org/>

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Drobné skleněné a kovové předměty jsem sterilizovala namočením do etanolu a následným opálením nad kahanem. Drobné plastové předměty jsem sterilizovala pomocí kyseliny peroctové v uzavřeném sáčku, předměty byly opůsobeny nejméně po dobu 24 hodin. Laboratorní sklo bylo sterilizováno pomocí suchého tepla (160 °C) po dobu 180 minut. Voda, roztoky, média, párátko a špičky k mikropipetám byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při tlaku 120 kPA.

4.2.2 Práce s bakteriemi

Bakterie jsem použila pro izolaci plasmidů, které sloužily jako templát PCR kazety.

4.2.2.1 Příprava kompetentních buněk

Kulturu *E. Coli* DH5 α jsem zaočkovala do 30 ml TPN média a inkubovala přes noc v třepačce při 37 °C. Druhý den jsem tímto inokulem zaočkovala 500 ml TPN média na optickou densitu 0,1-0,2 ($\lambda=560$ nm) a dále kultivovala při 37 °C, dokud kultura nedosáhla optické density 0,7-0,8. Poté jsem kulturu centrifugovala v předem vychlazené (4 °C) centrifuze 10 minut, 4000 ot.min⁻¹. Pelet jsem dvakrát promyla v 500 ml vychlazené demiH₂O a centrifugovala při 4 °C, 4000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut. Po odlití vody jsem buňky resuspendovala v 1 ml vychlazeného 10% (v/v) glycerolu a rozpipetovala je po 50 μ l do mikrozku mávek. Kompetentní buňky byly skladovány v -80 °C.

4.2.2.2 Transformace bakterií elektroporací

K 50 μ l kompetentních buněk *E. Coli* DH5 α jsem přidala 1 μ l plasmidové DNA, promíchala a po dobu jedné minuty inkubovala na ledu. Poté jsem suspenzi přenesla do

předem vychlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm), přemístila do elektroporátoru (Gene Pulser Apparatus“, Bio-Rad) a buňky vystavila pulsu stejnosměrného napětí (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV). Ihned po pulzu jsem do kyvety přidala 1 ml SOC média, suspenzi převedla do Erlenmayerovy baňky a kultivovala při 37 °C v horkovzdušené třepačce. Po jedné hodině kultivace jsem vysela 10 μ l, 100 μ l a zbytek suspenze na pevné selekční médium ŽAmp a staticky kultivovala při 37 °C.

4.2.2.3 Izolace plazmidové DNA (maxiprecipitace)

Přes noc jsem ve 200 ml ŽBamp kultivovala bakterie nesoucí příslušný plasmid (37 °C). Druhý den jsem narostlou kulturu centrifugovala 10 min., 4°C, 4000 ot.min⁻¹. Pelet jsem nesuspendovala v 10 ml RI a přidala 200 ml čerstvě připraveného RII. Směs jsem opatrným převrácením zkumavky promíchala a inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě. Poté jsem přidala 15 ml vychlazeného RIII, opatrným otáčením směs promíchala a nechala inkubovat 30 minut v ledové lázni. Směs jsem centrifugovala 30 min., 4°C, 4000 ot.min⁻¹, poté jsem přefiltrovala supernatant přes několikrát přeloženou gázu a přidala 0,8 objemu isopropanolu, krátce vortexovala a poté centrifugovala 30 min., 4°C, 4000 ot.min⁻¹. Sediment jsem promyla 80% ethanolem, vortexovala a opět centrifugovala 10 min, 4°C, 4000 ot.min⁻¹. Pelet jsem 10 minut sušila, přidala 300 μ l TE pufru, 1/100 objemu RNázy A a 60 minut inkubovala. Poté byla DNA přečištěna fenol chloroformovou extrakcí.

4.2.2.4 Přečištění plazmidové DNA fenol chloroformovou extrakcí

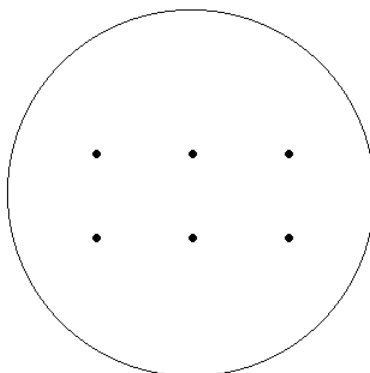
K roztoku DNA (300 μ l TE, 1/100 objemu RNázy A) jsem přidala stejný objem fenolu, 5 minut jsem směs otáčením zkumavky míchala a poté centrifugovala 10 min., 5500 ot.min⁻¹. K odebrané vodní fázi jsem přidala stejný objem upraveného chloroformu, směs otáčením 5 minut míchala a centrifugovala 10 min., 5500 ot.min⁻¹. Tento krok jsem opakovala, dokud se mezi fázemi nepřestaly objevovat vysrážené proteiny. K vodné fázi jsem přidala 2,5 násobek objemu 98% ethanolu a 1/10 NaAc. Směs jsem promíchala, 2 hodiny inkubovala v -20 °C a poté centrifugovala 30 minut ve 4 °C na 5500 ot.min⁻¹. Pelet jsem promyla 80% ethanolem, vysušila a resuspendovala ho v 50 μ l TE pufru. Čistotu plasmidu jsem zkontrolovala na horizontální elektroforéze v agarovém gelu, jeho koncentraci změřila na NanoDropu a jeho správnost ověřila stěpením restrikcními enzymy.

4.2.3 Práce s kvasinkovými kulturami

4.2.3.1 Kultivace kvasinkových kultur

Kvasinkové kultury jsem kultivovala v 28 °C. Kultivace probíhala aerobně, v případě tekutých kultur v horkovzdušné třepačce, v případě stacionární kultivace v termostatu.

Při většině experimentů jsem pracovala s obřími koloniemi. Kvasinky jsem nejprve vynesla na pevné YEPG médium, po 24 hodinové kultivaci jsem odebrala biomasu a naředila jí vodou tak, aby vznikla suspenze o koncentraci 12 mg/ml. Tuto suspenzi jsem nakapala na Petriho misky podle nákresu na obrázku 11. Na jedné misce vždy bylo 6 kapek (každá o objemu 10 μ l) ve vzdálenosti 1,5 cm od vedlejší kapky.



Obr. 11 Rozmístění obřích kolonií na Petriho misce. Každá tečka znázorňuje 10 μ l nanášku buněčné suspenze. Kolonie jsou od sebe vzdáleny 1,5 cm.

4.2.3.2 Dlouhodobé uchovávání kvasinkových kmenů

Kmeny jsem uchovávala ve skladovacím médiu v -80 °C. Při jejich používání byly chlazeny v mrazícím bločku vychlazeném na -80 °C.

4.2.3.3 Stanovení počtu buněk a hustoty kultury

Koncentraci buněčné suspenze jsem určovala měřením OD (optické denzity) při vlnové délce $\lambda=560$ nm na spektrofotometru (Novaspec Plus, Amersham bioscience). Buněčná suspenze vždy byla naředěná tak, aby se hodnota OD pohybovala v hodnotách mezi 0,2-0,5. Používala jsem plastové kyvety s optickou dráhou 1 cm, jako blank jsem používala příslušné

médium. Počet buněk v suspenzi jsem stanovovala také pomocí Thomovy počítačové komůrky. Postup je popsán v kapitole 4.2.3.8.

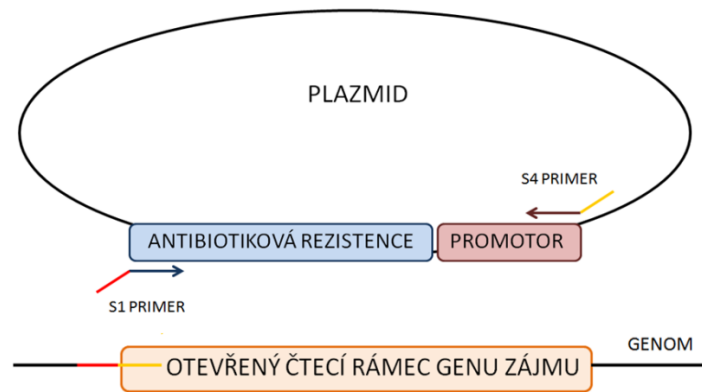
4.2.3.4 Transformace kvasinkových kmenů

Příprava požadovaných kmenů, tzn. kmenů s delecí vybraného genu a kmenů s konstitutivním silným promotorem před vybraným genem, byla založena na velkém množství homologních rekombinací probíhajících v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetentní kvasinkové buňky byly transformovány pomocí kazet získaných PCR reakcemi (kapitola 4.2.3.4.1 a 4.2.3.4.2). Postupovala jsem podle protokolu podle Gietz a Woods (Gietz and Woods 2002). Postup je popsán v kapitole 4.2.3.4.4. Získané klony jsem ověřila pomocí ověřovací PCR (4.2.3.4.6), porovnávala morfologii obřích kolonií (kapitola 4.2.3.4.7) a nechala osekvenovat části upravených úseků genomu (4.2.3.4.7).

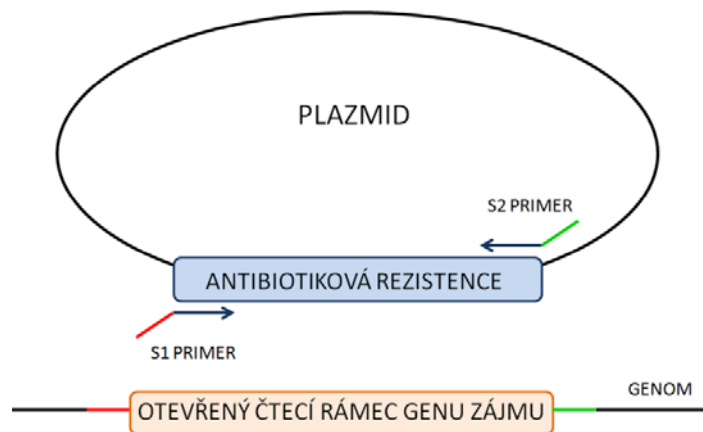
4.2.3.4.1 Navrhování primerů

Primery byly navrženy tak, aby byly specifické pro požadovanou sekvenci, netvořily sekundární a vyšší struktury, teplota nasedání na DNA templát byla přibližně stejná, obsah G-C párů byl v rozmezí 40-60 % a rozložení bází bylo přibližně stejné. Při navrhování jsem vycházela ze sekvence pro daný gen a oblastí vzdálených 1 kbp „upstream“ a „downstream“ od genu zájmu.

Na syntézu transformační kazety jsem pro každý kmen navrhla tři primery: S1, S2 a S4. Primer S1 (komplementární k sekvenci „upstream“ od otevřeného čtecího rámce genu) a primer S2 (komplementární k sekvenci „downstream“ od otevřeného čtecího rámce genu) jsem použila na syntézu deleční kazety. Primer S1 a primer S4 (komplementární k „downstream“ sekvenci od počátku otevřeného čtecího rámce genu) jsem použila na přípravu kazety na vnesení TEF promotoru. Schématické znázornění rozložení primerů na přípravu kazet pro vkládání TEF promotoru je zobrazeno na obrázku 12, obrázek číslo 13 zobrazuje rozložení primerů na přípravu delečních kazet, v tabulce číslo 2 jsou sekvence primerů použitých při přípravě PCR kazet. Primery byly navrženy podle publikace (Janke, Magiera et al. 2004)



Obr. 12 Schématické znázornění rozložení primerů na přípravu kazety pro vnesení TEF promotoru. S1 primer byl navržen tak, aby byl komplementární k antibiotikové rezistenci nesené plasmidem (zobrazeno modře) a „upstream“ oblasti genu zájmu (zobrazeno červeně). S4 primer je komplementární k plasmidovému TEF promotoru (černá část šipky) a počátku otevřeného čtecího rámce genu zájmu (zobrazeno žlutě).



Obr. 13 Schématické znázornění rozložení primerů na přípravu deleční kazety. S1 primer byl navržen tak, aby byl komplementární k antibiotikové rezistenci nesené plasmidem (zobrazeno modře) a „upstream“ oblasti genu zájmu (zobrazeno červeně). S1 primer je schodný jako pro přípravu kazety na vnášení TEF promotoru. S2 primer je také komplementární k antibiotikové rezistenci nesené plasmidem (modrá část šipky) a oblasti za koncem otevřeného čtecího rámce genu zájmu (zobrazeno zeleně).

Sekvence primerů na přípravu PCR kazet		
Gen	Primeru	Sekvence primeru
<i>RIM15</i>	S1	CTGCCTCATTTGATAGAATAGATAAGCCCAGTAGAGGAAGACAGCGTAC GCTGCAGGTCGAC
	S4	CTCTTTCATAGCCTGAGATCCGCCTGCGGTGTTACTTCTATTGAACATCGA TGAATTCTCTGTCCG
	S2	AGTTTTTATTTCAGTTATTTTTTTTAATTATCTTTATCTTAAAATTTATCAAT CGATGAATTCGAGCTCG
<i>SCH9</i>	S1	TTATACTCGTATAAGCAAGAAATAAAGATACGAATATACAATATGCGTAC GCTGCAGGTCGAC
	S4	AAATCCAGTATCCTGATTTCGACGATTTTGATGTAAAAAATTCATCATCG ATGAATTCTCTGTCCG
	S2	AAAAGAAAAGGAAAAGAAGAGGAAGGGCAAGAGGAGCGATTGAGAAAT CAATCGATGAATTCGAGCTCG
<i>GIS1</i>	S1	ATTTTTTTTTTTTAAATTTGAAGAATAGCTACAAAACAGACTACACGTACG CTGCAGGTCGAC
	S4	AAAAACCGGAACGCCATCAATAACCTCAACTGGCTTGATTTCCATCATCG ATGAATTCTCTGTCCG
	S2	TCGATAAAAATTTTTTTTGAACCCATTTTGTATATCATTTTCTTGACCTAAT CGATGAATTCGAGCTCG
<i>MSN2</i>	S1	TCTTCTTTTTTCAACTTTTATTGCTCATAGAAGAACTAGATCTAAAATGC GTACGCTGCAGGTCGAC
	S4	CTTCTATGGGGAATAAAATATCTTCGCTATTGAAATCATGGTCGACCGT CATCGATGAATTCTCTGTCCG
	S2	AATTATCTTATGAAGAAAGATCTATCGAATTAAAAAAATGGGGTCTATTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
<i>MSN4</i>	S1	TTATCAGTTCGGCTTTTTTTTCTTTCTTCTTATTA AAAACAATATAATGCG TACGCTGCAGGTCGAC
	S4	TGTTTCTTGTTGCGTGACGAACGAACTACTATTAGGTCCGAAGACTAG CATCGATGAATTCTCTGTCCG
	S2	CATACCGTAGCTTGCTTGCTTTTATTTGCTTTTGACCTTATTTTTTTCAAT CGATGAATTCGAGCTCG

Tab. 2 Sekvence primerů použitých na přípravu PCR kazet.

4.2.3.4.2 Příprava kazet na homologní rekombinaci pomocí PCR

Polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhaly v cyklu (používala jsem gradientový PCR termocyklér BIOER XP cycler; PCR termocyklér BIOER GenePRO; PCR termocyklér). Pro každou reakci jsem optimalizovala podmínky, tzn. koncentraci primerů ve směsi a teplotu nasedání primerů. Pro různé směsi se tyto podmínky lišily, v tabulce číslo 3 uvádím pro příklad nejčastější složení reakční směsi, v tabulce číslo 4 PCR program. V tabulkách 5, 6 a 7 jsou uvedeny velikosti transformačních kazet.

Reakční směs PCR	
primer S1 (5 pmol·μl ⁻¹)	1 μl
primer S2 nebo S4 (5 pmol·μl ⁻¹)	1 μl
plasmid μl (1 ng·μl ⁻¹)	1 μl
Master Mix	20 μl
demiH ₂ O	17 μl
celkový objem	40 μl

Tab. 3 Složení reakční PCR směsi na přípravu kazet

Podmínky PCR			
Denaturace	94 °C	3 min	1 x
Denaturace	94 °C	20 s	35 x
Nasedání primerů	52 °C	20 s	35 x
Syntéza	72 °C	1,5 min	35 x
Dosyntetizování	72 °C	5 min	1 x
Chlazení	4 °C	60 min	1 x

Tab 4 Program na syntézu PCR kazet.

Kazeta pro vnesení TEF promotoru před gen (plasmid pYM-N18)	Velikost PCR kazety (bp)
<i>RIM15</i>	2083
<i>SCH9</i>	2031
<i>GIS1</i>	2030
<i>MSN2</i>	2041
<i>MSN4</i>	2041

Tab. 5 Velikost PCR kazety na vnesení TEF promotoru před gen zájmu.

Kazeta pro delecí genu (plasmid pFA6a-hphNT1)	Velikost PCR kazety (bp)
<i>RIM15</i>	1827
<i>SCH9</i>	1827
<i>GIS1</i>	1826
<i>MSN2</i>	1832
<i>MSN4</i>	1831

Tab. 6 Velikost PCR kazety na delecí genu zájmu.

Kazeta pro delecí genu (plasmid pFA6a-natNT2)	Velikost PCR kazety (bp)
<i>MSN2</i>	1449
<i>MSN4</i>	1448

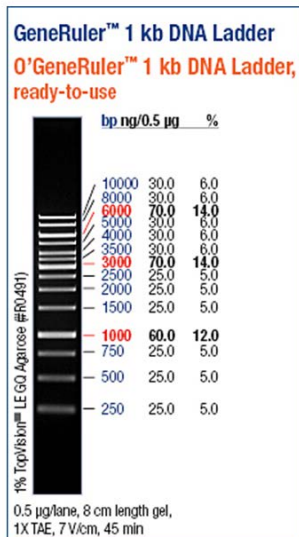
Tab. 7 Velikost PCR kazety na delecí druhého genu v kmenech s dvojitou delecí.

4.2.3.4.3 Elektroforetická analýza DNA

Správnost produktu PCR reakce, tedy kazety, jsem ověřila díky různé pohyblivosti v závislosti na velikosti makromolekul v elektrickém poli při horizontální elektroforéze.

Požadované množství agarózy jsem v mikrovlnné troubě povařila po dobu zhruba tři minut s takovým množstvím 0,5xTBE, aby vzniknul 1% (w/v) roztok. Po ochlazení agarózy na cca 50 °C jsem přidala ethidiumbromid (1 µl/ml gelu), který zajišťuje zviditelnění DNA. Agarózu jsem přelila do plastové vaničky s hřebenem, po 20 minutách jsem jí přenesla do elektroforetického přístroje (Bio-Rad; OWL EASYCAST™ B1, Thermo Scientific; OWL EASYCAST™ B2, Thermo Scientific) a gel zalila 0,5x TBE. Do jamek jsem nanasla 5-10 µl vzorku, první jamka vždy byla použita na 1 µl standardu GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (obr. 14). Elektroforetický přístroj jsem připojila ke zdroji jednosměrného zdroje napětí (Bio-

Rad; ENDURO™, Labnet International; power station 300, Labnet International). Napětí bylo vždy $7 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ a čas 45 minut. Gely jsem fotografovala pod UV transluminátorem (Electronic Dual Light™, Ultra Lum).



Obr. 14 Standard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix

4.2.3.4.4 Transformace kvasinkových buněk LiAc/ssDNA/PEG metodou

Rodičovský kmen *Saccharomyces cerevisiae* jsem ze skladovací konzervy sterilním párátkem přenesla na tuhé YEPG médium. Po 24 hodinách růstu jsem biomasu přenesla do 25 ml tekutého YEPG média a poté jsem suspenzi kultivovala ve třepačce (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) při teplotě $28 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 12 hodin. Následně jsem 1ml suspenze přenesla do 50 ml tekutého média a kultivovala jsem ve $28 \text{ }^\circ\text{C}$, dokud nebyla hodnota optické density kultury 2 (měřeno na přístroji Novaspec Plus, Amersham Biosciences), která odpovídá množství 2×10^7 buněk/ml.

Takto vyrostlou suspenzi jsem přelila do 50 ml falkony a centrifugovala po dobu 5 minut při $22 \text{ }^\circ\text{C}$ na 4000 otáček za minutu (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Supernatant jsem slila a buňky jsem propláchla ve 25 ml vody. Suspenzi jsem centrifugovala po dobu 5 minut při $22 \text{ }^\circ\text{C}$ na 4000 otáček za minutu, slila supernatant, buňky resuspendovala v 1 ml vody a přenesla do eppendorfovy zkumavky. Suspenzi jsem centrifugovala 2 minuty při laboratorní teplotě na 6000 otáček/minutu. Vodu jsem odebrala a buňky naředila vodou tak, aby vzniklá suspenze obsahovala 2×10^7 buněk/ml. Pro každou transformační směs jsem odebrala 100 µl buněčné suspenze, centrifugovala ji po dobu 2

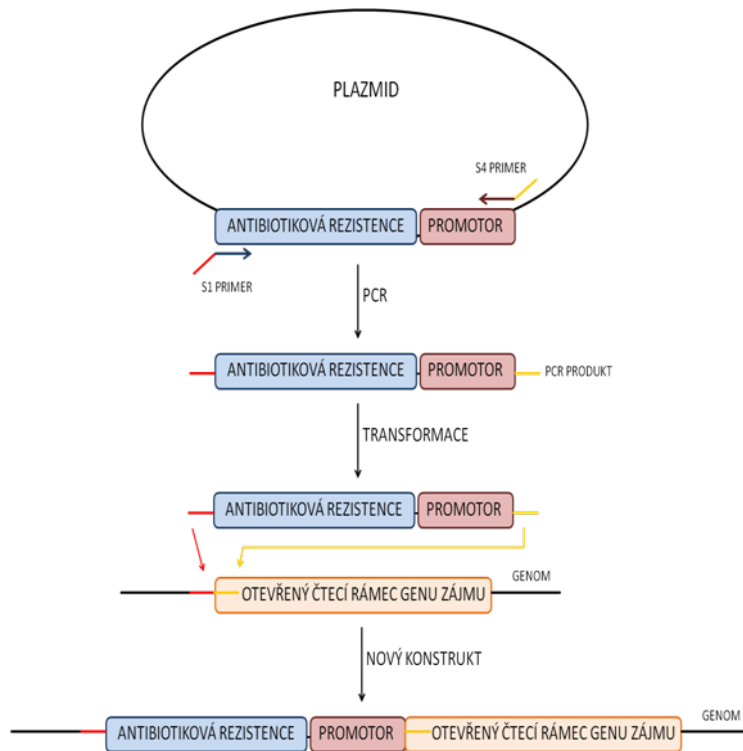
minut při 22 °C na 6000 otáček za minutu, odebrala supernatant a přidala transformační směs, jejíž složení pro jednu reakci je v tabulce 8.

Transformační směs	
50 % PEG	240 µl
1 M LiAc	36 µl
ss DNA (10 mg/ml)	10 µl
dest. H ₂ O	40 µl
Kazeta	34 µl

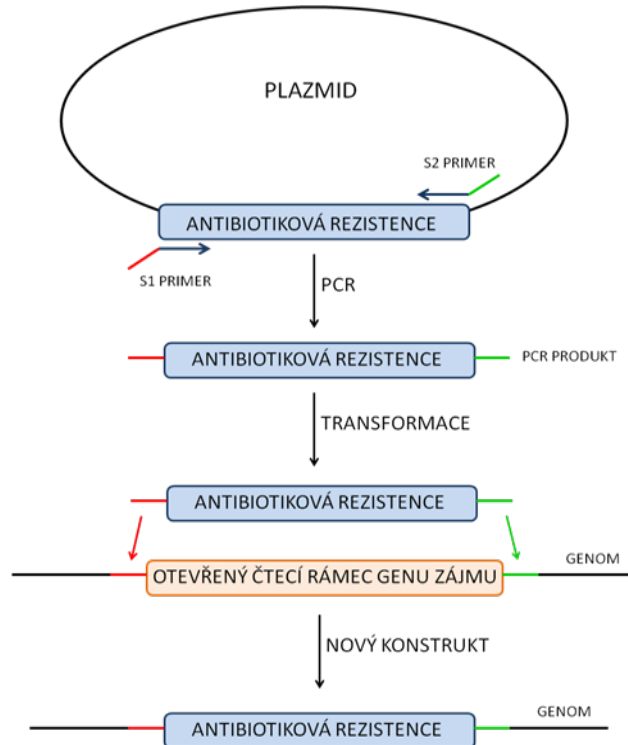
Tab. 8 Složení reakční směsi na transformaci kvasinkových buněk. Salmon sperm DNA (ssDNA) jsem před použitím 5 minut vařila a poté zchladila na ledu.

Buňky jsem s transformační směsí řádně promíchala a inkubovala je v rotačním bločku předeřtém na 42 °C po dobu 40 minut (Barnstead International, Lab-Line). Směs jsem centrifugovala 1 minutu při laboratorní teplotě na 6000 otáček za minutu. Odebrala jsem supernatant, k buňkám přidala 2 ml tekutého YEPG média a kultivovala jsem 4 hodiny v horkovzdušné třepačce při 28 °C. Poté jsem suspenzi centrifugovala (2 min., 22 °C, 6000 ot./min.), odebrala supernatant, přidala vodu a buňky vysela na Petriho misky s příslušným selekčním médiem. Po 3-4 denní statické kultivaci ve 28 °C jsem jednotlivé kolonie vzniklé růstem jednoho klonu přenesla na petriho misku s tuhým YEPG médiem. Po další 24 hodinové statické kultivaci ve 28 °C jsem část roztěru použila na vytvoření konzervy k trvalému uchování kmene a druhou část k ověření správnosti vzniklého konstruktů.

Na obrázku 15 je znázorněno schéma vkládání silného TEF promototu před gen zájmu, na obrázku 16 je znázorněna delece požadovaného genu.



Obr 15 Schématické znázornění postupu vkládání silného promotoru před gen zájmu. Z plazmidu je při PCR reakci přepsána kazeta. Při transformaci dojde pomocí homologních konců k jejímu vložení do genomu. Vzniklý konstrukt obsahuje antibiotikovou rezistenci, která slouží jako selekční marker po transformaci a silný TEF promotor před genem zájmu.



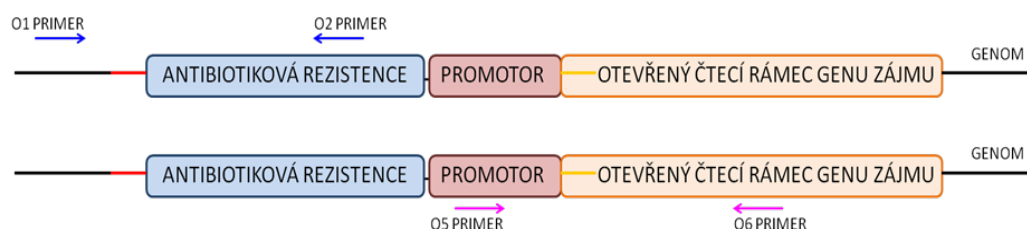
Obr. 16 Schématické znázornění postupu při delecí genu. Z plazmidu je při PCR reakci přepsána kazeta, která se přes homologní konce při transformaci rekombinuje do genomu. Vzniklý konstrukt obsahuje antibiotikovou rezistenci, která nahrazuje otevřený čtecí rámec genu zájmu a zároveň slouží jako selekční marker po transformaci.

4.2.3.4.5 Získání DNA z kvasinkových buněk na ověřovací PCR

Z každé kolonie vytvořené jedním klonem jsem odebrala biomasu o velikosti špendlíkové hlavičky a vložila ji do 40 µl čerstvě připraveného 20 mM NaOH. Biomasu jsem řádně resuspendovala (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a denurovala 15 minut při 95 °C (gradientový PCR termocykler BIOER XP cycler; PCR termocyklér BIOER GenePRO; PCR termocyklér). Poté jsem vzorky centrifugovala na 2000 otáček/minutu po dobu 1 minuty (mikrocentrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International) a 1 µl supernatantu použila jako templát DNA pro 10 µl PCR reakce.

4.2.3.4.6 Ověření modifikovaných kmenů pomocí ověřovací PCR

Na ověřovací PCR jsem pro každý kmen navrhla tři primery: O1, O4 a O6. K ověřování byly dále použity primery O2, O3 a O5, které byly navrženy tak, aby byly specifické pro vnesený selekční gen a nebo pro gen vneseného TEF promotoru. Správnost delečních kmenů byla ověřena pomocí kombinace primerů O1 (komplementární k oblasti „upstream“ od otevřeného čtecího rámce genu) a O2 (komplementární k vnesené antibiotikové rezistenci) a kombinace O4 (komplementární k oblasti „downstream“ za otevřeným čtecím rámcem genu) a O3 (komplementární k vnesené antibiotikové rezistenci). Správnost konstruktů s vneseným konstitutivním promotorem byla ověřena pomocí kombinace primerů O1 a O2 a kombinace O6 primeru (komplementární k otevřenému čtecímu rámcu genu) a O5 (komplementární ke genu TEF promotoru). Schématické znázornění rozvržení primerů je na obrázcích 17 a 18, tabulky 9, 10, 11 a 12 obsahují sekvence použitých primerů.



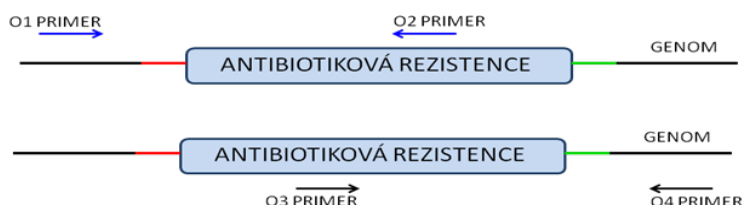
Obr. 17 Umístění primerů na ověřovací PCR nadprodukcčních kmenů. Primery O1 a O6 jsou specifické pro každý kmen, primery O2 a O5 jsou pro všechny kmeny univerzální. V reakci vždy byly použity kombinace primerů označených stejnou barvou: O1 a O2 (modré), O5 a O6 (růžové).

Plasmid	Primer	Sekvence primeru
pYM-N18	O2	GATGGCAAGATCCTGGTATC
	O5	CGATGACCTCCCATTGATAT

Tab. 9 Sekvence univerzálních ověřovacích primerů O2 a O5 komplementárních k plasmidu pYM-N18.

Kmen	Primer	Sekvence primeru
BY4742-P _{TEF} - <i>RIM15</i>	O1	AACTCATCAAGCATTTC
	O6	TTTCATAATTGGAGGAAGTC
BY4742-P _{TEF} - <i>SCH9</i>	O1	GCTGGTCGCTTATATTCTC
	O6	GACGTGGTAATAATCGTAGG
BY4742-P _{TEF} - <i>GIS1</i>	O1	CTATTTGTTTCTTTGTTGGG
	O6	GAGGTGAGCCTTCTAAAAG
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN2</i>	O1	AGCACGAGCTCAACAACA
	O6	AGTCGAAAGATAGTGGAG
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN4</i>	O1	GCATGAGCATACTGTAG
	O6	CTATGCGGAGAATCCATT

Tab. 10 Sekvence ověřovacích primerů specifických pro každý kmen.



Obr. 18 Umístění primerů na ověřovací PCR delečních kmenů. Primery O1 a O4 jsou specifické pro každý kmen, primery O2 a O3 jsou pro všechny kmeny univerzální. V reakci byly použity kombinace primerů označených stejnou barvou: O1 a O2 (modré) a O3 a O4 (černé).

Plasmid	Primer	Sekvence primeru
pFA6a-hphNT1	O2	GAAATCACGCCATGTAGTGT
	O3	ACTGTCGGGCGTACACAAAT
pFA6a-natNT2	O2	ATTCGTCGTCGATTCGT
	O3	CGTGGTCATCTCGTACTC

Tab. 11 Sekvence univerzálních ověřovacích primerů O2 a O3 komplementárních k plasmidu pFA6a-hphNT1 a primerů O2 a O3 komplementárních k plasmidu pFA6a-natNT2.

Kmen	Primer	Sekvence primeru
BY4742- <i>rim15Δ</i>	O1	AACTCATCAAGCATTTC
	O4	CTATTCTTCCAGAGGATGATG
BY4742- <i>sch9Δ</i>	O1	GCTGGTCGCTTATATTCTC
	O4	TACAATGGAATGGTGAGGTA
BY4742- <i>gis1Δ</i>	O1	CTATTTGTTTCTTTGTTGGG
	O4	GGTCTTGAACATGATTGGA
BY4742- <i>msn2Δ</i>	O1	AGCACGAGCTCAACAACA
	O4	CGCACGGAATTCATTAAAC
BY4742- <i>msn4Δ</i>	O1	GCATGAGCATACTGTAG
	O4	TAAGAGTCATCACAGCAAC

Tab. 12 Sekvence ověřovacích primerů specifických pro každý kmen.

Stejně jako v případě přípravy kazet, polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhaly v cykleru (používala jsem gradientový PCR termocykler BIOER XP cycler; PCR termocyklér BIOER GenePRO; PCR termocyklér). Pro každou reakci jsem optimalizovala podmínky, tzn. koncentraci primerů ve směsi a teplotu nasedání primerů. Pro různé směsi se tyto podmínky lišily, v tabulce číslo 13 uvádím pro příklad nejčastější složení reakční směsi, v tabulce číslo 14 PCR program. V tabulkách 15, 16 a 17 je uvedena velikost produktu ověřovací PCR.

Reakční směs PCR	
primer O1 nebo O4 nebo O6 (5 pmol·μl ⁻¹)	0,7 μl
primer O2 nebo O3 nebo O5 (5 pmol·μl ⁻¹)	0,7 μl
genomová DNA	1 μl
Master Mix	5 μl
demiH ₂ O	2,3 μl
celkový objem	10 μl

Tab. 13 Složení reakční směsi při ověřovací PCR

Podmínky PCR			
Denaturace	94 °C	5 min	1 x
Denaturace	94 °C	15 s	35 x
Nasedání primerů	54 °C	15 s	35 x
Syntéza	72 °C	1,5 min	35 x
Dosyntetizování	72 °C	5 min	1 x
Chlazení	4 °C	60 min	1 x

Tab. 14 Program na ověřovací PCR.

Název kmenu	Použité primery	Velikost produktu PCR (bp)
BY4742-P _{TEF} - <i>RIM15</i>	O5+O6	304
	O1+O2	601
BY4742-P _{TEF} - <i>SCH9</i>	O5+O6	539
	O1+O2	754
BY4742-P _{TEF} - <i>GIS1</i>	O5+O6	358
	O1+O2	683
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN2</i>	O5+O6	403
	O1+O2	625
BY4742-P _{TEF} - <i>MSN4</i>	O5+O6	392
	O1+O2	298

Tab. 15 Délka produktu ověřovací PCR reakce nadprodukčních kmenů. Popis umístění primerů je uveden na obrázku 17.

Název kmenu	Použité primery	Velikost produktu PCR (bp)
BY4742- <i>rim15Δ</i>	O3+O4	885
	O1+O2	976
BY4742- <i>sch9Δ</i>	O3+O4	660
	O1+O2	1197
BY4742- <i>gis1Δ</i>	O3+O4	756
	O1+O2	997
BY4742- <i>msn2Δ</i>	O3+O4	727
	O1+O2	1186
BY4742- <i>msn4Δ</i>	O3+O4	822
	O1+O2	1156

Tab. 16 Délka produktu ověřovací PCR reakce delečních kmenů. Popis umístění primerů je uveden na obrázku 18.

Název kmenu	Použité primery	Velikost produktu PCR (bp)
BY4742- <i>msn2Δ/msn4Δ</i>	O3+O4	1067
	O1+O2	908
BY4742- <i>msn4Δ/msn2Δ</i>	O3+O4	972
	O1+O2	938

Tab. 17 Délka produktu ověřovací PCR reakce kmenů s delecí genů *MSN2* a *MSN4*. Kmen BY4742-*msn2Δ/msn4Δ* byl odvozen od kmene BY4742-*msn2Δ*, kmen BY4742-*msn4Δ/msn2Δ* byl odvozen od kmene BY4742-*msn4Δ*. Popis umístění primerů je uveden na obrázku 18.

Předpokládaná délka produktu PCR reakce byla ověřená pomocí elektroforetické analýzy popsané v kapitole 4.2.3.4.3.

4.2.3.4.7 Ověření kmenů porovnáním morfologie obřích kolonií

U všech klonů, u kterých jsem ověřila pomocí PCR správné vložení kazety, jsem po dobu 21 dnů pozorovala morfologii obřích kolonií (kapitola 4.2.3.1). Morfologie obřích kolonií klonů stejného kmene by měla být obdobná, pokud se některý kmen lišil od ostatních, vyhodnotila jsem jej jako nesprávný. Jeden klon od každého kmene, který jsem sekvenčně ověřila, a morfologicky se shodoval s většinou klonů stejného kmene, jsem dále ověřovala pomocí sekvenace DNA.

4.2.3.4.8 Ověření kmenů pomocí sekvenace DNA

Sekvenovaný úsek DNA kmenů s konstitutivním silným promotorem zahrnoval TEF promotor a počátek genu zájmu, sekvenován byl tedy produkt PCR reakce O5 a O6 primeru (znázorněny na obrázku 16). V případě delečních kmenů jsem připravila vzorky na sekvenci tak, abych se ujistila, že gen mého zájmu byl celý odstraněn. Jednalo se tedy o produkty reakce O1 a O2 primeru a O3 a O4 primeru (znázorněny na obrázku 17). Program i složení reakční směsi bylo shodné jako v případě ověřovací PCR popsané v předešlé kapitole.

Po proběhnutí PCR reakce jsem DNA vysrážena etanolem. Po vysušení jsem k DNA přidala 30 μ l demiH₂O a změřila koncentraci na mikrokapilárním spektrofotometru NANODROP 1000 (Thermo Scientific). Během měření koncentrace jsem také sledovala čistotu DNA pomocí hodnot A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{280} , které nikdy nebyly menší než 1,6. Vzorek jsem naředila na požadovanou koncentraci (závislou na délce) a přidala primer podle pravidel Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK, ve které jsem vzorky nechávala zpracovat. S daty získanými ze sekvenace jsem pracovala v nástrojích dostupných na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4.2.3.4.9 Srážení DNA etanolem

K roztoku DNA jsem přidala 2,5 objemu ledově studeného 96% ethanolu a 0,1 výsledného objemu 3M NaAc. DNA jsem srážela přes noc při -20°C . Druhý den jsem sraženinu centrifugovala (30 min., 4°C , 14 000 ot.min⁻¹), peletu jsem opláchla ledovým 80% ethanolem, vysušila při laboratorní teplotě a resuspendovala v TE pufru (objem jsem volila dle očekávaného množství DNA). Dále jsem roztok DNA skladovala při -20°C .

4.2.3.5 Vertikální řezy koloniemi

Výšku kolonií a uspořádání různých typů buněk v rámci kolonií jsem určovala pomocí mikroskopie vernikálních řezů. Z obřích kolonií rostoucích na tuhém GM+BKP médiu jsem vždy vybrala jednu z krajních kolonií, vyřízla jí z Petriho misky a přelila jí 2 ml 2 % (w/v) agarózy. Po zatuhnutí (30 minut při laboratorní teplotě a 5 minut při 7°C) jsem žiletkou uřízla polovinu kolonie. Tuto polovinu jsem dále řezala na mikrotomu, mikroskopovala jsem řezy o tloušťce 20 μ m a složením jejich fotografií zaznamenala vnitřní uspořádání kolonií.

4.2.3.6 Separace jednotlivých subpopulací buněk kolonie

Buňky obřích kolonií jsem dělila na různé subpopulace pomocí žiletky, která měla z důvodu usnadnění práce konce oblepené lepicí páskou. Nejprve jsem tahem žiletky odebrala buňky horní vrstvy, poté jsem stejným způsobem odebrala buňky ze střední části kolonie, které jsem k analýze nepoužila. Buňky spodní vrstvy jsem odebrala ze střední části párátkem. Kvalitu rozdělení buněk na subpopulace jsem kontrolovala mikroskopickým pozorováním (kapitola 4.2.3.7).

4.2.3.7 Mikroskopické pozorování

Při pozorování buněk jsem použita mikroskop Leica DMR. Preparáty jsem pozorovala pomocí Nomarského kontrastu ve viditelném světle. Obraz jsem zaznamenávala pomocí kamery JENOPTIK Progres® MF^{cool}.

4.2.3.8 Určení hmotnosti buněk horní a spodní vrstvy kolonií v čase

Hmotnost buněk a poměr hmotnosti mezi U a L buňkami kolonie v čase jsem určovala na základě rozdílného počtu buněk ve stejné hmotnosti biomasy. Analyzovala jsem buňky pocházející z obřích kolonií, které rostly na GM+BKP médiu 5, 7, 9, 12, 14, 20 a 30 dní. Buněčná suspenze použitá pro tuto analýzu byla zároveň použitá pro určení procentuálního zastoupení živých buněk (kapitola 4.2.3.9). Buňky kolonie jsem na jednotlivé subpopulace rozdělila pomocí žiletky a naředila je na koncentraci 12 mg/ml. U a L buňky jsem dále naředila tak, aby bylo možné je spočítat v Thomově počítací komůrce. Ředění se lišilo v závislosti na kmenu. Počet buněk jsem v případě všech kmenů přepočítala na množství obsažené v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^{-5} mg/ml.

4.2.3.9 Určení zastoupení živých buněk horní a spodní vrstvy kolonií v čase

Rozdílnou životaschopnost buněk horní a spodní vrstvy obřích kolonií delečních a nadprodukcčních kmenů jsem určovala 5., 7., 9., 12., 14., 20. a 30. den růstu obřích kolonií na GM+BKP médium. Kolonie jsem sterilně rozdělila žiletkou, naředila je vodou na koncentraci 12 mg/ml a dále je ředila na koncentraci 12×10^{-5} . Z této koncentrace jsem na petriho misky s YEPG médiem vysela takové množství suspenze, aby vyrostlo 100-400 kolonií na misku, buňky horní i spodní vrstvy jsem vysela vždy na tři misky s YEPG médiem. Počet vyrostlých kolonií po 2-4 dnech jsem určila pomocí programu Colony Counter. Počet buněk v suspenzi, kterou jsem použila k výsevu, jsem určovala pomocí Thomovy počítací komůrky. Buňky v komůrce jsem pozorovala mikroskopem (Leica DMR, zvětšení 20x10) a následně pořídila jejich fotografie. Pro horní i spodní buňky jsem analyzovala více než 200 komůrek o rozměrech 1/400x0,1x0,1 mm, které byly v rámci sklíčka úhlopříčně uspořádané. Spočítání bylo provedeno pomocí programu CellCounter (Náhlík 2014). Počet buněk, které jsem vysela na petriho misky, představoval ve výpočtu procentuálního zastoupení živých buněk 100%. Skutečné zastoupení živých buněk jsem dopočítala na základě průměrného počtu kolonií ze tří petriho misek.

5 Výsledky

5.1 Příprava kmenů

Cíl: Příprava kmenů potřebných pro účely této práce.

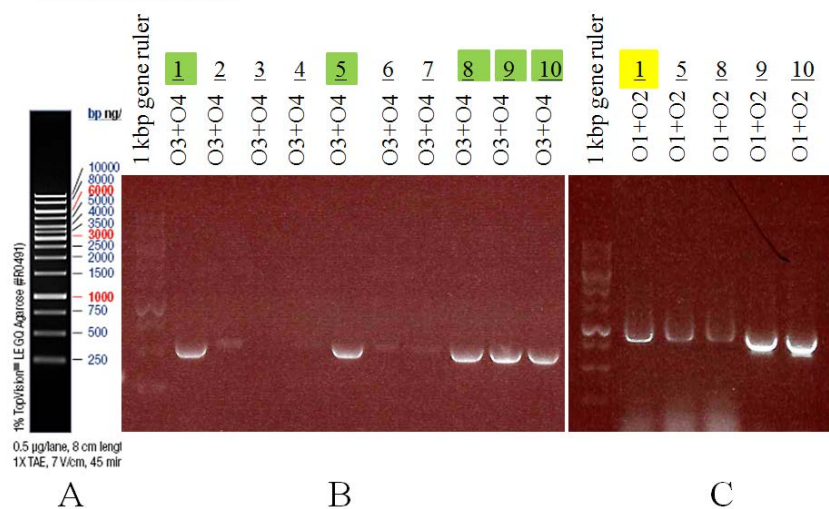
V rámci diplomové práce jsem připravila kmeny s nadprodukcí genu zájmu, s delecí genu zájmu a kmen, který nese dvojitou delecí. Kmeny byly odvozené od haploidního laboratorního kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742.

Nadprodukce genu zájmu jsem dosáhla výměnou přirozeného promotoru za silný konstitutivní promotor TEF přímo v genomu kvasinek pomocí homologní rekombinace. Kazetu pro homologní rekombinaci jsem připravila z plazmidu pYM-N18 (obr. 19 B). Kmeny jsem odvozovala od haploidního rodičovského kmene, který obsahuje vždy jednu alelu příslušného genu. Výsledný konstrukt proto obsahoval pouze modifikovaný gen. Ověření připravených kmenů pomocí PCR (4.2.3.4.6) a následné elektroforézy (4.2.3.4.3) je zobrazeno na obrázcích 20-24.

Delece genu zájmu bylo dosaženo rekombinací genu z genomu kvasinky a nahrazením antibiotikovou rezistencí. Pro přípravu kazet jsem použila plazmid pFA6a-hphNT1 (obr. 19 C). Stejně jako v případě přípravy nadprodukčních kmenů, transformace probíhala jednodrokově, protože jsem použila haploidní rodičovský kmen. Ověření připravených kmenů pomocí PCR (4.2.3.4.6) a následné elektroforézy (4.2.3.4.3) je zobrazeno na obrázcích 25-29.

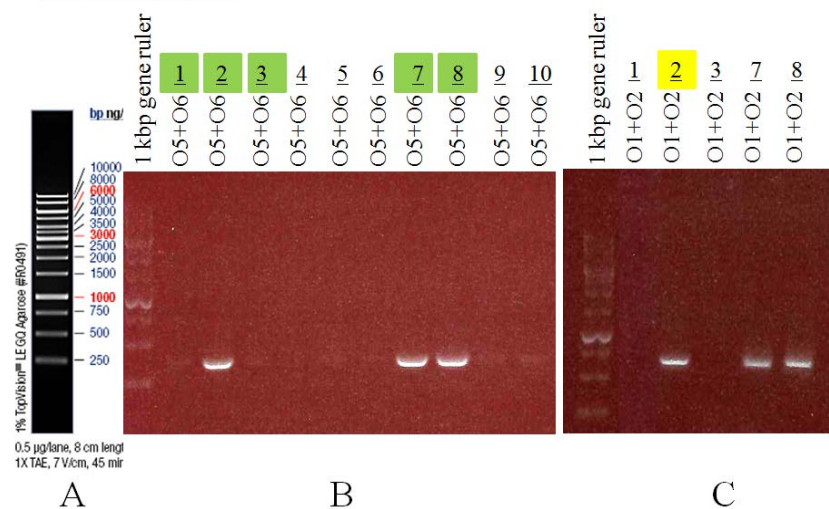
V případě přípravy kmene s dvojitou delecí *msn2Δ/msn4Δ* byly nezbytné dvě transformace. Během první transformace jsem z genomu rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 odstranila gen *MSN2* nebo *MSN4*. Jednotlivé získané klony kmenů jsem ověřila pomocí PCR, morfologického porovnání a sekvenace (kapitoly 4.2.3.4.6, 4.2.3.4.7 a 4.2.3.4.8). Dále jsem vybrala jeden klon kmene *msn2Δ* (odvozený kmen s dvojitou delecí je označen *msn2Δ/msn4Δ*) a jeden klon kmene *msn4Δ* (odvozený kmen s dvojitou delecí je označen *msn4Δ/msn2Δ*) a deletovala v nich gen *MSN4* nebo *MSN2*. K tomuto účelu jsem použila kazetu připravenou z plazmidu pFA6a-natNT1 (obr. 19 C). Na další analýzu kmenů jsem použila kmen *msn2Δ/msn4Δ*, ve kterém jsem jako první deletovala gen *MSN2*. Ověření připravených kmenů pomocí PCR (4.2.3.4.6) a následné elektroforézy (4.2.3.4.3) je zobrazeno na obrázcích 30 a 31.

BY4742-P_{TEF}-SCH9



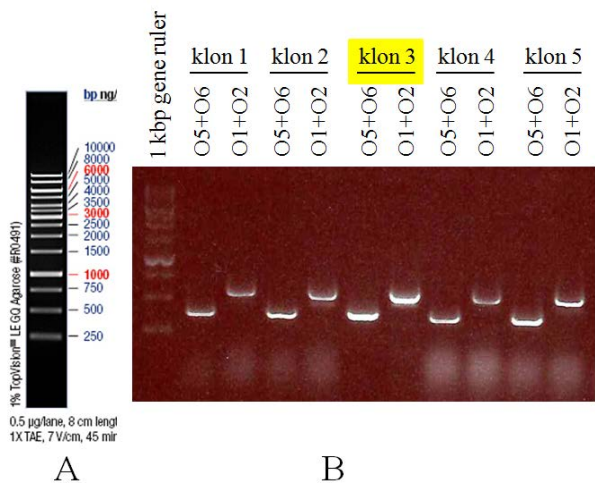
Obr. 21 PCR ověření klonů kmene BY4742-P_{TEF}-SCH9. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 µl. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O5 a O6 primerů, velikost produktů odpovídá 539 bp, nanáška 5 µl. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 754 bp, nanáška 5 µl. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-P_{TEF}-GIS1



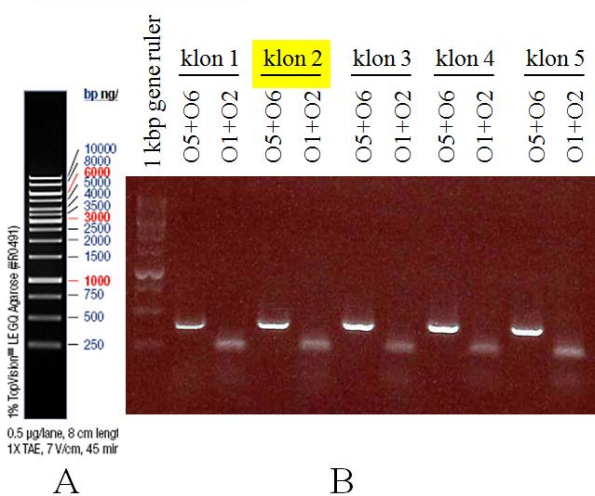
Obr. 22 PCR ověření klonů kmene BY4742-P_{TEF}-GIS1. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 µl. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O5 a O6 primerů, velikost produktů odpovídá 358 bp, nanáška 5 µl. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 683 bp, nanáška 5 µl. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742- P_{TEF} -*MSN2*



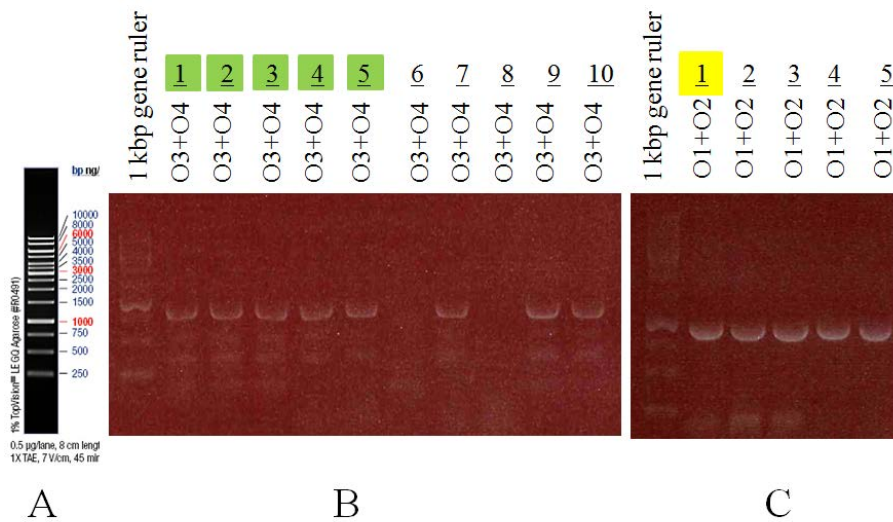
Obr. 23 PCR ověření klonů kmene BY4742- P_{TEF} -*MSN2*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O5 a O6 primerů, velikost produktů odpovídá 403 bp, nanáška 5 μ l a PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 625 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742- P_{TEF} -*MSN4*



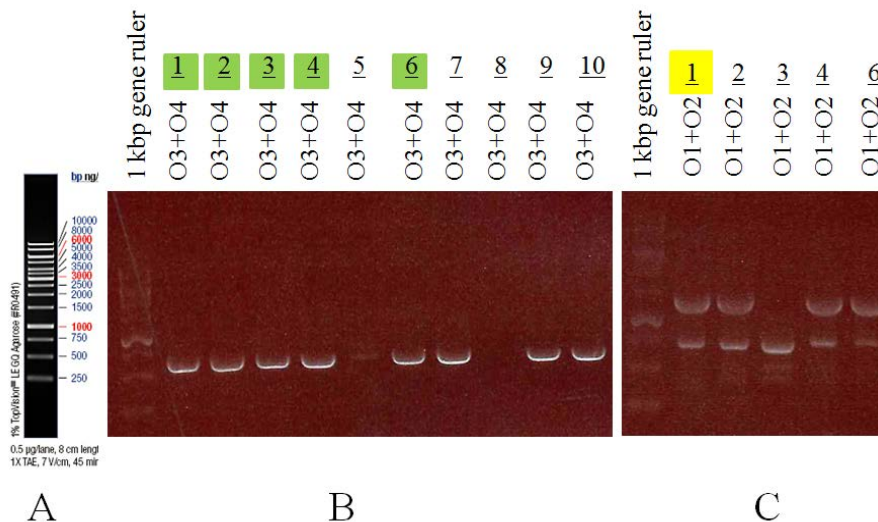
Obr. 24 PCR ověření klonů kmene BY4742- P_{TEF} -*MSN4*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O5 a O6 primerů, velikost produktů odpovídá 392 bp, nanáška 5 μ l a PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 298 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-*rim15Δ*



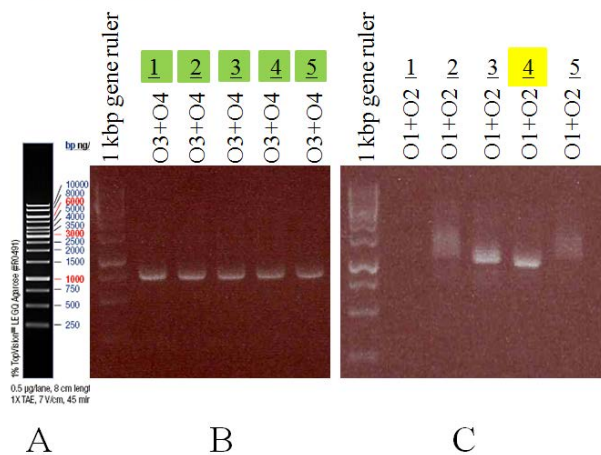
Obr. 25 PCR ověření klonů kmene BY4742-*rim15Δ*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 885 bp, nanáška 5 μ l. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 976 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-*sch9Δ*



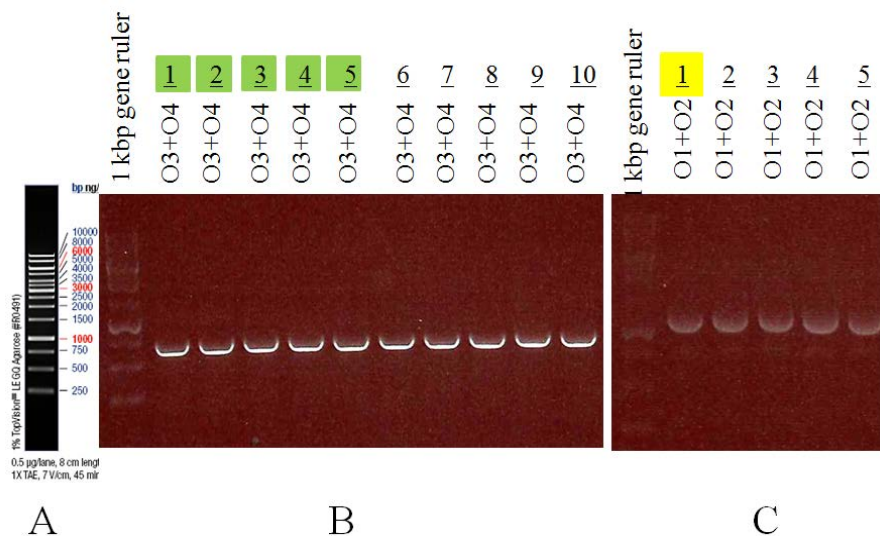
Obr. 26 PCR ověření klonů kmene BY4742-*sch9Δ*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 660 bp, nanáška 5 μ l. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 1197 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-*gis1A*



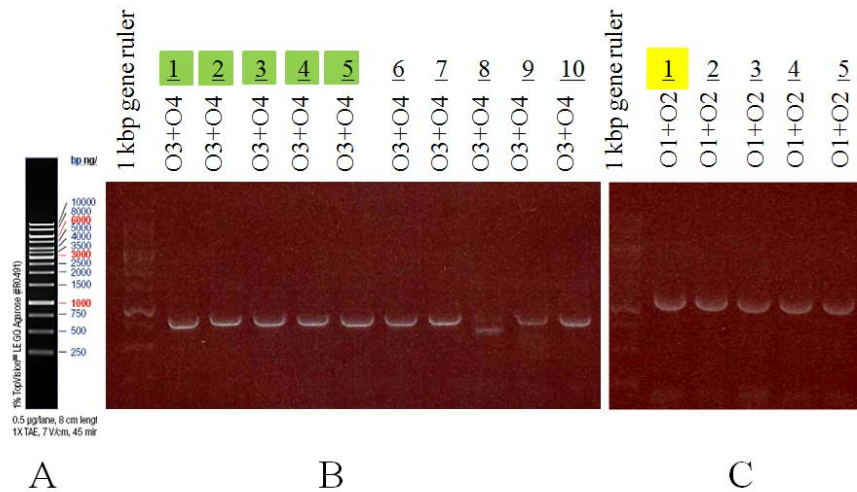
Obr. 27 PCR ověření klonů kmene BY4742-*gis1A*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 µl. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 756 bp, nanáška 5 µl. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 997 bp, nanáška 5 µl. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-*msn2A*



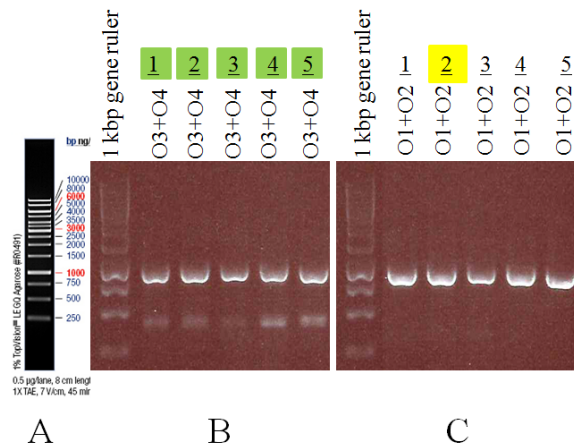
Obr. 28 PCR ověření klonů kmene BY4742-*msn2A*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 µl. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 727 bp, nanáška 5 µl. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 1186 bp, nanáška 5 µl. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-msn4Δ



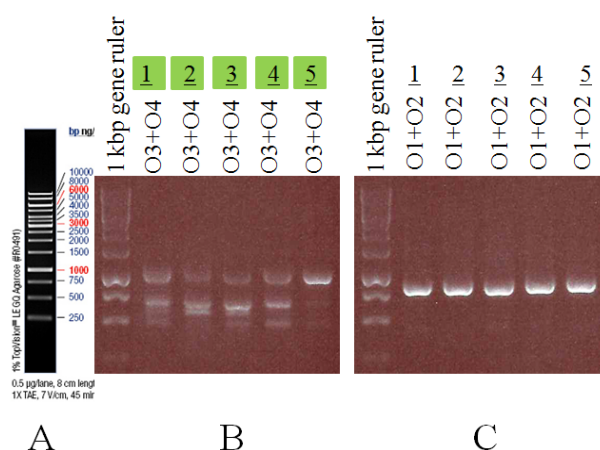
Obr. 29 PCR ověření klonů kmene *BY4742-msn4Δ*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 822 bp, nanáška 5 μ l. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 1156 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-msn2Δ/msn4Δ



Obr. 30 PCR ověření klonů kmene *BY4742-msn2Δ/msn4Δ*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 1064 bp, nanáška 5 μ l. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 908 bp, nanáška 5 μ l. Žlutě je označen klon, který jsem ověřila sekvencí DNA a použila pro analýzu kmenů.

BY4742-*msn4Δ/msn2Δ*



Obr. 31 PCR ověření klonů kmene BY4742-*msn4Δ/msn2Δ*. A marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (viz. Obr. 14), 1 μ l. B PCR produkty ověřovací PCR při použití O3 a O4 primerů, velikost produktů odpovídá 972 bp, nanáška 5 μ l. Zeleně jsou označeny klony, které jsem dále ověřovala O1 a O2 primery. C PCR produkty ověřovací PCR při použití O1 a O2 primerů, velikost produktů odpovídá 938 bp, nanáška 5 μ l. Pro analýzu kmenů jsem použila klon kmenu BY4742-*msn2Δ/msn4Δ*.

5.2 Morfologická charakteristika kolonií připravených kmenů

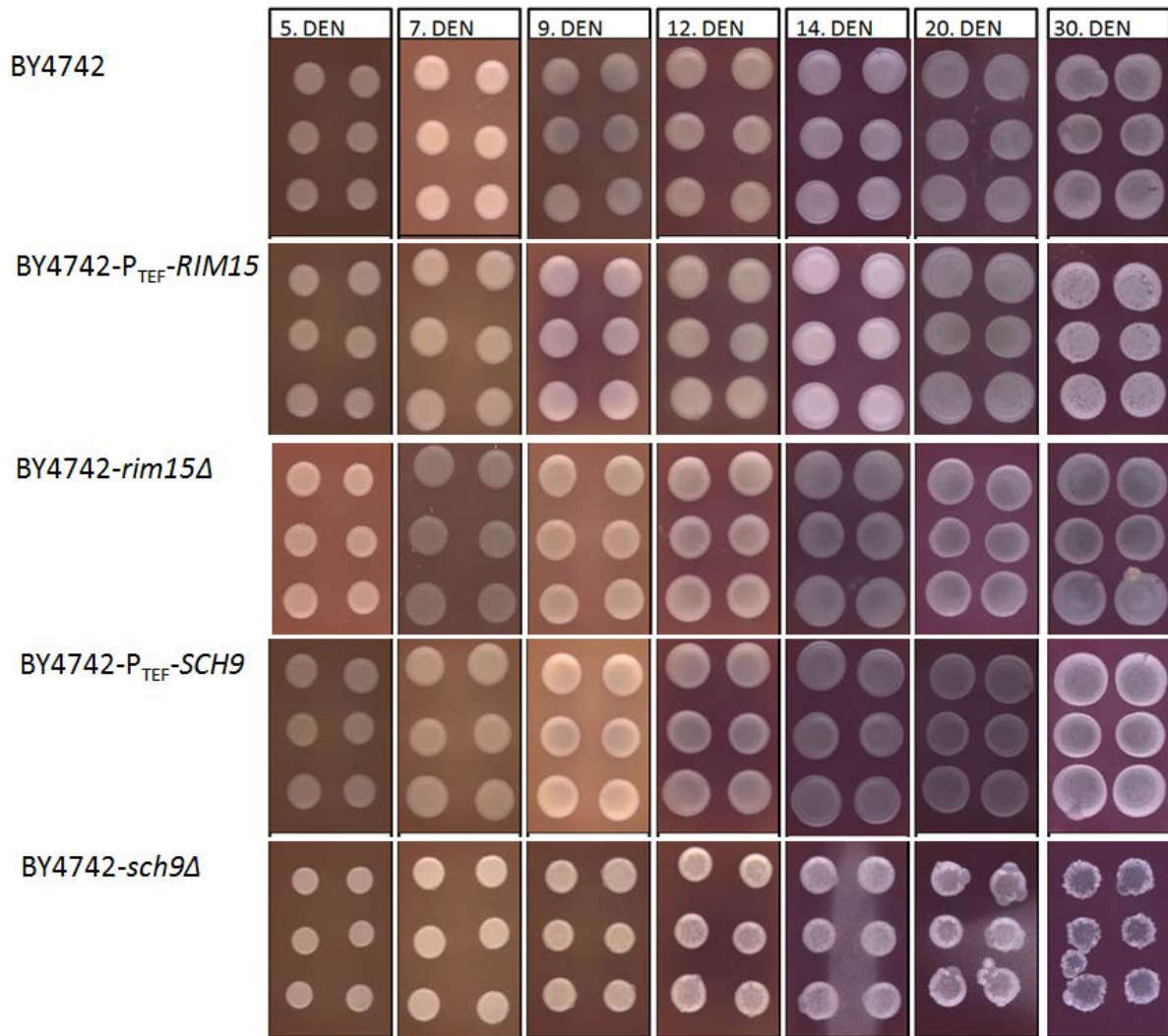
5.2.1 Morfologie obřích kolonií a produkce amoniaku

Cíl: Charakterizovat morfologii a schopnost produkovat amoniak obřích kolonií kmenů s konstitutivní expresí a delecí vybraných genů.

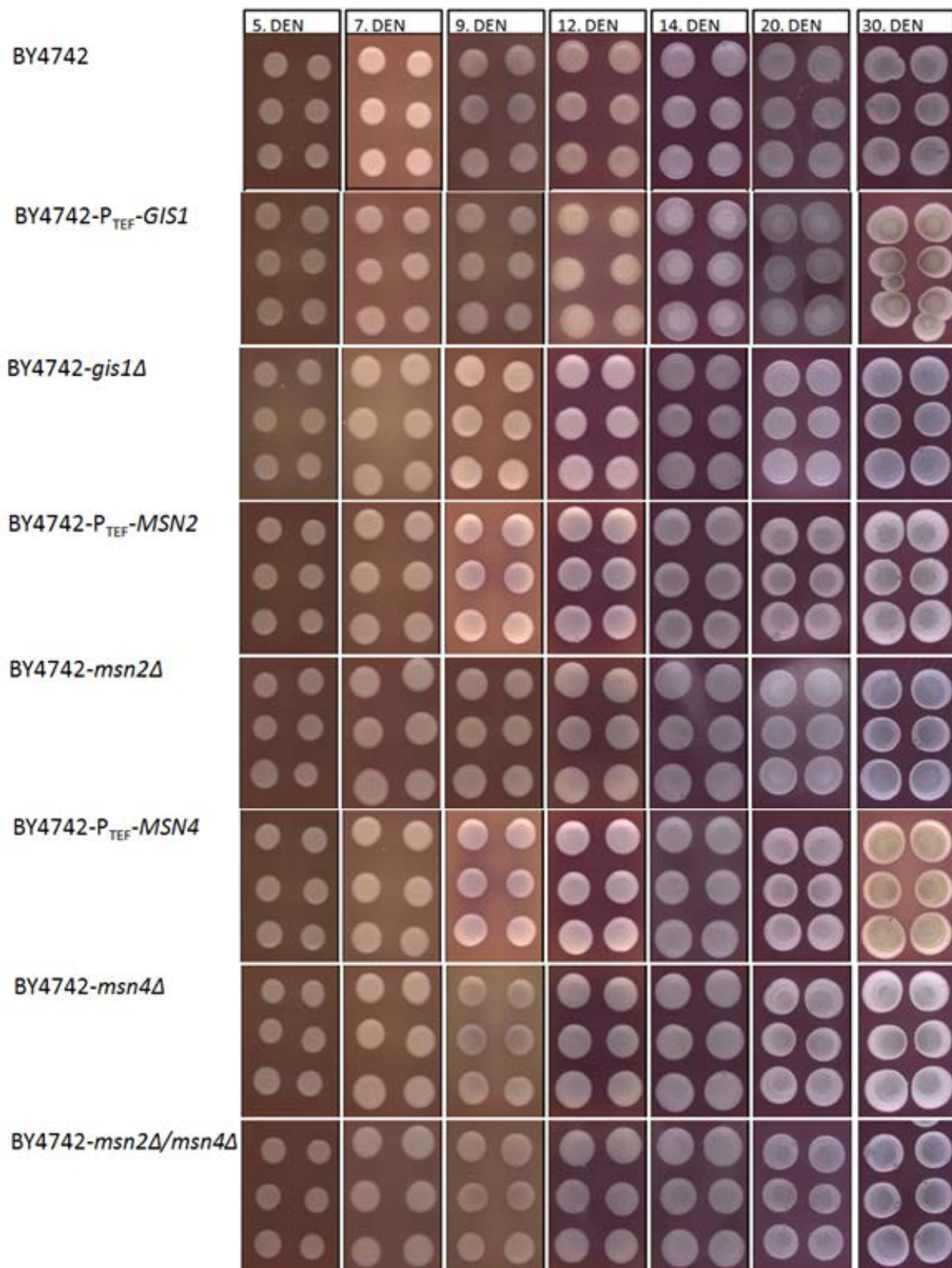
Obří kolonie laboratorního kmene BY4742 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vytváří na glycerolovém médiu hladké kolonie. Růst a vývoj kolonie je provázen střídáním acidických a alkalických fází. Během alkalické fáze je uvolňován plynný amoniak, který slouží jako signální molekula a ovlivňuje mnoho buněčných procesů včetně růstu, genové exprese a schopnosti buněk kolonie se diferencovat na různé subpopulace. Schopnost uvolňovat amoniak je tedy pro vývoj kolonie klíčová (Palkova and Forstova 2000), (Palkova, Devaux et al. 2002).

Alkalizaci média vyvolanou obřími koloniemi rodičovského kmene *S.cerevisiae* BY4742 a koloniemi kmenů, které jsem připravila, jsem pozorovala 5.,7.,9.,12.,14.,20. a 30. den růstu kolonií na GM+BKP médiu (kapitola 4.2.3.1). Z obrázku 32 a 33 je patrné, že u žádného z připravených kmenů nedochází k výrazným změnám schopnosti alkalizace média.

V uvedené dny jsem také pozorovala morfologii obřích kolonií. Kolonie kmene BY4742-*sch9Δ* již od rané fáze vývoje vykazovaly výrazné morfologické změny oproti koloniím kmene rodičovského. Na povrchu kolonií BY4742-*sch9Δ* se vyskytovalo mnoho papil a kolonie měly menší poloměr. Morfologii a alkalizaci koloniemi jsem zaznamenávala kamerou (kapitola 4.2.3.7).



Obr. 32 Morfologie a alkalizace kolonií rodičovského kmene BY4742, a kmenů se zvýšenou expresí resp. delecí genů kódujících kinázy Rim15p a Sch9p. Jednotlivé kmeny jsou seřazeny v řádcích pod sebou, sloupce představují stáří kolonie. Alkalizace je zřejmá dle barvy GM+BKP média. Žlutá barva značí více acidické pH, fialová znamená více alkalické pH. Přechodové pH má hodnotu 6,3.



Obr. 33 Morfologie a alkalizace kolonií rodičovského kmene BY4742, a kmenů se zvýšenou expresí resp. delecí genů kódujících transkripční faktory *Msn2p*, *Msn4p* a *Gis1p*. Jednotlivé kmeny jsou seřazeny v řádcích pod sebou, sloupce představují stáří kolonie. Alkalizace je zřejmá dle barvy GM+BKP média. Žlutá barva značí více acidické pH, fialová znamená více alkalické pH. Přechodové pH má hodnotu 6,3.

5.2.2 Vertikální diference kolonií a morfologie buněk centrální části kolonie

Cíl: Porovnat schopnost vertikální diference rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 s připravenými nadprodukčními a delečními kmeny a porovnat morfologii buněk v centrální části kolonií.

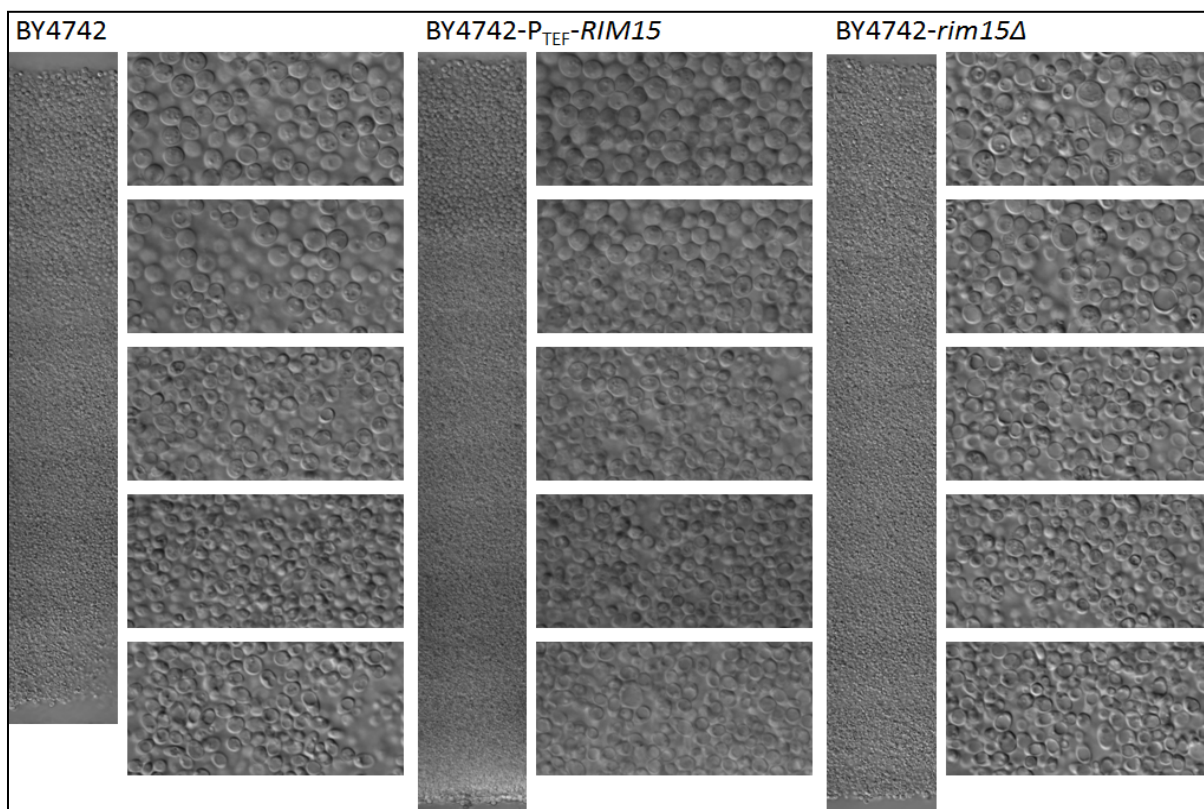
Vliv proteinů drah monitorujících dostupnost živin na vznik různých subpopulací buněk v centrální části kolonií jsem pozorovala pomocí mikroskopie tenkých řezů 14. den růstu kolonie (kapitola 4.2.3.5). Experiment byl opakován dvakrát, uvedená obrazová dokumentace pochází z druhého experimentu.

Centrální část obřích kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 je 14. den růstu tvořena dvěma populacemi buněk, buňkami horními, které se vyskytují v horní části kolonie a buňkami spodními, které se vyskytují v blízkosti média. Mezi vrstvami je ostrý přechod, buňky se navzájem nemísí a jejich morfologie je rozlišná. Řez kolonií *S. cerevisiae* BY4742 je na obrázcích 34-39 vždy v levé části.

Schopnost tvořit dvě oddělené populace buněk je nejvíce narušená v případě kmenů BY4742-*rim15Δ* (obrázek č. 34) a BY4742-P_{TEF}-*SCH9* (obrázek č. 35). Kmen BY4742-*rim15Δ* netvoří přechod mezi oběma vrstvami buněk a buňky horní a spodní vrstvy nejeví výrazně odlišnou morfologii. V části přechodu horních a spodních buněk kmene BY4742-P_{TEF}-*SCH9* dochází k promísení obou buněčných populací, netvoří se tak ostrá linie přechodu.

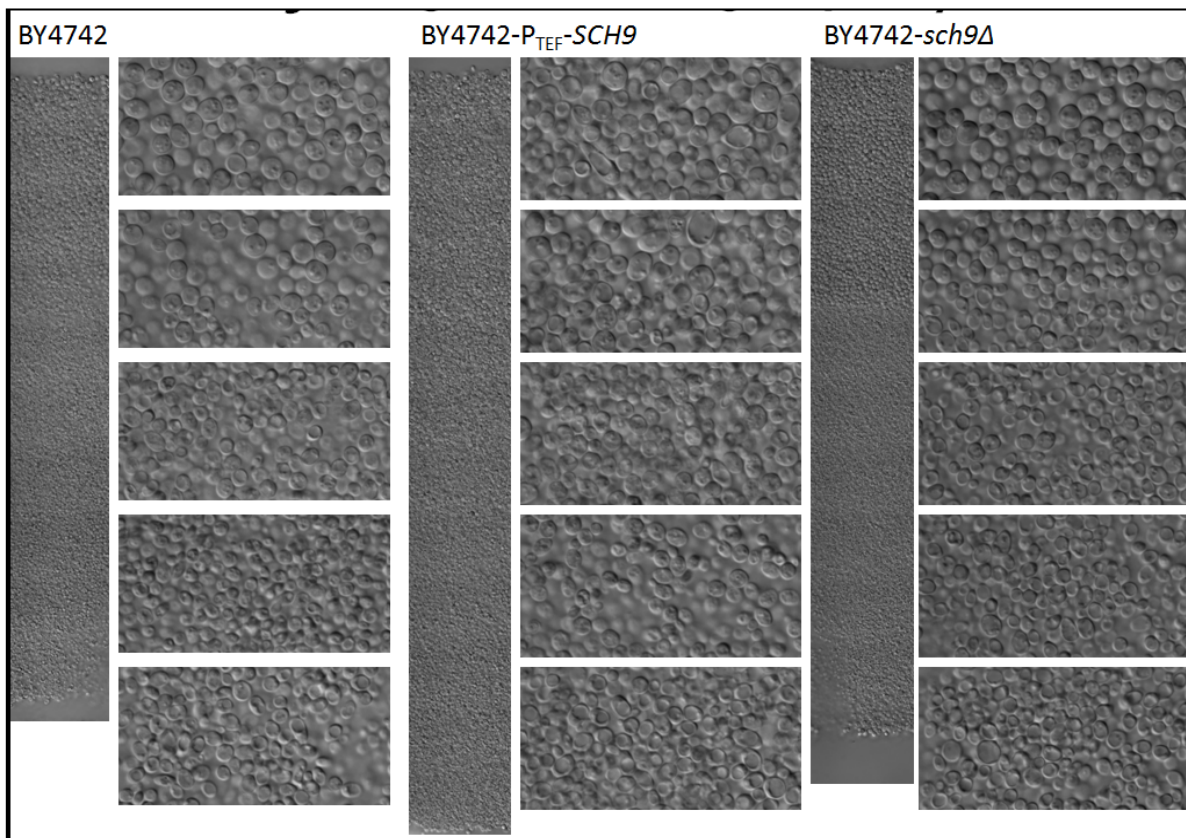
Obrázky 37-39 ukazují, že uspořádání buněk v centrální části kolonie a schopnost vytvořit dvě odlišné populace buněk není výrazně narušená zvýšenou expresí nebo delecí genů transkripčních faktorů *Gis1p*, *Msn2p* a *Msn4p*. Z obrázků je také patrné, že u kmenů s modifikacemi těchto genů dochází ke změnám v morfologii jednotlivých typů buněk.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742- P_{TEF} -*RIM15* a BY4742-*rim15* Δ



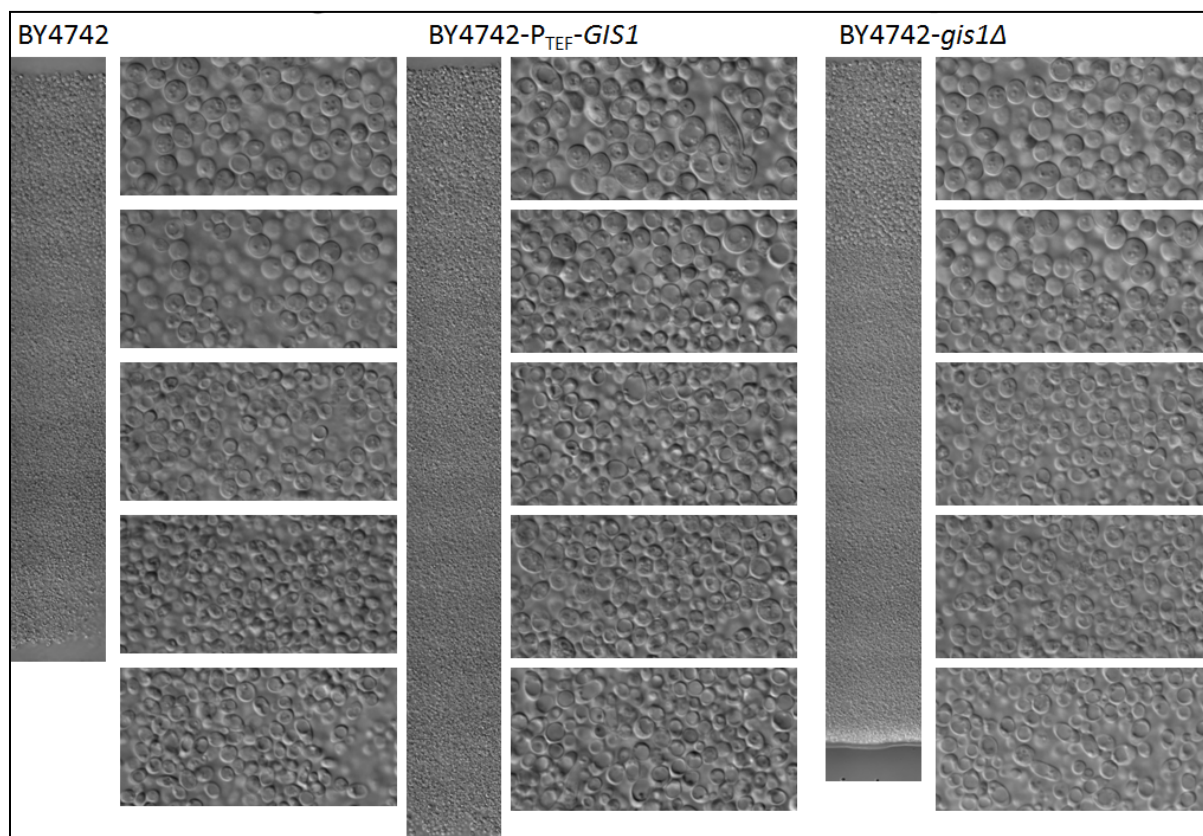
Obr. 34 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742, kmene BY4742- P_{TEF} -*RIM15* se zvýšenou expresí genu *RIM15* a delečního kmene BY4742-*rim15* Δ 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μ m silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742-P_{TEF}-SCH9 a BY4742-sch9Δ



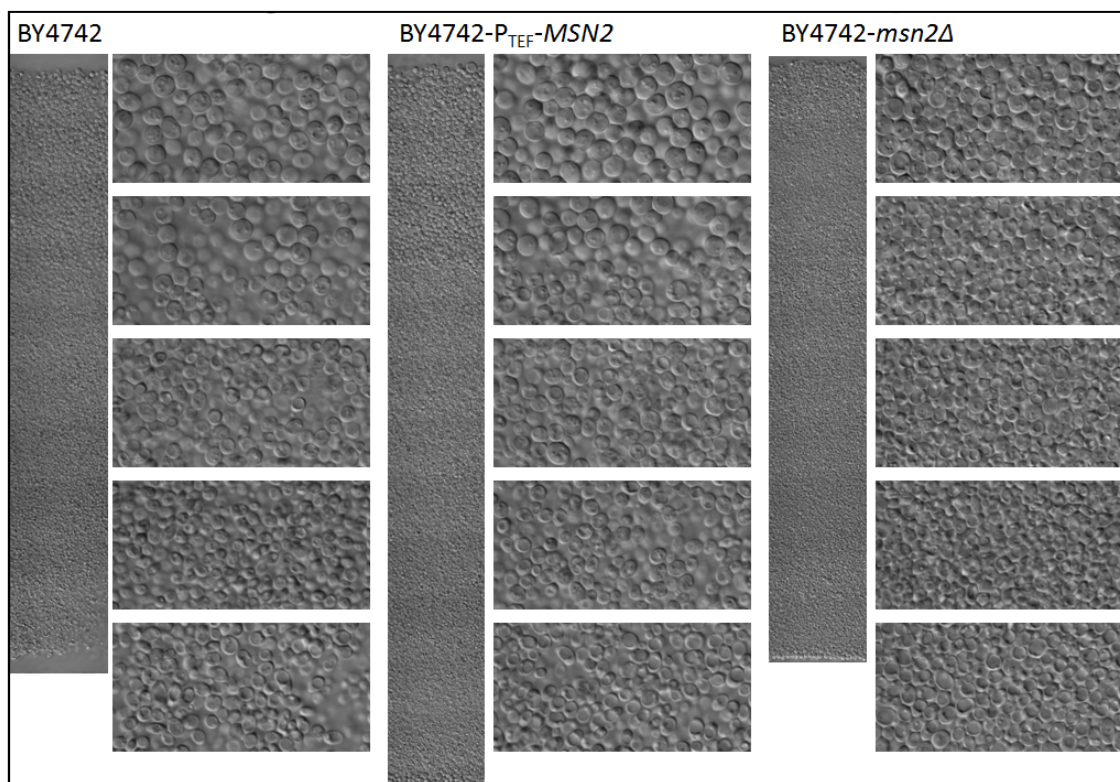
Obr. 35 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742, kmene BY4742-P_{TEF}-SCH9 se zvýšenou expresí genu *SCH9* a delečního kmene BY4742-*sch9Δ* 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μm silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742-P_{TEF}-GIS1 a BY4742-gis1Δ



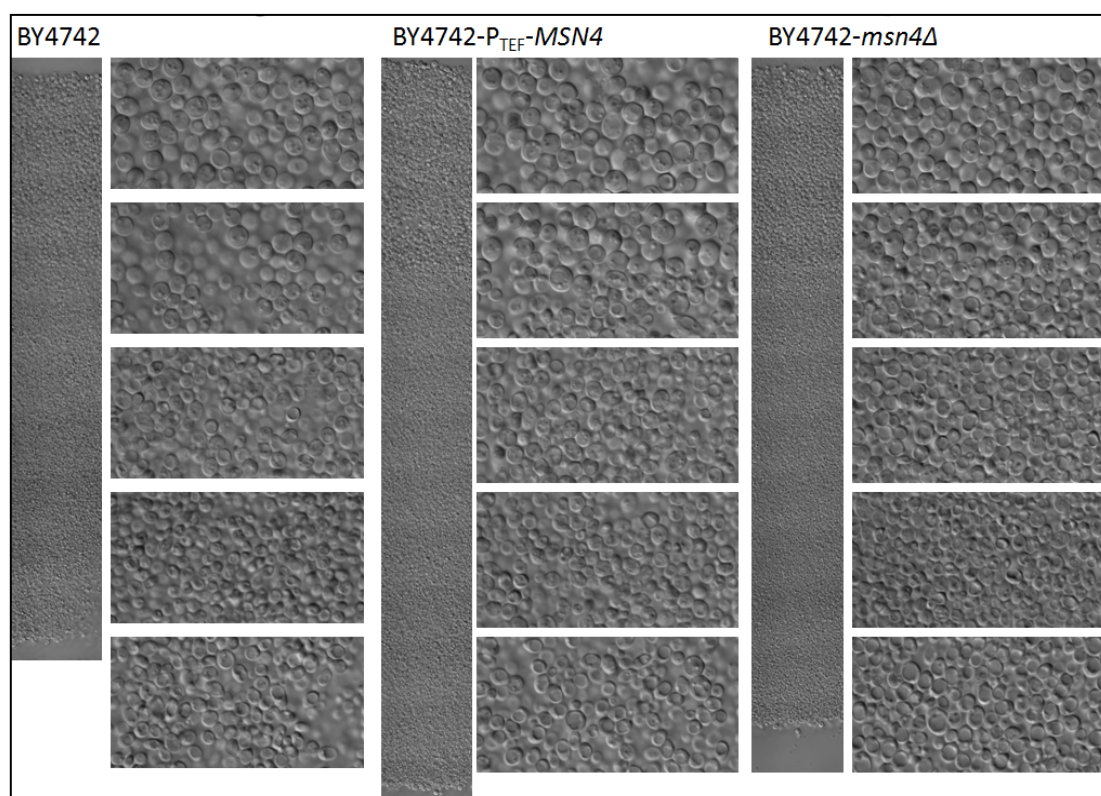
Obr. 36 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742, kmene BY4742-P_{TEF}-GIS1 se zvýšenou expresí genu *GIS1* a delečního kmene BY4742-*gis1Δ* 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μm silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742-P_{TEF}-MSN2 a BY4742-*msn2*Δ



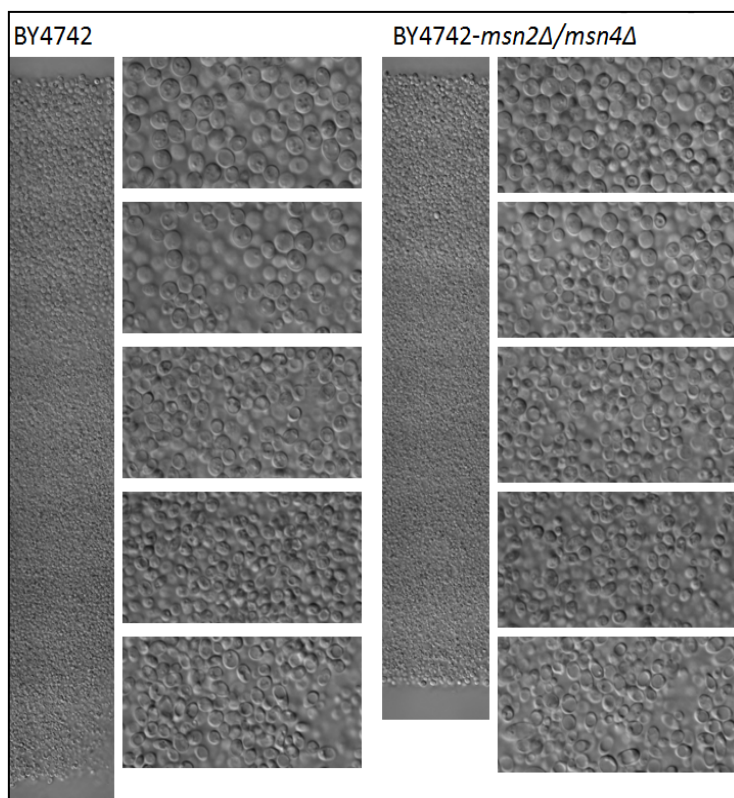
Obr. 37 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742, kmene BY4742-P_{TEF}-MSN2 se zvýšenou expresí genu *MSN2* a delečního kmene BY4742-*msn2*Δ 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μm silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742- P_{TEF} -*MSN4* a BY4742-*msn4* Δ



Obr. 38 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742, kmene BY4742- P_{TEF} -*MSN4* se zvýšenou expresí genu *MSN4* a delečního kmene BY4742-*msn4* Δ 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μ m silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

Vertikální řezy obřích kolonií kmenů BY4742, BY4742- *msn2Δ/msn4Δ*



Obr. 39 Vertikální řez centrální částí kolonie rodičovského kmene BY4742 a delečního kmene BY4742-*msn2Δ/msn4Δ* 14. den růstu na GM+BKP médiu. Mikroskopované řezy byly 20 μm silné. Lokalizace buněk, které jsou znázorněny na detailu v pravé části od fotografie řezu kolonií, přibližně odpovídá lokalizaci v rámci kolonie.

5.2.3 Změny morfologie U a L buněk v čase

Cíl: Porovnat morfologii buněk horní a spodní buněčné subpopulace centrální části kolonií v čase.

Morfologie buněk centrální části kolonií se liší v závislosti na lokalizaci. Již dříve bylo zjištěno, že pro buňky obsažené v horní buněčné subpopulaci je typická větší velikost (průměr 15. den růstu na GM+BKP médiu je $3,92 \pm 0,79 \mu\text{m}$), několik lipidických tělísek a malá vakuola. Menší buňky (po 15 dnech růstu na GM+BKP médiu je průměrná velikost $2,87 \pm 0,46 \mu\text{m}$) tvoří subpopulaci, která je lokalizována blíže médiu. Pro spodní buňky je typická velká vakuola a jedno lipidické tělísko (Cap, Stepanek et al. 2012).

S cílem charakterizovat morfologii U a L buněk jsem z obřích kolonií 5., 7., 9., 12., 14., 20. a 30. den růstu na GM+BKP médiu odebrala jednotlivé vrstvy buněk pomocí žiletky a pozorovala buňky ve světelném mikroskopu (kapitoly 4.2.3.6 a 4.2.3.7).

Na obrázku 40 je zachycen vývoj morfologie horních a spodních buněk kolonií kmene *S.cerevisiae* BY4742 v čase. Během raných stádií vývoje kolonií (5. a 7. den) nejsou patrné výrazné morfologické rozdíly mezi horní a spodní vrstvou buněk, k plné diferenciaci dochází až 12. a 14. den, kdy došlo k alkalizaci média. V pozdějších stádiích vývoje kolonie, tedy 20. a především 30. den, buňky svojí typickou morfologií ztrácí. Horní buňky obsahují menší počet lipidických tělísek a u některých je patrná velká vakuola. Většina spodních buněk je mrtvá, proto jsou menší než v časnějších dnech vývoje a jejich vakuola není patrná.

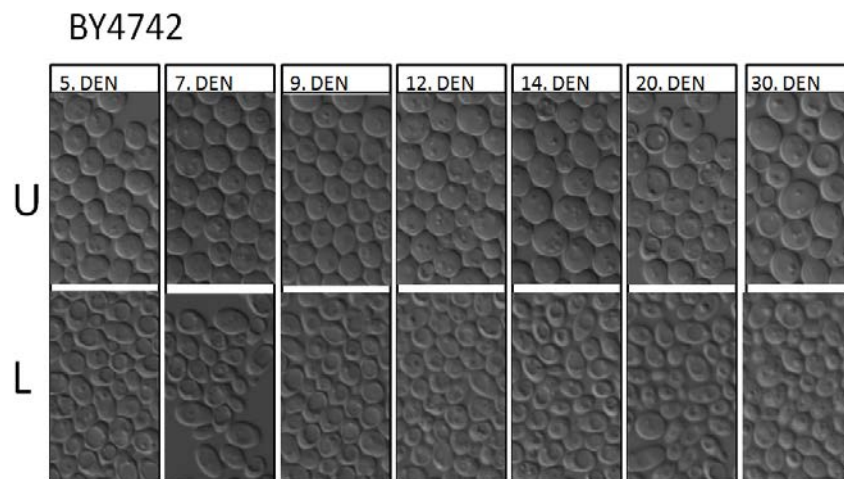
Kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-*RIM15* (obr. 41) se morfologickým vývojem svých buněk v čase příliš neliší od kolonií kmene rodičovského. Horní buňky jeví mírně zvýšenou schopnost si v pozdějších dnech vývoje, především 30. den, udržet morfologii typickou pro buňky horní vrstvy, tedy nemají velkou vakuolu a obsahují více lipidických tělísek. Naproti tomu kolonie kmene BY4742-*rim15Δ* (obr. 42) vykazují značné rozdíly oproti koloniím kmene rodičovského již během raných stádií vývoje. Buňky horní vrstvy již od 5. dne růstu obsahují velkou vakuolu a malý počet lipidických tělísek, velikostí ani tvarem se od buněk spodní vrstvy příliš neliší, rozdíly jsou patrné až v pozdních dnech vývoje, tedy 20. a 30. den, kdy jsou U buňky větší a často celé vyplněné vakuolou. Populace buněk ležících blíže médiu je již od raných fází vývoje obsahuje značný počet mrtvých buněk.

Nadprodukce kinázy Sch9p (obr. 43) má za následek podobný, ale ne tak výrazný efekt, jako delece genu kinázy Rim15p. Buňky horní vrstvy kolonií kmene BY4742-P_{TEF}-*SCH9* jsou oproti rodičovskému kmenu menší, obsahují větší vakuolu a méně lipidických tělísek. V pozdějších stádiích vývoje, především 20. a 30. den, je tento efekt výrazný. Buňky spodní vrstvy kolonií svojí morfologií připomínají mrtvé buňky. Morfologie horních buněk kolonií delečního kmene BY4742-*sch9Δ* (obr. 44) je až do 12. dne shodná s morfologií horních buněk kmene rodičovského, v pozdějších dnech buňky kolonií delečního kmene obsahují větší množství vakuol. Naproti tomu buňky spodní vrstvy kolonií až do 20. dne vývoje mají výraznou vakuolu a morfologii podobnou spodním buňkám kolonií rodičovského kmene v časnějších stádiích vývoje, mrtvé buňky jsou přítomny méně.

Buňky kolonií kmene BY4742-P_{TEF}-*GIS1* (obr. 45) jsou již během časných fází (5. den) vývoje kolonie plně diferencovány. Horní buňky jsou větší než buňky kolonií kmene rodičovského, v jiných aspektech se výrazně neliší. Buňky spodní vrstvy jsou oproti spodním buňkám kolonií rodičovského kmene větší, často je patrné, že nedošlo k oddělení buněk po pučení. Horní i spodní buňky kolonií delečního kmene BY4742-*gis1Δ* (obr. 46) jsou

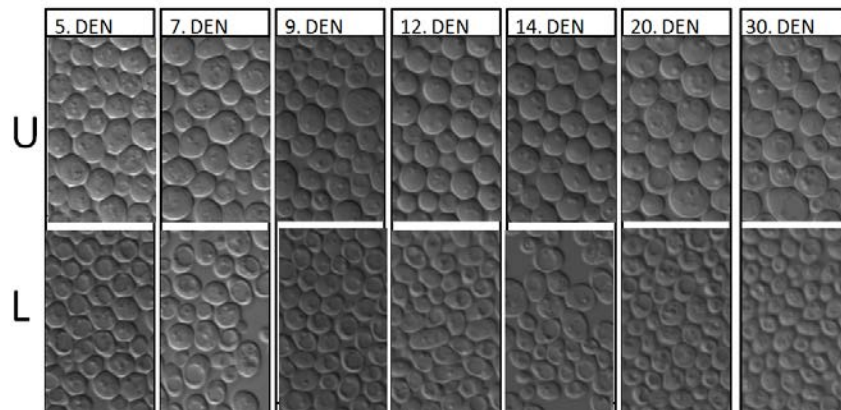
v porovnání s buňkami kolonií rodičovského kmene větší, jiné morfologické rozdíly jsem nepozorovala.

Morfologie buněk kolonií kmenů s nadprodukcí transkripčních faktorů Msn2p (obr. 47) a Msn4p (obr. 49) je velice podobná buňkám kolonií rodičovského kmene. V případě horních buněk kolonií jsem morfologické rozdíly nepozorovala ani v případě kolonií delečních kmenů BY4742-*msn2Δ* (obr. 48) a BY4742-*msn4Δ* (obr. 50). Spodní buňky kolonií těchto kmenů již 14. den obsahují mrtvé buňky. U kolonií kmene s dvojitou delecí BY4742-*msn2Δ/ msn4Δ* (obr. 51) jsem zjistila stejnou morfologii jako v případě kolonií kmenů, které nesou delecí v genu pro jeden z transkripčních faktorů stresové odpovědi.



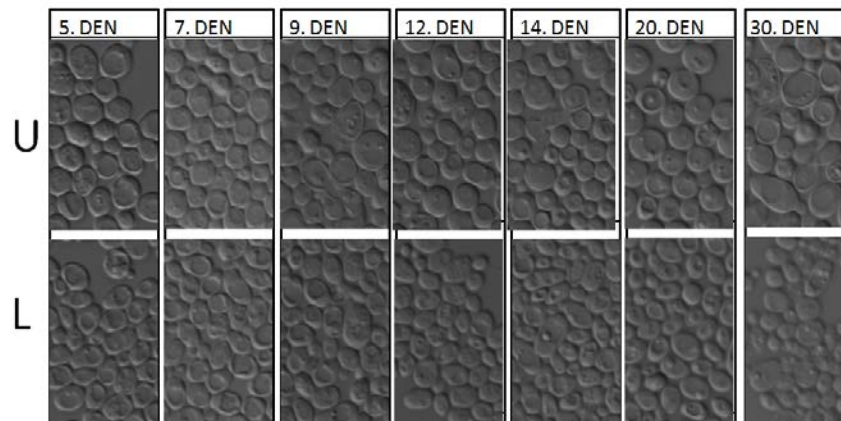
Obr. 40 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-P_{TEF}-RIM15

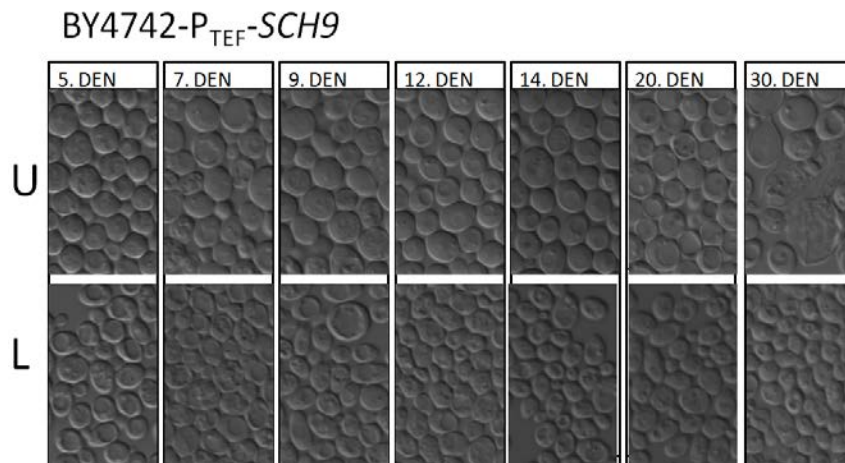


Obr. 41 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

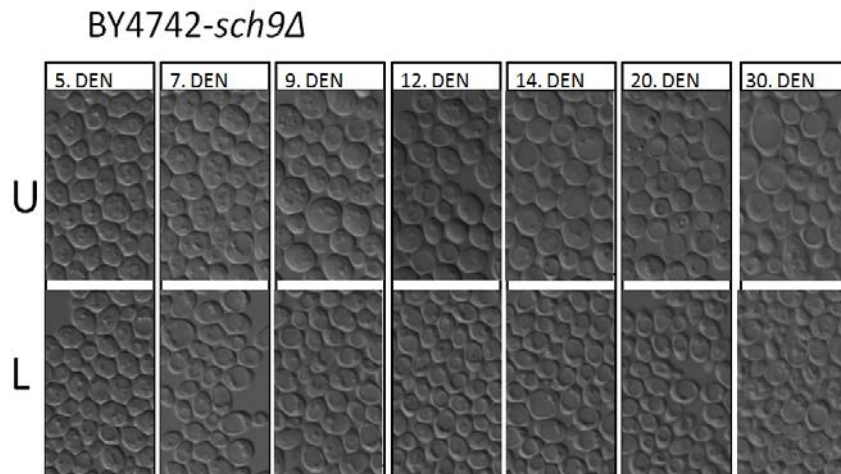
BY4742-rim15Δ



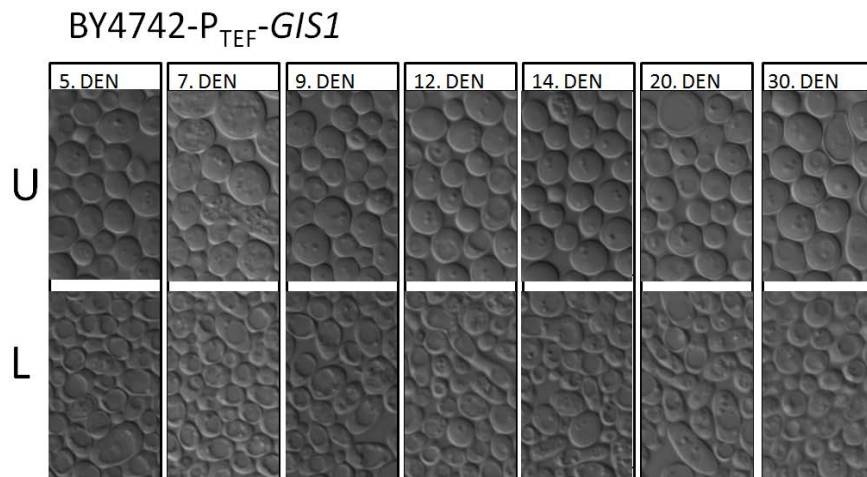
Obr. 42 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.



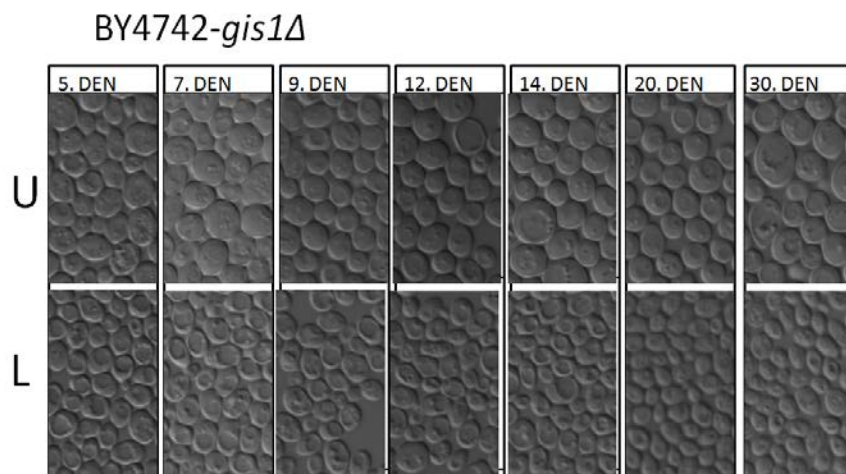
Obr. 43 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.



Obr. 44 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

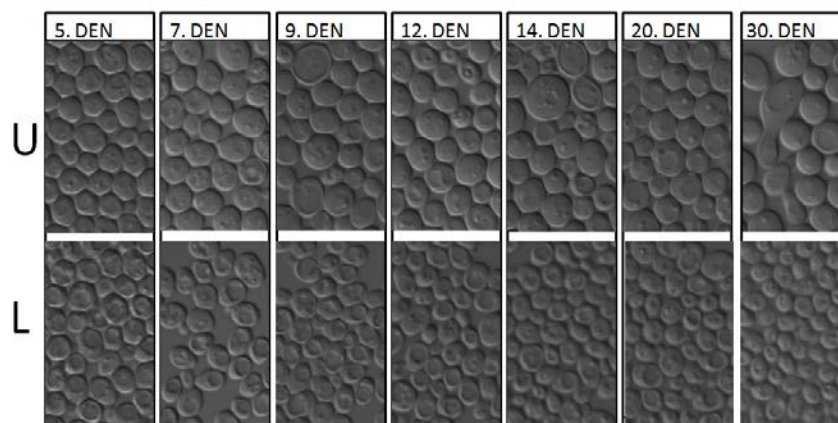


Obr. 45 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.



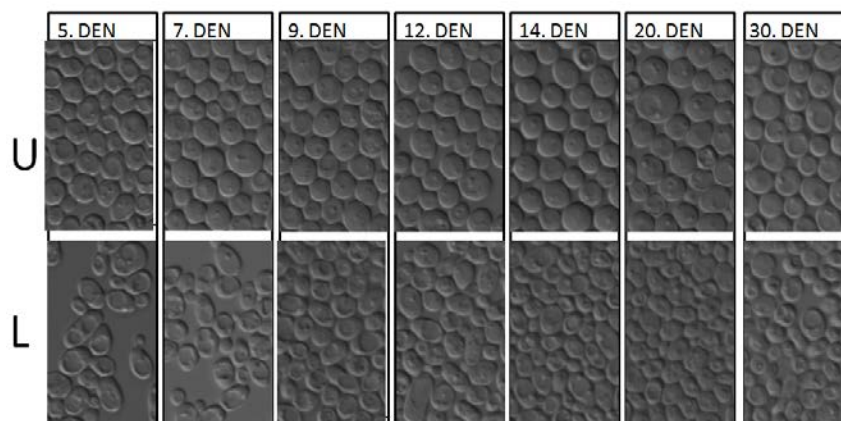
Obr. 46 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-P_{TEF}-MSN2



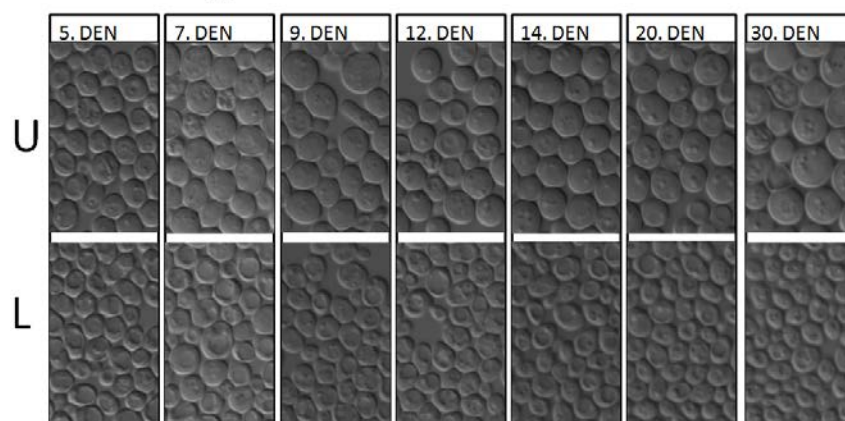
Obr. 47 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-*msn2*Δ



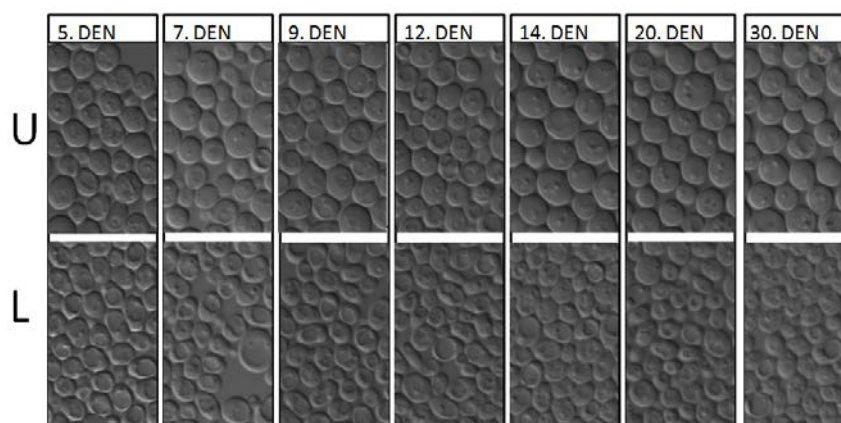
Obr. 48 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-P_{TEF}-MSN4



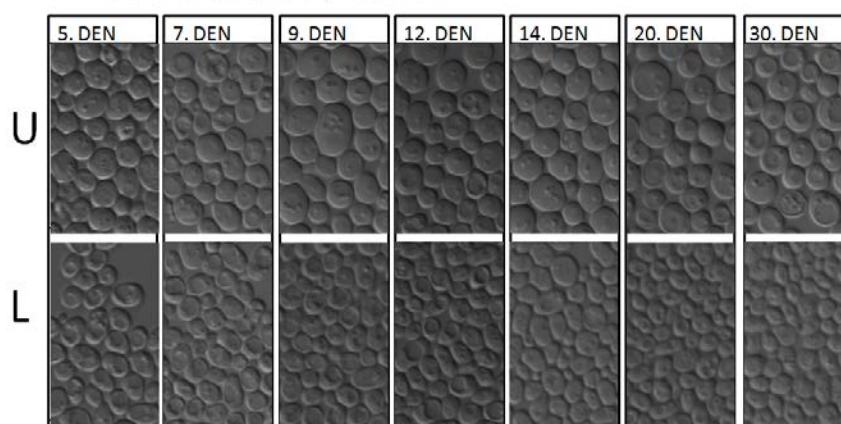
Obr. 49 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-*msn4*Δ



Obr. 50 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

BY4742-*msn2*Δ/*msn4*Δ



Obr. 51 Morfologie horních (U) a spodních (L) buněk kolonií v čase. Každý sloupec znázorňuje jeden referenční den.

5.3 Hmotnostní poměr U a L buněk

Cíl: Určit množství buněk obsažené v jednotce biomasy jednotlivých subpopulací připravených kmenů pro následné stanovení přežívání jednotlivých subpopulací v koloniích (kapitola 4.2.3.9)

Množství buněk v jednotce biomasy jsem analyzovala ve dvou nezávislých pokusech 5., 7., 9., 12., 14., 20. a 30. den růstu obřích kolonií na GM+BKP médiu podle postupu popsaného v kapitole 4.2.3.8. Množství buněk na jednotku biomasy vypovídá o velikosti buněk, procentuálním zastoupení buněk mrtvých a odlišné schopnosti hromadit zásobní látky. Množství buněk obsažené v jednotce biomasy je také nezbytný údaj pro následující analýzu, tedy určení počtu živých a mrtvých buněk.

Počet buněk horní populace kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 (obr. 52) zůstává během vývoje kolonií zachován. Počet spodních buněk se během raného vývoje a v období středního stáří kolonie, tedy od 5. do 14. dne, také výrazně nemění. Poměr mezi počtem buněk horní a spodní vrstvy v jednotce biomasy se v tomto období výrazně nemění, buněk spodních buněk je zhruba o třetinu více. V pozdějších fázích vývoje kolonií, tedy 20. a 30. den dochází k růstu počtu buněk spodní vrstvy.

Počet buněk kolonií nadprodukčního kmene BY4742-P_{TEF}-RIM15 (obr. 53) je velice podobný jako počet buněk kolonií kmene rodičovského. Deleční kmen BY4742-*rim15Δ* (obr. 54) se od kolonií rodičovského kmene 5. a 7. den neliší, během 9. dne dochází k vyrovnání počtu buněk horní a spodní vrstvy. Ve 12. a 14. dni je počet buněk horní vrstvy kolonií vyšší než počet buněk spodní vrstvy. Ve 20. dochází k vyrovnání počtu buněk a 30. den je množství buněk spodní vrstvy opět vyšší než počet buněk vrstvy horní.

Kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-SCH9 (obr. 55) se počtem buněk obsažených v jednotce biomasy od kolonií rodičovského kmene neliší. Kolonie delečního kmene BY4742-*sch9Δ* (obr. 56) mají také zachovaný poměr horních a spodních buněk na jednotku biomasy, počet buněk je v případě obou subpopulací vyšší.

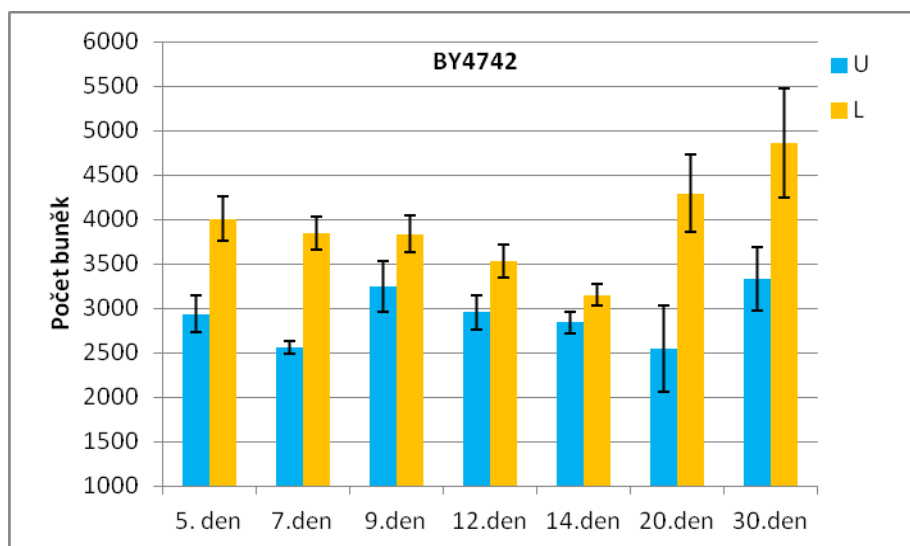
Kolonie kmene s nadprodukcí transkripčního faktoru Gis1p (obr. 57) mají zachovaný poměr počtu buněk horní a spodní vrstvy, množství buněk na jednotku biomasy je výrazně nižší, než v případě buněk kolonií kmene rodičovského. Kolonie delečního kmene BY4742-*gis1Δ* (obr. 58) mají zachované poměry počtu buněk a celkové množství buněk se od rodičovského kmene neliší.

V případě kolonií kmenů s nadprodukcí transkripčních faktorů stresové odpovědi Msn2p (obr. 59) a Msn4p (obr. 61) jsem pozorovala podobný trend jako v případě kolonií rodičovského kmene. Kolonie kmenů, které nesou delecí genu *MSN2* (obr. 60) nebo *MSN4* (obr. 62) obsahují v jednotce biomasy až do 12. dne vývoje stejný počet buněk horní a spodní vrstvy. V pozdějších dnech se rozdíl v počtu buněk rapidně zvyšuje, především počet buněk spodní vrstvy je ve 20. a 30. dni vývoje kolonie výrazně vyšší. V případě kolonií kmene s dvojitou delecí nedávají výsledky jednoznačnou odpověď (obr. 63).

Počet U a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
Počet buněk	1. pokus	U buňky	2729	2635	3527	2766	2965	3033	3687
		L buňky	3758	3666	4040	3715	3027	4726	5474
	2. pokus	U buňky	3147	2487	2959	3146	2716	2059	2975
		L buňky	4259	4027	3628	3344	3276	3864	4249
	průměr	U buňky	2938	2561	3243	2956	2841	2546	3331
		L buňky	4009	3847	3834	3530	3152	4295	4862

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



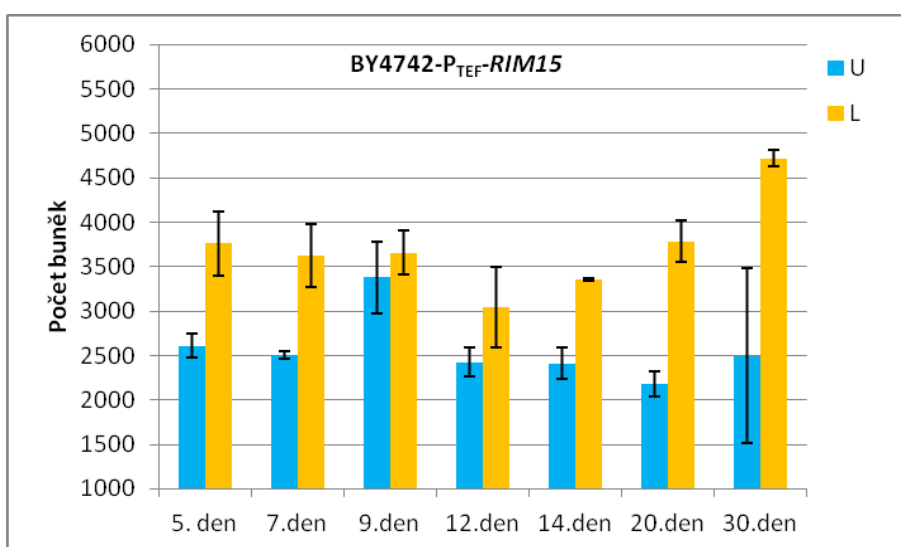
Obr. 52 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-

RIM15

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5										
kolonie BY4742-P _{TEF} -RIM15										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den		
počet buněk	1. pokus	U buňky	2480	2470	3781	2266	2590	2321	3476	
		L buňky	4125	3268	3908	2591	3339	4017	4813	
	2. pokus	U buňky	2743	2542	2977	2585	2230	2034	1519	
		L buňky	3395	3982	3408	3500	3364	3547	4623	
	průměr	U buňky	2612	2506	3379	2426	2410	2178	2498	
		L buňky	3760	3625	3658	3046	3352	3782	4718	

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5 v čase

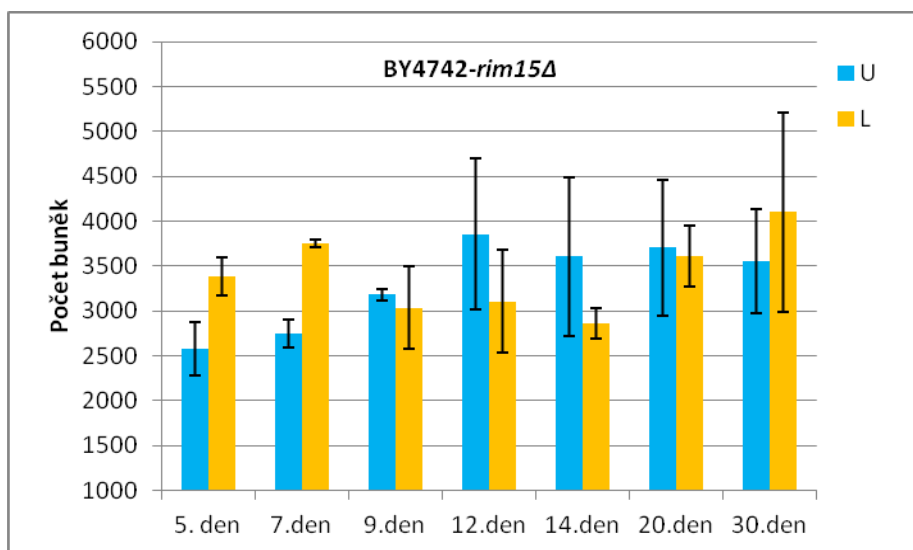


Obr. 53 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12xe-5. V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-rim15A

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742-rim15A									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	2287	2594	3245	4699	4494	4459	4134
		L buňky	3591	3795	2574	2540	2692	3267	2994
	2. pokus	U buňky	2878	2904	3114	3015	2718	2948	2969
		L buňky	3179	3707	3499	3675	3034	3948	5208
	průměr	U buňky	2583	2749	3180	3857	3606	3704	3552
		L buňky	3385	3751	3037	3108	2863	3608	4101

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



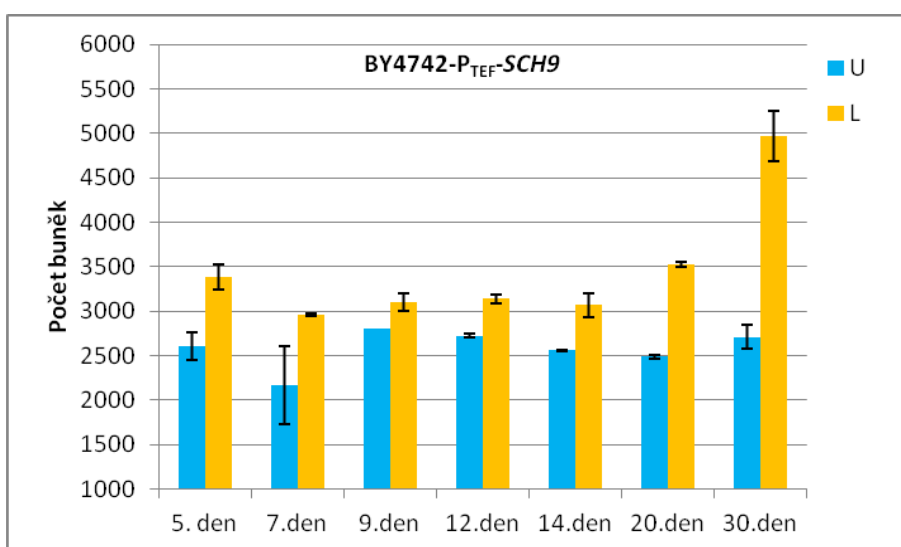
Obr. 54 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-

SCH9

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5										
kolonie BY4742-P _{TEF} -SCH9										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den		
počet buněk	1. pokus	U buňky	2765	1725	2806	2705	2563	2512	2841	
		L buňky	3525	2941	3203	3188	3207	3491	5256	
	2. pokus	U buňky	2449	2606	2806	2748	2556	2468	2581	
		L buňky	3247	2974	3007	3088	2934	3559	4680	
	průměr	U buňky	2607	2166	2806	2727	2560	2490	2711	
		L buňky	2607	2166	2806	2727	2560	2490	2711	

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5 v čase

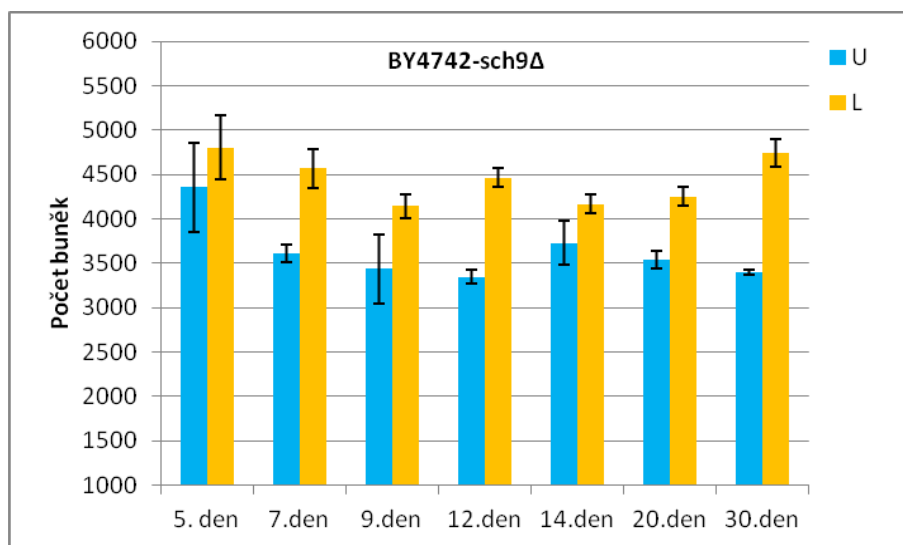


Obr. 55 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12xe-5. V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-sch9A

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742-sch9A									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	4857	3507	3825	3422	3973	3445	3371
		L buňky	5170	4788	4014	4566	4274	4147	4903
	2. pokus	U buňky	3851	3708	3048	3276	3482	3635	3426
		L buňky	4442	4349	4274	4363	4063	4358	4590
	průměr	U buňky	4354	3608	3437	3349	3728	3540	3399
		L buňky	4806	4569	4144	4465	4169	4253	4747

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



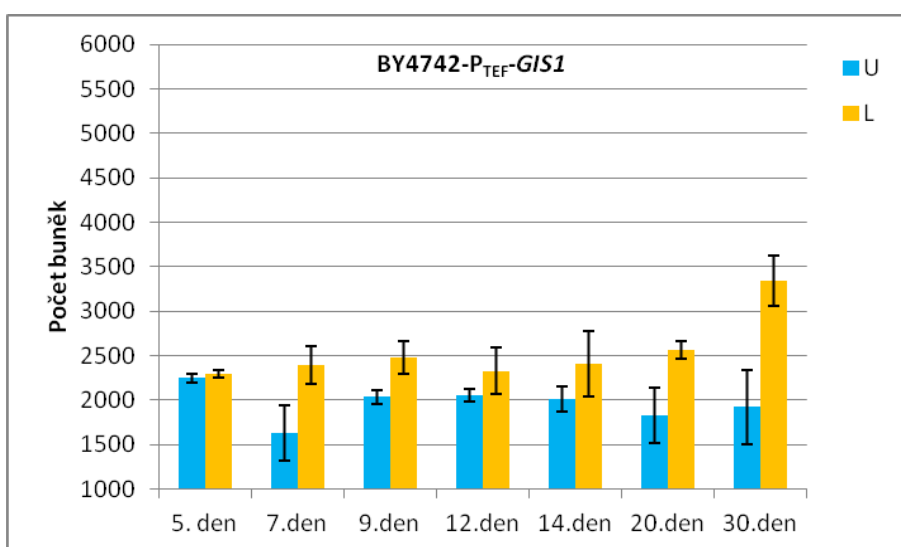
Obr. 56 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-

GIS1

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5										
kolonie BY4742-P _{TEF} -GIS1										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den		
počet buněk	1. pokus	U buňky	2297	1948	2109	2119	2149	2146	2339	
		L buňky	2254	2609	2660	2591	2773	2463	3060	
	2. pokus	U buňky	2197	1319	1958	1979	1874	1519	1510	
		L buňky	2339	2176	2296	2068	2047	2658	3621	
	průměr	U buňky	2247	1634	2034	2049	2012	1833	1925	
		L buňky	2297	2393	2478	2330	2410	1561	2241	

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5 v čase

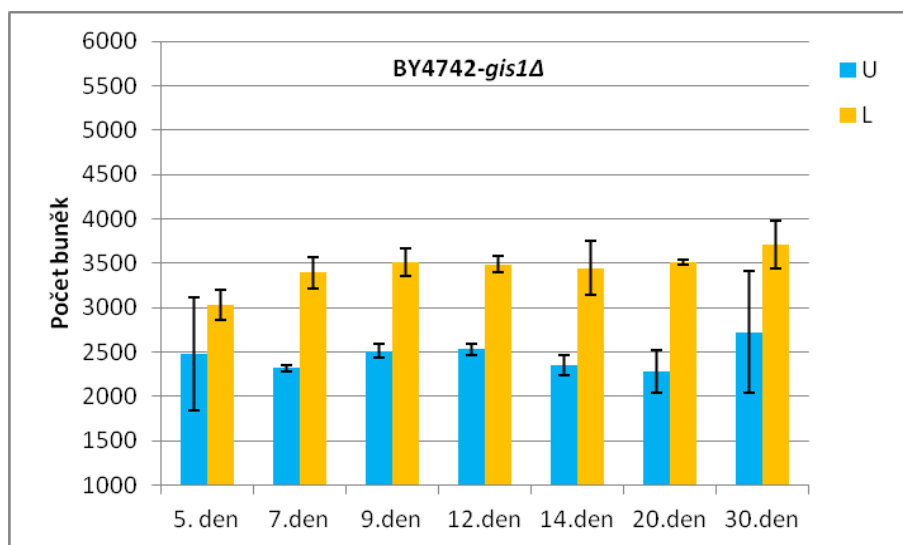


Obr. 57 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12xe-5. V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-gis1A

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742-gis1A									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	1841	2285	2439	2597	2465	2045	3408
		L buňky	2866	3567	3661	3578	3750	3536	3442
	2. pokus	U buňky	3117	2354	2588	2469	2242	2525	2043
		L buňky	3194	3217	3362	3398	3146	3480	3979
	průměr	U buňky	2479	2320	2514	2533	2354	2285	2726
		L buňky	3030	3392	3512	3488	3448	3508	3711

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



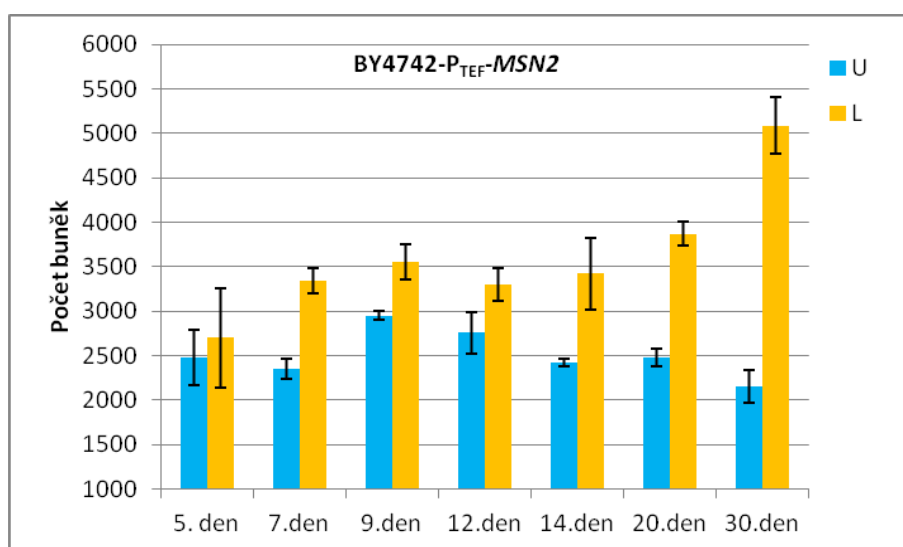
Obr. 58 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-

MSN2

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5										
kolonie BY4742-P _{TEF} -MSN2										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den		
počet buněk	1. pokus	U buňky	2172	2462	2897	2986	2378	2378	2335	
		L buňky	2143	3486	3747	3121	3829	4002	4775	
	2. pokus	U buňky	2795	2237	3009	2526	2464	2584	1970	
		L buňky	3262	3207	3359	3489	3016	3740	5401	
	průměr	U buňky	2484	2350	2953	2756	2421	2481	2153	
		L buňky	2484	2350	2953	2756	2421	2481	2153	

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5 v čase

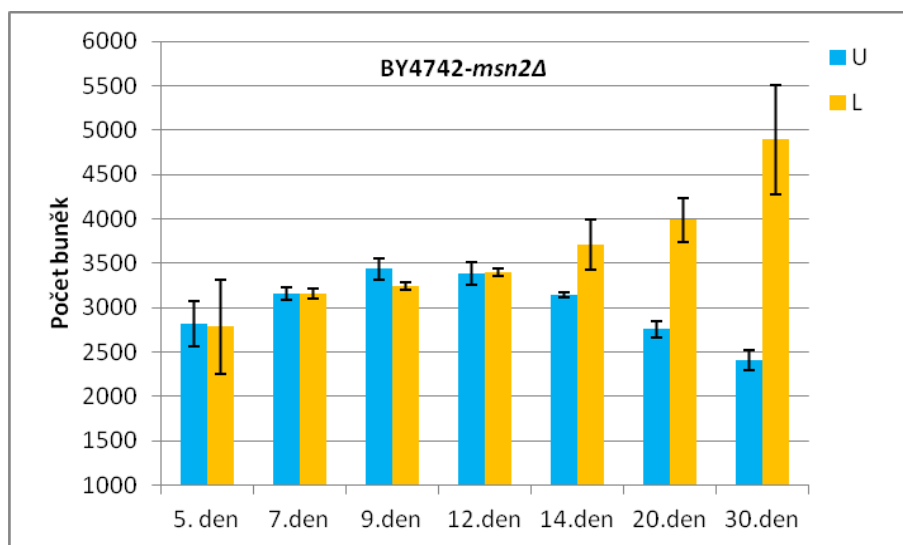


Obr. 59 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5. V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-*msn2Δ*

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742- <i>msn2Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	2560	3082	3320	3509	3122	2851	2527
		L buňky	2259	3098	3204	3446	3999	4239	5507
	2. pokus	U buňky	3069	3222	3550	3256	3179	2670	2291
		L buňky	3314	3212	3283	3356	3421	3733	4282
	průměr	U buňky	2815	3152	3435	3383	3151	2761	2409
		L buňky	2787	3155	3244	3401	3710	3986	4895

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



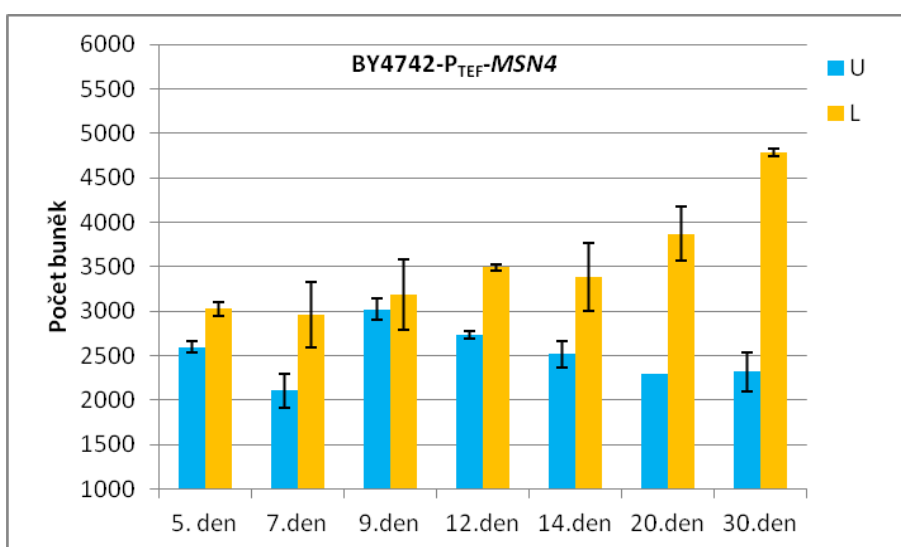
Obr. 60 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-P_{TEF}-

MSN4

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5										
kolonie BY4742-P _{TEF} -MSN4										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den		
počet buněk	1. pokus	U buňky	2658	1918	3143	2781	2660	2289	2536	
		L buňky	2946	2588	2791	3530	3770	4177	4748	
	2. pokus	U buňky	2533	2302	2903	2694	2371	2300	2102	
		L buňky	3102	3333	3589	3459	2999	3568	4828	
	průměr	U buňky	2596	2110	3023	2738	2516	2295	2319	
		L buňky	3024	2961	3190	3495	3385	3873	4788	

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5 v čase

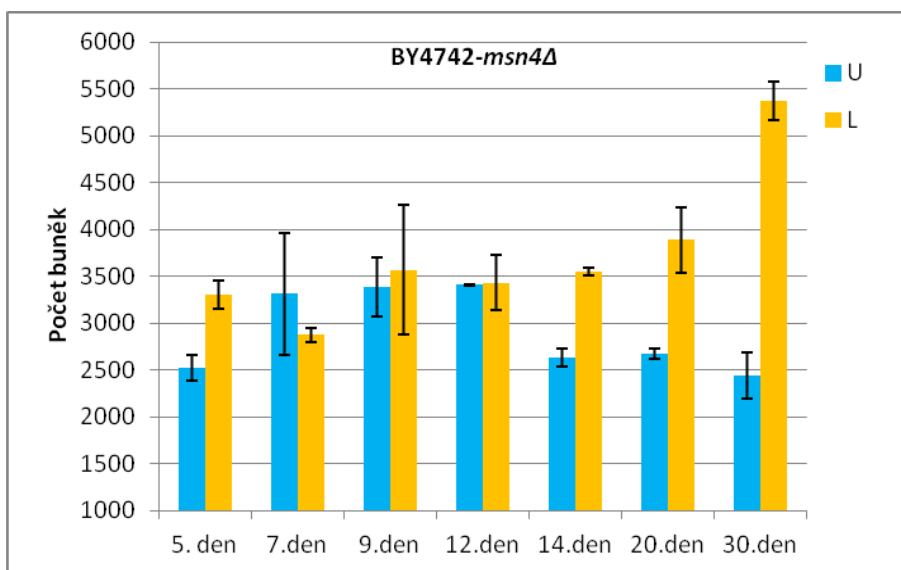


Obr. 61 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12x10e-5. V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-*msn4Δ*

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742- <i>msn4Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	2662	3958	3703	3405	2540	2723	2681
		L buňky	3451	2944	4258	3722	3507	4235	5578
	2. pokus	U buňky	2386	2665	3069	3411	2724	2618	2189
		L buňky	3146	2800	2875	3141	3594	3539	5170
	průměr	U buňky	2524	3312	3386	3408	2632	2671	2435
		L buňky	3299	2872	3567	3432	3551	3887	5374

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



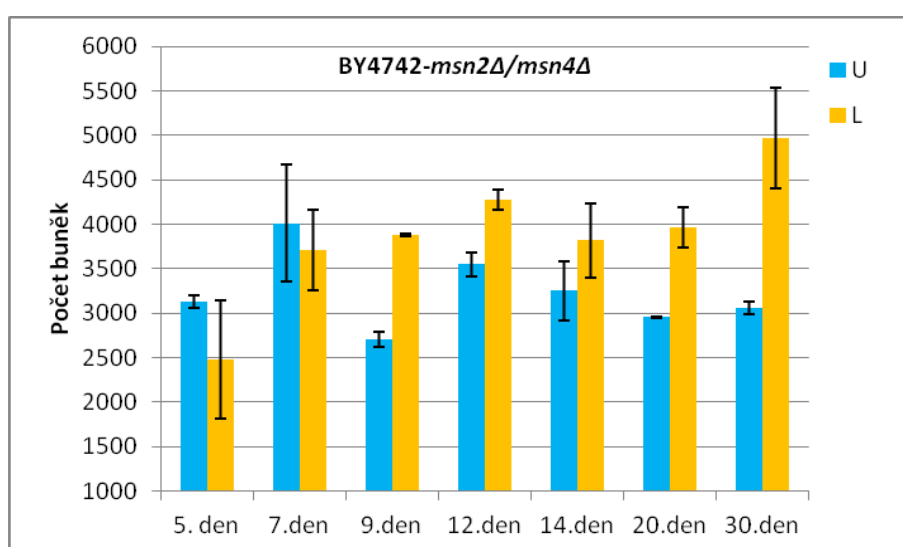
Obr. 62 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

Počet U buněk a L buněk obsažených v jednotce biomasy v čase, kolonie kmene BY4742-*msn2Δ*/

msn4Δ

Počet buněk obsažený v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5									
kolonie BY4742- <i>msn2Δ</i> / <i>msn4Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
počet buněk	1. pokus	U buňky	3200	4667	2784	3416	2923	2959	3129
		L buňky	1815	4159	3864	4160	4238	3733	5533
	2. pokus	U buňky	3058	3361	2626	3685	3581	2948	2990
		L buňky	3149	3256	3900	4394	3396	4185	4400
	průměr	U buňky	3129	4014	2705	3551	3252	2954	3060
		L buňky	2482	3708	3882	4277	3917	3959	4967

Počet U a L buněk v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 v čase



Obr. 63 Číselné a grafické znázornění počtu U a L buněk obsažených v 1 ml suspenze o koncentraci 12×10^5 . V tabulce jsou uvedeny počty buněk v jednotlivých pokusech a jejich průměr. V grafu je modrou barvou znázorněn průměrný počet U buněk, žlutou barvou L buněk v jednotlivých analyzovaných dnech.

5.4 Přežívání U a L buněk v čase

Cíl: Určit procentuální zastoupení životaschopných buněk v jednotlivých subpopulacích buněk obřích kolonií rodičovského kmene *S. cerevisiae* BY4742 a kolonií připravených modifikovaných kmenů.

Mikroskopie tenkých řezů centrálních částí kolonií jednotlivých kmenů ukázala rozdíly ve schopnosti tvořit dvě diferencované subpopulace buněk ve vertikálním směru. Také morfologie buněk jednotlivých separovaných subpopulací byla odlišná od morfologie subpopulací buněk kolonií rodičovského kmene. Na základě tohoto pozorování jsem se

rozhodla určit procentuální zastoupení živých buněk jednotlivých subpopulací kolonií jednotlivých kmenů v čase.

Analyzovala jsem schopnost buněk odebraných z různě starých kolonií jednotlivých kmenů z hlediska jejich přežití a schopnosti vytvořit nové kolonie s cílem zjistit, které z regulačních proteinů by mohly být zapojené do časných stádií vývoje kolonií a které by naopak mohly hrát roli až během stárnutí kolonie. Buňky horní a spodní vrstvy jsem analyzovala zvláště s cílem zjistit, které regulační proteiny by mohly hrát roli ve vývoji jednotlivých buněčných subpopulací. Paralelně jsem sledovala i průběh alkalizace média jak je uvedeno v kapitole 5.2.1.

Obrázek 64 ukazuje, že v buněčných subpopulacích lokalizovaných v horní resp. spodní vrstvě kolonií rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, dochází v průběhu vývoje kolonií k lineárnímu snižování procenta buněk schopných tvořit nové kolonie. Během celého vývoje kolonií je procentuální zastoupení životaschopných buněk vyšší v subpopulaci buněk horních vrstev kolonií.

Graf na obrázku 65 ukazuje procentuální zastoupení životaschopných buněk v koloniích kmene BY4742- P_{TEF} -*RIM15*. Buňky kolonií nadprodučního kmene se příliš neliší svojí schopností přežít v čase. Naopak deleční kmen BY4742-*rim15Δ* (obr. 66) vykazuje během celého vývoje výrazně snížené procento životaschopných buněk.

Nadprodukce kinázy Sch9p způsobuje částečné snížení množství životaschopných buněk v horních i spodních vrstvách kolonií, jak ukazuje obrázek 67, jejich vzájemný poměr je zachován. Delece genu *SCH9* (obr. 68) má za následek výrazné zvýšení životaschopnosti buněk spodní vrstvy, procento živých buněk v dolních buňkách je vyšší než v buňkách vrstvy horní.

Horní i spodní subpopulace buněk kolonií kmene BY4742- P_{TEF} -*GIS1* (obr. 69) je tvořena menším počtem životaschopných buněk. V případě kolonií delečního kmene BY4742-*gis1Δ* (obr. 70) není možné pozorovat jednotný efekt ve všech dnech vývoje.

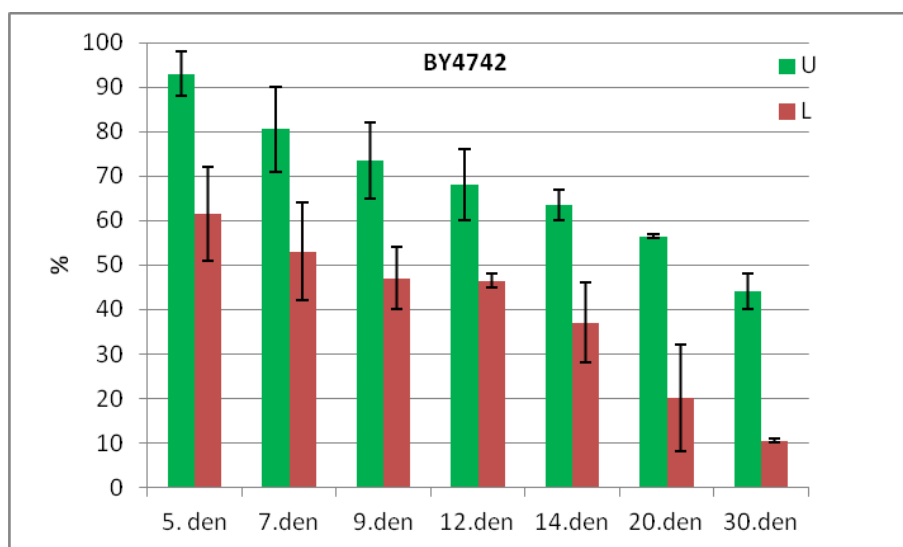
Nadprodukce transkripčních faktorů stresové odpovědi Msn2p (obr. 71) a Msn4p (obr. 73) výrazně neovlivňuje schopnost dlouhodobého přežití buněk v kolonii. Deleční kmeny BY4742-*msn2Δ* (obr. 72), BY4742-*msn4Δ* (obr. 74) a kmen s dvojitou delecí BY4742-*msn2Δ/msn4Δ* (obr. 75), vykazují výrazné rozdíly v procentech živých buněk ve srovnání s kmenem BY4742. Během střední a pozdní doby vývoje kolonií, tzn. od 9. dne až do 30. dne,

je v horních subpopulacích větší procento životaschopných buněk, naopak ve spodní subpopulaci je procento životaschopných buněk výrazně sníženo.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742

Procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých pokusech a výsledný průměr										
BY4742										
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30.den		
% živých buněk	1. pokus	U buňky	98	90	82	76	67	57	40	
		L buňky	72	64	54	48	46	32	11	
	2. pokus	U buňky	88	71	65	60	60	56	48	
		L buňky	51	42	40	45	28	8	10	
	průměr	U buňky	93	81	74	68	64	57	44	
		L buňky	62	53	47	47	37	20	11	

Procentuální zastoupení živých buněk

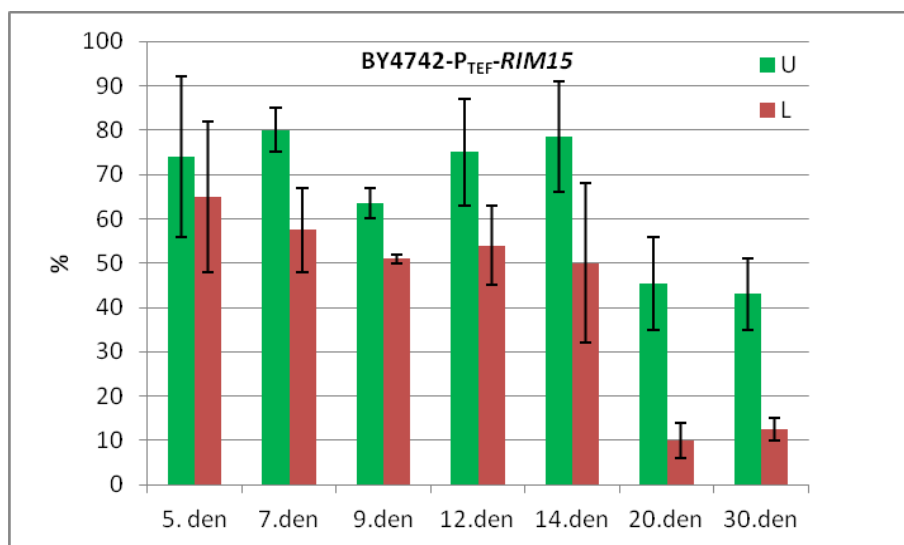


Obr. 64 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-P_{TEF}-RIM15

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742-P _{TEF} -RIM15									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	92	85	60	87	91	35	35
		L buňky	82	67	50	63	68	14	15
	2. pokus	U buňky	56	75	67	63	66	56	51
		L buňky	48	48	52	45	32	6	10
	průměr	U buňky	74	80	64	75	79	46	43
		L buňky	65	58	51	54	50	10	12

Procentuální zastoupení živých buněk

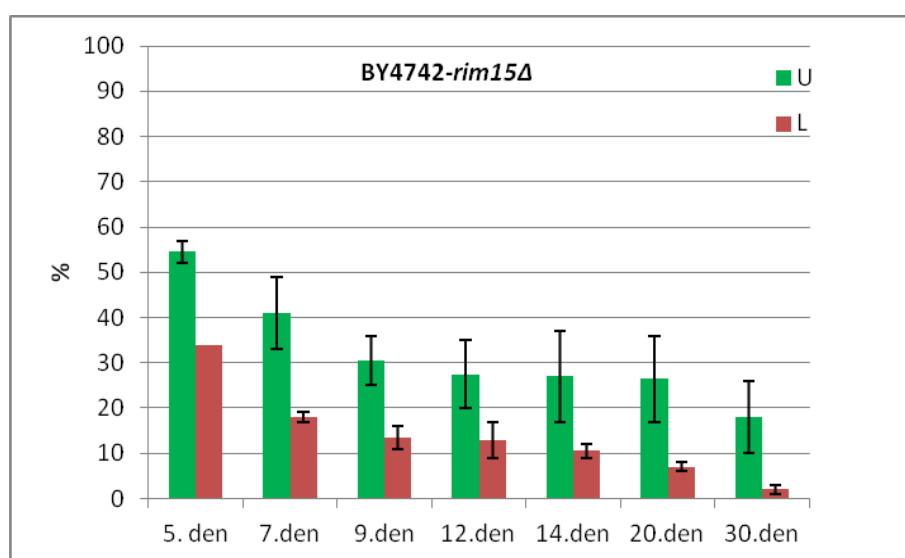


Obr. 65 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-*rim15Δ*

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742- <i>rim15Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	52	33	25	20	17	17	10
		L buňky	34	19	16	9	12	8	3
	2. pokus	U buňky	57	49	36	35	37	36	26
		L buňky	34	17	11	17	9	6	1
	průměr	U buňky	55	41	31	28	27	27	18
		L buňky	34	18	14	13	11	7	2

Procentuální zastoupení živých buněk

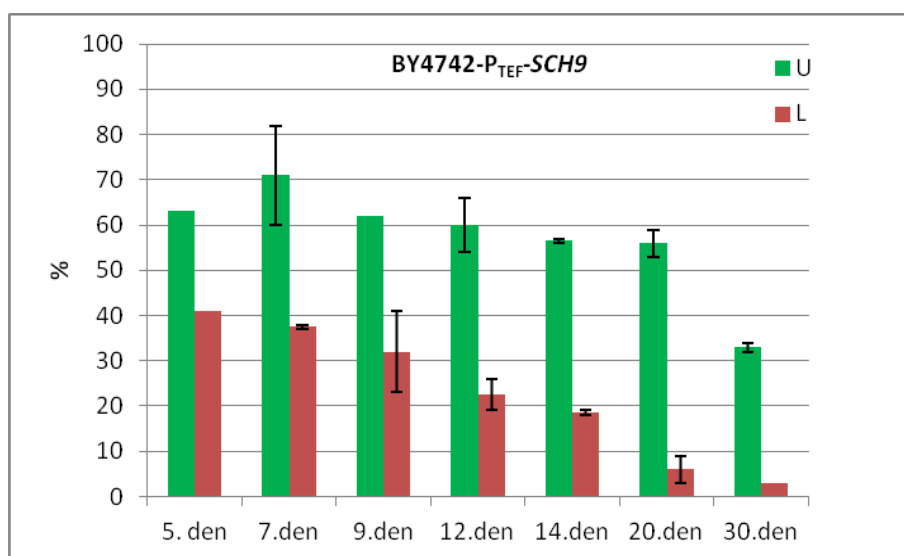


Obr. 66 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-P_{TEF}-SCH9

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr								
BY4742-P _{TEF} -SCH9								
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den
1. pokus	U buňky	x	82	62	54	57	59	32
	L buňky	41	37	23	19	18	9	3
2. pokus	U buňky	63	60	62	66	56	53	34
	L buňky	41	38	41	26	19	3	3
% živých buněk průměr	U buňky	63	71	62	60	57	56	33
	L buňky	41	38	32	23	19	6	3

Procentuální zastoupení živých buněk

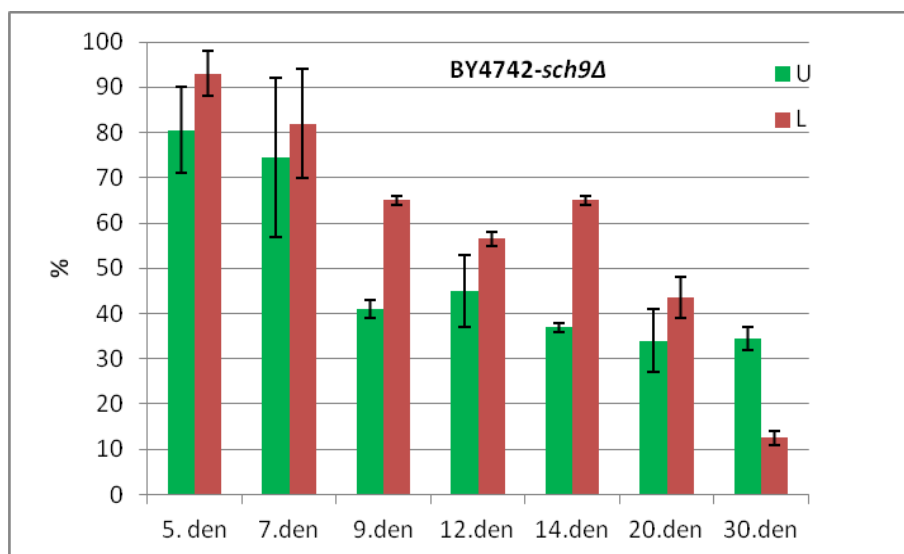


Obr. 67 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-sch9Δ

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742-sch9Δ									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	90	92	43	53	36	41	37
		L buňky	98	94	64	55	64	48	11
	2. pokus	U buňky	71	57	39	37	38	27	32
		L buňky	88	70	66	58	66	39	14
	průměr	U buňky	81	75	41	45	37	34	35
		L buňky	93	82	65	57	65	44	13

Procentuální zastoupení živých buněk

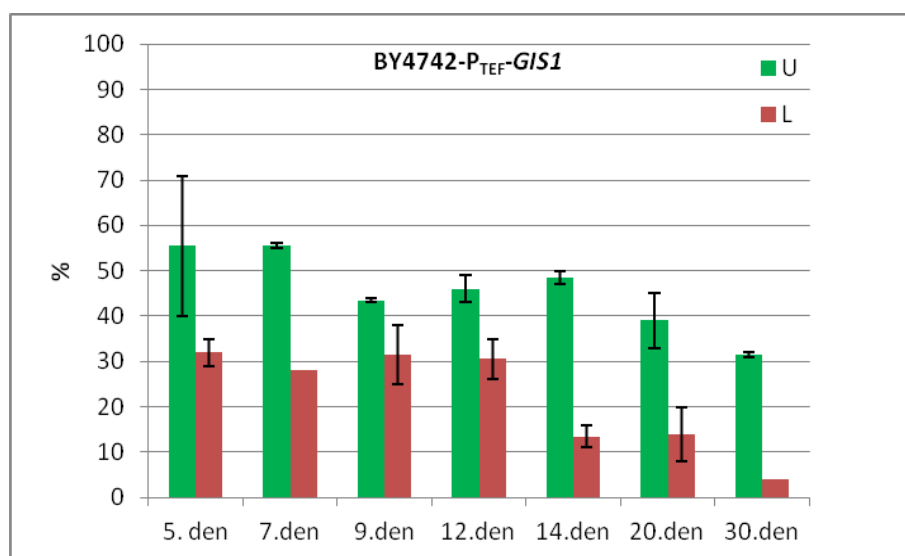


Obr. 68 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-P_{TEF}-GIS1

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742-P _{TEF} -GIS1									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	71	56	44	43	47	33	31
		L buňky	29	28	25	26	16	20	4
	2. pokus	U buňky	40	55	43	49	50	45	32
		L buňky	35	28	38	35	11	8	4
	průměr	U buňky	56	56	44	46	49	39	32
		L buňky	32	28	32	31	14	14	4

Procentuální zastoupení živých buněk

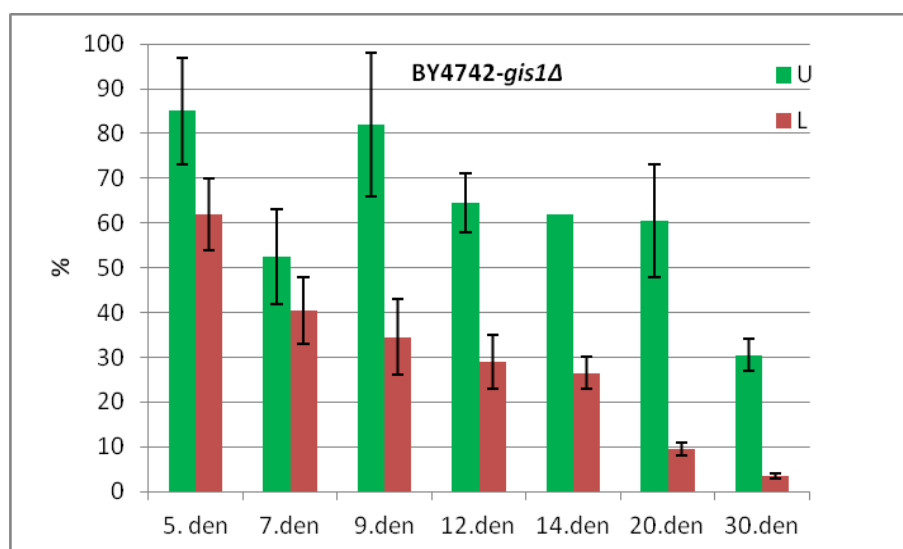


Obr. 69 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-*gis1Δ*

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742- <i>gis1Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	97	63	98	58	x	73	27
		L buňky	70	48	26	23	23	11	4
	2. pokus	U buňky	73	42	66	71	62	48	34
		L buňky	54	33	43	35	30	8	3
	průměr	U buňky	85	53	82	65	62	61	31
		L buňky	62	41	35	29	27	10	4

Procentuální zastoupení živých buněk

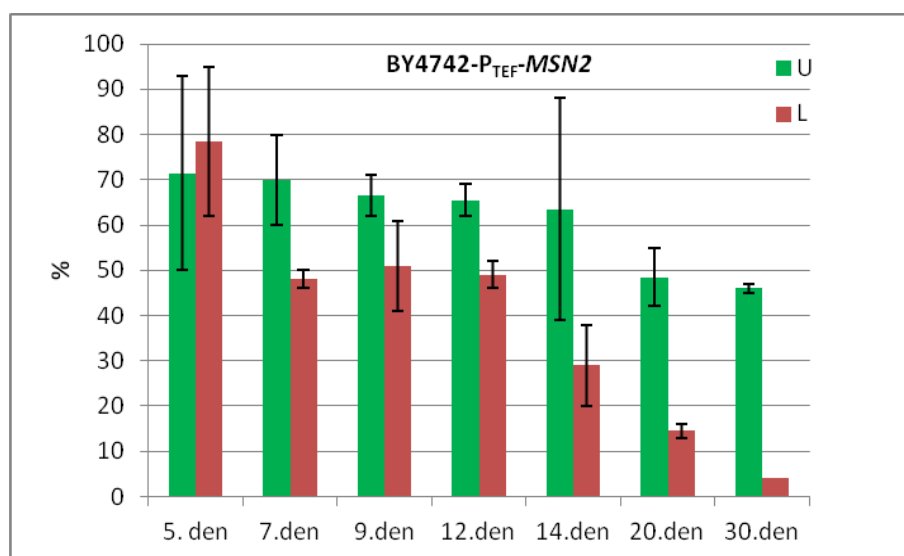


Obr. 70 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-P_{TEF}-MSN2

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742-P _{TEF} -MSN2									
stáří kolonie		5. den	7.den	9.den	12.den	14.den	20.den	30.den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	93	80	62	69	39	55	45
		L buňky	95	50	41	46	20	16	4
	2. pokus	U buňky	50	60	71	62	88	42	47
		L buňky	62	46	61	52	38	13	4
	průměr	U buňky	72	70	67	66	64	49	46
		L buňky	79	48	51	49	29	15	4

Procentuální zastoupení živých buněk

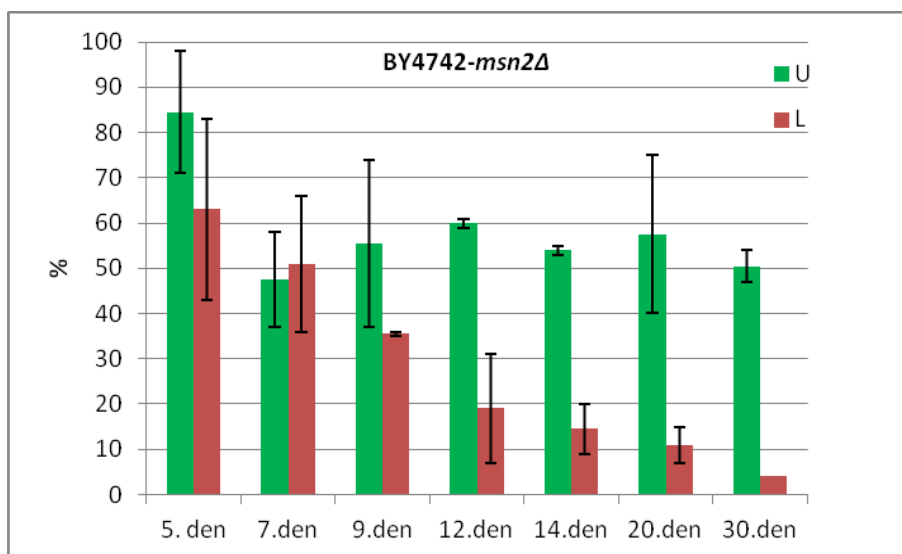


Obr. 71 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněn průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-*msn2Δ*

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr								
BY4742- <i>msn2Δ</i>								
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den
1. pokus	U buňky	98	58	74	61	53	75	54
	L buňky	83	66	36	31	20	15	X
2. pokus	U buňky	71	37	37	59	55	40	47
	L buňky	43	36	35	7	9	7	4
% živých buněk průměr	U buňky	85	48	56	60	54	58	51
	L buňky	63	51	36	19	15	11	4

Procentuální zastoupení živých buněk

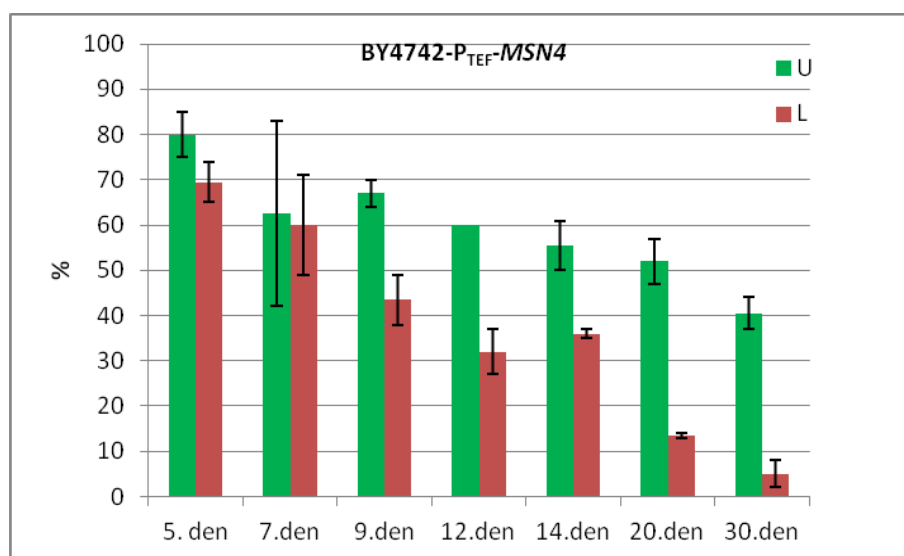


Obr. 72 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-P_{TEF}-MSN4

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742-P _{TEF} -MSN4									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	75	83	70	60	50	57	37
		L buňky	74	71	38	27	35	13	8
	2. pokus	U buňky	85	42	64	60	61	47	44
		L buňky	65	49	49	37	37	14	2
	průměr	U buňky	80	63	67	60	56	52	41
		L buňky	70	60	44	32	36	14	5

Procentuální zastoupení živých buněk

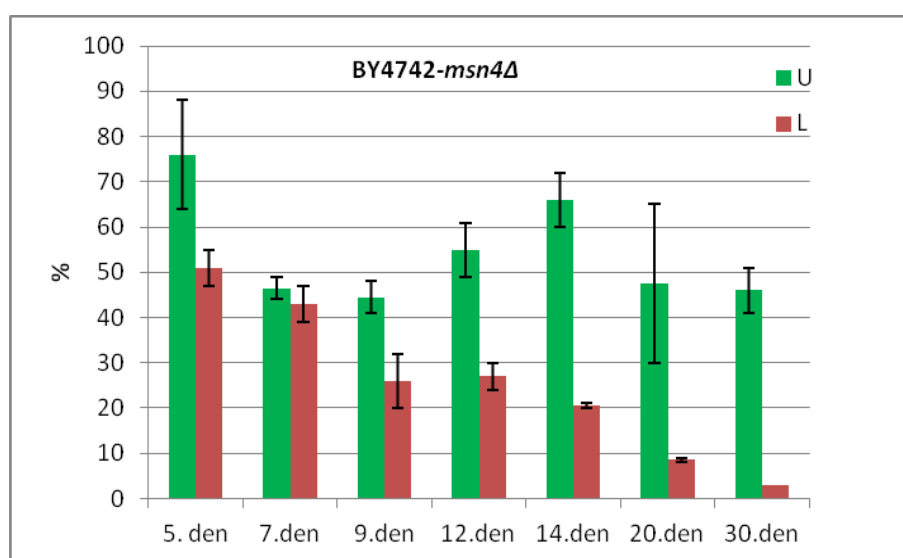


Obr. 73 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-*msn4Δ*

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742- <i>msn4Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	64	49	41	61	60	65	51
		L buňky	55	47	20	30	20	8	3
	2. pokus	U buňky	88	44	48	49	72	30	41
		L buňky	47	39	32	24	21	9	3
	průměr	U buňky	76	47	45	55	66	48	46
		L buňky	51	43	26	27	21	9	3

Procentuální zastoupení živých buněk

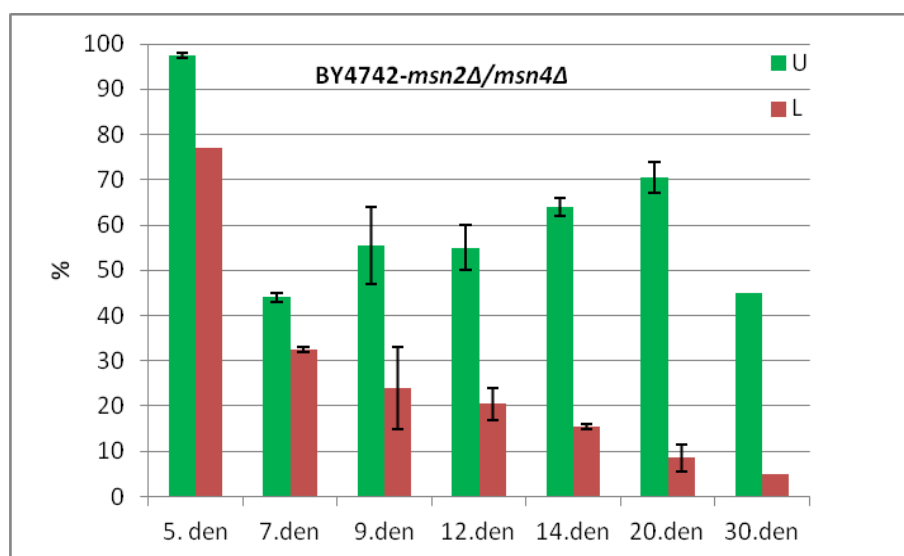


Obr. 74 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

Počet živých U buněk a L buněk v čase, kmen BY4742-*msn2Δmsn4Δ*

Procentuální zastoupení živých buněk z jednotlivých pokusů a výsledný průměr									
BY4742- <i>msn2Δ/msn4Δ</i>									
stáří kolonie		5. den	7. den	9. den	12. den	14. den	20. den	30. den	
% živých buněk	1. pokus	U buňky	97	45	64	60	66	67	45
		L buňky	89	40	21	14	12	4	2
	2. pokus	U buňky	98	43	47	50	62	74	45
		L buňky	65	25	27	27	19	13	8
	průměr	U buňky	98	44	56	55	64	71	45
		L buňky	77	33	24	21	16	9	5

Procentuální zastoupení živých buněk



Obr. 75 Číselné a grafické znázornění procentuálního zastoupení živých U a L buněk v časovém vývoji kolonie. V tabulce je uvedeno procentuální zastoupení živých buněk v jednotlivých dnech během dvou pokusů a jejich průměr. V grafu je pro jednotlivé dny zelenou barvou znázorněný průměrný počet procent živých U buněk, červenou barvou průměrný počet procent živých L buněk.

6 Diskuze

Laboratorní kmen *Saccharomyces cerevisia* BY4742 vytváří na komplexním glycerolovém médiu hladké obří kolonie. V rámci makrokolonií dochází k horizontální a vertikální diferenciaci a vzniku subpopulací buněk s odlišnou morfologií a fyziologií. V centrální části kolonie je možné rozlišit dvě hlavní subpopulace, horní, která je tvořena buňkami s unikátními metabolickými vlastnostmi, a spodní, kterou tvoří hladovějící buňky vyživující buňky vrstvy horní. Regulační a signální mechanismy, které umožňují vznik dvou odlišných vrstev buněk v rámci jedné kolonie, nejsou známy. Experimentální data, která byla v minulosti získána v naší laboratoři, naznačila, že by výrazný vliv mohly mít signální dráhy monitorující dostupnost živin (Cap, Stepanek et al. 2012). Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda, ve kterých fázích vývoje kolonie a jak ovlivňují tyto signální dráhy vertikální diferenciaci a tvorbu dvou buněčných subpopulací v centrální části obří kolonie. Připravila jsem proto pět nadprodukcčních kmenů, dva se zvýšenou produkcí kináz s centrální rolí v živinami spouštěné signalizaci (BY4742-P_{TEF}-*RIM15* a BY4742-P_{TEF}-*SCH9*) a tři se zvýšenou produkcí transkripčních faktorů, které jsou hlavními efektoři zmíněných kináz (BY4742-P_{TEF}-*GIS1*, BY4742-P_{TEF}-*MSN2* a BY4742-P_{TEF}-*MSN4*). Rovněž jsem připravila deleční kmeny BY4742-*rim15Δ*, BY4742-*sch9Δ*, BY4742-*gis1Δ*, BY4742-*msn2Δ* a BY4742-*msn4Δ* a jeden kmen s dvojitou delecí BY4742-*msn2Δ/msn4Δ*. U všech kmenů jsem zjišťovala morfologii makrokolonií, jednotlivých buněčných subpopulací a jejich uspořádání, a zastoupení životaschopných buněk v jednotlivých vrstvách buněk kolonie.

6.1 Morfologie obřích kolonií

Obří kolonie nově připravených kmenů se s výjimkou kmene BY4742-*sch9Δ* neliší svojí morfologií od kolonií kmene rodičovského. Na povrchu obří kolonie delečního kmene *sch9Δ* jsou již od 5. dne vývoje patrné vznikající papily, jejich počet během stárnutí kolonie se zvyšuje a v pozdních dnech vývoje je jimi pokryt téměř celý povrch kolonie. Ostatní mutantní kmeny, stejně jako kmen rodičovský, tvoří hladké kolonie, které na svém povrchu během raného vývoje papily nemají. V pozdějších dnech vývoje (okolo 20. dne), se papily začnou objevovat, jejich četnost u mutantních kmenů není odlišná od kmene rodičovského. Viditelná alkalizace je u všech kolonií mutantních kmenů shodná s koloniemi rodičovského kmene.

Jak již bylo zmíněno, kvasinky jsou studovány především jako jednobuněčné organismy rostoucí v tekutých třepaných kulturách. Z tohoto důvodu není možné srovnání mého pozorování s výsledky jiných autorů.

6.2 Morfologie U a L buněk

Účelem této části byla charakterizace morfologie odebraných U a L buněk v časovém vývoji kolonie a porovnání s morfologií U a L pozorovanou na vertikálních řezech kolonií. Pozorovala jsem morfologii buněk, které byly použity na určení procentuálního zastoupení živých buněk v jednotlivých buněčných subpopulacích, tato data sloužila zároveň jako kontrola rozdělení buněk kolonie.

Buňky horní vrstvy kolonií kmene *rim15Δ* jsou velice podobné buňkám lokalizovaným ve spodní vrstvě. Často obsahují velkou vakuolu, jsou menší a většina z nich neobsahuje lipidické tělísko. Podobnou morfologii mají horní buňky kolonií nadprodukčního kmene P_{TEF} -*SCH9*. Pro buňky s nadprodukcí genu pro transkripční faktor Gis1p je typická větší velikost U i L buněk. Od 12. dne je možné ve spodní frakci buněk pozorovat nedokončené pučení, vznikají protáhlé buňky s dvěma vakuolami. Delece genů *MSN2*, *MSN4* a dvojitá delece *MSN2/MSN4* ovlivňuje morfologii především L buněk, které jsou menší a neobsahují výraznou vakuolu.

6.3 Vertikální diferenciaci

Největší rozdíly ve schopnosti tvořit dvě oddělené diferencované subpopulace buněk jsem pozorovala u kmenů *rim15Δ* a P_{TEF} -*SCH9*. Kmen s delecí genu *RIM15* není schopen v centrální části kolonie tvořit dvě jasně oddělené vrstvy buněk. Buňky lokalizované v horní části kolonie jsou větší než buňky lokalizované u média a nejsou odděleny ostrým přechodem, oba subtypy se navzájem mísí. Podobný fenotyp jsem pozorovala u kolonií kmene s nadprodukcí kinázy Sch9p. V případě těchto kolonií se U a L buňky více liší svojí velikostí než buňky kolonií delečního kmene *rim15Δ*. Buňky se navzájem mísí, v centrální části kolonie se nevytváří ostrý přechod mezi jednotlivými subpopulacemi.

Fenotyp, který jsem pozorovala u kolonií delečního kmene *rim15Δ* a u kolonií kmene s nadprodukcí kinázy Sch9p, je v souladu s faktem, že Sch9p kináza inhibuje v buňkách rostoucích v tekutých kulturách Rim15p kinázu (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003).

Nadprodukce Sch9p má stejný, ale ne tak silný vliv na formování dvou buněčných subpopulací kolonií, jako ztráta Rim15p kinázy.

Změněná hladina transkripčních faktorů Gis1p, Msn2p a Msn4p neměla vliv na vytvoření dvou oddělených populací buněk kolonií. Buňky U a L vrstvy u kolonií některých z těchto mutantních kmenů se od rodičovského kmenu odlišují v morfologii, ale ve všech případech jsou oba buněčné subtypy od sebe jasně odděleny.

Na základě těchto pozorování lze říci, že dráha Sch9p-Rim15p se pravděpodobně podílí na diferenciaci kvasinkových kolonií, ale aktivace/inaktivace jednotlivých transkripčních faktorů (které byly v této práci testovány) tuto diferenciaci výrazně neovlivní.

6.4 Přežívání buněk v horních a dolních vrstvách během vývoje kolonie

Cílem této části práce bylo určit frakci živých buněk v jednotlivých buněčných subpopulacích. Výsledky mohou ukázat zapojení jednotlivých složek drah monitorujících dostupnost živin v různých fázích vývoje a jejich vliv na životaschopnost U a L buněk. Data z tohoto pokusu jsou také nezbytná pro případnou další charakterizaci buněčných subpopulací kolonie, která se často vztahuje na jednotku biomasy. Např. v případě charakterizace aktivity a celkové fyziologie buněk (např. schopnosti respirace) je vždy nutné brát v potaz zastoupení živých buněk v rámci dané subpopulace. Morfologie buněk kolonií připravených kmenů byla odlišná od rodičovského kmene, proto bylo nezbytné určit počet buněk obsažených v jednotce biomasy.

Buňky v centrální části kolonie jsou chronologicky stárnoucí buňky (Vachova and Palkova 2005). Vliv mnou studovaných kináz a transkripčních faktorů na chronologické stárnutí (doba přežití buněk, které se nedělí) kvasinek *S. cerevisiae* byl dříve charakterizován s využitím buněk rostoucích v tekutých kulturách (Allen, Buttner et al. 2006). Tyto buňky se svojí fyziologií od buněk v koloniích výrazně liší.

Buňky kmene BY4742-P_{TEF}-RIM15 se svojí schopností přežití v čase příliš neliší od kolonií kmene rodičovského, u buněk spodní vrstvy jsem pozorovala vyšší procentuální zastoupení živých buněk. Efekt delece genu RIM15 je patrný již od časných stádií vývoje kolonie, nepřítomnost Rim15p kinázy má za následek výrazné snížení životaschopnosti buněk horní i spodní vrstvy. Tyto výsledky ukazují, že signalizace Rim15p kinázou má na vývoj

kolonie pozitivní efekt a tato signalizace je buď nezbytná po celou dobu vývoje kolonie, nebo v počátečních fázích vývoje Rim15p spustí specifický program, který vývoj kolonie řídí. Analýza morfologie buněk a jejich rozložení v centrální části kolonie je v souladu s tímto pozorováním. V případě kolonií kmene nadprodukcčního k morfologickým změnám ve srovnání s koloniemi rodičovského kmene nedochází, naopak kolonie kmene s delecí genu *RIM15* mají změněnou morfologii buněk a nedochází v nich k jasnému odlišení buněk horní a dolní vrstvy a vzniku buněk s typickou U resp. L morfologií.

Na buňky dolních vrstev má signalizace Rim15p kinázou pozitivní efekt. V případě nadprodukce Rim15p jsem nepozorovala výrazný efekt na buňky horní vrstvy, naopak nepřítomnost Rim15p jejich životaschopnost výrazně snižuje. Kináza Rim15p tak může mít důležitou signální roli i v horních buňkách, která je patrná především v její nepřítomnosti. Jiným vysvětlením může být, že signalizace kinázou Rim15p není v buňkách horní vrstvy důležitá, ale snížené množství živých dolních buněk nedokáže dostatečně vyživovat horní vrstvu buněk (případně nevznikají dolní buňky s charakteristickými vlastnostmi L buněk), buňky v horní vrstvě strádají a nedochází ke vzniku typických U buněk.

Mé výsledky jsou v souladu se studiemi provedenými na tekutých kulturách kmenů s delecí *RIM15*. Snížená životaschopnost buněk kmene *rim15Δ* je v minimálním médiu obohaceném o 0,5% glukózu patrná již druhý den kultivace, sedmý den kultura obsahuje pouze 30% živých buněk a desátý den kultivace neobsahuje žádné živé buňky. Buněčná kultura rodičovského kmene kultivovaného ve stejných podmínkách obsahuje sedmý den růstu 75% živých buněk, životaschopné buňky je možné nalézt až do patnáctého dne kultivace (Wei, Fabrizio et al. 2008).

Kináza Sch9p má vliv především na životaschopnost buněk spodní vrstvy. V případě kolonií nadprodukcčního kmene BY4742- P_{TEF} -*SCH9* dochází ke snížení zastoupení živých dolních buněk, naopak suspenze L buněk delečního kmene BY4742-*sch9Δ* obsahuje vyšší procento živých buněk než suspenze U buněk, což je situace odlišná od kolonií rodičovského kmene. Vliv Sch9p kinázy na buňky horní vrstvy není jednoznačný. V raných fázích kolonie nadprodukcčního kmene obsahují menší frakci živých buněk než kolonie rodičovského kmene, stejný fenomén je možné pozorovat u kolonií delečního kmene ve střední a pozdní fázi vývoje.

Vliv nadprodukce kinázy Sch9p na U buňky v raných fázích vývoje není zřejmý. Výsledek z 5. dne vývoje kolonií z důvodu kontaminace během 1. pokusu zahrnuje pouze

jednu hodnotu, hodnoty pro 7. den růstu kolonií se od sebe lišily. Podobnost s koloniemi rodičovského kmene v dalších analyzovaných dnech by mohla být dána sníženou aktivitou TEF promotoru, který by mohl mít ve stacionární fázi sníženou funkci. V důsledku velkých rozdílů v hodnotách zjištěných pro horní buňky kolonií delečního kmene *sch9Δ* 5. a 7. den v prvním a druhém pokusu není možné určit, zda je podobná schopnost přežití v čase jako u rodičovského kmene způsobena vlivem kinázy, nebo chybou v měření. Signalizace Sch9p kinázou výrazně zhoršuje životaschopnost buněk spodní vrstvy. Rim15p kináza je Sch9p kinázou negativně regulována, opačný efekt těchto kináz na buňky je tedy v souladu s předpokladem (Pedruzzi, Dubouloz et al. 2003). Buňky spodní vrstvy jsou buňky ve stacionární fázi, které pravděpodobně vyživují buňky horní vrstvy a tím se postupně vyčerpávají, nadprodukce Sch9p možná tyto vlastnosti potlačuje a tím přispívá k životaschopnosti těchto buněk.

Výsledky jsou v souladu s daty dostupnými v literatuře. Kmen s delecí *SCH9* přežívá v tekutém komplexním médiu třikrát déle, než kmen rodičovský. U rodičovského kmene nastává prudký pokles počtu živých buněk již čtvrtý den kultivace, v případě kmene *sch9Δ* je tento pokles možné pozorovat až dvacátý den kultivace (Fabrizio, Pozza et al. 2001). V tekutém minimálním médiu obohaceném 0,5% glukózou má delece *SCH9* stejný efekt jako v komplexním médiu. Počet živých buněk v kultuře rodičovského kmene po desetidenní kultivaci činí 8%, v případě kmene *sch9Δ* tvoří živé buňky 90% kultury. Kmen *sch9Δ* přežívá ve zmíněném médiu až 35 dní, tedy výrazně déle, než kmen rodičovský, který přežívá pouze 15 dní. Schopnost dlouhodobého přežití je dána především tím, že buňky delečního kmene rostou velice pomalu (Wei, Fabrizio et al. 2008).

Nadprodukce transkripčního faktoru Gis1p má negativní vliv na přežívání buněk rostoucích v horní i spodní části centra kolonie. Vliv delece genu *GIS1* nebyl jednoznačný, v buňkách spodní vrstvy způsobuje, stejně jako nadprodukce, vyšší zastoupení mrtvých buněk. Výsledky měření zastoupení živých buněk horní vrstvy kolonií delečního kmene se mezi dvěma pokusy výrazně lišily ve více dnech, proto není možné určit vliv Gis1p.

Vzhledem k tomu, že nadprodukce Gis1p způsobuje snížené přežívání buněk kolonií, mohl by mít transkripční faktor Gis1p na přežívání buněk negativní vliv. Analýza delečního kmenu tuto hypotézu ale vyvrací, protože ztráta Gis1p buňkám neposkytuje výhodu v dlouhodobém přežívání. Vysvětlením tohoto podobného efektu ztráty i nadprodukce Gis1p

na buňky kolonií může být vyšší síla přirozeného promotoru (a tak i vyšší transkripce *Gis1p* v rodičovském kmenu), než transkripce z TEF promotoru vneseném transformací.

V kultuře delečního kmene *gis1Δ*, která roste v tekutém minimálním médiu obohaceném o 0,5% glukózu, je během prvního až sedmého dne růstu stejné zastoupení živých buněk jako u kmene rodičovského. Částečné snížení životaschopných buněk kmene *gis1Δ* nastává osmý den kultivace, kultura je tvořena 10% živých buněk (rodičovský kmen 20%). Schopnost dlouhodobého přežívání není u kmene s delecí *GIS1* výrazně narušená. Buňky jsou životaschopné do 12. dne kultivace, buňky kmene rodičovského do dne 15. (Wei, Fabrizio et al. 2008). Tato data nejsou zcela v souladu s mým pozorováním, spodní buňky kolonií kmene BY4742-*gis1Δ* vykazují sníženou schopnost přežití již od raných fází vývoje kolonie.

Kolonie nadprodukčních kmenů BY4742-P_{TEF}-*MSN2* a BY4742-P_{TEF}-*MSN4* svým profilem přežívání v čase připomínají kolonie rodičovského kmene BY4742. Dolní buňky kolonií delečních kmenů BY4742-*msn2Δ*, BY4742-*msn4Δ* a kmene s dvojitou delecí BY4742-*msn2Δ/msn4Δ* vykazují sníženou schopnost přežívání od 7. dne vývoje kolonie, v případě kmene s delecí genu *MSN4* jsem tento efekt pozorovala již 5. den vývoje kolonie. Horní buňky kolonií těchto kmenů nemají 5. den změněnou schopnost přežívání oproti horním buňkám kolonií rodičovského kmene, v 7. až 9. dni životaschopných horních buněk rapidně klesá.

Během první acidické fáze dochází k hromadění reaktivních forem kyslíku (Vachova and Palkova 2005). Následuje alkalická fáze, během které dochází ke změnám v metabolismu umožňujícím ochranu před oxidativním stresem (Palkova, Devaux et al. 2002). Signalizace vyvolaná amoniakem způsobí únik buněk lokalizovaných na okrajích kolonie z kvasinkové programované buněčné smrti, která do té doby probíhá ve všech částech kolonie stejně. V buňkách lokalizovaných v centrální části kolonie začne docházet k odumírání s větší četností (Vachova and Palkova 2005). Transkripční faktory *Msn2p* a *Msn4p* se váží ve stresových podmínkách do „STRE“ oblastí promotorů genů, které kódují proteiny účastnící se všeobecné i specifické odpovědi na stres (Martinez-Pastor, Marchler et al. 1996).

Na základě výše zmíněných zjištění by se dalo menší procentuální zastoupení životaschopných buněk v horní vrstvě delečních kmenů *msn2Δ*, *msn4Δ* a *msn2Δ/msn4Δ* v časných dnech vývoje kolonií vysvětlit tím, že během acidické fáze je v koloniích mutantních kmenů zvýšená hladina stresových faktorů, protože je snížena produkce některých faktorů obrany proti stresu. Po přechodu kolonií do alkalické fáze dochází k vyrovnání

zastoupení živých buněk v koloniích těchto mutantních kmenů ve srovnání s koloniemi rodičovského kmene BY4742. Toto zjištění je v souladu s předchozími výsledky, které naznačily, že odpověď na stres je důležitá hlavně během časných fází vývoje kolonie, zatímco po přepnutí do alkalické fáze není přímá obrana proti stresu významná (Cap et al, 2009).

Efekt nadprodukce i ztráty Msn4p má na přežívání buněk v rámci kolonie větší vliv, než nadprodukce nebo ztráta genu *MSN2*. Tento jev je v rozporu s daty získanými studiem tekutých kultur, ve kterých hraje důležitější roli transkripční faktor Msn2p (Schroeder, Raimundo et al. 2013). Dvojitá delece *msn2Δ/msn4Δ* nemá výrazně větší vliv na přežívání buněk kolonií než jednotlivé mutace. Toto pozorování je v rozporu s daty získanými na tekutých kulturách, ve kterých má ztráta obou genů pro transkripční faktory stresové odpovědi větší vliv než ztráta pouze jednoho genu (Schroeder, Raimundo et al. 2013), nebo naopak nemá na životaschopnost buněk v čase žádný vliv (Wei, Fabrizio et al. 2008).

7 Souhrn

- Připravila jsem kmeny s delecí, respektive zvýšenou expresí genů *SCH9* a *RIM15*, které kódují kinázy s centrální signální rolí v drahách monitorující dostupnost živin a kmeny s delecí, respektive zvýšenou expresí genů kódujících hlavní efekторы zmíněných kináz, *Gis1p*, *Msn2p*, *Msn4p* a kmen s dvojitou delecí v genech *MSN2* a *MSN4*.
- Delece genu *SCH9* vede k narušení morfologie obří kolonie, vytváří se mnoho papil. Ostatní modifikace nemají na morfologii obřích kolonií vliv. Buňky horní vrstvy kmenů $P_{TEF}\text{-}SCH9$ a *rim15Δ* nemají typickou morfologii, jsou podobné buňkám spodní vrstvy. Zvýšená exprese genu *GIS1* má za následek vznik větších U i L buněk, které mají často oválný tvar. Delece i zvýšená exprese genů *MSN2* a *MSN4* od 14. dne vývoje kolonie vede k menší velikost buněk spodní vrstvy a méně výrazné vakuolizaci L buněk.
- Vertikální diferenciacce je narušena především v případě kmenů *rim15Δ* a $P_{TEF}\text{-}SCH9$, nedochází k vytvoření dvou oddělených buněčných subpopulací. Ostatní modifikované kmeny tvoří dvě buněčné subpopulace oddělené výrazným přechodem.
- Sníženou schopnost přežívání horních i dolních buněk během celého vývoje kolonie jsem pozorovala u kmenů *rim15Δ* a $P_{TEF}\text{-}GIS1$. Delece *SCH9* má za následek výrazně zvýšenou životaschopnost buněk spodní vrstvy. Zastoupení živých buňky v horní vrstvě kolonií delecčních kmenů *msn2Δ* a *msn4Δ* a kmenu s dvojitou delecí *msn2Δ/msn4Δ* je během 5. a 7. dne nižší než u kmene rodičovského, nižší zastoupení živých buněk spodní vrstvy těchto kmenů se objevuje až od 8. dne vývoje kolonie.

8 Seznam použité literatury

- Allen, C., S. Buttner, A. D. Aragon, J. A. Thomas, O. Meirelles, J. E. Jaetao, D. Benn, S. W. Ruby, M. Veenhuis, F. Madeo and M. Werner-Washburne (2006). "Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures." J Cell Biol **174**(1): 89-100.
- Angeles de la Torre-Ruiz, M., J. Torres, J. Arino and E. Herrero (2002). "Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **277**(36): 33468-33476.
- Arndt, K. T., C. A. Styles and G. R. Fink (1989). "A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases." Cell **56**(4): 527-537.
- Baba, M., K. Takeshige, N. Baba and Y. Ohsumi (1994). "Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization." J Cell Biol **124**(6): 903-913.
- Beck, T. and M. N. Hall (1999). "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors." Nature **402**(6762): 689-692.
- Bhandari, D., J. Zhang, S. Menon, C. Lord, S. Chen, J. R. Helm, K. Thorsen, K. D. Corbett, J. C. Hay and S. Ferro-Novick (2013). "Sit4p/PP6 regulates ER-to-Golgi traffic by controlling the dephosphorylation of COPII coat subunits." Mol Biol Cell **24**(17): 2727-2738.
- Binda, M., M. P. Peli-Gulli, G. Bonfils, N. Panchaud, J. Urban, T. W. Sturgill, R. Loewith and C. De Virgilio (2009). "The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex." Mol Cell **35**(5): 563-573.
- Blattner, C., S. Jennebach, F. Herzog, A. Mayer, A. C. Cheung, G. Witte, K. Lorenzen, K. P. Hopfner, A. J. Heck, R. Aebersold and P. Cramer (2011). "Molecular basis of Rrn3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth." Genes Dev **25**(19): 2093-2105.
- Bohm, S., D. Frishman and H. W. Mewes (1997). "Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins." Nucleic Acids Res **25**(12): 2464-2469.
- Boles, E. and C. P. Hollenberg (1997). "The molecular genetics of hexose transport in yeasts." FEMS Microbiol Rev **21**(1): 85-111.
- Bonawitz, N. D., M. Chatenay-Lapointe, Y. Pan and G. S. Shadel (2007). "Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression." Cell Metab **5**(4): 265-277.
- Bonfils, G., M. Jaquenoud, S. Bontron, C. Ostrowicz, C. Ungermann and C. De Virgilio (2012). "Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex." Mol Cell **46**(1): 105-110.
- Bontron, S., M. Jaquenoud, S. Vaga, N. Talarek, B. Bodenmiller, R. Aebersold and C. De Virgilio (2013). "Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A." Cell Rep **3**(1): 16-22.
- Breviario, D., A. Hinnebusch, J. Cannon, K. Tatchell and R. Dhar (1986). "Carbon source regulation of RAS1 expression in *Saccharomyces cerevisiae* and the phenotypes of ras2- cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4152-4156.
- Budovskaya, Y. V., J. S. Stephan, S. J. Deminoff and P. K. Herman (2005). "An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13933-13938.

- Budovskaya, Y. V., J. S. Stephan, F. Reggiori, D. J. Klionsky and P. K. Herman (2004). "The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **279**(20): 20663-20671.
- Cameroni, E., N. Hulo, J. Roosen, J. Winderickx and C. De Virgilio (2004). "The novel yeast PAS kinase Rim 15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms." Cell Cycle **3**(4): 462-468.
- Cap, M., L. Stepanek, K. Harant, L. Vachova and Z. Palkova (2012). "Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism." Mol Cell **46**(4): 436-448.
- Carroll, A. S. and E. K. O'Shea (2002). "Pho85 and signaling environmental conditions." Trends Biochem Sci **27**(2): 87-93.
- Casamayor, A., P. D. Torrance, T. Kobayashi, J. Thorner and D. R. Alessi (1999). "Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast." Curr Biol **9**(4): 186-197.
- Causton, H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander and R. A. Young (2001). "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes." Mol Biol Cell **12**(2): 323-337.
- Cavanaugh, A. H., I. Hirschler-Laszkiewicz, Q. Hu, M. Dundr, T. Smink, T. Misteli and L. I. Rothblum (2002). "Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis." J Biol Chem **277**(30): 27423-27432.
- Celenza, J. L. and M. Carlson (1984). "Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **4**(1): 49-53.
- Celenza, J. L., F. J. Eng and M. Carlson (1989). "Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase." Mol Cell Biol **9**(11): 5045-5054.
- Claypool, J. A., S. L. French, K. Johzuka, K. Eliason, L. Vu, J. A. Dodd, A. L. Beyer and M. Nomura (2004). "Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes." Mol Biol Cell **15**(2): 946-956.
- Cobitz, A. R., E. H. Yim, W. R. Brown, C. M. Perou and F. Tamanoi (1989). "Phosphorylation of RAS1 and RAS2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(3): 858-862.
- Colombo, S., P. Ma, L. Cauwenberg, J. Winderickx, M. Crauwels, A. Teunissen, D. Nauwelaers, J. H. de Winde, M. F. Gorwa, D. Colavizza and J. M. Thevelein (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**(12): 3326-3341.
- Colombo, S., D. Ronchetti, J. M. Thevelein, J. Winderickx and E. Martegani (2004). "Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **279**(45): 46715-46722.
- Cooper, D. M. (2003). "Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP." Biochem J **375**(Pt 3): 517-529.
- Crauwels, M., M. C. Donaton, M. B. Pernambuco, J. Winderickx, J. H. de Winde and J. M. Thevelein (1997). "The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway." Microbiology **143** (Pt 8): 2627-2637.
- De Vit, M. J., J. A. Waddle and M. Johnston (1997). "Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor." Mol Biol Cell **8**(8): 1603-1618.
- DeVit, M. J. and M. Johnston (1999). "The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Biol **9**(21): 1231-1241.

- Di Como, C. J. and K. T. Arndt (1996). "Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases." Genes Dev **10**(15): 1904-1916.
- Dobbelaere, J., M. S. Gentry, R. L. Hallberg and Y. Barral (2003). "Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle." Dev Cell **4**(3): 345-357.
- Dubouloz, F., O. Deloche, V. Wanke, E. Cameroni and C. De Virgilio (2005). "The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast." Mol Cell **19**(1): 15-26.
- Duvel, K., A. Santhanam, S. Garrett, L. Schneper and J. R. Broach (2003). "Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast." Mol Cell **11**(6): 1467-1478.
- Fabrizio, P., F. Pozza, S. D. Pletcher, C. M. Gendron and V. D. Longo (2001). "Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast." Science **292**(5515): 288-290.
- Garrett, S., M. M. Menold and J. R. Broach (1991). "The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle." Mol Cell Biol **11**(8): 4045-4052.
- Geyskens I, K. S., Donaton MCV, Bergsma JCT, Thevelein JM, Wera S (2001). "Expression of mammalian PKB complements deletion of the yeast protein kinase Sch9." Nato Sci Ser A **316**: 117-126.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Gorner, W., E. Durchschlag, M. T. Martinez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis and C. Schuller (1998). "Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity." Genes Dev **12**(4): 586-597.
- Gorner, W., E. Durchschlag, J. Wolf, E. L. Brown, G. Ammerer, H. Ruis and C. Schuller (2002). "Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor." EMBO J **21**(1-2): 135-144.
- Hahn, J. S., Z. Hu, D. J. Thiele and V. R. Iyer (2004). "Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor." Mol Cell Biol **24**(12): 5249-5256.
- Hahn, J. S. and D. J. Thiele (2004). "Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase." J Biol Chem **279**(7): 5169-5176.
- Hashikawa, N., Y. Mizukami, H. Imazu and H. Sakurai (2006). "Mutated yeast heat shock transcription factor activates transcription independently of hyperphosphorylation." J Biol Chem **281**(7): 3936-3942.
- Healy, A. M., S. Zolnierowicz, A. E. Stapleton, M. Goebel, A. A. DePaoli-Roach and J. R. Pringle (1991). "CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase." Mol Cell Biol **11**(11): 5767-5780.
- Heitman, J., N. R. Movva and M. N. Hall (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." Science **253**(5022): 905-909.
- Helliwell, S. B., P. Wagner, J. Kunz, M. Deuter-Reinhard, R. Henriquez and M. N. Hall (1994). "TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast." Mol Biol Cell **5**(1): 105-118.
- Hu, Y., E. Liu, X. Bai and A. Zhang (2010). "The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Yeast Res **10**(2): 177-187.
- Jacquet, M., G. Renault, S. Lallet, J. De Mey and A. Goldbeter (2003). "Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **161**(3): 497-505.

- Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel and M. Knop (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." Yeast **21**(11): 947-962.
- Jiang, R. and M. Carlson (1996). "Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex." Genes Dev **10**(24): 3105-3115.
- Jiang, Y. and J. R. Broach (1999). "Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast." EMBO J **18**(10): 2782-2792.
- Kabeya, Y., Y. Kamada, M. Baba, H. Takikawa, M. Sasaki and Y. Ohsumi (2005). "Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy." Mol Biol Cell **16**(5): 2544-2553.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." J Cell Biol **150**(6): 1507-1513.
- Kraakman, L., K. Lemaire, P. Ma, A. W. Teunissen, M. C. Donaton, P. Van Dijck, J. Winderickx, J. H. de Winde and J. M. Thevelein (1999). "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose." Mol Microbiol **32**(5): 1002-1012.
- Kunz, J., U. Schneider, I. Howald, A. Schmidt and M. N. Hall (2000). "HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast." J Biol Chem **275**(47): 37011-37020.
- Lee, J., R. D. Moir and I. M. Willis (2009). "Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway." J Biol Chem **284**(19): 12604-12608.
- Lee, P., B. R. Cho, H. S. Joo and J. S. Hahn (2008). "Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4." Mol Microbiol **70**(4): 882-895.
- Lee, P., M. S. Kim, S. M. Paik, S. H. Choi, B. R. Cho and J. S. Hahn (2013). "Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **587**(22): 3648-3655.
- Liu, K., X. Zhang, R. L. Lester and R. C. Dickson (2005). "The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9." J Biol Chem **280**(24): 22679-22687.
- Lobo, Z. and P. K. Maitra (1977). "Genetics of yeast hexokinase." Genetics **86**(4): 727-744.
- Loewith, R. and M. N. Hall (2011). "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control." Genetics **189**(4): 1177-1201.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-468.
- Londesborough, J. (1982). "Activity of cyclic-AMP phosphodiesterase in permeabilised cells of Bakers' yeast." Eur J Biochem **126**(3): 631-637.
- Ludin, K., R. Jiang and M. Carlson (1998). "Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6245-6250.
- Luke, M. M., F. Della Seta, C. J. Di Como, H. Sugimoto, R. Kobayashi and K. T. Arndt (1996). "The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase." Mol Cell Biol **16**(6): 2744-2755.
- Luo, X., N. Talarek and C. De Virgilio (2011). "Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs." RNA Biol **8**(1): 14-17.

- Ma, P., S. Wera, P. Van Dijck and J. M. Thevelein (1999). "The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling." Mol Biol Cell **10**(1): 91-104.
- Maitra, P. K. (1970). "A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **245**(9): 2423-2431.
- Marion, R. M., A. Regev, E. Segal, Y. Barash, D. Koller, N. Friedman and E. K. O'Shea (2004). "Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14315-14322.
- Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis and F. Estruch (1996). "The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE)." EMBO J **15**(9): 2227-2235.
- Meunier, J. R. and M. Choder (1999). "*Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression." Yeast **15**(12): 1159-1169.
- Moir, R. D., J. Lee, R. A. Haeusler, N. Desai, D. R. Engelke and I. M. Willis (2006). "Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15044-15049.
- Munder, T. and H. Kuntzel (1989). "Glucose-induced cAMP signaling in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the CDC25 protein." FEBS Lett **242**(2): 341-345.
- Nakashima, N., E. Noguchi and T. Nishimoto (1999). "*Saccharomyces cerevisiae* putative G protein, Gtr1p, which forms complexes with itself and a novel protein designated as Gtr2p, negatively regulates the Ran/Gsp1p G protein cycle through Gtr2p." Genetics **152**(3): 853-867.
- Nath, N., R. R. McCartney and M. C. Schmidt (2003). "Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1." Mol Cell Biol **23**(11): 3909-3917.
- Nehlin, J. O. and H. Ronne (1990). "Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins." EMBO J **9**(9): 2891-2898.
- Nomura, M. (2001). "Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **66**: 555-565.
- Palkova, Z., F. Devaux, M. Icovova, L. Minarikova, S. Le Crom and C. Jacq (2002). "Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development." Mol Biol Cell **13**(11): 3901-3914.
- Palkova, Z. and J. Forstova (2000). "Yeast colonies synchronise their growth and development." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1923-1928.
- Palkova, Z., B. Janderova, J. Gabriel, B. Zikanova, M. Pospisek and J. Forstova (1997). "Ammonia mediates communication between yeast colonies." Nature **390**(6659): 532-536.
- Papamichos-Chronakis, M., T. Gligoris and D. Tzamarias (2004). "The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor." EMBO Rep **5**(4): 368-372.
- Pedruzzi, I., N. Burckert, P. Egger and C. De Virgilio (2000). "*Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1." EMBO J **19**(11): 2569-2579.
- Pedruzzi, I., F. Dubouloz, E. Camerini, V. Wanke, J. Roosen, J. Winderickx and C. De Virgilio (2003). "TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0." Mol Cell **12**(6): 1607-1613.
- Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, R. R. McCartney, M. C. Schmidt, N. Rachidi, S. J. Lee, A. S. Mah, L. Meng, M. J. Stark, D. F. Stern, C. De Virgilio,

- M. Tyers, B. Andrews, M. Gerstein, B. Schweitzer, P. F. Predki and M. Snyder (2005). "Global analysis of protein phosphorylation in yeast." *Nature* **438**(7068): 679-684.
- Reinders, A., N. Burckert, T. Boller, A. Wiemken and C. De Virgilio (1998). "Saccharomyces cerevisiae cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase." *Genes Dev* **12**(18): 2943-2955.
- Reinke, A., S. Anderson, J. M. McCaffery, J. Yates, 3rd, S. Aronova, S. Chu, S. Fairclough, C. Iverson, K. P. Wedaman and T. Powers (2004). "TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in Saccharomyces cerevisiae." *J Biol Chem* **279**(15): 14752-14762.
- Reiter, W., E. Klopff, V. De Wever, D. Anrather, A. Petryshyn, A. Roetzer, G. Niederacher, E. Roitinger, I. Dohnal, W. Gorner, K. Mechtler, C. Brocard, C. Schuller and G. Ammerer (2013). "Yeast protein phosphatase 2A-Cdc55 regulates the transcriptional response to hyperosmolarity stress by regulating Msn2 and Msn4 chromatin recruitment." *Mol Cell Biol* **33**(5): 1057-1072.
- Rolland, F., J. H. De Winder, K. Lemaire, E. Boles, J. M. Thevelein and J. Winderickx (2000). "Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process." *Mol Microbiol* **38**(2): 348-358.
- Rolland, F., V. Wanke, L. Cauwenberg, P. Ma, E. Boles, M. Vanoni, J. H. de Winder, J. M. Thevelein and J. Winderickx (2001). "The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *FEMS Yeast Res* **1**(1): 33-45.
- Roosen, J., K. Engelen, K. Marchal, J. Mathys, G. Griffioen, E. Cameroni, J. M. Thevelein, C. De Virgilio, B. De Moor and J. Winderickx (2005). "PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability." *Mol Microbiol* **55**(3): 862-880.
- Santangelo, G. M. (2006). "Glucose signaling in Saccharomyces cerevisiae." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(1): 253-282.
- Sass, P., J. Field, J. Nikawa, T. Toda and M. Wigler (1986). "Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of Saccharomyces cerevisiae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9303-9307.
- Shamji, A. F., F. G. Kuruvilla and S. L. Schreiber (2000). "Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins." *Curr Biol* **10**(24): 1574-1581.
- Schmidt, A., J. Kunz and M. N. Hall (1996). "TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13780-13785.
- Schmidt, M. C. and R. R. McCartney (2000). "beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition." *EMBO J* **19**(18): 4936-4943.
- Schmitt, A. P. and K. McEntee (1996). "Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in Saccharomyces cerevisiae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5777-5782.
- Schroeder, E. A., N. Raimundo and G. S. Shadel (2013). "Epigenetic silencing mediates mitochondria stress-induced longevity." *Cell Metab* **17**(6): 954-964.
- Smets, B., R. Ghillebert, P. De Sniijder, M. Binda, E. Swinnen, C. De Virgilio and J. Winderickx (2010). "Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in Saccharomyces cerevisiae." *Curr Genet* **56**(1): 1-32.
- Smith, A., M. P. Ward and S. Garrett (1998). "Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation." *EMBO J* **17**(13): 3556-3564.
- Sneddon, A. A., P. T. Cohen and M. J. Stark (1990). "Saccharomyces cerevisiae protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes." *EMBO J* **9**(13): 4339-4346.

- Stahl, G., S. N. Salem, L. Chen, B. Zhao and P. J. Farabaugh (2004). "Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell **3**(2): 331-338.
- Stepanchick, A., H. Zhi, A. H. Cavanaugh, K. Rothblum, D. A. Schneider and L. I. Rothblum (2013). "DNA binding by the ribosomal DNA transcription factor *rrn3* is essential for ribosomal DNA transcription." J Biol Chem **288**(13): 9135-9144.
- Stephan, J. S., Y. Y. Yeh, V. Ramachandran, S. J. Deminoff and P. K. Herman (2009). "The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(40): 17049-17054.
- Sutherland, C. M., S. A. Hawley, R. R. McCartney, A. Leech, M. J. Stark, M. C. Schmidt and D. G. Hardie (2003). "Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex." Curr Biol **13**(15): 1299-1305.
- Swinnen, E., V. Wanke, J. Roosen, B. Smets, F. Dubouloz, I. Pedruzzi, E. Cameroni, C. De Virgilio and J. Winderickx (2006). "Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*." Cell Div **1**: 3.
- Talarek, N., E. Cameroni, M. Jaquenoud, X. Luo, S. Bontron, S. Lippman, G. Devgan, M. Snyder, J. R. Broach and C. De Virgilio (2010). "Initiation of the TORC1-regulated G0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway." Mol Cell **38**(3): 345-355.
- Tanaka, K., K. Matsumoto and E. A. Toh (1989). "IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **9**(2): 757-768.
- Tanaka, K., M. Nakafuku, F. Tamanoi, Y. Kaziro, K. Matsumoto and A. Toh-e (1990). "IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein." Mol Cell Biol **10**(8): 4303-4313.
- Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, J. D. Scott, B. McMullen, M. Hurwitz, E. G. Krebs and M. Wigler (1987). "Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **7**(4): 1371-1377.
- Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller and M. Wigler (1987). "Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase." Cell **50**(2): 277-287.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **333**(1-2): 169-174.
- Tudisca, V., V. Recouvreux, S. Moreno, E. Boy-Marcotte, M. Jacquet and P. Portela (2010). "Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions." Eur J Cell Biol **89**(4): 339-348.
- Urban, J., A. Soulard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer, H. Riezman, J. R. Broach, C. De Virgilio, M. N. Hall and R. Loewith (2007). "Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell **26**(5): 663-674.
- Vachova, L., M. Cap and Z. Palkova (2012). "Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity." Oxid Med Cell Longev **2012**: 601836.
- Vachova, L., H. Kucerova, F. Devaux, M. Ulehlova and Z. Palkova (2009). "Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies." Environ Microbiol **11**(2): 494-504.
- Vachova, L. and Z. Palkova (2005). "Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia." J Cell Biol **169**(5): 711-717.
- van Aelst, L., A. W. Jans and J. M. Thevelein (1991). "Involvement of the CDC25 gene product in the signal transmission pathway of the glucose-induced RAS-mediated cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Gen Microbiol **137**(2): 341-349.

- van Zyl, W., W. Huang, A. A. Sneddon, M. Stark, S. Camier, M. Werner, C. Marck, A. Sentenac and J. R. Broach (1992). "Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **12**(11): 4946-4959.
- Vannini, A., R. Ringel, A. G. Kusser, O. Berninghausen, G. A. Kassavetis and P. Cramer (2010). "Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1." Cell **143**(1): 59-70.
- Versele, M., J. H. de Winde and J. M. Thevelein (1999). "A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2." EMBO J **18**(20): 5577-5591.
- Vežina, C., A. Kudelski and S. N. Sehgal (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomyces and isolation of the active principle." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 721-726.
- Vidan, S. and A. P. Mitchell (1997). "Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p." Mol Cell Biol **17**(5): 2688-2697.
- Vincent, O. and M. Carlson (1999). "Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4." EMBO J **18**(23): 6672-6681.
- Vincent, O., R. Townley, S. Kuchin and M. Carlson (2001). "Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism." Genes Dev **15**(9): 1104-1114.
- Voordeckers, K., M. Kimpe, S. Haesendonckx, W. Louwet, M. Versele and J. M. Thevelein (2011). "Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9." J Biol Chem **286**(25): 22017-22027.
- Wang, Y. and D. J. Burke (1997). "Cdc55p, the B-type regulatory subunit of protein phosphatase 2A, has multiple functions in mitosis and is required for the kinetochore/spindle checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **17**(2): 620-626.
- Wang, Y., M. Pierce, L. Schneper, C. G. Guldal, X. Zhang, S. Tavazoie and J. R. Broach (2004). "Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast." PLoS Biol **2**(5): E128.
- Wanke, V., I. Pedruzzi, E. Cameroni, F. Dubouloz and C. De Virgilio (2005). "Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex." EMBO J **24**(24): 4271-4278.
- Wei, M., P. Fabrizio, J. Hu, H. Ge, C. Cheng, L. Li and V. D. Longo (2008). "Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9." PLoS Genet **4**(1): e13.
- Whistler, J. L. and J. Rine (1997). "Ras2 and Ras1 protein phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **272**(30): 18790-18800.
- Xiao, B. and D. Jian (2010). "Serine214 of Ras2p plays a role in the feedback regulation of the Ras-cAMP pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **584**(11): 2333-2338.
- Xue, Y., M. Battle and J. P. Hirsch (1998). "GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway." EMBO J **17**(7): 1996-2007.
- Yamamoto, R. T., Y. Nogi, J. A. Dodd and M. Nomura (1996). "RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template." EMBO J **15**(15): 3964-3973.
- Yang, X., R. Jiang and M. Carlson (1994). "A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex." EMBO J **13**(24): 5878-5886.

- Yorimitsu, T., S. Zaman, J. R. Broach and D. J. Klionsky (2007). "Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **18**(10): 4180-4189.
- Yun, C. W., H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto and H. Kumagai (1997). "G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 287-292.
- Yun, C. W., H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto and H. Kumagai (1998). "Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **252**(1): 29-33.
- Zhang, A., Y. Shen, W. Gao and J. Dong (2011). "Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **585**(19): 3026-3032.
- Zhang, N., J. Wu and S. G. Oliver (2009). "Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast." Microbiology **155**(Pt 5): 1690-1698.
- Zhang, T., M. P. Peli-Gulli, H. Yang, C. De Virgilio and J. Ding (2012). "Ego3 functions as a homodimer to mediate the interaction between Gtr1-Gtr2 and Ego1 in the ego complex to activate TORC1." Structure **20**(12): 2151-2160.
- Zhao, Y., G. Boguslawski, R. S. Zitomer and A. A. DePaoli-Roach (1997). "*Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions." J Biol Chem **272**(13): 8256-8262.
- Zheng, Y. and Y. Jiang (2005). "The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the Tap42-phosphatase complexes." Mol Biol Cell **16**(4): 2119-2127.