

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd**



**Studium stresových faktorů u *Candida albicans*
(diplomová práce)**

Hradec Králové, 2007

Renáta Vindušková

Souhrn

Kvasinky rostoucí na pevném povrchu vytvářejí mnohobuněčné struktury, tzv. kolonie, s charakteristickou organisovanou [morfologií](#), která vzniká dělením nepohyblivých kvasinkových buněk. Organizace kvasinkových kolonií proto musí být zajištěna signály vysílanými a přijímanými dělicími se buňkami, které kolonii tvoří. Z tohoto pohledu připomíná vývoj kvasinkové kolonie tvorbu tkání a orgánů vyšších mnohobuněčných organismů

Jednou z charakteristických vlastností mnohobuněčných organismů je jejich schopnost vysílat a přijímat signály na velké vzdálenosti. Kvasinkové kolonie využívají pro komunikaci mezi koloniemi jednoduchou plynnou látku, čpavek (amoniak), který kolonie produkují v pulsech. Vlivem amoniaku sousední kolonie synchronisují svůj vývoj.

Přechod kolonií z kyselé fáze do fáze intenzivní produkce amoniaku (alkalická fáze) je spojen s výraznými změnami metabolismu buněk kolonií.

Můžeme se domnívat, že plyný amoniak se u kvasinkových kolonií uplatňuje jako jakýsi "alarm" signál, který indukuje změny vedoucí k zapnutí adaptivního metabolismu a úniku ze stresu.

Do budoucnosti by zásahy do mezibuněčné signalizace mohly být vhodným cílem pro nově vyvíjené antimikrobní látky

Summary

Yeast cells, when growing on solid surfaces, form multicellular structures, colonies, with a characteristic organised [morphologies](#), formed during the division of non-motile yeast cells. Organisation of yeast colonies should, therefore be ensured by signals transmitted and received by dividing cells within a colony

In this regard, the yeast colony exhibits an analogy to embryogenesis of higher organisms,

One of the characteristic attributes of multicellular organisms is their ability to emit and receive signals over long distances. Yeast colonies use for the long-range inter-colony signalling a simple volatile compound ammonia, produced by colonies in pulses. Ammonia action results in synchronisation of the development in neighbouring colonies.

The transition of colonies from acidic phase to the phase of intense ammonia production (alkali phase) is connected with intensive metabolic changes.

In this regard volatile ammonia acts as starvation signal between colonies.

If we are able to influence cell communication for example by new antibiotics, we would protect ourselves against several mycoses.

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému školiteli, panu Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi za zajímavé téma diplomové práce a cenné připomínky a návrhy k jejímu vypracování.

Poděkování patří samozřejmě paní prof. PhDr. Zdeně Pálkové, CSc. a celému vědeckému týmu „Yeast colony group“ za poskytnutí informací o buněčné signalizaci existující mezi buňkami kvasinkových kolonií, trpělivý přístup k výuce metodiky průkazu signalizace kolonií kvasinek a za demonstrování pokusu týkajícího se této problematiky.

Zde bych chtěla zvláště zdůraznit, že mi vědecký tým poskytl řadu výsledků, k nimž dospěl a dal mi laskavý souhlas k použití těchto informací v mé práci. Tyto informace se týkají změn v metabolismu, expresi genů a celkových změn kvasinkových buněk v průběhu signalizace. Výsledky byly pořízeny pomocí molekulárně-biologických metod a jejich zveřejnění pomůže čtenáři pochopit lépe celý proces signalizace buněk kvasinkových kolonií.

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY KANDIDÓZY	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. PERIODICKÝ RŮST KVASINKOVÝCH KOLONIÍ.....	9
2.2. KOLONIE KVASINEK PRODUKUJÍ CHEMICKÉ SIGNÁLY V PULSECH	10
2.3. SYNCHRONIZACE KOLONIÍ POD VLIVEM SIGNÁLŮ AMONIAKU.....	11
2.4. ZDROJE AMONIAKU	12
2.5. VLIV AMINOKYSELIN.....	13
2.6. FORMY PRODUKCE AMONIAKU	13
2.7. ROLE SIGNÁLŮ AMONIAKU PRO DLOUHODOBÉ PŘEŽÍVÁNÍ KOLONIÍ	14
2.8. ZMĚNY METABOLISMU PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE.....	15
2.9. ALKALICKÁ FÁZE	16
2.10. AMONIAK a pH.....	16
3. METODICKÁ A EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1. SYNCHRONIZACE RŮSTU A VÝVOJE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ MEZIBUNĚČNÉ SIGNALIZACE „QUORUM SENSING“	19
3.2. KVANTIFIKACE VYDÁVANÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU.....	21
3.3. REZISTENCE BUNĚK K METHYLAMONIU	22
3.4. SCHOPNOST SYNCHRONIZACE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ OBDRŽENÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU.....	23
3.5. SCHOPNOST KOLONIÍ CANDIDA MOGII MĚNIT STRUKTURU A MORFOLOGII SVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ OBDRŽENÉHO SIGNÁLU AMONIAKU.....	24

4. VÝSLEDKY POKUSŮ	24
4.1 MEZIBUNĚČNÁ SIGNALIZACE	24
4.2. STAVY BUNĚK PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE	25
4.3. PRŮBĚH ZMĚN V KVASINKOVÝCH BUŇKÁCH PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE	27
4.4. SYNCHRONIZACE DRUHÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU OBŘÍ KOLONIE CANDIDA MOGII.....	28
4.5. AMONIAK JE ZODPOVĚDNÝ ZA SYNCHRONIZACI RŮSTU	30
4.6. SYNCHRONIZACE VÝVOJE KVASINKOVÝCH KOLONÍ VYKAZUJE UNIVERZÁLNÍ CHARAKTER	34
5. DISKUSE.....	35
6. ZÁVĚR	41
7. DOPLŇKOVÉ INFORMACE A PŘÍLOHY	43
7.1. VÝVOJOVÉ FÁZE KVASINKOVÝCH KOLONÍ	43
7.2. TRANSPORTNÍ SYSTÉM AMONIAKU.....	43
7.3. DALŠÍ PROTEINY ZAPOJENÉ DO PŘENOSU AMONIAKU	44
7.4 ZMĚNY V ENERGETICKÉM STAVU BUNĚK ZAHRNÚJÍCÍ ZMĚNY V MITOCHONDRIÁLNÍCH FUNKCÍ A ZMĚNY V PRŮBĚHU CITRÁTOVÉHO CYKLU	45
7.5. STRUKTURA KOLONIE A MORFOLOGIE BUNĚK CANDIDA MOGII A ZMĚNY DOPROVÁZEJÍCÍ PŘECHOD KOLONÍ Z KYSELÉ RŮSTOVÉ DO KLIDOVÉ ALKALICKÉ FÁZE PRODUKCE AMONIAKU.	47
8. SEZNAM TABULEK A VYOBRAZENÍ	50
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY KANDIDÓZY

Předpokládá se, že 25 % všech lidí trpících rozličnými příznaky, jako jsou deprese, bolesti hlavy bez zjevného důvodu, senná rýma, těžké či dlouhotrvající akné, alergické reakce, bolesti v krku, afty, vaginální pálení a výtoky, časté záněty močového měchýře, opakované ušní infekce, zapomnětlivost, nadýmání žaludku, chronický průjem nebo zácpa, astma, výkyvy nálad, letargie nebo menstruační problémy, spojuje fakt, že postižení mají v těle přemnožené kvasinky typu *Candida albicans*.

Candida albicans je kvasinka, která žije na površích (kůže, sliznice) lidského těla, která kolonizuje již od okamžiku narození. Za normálního stavu existuje rovnováha mezi obrannými mechanismy a kvasinkami, která vyúsťuje do komenzálního stavu. Avšak za určitých okolností, například pokud je oslabena nebo narušena imunita, jako je užívání antibiotik, kortikosteroidů a hormonů, se mohou kvasinky přemnožit. Jakmile k tomu dojde, vymknou se imunitnímu dohledu. Přemnožení kandidy potom může vyvolávat nejrůznější patofyziologické stavy a příznaky, které jsou nezřídka špatně diagnostikovatelné, a tudíž mohou oddálit včasné zahájení účinné terapie.

Aby léčba kandidózy byla úspěšná, měla by být komplexní a zahrnovat více léčebných postupů. Např. pokud je onemocnění výsledkem užívání antibiotik, je důležité obnovit přirozenou střevní mikroflóru a posílit imunitní systém. Velkým problémem bohužel je, že úspěšná léčba klade na pacienta mnoho nároků. Jednak může být léčba dlouhodobá, někdy i finančně náročná, mnohdy z důvodu dřívějšího špatného indikování je neúčinná a v neposlední řadě může rovněž negativně ovlivnit pacientovo zdraví, neboť některá antimykotika mají řadu toxických vedlejších účinků, pokud jsou podávána celkově. Právě z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum a vývoj nových potenciálně účinných přípravků, které mají rozličný cíl zásahu.

Dlouhou dobu panovalo obecné mínění, že kvasinky, stejně jako bakterie, žijí bez výjimky jako jednobuněčné mikroorganismy. Toto tvrzení, vzniklé podle postulátů jednoho ze zakladatelů mikrobiologie R. Kocha, bylo podloženo studiem čistých kultur. Průlom těmto informacím učinil před devatenácti lety Shapiro v časopise *Scientific American*. Jeho článek představoval především nejrůznější vzorce chování a organizace buněčné diferenciaci v koloniích některých bakterií. Od roku 1998 se začíná uvažovat o principu mnohobuněčnosti jednobuněčných organismů.

U nás se touto myšlenkou již léta zabývá vědecký tým pod vedením doc. Z. Palkové na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, kde probíhá intenzivní výzkum kvasinkových kolonií, zejména signalizačních systémů sestávajícího se z produkce látek zvaných „quorum sensing“. Poznání a pochopení těchto látek a toho jak fungují by v budoucnu mohlo přispět k nalezení odpovědi na otázky, jež si klade celá řada lékařů, odborníků a vědeckých pracovníků, a které se týkají především chování kvasinek a jejich kolonií v různých situacích.

Kvasinky rostoucí na pevném povrchu vytvářejí mnohobuněčné, pouhým okem viditelné útvary zvané kolonie, s charakteristicky organizovanou morfologií, která vzniká dělením nepohyblivých kvasinkových buněk. Pro vývoj takových kolonií je nezbytná mezibuněčná komunikace založená na signalizaci. Organizace kvasinkových kolonií vyžaduje jak schopnost buněk signály vysílat, tak i přijímat. Vysílání a příjem signálů umožňuje koordinovaně reagovat na vnější podněty, které jsou důležité pro růst a přežití.

Kvasinkové kolonie využívají pro komunikaci mezi koloniemi jednoduchou plynnou látku, čpavek (amoniak), který kolonie produkují v pulsech. Vlivem amoniaku sousední kolonie synchronisují svůj vývoj a v případě kolonií kvasinky *Candida mogii* paralelně dochází k výrazným změnám v morfologii buněk a tím i v morfologii kolonií. Pro pulsní produkci amoniaku, zdá se, hraje významnou roli příjem aminokyselin z prostředí a jejich metabolismus. Přejít kolonií z kyselé fáze do fáze intenzivní produkce amoniaku (alkalická fáze) je spojen s výraznými změnami metabolismu buněk kolonií.

Do budoucna by zásahy do mezibuněčné signalizace mohly být vhodným cílem pro nově vyvíjené antimikrobní látky.

Proč by účinná terapie nemohla být mířena jen na kolonie nacházející se na lehce dostupných místech? Tyto kolonie, samy na ústupu, by pak vysílaly vlivem antimykotik takové signály, které by vedly k indukci apoptózy u sousedních kolonií.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Téměř dvě století panoval mezi mikrobiology názor, že mikroorganismy existují prakticky výhradně jen jako jednobuněčné primitivní formy života, jejichž schopnost komunikovat s vnějším okolím je velmi omezená. Tento názor se utvářel od dob formulování Kochových postulátů až po dnešní dobu (Gershon, 2000), kdy probíhá intenzivní výzkum doposud neprobádaných oblastí mikrosvěta. Laboratorní podmínky, za jakých je většina mikroorganismů zkoumána, nám nemohou nikdy nahradit přirozené podmínky, v nichž se tyto organismy vyskytují v přírodě. Přesto nám v tomto případě umožní alespoň částečně poznat vztahy, které panují v kolonii kvasinek. Cílem práce je demonstrovat na koloniích kvasinek, že i takovéto jednoduché formy života spolu dokáží navzájem komunikovat a tak ovlivňovat růst a vývoj svých kolonií v závislosti na okolních faktorech.

Primárně je třeba si uvědomit, že pro kvasinku je sama o sobě výhodnější z hlediska přežití tvorba kolonií než samostatná existence. Toto tvrzení je podepřeno například vznikem bakteriálních biofilmů, struktur, jež velmi dobře odolávají antibiotikům.

Kolonie kvasinek mají schopnost produkovat četné signály řídící vývoj dalších kvasinkových buněk uvnitř kolonie. Intenzivním výzkumem bylo zjištěno, že jednotlivé druhy kandid mohou měnit strukturu a morfologii svých kolonií podle toho, jak se mění podmínky v jejich okolí. Schopnost adaptace umožňuje četným druhům kandid osídlit a kolonizovat hostitelskou tkáň. Právě invazivní růst v tkáních hostitele je považován za faktor virulence.

2.1. PERIODICKÝ RŮST KVASINKOVÝCH KOLONIÍ

Každý žijící organismus roste, vyvíjí se a adaptuje se svému okolí v souladu se svými „biologickými hodinami“, pod jejichž kontrolou spouští další mechanismy důležité pro svou existenci. Bylo zjištěno, že biologické hodiny, jež jsou zodpovědné za genovou expresi a aktivaci řady enzymů v životně důležitých metabolických drahách, jsou ve většině případů regulovány vnějšími faktory (teplotou, světlem atd.).

Růstové periody mají buď podobu oscilující křivky a nebo se dají přirovnat ke tvaru přesýpacích hodin (Rensing a kol., 2001). Růstové periody organismů, jejichž růst osciluje mezi jednotlivými obdobími, trvají vždy stejný časový úsek. Podle délky

trvání periody rozlišujeme tři kategorie cyklů: ultradiální (kratší než jeden den), cirkadiální (trvá právě jeden den) a infradiální (delší než jeden den). Naproti tomu, periody tvaru přesýpacích hodin mají dobu trvání přizpůsobenou aktuálním podmínkám. Touto periodou prochází většina organismů během svého dospívání a vývoje. Samozřejmě, že ve většině případů se oba typy růstových period doplňují.

Teprve nejnovější výzkum objevil signály, jimiž mikroorganismy dokáží komunikovat mezi sebou samými a se svým okolím. Signály mohou mít různý charakter od chemické povahy až po vizuální podobu. Velmi důležitý signál produkovaný mikroorganismy, jehož prostřednictvím synchronizují svůj růst a vývoj, je znám již u bakterií a nazýváme ho quorum senzory. Quorum senzorké látky ovlivňují jednotlivé buňky tak, že jim umožní identifikovat populační hustotu buněk v okolí a přizpůsobit svůj růst do míst, kde nedochází ke konkurenci o živiny (Miller a Bassler, 2001). Signály na delší vzdálenost nejsou tedy výhradně záležitostí mnohobuněčných organismů, ale jejich objevení v mikrosvětě inspirovalo již řadu výzkumných projektů. Dnes je již známa signalizace mezi koloniemi bakterií za použití ultrazvuku (Matsushashi a kol., 1995) a signalizace mezi koloniemi kvasinek pomocí jednoduché chemické sloučeniny (Pálková a kol., 1997).

2.2. KOLONIE KVASINEK PRODUKUJÍ CHEMICKÉ SIGNÁLY V PULSECH

Počáteční studie chování kolonií kvasinek odhalily existenci načasovaných period, během nichž dochází ke změnám pH v okolí kolonií a pravidelnému střídání kyselé fáze s fází alkalickou. Na agaru se tak lze pozorovat směrované zóny. Vznik těchto zón naznačuje možnost určité komunikace mezi individuálními koloniemi

Molekula zodpovědná za přechod z kyselé do zásadité fáze byla intenzivně prozkoumána a navzdory původním předpokladům bylo zjištěno, že se ve skutečnosti jedná o těkavou molekulu amoniaku, signálu majícího schopnost působit na delší vzdálenost mezi různými koloniemi. Jeho role se definitivně potvrdila tím, když se jedna z partnerských kolonií substituovala amoniakem a indukovala tak tvorbu této molekuly u druhé kolonie, která se objevila jako směrovaná alkalická zóna kolem kolonie.

Časové měření prokázalo, že výdej amoniaku produkují kvasinkové kolonie v pulsech odpovídajícím změnám pH kolem rostoucích kolonií. První puls vypouští buňka krátce po vyočkování kmene a ukazuje se, že tento signál má pouze orientační charakter. Rychle po něm dochází k opětovné acidifikaci vnějšího prostředí buňky. Druhý puls je vydán s výrazně větší intenzitou a je již přímo směřován sousedním koloniím, jejichž růst by měl být následkem toho směřován do míst, kde nedochází k takové konkurenci o živiny.

Toto chování je zřejmě universální všem druhům kvasinek a u jednotlivých druhů se liší v načasování výdeje pulsů amoniaku (Pálková a kol., 1997).

Ani druhý puls však není konečný. Kolonie mohou v průběhu svého vývoje opět vstoupit do druhé acidické fáze, na jejímž konci dojde opět ke třetímu signálu amoniaku (Pálková a Forstová, 2000). Celkový počet vydaných signálů tak závisí na rozloze plochy, kde kolonie rostou a na nabídce živin.

2.3. SYNCHRONIZACE KOLONIÍ POD VLIVEM SIGNÁLŮ AMONIAKU

Přepínání z kyselé do alkalické fáze za pomoci produkce amoniaku jako odpovědi na přicházející signály z okolí bylo předmětem několikaletého výzkumu. Zjistilo se, že produkce amoniaku může být v jednotlivých koloniích indukována buď příjmem molekul amoniaku od sousedních kolonií, nebo tato látka může být do média dodávána uměle. Příjmové buňky pak mají schopnost spustit svou vlastní tvorbu těchto signálních molekul.

Díky této schopnosti dochází po čase k synchronizaci růstu sousedních kolonií a jejich dalšího vývoje. Produkce amoniaku je spojena s intenzivními změnami v metabolismu buněk a jedná se o děj velmi rychlý, trvající řádově jen několik hodin. Výsledkem je přestavba metabolických drah a inhibice růstu. Jestliže koncentrace amoniaku v okolí klesá, dochází opět k rapidním změnám, organismus se navrácí k původnímu stavu a začíná opětovný růst v další kyselé fázi vývoje (Palková a Forstová, 2000).

Synchronizace růstu není jen otázka kolonií stejného stáří, ale bylo zjištěno, že i kolonie nacházející se v různých stádiích svého vývoje posléze přizpůsobí své cykly

okolí a zesynchronizují svůj růst. Nachází-li se jedna kolonie před vstupem do alkalické fáze, ostatní v jejím okolí se jí pod vlivem prvního signálu rychle přizpůsobují, čímž indukují svou vlastní tvorbu amoniaku a signál se tak zesiluje.

Dosavadní výzkum dokazuje, že schopnost produkovat amoniak jako signální molekulu je společná všem druhům kvasinek. Kolonie *Candida mogii* mají však ještě jednu pozoruhodnou vlastnost. U tohoto druhu je produkce amoniaku navíc spojena s intenzivními změnami ve struktuře a morfologii kolonií, tudíž je jednoduše pozorovatelné, v jaké fázi se buňky právě nachází.

Zesilování produkce amoniaku jako odpověď na přijímané signály umožňuje nově rostoucím koloniím směřovat růst do míst, kde je ještě dostatek živin a kde o ně nemusí soutěžit s ostatními koloniemi. Výhodné vlastnosti molekuly amoniaku, především její schopnost volně difundovat a rozptylovat se v okolí přímo předurčují její roli jako signální molekuly.

2.4. ZDROJE AMONIAKU

Zdroje amoniaku jsou v zásadě dva :

1. amoniak dodávaný buňkám z jejich bezprostředního okolí, a který buňka přijme zvenčí
2. amoniak vzniklý při katabolických dějích a transaminací aminokyselin, tedy vlastní

Ke studiu způsobu, jímž dochází k příjmu amoniaku do buňky, byly použity kolonie *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledky studií prokázaly, že za příjem této molekuly jsou zodpovědné tři membránové transportéry: permeázy Mep1p, Mep2p a Mep3p (Marini a kol., 1994, 1997). Tyto permeázy transportují amoniak a jeho analog dovnitř kvasinkových buněk, přičemž dochází k výdeji draselných kationů jako antiportu.

Další pozorování potvrdila domněnku, že produkce amoniaku není úplně závislá na jeho příjmu z okolí. Jsou-li do média přidávány molekuly amoniaku, žádné změny tím vyvolány nejsou. Změny koncentrace amoniaku v agaru tedy nejsou zodpovědné za jeho produkci koloniemi rostoucími na tomto agaru. Ani buňky mající určitý defekt v transportérech se výrazněji nelišily produkcí amoniaku od buněk normálních.

Závěrem je tedy nutno říci, že buněčná signalizace není ovlivňována změnami v koncentraci přijímaného amoniaku (Zikanová a kol, 2002).

2.5. VLIV AMINOKYSELIN

Paralelní studie analýzy chování kvasinkových kolonií na různých médiích ukázaly, že směrované zóny kolem kolonií se netvoří na médiu bez přídavku aminokyselin. Kolonie rostoucí na tomto médiu nedokáží amoniak produkovat v pulsech a nemohou tak inhibovat růst. Po delší době kultivace docházelo k prorůstání kolonií. Dodání aminokyselin do minimálního média mělo za následek obnovení tvorby amoniaku a růstové inhibice mezi partnerskými koloniemi. Tento fakt potvrdil názor, že inhibice růstu mezi kvasinkovými koloniemi je aktivním procesem, nejen důsledkem pouhého vyčerpání živin.

Podobně se již na normálním médiu, tj. obsahujícím aminokyseliny, chovaly kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, které ztratily schopnost aminokyseliny využít.

2.6. FORMY PRODUKCE AMONIAKU

Signalizační systém kvasinkových kolonií se skládá ze dvou mechanismů: jedním z nich je přestavba buněčného metabolismu, jež vede ke tvorbě a vydávání molekul amoniaku, druhý mechanismus pak zahrnuje příjem amoniakálního signálu buňkou sousední, v níž pak dochází k týmž metabolickým změnám.

Amoniak se nachází ve dvou formách, jako neprotonizovaná forma NH_3 a jeho protonizovaný analog NH_4^+ . Celkový poměr obou sloučenin závisí na aktuálním pH a obě formy se liší ve schopnosti penetrovat biologické membrány. Zatímco kationt NH_4^+ může být transportován do buněk pouze za použití specifických transportérů proteinové povahy, neprotonizovaná forma NH_3 může difundovat volně skrz fosfolipidovou membránu.

Za výdej amoniaku do okolí jsou zodpovědné proteiny plazmatické membrány, zahrnující Rhe proteiny (jež současně slouží i k příjmu těchto molekul) a Ato proteiny (zodpovídající za výdej amoniaku) (Palková a kol., 2000).

Expresi Ato proteinu řídí indukovatelné ATO geny, které jsou zapínány těsně před spuštěním druhého pulsu amoniaku (Palková a kol., 2002).

Jednoduché mutace v těchto genech jsou slučitelné se životem a neprojevují se ve fenotypu (Costanzo a kol., 2000). Na druhou stranu, schopnost produkovat amoniak je výrazně snížena u kolonií *Saccharomyces cerevisiae*, jímž chybí některé ATO geny (Palková a kol., 2002).

Tvrzení, že tvorba amoniaku je kódována ATO geny, bylo doloženo experimentálně pokusem, kdy u buněk nacházejících se v alkalické fázi byla objevena zvýšená exprese Ato genů.

Schopnost produkovat amoniak závisí také na extracelulárním pH (zejména na koncentraci vodíkových protonů). Výdej amoniaku prostřednictvím Ato proteinů je zprostředkován současným příjmem vodíkových protonů, jedná se tedy o antipody NH_4^+/H^+ (Palková a kol., 2002).

Amoniak tedy může opouštět buňku ve dvou formách. V prvním případě neprotonovaná forma volně prostupuje membránou bez pomoci membránových transportérů. Druhý případ však již existenci specifických transportérů vyžaduje, jejich činností dochází pak k aktivnímu transportu NH_4^+ výměnou za H^+ , v okolí buňky se tak zvýší pH, což umožní konverzi NH_4^+ na těkavý NH_3 a ten je pak uvolněn do okolí.



2.7. ROLE SIGNÁLŮ AMONIAKU PRO DLOUHODOBÉ PŘEŽÍVÁNÍ KOLONIÍ

Směřované zóny kolem jednotlivých kolonií se objevují již během několika prvních týdnů vývoje. Orientované zóny vznikají nejen mezi tzv. monokoloniemi (kolonie vzniklé z jedné buňky), ale i mezi tzv. obřími koloniemi (vzniklými z buněčné suspenze). Oba typy, jak monokolonie tak i obří kolonie, vykazují organizovanou strukturu. Navíc bylo prokázáno, že tvorba směrovaných zón je společná všem druhům kvasinek (včetně nepříbuzných druhů). Jednotlivé druhy se liší pouze časovým průběhem pulzů (Palková a kol., 1997).

Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* rostoucí za standardních podmínek na GM médiu, přicházejí do acidické fáze po vydání prvního krátkého signálu amoniaku (trvajícím maximálně jeden den). Druhý signál amoniaku je vydán okolo desátého dne

vývoje. Koncentrace amoniaku prudce stoupá následující dva dny, kdy opět následuje druhá acidická fáze (Meunier a Choder, 1999). V tomto období již dochází pouze k velmi pozvolnému růstu koncentrace a celkový počet buněk se již nezvětšuje. Kolonie vstupují do stacionární fáze. Bylo však prokázáno, že buňky mohou opět naprogramovat svůj metabolismus (Pálková a kol., 2000).

2.8. ZMĚNY METABOLISMU PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE

Přepnutí z kyselé do alkalické fáze je doprovázeno změnami v metabolismu buňky, mezi něž patří změny v metabolismu aminokyselin, dochází rovněž k výrazně odlišnému průběhu mitochondriální oxidativní fosforylace a degradačních procesů během citrátového cyklu. Ve zvýšené míře se exprimují peroxisomy a četné enzymy.

První molekuly NH_4^+ opouštějící buňku pocházejí právě z degradace aminokyselin, zejména z jejich deaminace.

V kyselé fázi se v buňce mnohonásobně zvyšuje aktivita mitochondrií, v nichž probíhá intenzivní respirace a přechodem do alkalické fáze se tato aktivita postupně snižuje vypínáním exprese genů kódujících mitochondriální funkce.

Změny v průběhu citrátového cyklu jsou mnohem komplikovanější. Enzymy, jako mitochondriální citrátsyntáza (tvoří citrát a CoA z oxalacetátu a acetylCoA) a metylisocitrátlyaza (konvertuje citrát a sukcinát na glyoxalát) jsou v aktivovaném stavu, zatímco isocitrátdehydrogenáza a -ketoglutarátdehydrogenáza jsou deaktivovány. Tyto změny byly již prozkoumány u bakterií a nazvány jako glyoxalátový cyklus (Cozzone, 1998).

Během této fáze Krebsova cyklu je isocitrát přeměňován přímo na glyoxylát a sukcinát enzymem isocitrátlyázou (přičemž vzniká adekvátní množství CO_2 a NADH), který se aktivuje při vstupu buněk do alkalické fáze (Pálková a kol., 2002). Pro správný průběh glyoxylátové dráhy potřebuje tedy buňka dva základní substráty, oxalacetát a acetyl-CoA. Oxalacetát přichází jako produkt metabolismu karboxylových kyselin z cytosolu pomocí speciálních transportérů (Oac1p), jejichž geny jsou indukovány na počátku alkalické fáze (Palmieri a kol., 1999).

Dalším zdrojem oxalacetátu je deaminace aminokyselin. Aby se zabránilo okyselování extracelulárního prostoru buňky, ke kterému by logicky docházelo prostřednictvím uvolňování karboxylových skupin do okolí, preferují buňky přímou reutilizaci karboxylových kyselin vznikajících deaminací aminokyselin (Pálková a kol., 2000).

Hlavním zdrojem acetyl-CoA je peroxisomální oxidace mastných kyselin. Aktivace celé řady enzymů zodpovědných za tento proces se děje na počátku alkalické fáze a produkce amoniaku. Utilizace acetyl-CoA do mitochondrií je zprostředkována carnitinacetyltransferázou, jejíž gen CAT2 je zapnut (Pálková a kol., 2002).

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že snížení mitochondriálních funkcí, k němuž dochází vstupem kolonií do alkalické fáze, je částečně nahrazováno zapnutím alternativních drah glyoxylátového cyklu, zvýšenou aktivací metabolismu mastných kyselin a počtu peroxisomů (Epstein a kol., 2001)

2.9. ALKALICKÁ FÁZE

Přechodem z kyselé do alkalické fáze se kolonie kvasinek adaptují na nepříznivé podmínky vzniklé postupným vyčerpáním živin (Palková a kol., 2002), zejména snížením aktivity svého metabolismu a do jisté míry i zastavením svého růstu a vývoje. Tím však vývoj kolonie zdaleka nekončí, organismy jsou schopny příchodem příznivějších faktorů opět přepnout svůj metabolismus do kyselé fáze (Pálková a Forstová, 2002).

Výhodné chemicko-fyzikální vlastnosti molekuly amoniaku ji přímo předurčují k důležité roli signální molekuly, varující okolní kolonie před blížícími se nepříznivými podmínkami. Kolonie, jež obdrží tento varující signál, jsou schopny vyvolat vlastní produkci amoniaku. Celkový signál se zesiluje, přičemž dochází k synchronizaci růstu sousedních kolonií.

2.10. AMONIAK a pH

Neutrální slabá báze NH_3 a jeho konjugovaná kyselina NH_4^+ se liší několika vlastnostmi, zejména nábojem a schopností prostupovat biologické membrány a ovlivňovat tak pH.

NH₃ se rozpouští v tenké vodné vrstvě nacházející se na povrchu buněk, neboť rozpustnost molekuly amoniaku ve vodě je relativně vysoká (45mM/mmHg) (Marcaggi a Coles, 2001).

Jednoduchou chemickou rovnicí dochází k protonizaci molekuly NH₃ na molekulu NH₄⁺. Poměr obou sloučenin je konstantní a je dán Henderson-Haselbachovou rovnicí:

$$\frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} [H^+] = Ka = 10^{-9.25}$$

pH	[NH ₄ ⁺]/[NH ₃]
3	1.78 × 10 ⁶
4	1.78 × 10 ⁵
5	1.78 × 10 ⁴
6	1780
7	178
8	17.8
9	1.78

pK₁ = 9,25

Tab. 1 : poměr protonizované a neprotonizované formy amoniaku při konkrétním pH (3-9)

Pro fyziologické hodnoty pH je poměr NH₃/ NH₄⁺ přibližně roven jedné. Při zvýšení pH je většina molekul amoniaku přítomna ve formě NH₄⁺

Akumulace NH₃/ NH₄⁺ na povrchu buněk vede k penetraci membrány. Schopnost membránou volně prostoupit jednoduchou difúzí má však pouze neutrální molekula NH₃. Rychlost difúze je ovlivněna řadou fyzikálních faktorů, jako je teplota, dále složení lipidové dvojvrstvy a její tloušťka (Marcaggi a Coles, 2001). Membrána, obsahující více lipofilních molekul, např. fosfatidylcholin, je pro NH₃ hůře prostupná důsledkem snížené schopnosti této molekuly rozpouštět se v tucích. Přítomnost dalších

specifických proteinů membrány, např. aquaporinů, rychlost prostupu také značně ovlivní. NH_4^+ musí být skrze lipidovou dvojvrstvu přenesena pomocí transportérů.

Konečné množství NH_3 molekul difundujících do buněk je dáno hodnotou poměru extracelulárního a intracelulárního pH.

$[\text{NH}_4^+]_i/[\text{NH}_4^+]_e$	ΔpH	
	$\text{pH}_e > \text{pH}_i$	$\text{pH}_e < \text{pH}_i$
1000	3	
100	2	
10	1	
1	$\text{pH}_e = \text{pH}_i$	
0.1		1
0.01		2
0.001		3

Tab. 2 : poměr mezi intracelulární a extracelulární hodnotou pH a vliv jeho hodnoty na množství molekul amoniaku difundujících plazmatickou membránou

Studium kolonií *Candida mogii* potvrdilo, že molekuly jiných alkálií (včetně chloridu amonného) nejsou schopny přepnout metabolismus buněk z kyselé do alkalické fáze. Chceme-li vyvolat v buňkách jejich vlastní produkci amoniaku, musíme k tomu použít opět jen molekuly plynného amoniaku, přičemž nezáleží na tom, v jaké vývojové fázi se kolonie nachází.

Kolonie, které jsou v kyselé fázi, potřebují ke svému přechodu do alkalické fáze mnohem větší množství molekul než ty, které se k přepnutí již pomalu chystají (Pálková a Forstová, 2000). Rozdíl v citlivosti kolonií na amoniak se vysvětluje tím, že kyselé prostředí kolem kolonií proponuje molekulu přicházejícího NH_3 na NH_4^+ , který schopnost indukovat vlastní tvorbu již nemá.

3. METODICKÁ A EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. SYNCHRONIZACE RŮSTU A VÝVOJE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ MEZIBUNĚČNÉ SIGNALIZACE „QUORUM SENSING“

Úkolem tohoto pokusu bylo prokázat existenci předpokládaného signalizačního systému, který poskytuje buňkám kvasinkových kolonií informace o podmínkách prostředí, ve kterém rostou, zejména o aktuálním stavu živin. Pomocí tohoto systému, schopností vydávat, přijímat a správně informovat chemické signály mohou buňky různého stáří synchronizovat svůj další růst a vývoj tak, aby se co nejlépe přizpůsobily okolním podmínkám, které ne vždy jsou pro tyto organismy výhodné.

POKUSNÉ BUŇKY

Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (α , his 3, leu 2), kmeny *Candida mogii*, *Rhodotula glutinis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces occidentalis*, *Kluyveromyces marxianus* z kolekce sbírky Přírodovědecké fakulty University Karlovy Oddělení genetiky a mikrobiologie.

ŽIVNÉ MEDIUM

GM-BKP agar :

1% kvasničný extrakt (yeast extrakt)

3% glycerol

2% agar

30 mM CaCl₂

0,01% bromkresolový purpur (indikátor pH)

STRUČNÝ POSTUP PŘÍPRAVY A PH :

na celkové množství 0,5 l média : 5 g yeast extraktu, 15 ml glycerolu, 450 ml destilované vody, 10 g agaru, 15 ml CaCl₂ (1 M), 5 ml EtOH

postup přípravy:

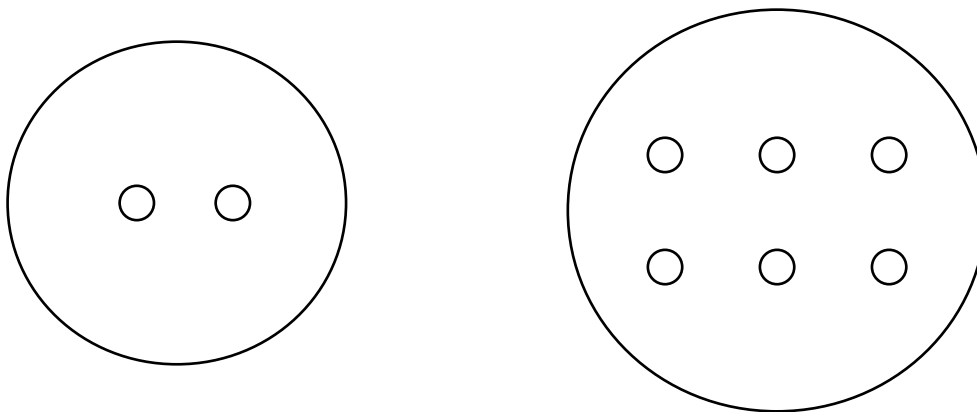
1. 10 g agaru navážíme do 500 ml Ehrlenmayerovy baňky, k agaru přidáme 15 ml glycerolu, který rozpustíme ve 430 ml destilované vody.
2. Směs dobře promícháme a zahřejeme.
3. Baňku se směsí necháme klávkovat v autoklávu při tlaku 1,21 MPa alespoň 20 min.
4. Médium se nechá zchladnout na cca 60° C.
5. Před nalitím na Petriho misky přidáme yeast extrakt, CaCl₂, bromkresolový purpur a EtOH (přičemž optimální hodnota pH je 5,0).
6. Dobře promícháme.
7. Nalité misky s médiem necháme alespoň týden vysychat.

POUŽITÝ MATERIÁL

Speciálně upravené Petriho misky (s virologickou komůrkou na víčku misky), očkovací kličky (popř. dřevěná párátka).

USPOŘÁDÁNÍ POKUSU

Ke zjištění, zda daná kolonie kvasinek vykazuje schopnost produkovat amoniak k mezibuněčné signalizaci byly do středu Petriho misky naočkovány 2 kolonie testovaného kmenu tak, aby vzdálenost mezi koloniemi byla 2 cm. K urychlení celého pokusu byly tytéž kmeny naočkovány po 6 koloniích na jednu misku. V tomto případě činila vzdálenost mezi jednotlivými koloniemi 1,5 cm (obr.1).



Obrázek 1: rozmístění očkovacích míst na médiu

K očkování se použilo 10 μl kvasinkové suspenze mléčně zkalené.

Poté se naočkované misky inkubovaly v 28°C (při inkubaci v 31°C byl zaznamenán Primárně je třeba si uvědomit, že pro kvasinku je sama o sobě výhodnější z hlediska přežití tvorba kolonií než samostatná existence. Toto tvrzení je podepřeno například vznikem bakteriálních biofilmů, struktur, jež velmi dobře odolávají antibiotikům.

narůst drobných kolonií, jež pro pozorování a celý pokus nebyly vhodné) a sledoval se vývoj amoniaku, který se projevil jako vznik fialové zóny kolem rostoucí kolonie na základě změny pH GM-BKP agaru.

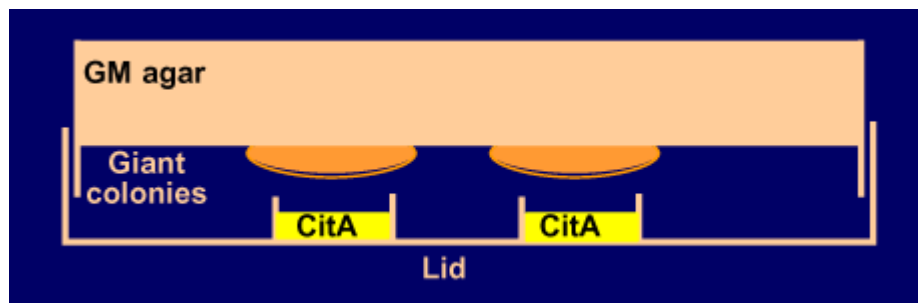
3.2. KVANTIFIKACE VYDÁVANÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU

Do středu speciálně upravené Petriho misky se naočkovaly opět dvě kolonie ve vzdálenosti 2 cm. Speciálně upravená Petriho miska (obr. 2) měla na víčku přichyceny (přilepeny) 2 virologické mističky tak, aby spočívaly přímo nad rostoucími koloniemi. Do nich bylo aplikováno 500 μl kyseliny citronové 0,5%.

Do mističek byl jímán vydávaný amoniak a v jednotlivých intervalech (viz tabulka 1) byly odebírány vzorky (100 μl vzorku + 900 μl destilované vody), v nichž bylo stanoveno množství amoniaku. Množství amoniaku bylo určeno pomocí Nesslerova činidla. Uvolňovaný amoniak reagoval s kyselinou citronovou za vzniku citronanu amonného.

Reakcí s Nesslerovým činidlem vznikalo zbarvení různé intenzity, spektrofotometricky jsme pak zjistili příslušné množství amoniaku.

V tomto pokusu nešlo o přesnou kvantifikaci amoniakálního signálu, která je závislá na mnoha vnějších faktorech a liší se v různých koloniích. Cílem bylo zjistit v jakých fázích amoniakální signalizace je produkce amoniaku nejmohutnější.



Obrázek 2: kvantifikace amoniakálního signálu

kvasinka	odběrové dny							
Saccharomyces	0 - 1	1 - 3	3 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30
Candida mogii	0 - 5	5 - 9	9 - 10	10 - 15				

Tab. 3: Pořadí a počet jednotlivých odběrů u *Saccharomyces* a *C. mogii* ke kvantifikaci amoniakálního signálu

3.3. REZISTENCE BUNĚK K METHYLAMONIU

Buňky, jež se nacházely v kyselé či alkalické fáze, byly vystaveny různým koncentracím methylamonium (0-100 mM) po dobu 1 hod. Poté byly buňky naočkovány na médium a po inkubaci bylo odečteno množství přežívajících buněk jako CFU.

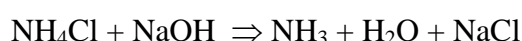
BARVENÍ NEUTRÁLNÍ ČERVENÍ

Buňky byly odebrány v různých fázích svého přechodu a obarveny pomocí 1mg/ml neutrální červeně a pozorovány pod mikroskopem.

3.4. SCHOPNOST SYNCHRONIZACE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ OBDRŽENÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU

Do malé virologické mističky na víčku Petriho misky bylo odváženo ekvimolární množství NH_4Cl a 1M NaOH (70 mg NH_4Cl a 70 μl NaOH). Tato nádobka pak byla umístěna tak, aby byla naproti ve vzdálenosti 25 mm od rostoucí kolonie. K pokusu byly použity kolonie různého stáří a v různých fázích vývoje.

V nádobce vznikl amoniak následující chemickou reakcí:

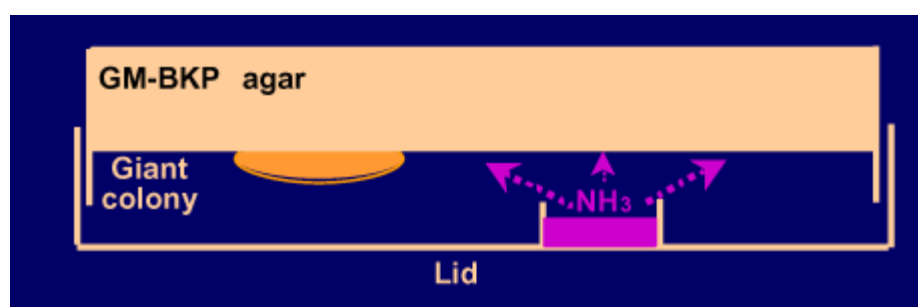


Vznikající amoniak byl uvolňován do okolní atmosféry a kolonie tak byly vystaveny rovnoměrnému působení této sloučeniny. Díky absorpci amoniaku médiem vznikl v médiu gradient o různé hodnotě pH, který byl vizualizován jako fialová barva různé intenzity díky přítomnosti indikátoru.

K dalšímu pokusu byl použit přímo amoniak, který se aplikoval do malé mističky umístěné na víčku Petriho misky tak, aby byl umístěn naproti naočkované kolonii (obr.3)

Nádobka s uvolňovaným amoniakem simulovala přítomnost partnerské kolonie, především pak přirozenou signalizaci pomocí molekul amoniaku.

Umělý amoniakální zdroj pak navodil přechod exponované kolonie z kyselé do alkalické fáze, což bylo předmětem pozorování.



Obrázek 3: umístění umělého zdroje amoniaku

3.5. SCHOPNOST KOLONIÍ CANDIDA MOGII MĚNIT STRUKTURU A MORFOLOGII SVÝCH KOLONIÍ NA ZÁKLADĚ OBDRŽENÉHO SIGNÁLU AMONIAKU

Do agaru bylo aplikováno 100 μ l 300 mM NH₄Cl a 100 μ l 300 mM NaOH v různých vzdálenostech od naočkovaných kolonií: 1,0 cm, 1,5 cm a 2,0 cm.

Difúzí těchto sloučenin vznikal v agaru opět gradient, jehož působení na rostoucí kolonie bylo opět předmětem pozorování. V jednotlivých fázích růstu kolonie byly odebírány vzorky, vždy ze středu a okraje kolonie. Buňky byly pozorovány pod mikroskopem a rozdíly v morfologii byly nafoceny.

BARVENÍ BUNĚK

Buňky kvasinkových kolonií byly obarveny pomocí diaminofenylindolu

Buňky odebrané z různých částí kolonií byly resuspendovány v 10% etanolovém roztoku diaminofenylindolu. Poté byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu v UV světle (Olympus WIG filter)

Obrázky kolonií byly pořízeny fotoaparátem Hitachi HV-C20

4. VÝSLEDKY POKUSŮ

4.1 MEZIBUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Po určité době se na GM-BKP médiu objevila kolem rostoucích kolonií fialová zóna. To znamenalo, že kolonie vstupuje do alkalické fáze a začíná signalizovat.

Fialová barva vznikala na základě změny pH média a díky přítomnosti pH indikátoru v tomto médiu.

Prokázali jsme, že signalizace byly schopny všechny testované kmeny kvasinek, přičemž časový nástup signalizace nešel zobecnit, neboť závisel na řadě faktorů. Nejvíce pak asi na složení east extraktu, který byl použit v GM-BKP agaru, dále pak

na teplotě inkubace, počtu dalších kolonií na médiu (čím větší počet kolonií jsme na agar vyočkovali, tím rychleji signalizace nastala).

V různých časových intervalech byl pozorován vývoj signalizace jednotlivých kolonií a změny zachyceny pomocí fotoaparátu.

4.2. STAVY BUNĚK PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE

Kvasinková buňka, jež pod vlivem obdržného signálu přechází z růstové fáze do fáze klidové, kdy vylučuje amoniak, prochází šesti mezistádií. Tento pokus byl prováděn na buňkách obřích kolonií *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Pálková a kol., 1997). Byly sledovány dva fyziologické markery, na základě kterých byl celý přechod z kyselé do alkalické fáze rozdělen do 6 stádií: 1. pozměněná afinita buněčných vakuol k neutrálnímu červenému barvivu u buněk v různých vývojových stádiích, 2. změny v intracelulární koncentraci aminokyselin a jejich rozdílná distribuce mezi cytoplasmou a vakuolami. Intracelulární komponenty buněk v kyselé fázi neměly afinitu k neutrální červení, a proto zůstaly neobarvené (pod mikroskopem tedy nebyly viditelné žádné červené útvary). Přechodem do alkalické fáze se pod mikroskopem postupně začaly objevovat uvnitř buněk malé červené útvary, jejichž pH bylo nižší než okolní cytoplasma, což umožnilo, aby mohly být obarveny. Počet těchto vezikul se zvyšoval s rostoucí produkcí amoniaku. V konečné fázi byly již viditelné velké červené vakuoly uvnitř každé buňky. Intracelulární pool aminokyselin se snižoval ve 3. stadiu a v 5. a 6. stadiu opět vzrůstal, zatímco cytoplasmatická zásoba zůstala po celou dobu téměř nezměněna.

Důležité bylo také zjistit, jakým způsobem přechod z růstové do klidové fáze ovlivňuje genovou expresi. K tomu dopomohla izolace RNA z kolonií rostoucích na GM-BKP médiu. RNA byla izolována z buněk různých vývojových stádií: 1. z kolonií v „plné“ kyselé fázi, 2. z kolonií, jež byly na konci kyselé fáze, 3. z „neutrálních“ kolonií, 4. z kolonií vstupujících do alkalické fáze, 5. z kolonií počínajících produkovat amoniak a 6. z kolonií v plně alkalické fázi, kdy prostor mezi koloniemi byl zabarven intenzivně fialově.

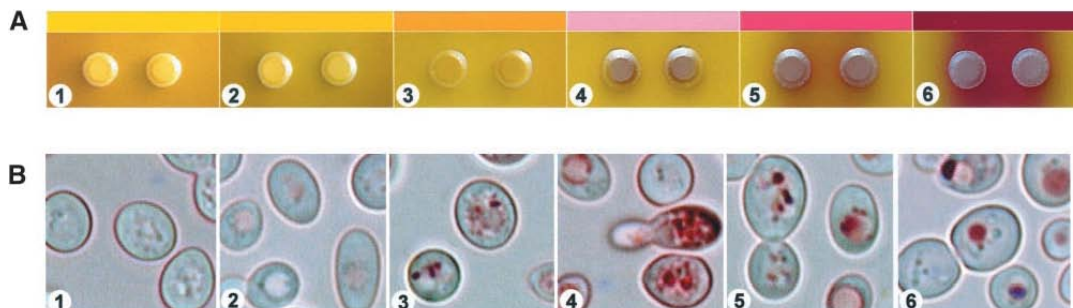
Bylo provedeno cca 5885 testů více než 200 genů a zjišťovaly se signifikantní změny v jejich expresi alespoň v jedné z šesti fází přechodu.

Celou analýzu ztěžovala skutečnost, že u většiny zkoumaných buněk nešlo jednoznačně určit, o které vývojové stádium se jedná. Ačkoli se totiž buňky navenek jeví jako klidové, jsou neustále „připraveny“ reprogramovat svůj metabolismus a zahájit tak opět růst. (Meunier a Choder, 1999).

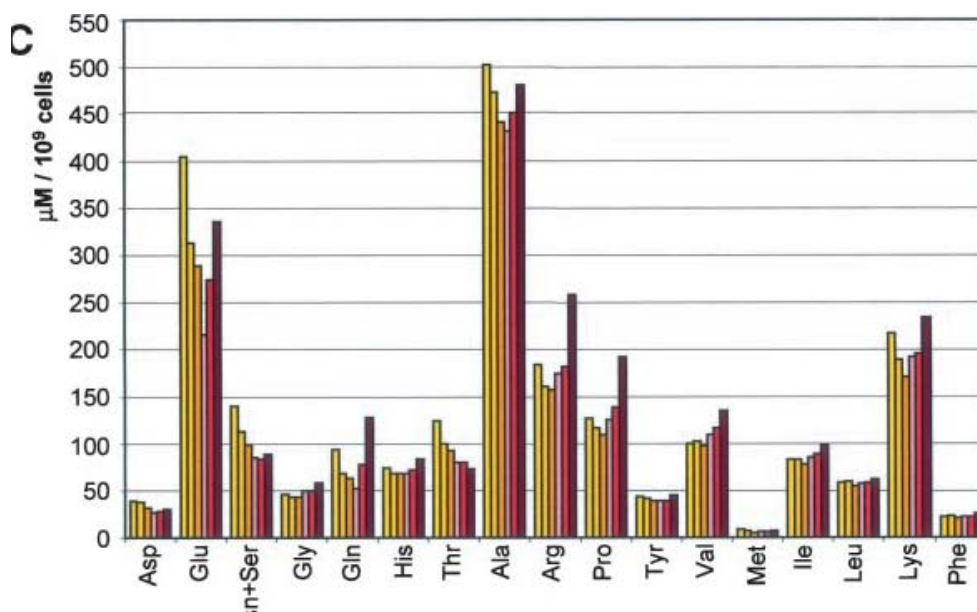
K důkazu, že analyzované geny byly skutečně odpovědné za amoniakální produkci nebo za přechod z kyselé do alkalické fáze, byly analyzovány kolonie s určitými delekcemi v genomu. Byly srovnávány amoniakální fáze normálních kolonií a mutantních kolonií. Ačkoli všechny kolonie, včetně mutantních, dokázaly zahájit přechod z kyselé do alkalické fáze, úspěšně signalizovat začaly jen kolonie s normálním genomem.

To potvrdilo závěr, že mutace v genech odpovědných za amoniakální signalizaci vedou k defektnímu signalizačnímu systému buněk, jak ve smyslu kvantity signálů, tak i ve kvalitě vydávaných signálů.

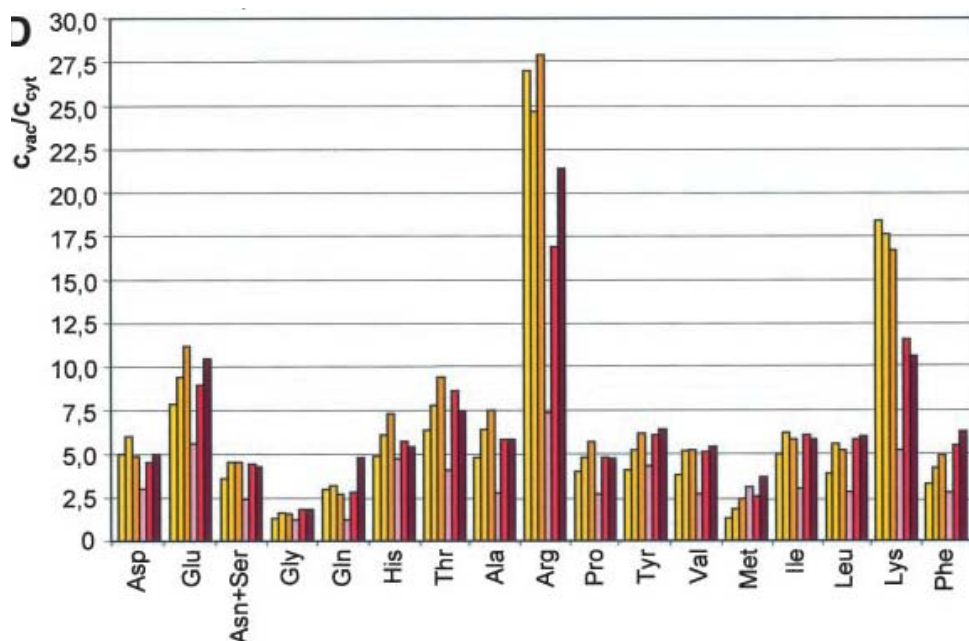
4.3. PRŮBĚH ZMĚN V KVASINKOVÝCH BUŇKÁCH PŘI PŘECHODU Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE



Obrázek 4: Fáze 1 (stáří 7 dní), 2 (9 dní), 3 (10 dní), 4 (10,5 dne), 5 (11 dní), 6 (12 dní) znázorňují změny pH okolí buněk během přechodu kyselá/alkalická fáze.



Obrázek 5: Změny v intracelulární koncentraci jednotlivých aminokyselin během fáze 1-6 přechodu



Obrázek 6: Změny v poměru koncentrací jednotlivých aminokyselin ve vakuolách a v cytoplazmě během fáze 1-6 přechodu

4.4. SYNCHRONIZACE DRUHÉHO AMONIAKÁLNÍHO SIGNÁLU OBŘÍ KOLONIE *CANDIDA MOGII*

Sedm kmenů obřích kolonií *Candida mogii* bylo současně inokulováno do sedmi misek s GM-BKP agarem a paralelně inkubováno se sedmi nenaočkovanými miskami s tímto médiem při 28°C. (Obr.1)

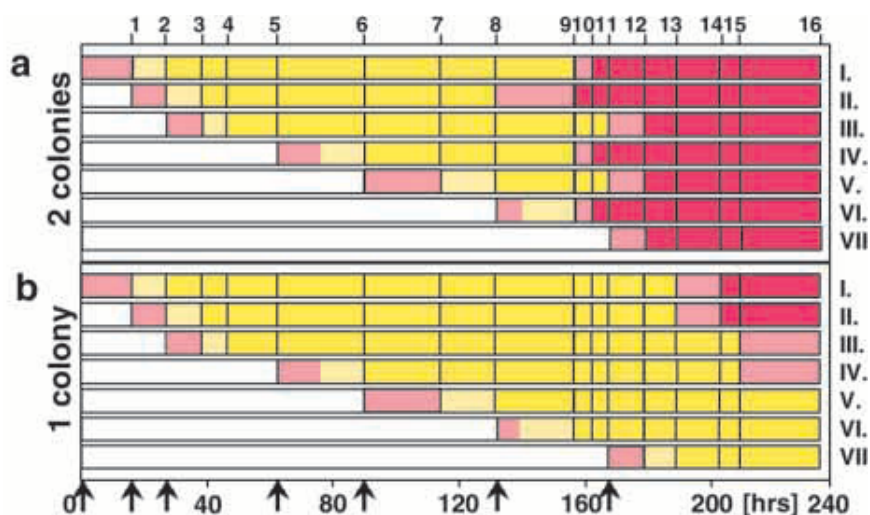
Po inkubaci byly naočkovány nové kolonie, a to buď vedle obřích kolonií, nebo na dosud nenaočkované misky. Všechny nově rostoucí kolonie vydaly svůj první amoniakální signál téměř bezprostředně po inokulaci. První amoniakální puls kolonie vydaly nezávisle na vývojovém stádiu své sousední obří kolonie. Ale již druhý signál a přechod mladých kolonií do druhé alkalické fáze byl značně ovlivněn vývojovým stadiem starších sousedních kolonií.

Jestliže byla nová kolonie očkovaná vedle staré, která se nacházela v kyselé fázi před druhým amoniakálním pulsem, tato mladá kolonie byla ihned po vydání prvního slabého orientačního signálu amoniaku schopna plynule přejít do fáze kyselé a druhý signál byl již vydán oběma koloniemi současně. Jestliže ale byla nová kolonie inokulována vedle staré, jež právě vstupovala do druhé alkalické fáze, byla kyselé fáze

rostoucí nové kolonie zcela eliminována a nová kolonie byla ihned schopna odpovědět na přijatý signál amoniaku svou vlastní mohutnou a již orientovanou produkcí amoniaku.

Po indukování amoniakální produkce nových kolonií byl potlačen jejich vlastní růst a expanze do okolí starších obřích kolonií. Jako kontrola posloužily prázdné misky, kde naočkovaná nová kolonie rostla obvyklým tempem a jejich signalizační systém nebyl nijak ovlivněn, tzn. byly přítomny všechny fáze signalizace, jež buňky kolonie vydávají za běžných podmínek.

Výsledek tohoto pokusu tedy dokázal, že jednotlivé kolonie *C. mogii* mohou přizpůsobit svůj růstový a vývojový cyklus signálům, které obdrží od svých „starších soukmenovců“.



Obrázek 7: Změny pH okolí rostoucích kvasinkových kolonií v různých vývojových stádiích

A Změna pH u nově rostoucí solitární kolonie

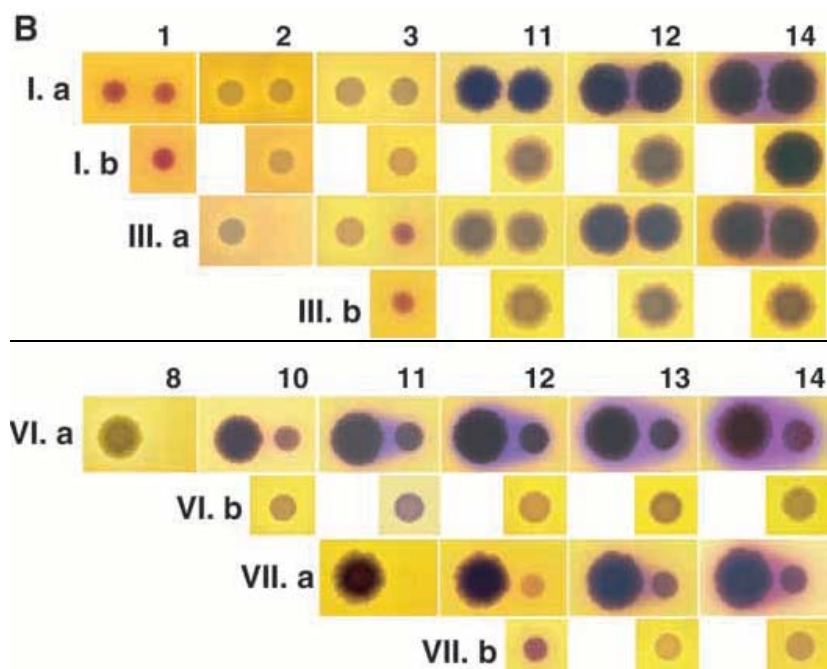
B Změna pH mezi nově naočkovanou kolonií a starší kolonií

Změny indikátoru bromkresolového purpuru: žlutá (pH=5.2) – fialová (6,8)
Barevně je vyznačen průběh vývoje kolonií: žlutá – kyselá fáze, fialová – alkalická fáze

Římské číslice v pravé části grafu znázorňují, že bylo provedeno celkem sedm očkování

Obr. B : snímky různých vývojových stadií kolonie *C. mogii* z grafu na obr. A

Starší kolonie byla naočkovávána v čase 0, šipky v dolní části grafu znázorňují různé doby, kdy došlo k dalšímu očkovaní nové kolonie.

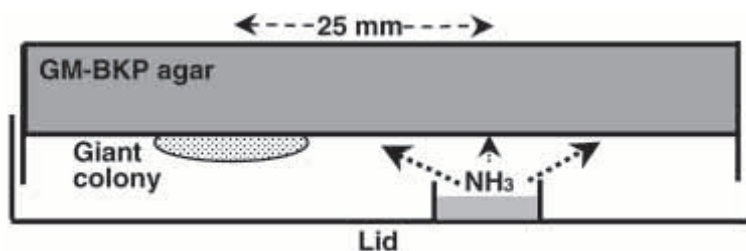


4.5. AMONIAK JE ZODPOVĚDNÝ ZA SYNCHRONIZACI RŮSTU

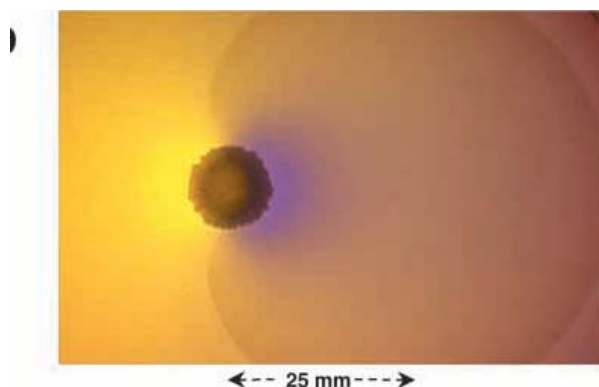
Cílem pokusu bylo zjistit, zda je možné vyvolat druhý amoniakální signál u kolonií *Candida mogii* různého stáří pomocí umělého zdroje amoniaku umístěného do blízkosti těchto kolonií. (viz obr.2). Potřebovali jsme zjistit, co je vlastně zodpovědné za vyvolání signálu. Jestli neutrální molekula amoniaku, amonný kationt či zda i jiná alkalická sloučenina může do vývoje kolonií významně zasáhnout.

Do blízkosti kolonie nacházející se v kyselé růstové fázi byl tedy umístěn zdroj NH_4Cl nebo NaOH tak, aby tyto sloučeniny vytvořily různý koncentrační gradient prostupující živným médiem. Poté byl pozorován účinek na kolonie.

Pozorováním bylo zjištěno, že pouze samotný koncentrační gradient amoniaku NH_3 (z umělého zdroje) je schopen vyvolat přechod kolonií z kyselé do alkalické fáze, zatímco samotné sloučeniny NH_4Cl nebo NaOH tento přechod indukovat nemohou.



Obrázek 8: Umístění umělého zdroje amoniaku do blízkosti kolonie



Obrázek 9: Fotografie pořízená 18 hodin po umístění zdroje amoniaku vedle 3 dny staré kolonie 3 nacházející se původně v kyselé fázi

Obří kolonie *Candida mogii* dokáží měnit strukturu a morfologii svých kolonií podle stádia vývoje, ve kterém se právě nacházejí.

Bylo prokázáno, že morfologie kvasinkových kolonií se dramaticky mění vstupem do druhé alkalické fáze navozené buď umělým zdrojem amoniaku, nebo přirozenou signalizací sousední kolonie.

V kyselé fázi mají kolonie relativně hladký povrch. Přechodem do alkalické fáze začínáme na povrchu rozeznávat určitou hrubší strukturu. Když kolonie vstupuje do fáze, kdy začíná svou vlastní produkci amoniaku, získají kolonie podobu drobných slabších či silnějších vláček podobných špagetám. Tato strukturální změna je doménou celé kolonie a doprovází tak přechod buněk od formy invazivní k formě neinvazivní.

Pomocí obarvení jader jednotlivých buněk kolonií, bylo dokázáno, že v alkalické fázi se buňky kolonií ani nedělí a ani dále nezvětšují hranice svých kolonií.

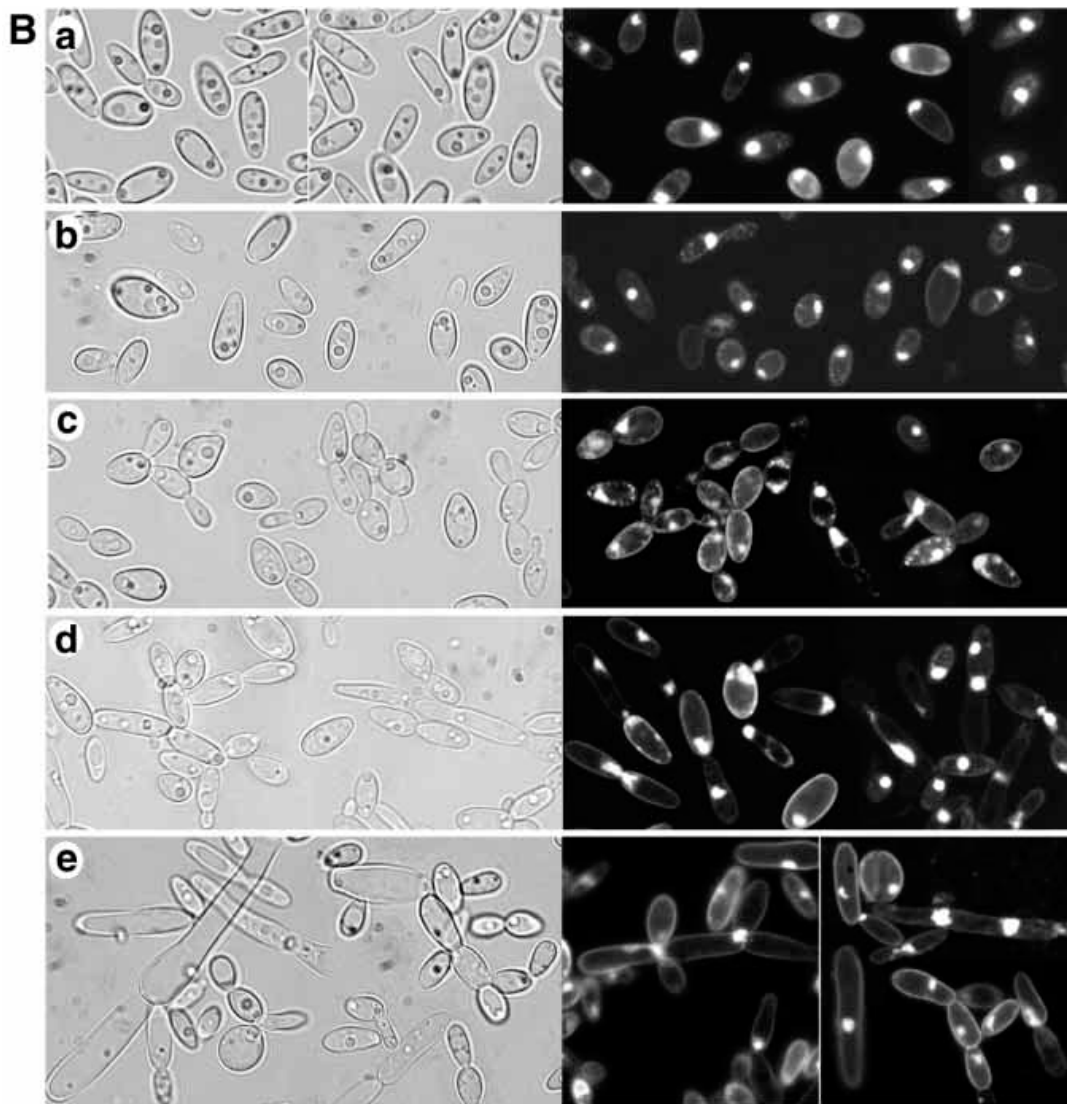
Odstraněním zdroje amoniaku jednotlivé kolonie byly schopny vstoupit do kyselé fáze a opět začít růst. Tento přechod byl opět doprovázen výraznou změnou v morfologii a vláčková podoba kolonie po čase zmizela. Kolonie znovu získaly hladký povrch. Po

proběhnutí druhé kyselé fáze se buňky nacházející se nejbližší zdroji amoniaku, ať již umělému či přirozenému od partnerské kolonie, připravily k druhému amoniakálnímu signálu. Tuto změnu následovalo ihned přeskupení povrchu kolonie opět do podoby vláček. Tato změna již nevykazovala symetrii a díky tomu tvar kolonií byl nepravidelný.

Abychom lépe odhalili dobu, kdy se buňky přestanou dělit, pozorovali jsme buňky na okrajích kolonií, které jsou jako první vystaveny signálům a začínají tak sami produkovat amoniak. Žádná z těchto buněk se nenacházela ve stádiu mitózy, buňky měly kulatý či oválný tvar a převážně se nacházely ve formě kvasinek. Ve stejnou dobu byly odebrány buňky nacházející se na opačné straně kolonie. U nich byla prokázána vláčková struktura tvořená hyfami a pseudohyfami. O dva dny později, když do alkalické fáze vstoupily již všechny buňky v kolonii, u převážné většiny pozorovaných buněk bylo vidět strukturu kvasinek a žádné stádium mitózy. O další den později, kdy začala vláčková struktura postupně mizet, bylo mikroskopicky zaznamenány známky dělení buněk (přesto některé buňky měly ještě podobu kvasinek). Šestý den se opětovně začaly formovat pseudohyfy a o tři dny později byly již kompletně zformovány hyfy a kolonie postupně zřívověly. Další kyselá fáze již nenásledovala.



Obrázek 10: Buňky kolonie *C. mogii* izolované z části kolonie, jež nebyla pod vlivem amoniakálního signálu.



Obrázek 11: Buňky kolonie *C. mogii* izolované z části kolonie, jež byla vystavena působení amoniakálního signálu.

Snímky buněk byly pořízeny ihned po indukci přechodu, tj. v čase 0 (a), po 2 dnech (b), po 3 dnech (c), po 6 dnech (d), po 9 dnech (e).

Zvětšení : 1500krát

V levé části jsou snímky ze světelného mikroskopu, v pravé pak vidíme obrázky získané z fluorescenčního mikroskopu po obarvení buněk diaminofenylindolem.

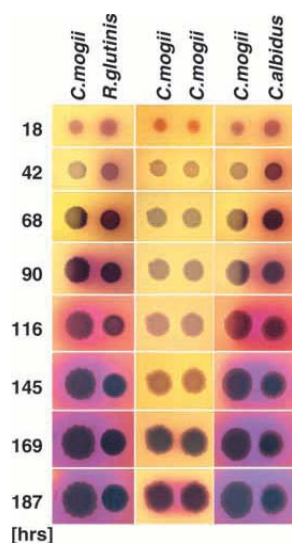
4.6. SYNCHRONIZACE VÝVOJE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ VYKAZUJE UNIVERZÁLNÍ CHARAKTER

Předmětem tohoto pokusu bylo zjistit, zda-li mezibuněčná signalizace pomocí amoniaku je doménou i jiných druhů kvasinek. K pokusu byly použity dvě obří kolonie *Candida mogii*, *Rhodotula glutinis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* a *Saccharomyces occidentalis*.

Bylo prokázáno, že kolonie *R. glutinis* a *C. albicans* poskytují první signál amoniaku mnohem vyšší intenzity než kolonie *C. mogii*. Navíc oba druhy, jak *R. glutinis*, tak i *C. albicans* dokáží indukovat tvorbu amoniaku u kolonií *C. mogii*.

Indukce amoniakální fáze byla vyzkoušena na uvedených druzích kvasinek a vždy byla úspěšně vyvolána. To jen potvrdilo domněnku, že indukce alkalické fáze je universální fenomén mnoha druhů kvasinek. Jednotlivé druhy se však odlišují časovým průběhem těchto fází. Kolonie *K. marxianus* vstupují do alkalické fáze daleko dříve po naočkování ve srovnání s koloniemi *C. mogii*, u kterých, ale coby partnerská kolonie, vyvolávají produkci amoniaku dříve, než jsou-li tytéž kolonie *C. mogii* vystaveny působení uměle navozené signalizace, nebo signalizace od svých partnerských kolonií *C. mogii*.

Na základě tohoto pokusu se dá předpokládat existence amoniakální mezibuněčné signalizace i u dalších druhů kvasinek, zejména pak u druhů patogenních.



Obrázek 12: Indukce amoniakální produkce a synchronizace vývoje obřích kolonií u různých druhů kvasinek.

Kolonie *C. mogii*, *Cr. albidus* a *R. glutinis* byly naočkovány na médium v čase 0 a zobrazené fotografie byly pořízeny v čase uvedeném vlevo na grafu

5. DISKUSE

Experimentálně byla prokázána existence mezibuněčné signalizace u kolonií různých druhů kvasinek. Rozhodujícím činitelem odpovědným za tuto signalizaci je molekula amoniaku, která díky ideálním vlastnostem, zejména rozpustností ve vodě a schopností dobře difundovat do okolí, je vhodná ke komunikaci na delší vzdálenosti mezi jednotlivými buňkami.

Amoniakální signalizaci používají kvasinkové kolonie k předávání informací o stavu prostředí, kde rostou, především o zdroji živin a velikosti prostoru, což jsou základní podmínky nezbytné pro správný a optimální vývoj kolonie.

Než-li vstoupí buňka do alkalické fáze a začne produkovat vlastní signál, kterým je již zmíněná molekula amoniaku, prochází její metabolismus radikálními změnami. Tato metabolická změna je děj velmi rychlý, obvykle trvající jen několik hodin. Buňka zapíná „šetřící“ metabolické dráhy, čímž vlastně reaguje na postupné vyčerpávání zdroje živin a také na ubývání životního prostoru v důsledku přítomnosti dalších kolonií, jejichž buňky reagují obdobně.

Kolonie zastaví svůj růst do míst s nedostatkem živin, případně rozšiřují své hranice směrem, kde ještě žádné jiné kolonie nerostou. Dochází tak k určité synchronizaci růstu a vývoje všech kolonií rostoucích na médiu bez ohledu na jejich stáří.

Produkce amoniaku a vlastní signalizace je vyvolána buď nedostatkem živin a dalšími spolupůsobícími „stresovými“ faktory, nebo je indukována na základě příjmu amoniakálního signálu od starší partnerské kolonie rostoucí v bezprostředním okolí.

Intenzita a rychlost uvolňování amoniakální produkce (kterou jsme schopni vizualizovat díky přítomnosti indikátoru bromkresolového purpuru přidávaného do média) stoupala s rostoucí velikostí a počtem kolonií, které se nacházely v okolí signalizující kolonie. To jen potvrdilo myšlenku, že velikost signálu je úměrná nepříznivému faktoru, který ji vyvolává (Pálková, 1997). Vznikla tak hypotéza „ping-pongové“ odpovědi buněk dostávající signály amoniaku: molekula amoniaku

uvolňovaná signalizujícími koloniemi těká do okolního prostoru a difunduje médiiem, čímž je rozpoznávána buňkami sousedních kolonií. Ty jsou pak podněcovány k přeměně metabolických drah a vlastní produkci molekul amoniaku, která bývá zpravidla větší než produkce buněk, které začaly signalizovat jako první. Tento mechanismus napomáhá vysvětlit rychlý, narůstající a především orientovaný směr šíření signálu mezi dvěma (či více) sousedícími kvasinkovými koloniemi.

Pozorováním bylo také zjištěno, že první amoniakální puls, jež je buňkami kolonie vydán krátce po inokulaci na živné médium, má charakter pouze orientační, není nijak ovlivněn stupněm vývoje starší partnerské kolonie v sousedství. To jen utvrdilo závěr učiněný na základě předchozích pokusů, že první amoniakální signál není závislý na složení média a počtu dalších kolonií v okolí a buňky ho vydají vždy téměř ve stejnou dobu nezávisle na okolních podmínkách. Předpokládá se, že tento první amoniakální puls má svůj původ v přeměně proteinů nebo/a v aktivaci buněčných zásob aminokyselin.

Jestliže na témže médiu rostou společně kolonie různého stáří nacházející se v různých fázích vývoje, dochází po určitém čase k jevu, jež by se dal nazvat růstovou synchronizací sousedních kolonií. Kolonie těch druhů kvasinek, jež vstoupí do druhé fáze amoniakální produkce, působí pomocí svých signálů na sousední kolonie, u nichž indukují jejich vlastní tvorbu signálů. Tím vlastně synchronizují jejich růst spolu s vlastním. Dále se zjistilo, že buňky nacházející se v alkalické amoniakální fázi neprodělávají mitózu a nejsou tedy schopny podílet se na růstu celé kolonie. Tento jev patří k univerzálním vlastnostem buněk kvasinkových kolonií bez ohledu na taxonomický druh kvasinky.

Přechod buněk kolonií *C. mogii* z kyselé růstové fáze do fáze alkalické může být vyvolán pomocí umělého zdroje amoniaku a dávka potřebná k tomuto přechodu závisí na vývojové fázi kolonie. Intenzivně rostoucí kolonie (nacházející se v „kyselé“ fázi vývoje) potřebují daleko větší množství molekul amoniaku k zahájení vlastní tvorby, než kolonie, které jsou uvnitř první alkalické fáze nebo kolonie již se chystající spustit druhou alkalickou fází. Tento efekt se dá vysvětlit na základě protonizace přicházející molekuly amoniaku, ke které dochází v kyselém prostředí. Vzniklá molekula NH_4^+ totiž neprosteoupí buněčnou membránou, a tak buňky neobdrží žádný signál.

Hypotézu o tom, že aktivní molekulou způsobující indukci signalizace je neutrální (neprotionizovaný) amoniak potvrdily výzkumy, kdy k rostoucím koloniím byly aplikovány chemické sloučeniny NH_4Cl a NaOH . Jejich postupné šíření médiem tvořilo gradient o různé intenzitě těchto látek. Ale žádný efekt na buňky nebyl zaznamenán.

Již v r. 1983 bylo potvrzeno, že neprotionizovaný amoniak (NH_3) dokáže prostupovat biologické membrány prostou difúzí (Bolognez a kol., 1983).

Navíc kolonie *Candida mogii* disponují ještě jednou pozoruhodnou vlastností. Přejít z kyselé do alkalické fáze je spjat se změnami v morfologii celé kolonie a s intenzivní strukturální přestavbou, zahrnující změnu podoby povrchu celé kolonie z hladké (tvořené pseudohyfy) na „špagetovitou“. Tento děj je reversibilní a buňky se po ukončení signalizace opět navrací do rostoucího stádia, přičemž ztrácejí vláknitkovou podobu a povrch kolonie je opět hladký. Kolonie tak podle stavu živin v médiu přepínají svůj metabolismus z „šetřící“ alkalické fáze do růstové kyselá fáze a naopak, přičemž jejich růst se orientuje do volného prostoru.

Popsaný mechanismus mezibuněčné signalizace kvasinkových kolonií přibližuje chování těchto primitivních jednobuněčných forem života mnohobuněčným organismům, které se vyvíjejí právě kooperací jednotlivých buněk na základě signalizačního systému.

Molekula amoniaku představuje díky svým vlastnostem ideální signalizační molekulu v přirozených podmínkách. Díky schopnosti kvasinek přijímat tento signál a velmi rychle vyhodnotit informaci, kterou tato molekula nese, spustit vlastní produkci a předat tak signál dál, dokáží buňky kvasinkových kolonií synchronizovat svůj růst a vývoj, což pro ně představuje důležitou výhodu z hlediska dlouhodobějšího přežití.

REGULACE PŘECHODU BUNĚK KVASINKOVÝCH KOLONIÍ Z KYSELÉ DO ALKALICKÉ FÁZE

Změny v metabolismu a chování buněk kvasinkových kolonií v průběhu přechodu z kyselá růstové fáze do klidové alkalické fáze poukazuje na skutečnost, že existují alespoň dva kontrolní body řídící tyto změny.

První kontrolní bod zodpovídá za „rozhodnutí“ buňky spustit řetězec změn spojených s konverzí metabolismu a produkcí amoniaku jako signální molekuly.

Druhý bod kontroluje již samotnou tvorbu amoniaku, jeho uvolňování z buňky a šíření do okolí.

Aktivace řady genů zapojených do metabolismu aminokyselin (fáze 1 a 2), signifikantní změny v intracelulárních buněčných zásobách aminokyselin, zvýšená schopnost přijímat aminokyseliny z okolí a produkovat amoniak poukazuje na fakt, že pro „rozhodnutí“ buňky konvertovat svůj metabolismus a zahájit přechod z kyselé do alkalické fáze, je důležitá deplece aminokyselin v živném médiu, která samotnou indukci přechodu podporuje.

UVOLŇOVÁNÍ AMONIAKU

Aktivace řady enzymů katabolizujících aminokyseliny vede k výraznému snížení nitrobuněčného poolu aminokyselin, jež je představován četnými drobnými vakuolami. Tento poznatek byl získán při pozorování úbytku těchto vakuol, ke kterému dochází v alkalické fázi. To podpořilo domněnku, že amoniak uvolňovaný v průběhu alkalické fáze pochází z aminokyselin.

Dodnes však nemůžeme s jistotou říci, zda je amoniak z buněk uvolňován ve formě neprotonizované (a schopné tedy přímé difúze skrz membránu bez přítomnosti transportního proteinu) nebo zda je uvolňovaný amoniak ve formě NH_4^+ .

Na druhou stranu víme, že dochází k určitému snížení extracelulárního poměru $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, což znamená, že těkavý NH_3 je v jisté míře uvoňován z buněk do okolí. Jelikož je tato chemická sloučenina ve vyšších koncentracích toxická, rozbíhá se intenzivní exprese genů pro permeázy štěpící amoniak pravděpodobně ihned po té, kdy začne buňka vydávat detekovatelné množství amoniaku.

Časná aktivace transportérů protonů do buněk, spolu s represí genů kódujících H^+ ATPázu plazmatické membrány (vylučující vodíkový proton z buněk), je s největší pravděpodobností zodpovědná za snížení extracelulárního pH, acidifikaci cytoplazmy a z toho vyplývající depolarizaci plazmatické membrány.

Provedená pozorování potvrzují myšlenku, že za transport amoniaku ven z buněk u kolonií *Saccharomyces cerevisiae* odpovídají Ato proteiny. Geny pro tyto proteiny se začínají přepisovat při vstupu buněk do alkalické fáze a jejich zapnutí je spojeno se zvýšením celkové produkce amoniaku. Jejich delece vede opět ke snížení amoniakální produkce. Další zajímavý poznatek je, že hodnota pH kolem 4 podporuje vydávání

amoniakálního signálu po zhruba 20 minutové inkubaci při 28°C, zatímco při pH 7,0 je produkce snížena. Buňky s vysokou expresí ATO genů se stávají více rezistentními ke škodlivému působení toxického analogu amoniaku – methylamonia.

Tyto výsledky pokusů vedly jednoznačně k závěru, že Ato proteiny *Saccharomyces cerevisiae* se uplatňují v antiportu NH_4^+/H^+ , vylučující tak amonné kationy ven z buňky spolu s příjmem vodíkových protonů do nitra buňky, čímž se snižuje hodnota pH okolí.

POSTUPNÁ METABOLICKÁ ALTERACE U BUNĚK VSTUPUJÍCÍCH DO ALKALICKÉ FÁZE

Jelikož buňka přechodem do alkalické fáze zastavuje svůj růst a vývoj z důvodu postupného vyčerpávání živin, je pro ní nezbytné přizpůsobit těmto poměrům svůj metabolismus.

Mezi „radikální“ změny patří aktivace metabolismu aminokyselin, zvýšený příjem karboxylových kyselin do cytoplazmy, transport oxalacetátu do mitochondrií, represe mitochondriální oxidativní fosforylace a enzymů účastnících se citrátového cyklu. Tyto změny jsou v mnohém podobné metabolickým změnám známým již u bakterií jako glyoxylátová dráha (Cozzone, 1998). Tato alternativní metabolická dráha umožňuje acetylCoA (vznikající z acetátu nebo z mastných kyselin) a oxalacetát přeměnit přímo na isocitrát, který je konvertován na glyoxylát a sukcinát enzymem isocitrátlyázou, klíčovým enzymem tohoto děje. Glyoxylátová dráha je jediná možná varianta přímého využití acetylCoA jako živiny pro růst u mikroorganismů (Cozzone, 1998).

U kvasinkových kolonií hraje glyoxylátová dráha zajisté stejnou roli představuje tak pro buňky pravděpodobně jedinou možnost na přežití za ztížených podmínek, kdy dochází zdroj živin.

Mezi první změnu v metabolismu zahajovanou současně se vstupem do alkalické fáze patří utilizace karboxylových kyselin, které jsou získávány z metabolismu aminokyselin přímou deaminací. Tento děj zodpovídá také za první uvolnění amoniaku. Díky tomu dojde bezprostředně po zahájení přechodu z kyselé do alkalické fáze k výraznému snížení intracelulárních zásob aminokyselin. Karboxylový skelet je metabolizován na oxalacetát, jež je za pomoci specifického transportéru Oac1 přenesen z cytosolu do mitochondrií (k dalšímu využití) a acetylCoA.

V pozdější fázi přechodu je aktivována β -oxidace mastných kyselin, která slouží coby další zdroj acetylCoA. V téže době dochází k výrazné translaci genů pro mitochondriální citrátsyntázu a isocitrátlyázu. Paralelní aktivace enzymu aspartátaminotransferázy poukazuje na propojení produkce oxalacetátu s opětovnou biosyntézou aminokyselin, jež je důležitá pro znovuoobnovení zásob aminokyselin v buněčných vakuolách.

Všechny uvedené poznatky tak směřují k závěru, že amoniak uvolňovaný buňkami kvasinkových kolonií slouží jako tzv. „alarmující“ signál, který má podávat informaci sousedním buňkám o postupném vyčerpávání zdroje živin. Schopnost těkavé molekuly amoniaku indukovat jeho tvorbu u buňky, jež signál přijímá, umožňuje tento signál potencovat a směřovat růst a další vývoj buněk do míst s vhodnějšími podmínkami.

6. ZÁVĚR

Výsledky provedených pokusů jednoznačně potvrdily existenci mezibuněčné signalizace mezi testovanými kvasinkovými koloniemi, jejímž původcem je molekula amoniaku. Potvrdilo se, že právě molekula amoniaku je vhodná díky svým chemickým vlastnostem pro komunikaci kolonií i na delší vzdálenost.

Amoniakální signalizaci používají kvasinkové kolonie k předávání informací o stavu prostředí, kde rostou, především o zdroji živin a velikosti prostoru, což jsou základní podmínky nezbytné pro správný a optimální vývoj kolonie.

Dalším pozorováním a pokusy bylo prokázáno, že produkce amoniaku a vlastní signalizace je vyvolána buď nedostatkem živin a dalšími spolupůsobícími „stresovými“ faktory, nebo je indukována na základě příjmu amoniakálního signálu od starší partnerské kolonie rostoucí v bezprostředním okolí.

Intenzita a rychlost uvolňování amoniakální produkce, již je možno vizualizovat díky přítomnosti indikátoru bromkresolového purpuru přidávaného do média, stoupá s rostoucí velikostí a počtem kolonií, které se nacházejí v okolí signalizující kolonie.

Další zajímavý jev, který byl zjištěn několika nezávislými pokusy, je, že výdej amoniaku, tj. vlastní signalizace, má pulsní charakter. To znamená, že první amoniakální puls je pouze orientační a účinný je až druhý amoniakální puls, který je mnohonásobně silnější a dá se považovat za vlastní signál.

Jestliže na témže médiu rostou společně kolonie různého stáří nacházející se v různých fázích vývoje, dochází po určitém čase k jevu, jenž je možno nazvat růstovou synchronizací sousedních kolonií

Kolonie, jež vstoupí do druhé fáze amoniakální produkce, působí pomocí svých signálů na sousední kolonie, u nichž indukují jejich vlastní tvorbu signálů. Tím v podstatě synchronizují jejich růst spolu s vlastním. Tento jev patří k universálním vlastnostem buněk kolonií těch druhů kvasinek, jež žijí ve volné přírodě a nejsou patogenní. Zda-li totéž můžeme předpokládat i u patogenních druhů, může být předmětem dalšího pozorování a pokusů.

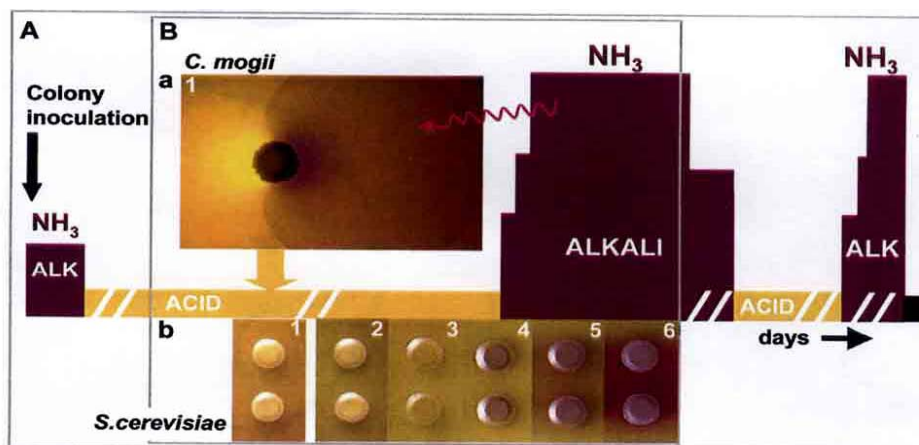
Kolonie *Candida mogii* disponují ještě jednou pozoruhodnou vlastností, jež se dá s výhodou využít v současné mikrobiologické praxi. Přechod z kyselé do alkalické fáze je spjat se změnami v morfologii celé kolonie a s intenzivní strukturální přestavbou, zahrnující změnu podoby povrchu celé kolonie z hladké (tvořené pseudohyfy) na „špagetovitou“. Tento děj je reversibilní a buňky se po ukončení signalizace opět navracejí do rostoucího stádia, přičemž ztrácejí vláčkovitou podobu a povrch kolonie je opět hladký.

Na základě četných cílených pokusů byla domněnka o existenci mezibuněčné komunikace mezi buňkami kvasinek v kolonii i mezi koloniemi navzájem potvrzena. Díky tomu víme, že buňky jsou schopny předávat si informace o stavu okolí, zejména o přítomnosti živin či naopak různých stresových faktorů. Na základě přijímaných informací jsou pak tyto kolonie schopny přizpůsobit svůj růst do míst s výhodnějšími podmínkami a zastavit tak expanzi tam, kde se jsou živiny již vyčerpány.

Tento jev lze prakticky využít tak, že jestliže navodíme vnějším zásahem nepříznivé podmínky pro růst a množení u jedné kolonie, ta je pak s největší pravděpodobností předá postupně dalším koloniím. Čili můžeme uvažovat o zefektivnění testování nových potenciálně účinných antimykotik nebo o mnohem menší intenzitě terapie, která nebude příliš zatěžovat pacienta.

7. DOPLŇKOVÉ INFORMACE A PŘÍLOHY

7.1. VÝVOJOVÉ FÁZE KVASINKOVÝCH KOLONIÍ



Obrázek 13: Vývojové fáze

A : schéma vývoje kvasinkové kolonie z hlediska mezibuněčné signalizace

B : detailní zobrazení tranzice kolonií *Saccharomyces cerevisiae* z kyselé do alkalické amoniakální fáze

a : možnost indukce amoniakální produkce u kolonie *Candida mogii* pomocí umělého zdroje amoniaku, tato kolonie se nacházela původně v kyselé fázi vývoje (Pálková a Forstová, 2000)

b : jednotlivé fáze přechodu z kyselé do alkalické fáze (druhý amoniakální puls) popsané doc. Pálkovou

7.2. TRANSPORTNÍ SYSTÉM AMONIAKU

K nejrychleji a nejmohutněji zapínaným genům během první alkalické fáze buňky patří tři geny, jež kódují tři transmembránové Ato proteiny. Dva z nich, Ynr002p a Ycr010p, vykazují značnou homogenitu ve složení aminokyselin (78%). Třetí, Ydr384p je homologii pouze z 38%.

Jednoduché mutace v těchto genech jsou slučitelné se životem a neovlivňují viditelně genotyp buněk. Amoniakální produkce těchto buněk, nesoucí určité mutace v těchto genech, je však ovlivněna, a to zejména v druhé fázi amoniakální produkce, kdy tyto buňky uvolňují mnohem menší množství molekul amoniaku než buňky s normálním genomem.

Jelikož je známo, že množství uvolněného amoniaku roste s rostoucím pH v okolí kolonie, musela být vyloučena možnost, že geny kódující proteiny Ynr002p, Ycr010p a Ydr384p ovlivňují přednostně extracelulární pH a produkce amoniaku je pouze důsledek tohoto jevu.

Buňky kolonií nacházející se v odlišných stádiích, byly exponovány identické hodnotě pH okolí a byla u nich sledována produkce amoniaku. Bylo zjištěno, že buňky ve stádiu 6 (tedy v plně rozvinuté alkalické fázi a s plně aktivovanou genovou expresí proteinů Ynr002p, Ycr010p a Ydr384p) produkují větší množství amoniaku, než buňky analyzované ve stádiu 2.

Tímto pokusem se tedy dokázalo, že produkce amoniaku nezávisí pouze na okolním pH, ale také na stupni exprese genů kódujících Ato proteiny, jež se podílí na transportu molekul amoniaku ven z kvasinkové buňky.

Aby mohla být role Ato proteinů jako transportních činitelů potvrzena, zjišťovala se schopnost transportovat toxický analog amoniaku, methylamonium, ven z buňky po předchozí expozici této sloučenině. Bylo zjištěno, že buňky s aktivovanými geny pro Ato proteiny mají větší schopnost přežít působení této jedovaté molekuly díky své schopnosti transportovat ji ven z intracelulárního prostoru. Buňky, jež se nachází v kyselé fázi a mají geny pro Ato proteiny deaktivované nebo jen částečně aktivované mají 5krát nižší šanci přežít expozici methylamonia.

7.3. DALŠÍ PROTEINY ZAPOJENÉ DO PŘENOSU AMONIAKU

Již během 1. a 2. fáze konverze buňky jsou aktivovány geny kódující tři permeázy plazmatické membrány, YLR004c, YOL119c, YOR306c, které jsou s největší pravděpodobností zapojeny do transportu karboxylových kyselin, který je aktivován. Tato skutečnost dokazuje fakt, že utilizace karboxylových kyselin je v prvních fázích

přechodu spjata s metabolismem aminokyselin. Karboxylové kyseliny mohou být metabolisovány zapojením enzymů účastnících se dějů v glyoxylátovém cyklu.

Expres rozličných genů kódujících permeázy plazmatické membrány, transportující různé ionty a pravděpodobně se podílející na ovlivnění extracelulárního pH či elektrické polaritě plazmatické membrány, je také výrazně změněna.

Geny kódující permeázy pro přenos sulfátové skupiny (SUL1, SUL2) a zinečnatých kationů (ZRT1) jsou aktivovány ve fázích 1 nebo 2. Geny pro permeázy přenášející fosfátovou skupinu se aktivují během fází 2 nebo 3. Naproti tomu ve fázi 4, kdy již můžeme s jistotou detekovat první molekuly amoniaku, se vypíná expres genů PMA1 a PMA2, genů kódujících membránovou ATPázu zodpovědnou za transport vodíkových kationů. Tím je vysvětlená snížená schopnost buněk vylučovat protony a snižovat tak extracelulární pH během fáze 4.

7.4 ZMĚNY V ENERGETICKÉM STAVU BUNĚK Zahrnující změny v MITOCHONDRIÁLNÍCH FUNKCÍCH A ZMĚNY V PRŮBĚHU CITRÁTOVÉHO CYKLU

Vypínání genů, jejichž produkty jsou funkčně spjaté se správným průběhem mitochondriální oxidativní fosforylace, začíná brzy po zahájení přechodu buněk z kyselé do alkalické fáze a tato represe je plně dokončena ve fázi 5 až 6. Produkty těchto genů jsou enzymy účastnící se přenosu elektronů v komplexech I – IV, enzym ATPsyntáza, transportéry fosfátové funkční skupiny skrze mitochondriální membránu, proteiny zodpovědné za import do mitochondriální matrix a poriny vnější mitochondriální membrány spjaté s NADH influxem do buněk. Všechny výše uvedené enzymy a proteiny jsou během alkalické fáze v represi.

To má za následek rapidní snížení buněčné respirace, jež probíhá právě v mitochondriích.

Během fáze 3 a 4 se začínají postupně vypínat i geny kódující enzymy citrátového cyklu současně s geny pro transport ADP/ATP.

Snížení mitochondriálních funkcí se s největší pravděpodobností děje za účelem šetření energií a tudíž se začínají aktivovat méně energeticky náročné alternativní metabolické dráhy.

Během fáze 1-2 je zapínán gen OAC1 zodpovědný za přenos oxalacetátu z cytoplazmy dovnitř mitochondrií. Spolu s ním se aktivují geny kódující proteiny metabolismu aminokyselin. Jedním z enzymů citrátového cyklu, jehož aktivita se v průběhu alkalické fáze spíše zvyšuje, je citrátsyntáza (využívá oxalacetát a acetylCoA, z nichž tvoří citrát a CoA, tvorba citrátu se tedy děje v mitochondriální matrix, z tohoto důvodu nemůže citrát efektivně vstupovat do citrátového cyklu ve fázi 5 a 6).

Spolu s aktivací citrátsyntázy se aktivuje 2-methylisocitrátlyáza, konvertující citrát na sukcinát a glyoxalát. Mezi další aktivované geny patří geny kódující dvě mitochondriální aldehyddehydrogenázy katalyzující oxidaci acetaldehydu na acetát, při tomto ději se regeneruje NADH.

Další metabolické změny se týkají peroxisomálních funkcí β -oxidace mastných kyselin. Geny pro enzymy zapojené do produkce acetylCoA v peroxisomech a v transportu mastných kyselin přes peroxisomální membránu jsou aktivovány v průběhu 3 a 4 fáze přechodu. Z toho vyplývá skutečnost, že alternativní zásoby živin, jako jsou mastné kyseliny, jsou mobilizovány během fáze, kdy buňka vyloučí první detekovatelné množství amoniaku. Z nich je pak tvořen acetylCoA potřebný pro další děje. Aby mohl být acetylCoA využit mitochondriální citrátsyntázou, musí být transportován z peroxisomů do mitochondriální matrix. To se děje na základě aktivace genu pro CAT2 pro carnitin O-acetyltransferázu.

7.5. STRUKTURA KOLONIE A MORFOLOGIE BUNĚK CANDIDA MOGII A ZMĚNY DOPROVÁZEJÍCÍ PŘECHOD KOLONIÍ Z KYSELÉ RŮSTOVÉ DO KLIDOVÉ ALKALICKÉ FÁZE PRODUKCE AMONIAKU.

Obr. 14

A : indukce obří kolonie zdrojem amoniaku, který byl umístěn v pravé části od rostoucí kolonie (b)

Zvětšený detail „kyselého“ levého okraje rostoucí kolonie (a) a „alkalického“ pravého okraje kolonie (c).

Detailní snímek části kolonie v bíle orámovaném úseku na obr. b, kde byly nejdříve zaznamenány strukturální změny (e, f)

Buňky z „kyselého“ části kolonie – invazivní forma (d) a z „alkalického“ části kolonie – klidová forma (g)

B : Podoba kolonie a její struktura v růstové kyselé fázi vývoje (a).

Detailní záběr okraje kolonie (b).

Mění se struktura kolonie ve fázi po vydání detekovatelného amoniakálního signálu (c,d)

Zvětšení :

4krát : B a, c

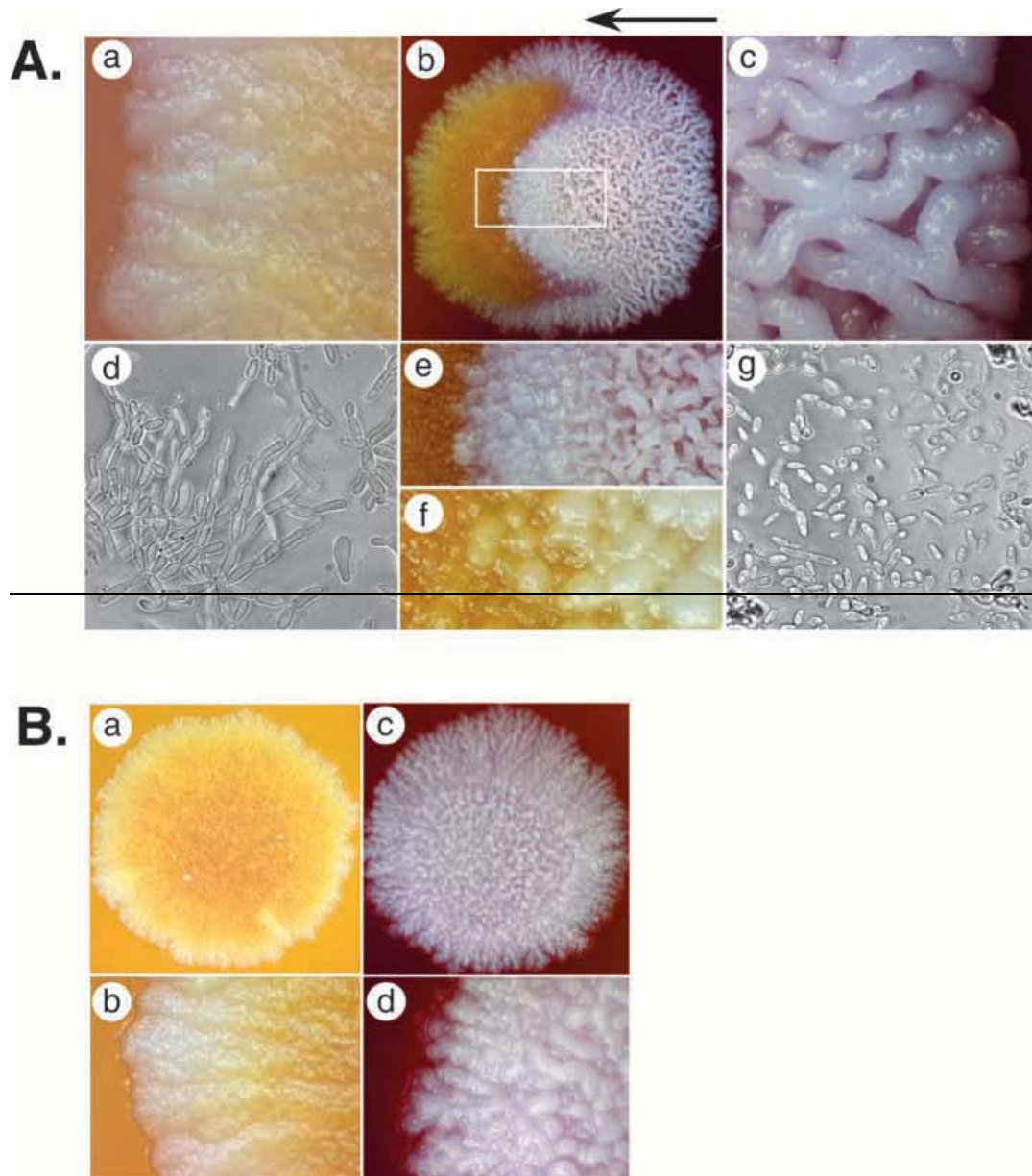
5krát : A b

14krát : A e

20krát : B b, d

35krát : A a, c

600krát : A d, g



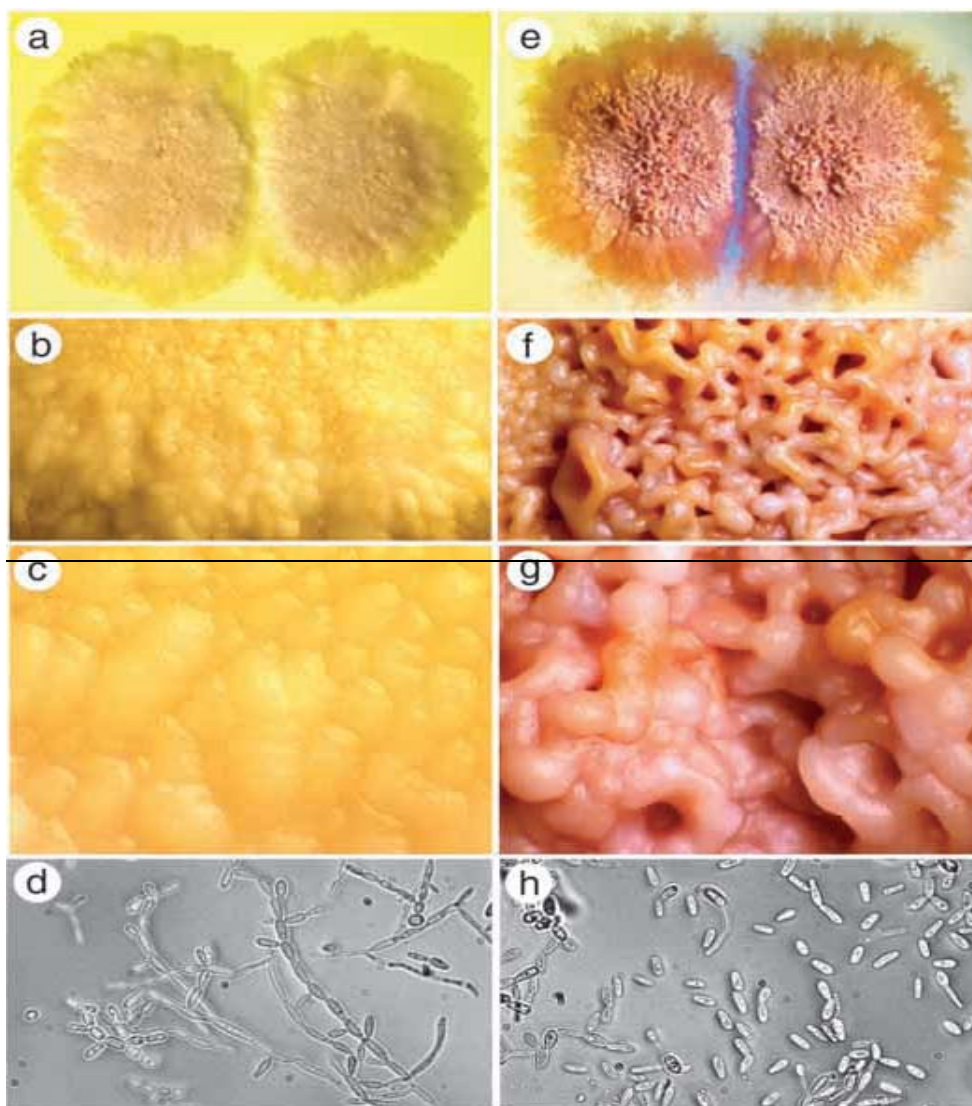
Obrázek 14.

Obr. 15

Kolonie *C. mogii* a morfologie buněk nacházející se v druhé kyselé fázi vývoje a během přechodu do třetí alkalické fáze (e).

Zvětšené detaily morfologie kolonie (b, c, f, g) a buněk k centrální části kolonie (d, h)

Zvětšení : 2krát : a, e, 10krát : b, f, 30krát : c, g, 600krát : d, h



Obrázek 15

8. SEZNAM TABULEK A VYOBRAZENÍ

Všechna vyobrazení a tabulky jsou součástí archivu oddělení Mikrobiologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UK.

Tabulky :

Tabulka 1. Poměr protonizované a neprotonizované formy amoniaku při konkrétním pH (3-9).....14

Tabulka 2. :Poměr mezi intracelulární a extracelulární hodnotou pH a vliv jeho hodnoty na množství molekul amoniaku difundujících plazmatickou membránou.....15

Tabulka 3. : Pořadí a počet jednotlivých odběrů u *Saccharomyces* a *C. mogii* ke kvantifikaci amoniakálního signálu.....20

Obrázky :

Obrázek 1: rozmístění očkovacích míst na médiu 21

Obrázek 2: kvantifikace amoniakálního signálu..... 22

Obrázek 3: umístění umělého zdroje amoniaku..... 23

Obrázek 4: Fáze 1 (stáří 7 dní), 2 (9 dní), 3 (10 dní), 4 (10,5 dne), 5 (11 dní), 6 (12 dní) znázorňují změny pH okolí buněk během přechodu kyselá/alkalická fáze. 27

Obrázek 5: Změny v intracelulární koncentraci jednotlivých aminokyselin během fáze 1-6 přechodu 27

Obrázek 6: Změny v poměru koncentrací jednotlivých aminokyselin ve vakuolách a v cytoplazmě během fáze 1-6 přechodu..... 28

Obrázek 7:Změny pH okolí rostoucích kvasinkových kolonií v různých vývojových stádiích 29

Obrázek 8: Umístění umělého zdroje amoniaku do blízkosti kolonie	31
Obrázek 9: Fotografie pořízená 18 hodin po umístění zdroje amoniaku vedle 3 dny staré kolonie 3 nacházející se původně v kyselé fázi.....	31
Obrázek 10: Buňky kolonie C. mogii izolované z části kolonie, jež nebyla pod vlivem amoniakálního signálu.	32
Obrázek 11: Buňky kolonie C. mogii izolované z části kolonie, jež byla vystavena působení amoniakálního signálu.....	33
Obrázek 12: Indukce amoniakální produkce a synchronizace vývoje obřích kolonií u různých druhů kvasinek.....	32
Obrázek 13: Vývojové fáze.....	39
Obrázek 14: Fotografie kolonií.....	44
Obrázek 15: Fotografie kolonií.....	45

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bogonez, E., Machalo, A., Satrustegui, J. (1983). Ammonia accumulation in acetate-growing yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 733, 234-241.

Cozzone, A. J. (1998). Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 127-164.

Epstein, C. B. a kol (2001). Genome-wide response to mitochondrial dysfunction. *Mol. Cell Biol.* 21, 297-308.

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

Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Andre, B. (1997). A family of ammonium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17 (4282-4293).

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

Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev. Microbiol.* 55, 165-199.

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

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

Pálková, Z., a kol. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillation guide yeast colony development. *Mol. Cell Biol.* 22, 3901-3914.

Rensing, L., Meyer-Grahe, U., Ruoff, P. (2001). Biological timing and the clock metaphor: Oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiol. Int.* 18, 329-369.

Zikánová, B., Kuthan, M., Ricinová, M., Forstová, J., Pálková, Z. (2002). Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 962-967.