

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Danila Voloshin

Interakce proteinů Whi3 a Yap6 při mírném osmotickém stresu

Interaction of Whi3 and Yap6 under mild osmotic stress

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:
RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Danila Voloshin

Tato práce byla vypracována za podpory grantu GAČR 19-11384S „Regulace a vzájemný vztah mezi procesy klíčovými pro tvorbu kvasinkových biofilmů: Role environmentálních faktorů a specifických regulátorů“.

Rád bych poděkoval vedoucí této diplomové práce RNDr. Michaele Schierově, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce, cenné rady a připomínky k její vypracování. Také bych chtěl poděkovat za přípravu skriptu pro statistickou analýzu Dr. ing. Janu Schierovi z ÚTIA AVČR. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu a umožnění studia na vysoké škole.

Abstrakt

Při růstu kolonií přírodních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* na pevném médiu dochází k diferenciaci buněk uvnitř kolonie, která vede ke vzniku strukturovaných kolonií. Schopnost buněk tvořit strukturované kolonie je závislá na povrchovém adhesinu Flo11p. Exprese genu *FLO11* je pozitivně regulována pomocí RNA-vazebného proteinu Whi3p, který má pravděpodobně negativní vliv na hladinu transkripčního faktoru Yap6p. Cílem práce bylo zjistit, zda Yap6p ovlivňuje morfologii kolonií a expresi *FLO11*. Analýzou exprese *FLO11* pomocí fluorescenčních proteinů pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed u kmenů s delecí *WHI3* byl prokázán negativní vliv Yap6p na expresi *FLO11* a potvrzeny změny vlivu Yap6p na expresi *FLO11* v přítomnosti NaCl. U kmene se zvýšenou expresí *YAP6* byly hodnoty fluorescence pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed nižší než u kmene s delecí *YAP6* a zároveň v přítomnosti NaCl docházelo k největšímu nárůstu fluorescence. Je pravděpodobné, že ačkoliv má protein Yap6 za standardních podmínek kultivace negativní vliv na expresi *FLO11*, v přítomnosti mírného osmotického stresu je zodpovědný za výrazné zvýšení exprese *FLO11*. U kmenů s delecí *WHI3* bylo pozorováno výrazné zvýšení vrásčitosti kolonií rostoucích v přítomnosti NaCl.

Analýzou strukturovaných kolonií u modelového organismu *S. cerevisiae* lze přispět k objasnění faktorů podporujících virulenci u patogenních kvasinek.

Klíčová slova: morfologie kolonií, signální dráha filamentárního růstu, osmotický stres, fluorescenční proteiny, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Natural strains of the *Saccharomyces cerevisiae* growing on solid medium form structured, biofilm-like colonies. This ability is dependent on the surface adhesin Flo11p. The expression of the *FLO11* gene is upregulated by the RNA-binding protein Whi3p, which is likely to have a negative effect on the level of the transcription factor Yap6p. The aim of this study was to determine whether Yap6p affects colony morphology and *FLO11* expression. Analysis of *FLO11* expression using the fluorescent proteins pFlo11-GFP and Flo11p-DsRed in *WHI3*-deletion strains demonstrated a negative effect of Yap6p on *FLO11* expression and confirmed changes in the effect of Yap6p on *FLO11* expression in the presence of NaCl. In the strain overexpressing *YAP6*, the fluorescence values of pFlo11-GFP and Flo11p-DsRed were lower than in the strain with deletion of the *YAP6* and in the presence of NaCl there was observed the largest increase in fluorescence. Although Yap6 protein is thought to have a negative effect on *FLO11* expression under standard culture conditions, it seems to be responsible for a significant increase in *FLO11* expression in the presence of mild osmotic stress. In *WHI3*-deletion strains, there was observed a significant increase in structuredness of colonies growing in the presence of NaCl.

Analysis of structured colonies in *S. cerevisiae* as model organism can help to identify factors promoting virulence in pathogenic yeasts.

Keywords: colony morphology, filamentous growth pathway, osmotic stress, fluorescent proteins, *Saccharomyces cerevisiae*.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 9 |
| 2 | PŘEHLED LITERATURY | 11 |
| 2.1 | KOLONIE <i>S. CEREVISIAE</i> | 11 |
| 2.2 | FILAMENTÁRNÍ RŮST | 13 |
| 2.3 | PROTEIN <i>FLO11</i> A JEHO ROLE V TVORBĚ BIOFILMU KOLONIE <i>S. CEREVISIAE</i> | 14 |
| 2.3.1 | STRUKTURA FLO11P | 14 |
| 2.3.2 | REGULACE EXPRESE <i>FLO11</i> | 15 |
| 2.3.3 | EXPRESSE <i>FLO11</i> V ZÁVISLOSTI NA ZDROJÍCH UHLÍKU | 19 |
| 2.4 | RNA-VAZEBNÝ PROTEIN <i>WHI3</i> A JEHO ROLE V REGULACI EXPRESE FLO11P | 21 |
| 2.4.1 | STRUKTURA WHI3P | 21 |
| 2.4.2 | FUNKCE WHI3P | 22 |
| 2.5 | OSMOTICKÝ STRES A HOG DRÁHA | 25 |
| 2.5.1 | AKTIVACE HOG DRÁHY: SLN1P | 26 |
| 2.5.3 | JINÉ ZPŮSOBY AKTIVACE HOG DRÁHY | 28 |
| 2.5.4 | HOG1P A JEHO FUNKCE | 29 |
| 2.5.5 | ZPĚTNOVAZEBNÁ REGULACE HOG DRÁHY | 31 |
| 2.5.6 | INTERAKCE HOG S FG MAPK DRAHOU | 31 |
| 2.6 | TRANSKRIPČNÍ FAKTORY <i>YAP</i> RODINY | 32 |
| 2.6.1 | <i>YAP1</i> | 33 |
| 2.6.2 | <i>YAP2 (CAD1)</i> | 34 |
| 2.6.3 | <i>YAP3</i> | 35 |
| 2.6.4 | <i>YAP4/YAP6</i> | 35 |
| 2.6.5 | <i>YAP5</i> | 36 |
| 2.6.6 | <i>YAP7</i> | 37 |
| 2.6.7 | <i>YAP8 (ARR1)</i> | 37 |
| 3 | CÍLE PRÁCE | 38 |
| 4 | MATERIÁL A METODY | 39 |
| 4.1 | MATERIÁL | 39 |
| 4.1.1 | POUŽITÉ MIKROORGANISMY | 39 |
| 4.1.2 | PŘIPRAVENÉ KVASINKOVÉ KMENY | 40 |
| 4.1.3 | POUŽITÉ PLAZMIDY | 40 |
| 4.1.4 | POUŽITÉ PRIMERY | 44 |
| 4.1.5 | CHEMIKÁLIE | 46 |
| 4.1.6 | KULTIVAČNÍ MÉDIA | 47 |
| 4.2 | METODY | 48 |
| 4.2.1 | KULTIVACE | 48 |
| 4.2.2 | STERILIZACE | 48 |
| 4.2.3 | UCHOVÁVANÍ ZÁSOBNÍCH KULTUR | 48 |
| 4.2.4 | SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ POČTU BUNĚK | 48 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2.5 | MĚŘENÍ INTENZITY FLUORESCENCE NA CLARIOSTAR | 49 |
| 4.2.6 | PŘÍPRAVA KMENŮ PRO ANALÝZU INTERAKCE WHI3P-YAP6P A FLO11P | 49 |
| 4.2.7 | STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ NAMERENÝCH DAT | 57 |
| 4.2.8 | POČÍTAČOVÉ PROGRAMY, INTERNETOVÉ SERVERY A DATABÁZE | 59 |
| 5 | VÝSLEDKY | 60 |
| 5.1 | PŘÍPRAVA KMENŮ S MUTACEMI <i>YAP6</i> , PRODUKUJÍCÍCH FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝ FLO11P A OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO MĚŘENÍ FLUORESCENCE | 60 |
| 5.1.1 | PŘÍPRAVA KMENŮ PRO ANALÝZU | 60 |
| 5.1.2 | OPTIMALIZACE MĚŘENÍ FLUORESCENCE (PRO GFP A DsRED) | 63 |
| 5.1.3 | OPTIMALIZACE SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA | 65 |
| 5.1.4 | OPTIMALIZACE PODMÍNEK KULTIVACE PRO ANALÝZU VLIVU STRESU | 66 |
| 5.2 | SLEDOVÁNÍ PRODUKCE FLO11P KOLONIÍ KMENŮ RŮZNÉHO GENOTYPU (<i>WHI3</i> , <i>YAP6</i> - DELECE GENŮ, ZVÝŠENÁ EXPRESE) BĚHEM KULTIVACE ZA STANDARDNÍCH I STRESOVÝCH PODMÍNEK | 68 |
| 5.2.1 | VLIV GENOTYPU <i>YAP6</i> A STÁŘÍ KOLONIE NA EXPRESI <i>FLO11</i> U KMENE S DELEČÍ <i>WHI3</i> | 68 |
| 5.2.2 | SLEDOVÁNÍ VLIVU GENOTYPU <i>YAP6</i> NA EXPRESI <i>FLO11</i> A MORFOLOGII KOLONIÍ VE STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH | 71 |
| 5.2.3 | VLIV NaCl NA EXPRESI <i>FLO11</i> U RODIČOVSKÉHO KMENE | 87 |
| 5.2.4 | SLEDOVÁNÍ MORFOLOGIE KOLONIÍ VYBRANÝCH KMENŮ S MUTACEMI <i>WHI3</i> A <i>YAP6</i> A JEJICH CITLIVOST VŮČI OSMOTICKÉMU STRESU | 95 |
| 5.2.5 | VLIV NaCl NA PRŮMĚRNÝ POČET BUNĚK V KOLONIÍCH..... | 97 |
| 5.3 | SROVNÁNÍ VLIVU <i>YAP6</i> NA EXPRESI <i>FLO11</i> A MORFOLOGII KOLONIÍ S VLIVEM GENŮ <i>TEC1</i> A <i>MPT5</i> , EV. DALŠÍCH (<i>TUP1</i> , <i>CYC8</i>)..... | 98 |
| 6 | DISKUSE | 99 |
| 6.1 | SROVNÁNÍ VLIVU GENOTYPU <i>YAP6</i> U KMENE S DELEČÍ <i>WHI3</i> NA MORFOLOGII KOLONIÍ A NA EXPRESI <i>FLO11</i> ZA NESELEKTIVNÍCH PODMÍNEK KULTIVACE..... | 100 |
| 6.2 | SROVNÁNÍ VLIVU GENOTYPU <i>YAP6</i> NA EXPRESI <i>FLO11</i> ZA VYBRANÝCH SELEKTIVNÍCH PODMÍNEK.. | 100 |
| 6.3 | VLIV STAŘÍ A GENOTYPU <i>YAP6</i> NA EXPRESI <i>FLO11</i> | 102 |
| 6.4 | VLIV NaCl NA EXPRESI <i>FLO11</i> U <i>WHI3+</i> KMENŮ | 103 |
| 6.5 | VLIV GENOTYPU <i>WHI3</i> A <i>YAP6</i> NA MORFOLOGII KOLONIÍ VYBRANÝCH KMENŮ | 104 |
| 7 | SOUHRN | 105 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 106 |
| 9 | PŘÍLOHA K DP | 113 |

Seznam zkratek

| Zkratka | Anglické vysvětlení | Český překlad |
|---------|---|---|
| 0,2D | Glucose médium (0,2% w/v) | Glukózové médium (0,2% w/v) |
| bp | Base pair | Pár bází |
| CDK | Cyclin-dependent kinase | Cyklin-dependentní kináza |
| DsRed | Red fluorescent protein | Červený fluorescenční protein |
| ECM | Extracellular matrix | Extracelulární matrix |
| Edi | Edicin | Edicin |
| FG | Filamentous growth | Draha filamentárního růstu |
| G418 | Geneticin | Geneticin |
| GEF | Guanine nucleotide exchange factor | Faktor výměny guaninu |
| GFP | Green fluorescent protein | Zelený fluorescenční protein |
| GM | Glycerol médium | Glycerolové médium |
| HOG | High Osmolarity Glycerol | Draha odpovědi na vysokou osmolaritu závislá na Hog1p |
| Hygr | Hygromycin B | Hygromycin B |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase | Mitogenem aktivovaná proteinkináza |
| MAP3K | Mitogen-activated protein kinase kinase | Mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza kináza |
| MAP2K | Mitogen-activated protein kinase kinase | Mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza |
| Nat | Nourseothricin | Nourseothricin |
| ncRNA | Non-coding RNA | Nekódující RNA |
| NLS | Nuclear localization signal | Signál jaderné lokalizace |
| OD | Optical density | Optická denzita |
| PCR | Polymerase chain reaction | Polymerázová řetězová reakce |
| PKA | Protein kinase A | Proteinkináza A |
| ROS | Reactive oxygen species | Reaktivní formy kyslíku |
| UPR | Unfolded protein response | Dráha odpovědi na nesvinuté bílkoviny |
| v/v | Volume/volume | Objem/objem |
| w/v | Weight/volume | Hmotnost/objem |
| YD | Glucose médium (2% w/v) | Glukózové médium (2% w/v) |
| YE | Yeast extract | Kvasničný autolyzát |

1 Úvod

Saccharomyces cerevisiae tvoří různé typy mnohobuněčných struktur (biofilmů) v závislosti na podmínkách prostředí. Při růstu kolonií přírodních kmenů na pevném médiu dochází k diferenciaci buněk uvnitř kolonie, která vede ke vzniku struktury, podobné mnohobuněčnému organismu. Strukturované kolonie mají vyšší odolnost vůči nepříznivým podmínkám prostředí oproti hladkým laboratorním kmenům a souvisejí s patogenezí některých rodů kvasinek.

Diferenciace buněk kolonie je závislá na povrchovém adhesinu Flo11p. Flo11p je esenciální pro tvorbu různých fenotypů a procesů, spojených se sociálním chováním *S. cerevisiae* a s tvorbou mnohobuněčných struktur, závislých na adhezi mezi buňkami nebo adhezi k abiotickým povrchům.

Na regulaci exprese Flo11p se několika nezávislými způsoby podílí RNA-vazebný protein Whi3p, jehož delece vede ke snížení exprese *FLO11*. Whi3p reguluje průběh buněčného cyklu, zejména inhibuje přechod mezi G1 a S fázemi. V závislosti na podmínkách prostředí umožňuje inhibice přechodu buňky do S fáze volbu alternativní dráhy buněčné diferenciace, např. sporulace, přechod do klidového stavu (quiescence) a filamentární růst.

V předchozích studiích YCG skupiny bylo zjištěno, že u kmene s delecí *WHI3* dochází ke zvýšení hladiny transkripčního faktoru Yap6p oproti kmenům s funkčním *WHI3*. Yap6p je málo prostudovaným transkripčním faktorem, který patří do rodiny bZIP (basic leucine-zipper) proteinů YAP (Yeast homolog of AP-1). Rodina proteinů YAP je konzervovanou skupinou u všech eukaryot. Aktivita YAP proteinů umožňuje buňkám adaptovat se na různé typy stresových podmínek.

V literatuře je Yap6p popsán jako transkripční faktor, který se podílí na odpovědi na osmotický stres a který interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p, mimo jiné regulujícím expresi *FLO11*. Také je předpokládána jeho interakce s proteinem Sok2p, který se zúčastní regulace filamentárního růstu. Podrobnější studium proteinu Yap6p by umožnilo získat více informací o jeho funkcích a interakcích, případně lépe pochopit mechanismy vývoje strukturovaných kolonií a sociálního chování kvasinek.

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakce proteinů Whi3p a Yap6p za standardních podmínek, při mírném dlouhodobém osmotickém stresu a sleduje jejich vliv na expresi *FLO11* a na morfologii kolonií.

Pro řešení dané diplomové práce byl jako modelový organismus zvolen divoký kmen *S. cerevisiae* BR-F, který má výraznou tendenci ke tvorbě strukturovaných kolonií. Deleci *WHI3* u daného kmene dochází k výraznému, nikoliv však úplnému potlačení schopnosti tvorby strukturovaných kolonií, které usnadňuje studium vlivu mutací dalších genů na morfologii kolonií.

2 Přehled literatury

2.1 Kolonie *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tvoří různé typy mnohobuněčných struktur v závislosti na podmínkách prostředí. V tekutém médiu vytvářejí floky (agregáty buněk) a flor (ploché kolonie na rozhraní vzduch – kapalina), na pevném médiu vytvářejí strukturované biofilmy a velké ploché kobercové kolonie (mats). Buňky se v různých typech kolonií výrazně liší ve své morfologii a metabolismu (Honigberg 2016, Plocek *et al.*, 2020).

Schopnost buněk tvořit různé mnohobuněčné struktury závisí na jejich genetickém pozadí. Většina laboratorních a domestikovaných kmenů na pevném médiu tvoří hladké kolonie, zatímco divoké kmeny tvoří strukturované kolonie. Stupeň strukturovanosti či vrásčitosti je ovlivněn složením média. Na médiu s vysokou koncentrací glukózy (4% w/v) rostou málo vrásčité až hladké kolonie (až do vyčerpání glukózy z média), zatímco na médiu s nefermentovatelnými zdroji uhlíku, podporujícími respirační metabolismus, rostou vrásčité kolonie (Granek *et al.*, 2010).

Za dlouhodobé kultivace na médiu s vysokou koncentrací glukózy mohou být divoké kmeny domestikovány – mohou reverzibilně ztratit schopnost tvořit strukturované kolonie. Domestikovaný stav může být revertován za různých stresových podmínek (Šťovíček *et al.*, 2014).

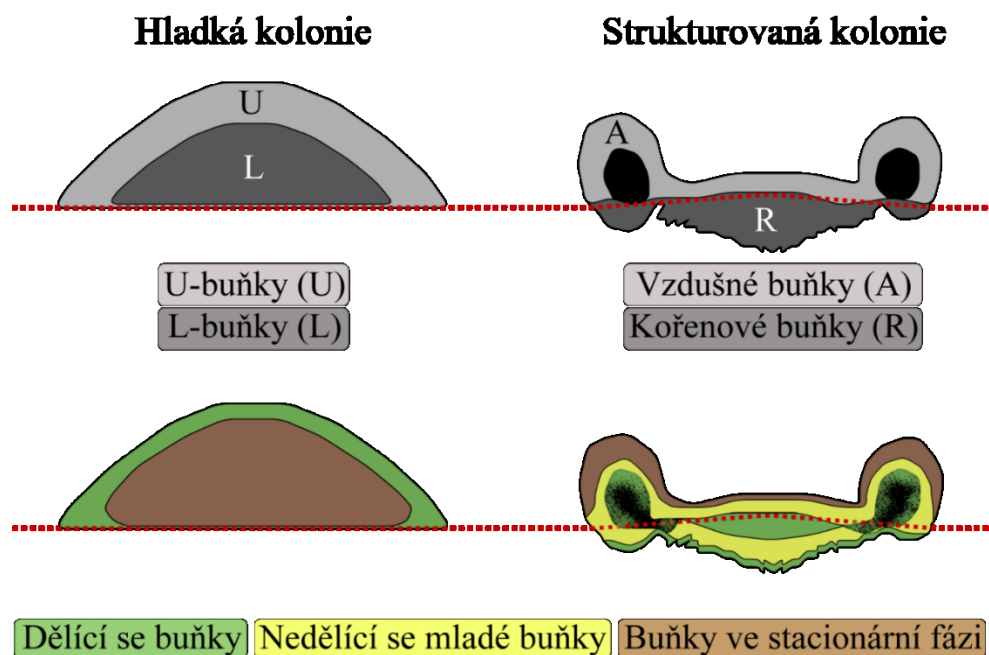
Během růstu kvasinkové kolonie dochází ke vzniku struktur, charakteristických pro daný kmen a médium. Kolonie na pevném komplexním médiu bez zkvasitelných cukrů procházejí diferenciací v závislosti na změnách kyselosti prostředí (média), které jsou spojeny s produkcí amoniaku. Amoniak hraje důležitou roli v synchronizaci a diferenciaci buněk uvnitř kolonie. Signalizace pomocí amoniaku také slouží pro komunikaci mezi vzdálenými koloniemi: buňky šíří v prostředí signál o postupném vyčerpání živin a urychlují proces diferenciaci v ostatních koloniích (Palková *et al.*, 1997, Váchová *et al.*, 2013). Rychlost diferenciaci kolonií je závislá na hustotě výsevu: při vysoké hustotě výsevu rychleji dochází k diferenciaci kolonií na plotně (Palková *et al.*, 2000).

Diferencované buňky hladkých obřích kolonií mohou být rozděleny do dvou hlavních subpopulací: U (upper) a L (lower) buňky. Struktura řezu hladkou kolonií je schematicky znázorněna na obrázku 2.1. U buňky tvoří vnější a horní oblasti kolonie. Jsou to velké, sporulující, dělící se, dlouho žijící buňky odolné stresu, metabolicky aktivní, ve kterých probíhá autofagie (Váchová *et al.*, 2013, 2018).

Oproti tomu, L buňky jsou malé, citlivé ke stresu (jako teplotní šok a působení etanolu), s nízkou metabolickou aktivitou. L buňky často mají jednu velkou vakuolu, na rozdíl od U buněk, které nemají pozorovatelné vakuoly. V L buňkách je zvýšena exprese genů spojených s glukoneogenezí a proteolýzou, zejména syntézou proteazomálních proteinů. L buňky poskytují U buňkám živiny, jako aminokyseliny a uhlovodíky, což umožňuje U buňkám využívat fermentativní metabolismus. Snížená aktivita systému oxidativní fosforylace U buněk vede ke snížení hladiny ROS (reactive oxygen species) a zpomaluje jejich chronologické stárnutí. Přestože se L buňky chovají jako hladovějící, nedochází u nich k aktivaci charakteristických adaptivních mechanismů, jako autofagie a ukládání zásobních uhlovodíků (glykogenu a trehalózy) (Váchová *et al.*, 2013, 2018, Čáp *et al.*, 2015).

Strukturované kvasinkové kolonie jsou tvořeny dvěma subpopulacemi buněk: vzdušnými (aerial) a kořenovými (root) buňkami. Struktura řezu strukturovanou kolonií je schematicky znázorněna na obrázku 2.1. Vzdušné buňky tvoří část kolonie na povrchu agaru a nad ním, zatímco invazivní pseudohyfalní kořenové buňky tvoří podpovrchovou složku kolonie. V oblasti vzdušných buněk se tvoří struktury, vyplněné tzv. ECM (extracelulární matrix), které neobsahují buňky. ECM slouží jako rezerva živin a polopropustná bariéra, zabráňující průniku některých látek, včetně toxických (Váchová *et al.*, 2011, 2018).

Na rozdíl od metabolicky aktivních U buněk hladkých kolonií, vzdušné buňky strukturovaných kolonií se chovají jako buňky ve stacionární fázi: akumulují glykogen a trehalózu, mají aktivní systém autofagie, exprimují stresové geny. Metabolicky aktivní kořenové buňky se také liší od L buněk hladkých kolonií (Váchová *et al.*, 2018).



Obr. 2.1. Schematické znázornění řezu hladkou a strukturovanou kolonií. Červená přerušovaná čára znázorňuje povrch agarového média. Horní část obrázku zobrazuje buněčné subpopulace hladkých a strukturovaných kolonií. V dolní části obrázku je zobrazena jejich aktivita ve vztahu k buněčnému dělení (převzato a upraveno podle Váchová *et al.*, 2018).

2.2 Filamentární růst

Filamentární růst je jednou z alternativních drah buněčné diferenciace diploidních buněk. Je indukován při nedostatku živin, zejména za podmínek nízkých koncentrací zdrojů dusíku. Předpokládá se, že umožňuje rychlejší a efektivnější šíření kolonie při hledání živin v jejím okolí (Honigberg 2016).

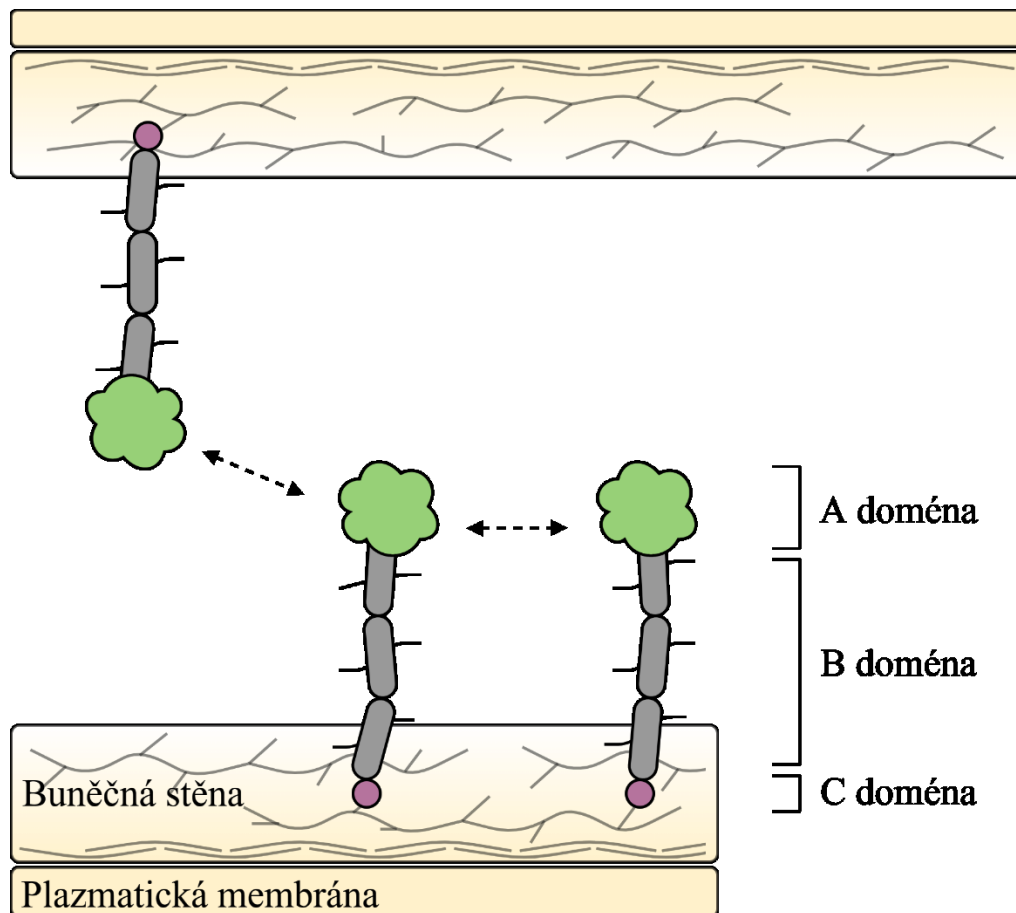
Filamentární růst je nejčastěji pozorován na obvodu kolonie. Filamentárně rostoucí části kolonie jsou tvořeny protáhlými buňkami, pučícími unipolárně, které po pučení zůstávají spojené (adheze závislá na Flo11p, který je popsán v následující kapitole) a tím tvoří tzv. pseudohyfy. Filamentární diferenciace je často asociována s invazivním růstem, kdy buňky zarůstají do substrátu. Invazivní růst je nezbytný pro patogenezí mnoha patogenních kvasinek, např. *C. albicans* (Honigberg 2016).

Přestože filamentární a invazivní růst jsou velmi podobné procesy, nelze je zaměňovat. Piccirillo *et al.* ukázali, že některé kmeny invadovali agar bez přítomnosti detekovatelného filamentárního růstu v oblastech invaze. V souvislosti s jinými výsledky se předpokládá, že filamentární diferenciace usnadňuje invazivní růst, ale není nezbytnou podmínkou (Piccirillo *et al.*, 2010, Honigberg 2016).

2.3 Protein *FLO11* a jeho role v tvorbě biofilmu kolonie *S. cerevisiae*

FLO11 je povrchový glykoprotein rodiny Flo adhesinů (v literatuře se také nazývají flokuliny, podle procesu flokulace, na němž se podílí některé proteiny této rodiny). Flo11p má esenciální roli při vytváření různých fenotypů a procesů, spojených se sociálním chováním *S. cerevisiae* a s tvorbou mnohobuněčných struktur, závislých na adhezi mezi buňkami nebo adhezi k abiotickým povrchům. Je esenciální pro tvorbu strukturovaných biofilmů, kobercových kolonií, pro filamentární a invazivní růst (Guo *et al.*, 2000).

2.3.1 Struktura Flo11p



Obr. 2.2. Schematické zobrazení domén povrchového proteinu *FLO11*. Přerušovaná oboustranná šipka znázorňuje vazebné interakce mezi A doménami Flo11p. A doména zprostředkuje vazebné interakce mezi proteiny *FLO11* sousedních buněk. B doména je dlouhá, bohatá na repetice a silně glykosylovaná. Předpokládá se, že za určitých podmínek způsobuje tvorbu prionům podobných klastrů se sousedními Flo11p a tím zvyšuje sílu adheze. C doména obsahuje signál pro glykofosfatidylinositol (GPI)-kotvu, která zajišťuje připojení proteinu k buněčné stěně či plazmatické membráně (vytvořeno podle Barua *et al.*, 2016, Oppler *et al.*, 2019, Brückner *et al.*, 2020).

U Flo11p byly popsány 3 domény (obrázek 2.2):

- 1) A doména (oblast 22.-209. AK, (www.uniprot.org)) je tvořena jádrem podobným imunoglobulinům. Je zapojena do vazebných interakcí mezi buňkami a uplatňuje se při adhezi k abiotickým povrchům (Oppler *et al.*, 2019). Ze 76 kmenů kolem 30% kmenů obsahovalo v A doméně variabilní inzert v délce 15 AK (Oppler *et al.*, 2019). Kmeny se stejnou A doménou k sobě silněji adherují než kmeny s odlišnými A doménami. Předpokládá se, že se variabilita sekvence A domény využívá pro rozlišení mezi geneticky příbuznějšími buňkami („kin discrimination“) a zajišťuje jim konkurenční výhodu (Barua *et al.*, 2016, Brückner *et al.*, 2020).
- 2) Dlouhá silně glykosylovaná B doména je bohatá na Ser-Thr repetice. Rekombinací dochází ke změnám délky této domény, což ovlivňuje schopnost buněk adherovat k povrchům a jiným buňkám. Výsledky analýzy 64 kmenů ukazují, že délka B domény je 650 až 3100 bp (Oppler *et al.*, 2019). B doména obsahuje sekvence náchylné k agregaci, schopné tvořit vlákna podobná amyloidům, která pozitivně ovlivňují efektivitu flokulace (Ramsook *et al.*, 2010). Lipke *et al.* ukázali, že agregaci lze stimulovat střížnými silami (při centrifugaci nebo vortexování). Navržený model popisuje, že působením střížných sil dochází k rozvolnění proteinu, vystavení sekvencí náchylných k agregaci a jejich asociaci s homologickými sekvencemi v molekulách jiných Flo11p s následnou tvorbou adhezních klastrů (Lipke *et al.*, 2017).
- 3) C doména, která je 28 aminokyselin dlouhá (www.uniprot.org), obsahuje signál pro glykofosfatidylinositol (GPI)-kotvu. Zajišťuje připojení proteinu k buněčné stěně či plazmatické membráně (Oppler *et al.*, 2019).

2.3.2 Regulace exprese *FLO11*

Regulace exprese *FLO11* je velmi komplexní. Promotor *FLO11* (cca 3 kbp dlouhý) patří do největších regulačních „upstream“ sekvencí v genomu *S. cerevisiae* (Barrales *et al.*, 2012). Daná podkapitola se především věnuje regulaci *FLO11* v diploidních buňkách, v závislosti na zdrojích uhlíku a hyperosmotickém stresu. Exprese *FLO11* v závislosti na přítomnosti glukózy je regulována cAMP-PKA a SNF1 drahami. Na regulaci exprese Flo11p se také několika nezávislými způsoby podílí RNA-vazebný protein *WHI3*, jehož popisu se věnuje následující kapitola 3.

2.3.2.1 cAMP-PKA dráha

cAMP-PKA (cyclic adenosine monophosphate - protein kinase A) dráha hraje důležitou roli v regulaci metabolismu buňky. Přidání glukózy k buňkám, rostoucím na nefermentovatelném zdroje uhlíku způsobuje krátké (minuty), ale výrazné zvýšení intracelulární hladiny cAMP a stimuluje aktivitu PKA (Kraakman *et al.*, 1999). K aktivaci cAMP-PKA dráhy dochází navázáním glukózy (glukóza-6-fosfátu nebo strukturně podobného cukru) na receptorový protein Gpr1 (Lorenz *et al.*, 2000). Gpr1p s navázanou glukózou aktivuje α podjednotku G proteinu Gpa2, která přenáší signál na adenylát cyklázu Cyr1p. Cyr1p katalyzuje produkci cAMP z ATP. Akumulovaný cAMP se váže na Bcy1p, regulační podjednotku PKA, čímž způsobuje derepresi a uvolnění katalytických podjednotek Tpk1-3p (Santangelo G., 2006). Aktivita PKA způsobuje zpětnovazebnou inhibici syntézy cAMP fosforylací Cdc25p (Ras1/2p-GEF (guanine nucleotide exchange factor)) asociovaného s membránou, stimulujícího aktivitu adenylát cyklázy prostřednictvím Ras1/2p). PKA zároveň stimuluje degradaci cAMP pomocí Pde1p fosfatázy (Chen *et al.*, 2000, Jian *et al.*, 2010).

Tpk1p inhibuje aktivitu Yak1p kinázy, která pravděpodobně reguluje expresi *FLO11* během stacionární fáze (role Yak1p v regulaci je popsána v kapitole o Whi3p). Inhibice Yak1p vede ke zvýšení aktivity Sok2p – negativního regulátoru *FLO11* (Malcher *et al.*, 2011).

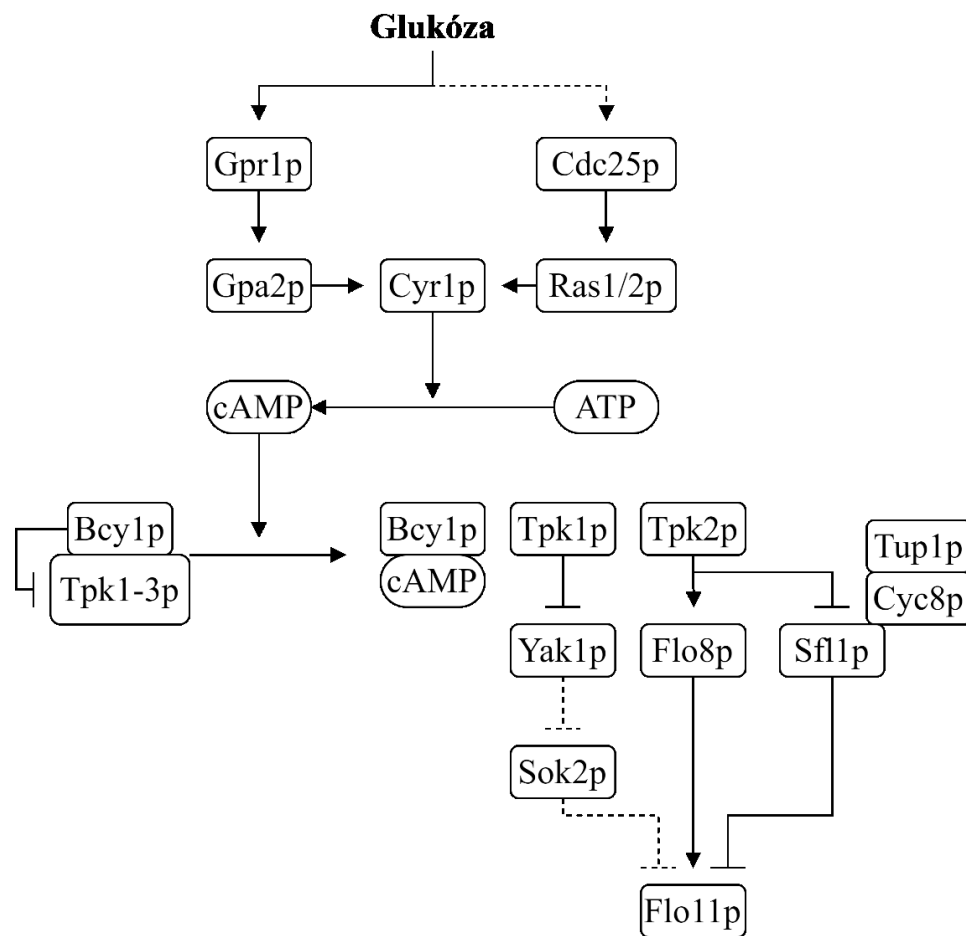
Tpk2p fosforyluje transkripční faktory Flo8p (aktivátor *FLO11*) a Sfl1p (represor *FLO11*), kompetující o vazebná místa na promotoru *FLO11*. Fosforylací Sfl1p dochází k jeho uvolnění z promotoru *FLO11*. Fosforylovaný Flo8p se váže na promotor *FLO11*, aktivuje ho a umožňuje vazbu dalších aktivačních transkripčních faktorů, zejména komplexu Ste12p-Tec1p (Conlan *et al.*, 2001, Bumgarner *et al.*, 2012).

cAMP-PKA dráha také může být aktivována prostřednictvím proteinů Ras1/2p. Za přítomnosti glukózy nepřímo dochází k aktivaci Cdc25p, který prostřednictvím Ras1p (a jeho paralogu Ras2p) stimuluje aktivitu adenylát cyklázy Cyr1p (Tamanai 2011).

Na regulaci *FLO11* pomocí transkripčních faktorů Flo8p a Sfl1p se podílí 2 ncRNA (nekódující RNA) *ICRI* a *PWRI*, které působí v cis. Krátké pulzy transkripce *PWRI* ncRNA jsou iniciované nasednutím Flo8p na promotor *FLO11*. *PWRI* ncRNA pozitivně reguluje transkripci *FLO11* tím, že inhibuje transkripci *ICRI* ncRNA (Bumgarner *et al.*, 2012).

ICRI ncRNA zabraňuje nasednutí transkripčních faktorů na promotor *FLO11*, čímž dochází k inhibici iniciace transkripce. Na inhibici *ICRI* ncRNA se podílí Rpd3L histon deacetylázový komplex, který uvolní *ICRI* ncRNA z promotoru *FLO11* a umožňuje vazbu transkripčních faktorů (Bumgarner *et al.*, 2012). V souladu s výsledky Bumgarner *et al.* bylo ukázáno, že exprese *FLO11* pozitivně reguluje nejen Rpd3L histon deacetylázový komplex, ale i SWI/SNF1 komplex remodelace chromatinu (Barrales *et al.*, 2012).

Inhibicí represoru Sfl1p a stimulací transkripce *PWR1* ncRNA (aktivací transkripčního faktoru Flo8p) cAMP-PKA dráha zajišťuje expresi *FLO11* na bazální úrovni a umožňuje stimulaci exprese dalšími aktivátorovými proteiny (Bumgarner *et al.*, 2012, Tuck A., 2012).



Obr. 2.3. Schematické zobrazení role cAMP-PKA dráhy v regulaci *FLO11* v závislosti na přítomnosti glukózy. Glukóza způsobuje aktivaci adenylát cyklázy Cyr1p přenosem signálu z receptoru Gpr1p prostřednictvím Gpa2p. Alternativně se Cyr1p aktivuje pomocí Ras1/2 proteinů (prostřednictvím Cdc25p). Aktivní Cyr1p katalyzuje syntézu signální molekuly cAMP, která se váže na Bcy1p, regulační podjednotku PKA, a způsobuje uvolnění katalytických podjednotek Tpk1-3p. Aktivní Tpk1p inhibuje Yak1p kinázu. Yak1p inhibuje Sok2p, nepřímý represor *FLO11*. Tpk2p aktivuje transkripční faktor Flo8p (aktivátor *FLO11*) a zároveň inhibuje Sfl1p (represor *FLO11*), který interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p). T-koncovou čarou je znázorněna inhibice, čarou se šipkou – aktivace. Přerušovanou čarou je zobrazeno nepřímé působení (Vytvořeno podle Conlan *et al.*, 2001, Santangelo G., 2006, Malcher *et al.*, 2011, Tamanioi F., 2011, Bumgarner *et al.*, 2012).

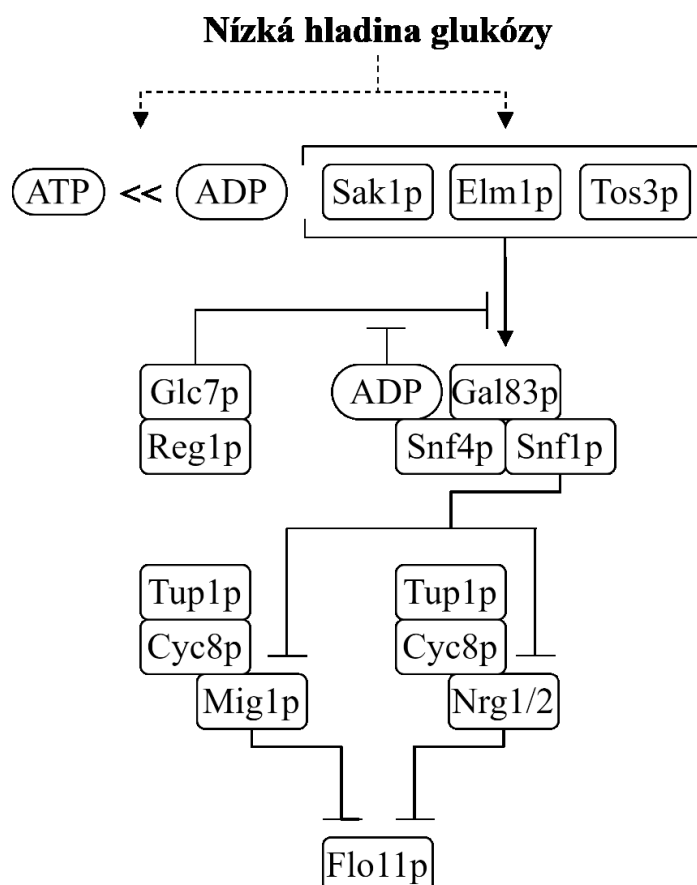
2.3.2.2 SNF1 dráha

SNF1 dráha katabolické represe, která reguluje širokou škálu genů, závislých na hladině glukózy, také reguluje expresi *FLO11* (Kuchin *et al.*, 2002). Centrální složkou dráhy je SNF1 komplex, tvořený α katalytickou podjednotkou Snf1p, třemi alternativními β podjednotkami Sip1p, Sip2p a Gal83p, které tvoří lešení (scaffold), a γ regulační podjednotkou Snf4p (Ghillebert *et al.*, 2011).

Aktivace SNF1 dráhy vyžaduje fosforylaci Snf1p kinázy (katalytické podjednotky SNF1 komplexu), která je fosforylována pomocí funkčně duplicitních kináz Sak1p, Elm1p a Tos3p. Za podmínek vysoké hladiny glukózy dochází k defosforylaci Snf1p kinázy prostřednictvím Glc7p-Reg1p fosfatázy (Glc7p – katalytická podjednotka, Reg1p – regulační podjednotka) (Sanz *et al.*, 2000, Hong *et al.*, 2003).

Při nízké hladině glukózy v buňce, dochází ke zvýšení koncentrace ADP. ADP se váže na Snf4p podjednotku SNF1 komplexu, což brání defosforylaci Snf1p kinázy (Mayer *et al.*, 2011). Snf1p kináza interaguje s transkripčními faktory Mig1p a Nrg1/2p, které inhibují expresi *FLO11* vazbou na jeho promotorovou sekvenci (Kuchin *et al.*, 2002, Bendrioua *et al.*, 2014). Aktivní Snf1p fosforyluje a tím inaktivuje Mig1p a Nrg1p, což vede k derepresi *FLO11* (Bendrioua *et al.*, 2014).

Inhibice genů závislých na glukóze prostřednictvím Nrg1p a Mig1p je závislá na regulačním komplexu Tup1p-Cyc8p, jehož vazba na promotor *FLO11* je zprostředkována danými transkripčními faktory (Verstrepen *et al.* 2006).



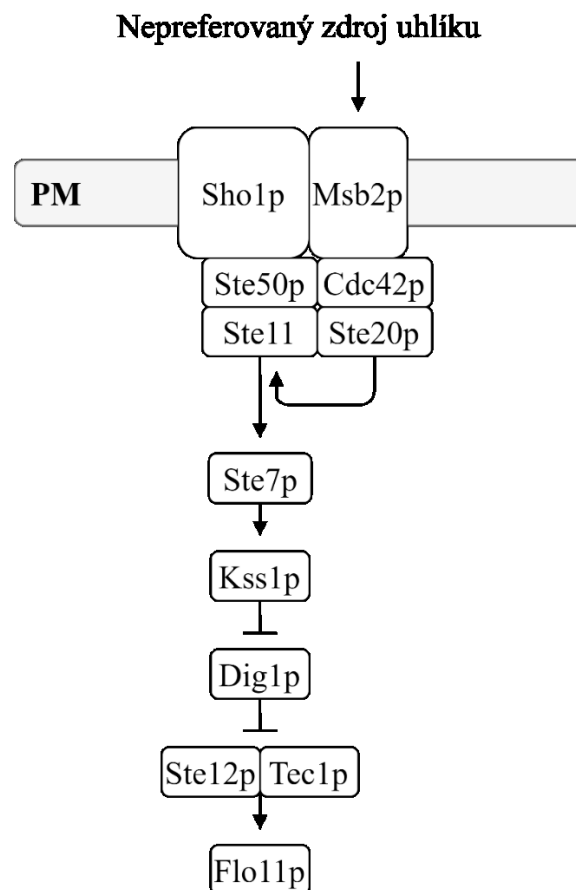
Obr. 2.4. Schematické zobrazení regulace *FLO11* SNF1 drahou katabolické represe. Nízká hladina glukózy v buňce stimuluje zvýšení poměru ADP/ATP v buňce. ADP se váže na Snf4p, regulační podjednotku SNF1 komplexu. SNF1 komplex je aktivován fosforylací Snf1p pomocí funkčně duplicitních kináz Sak1p, Elm1p, Tos3p, a inaktivován defosforylací Snf1p Glc7p-Reg1p fosfatázou. Vazba ADP na Snf4p brání defosforylaci Snf1p. Aktivní SNF1 komplex inaktivuje transkripční faktory Mig1p a Nrg1/2p, které prostřednictvím regulačního komplexu Tup1p-Cyc8p inhibují transkripci *FLO11*. T-koncovou čarou je znázorněna inhibice, čarou s šipkou – aktivace. Prerušovanou čarou je zobrazeno nepřímé působení (vytvořeno podle Sanz *et al.*, 2000, Kuchin *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2003, Verstrepen *et al.* 2006, Ghillebert *et al.*, 2011, Mayer *et al.*, 2011, Bendrioua *et al.*, 2014).

2.3.3 Exprese *FLO11* v závislosti na zdrojích uhlíku

Zdroje uhlíku, glukóza, fruktóza, manóza, galaktóza, rafinóza nebo škrob podporují filamentární růst diploidních buněk, ale jenom za podmínek hladovění na zdroji dusíku (což se považuje za hlavní příčinu inicializace programu filamentárního růstu v diploidních buňkách). Výsledky Northern blot analýzy RNA, izolované z kolonií *S. cerevisiae* (Σ 1278b), rostoucích na různých zdrojích uhlíku (glukóza, fruktóza, manóza, galaktóza, rafinóza, etanol a glycerol) ukazují, že exprese *FLO11* byla výrazně zvýšena jenom za podmínek růstu na médiu s etanolem. Předpokládá se, že alkoholy zvyšují expresi *FLO11* a indukují filamentární růst, protože jejich zvýšená koncentrace mimikuje hladovění na zdroj dusíku (Lorenz *et al.*, 2000, Palecek *et al.*, 2002).

Nicméně, existují studie, které tvrdí, že za podmínek růstu na nepreferovaných zdrojích uhlíku dochází k snížení stupně glykosylace a štěpení extracelulární domény receptorového proteinu Msb2p, což stimuluje aktivaci FG MAPK (filamentous growth mitogen-activated protein kinase) dráhy, která je schematicky zobrazena na obrázku X (Vadaie *et al.*, 2008). Signál z Msb2p aktivuje MAP3K Ste20p prostřednictvím malé GTPázy Cdc42p. Signál z Msb2p je přenášen dále kaskádou Ste20p-Ste11p-Ste7p (stejně jako u HOG dráhy), která následně aktivuje MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Kss1p (Shock *et al.*, 2009).

V neaktivním stavu se Kss1p MAP kináza váže na komplex transkripčních faktorů Ste12p-Tec1p a inhibuje jeho aktivitu. Aktivní Kss1p disociuje z komplexu Ste12p-Tec1p a zároveň fosforylací inaktivuje Dig1p, inhibitor Ste12p. Uvolněný komplex Ste12p-Tec1p se váže na promotor *FLO11* a stimuluje jeho transkripci (Cook *et al.*, 1996).



Obr. 2.5. Zjednodušené schematické zobrazení FG MAPK dráhy. Nepreferovaný zdroj uhlíku způsobuje snížení stupně glykosylace a štěpení extracelulární domény receptorového proteinu Msb2p. To způsobuje aktivaci Msb2p a prostřednictvím malé GTPázy Cdc42p (a adaptérového proteinu Ste50p) stimuluje přenos signálu Ste20p-Ste11p-Ste7p kaskádou, stejnou, jako u HOG MAPK dráhy. Daná kaskáda aktivuje Kss1p MAP kinázu. Kss1p inhibuje aktivitu Dig1p, který je inhibitorem transkripčního faktoru Ste12p. Ste12p-Tec1p aktivuje expresi *FLO11* vazbou na jeho promotorovou sekvenci. T-koncovou čarou znázorněna inhibice, čarou s šipkou – aktivace. PM - plazmatická membrána (Převzato a upraveno podle Shock *et al.*, 2009).

2.4 RNA-vazebný protein *WHI3* a jeho role v regulaci exprese *Flo11p*

RNA-vazebné proteiny jsou důležitou složkou v regulaci degradace, lokalizace a translace mRNA. *WHI3* je neesenciální gen, kódující RNA-vazebný protein. Poprvé byl izolován a popsán jako gen, ovlivňující velikost buňky a průběh buněčného cyklu, zejména inhibici tzv. STARTu, kvasinkového kontrolního bodu pro přechod mezi G1 a S fázemi (Nash *et al.*, 2001).

V závislosti na podmínkách prostředí, umožňuje inhibice přechodu buňky do S fáze volbu alternativní dráhy buněčné diferenciaci, jako sporulace, přechod do klidového stavu a filamentární růst (Garí *et al.*, 2003, Honigberg *et al.*, 2016).

2.4.1 Struktura *Whi3p*

WHI3 kóduje 661 aminokyselin dlouhý protein, u něhož byly popsány tři strukturální domény:

- 1) N-terminální CRR (Cdc28-recruitment region) je lokalizována v oblasti proteinu tvořenou aminokyselinovými zbytky 121–220. Tato doména umožňuje interakci s Cdc28p (Wang *et al.*, 2004, www.uniprot.org). Cdc28p je katalytická podjednotka CDK (cyclin-dependent kinase), klíčového regulátoru buněčného cyklu. Mechanismus inhibice přechodu mezi G1 a S fázemi spočívá v interakci *Whi3p* s Cdc28p a s *CLN3* mRNA. Cln3p je cyklin, který je zodpovědný za iniciaci přechodu mezi G1 a S fázemi. Za interakci *Whi3p* s mRNA *CLN3* je zodpovědná C-terminální doména, která je popsána dále. Důsledkem výše zmíněné interakce je prevence akumulace komplexu Cln3p-Cdc28p v jádře a inhibice předčasného přechodu mezi G1 a S fázemi (Wang *et al.*, 2004, Colomina *et al.*, 2009).

- 2) Doména bohatá na glutamin, která je lokalizována v oblasti 247-277 (www.uniprot.org). Hraje důležitou roli ve ztrátě citlivosti k feromonům u starších buněk kvasinek (15-20 cyklů dělení) a při regulaci translace. Tato doména způsobuje postupnou tvorbu agregátů podobných prionům, resistantních k působení detergentů a proteáz. Agregáty Whi3p následně vedou ke sterilitě haploidních buněk v důsledku neschopnosti buňky zastavit buněčný cyklus v přítomnosti feromonového signálu, což je důležité pro karyogamii. Podobný mechanismus se uplatňuje při ztrátě citlivosti haploidních buněk k feromonu v případě, že buňka nepotká partnera po dobu delší než 4 hodiny od začátku působení α -faktoru. Agregáty Whi3p zůstávají v mateřských buňkách, a proto dceřiné buňky nevykazují sníženou citlivost k feromonu (Caudron et al., 2013, Schlissel et al., 2017).
- 3) C-terminální RRM (RNA recognition motif), která je lokalizována v oblasti 538-625. Umožňuje vazbu na *CLN3* a další mRNA, obsahující UGCAU/GCAU motif (Wang et al., 2004, www.uniprot.org)

2.4.2 Funkce Whi3p

Na základě transkriptomické a proteomické analýzy dat bylo zjištěno, že Whi3p váže mRNA i jiných cyklinů, např. *CLN1* a *CLN2*, na rozdíl od *CLN3*, vliv Whi3p je v tomto případě pozitivní (Schladebeck et al. 2013). Pomocí RNA binding assay bylo objeveno kolem 300 potenciálních mRNA, kódujících různé membránové a sekretované proteiny. Mezi ně patří 17 mRNA, kódujících enzymy a strukturní proteiny, které zajišťují správnou funkci buněčné stěny (Colomina et al., 2008). Cai et al., za využití RNA-seq, microarray, ribosome profiling a dalších metod, ukázali, že Whi3p mírně destabilizuje stovky různých mRNA. Míra destabilizace korelovala s množstvím vazebných sekvencí pro *WHI3* (UGCAU/GCAU) v 5' nepřekládané oblasti cílových mRNA (Colomina et al., 2008, Riordan et al., 2011, Cai et al., 2013).

Za podmínek stresu, jako nedostatek glukózy, teplotní šok (15 min při 46°C) se Whi3p lokalizuje do tzv. stresových granulí, kde kolokalizuje s Pub1p, který se váže na polyA konec různých mRNAs a stabilizuje je. Po překonání stresových podmínek se Whi3p přesouvá do cytoplazmy. Whi3p není esenciální pro tvorbu stresových granulí (Holmes et al., 2013). Podle Buchan et al. (2008) jsou ve stresových granulích u kvasinek dočasně akumulovány mRNA, které mohou být při přechodu do standardních podmínek znovu využity.

Při mírném teplotním stresu (36°C) je Whi3p lokalizován v tzv. P-bodies spolu s proteinem Edc3p, který je tzv. „decapping“ enzymem. Počet P-bodies roste s rostoucí teplotou

(mezi 36°C a 46°C) a rovněž roste podíl Whi3p lokalizovaných v P-bodies. Protein Pub1p není v P-bodies přítomen (Holmes *et al.*, 2013). Podle Wang *et al.* (2018) nejsou P-bodies univerzálním centrem degradace mRNA.

Je pravděpodobné, že akumulace mRNA stresových genů ve stresových granulích, zprostředkovaná interakcí s Whi3p, podmiňuje přežití kvasinek za stresových podmínek (Holmes *et al.*, 2013).

2.4.2.1 Whi3p a filamentární růst/tvorba biofilmu

WHI3 je esenciální pro filamentární růst. Exprese genu, kódujícího buněčný adhesin Flo11p, je závislá na Whi3p a regulována několika nezávislými způsoby, které jsou schematicky znázorněny na obrázku 2.6 (Malcher *et al.*, 2011). U kmene s delecí *WHI3* je exprese *FLO11* 7x nižší (Malcher *et al.*, 2011). Schladebeck *et al.* (2013) prokázala, že při delecí *WHI3*, dochází ke snížení hladiny proteinů Tec1p, Yak1p, Phd1p a Mpt5p přibližně na 50%, ačkoliv přímá interakce mezi Whi3p a mRNA je potvrzena jen u *TEC1* a *MPT5*.

Whi3p pozitivně reguluje *FLO11* regulací transkripčního faktoru Tec1p na post-transkripční úrovni. Komplex Tec1p-Ste12p (součást feromonové signální dráhy a dráhy filamentárního růstu (FG – MAPK)) pozitivně reguluje expresi *FLO11*. Heise *et al.* (2010) prokázal, že overexprese *TEC1* aktivuje expresi *FLO11* i v kmenech s delecí *STE12*. Exprese *FLO11* je mimo jiné ovlivněna i post-transkripční regulací kinázy Yak1p. Malcher *et al.* (2011) prokázali, že zvýšení exprese *YAK1* může eliminovat negativní efekt delece *WHI3* na expresi *FLO11* a schopnost adheze. Naopak delece *YAK1* nebo ztráta kinázové aktivity Yak1p mají výrazně negativní efekt na expresi *FLO11*. Malcher *et al.* (2011) našli 46 genů, jejichž exprese je regulována pomocí Whi3p i Yak1p, většina těchto genů byla zároveň závislá na Msn2p nebo Sok2p.

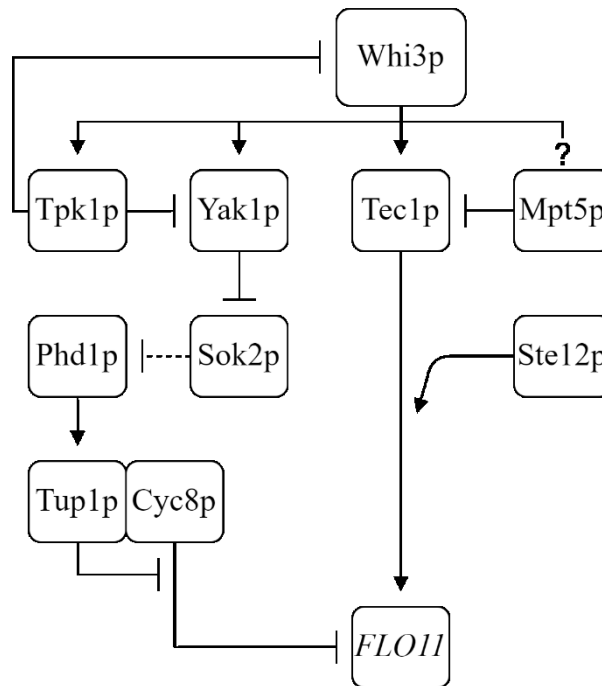
Yak1p inhibuje aktivitu Sok2p, negativně regulujícího Phd1p (Pan *et al.*, 2000). Transkripční faktor Phd1p interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p a dochází k inhibici aktivity Cyc8p, který je represorem *FLO11* (Schladebeck *et al.*, 2013, Nguyen *et al.*, 2018). Yak1p je také jedním z aktivátorů transkripčních faktorů obecné stresové odpovědi Msn2p/Msn4p (Malcher *et al.*, 2011, Schladebeck *et al.*, 2013).

Při nedostatku glukózy se Yak1p přesouvá do jádra, kde fosforyluje Pop2p a tím zabraňuje vstupu do G1 fáze. Tím posiluje účinek Whi3p při regulaci buněčného cyklu. Pop2p je součástí deadenylačního komplexu Ccr4p-Not1p, se kterým kooperuje Whi3p i Mpt5p (Moriya *et al.*, 2001).

Whi3p pozitivně reguluje expresi Tpk1p, katalytické podjednotky PKA, která je negativním regulátorem Yak1p. Fosforylace Yak1p v pozicích S206, S240, and S295 inaktivuje Yak1p, naopak absence těchto míst má pozitivní efekt na expresi *FLO11* (Zhu *et al.*, 2000, Malcher *et al.*, 2011). Podle Malchera *et al.* (2011) je pravděpodobné, že je Whi3p aktivní zejména ve stresových podmínkách, kdy aktivuje Yak1p a tím i filamentární růst. Za těchto podmínek zároveň inhibuje vstup do G1 fáze. Ve stresových podmínkách je aktivita Tpk1p nízká. Je možné, že v závislosti na vnějších i vnitřních podmínkách Whi3p může regulovat expresi *FLO11* a fenotypů závislých na Flo11p pozitivní i negativní regulací Yak1p, vytvářením pólů aktivity Yak1p (Schladebeck *et al.*, 2013). Mizunuma *et al.* prokázali, že Tpk1p inhibuje i aktivitu Whi3p fosforylací v pozici S568. Fosforylace Whi3p byla detekována za normálních podmínek růstu v YPD médiu (2% glukóza) (Mizunuma *et al.*, 2013).

Whi3p váže rovněž mRNA *MPT5* (alias *PUF5*), kódující RNA-vazebný protein, který je represorem filamentárního růstu (Prinz *et al.* 2007), zároveň však pozitivně ovlivňuje integritu buněčné stěny a oddaluje senescenci (Kaeberlein a Guarente 2002, Stewart *et al.*, 2007). Delece genu podmiňuje filamentární růst. Mpt5p inhibuje expresi *TEC1* a *PHD1* na post-transkripční úrovni, váže se na 3'konec mRNA *TEC1* a interakcí s polyadenylačním komplexem Ccr4p-Not1p podmiňuje její degradaci. Kompetuje tedy s Whi3p (Prinz *et al.* 2007, Schladebeck *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2018) sledovali osud RNA vázaných s Mpt5p v P-bodies při nedostatku glukózy. Podle jejich analýzy ne všechny RNA vázané na Mpt5p musí být v P-bodies degradovány. Vztah mezi *TEC1* a *MPT5* je opět složitější, Madhani *et al.* (1999) prokázal, že se proteiny Tec1p a Ste12p podílejí na regulaci exprese *MPT5*.

Vliv Whi3p na expresi Flo11p



Obr. 2.6. Role Whi3p v regulaci Flo11p. Whi3p pozitivně reguluje hladinu transkripčního faktoru Tec1p, který se v komplexu se Ste12p váže na promotorovou sekvenci *FLO11* a pozitivně reguluje jeho expresi. Whi3p má pozitivní vliv na aktivitu kinázy Yak1p, která inhibuje aktivitu Sok2p. Sok2p nepřímo inhibuje transkripční faktor Phd1p, který interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8. Phd1p prostřednictvím Tup1p stimuluje potlačení aktivity Cyc8p, který je represorem transkripce *FLO11*. Kináza Tpk1p inhibuje Yak1p i Whi3p. T-koncová čára znázorňuje inhibici, čára se šipkou – aktivace, přerušovaná T-koncová čára – genetickou interakci (vytvořeno podle Pan *et al.*, 2000, Malcher *et al.*, 2011, Schladebeck *et al.*, 2013, Nguyen *et al.*, 2018).

2.5 Osmotický stres a HOG dráha

V místech svého přirozeného výskytu se kvasinkové populace mohou setkat s rychlými změnami osmolarity prostředí. Podobné změny představují pro buňky stres, protože vyrovnání rozdílu vnějšího a vnitrobuněčného osmotického potenciálu vede ke změně objemu buňky a jejímu poškození nadměrným příjmem, či přílišným úbytkem vody.

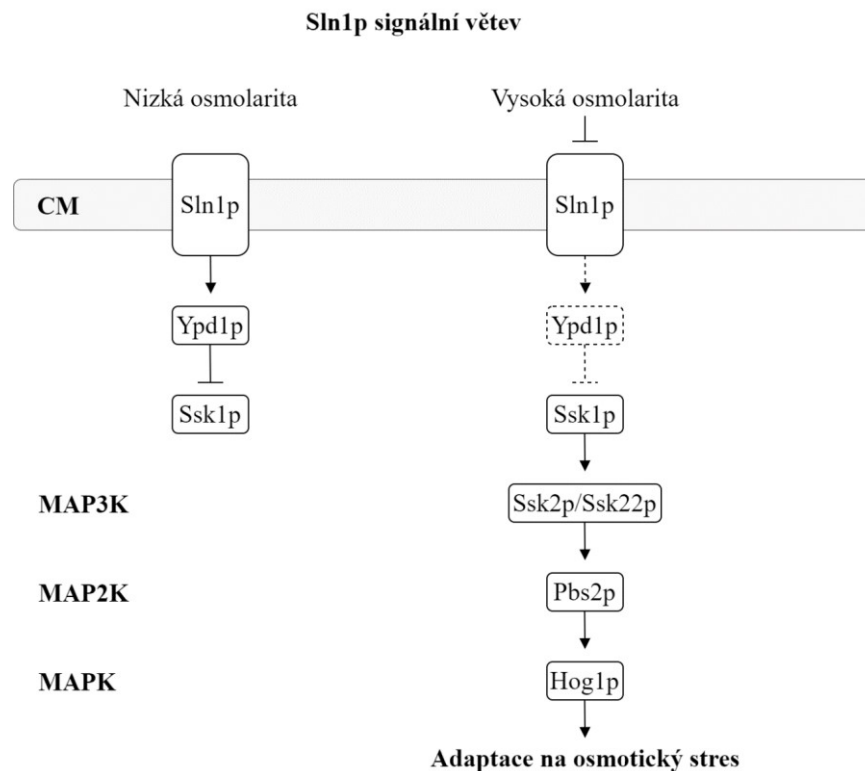
Buněčná odpověď na vysokou osmolaritu prostředí a změnu objemu buňky je hlavně zajištěna HOG (High Osmolarity Glycerol) drahou, jejíž aktivace vede ke změně globální genové exprese, ke změnám v aktivitě enzymů, k zastavení buněčného cyklu, ke změně vnitrobuněčné osmolarity syntézou buněčných osmolytů a ke změnám transportních systémů (Hohmann 2002, Proft *et al.*, 2004, Saito *et al.*, 2012, Talemi *et al.*, 2016).

2.5.1 Aktivace HOG dráhy: Sln1p

HOG dráha je aktivovaná dvěma nezávislými drahami, závislými na proteinech Sln1p a Sho1p. Průběh aktivace HOG dráhy pomocí Sln1p cestou je znázorněn na obrázku 2.7. Při nízké osmolaritě prostředí se transmembránová kináza Sln1p aktivuje autofosforylací. Fosforylovaný Sln1p přenáší fosfátovou skupinu přes fosfotransferázu Ypd1p na Ssk1p (reguluje aktivitu MAP3K Ssk2p/Ssk22p). Fosforylovaný Ssk1p je neaktivní, a proto nedochází k aktivaci Hog1p.

Za podmínek vysoké osmolarity (v testech byly submerzně kultivované buňky vystaveny krátkému (cca 1 min) osmotickému stresu 0,4 M NaCl) se Sln1p neaktivuje, a proto dochází k akumulaci nefosforylovaného Ssk1p, který následně aktivuje MAP kinázovou kaskádu, vedoucí k aktivaci Hog1p. Tudiž, Sln1p-Ypd1p-Ssk1p systém působí jako negativní regulátor HOG dráhy při nízké osmolaritě, ale v hyperosmotických podmínkách ji aktivuje (Posas *et al.*, 1996, Hohmann 2002).

Experimenty Vallejo *et al.* ukazují, že Hog1p může být aktivován nejen osmotickým stresem, ale i při hladovění po glukóze. Aktivace Hog1p je zajištěna zpomalením degradace nefosforylovaného Ssk1p dosud nejasným mechanismem, který nesouvisí ani se změnou jeho lokalizace, ani se snížením jeho úrovně ubiquitinace (Vallejo *et al.*, 2015).



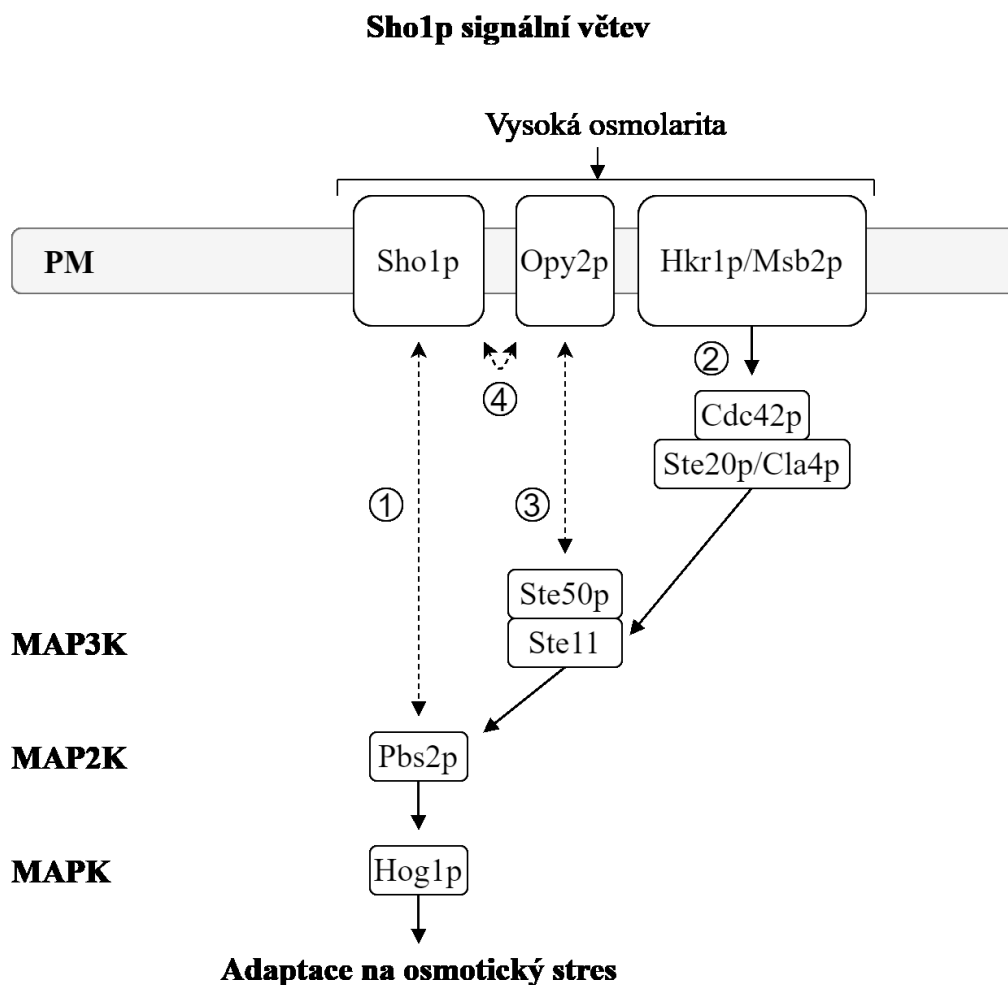
Obr. 2.7. Schéma aktivace HOG dráhy signální cestou, závislou na Sln1p. Za podmínek osmotického stresu dochází k inhibici transmembránového osmosensoru Sln1p, který je pozitivním regulátorem Ypd1p, represoru Ssk1p. Dereprese Ssk1p vede k aktivaci MAP kinázové kaskády, vedoucí k aktivaci Hog1p. T-koncová čára znázorňuje inhibice (převzato a upraveno podle Vallejo *et al.*, 2015).

2.5.2 Aktivace HOG dráhy: Sho1p

HOG dráha může být alternativně aktivována pomocí transmembránového osmosensoru Sho1p, tato regulační kaskáda je znázorněna na obrázku 2.8. V hyperosmotických podmínkách (za účasti různých adaptorových proteinů) dochází postupně k následujícím změnám:

- 1) MAP2K Pbs2p se váže na transmembránový osmosensor Sho1p
- 2) Funkčně duplicitní kinázy Ste20p/Cla4p se vážou na duplicitní transmembránové ko-osmosensory Hkr1p/Msb2p prostřednictvím malé GTPázy Cdc42p
- 3) Na transmembránový protein Opy2p se váže MAP3K Ste11p pomocí adaptorového proteinu Ste50p
- 4) Opy2p s navázaným Ste50p se váže na Sho1p a tím usnadňuje interakci mezi Pbs2p a Ste11p

Výše uvedené proteiny tvoří Pbs2p-aktivační komplex. Interakcí duplicitních transmembránových ko-osmosensorů Hkr1p/Msb2p s malou GTPázou Cdc42p dochází k aktivaci duplicitních kináz Ste20p/Cla4p, které fosforylují MAP3K Ste11p. Fosforylovaný Ste11p aktivuje fosforylaci Pbs2p. V přítomnosti fosforylovaného Pbs2p Pbs2p-aktivační komplex rychle disociuje. Uvolněný fosforylovaný Pbs2p následně aktivuje Hog1p (Raitt *et al.*, 2000, Tatebayashi *et al.*, 2006, Takayama *et al.*, 2019).



Obr. 2.8. Schéma aktivace HOG dráhy signální cestou, závislou na Sho1p. Za podmínek osmotického stresu dochází ke tvorbě Pbs2p-aktivačního komplexu, jehož tvorba znázorněna pomocí jednotlivých děje: 1) MAP2K Pbs2p se váže na osmosensor Sho1p, 2) kinázy Ste20p/Cla4p se vážou na ko-osmosensory Hkr1p/Msb2p prostřednictvím Cdc42p, 3) transmembránový protein Opy2p se váže na MAP3K Ste11p pomocí adaptorového proteinu Ste50p, 4) Opy2p s navázaným Ste50p se váže na Sho1p, čímž usnadňuje interakci mezi Pbs2p a Ste11p. Interakcí proteinů Pbs2p-aktivačního komplexu dochází k fosforylaci Pbs2p, který následně aktivuje Hog1p. Oboustrannou šipkou jsou označeny vazebné interakce, které usnadňují interakci proteinů v Pbs2p-aktivačním komplexu. PM - plazmatická membrána (převzato a upraveno podle Tatebayashi *et al.*, 2020).

2.5.3 Jiné způsoby aktivace HOG dráhy

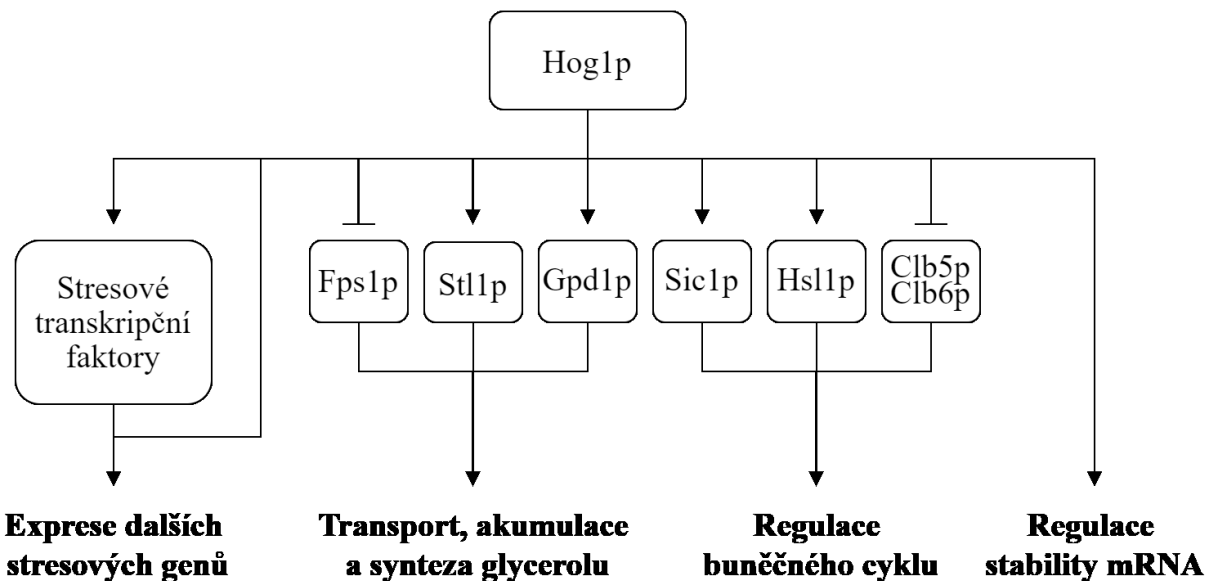
U mutantních kmenů, které mají obě signální dráhy defektní, za podmínek velmi vysoké osmolarity (>1M NaCl) přesto dochází k aktivaci HOG dráhy neznámým mechanismem. V nedávné práci Tatebayashi *et al.* ukázali, že MAP3K (Ste11p, nebo Ssk2p/Ssk22p) nejsou na rozdíl od Pbs2p esenciální pro aktivaci Hog1p. Jejich experimenty ukázaly, že Pbs2p je fosforylován signálem Sln1p dráhy na obou aktivačních místech (Ser514 a Thr518), přestože při aktivaci Sho1p dráhy je fosforylován jenom Thr518.

Monofosforylovaný (Thr518) Pbs2p je schopný aktivovat Hog1p jenom při osmotickém stresu (10 min působení 1 M NaCl). Přesný mechanismus dané interakce Pbs2p a Hog1p nebyl prostudován, ale předpokládá se, že vysoká externí osmolarita může způsobit konformační změny Hog1p, které umožňují jeho aktivaci monofosforylovaným Pbs2p (Vázquez-Ibarra *et al.*, 2019, Tatebayashi *et al.*, 2020).

2.5.4 Hog1p a jeho funkce

Signální dráhy Sln1p a Sho1p konvergují na Pbs2p (MAP2K), regulujícího aktivitu MAP kinázy Hog1p. Po rychlé dvojité fosforylaci je MAP kináza Hog1p, která je za normálních podmínek rovnoměrně rozložena mezi jádrem a cytoplasmou, aktivována a následně přemístěna do jádra, v němž fosforyluje a aktivuje transkripční faktory, čímž stimuluje expresi více než 50 stresových genů (Hohmann. 2002, García-Marqués *et al.*, 2015).

Přehled funkcí Hog1p



Obr. 2.9. Přehled funkcí Hog1p. Za podmínek vysoké osmolarity Hog1p reguluje expresi řady stresových transkripčních faktorů, ovlivňuje transport, akumulaci a syntézu glycerolu pomocí membránového kanálu Fps1p, membránové pumpy Stl1p a aktivací GPD1, kódujícího glycerol-3-fosfát dehydrogenázu. Aktivita Hog1p snižuje stabilitu široké škály mnoha mRNA a zároveň zvyšuje stabilitu mRNA některých stresových genů. Hog1p způsobuje dočasné zastavení buněčného cyklu v jeho různých fázích přímou, nebo nepřímou interakcí s regulátory buněčného cyklu, jako inhibitor CDK (cyclin-dependent kinase) Sic1p, cyklíny Clb5p a Clb6p, Hsl1p kinázy, která následně způsobuje inhibici katalytické podjednotky CDK Cdc28p (vytvořeno podle Clotet *et al.*, 2006, Romero-Santacreu *et al.*, 2009, Yaakov *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2013, Petelenz-Kurziel *et al.*, 2013).

Hog1p hraje důležitou roli v regulaci syntézy, akumulaci a transportu glycerolu jako buněčného osmolytu. Za podmínek vysoké osmolarity Hog1p inaktivuje membránový kanál Fps1p (fosforylací jeho pozitivního regulátoru Rgc2p), čímž inhibuje export glycerolu z buňky; nepřímo aktivuje membránový protein Stl1p, který umožňuje buňce pumpovat glycerol zpátky do cytosolu. Syntéza glycerolu za podmínek hyperosmotického stresu je zajištěna pomocí *GPD1* (Lee *et al.*, 2013, Petelenz-Kurdziel *et al.*, 2013). Hog1p aktivuje transkripci *GPD1* hlavně za účasti transkripčního faktoru Hot1p. Jeho delece výrazně snižuje asociaci Hog1p s promotorovou sekvencí *GPD1* (Alepuz *et al.*, 2001).

Westfall *et al.* (2008) a García-Marqués *et al.* (2015) studovali vliv lokalizace Hog1p na indukci exprese *GPD1* při osmotickém stresu a při indukci UPR (unfolded protein response), signální dráhy, vedoucí k syntéze chaperonů a enzymů, které se zúčastní procesu sbalení proteinů. Buňky s Hog1p trvale vázaným na plazmatickou membránu byly schopné aktivovat transkripci *GPD1* za obou podmínek, lokalizace Hog1p v jádře není při krátkodobém osmotickém stresu nezbytná. Absence Hog1p v cytoplazmě u buněk produkujících Hog1p s NLS (nuclear localization signal) z SV40 narušila jejich schopnost aktivovat UPR, odpověď na osmotický stres byla zachována (Westfall *et al.*, 2008, García-Marqués *et al.*, 2015).

Aktivovaný Hog1p ovlivňuje stabilitu mRNA. Za podmínek krátkého mírného osmotického stresu, vyvolaného 0,4 M NaCl se snižuje stabilita široké škály mRNA, ale zároveň dochází ke stabilizaci některých mRNA, jejichž exprese je indukovaná osmotickým stresem (Romero-Santacreu *et al.*, 2009).

Hog1p způsobuje dočasné zastavení buněčného cyklu v jeho různých fázích přímou, nebo nepřímou interakcí s regulátory buněčného cyklu. Za podmínek osmotického stresu (0,4 M NaCl) Hog1p fosforyluje a stabilizuje Sic1p, inhibitor CDK (cyclin-dependent kinase), čímž inhibuje přechod buňky do S fáze. U buněk, které prošly STARTem, kontrolním bodem pro přechod mezi G1 a S fázemi, Hog1p způsobuje prodloužení S fáze tím, že ovlivňuje expresi genů kódujících cykliny Clb5p a Clb6p, a interaguje s replikačním komplexem (Yaakov *et al.*, 2009).

Hog1p rovněž ovlivňuje přechod buňky do mitotické fáze. Fosforylací Hsl1p kinázy Hog1p zvyšuje akumulaci Swe1p kinázy, která inhibuje katalytickou podjednotkou CDK Cdc28p. Hog1p také negativně reguluje hladinu cyklinu Clb2p, což spolu s akumulací Swe1p oddaluje přechod do M fáze (Clotet *et al.*, 2006).

Mas *et al.* ukázali, že za podmínek osmotického stresu (vyvolaného sorbitolem a NaCl) Hog1p přímo interaguje s RSC komplexem remodelace chromatinu a způsobuje jeho asociaci s geny, jejichž exprese je indukovaná stresem (Mas *et al.*, 2009).

Hog1p aktivuje důležité transkripční faktory obecné stresové odpovědi, Msn2p a jeho paraloga Msn4p, regulující stovky genů za různých stresových podmínek prostředí (Capaldi *et al.*, 2008, Sadeh *et al.*, 2011).

2.5.5 Zpětnovazební regulace HOG dráhy

Syntéza a akumulace glycerolu, jako buněčného osmolytu, vede k normalizaci vnitrobuněčné osmolarity a následně k defosforylaci Hog1p, jeho exportu z jádra za účasti homologu importinu- β Xpo1p. Za defosforylaci Hog1p jsou zodpovědné Ser/Thr fosfatázy Ptc1p, Ptc2p, Ptc3p a Tyr fosfatázy Ptp2p, Ptp3p. Fosfatáza Ptp2p je lokalizována v jádře (na rozdíl od cytoplasmatické Ptp3p) a předpokládá se, že hraje hlavní roli v defosforylaci Hog1p na Tyr-176 (Mattison *et al.*, 2000, Vázquez-Ibarra *et al.*, 2018).

Po aktivaci, Hog1p fosforyluje svůj upstream aktivátor Ssk2p (a pravděpodobně Ssk1p), čímž ho inaktivuje a tím zabraňuje své další aktivaci signální drahou závislou na Sln1p (Sharifian *et al.*, 2015).

2.5.6 Interakce HOG s FG MAPK drahou

MAPK signální dráhy jsou konzervovány u eukaryot včetně kvasinek a sdílejí mezi sebou některé komponenty. Pro zajištění aktivace správné signální dráhy jako odpovědi na vnější či vnitřní signály a zároveň zabránění aktivace konkurenčních drah, buňky musejí mít sofistikovaný systém regulace.

Dráha filamentárního růstu FG a dráha HOG sdílejí MAP3K Ste11p a většinu upstream proteinů (Sho1p, Msb2p a Opy2p, Ste50p, Cdc42p, Ste20p). Aktivace HOG dráhy za podmínek osmotického stresu vede k aktivaci-MAPK Kss1p, který je součástí FG dráhy. Aktivace Kss1p je pouze dočasná, protože aktivní Hog1p fosforyluje Ste50p, společný adaptorový protein obou drah, což následně inhibuje další aktivaci FG dráhy (Hao *et al.*, 2008).

Transmembránový osmosensor Msb2p je rovněž součástí HOG a FG. Msb2p se přes malý GTPázový protein Cdc42 váže na Ste20p a společně aktivují MAP3K Ste11p. Delece mucinové domény Msb2p, nebo defekt v její glykosylaci, způsobuje zvýšenou aktivitu FG dráhy za normálních podmínek, při osmotickém stresu (0,5 M KCl) je aktivace FG výraznější. Glykosylace je závislá na přítomnosti odpovídajících cukrů nebo jejich derivátů v prostředí, a proto nízká aktivita glykosylačního aparátu může mimikovat hladovění buňky. Lien *et al.* navrhli hypotézu, že úroveň glykosylace Msb2p je jedním ze způsobů aktivace FG dráhy (Lien *et al.*, 2013).

2.6 Transkripční faktory *YAP* rodiny

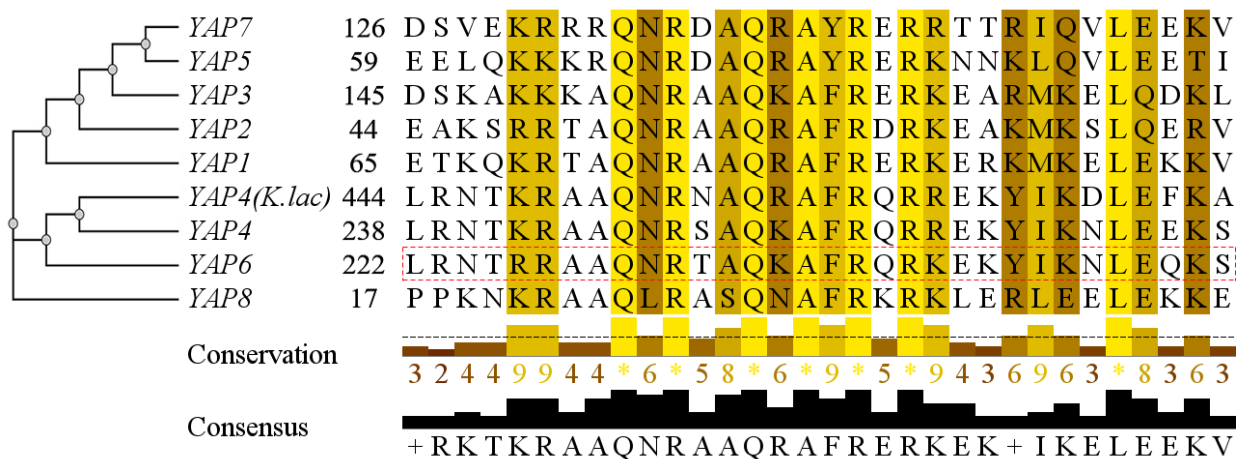
HOG dráha reguluje aktivitu řady transkripčních faktorů, které zajišťují buněčnou odpověď na osmotický, oxidační a teplotní stres, do nichž také patří někteří zástupci rodiny *YAP*.

Rodina bZIP (basic leucine-zipper) proteinů *YAP* (Yeast homolog of AP-1), která je konzervovanou skupinou u všech eukaryot, patří do skupiny transkripčních faktorů, které se aktivují ve stresových podmínkách. U kvasinek se většinou vyskytují jako homodimery, ale u mnohobuněčných organismů tvoří i heterodimery (Reinke *et al.*, 2013). Genomy hub obvykle obsahují 3 až 4 členy této proteinové rodiny, ale *S. cerevisiae* jich obsahuje 8 (*Yap1p* až *Yap8p*), což je důsledkem celogenomové duplikace (WGD), která nastala během evolučního vývoje (Wolfe *et al.*, 2015).

V dané kapitole budou postupně probrány zástupci rodiny *YAP*, jejich známé funkce a regulace. V tabulce 2.1 je uveden stručný přehled členů rodiny a typu stresu, který indukuje jejich aktivitu. Proteiny dané rodiny sdílejí mezi sebou poměrně nízký stupeň identity na úrovni aminokyselin (maximální hodnoty identity vykazují paralogy *Yap4p* a *Yap6p* – 20%), nejvíc zachovanou mají DNA-vazebnou část bZIP domény (Obr. 2.10).

Tabulka 2.1. Přehled členů rodiny *YAP* a stresů, které je aktivují

| Člen rodiny | Stres indukující aktivitu |
|-------------|------------------------------|
| <i>YAP1</i> | Oxidační stres |
| <i>YAP2</i> | Oxidační stres |
| <i>YAP3</i> | Oxidační stres (hydrochinon) |
| <i>YAP4</i> | Osmotický a oxidační stres |
| <i>YAP5</i> | Oxidační stres (Fe) |
| <i>YAP6</i> | Osmotický a oxidační stres |
| <i>YAP7</i> | NO-stress |
| <i>YAP8</i> | Oxidační stres (As(III)) |



Obr. 2.10. Porovnání konzervované části bZIP (Basic Leucine Zip) domény členů rodiny YAP. V dolní části obrázku je znázorněna konsensus sekvence DNA-vazebné části bZIP domény, vytvořena z porovnání sekvencí. Intenzita zbarvení znázorňuje stupně zachování fyzikálně-chemických vlastností aminokyselin. Zdrojem sekvencí proteinů je databáze www.yeastgenome.org. Alignment sekvencí byl proveden pomocí Clustal Omega (1.2.4). Alignment byl zpracován v Jalview (2.11.1.3). Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí FastME (2.1.6.1.1).

2.6.1 YAP1

Z hlediska funkcí a sekvence je *YAP1* nejvíce konzervovaný člen z celé rodiny. Podílí se na obraně buňky proti oxidačnímu stresu, způsobeného jak metabolickou činností buněk, tak i kovy, jako kadmium, železo, rtuť, kobalt, chrom a měď⁴. Mutanty s delecí *YAP1* vykazují zvýšenou citlivost ke kadmium a H₂O₂. Yap1p reguluje expresi *YCF1*, kódujícího vakuolární transportér, který napomáhá kompartmentalizaci arsenu a kadmia. Přispívá k regulaci detoxifikace arseničnanů regulací exprese *ACR2* a *ACR3*. *YAP1* je nepřímý represor genu *FET4*, který kóduje nízkoafinitní transportér železa (a jiných bivalentních kovů). Represe *FET4* je zprostředkována pozitivní regulací exprese *ROX1*, který kóduje represor anaerobních genů, včetně *FET4* (Rox1p také negativně reguluje expresi *FET4* za aerobních podmínek). Přestože represe transportéru by měla snižovat příjem dalších toxických kovů z prostředí, represe genu *FET4* nevykazuje výrazný efekt na příjem toxických kovů buňkou (Pimentel *et al.*, 2014, Caetano *et al.*, 2015, Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019).

Regulace aktivity Yap1p je hlavně zajištěna změnou jeho koncentrace v jádru. Za normálních fyziologických podmínek je vyšší hladina Yap1p v cytoplazmě než v jádře. Yap1p obsahuje na N- a C- koncích domény bohaté na cystein, zvané CRD (cysteine-rich domains), které určují jeho buněčnou lokalizaci za různých podmínek (Isoyama *et al.*, 2001, Azevedo *et al.*, 2007).

Za podmínek stresu, způsobeného H_2O_2 , je Yap1p akumulován v jádru. Dochází k interakcím cCRD (C-terminální CRD) a nCRD (N-terminální CRD) s aktivní formou Hyr1p peroxidázy, která je senzorem H_2O_2 a je nezbytná k aktivaci Yap1p (v literatuře se také označuje jako Orp1p a Gpx3p). Oxidovaný zbytek Cys36 v proteinu Hyr1p (-SOH) interaguje s Cys598 Yap1p za vzniku disulfidového můstku. Změna konformace následně umožňuje Yap1p vytvořit můstek mezi Cys598 a Cys303 Yap1p, který je v dané formě aktivní. Interakce Yap1p a Hyr1p je zprostředkována proteinem Ybp1p, který napomáhá tvorbě disulfidového můstku mezi Yap1p a Hyr1p. Aktivní forma Yap1p není schopná vázat exportin Crm1p, což vede k akumulaci Yap1p v jádru (Veal *et al.*, 2003, Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019).

Aktivace Yap1p působením kadmia, selenu, nebo jiných thiol-reaktivních látek, jako methylmethansulfonát, rtuť a benomyl, probíhá odlišným mechanismem. Daný způsob aktivace zahrnuje jenom C-terminální CRD a je spojen s modifikacemi Cys598, Cys620, Cys629, které brání vazbě exportinu Crm1p. Podobný mechanismus se uplatňuje v regulaci buněčné lokalizace Yap2p (Azevedo *et al.*, 2003, 2007).

2.6.2 YAP2 (CAD1)

Standardní jméno - *CAD1*. Podílí se na regulaci genů, spojených s detoxifikací ROS a kadmia. Přestože v důsledku jeho overexprese buňky mají zvýšenou rezistenci ke Cd^{2+} a Zn^{2+} , delece *YAP2* nezpůsobuje výrazné zvýšení senzitivity k daným látkám (funkční *YAP1* je schopný částečně kompenzovat deleci *YAP2*) (Bilsland *et al.*, 2004). Yap2p a Yap1p mají hodně společných cílů, ale nejsou redundantní, zejména za podmínek stresu vyvolaného působením H_2O_2 , regulují aktivitu různých regulonů (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019).

MAPK-aktivována kináza Rck1p (je součástí signální dráhy buněčné odpovědi na oxidativní stres a stresy spojené s buněčnou stěnou) fyzicky interaguje s Yap2p a inhibuje jeho aktivitu. Inhibice spočívá ve zkrácení doby, po kterou se Yap2p nachází v jádru za podmínek stresu způsobeného kadmii, a tím pravděpodobně snižuje stabilitu Yap2p. Delece *RCK1* zvyšuje rezistenci buněk ke kadmiu, způsobuje overexpresi *FRM2* (oxidoreduktáza, negativně regulující metabolismus mastných kyselin; je cílem Yap2p) a zvyšuje senzitivitu k tBOOH (terc-Butylhydroperoxid), která je potlačena v kmenech s overexpresí *YAP2* (Bilsland *et al.*, 2004, Bang *et al.*, 2012, Mazzola *et al.*, 2015).

C-terminální doména Yap2p má vysokou podobnost s cCRD (C-terminal cysteine-rich domain) Yap1p, což je příčinou podobné regulace jejich lokalizace v buňce v případě Cd^{2+} jako stresoru. Za normálních podmínek je většinou lokalizován v cytoplazmě, z důvodu vyšší efektivity jeho exportu z jádra než importu, za účasti exportinu Crm1p. V přítomnosti Cd^{2+} dochází k vazbě Cd^{2+} na cysteinové zbytky (Cys391 (esenciální pro danou interakci), Cys356/Cys387) cCRD Yap2p, které inhibují export z jádra, závislý na Crm1p. Vazba Cd^{2+} na cCRD Yap2p způsobuje akumulaci Yap2p v jádře (Azevedo *et al.*, 2007).

2.6.3 YAP3

Pro daný transkripční faktor ještě nebyly nalezeny cílové geny. Předpokládá se, že se podílí na buněčné odpovědi na hydrochinon, indukující tvorbu ROS a poškození DNA. V přítomnosti hydrochinonu se Yap3p začíná akumulovat v jádře a kmeny s delecí *YAP3* mají zvýšenou citlivost na hydrochinon (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019, North *et al.*, 2011).

2.6.4 YAP4/YAP6

YAP4 (standardní jméno *CIN5*) a *YAP6* (*HAL4*) jsou součástí HOG dráhy. Mezi cílové geny transkripčního faktoru Yap4p patří geny kódující proteiny spojené s transportem hexóz, katabolismem glukózy, etanolu a proteiny s oxidoreduktázovou aktivitou. K indukci exprese *YAP4* dochází hlavně za podmínek hyperosmotického a oxidačního stresu. Za podmínek vysoké osmolarity prostředí je exprese *YAP4* závislá na transkripčním faktoru Msn2p, který je mimo jiné regulován Hog1p. Kmeny s delecí *MSN2* vykazují pokles exprese *YAP4* o 75%. Overexprese *YAP4* (a *YAP6*) také zvyšuje toleranci buněk k Na^+ , Li^+ a cis-platině (Mendizabal *et al.*, 1998, Nevitt *et al.*, 2004, Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010, 2019).

Yap4p přispívá k regulaci exprese *GCY1* (kóduje glycerol dehydrogenázu, která hraje roli v katabolismu D-xylózy, arabinózy a glycerolu), *GPP2* (kódujícího glycerol-3-fosfat fosfatázu, hraje roli v biosyntéze glycerolu) a *DCS2* (homolog *DCS1*, hraje roli v degradaci mRNA, lokalizován do P-tělísek) (Nevitt *et al.*, 2004).

Yap4p a Yap6p mají stupeň identity na úrovni aminokyselin kolem 20% (s nejvyšší homologií v oblasti bZIP domény), nejvyšší ze všech členů dané rodiny. Yap4p a Yap6p sdílejí 73-86% cílových genů, ale Yap6p specificky reguluje expresi genů, kódujících ribozomální proteiny (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019).

Oba proteiny jsou převážně lokalizované v jádru a aktivují se za podmínek osmotického, oxidativního, teplotního stresu a během stacionární fáze (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010, 2019).

Yap6p a Yap4p fyzicky interagují s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p a zprostředkují jeho vazbu do promotoru cílových genů. Deleci *TUP1* dochází k výrazné derepresi daných genů. Podobným způsobem za podmínek dostatečné koncentrace živin v prostředí dochází k represi *IME1*, kódujícího klíčový transkripční faktor pro vstup buňky do meiózy. V $\Delta yap6/\Delta sok2/\Delta phd1$ kmenech dochází ke snížené asociaci komplexu Tup1p-Cyc8p s promotorem *IME1* a k jeho zvýšené expresi. Nicméně, delece jenom jednoho z daných transkripčních faktorů neměla výrazný vliv na expresi *IME1* (Hanlon *et al.*, 2011, Tam *et al.*, 2020). Předpokládá se, že Yap6p interaguje s proteiny Sok2p a Phd1p, které se podílí na regulaci filamentárního růstu (MacIsaac *et al.*, 2006).

2.6.4.1 Struktura Yap6p

YAP6 kóduje 383 aminokyselin dlouhý protein, u něhož byla popsána jenom bZIP (Basic Leucine Zipper) doména, která je lokalizována v oblasti 221-284 (www.uniprot.org). Yap4p/Yap6p se vážou na specifickou sekvenci TTACGTAA, zvanou YRE-A (Yeast Response Element) v promotoru svých cílových genů (Fujii *et al.*, 2000). Podle globální genomické analýzy Yap6p reguluje více než 1000 genů, mezi nimi i *WHI3* (Venters *et al.* 2011).

2.6.5 YAP5

Při zvýšené koncentrace železa v buňce, Yap5p aktivuje expresi genů, zodpovědných za zachycení volného železa v cytoplazmě (*TYWI*), transport do vakuoly (*CCCI*), a regulaci aktivity transkripčního faktoru *AFT1*, regulujícího geny pro příjem a metabolismus železa. Yap5p také aktivuje transkripci *CUPI*, kódujícího cytosolický protein, který váže měď (Gupta *et al.*, 2020, Pimentel *et al.*, 2012).

Yap5p je lokalizován v jádře a je vázán na promotory svých cílových genů, nezávisle na koncentraci železa v buňce (Li *et al.*, 2008). Předpokládá se, že k aktivaci dimeru Yap5p dochází po vazbě [2Fe–2S] ISC (iron-sulphide cluster) na CRD domény Yap5p, ale donor klastru dosud nebyl identifikován (Gupta *et al.*, 2020, Pimentel *et al.*, 2012).

Yap7p je paralog Yap5p, vznikl celogenomovou duplikací (Merhej *et al.*, 2015).

2.6.6 *YAP7*

Yap7p je málo prostudovaným transkripčním faktorem, ale je známo, že má funkci represoru genu *YHB1*, kódujícího flavohemoglobin, jehož funkcí je detoxifikace oxidu dusnatého (NO). Represe *YHB1* je závislá na Tup1p (Yap7p umožňuje vazbu Tup1p na promotor *YHB1*) a na interakci s regulačním komplexem Hap2p/Hap3p/Hap5p. Skupinou Merhej *et al.* (2015) bylo zjištěno, že laboratorní kmeny *S. cerevisiae* mají mutaci v *YAP7*, která způsobuje posun čtecího rámce a následnou translaci kratšího proteinu, který neinteraguje s Tup1p, a proto ztrácí schopnost inhibovat transkripci *YHB1*.

2.6.7 *YAP8 (ARR1)*

Standardní jméno – *ARR1*. Yap8p je klíčovým regulátorem buněčné detoxifikace arseničnanu a jeho DNA-vázaná forma je zároveň senzorem arseničnanů. Yap8p je konstitutivně lokalizován v jádře (nezávisle na přítomnosti As(III) v médiu) a je vázán na promotory svých cílových genů jako homodimer. K aktivaci dochází navázáním As(III) na 3 cysteiny (Cys132, 137, 274) v poměru přibližně 1 molekula Yap8p ku 1 molekule arseničnanu. Lokus genu *YAP8* leží v blízkosti jeho cílových genů: *ACR2* (kóduje As(V) reduktázu) a *ACR3* (As(III) efluxní pumpa). Na rozdíl od Yap1p, který je také schopen aktivovat transkripci *ACR2* a *ACR3*, má užší specializaci a reguluje transkripci jenom dvou daných genů za podmínek přítomnosti As(III) (Kumar *et al.*, 2015, Ilina *et al.*, 2008).

3 Cíle práce

- Zjistit, zda se interakce Whi3p a Yap6p mění v závislosti na stáří kolonie, zdroji uhlíku v médiu atd.
- Srovnat vliv genotypu *YAP6* u kmene s delecí *WHI3* na morfologii kolonií a na expresi *FLO11*.
- Srovnat vliv genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* ve stresových podmínkách.
- Srovnat vliv *YAP6* na expresi *FLO11* a morfologii kolonií s vlivem genů *TEC1* a *MPT5*, ev. dalších (*TUP1*, *CYC8*).

Dílčí úkoly:

- Připravit kmeny s mutacemi *YAP6*, *MPT5* a *TEC1* produkující fluorescenčně značený Flo11p.
- Optimalizovat podmínky pro kultivaci a měření fluorescence.
- Analyzovat produkci Flo11p v koloniích kmenů různého genotypu (*WHI3*, *YAP6/MPT5/TEC1*) během kultivace za standardních i stresových podmínek.
- Charakterizovat morfologii kolonií vybraných kmenů s mutacemi *WHI3* a *YAP6/MPT5/TEC1* a sledovat jejich citlivost vůči osmotickému stresu.

Při řešení diplomového projektu budu ověřovat následující hypotézy:

- Yap6p ovlivňuje expresi *FLO11*: delece *YAP6* u kmenů s delecí *WHI3* způsobí zvýšenou expresi *FLO11*, overexprese bude mít opačný efekt.
- Vliv *YAP6* na expresi *FLO11* je závislý na přítomnosti osmotického stresu a stáří kolonie.
- Yap6p je pod negativní kontrolou Whi3p.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganismy

Při řešení diplomového projektu byly použity následující mikroorganismy:

Saccharomyces cerevisiae BR-F – izolovaný prototrofní divoký kmen *S. cer.* MATa/MATa. Pochází ze sbírky Chemického institutu Akademie věd Slovenské republiky. Katalogové číslo ve sbírce je CCY 21-4-97.

Kmeny odvozeny od BR-F, které byly použité pro analýzy a přípravu nových kmenů pro účely dané práce, jsou popsane v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1. Seznam kmenů, použitých pro analýzy a přípravu nových kmenů.

| Název kmene | Genotyp | Číslo ve sbírce* | Rezistence |
|--|--|------------------|--------------------|
| | | 207 | |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ</i> | 902 | - |
| BR-F <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 1235 | - |
| BR-F <i>mpt5Δ/mpt5Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, mpt5Δ::KanMX /mpt5Δ::Nat,</i> <i>FLO11-DsRed/FLO11</i> | 1275 | Kan Nat |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, pFLO11-GFP-KanMX/</i> <i>FLO11</i> | 1817 | Kan |
| BR-F <i>pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, pFLO11-GFP-KanMX/FLO11</i> | 1840 | Kan |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ::KanMX /whi3Δ::Nat,</i> <i>FLO11-DsRed/FLO11</i> | 1865 | Kan Nat |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ,</i> <i>yap6Δ::Nat/yap6Δ::Hygr,</i> <i>KanMX/FLO11</i> <i>pFLO11-GFP-</i> | 1983 | Kan Nat Hygr |
| BR-F <i>mpt5Δ/mpt5Δ</i> <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, mpt5Δ/mpt5Δ</i> | 1997 | - |
| BR-F <i>tec1Δ/tec1Δ pFLO11-</i> <i>GFP</i> | <i>MATa/MATa, tec1Δ/tec1Δ, pFLO11-GFP-</i> <i>KanMX/FLO11</i> | 2045 | Kan |

*sbírka skupiny YCG (Yeast Colony Group)

4.1.2 Připravené kvasinkové kmeny

Pro účely dané práce byly připraveny kmeny, jejichž seznam je uveden v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2. Seznam kmenů, připravených pro danou práci.

| Název kmene | Genotyp | Číslo ve sbírce* | Rezistence |
|--|---|------------------|------------|
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>TEFYAP6 pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, Nat-p_{TEF}-YAP6/YAP6, whi3Δ/whi3Δ, p_{FLO11}-GFP-KanMX/FLO11</i> | 2007 | Kan Nat |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>mpt5Δ/mpt5Δ pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, mpt5Δ/mpt5Δ, p_{FLO11}-GFP-KanMX/FLO11</i> | 3001 | Kan |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>TEFTEC1 pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, Nat-p_{TEF}-TEC1/TEC1, p_{FLO11}-GFP-KanMX/FLO11</i> | 3002 | Kan Nat |
| BR-F <i>tec1Δ/tec1Δ</i> <i>TEFYAP6 pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, tec1Δ/tec1Δ, Nat-p_{TEF}-YAP6/YAP6, p_{FLO11}-GFP-KanMX/FLO11</i> | 3004 | Kan Nat |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3007 | - |
| BR-F <i>mpt5Δ/mpt5Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, mpt5Δ/mpt5Δ, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3010 | - |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, yap6Δ::KanM/YAP6, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3013 | Kan |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>TEFYAP6 FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, KanMX-p_{TEF}-YAP6/YAP6, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3016 | Kan |
| BR-F <i>yap6Δ FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, yap6Δ::KanMX/YAP6, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3017 | Kan |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>yap6Δ/yap6Δ FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, yap6Δ::Nat/yap6Δ::KanMX, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3028 | Kan Nat |
| BR-F <i>yap6Δ/yap6Δ</i> <i>FLO11p-DsRed</i> | <i>MATa/MATa, yap6Δ::KanMX/yap6Δ::Nat/YAP6, FLO11-DsRed/FLO11</i> | 3032 | Kan Nat |
| BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ</i> <i>mpt5Δ/mpt5Δ pFLO11-GFP</i> | <i>MATa/MATa, whi3Δ/whi3Δ, mpt5Δ/mpt5Δ, p_{FLO11}-GFP-KanMX/FLO11</i> | 3034 | Kan |

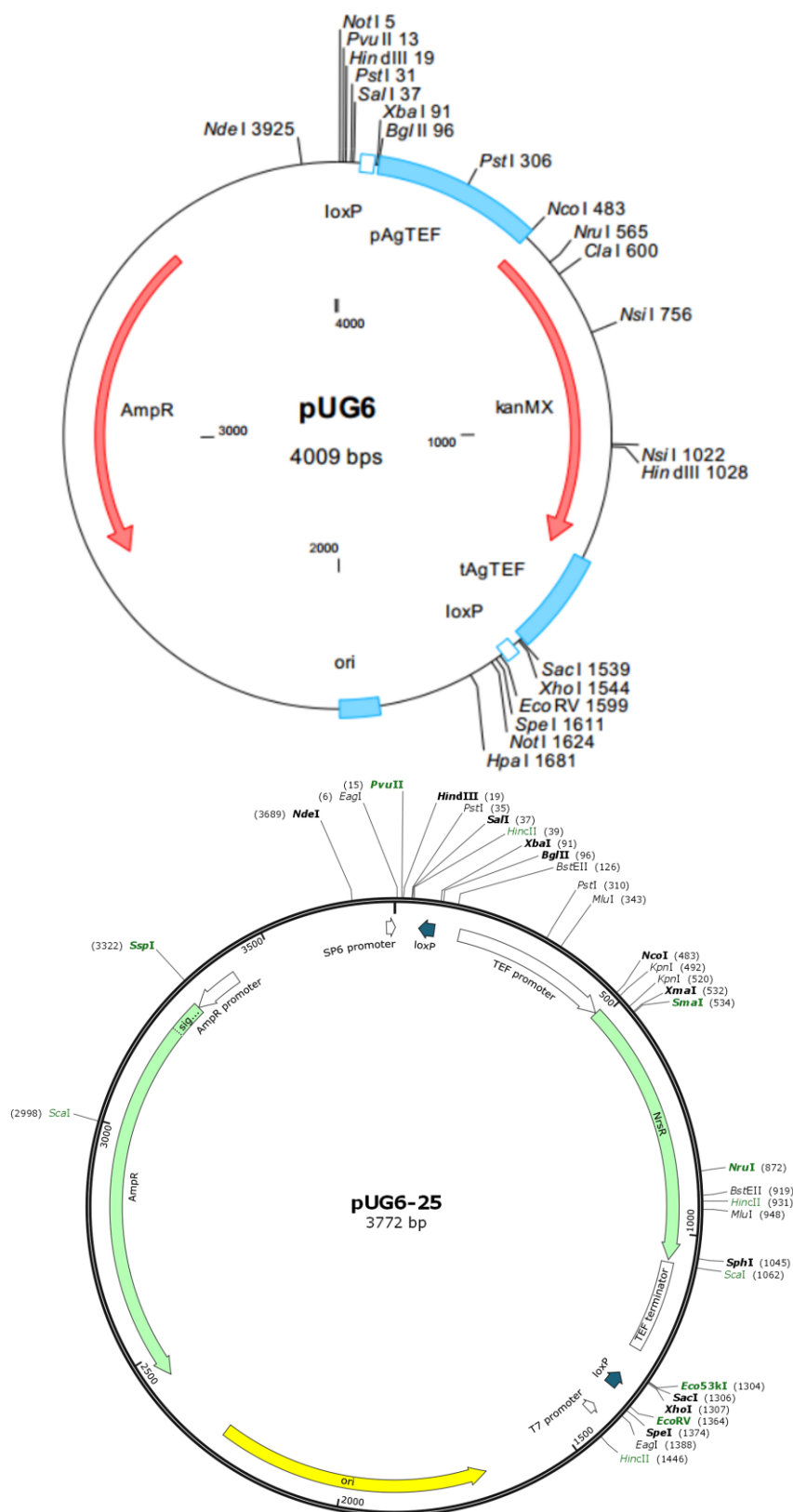
*sbírka skupiny YCG (Yeast Colony Group)

4.1.3 Použité plazmidy

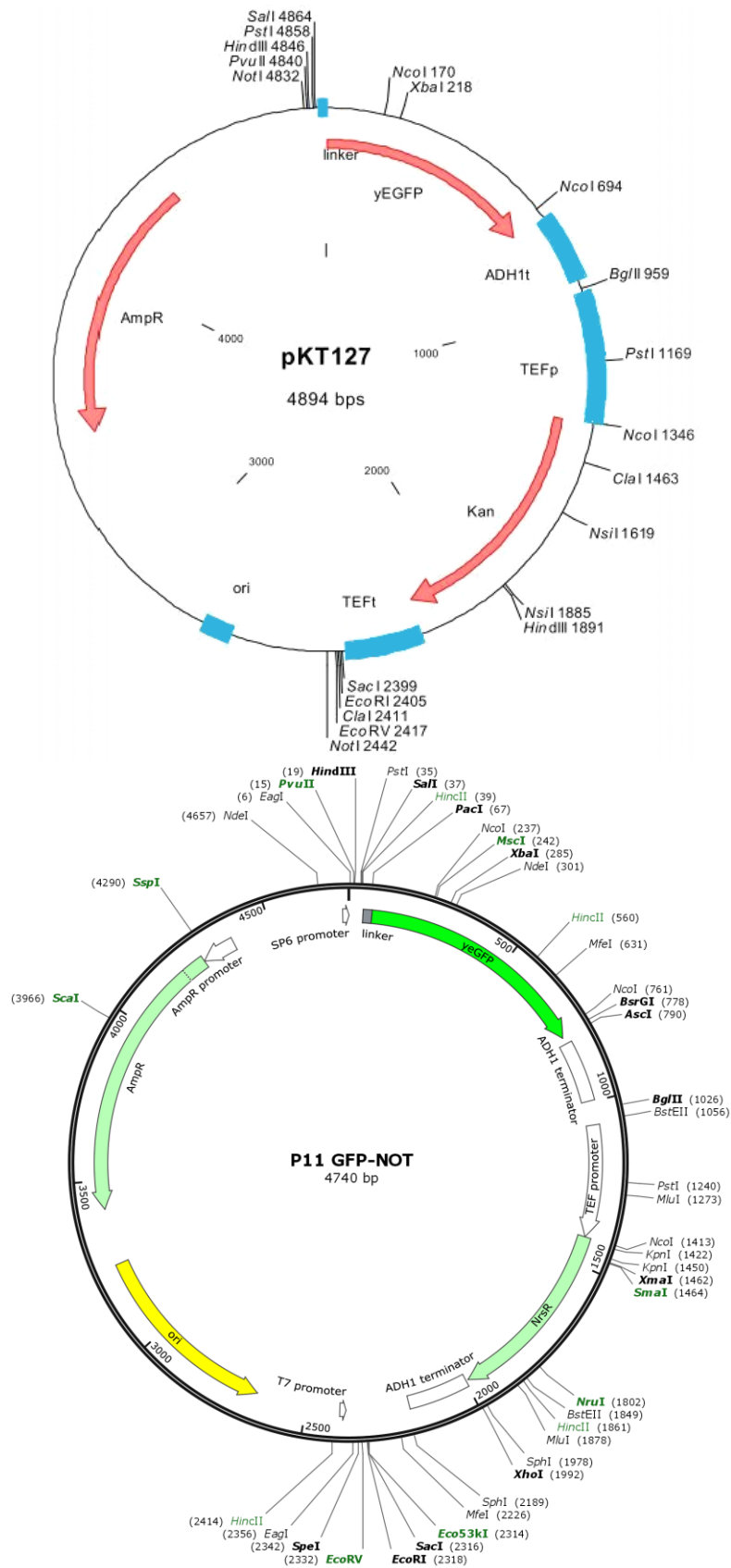
Při řešení diplomového projektu byly použity plazmidy, popsané v tabulce 4.3. Mapy plazmidů jsou uvedeny na obrázcích 4.1-4.4.

Tabulka 4.3. Seznam použitých plazmidů.

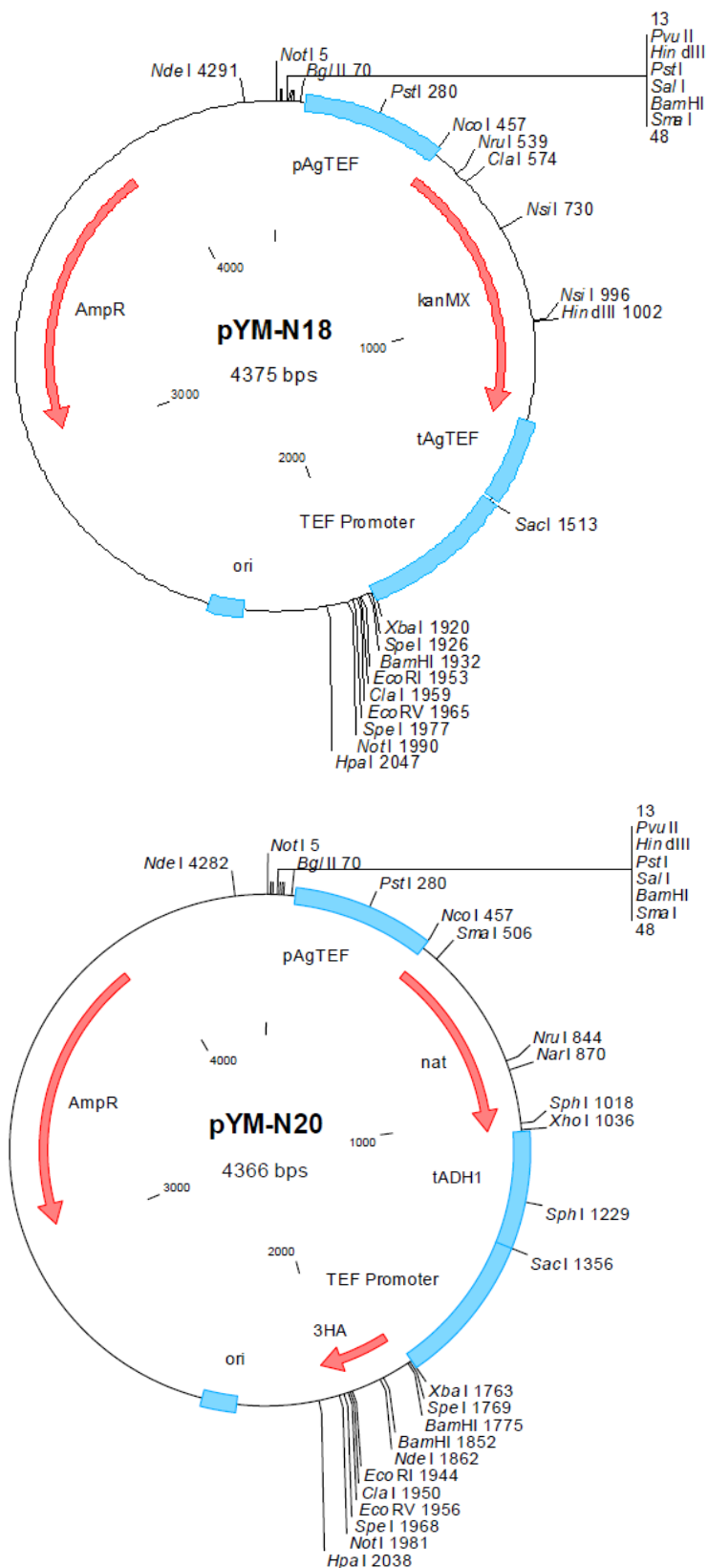
| Plazmid | Selekční marker | Použití |
|---------|-----------------|----------------------------------|
| p11 | <i>Nat</i> | Příprava <i>pFLO11-GFP</i> kmenů |
| pKT127 | <i>KanMX</i> | Příprava <i>pFLO11-GFP</i> kmenů |
| pSH69 | <i>HphMX</i> | Odstranění rezistence k Kan, Nat |
| pUG6 | <i>KanMX</i> | Příprava <i>yap6Δ</i> kmenů |
| pUG6-25 | <i>Nat</i> | Příprava <i>yap6Δ</i> kmenů |
| pYMN18 | <i>KanMX</i> | Příprava <i>TEFYAP6</i> kmenů |
| pYMN20 | <i>Nat</i> | Příprava <i>TEFYAP6</i> kmenů |



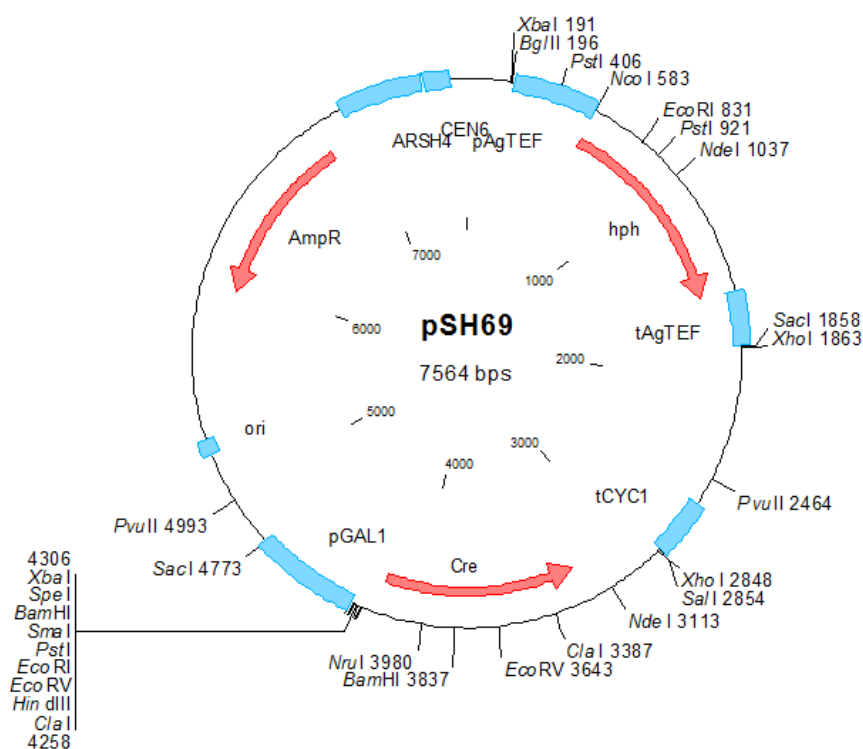
Obr. 4.1. Mapy plazmidů pUG6 a pUG6-25, použitých pro přípravu kmenů s delecí *YAP6*. Plazmid pUG6-25 je odvozen od plazmidu pUG6, jehož KanMX marker byl nahrazen NrsR (=Nat) markerem. Plazmid pUG6-25 připravil Ing. Otakar Hlaváček, Ph.D. ze skupiny Laboratoř biologie kvasinkových kolonií.



Obr. 4.2. Mapy plazmidů *pKT127* a *p11*, použitých pro přípravu *pFLO11-GFP* kmenů. Plazmid *p11* je odvozen od plazmidu *pKT127*, jehož *KanMX* marker byl nahrazen *NrsR* (=Nat) markerem. Plazmid *p11* připravil Ing. Otakar Hlaváček, Ph.D. ze skupiny Laboratoř biologie kvasinkových kolonií.



Obr. 4.3. Mapy plazmidů *pYM-N18* a *pYM-N20*, použitých pro přípravu *TEFYAP6*, *TEFTEC1* kmenů. Plazmid *pYM-N20* je odvozen od plazmidu *pYM-N18*, jehož *KanMX* marker byl nahrazen *Nat* markerem. Dané kazety byly použity při výměně promotoru požadovaného genu za silný konstitutivní promotor genu TEF (kódujícího translační elongační faktor 1a u *Ashbya gossypii*).



Obr. 4.4. Mapa plazmidu pSH69, použitého pro odstranění rezistence ke Kan a Nat u kmenů po několikanásobné manipulaci genomu.

4.1.4 Použité primery

Klonovací primery, použité na přípravu transformačních kazet a testovací primery pro ověřovací PCR pocházejí ze zásob YCG skupiny, nebo byly objednány u společností KRD a Sigma-Aldrich. Seznam použitých klonovacích a testovacích primerů, včetně jejich sekvencí a polohy v genu vzhledem k sekvenci cílového genu jsou popsány v tabulkách 4.4, 4.5.

Tabulka 4.4. Seznam použitých klonovacích primerů pro přípravu transformačních kazet.

| Název primeru | Sekvence primeru směrem od 5' k 3' konci | Použitý plazmid | Cíl transformace |
|--------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>FLO11Fw1Ireplace</i> | AATTAATAATATACTTTTGTAGGCCTC AAAAATCCATATACGCACACTGGTGA CGGTGCTGGTTTA | <i>pKT127</i> <i>p11</i> | Vložení GFP za promotor <i>FLO11</i> |
| <i>FLO11Rev1Ireplace</i> | AATGAAAACATCGTAATGAAGAAAC GAACATGTTGGAATTGTATCATCGAT GAATTCGAGCTCG | | |
| <i>TEC1TEFFw</i> | GAAGAATAATCCACCTATTTCAACAA TTCTGATACCTGTTTAACCATGCGTAC GCTGCAGGTCGAC | <i>pYM-N20</i> | Výměna promotoru |
| <i>TEC1TEFRev</i> | TATATTTCTAGAATTATCCTTGCCAAA GTCGTCTTCTTTAAGACTCATCGATGA ATTCTCGTCG | | |
| <i>YAP6DELFw</i> | CGAAGAGTGCTAAGGGACAAATGCA AAACCCTCCGTTGATCAGCTGAAGCT TCGTACGC | <i>pUG6</i> <i>pUG6-25</i> | Delece genu |
| <i>YAP6DELRev</i> | AAGTTGATCTTCCAGTACTAGAGATC AATATCTGCTCCGCATAGGGCCACTA GTGGATCTG | | |
| <i>YAP6TEFFw</i> | TTCAATAAACAAACAG AATAACGAAGAGTGCTAAGGGACAA GCTTGCCTCGTCCCCGCCGG | <i>pYM-N18</i> <i>pYM-N20</i> | Výměna promotoru |
| <i>YAP6TEFRev</i> | GATTATACATATCGGGACGAATCAAC GGAGGGTTTTGCATCTATAGGGAGAC CGGCAGAT | | |

Tabulka 4.5. Seznam použitých testovacích primerů pro ověřovací PCR. Písmeno C označuje polohu na komplementárním vlákně. Polohy primeru počítány ze sekvencí genů s 1000 bp. před začátkem kódující sekvence a 1000 bp za kódující sekvencí. Polohy primerů *KanMXRev*, *NatRev*, *GFP589Rev*, *Gcn4-GFPoversekvRev* a *TEFFw2* počítány podle jejich lokalizace na transformační kazetě.

| Název primeru | Sekvence primeru směrem od 5' k 3' konci | Poloha primeru |
|----------------------------|--|----------------|
| <i>FLO11FwA2</i> | AGGTCCGTTCTCTTCTGATG | 565 |
| <i>FLO11probeFw</i> | TACAACCGAAACTACCATTGT | 3748 |
| <i>FLO11probeRev</i> | TTAGAATACAACCTGGAAGAGC | 5084 C |
| <i>FLO11RevB2</i> | GGCACTACCTTGCAAATACT | 1456 C |
| <i>Gcn4-GFPoversekvRev</i> | CCTACAGGAAAGAGTTACTC | 871 C (pKT127) |
| <i>GFP589Rev</i> | TAACAAGACTGGACCATC | 589 C (pKT127) |
| <i>KanMXRev</i> | CTGATTGCCCGACATTATCG | 585 C (pUG6) |
| <i>NatRev</i> | AGTACGAGACGACCACGAA | 770 C (pAG-25) |
| <i>TEC1Fw</i> | TTCCATTTAGTGACACAGGT | 449 |
| <i>TEC1Rev</i> | TGAAATCAGCTCGTTTCTTC | 1507 C |
| <i>TEFFw2</i> | TTAATTACCCGTAATAAAGG | 1670 (pYM-N18) |
| <i>YAP6FwA</i> | AGCGAATTTAAGAAAGAGCGT | 428 |
| <i>YAP6RevB</i> | ATCAGGAACAGGTTTGGTTA | 1627 C |

4.1.5 Chemikálie

| Název | Textová zkratka/chemický vzorec | Výrobce |
|--------------------------------------|--|---------------------|
| Acetát lithný | LiAc | Serva |
| Agar | - | VWR Life Science |
| Agaróza | - | Sigma-Aldrich |
| CleanSweep™ PCR Purification Reagent | - | Thermo Fisher |
| D-glukóza | - | Spofa |
| Ethidiumbromid | EtBr | Serva |
| Glycerol (bezvodý) | C ₃ H ₈ O ₃ | Lach-Ner |
| HEPES pufr | - | Carl Roth |
| Hydroxid sodný | NaOH | Lach-Ner |
| Chlorid lithný | LiCl | Serva |
| Chlorid sodný | NaCl | Lach-Ner |
| Kvasničný autolyzát | YE | VWR Life Science |
| Kvasničný autolyzát | YE | Formedium |
| Kyselina boritá | H ₃ BO ₃ | Lachema |
| Kyselina ethylenndiamintetraoctová | EDTA | Serva |
| Kyselina chlorovodíková | HCl | Penta |
| MES pufr | - | Sigma-Aldrich |
| OneTaq® Master Mix | - | New England Biolabs |
| Pepton | - | IMUNA PHARM |
| Persteril® | - | Overlack |
| Polyetylen glykol 3350 | PEG | Sigma-Aldrich |
| PPP PCR Master Mix | - | Sigma-Aldrich |
| Salmon sperm DNA | ssDNA | BioLabs |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | Tris | Sigma-Aldrich |

4.1.6 Kultivační média

4.1.6.1 Pevná média

| | |
|--------------------|---|
| GM: | 3% (v/v) glycerol 1% (w/v) YE 2% (w/v) agar 0,04% (w/v) glukóza |
| GM + 40mM NaCl: | 3% (v/v) glycerol 1% (w/v) YE 0,04% (w/v) glukóza 2% (w/v) agar 1/25 objemu 1M NaCl |
| GM + 120mM NaCl: | 3% (v/v) glycerol 1% (w/v) YE 2% (w/v) agar 0,04% (w/v) glukóza 3/25 objemu 1M NaCl |
| 0,2D: | 0,2% (w/v) glukóza 1% (w/v) YE 2% (w/v) agar |
| 0,2D + 40mM NaCl: | 0,2% (w/v) glukóza 1% (w/v) YE 2% (w/v) agar 1/25 objemu 1M NaCl |
| 0,2D + 120mM NaCl: | 0,2% (w/v) glukóza 1% (w/v) YE 2% (w/v) agar 3/25 objemu 1M NaCl |

4.1.6.1 Tekutá média

| | |
|--------------------|--|
| Skladovací médium: | 60% (v/v) glycerol 2% (w/v) glukóza 2% pepton 1% (w/v) YE |
| YD: | 2% (w/v) glukóza 1% (w/v) YE |
| Gal: | 2% (w/v) galaktóza 1% (w/v) YE |

Do médií s Kan, Nat, Edi nebo Hygr bylo přidáno odpovídající množství příslušného antibiotika pro výslednou koncentraci, popsanou v tabulce 4.6.

Tabulka 4.6. Seznam použitých antibiotik a jejich koncentrací v médiu.

| Název | Textová zkratka | Koncentrace v médiu, mg/1000 ml | Výrobce |
|----------------|-----------------|---------------------------------|------------------|
| Edicin | Edi | 20 | SANDOZ |
| Geneticin | G418 | 200 | MP Biochemicals |
| Hygromycin B | Hygr | 400 | Sigma-Aldrich |
| Nourseothricin | Nat | 100 | WERNER BioAgents |

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace

Kultury na pevných médiích byly kultivovány v termostatu za teploty 28°C. Pevné médium se používalo při inokulaci buněk ze zásobních kultur, vyčárkování klonů při analýze transformantů, výsevech monoklonií za účelu analýzy transformantů a sledování morfologie kolonií.

Kultury v tekutém médiu se kultivovaly v Erlenmeyerových baňkách na třepačce MIULab Es-60 při teplotě 28°C a frekvenci třepání 150 rpm.

4.2.2 Sterilizace

Zásobní roztoky, roztoky pro přípravu médií a spotřební laboratorní materiál (špičky pro pipety, mikrozkušavky, párátko) se sterilizovaly v autoklávu 20 minut při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa. Laboratorní sklo se sterilizovalo v horkovzdušné sušárně 2 hodiny při teplotě 180°C. Plastové zkumavky byly sterilizovány parou kyseliny peroctové po dobu minimálně 24 hodin. Pracovní povrchy byly sterilizovány za využitím dezinfekčního přípravku Persteril®.

4.2.3 Uchovávání zásobních kultur

Kultury uložené do sbírky byly uchovávány ve šroubovacích mikrozkušavkách se skladovacím médiem při teplotě -80°C. Pro krátkodobé uchovávání byly kultury na Petriho miskách skladovány při 4 °C.

4.2.4 Spektrofotometrické stanovení počtu buněk

Do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek byla připravena suspenze buněk z kultury na pevném médiu. Počet buněk byl stanoven na základě OD, pomocí spektrofotometru WPA S1200 Spectrawave, při vlnové délce 600 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda (10mM HEPES v případě stanovení počtu buněk pro měření intenzity fluorescence na CLARIOstar Plus microplate reader).

Suspenze byla naředěna tak, aby výsledná koncentrace buněk zhruba odpovídala 0,2-0,5 OD. Při vyšších hodnotách OD dochází ke ztrátě linearity závislosti OD na koncentraci buněk v suspenzi. Na základě měření naředěné suspenze byla vypočtena koncentrace buněk v původním vzorku. Suspenze z tekutého média byly přímo nebo po naředění změřeny pomocí spektrofotometru.

4.2.5 Měření intenzity fluorescence na CLARIOstar

Do 2 ml Eppendorfových zkumavek bylo připraveno 1 ml 10mM HEPES pufru, pH 7,5 a vytvořena suspenze buněk. Suspenze byla vhodným způsobem zředěna pufrům na objem 3-5 ml a OD zředěné suspenze byla změřena pomocí WPA S1200 Spectrawave spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Koncentrace suspenze byla upravena podle naměřených údajů na výslednou hodnotu 0,2, která přibližně odpovídá koncentraci 2×10^6 buněk/ml.

Do černých, neprůhledných mikrotitracních destiček s plochým dnem (Microtiter) bylo naneseno 100 μ l této buněčné suspenze, intenzita jejich fluorescence byla změřena pomocí CLARIOstar Plus microplate reader za parametrů, popsaných v tabulce 4.7.

Tabulka 4.7. Parametry měření fluorescence pomocí CLARIOstar Plus microplate reader.

| Parametr | Měření fluorescence GFP | Měření fluorescence DsRed |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Počet excitací | 20 | 20 |
| Fokální výška | 3,3-4,0 mm | 3,3-4,0 mm |
| Gain | 1000 | 1500 |
| Vlnová délka excitace | 470-15 nm | 540-15 nm |
| Vlnová délka měřené emise | 515-20 nm | 605-20 nm |

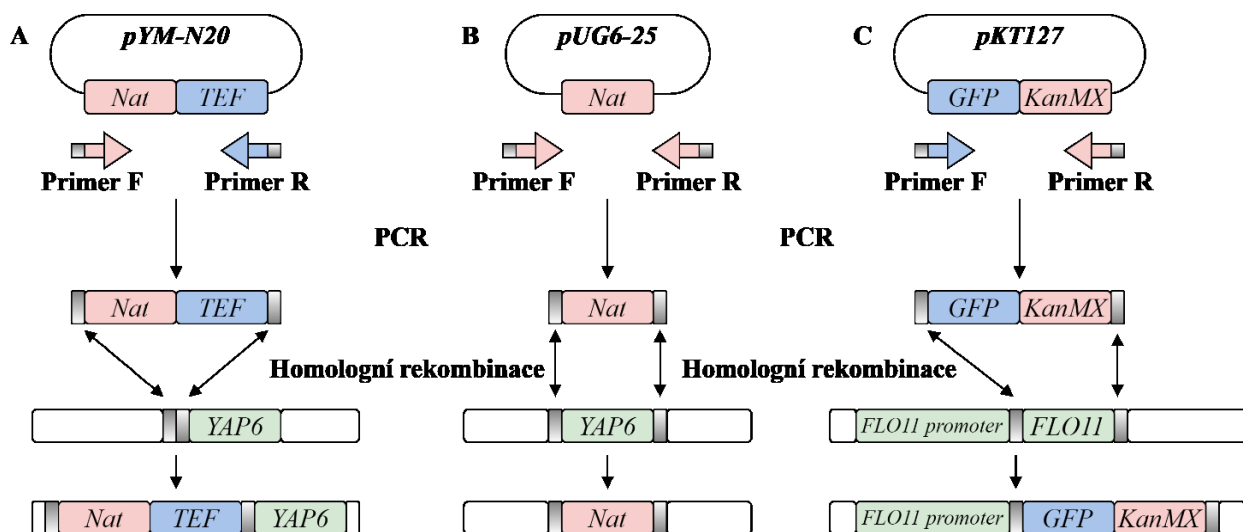
Z každé suspenze byl nanesen vzorek do 6 jamek, z každé kultury (kmen / médium/doba kultivace) byly připraveny 3 nezávislé vzorky (suspenze buněk). Kultivace byla opakována nejméně dvakrát. Vzhledem k nehomogenní povaze suspenzí buněk izolovaných z kolonií, byla variabilita uvnitř šestice značná (20-80% průměru). Každá destička byla změřena 3x po sobě, takže pro každou suspenzi bylo změřeno 18 hodnot fluorescence. Emitovaná fluorescence byla měřena ve vertikální spirále. Výsledky měření byly hodnoceny statisticky.

4.2.6 Příprava kmenů pro analýzu interakce Whi3p-Yap6p a Flo11p

4.2.6.1 Typy použitých transformací

Pro účely dane práce byly použity několik typů transformací, které měli za cíl výměnu promotoru, delecí zvolených genů, nebo inserce kódující sekvence fluorescenčního proteinu GFP za jejich promotor. Plazmidy použité pro přípravu transformačních kazet obsahovali loxP místa, kterými byli ohraničeny geny pro rezistenci k antibiotikům. To umožňuje následujícím vnesením plazmidu pSH69, který obsahuje CreA rekombinázu, odstranit rezistenční markery.

Odstranění selekčních markerů pomocí CreA rekombinázy je popsáno v podkapitole č. 4.2.6.9. Příklady typů použitých transformací schematicky zobrazeny na obrázku 4.6.



Obrázek 4.6. Typy použitých transformací. (A) Nahrazení promotoru požadovaného genu za silným konstitutivním promotorem genu *TEF* (*Ashbya gossypii*). (B) Delece vybraného genu. (C) Inzerce kódující sekvence fluorescenčního proteinu GFP za promotor *FLO11*. Červenou barvou zvýrazněny geny pro rezistence k antibiotikům, zelenou – cílové geny. Šedá barva znázorňuje homologní sekvence, použité v primerech. Modrou barvou v případě (A) zvýrazněna promotorova sekvence genu *TEF*, v případě (B) kódující sekvence fluorescenčního proteinu GFP.

4.2.6.2 Příprava kazet pro transformaci kvasinek

Pro přípravu deleční kazety na bázi *pUG6* a *pUG6-25* plazmidů bylo do PCR mikrozkušavek připraveno 50 μ l reakční směsi. Složení reakční směsi je popsáno v tabulce 4.8. Směs byla důkladně promíchána, rozdělena do 2 PCR mikrozkušavek po 25 μ l a umístěna do cykleru. Reakce proběhla podle zvoleného teplotního programu, popsaného v tabulce 4.9.

Tabulka 4.8. Složení reakční směsi pro přípravu deleční kazety.

| Složka reakční směsi | Objem, (μ l) |
|-----------------------------|-------------------|
| Sterilní redestilovaná voda | 17 |
| Primer (5 μ M) | 3 |
| Reverzní primer (5 μ M) | 3 |
| PPP Master Mix | 25 |
| Templátová DNA | 2 |

Tabulka 4.9. Teplotní program pro přípravu deleční kazety

| Fáze reakce | Teplota, (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|---------------|-------|-------------|
| 1. Start reakce | 94 | 5 min | 35 |
| 2. Denaturace DNA | 94 | 40 s | |
| 3. Annealing primerů | 54 | 45 s | |
| 4. Syntéza DNA | 72 | 100 s | |
| 5. Dosyntetizování | 72 | 5 min | |

Kazety na přípravu GFP kmenů byly připraveny na bázi plazmidů p11 a pKT127. Do PCR mikrozkušavek bylo připraveno 50 μ l reakční směsi, jejíž složení je popsáno v tabulce 4.10. Na přípravu kazet pro fúzi (a výměnu promotoru) byl použit OneTaq® Master Mix, který má větší přesnost syntézy DNA, než PPP Master Mix. Po důkladném promíchání byla směs rozdělena do 2 PCR mikrozkušavek po 25 μ l a umístěna do cykleru. Reakce proběhla podle zvoleného teplotního programu, popsaného v tabulce 4.11.

Tabulka 4.10. Složení reakční směsi pro přípravu fúzní kazety.

| Složka reakční směsi | Objem, (μ l) |
|-----------------------------|-------------------|
| Sterilní redestilovaná voda | 17 |
| Forward primer (5 μ M) | 3 |
| Reverzní primer (5 μ M) | 3 |
| OneTaq® Master Mix | 25 |
| Templátová DNA | 2 |

Tabulka 4.11. Teplotní program pro přípravu fúzních kazet

| Fáze reakce | Teplota, (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|---------------|--------|-------------|
| 1. Start reakce | 94 | 3 min | 35 |
| 2. Denaturace DNA | 94 | 30 s | |
| 3. Annealing primerů | 56 | 30 s | |
| 4. Syntéza DNA | 68 | 160 s | |
| 5. Dosyntetizování | 68 | 10 min | |

Pro přípravu kazet pro výměnu promotoru na bázi plazmidů pYM-N18 a pYM-N20 bylo do PCR mikrozkušavek připraveno 50 μ l reakční směsi, jejíž složení je popsáno v tabulce 4.12. Po důkladném promíchání byla směs rozdělena do 2 PCR mikrozkušavek po 25 μ l a umístěna do cykleru. Reakce proběhla podle zvoleného teplotního programu, popsaného v tabulce 4.13.

Tabulka 4.12. Složení reakční směsi pro přípravu kazety pro výměnu promotoru.

| Složka reakční směsi | Objem, (μ l) |
|--|-------------------|
| Sterilní redestilovaná voda | 17 |
| Forward primer (5 μ M) | 3 |
| Reverzní primer (5 μ M) | 3 |
| OneTaq® Master Mix | 25 |
| Templátová DNA (plazmid pYM-N18/pYM-N20) | 2 |

Tabulka 4.13. Teplotní program pro přípravu kazety pro výměnu promotoru

| Fáze reakce | Teplota, (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|---------------|--------|-------------|
| 1. Start reakce | 94 | 3 min | 35 |
| 2. Denaturace DNA | 94 | 30 s | |
| 3. Annealing primerů | 56 | 30 s | |
| 4. Syntéza DNA | 68 | 160 s | |
| 5. Dosyntetizování | 68 | 10 min | |

4.2.6.3 Transformace buněk *S. cerevisiae* LiAc/PEG metodou (podle Gietz et al., 2007)

Kultura příslušného kmene byla inkubována přes noc v 10 ml tekutého YD média s edicinem na rotační třepače MIULab ES-60 při teplotě 28 °C, frekvenci třepání 150 rpm.

V následující den (po 12-15 hodinách kultivace) bylo 2 ml suspenze přeočkováno do 30 ml čerstvého YD média s edicinem. Po 4 hodinách kultivace byla změřena koncentrace buněk, která by měla zhruba odpovídat hodnotě 2×10^7 buněk/ml. Suspenze byla převedena do sterilních 30 ml zkumavek a centrifugována na Hettich Universal 320R při 3000 rpm po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v 25 ml sterilní destilované vody a znovu centrifugovány za stejných podmínek. Po odstranění vody byly buňky následně resuspendovány v 1 ml sterilní destilované vody. Po centrifugaci na Hettich Mikro 200 při 10000 rpm po dobu 1 min, byl odstraněn supernatant, buňky byly resuspendovány v takovém objemu destilované vody, aby výsledná koncentrace v suspenzi odpovídala 5×10^8 / ml.

Do 2ml Eppendorfové zkumavky bylo připraveno 100 µl výsledné suspenze. Po krátké centrifugaci byl odstraněn supernatant a přidáno 360 µl transformační směsi (složení viz. tabulka 4.14). SS-Carrier DNA (Salmon sperm DNA) byla denaturována po dobu 5 minut ve vroucí vodní lázni. SS-Carrier DNA byla přidána k transformačnímu pufru těsně před jeho použitím.

Výsledná transformační směs (buňky, transformační pufr a transformující DNA) byla důkladně promíchána a inkubována ve vodní lázni 40 min (příp. 20 min) za teploty 42 °C. Při opakované transformaci (postupné modifikaci genomu) byla doba heat shocku zkrácena na 20 minut, účinnost transformace pak byla vyšší, pravděpodobně kvůli vyšší životaschopnosti transformovaných buněk.

Po inkubaci, zkumavky byly krátce odstředěny při 10 000 rpm po dobu 1 min, transformační pufr odebrán a nahrazen 1 ml YD média s edicinem. Směs byla přemístěna do 15 ml zkumavky a inkubována na třepače (150 rpm, 28 °C) po dobu 3 hodin. Výsledná kultura byla vyseta na selektivní GM plotny a inkubovaná v termostatu za teploty 28 °C.

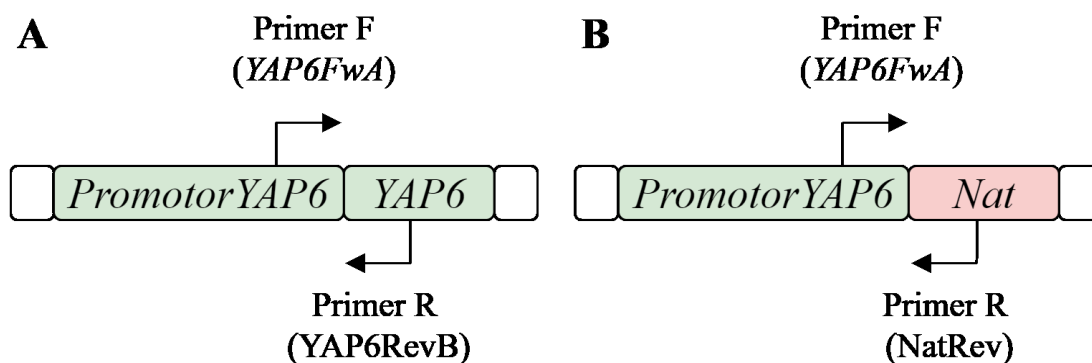
Tabulka 4.14. Složení směsi pro transformace.

| Složka transformační směsi | Objem, (μl) |
|-------------------------------------|-------------|
| Transformační kazeta (50-100 ng/μl) | 20 |
| LiAc (1M) | 36 |
| SS-Carrier DNA (10 mg/ml) | 12 |
| Sterilní redestilovaná voda | 72 |
| PEG 3350 (50%, w/v) | 240 |
| Celkový objem směsi | 360 |

4.2.6.4 Selektce a purifikace transformantů

Po 5-7 dnech byly kolonie transformantů narostlé na selektivních plotnách přeočkovány na stejné selektivní médium. Následující den byla z narostlých klonů izolována chromozomová DNA pro ověřovací PCR. PCR reakce byla provedena za využití testovacích primerů, které byly zvoleny v závislosti na použité transformační kazetě, např. *YAP6FwA* - *NatRev*.

Pozitivní klony byly purifikovány výsevem na stejné selektivní médium. Po 4 dnech byly odebrány 4 kolonie od každého pozitivního klonu a genotyp kolonií byl ověřen pomocí PCR jako v předchozím případě. Pomocí páru testovacích primerů byla rovněž ověřena přítomnost nemutované alely v genomu (např. *YAP6FwA* - *YAP6RevB*). Principy testovacích PCR reakcí jsou schematicky znázorněny na obrázku 4.7. Pozitivní klony byly uloženy do sbírky.



Obrázek 4.7. Obecné principy testovacích PCR reakcí. (A) Reakce pro ověření přítomnosti intaktní alely *YAP6*. (B) Reakce pro ověření delece (alespoň jedné) alely *YAP6* genu.

4.2.6.5 Izolace chromozomové DNA pro PCR reakce

Do 0,2 ml mikrozkuvek bylo připraveno 40 μ l 20mM NaOH a přidáno malé množství biomasy testovaného klonu (24 h kultivace na selektivním mediu). Vzorky byly důkladně promíchány a umístěny na PCR cykler Bioer Technology GenePro. Denaturace DNA proběhla podle zvoleného programu (15 min při 95 °C). Po denaturaci byly vzorky centrifugovány v centrifuze Labnet International C1301-B po dobu 1 min. Supernatant s izolovanou DNA byl odebrán do 1,5 ml zkuvek a uchováván při teplotě -18 °C.

4.2.6.6 Ověření genotypu transformantů pomocí PCR

Do PCR mikrozkuvek byla připravena reakční směs podle tabulky 4.15. Výsledná směs byla umístěna do cyklu. PCR reakce probíhala podle teplotního programu, který byl zvolen v závislosti na doporučené teplotě annealingu použitých primerů. Použité kombinace primerů jsou popsány v tabulce 4.16, teplotní programy jsou popsány v tabulkách 4.17, 4.18.

Tabulka 4.15. Složení reakční směsi pro PCR reakce.

| Reakční složka | Objem, (μ l) |
|---------------------------------------|-------------------|
| Forward testovací primer (5 μ M) | 1 |
| Reverzní testovací primer (5 μ M) | 1 |
| Templátová DNA | 1 |
| Sterilní redestilovaná voda | 2 |
| PPP Master Mix | 5 |

Tabulka 4.16. Použité kombinace primerů pro ověřovací PCR reakce.

| Reakce | Použití |
|--|---|
| <i>FLO11FwA2 – FLO11RevB2</i> | Ověření přítomnosti nemodifikované alely <i>FLO11</i> |
| <i>FLO11FwA2 – GFP589Rev</i> | Ověření zabudování GFP sekvence za promotor <i>FLO11</i> |
| <i>FLO11FwA2 – Gcn4-GFPoversekvRev</i> | Příprava templátu pro sekvenování (kontrola pFLO11-GFP klonů) |
| <i>FLO11probeFw – FLO11probeRev</i> | Určení typu alely <i>FLO11</i> |
| <i>TEC1Fw – NatRev</i> | Ověření delece <i>TEC1</i> alely |
| <i>TEC1Fw – TEC1Rev</i> | Ověření přítomnosti nemodifikované alely <i>TEC1</i> |
| <i>TEFFw – TEC1Rev</i> | Ověření výměny promotoru <i>TEC1</i> za promotor TEF |
| <i>TEFFw – YAP6Rev</i> | Ověření výměny promotoru <i>YAP6</i> za promotor TEF |
| <i>YAP6Fw – YAP6Rev</i> | Ověření přítomnosti nemodifikované alely <i>YAP6</i> |
| <i>YAP6Fw – NatRev</i> | Ověření delece <i>YAP6</i> alely |
| <i>YAP6Fw – KanMXRev</i> | Ověření delece <i>YAP6</i> alely |

Tabulka 4.17. Teplotní program pro ověřovací PCR reakce s primery genů *FLO11*, *YAP6* (kromě *TEF* primerů).

| Fáze reakce | Teplota, (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|---------------|-------|-------------|
| 1. Start reakce | 95 | 2 min | 35 |
| 2. Denaturace DNA | 95 | 30 s | |
| 3. Annealing primerů | 50 | 40 s | |
| 4. Syntéza DNA | 72 | 80 s | |
| 5. Dosyntetizování | 72 | 8 min | |

Tabulka 4.18. Teplotní program pro ověřovací PCR reakce s *TEF* primery

| Fáze reakce | Teplota, (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|---------------|-------|-------------|
| 1. Start reakce | 95 | 2 min | |
| 2. Denaturace DNA | 95 | 30 s | 35 |
| 3. Annealing primerů | 54 | 40 s | |
| 4. Syntéza DNA | 72 | 80 s | |
| 5. Dosyntetizování | 72 | 8 min | |

4.2.6.7 Horizontální elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Pro elektroforézu byl použit 0,7% agarózový gel, který byl připraven rozvařením 0,49 g agarózy v 70 ml 0,5×TBE pufru (10x ředěný 5×TBE. Složení 5×TBE pufru je popsáno v tabulce 4.19). Po ochlazení na teplotu kolem 40-50 °C bylo přidáno 100 µl EtBr (100 mg/ml), gel byl přelit do formy se zvoleným hřebenem. Po ztuhnutí, gel byl přemístěn do elektroforetické lázně s 0,5 x TBE puftrem. Do odpovídajících jamek v gelu byly přidány vzorky (3 µl PCR produktu) a standard (3 µl, GeneRuler DNA Ladder Mix) pro porovnání hmotnosti výsledných produktů. Elektroforéza probíhala 40 minut za konstantního stejnosměrného napětí 80 V/cm.

Tabulka 4.19. Složení 5x TBE.

| Složka roztoku | Množství |
|-----------------|----------|
| Tris | 0,2M |
| EDTA (0,5M) | 10mM |
| Kyselina boritá | 0,45M |

Po ukončení elektroforézy, byla DNA zviditelněna pomocí UV transiluminátoru, snímky gelu byly uschovány pro další použití.

4.2.6.8 Ověřování transformantů sekvenováním DNA

Pro ověření správného zabudování transformační kazety byla nejdříve provedena ověřovací PCR reakce. Produkty PCR reakce byly ověřeny elektroforézou a přečištěny za použití komerčního kitu CleanSweep. Pro každý vzorek je do PCR mikrozkušavek připraveno: 5 µl PCR produktu a 1 µl CleanSweep Master Mix. Výsledná směs je umístěna do cykleru, purifikace PCR produktu probíhá podle programu uvedeného v tabulce 4.20.

Tabulka 4.20. Teplotní program pro přečištění PCR produktu.

| Fáze | Teplota, °C | Délka, min |
|------|-------------|------------|
| 1. | 37 | 30 |
| 2. | 80 | 15 |

Přečištěný produkt PCR je templátem pro sekvenování Sangerovou metodou. PCR produkt je vhodně naředěn podle koncentrace DNA v PCR produktu (odhad podle síly bandu v gelu). Směs pro sekvenování je popsána v tabulce 4.21.

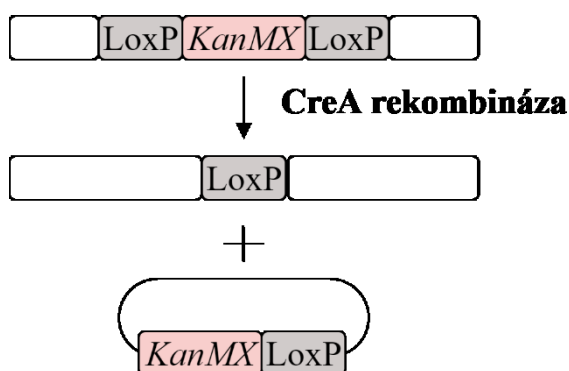
Tabulka 4.21. Složení směsi pro sekvenování.

| Složka směsi | Množství, μ l |
|--------------------|-------------------|
| PCR produkt | 1 |
| Primer | 1 |
| Redestilovaná voda | 6 |

Vlastní sekvenování DNA zajistila Sekvenační laboratoř v centru Biocev, Vestec.

4.2.6.9 Odstranění selekčních markerů pomocí CreA rekombinázy

Pro odstranění selekčních genů podmiňujících rezistenci ke Kan a Nat u kmenů po několikanásobné manipulaci genomu byl do buněk vnesen replikativní plazmid pSH69, obsahující gen kódující CreA rekombinázu a marker pro rezistenci k hygromycinu. CreA rekombináza je pod kontrolou *GAL1* promotoru, což umožňuje regulovat expresi CreA na základě přítomnosti galaktózy v médiu. Exprimovaná CreA rekombináza specificky vyštěpí sekvence, které se nacházejí mezi loxP místy. V kazetách použitých pro delecí genů jsou geny pro rezistenci k antibiotikům ohraničeny loxP sekvencemi. Schematické zobrazení působení CreA rekombinázy je na obrázku 4.5.



Obr. 4.5. Odstranění selekčních markerů pomocí CreA rekombinázy. CreA rekombináza specificky vyštěpuje sekvence, které se nacházejí mezi loxP místy, kterými byly ohraničeny geny pro rezistenci k antibiotikům v použitých transformačních kazetách.

Transformace za použití plazmidu pSH69 se prováděla u kmenů, u kterých byly postupně delegovány obě alely cílového genu, postupným jejich nahrazením geny pro rezistenci ke Kan a k Nat.

Po transformaci byly buňky vysety na GM médium s Nat, G418 a Hygr. Po 5-7 dnech byly narostlé kolonie přeneseny do tekutého YD média se stejnými antibiotiky a kultivovaly se

přes noc na třepačce MIULab Es-60 při teplotě 28°C a frekvenci třepání 150 rpm. Následující den byly buňky izolovány z YD média centrifugací (Hettich Universal 320R při 3000 rpm po dobu 5 minut), promyty destilovanou vodou a přeneseny do tekutého Gal média s Hygr. Po 3 hodinách kultivace byly buňky vysety na GM médium. Po 3-5 dnech kultivace byly kolonie otisknuty sametem a přeneseny na 3 varianty GM média: bez antibiotik, s Kan, s Nat. V následující den byly vybrány kolonie nerostoucí na obou médiích s antibiotikem a vyčárkovány na GM médium a GM médium s Hygr. Klony, které ztratily plazmid pSH69, nerostoucí na médiu s Hygr, byly otestovány ověřovací PCR reakcí (Forward primer modifikovaného genu + Reverzní primer Nat Rev/KanMX Rev, popsaných v tabulce 4.5). Negativní klony obou reakce byly purifikovány a uloženy do sbírky.

4.2.7 Statistické zpracování namerených dat

Výsledky dílčích testů byly průběžně hodnoceny pomocí t testu (oboustranný, s rozdílnými rozptyly). Data z nezávislých měření pro stejné kmene a média byla propojena pomocí transformace podle Valcu a Valcu (2011).

Distribuce hodnot byla vizualizována pomocí histogramu a následně kvantilovými grafy. Naměřené hodnoty nesledují normální rozdělení, distribuce je pozitivně sešikmená.

Závislost hodnot fluorescence na sledovaných parametrech (vliv kmene a vliv média) byla hodnocena pomocí ANOVA testu rozptylu. Tato metoda vyžaduje shodu rozptylů (An introduction to the two-way ANOVA. <https://www.scribbr.com/statistics/two-way-anova/>). Pomocí Levene testu shody rozptylu (Levene 1960) bylo zjištěno, že rozptyly mezi jednotlivými „ošetřeními“ jsou průkazně rozdílné. Řešením proto byla ARTool (The Aligned Rank Transform for nonparametric factorial analyses) transformace dat, tedy převod hodnot fluorescence transformací, která následně umožňuje analýzu variance odděleně pro kmen, médium i určení příspěvku interakce mezi těmito parametry (Wobbrock et al., 2011). Odhad vlivu jednotlivých parametrů je přesnější. V ANOVA tabulkách jsou uvedeny následující hodnoty:

Df (degree of freedom) – počet stupňů volnosti, odpovídá počtu tříd daného parametru -1 (pro 3 typy médií Df = 2), rovněž označovaný DFT

Df.res (degrees of freedom for residues) – odvozena z rozdílu počtu všech měření zahrnutých do dané analýzy a počtu srovnávaných skupin (N-k), rovněž označovaná DFE (od error)

Sum.Sq – rozptyl vysvětlený „ošetřením“ (parametrem), rovněž označovaný SST

Sum.Sq.Res – residuální rozptyl, rovněž označovaný SSE

F value – statistika u ANOVA analýzy, s F rozdělením, závislým na počtech stupňů volnosti Df.

Pr – pravděpodobnost dosažení dané hodnoty F nebo vyšší při platnosti hypotézy H_0 o shodě průměrů nebo mediánů mezi testovanými skupinami. Hypotéza se zpravidla zamítá při $Pr < 0,05$.

Parciální efekt parametru (hodnota Eta, vyjádřená jako podíl Sum.Sq a celkové variability (Sum.Sq+ Sum.Sq.res) (Lakens, 2013).

$$\eta^2 p = SST / (SST + SSE) \quad MST = SST / DFT \quad MSE = SSE / DFE \quad F = MST / MSE$$

(popis podle The ANOVA table and tests of hypotheses about means, Engineering Statistics Handbooks. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/prc/section4/prc433.htm>).

U testů s vysokým efektem interakce mezi parametry (nad 0,1) byl proveden Tukey HSD test v rámci balíčku ARTool. Jde o párový „post hoc“ test. HSD je zkratkou pro „honestly significant difference“, neboli test signifikantních rozdílů mezi průměry všech variant (v daném případě např. všech kombinací kmen x médium). Hodnota statistiky je rovna podílu rozdílu mezi průměry dvou variant a střední chyby průměru (standard error of the mean (SE), což je podíl variance a počtu měření v rámci daného ošetření) (An introduction to the two-way ANOVA. <https://www.scribbr.com/statistics/two-way-anova/>, Tukey test. https://www.statisticshowto.com/tukey-test-honest-significant-difference/#google_vignette).

Vysoká absolutní hodnota statistiky a nízká hodnota pravděpodobnosti dosažené hodnoty při platnosti H_0 (absence rozdílu mezi průměry) potvrzuje přítomnost rozdílů mezi takovými kombinacemi. Tukey test upravuje kritické hodnoty statistiky pro zamítnutí hypotézy podle počtu provedených testů. Výsledky Tukey analýzy jsou uvedeny v příloze.

$$HSD = \frac{M_i - M_j}{\sqrt{\frac{MS_w}{n_h}}}$$

- $M_i - M_j$ je rozdíl průměrů mezi variantami
- MS_w (Mean Square Within), variance hodnot v daném ošetření (variantě)

$$MS_{Within} = \frac{SS_{Within}}{df_{Within}}$$

“df” je počet stupňů volnosti, hodnota odpovídá rozdílu počtu hodnot zahrnutých do analýzy a počtu skupin

SS_{within} je součet rozptylů uvnitř skupin, hodnotu lze stanovit jako součin počtu stupňů volnosti pro danou skupinu ($n-1$) a hodnoty rozptylu uvnitř skupiny.

4.2.8 Počítačové programy, internetové servery a databáze

Saccharomyces Genome Database (SGD) www.yeastgenome.org – databáze

UniProt www.uniprot.org – databáze

Clustal Omega (1.2.4) www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo – srovnání sekvencí (sequence alignment)

PhyML (3.1/3.0 aLRT) – tvorba fylogenetického stromu na základě zarovnaných sekvencí

Jalview (2.11.1.3) – software pro vizualizaci a zpracování sekvencí

Oligo Calculator version (3.27), Primer-BLAST – navrhování primerů

5 Výsledky

V předchozích studiích bylo zjištěno, že kmen s delecí *WHI3* má výrazně sníženou hladinu Flo11p, zpomalený růst a téměř hladké třídní kolonie. U starších kolonií je zřetelná kresba, ale kolonie zůstávají ploché. Pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy proteinových extraktů byla u kmene s delecí *WHI3* zjištěna zvýšená hladina transkripčního faktoru Yap6p oproti kmenům s funkčním *WHI3*.

V literatuře se Yap6p popisuje jako součást buněčné odpovědi na stres, protein, který interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p, mimo jiné regulujícím expresi *FLO11*. Také je předpokládána jeho interakce s proteinem Sok2p, který se zúčastní regulace filamentárního růstu.

Předpokládáme, že je Yap6p pod kontrolou Whi3p, podílí se na regulaci exprese *FLO11* a že se jeho vliv může měnit v závislosti na podmínkách kultivace. Očekává se, že pokud bude u kmenů s delecí *WHI3* odstraněn/nadprodukován gen *YAP6* – dojde ke změně exprese *FLO11* a efekt bude závislý na kultivačních podmínkách, zejména přítomnosti osmotického stresu.

5.1 Příprava kmenů s mutacemi *YAP6*, produkujících fluorescenčně značený Flo11p a optimalizace podmínek pro měření fluorescence

Cílem bylo připravit značené kmeny s mutacemi v požadovaných genech, optimalizovat kultivační podmínky a podmínky měření intenzity fluorescence pro sledování vlivu genotypu připravených mutantů na expresi *FLO11* za neselektivních podmínek.

5.1.1 Příprava kmenů pro analýzu

Pro analýzu vlivu mutací *YAP6*, *TEC1*, *MPT5* u rodičovského kmene a kmene s delecí *WHI3* na expresi *FLO11* a morfologii kolonií byla připravena sada kmenů. Kmeny s mutacemi *YAP6* byly dále charakterizovány při kultivaci v přítomnosti solí: NaCl a LiCl. Použité plazmidy jsou popsány v tabulce 4.3, primery v tabulce 4.4. Připravené kmeny byly ověřeny ověřovací PCR a sekvenováním. V rámci dané práce byly používány diploidní kmeny *S. cerevisiae*, a proto pro přípravu delečních kmenů byly postupně deletovány obě alely příslušného genu. Příprava kmenů značených DsRed je schematicky zobrazena na obrázku 5.2, kmenů značených GFP – na obrázku 5.3.

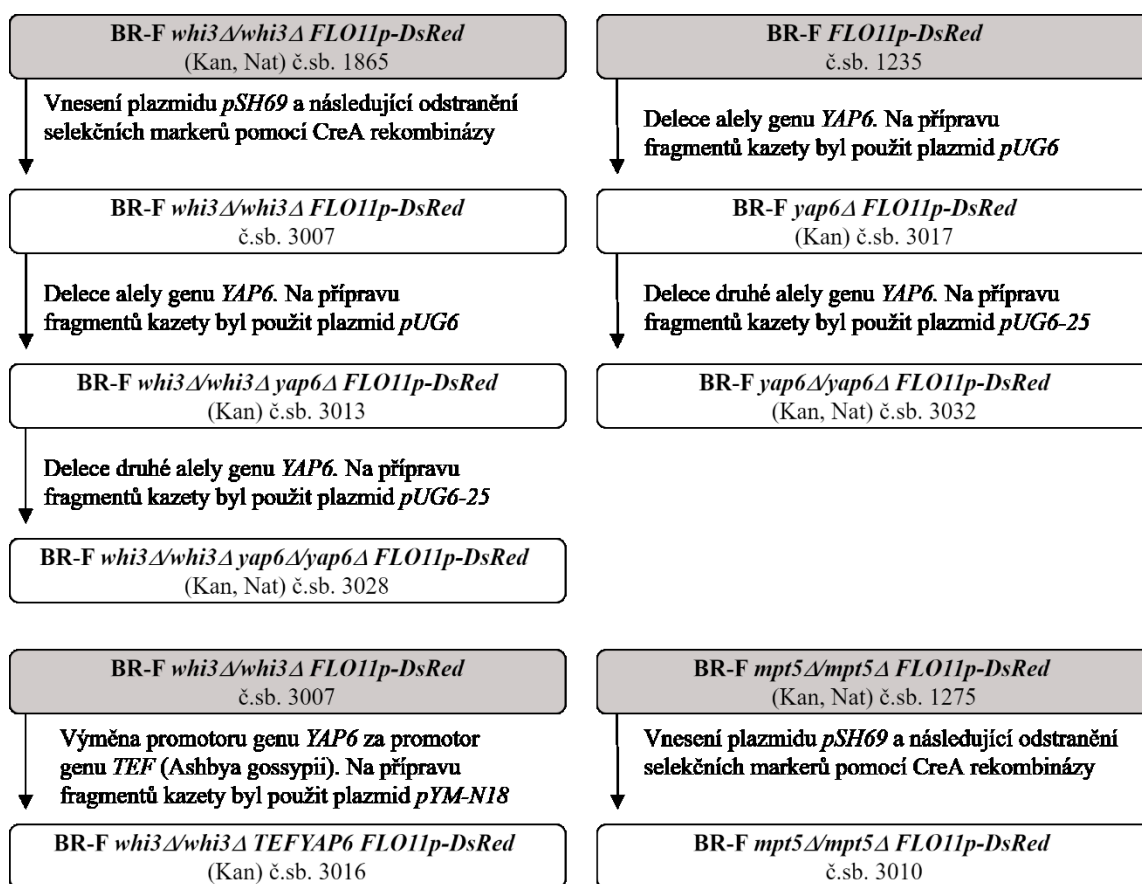
Při přípravě *pFLO11-GFP* kmenů byly vybrány pro další analýzu kmeny se zachovanou delší alelou *FLO11* (v kódující sekvenci obsahuje inzert 45 nukleotidů, vykazuje silnější pozitivní vliv na vrásčitost kolonie). Kmeny značené fluorescenčním proteinem DsRed jsou odvozeny od původního kmene BR-F *Flo11p-DsRed*, u nichž nebyla delší alela *FLO11* modifikována. Na obrázku 5.1 je zobrazeno srovnání kódujících sekvencí *FLO11* (Yeastgenome.org) a kmene č.sb. 3023 (BR-F *whi3Δ/whi3Δ mpt5Δ/mpt5Δ pFLO11-GFP*, genotyp je totožný s č.sb. 3034), který má zachovanou dlouhou alelu *FLO11*.

```
#####
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 650
# Identity:      458/650 (70.5%)
# Similarity:    458/650 (70.5%)
# Gaps:         170/650 (26.2%)
# Score: 2147.0
#
#
#=====

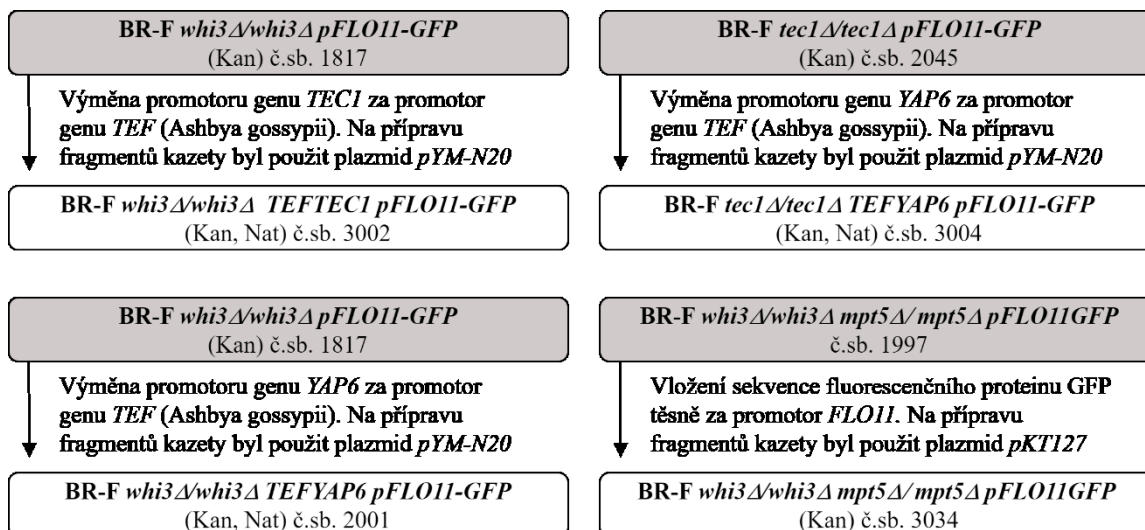
3023CDS      301  GTCACTGGTCCAAAAGATACCGTCCAACCTATACGGTTACGACGAAAATAC      350
           |||||||||.|.|||||
FLO11CDS     301  GTCACTGGTCCAAAAGGTACCGTCCAACCTATACGGTTA-----      338

3023CDS      351  CGATTGGATTGACAACCCACTTGTTCCTCCGTTGCGACGAAAATACCTATT      400
           |.|||||
FLO11CDS     339  -----CAACGAAAATACCTATT      355
```

Obr. 5.1. Srovnání dlouhé a krátké alely *FLO11*. Kmen č.sb. 3023 (BR-F *whi3Δ/whi3Δ mpt5Δ/mpt5Δ pFLO11-GFP*, genotyp je totožný s č.sb. 3034) má zachovanou dlouhou alelu *FLO11*. Kódující sekvence krátké alely *FLO11* pochází z databáze Yeastgenome.org. Šedou barvou zvýrazněna sekvence inzertu v kódující sekvenci dlouhé alely. Pro porovnání sekvencí byl použit EMBOSS Needle s maticí DNAfull.



Obr. 5.2. Příprava kmenů značených DsRed. Šedou barvou jsou zvýrazněny rodičovské kmeny, které pocházejí ze sbírky YCG skupiny. Šipky znázorňují jednotlivé transformace. V závorkách je uvedena informace o rezistencích k antibiotikům u příslušných kmenů.

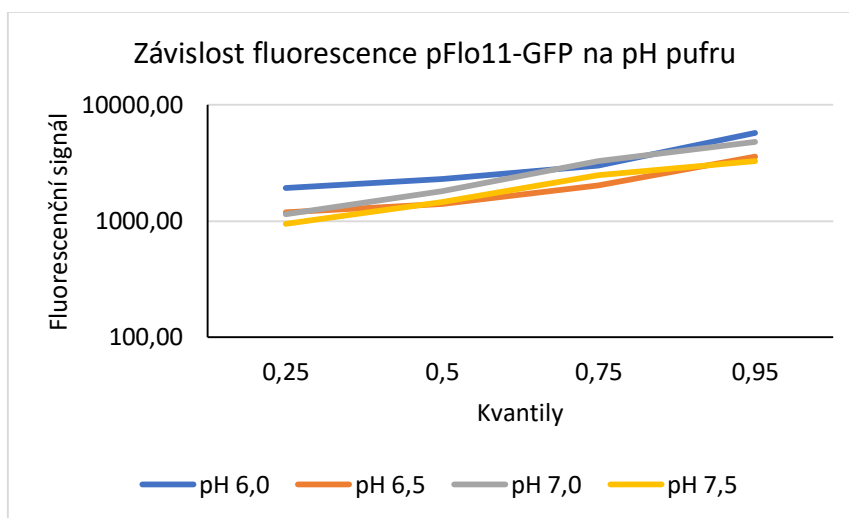


Obr. 5.3. Příprava kmenů značených GFP. Šedou barvou jsou zvýrazněny rodičovské kmeny, které pocházejí ze sbírky YCG skupiny. Šipky znázorňují jednotlivé transformace. V závorkách je uvedena informace o rezistencích k antibiotikům u příslušných kmenů.

5.1.2 Optimalizace měření fluorescence (pro GFP a DsRed)

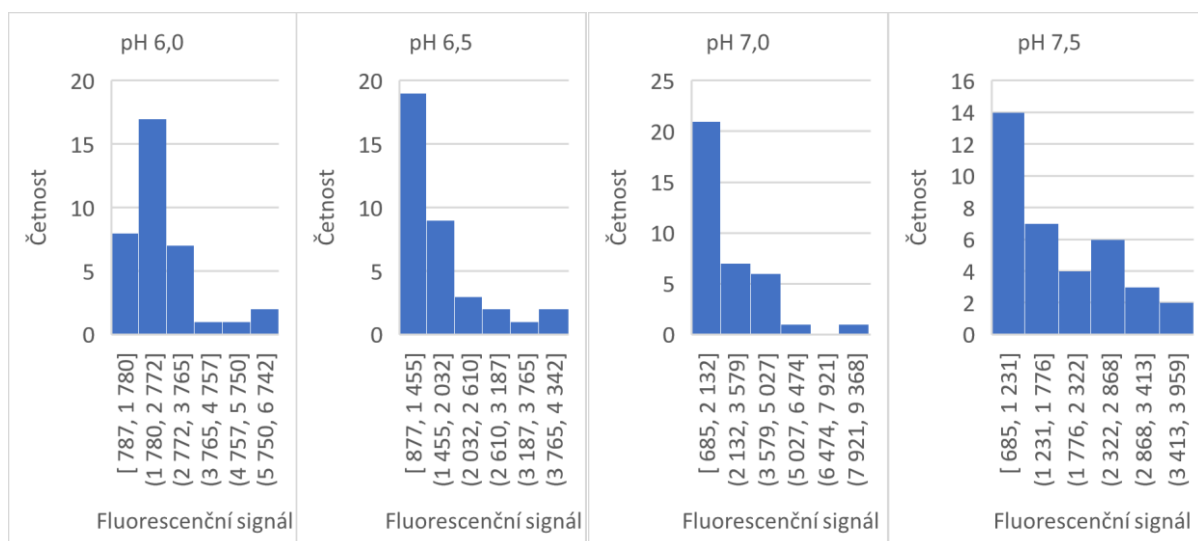
V rámci optimalizace měření fluorescence kmenů značených GFP a DsRed byly provedeny testy pro zjištění vlivu použitého pufru a jeho pH na výslednou fluorescenci značených kmenů. Pro měření se používal 10mM HEPES pufr upravený na požadovanou hodnotu pH pomocí 1M roztoku NaOH.

Byly otestovány 2 pufrы: HEPES a MES o pH 6 až 7,5. Ve obrázku 5.4 a skupině grafů 5.1. jsou výsledky testování HEPES pufru o různém pH. V testech byl použit kmen BR-F *pFLO11-GFP* (č.s.b.1840).



Obrázek 5.4. Závislost fluorescenci *pFlo11-GFP* na pH HEPES pufru. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).

Skupina grafů 5.1. Distribuce hodnot fluorescenci *pFlo11-GFP* v závislosti na použitém pH HEPES pufru.

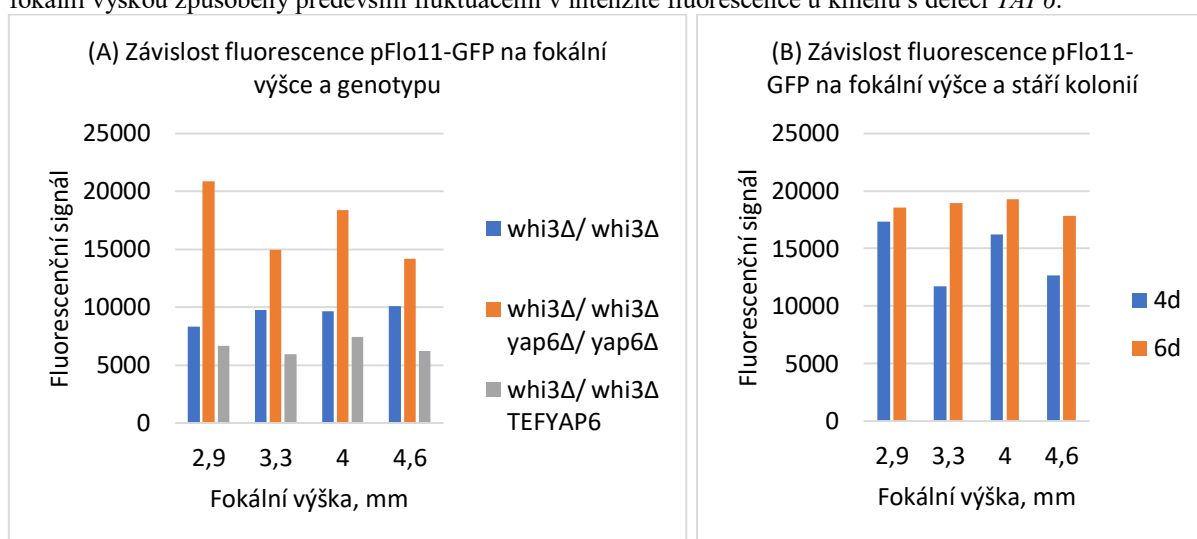


Pro měření fluorescence byl zvolen HEPES pufr s pH 7,5, který vykázal stabilní fluorescenci proteinu GFP v pH nad 6,5.

Dalším krokem optimalizace byla volba optimálních hodnot parametru fokální výšky pro měření fluorescence. Bylo provedeno několik testů pro zjištění vlivu fokální výšky na výsledné hodnoty fluorescence. Příklad výsledků je ve skupině grafů 5.2.

Skupina grafů 5.2. Závislost fluorescence pFlo11-GFP na fokální výšce, genotypu a stáří kolonie. V testu byly použity 4 a 6 dní staré kolonie kmenů:

BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983), BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Na grafu (A) jsou znázorněny součty hodnot fluorescence jednotlivých kmenů na stejné desce, na grafu (B) – součty hodnot fluorescence byly stanoveny zvlášť pro 4 a 6-denní kolonie. Z grafu je patrné, že jsou rozdíly ve fluorescenci u 4-denních kolonií při měření s různou fokální výškou způsobeny především fluktuacemi v intenzitě fluorescence u kmenů s delecí *YAP6*.



Výsledky neukázaly výrazný rozdíl v intenzitě fluorescence v použitém intervalu hodnot fokální výšky. Fluktuace součtu hodnot fluorescenčního signálu kmene BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) byla dána náhodným nárazem excitačního paprsku na velké shluky buněk, čímž dochází k výraznému zvýšení naměřených hodnot. Pro měření experimentálních dat se dále parametr fokální výšky pohyboval v rozmezí 3,3 – 4,0 podle výsledků kalibrací před začátkem příslušného měření.

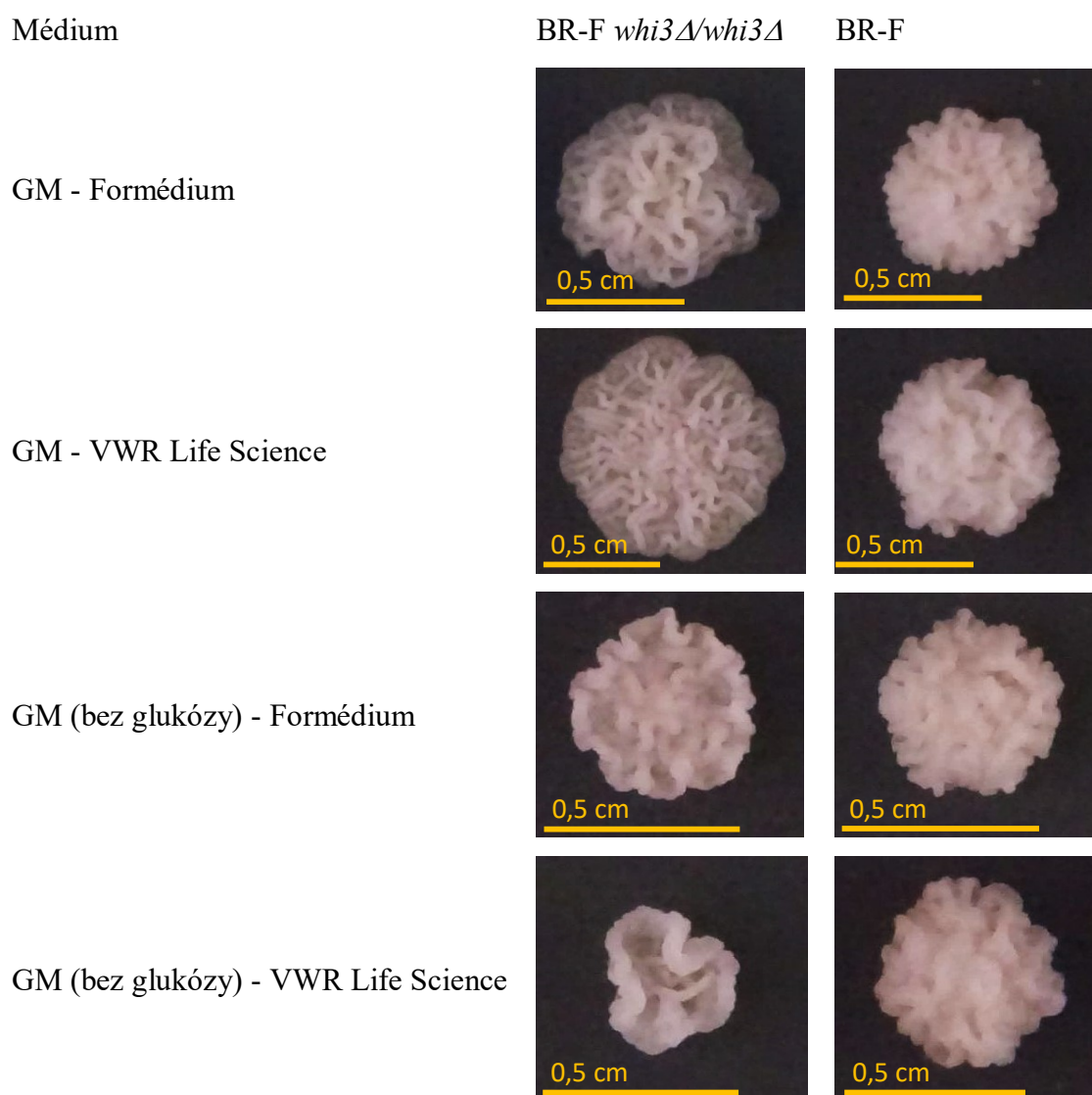
Pro měření fluorescence se připravuje z vrásčitých kolonií suspenze, ve kterých shluky buněk rychle sedimentují na dno zkumavek, což by mohlo způsobovat další chyby nerovnoměrným rozložením buněk v měřících jamkách. Při dávkování buněčných suspenzí na mikrotitrační destičky byly zkumavky důkladně míchány po každých 3 vzorcích nanesených na destičku, aby byly vzorky co nejméně variabilní.

5.1.3 Optimalizace složení kultivačního média

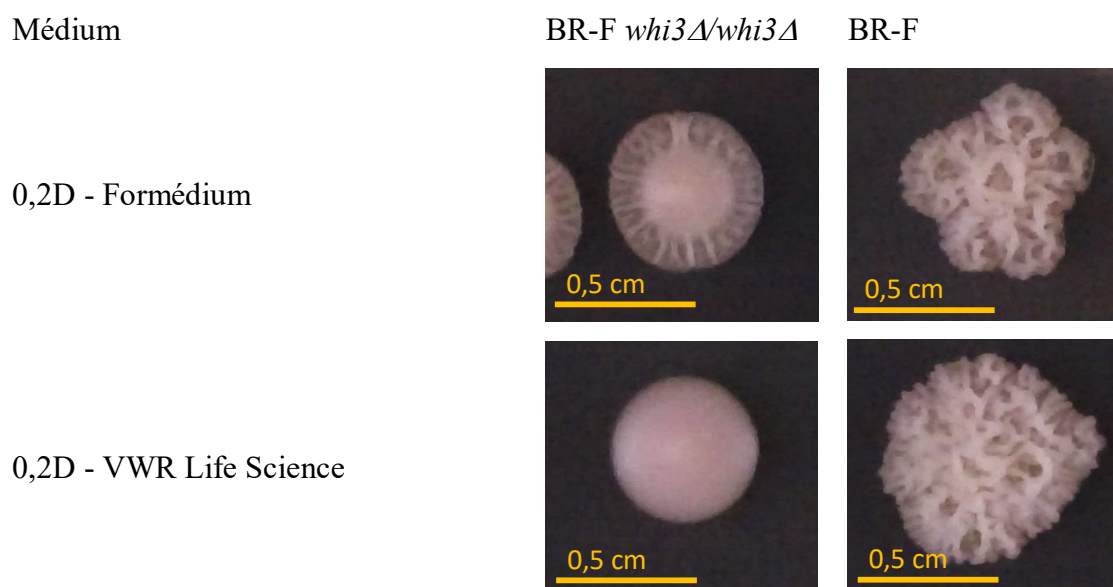
Složky kultivačního média mohou výrazně ovlivnit výslednou morfologii kolonií. Pro zajištění co nejvýraznějšího rozdílu ve strukturovanosti mezi koloniemi, kultivovanými v různých médiích, byla provedena optimalizace složení kultivačního média. Mezi sebou byly srovnány kvasničné autolyzáty (YE) dvou různých výrobců: Formédium a VWR Life Science.

Pro srovnání různých kvasničných autolyzátů byly použity 3 typy média: GM (0,04% glukózy), GM bez glukózy a 0,2D (0,2% glukózy). Mezi sebou byly porovnány 2 kmeny: divoký kmen (BR-F) a kmen s delecí obou alel genu *WHI3* (BR-F *whi3Δ/whi3Δ*).

Na obrázcích 5.5, 5.6 je porovnání morfologie 7-denních kolonií kmenů BR-F (č.s.b.207) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ* (č.s.b. 902) rostoucích na médiu s různými kvasničnými autolyzáty.



Obr. 5.5. Srovnání morfologie 7-denních kolonií na GM médiu a GM médiu bez glukózy. Oranžovou čarou je zobrazeno měřítko.



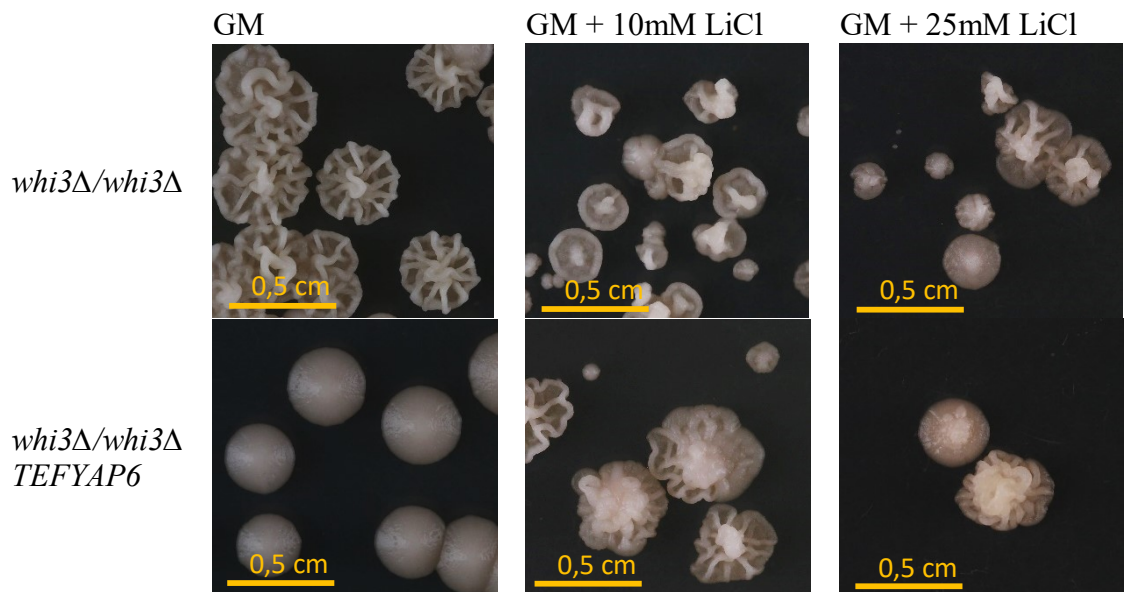
Obr. 5.6. Srovnání morfologie 7-denních kolonií na 0,2D médiu. Oranžovou čarou je zobrazeno měřítko.

Na médiu s VWR YE byl pozorován výraznější rozdíl v morfologii kolonií divokého kmene a kmene s delecí *WHI3* než na médiu s YE Formédium. V dalších kultivacích byl proto v médiu používán VWR YE.

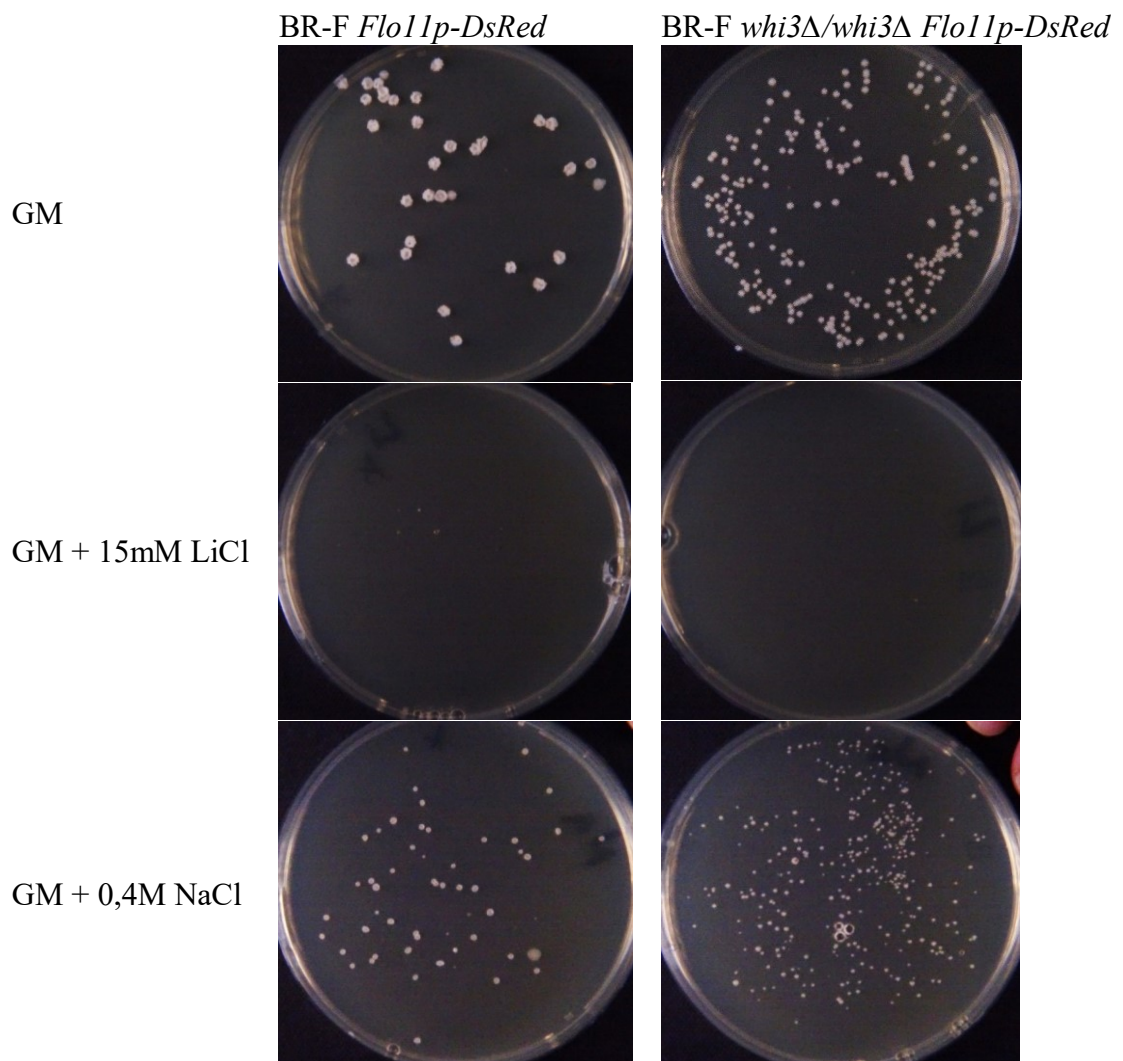
5.1.4 Optimalizace podmínek kultivace pro analýzu vlivu stresu

V literatuře je *YAP6* popsán jako gen, který se pravděpodobně podílí na regulaci odpovědi buňky na osmotický stress. Byla snaha najít takové selektivní podmínky, vyvolávající osmotický stress, při nichž by se lišil fenotyp kmenů s delecí *YAP6* od rodičovského kmene a kmene se zvýšenou expresí *YAP6*. Zároveň bylo potřeba, aby se vlivem stresoru příliš nezměnila rychlost růstu, protože jsme chtěli měřit fluorescenci buněk v koloniích stejného stáří.

Byl otestován vliv NaCl a LiCl v různých koncentracích na výsledný fenotyp kmenů s mutacemi *YAP6* a rodičovského kmene při kultivaci monokolonií na GM médiu. Na obrázku 5.7 je znázorněn vliv LiCl v koncentracích 10mM a 25mM na morfologii 10-denních kolonií kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Na obrázku 5.8 je zobrazeno porovnání inhibice růstu 4-denních kolonií buněk, způsobené 15mM LiCl a 0,4M NaCl pro kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *Flo11p-DsRed* (č.sb. 1235).



Obr. 5.7. Vliv LiCl na morfologii kolonií u kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Na obrázku je zřetelná silná inhibice růstu většiny kolonií buněk působením LiCl.



Obr. 5.8. Vliv NaCl a LiCl na růst kolonií u kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *Flo11p-DsRed* (č.sb. 1235). Při kultivaci na GM s 15mM LiCl byl růst kolonií v prvních 4 dnech silně inhibován.

Silná inhibice růstu buněk, způsobena LiCl v malých koncentracích (10-25mM LiCl) by kolidovala s možností získat suspenze buněk z těchto kolonií pro měření. Na základě orientačních kultivačních testů byl pro měření vlivu osmotického stresu na expresi *FLO11* NaCl v koncentracích 40mM a 120mM. Za daných podmínek bylo možné pozorovat zřetelnou změnu v morfologii kolonií a zároveň inhibice růstu nebyla příliš silná a nekolidovala s možností získu dostatečného množství biomasy pro analýzu fluorescence. Vliv 40mM a 120mM NaCl na morfologii kolonií je zobrazen v kapitole 5.2.4, na obrázcích 5.16, 5.17 5.18 a 5.19.

5.2 Sledování produkce Flo11p kolonií kmenů různého genotypu (*WHI3*, *YAP6* - delece genů, zvýšená exprese) během kultivace za standardních i stresových podmínek

Pro sledování exprese *FLO11* byly připraveny kmeny, značené pomocí fluorescenčních proteinů GFP a DsRed. Kódující sekvence fluorescenčního proteinu GFP byla vložena za promotorovou sekvenci jedné z alel *FLO11*, což umožnilo sledování exprese *FLO11* na úrovni transkripce.

Kmeny značené DsRed byly připraveny N-koncovou fúzí jedné alely genu *FLO11* s kódující sekvencí fluorescenčního proteinu DsRed. Tento systém umožnil sledování exprese proteinu Flo11 i na translační a posttranslační úrovni.

Pro eliminaci vlivu přirozené fluorescence buněk byla všechna stanovení intenzity fluorescence doprovázena negativní kontrolou. Průměrná hodnota negativní kontroly byla následně odečtena od naměřených hodnot fluorescence testovaných kmenů na příslušném médiu. V závislosti na testovaných kmenech, jako negativní kontrola byl použit rodičovský kmen BR-F (v případě stanovení fluorescence *WHI3*+ kmenů) nebo kmen BR-F *whi3Δ/whi3Δ* (č.s.b. 902). Negativní kontrola vykazovala výrazně menší rozptyl hodnot fluorescence než značené kmeny, bez závislosti na složení média.

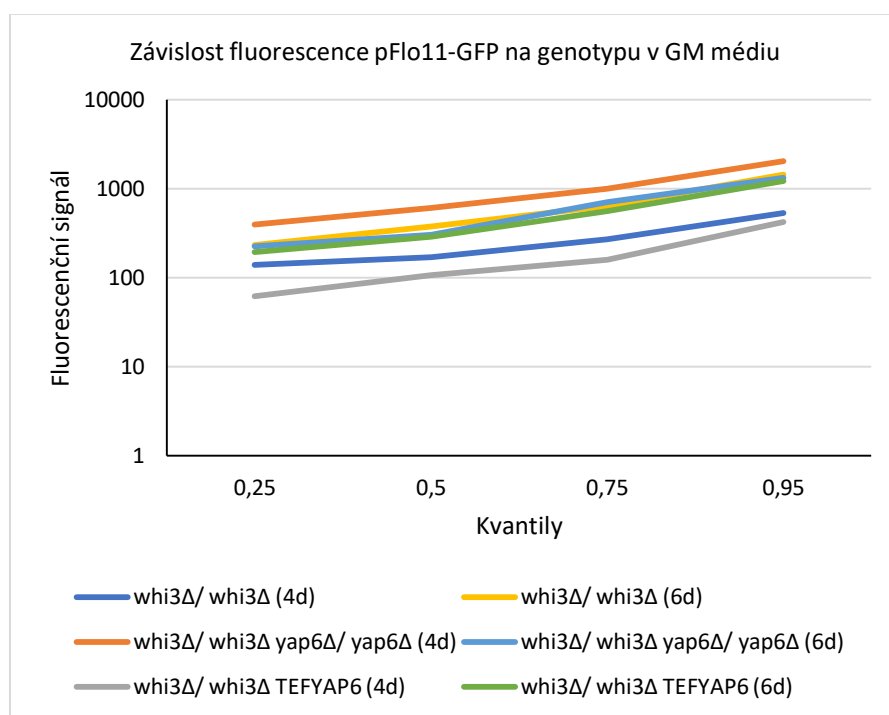
5.2.1 Vliv genotypu *YAP6* a stáří kolonie na expresi *FLO11* u kmene s delecí *WHI3*

Fluorescence značených kmenů byla sledována u 4 a 6 dní starých kolonií, protože v daném časovém období dochází k výrazné změně ve vráscitosti kmenů s delecí *WHI3* a podle předchozích experimentů i ke změnám ve fluorescenci značených kolonií. Zároveň, kolonie mladší než 4 dny, často neposkytovaly dostatečné množství biomasy na analýzy (efekt byl mnohem výraznější na médiích se stresorem).

Vliv genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3* za neselektivních podmínek

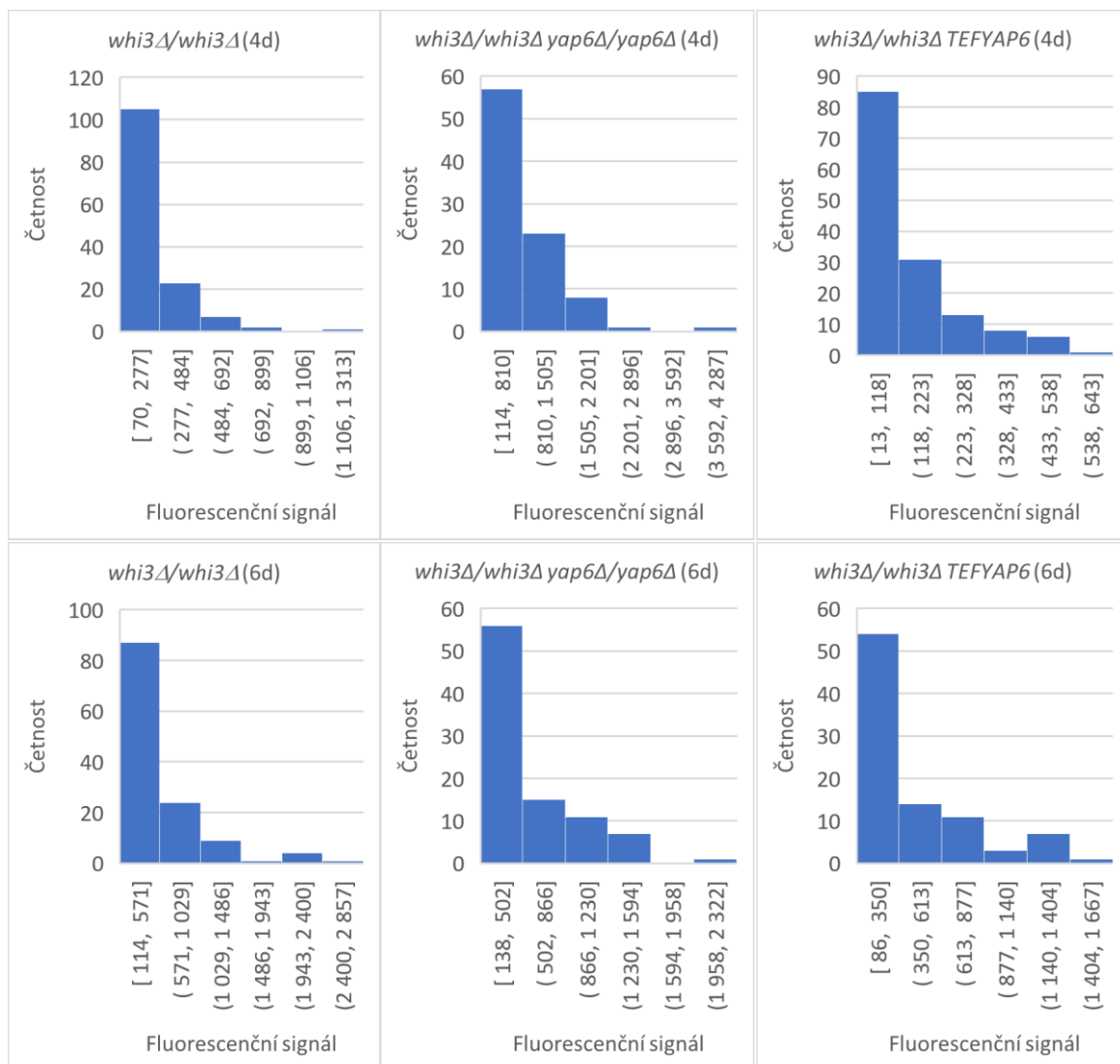
Pro zjištění vlivu delece/overexprese *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3* za neselektivních podmínek byla provedena série experimentů. Byly sledovány kmeny s delecí *WHI3*, s dvěma standardními alelami *YAP6*, kmen BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), s delecí obou alel *YAP6* BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) a se zvýšenou expresí *YAP6* BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007), u kterého byl u jedné alely nahrazen původní promotor promotorem TEF.

Byla provedena série stanovení intenzity fluorescence 4 a 6-denních kolonií výše zmíněných kmenů rostoucích na GM médiu. Na obrázku 5.9 jsou shrnuty výsledky několika stanovení, tabulka 5.1 popisuje kvantitativní údaje o naměřených hodnotách. Ve skupině grafů 5.2 jsou uvedena data o distribuci hodnot fluorescencí pFlo11-GFP příslušných kmenů. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.3.



Obrázek 5.9. Závislost fluorescencí pFlo11-GFP na genotypu v GM médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko). Čísla v závorkách v legendě grafu popisují stáří kolonií příslušného kmene. V experimentech byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007).

Skupina grafů 5.3. Distribuce naměřených hodnot fluorescencí pFlo11-GFP použitých kmenů.



Tabulka 5.1. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách.

| Kmen | Stáří kolonie, d | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|--------------------------------|------------------|--------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | 4 | GM | 2 | 8 | 138 |
| | 6 | GM | 2 | 7 | 126 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | 4 | GM | 2 | 5 | 90 |
| | 6 | GM | 2 | 5 | 90 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | 4 | GM | 2 | 8 | 144 |
| | 6 | GM | 1 | 5 | 90 |

Tabulka 5.2. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Parametr Inkubace vyjadřuje vliv doby kultivace na výslednou fluorescenci. Parametr Kmen vyjadřuje vliv genotypu na výslednou fluorescenci.

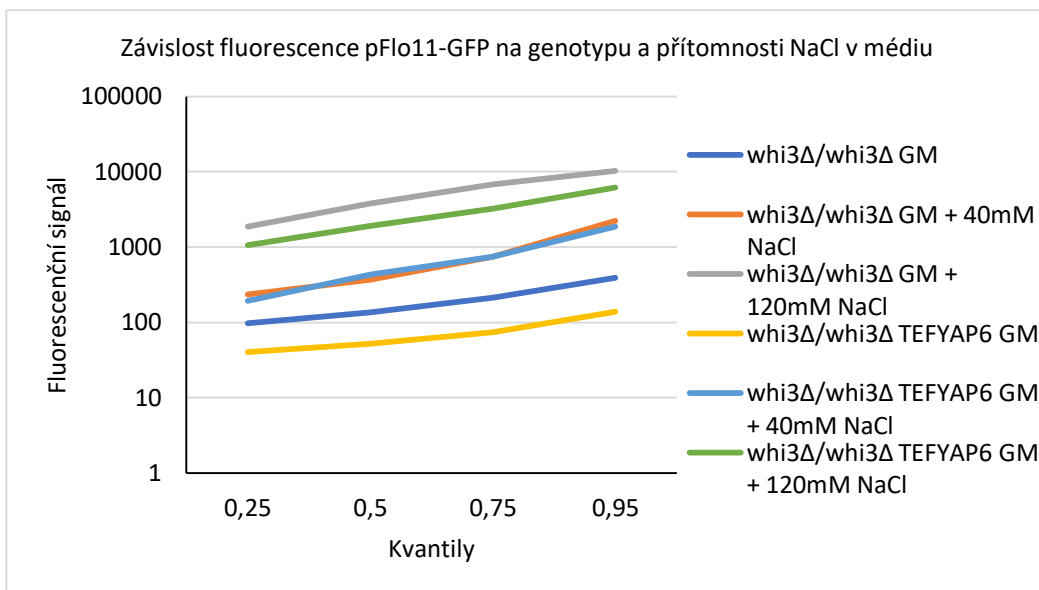
| Parameter | Kmen | Inkubace | Kmen:Inkubace |
|-----------------|-----------|-----------|---------------|
| Df | 2 | 1 | 2 |
| Df.res | 840 | 840 | 840 |
| Sum Sq | 13313714 | 536064 | 2542919 |
| Sum Sq.res | 35259567 | 48313509 | 45751350 |
| F value | 158,59 | 9,32 | 23,34 |
| Pr(>F) | 3,710E-59 | 2,338E-03 | 1,360E-10 |
| Efekt parametru | 0,27 | 0,01 | 0,05 |

V buněčných suspenzích z kolonií po 4 dnech inkubace byla, v souladu s předpokladem, nejvyšší fluorescence u buněk kmene s delecí obou alel genu *YAP6* (BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP*, č.sb.1983). Kmen se zvýšenou expresí *YAP6*, *TEFYAP6* (BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP*, č.sb.2007) měl nejnižší hodnoty fluorescence. Ze získaných dat vyplývá, že *YAP6* má negativní účinek na expresi *FLO11*. Rozdíly v expresi *FLO11* jsou velmi významné v časných fázích vývoje kolonie, ale jsou méně výrazné u starších kolonií. Statistická analýza potvrzuje, že velké rozdíly v získaných hodnotách fluorescence jsou závislé na hladině Yap6p. Rozdíly v genotypu *YAP6* lze vysvětlit 27% celkové variability fluorescence v daných experimentech.

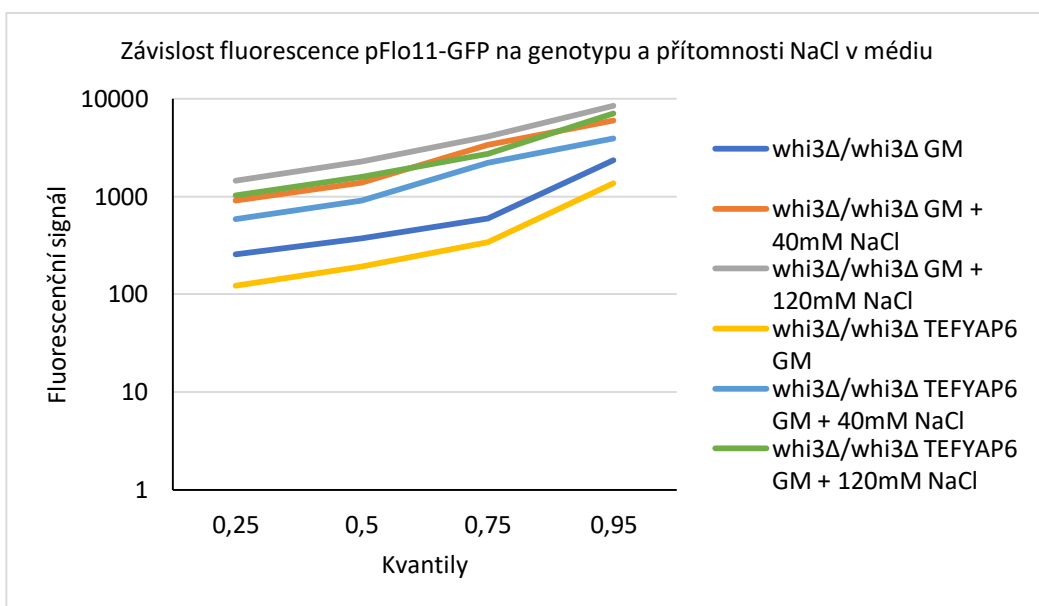
5.2.2 Sledování vlivu genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* a morfologii kolonií ve stresových podmínkách

Pro sledování vlivu delece/overexprese *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3* za vybraných selektivních podmínek byla provedena série stanovení intenzity fluorescencí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed u připravených kmenů za podmínek kultivace monokolonií na pevném GM médiu a GM médiích s přidavkem NaCl (40mM a 120mM).

Shrnutí výsledků stanovení intenzity fluorescencí pFlo11-GFP kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb. 2007) je znázorněno na obrázcích 5.10 a 5.11. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulkách 5.3, 5.4. Skupiny grafů 5.4 a 5.5 znázorňují tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence příslušných kmenů. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.5.

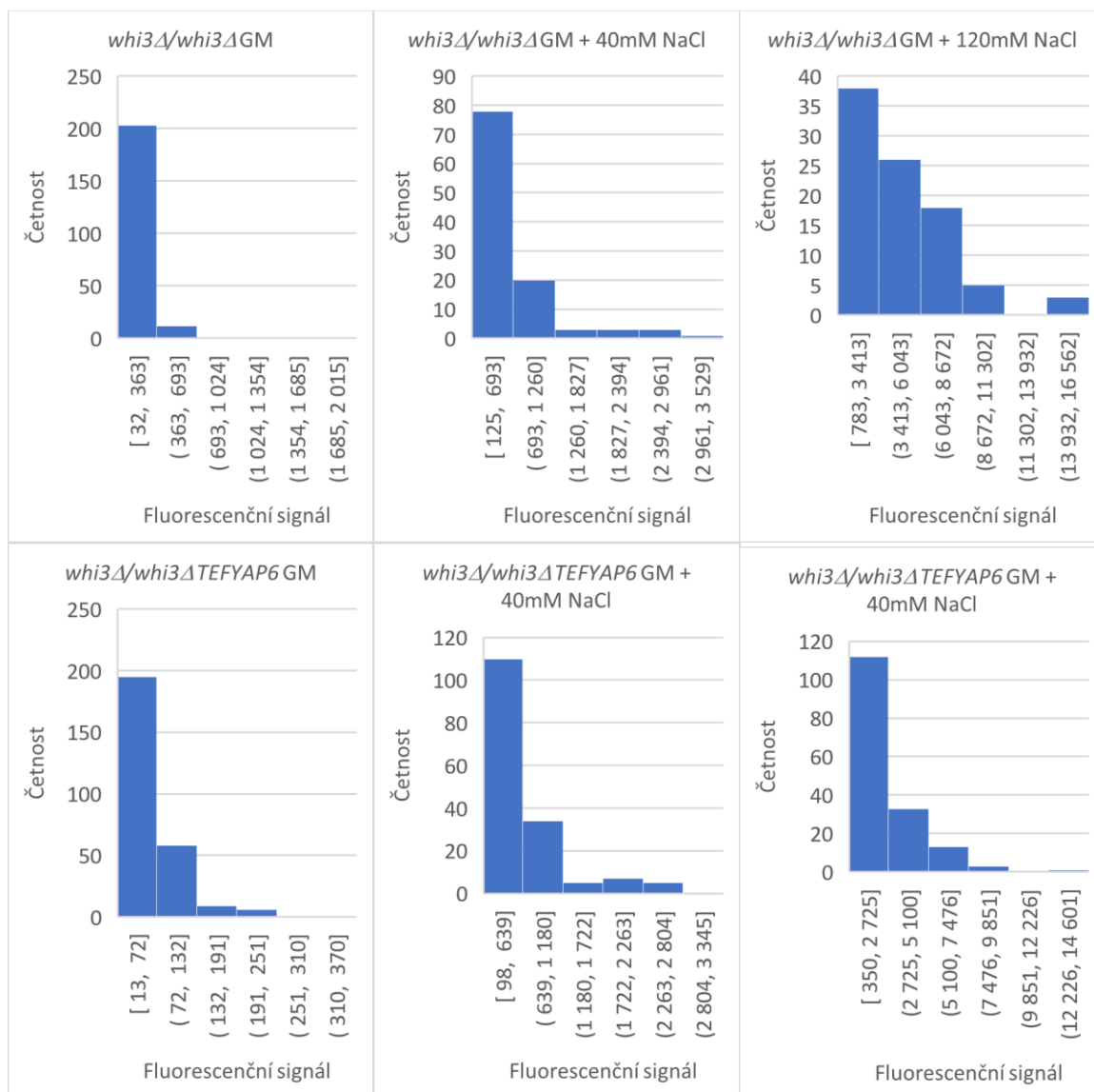


Obrázek 5.10. Závislost fluorescence 4-denních kolonií, značených pFlo11-GFP na genotypu a přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko). V experimentech byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb. 2007).



Obrázek 5.11. Závislost fluorescence 6-denních kolonií, značených pFlo11-GFP na genotypu a přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko). V experimentech byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb. 2007).

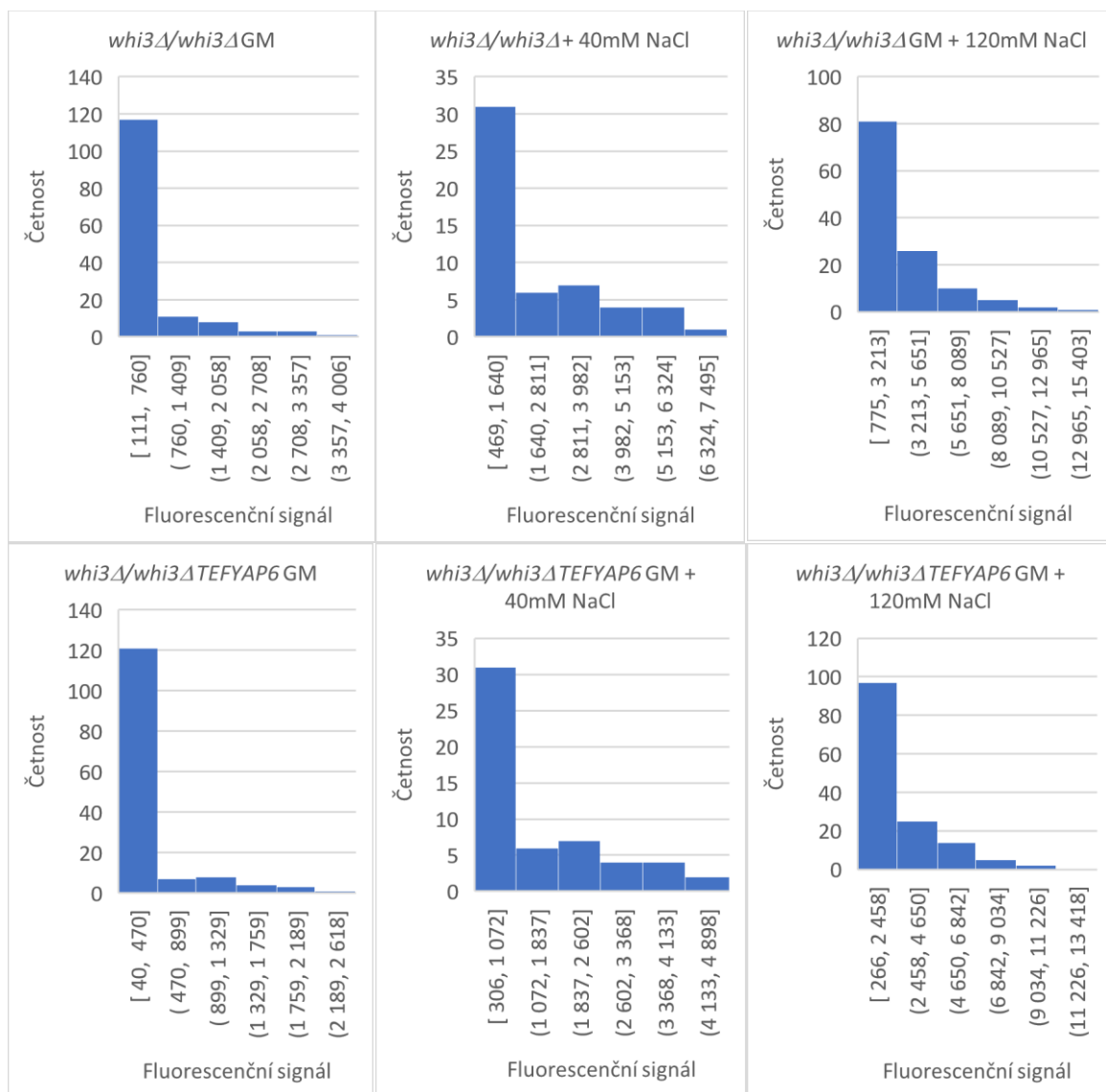
Skupina grafů 5.4. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u 4-denních kolonií.



Tabulka 5.3. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u 4-denních kolonií.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|---------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 3 | 6 | 216 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 3 | 108 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 5 | 91 |
| <i>whi3Δ/whi3ΔTEFYAP6</i> | GM | 3 | 10 | 270 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 5 | 162 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 5 | 162 |

Skupina grafů 5.5. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u 6-denních kolonií.



Tabulka 5.4. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u 6-denních kolonií.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|---------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 2 | 8 | 144 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 7 | 125 |
| <i>whi3Δ/whi3ΔTEFYAP6</i> | GM | 2 | 8 | 144 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 8 | 144 |

Tabulka 5.5. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb. 2007). Parametr Médium vyjadřuje vliv NaCl v různých koncentracích na výslednou fluorescenci. Parametr Kmen vyjadřuje vliv genotypu na výslednou fluorescenci.

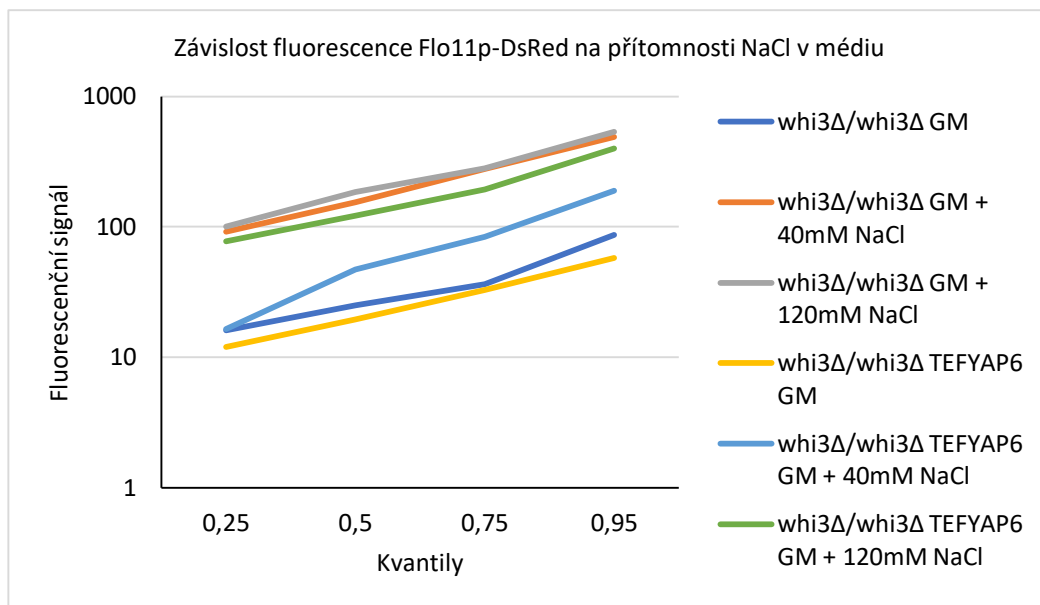
| Stáří kol., d | 4 | | | 6 | | |
|-----------------|-----------|------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| Parametr | Kmen | Médium | Kmen:Médium | Kmen | Médium | Kmen:Médium |
| Df | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Df.res | 1002 | 1002 | 1002 | 318 | 318 | 318 |
| Sum Sq | 10094978 | 50390738 | 12788026 | 151927 | 1582566 | 48013 |
| Sum Sq.res | 63318254 | 28329465 | 62736578 | 2473919 | 1225901 | 2588984 |
| F value | 159,75 | 891,15 | 102,12 | 19,53 | 205,26 | 2,95 |
| Pr(>F) | 4,391E-34 | 4,288E-223 | 4,321E-41 | 1,361E-05 | 5,725E-58 | 5,385E-02 |
| Efekt parametru | 0,14 | 0,64 | 0,17 | 0,06 | 0,56 | 0,02 |

Výsledky statistického zpracování hodnot ukazují, že vliv genotypu je vyšší u mladších kolonií, velmi silný vliv NaCl je srovnatelný u 4 i 6-denních kolonií (zjištěný efekt média kolem 60%). U 4 denních kolonií je velmi významná interakce mezi genotypem a přítomností NaCl. Podle Tukey analýzy (tabulka P1, P2) jsou velké rozdíly v hodnotě fluorescence mezi oběma kmeny při kultivaci na GM (HSD 19,5), není rozdíl mezi hodnotami při kultivaci na GM 40 (HSD 0,85) a pouze malý rozdíl je při kultivaci na GM 120 (HSD 4,45). To lze vysvětlit pozitivním efektem zvýšení hladiny Yap6p při osmotickém stresu. Rozdíly v hodnotách fluorescence mezi 6-denními koloniemi obou kmenů jsou méně výrazné, vliv interakce mezi genotypem a přítomností NaCl je velmi slabý. Stírají se rozdíly při kultivaci za neselektivních podmínek (HSD 5,31) i za obou podmínek osmotického stresu (hodnoty HSD 3,16 a 2,6).

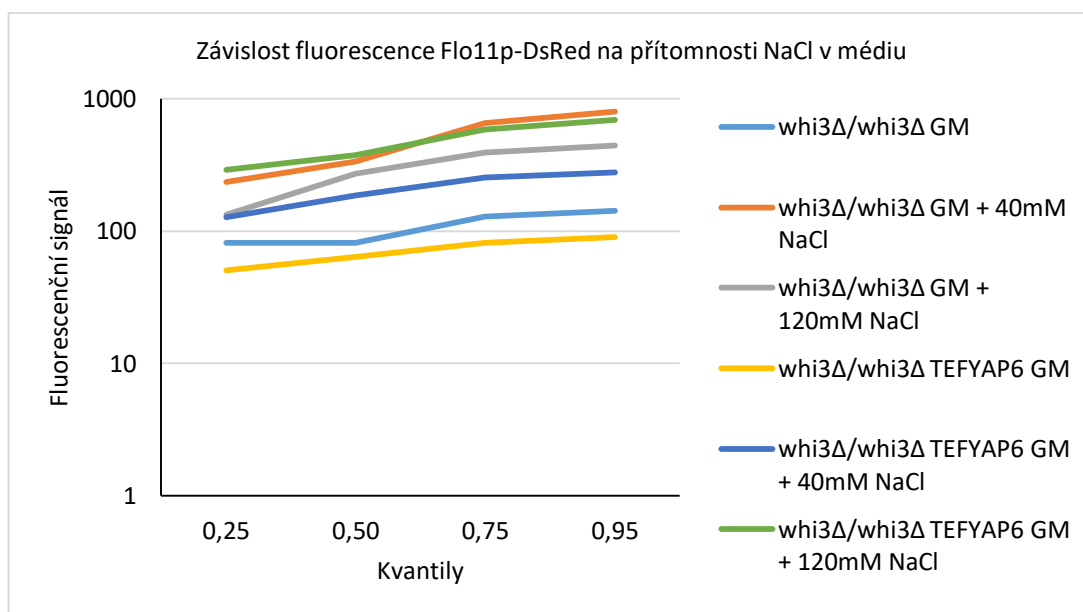
Vliv overexprese *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3*, značených Flo11p-DsRed za vybraných selektivních podmínek

Byla provedena série experimentů pro stanovení fluorescence u kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016) pro sledování vlivu selektivních podmínek a genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* na translační a post-translační úrovni.

Výsledky stanovení intenzity fluorescence vybraných kmenů za podmínek kultivace monokolonií na pevném GM médiu a GM médiích s 40mM a 120mM NaCl jsou shrnuty na obrázcích 5.12 a 5.13. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulkách 5.6, 5.7. Skupiny grafů 5.6 a 5.7 znázorňují tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence příslušných kmenů. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.8.

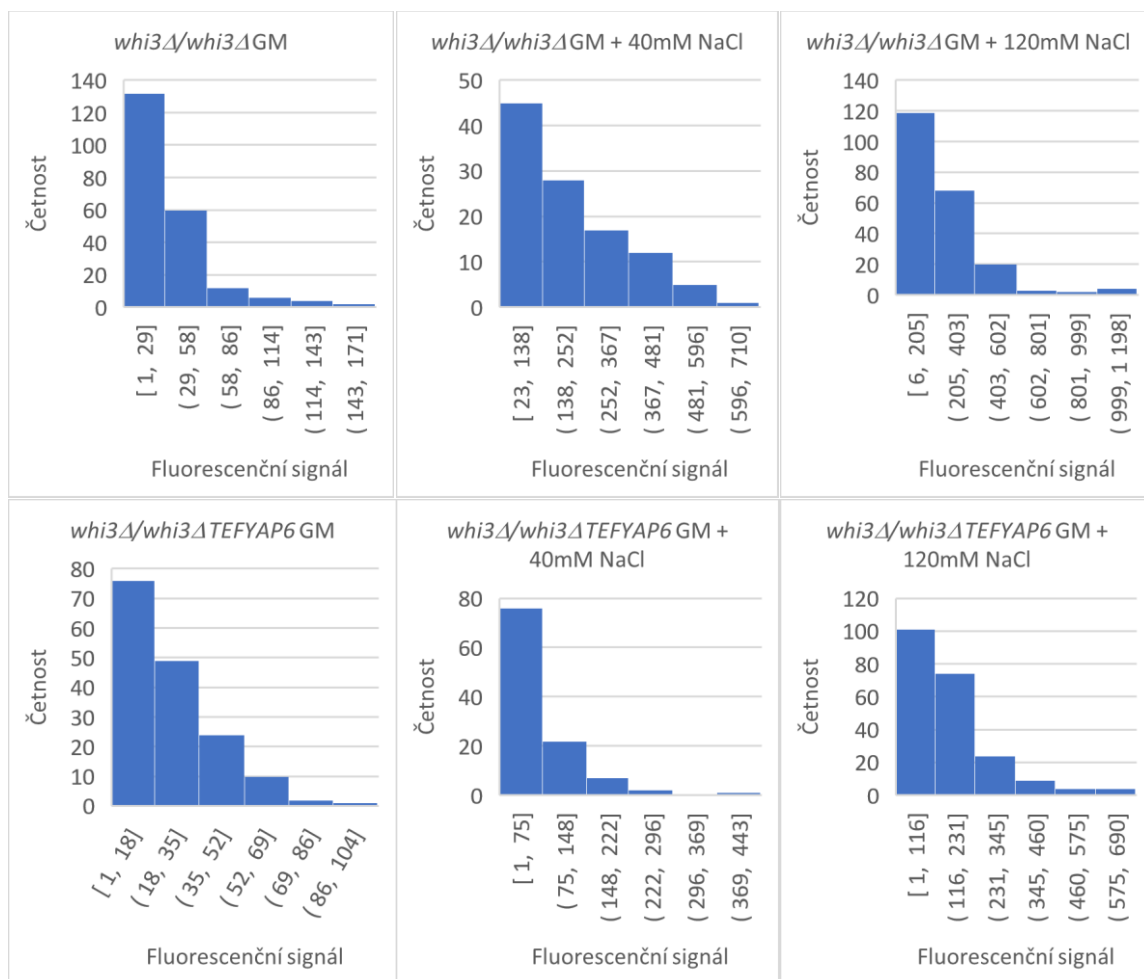


Obrázek 5.12. Závislost fluorescence u 4-denních kolonií, značených Flo11p-DsRed na genotypu a přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko). V experimentech byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016).



Obrázek 5.13. Závislost fluorescence u 6-denních kolonií, značených Flo11p-DsRed na genotypu a přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko). V experimentech byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016).

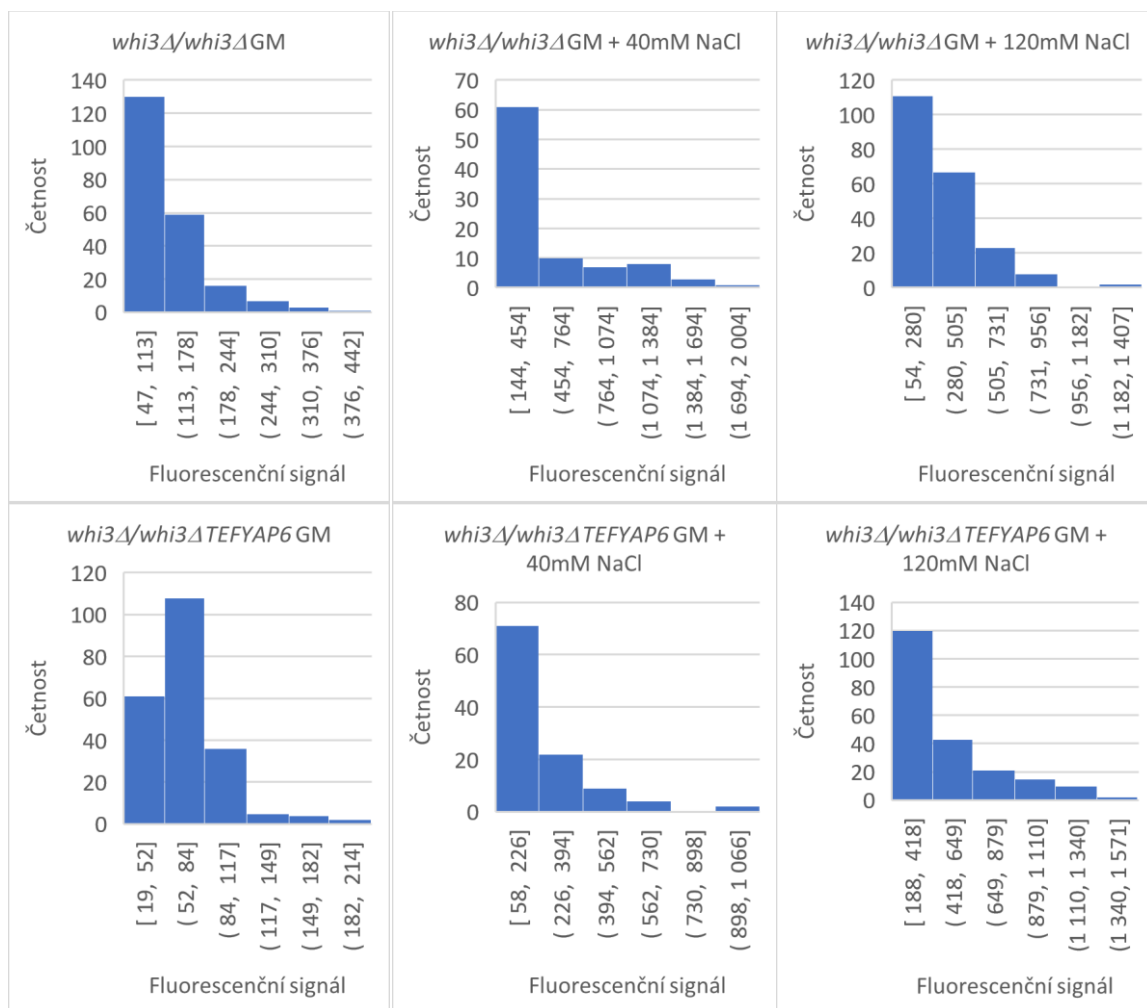
Skupina grafů 5.6. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence Flo11p-DsRed u 4-denních kolonií.



Tabulka 5.6. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescence Flo11p-DsRed u 4-denních kolonií.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|----------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 2 | 12 | 216 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 12 | 216 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 2 | 12 | 162 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 3 | 216 |

Skupina grafů 5.7. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence Flo1p-DsRed u 6-denních kolonií.



Tabulka 5.7. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescence Flo1p-DsRed u 4-denních kolonií.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|----------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 2 | 12 | 216 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 90 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 12 | 212 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 2 | 12 | 216 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 90 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 12 | 211 |

Tabulka 5.8. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016). Parametr Médium vyjadřuje vliv NaCl v různých koncentracích na výslednou fluorescenci. Parametr Kmen vyjadřuje vliv genotypu na výslednou fluorescenci.

| Stáří kol., d | 4 | | | 6 | | |
|-----------------|-----------|------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| Parametr | Kmen | Médium | Kmen:Médium | Kmen | Médium | Kmen:Médium |
| Df | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Df.res | 1020 | 1020 | 1020 | 1047 | 1047 | 1047 |
| Sum Sq | 6167735 | 39020901 | 8376149 | 429423 | 56451118 | 13550775 |
| Sum Sq.res | 76094652 | 48320874 | 77576921 | 90278842 | 38101925 | 75668942 |
| F value | 82,67 | 411,84 | 55,07 | 4,98 | 775,61 | 93,75 |
| Pr(>F) | 4,931E-19 | 7,683E-132 | 1,951E-23 | 2,585E-02 | 2,289E-207 | 3,525E-38 |
| Efekt parametru | 0,075 | 0,447 | 0,097 | 0,005 | 0,597 | 0,152 |

Ze získaných výsledků plyne, že vlivem NaCl dochází k intenzivní indukci exprese *FLO11* u obou kmenů. Výsledky statistického zpracování naměřených hodnot ukazují, že genotyp kmenů ovlivňuje expresi *FLO11* v ranních fázích vývoje, ale jeho efekt byl mnohem slabší, než přítomnost NaCl v médiu. U 4 a 6-denních kolonií dochází k velmi významné interakci mezi genotypem a přítomností NaCl, kterou lze vysvětlit 10% a 15% celkové variability fluorescence v daných stanoveních. Tukey test (tabulka P3, P4) pro 4-denní kolonií ukázal velký rozdíl v hodnotách fluorescence mezi kmeny jenom při kultivaci na GM + 40mM NaCl mediu (HSD 12,56). U 6-denní kolonií byly stanoveny velké rozdíly v hodnotách fluorescence mezi kmeny na všech médiích.

Vliv delece *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3*, značených Flo11p-DsRed a pFLO11-GFP za vybraných selektivních podmínek

Pro další potvrzení vlivu NaCl na kmeny s delecí *WHI3* byla provedena série stanovení intenzity fluorescencí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed u kmenů s delecí *YAP6* za podmínek kultivace monokolonií na pevném GM médiu a GM médiích s přidavkem NaCl (40mM a 120mM). V experimentech byly použity kmeny

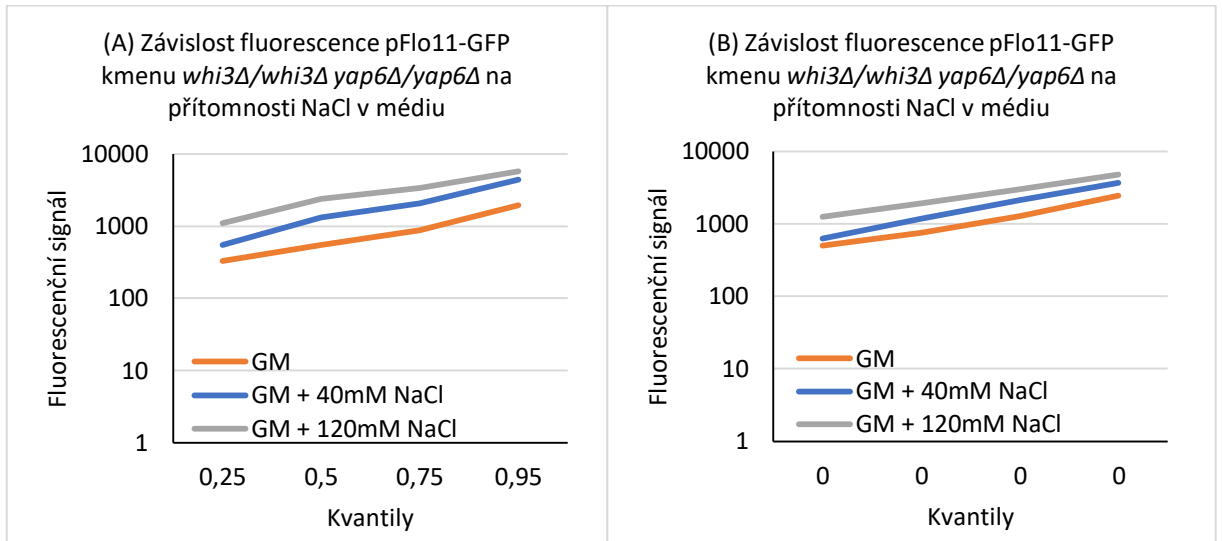
BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) a

BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed* (č.sb.3028).

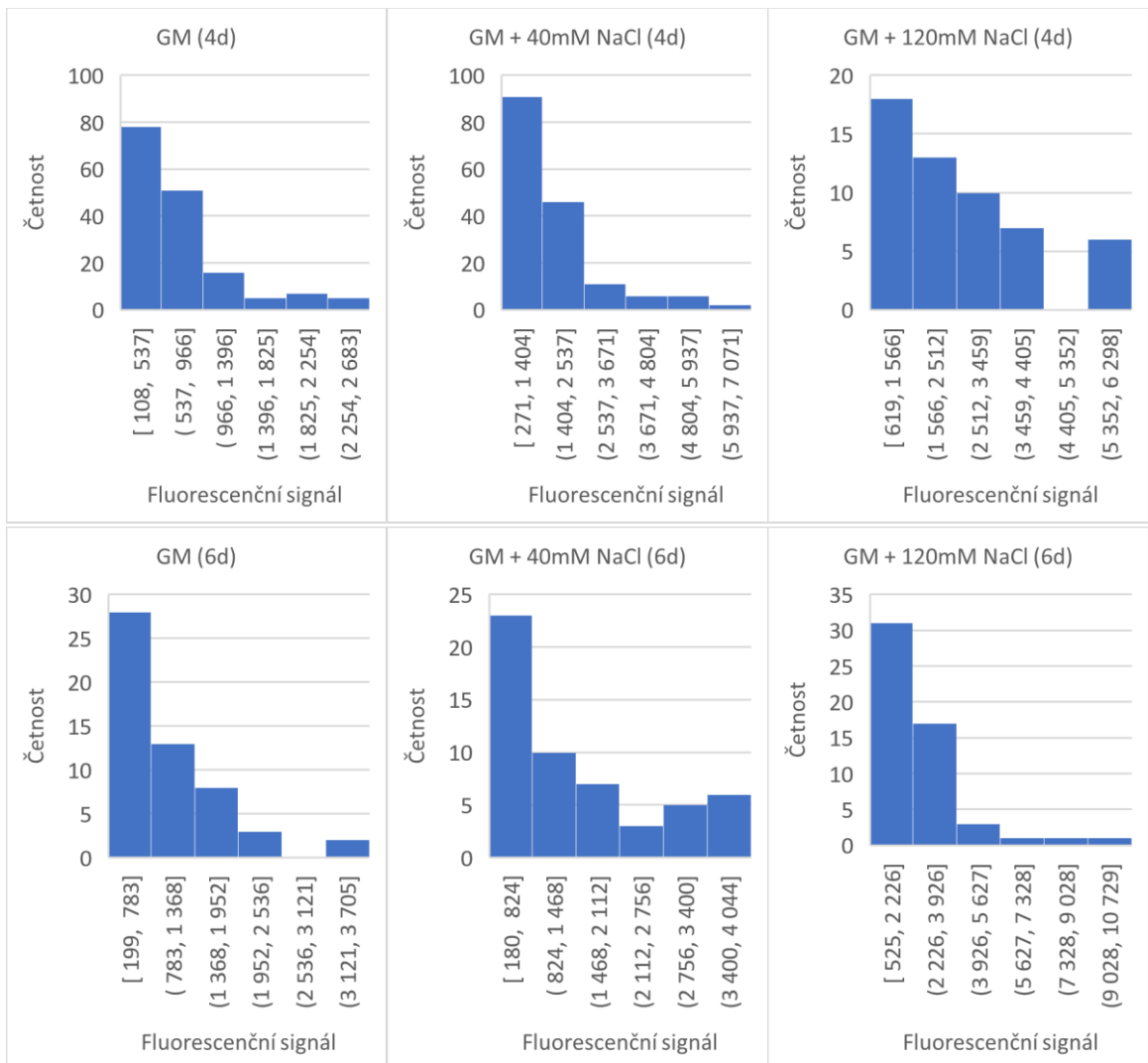
Výsledky sledování intenzity fluorescencí pFlo11-GFP kmenu

BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983) jsou znázorněny ve skupině grafů 5.8. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulce 5.9. Skupina grafů 5.9 znázorňuje tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.11.

Skupina grafů 5.8. Závislost fluorescence pFlo11-GFP (A) u 4-denních a (B) u 6-denních kolonií kmene *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* na přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).



Skupina grafů 5.9. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence kmene *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* po 4 a 6 dnech kultivace. Čísla v závorkách v názvu grafu popisují stáří kolonií.



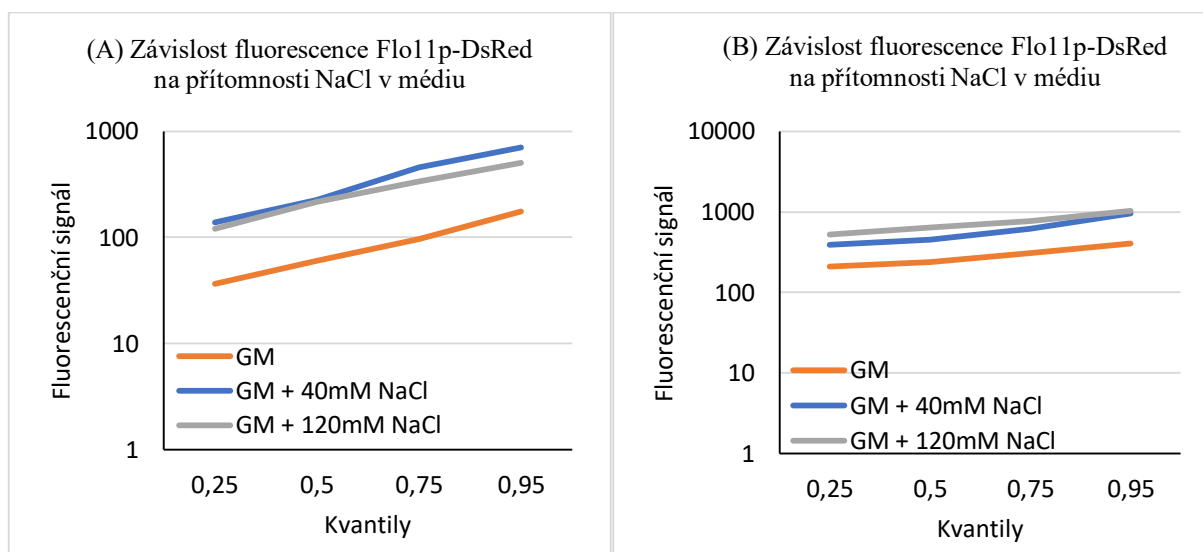
Tabulka 5.9. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP.

| Kmen | Stáří kolonie, d | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|--------------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | 4 | GM | 2 | 9 | 162 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |
| | 4 | GM + 40mM NaCl | 2 | 9 | 162 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |
| | 4 | GM + 120mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |

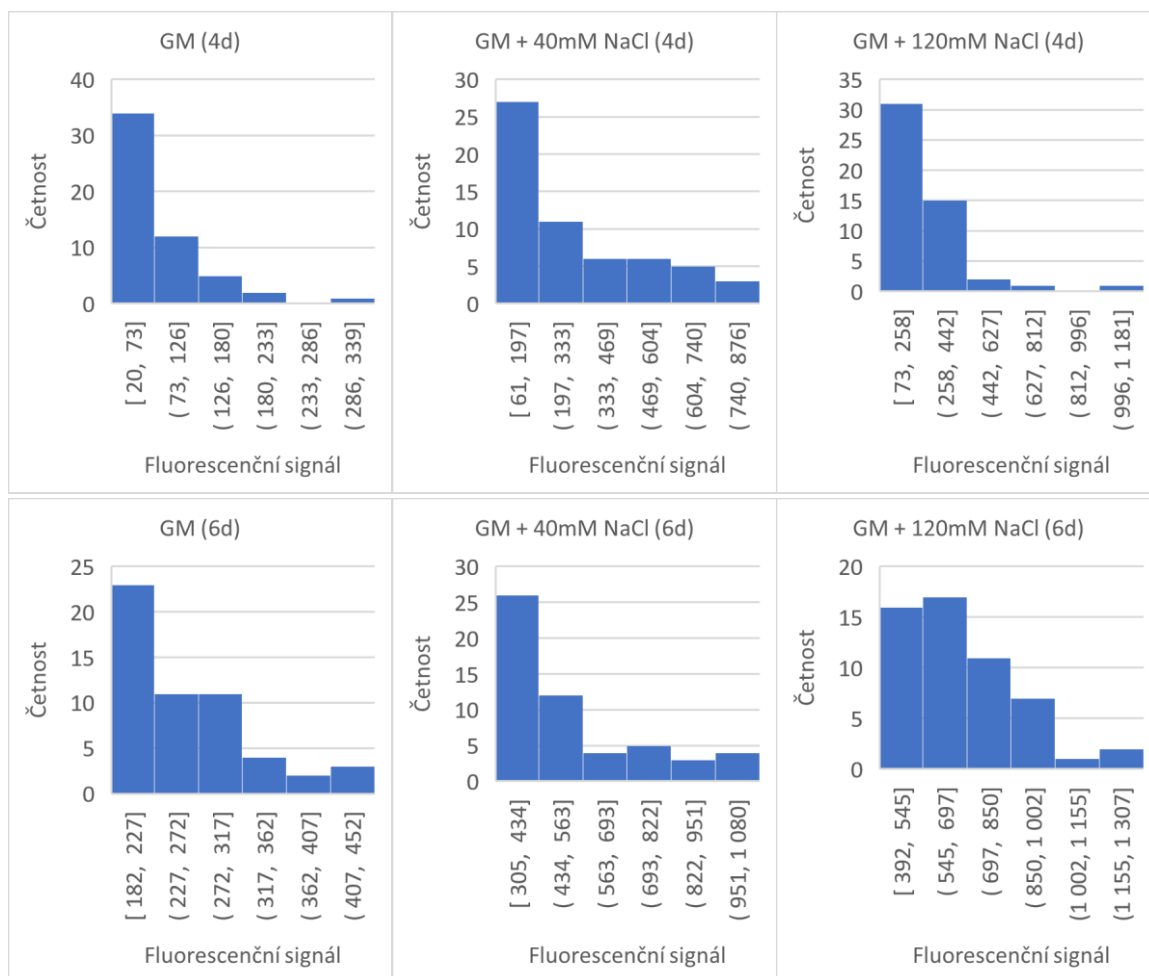
Výsledky sledování intenzity fluorescence Flo11p-DsRed kmene

BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed* (č.s.b. 3028) jsou znázorněny ve skupině grafů 5.10. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulce 5.10. Skupina grafů 5.11 znázorňuje tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.11.

Skupina grafů 5.10. Závislost fluorescence Flo11p-DsRed (A) 4-denních a (B) 6-denních kolonií kmene BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed* (č.s.b. 3028) na přítomnosti NaCl v médiu. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).



Skupina grafů 5.11. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence Flo11p-DsRed kmenu BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed* (č.s.b. 3028) po 4 a 6 dnech kultivace. Čísla v závorkách v názvu grafu popisují stáří kolonií.



Tabulka 5.10. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescence Flo11p-DsRed.

| Kmen | Stáří kolonie, d | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|--------------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | 4 | GM | 1 | 3 | 54 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |
| | 4 | GM + 40mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |
| | 4 | GM + 120mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | 6 | | 1 | 3 | 54 |

Tabulka 5.11. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* značených pomocí Flo11p-DsRed a pFlo11-GFP. Parametr Médium vyjadřuje vliv NaCl v různých koncentracích na výslednou fluorescenci.

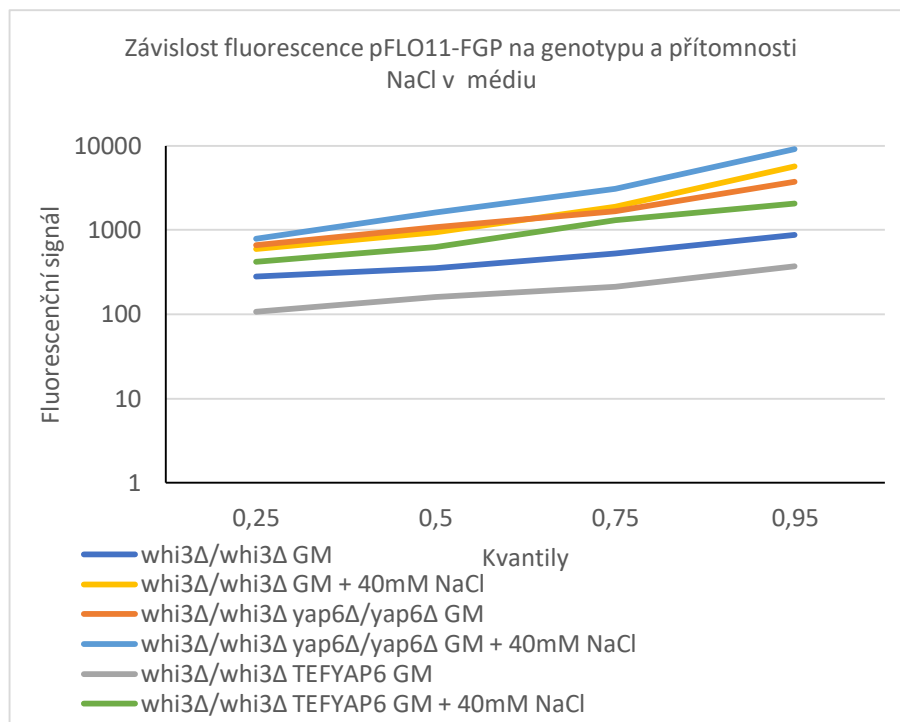
| Kmen | BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed</i> | BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP</i> | BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP</i> | BR-F <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP</i> |
|-----------------|--|--|--|--|
| Stáří kol., d | 4 | 6 | 4 | 6 |
| Parametr | Médium | | | |
| Df | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Df.res | 159 | 159 | 159 | 159 |
| Sum Sq | 172286 | 237142 | 182918 | 69511 |
| Sum Sq.res | 181971 | 117128 | 171361 | 284767 |
| F value | 75,27 | 160,96 | 84,861 | 19,41 |
| Pr(>F) | 9,985E-24 | 6,117E-39 | 8,38E-26 | 2,878E-08 |
| Efekt parametru | 0,49 | 0,67 | 0,52 | 0,20 |

Z výsledků měření intenzity fluorescence kmenů s delecí *WHI3* a *YAP6* plyne, že NaCl způsobuje zvýšení exprese *FLO11* jak pro systém GFP, tak i pro DsRed systém. Statistická analýza ukazuje, že se vliv NaCl na výslednou fluorescenci u kmene značeného pomocí GFP snižuje s časem více než dvakrát, oproti rostoucímu vlivu NaCl na fluorescenci kmene značeného pomocí DsRed. Popsaný efekt by mohl být vysvětlen změnami stability transkriptu či proteinu nebo regulací iniciace translace v průběhu kultivace.

Tukey test pro porovnání výsledků 4-denních kolonií kmenů *yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* a *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* z přechozích stanovení (tabulka P8) ukázal, že u kmene *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* mezi 40 mM a 120 mM NaCl už nedochází ke změnám fluorescence, zatímco u *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* je nárůst výrazný.

Vliv genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* u kmenů s delecí *WHI3*, značených pFlo11-GFP za vybraných selektivních podmínek

Pro porovnání vlivu genotypu (delece a overexprese) *YAP6* u kmenů s delecí *WHI3* bylo provedeno stanovení intenzity fluorescence u kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983), BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Fluorescence byla sledována u suspenzí buněk z monoklonií rostoucích 4 dnů na pevném GM médiu a GM médiu s 40mM NaCl. Výsledky stanovení fluorescencí pFlo11-GFP daných kmenů jsou znázorněny na obrázku 5.14. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulce 5.12. Skupina grafů 5.12 znázorňuje tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 5.13.

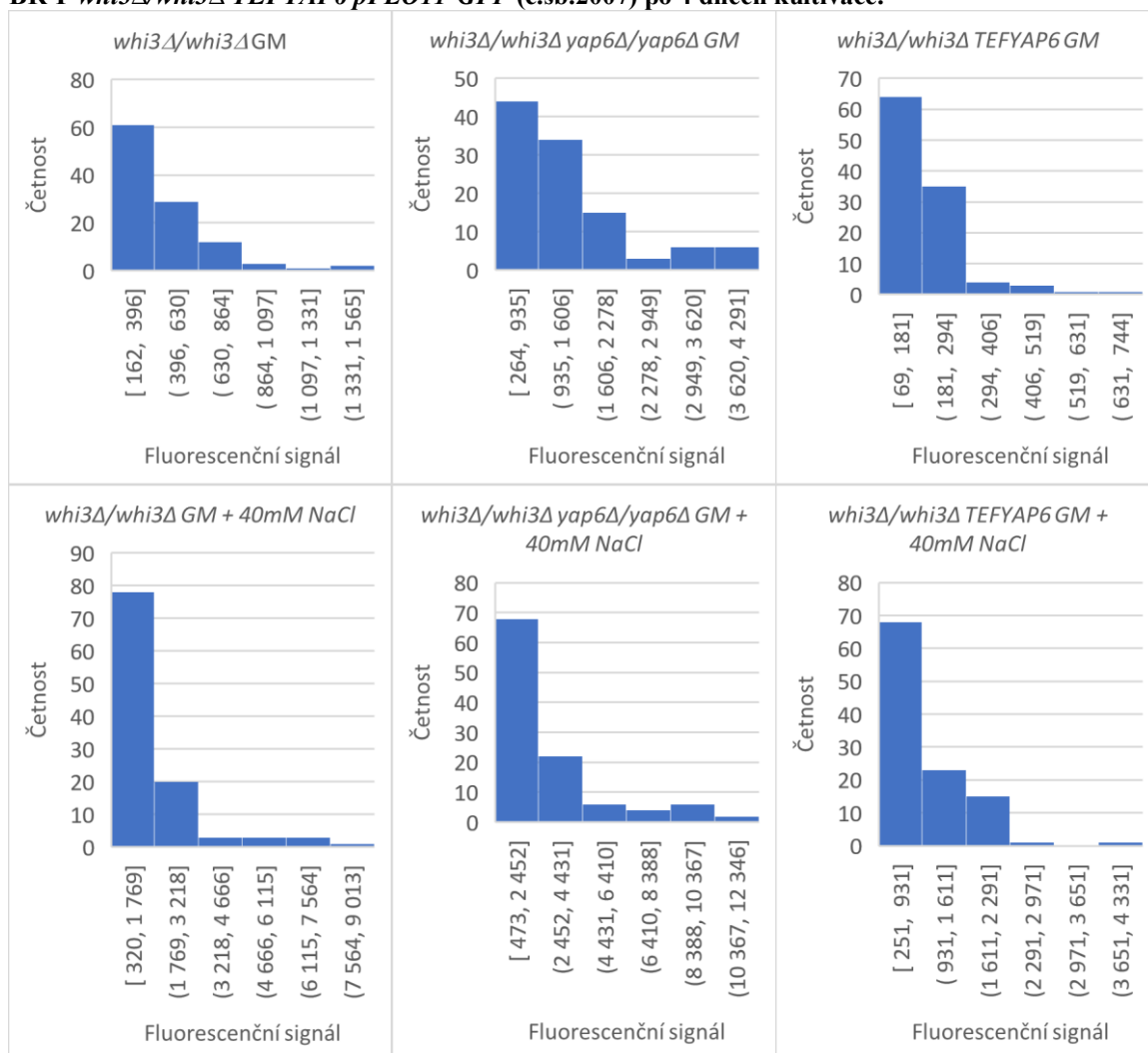


Obrázek 5.14. Závislost fluorescencí pFlo11-GFP na genotypu a přítomnosti NaCl v médiu. V experimentu byly použity kmeny BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983), BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007) Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).

Tabulka 5.12. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|--------------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 1 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 6 | 108 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | GM | 1 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 6 | 108 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 1 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 6 | 108 |

Skupina grafů 5.12. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescencí pFlo11-GFP kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983), BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007) po 4 dnech kultivace.



Tabulka 5.13. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817), BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1983), BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007). Parametr Médium vyjadřuje vliv 40mM NaCl na výslednou fluorescenci. Parametr Kmen vyjadřuje vliv genotypu na výslednou fluorescenci.

| Parametr | Kmen | Médium | Kmen:Médium |
|-----------------|-----------|-----------|-------------|
| Df | 2 | 1 | 2 |
| Df.res | 642 | 642 | 642 |
| Sum Sq | 4615814 | 4647184 | 280865 |
| Sum Sq.res | 15677671 | 15862665 | 20245660 |
| F value | 94,51 | 188,08 | 4,45 |
| Pr(>F) | 1,057E-36 | 9,975E-38 | 1,200E-02 |
| Efekt parametru | 0,23 | 0,23 | 0,01 |

Na médiu se 40mM koncentrací NaCl došlo k vzestupu hodnot fluorescence u všech použitých kmenů. Kmen s overexpresí *YAP6* za všech kultivačních podmínek vykázal nejnižší hodnoty fluorescence (tabulka P5). Zároveň, kmen s delecí *YAP6* měl zvýšenou fluorescenci, oproti ostatním kmenům. Podobně jako v předchozích měřeních, kmen s overexpresí *YAP6* měl nejnižší hodnoty fluorescence a největší citlivost exprese *FLO11* značeného GFP k NaCl. Výsledky statistického zpracování získaných dat tyto změny potvrzují. Výsledky statistického zpracování (tabulka P6) pro kmeny *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* a *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* ukazují, delece *YAP6* u kmene značeného pomocí pFlo11-GFP způsobuje pokles vlivu NaCl na hodnoty fluorescence oproti kmenu s overexpresí *YAP6*. Pokles je mnohem výraznější u starších kolonií. U kmenů značených Flo11p-DsRed vliv NaCl na hodnoty fluorescence s časem roste, nezávisle na genotypu *YAP6*.

Shrnutí vlivu NaCl na expresi *FLO11* u kolonií kmenů s delecí *WHI3* ve stresových podmínkách je zobrazeno v tabulce 5.14.

Tabulka 5.14. Porovnání mediánů 4-denních kolonií kmenů *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* a *whi3Δ/whi3Δ* pro pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed.

| Kmen | Médium | Medián (pFlo11-GFP) | Vliv NaCl, % | Medián (Flo11p-DsRed) | Vliv NaCl, % |
|--------------------------------|------------------|---------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 137 | - | 25 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 365 | 267 | 155 | 620 |
| | GM + 120 mM NaCl | 3818 | 2794 | 184 | 737 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 52 | - | 20 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 431 | 822 | 47 | 240 |
| | GM + 120 mM NaCl | 1892 | 3608 | 122 | 621 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | GM | 357 | - | 60 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 1496 | 420 | 224,5 | 374 |
| | GM + 120 mM NaCl | 2373 | 665 | 216,5 | 361 |

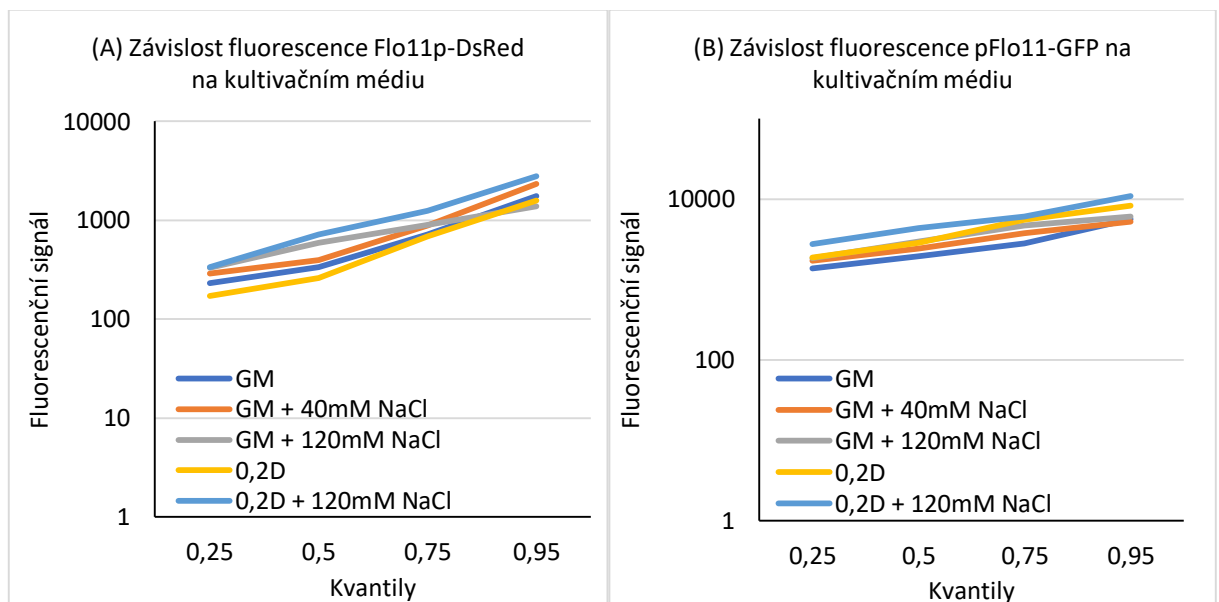
Z výsledků porovnání vlivu NaCl (jako procent intenzity fluorescence pFlo11-GFP u kolonií rostoucích na GM se 40mM a 120mM NaCl vůči intenzitě fluorescence kolonií na GM) je vidět, že u *pFLO11-GFP* kmenů měl NaCl největší vliv na fluorescenci kmene s overexpresí *YAP6*, nejmenší u kmene s delecí *YAP6*. Zároveň, u kmene *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* byl vliv NaCl na hodnoty fluorescence menší než u kmene s nemodifikovanou alelou *YAP6*. Nejmenší vliv 120 mM NaCl vykázaly v systému pFlo11-GFP i Flo11p-DsRed kmeny s delecí *YAP6*. Výsledky se shodují s tabulkou P5, na které je uvedeno další porovnání vlivu NaCl na fluorescenci pFlo11-GFP. Data uvedená v tabulce 5 vycházejí z experimentu, ve kterém byly zařazeny všechny 3 kmeny.

5.2.3 Vliv NaCl na expresi *FLO11* u rodičovského kmene

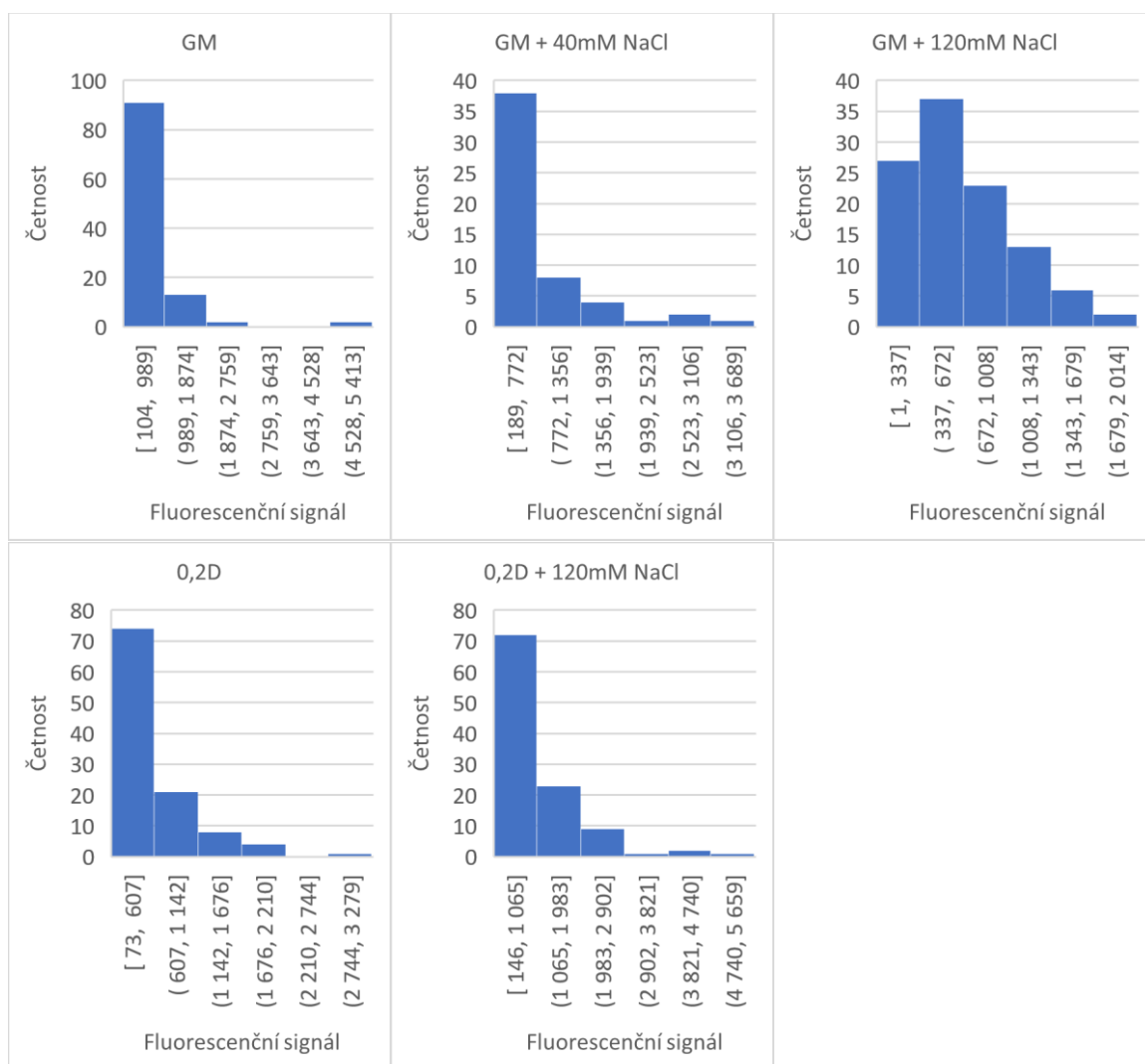
Pro porovnání exprese *FLO11* na úrovni transkripce a na translační/post-translační úrovni byla provedena série stanovení intenzity fluorescence u BR-F kmenů s modifikovanou krátkou alelou *FLO11*, značených pomocí GFP (BR-F *pFLO11-GFP*, č.s.b. 1840) a DsRed (BR-F *Flo11p-DsRed*, č.s.b. 1235)

Cílem experimentu bylo zjistit, zda u kmene s funkčním proteinem Whi3p bude exprese *FLO11* ovlivněna přítomností NaCl v médiu. fluorescence pFlo11-GFP nebo Flo11p-DsRed byla sledována u suspenzí buněk z monoklonií rostoucích 4 a 6 dnů na pevném GM médiu, 0,2D médiu a médiích se zvýšenou koncentrací solí. Výsledky stanovení fluorescence jsou shrnuty ve skupinách grafů 5.13, 5.16. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách jsou uvedeny v tabulkách 5.15 - 5.18 Skupiny grafů 5.14, 5.15, 5.17, 5.18 znázorňují tendenci distribuce naměřených hodnot fluorescence příslušných kmenů. Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulkách 5.19, 5.20 a 5.21. Na obrázku 5.15 jsou snímky monoklonií příslušných kmenů po 4 a 6 dnech kultivace na různých médiích.

Skupina grafů 5.13. Závislost fluorescence (A) Flo11p-DsRed (B) pFLO11-GFP na zdroji uhlíku v médiu a přítomnosti NaCl u kolonií po 4 dnech kultivace. V experimentech byly použity kolonie kmenů BR-F *Flo11p-DsRed* (č.s.b. 1235) a BR-F *pFLO11-GFP* (č.s.b. 1840) po 4 dnech kultivace. GM - 3% glycerol, 0,2D - 0,2% glukóza. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).



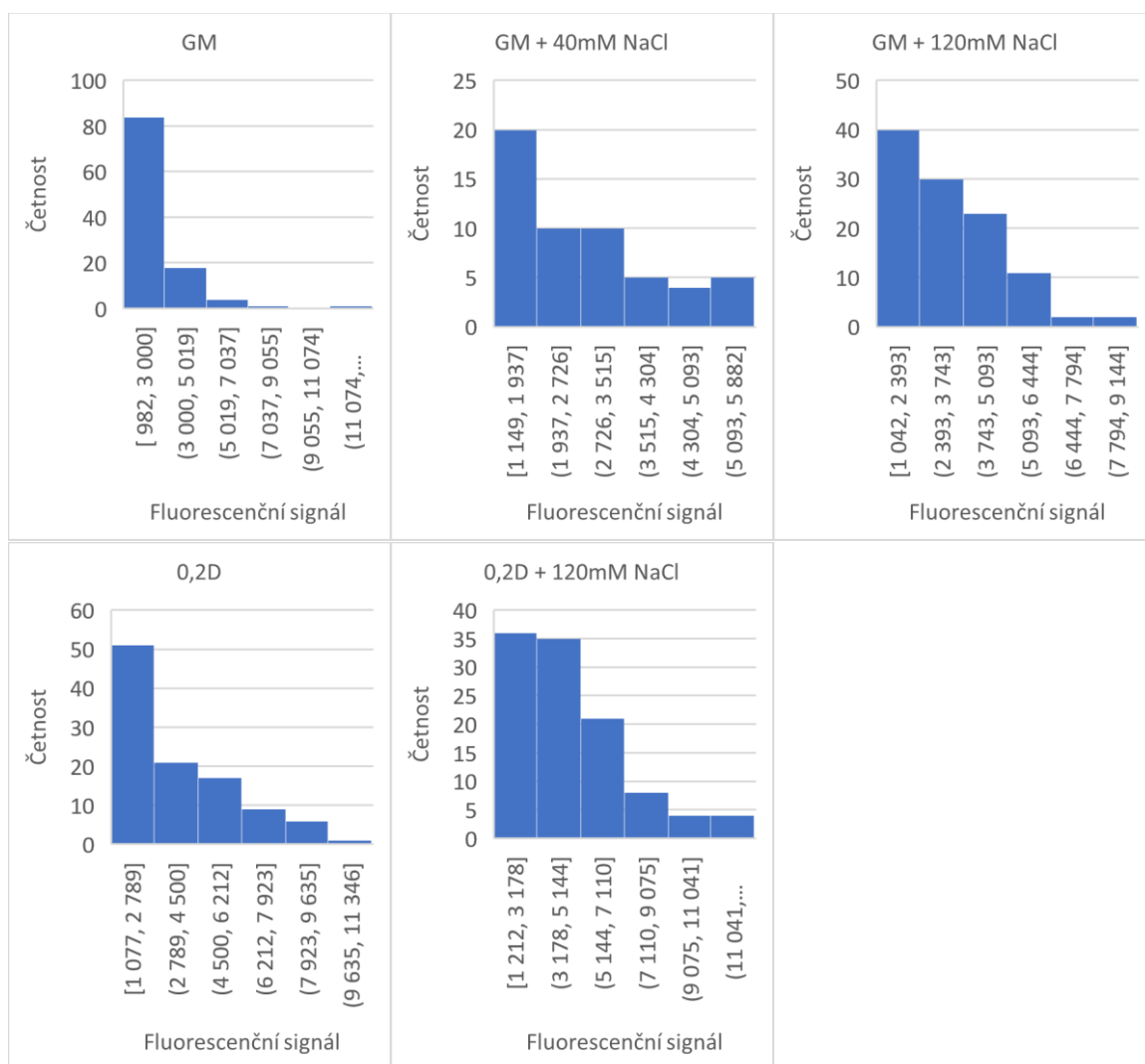
Skupina grafů 5.14. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence Flo11p-DsRed u kolonií po 4 dnech kultivace.



Tabulka 5.15. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescence Flo11p-DsRed u kolonií po 4 dnech kultivace.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|-------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| BR-F Flo11p-DsRed | GM | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 1 | 3 | 54 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |

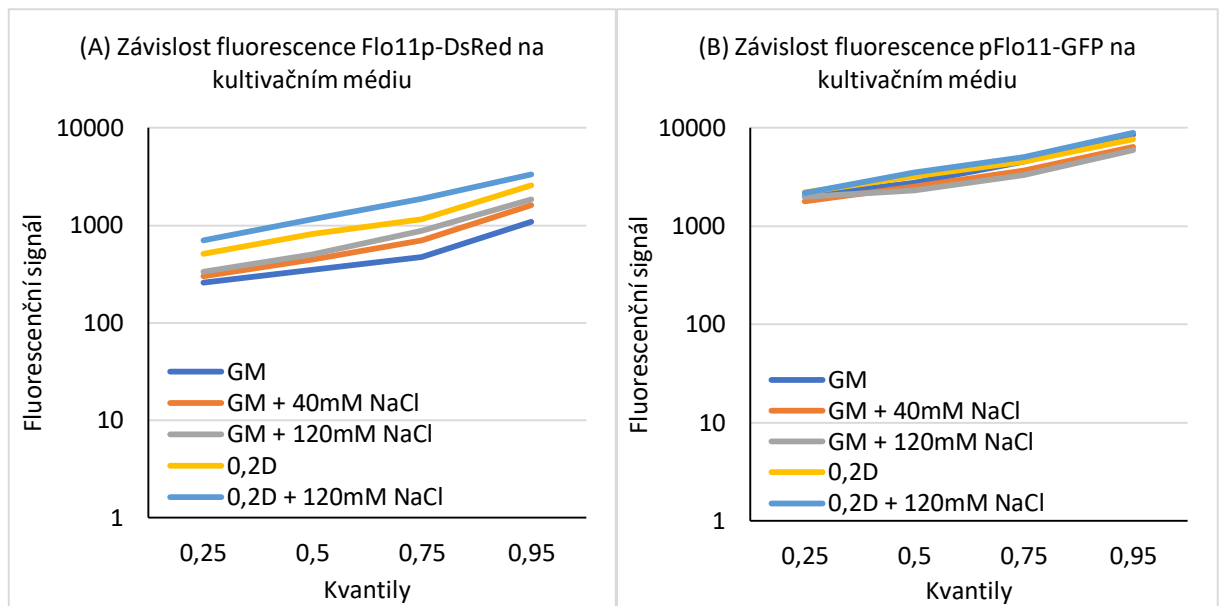
Skupina grafů 5.15. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u kolonií po 6 dnech kultivace.



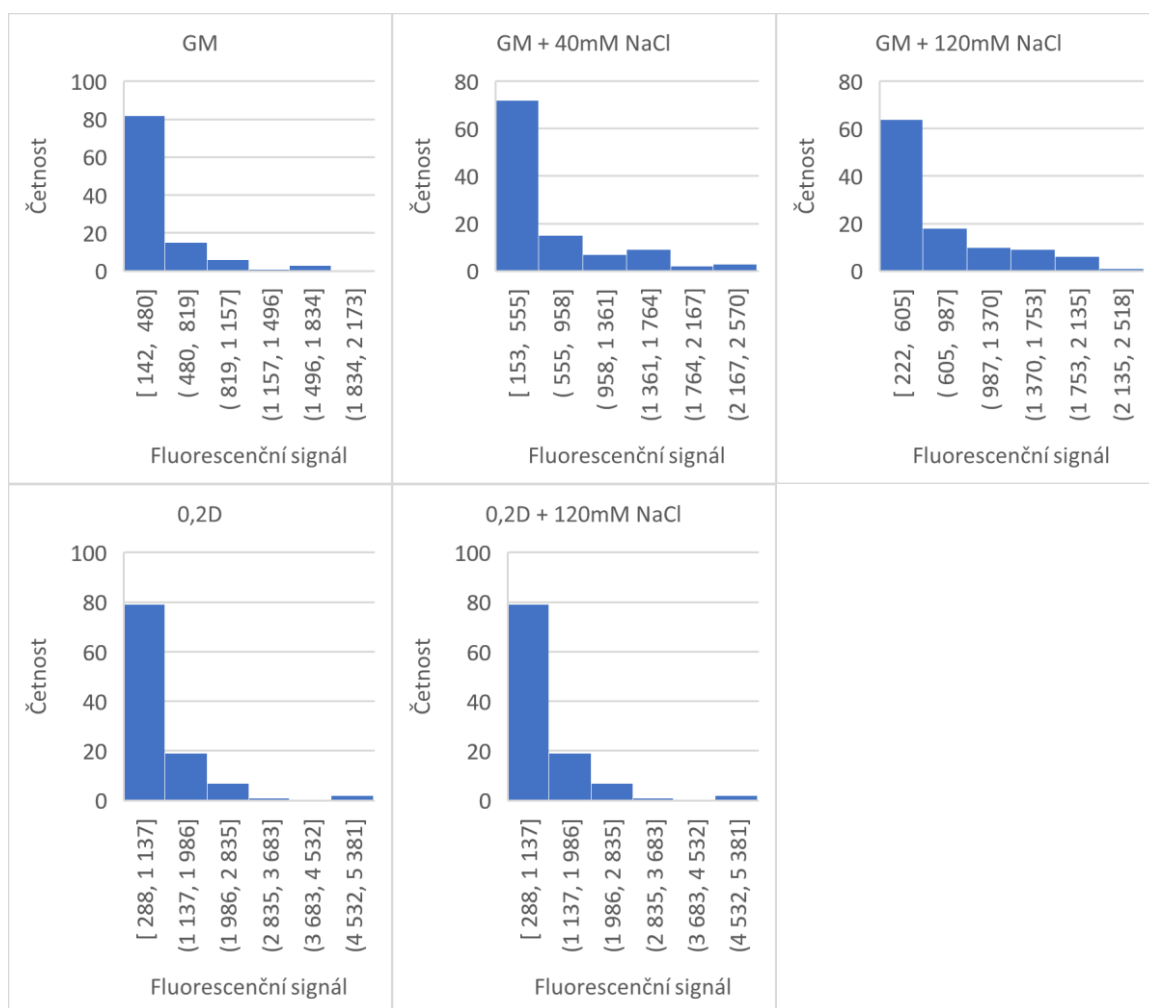
Tabulka 5.16. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP u kolonií po 6 dnech kultivace.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|----------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| BRF pFLO11-GFP | GM | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |

Skupina grafů 5.16. Závislost fluorescence (A) Flo11p-DsRed (B) pFLO11-GFP na zdroji uhlíku v médiu a přítomnosti NaCl u kolonií po 6 dnech kultivace. V experimentech byly použity kolonie kmenů BR-F *Flo11p-DsRed* (č.s.b. 1235) a BR-F *pFLO11-GFP* (č.s.b. 1840) po 6 dnech kultivace. GM-3% glycerol, 0,2D-0,2% glukóza. Svislá osa znázorňuje hodnotu fluorescenčního signálu (logaritmické měřítko).



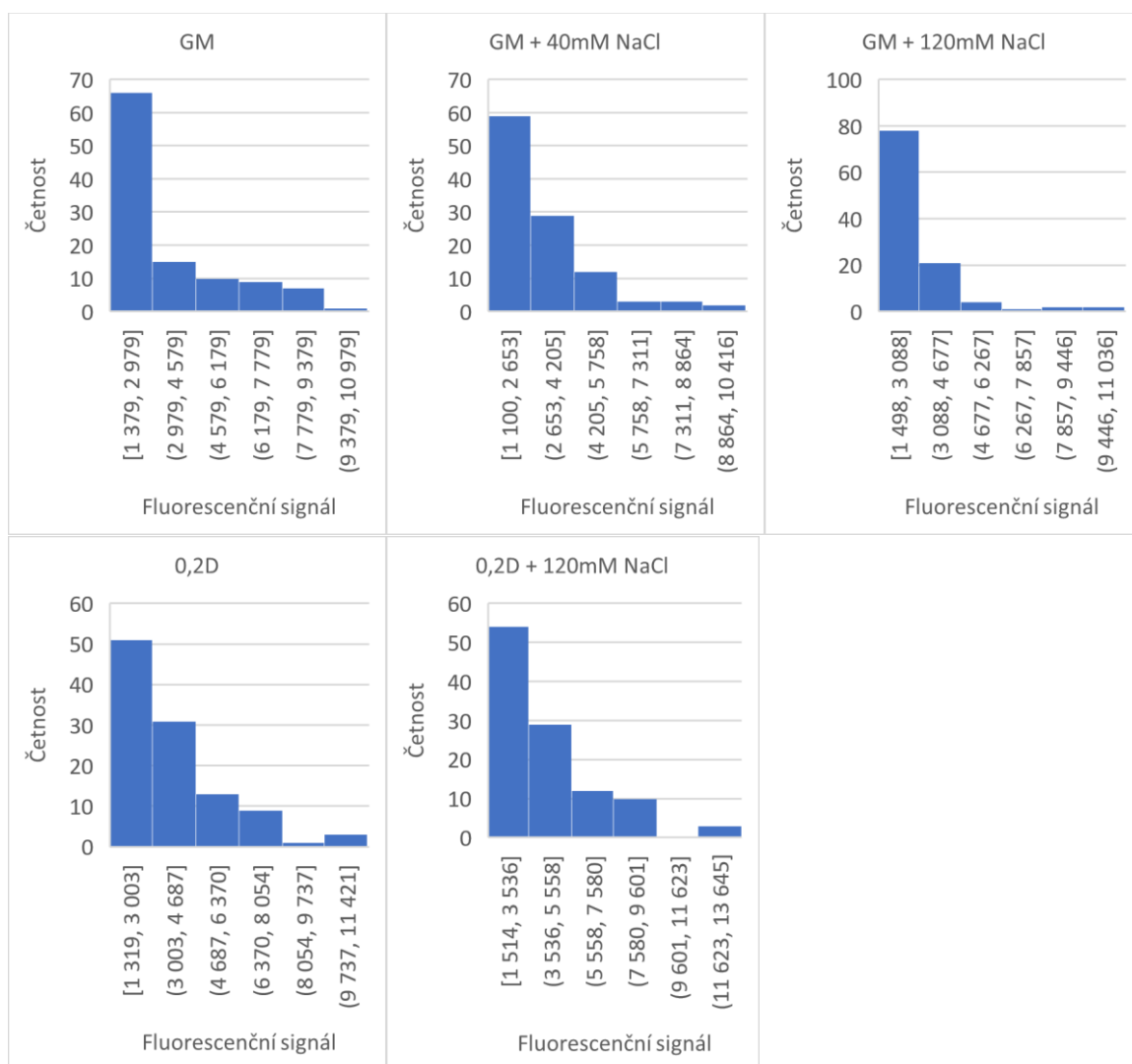
Skupina grafů 5.17. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescence Flo11p-DsRed kolonií po 6 dnech kultivace.



Tabulka 5.17. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescence Flo11p-DsRed kolonií po 6 dnech kultivace.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|-------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| BR-F Flo11p-DsRed | GM | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 105 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D + 120mM NaCl | 2 | 6 | 105 |

Skupina grafů 5.18. Distribuce naměřených hodnot intenzity fluorescencí pFlo11-GFP kolonií po 6 dnech kultivace.



Tabulka 5.18. Kvantitativní údaje o naměřených hodnotách intenzity fluorescencí pFlo11-GFP kolonií po 6 dnech kultivace.

| Kmen | Médium | Počet biologických pokusů | Počet nezávislých vzorků | Počet změřených hodnot |
|-----------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| BR-F pFLO11-GFP | GM | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 40mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | GM + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D | 2 | 6 | 108 |
| | 0,2D + 120mM NaCl | 2 | 6 | 108 |

Tabulka 5.19. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmene BR-F *Flo11p-DsRed* (č.s.b. 1235). Parametr zdroj_C vyjadřuje vliv zdroje uhlíku, tzn. rozdíly mezi GM a 0,2D médiem. Parametr NaCl vyjadřuje vliv 120mM na výslednou fluorescenci.

| Stáří kol., d | 4 | | | 6 | | |
|-----------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| Parametr | zdroj_C | NaCl | zdroj_C:NaCl | zdroj_C | NaCl | zdroj_C:NaCl |
| Df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Df.res | 428 | 428 | 428 | 428 | 428 | 428 |
| Sum Sq | 63317 | 325601 | 121672 | 1574218 | 524451 | 70125 |
| Sum Sq.res | 6448674 | 6189280 | 6511793 | 5050940 | 5998403 | 6422028 |
| F value | 4,20 | 22,52 | 8,00 | 133,39 | 37,42 | 4,67 |
| Pr(>F) | 4,098E-02 | 2,845E-06 | 4,905E-03 | 4,792E-27 | 2,150E-09 | 3,118E-02 |
| Efekt parametru | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,24 | 0,08 | 0,01 |

Tabulka 5.20. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *pFLO11-GFP* (č.s.b. 1840). Parametr zdroj_C vyjadřuje vliv zdroje uhlíku, tzn. rozdíly mezi GM a 0,2D médiem. Parametr NaCl vyjadřuje vliv 120mM NaCl na výslednou fluorescenci.

| Stáří kol., d | 4 | | | 6 | | |
|-----------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| Parametr | zdroj_C | NaCl | zdroj_C:NaCl | zdroj_C | NaCl | zdroj_C:NaCl |
| Df | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Df.res | 416 | 416 | 416 | 428 | 428 | 428 |
| Sum Sq | 562030 | 362091 | 669 | 222406 | 261 | 74997 |
| Sum Sq.res | 5610144 | 5772975 | 6131193 | 6411979 | 6629496 | 6596456 |
| F value | 41,68 | 26,09 | 0,05 | 14,85 | 0,02 | 4,87 |
| Pr(>F) | 3,007E-10 | 4,967E-07 | 8,314E-01 | 1,346E-04 | 8,967E-01 | 2,792E-02 |
| Efekt parametru | 0,09 | 0,05 | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 0,00 |

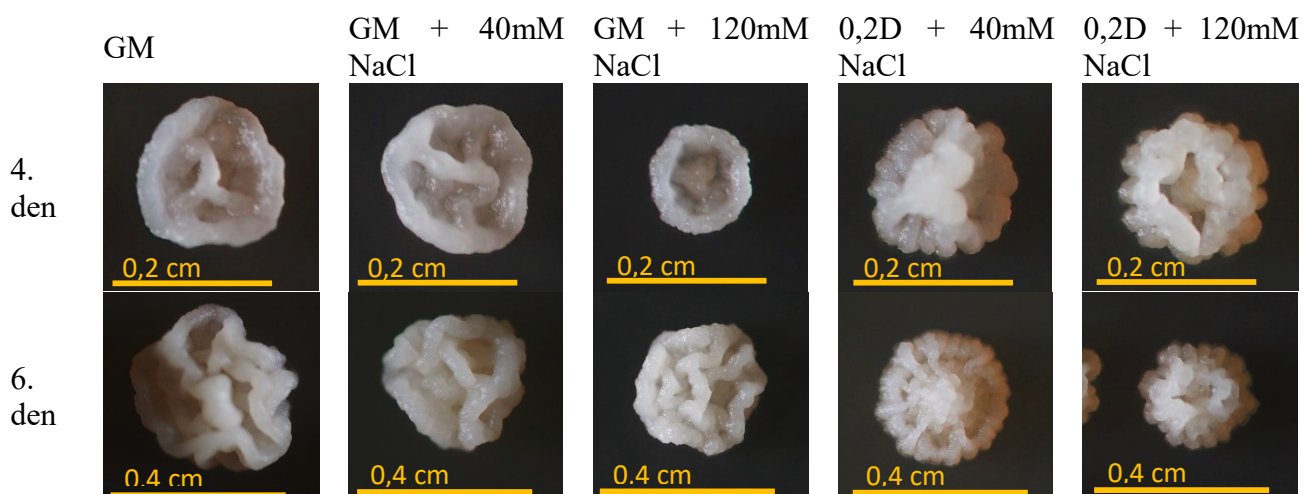
Tabulka 5.21. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence kmenů BR-F *Flo11p-DsRed* (č.s.b. 1235) a BR-F *pFLO11-GFP* (č.s.b. 1840). Parametr NaCl vyjadřuje vliv NaCl v různých koncentracích na výslednou fluorescenci (pouze na GM médiu).

| Protein | DsRed | | GFP | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Stáří kol., d | 4 | 6 | 4 | 6 |
| Parametr | NaCl | | | |
| Df | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Df.res | 267 | 321 | 261 | 321 |
| Sum Sq | 41261 | 190234 | 134270 | 44969 |
| Sum Sq.res | 1598954 | 2644072 | 1399019 | 2789353 |
| F value | 3,44 | 11,55 | 12,52 | 2,59 |
| Pr(>F) | 3,333E-02 | 1,436E-05 | 6,398E-06 | 7,677E-02 |
| Efekt parametru | 0,03 | 0,07 | 0,09 | 0,02 |

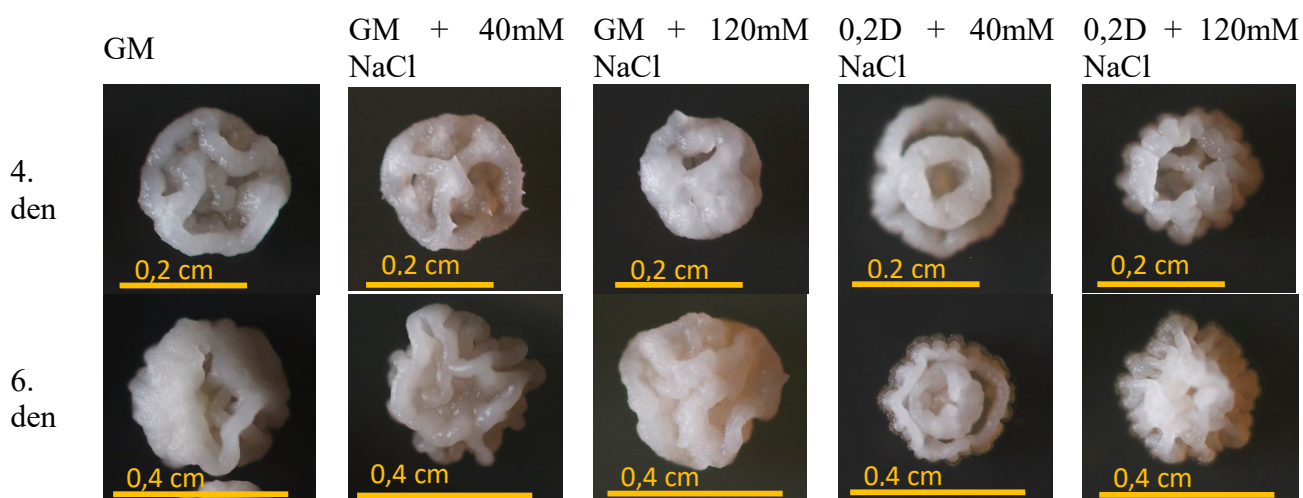
Výsledky stanovení intenzity fluorescence kmenů značených pomocí GFP (BR-F *pFLO11-GFP*, č.s.b. 1840) a DsRed (BR-F *Flo11p-DsRed*, č.s.b. 1235) ukazují na výrazně sníženou citlivost exprese *FLO11* u kmenů s funkčním *WHI3* k vyšší koncentraci NaCl (120mM) oproti kmenům s delecí *WHI3*. V porovnání se všemi třemi kmeny lišícími se genotypem *YAP6* je efekt NaCl výrazně nižší u kmenů s funkčním proteinem *Whi3p*.

U kmenů s funkčním *WHI3* bylo možné srovnat expresi *FLO11* při kultivaci na GM a 0,2D (za neselektivních podmínek i při osmotickém stresu). U kmene BR-F *Flo11p-DsRed* (č.s.b. 1235) byl u 6-denní kultury prokázán relativně velký vliv zdroje uhlíku v médiu (efekt =24%), který převýšil vliv 120 mM NaCl. U kmene BR-F *pFLO11-GFP*, č.s.b. 1840 byl mírný efekt zdroje uhlíku pozorován pouze u 4-denních kolonií (9%).

(A) Kmen BR-F *pFLO11-GFP*



(B) Kmen BR-F *Flo11p-DsRed*



Obrázek 5.15. Vliv NaCl na morfologii kolonií v závislosti na zdroji uhlíku u kmene BR-F. (A) Kmen BR-F značený pomocí fluorescenčního proteinu GFP, (B) Kmen BR-F značený pomocí fluorescenčního proteinu DsRed.

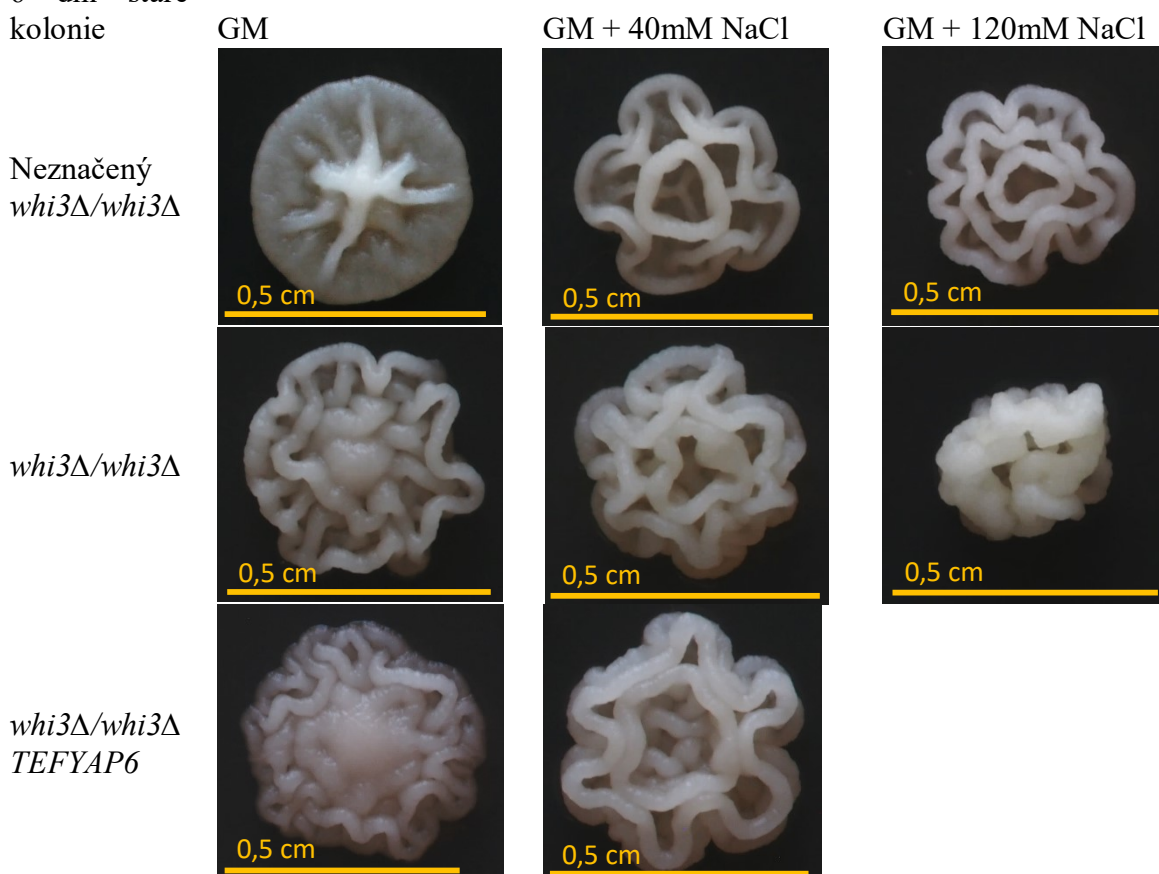
Oba značených BR-F kmenů měli shodný fenotyp jak na GM médiích, tak i za podmínek kultivace na bohatém 0,2D médiu.

5.2.4 Sledování morfologie kolonií vybraných kmenů s mutacemi *WHI3* a *YAP6* a jejich citlivost vůči osmotickému stresu

Morfologie kolonií byla sledována především pro 4. a 6. den kultivace. Hustota výsevu se pohybovala v rozmezí 40-100 buněk na plotnu. Většina následujících snímků byla pořízena jako dokumentace v rámci experimentů pro stanovení intenzity fluorescencí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed. Ze souboru snímků byly zvoleny snímky s charakteristickým vzhledem kolonie pro daný kmen a pokud možno ve stejné vzdálenosti od středu a okrajů plotny.

Výsledky sledování vlivu genotypu a NaCl na morfologii kolonií kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ* (č.sb. 902), BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFLO11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007) jsou znázorněny na obrázku 5.16.

6 dní staré
kolonie



Obr. 5.16. Sledování vlivu genotypu a NaCl na morfologii kolonie. Oranžovou čarou je zobrazeno měřítko. Na daném obrázku jsou z technických důvodů uvedeny jenom 6 dnů staré kolonie, snímek *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* na médiu GM + 120mM NaCl chybí.

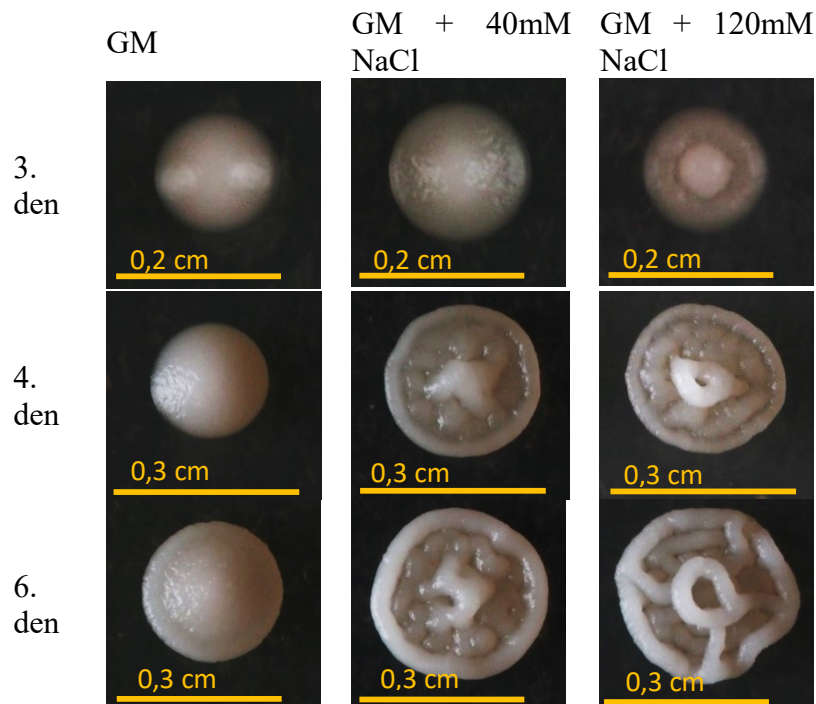
Kmen BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFLO11-GFP* (č.sb.2007), který zpravidla vykazuje hladký fenotyp na GM médiu, v daném experimentu měl neobvykle vysokou vrásčitost.

Morfologie buněk byla ve značně míře ovlivněna hustotou výsevu. Se zvyšující se hustotou výsevu a vzdáleností od okrajů plotny docházelo ke zmenšení velikosti kolonií. Příklad vlivu vzdálenosti od centra plotny a lokální hustoty výsevu na morfologii kolonií je uveden na obrázku 5.17. Kolonie na médiu se zvýšenou koncentrací NaCl byly vyšší a menší, než kolonie na GM. Zpravidla se vzrůstající koncentrací soli se také zvyšovala strukturovanost kolonií.

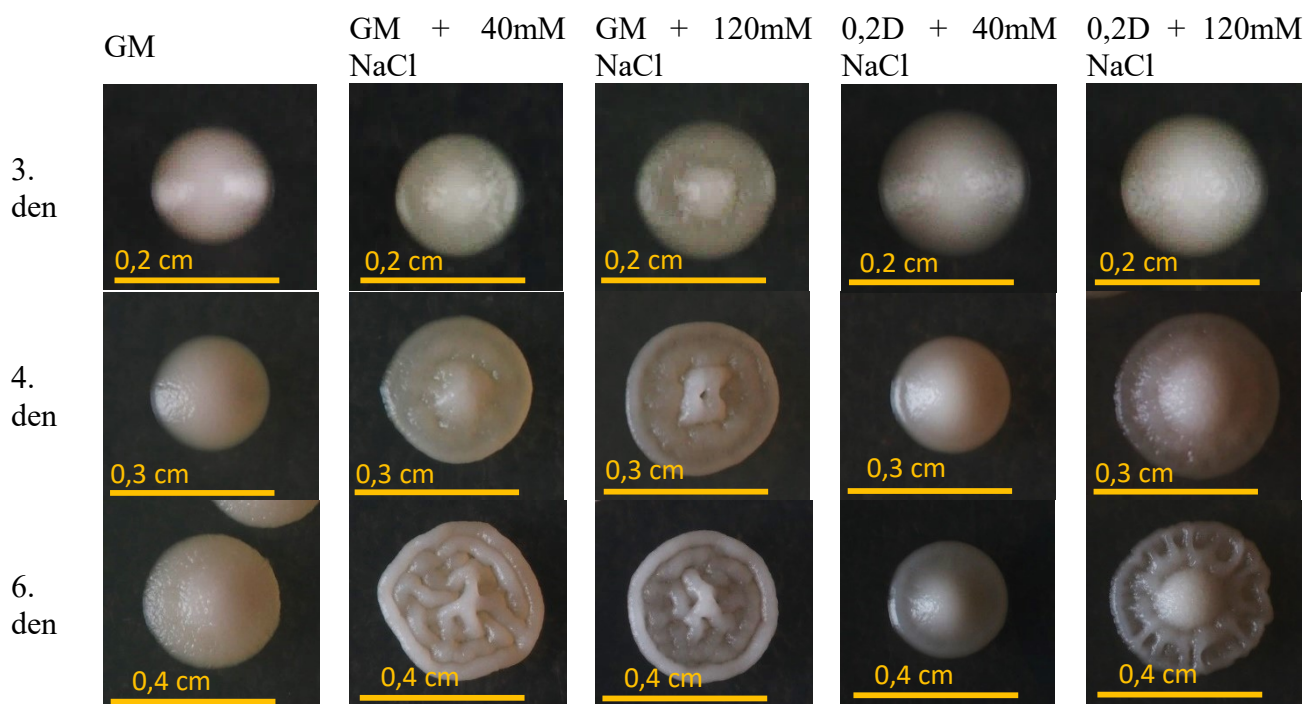


Obr. 5.17. Vliv vzdálenosti od centra plotny a lokální hustoty výsevu na morfologii kolonie. Oranžovou čarou je zobrazeno měřítko. Uvedeny kmen BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFLO11-GFP*, (č.sb.1983) byl kultivován v GM + 120mM NaCl médiu po dobu 6 dní.

Výsledky sledování vlivu genotypu a NaCl na morfologii kolonií kmenů s delecí *WHI3*, značených pomocí fluorescenčního proteinu DsRed jsou znázorněny na obrázcích 5.18 a 5.19.



Obr. 5.18. Vliv NaCl na morfologii kolonií u kmene BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007).



Obr. 5.19. Vliv NaCl na morfologii kolonií v závislosti na zdroji uhlíku u kmene BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016).

U kmene *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* stejně, jako i u *whi3Δ/whi3Δ*, značených DsRed se vzrůstem koncentrací soli docházelo k postupnému zvýšení strukturovanosti kolonií. V porovnání s GM médiem, na bohatém 0,2D médiu i při aplikaci zvýšených koncentrací NaCl je vrásčitost kolonií u tohoto kmene snižena.

5.2.5 Vliv NaCl na průměrný počet buněk v koloniích

Byla provedena analýza průměrného počtu buněk v koloniích používaných pro měření fluorescence. Shrnutí výsledků analýzy je zobrazeno v tabulce 5.22. Výpočet hodnot se prováděl na základě stanovení OD buněčné suspenze pomocí spektrofotometru WPA S1200 Spectrawave, při vlnové délce 600 nm. Jako blank byl použit 10mM pufr HEPES, pH 7,5. Suspenze byla naředěna tak, aby výsledná koncentrace buněk zhruba odpovídala OD 0,2-0,5.

Při výpočtu průměrného počtu buněk v koloniích byla pozorována velká variabilita v hodnotách stejných kmenů. Hodnoty počtu buněk nebyly počítány pro kmen *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ*.

Tabulka 5.22. Průměrný počet buněk v koloniích.

| Genotyp | Médium | Počet buněk v kolonii, x10 ⁶ | | Vliv NaCl, % | |
|----------------------------|-------------------|---|-------|--------------|-------|
| | | 4 dny | 6 dnů | 4 dny | 6 dnů |
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 6,7 | 8,9 | - | - |
| | GM + 40mM NaCl | 3,2 | 6,5 | 47 | 73 |
| | GM + 120mM NaCl | 2,5 | 5,1 | 37 | 58 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 7,5 | 10,3 | - | - |
| | GM + 40mM NaCl | 4,0 | 8,9 | 53 | 86 |
| | GM + 120mM NaCl | 2,7 | 5,4 | 35 | 52 |
| <i>WHI3/WHI3 YAP6/YAP6</i> | GM | 4,4 | 5,1 | - | - |
| | GM + 40mM NaCl | 4,1 | 3,1 | 92 | 62 |
| | GM + 120mM NaCl | 2,0 | 4,6 | 45 | 90 |
| | 0,2D | 3,8 | 6,1 | - | - |
| | 0,2D + 120mM NaCl | 1,5 | 5,6 | 40 | 92 |

Z dat je dobře pozorovatelný negativní efekt NaCl na počet buněk v koloniích všech kmenů. Inhibice dělení buněk v kolonii působením NaCl klesala s časem. Výjimkou je hodnota uvedená u rodičovského kmene při kultivaci na GM + 40mM NaCl, je pravděpodobně způsobena menším počtem stanovení počtu buněk i vyšší mírou tvorby shluků buněk u tohoto kmene. Vzhledem k velké variabilitě získaných hodnot, má analýza vlivu NaCl na průměrný počet buněk v koloniích orientační charakter.

5.3 Srovnání vlivu *YAP6* na expresi *FLO11* a morfologii kolonií s vlivem genů *TEC1* a *MPT5*, ev. dalších (*TUP1*, *CYC8*).

Z důvodu ochranných opatření kvůli epidemii COVID-19 nebyly plánované experimenty provedeny.

6 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se interakce Whi3p a Yap6p mění v závislosti na stáří kolonie a podmínkách kultivace, srovnání vlivu genotypu *YAP6* u kmene s delecí *WHI3* na morfologii kolonií a na expresi *FLO11* a následné porovnání vlivu genu *YAP6* s vlivem genů *TEC1* a *MPT5*, ev. dalších (*TUP1*, *CYC8*). Za tímto účelem byla z BR-F kmene *Saccharomyces cerevisiae* s delecí *WHI3* připravena sada kmenů s odlišnými genotypy pro *YAP6*, *TEC1* a *MPT5*, značených pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed. Pro porovnání exprese *FLO11* na transkripční úrovni a na translační/post-translační úrovni byly zvoleny dva typy fluorescenčního značení. Pro sledování exprese *FLO11* na úrovni transkripce byly kmeny označeny vložením kódující sekvence fluorescenčního proteinu GFP za promotorovou sekvenci jedné z alel *FLO11*. N-koncová fúze jedné alely genu *FLO11* s kódující sekvencí fluorescenčního proteinu DsRed umožnila sledování exprese *FLO11* na translační a posttranslační úrovni.

V literatuře je popsán polymorfismus v délce repetitivních oblastí B domény Flo11p u *Saccharomyces cerevisiae*, který ovlivňuje vlastnosti proteinu (Fidalgo et al., 2008). Z předchozích studií bylo zjištěno, že u kmene BR-F *Saccharomyces cerevisiae* delší alela *FLO11*, která obsahuje v kódující sekvenci inzert 45 nukleotidů, vykazuje silnější pozitivní vliv na vrásčitost kolonie. Tato alela obsahuje i delší repetitivní oblast kódující C-koncovou část proteinu. Z toho důvodu byly při přípravě *pFlo11-GFP* kmenů vybrány pro další analýzu kmeny se zachovanou delší alelou *FLO11*. Kmeny značené fluorescenčním proteinem DsRed byly odvozeny od původního kmene BR-F *Flo11p-DsRed*, u nichž nebyla delší alela *FLO11* modifikována. Všechny připravené kmeny byly ověřeny ověřovací PCR a sekvenováním.

Z důvodu ochranných opatření kvůli epidemii COVID-19 nebyly kmeny s různým genotypem *TEC1* a *MPT5* použity a plánované experimenty pro porovnání vlivu daných genů nebyly provedeny. Přestože nebyly hlavním cílem práce, pravděpodobně by mohly pomoci v upřesnění a pochopení mechanismů vlivu proteinu Whi3p na expresi *FLO11*.

Při přípravě suspenze buněk pro stanovení intenzity fluorescence bylo současně na základě OD stanoveno přibližné množství buněk v koloniích použitých kmenů a následně stanoven vliv NaCl na počet buněk v koloniích. Inhibice počtu buněk působením NaCl klesala s časem, což je pravděpodobně dáno postupnou adaptací buněk na podmínky zvýšené osmolarity média a vývojem strukturovaných kolonií, které zvyšují odolnost kvasinek a umožňují jim rychlejší růst v sub-optimálních podmínkách prostředí. Pokles inhibičního efektu vlivem NaCl u starších kolonií může být způsoben i sníženým vlivem inhibice růstu kolonie

(proliferace) v důsledku vysoké hustoty buněk. K této inhibici dochází pravděpodobně rychleji u kolonií rostoucích v neselektivních podmínkách.

6.1 Srovnání vlivu genotypu *YAP6* u kmene s delecí *WHI3* na morfologii kolonií a na expresi *FLO11* za neselektivních podmínek kultivace.

Data z výsledků stanovení intenzity fluorescence kmenů, značených pFlo11-GFP ukazují, že kmen, který měl promotorovou sekvenci jedné alely *YAP6* nahrazenou silným konstitutivním promotorem genu *TEF* (kódujícího translační elongační faktor u *Ashbya gossypii*), vykazoval fluorescenci nižší než kmen s nemodifikovanými alelami *YAP6*. Zároveň, delece obou alel *YAP6* způsobila zvýšení hodnot fluorescence oproti rodičovskému kmenu. Při porovnání výsledků měření fluorescence kolonií rostoucích na GM u jiných experimentů je zřetelné zachování významných rozdílů v expresi *FLO11* mezi různými kmeny, které potvrzuje negativní vliv Yap6p na expresi *FLO11*. Statistické zpracování dat tento vliv potvrdilo. Získaná data jsou v souladu s hypotézou o negativním vlivu Yap6p na expresi *FLO11*.

Je známo, že se na regulaci *FLO11* podílí regulační komplex Tup1p-Cyc8p, který inhibuje expresi *FLO11* pomocí Mig1p, Nrg1/2p (SNF1 dráha) a Sfl1p (cAMP-PKA dráha) (Conlan *et al.*, 2001, Bendrioua *et al.*, 2014). Hanlon *et al.*, (2011) predikoval, že Yap6p fyzicky interaguje s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p a zprostředkuje jeho vazbu do promotoru cílových genů. V literatuře chybí informace o tom, zda-li *FLO11* patří do cílových genů Yap6p. Je možné, že je jeho vliv na expresi *FLO11* zprostředkován jinou cestou. Předpokládá se interakce Yap6p s proteiny Sok2p (negativně reguluje Phd1p) a Phd1p (inhibuje aktivitu Cyc8p, který je represorem *FLO11*) (MacIsaac *et al.*, 2006, Schladebeck *et al.*, 2013, Nguyen *et al.*, 2018). Vzhledem k tomu, že byl prokázán vliv Yap6p na expresi *FLO11*, bylo by možné zaměřit další studium vlivu Yap6p na ověření interakcí Yap6p s proteiny Sok2p a Phd1p či jeho vlivu na expresi genů kódujících tyto transkripční faktory i jiné proteiny, které se mohou podílet na regulaci exprese *FLO11*.

6.2 Srovnání vlivu genotypu *YAP6* na expresi *FLO11* za vybraných selektivních podmínek

Z důvodu, že je Yap6p v literatuře popsán jako stresový transkripční faktor, jehož zvýšená hladina zvyšuje odolnost buňky k lithným a sodným iontům, předpokládalo se, že přítomnost daných iontů bude ovlivňovat expresi Yap6p a tím pádem i expresi *FLO11* (Mendizabal *et al.*, 1998). Podle výsledků orientačních testů s LiCl a NaCl v různých

koncentracích bylo zjištěno, že silná inhibice růstu buněk, kterou způsobuje LiCl v malých koncentracích (10-25mM LiCl), kolidovala s možností získat dostatečné množství buněk pro měření fluorescence. Pro měření fluorescence byl zvolen NaCl v koncentracích 40mM a 120mM. Za daných podmínek byla pozorována zřetelná změna v morfologii kolonií a zároveň inhibice růstu nebyla příliš silná. Nalezené mírné stresové podmínky lze využít při sledování stresových granulí v naší laboratoři (Kočířová, 2020).

V souladu s předpokladem, získané výsledky ukazují, že na médiu s 40mM a 120mM NaCl u všech použitých kmenů dochází ke zvýšení hodnot fluorescence jak pFlo11-GFP, tak i Flo11p-DsRed. Data jsou podpořena statistickou analýzou. Přestože mechanismus indukce exprese *FLO11* za podmínek osmotického stresu nebyl popsán v literatuře, jednou z možných cest by mohla být aktivace zprostředkovaná interakcí Hog1p, který je aktivován za podmínek osmotického stresu, s regulačním komplexem Tup1p-Cyc8p. Proft *et al.* (2002) prokázal, že aktivní Hog1p je schopný přepnout funkci komplexu Tup1p-Cyc8p, který se zpravidla považuje za represor transkripce, na aktivátor transkripce. Z důvodu, že mají Yap4p a Yap6p hodně společných cílů a Yap4p je podle literatury pod kontrolou HOG dráhy, studium Yap6p by mohlo být zaměřeno na vyhledání možných interakcí Yap6p a HOG dráhy (Nevitt *et al.*, 2004).

Podobně jako za neselektivních podmínek, kmen s overexpresí genu *YAP6* vykazoval (zejména v časných fázích vývoje) nejnižší hodnoty fluorescence pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed ze všech kmenů s delecí *WHI3* i v přítomnosti NaCl. Kmen s delecí *YAP6* měl opět průměrné hodnoty fluorescence vyšší než ostatní kmeny.

V této práci posuzujeme vliv NaCl na expresi *FLO11* třemi parametry: efektem parametru získaným z ANOVA analýzy, HSD poměrem odvozeným z Tukey analýzy (umožňuje identifikovat rozdíly v hodnotách fluorescence mezi jednotlivými médii pro daný kmen nebo porovnat fluorescenci u dvou kmenů na různých médiích) a poměrem mediánů fluorescence v přítomnosti NaCl a fluorescence za neselektivních podmínek. Tento poměr jako jediný vychází z netransformovaných dat a je nejvíc ovlivněn absolutními hodnotami fluorescence a jejich nenormálním rozdělením.

Výsledky statistického zpracování naměřených hodnot ukazují, že genotyp *YAP6* ovlivňuje expresi *FLO11* (především u mladších kolonií), ale jeho efekt byl mnohem slabší než přítomnost NaCl v médiu. Při porovnání vlivu 40mM NaCl pomocí poměru mediánů je zřejmé, že největší vliv měl NaCl u kmene s overexpresí *YAP6*, nejmenší u kmene s delecí *YAP6* (tabulka 5.11,P6). Z výsledků uvedených v tabulce jednoznačně vyplývá, že Yap6p zvyšuje expresi *FLO11* při osmotickém stresu, avšak zároveň, že je zvýšení exprese *FLO11* při

osmotickém stresu závislé nejen na aktivitě Yap6p. Výsledky u kmenů s pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed byly rámcově shodné.

Pro potvrzení, že v přítomnosti osmotického stresu dochází k indukci exprese *YAP6*, by bylo možné připravit kmen produkující fluorescenční protein GFP pod kontrolou promotoru *YAP6* a sledovat změny ve fluorescenci proteinu pYap6-GFP za stresových podmínek. Zároveň by bylo možné srovnat fluorescenci pYap6-GFP u kmene s delecí *WHI3* s fluorescencí u kmene *WHI3+* pro ověření hypotézy o tom, že je Yap6p je pod negativní kontrolou Whi3p, která nebyla ověřena s časových důvodů.

Venters *et al.* (2011) na základě ChIP-chip a microarray analýz predikoval, že se Yap6p může podílet na regulaci syntézy ribozomálních proteinů a tRNA. Je možné, že je rozdíl mezi výsledky analýzy u *pFlo11-GFP* a *Flo11p-DsRed* kmenů způsoben regulací translačního aparátu pomocí Yap6p.

6.3 Vliv staří a genotypu *YAP6* na expresi *FLO11*

Bylo zjištěno, že podstatné rozdíly mezi kmeny *whi3Δ/whi3Δ* a *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* ve fluorescenci pFlo11-GFP se projevují především v časných fázích vývoje kolonie (4 dny kultivace) při kultivaci na neselektivním médiu, avšak v přítomnosti 40 mM NaCl a 120 mM NaCl byly rozdíly ve fluorescenci výrazně menší. Menší rozdíly v naměřených hodnotách fluorescence mezi oběma kmeny byly u 6 denních kolonií (tabulka P1, P2). To by mohlo být vysvětleno tím, že za neselektivních podmínek je exprese *FLO11* výrazněji potlačena u kmene s vyšší hladinou Yap6p než u rodičovského kmene. Působením NaCl dochází k indukci exprese *YAP6* u obou kmenů, rozdíly v hladinách Yap6p se zmenšují a tím se zmenšují i rozdíly v hodnotách fluorescencí pFlo11-GFP. Je však třeba předpokládat, že se zároveň v přítomnosti NaCl mění funkce Yap6p z represoru na aktivátor. Postupné stírání rozdílů v hodnotách fluorescencí pFlo11-GFP mezi kmeny může být způsobeno i změnou aktivity dalších regulačních drah a jejich interakcí, například, spojených se stoupajícím nutričním stresem v rostoucích koloniích, nebo naopak působením stresových drah, ovlivňujících transkripci *FLO11*.

Na rozdíl od kmenů značených pFlo11-GFP, byly u kmenů značených Flo11p-DsRed větší rozdíly mezi kmeny s různým genotypem *YAP6* u kolonií rostoucích 6 dnů, na neselektivním médiu i v přítomnosti NaCl (tabulka P3, P4). Vliv zvýšené exprese *YAP6* na expresi *FLO11* v přítomnosti NaCl byl méně výrazný než při sledování fluorescence pFlo11-GFP. Na rozdíl od kmene s delecí *YAP6*, fluorescence pFlo11-GFP i Flo11p-DsRed byla u kmene se zvýšenou expresí *YAP6* vyšší na GM + 120mM NaCl než na GM + 40mM NaCl

U starších kolonií kmene *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* značeného pFlo11-GFP (po 6 dnech kultivace) byl průkazný výrazný pokles vlivu NaCl na hodnoty fluorescence (z hodnoty efektu 52% na 20%). U kmene téhož genotypu, značeného Flo11p-DsRed, vliv přítomnosti NaCl v médiu narůstal (z hodnoty efektu 0,49 na 0,67. Tabulka 5.11, P6). Delece *YAP6* u kmene s delecí *WHI3* značeného pomocí pFlo11-GFP způsobuje pokles vlivu NaCl na hodnoty fluorescence. Pokles je mnohem výraznější u starších kolonií. U kmene s delecí *YAP6* i u kmene s overexpresí *YAP6* značených Flo11p-DsRed je vliv NaCl, měřený jako efekt ANOVA parametru, vyšší u 6denních než 4-denních kolonií. Míra nárůstu exprese *FLO11* vyjádřená poměrem mediánů je závislá na genotypu *YAP6* a řádově se neliší mezi 4. a 6. dnem kultivace (tabulka 5.11, P6).

Zjištěné rozdíly v závislosti exprese *FLO11* na přítomnosti NaCl v obou systémech lze vysvětlit změnami stability transkriptu či proteinu nebo regulací iniciace translace (i způsobem nezávislým na Yap6p), například, indukovaných signálními drahami odpovědi na stresové podmínky.

U kmenů *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* a *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* oproti *pFlo11-GFP* kmenům, byla nalezena významná interakce mezi médiem a genotypem nejen pro 4-denní kolonie, ale i pro 6-denní kolonie (efekt interakce Kmen:Médium byl 0,097 a 0,152 oproti 0,17 a 0,02 u *pFlo11-GFP* kmenů).

Rozdíly ve fluorescenci pFlo11-GFP mezi GM médiem a médiem s NaCl klesají s časem jak u kmene s delecí *YAP6*, tak i pro kmen s overexpresí *YAP6*. U stejných kmenů značených Flo11p-DsRed dochází s časem ke zvýšení rozdílů v hodnotách fluorescence (tabulky P7, P8).

Získaná data potvrzují hypotézu o vlivu Yap6p na expresi *FLO11* i hypotézu o změnách vlivu Yap6p na expresi *FLO11* u kolonií v různé fázi jejich vývoje.

6.4 Vliv NaCl na expresi *FLO11* u *WHI3+* kmenů

U rodičovských kmenů BR-F, *WHI3+*, značených pomocí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed, byl vliv NaCl na expresi *FLO11* výrazně slabší než u kmenů s delecí *WHI3*. U *WHI3+* kmenů byl také sledován vliv zdroje uhlíku na expresi *FLO11*: u kmene BR-F *FLO11p-DsRed* byl u 6-denní kultury prokázán relativně velký vliv zdroje uhlíku v médiu (efekt média 24%), který převýšil vliv 120mM NaCl. U kmene značeného pFlo11-GFP byl mírný efekt zdroje uhlíku pozorován pouze u 4-denních kolonií (efekt média 9%). V přítomnosti 0,01M glukózy (0,2D médium) oba kmeny vykazovaly vyšší hodnoty fluorescence než na respiračním GM médiu.

Tento výsledek je překvapivý. Při kultivaci kmenů s delecí *WHI3* na 0,2D médiu byla potlačena tvorba vrásčitých kolonií výrazněji než při kultivaci na GM a i fluorescencí pFlo11-GFP byla výrazně snižena (ústní sdělení). Snižená exprese *FLO11*, jako esenciálního genu pro vznik strukturovaných kolonií, se proto očekávala i u BR-F kmenů s funkčním Whi3p. Tyto kmeny mají však velmi vysokou tendenci ke tvorbě strukturovaných kolonií, a proto mírná redukce strukturovanosti u nich není nápadná. Navíc, exprese *FLO11* by měla být částečně inhibována či snížena katabolickou represí v přítomnosti glukózy (Kuchin *et al.*, 2002). Je možné, že zvýšená exprese *FLO11* na 0,2D byla spojena s aktivitou cAMP-PKA za přítomnosti glukózy (Kraakman *et al.*, 1999, Lorenz *et al.*, 2000).

6.5 Vliv genotypu *WHI3* a *YAP6* na morfologii kolonií vybraných kmenů

Většina snímků byla pořízena jako dokumentace v rámci experimentů pro stanovení intenzity fluorescencí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed. Z toho důvodu ne všechny kmeny (zejména kmeny *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ*) mají dostatečné množství materiálu pro demonstraci vývoje kolonií a změn v morfologii kolonií způsobených vlivem genotypu kmene a přítomnosti NaCl. Morfologie kolonií byla sledována především pro 4. a 6. den kultivace.

BR-F kmeny, značené pomocí pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed měly shodnou morfologii kolonií na neselektivních médiích a v přítomnosti NaCl. Jak bylo zmíněno v minulé kapitole, kmeny s funkčním Whi3p se chovají poměrně stabilně. U kmenů s delecí *WHI3* byly pozorovány zcela očekávané změny morfologie kolonií na neselektivním médiu: mladší kolonie byly hladké nebo jen velmi málo vrásčité, po 4 dnech kultivace začaly postupně zvyšovat svoji strukturovanost, zůstávaly však více ploché než kmeny s *WHI3+*. Kmeny s overexpresí *YAP6* jsou méně vrásčité, což by také mohlo potvrzovat negativní vliv Yap6 na expresi *FLO11*. V přítomnosti NaCl v médiu dochází k výraznému zvýšení vrásčitosti kolonií všech kmenů s delecí *WHI3*. Zpravidla byly kolonie na médiu se zvýšenou koncentrací NaCl menší, ale méně ploché než kolonie rostoucí na GM.

Vliv Yap6p na morfologii kolonií je méně výrazný než delece *WHI3*. Při kultivaci kmene *whi3Δ/whi3Δ* je strukturovanost kolonií rostoucích na všech typech testovaných médií silně redukována v porovnání s rodičovským kmenem *WHI3+*. Vliv Yap6 na morfologii kolonií by bylo vhodné pozorovat u kmenů s jiným genotypem, např. u kmene s delecí *TEC1*, u něhož je ztráta schopnosti tvořit strukturované kolonie méně výrazná.

Morfologie kolonií je kromě jejího stáří, zdroje uhlíku a přítomnosti NaCl ovlivněna hustotou výsevu a vzdáleností kolonie od středu plotny.

7 Souhrn

- Z BR-F kmene *Saccharomyces cerevisiae* s delecí *WHI3* bylo připraveno 12 kmenů s odlišnými genotypy pro *YAP6*, *TEC1* a *MPT5*, značených pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed. Pro měření fluorescence byly používány kmeny se zachovanou delší alelou *FLO11*.
- V rámci optimalizace podmínek mírného osmotického stresu byly otestovány LiCl a NaCl v různých koncentracích. Na základě testů byl pro měření fluorescence zvolen NaCl v koncentracích 40mM a 120mM. Za daných podmínek byla pozorována zřetelná změna v morfologii kolonií i vliv na expresi *FLO11*.
- Byla potvrzena hypotéza o negativním vlivu *YAP6* na expresi *FLO11* jak za neselektivních podmínek, tak i za podmínek mírného osmotického stresu, vyvolaného NaCl. Výsledky u kmenů značených pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed byly rámcově shodné. Kmeny s overexpresí *YAP6* vykazovaly nejnižší fluorescenci pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed, zatímco delece *YAP6* způsobovala zvýšení hodnot fluorescence oproti kmenům s jiným genotypem *YAP6*.
- Byly potvrzeny změny vlivu *YAP6* na expresi *FLO11* za přítomnosti osmotického stresu. Při mírném osmotickém stresu docházelo ke zvýšení exprese *FLO11*, výrazné změny byly pozorovány především u kmene se zvýšenou expresí *YAP6*. Kmen s delecí *YAP6* vykazoval v přítomnosti NaCl nejmenší změny v expresi *FLO11*.
- Byly potvrzeny změny vlivu *YAP6* na expresi *FLO11* v závislosti na stáří kolonií. Delece *YAP6* u kmene s delecí *WHI3* značeného pomocí pFlo11-GFP způsobuje pokles vlivu NaCl na hodnoty fluorescence oproti overexpresi *YAP6*. Pokles je mnohem výraznější u starších kolonií. U kmenů značených Flo11p-DsRed vliv NaCl na hodnoty fluorescence s časem roste, nezávisle na genotypu *YAP6*.
- U BR-F kmenů s funkčními alelami *WHI3*, značených pomocí pFlo11-GFP nebo Flo11p-DsRed byl vliv NaCl na expresi *FLO11* výrazně slabší než u kmenů s delecí *WHI3*.
- V přítomnosti NaCl v médiu dochází k výraznému zvýšení vrásčitosti kolonií kmenů s delecí *WHI3*, nezávisle na genotypu *YAP6*. Overexprese *YAP6* u kmenů s delecí *WHI3* způsobovala snížení vrásčitosti kolonií oproti kmenům s nemodifikovanou alelou *YAP6*.
- Z důvodu ochranných opatření kvůli epidemii COVID-19 nebyly kmeny s různým genotypem *TEC1* a *MPT5* použity a plánované experimenty pro porovnání vlivu daných genů nebyly provedeny.

8 Seznam použité literatury

- Alepuz, P. M., Jovanovic, A., Reiser, V., & Ammerer, G. (2001). Stress-Induced MAP Kinase Hog1 Is Part of Transcription Activation Complexes. *Molecular Cell*, 7(4), 767–777.
- Azevedo, D., Nascimento, L., Labarre, J., Toledano, M. B., & Rodrigues-Pousada, C. (2007). The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS letters*, 581(2), 187–195.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., & Toledano, M. B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free radical biology & medicine*, 35(8), 889–900.
- Balagopal, V., & Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Current opinion in cell biology*, 21(3), 403–408.
- Bang, S. Y., Kim, J. H., Lee, P. Y., Bae, K. H., Lee, J. S., Kim, P. S., Lee, D. H., Myung, P. K., Park, B. C., & Park, S. G. (2012). Confirmation of Frm2 as a novel nitroreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(4), 638–641.
- Barrales, R. R., Korber, P., Jimenez, J., & Ibeas, J. I. (2012). Chromatin modulation at the *FLO11* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* by HDAC and Swi/SNF1 complexes. *Genetics*, 191(3), 791–803.
- Barua, S., Li, L., Lipke, P. N., & Dranginis, A. M. (2016). Molecular Basis for Strain Variation in the *Saccharomyces cerevisiae* Adhesin Flo11p. *MSphere*, 1(4), e00129-16.
- Bendrioua, L., Smedh, M., Almquist, J., Cvijovic, M., Jirstrand, M., Goksör, M., *et al.*, (2014). Yeast AMP-activated protein kinase monitors glucose concentration changes and absolute glucose levels. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 12863–12875.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., & Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular microbiology*, 53(6), 1743–1756.
- Blanca, M. J., Alarcón, R., Arnau, J., Bono, R., & Bendayan, R. (2017). Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*, 29(4), 552–557.
- Brückner, S., Schubert, R., Kraushaar, T., Hartmann, R., Hoffmann, D., Jelli, E., Drescher, K., Müller, D. J., Essen, L. O., & Mösch, H. U. (2020). Kin discrimination in social yeast is mediated by cell surface receptors of the *FLO11* adhesin family. *ELife*, 9, 1–26.
- Bumgarner, S. L., Neuert, G., Voight, B. F., Symbor-Nagrabska, A., Grisafi, P., van Oudenaarden, A., & Fink, G. R. (2012). Single-cell analysis reveals that noncoding RNAs contribute to clonal heterogeneity by modulating transcription factor recruitment. *Molecular cell*, 45(4), 470–482.
- Caetano, S. M., Menezes, R., Amaral, C., Rodrigues-Pousada, C., & Pimentel, C. (2015). Repression of the Low Affinity Iron Transporter Gene *FET4*: a novel mechanism against cadmium toxicity orchestrated by *YAP1* via *ROX1*. *The Journal of biological chemistry*, 290(30), 18584–18595.
- Cai, Y., & Futcher, B. (2013). Effects of the yeast RNA-binding protein *WHI3* on the half-life and abundance of *CLN3* mRNA and other targets. *PloS one*, 8(12), e84630.
- Capaldi, A. P., Kaplan, T., Liu, Y., Habib, N., Regev, A., Friedman, N., & O'Shea, E. K. (2008). Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nature genetics*, 40(11), 1300–1306.
- Clotet, J., Escoté, X., Adrover, M. A., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., de Nadal, E., & Posas, F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *The EMBO journal*, 25(11), 2338–2346.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Vergés, E., Aldea, M., & Garí, E. (2009). *WHI3* regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell Cycle*, 8(12), 1912–1920.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Wang, H., Aldea, M., & Garí, E. (2008). *WHI3*, a developmental regulator of budding yeast, binds a large set of mRNAs functionally related to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28670–28679.
- Conlan, R. S., & Tzamarias, D. (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *Journal of molecular biology*, 309(5), 1007–1015.

- Cook, J. G., Bardwell, L., Kron, S. J., & Thorner, J. (1996). Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 10(22), 2831–2848.
- Čáp, M., Váchová, L., & Palková, Z. (2015). Longevity of U cells of differentiated yeast colonies grown on respiratory médium depends on active glycolysis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(21), 3488–3497.
- Fidalgo, M., Barrales, R. R., & Jimenez, J. (2008). Coding repeat instability in the *FLO11* gene of *Saccharomyces* yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, 25(12), 879–889.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M., & Hakoshima, T. (2000). Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nature structural biology*, 7(10), 889–893.
- García-Marqués, S., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2015). Nuclear versus cytosolic activity of the yeast Hog1 MAP kinase in response to osmotic and tunicamycin-induced ER stress. *FEBS Letters*, 589(16), 2163–2168.
- Garí, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B., & Aldea, M. (2001). *WHI3* binds the mRNA of the G1 cyclin *CLN3* to modulate cell fate in budding yeast. *Genes and Development*, 15(21), 2803–2808.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., & Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *The FEBS journal*, 278(21), 3978–3990.
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols*, 2(1), 31–34.
- Granek, J. A., & Magwene, P. M. (2010). Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS genetics*, 6(1), e1000823.
- Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q., & Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12158–12163.
- Gupta, M., & Outten, C. E. (2020). Iron–sulfur cluster signaling: The common thread in fungal iron regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 189–201.
- Hanlon, S. E., Rizzo, J. M., Tatomer, D. C., Lieb, J. D., & Buck, M. J. (2011). The stress response factors Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 direct targeting of the conserved co-repressor Tup1-Ssn6 in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 6(4).
- Hao, N., Zeng, Y., Elston, T. C., & Dohlman, H. G. (2008). Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *The Journal of biological chemistry*, 283(49), 33798–33802.
- Heise, B., van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S., & Mösch, H. U. (2010). The TEA transcription factor *TEC1* confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryotic cell*, 9(4), 514–531.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2) 300-372
- Holmes, K. J., Klass, D. M., Guiney, E. L., & Cyert, M. S. (2013). *WHI3*, an *S. cerevisiae* RNA-binding protein, is a component of stress granules that regulates levels of its target mRNAs. *PLoS one*, 8(12), e84060.
- Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., & Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8839–8843.
- Honigberg, S. M. (2016). Similar environments but diverse fates: Responses of budding yeast to nutrient deprivation. *Microbial Cell*, 3(8), 302–328.
- Chen, R. A., Michaeli, T., Van Aelst, L., & Ballester, R. (2000). A role for the noncatalytic N terminus in the function of Cdc25, a *Saccharomyces cerevisiae* Ras-guanine nucleotide exchange factor. *Genetics*, 154(4), 1473–1484.
- Ilina, Y., Sloma, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Novotny, M., Thorsen, M., Wysocki, R., & Tamás, M. J. (2008). Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p. *The Biochemical journal*, 415(3), 467–475.

- Isoyama, T., Murayama, A., Nomoto, A., & Kuge, S. (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 276(24), 21863–21869.
- Jian, D., Aili, Z., Xiaojia, B., Huansheng, Z., & Yun, H. (2010). Feedback regulation of Ras2 guanine nucleotide exchange factor (Ras2-GEF) activity of Cdc25p by Cdc25p phosphorylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 584(23), 4745–4750.
- Kaerberlein, M., & Guarente, L. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* MPT5 and SSD1 function in parallel pathways to promote cell wall integrity. *Genetics*, 160(1), 83–95.
- Kočičřová, E. (2020): Tvorba proteinových granulí v diferencovaných buňkách kvasinkových kolonií. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta UK.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H., & Thevelein, J. M. (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. *Molecular microbiology*, 32(5), 1002–1012.
- Kuchin, S., Vyas, V. K., and Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors NRG1 and NRG2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3994–4000.
- Kumar, N. V., Yang, J., Pillai, J. K., Rawat, S., Solano, C., Kumar, A., Grötli, M., Stemmler, T. L., Rosen, B. P., & Tamás, M. J. (2015). Arsenic Directly Binds to and Activates the Yeast AP-1-Like Transcription Factor Yap8. *Molecular and cellular biology*, 36(6), 913–922.
- Lakens D. (2013). *Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. Frontiers in psychology*, 4, 863.
- Lee, J., Reiter, W., Dohnal, I., Gregori, C., Beese-Sims, S., Kuchler, K., Ammerer, G., & Levin, D. E. (2013). MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes & development*, 27(23), 2590–2601.
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press. pp. 278–292.
- Li, L., Bagley, D., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2008). Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Molecular and cellular biology*, 28(4), 1326–1337.
- Lien, E. C., Nagiec, M. J., & Dohlman, H. G. (2013). Proper protein glycosylation promotes mitogen-activated protein kinase signal fidelity. *Biochemistry*, 52(1), 115–124.
- Lipke, P. N., Klotz, S. A., Dufrene, Y. F., Jackson, D. N., & Garcia-Sherman, M. C. (2017). Amyloid-Like β -Aggregates as Force-Sensitive Switches in Fungal Biofilms and Infections. *Microbiology and molecular biology reviews*, 82(1), e00035-17.
- Lorenz, M. C., Cutler, N. S., & Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 11(1), 183–199.
- Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P., & Heitman, J. (2000). The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154(2), 609–622.
- MacIsaac, K. D., Wang, T., Gordon, D. B., Gifford, D. K., Stormo, G. D., & Fraenkel, E. (2006). An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC bioinformatics*, 7, 113.
- Madhani, H. D., Galitski, T., Lander, E. S., & Fink, G. R. (1999). Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12530–12535.
- Malcher, M., Schladebeck, S., & Mösche, H. U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 187(3), 717–730.
- Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., Rodríguez de la Concepción, M. L., Logie, C., Jimeno-González, S., Chávez, S., Ammerer, G., & Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *The EMBO journal*, 28(4), 326–336.

- Mattison, C. P., & Ota, I. M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes & development*, 14(10), 1229–1235.
- Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartney, R. R., Leiper, F. C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L. F., Ogrodowicz, R., Martin, S. R., Schmidt, M. C., Gamblin, S. J., & Carling, D. (2011). ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 14(5), 707–714.
- Mazzola, D., Pimentel, C., Caetano, S., Amaral, C., Menezes, R., Santos, C. N., Eleutherio, E., & Rodrigues-Pousada, C. (2015). Inhibition of Yap2 activity by MAPKAP kinase Rck1 affects yeast tolerance to cadmium. *FEBS letters*, 589(19 Pt B), 2841–2849.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R., & de Larrinoa, I. F. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS letters*, 425(2), 323–328.
- Menezes, R. A., Amaral, C., Delaunay, A., Toledano, M., & Rodrigues-Pousada, C. (2004). Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS letters*, 566(1-3), 141–146.
- Merhej, J., Delaveau, T., Guitard, J., Palancade, B., Hennequin, C., Garcia, M., Devaux, F. (2015). Yap7 is a transcriptional repressor of nitric oxide oxidase in yeasts, which arose from neofunctionalization after whole genome duplication. *Molecular Microbiology*, 96(5), 951–972.
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., & Hirata, D. (2013). Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the *WHI3* cell cycle regulator in budding yeast. *The Journal of biological chemistry*, 288(15), 10558–10566.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., & Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes & development*, 15(10), 1217–1228.
- Nash, R. S., Volpe, T., & Futcher, B. (2001). Isolation and characterization of *WHI3*, a size-control gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157(4), 1469–1480.
- Nevitt, T., Pereira, J., & Rodrigues-Pousada, C. (2004). YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 21(16), 1365–1374.
- Nguyen, P. V., Hlaváček, O., Maršíková, J., Váchová, L., & Palková, Z. (2018). Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms. *PLoS genetics*, 14(7), e1007495.
- North, M., Tandon, V. J., Thomas, R., Loguinov, A., Gerlovina, I., Hubbard, A. E., Zhang, L., Smith, M. T., & Vulpe, C. D. (2011). Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. *PLoS one*, 6(8).
- Oppler, Z. J., Parrish, M. E., & Murphy, H. A. (2019). Variation at an adhesin locus suggests sociality in natural populations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings. Biological sciences*, 286(1913), 20191948.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S., Huh, J. H., & Kron, S. J. (2002). Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Molecular microbiology*, 45(2), 453–469.
- Palková Z, Janderová B, Gabriel J, Zikánová B, Pospíšek M, Forstová J. Ammonia mediated communication between yeast colonies. *Nature*. 1997 Dec 4;390(6659):532-6.
- Palková, Z., & Forstová, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of cell science*, 113 (Pt 11), 1923–1928.
- Pan, X., & Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Molecular and cellular biology*, 20(22), 8364–8372.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Rande-Gil, F., & Prieto, J. A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 281(8), 4638–4645

- Petelenz-Kurdziel, E., Kuehn, C., Nordlander, B., Klein, D., Hong, K. K., Jacobson, T., Dahl, P., Schaber, J., Nielsen, J., Hohmann, S., & Klipp, E. (2013). Quantitative analysis of glycerol accumulation, glycolysis and growth under hyper osmotic stress. *PLoS computational biology*, 9(6), e1003084.
- Piccirillo, S., & Honigberg, S. M. (2010). Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies. *Research in microbiology*, 161(5), 390–398.
- Pimentel, C., Caetano, S. M., Menezes, R., Figueira, I., Santos, C. N., Ferreira, R. B., Rodrigues-Pousada, C. (2014). Yap1 mediates tolerance to cobalt toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(6), 1977–1986.
- Pimentel, C., Vicente, C., Menezes, R. A., Caetano, S., Carreto, L., & Rodrigues-Pousada, C. (2012). The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLoS ONE*, 7(5), 1–11.
- Plocek, V., Váchová, L., Šťovíček, V., & Palková, Z. (2020). Cell Distribution within Yeast Colonies and Colony Biofilms: How Structure Develops. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3873.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, 86(6), 865–875.
- Proft, M., & Struhl, K. (2002). Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular cell*, 9(6), 1307–1317.
- Proft, M., & Struhl, K. (2004). MAP Kinase-Mediated Stress Relief that Precedes and Regulates the Timing of Transcriptional Induction. *Cell*, 118(3), 351–361.
- Proft, M., Mas, G., de Nadal, E., Vendrell, A., Noriega, N., Struhl, K., & Posas, F. (2006). The Stress-Activated Hog1 Kinase Is a Selective Transcriptional Elongation Factor for Genes Responding to Osmotic Stress. *Molecular Cell*, 23(2), 241–250.
- Raitt, D. C., Posas, F., & Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO journal*, 19(17), 4623–4631.
- Ramsook, C. B., Tan, C., Garcia, M. C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R., Litewka, A., O'Meally, S., Otoo, H. N., Khalaf, R. A., Dranginis, A. M., Gaur, N. K., Klotz, S. A., Rauceo, J. M., Jue, C. K., & Lipke, P. N. (2010). Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryotic cell*, 9(3), 393–404.
- Reinke, A. W., Baek, J., Ashenberg, O., & Keating, A. E. (2013). Networks of bZIP protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution. *Science* 340: 730-734.
- Riordan, D. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2011). Identification of RNA recognition elements in the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome. *Nucleic acids research*, 39(4), 1501–1509.
- Rodrigues-Pousada, C., Devaux, F., Caetano, S. M., Pimentel, C., da Silva, S., Cordeiro, A. C., & Amaral, C. (2019). Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 6(6), 267–285.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A., & Pimentel, C. (2010). The Yap family and its role in stress response. *Yeast (Chichester, England)*, 27(5), 245–258.
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., & Alepuz, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(6), 1110–1120.
- Sadeh, A., Movshovich, N., Volokh, M., Gheber, L., & Aharoni, A. (2011). Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. *Molecular biology of the cell*, 22(17), 3127–3138.
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289–318.
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(1), 253–282.
- Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., & Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 20(4), 1321–1328.

- Sharifian, H., Lampert, F., Stojanovski, K., Regot, S., Vaga, S., Buser, R., Lee, S. S., Koeppl, H., Posas, F., Pelet, S., & Peter, M. (2015). Parallel feedback loops control the basal activity of the HOG MAPK signaling cascade. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 7(4), 412–422.
- Shock, T. R., Thompson, J., Yates, J. R., 3rd, & Madhani, H. D. (2009). Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the *TEC1* transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryotic cell*, 8(4), 606–616.
- Schladebeck, S., & Mösch, H. U. (2013). The RNA-binding protein *WHI3* Is a key regulator of developmental signaling and ploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(1), 73–86.
- Schlüssel, G., Krzyzanowski, M. K., Caudron, F., Barral, Y., & Rine, J. (2017). Aggregation of the *WHI3* protein, not loss of heterochromatin, causes sterility in old yeast cells. *Science*, 355(6330), 1184–1187.
- Stewart, M. S., Krause, S. A., McGhie, J., & Gray, J. V. (2007). Mpt5p, a stress tolerance- and lifespan-promoting PUF protein in *Saccharomyces cerevisiae*, acts upstream of the cell wall integrity pathway. *Eukaryotic cell*, 6(2), 262–270.
- Šťovíček, V., Váchová, L., Begany, M., Wilkinson, D., & Palková, Z. (2014). Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC genomics*, 15, 136.
- Takayama, T., Yamamoto, K., Saito, H., & Tatebayashi, K. (2019). Interaction between the transmembrane domains of Sho1 and Opy2 enhances the signaling efficiency of the Hog1 MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 14(1), e0211380.
- Talemi, S. R., Tiger, C. F., Andersson, M., Babazadeh, R., Welkenhuysen, N., Klipp, E., Hohmann, S., & Schaber, J. (2016). Systems Level Analysis of the Yeast Osmo-Stat. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12.
- Tam, J., & van Werven, F. J. (2020). Regulated repression governs the cell fate promoter controlling yeast meiosis. *Nature communications*, 11(1), 2271.
- Tamanoi F. (2011). Ras signaling in yeast. *Genes & cancer*, 2(3), 210–215.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., & Saito, H. (2006). Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *The EMBO journal*, 25(13), 3033–3044.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tomida, T., Nishimura, A., Takayama, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Adachi-Akahane, S., Tokunaga, Y., & Saito, H. (2020). Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K. *The EMBO Journal*, 39(5).
- Tuck, A. C., & Tollervy, D. (2012). An RNA reset button. *Molecular cell*, 45(4), 435–436.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D. S., Nickerson, S. R., Krysan, D. J., & Cullen, P. J. (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *The Journal of cell biology*, 181(7), 1073–1081.
- Váchová, L., & Palková, Z. (2018). How structured yeast multicellular communities live, age and die?. *FEMS yeast research*, 18(4), 10.1093/femsyr/foy033.
- Váchová, L., Hatáková, L., Čáp, M., Pokorná, M., & Palková, Z. (2013). Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 102485.
- Váchová, L., Stovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Stěpánek, L., Kubínová, L., & Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of cell biology*, 194(5), 679–687.
- Valcu, M., & Valcu, C. M. (2011). Data transformation practices in biomedical sciences. *Nature methods*, 8(2), 104–105.
- Vallejo, M. C., & Mayinger, P. (2015). Delayed Turnover of Unphosphorylated Ssk1 during Carbon Stress Activates the Yeast Hog1 Map Kinase Pathway. *PloS one*, 10(9), e0137199.
- Vázquez-Ibarra, A., Subirana, L., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Rojas-Ortega, E., Rodríguez-González, M., de Nadal, E., Posas, F. and Coria, R. (2018), Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP3Ks, in the

- absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmostress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 285: 1079-1096.
- Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E., & Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, 278(33), 30896–30904.
- Venters BJ, Wachi S, Mavrich TN, et al. A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Molecular cell*. 2011;41(4):480-492.
- Venters, B. J., Wachi, S., Mavrich, T. N., Andersen, B. E., Jena, P., Sinnamon, A. J., Jain, P., Rolleri, N. S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C., & Pugh, B. F. (2011). A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Molecular cell*, 41(4), 480–492.
- Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*, 60(1), 5–15.
- Vinod, P. K., Sengupta, N., Bhat, P. J., & Venkatesh, K. V. (2008). Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of *FLO11*. *PLoS one*, 3(2), e1663.
- Wang, H., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C., & Aldea, M. (2004). Recruitment of Cdc28 by *WHI3* restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO Journal*, 23(1), 180–190.
- Westfall, P. J., Patterson, J. C., Chen, R. E., & Thorner, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12212 LP – 12217.
- Willaert, R. G. (2018). Adhesins of yeasts: Protein structure and interactions. *Journal of Fungi*, 4(4), 1–28.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., & Ota, I. (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell*, 1(2), 163–173.
- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., Higgins, J. J. (2011). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. *Association for Computing Machinery, (CHI '11)*, 143–146.
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the yeast whole-genome duplication. *PLoS Biology*
- Yaakov, G., Duch, A., García-Rubio, M., Clotet, J., Jimenez, J., Aguilera, A., & Posas, F. (2009). The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Molecular biology of the cell*, 20(15), 3572–3582.
- Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K. G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M. A., & Snyder, M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature genetics*, 26(3), 283–289.

9 Příloha k DP

Tabulka P1. Tukey test pro 4-denní kolonie kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFlo11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFlo11-GFP* (č.sb. 2007). GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|-------------------------|----------|-------|------|--------|-----------|
| 1817,GM - 1817,GM120 | -522,84 | 15,70 | 1002 | -33,31 | 1,901E-13 |
| 1817,GM - 1817,GM40 | -225,67 | 14,75 | 1002 | -15,30 | 1,901E-13 |
| 1817,GM - 2007,GM | 222,94 | 11,42 | 1002 | 19,52 | 1,901E-13 |
| 1817,GM - 2007,GM120 | -449,66 | 13,00 | 1002 | -34,58 | 1,901E-13 |
| 1817,GM - 2007,GM40 | -212,49 | 13,00 | 1002 | -16,34 | 1,901E-13 |
| 1817,GM120 - 1817,GM40 | 297,18 | 17,86 | 1002 | 16,64 | 1,901E-13 |
| 1817,GM120 - 2007,GM | 745,79 | 15,23 | 1002 | 48,97 | 1,901E-13 |
| 1817,GM120 - 2007,GM120 | 73,18 | 16,45 | 1002 | 4,45 | 1,394E-04 |
| 1817,GM120 - 2007,GM40 | 310,36 | 16,45 | 1002 | 18,87 | 1,901E-13 |
| 1817,GM40 - 2007,GM | 448,61 | 14,25 | 1002 | 31,49 | 1,901E-13 |
| 1817,GM40 - 2007,GM120 | -223,99 | 15,54 | 1002 | -14,41 | 1,901E-13 |
| 1817,GM40 - 2007,GM40 | 13,18 | 15,54 | 1002 | 0,85 | 9,583E-01 |
| 2007,GM - 2007,GM120 | -672,60 | 12,43 | 1002 | -54,09 | 1,901E-13 |
| 2007,GM - 2007,GM40 | -435,43 | 12,43 | 1002 | -35,02 | 1,901E-13 |
| 2007,GM120 - 2007,GM40 | 237,17 | 13,90 | 1002 | 17,06 | 1,901E-13 |

Tabulka P2. Tukey test pro 6-denní kolonie kmenů BR-F *whi3Δ/whi3Δ pFlo11-GFP* (č.sb.1817) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFlo11-GFP* (č.sb. 2007). GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|-------------------------|----------|-------|-----|--------|-----------|
| 1817,GM - 1817,GM120 | -154,11 | 11,14 | 318 | -13,83 | 1,026E-12 |
| 1817,GM - 1817,GM40 | -104,34 | 11,14 | 318 | -9,37 | 1,083E-12 |
| 1817,GM - 2007,GM | 59,15 | 11,14 | 318 | 5,31 | 3,066E-06 |
| 1817,GM - 2007,GM120 | -125,13 | 11,14 | 318 | -11,23 | 1,048E-12 |
| 1817,GM - 2007,GM40 | -69,18 | 11,14 | 318 | -6,21 | 2,477E-08 |
| 1817,GM120 - 1817,GM40 | 49,77 | 11,14 | 318 | 4,47 | 1,591E-04 |
| 1817,GM120 - 2007,GM | 213,26 | 11,14 | 318 | 19,14 | 1,026E-12 |
| 1817,GM120 - 2007,GM120 | 28,98 | 11,14 | 318 | 2,60 | 9,981E-02 |
| 1817,GM120 - 2007,GM40 | 84,94 | 11,14 | 318 | 7,62 | 5,349E-12 |
| 1817,GM40 - 2007,GM | 163,49 | 11,14 | 318 | 14,68 | 1,026E-12 |
| 1817,GM40 - 2007,GM120 | -20,79 | 11,14 | 318 | -1,87 | 4,251E-01 |
| 1817,GM40 - 2007,GM40 | 35,17 | 11,14 | 318 | 3,16 | 2,143E-02 |
| 2007,GM - 2007,GM120 | -184,28 | 11,14 | 318 | -16,54 | 1,026E-12 |
| 2007,GM - 2007,GM40 | -128,32 | 11,14 | 318 | -11,52 | 1,037E-12 |
| 2007,GM120 - 2007,GM40 | 55,95 | 11,14 | 318 | 5,02 | 1,254E-05 |

Tabulka P3. Tukey test pro 4-denní kolonie kmenů

BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016).
GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|-------------------------|----------|-------|------|--------|-----------|
| 3007,GM - 3007,GM120 | -463,54 | 19,29 | 1020 | -24,03 | 1,901E-13 |
| 3007,GM - 3007,GM40 | -470,57 | 23,63 | 1020 | -19,92 | 1,901E-13 |
| 3007,GM - 3016,GM | 49,40 | 20,84 | 1020 | 2,37 | 1,676E-01 |
| 3007,GM - 3016,GM120 | -394,04 | 19,29 | 1020 | -20,43 | 1,901E-13 |
| 3007,GM - 3016,GM40 | -127,95 | 23,63 | 1020 | -5,42 | 1,137E-06 |
| 3007,GM120 - 3007,GM40 | -7,03 | 23,63 | 1020 | -0,30 | 9,997E-01 |
| 3007,GM120 - 3016,GM | 512,94 | 20,84 | 1020 | 24,62 | 1,901E-13 |
| 3007,GM120 - 3016,GM120 | 69,50 | 19,29 | 1020 | 3,60 | 4,444E-03 |
| 3007,GM120 - 3016,GM40 | 335,59 | 23,63 | 1020 | 14,20 | 1,901E-13 |
| 3007,GM40 - 3016,GM | 519,97 | 24,90 | 1020 | 20,88 | 1,901E-13 |
| 3007,GM40 - 3016,GM120 | 76,53 | 23,63 | 1020 | 3,24 | 1,562E-02 |
| 3007,GM40 - 3016,GM40 | 342,62 | 27,28 | 1020 | 12,56 | 1,901E-13 |
| 3016,GM - 3016,GM120 | -443,43 | 20,84 | 1020 | -21,28 | 1,901E-13 |
| 3016,GM - 3016,GM40 | -177,35 | 24,90 | 1020 | -7,12 | 2,985E-11 |
| 3016,GM120 - 3016,GM40 | 266,09 | 23,63 | 1020 | 11,26 | 1,901E-13 |

Tabulka P4 Tukey test pro 6-denní kolonie kmenů

BR-F *whi3Δ/whi3Δ Flo11p-DsRed* (č.s. 3007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.s. 3016). GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|-------------------------|----------|-------|------|--------|-----------|
| 3007,GM - 3007,GM120 | -273,58 | 17,86 | 1047 | -15,31 | 2,006E-13 |
| 3007,GM - 3007,GM40 | -417,14 | 23,18 | 1047 | -17,99 | 2,006E-13 |
| 3007,GM - 3016,GM | 198,69 | 17,78 | 1047 | 11,17 | 2,235E-13 |
| 3007,GM - 3016,GM120 | -463,68 | 17,89 | 1047 | -25,92 | 2,006E-13 |
| 3007,GM - 3016,GM40 | -188,63 | 21,78 | 1047 | -8,66 | 2,536E-13 |
| 3007,GM120 - 3007,GM40 | -143,56 | 23,25 | 1047 | -6,18 | 1,415E-08 |
| 3007,GM120 - 3016,GM | 472,27 | 17,86 | 1047 | 26,44 | 2,006E-13 |
| 3007,GM120 - 3016,GM120 | -190,09 | 17,97 | 1047 | -10,58 | 2,567E-13 |
| 3007,GM120 - 3016,GM40 | 84,95 | 21,85 | 1047 | 3,89 | 1,496E-03 |
| 3007,GM40 - 3016,GM | 615,83 | 23,18 | 1047 | 26,56 | 2,006E-13 |
| 3007,GM40 - 3016,GM120 | -46,54 | 23,26 | 1047 | -2,00 | 3,428E-01 |
| 3007,GM40 - 3016,GM40 | 228,51 | 26,37 | 1047 | 8,66 | 2,532E-13 |
| 3016,GM - 3016,GM120 | -662,36 | 17,89 | 1047 | -37,03 | 2,006E-13 |
| 3016,GM - 3016,GM40 | -387,32 | 21,78 | 1047 | -17,79 | 2,006E-13 |
| 3016,GM120 - 3016,GM40 | 275,04 | 21,86 | 1047 | 12,58 | 2,006E-13 |

Tabulka P5. Porovnání mediánů 4-denních kolonií kmenů *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6*, *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ* a *whi3Δ/whi3Δ* pro pFlo11-GFP.

| Kmen | Médium | Medián | Vliv NaCl, % |
|--------------------------------|-----------------|--------|--------------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ</i> | GM | 353 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 933 | 264 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | GM | 1073 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 1619 | 151 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | GM | 159 | - |
| | GM + 40 mM NaCl | 623 | 391 |

Tabulka P6. Výsledky statistického zpracování hodnot intenzity fluorescence u 4 a 6-denních kolonií kmenů *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6* a *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ*, značených pFlo11-GFP a Flo11p-DsRed. Parametr Médium vyjadřuje vliv 40mM a 120mM NaCl na výslednou fluorescenci.

| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | | | | |
|--------------------------------|------------|-----------|--------------|------------|
| Fluor. protein | pFlo11-GFP | | Flo11p-DsRed | |
| Stáří, d | 4 | 6 | 4 | 6 |
| Parametr | Médium | | | |
| Df | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Df.res | 591 | 159 | 483 | 532 |
| Sum Sq | 14054612 | 229822 | 4716741 | 9571310 |
| Sum Sq.res | 3410128 | 124450 | 4848957 | 3189430 |
| F value | 1218 | 147 | 235 | 798 |
| Pr(>F) | 2,370E-210 | 7,583E-37 | 5,51E-72 | 6,679E-161 |
| Efekt parametru | 0,805 | 0,649 | 0,493 | 0,750 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | | | | |
| Fluor. protein | pFlo11-GFP | | Flo11p-DsRed | |
| Stáří, d | 4 | 6 | 4 | 6 |
| Parametr | Médium | | | |
| Df | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Df.res | 159 | 159 | 159 | 159 |
| Sum Sq | 182918 | 69511 | 172286 | 237142 |
| Sum Sq.res | 171361 | 284767 | 181971 | 117128 |
| F value | 85 | 19 | 75 | 161 |
| Pr(>F) | 8,377E-26 | 2,878E-08 | 9,98E-24 | 6,117E-39 |
| Efekt parametru | 0,516 | 0,196 | 0,486 | 0,669 |

Tabulka P7. Tukey test pro 4 a 6-denních kolonií kmenů

BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 pFlo11-GFP* (č.sb. 2007) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ pFlo11-GFP* (č.sb.1983). GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Staří, d | Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|--------------------------------|------------------------|----------|------|-----|--------|-----------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | | | | | | |
| 4 | GM - GM120 | -359,95 | 7,55 | 591 | -47,68 | 4,902E-10 |
| | GM - GM40 | -224,11 | 7,55 | 591 | -29,69 | 4,902E-10 |
| | GM120 - GM40 | 135,84 | 8,44 | 591 | 16,09 | 4,902E-10 |
| 6 | GM - GM120 | -89,52 | 5,38 | 159 | -16,63 | 0,000E+00 |
| | GM - GM40 | -64,09 | 5,38 | 159 | -11,90 | 0,000E+00 |
| | GM120 - GM40 | 25,43 | 5,38 | 159 | 4,72 | 1,513E-05 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | | | | | | |
| 4 | GM - GM120 | -77,77 | 6,32 | 159 | -12,31 | 1,901E-13 |
| | GM - GM40 | -62,23 | 6,32 | 159 | -9,85 | 9,548E-15 |
| | GM120 - GM40 | 15,54 | 6,32 | 159 | 2,46 | 3,958E-02 |
| 6 | GM - GM120 | -51,74 | 8,31 | 159 | -6,23 | 1,201E-08 |
| | GM - GM40 | -25,09 | 8,00 | 159 | -3,14 | 5,770E-03 |
| | GM120 - GM40 | 26,65 | 8,17 | 159 | 3,26 | 3,834E-03 |

Tabulka P8. Tukey test pro 4 a 6-denní kolonie kmenů

BR-F *whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6 Flo11p-DsRed* (č.sb. 3016) a BR-F *whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ Flo11p-DsRed* (č.sb. 3028). GM40 je médium GM + 40mM NaCl, GM120 je GM + 120mM NaCl.

| Stáří, d | Rozdíl mezi variantami | Estimate | SE | df | HSD | P.value |
|--------------------------------|------------------------|----------|-------|-----|--------|-----------|
| <i>whi3Δ/whi3Δ TEFYAP6</i> | | | | | | |
| 4 | GM - GM120 | -222.76 | 10,41 | 483 | -21,39 | 6,242E-11 |
| | GM - GM40 | -89.03 | 12,45 | 483 | -7,15 | 7,192E-11 |
| | GM120 - GM40 | 133.72 | 11,81 | 483 | 11,32 | 6,243E-11 |
| 6 | GM - GM120 | -298,78 | 7,49 | 532 | -39,87 | 3,130E-10 |
| | GM - GM40 | -170,03 | 9,13 | 532 | -18,63 | 3,130E-10 |
| | GM120 - GM40 | 128,75 | 9,16 | 532 | 14,05 | 3,130E-10 |
| <i>whi3Δ/whi3Δ yap6Δ/yap6Δ</i> | | | | | | |
| 4 | GM - GM120 | -64,44 | 6,64 | 159 | -9,71 | 8,660E-15 |
| | GM - GM40 | -72,60 | 6,40 | 159 | -11,35 | 0,000E+00 |
| | GM120 - GM40 | -8,16 | 6,53 | 159 | -1,25 | 4,261E-01 |
| 6 | GM - GM120 | -91,42 | 5,22 | 159 | -17,50 | 0,000E+00 |
| | GM - GM40 | -63,58 | 5,22 | 159 | -12,17 | 0,000E+00 |
| | GM120 - GM40 | 27,83 | 5,22 | 159 | 5,33 | 9,970E-07 |