

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**a**

**UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR VE ŠTRASBURKU**

**Faculté de Sciences de la Vie**

**Osmotolerantní kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii*  
- konstrukce nástrojů genového inženýrství a charakterizace  
specifických vlastností**

Dizertační práce

Mgr. Lenka Příbylová

Školitelé: RNDr. Hana Sychrová, DrSc. a Prof. Serge Potier

Spoluškolitel: Prof. Jacky de Montigny

Odd. Membránového transportu, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

a

Lab. Génétique moléculaire, génomique et microbiologie, ULP/CNRS, Strasbourg

Praha 2007



Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg 1 (ULP)  
et Docteur de l'Université Charles à Prague (UK)

Disciplines: Sciences du vivant, Aspects moléculaires  
et cellulaires de la biologie (ULP)  
Biologie moléculaire et cellulaire, génétique et virologie (UK)

par Lenka Přibylová

**La levure osmotolérante *Zygosaccharomyces rouxii*  
- construction d'outils génétiques et moléculaires et  
caractérisation de propriétés spécifiques liées à l'osmotolérance**

**Membres du jury:**

<b>Dr. Hana Sychrová</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Prof. Serge Potier</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Prof. Jacky de Montigny</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>
<b>Prof. Catherine Florentz</b>	<b>Rapporteur interne</b>
<b>Dr. Čeněk Novotný</b>	<b>Rapporteur externe</b>
<b>Dr. Vladimír Vondrejs</b>	<b>Rapporteur externe</b>

Tato dizertační práce vznikala v letech 2002 – 2007 v rámci postgraduálního studia ve spolupráci („en co-tutelle“) mezi Univerzitou Karlovou v Praze a Univerzitou Louis Pasteur ve Štrasburku. Byla vypracována zčásti na Oddělení Membránového transportu Fyziologického ústavu, AV ČR, v.v.i., v Praze a zčásti v Laboratoire Génétique moléculaire, génomique et microbiologie UMR 7156, Département Microorganismes, génomes et environnement ULP/CNRS ve Štrasburku.

Během svého postgraduálního studia v letech 2003 – 2007 byla autorka předkládané práce členkou Collège Doctoral Européen des Universités de Strasbourg (CDE), ročníku Nicolas Copernic. Toto členství jí umožnilo využívat pomoc poskytovanou CDE postgraduálním studentům a účastnit se pravidelných přednášek týkajících se evropského společenství přednesených specialisty v různých oborech.

Cette thèse a été réalisée de 2002 à 2007 en co-tutelle entre l'Université Charles à Prague, République Tchèque, et l'Université Louis Pasteur à Strasbourg, France. Le travail a été conduit en partie dans le Département de Transport membranaire, Institut de Physiologie, AS CR, v.v.i. à Prague et en partie dans le Laboratoire Génétique moléculaire, génomique et microbiologie UMR 7156, Département Microorganismes, génomes et environnement ULP/CNRS à Strasbourg.

L'auteur de cette thèse a été membre de la promotion Nicolas Copernic du Collège Doctoral Européen des Universités de Strasbourg pendant la préparation de sa thèse de 2003 à 2007. Elle a bénéficié des aides spécifiques du CDE et a suivi un enseignement hebdomadaire sur les affaires européennes dispensé par des spécialistes internationaux.

Seznam grantových projektů, jejichž byla práce součástí:

La liste des subventions (grants), dont la thèse a fait partie:

GA AV ČR IAA5011407 (2004 – 2007) Úloha přenašečů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  v buněčné fyziologii – kvasinky jako modelový organismus pro expresi a charakterizaci

MŠMT LC 531 (2005 – 2009) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek

GA ČR 204/01/0272 (2001 – 2003) Geny podílející se na osmotoleranci nekonvenčních kvasinek, jejich charakterizace a funkční exprese v *Saccharomyces cerevisiae*

GA ČR 204/03/H066 (2003 – 2007) Molekulární mechanismy buněčných interakcí

GA ČR 204/05/0028 (2005 – 2007) Studium fyziologické a molekulové podstaty vysoké osmotolerance kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii*

MŠMT Projekt Barrande 2-06-06 (2006 – 2007) Genetická podstata osmotolerance některých nekonvenčních kvasinek – izolace a charakterizace specifických genů na základě systematického sekvenování genomů v rámci francouzského projektu Génolevures 2

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala hlavně RNDr. Haně Sychrové, DrSc., a dále Prof. Jacky de Montigny a Prof. Serge Potier za odborné vedení, cenné rady, ochotu a všestrannou pomoc během mého studia.

Za příjemné a přátelské pracovní prostředí a za spolupráci děkuji všem pracovníkům z Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu, AV ČR, v.v.i., a z Laboratoire Génétique moléculaire, génomique et microbiologie, Département Microorganismes, génomes et environnement ULP/CNRS ve Štrasburku.

Za cenné rady a spolupráci při analýze buněčných stěn kvasinkových kmenů děkuji Doc. Ing. Vladimíru Farkašovi, DrSc. z Chemického ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě a MUDr. Ivě Slaninové, Ph.D. z Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Za všestrannou pomoc při studiu ve Štrasburku bych chtěla poděkovat organizaci Collège Doctoral Européen.

Zvláštní poděkování patří mým nejbližším a přátelům za jejich trpělivost a podporu během mého studia.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier le Docteur Hana Sychrová et les Professeurs Jacky de Montigny et Serge Potier de m'avoir guidé durant ce travail. Je les remercie aussi pour leur disponibilité et leurs conseils précieux pour mener à bien ce projet.

Merci à tous mes ami(e)s et collègues du Département de Transport membranaire de l'Institut de Physiologie, AS CR, v.v.i., à Prague et du Laboratoire Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie ULP/CNRS à Strasbourg pour tous les coups de mains et les conseils.

Je remercie les Docteurs Vladimír Farkaš de l'Institut de Chimie de Slovaque Académie de Sciences à Bratislava et Iva Slaninová de la Faculté de Chimie de l'Université Masaryk à Brno pour la collaboration et leurs conseils concernant les analyses des parois cellulaires.

Je voudrais aussi remercier le Collège Doctoral Européen pour son aide lors de mes études doctorales.

Enfin, tout particulièrement, je voudrais remercier ma famille et mes ami(e)s pour leurs encouragements et leur soutien constant tout au long de ces années.

## **OBSAH**

<b>1. Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2. Současný stav problematiky</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Kvasinky ve stresových podmínkách</b>	<b>12</b>
2.1.1. Osmotolerance kvasinek	13
2.1.2. Buněčná stěna a osmotolerance	17
2.1.3. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -antiportní systémy	19
2.1.3.1. Protein Nha1	20
2.1.3.2. Protein Nhx1	22
2.1.3.2. Protein Kha1	22
<b>2.2. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i></b>	<b>23</b>
2.2.1. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -transportní proteiny <i>Z. rouxii</i>	27
2.2.2. Přirozený plasmid pSR1	28
<b>2.3. Nástroje genového inženýrství používané v kvasinkách</b>	<b>29</b>
2.3.1. Transformace kvasinkových buněk	31
2.3.1.1. Transformace protoplastů/sféroplastů	32
2.3.1.2. Transformace buněk prostřednictvím PEG a iontů Li <sup>+</sup>	33
2.3.1.3. Transformace buněk elektroporací	33
2.3.2. Plasmidy používané v kvasinkách	35
2.3.2.1. Episomální plasmidy <i>S. cerevisiae</i>	38
2.3.2.2. Centromerové plasmidy	39
2.3.3. Techniky cílené delece genů v kvasinkách	41
<b>2.4. <i>Hemiascomycetes</i> - modelová skupina pro studium evoluce eukaryotického genomu</b>	<b>43</b>
2.4.1. Projekt Génolevures	43
<b>3. Cíle práce</b>	<b>48</b>
<b>4. Materiál a metody</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Materiál</b>	<b>49</b>
4.1.1. Kmeny bakterií a kvasinek	49
4.1.2. Kultivační půdy	50

4.1.3. Plasmidy	50
<b>4.2. Metody</b>	<b>51</b>
4.2.1. Mikrobiologické metody	52
4.2.2. Molekulárně-biologické metody	53
4.2.3. Biochemické metody	57
4.2.4. Metody počítačové analýzy sekvencí	57
<b>5. Výsledky a diskuze</b>	<b>58</b>
<b>5.1. Příprava nástrojů genového inženýrství pro <i>Z. rouxii</i></b>	<b>60</b>
5.1.1. Publikace č. 1: Efficient transformation of the osmotolerant yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> by electroporation	61
5.1.2. Publikace č. 2: Expression of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>MPR1</i> gene encoding N-acetyltransferase in <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> confers resistance to L-azetidine-2-carboxylate	62
5.1.3. Publikace č. 3: Characterization of <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> centromeres and construction of first <i>Z. rouxii</i> centromeric vectors	63
5.1.4. Publikace č. 4: Tools for the genetic manipulation of <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	64
<b>5.2. Osmotolerantní vlastnosti <i>Z. rouxii</i></b>	<b>66</b>
5.2.1. Publikace č. 5: Osmoresistant yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> : the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism	67
5.2.2. Publikace č. 6: Differences in osmotolerant and cell wall properties of two <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> strains	68
<b>5.3. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny</b>	<b>69</b>
5.3.1. Publikace č. 7: Exploration of yeast alkali metal cation/H <sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison	70
5.3.2. Charakterizace Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -transportních proteinů <i>Z. rouxii</i>	71
5.3.2.1. Identifikace a izolace <i>ZrNHA1</i>	71
5.3.2.2. Sekvenční analýza <i>ZrNha1p</i>	72
5.3.2.3. Heterologní exprese <i>ZrNha1p</i> v <i>S. cerevisiae</i> BW31	73
5.3.2.3.1. Vliv <i>ZrNha1p</i> na toleranci <i>S. cerevisiae</i> BW31 k solím v médiu	73
5.3.2.3.2. Lokalizace <i>ZrNha1p</i> v buňkách <i>S. cerevisiae</i> BW31	74



5.3.2.3.3. Výstup kationtů z buněk <i>S. cerevisiae</i> BW31 exprimujících <i>ZrNHA1</i>	75
5.3.2.4. Delece genů <i>ZrSOD2-22</i> a <i>ZrNHA1</i> v <i>Z. rouxii</i>	77
5.3.2.5. Vliv delecí <i>ZrSOD2-22</i> a <i>ZrNHA1</i> na halotoleranci buněk <i>Z. rouxii</i>	77
5.3.2.6. Komplementace mutací <i>Zrsod2-22Δ</i> a <i>Zrnha1Δ</i> vložením genu na plasmidu	79
5.3.2.7. Vzájemná komplementace funkcí <i>ZrSod2-22p</i> a <i>Zrnha1p</i>	80
5.3.2.8. Fylogenetický vztah <i>ZrSOD2-22</i> a <i>ZrNHA1</i>	81
5.3.2.9. Závěr	82
<b>5.4. Sekvence a anotace genomu <i>Z. rouxii</i></b>	<b>84</b>
5.4.1. Příprava DNA <i>Z. rouxii</i> CBS 732 <sup>T</sup> pro sekvenaci	84
5.4.2. Anotace	85
<b>6. Souhrn</b>	<b>93</b>
<b>7. Seznam použitých symbolů a zkratek</b>	<b>97</b>
<b>8. Seznam literatury</b>	<b>99</b>
<b>9. Résumé de thèse de Doctorat en co-tutelle</b>	<b>116</b>
<b>10. Přílohy</b>	<b>122</b>
<b>10.1. Sekvence proteinu <i>ZrNha1</i></b>	<b>122</b>
<b>10.2. Srovnání sekvencí <i>ScNha1p</i>, <i>ZrSod2-22p</i> a <i>ZrNha1p</i></b>	<b>123</b>
<b>10.3. Seznam autorčiných publikací a rukopisů/La liste de publications de l'auteur de thèse</b>	<b>125</b>

# 1. Úvod

Kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii* patří, stejně jako většina ostatních známých druhů kvasinek, do třídy *Hemiascomycetes*. V řadě vlastností se podobá modelové kvasince *Saccharomyces cerevisiae*; na rozdíl od ní (a většiny ostatních druhů kvasinek) je však schopna přežívat v prostředí s vysokou koncentrací osmoticky aktivních látek (v přírodě se nejčastěji jedná o vysoké koncentrace solí nebo cukrů). Podstata této vysoké osmotolerance dosud není známa, soudí se, že je dána přítomností specifických genů. Jejich identifikace by vedla nejen k prohloubení znalostí o mechanismech osmotolerance vůbec, ale tyto geny by též mohly být využity v biotechnologických aplikacích – jejich exprese v průmyslových kmenech *S. cerevisiae* by mohla zlepšit vlastnosti těchto kmenů při růstu v koncentrovaném prostředí (např. při fermentacích).

Jakkoli již byla publikována řada studií zabývajících se osmotolerantními vlastnostmi *Z. rouxii* z fyziologického hlediska (Jansen *et al.*, 2003; Kurtzman a Fell, 1998; Martorell *et al.*, 2007; van Zyl *et al.*, 1990), znalost procesů probíhajících na molekulové úrovni je zatím velmi limitovaná. Dosud bylo identifikováno a/nebo charakterizováno jen několik genů *Z. rouxii* účastnících se odpovědi buňky na osmotický stres, většina z nich prostřednictvím heterologní exprese v mutantních kmenech *S. cerevisiae* (např. Iwaki *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002). Žádný z těchto genů však nebyl druhově specifický. Je to dáno především tím, že dosud neexistoval systém molekulárně-biologických technik pro genovou manipulaci *Z. rouxii*. Jedním z úkolů dizertační práce tak bylo vytvořit soubor nástrojů genového inženýrství pro *Z. rouxii*.

Naprostá většina známých genů *Z. rouxii* byla izolována ze dvou divokých kmenů, ATCC 42981 a CBS 732, což je typový kmen *Z. rouxii*. V předkládané dizertační práci jsme se tedy pokusili blíže charakterizovat tyto dva nejčastěji studované divoké kmeny, a to hlavně z hlediska jejich osmotolerantních vlastností. S ohledem na provázanost signální dráhy odpovědi buňky na osmotický stres a signálních drah regulace složení a struktury buněčné stěny (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2005; Mager a Siderius, 2002; Munro *et al.*, 2007) byla pozornost věnována i vlastnostem buněčné stěny obou kmenů. Část práce se zabývá studiem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -transportních systémů *Z. rouxii*, které se podílejí na vysoké osmotoleranci zajišťováním iontové homeostáze. Konečně poslední kapitola popisuje proces anotací

následujících po systematickém sekvenování genomové DNA *Z. rouxii* a tří dalších druhů kvasinek, na kterých se autorka této práce podílela jako člen konsorcia Génolevures 3 (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>).

Výsledková a diskuzní část dizertační práce je prezentována ve formě šesti prací, které již byly publikovány nebo byly přijaty do tisku, jednoho rukopisu, který byl odeslán k recenznímu řízení, a dále dvou kapitol obsahujících dosud nezveřejněné výsledky a jejich diskuzi (rukopisy v přípravě).

## 2. Současný stav problematiky

### 2.1. Kvasinky ve stresových podmínkách

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy zvládají několik mikrometrů, a jako takové nemohou uniknout změnám prostředí, ve kterém se nacházejí, nýbrž musí být schopny nepříznivé (stresové) podmínky přežít, a pokud možno se ně adaptovat. Takovými stresovými podmínkami mohou být například změny teploty, vlhkosti, osmolarity, pH, přítomnost reaktivních oxidantů nebo těžkých kovů, nedostatek živin. V kvasinkách se v průběhu evoluce vyvinula řada specifických i obecných signálních drah vedoucích ke změnám enzymových aktivit a genové exprese, které jim přežití a adaptaci umožňují. Stresové podmínky tak indukují molekulární mechanismy, při nichž dochází k úpravám metabolismu a ostatních buněčných procesů. Molekulární odpověď buňky spočívá nejen v odstranění případného poškození způsobeného nepříznivými podmínkami, ale zahrnuje i vybudování jisté tolerance k určitému stresovému podnětu (adaptace jako účinné obraně před dalším poškozením; Hohmann, 2002; Mager a Siderius, 2002).

Velmi častým případem stresové změny podmínek prostředí je změna v osmotickém tlaku působícím na povrch kvasinkové buňky. Přirozeným životním prostředím jsou kvasinkám rostliny a jejich šťávy s vysokým podílem cukrů, sladkovodní nebo mořská voda. Osmotický stres je tedy obvykle navozen vysokou koncentrací cukrů nebo solí (NaCl, KCl; Hohmann a Mager, 1997). Zvýšená koncentrace osmoticky aktivních látek má za následek snížení aktivity vody, která je definována jako chemický potenciál volné vody v roztoku. Nízká aktivita vody v prostředí limituje růst buněk, kterýžto fakt je již po století využíván například pro konzervaci ovoce v suché formě či v přítomnosti vysoké koncentrace cukrů (marmelády). Vnitrobuněčná aktivita vody určuje, jak vysoký je tlak působící na buněčný povrch, a ovlivňuje tak tvar buněk, jejich velikost a schopnost expanze povrchových struktur buňky čili růst. Určitý stálý vnitrobuněčný obsah vody je též nezbytný pro správnou funkci enzymů. Pokud by buňka nebyla schopna obsah vody regulovat a ocitla by se v prostředí s nízkou vodní aktivitou (tzv. hyperosmotický šok), nastal by po koncentračním spádu únik vody z buňky a došlo ke smrštění buňky, snížený buněčný tlak by neumožňoval růst a nedostatek vody by vedl k selhání enzymatických procesů. V opačném případě, pokud by se buňka ocitla v prostředí s příliš vysokou vodní aktivitou, nastal by vtok vody do buňky, buněčný tlak by

příliš vzrostl, a došlo by k prasknutí buněčného obalu a smrti buňky (tzv. hypoosmotický šok; Hohmann a Mager, 1997; Hohmann, 2002; Mager a Siderius, 2002).

Schopnost kvasinkových buněk přizpůsobit buněčné procesy změnám aktivity vody v prostředí, tj. změnám vnějšímu osmotickému tlaku, se nazývá osmotolerance.

### **2.1.1. Osmotolerance kvasinek**

Jelikož se tato dizertační práce týká kvasinky studované hlavně pro svou schopnost tolerance k vysoké osmolaritě prostředí, bude se tato kapitola zabývat odpovědí kvasinkové buňky na hyperosmotický šok, a nikoli na šok hypoosmotický. Nejlépe je odpověď buňky na hyperosmotický šok prostudována u modelové kvasinky *S. cerevisiae*. Níže uvedené mechanismy tak byly, není-li zmíněno jinak, popsány právě v této kvasince.

Při hyperosmotickém šoku v důsledku snížené vodní aktivity fyzikálně-mechanické síly bezprostředně způsobí, že buňka rychle ztrácí vodu, cytoplasma se zahušťuje, zmenšuje se buněčný objem a vnitrobuněčný tlak. Dochází k disociaci proteinů vážících se na chromatin (Proft a Struhl, 2004) a v závislosti na míře hyperosmotického šoku může dojít až ke kolapsu cytoskeletu a depolarizaci aktinových vláken. Tato náhlá změna vodní aktivity spouští v rámci sekund obranné procesy zajišťující přežití buňky, tzv. primární odpověď na stres. V druhé fázi buněčné odpovědi, tzv. osmo adaptační, dochází k ustavení tolerance k novým podmínkám (Hohmann a Mager, 1997; Mager a Siderius, 2002).

Prvotní obranný mechanismus umožňující přežití hyperosmotického šoku zajišťuje vakuola. Z té se po koncentračním gradientu uvolňuje voda do cytoplasmy, zřejmě v součinnosti s  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportním proteinem Nhx1 (viz kap. 2.1.3.2.), čímž dochází k částečné kompenzaci ztráty vody způsobené šokem (Mager a Siderius, 2002; Nass a Rao, 1999). Součástí primární odpovědi buňky na hyperosmotický šok je dále uzavření akvaglyceroporinového kanálu Fps1 (Hohmann, 2002; Pettersson *et al.*, 2005). Mechanismus regulace funkce Fps1p není dosud objasněn, soudí se, že sám funguje jako osmosenzor. Jeho prostřednictvím (pokud je otevřen) může z buňky unikat po koncentračním gradientu glycerol. Zavřením akvaglyceroporinového kanálu tak buňka okamžitě zamezuje úniku glycerolu. Glycerol je hlavní osmoregulační látkou kvasinek; jeho akumulací buňka zvyšuje vnitrobuněčnou osmolaritu (aniž by negativně ovlivňovala funkci enzymů), a umožní tak návrat ztracené vnitrobuněčné vody zpět a znovunastolení potřebného vnitrobuněčného tlaku a

enzymatických procesů. V primární fázi odpovědi na hyperosmotický šok buňka zamezí úniku glycerolu již přítomného v buňce, a v následující osmo adaptační fázi si obsah glycerolu akumuluje prostřednictvím syntézy *de novo*. Kromě glycerolu mohou být jako osmoregulační látky kvasinkami využívány též ostatní cukerné alkoholy, např. arabitol, mannitol nebo erythritol (van Eck *et al.*, 1993; Yancey *et al.*, 1982), minoritně též trehalosa - její akumulaci však kvasinky uplatňují spíše při jiných druzích stresu než je stres osmotický (např. tepelný nebo způsobující zmrznutí či vysušení buňky; Arguelles, 2000; Hino *et al.*, 1990).

U kvasinky *S. cerevisiae* existuje signální dráha vedoucí od senzorů zvýšené osmolarity prostředí ke genům regulujícím obsah glycerolu v buňce, HOG (high osmolarity glycerol pathway), která je aktivována v primární fázi odpovědi buňky na hyperosmotický stres (Hohmann, 2002; Mager a Siderius, 2002). Tato dráha přenáší signál od osmosenzorů v buněčném povrchu do jádra, kde aktivuje geny účastnící se syntézy glycerolu. Procesy vyvolané aktivací signální dráhy HOG bývají již řazeny do pozdější, osmo adaptační fáze odpovědi (Hohmann, 2002). Molekulární mechanismy pro bezprostřední přežití hyperosmotického šoku a pro následnou adaptaci na vysokou osmolaritu se každopádně zčásti překrývají, neboť buňky adaptované na mírně zvýšenou osmolaritu prostředí přežívají osmotický šok lépe než neadaptované buňky (Hohmann, 2002).

Součástí signální dráhy HOG jsou senzory Sln1p a Sho1p, které buňka obsahuje na svém povrchu. Soudí se, že se nejedná přímo o receptory detekující zvýšenou osmolaritu prostředí, nýbrž o senzory aktivované fyzikálními stimuly způsobenými změnou vlastností buněčné membrány v reakci na hyperosmotický stres či oddálením plasmatické membrány od buněčné stěny v důsledku smršťování buněčného objemu (Hao *et al.*, 2007; Hayashi a Maeda, 2006; Hohmann, 2002). Sln1p a Sho1p představují začátky dvou větví signální dráhy HOG, které aktivují kaskádu mitogenně aktivovaných proteinkinas, tzv. MAPK. Centrální modul MAPK dráhy HOG tvoří kiny Ste11p, Pbs2p a Hog1p. Aktivovaná kinasa Hog1p se přesunuje do jádra, kde aktivuje několik transkripčních faktorů (např. Msn2p/Msn4p, Sko1p/Acr1p, Smp1p, Sgd1p, Msn1p, Hot1p; Hohmann, 2002; Krantz *et al.*, 2006). Hog1p dále operuje i v cytosolu, regulujíc fosforylací aktivitu proteinů, např. Rck2p, což je kinasa regulující translační mechanismus buňky (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Swaminathan *et al.*, 2006), nebo transportních proteinů Nha1p a Tok1p, zajišťujících iontovou homeostázi (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2006; Proft a Struhl, 2004).

Transkripční faktory aktivované Hog1p regulují expresi různých genů, mezi nimi genu *GPD1*. *GPD1* kóduje glycerol-3-fosfát-dehydrogenasu, což je enzym umožňující vznik glycerolu z dihydroxyacetonfosfátu. Indukcí exprese *GPD1* se tak zvyšuje obsah glycerolu v buňce. Glycerol je nicméně velmi malá molekula a může difuzí procházet přes plasmatickou membránu a stěnu buňky, i když tento průnik je omezen vlastnostmi membrány (Hohmann, 2002). Jakkoli zavřením kanálu Fps1p za hyperosmotického šoku dochází k omezení úniku glycerolu ven z buňky, buňka nově syntetizovaný glycerol po koncentračním spádu nadále ztrácí. V *S. cerevisiae* byl identifikován protein, který je schopen aktivně transportovat uniknuvší glycerol zpět do buňky. Jedná se o cukerný přenašeč Stl1p, jehož exprese je indukována osmotickým stresem a dráhou HOG (a také při růstu na nefermentovatelném zdroji uhlíku či při tzv. diauxickém posunu růstu při vyčerpání glukosy v růstovém médiu; Ferreira *et al.*, 2005; Rep *et al.*, 2001). Stl1p do buňky transportuje glycerol současně s protony. Proteinové produkty genů kódující O-acyltransferasy asociované s plasmatickou membránou Gup1p a Gup2p byly též původně označovány za přenašeče glycerolu symportem s protony (Holst *et al.*, 2000); tato jejich funkce se však nepotvrdila (Neves *et al.*, 2004).

Výsledkem aktivace dráhy HOG je tedy zvýšený obsah glycerolu v buňce (Alonso-Monge *et al.* 2001; Hohmann a Mager 1997). Akumulace glycerolu vede k vtoku vody do buňky, ta zvyšuje svůj objem, až dosáhne velikosti jen o málo menší než před hyperosmotickým šokem. Je opraven cytoskelet a repolarizována aktinová vlákna (Bettinger *et al.*, 2007). Po dosažení kritického objemu je obnoven růst a buňka se může začít dělit (Mager a Siderius, 2002). Odpověď buňky na osmotický šok dále zahrnuje i přestavění buněčné stěny (viz kap. 2.1.2.).

Odpověď buňky na hyperosmotický stres se částečně překrývá také s odpovědí na ostatní typy stresů, tzv. obecnou odpovědí na stres (general stress response) nebo na oxidativní stres (Bilsland *et al.*, 2004). Mediátory obecné odpovědi jsou transkripční faktory Msn2p a Msn4p, substráty kinasy Hog1p. Za normálních podmínek jsou tyto faktory lokalizovány v cytoplasmě, za stresových podmínek se přesunují do jádra, kde se váží na promotory obsahující ve své sekvenci specifický úsek STRE (stress response element), a indukují tak expresi genů kontrolovaných těmito promotory, což má za následek razantní změnu transkripčního profilu (Mager a Siderius, 2002).

Kromě signální dráhy HOG byla v rámci odpovědi buňky na osmotický stres detekována i zvýšená aktivita dráhy proteinkinasy A (Hohmann, 2002). Proteinkinasa A např. reguluje lokalizaci Msn2p/Msn4p nebo expresi genu *ENA1*, kódujícího sodnou ATPasu plasmatické membrány, která je též aktivována signální dráhou HOG a některými dalšími signálními dráhami - TOR, Rim101/Nrg1 nebo calcineurinu (Marquez a Serrano, 1996; Platara *et al.*, 2006). Signální dráha proteinkinasy A je mediátorem odpovědi buňky na nejrůznější typy stresů, účastní se obecné odpovědi na stres. Není tedy jisté, zda tato dráha reaguje přímo na osmotický stres. Mechanismus, jakým je aktivita protein kinasy A regulována, dosud není znám.

Pokud je osmotický šok způsoben ionty solí (NaCl, KCl), ty kromě osmotického působení navíc narušují iontovou homeostázi, v případě sodných kationtů se přidává ještě toxický efekt. Ionty  $\text{Na}^+$  totiž inhibují funkci některých enzymů – blokují jejich vazebná místa pro  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  nebo  $\text{Ca}^{2+}$ . Buňka se tedy snaží snižovat koncentraci  $\text{Na}^+$  v cytosolu, a to buď jejich sekvestrací do vakuoly nebo aktivním vypuzováním z buněk. V *S. cerevisiae* byly identifikovány dva systémy pro transport iontů  $\text{Na}^+$  z buněk. Je to jednak ATPasa plasmatické membrány kódovaná genem *ENA*, která vypuzuje ionty  $\text{Na}^+$  ven z buňky za využití energie uvolněné přeměnou ATP na ADP. V genomu většiny kmenů *S. cerevisiae* se nachází několik téměř identických genů *ENA*, přičemž jednotlivé geny *ENA* se liší mírou exprese (Garcia-deblas *et al.*, 1993). Jak je uvedeno výše, exprese genu *ENA1* je indukována signální dráhou HOG a některými dalšími signálními dráhami (Marquez a Serrano, 1996; Platara *et al.*, 2006). Druhým typem systémů jsou  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportéry kódované geny *NHA1* a *NHX1*, které pumpují ven z cytoplasmy ionty  $\text{Na}^+$  výměnou za protony (Nass *et al.*, 1997; Prior *et al.*, 1996). Pojednává o nich blíže kapitola 2.1.3. Oba typy systémů se účastní též regulace homeostáze draselných kationtů.

Popsané mechanismy odpovědi buňky na hyperosmotický šok se patrně odehrávají (a obdobné geny a signální dráhy existují) i v dalších druzích kvasinek. Rozsáhlá srovnávací analýza odhalila přítomnost homologů genů signální dráhy HOG v dalších dvaceti druzích taxonu *Fungi* (Krantz *et al.*, 2006), v řadě z nich již byly tyto geny a jejich produkty studovány podrobněji (např. Bansal a Mondal, 2000; Hernandez-Lopez *et al.*, 2006; Iwaki *et al.*, 1999; Kinclová *et al.*, 2001a; Lenassi *et al.*, 2007). Homology genu *FPS1* byly již identifikovány u devíti kvasinkových druhů (Pettersson *et al.*, 2005), z nich *FPS1* *Z. rouxii* byl



funkčně analyzován (Tang *et al.*, 2005). U několika druhů kvasinek byla též zjištěna schopnost si glycerol uniknuvší difuzí transportovat zpět do buňky, tj. přítomnost proteinu s podobnou funkcí jako má St11p *S. cerevisiae* (Lages *et al.*, 1999): u *Debaryomyces hansenii* a *Z. rouxii* byl prokázán aktivní transport glycerolu, který se pravděpodobně děje symportem se sodnými ionty (Lucas *et al.*, 1990; van Zyl *et al.*, 1990), u kvasinky *Pichia sorbitophila* se nachází systém přenášející glycerol poháněný gradientem protonů vytvořeným H<sup>+</sup>-ATPasou plasmatické membrány (Oliveira *et al.*, 1996).

Modelová kvasinka *S. cerevisiae* se řadí mezi druhy osmosenzitivní; většina kmenů *S. cerevisiae* totiž není schopna růst při vyšší koncentraci NaCl než 1,7 M (10%;  $a_w = 0,96$ ; Hohmann a Mager, 1997). Mezi osmotolerantní kvasinkové druhy se řadí ty, které jsou schopné přežít větší než 2 M (12%) koncentraci NaCl a 2,8 M (50%) koncentraci glukosy (Lages *et al.*, 1999). Nejvýraznějšími zástupci osmotolerantních druhů jsou kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*, dále rod *Pichia*, *Candida* nebo druh *D. hansenii*. Většina z těchto druhů kvasinek je schopná tolerovat relativně nižší vodní aktivitu prostředí (až  $a_w = 0,62$ ) zřejmě díky tomu, že jsou schopny vnitrobuněčně akumulovat glycerol do vysoké koncentrace. U kvasinky *D. hansenii* bylo zjištěno halotolerantní chování odlišné od *S. cerevisiae* - metabolické systémy *D. hansenii* jsou rezistentní k vysokým vnitrobuněčným koncentracím iontu Na<sup>+</sup> (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2004), přičemž byl pozorován i pozitivní efekt sodných kationtů na růst *D. hansenii* (Almagro *et al.*, 2000), díky čemuž je někdy chování této kvasinky označováno jako halofilní (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2004; Prista *et al.*, 1997).

Studiu vysoce osmotolerantního druhu *Z. rouxii* je věnována tato dizertační práce.

### **2.1.2. Buněčná stěna a osmotolerance**

Buněčná stěna kvasinek je dynamická struktura. Tvoří ji čtyři typy makromolekul spojených navzájem kovalentními vazbami:  $\beta$ -1,3-glukan,  $\beta$ -1,6-glukan, chitin (polymer N-acetyl-D-glucosaminu) a mannanproteiny (proteiny s bočními řetězci mannosylových zbytků, spojených  $\alpha$ -1,2 a  $\alpha$ -1,3 vazbami, z nichž některé jsou v membráně ukotveny tzv. glykosylphosphatidylinositolovou kotvou). Stěna je uspořádána do dvou vrstev: vnitřní vrstva, tvořená polysacharidy (z nich hlavně  $\beta$ -1,3-glukanem), funguje jako jakési lešení pro vrstvu vnější, ochrannou, tvořenou mannanproteiny, jejichž dlouhé mannosylové řetězce zasahují do vnějšího prostředí. Tato dynamická, elastická struktura je v závislosti na potřebě adaptace na

mění se podmínky prostředí nebo reakce na různé vývojové programy vysoce flexibilní co se týče složení i struktury dané provázaností vazeb mezi polysacharidovými řetězci (Klis *et al.*, 2006). Buněčná stěna tak reaguje například i na vystavení buňky hyperosmotickému šoku. Byla zjištěna provázanost signální dráhy HOG s dalšími MAPK signálními dráhami ovlivňujícími vlastnosti buněčné stěny (dráhou protein kinasy C, tj. dráhou integrity buněčné stěny PKC, a signální dráhou sterilního vegetativního růstu SVG; Mager a Siderius, 2002).

Signální dráha PKC je v *S. cerevisiae* aktivována v případě destabilizace buněčné stěny (Gustin *et al.*, 1998). Signál je přenášen od sensorů přítomných v plasmatické membráně kaskádou MAP kinas do jádra, kde dochází k aktivaci transkripčních faktorů (např. Swi4p/Swi6p, Rlm1p) regulujících expresi genů, jejichž translační produkty se účastní tvorby buněčné stěny nebo regulují buněčný cyklus (Mager a Siderius, 2002). Tato signální dráha je přechodně aktivována hyperosmotickým šokem (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2005; Wojda *et al.*, 2003), přičemž její aktivace vyžaduje předchozí aktivaci dráhy HOG. Zvýšení vnitrobuněčné koncentrace glycerolu způsobené aktivní dráhou HOG vede totiž ke změně vnitrobuněčného tlaku, která je detekována senzory signální dráhy PKC. Dochází tak k přestavění buněčné stěny v odpovědi na porušení osmotické rovnováhy. Signální dráha PKC se podílí též na buněčné odpovědi na hypoosmotický či tepelný stres (Alonso-Monge *et al.*, 2001; Mager a Siderius, 2002).

Signální dráha vegetativního růstu SVG operuje za normálního vegetativního růstu a v případě absence funkční PKC (Gustin *et al.*, 1998; Lee a Elion, 1999). Bylo zjištěno, že také k její aktivaci dochází za hyperosmotického stresu (Alonso-Monge *et al.*, 2001; Mager a Siderius, 2002). Důležitou roli při této aktivaci hraje kinasa Ste11p, která je společná pro dráhu HOG i dráhu SVG. Jelikož signální modul dráhy SVG zahrnující MAP kinasy Ste11p, Ste7p a Kss1p je totožný s MAPK modulem dráhy filamentárního růstu (FG), je obtížné rozlišit mezi těmito signálními dráhami, a některé práce tak udávají, že hyperosmotický stres aktivuje též dráhu filamentárního růstu, která zajišťuje adaptivní změny ve složení a struktuře buněčné stěny v reakci na limitovanou dostupnost živin (operuje tedy za jiných podmínek než dráha SVG; Yang *et al.*, 2007).

Hog1p se účastní též regulace biosyntézy  $\beta$ -glukanu (Jiang *et al.*, 1995). Bylo prokázáno, že mutantní alely genů dráhy HOG způsobily zvýšenou odolnost buňky k látce calcofluor white způsobující poškození buněčné stěny (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000). Tentýž

fenotyp vykazovala zvýšená exprese genu *HOG1* kvasinek *S. cerevisiae* a *Candida albicans* v mutantu *hog1Δ S. cerevisiae* (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Mutanti *S. cerevisiae hog1Δ* jsou též citliví k Zymolyase, což je směs enzymů narušujících buněčnou stěnu (Alonso-Monge *et al.*, 2001).

Tato pozorování naznačují, že signální dráha HOG se v odpovědi *S. cerevisiae* na hyperosmotický stres spolu s dráhami PKC a SVG/FG účastní regulace složení či struktury buněčné stěny. Provázání signálních drah HOG a PKC bylo spolu se signální dráhou  $Ca^{2+}$ /calcineurinu regulují biosyntézu chitinu popsáno i u kvasinky *C. albicans* (Munro *et al.*, 2007). U kvasinky *D. hansenii* byla zjištěna role buněčné stěny pro předání signálu o zvýšeném osmotickém tlaku prostředí dál do buňky - exprese *DhGPD1* za hyperosmotického stresu, a tedy i akumulace glycerolu, nebyla zvýšena v protoplastech (tj. v buňkách zbavených buněčné stěny) do takové míry jako v neporušených buňkách (Thome, 2007).

### 2.1.3. $Na^+/H^+$ -antiportní systémy

Pro optimální fungování kvasinkové buňky je velmi důležitá stálá vnitrobuněčná koncentrace draselných iontů ( $K^+$ ), které jsou nepostradatelné pro mnoho fyziologických procesů - např. pro regulaci objemu, vnitrobuněčného pH, syntézu proteinů, aktivaci enzymů atd. (Rodriguez-Navarro, 2000; Sychrová, 2004). Ve volné přírodě je draselný kation přítomný obvykle v nižších koncentracích, nejrozšířenější je kation sodný. Buňka se tak snadno může dostat do prostředí s vyšší koncentrací  $Na^+$ . Ionty  $Na^+$  působí jak osmoticky (snižují vnitrobuněčnou aktivitu vody), tak toxicky, když po koncentračním gradientu vstupují do buňky a blokují vazebná místa enzymů pro  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ . Kvasinka *S. cerevisiae*, aby si udržela nízkou vnitrobuněčnou koncentraci sodných iontů a optimální vnitrobuněčnou koncentraci iontů draselných, obsahuje různé transportní systémy jak v plasmatické membráně, tak v membránách organel, lišící se svou substrátovou specifitou a mechanismem transportu.  $Na^+/H^+$ -antiportní proteiny jsou příkladem systému, který je schopen z cytoplasmy vypuzovat jak sodné, tak draselné ionty výměnou za protony. V genomu *S. cerevisiae* byly identifikovány tři geny kódující  $Na^+/H^+$ -antiportní proteiny, *NHA1*, *NHX1* a *KHA1*. Funkce *NHA1* a *NHX1* byla potvrzena: protein Nha1p je přenašeč plasmatické membrány se širokou substrátovou specifitou a v této kapitole mu bude věnována největší pozornost, Nhx1p je lokalizovaný

v prevakuolárních kompartmentech. Produkt *KHAI*, který je také lokalizován vnitrobuněčně, je ze všech těchto proteinů nejméně charakterizován.

### 2.1.3.1. Protein Nha1

Gen *S. cerevisiae* *NHAI* byl izolován z genomové knihovny na základě schopnosti jím kódovaného proteinu zlepšit růst halosenzitivního kmene *S. cerevisiae* za přítomnosti vyšší koncentrace NaCl (Prior *et al.*, 1996). Protein tvoří řetězec 985 aminokyselin s krátkým hydrofilním N-koncem, dvanácti hydrofobními transmembránovými doménami a dlouhým hydrofilním C-koncem. Ten se skládá z 554 aminokyselin, tj. tvoří 56.2 % celého proteinu, a soudí se, že jeho funkce je hlavně regulační (Kinclová *et al.*, 2001b; Kinclová-Zimmermannová a Sychrová, 2006; Simon *et al.*, 2001). Protein je lokalizovaný na plasmatické membráně, jako substrát rozeznává nejméně čtyři různé kationty alkalických kovů - Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> a Rb<sup>+</sup>, a řadí se tak mezi přenašeče se širokou substrátovou specifitou (Banuelos *et al.*, 1998; Kinclová *et al.*, 2001b; Kinclová *et al.*, 2002). K výstupu kationtů z buněk využívá gradient protonů vytvářený činností H<sup>+</sup>-ATPasy Pma1p. Transport je elektrogenní, oproti výstupu jednoho iontu Na<sup>+</sup> vstupuje do buňky několik protonů (Ohgaki *et al.*, 2005). Analýza fenotypu mutantního kmene s delecemi genů kódujících Nha1p a Na<sup>+</sup>-ATPasy Ena1p potvrdila, že oba typy transportních systémů jsou nutné pro zabezpečení tolerance buněk k vysokým extracelulárním koncentracím solí. Protein Nha1p se vzhledem k závislosti své funkce na přítomnosti elektrochemického gradientu H<sup>+</sup> přes plasmatickou membránu podílí na halotoleranci buněk především v prostředích s nízkým pH a ATPasa Ena1p v prostředí s pH vyšším. Hladina exprese proteinu Nha1p nicméně zůstává konstitutivně nízká a nemění se v závislosti na změně podmínek prostředí, kdežto exprese Ena1p je indukována přítomností soli v médiu nebo vysokým pH (Banuelos *et al.*, 1998; Haro *et al.*, 1991; Platara *et al.*, 2006).

Za podmínek hyperosmotického stresu je funkce Nha1p regulována kinasou Hog1, která protein fosforyluje na jeho C-konci. Tato aktivace Nha1p předchází aktivaci genů prostřednictvím transkripčních faktorů fosforylovaných Hog1p v jádře (Proft a Struhl, 2004). Fosforylace proteinu Nha1p prostřednictvím Hog1p má za následek změnu transportní aktivity - za podmínek osmotického stresu způsobeného sorbitolem nejspíše dochází k přechodné inaktivaci Nha1p, a tak ke snížení výstupu draselných kationtů z buněk, což umožní udržet vyšší vnitrobuněčnou koncentraci iontů, a tedy přežít nepříznivé osmotické podmínky do

doby, než je buňka schopna zvýšit vnitrobuněčnou koncentraci glycerolu (Kinclová-Zimmermannová a Sychrová, 2006); existuje též studie navrhuující, že fosforylace proteinu za podmínek osmotického stresu vyvolaného NaCl zvyšuje jeho schopnost eliminovat z buňky sodné kationty (Proft a Struhl, 2004).

Kromě své funkce eliminace toxických kationtů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  z cytoplasmy hraje Nha1p důležitou roli v regulaci homeostáze draselných kationtů a v regulaci vnitrobuněčného pH. Přítomnost Nha1p v plasmatické membráně ovlivňuje aktivitu transportního systému Trk1, který je vysokoafinní přenašeč pro vstup  $\text{K}^+$  do buněk. Vzhledem ke své kapacitě transportu draselných kationtů je protein Nha1 v případě alkalizace cytoplasmy schopen využít gradientu  $\text{K}^+$  jako zdroje energie pro vstup  $\text{H}^+$  do buňky (Banuelos *et al.*, 1998; Kinclová *et al.*, 2001b). V souvislosti s funkcí regulace homeostáze draselných iontů se protein Nha1p účastní též regulace buněčného objemu a ovlivňuje membránový potenciál buněk (nadprodukce proteinu způsobuje hyperpolarizaci plasmatické membrány; Kinclová *et al.*, 2001b; Kinclová-Zimmermannová a Sychrová, 2006). Vedle těchto funkcí souvisejících s transportní aktivitou hraje též důležitou roli v regulaci buněčného cyklu - jeho nadprodukce v buňkách s nefunkčními proteiny Sit4p a Hal3p (proteiny ovlivňující průchod buněčným cyklem) překoná blok buněk v přechodu z fáze G1 do fáze S (Simon *et al.*, 2001).

Homology genu *ScNHAI* již byly identifikovány ve většině doposud sekvenovaných kvasinkových genomech a v řadě kvasinkových druhů byly alespoň částečně charakterizovány - v *Schizosaccharomyces pombe* (Jia *et al.*, 1992; Papoušková a Sychrová, 2007), *Z. rouxii* (Iwaki *et al.*, 1998; Kinclová *et al.*, 2001a; Watanabe *et al.*, 1995), *C. albicans* (Soong *et al.*, 2000), *P. sorbitophila* (Banuelos *et al.*, 2002), *Yarrowia lipolytica* (Papoušková a Sychrová, 2006), *D. hansenii* (Velková a Sychrová, 2006). Na základě analýz jejich funkce v buňkách je možno tyto antiportéry rozdělit do dvou podrodin: 1) podrodiny obsahující antiportéry se substrátovou specifitou pouze pro  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$ , jejichž role spočívá právě v eliminaci těchto toxických kationtů z buněk, a 2) podrodiny obsahující antiportéry se širokou substrátovou specifitou (tj. pro  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  a  $\text{Rb}^+$ ), které v buňce kromě eliminace toxických kationtů zastávají i další funkce jako jsou regulace buněčného objemu, homeostáze draselných kationtů a pH (Kinclová *et al.*, 2002; Sychrová, 2004). U dvou druhů, *Y. lipolytica* (Papoušková a Sychrová, 2006) a *S. pombe* (Papoušková a Sychrová, 2007), byla zjištěna přítomnost dvou antiportérních proteinů typu Nha1, z nichž každý spadá do jiné podrodiny. Homology *ScNha1p*

byly nalezeny i v lidském genomu, dosud však nebyla studována jejich exprese, ani funkce kódovaných proteinů (Brett *et al.*, 2005).

#### **2.1.3.2. Protein Nhx1**

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportní protein Nhx1 kvasinky *S. cerevisiae* se nachází v prevakuolárních kompartmentech, které jsou ekvivalentní živočišným pozdním endosomům, a na eliminaci kationtů z cytoplasmy se podílí jejich sekvestrací do vakuoly (Nass *et al.*, 1997; Nass a Rao, 1998). Jeho substráty jsou jak sodné, tak draselné kationty (Brett *et al.*, 2005). Transportní aktivita proteinu také zřejmě hraje roli při odpovědi buněk na hyperosmotický šok. Protein Nhx1 pravděpodobně za hyperosmotického šoku transportuje z vakuoly kationty, zvyšuje tak koncentraci osmoticky aktivních látek v cytoplasmě, a tím uvolňuje z vakuoly i vodu (Nass a Rao, 1999). Svou činností protein ovlivňuje pH uvnitř vakuoly i v cytoplasmě a díky svému vlivu na pH uvnitř endosomálních váček působí na jejich správný pohyb v buňce, a tím i na lokalizaci vakuolárních proteinů (Ali *et al.*, 2004; Bowers *et al.*, 2000; Brett *et al.*, 2005).

Homology *ScNHX1* byly nalezeny také u hlístic (Nehrke a Melvin, 2002), hmyzu (Pullikuth *et al.*, 2006), rostlin a savců. V savčích buňkách bylo zatím identifikováno takových genů celkem 9, jejichž proteinové produkty se nacházejí jak v plasmatické membráně, tak v membránách vnitrobuněčných (Brett *et al.*, 2005; Orłowski a Grinstein, 2004). Taktéž rostlinné homology Nhx1p byly nalezeny jak v membráně plasmatické (Shi *et al.*, 2000), tak v membráně tonoplastu (Blumwald, 2000). Heterologní exprese rostlinných Nhx často komplementuje fenotypy mutantních kmenů *S. cerevisiae* postrádajících vlastní *ScNhx1*, a bývá proto využívána k jejich charakterizaci (např. Fukuda *et al.*, 2004; Gaxiola *et al.*, 1999; Kagami a Suzuki, 2005; Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2004; Mohsen *et al.*, 2007).

#### **2.1.3.2. Protein Kha1**

Protein Kha1 *S. cerevisiae* byl nejprve popsán jako  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -transportní protein plasmatické membrány (Ramirez *et al.*, 1998). Tato jeho funkce ani lokalizace však nebyla potvrzena. Kha1p je lokalizován v membránách Golgiho aparátu a jeho činnost je důležitá pro přežití buněk za vysokého pH (Flis *et al.*, 2005; Marešová a Sychrová, 2005). Homology Kha1p již byly nalezeny u několika různých druhů organismů (např. u bakterií, plísní, rostlin,

obožživelníků, hmyzu), zatím jen některé z nich byly funkčně charakterizovány (Cellier *et al.*, 2004; Marešová a Sychrová, 2006; Sze *et al.*, 2004).

## 2.2. *Zygosaccharomyces rouxii*

Kvasinka *Z. rouxii* patří spolu s naprostou většinou známých kvasinkových druhů do třídy *Hemiascomycetes*. Vegetativně se rozmnožuje multipolárním pučením. Buňky jsou oválné nebo protáhlé, s rozměry (3,0 – 7,8) x (3,5 – 8,1)  $\mu\text{m}$ . Kolonie tvořené buňkami *Z. rouxii* jsou hladké a lesklé. Okraje jsou plné nebo slabě laločnaté. Při růstu na médiu s nízkým obsahem živin vytvářejí buňky slabě diferencované pseudohyfy. Kvasinka *Z. rouxii* tvoří primitivní asky se čtyřmi kulatými nebo oválnými askosporami, které mohou být hladké nebo mírně drsné (Kurtzman a Fell, 1998). Některé kmeny ve svém jádře přirozeně obsahují plasmid pSR1, tvořený dvouřetězcovou cirkulární DNA, kterému je věnována podkapitola 2.2.2. Různé kmeny obsahují různý počet chromosomů - od šesti (de Jonge *et al.*, 1986) až po devět (Johnston *et al.*, 1989). Typový kmen *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> jich obsahuje sedm (Sychrová *et al.*, 2000a).

Kvasinka *Z. rouxii* je podobná a blíže příbuzná modelové kvasince *S. cerevisiae*, v minulosti byla dokonce nazývána *Saccharomyces rouxii*. Vlastností, kterou se od *S. cerevisiae* (a stejně tak od většiny ostatních druhů kvasinek) výrazně liší, je její vysoká osmotolerance. Je schopna přežívat v prostředí s koncentrací NaCl až 3,4 M (cca 20%) a glukosy více než 5 M (90 %; Barnett *et al.*, 1990; Hosono, 1992; Martorell *et al.*, 2007), kdežto například většina laboratorních kmenů *S. cerevisiae* není schopna tolerovat vyšší než 1,7 M (10%) NaCl (Hohmann a Mager, 1997). Vzhledem k této své vysoké osmotoleranci je kvasinka *Z. rouxii* častou kontaminací potravinových produktů jako jsou různé šťávy, omáčky, džemy nebo salátové zálivky, také se ale používá při výrobě tradičních slaných japonských pokrmů – sójové omáčky (které dodává specifickou chuť produkcí vyšších alkoholů při fermentaci) a koncentrované slané kořenící směsi zvané miso (Arnold, 1974; Martorell *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2000). Výskyt kvasinky *Z. rouxii* jako časté kontaminace potravinových produktů je také dán její tolerancí k vysokým koncentracím slabých kyselin, které se přidávají do potravin jako konzervační prostředek, a vysokou schopností fermentovat glukosu (Martorell *et al.*, 2007). Jako hlavní osmoregulační látku *Z. rouxii* akumuluje glycerol a také D-arabitol (Moran a Witter, 1979). Jakkoli byla provedena již řada fyziologických studií zabývajících se

(nejen) vysokou osmotolerancí *Z. rouxii* (Jansen *et al.*, 2003; Kurtzman a Fell, 1998; Martorell *et al.*, 2007; van Zyl *et al.*, 1990), podstata této jedinečné vlastnosti zůstává dosud neznámá. Soudí se, že je zajištěna specifickými geny. Analýza transkripčního profilu kvasinky *Z. rouxii* při růstu za stresu způsobeného NaCl prostřednictvím hybridizace cDNA s membránami GeneFilters<sup>®</sup> obsahujícími sekvence všech otevřených čtecích rámců *S. cerevisiae* odhalila 155 genů, jejichž exprese se přítomností solného stresu zvýšila, z toho jich 38 vykazovalo jiný trend změny exprese než jejich homology *S. cerevisiae* (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2002). Na vysoké osmotoleranci by se např. mohl podílet systém aktivně do buňky transportující glycerol - aktivita takového transportního systému, specifického pro glycerol a operujícího v přítomnosti stresu způsobeného NaCl, byla v *Z. rouxii* již detekována, protein ani příslušný gen však zatím nebyly izolovány (van Zyl *et al.*, 1990). V souvislosti s osmotolerancí *Z. rouxii* byl též studován vliv vysokých koncentrací NaCl na buněčný povrch a bylo zjištěno, že při solném stresu dochází k redukci obsahu chitinu v buněčné stěně (Iwata, 1996) a ke snížení fluidity buněčné membrány (Hosono, 1992).

Mezi nejčastěji studované kmeny *Z. rouxii* patří typový kmen CBS 732 (jinak též ATCC 2623) a ATCC 42981. Kmen CBS 732<sup>T</sup> byl izolován z vinného moštu, kmen ATCC 42981 z tradiční japonské slané kořenící směsi miso. Kompletní sekvence genomu kmene CBS 732<sup>T</sup> bude v brzké době veřejně přístupná (projekt Génolevures 3, viz kap. 2.4.). Dosud bylo charakterizováno jen několik genů *Z. rouxii* a jejich proteinových produktů, a to hlavně v rámci studia osmotolerance. Žádný z nich nebyl druhově specifický, většina byla izolována a/nebo charakterizována komplementací osmosenzitivních mutací *S. cerevisiae*.

Z kmene ATCC 42981 byl izolován gen kódující Na<sup>+</sup>-ATPasu *ZrENA1*, homologní k *ENA1 S. cerevisiae* (Watanabe *et al.*, 1999). Expresa *ZrENA1* byla nezávislá na osmotickém šoku způsobeném NaCl, na rozdíl od genu *ScENA1*, jehož exprese je za těchto podmínek indukována. Na základě analýzy mutantního kmene *Z. rouxii* postrádajícího *ZrEna1p* byl zformulován předpoklad, že Na<sup>+</sup>-ATPasa *ZrEna1p* se na transportu sodných kationtů z buněk *Z. rouxii* za osmotického stresu způsobeného NaCl podílí jen minoritně, a hlavní úlohu zde hrají Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny, o kterých se blížeji zmiňuje kap. 2.2.1.

V kmene ATCC 42981 byl dále identifikován gen *ZrPMA1*, kódující H<sup>+</sup>-ATPasu plasmatické membrány (Watanabe *et al.*, 1991). *ZrPma1p* využívá energii získanou štěpením ATP k transportu protonů ven z buňky a vytváří tak na membráně buňky protonový gradient,



funguje tedy stejně jako její homolog *ScPma1p*. Aktivita *ZrPma1p* se zvyšuje při vyšší koncentraci NaCl v prostředí (Watanabe, 1991). V *Z. rouxii* byl dále identifikován gen kódující podjednotku  $\beta$  mitochondriální  $F_1$ -ATPsynthasy, *ZrATP2* (Watanabe *et al.*, 2003). Také aktivita *ZrAtp2p* vzrůstá po vystavení buněk osmotickému šoku. Je možné, že zvýšená produkce ATP mitochondriální ATPsynthasou je využívána jako energetický zdroj pro eliminaci toxických sodných kationtů z buněk - např. pro funkci  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -transportních proteinů, které využívají gradient protonů vytvářený plasmatickou  $\text{H}^+$ -ATPasou, která ke své činnosti potřebuje ATP.

Dalšími geny identifikovanými v rámci studia osmotolerance *Z. rouxii* jsou *ZrHOG1* a *ZrHOG2*, izolované ze kmene ATCC 42981 (Iwaki *et al.*, 1999). Tyto geny představují homology *ScHOG1* a kódují příslušné kinasy. Jak *ZrHog1p*, tak *ZrHog2p* jsou schopny komplementovat mutaci *hog1 S. cerevisiae*, a obě jsou také důležité pro osmotoleranci *Z. rouxii*. V kmeni CBS 732<sup>T</sup> byl identifikován jen jeden gen kódující kinasu *Hog1p*, podobnější *ZrHOG2* kmene ATCC 42981 (Kinclová *et al.*, 2001a). Stejně jako geny *HOG* kmene ATCC 42981, i *ZrHOG1* kmene CBS 732<sup>T</sup> byl schopný komplementovat mutaci *hog1 S. cerevisiae*. V *Z. rouxii* tak nejspíše existuje signální dráha obdobná signální dráze *HOG S. cerevisiae*.

Dále byly ve kmeni ATCC 42981 identifikovány geny *ZrGPD1* a *ZrGPD2*, které kódují glycerol-3-fosfát-dehydrogenasu, a *ZrGCY1* a *ZrGCY2*, kódující glycerol dehydrogenasu (Iwaki *et al.*, 2001). Fakt, že kmen ATCC 42981 v několika případech obsahuje hned dvě kopie některých genů (*HOG*, *GPD*, *GCY*, *SOD* - viz kap. 2.2.1.) je dán tím, že se pravděpodobně jedná o kmen hybridní (James *et al.*, 2005).

Geny *ZrGPD1* a *ZrGPD2* jsou homologní s genem *GPD1 S. cerevisiae*, jehož produkt se v *S. cerevisiae* účastní syntézy glycerolu a hraje klíčovou roli za podmínek osmotického šoku, kdy je jeho exprese aktivována kinasou *Hog1p* (viz kap. 2.1.1.). Jak *ZrGPD1*, tak *ZrGPD2* jsou v *Z. rouxii* exprimovány konstitutivně a silně. *ZrGPD1* byl schopen komplementovat mutaci *gpd1Δ gpd2Δ S. cerevisiae*, a soudí se proto, že geny *ZrGPD1* a *ZrGPD2* hrají důležitou roli při syntéze glycerolu i v *Z. rouxii* (Watanabe *et al.*, 2004). Geny *ZrGCY1* a *ZrGCY2* jsou homologní s genem *GCY1 S. cerevisiae*, který se v *S. cerevisiae* účastní naopak disimilace glycerolu v dráze zahrnující jako meziprodukt dihydroxyaceton. Také exprese *ScGCY1* se v *S. cerevisiae* zvyšuje za podmínek osmotického šoku, a totéž bylo pozorováno pro expresi *ZrGCY1* a *ZrGCY2* v *Z. rouxii* (Iwaki *et al.*, 2001). Součástí dráhy

disimilace glycerolu přes dihydroxyaceton je dále enzym dihydroxyaceton kinasa (v *S. cerevisiae* Dak1p), který byl identifikován též v *Z. rouxii* (ZrDak1p; Wang *et al.*, 2002). I exprese *ScDAK1* je indukována za osmotického šoku (Rep *et al.*, 2000). Soudí se, že v obou kvasinkách se za podmínek osmotického šoku proteiny syntézy glycerolu (Gpd) a disimilace glycerolu (Gcy a Dak) podílejí na regulaci obsahu glycerolu v buňce (Norbeck a Blomberg, 1997; Watanabe *et al.*, 2004). Proteiny Gcy a Dak také mohou hrát důležitou roli v metabolismu redukčních ekvivalentů (Hohmann, 2002). Při osmotickém stresu může totiž docházet k tvorbě kyslíkových radikálů, a buňka tak potřebuje zvýšit produkci NADPH pro jejich eliminaci. K produkci NADPH dochází právě např. při disimilaci glycerolu přes dihydroxyaceton. V souladu s touto hypotézou je fakt, že při osmotickém stresu vzrůstá aktivita pentosového cyklu, který je též producentem NADPH, a také skutečnost, že dráha HOG v *S. cerevisiae* je aktivována i v odpovědi na oxidativní stres (Bilsland *et al.*, 2004).

V *Z. rouxii* byl dále identifikován homolog genu *ScFPS1*, jehož produkt kóduje kanál regulující obsah glycerolu v buňce (viz kap. 2.1.1.). *ZrFPS1* komplementoval mutaci *fps1Δ* *S. cerevisiae* a v *Z. rouxii* byla prokázána jeho funkce uvolňující z buněk glycerol (a také D-arabitol) za hypoosmotických podmínek, tj. obdobná funkci *ScFps1p*.

V souvislosti se studiem halotolerance *Z. rouxii* byly dále identifikovány geny homologní k *ScTPS1* a *ScTPS2*, které se v *S. cerevisiae* účastní syntézy trehalosy, disacharidu akumulovaného kvasinkami při tepelném i solném stresu (Kwon *et al.*, 2003). V *S. cerevisiae* je exprese genů *ScTPS1* a *ScTPS2* indukována stresem, v *Z. rouxii* jsou *ZrTPS1* a *ZrTPS2* exprimovány konstitutivně a silně. Regulace syntézy trehalosy a její funkce v buňkách *Z. rouxii* tak vyžaduje další studium.

V *Z. rouxii* byly dále charakterizovány geny *ADE2* (Sychrová *et al.*, 1999), *LEU2* (Sychrová, 2001) a *HIS3* (Sychrová *et al.*, 2000b), všechny ve kmeni CBS 732<sup>T</sup>.

Výčet genů a jejich proteinových produktů charakterizovaných v *Z. rouxii* tak zůstává poměrně krátký. Žádný z dosud charakterizovaných genů *Z. rouxii* není druhově specifický. Tato poměrná neprobádanost kvasinky *Z. rouxii* z molekulárně-biologického hlediska je dána hlavně tím, že dosud neexistoval soubor nástrojů genového inženýrství pro manipulace genomu *Z. rouxii*. Vytvořit soubor technik pro genové manipulace v *Z. rouxii* bylo jedním z hlavních cílů této dizertační práce.

### 2.2.1. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny *Z. rouxii*

V různých kmenech kvasinky *Z. rouxii* byly dosud identifikovány celkem tři geny kódující Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny homologní k Nha1p *S. cerevisiae*.

Ve kmeni ATCC 429821 byly nalezeny *ZrSOD2* a *ZrSOD22* (Iwaki *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1995). Proteinové produkty těchto dvou genů si jsou velmi podobné (jsou z 81 % identické), oba mají dle predikce topologie 12 transmembránových domén. Expese jak *ZrSOD2*, tak *ZrSOD22* v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících Na<sup>+</sup>-ATPasy Ena zvýšila toleranci buněk k sodným a lithným kationtům. Expese *ZrSOD2* v buňkách *Z. rouxii* byla konstitutivní, transkripty *ZrSOD22* se naopak nepodařilo detekovat. Také pouze přerušení (disrupce) genu *ZrSOD2* mělo vliv na fenotyp *Z. rouxii*, buňky se staly citlivými k vyšším koncentracím solí, zatímco obdobná disrupce genu *ZrSOD22* se fenotypově neprojevila. *ZrSOD22* je tedy v *Z. rouxii* ATCC 42981 exprimován buď velmi slabě či není exprimován vůbec, a na toleranci buněk ke zvýšené koncentraci NaCl se podílí hlavně *ZrSOD2*. Jakkoli je expese *ZrSOD2* konstitutivní, může být jeho schopnost transportu sodných kationtů za stresu způsobeného NaCl zvýšena prostřednictvím zvýšené aktivity H<sup>+</sup>-ATPasy plasmatické membrány *ZrPma1p* vytvářející gradient protonů přes membránu a také zvýšené aktivity mitochondriální ATPsynthasy poskytující ATP potřebné pro funkci *ZrPma1p* (Watanabe *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2005; Watanabe, 1991)

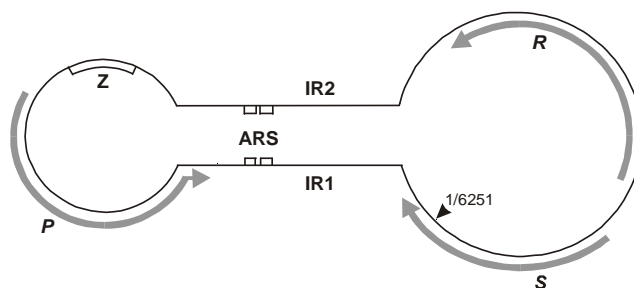
Ve kmeni CBS 732<sup>T</sup> byl nalezen pouze gen *ZrSOD2-22* (Kinclová *et al.*, 2001a), velmi podobný genu *ZrSOD2*, obsahující na svém 3' konci inzerci 45 nukleotidů homologních ke genu *ZrSOD22*. *ZrSod2-22p* je tedy z 99.7 % identický s *ZrSod2p* a z 83.9 % se *ZrSod22p*. Expese genu *ZrSOD2-22* v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících vlastní Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportér a zároveň ATPasy Ena zvýšila toleranci buněk k NaCl a LiCl v médiu, a to dokonce více než expese *ScNHA1*. Studie srovnávající transportní vlastnosti čtyř Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek *S. cerevisiae* (*NHA1*), *C. albicans* (*CNHI*), *S. pombe* (*sod2*) a *Z. rouxii* (*ZrSOD2-22*) ukázala, že *ZrSod2-22p* má transportní kapacitu pro sodné a lithné kationty a, stejně jako *sod2*, nerozeznává jako substrát kationty draselné nebo rubidné. *ScNha1p* a *CaCnh1p* naopak mají širokou substrátovou specifitu pro všechny tyto kationty (Kinclová *et al.*, 2002). Pro substrátovou specifitu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek je zřejmě důležité složení páté transmembránové domény, a to hlavně přítomnost aminokyselin s hydroxylovou skupinou, a dále prolinu nacházejícího se v *ZrSOD2-22* na pozici 145, který je sice konzervován ve všech

dosud identifikovaných  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportních proteinech kvasinek, ale jehož záměna za serin či threonin změní substrátovou specifitu tak, že *ZrSod2-22p* začne transportovat draselné kationty (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005, 2006).

### 2.2.2. Přirozený plasmid pSR1

pSR1 je cirkulární plasmid, který většina kmenů *Z. rouxii* obsahuje přirozeně ve svém jádře (Toh-e *et al.*, 1982). Svou strukturou je velmi podobný přirozenému plasmidu  $2\mu$  kvasinky *S. cerevisiae*, a stejně jako  $2\mu$  se nachází ve dvou izoformách, A a B (Araki *et al.*, 1985; Volkert *et al.*, 1989).

Struktura plasmidu je naznačena na obr. 1. Plasmid dlouhý 6251 bp tvoří dvě jedinečné sekvence (2654 bp a 1679 bp) oddělené dvěma zcela homologními obrácenými repeticemi – IR1 a IR2, dlouhými 959 bp. Plasmid obsahuje tři otevřené čtecí rámce (ORF, open reading frame) - *P*, *S*, a *R*, a regulační oblast *Z*. Na plasmidu se dále nacházejí dvě autonomně se replikující sekvence (ARS, autonomously replicating sequence) rozeznávané replikačním aparátem *Z. rouxii* i *S. cerevisiae*, a pravděpodobně dvě další ARS rozeznávané již jen *Z. rouxii* (Araki *et al.*, 1985; Araki a Oshima, 1989). Sekvenční homologie s plasmidem  $2\mu$  byla prokázána pouze v oblasti ORFu *R*.



**Obr. 1.** Plasmid pSR1 (typ A). Rovnoběžné přímkové značí obrácené repetice, šipky vyznačují otevřené čtecí rámce (v orientaci 5'→3'). Vyznačeny jsou oblasti, ve kterých se nacházejí ARS, dále oblast *Z* a místo začátku číslování sekvence.

Protein *R* kóduje rekombinasi, která katalyzuje místně specifickou rekombinaci v oblasti obrácených repetic (Araki *et al.*, 1985; Matsuzaki *et al.*, 1988). Tato rekombinace slouží pro amplifikaci plasmidu v hostiteli a probíhá pravděpodobně analogicky jako u

plasmidu 2 $\mu$  (Futcher, 1986). Proces rekombinace mezi obrácenými repeticemi plasmidu pSR1 je nezávislý na hostitelských faktorech, jelikož probíhá i v heterologním hostiteli jako je *S. cerevisiae*. Rekombinasa R je pro rekombinaci, a tedy i pomnožování plasmidu esenciální, může však být poskytnuta jiným plasmidem, který obsahuje gen *R*, nacházejícím se v buňce. Stejně tak plasmid postrádající geny *P* a *S* může využívat produktů genů *P* a *S* nacházejících se na jiném plasmidu. Čtecí rámce *P* a *S* kódují produkty podílející se na stabilitě plasmidu pSR1 v hostiteli, nicméně nejsou esenciální, stabilitu pouze výrazně zvyšují (Jearnpipatkul *et al.*, 1987a). Přesnější funkce proteinu *P* zůstává neznámá. Čtecí rámec *S* kóduje dva faktory, jednak protein a jednak RNA. Tyto zřejmě spolupracují s dosud neznámým hostitelským faktorem *Z. rouxii*, který se pak váže na oblast *Z*. Tato vazba stabilizuje pSR1 a umožní plasmidu existovat v hostitelské buňce ve vysokém počtu kopií. Plasmid pSR1 a jeho deriváty jsou v *S. cerevisiae* méně stabilní než v *Z. rouxii* z důvodu absence hostitelského faktoru. Přestože svou funkcí je oblast *Z* podobná analogické oblasti REP3 plasmidu 2 $\mu$ , strukturně je naprosto odlišná (Jearnpipatkul *et al.*, 1987a; Jearnpipatkul *et al.*, 1987b). Proteiny kódované oběma plasmidy nejsou vzájemně zastupitelné, jsou funkční vždy jen pro „svůj“ plasmid (Araki *et al.*, 1985).

Plasmid pSR1 byl dosud využit ke konstrukci několika málo plasmidů pro *Z. rouxii* (Araki *et al.*, 1985; Jearnpipatkul *et al.*, 1987a; Ushio *et al.*, 1988). Většina uvedených vlastností tohoto plasmidu byla zjištěna na základě chování těchto konstruktů v hostitelích *Z. rouxii* a *S. cerevisiae*. Využití plasmid pSR1 ke konstrukci stabilních episomálních plasmidů pro *Z. rouxii* obsahujících polylinker a různé selekční geny bylo jedním z úkolů této dizertační práce.

### **2.3. Nástroje genového inženýrství používané v kvasinkách**

Nástroji genového inženýrství se rozumí metody pro manipulaci s genovou výbavou buněk. Pro pochopení funkce genů a jimi kódovaných proteinů jsou zásadní.

Pro kvasinky takových metod existuje celá řada, a to hlavně pro modelovou kvasinku *S. cerevisiae*. Důvodem, proč se *S. cerevisiae* stala jedním z nejdůležitějších modelových eukaryotních mikroorganismů, je právě široká škála nástrojů umožňujících manipulaci s její genovou výbavou a nenáročný způsob její kultivace. Jde o mikroorganismus dostatečně rychle se množící (generační doba v exponenciální fázi růstu je cca 2 hodiny), lze s ním pracovat

mikrobiologickými metodami. Buňky se dají uchovávat po velmi dlouhou dobu, např. v médiu s osmotickým stabilizátorem glycerolem v -80 °C po několik let.

Manipulovat s genovou výbavou kvasinky *S. cerevisiae* je možno různými způsoby. Buňky kvasinky *S. cerevisiae* se vyskytují jak v haploidní, tak diploidní formě. Haploidní formy lze křížit a získávat tak diploidní kultury, jejichž sporulací získané haploidní potomstvo lze podrobovat tetradové analýze. Haploidní stav umožňuje snadnou přípravu mutantů, buď náhodnou mutagenézí pomocí UV záření či chemickými mutageny, nebo cílenou mutagenézí, např. delecí vybraného genu. Cílené delece genů jsou umožněny znalostí sekvence genomu *S. cerevisiae* a vysokou frekvencí, se kterou probíhá v této kvasince homologní rekombinace. Metodou delecí genů kvasinek se podrobněji zabývá kapitola 2.3.3. Diploidní kvasinkové buňky lze využít pro studium funkce esenciálních genů. Technika indukované fúze protoplastů umožňuje křížení nezávislé na párovacím typu, ploidii a do určité míry i na druhu kvasinky. Pomocí fúze protoplastů lze do buněk vnášet i arteficiální chromosomy (Vondrejs, 2003).

Velmi důležitou technikou je transformace, pomocí níž je možno kontrolovaně vnášet fragmenty DNA do kvasinkové buňky bez ohledu na jejich původ a udržet je v buňce příjemce – buď v rámci vektoru plasmidového typu, nebo v chromosomu recipienta. Cizorodé geny mohou být po případné vhodné úpravě *in vitro* v buňce kvasinky exprimovány. Vzhledem k tomu, že řada životních dějů probíhajících v kvasince má analogii v obdobných procesech vyšších eukaryot, je funkce genů různých organismů často studována prostřednictvím jejich heterologní exprese v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících vlastní geny analogické genům studovaným (např. Fukuda *et al.*, 2004; Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2004; Marešová a Sychrová, 2006; Pullikuth *et al.*, 2006; Sychrová, 2004). Pro tyto účely lze využít sbírek stávajících mutantů *S. cerevisiae*, které jsou velmi rozsáhlé.

Z kvasinky *S. cerevisiae* lze dále poměrně snadno izolovat jádra, mitochondrie, celkovou DNA, plasmidovou DNA, různé typy buněčné RNA a dsRNA z virových partikulí. Z mutantních kmenů lze izolovat poškozený gen a sekvenováním zjistit typ poškození (Vondrejs, 2003).

Metody genových modifikací byly již alespoň částečně rozpracovány u řady dalších druhů kvasinek, jako jsou např. *C. albicans* (Thompson *et al.*, 1998), *Candida glabrata* (Alderton *et al.*, 2006; Kosa *et al.*, 2007), *Kluyveromyces lactis* (Kooistra *et al.*, 2004), *Saccharomyces castellii* (Astromskas a Cohn, 2007), *S. pombe* (Suga a Hatakeyama, 2001),

*Schwanniomyces occidentalis* (Costaglioli *et al.*, 1994), *Hansenula polymorpha* (Faber *et al.*, 1994) a další. Genové modifikace se kromě studia procesů probíhajících v buňkách využívají i pro zlepšení vlastností průmyslových kvasinkových kmenů. Některé druhy kvasinek jsou využitelné pro speciální aplikace - např. methylotrófní kvasinky rodu *Pichia* pro vysokou produkci cizorodých proteinů, *K. lactis* nebo *Y. lipolytica* pro sekreci proteinů, příčně se dělicí kvasinka *S. pombe* pro studium eukaryotického buněčného cyklu (Romanos *et al.*, 1992; Vondrejs, 2003).

Jak již bylo zmíněno, je jednou z nejdůležitějších technik pro genové manipulace kvasinek technika přenosu DNA do buňky prostřednictvím vektorů (transformace). Fenotypový projev buňky ve srovnání s netransformovanou kontrolou pak odráží funkci studované DNA (genu). Další zásadní technikou pro studium funkce genů a jejich produktů je metoda cílené delecce genů. Umožňuje vyřadit z funkce konkrétní gen a studiem fenotypu mutanta zjistit funkci genu v buňce nebo tento mutantní kmen využít k expresi a studiu funkce jiného genu. Vytvořit soubor nástrojů genového inženýrství umožňující studium funkce genů v *Z. rouxii* prostřednictvím transformace buněk různými plasmidy a za pomoci techniky cílené delecce genů bylo jedním z cílů této dizertační práce. Následující podkapitoly se proto podrobněji věnují těmto metodám manipulace kvasinkového genomu.

### **2.3.1. Transformace kvasinkových buněk**

Termín transformace byl poprvé použit pro popis dědičných změn vyvolaných u bakterie *Pneumococcus* (Griffith, 1928 v Gietz a Woods, 2001). U této bakterie je faktorem způsobujícím virulenci polysacharidové pouzdro. Autor injektoval do peritonea myši nevirulentní kmen bakterie postrádající polysacharidový obal spolu s horkem inaktivovaným virulentním kmenem s obalem a zjistil, že nevirulentní kmen se transformoval na virulentní. Soudil, že transformačním faktorem byla složka polysacharidového pouzdra. Jako transformační faktor v případě bakterie *Pneumococcus* byla později v průlomové studii určena DNA (Avery *et al.*, 1944 v Gietz a Woods, 2001). Pojem transformace buněk se od té doby používá pro vnesení DNA do buňky následovaný změnou fenotypu.

První zmínky o transformaci kvasinky pocházejí z roku 1960 (Oppenoorth, 1960 v Gietz a Woods, 2001), dalším autorům se však nepodařilo výsledky získané v této práci zopakovat (Gietz a Woods, 2001). První úspěšná transformace houbového organismu se

datuje do roku 1973 (Mishra a Tatum, 1973). Autoři pěstovali mutantní kmen houby *Neurospora crassa* v přítomnosti DNA získané z divokého kmene téhož druhu a podařilo se jim izolovat klony vykazující fenotyp divokého kmene. O rok později bylo prokázáno, že k takové transformaci dochází i u kvasinek (Khan a Sen, 1974). Transformace se tedy dosáhlo pouhým samovolným průchodem DNA přes buněčnou stěnu a plasmatickou membránu. To je poměrně ojedinělý jev, výtěžky transformantů (tj. počty kolonií vzešlých z transformovaných buněk) byly velmi nízké. Molekula DNA je totiž poměrně velká a nabitá, a přes buněčný povrch tedy prochází jen obtížně. Pro její přesun do buňky je zapotřebí buněčný povrch rozvolnit.

Zásadním pro zefektivnění metody transformace bylo objevení možnosti přípravy kvasinkových protoplastů/sféroplastů (Eddy a Williamson, 1957; Hutchison a Hartwell, 1967 v Gietz a Woods, 2001) a způsobu jejich transformace (Hinnen *et al.*, 1978). Od té doby byla metoda transformace prostřednictvím DNA úspěšně aplikována na mnoho dalších druhů buněk, a to nejen kvasinek a bakterií, ale i rostlin a živočichů. Byla popsána celá řada transformačních metod, některé účinnější, jiné méně účinné – v závislosti na druhu transformovaného organismu a velikosti přenášené DNA (Gietz a Woods, 2001).

### **2.3.1.1. Transformace protoplastů/sféroplastů**

Protoplasty se obvykle rozumí buňky s odstraněnou buněčnou stěnou, sféroplasty pak buňky se zbytky buněčné stěny, některé práce ale termíny zaměňují. Buňky s odstraněnou či poškozenou buněčnou stěnou nejsou odolné proti změnám osmotického tlaku, musí se proto udržovat v osmoticky stabilním prostředí. Nejčastěji se pro kvasinky používá 0,8 – 1 M sorbitol. Kultivace probíhá v tzv. regeneračním selekčním agaru, což je řídké pevné médium, do kterého se buňky v podstatě zalijí. Metoda transformace protoplastů/sféroplastů spočívá v jejich inkubaci s PEG (polyethylenglykol), ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a plasmidovou DNA v osmoticky stabilizovaném roztoku. PEG funguje tak, že „lepí“ plasmidovou DNA na povrch buňky, a tak zvyšuje pravděpodobnost jejího vstupu do buněk, ionty  $\text{Ca}^{2+}$  zase rozvolňují buněčný povrch (Fincham, 1989; Gietz a Woods, 2001). K transformační směsi se obvykle přidává ve vysoké koncentraci tzv. nosičová DNA (např. komerčně dodávaná chromosomální DNA z buněk lososích *testes* nebo telecího thymu). Ta zvyšuje účinnost transformace pravděpodobně tak, že „vysytí“ přítomné deoxyribonukleasy (Gietz a Woods, 2001). Účinnost transformace



některých kmenů *S. cerevisiae* lze zvýšit také ochlazením transformační směsi na 4 °C (Johnston *et al.*, 1981). V současné době se metodou transformace protoplastů prostřednictvím PEG a  $\text{Ca}^{2+}$  dosahuje účinnosti až  $3 \times 10^7$  transformantů/ $\mu\text{g}$  pDNA (Gietz a Woods, 2001). Tato metoda je také jedinou metodou, pomocí které lze vnést do kvasinkové buňky umělé kvasinkové chromosomy (Fincham, 1989), a kterou bylo doposud možno transformovat buňky *Z. rouxii* (Ushio *et al.*, 1988).

Transformace protoplastů/sféroplastů kvasinek je metoda poměrně náročná - příprava buněk a manipulace s nimi vyžaduje neustálou osmotickou stabilizaci a hrozí zvýšená možnost kontaminací. Zároveň může působením PEG docházet k fúzi buněk, což vede k polyploidii (Gietz a Woods, 2001). Proto byly vyvinuty metody umožňující transformaci buněk s nepoškozenou buněčnou stěnou. Mezi nejčastěji používané metody patří transformace prostřednictvím PEG a iontů  $\text{Li}^+$ , a hlavně elektroporace.

### **2.3.1.2. Transformace buněk prostřednictvím PEG a iontů $\text{Li}^+$**

V první práci popisující tuto metodu autoři na buňky nejprve působili kationty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  nebo  $\text{Li}^+$ , a poté je inkubovali v přítomnosti PEG a plasmidové DNA. Následoval teplotní šok 42 °C (Ito *et al.*, 1983). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s kationty  $\text{Li}^+$ , účinnost transformace byla 450 transformantů/ $\mu\text{g}$  DNA. To bylo méně než se dosahuje při transformaci protoplastů, metoda transformace za použití kationtů  $\text{Li}^+$  je však rychlejší a jednodušší, buňky nemusejí být osmoticky stabilizovány, vysévány v regeneračním agaru.

Existují různé modifikace této metody - pro optimalizaci účinnosti transformace je místo teplotního šoku možné inkubovat buňky s 2-mercaptoethanolem nebo DMSO (dimethylsulfoxid), místo iontů  $\text{Li}^+$  použít ionty  $\text{Ca}^{2+}$  či transformační směs inkubovat v pufru TE (Tris-EDTA) nebo přidat nosičovou DNA. Touto metodou se v závislosti na transformovaném kmeni dosahuje výtěžků  $10^4$ - $10^6$  transformantů/ $\mu\text{g}$  DNA (Gietz a Woods, 2001; Gietz a Schiestl, 2007).

### **2.3.1.3. Transformace buněk elektroporací**

Transformace elektroporací je nejpoužívanější metodou pro transformaci kvasinek. Poprvé byla použita k transformaci myších buněk (Neumann *et al.*, 1982 v Gietz a Woods, 2001). V současné době je využívána také pro transformaci buněk živočišných, rostlinných a

je standardním postupem při transformaci buněk bakteriálních. Při transformaci kvasinkových buněk se prostřednictvím této metody dosahuje účinnosti  $10^3 - 10^6$  transformantů/ $\mu\text{g}$  DNA (Gietz a Woods, 2001).

Princip metody spočívá v tom, že na suspenzi buněk v elektroporační kyvetě působí krátkodobě elektrický pulz, který lokálně destabilizuje membránu buněk, a umožní tak vstup plasmidové DNA do buňky. Aby bylo dosaženo dostatečné účinnosti, je třeba elektrický pulz aplikovat na buňky s rozvolněnými povrchovými strukturami. Transformují se proto buňky v exponenciální fázi růstu, které se předtím, než jsou vystaveny působení elektrického pulzu, inkubují s činidlem, které jejich povrchové struktury ještě více rozvolní. Používá se např. DTT (1,4-dithiothreitol), 2-mercaptoethylamin, 2-mercaptoethanol nebo 3-mercapto-1,2-propandiol (Suga a Hatakeyama, 2001). Účinnost transformace některých druhů či kmenů kvasinek se zvýší, pokud inkubační roztok obsahuje navíc ještě ionty  $\text{Li}^+$  a/nebo pufr TE (De Backer *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1998).

Předtím, než se suspenze buněk vystaví působení elektrického pole, je ovšem třeba tyto „rozvolňovače“ buněčného povrchu z transformační směsi odstranit, jinak by docházelo ke zkratům. Buňky se proto promyjí (nejčastěji vodou), a poté resuspendují v elektroporačním roztoku. Jako elektroporační roztok se používá 1 M sorbitol (Thompson *et al.*, 1998) nebo elektroporační pufr (EB, electroporation buffer) obsahující 270 mM sacharosu (Faber *et al.*, 1994). Suspenze buněk se pak převede do elektroporační kyvety a přidá se plasmidová DNA. Po aplikaci elektrického pulzu se transformační směs obvykle zředí vodou nebo růstovým médiem a před vysetím na pevnou půdu se několik minut nechá stát při laboratorní teplotě, aby došlo k regeneraci buněk po stresu způsobeném elektrickým pulzem. Některé kmeny kvasinek však toto nevyžadují (Meilhoc *et al.*, 1990).

Účinnost transformace elektroporací se často velmi liší nejen u různých druhů, ale i kmenů stejného druhu kvasinky. Je to dáno tím, že buňky odlišného tvaru a velikosti odpovídají na působení elektrického pole odlišně. Důležitým faktorem je hustota, tloušťka a struktura buněčné stěny (Gift a Weaver, 1995; Meilhoc *et al.*, 1990). Proto takřka každý kvasinkový kmen vyžaduje jiné podmínky elektroporace. Nejkritičtějšími parametry jsou zde intenzita elektrického pole a doba trvání pulzu. Čím jsou tyto hodnoty vyšší, tím méně buněk z transformační směsi zůstává životaschopných; účinnost transformace (tj. počet transformantů/ $\mu\text{g}$  DNA) naopak stoupá. Při vysokých hodnotách napětí a doby trvání pulzu

však účinnost začne klesat - příliš mnoho buněk ztrácí životaschopnost. Pro každý druh i kmen je výhodné stanovit optimální podmínky experimentálně; např. pro některé kmeny *S. cerevisiae* je optimální elektrický pulz o intenzitě 1,74 kV/cm a době trvání 15 ms (Meilhoc *et al.*, 1990), pro některé kmeny *S. pombe* 11 kV/cm a 5 ms (Suga a Hatakeyama, 2001), pro *S. occidentalis* 2,17 kV/cm a 18 ms (Costaglioli *et al.*, 1994), pro *H. polymorpha* 7,5 kV/cm a 5 ms (Faber *et al.*, 1994), pro *C. albicans* 7,5 kV/cm a 5 ms (Thompson *et al.*, 1998) atd.

Účinnost transformace závisí také na koncentraci plasmidové DNA a buněk v elektroporační směsi. Účinnost lineárně stoupá jak se zvyšující se koncentrací buněk, tak se zvyšující se koncentrací plasmidové DNA. Při množství buněk nad  $4 \times 10^9$  však už obvykle klesá, jednotlivé buňky jsou již příliš blízko u sebe, a to vede k nestejnorodosti aplikovaného elektrického pulzu. Zároveň se projevuje saturace DNA – u množství vyššího než 100 ng se účinnost již nezvyšuje, ale ani nesnižuje (Meilhoc *et al.*, 1990). Zdá se však, že toto neplatí u všech druhů – u kvasinky *H. polymorpha* stoupá účinnost transformace až do 10  $\mu$ g přidané pDNA (Faber *et al.*, 1994).

Metoda transformace buněk elektroporací patří mezi nejjednodušší a nejučinnější. Jedním z cílů této práce bylo optimalizovat pro kvasinku *Z. rouxii* právě tuto metodu transformace jako součást souboru nástrojů genového inženýrství.

### 2.3.2. Plasmidy používané v kvasinkách

Podstatou metody transformace je to, že se do buňky vnese DNA, která je schopna se replikovat, a přenášet se tak do dalších generací. Taková DNA tedy musí být sama replikonem nebo se stát součástí buněčného replikonu. Proto se DNA do buňky vnáší prostřednictvím vektoru, plasmidu, který se buď sám v hostiteli replikuje (tzv. replikativní plasmid), nebo se integruje do chromosomu příjemce (integrativní plasmid). Kvasinkové plasmidy jsou buď cirkulární nebo lineární, většinou relativně malé, protože plasmid větší než 15 kbp se jen obtížně dostává do buněk. Pro vkládání větších fragmentů DNA (až 500 kbp) se používají tzv. umělé kvasinkové chromosomy (YAC, yeast artificial chromosomes; Vondrejs, 2003).

Replikativní cirkulární plasmidy obsahují sekvenci, která jim zajišťuje pomnožování v hostiteli. Tato sekvence se označuje jako ARS a bývá druhově specifická. Zdrojem ARS mohou být plasmidy, jejichž přirozeným hostitelem je buňka příjemce (např. plasmid 2 $\mu$  *S. cerevisiae*) – takové plasmidy mohou v buňce existovat v mnoha kopiích, označují se jako

mnohokopiové nebo episomální, YEp (yeast episomal plasmid, viz kap. 2.3.2.1.). Dalším zdrojem ARS může být DNA chromosomu. Plasmidy obsahující pouze chromosomální ARS se nazývají YRp (yeast replicative plasmid), a počet jejich kopií v buňce není regulován, ani není zajištěno jejich stabilní pomnožování v populaci hostitele. Kromě chromosomálního ARS proto nesou plasmidy obvykle ještě centromeru organismu, ve kterém se replikují, a označují se pak jako centromerové (YCp, yeast centromeric plasmid, viz kap. 2.3.2.2.). Takové plasmidy jsou v buňce přítomny v jedné až dvou kopiích a v hostiteli jsou velmi stabilní, téměř jako chromosomy (Gietz a Woods, 2001; Vondrejs, 2003).

Pro získání většího množství plasmidové DNA se využívá pomnožení plasmidů v buňkách bakterií. Plasmidy proto ve své sekvenci kromě kvasinkového replikonu obsahují ještě sekvenci *ori* umožňující jejich replikaci v *Escherichia coli*. Takové vektory schopné replikace ve dvou hostitelích se označují jako podvojně, kyvadlové nebo člunkové. Součástí plasmidů jsou dále tzv. „polylinkery“, oblasti DNA obsahující taková restriční místa, která se jinde na plasmidu nevyskytují, což umožňuje definované vkládání fragmentů DNA, a dále geny kódující selektovatelné nebo detekovatelné znaky. Ani nejúčinnější transformační techniky totiž nezajistí stoprocentní přenos DNA do všech buněk. Pro rozeznání přítomnosti plasmidu v buňce lze využít i metodu hybridizace se sondou, metody založené na selekci či detekci jsou však mnohem jednodušší (Vondrejs, 2003).

Pro selekci bakteriálních buněk obsahujících vnesenou DNA se nejčastěji používá rezistence k některému antibiotiku (nejčastěji k ampicilinu či tetracyklinu). Plasmid, kterým buňky transformujeme, obsahuje gen, jehož produkt hostiteli tuto rezistenci udělí. Jedná se tedy o tzv. pozitivní selekci (přežijí pouze transformované buňky). Další často používaný způsob je barevná detekce bakteriálních transformantů pomocí genu *lacZ* z *E. coli*.

Pro pozitivní selekci kvasinkových buněk obsahujících vnesenou DNA se většinou využívá auxotrofních vlastností mutantního kmene, který je transformován. Pokud se do kmene vnese plasmid obsahující gen, který mutaci komplementuje, jsou transformované buňky schopny růst v médiu bez auxotrofního přídatku, čímž se liší od buněk netransformovaných. Pro tento typ selekce se nejčastěji využívá kmenů s mutací v genech, jejichž produkty se účastní syntézy uracilu (*URA3*), leucinu (*LEU2*), histidinu (*HIS3*) nebo adeninu (*ADE2*). Využívají se také tzv. dominantní selekční geny, kdy je podstatou selekce transformantů jejich rezistence k nějaké toxické látce, kterou jim uděluje gen na plasmidu,

podobně jako u *E. coli*. Dominantní selekční geny mají tu výhodu, že se dají použít pro selekci transformantů u kvasinek, u kterých zatím nebyly připraveny auxotrofní mutanty, nebo u kterých je výběr auxotrofních mutantů omezený. Mezi nejčastěji využívané dominantní selekční geny patří bakteriální *kanMX*, který udělí kvasinkovým buňkám rezistenci ke geneticinu (Brown a Tuite, 1998; Fincham, 1989). Dále se používají např. gen *sat1*, jehož produkt působí rezistenci k nourseothricinu (Reuss *et al.*, 2004), gen *ble*, který umožní buňkám rezistenci k zeocinu (Alderton *et al.*, 2006), a další. Z hlediska možného využití pro dominantní selekci je též zajímavý gen *MPRI* *S. cerevisiae*, který kóduje N-acetyltransferasu detoxifikující L-azetidín-2-karboxylát (AZC), což je analog prolinu, který nahrazuje prolin v syntetizovaných proteinech a narušuje jejich funkci (Shichiri *et al.*, 2001). Pokusit se využít gen *ScMPRI* jako dominantní selekční gen pro *Z. rouxii* bylo také jedním z úkolů této dizertační práce. Jako selekční gen lze použít také cDNA kódující zymocin K1 a imunitu k tomuto „killerovému“ faktoru, pokud je zařazena za vhodný kvasinkový promotor. Transformované klony vytvářejí na podkladu buněk citlivého kmene průhledné inhibiční zóny (Vondrejs, 2003).

Pro kvasinku *Z. rouxii* byly zatím možnosti selekce transformantů omezené. Dosud existovaly jen dva auxotrofní mutantní kmeny, oba připravené UV mutagenézí: autorkou předkládané dizertační práce připravený *ura3* derivát divokého kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> (Příbylová, 2002) a kmen MA11 (*leu2*), odvozený od divokého kmene *Z. rouxii* ATCC 42981 (Ushio *et al.*, 1988). Komplementovat mutace bylo možno geny *ScURA3*, *ScLEU2* nebo *ZrLEU2*. Z dominantních selekčních genů byl zatím využit jen *kanMX* (Tang *et al.*, 2005; Ushio *et al.*, 1988).

Plasmidy plní i jiné funkce než pouhých nosičů genů. Výběrem vhodného plasmidu je možno ovlivnit počet kopií vkládaného genu (a následně množství proteinu) v buňce. Gen vložený do plasmidu episomálního se v buňce nachází ve vyšším počtu kopií, gen vložený do centromerového plasmidu v jedné, maximálně dvou. Gen lze též do plasmidů vkládat za různé promotory, které ovlivní jeho expresi. Existují promotory, které zajistí konstitutivní expresi, např. *TEF2*, *ADH1*, *CYC1*, *GPD1* (Ronicke *et al.*, 1997). Ty mohou ovlivnit i intenzitu, s jakou se bude gen v buňce přepisovat. Např. promotory *TEF2* a *GPD1* patří mezi tzv. „silné“ promotory, které způsobí, že se gen v buňce přepisuje intenzivně. Silných promotorů využívají i plasmidy určené pro sekreci proteinů. Ty za promotorem obsahují kódující

sekvenci pro signální peptid (pre-sekvenci), představující adresu pro vstup do endoplasmatického retikula (Vondrejs, 2003). Některé promotory mohou být využity pro regulovatelnou expresi genů. Exprese genů pod kontrolou promotoru *GALI* je indukována růstem transformantů *S. cerevisiae* na galaktose a inhibována na glukose, promotor *CUP1* je aktivován při růstu buněk v přítomnosti měďnatých iontů, *MET25* za absence methioninu (Labbe a Thiele, 1999; Ronicke *et al.*, 1997). Pro terminaci transkripce se využívají různé terminátory (např. genů *CYC1*, *TRP1*, *ADH1*). Pro detekci proteinových produktů genů, jejich lokalizaci, purifikaci či funkční analýzu se využívá značení proteinů prostřednictvím jejich fúze s molekulární značkou. Takovou značkou může být krátký peptid (např. FLAG nebo c-Myc), nebo celý protein, např. GFP (green fluorescent protein, zelený fluoresenční protein; Sun *et al.*, 2002). Pro účely značení existují plasmidy obsahující tyto značky, kam lze vložit vybraný gen tak, aby vznikl fúzní produkt - označený protein. Značení pomocí sekvence GFP se často používá pro určení lokalizace zkoumaného proteinu v buňce. Protein GFP pod UV zářením zeleně fluoreskuje, a je tak možno určit místo v buňce, kde se značený protein nachází (Niedenthal *et al.*, 1996). Již bylo připraveno několik variant sekvence GFP, které vydávají různou barvu fluorescence (kromě zelené i modrozelenou, žlutou nebo červenou), a je tak možno značit v buňce několik proteinů najednou (Lansford *et al.*, 2001).

Pro genové manipulace v kvasinkových buňkách se nejčastěji využívají episomální nebo centromerové plasmidy - pro klonování, konstrukci knihoven, zajištění exprese vnášených genů. Následující kapitoly se proto budou zabývat právě těmito typy plasmidů.

### 2.3.2.1. Episomální plasmidy *S. cerevisiae*

Episomální plasmidy *S. cerevisiae* obsahují jako replikon část plasmidu 2 $\mu$  vyskytujícího se přirozeně v jádře většiny kmenů *S. cerevisiae*. 2 $\mu$  je strukturně velmi podobný plasmidu pSR1 kvasinky *Z. rouxii*, o němž pojednává kapitola 2.2.2. Jeho název je odvozen od jeho konturové délky 2  $\mu$ m. Plasmid obsahuje čtyři otevřené čtecí rámce: A (*FLP*), B (*REP1*), C (*REP2*) a D (*RAF*), a oblast nutnou pro stabilní udržení plasmidu v populaci buněk REP3 (zvanou také STB, analogickou oblasti Z plasmidu pSR1). Na plasmidu se nachází ARS rozeznávaná kvasinkou *S. cerevisiae*. Nejdelší gen (*FLP*) kóduje rekombinasiu homologní ke genu *R* plasmidu pSR1. Ta při replikaci katalyzuje místně specifickou rekombinaci v oblasti obrácených repetitiv v úseku FRT, a umožňuje tak vznik plasmidových

multimerů (replikační vidlice se totiž již nepohybují proti sobě, nýbrž za sebou). Následující rekombinací je replikace zastavena a multimer je „rozstříhán“ na monomery opět za pomoci rekombinasy. Vzniká tak při jednom iniciačním kroku velké množství kopií plasmidu, což zvyšuje pravděpodobnost, že po rozdělení jádra a následné cytokinesi bude dceřinná buňka obsahovat alespoň několik kopií plasmidu (Futcher, 1986). Při replikaci zahájené v dalším buněčném cyklu se počet kopií plasmidu zase zvýší. Rovnoměrnějšímu rozdělování při segregaci napomáhají proteiny kódované geny *REP1*, *REP2* a *RAF*. Produkty Rep1 a Rep2 umožňují poměrně stejnoměrné rozdělení kopií plasmidu mezi mateřskou a dceřinnou buňkou při buněčném dělení tím, že se v koordinaci s histonem Cse4 váží na oblast REP3 nacházející se na plasmidu, čímž zřejmě mimikují centromeru (Malik, 2006). V populaci buněk je 2- $\mu$  plasmid relativně stabilní, v haploidním kmeni *S. cerevisiae* se ztrácí s frekvencí asi  $10^{-4}$ , v diploidním  $10^{-5}$  (Volkert *et al.*, 1989).

Pro konstrukci episomálních plasmidů se používá část dlouhá asi 2,5 kbp obsahující počátek replikace, část jedné z obrácených repetitivních sekvencí a oblast REP3. Tato část neobsahuje geny potřebné pro stabilní udržení plasmidu v populaci hostitele, proto kmen transformovaný takovým plasmidem musí obsahovat vlastní endogenní 2 $\mu$  (Janderová a Bendová, 1999; Vondrejs, 2003).

Episomální plasmidy se v transformantech *S. cerevisiae* nacházejí v počtu kopií od pěti do několika desítek, v závislosti na vlastnostech konkrétního plasmidu a hostitelského kmene. V populaci transformantů jsou poměrně stabilní (Romanos *et al.*, 1992; Struhl *et al.*, 1979).

V *Z. rouxii* není možno plasmidy odvozené od 2 $\mu$  využít, protože sekvence 2 $\mu$  není v buňkách *Z. rouxii* rozeznávána jako replikon, a plasmidy se v nich tím pádem nepomnožují (Araki *et al.*, 1985; Ushio *et al.*, 1988).

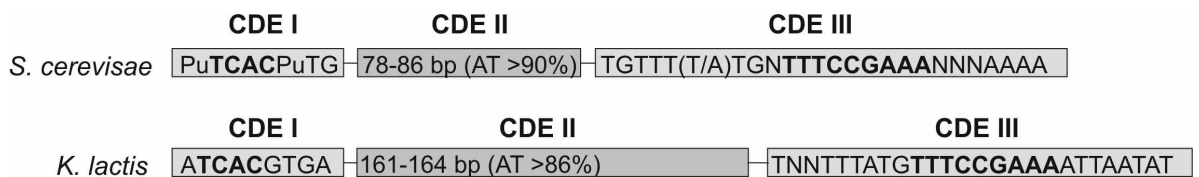
### 2.3.2.2. Centromerové plasmidy

Plasmidy obsahující chromosomální ARS a centromeru hostitele (YCp) se v populaci příjemce vyskytují v jedné, nejvýše ve dvou kopiích na buňku, a využívají se pro účely, kdy je zapotřebí v buňce exprimovat právě jednu, nejvýše dvě kopie genu. Nízký počet kopií plasmidu v buňce je dán tím, že více kopií centromerového plasmidu je pro buňku letální. Centromery na plasmidu totiž kompetují s centromerami na chromosomech o faktory účastnící se segregace (proteiny, které se na centromery váží, mikrotubuly, místo v dělicím vřeténku), a

větší množství centromerových plasmidů v buňce tak způsobuje ztrátu chromosomů při dělení (Futcher a Carbon, 1986). Díky sekvenci centromery jsou plasmidy YCp v hostiteli velmi stabilní, i když ne tak jako samotné chromosomy (Clarke a Carbon, 1980; Dani a Zakian, 1983).

Centromerové plasmidy se mohou replikovat i v jiném hostiteli, než ze kterého pochází jejich centromera; záleží na tom, zda hostitel rozezná ARS přítomnou na plasmidu jako replikon. Vzhledem k druhové specificitě centromer však heterologní hostitel nerozezná centromeru plasmidu, a ten je tak v buňkách nestabilní a není regulován počet jeho kopií (Heus *et al.*, 1993). Například centromerové plasmidy *S. cerevisiae* se v *Z. rouxii* pomnožují díky ARS funkční v obou druzích kvasinek, není však zajištěn jejich stabilní přenos do dalších generací, ani nízký počet kopií plasmidu na buňku (Ushio *et al.*, 1988).

Centromery pučících kvasinek jsou dlouhé cca 0,2 kbp, tj. ve srovnání s centromerami jiných organismů poměrně krátké (např. centromera příčně se dělicí kvasinky *S. pombe* je dlouhá přibližně 40 kbp, centromera *N. crassa* 400 kbp a lidská až 5000 kbp). Pro svou délku se kvasinkové centromery proto nazývají bodové (tzv. point centromeres). Centromera modelové kvasinky *S. cerevisiae* je tvořena třemi konzervovanými oblastmi CDE (centromere DNA element): 8 bp dlouhou oblastí CDE I, 78 - 86 bp dlouhou oblastí CDE II bohatou na páry bází AT (adenin-thymin) a 25 bp dlouhým úsekem CDE III. Obdobně je uspořádána např. i centromera kvasinky *K. lactis*, pouze její oblast CDE II je asi dvakrát delší než CDE II *S. cerevisiae* (obr. 2; Clarke, 1998).



Obr. 2. Uspořádání konsenzuálních sekvencí centromer *S. cerevisiae* a *K. lactis*. Oblasti CDE jsou znázorněny jako obdélníky, úsečky reprezentují úseky DNA je spojující. Motivy konzervované v obou kvasinkách jsou zvýrazněny tučným písmem.

Na konzervované oblasti centromer se váží proteiny a jejich komplexy, které výsledně tvoří kompozici centromera/kinetochor. Uspořádání sekvence centromery do oblastí CDE bylo



zjištěno i u *C. glabrata*, ale nikoli např. u kvasinek *D. hansenii*, *Y. lipolytica* nebo *C. albicans* (Dujon *et al.*, 2004; Sanyal *et al.*, 2004).

Vzhledem k tomu, že kvasinka *Z. rouxii* je blízce příbuzná druhům *S. cerevisiae* a *K. lactis*, lze usuzovat, že sekvence jejich centromer bude obdobná uspořádání centromer těchto dvou druhů. Centromery *Z. rouxii* zatím identifikovány nebyly, a neexistovaly tedy ani centromerové plasmidy pro *Z. rouxii*. Identifikace centromer *Z. rouxii* a jejich využití pro konstrukci plasmidů bylo jedním z cílů překládané práce.

### 2.3.3. Techniky cílené delece genů v kvasinkách

Možnost cílené delece genů v kvasinkové buňce je zásadní pro pochopení jejich funkce. V kvasince *S. cerevisiae* lze provádět delece prostřednictvím homologní rekombinace, která zde probíhá s vysokou frekvencí. Postup spočívá v přípravě konstruktů skládajícího se z úseku DNA nacházejícího se před genem určeným k deleci, selekčního genu a úseku DNA nacházejícího se za genem určeným k deleci. Tímto lineárním konstruktem je transformována buňka, ve které dojde k rekombinaci mezi homologními úseky konstruktů a chromosomu tak, že se cílový gen nahradí selekčním genem. U *S. cerevisiae* je pro cílenou rekombinaci zapotřebí, aby homologní úseky byly minimálně 35 - 45 bp dlouhé. Konstrukty, takzvané deleční kazety, je tak možno připravovat prostřednictvím polymerasové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) - selekční gen je namnožen za využití oligonukleotidů obsahujících na svém 5'-konci cca 40 bp sekvenci identickou k sekvenci nacházející se vlevo nebo vpravo od genu určeného k deleci. Nejčastěji používanými selekčními geny pro delece genů v kvasinkách jsou *kanMX* (Guldener *et al.*, 1996), *sat1* (Reuss *et al.*, 2004) nebo auxotrofní selekční geny - v případech, kdy kmen, ve kterém se uskutečňuje delece, má příslušnou auxotrofní mutaci. Kromě delece je možno stejným způsobem připravit tzv. disrupci, tj. přerušení sekvence cílového genu vložením selekčního genu.

Jelikož je v kvasinkách často třeba připravit kmen s několika delecemi (např. vyřadit z funkce celou genovou rodinu), byly vytvořeny systémy, které umožňují vyštěpení integrovaného selekčního genu z chromosomu a jeho opětovné využití pro deleci jiného genu. Princip spočívá v tom, že se na okraje selekčního genu v deleční kazetě připojí sekvence v podobě přímých repetit, mezi kterými dojde po integraci kazety do genomu k rekombinaci, která způsobí vyštěpení selekčního genu z místa delece. Selekční gen je pak možno použít ve

stejném kmeni pro delecí jiného genu. Takový postup využívá např. rekombinační systém *cre-loxP* bakteriofága  $\lambda$ . Deleční kazeta je připravena tak, že selekční gen *kanMX* obsahuje na svých okrajích 34 bp dlouhé přímé repetice *loxP* (Guldener *et al.*, 1996; obr. 3).



Obr 3. Deleční kazeta *loxP-kanMX-loxP*. Prázdné obdélníky zakončené šipkou značí úseky homologní se sekvencí nacházející se před resp. za cílovým genem určeným k delecí, černou barvou vyplněné čtverce symbolizují sekvence *loxP*, šedě zbarvený obdélník znázorňuje selekční gen *kanMX*. Upraveno podle Guldener *et al.* (1996).

Po integraci kazety *loxP-kanMX-loxP* do genomu se připravený deleční mutant transformuje episomálním plasmidem exprimujícím rekombinasi *cre*, která katalyzuje místně specifickou rekombinaci mezi místy *loxP*, čímž dojde k vyštěpení genu *kanMX* a jedné z repetice *loxP*. Na místě delecce pak zůstane jedna kopie sekvence *loxP*. Exprese genu *cre* bývá obvykle pod kontrolou regulovatelného promotoru *GAL*, buňky je tedy třeba pro expresi rekombinasy kultivovat s galaktosou jako zdrojem uhlíku. Pro další využití pro cílenou delecí prostřednictvím kazety *loxP-kanMX-loxP* je plasmid z kmene odléčen růstem transformanta za neselektivních podmínek.

Obdobně lze například využít pro konstrukci opakovatelně použitelných delečních kazet repetice *hisG* z histidinového operonu bakterie *Salmonella* (Alani *et al.*, 1987) nebo systému využívajícího rekombinasi *FLP* a místa FRT plasmidu 2 $\mu$  (Storici *et al.*, 1999).

Metoda cílené delecce genů prostřednictvím homologní rekombinace byla již využita nejenom v *S. cerevisiae*, ale i v dalších druzích kvasinek. Některé kvasinky, např. *K. lactis*, *Y. lipolytica* nebo rod *Candida* však nemají frekvenci homologní rekombinace tak vysokou jako *S. cerevisiae*, a pro cílenou delecí je zapotřebí použít deleční kazety obsahující i několik set bp dlouhé homologní úseky (Fickers *et al.*, 2003; Kooistra *et al.*, 2004; Sanglard *et al.*, 1997). Takové konstrukty pak není možno připravit pouze PCR, ale pro jejich konstrukci je zapotřebí několika kroků zahrnujících kromě PCR ještě restrikci a ligaci.

V kvasince *Z. rouxii* již byly prostřednictvím delečních kazet obsahujících dlouhé (několik set bp) úseky homologní k oblastem DNA obsahujícím cílové geny z funkce úspěšně

vyřazeny některé geny, např. *ZrSOD2* (Watanabe *et al.*, 1995) nebo *ZrHOG1* (Iwaki *et al.*, 1999); jednalo se však pouze o přerušení genů (disrupce), nikoli delece celých genů. Existuje též práce popisující deleci genu *ZrFPS1* prostřednictvím deleční kazety namnožené PCR, využívající selekčního genu *kanMX* (Tang *et al.*, 2005). Tyto práce dokládají, že frekvence homologní rekombinace v *Z. rouxii* je natolik vysoká, že ji je možno využít k cíleným delecím genů; nepředstavily však nástroj umožňující vícenásobné delece. Ani jedna z disrupcí/delecí nebyla provedena ve kmeni s genetickým pozadím CBS 732<sup>T</sup>, který je typovým kmenem *Z. rouxii*, a jehož kompletní sekvence genomu bude v brzké době veřejně přístupná. Vytvořit systém pro cílené vícenásobné delece genů v *Z. rouxii* bylo jedním z cílů této práce.

## **2.4. *Hemiascomycetes* - modelová skupina pro studium evoluce eukaryotického genomu**

Kvasinky třídy *Hemiascomycetes*, do které patří naprostá většina známých kvasinkových druhů včetně *Z. rouxii*, se od příčně se dělící kvasinky *S. pombe* evolučně oddělily asi před 350 miliony až 1000 miliony lety. Evoluční záběr této třídy je svou rozsáhlostí srovnatelný s kmenem strunatců (Dujon *et al.*, 2004; Dujon, 2005). Tento široký evoluční záběr spolu s poměrně malým a kompaktním genomem ve srovnání s ostatními eukaryoty a možností studia prostřednictvím celé škály molekulárně-biologických metod dělá z kvasinek třídy *Hemiascomycetes* skupinu ideální pro studium evoluce eukaryotického genomu. A právě studiem mechanismů působících v průběhu evoluce této třídy se zabývá mezinárodní projekt Génolevures.

### **2.4.1. Projekt Génolevures**

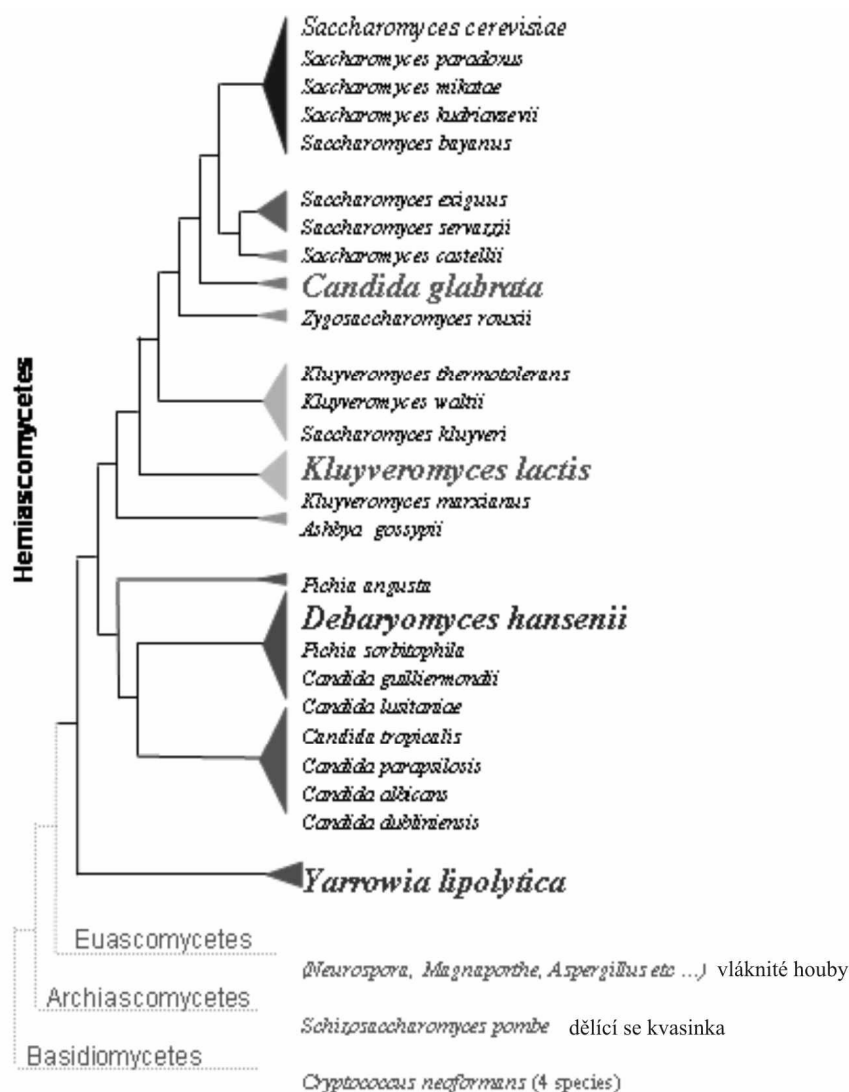
Projekt Génolevures (gène – francouzsky gen, levure – francouzsky kvasinka) byl zahájen v roce 1998 ve Francii (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>). Smyslem projektu je systematicky sekvenovat genomy příbuzných druhů kvasinek patřících do třídy *Hemiascomycetes*, a srovnáním sekvencí a strukturní a funkční analýzou genů získat informace, jež pomohou objasnit mechanismy molekulární evoluce eukaryotického genomu. Sekvenování genomů probíhá v centru Génoscope poblíž Paříže (<http://www.cns.fr>; Dujon *et*

al., 2004). Jedním z partnerů projektu je i laboratoř Génétique moléculaire, génomique et microbiologie, kde byla zčásti vypracována tato dizertační práce.

Projekt Génolevures se v současné době nachází již ve své třetí etapě. První etapa, **Génolevures 1** (Feldmann, 2000), trvala od roku 1998 do roku 2000, zúčastnilo se jí devět francouzských laboratoří a týkala se částečné sekvenace a analýzy genomů třinácti druhů kvasinek, mezi nimi i *Z. rouxii*, patřících spolu s *S. cerevisiae* do třídy *Hemiascomycetes*.

Roku 2001 byl pak zahájen tříletý projekt **Génolevures 2** (trval do roku 2004), na kterém spolupracovalo již třináct francouzských laboratoří, a který se zabýval kompletní sekvenací a analýzou genomů kvasinek *C. glabrata*, *K. lactis*, *D. hansenii* a *Y. lipolytica*, zástupců jednotlivých větví fylogenetického stromu sestaveného na základě dostupných sekvencí genomů kvasinek třídy *Hemiascomycetes* (obr. 4).

*C. glabrata* byla vybrána jako lidský patogen a protože, jakkoli *Candida*, je fylogeneticky příbuznější kvasince *S. cerevisiae* než diploidní kvasince *C. albicans*. *K. lactis* je průmyslová kvasinka, která již byla zároveň i předmětem řady genetických studií. Kvasinka *D. hansenii* byla vybrána jako zástupce halotolerantního druhu, příbuzného *C. albicans*. *Y. lipolytica*, která již také byla předmětem řady genetických studií, je ostatním druhům poměrně fylogeneticky vzdálená, zato sdílí společné vlastnosti s vláknitými houbami. Z hlediska evoluční studie byl velmi důležitý ten fakt, že tyto čtyři kvasinkové druhy mají rozdílné mechanismy pohlavního cyklu. *Y. lipolytica* má tzv. haplo-diploidní cyklus (t.j. vyskytuje se stejně často v haploidní jako v diploidní fázi), zatímco *D. hansenii* je homothallická kvasinka s pouze haploidním cyklem. Oba druhy mají pouze jeden párovací (MAT) lokus, kdežto *C. glabrata* a *K. lactis* mají MAT lokusy dva, podobně jako *S. cerevisiae*. U *C. glabrata* není znám pohlavní cyklus. *K. lactis* je heterothallická kvasinka s převážně haploidním cyklem v kontrastu k *S. cerevisiae*, která je druhem pseudo-heterothallickým, ve kterém dochází k přepínání párovacího typu. U všech čtyř druhů byl sekvenován genom haploidního kmene (Dujon *et al.*, 2004).



**Obr. 4.** Schematické znázornění fylogenetické příbuznosti některých kvasinek třídy *Hemiascomycetes*. Zvýrazněny jsou kvasinky studované v projektu Génolevures 2. Pro ilustraci je znázorněna i příbuznost s některými dalšími kvasinkami a vláknitými houbami, patřícími do jiných taxonů (upraveno dle <http://cbi.labri.fr/Genolevures>).

Rozsáhlá analýza nukleotidových a proteinových sekvencí vedla k získání velkého souboru informací o stupni zachování synteny (tj. zachování pořadí genů na chromosomu) mezi jednotlivými druhy, o genové redundanci a specifitě. Translační produkty identifikovaných genů byly spolu s proteiny *S. cerevisiae* rozříděny do rodin, které tak vytvořily základ pro mezidruhovou srovnávací analýzu. Ta odhalila, že ke speciaci uvnitř studovaného vzorku docházelo za přispění několika různých molekulárních mechanismů, které

vedly ke ztrátě genů či naopak k získání genů nových. Ukázalo se, že velmi podstatnou roli ve speciaci hrají duplikace. Teorie tzv. celkové duplikace genomu (whole genome duplication), která předpokládá zdvojení celého genomu předka rodu *Saccharomyces* a následnou masivní ztrátu redundantních genů v jeho potomcích, byla publikována již v roce 1997 (Wolfe a Shields, 1997). Projekt Génolevures 2 ukázal, že celkovou duplikaci genomu prodělal i předek kvasinky *C. glabrata* (Dujon *et al.*, 2004). Ztráta redundantních genů, funkční specializace jedné ze dvou genových kopií a rozsáhlé přeskupování genomu, které následovalo po celkovém zdvojení, byly hybnou silou speciace. Také u ostatních druhů analyzovaných v projektu Génolevures, které celkovou duplikaci genomu ve své evoluční historii neprodělaly, představovaly částečné duplikace důležitý speciační mechanismus (Dujon *et al.*, 2004; Dujon, 2006). Jednalo se o zdvojení různě dlouhých úseků DNA. Při tzv. segmentálních duplikacích docházelo ke zdvojení dlouhých úseků DNA (40 - 650 kb). Takovéto události však zřejmě v evoluci kvasinkových genomů nastaly jen vzácně. Naopak význačnou úlohu v evoluci kvasinek měly a mají duplikace jednotlivých genů zprostředkované například transpozony (Schacherer *et al.*, 2004). Dalším typem identifikovaných duplikačních mechanismů jsou tzv. tandemové duplikace. Při nich docházelo ke zdvojení úseků DNA obsahujících několik (nejčastěji 2 - 3) sousedících genů. Například kvasinka *D. hansenii* vykazuje značné množství takovýchto zdvojení (Dujon, 2006). Popsané duplikační mechanismy vysvětlují poměrně rozsáhlou redundanci genů pozorovanou v kvasinkách. V menší míře se na evoluci kvasinek podílely i další mechanismy způsobující vznik genů *de novo* jako jsou alternativní sestřih (v menší míře z toho důvodu, že v kvasinkových genomech se introny vyskytují zřídka; Bon *et al.*, 2003) nebo horizontální transfer, hrající roli spíše v evoluci bakteriálních druhů (Dujon *et al.*, 2004).

Kvasinky třídy *Hemiascomycetes* dnes představují taxon s nejvyšším počtem známých genomů. Tento vysoký počet umožňuje stále dokonalejší porozumění mechanismům speciace eukaryot. Informace získané z projektu Génolevures dosud vedly k publikování celé řady evolučních studií (<http://cbl.labri.fr/Genolevures/publications.php>; např. Dujon *et al.*, 2004; Dujon, 2005, 2006; Sherman *et al.*, 2006). V současné době probíhá za přispění celkem 15 laboratoří z Francie a Belgie další etapa projektu, **Génolevures 3**. Ten se zabývá kompletní sekvenací a analýzou genomů kvasinek *Z. rouxii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans* a *K. lactis*. Tyto druhy byly vybrány pro analýzu z hlediska své pozice ve

fylogenetickém stromu, která je evolučně zajímavá – jsou si blízce příbuzné (někdy se označují jako skupina *Kluyveromyces*), a ve své historii dle dosavadních zjištění neprodělaly celkovou duplikaci genomu. Genom kvasinky *K. lactis* byl již sekvenován v projektu Génolevures 2, nicméně anotace genomu nebyly kompletní a použitá metoda navíc nevyhovovala potřebám projektu Génolevures 3.

Anotací se rozumí odhadnutí funkce úseku DNA podle jeho sekvence, jde tedy o predikci genů (jak strukturních, tj. kódujících mRNA, tak i genů kódujících ostatní druhy RNA), pseudogenů (úseků DNA, které mají vysokou homologii s funkčním genem, ale samy nejsou přepisovány), mobilních genetických elementů (např. transpozonů) a dalších funkčních oblastí DNA (např. centromer, telomer, replikačních počátků). Predikce strukturních genů se provádí identifikací ORFů, tj. úseků DNA ohraničených iniciačním a terminačním kodonem, které pravděpodobně výsledně kódují proteiny. Anotací se rozumí též odhadnutí funkce kódovaného proteinu, které se provádí na základě rozpoznání homologie se známými proteiny jiných, příbuzných organismů.

Naučit se potřebné metody a podílet se na přípravě DNA *Z. rouxii* pro sekvenaci a na následných anotacích genomů všech čtyř kvasinek zahrnutých do projektu Génolevures 3 bylo jedním z cílů této dizertační práce.

### 3. Cíle práce

Cílem této dizertační práce bylo přinést více poznatků o nekonvenční kvasince *Z. rouxii*, a to hlavně z hlediska jejích osmotolerantních vlastností. Dílčí cíle je možno shrnout do několika bodů:

- 1) vytvořit soubor nástrojů genového inženýrství pro genové manipulace v *Z. rouxii*, a rozšířit tak možnosti studia této kvasinky:
  - a. připravit systém skládající se z účinné transformační techniky, různých auxotrofních mutantů a specifických episomálních a centromerových plasmidů pro *Z. rouxii* s různými selekčními geny;
  - b. vytvořit systém pro vícenásobnou delecí genů v *Z. rouxii* pomocí opakovatelně použitelných delečních kazet;
  - c. ověřit využití GFP pro lokalizaci proteinů v *Z. rouxii* a zkonstruovat plasmid pro expresi fúzních proteinů s GFP v *Z. rouxii*;
  - d. zjistit možnost využití promotoru *ScGAL1* pro regulovanou expresi genů v *Z. rouxii*;
- 2) charakterizovat kvasinku *Z. rouxii* z hlediska specifických vlastností, tj. hlavně její vysoké osmotolerance:
  - a. porovnat vlastnosti dvou nejčastěji studovaných divokých kmenů (CBS 732<sup>T</sup> a ATCC 42981) týkající se osmotolerance;
  - b. studovat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny, které hrají v kvasinkách důležitou roli převážně za osmotického stresu způsobeného ionty solí:
    - i. v databázích vyhledat sekvence kvasinkových genů kódujících proteiny homologní k *ScNha1p*, *ScNhx1p* a *ScKha1p* a tyto sekvence analyzovat;
    - ii. prostřednictvím vytvořeného souboru nástrojů genového inženýrství studovat funkci Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportních proteinů *Z. rouxii* přímo v této kvasince;
- 3) podílet se v rámci projektu Génolevures 3 na procesu sekvenace a následných anotacích genomu *Z. rouxii*.



## 4. Materiál a metody

### 4.1. Materiál

V této práci byly používány chemikálie nejvyšší dostupné čistoty běžně užívané v molekulární biologii od firem Sigma, Serva a Lachema. Původ méně známých chemikálií je uveden v jednotlivých publikacích. Používané enzymy byly, pokud není uvedeno jinak, od firem Fermentas, New England Biolabs, Roche nebo Amersham.

#### 4.1.1. Kmeny bakterií a kvasinek

Divoké kvasinkové kmeny:

*Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup>\*, ATCC 42981

*S. cerevisiae* FL100, Σ1278b, S288c

*S. kluyveri* CBS 3082\*

*K. lactis* CLIB 210\*

*K. thermotolerans* CBS 6340\*

\*kmeny studované v rámci projektu Génolevures 3

Mutantní kvasinkové kmeny:

*Z. rouxii* MA11 (*leu2*; Ushio *et al.*, 1988),

ULA (*ura3*; Přibylová, 2002)

*S. cerevisiae* BW31 (*MATa ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 nha1Δ::LEU2 ena1Δ::HIS3::4Δ*; Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005),

FRJ1 (*MATa ura2 trp1-4*; Schacherer *et al.*, 2004),

W3031A (*MATa ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1*; Wallis *et al.*, 1989)

Kmen bakterií:

*E. coli* XL1 – Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F<sup>'</sup> [proAB<sup>+</sup> lac1<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(*ter<sup>r</sup>)*]*)

#### 4.1.2. Kultivační půdy

Pro přípravu médií byly používány komerčně připravené směsi od firmy Difco (USA). Kultivace kvasinek probíhala v médiích YP (1% yeast extract, 2% bacto pepton, zdroj uhlíku v textu), YPG (1% yeast extract, 2% bacto pepton, 2% glukosa), YNB (0,17% yeast nitrogen base without amino acids and  $\text{NH}_4^+$ , 2% glukosa, 0,1% zdroj dusíku), YNB- $\text{NH}_4$  (0,67% yeast nitrogen base without amino acids nebo 0,17% yeast nitrogen base without amino acids and  $\text{NH}_4^+$  a 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% glukosa [pokud není uveden jiný zdroj uhlíku]). Kultivace bakterií probíhala v médiu LB (1% bacto trypton, 0,5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7 nebo 2% LB). Pevné půdy byly připravovány přidáním 2% agaru. V případě médií s přísadami solí byla sůl přidána před autoklávováním. Auxotrofní přísady byly přidávány do média po autoklávování ze zásobních roztoků o koncentraci 5 mg/ml, které byly předem sterilizovány filtrací přes membránový filtr Millex-GS (průměr pórů 0,22  $\mu\text{m}$ ). Selektivní půdy pro bakterie byly připravovány přidáním ampicilinu v konečné koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  do sterilního média ze zásobního roztoku o koncentraci 25 mg/ml. Zásobní roztok ampicilinu byl připraven stejně jako zásobní roztoky auxotrofních přísad.

#### 4.1.3. Plasmidy

V práci byly použity tyto plasmidy:

**YCplac33** (5,6 kbp, *URA3*, *ScCEN4/ScARS1*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid (Gietz a Sugino, 1988).

**pSRT5** (12,8 kbp, *ScLEU2*, pSR1, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid obsahující celou sekvenci plasmidu pSR1 (Ushio *et al.*, 1988).

**pLU1** (8,2 kbp, *ScURA3*, *ZrLEU2*, *ScCEN4/ScARS1*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný centromerový plasmid odvozený z vektoru YCplac33 obsahující úsek chromosomální DNA ze *Z. rouxii* zahrnující gen *ZrLEU2* (Sychrová, 2001)

**pFL34** (3,8 kbp, *ScURA3*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný integrativní plasmid (Bonneaud *et al.*, 1991).

**pFL38** (4,6 kbp, *ScURA3*, *ScCEN4/ScARS1*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný centromerový plasmid (Bonneaud *et al.*, 1991).

**pGRU1** (5,8 kbp, *ScURA3*, GFP, 2 $\mu$ , *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid obsahující sekvenci GFP (přístupové číslo GenBank AJ249649).

**pMH1** (11,2 kbp, *ScMPR1*, *ScURA3*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid obsahující gen *ScMPR1* (Takagi *et al.*, 2000).

**pNHA1-985** (8,8 kbp, *ScNHA1*, *ScURA3*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid odvozený od YEp352 obsahující gen *ScNHA1* za vlastním promotorem (Kinclová *et al.*, 2001b).

**pNHA1-985GFP** (9,3 kbp, *ScNHA1*, GFP, *ScURA3*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid odvozený od pGRU1 obsahující gen *ScNHA1* za vlastním promotorem a GFP (Kinclová *et al.*, 2001b).

**pSH47** (7,0 kbp, *cre*, *ScURA3*, *ScCEN6/ScARS1*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný centromerový plasmid obsahující promotor *GAL1* a gen *cre* (Guldener *et al.*, 1996).

**pUG6** (4,0 kbp, *kanMX*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný plasmid obsahující sekvenci *loxP-kanMX-loxP* (Guldener *et al.*, 1996).

**pZrSOD2-22** (8,3 kbp, *ZrSOD2-22*, *ScURA3*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid odvozený od YEp352 obsahující gen *ZrSOD2-22* za promotorem *ScNHA1* (Kinclová *et al.*, 2001a).

**YCpCJ025** (5,6 kbp, *ScGAP1*, GFP, *ScCEN6/ScARS1*, *Amp<sup>r</sup>*, *ori*) je podvojný episomální plasmid obsahující gen *ScGAP1* pod kontrolou promotoru *ScGAL1* a GFP (De Craene *et al.*, 2001).

## 4.2. Metody

Tato kapitola je shrnutím metod, použitých autorkou v této práci. Pokud byla konkrétní metoda popsána v některé z publikací, které jsou součástí této práce, je pouze stručně nastíněn

její princip a uveden odkaz na příslušnou publikaci. Detailně jsou popsány pouze metody neuvedené v publikacích č. 1-7.

#### **4.2.1. Mikrobiologické metody**

##### *Kultivace a uchovávání kultur*

Kmeny kvasinek byly kultivovány při teplotě 30 °C v tekutém médiu v baňkách nebo na pevném médiu na Petriho miskách. Dlouhodobě se kmeny uchovávaly při teplotě –80 °C v 30% glycerolu. Kmeny napěstované na pevných půdách se krátkodobě uchovávaly při teplotě 4 °C. Kmeny bakterií byly kultivovány při teplotě 37 °C stejným způsobem jako kvasinkové kmeny, dlouhodobě se uchovávaly také stejně jako kvasinkové kmeny.

##### *Sledování růstu buněk v médiu*

Růstové křivky byly měřeny během růstu kultur v tekutém médiu. Kultury byly zaočkovány do stejné OD<sub>600</sub> z předem napěstovaného inokula a kultivovány za stálého třepání při 30 °C. Růst byl sledován měřením OD při 600 nm. Konkrétní postup (objem kultur, počáteční OD, doba kultivace) je popsán v jednotlivých publikacích (např. publikace č. 5).

Pro charakterizaci fenotypu kmenů byly používány kapkové testy. Byl sledován růst kapek buněčných suspenzí na pevném médiu (postup viz publikace č. 5).

##### *Mikroskopie kvasinek*

Pro fotodokumentaci kvasinkových buněk byla použita kamera Sony Progressive 3CCD, a to jako součást mikroskopu Olympus AX70. Pro mikroskopii buněk nesoucích proteiny značené GFP byl použit filtr U-MWB.

##### *Stanovení tolerance k solím*

Tolerance kvasinkových buněk ke zvýšené koncentraci solí byla testována pomocí kapkových testů na pevných médiích YPG nebo YNB-NH<sub>4</sub> obsahujících NaCl, KCl nebo LiCl.

##### *Stanovení počtu buněk a sušiny biomasy připadající na 1 ml suspenze o OD<sub>600</sub> 1*

Stanovení počtu buněk a sušiny biomasy bylo provedeno v 1 ml exponenciálně rostoucí kultury, která dosáhla OD<sub>600</sub> 1 (viz publikace č. 5).

### *Sledování odolnosti buněčných stěn kvasinek k lytickým enzymům*

Na buňky v exponenciální fázi růstu bylo 20 min působeno Lyticasou z *Arthrobacter luteus* (Sigma) a Zymolyasou-100 T (Seikagaku America; viz publikace č. 6). Přežívání buněk bylo stanoveno výsevem na médium YPG.

## **4.2.2. Molekulárně-biologické metody**

### *Manipulace s DNA*

Purifikace a precipitace DNA, restriční štěpení, modifikace a ligace DNA in vitro byly prováděny podle standardních laboratorních protokolů (Sambrook *et al.*, 1989). Pro izolaci DNA z agarozového gelu byla používána souprava GENE CLEAN<sup>®</sup> Turbo (QBIogene).

### *Konstrukce plasmidů*

Plasmidy byly konstruovány restričním štěpením a ligací nebo homologní rekombinací v *S. cerevisiae* (Zaragoza, 2003). Postup konstrukce konkrétních plasmidů je popsán vždy v jednotlivých publikacích. Zde je popsána pouze konstrukce plasmidů připravených v rámci studia Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů *Z. rouxii* (viz kap. 5.3.2.). Sekvence oligonukleotidů použitých pro PCR-amplifikaci klonovaných genů jsou uvedeny v tab. 1.

Plasmid YEp352\_*ZrNHA1*: Gen *ZrNHA1* byl namnožen prostřednictvím PCR za využití oligonukleotidů pZrNHA1f a pZrNHA1r a genomové DNA kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup>. Fragment DNA namnožený technikou PCR byl vložen do mnohokopiového plasmidu pNHA1-985 (Kinclová *et al.*, 2001b) za promotor *ScNHA1* prostřednictvím homologní rekombinace v *S. cerevisiae* tak, aby v plasmidu nahradil gen *ScNHA1*.

Plasmid pZEU\_*ZrSOD2-22*: Gen *ZrSOD2-22* byl namnožen prostřednictvím PCR za využití oligonukleotidů ZSOSAC a ZSOSAC2 a plasmidu pZrSOD2-22 (Kinclová *et al.*, 2001a) jako templátu. Získaný fragment byl štěpen restričním enzymem *SacI*, přečištěn v agarozovém gelu a vložen do plasmidu pZEU do restričního místa *SacI*.

Plasmid pZEU\_*ZrNHA1*: Gen *ZrNHA1* byl namnožen prostřednictvím PCR za využití oligonukleotidů pZrNHA1f a pZrNHA1-2r a plasmidu YEp352\_*ZrNHA1* jako templátu. Výsledný fragment byl vložen do mnohokopiového plasmidu pZEU\_*ZrSOD2-22* za promotor *ScNHA1* prostřednictvím homologní rekombinace v *S. cerevisiae* tak, aby nahradil gen *ZrSOD2-22*.

Plasmid pGRU1\_ZrNHA1: Gen *ZrNHA1* byl namnožen prostřednictvím PCR za využití oligonukleotidů pZrNHA1f a pZrNHA1\_GFPr a plasmidu YEp352\_ZrNHA1 jako templátu. Výsledný fragment byl vložen do mnohokopiového vektoru pNHA1-985GFP (Kinclová *et al.*, 2001b) za promotor *ScNHA1* prostřednictvím homologní rekombinace v *S. cerevisiae* tak, aby v plasmidu nahradil gen *ScNHA1*.

#### Oligonukleotidy použité v práci

Sekvence oligonukleotidů použitých ke konstrukci plasmidů nebo delečních kazet jsou uvedeny vždy v konkrétní publikaci. Tab. 1 je seznamem sekvencí oligonukleotidů použitých pro konstrukci plasmidů s geny kódujícími Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry *Z. rouxii* nebo pro konstrukci kazet pro delecí těchto genů v *Z. rouxii* (kap. 5.3.2).

**Tab. 1.** Oligonukleotidy použité ke konstrukci plasmidů obsahujících geny *ZrNHA1* nebo *ZrSOD2-22* nebo k delecí těchto genů v *Z. rouxii*.

Oligonukleotid	Sekvence (5'-3')
pZrNHA1f	tttttgcattataaaaaaaaaatcctgaacttagctagatattATGGTTTGGGGTCAGCTGGA*
pZrNHA1r	cagtcacgacgttgtaaacgacggccagtgccaagcttgcctgCTTATTTTCAGGTGGAACCTTTC*
pZrNHA1-2r	agcttgcctgcctgcaggtgcactctagaggatccccgggTTATTTTCAGGTGGAACCTTTC*
pZrNHA1_GFPr	caaaattgggacaacaccagtggaataattcttcaccttttagacatTTTCAGGTGGAACCTTTC*
ZSOSAC	gatagattcggagctctttttttttta**
ZSOSAC2	caggtgagctctagactgggagaag**
SOD2-22kanf	tcctcttgatggtttggcgtcagttggaagtcaccaaggcacatggtgcttacagttgccttggatattctcatctataTTC GTACGCTGCAGGTCG†
SOD2-22kanr	catactacctaatacagcatggtccttaacaacaatgctaagtcgtctgaatctccgtagttctctcttcgctttctgcGCA TAGGCCGCTAGTGGA†
NHA1kanf	ttattagataatggtttggggtcagctggaaccgacaagccatggtgcttatgcttgcctcggggtttctcatcgaTT CGTACGCTGCAGGTCG†
NHA1kanr	tataatccagttatttcaggtggaactttcttcttagggagtccttaactttcttgggtgactgttttggctcccgatCCGCA TAGGCCGCTAGTGGA†

\*malá písmena, oblast homologní k promotoru *ScNHA1* nebo plasmidu YEp352, pZEU nebo pGRU1; kapitálky, oblast homologní ke genu *ZrNHA1*

\*\* podtrženo restriční místo *SacI*

†malá písmena, oblast homologní k lokusu obsahujícímu gen *ZrSOD2-22* nebo *ZrNHA1*; kapitálky, oblast homologní k plasmidu pUG6,

### *Polymerasová řetězová reakce (PCR)*

Pro analytickou PCR byla používána polymerasa Taq (PPP Master Mix, Top-BIO). Pro potřeby klonování byly používány polymerasy s tzv. „proofreading“ aktivitou, tj. schopné opravy případně chybně zařazených bází při polymeraci: Pfx (Invitrogen), Pfu (Promega) nebo směs polymerasy Taq (PPP Master Mix, Top-BIO) a ISIS<sup>TM</sup> (QBIOgene). DNA byla amplifikována v přístroji Master Cycler 5330 (Eppendorf) nebo Master Cycler Gradient (Eppendorf).

### *Elektroforetická analýza DNA*

Pro běžnou elektroforetickou analýzu byla DNA migrována v 1% agarozovém gelu. Pro analýzu karyotypu pulzní gelovou elektroforezou (PFGE, pulse-field gel electrophoresis) byla DNA izolována v agarozových bločcích (1,2% Pulse-field certified agaroze, Bio-Rad Laboratories) a migrována v aparatuře Bio-Rad CHEF (viz publikace č. 5).

### *Sekvenování DNA*

Vždy oba řetězce izolovaných fragmentů byly sekvenovány v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3100 DNA za využití BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

### *DNA-DNA hybridizace (Southern blot a chromoblot)*

Přenos elektroforeticky rozdělené štěpené genomové DNA (Southern blot) nebo chromosomů rozdělených PFGE (chromoblot) na nylonovou membránu a hybridizace s digoxigeninem značenou DNA-sondou byl prováděn podle standardních protokolů (Sambrook *et al.*, 1989) za pomoci soupravy DNA Labelling and Detection Kit (Roche). Použité sondy jsou uvedeny v publikaci č. 3.

### *Izolace DNA z buněk*

Plasmidová DNA z bakterií byly izolována tzv. „boiling“ metodou (Holmes a Quigley, 1981) nebo pomocí souprav GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Sigma) nebo Plasmid Mini Kit (Qiagen). Plasmidová a genomová DNA z kvasinek byla izolována postupem založeným na rozbíjení buněk pomocí skleněných kuliček ve směsi fenolu a chloroformu (Hoffman a Winston, 1987).

Chromosomální DNA *Z. rouxii* pro potřeby analýzy karyotypu prostřednictvím PFGE byla izolována v agarozových bločcích, aby během manipulace nedošlo k porušení chromosomů. Bylo využito protokolu popsaného pro izolaci DNA z kvasinky *S. cerevisiae* (Vezinhet *et al.*, 1990), který byl modifikován tak, že místo Zymolyasy bylo na buňky působeno Lyticasou (Sigma); viz publikace č. 5.

#### *Transformace kvasinek*

Buňky *S. cerevisiae* byly transformovány elektroporací za použití přístroje GHT 1287-B Jouan a elektrického pulzu 3.13 kV/cm, 24 ms. Před elektroporací byly buňky rostoucí v bohatém médiu YPG do exponenciální fáze růstu (OD<sub>600</sub> 0,8) promyty vodou, inkubovány 15 min v roztoku 25 mM DTT, opět promyty a resuspendovány v elektroporačním pufru EB (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 270 mM sacharosa, pH 7,5).

Transformaci buněk *Z. rouxii* popisuje publikace č. 1, kde je též uveden výsledný protokol elektroporace, který využívá stejného přístroje i parametrů el. pulzu jako protokol pro transformaci *S. cerevisiae*. V průběhu dizertační práce byl protokol uvedený v publikaci č. 1 mírně modifikován - elektroporace byla prováděna za využití přístroje Eppendorf a elektrického pulzu 9 kV/cm, 6 ms (viz publikace č. 3). V konkrétní publikaci je vždy uvedeno, která varianta protokolu byla užitá k transformaci. Modifikovaná verze byla použita pro elektroporaci buněk *Z. rouxii* i v kapitole 5.3.2. zabývající se studiem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů *Z. rouxii*.

#### *Delece genů*

Deleční kazety obsahující modul *loxP-kanMX-loxP* byly namnoženy PCR a použity k transformaci kmenů *Z. rouxii*. Po elektroporaci byly buňky inkubovány 2 hodiny v bohatém médiu YPG, a poté vysety na selekční médium YPG + 100 µg/ml geneticin. Fenotyp mutantů byl ověřen kapkovými testy, genotyp PCR. Selekční gen *kanMX* byl z genomu vyštěpen prostřednictvím plasmidu obsahujícího rekombinasi *cre* (pZCRE, viz publikace č. 4). Tato metoda byla využita pro delece genů *ZrNHA1* a *ZrSOD2-22* a pro přípravu auxotrofních mutantů *Z. rouxii*.

Oligonukleotidy použité k přípravě delečních kazet pro deleci auxotrofních genů *Z. rouxii* jsou uvedeny v publikaci č. 4, pro deleci genů *ZrNHA1* a *ZrSOD2-22* v tab. 1.



#### *Stanovení ztráty plasmidů z buněk a počtu jejich kopií*

Postupy obou metod jsou popsány v publikaci č. 3. Ztráta plasmidů z buněk byla stanovena jako procento buněk, které po 24-hodinové kultivaci kultury v neselektivních podmínkách ztratily plasmid. Počet kopií plasmidů v buňce byl měřen za využití techniky Southern blot hybridizací štěpené genomové DNA na membráně se sondou proti sekvenci přítomné jak v plasmidu, tak v chromosomu transformanta, a následnou denzitometrickou analýzou obrazu programem Aida 3.28 (Advanced Image Data Analyzer, Germany).

#### **4.2.3. Biochemické metody**

##### *Stanovení produkce glycerolu buňkami*

Množství glycerolu produkované buňkami *S. cerevisiae* a *Z. rouxii* bylo stanoveno prostřednictvím soupravy Free Glycerol Determination Kit (Sigma); viz publikace č. 5.

#### **4.2.4. Metody počítačové analýzy sekvencí**

Pro běžnou potřebu byly sekvence analyzovány pomocí programů Lasergene99 (DNASTAR Inc.) nebo Vector NTI (Invitrogen).

Při anotacích bylo využíváno softwarového programu vyvinutého speciálně pro potřeby projektu Génolevures 3 (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>). Anotační postup je popsán ve výsledkové části (kap. 5.4.2.). Pro kvasinkové druhy byly používány zkratky utvořené vždy z prvních dvou písmen rodového a druhového jména: Klla, *K. lactis*; Sakl, *S. kluyveri*; Klth, *K. thermotolerans*; Zyro, *Z. rouxii*; Sace, *S. cerevisiae*, Cagl, *C. glabrata*; Yali, *Y. lipolytica*.

Metody použité pro srovnání proteinových a DNA sekvencí antiportérů kvasinek homologních k *ScNHAI*, *ScNHX1* a *ScKHA1* jsou uvedeny v publikaci č. 7.

## 5. Výsledky a diskuze

Výsledky této dizertační práce jsou shrnuty ve čtyřech publikovaných pracích (kap. 5.1.1, 5.1.2., 5.2.1. a 5.3.1.), dvou pracích přijatých do tisku (kap. 5.1.3. a 5.2.2.), jednom rukopise odeslaném k recenzi (kap. 5.1.4.) a dvou dalších kapitolách obsahujících dosud nepublikované výsledky (5.3.2. a 5.4.).

Kapitola Příprava nástrojů genového inženýrství pro *Z. rouxii* se skládá celkem ze čtyř prací. Publikace č. 1: Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation popisuje optimalizaci protokolu pro transformaci *Z. rouxii*. Publikace č. 2: Expression of the *Saccharomyces cerevisiae MPR1* gene encoding N-acetyltransferase in *Zygosaccharomyces rouxii* confers resistance to L-azetidine-2-carboxylate pojednává o možnosti využití genu *ScMPR1* jako pomocného selekčního genu v *S. cerevisiae* nebo *Z. rouxii*. Publikace č. 3: Characterisation of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors popisuje identifikaci čtyř a funkční analýzu dvou centromer *Z. rouxii* a využití sekvence centromery pro konstrukci centromerového plasmidu. Konečně publikace č. 4: Development of tools for genetic manipulation in *Zygosaccharomyces rouxii* je souhrnem metod pro manipulaci genomu *Z. rouxii*: popisuje konstrukci různých auxotrofních mutantů, episomálních a centromerových plasmidů s různými selekčními geny, metodu umožňující vícenásobné delece genů *Z. rouxii* a konstrukci vektoru pro určení lokalizace proteinů v *Z. rouxii* pomocí GFP.

Kapitolu Osmotolerantní vlastnosti *Z. rouxii* tvoří dvě práce. Publikace č. 5 Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism se zabývá srovnáním vlastností kmenů *Z. rouxii* ATCC 2623 (čili CBS 732<sup>T</sup>) a ATCC 42981 a informuje hlavně o odlišnostech nalezených v osmotoleranci a asimilaci a produkci glycerolu. Publikace č. 6: Differences in osmotolerant and cell wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains se zabývá porovnáním vlastností buněčných stěn kmenů CBS 732<sup>T</sup> a ATCC 42981 v souvislosti s jejich rozdílnou osmotolerancí a naznačuje možnou souvislost osmotolerantních vlastností s flexibilitou buněčné stěny.

Další kapitola pojednává o Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportních proteinech. Její součástí je publikace č. 7: Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure

comparison, která je srovnávací studií sekvencí Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek homologních s *NHA1*, *NHX1* a *KHA1* *S. cerevisiae*. Podkapitola věnovaná Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportním proteinům *Z. rouxii* obsahuje dosud nepublikované výsledky popisující identifikaci nového genu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> kódujícího druhý Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportér (*ZrNHA1*) a srovnání funkce *ZrNha1p* a již známého *ZrSod2-22p*, který byl dosud studován jen prostřednictvím heterologní exprese, v *Z. rouxii* i v *S. cerevisiae*. Tyto výsledky budou zpracovány do rukopisu a zaslány k recenznímu řízení do konce letošního roku.

Poslední kapitola pojednává o přípravě DNA *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> k systematické sekvenaci a o první fázi anotací sekvencí genomů čtyř kvasinek zahrnutých do projektu Génolevures 3. Tato část bude publikována po dokončení anotace a analýzy všech čtyř kvasinkových genomů.

## 5.1. Příprava nástrojů genového inženýrství pro *Z. rouxii*

Poznání procesů probíhajících v kvasince *Z. rouxii* na molekulární úrovni je dosud velmi limitované, a to hlavně z důvodu chybějícího souboru metod pro genové manipulace v této kvasince. Pro identifikaci a charakterizaci genů *Z. rouxii* se doposud využívala převážně jejich heterologní exprese v *S. cerevisiae*. *Z. rouxii* je nicméně zajímavá právě z hlediska svých specifických vlastností, které jsou pravděpodobně zajištěny specifickými geny. Vzhledem k tomu, že izolace a studium specifických genů nemusí být prostřednictvím jejich exprese v heterologním hostiteli umožněno jednoduše z toho důvodu, že v heterologním hostiteli buď nefungují vůbec nebo je jejich funkce odlišná, je pro identifikaci a charakterizaci specifických genů *Z. rouxii* esenciální možnost genových manipulací přímo v této kvasince.

Soubor nástrojů umožňující manipulovat s genovou výbavou *Z. rouxii* dosud neexistoval. Zatím byly k dispozici pouze dva auxotrofní mutantní kmeny: *Z. rouxii* UL4 (*ura3*), derivát divokého kmene CBS 732<sup>T</sup> připravený autorkou této dizertační práce v rámci její diplomové práce (Příbylová, 2002), a *Z. rouxii* MA11 (*leu2*), derivát divokého kmene ATCC 42981 (Ushio *et al.*, 1988). Jediným dominantním selekčním genem využitým dosud v *Z. rouxii* byl *kanMX*. Možnosti selekce transformantů tak byly omezeny. Neexistovaly specifické plasmidy pro *Z. rouxii* s polylinkerem, ani jednoduchá a účinná technika transformace. Jediná publikovaná metoda pro transformaci *Z. rouxii* byla pracná technika využívající protoplastů (Ushio *et al.*, 1988). Nebyl k dispozici ani nástroj umožňující vícenásobné delece, jakkoli již bylo známo, že pro cílené delece v *Z. rouxii* lze využít homologní rekombinaci (Iwaki *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 1995).

V této dizertační práci se nám podařilo připravit soubor nástrojů pro genové manipulace v *Z. rouxii*, zahrnující účinnou a jednoduchou metodu transformace, možnost exprese genů z centromerových nebo episomálních plasmidů a selekce transformantů prostřednictvím různých selekčních genů, systém pro vícenásobné delece, a též možnost značení proteinů v buňkách *Z. rouxii* pro určení jejich vnitrobuněčné lokalizace. Výsledky jsme zveřejnili (publikace č. 1 - 3) nebo odeslali k recenznímu řízení (publikace č. 4).

### 5.1.1. Publikace č. 1: Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation

Příbylová, L., Sychrová, H. (2003) *J Microbiol Methods* **55**(2): 481 - 484

Prvním krokem pro vytvoření souboru nástrojů pro genové manipulace v *Z. rouxii* bylo optimalizovat metodu transformace. V současné době je jednou z nejjednodušších a nejvíce používaných metod transformace kvasinek elektroporace. V této práci jsme navázali na výsledky získané v autorčině diplomové práci, ve které byl připraven kmen *Z. rouxii* UL4 s mutací *ura3* (Příbylová, 2002).

Vytvořili jsme jednoduchý protokol pro transformaci dvou dostupných mutantních kmenů *Z. rouxii* - UL4 (*ura3*) a MA11 (*leu2*; Ushio *et al.*, 1988) elektroporací. Zjistili jsme, že kmeny pro účinnou transformaci vyžadují odlišné podmínky inkubace s látkami rozvolňujícími buněčný povrch. Na buňky kmene UL4 bylo třeba před aplikací elektrického pulzu působit kromě DTT ještě ionty  $\text{Li}^+$ , účinnost transformace kmene MA11 se působením  $\text{Li}^+$  naopak snižovala. Kmen UL4 též vyžadoval delší dobu působení látek rozvolňujících buněčný povrch než kmen MA11.

Vzhledem k tomu, že typovým kmenem *Z. rouxii* je CBS 732<sup>T</sup>, jehož celková sekvence genomu bude v brzké době veřejně dostupná, bylo výhodné připravit nástroje genového inženýrství pro manipulaci DNA ve kmenech s genetickým pozadím CBS 732<sup>T</sup>. Pro přípravu nástrojů pro manipulaci DNA *Z. rouxii* byl proto v následujících pracích využit hlavně kmen *Z. rouxii* UL4.

### 5.1.2. Publikace č. 2: Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *MPRI* gene encoding N-acetyltransferase in *Zygosaccharomyces rouxii* confers resistance to L-azetidine-2-carboxylate

Příbylová, L., Sychrová, H. (2006) *Folia Microbiol* **51**(3): 203 – 209

Pro selekci transformantů a především delečních mutantů se při genových manipulacích kvasinek využívají dominantní selekční geny. Mezi nejrozšířenější patří *kanMX*. Jeho využití jako selekčního genu v *Z. rouxii* již bylo publikováno, nicméně ve kmenech s jiným genetickým pozadím než CBS 732<sup>T</sup> (Tang *et al.*, 2005; Ushio *et al.*, 1988). Využití *kanMX* pro selekci transformantů a delečních mutantů odvozených od kmene CBS 732<sup>T</sup> jsme potvrdili v publikaci č. 4. Při genových manipulacích je však výhodné mít více možností selekce, a tedy je žádoucí i větší výběr dominantních selekčních genů.

Za účelem rozšíření možností dominantní selekce v *Z. rouxii* jsme zkoumali využití genu *MPRI* kvasinky *S. cerevisiae* jako selekčního genu. *ScMPRI*, kódující enzym detoxifikující analog prolinu (AZC), byl nalezen ve kmeni *S. cerevisiae* Σ1278b (Shichiri *et al.*, 2001). Tento kmen je proto rezistentní k přítomnosti AZC v médiu. Většina laboratorních kmenů *S. cerevisiae* funkční kopii genu *ScMPRI* neobsahuje, a je k přítomnosti AZC citlivá. Pokud exprimují gen *ScMPRI*, stanou se rezistentními. V databázi Génolevures 1, která představuje soubor sekvencí získaných při částečné sekvenaci genomu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup>, jsme nenalezli žádný gen homologní k *ScMPRI*, dalo se tedy předpokládat, že i buňky *Z. rouxii* budou k AZC citlivé.

V této práci jsme potvrdili, že buňky *Z. rouxii* jsou citlivé k přítomnosti AZC v růstovém médiu, přičemž exprese genu z plasmidu je učinila rezistentními. Nicméně, při selekci transformantů na základě jejich rezistence k AZC (tj. selekčním médiem bylo médium obsahující AZC) docházelo k výskytu spontánně rezistentních kolonií. Gen *ScMPRI* lze tedy v *Z. rouxii* použít pouze jako pomocný selekční gen, nikoli dominantní. Totéž jsme potvrdili pro *S. cerevisiae*.

### 5.1.3. Publikace č. 3: Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors

Příbylová, L., Straub, M.L., Sychrová, H., de Montigny, J. (2007) *Chromosome Res* (v tisku; DOI 10.1007/s10577-007-1136-z)

Pro expresi genů v kvasinkách jsou často používány centromerové plasmidy, které zajistí stabilní přenašení genu do dalších generací hostitele a jeho přítomnost v buňkách v max. dvou kopiích. Takové plasmidy pro *Z. rouxii* dosud neexistovaly. Pro expresi genů sice bylo možno použít centromerové plasmidy *S. cerevisiae*, protože ARS *S. cerevisiae* je rozeznávána i replikačním aparátem *Z. rouxii*, ale nebyla zajištěna regulace počtu kopií plasmidu v buňce ani jeho stabilní pomnožování (Ushio *et al.*, 1988). Sekvence centromery *Z. rouxii* dosud nebyla známa.

Za účelem konstrukce centromerových plasmidů pro *Z. rouxii* jsme v této práci identifikovali a funkčně charakterizovali centromery *Z. rouxii*. V databázi Génolevures 1 jsme na základě homologie s oblastmi DNA blízce příbuzné kvasinky *S. cerevisiae* obsahujícími centromery identifikovali čtyři fragmenty představující patrně centromery *Z. rouxii*. Dva fragmenty jsme vybrali pro funkční analýzu. Úseky představující pravděpodobné centromery jsme vložili do plasmidu obsahujícího pouze ARS *S. cerevisiae*, a funkčnost plasmidů jsme sledovali jak v buňkách *Z. rouxii*, tak *S. cerevisiae*. Prokázali jsme, že v *Z. rouxii* plasmidy fungují jako centromerové, a fragmenty tak skutečně představují centromery. Hybridizační analýzou DNA-DNA (Southern blot) jsme zjistili, že se jedná o centromery chromosomů II. resp. VII. Centromery jsme potvrdili jako druhově specifické - plasmid nesoucí centromeru *Z. rouxii* nebyl rozpoznán jako centromerový v *S. cerevisiae* a naopak.

Zjistili jsme, že centromery *Z. rouxii* mají obdobnou strukturu jako centromery blízce příbuzných kvasinek *S. cerevisiae* nebo *K. lactis* - též jsou uspořádané do oblastí CDE I, II a III, přičemž úsek CDE II *Z. rouxii* je delší než příslušný úsek *S. cerevisiae* a kratší než CDE II *K. lactis*. Právě rozdílná délka tohoto úseku patrně z velké části přispívá k druhové specifitě kvasinkových centromer.

Vzhledem k sekvenční homologii pravděpodobně představují všechny čtyři fragmenty identifikované v této práci centromery *Z. rouxii*. Jejich sekvence byla odeslána do databáze GenBank. Připravené plasmidy představují první centromerové plasmidy *Z. rouxii*.

#### 5.1.4. Publikace č. 4: Tools for the genetic manipulation of *Zygosaccharomyces rouxii*

Příbylová, L., de Montigny, J., Sychrová, H.

odesláno k recenznímu řízení do časopisu *FEMS Yeast Res*

Vytvoření transformačního protokolu, možnost využití *ScMPRI* jako pomocného selekčního genu a příprava centromerových plasmidů představovaly rozšíření do té doby limitovaných možností pro genové manipulace v *Z. rouxii*. V kvasinkách, a zvláště v modelové kvasince *S. cerevisiae*, však nástrojů pro genové manipulace existuje celá řada. Velmi často se například používají pro expresi genů episomální plasmidy (s replikonem 2 $\mu$ ), které zajistí, že vnášený gen bude v buňkách stabilně pomnožován v několika kopiích (viz kap. 2.3.2.1.). Tyto plasmidy však v *Z. rouxii* není možné použít, protože replikační aparát *Z. rouxii* nerozeznává 2 $\mu$ . *Z. rouxii* nicméně obsahuje přirozený plasmid pSR1, který je velmi podobný 2 $\mu$ , a který již byl využit pro konstrukci plasmidů (Ushio *et al.*, 1988); jednalo se však o plasmidy neobsahující polylinker, který by umožnil vnášení genů.

Další velmi užitečnou technikou pro genové manipulace v kvasinkách je možnost cílené delecce genů prostřednictvím delečních kazet a homologní rekombinace (viz kap. 2.3.3.). V kvasince *Z. rouxii* již byla potvrzena možnost cílených disrupcí/delecí genů využívajících homologní rekombinaci (Iwaki *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2005), nebyl však k dispozici nástroj umožňující vícenásobné delecce. Ani jedna z disrupcí/delecí navíc nebyla provedena ve kmeni s genetickým pozadím CBS 732<sup>T</sup>.

Pro expresi genů v kvasinkách je též výhodné využít regulovatelných promotorů (jedním z nejčastěji používaných regulovatelných promotorů je *ScGALI*) a značení jejich proteinových produktů pro určení jejich lokalizace v buňkách (GFP; viz kap. 2.3.2.). Takové možnosti pro *Z. rouxii* zatím nebyly.

V této práci jsme proto metody pro genové manipulace *Z. rouxii* rozšířili do té míry, abychom získali soubor nástrojů umožňující jak expresi genů z různých plasmidů, tak vícenásobné delecce genů. Jelikož jediným dosud dostupným auxotrofním mutantem odvozeným od typového kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> byl kmen *Z. rouxii* UL4, rozšířili jsme možnosti selekce o další auxotrofní mutanty a plasmidy obsahující příslušné selekční geny. Byly připraveny kmeny nesoucí různé kombinace mutací *ura3*, *leu2* a *ade2* a zkonstruovány specifické episomální a centromerové plasmidy s různými auxotrofními selekčními geny



(*ScURA3*, *ZrLEU2* a *ZrADE2*) a polylinkerem. Pro konstrukci episomálních plasmidů byla na základě dostupných informací o plasmidu pSR1 využita část jeho sekvence zajišťující replikaci a stabilitu plasmidů v buňkách. Sada centromerových plasmidů byla připravena odvozením od centromerového plasmidu zkonstruovaného v rámci publikace č. 3. Sekvence připravených plasmidů byly odeslány do databáze GenBank. Byl vytvořen systém pro vícenásobnou delecí genů v *Z. rouxii* využívající opakovatelně použitelné deleční kazety *loxP-kanMX-loxP* připravené prostřednictvím PCR a plasmidu nesoucího rekombinasi *cre*. Pro umožnění lokalizace proteinů v buňkách *Z. rouxii* byl zkonstruován plasmid pZGFP. Byla testována funkce promotoru *ScGAL1* v *Z. rouxii* – ukázalo se, že k expresi genů pod kontrolou tohoto promotoru dochází v *Z. rouxii* i při růstu buněk na glukose, a tento promotor tak není možno použít pro konstrukci plasmidů pro regulovatelnou expresi genů.

Vytvořené metody představují soubor nástrojů genového inženýrství využitelný pro genové manipulace kvasinky *Z. rouxii*, a tak významně rozšiřují možnosti studia specifických vlastností této kvasinky.

## 5.2. Osmotolerantní vlastnosti *Z. rouxii*

Nejčastěji studovanými divokými kmeny *Z. rouxii* jsou CBS 732<sup>T</sup> a ATCC 42981. Již z výsledků získaných v publikaci č. 1 bylo patrné, že se tyto kmeny ve svých vlastnostech liší. Buňky jejich derivátů vyžadovaly jiné podmínky pro rozvolnění svých buněčných povrchů před elektroporací, což naznačovalo odlišné složení či strukturu buněčných stěn. U několika druhů kvasinek již bylo prokázáno, že vlastnosti buněčných stěn jsou provázány s vlastnostmi osmotolerantními (viz kap. 2.1.2.). Že se budou vlastnosti osmotolerantní a vlastnosti buněčné stěny obou kmenů *Z. rouxii* navzájem ovlivňovat, naznačoval již fakt, že k jejich úspěšné elektroporaci bylo zapotřebí buňky kultivovat za mírného solného stresu (v přítomnosti 300 mM NaCl; viz publikace č. 1).

Rozhodli jsme se proto tyto dva divoké kmeny porovnat, a to hlavně z hlediska jejich vlastností týkajících se osmotolerance a buněčných stěn. Zjistili jsme významné rozdíly v toleranci k solím, produkci a asimilaci glycerolu, složení buněčných stěn, karyotypu. Získané výsledky jsme zveřejnili ve vědeckých časopisech (publikace č. 5 a 6).

### 5.2.1. Publikace č. 5: Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism

Příbylová, L., de Montigny, J., Sychrová, H. (2007) *Yeast* **24**(3): 171-180

Buňky kmenů *Z. rouxii* ATCC 2623 (tj. CBS 732<sup>T</sup>) a ATCC 42981 byly porovnány z hlediska svých morfologických, fyziologických a genomových vlastností. Kmen ATCC 42981 vykazoval vyšší toleranci k solím, vyšší produkci glycerolu a na rozdíl od kmene CBS 732<sup>T</sup> byl schopen asimilovat glycerol. Za podmínek osmotického stresu produkovaly oba kmeny *Z. rouxii* výrazně méně glycerolu než *S. cerevisiae*, což by naznačovalo přítomnost přenašeče aktivně transportujícího uniktnější glycerol zpět do buňky nebo schopnost efektivně zadržet produkovaný glycerol v buňce, jak tomu již bylo navrženo v práci van Zyl *et al.* (1990). Rozdíly byly nalezeny též v karyotypu - kmen ATCC 42981 obsahuje o jeden chromosom více a má celkově větší genom než CBS 732<sup>T</sup>, a dále v morfologii buněk - buňky kmene CBS 732<sup>T</sup> jsou elipsoidní až protáhlé a menší než ATCC 42981, zatímco buňky ATCC 42981 jsou kulaté a větší, což naznačuje odlišné vlastnosti buněčných stěn těchto kmenů.

Analýza mezigenových sekvencí prostřednictvím PCR potvrdila, že se i přes zjištěné rozdíly jedná o kmeny *Z. rouxii*. Nedávno byla zveřejněna hypotéza, že kmen ATCC 42981 je ve skutečnosti zřejmě kmenem hybridním - tedy vznikl pravděpodobně sloučením genomu kmene *Z. rouxii* a jiného kmene *Zygosaccharomyces* (James *et al.*, 2005). Tomu by odpovídaly i námi zjištěné rozdíly kmenů v karyotypu a fakt, že ve kmeni ATCC 42981 jsou často nalézány geny ve dvou kopiích. Zároveň je možné, že schopnost kmene ATCC 42981 asimilovat glycerol je důsledkem právě hybridního původu. Přesný původ kmene ATCC 42981 zbývá ještě stanovit; námi provedená analýza PCR dokládá, že genom ATCC 42981 minimálně zčásti odpovídá druhu *Z. rouxii*.

Schopnosti kmene ATCC 42981 růst v přítomnosti vyšší koncentrace solí než CBS 732 nebo produkovat více glycerolu mohou být dány právě tím, že kmen ATCC 42981 obsahuje geny podílející se na osmotoleranci (např. *SOD*, *HOG*, *GPD*; viz kap. 2.2.) ve dvou kopiích. Jeho vysoká tolerance k solím v médiu pramení patrně z toho, že se jedná o izolát z tradiční japonské slané kořenící směsi zvané miso; kmen CBS 732<sup>T</sup> byl naopak izolován z vinného moštu, tedy z prostředí, kde vysokou osmolaritu způsobují cukry, nikoli sole, a nemá tedy natolik účinné systémy umožňující růst v přítomnosti solí.

### 5.2.2. Publikace č. 6: Differences in osmotolerant and cell wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains

Příbylová, L., Farkaš, V., Slaninová, I., de Montigny, J., Sychrová, H. (2007) *Folia Microbiol* (v tisku)

Na základě rozdílných vlastností buněčných povrchů kmenů CBS 732<sup>T</sup> a ATCC 42981 zjištěných v publikaci č. 1 (odlišné podmínky pro rozvolnění buněčných stěn před elektroporací) a publikaci č. 5 (rozdíly v morfologii) jsme se rozhodli porovnat složení a strukturu buněčných stěn obou kmenů. Fakt, že k úspěšné elektroporaci kmenů odvozených od CBS 732<sup>T</sup> a ATCC 42981 bylo zapotřebí buňky kultivovat za mírného solného stresu (v přítomnosti 300 mM NaCl; viz publikace č. 1), naznačoval, že se budou vlastnosti osmotolerantní a vlastnosti buněčné stěny obou kmenů *Z. rouxii* navzájem ovlivňovat, jak již bylo prokázáno u několika druhů kvasinek (viz kap. 2.1.2.). U obou kmenů jsme proto sledovali vliv osmotického stresu na složení, odolnost a strukturu buněčné stěny.

U buněk jsme sledovali rezistenci k enzymům lyzujícím buněčnou stěnu (Lyticasa, Zymolyasa), obsah polymerů tvořících buněčnou stěnu a mikromorfologii buněčných stěn. Vlastnosti jsme porovnali jak za růstu v nestresových podmínkách (bohaté médium YPG), tak v podmínkách mírně zvýšené osmolarity (YPG + 300 mM NaCl). Rozdíly nalezené mezi kmeny naznačují, že buňky méně osmotolerantního kmene CBS 732<sup>T</sup> mají rigidnější buněčnou stěnu než buňky osmotolerantnějšího ATCC 42981, jejichž buněčná stěna byla dokonce méně odolná k působení lytických enzymů než stěna buněk osmosenzitivní kvasinky *S. cerevisiae*. Elasticitější buněčná stěna může pravděpodobněji flexibilněji reagovat na změny osmotického tlaku, a tak přispívat k vyšší osmotoleranci kmene ATCC 42981.

### 5.3. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny patří mezi membránové přenašeče kationtů alkalických kovů, které se podílejí na iontové homeostázi buňky, a tedy i na osmotoleranci (viz kap. 2.1.3.). Z tohoto důvodu jim v této práci byla věnována zvýšená pozornost.

Abychom zjistili, jak jsou jednotlivé skupiny kvasinkových přenašečů alkalických kovů fylogeneticky konzervované, provedli jsme srovnávací analýzu sekvencí kvasinkových přenašečů homologních k *ScNha1p*, *ScNhx1p* a *ScKha1p*. Výsledky jsme shrnuli do publikace č. 7 (kap. 5.3.1.).

Co se týče Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportních proteinů kvasinky *Z. rouxii*, zatím byl v typovém kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> identifikován pouze přenašeč s úzkou substrátovou specifitou (*ZrSod2-22p*, schopný eliminovat z cytoplasmy ionty Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>, ale nikoli K<sup>+</sup>; viz kap. 2.2.1.), jehož funkce byla zatím studována pouze prostřednictvím heterologní exprese v *S. cerevisiae* (Kinclová *et al.*, 2001a, 2002). V jiném kmene *Z. rouxii* (ATCC 42981) byly identifikovány dva geny kódující Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní proteiny (*ZrSOD2* a *ZrSOD22*), oba vykazující vysoký stupeň podobnosti s genem *ZrSOD2-22*, z nichž pouze *ZrSod2p* byl popsán jako podílející se na eliminaci sodných kationtů z buněk, *ZrSOD22* zřejmě není v buňkách vůbec přepisován (Iwaki *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1995). V *Z. rouxii* tak dosud nebyl identifikován Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní protein se specifitou pro transport draselných kationtů.

V této dizertační práci se nám v genomu kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> podařilo identifikovat dosud neznámý gen kódující transportní protein s primární strukturou velmi podobnou rodině kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů plasmatické membrány, který jsme nazvali *ZrNha1p*. Protein jsme funkčně charakterizovali (jak přímo v *Z. rouxii*, tak prostřednictvím heterologní exprese v *S. cerevisiae*), a určili jej jako přenašeč sodných, lithných a zároveň draselných kationtů. Za pomoci nástrojů genového inženýrství vyvinutých pro *Z. rouxii* jsme dále studovali i funkci Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportního proteinu *ZrSod2-22p* přímo v této kvasince. Funkce obou přenašečů jsme porovnali. Tyto výsledky popisuje kap. 5.3.2.

### 5.3.1. Publikace č. 7: Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison

Příbylová, L., Papoušková, K., Zavřel, M., Souciet, J.-L., Sychrová, H. (2006) *Folia Microbiol* 51(5): 413 – 424

Pro zjištění významu konkrétních oblastí Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek pro jejich funkci jsme ve veřejně dostupných databázích obsahujících alespoň částečné sekvence genomů patnácti různých kvasinek lokalizovali proteiny homologní k Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportním systémům ScNha1p, ScNhx1p a ScKha1p, a jejich sekvence porovnali na úrovni DNA i proteinů. Identifikovali jsme konzervované aminokyselinové zbytky či celé motivy, které tak vypovídají o funkčním významu těchto oblastí. Fylogenetická analýza příbuznosti identifikovaných přenašečů s Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportními proteiny ostatních organismů ukázala, že proteiny Nhx1 jsou příbuzné savčím a rostlinným přenašečům plasmatické membrány i vnitrobuněčných membrán, proteiny Kha1 jsou podobné bakteriálním přenašečům a proteiny Nha1 tvoří skupinu, jejíž představitelé byly zatím identifikovány pouze v houbových organismech a nedávno i v lidském genomu (Brett *et al.*, 2005).

Zajímavé bylo, že dva kvasinkové druhy, *Y. lipolytica* a *S. pombe*, obsahovaly hned dva geny kódující Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry homologní k ScNHA1, z nich pouze *Spsod2* byl charakterizovaný (Jia *et al.*, 1992; Kinclová *et al.*, 2002). Kolegyně Mgr. Klára Papoušková identifikované antiportéry charakterizovala a zjistila, že tyto kvasinky obsahují každá dva Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry lišící se substrátovou specifiitou (jeden transportující pouze Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>, druhý přednostně K<sup>+</sup>, a také Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>), které patrně hrají rozdílné role v buněčné fyziologii. Ostatní kvasinky obsahovaly jen jeden gen kódující přenašeč Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; ve druhých, kde již byl charakterizován, plnil vždy funkci transportéru všech tří kationtů (tj. Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>; Banuelos *et al.*, 2002; Kinclová *et al.*, 2002; Velková a Sychrová, 2006). Bylo důvodné předpokládat, že i kvasinka *Z. rouxii*, ve které byl dosud identifikován pouze přenašeč Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> (ZrSod2-22p), bude obsahovat antiportér typu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> rozeznávající jako svůj substrát K<sup>+</sup>. Jelikož přenašeč ZrSod2-22p byl dosud studován pouze heterologní expresí v *S. cerevisiae*, rozhodli jsme se sledovat jeho funkci přímo v *Z. rouxii*. Zároveň jsme využili přístupu do zatím neveřejné databáze Génolevures 3 obsahující kompletní sekvenci genomu *Z. rouxii* pro vyhledání možných dalších genů kódujících přenašeče typu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Získané výsledky shrnuje kap. 5.3.2.

### 5.3.2. Charakterizace Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportních proteinů *Z. rouxii*

Autorce této dizertační práce byl vzhledem k její účasti na projektu Génolevures 3 umožněn přístup do databáze obsahující dosud neanotovanou sekvenci genomu *Z. rouxii*. Tohoto přístupu jsme využili a databázi prohledali ve snaze identifikovat geny, které by mohly představovat dosud neznámé přenašeče patřící do rodiny Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportních proteinů. Identifikovali jsme gen, který jsme nazvali *ZrNHA1*. Funkci *ZrNha1p* jsme studovali jak heterologně v *S. cerevisiae*, tak přímo v *Z. rouxii*.

Dále jsme sledovali, jakou funkci má v *Z. rouxii* *ZrSod2-22p*. Tento Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-transportní protein byl totiž doposud studován pouze prostřednictvím heterologní exprese v *S. cerevisiae*, kde umožnil buňkám postrádajícím vlastní Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportér a ATPasy Ena růst v přítomnosti sodných a lithných ale nikoli draselných kationtů, a buňky jej exprimující byly schopny transportovat sodné, nikoli draselné kationty (viz kap. 2.2.1.). Zajímalo nás, zda se i v buňkách *Z. rouxii* *ZrSod2-22p* podílí pouze na transportu sodných a lithných kationtů, a ne na transportu kationtů draselných, a dále zda existují rozdíly ve funkci *ZrNha1p* a *ZrSod2-22p*. Ke studiu jsme využili nástroje pro genové manipulace *Z. rouxii* vytvořené v této práci.

#### 5.3.2.1. Identifikace a izolace *ZrNHA1*

V dosud neanotované databázi Génolevures 3 obsahující sekvenci genomu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> jsme na základě homologie s genem *ZrSOD2-22* identifikovali gen kódující patrně přenašeč typu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, který jsme vzhledem k jeho podobnosti s *ScNHA1* nazvali *ZrNHA1*.

Gen *ZrNHA1* jsme izolovali prostřednictvím PCR a vložili do mnohokopiového vektoru YEp352 za promotor *ScNHA1*, a připravili tak plasmid YEp352\_*ZrNHA1*. Pro potvrzení správnosti izolované sekvence byl úsek plasmidu obsahující vložený gen *ZrNHA1* sekvenován. Sekvence námi izolovaného genu i jím kódovaného proteinu vykazovala mírné rozdíly oproti sekvenci nalezené v databázi. Jelikož byla pro izolaci genu použita polymerasa s tzv. „proofreading“ aktivitou (tedy schopná opravit případnou nukleotidovou záměnu při procesu polymerace), je rozdíl v sekvenci přítomný v databázi a sekvence izolované možno vysvětlit tím, že klon kmene CBS 732<sup>T</sup> použitý pro izolaci genu *ZrNHA1* nebyl totožný s klonem CBS 732<sup>T</sup> použitým pro sekvenaci (Prof. Jacky de Montigny, osobní sdělení). V sekvenci DNA námi izolovaného genu bylo nalezeno sedm nukleotidových substitucí, čtyři z nich vedly k záměně aminokyselinového zbytku v kódovaném proteinu (R658 za G, V694 za

A, H806 za R a T938 za S, viz Příloha 10.1.). Proteinovou sekvenci nalezenou v databázi jsme spolu s proteinovou sekvencí námi izolovaného genu porovnali se sekvencemi přenašečů *ZrSod2-22* a *ScNha1p* a zjistili jsme, že všechny čtyři nalezené aminokyselinové záměny se nacházejí mimo transmembránové oblasti, v hydrofilním C-konci. Vzhledem k tomu, že na funkci přenašečů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se podílí hlavně oblast transmembránových domén, ve kterých se sekvence produktu námi izolovaného gene neliší od produktu genu v databázi, lze učinit závěr, že protein kódovaný námi izolovaným genem *ZrNHA1* by měl mít velmi podobné nebo i totožné transportní vlastnosti jako protein vzniklý přepisem a překladem sekvence v databázi.

### 5.3.2.2. Sekvenční analýza *ZrNha1p*

Produkt námi izolovaného genu, *ZrNha1p*, je tvořen 994 aminokyselinovými zbytky (viz Příloha 10.1.). Porovnáme-li jej s homologními *ZrSod2-22p* a *ScNha1p*, zjistíme, že svou délkou se protein *ZrNha1p* blíží spíše proteinu *ScNha1p*, tj. má, stejně jako *ScNha1p* a na rozdíl od *ZrSod2-22p*, poměrně dlouhý C-konec (tab. 2 a viz Příloha 10.2.).

**Tab. 2.** Struktura přenašečů *ZrNha1p*, *ZrSod2-22p* a *ScNha1p* podle modelu navrženého pro *ScNha1p* (Kinclová *et al.*, 2001b).

Antiportér	Počet aminokyselinových zbytků			
	Celkem	N-konec	TMS+smyčky	C-konec
<i>ScNHA1</i>	985	12	419	554
<i>ZrSOD2-22</i>	806	11	418	377
<i>ZrNHA1</i>	994	11	419	564

TMS, transmembránová oblast (transmembrane segment).

Srovnáme-li sekvenční identitu celkových proteinů a sekvenční identitu konzervovaných transmembránových oblastí antiportérů, které jsou klíčové pro transportní specifitu proteinů, je *ZrNha1p* v obou případech podobnější spíše *ScNha1p* než *ZrSod2-22p* (tab. 3). Na základě pozorované homologie můžeme odhadnout, že protein *ZrNha1p* obsahuje, stejně jako *ScNha1p*, krátký cytoplasmatický N-konec, 12 transmembránových domén a dlouhý cytoplasmatický C-konec. Tyto výsledky naznačovaly, že tento dosud neznámý přenašeč by mohl v buňkách *Z. rouxii* plnit funkce obdobné funkci *ScNha1p* v *S. cerevisiae*.



**Tab. 3.** Sekvenční identita (%) celých proteinů/transmembránových oblastí + smyček antiportérů.

Antiportér	ScNha1p	ZrSod2-22p	ZrNha1p
ZrSod2-22p	45,6/76,6	-	47,5/76,6
ZrNha1p	52,6/79,5	47,5/76,6	-

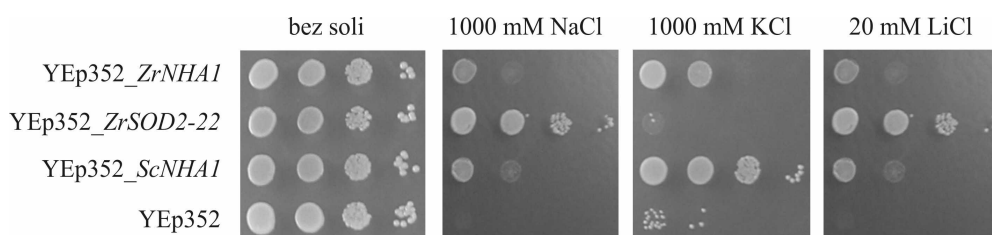
K porovnání sekvencí byl použit program Vector NTI (Invitrogen).

### 5.3.2.3. Heterologní exprese ZrNha1p v *S. cerevisiae* BW31

Abychom zjistili substrátovou specifitu, transportní vlastnosti a pravděpodobnou funkci identifikovaného přenašeče, byl izolovaný gen přítomný v plasmidu YEp352 pod kontrolou promotoru *ScNHAI* heterologně exprimován v buňkách kmene *S. cerevisiae* postrádajícího vlastní systémy pro výstup kationtů alkalických kovů (kmen BW31, *nha1Δ ena1-4Δ*; Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005). Takto bylo možno porovnat vlastnosti proteinu ZrNha1p s vlastnostmi přenašečů ZrSod2-22p a ScNha1p, které byly charakterizovány za stejných experimentálních podmínek (Kinclová *et al.*, 2002).

#### 5.3.2.3.1. Vliv ZrNha1p na toleranci *S. cerevisiae* BW31 k solím v médiu

Tolerance buněk BW31 exprimujících *ZrNHAI* ke zvýšené koncentraci solí NaCl, KCl a LiCl v médiu byla porovnána s tolerancí buněk exprimujících *ZrSOD2-22* nebo *ScNHAI* (pozitivní kontroly) a buněk obsahujících prázdný vektor (negativní kontrola). Přítomnost funkčního přenašeče byla detekována jako zvýšení tolerance, podmíněné schopností proteinu eliminovat nadbytečné kationty z cytoplasmy. Protein ZrNha1p umožnil buňkám růst za vyšší koncentrace všech tří testovaných solí, a je tedy zřejmě schopen eliminovat z cytoplasmy všechny tři typy kationtů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  i  $\text{K}^+$ ; obr. 5). Na médiu s NaCl nebo LiCl byla schopnost proteinů ZrNha1p a ScNha1p eliminovat kationty srovnatelná, nejvyšší toleranci vykazovaly buňky exprimující ZrSod2-22p. Tyto však, na rozdíl od buněk exprimujících ZrNha1p nebo ScNha1p, nebyly schopny růstu za vyššího obsahu KCl (v souladu s již publikovanými výsledky; Kinclová *et al.*, 2002). Nejvyšší tolerance ke KCl v médiu dosahovaly buňky exprimující ScNha1p.

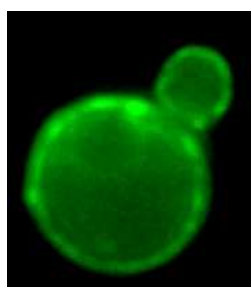


**Obr. 5.** Růst buněk *S. cerevisiae* BW31 exprimujících různé přenašeče na médiu YNB-NH<sub>4</sub> obsahujícím zvýšené koncentrace různých solí.

### 5.3.2.3.2. Lokalizace ZrNha1p v buňkách *S. cerevisiae* BW31

Abychom ověřili, že ZrNha1p je přenašečem plasmatické membrány a ne vnitrobuněčných organel, byla na 3' konec genu *ZrNHA1* připojena sekvence GFP tak, aby při expresi genu v buňkách vznikl fúzní protein. Toto bylo provedeno tak, že byl gen vložen do plasmidu pGRU1 pod kontrolou promotoru *ScNHA1*. Buňky *S. cerevisiae* nesoucí plasmid pGRU1\_ZrNHA1 pak obsahovaly fúzní protein ZrNha1p-GFP.

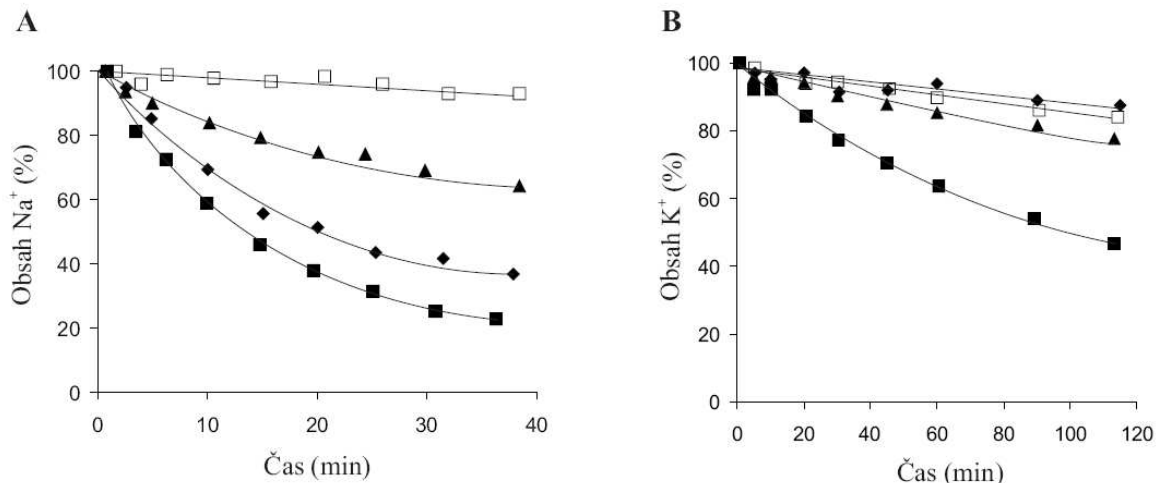
Bylo potvrzeno, že GFP neovlivnil aktivitu proteinu, protože tolerance buněk exprimujících fúzní protein byla totožná s tolerancí buněk exprimujících nezačleněný ZrNha1p. Lokalizace ZrNha1p-GFP v buňkách rostoucích v médiu YNB-NH<sub>4</sub> bez přidaných solí byla zjištěna fluorescenční mikroskopií. Obr. 6 ukazuje, že protein je lokalizován poblíž buněčného povrchu, a nikoli v membránách vnitrobuněčných. Tento výsledek je potvrzením, že protein ZrNha1p je přenašečem plasmatické membrány.



**Obr. 6.** Lokalizace proteinu ZrNha1p značeného GFP v buňkách *S. cerevisiae*.

### 5.3.2.3.3. Výstup kationtů z buněk *S. cerevisiae* BW31 exprimujících *ZrNHA1*

Pro ověření, že zvýšená tolerance k solím buněk BW31 produkujících přenašeč *ZrNha1p*, patrná z obr. 5, byla skutečně způsobena exportem kationtů z buněk, jsme sledovali výstup sodných a draselných kationtů z buněk BW31 produkujících *ZrNha1p*. Funkčnost proteinu byla porovnána s aktivitou druhého antiportéru *Z. rouxii* (*ZrSod2-22p*), majícího úzkou substrátovou specifitu, a proteinu *ScNha1p* kvasinky *S. cerevisiae*, transportujícího z buněk i draselné kationty. Měření výstupu a analýzu obsahu kationtů provedla Mgr. Klára Papoušková prostřednictvím metody plamenové atomové absorpční spektrofotometrie (Kinclová *et al.*, 2001b; obr. 7).



**Obr. 7.** Výstup sodných (A) a draselných (B) kationtů z buněk *S. cerevisiae* BW31 produkujících různé  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportéry plasmatické membrány. □ Buňky transformované YEp352 (negativní kontrola), ■ buňky produkující *ScNha1p*, ◆ buňky produkující *ZrSod2-22p*, ▲ buňky produkující *ZrNha1p*.

Z obr. 7A je patrné, že v buňkách exprimujících kterýkoli z antiportních proteinů dochází k výraznému exportu sodných kationtů (obsah  $\text{Na}^+$  v buňkách postupně klesá). Aktivita *ZrNha1p* je přitom nižší než aktivita druhých dvou přenašečů, nejvyšší aktivitu vykazuje přenašeč *ScNha1p*. Nižší výstup sodných kationtů z buněk exprimujících *ZrSOD2-22* než z buněk exprimujících *ScNHA1* je v souladu s již publikovanými výsledky (Kinclová *et al.*, 2002).

Z obr. 7B je patrné, že nepatrný výstup draselných kationtů z buněk byl naměřen i v případě buněk exprimujících *ZrSOD2-22*, jehož produkt nerozpoznává  $K^+$  jako substrát, a z buněk obsahujících pouze prázdný plasmid YEp352. Mgr. Papoušková sestavila tabulku, která ukazuje průměrný úbytek draselných kationtů z buněk exprimujících různé přenašeče za dobu měření 120 min (tab. 4).

**Tab. 4.** Průměrná ztráta  $K^+$  z buněk *S. cerevisiae* BW31 produkujících různé antiportéry během 120 min.

Přenašeč	Průměrná ztráta $K^+$ (nmol/mg suché váhy)
Žádný (YEp352)	96,63 ± 2,54
<i>ScNha1p</i>	290,07 ± 26,29
<i>ZrSod2-22p</i>	70,85 ± 3,70
<i>ZrNha1p</i>	160,00 ± 10,78

Tab. 4 dokazuje, že buňky neobsahující systém pro výstup  $K^+$  (obsahující prázdný plasmid YEp352 nebo exprimující *ZrSOD2-22*) ztrácí v průběhu 120 min přibližně 70 – 100 nmol  $K^+$ /mg suché váhy buněk. V tomto případě se zřejmě na úbytku  $K^+$  z buněk podílejí neznámé nespecifické transportéry. Buňky exprimující *ZrNHA1* exportují za 120 min přibližně 1,7 až 2,3krát více draselných kationtů než obě negativní kontroly. Nejvyšší výstup draselných kationtů byl v souladu s výsledky kapkových testů naměřen u buněk exprimujících *ScNHA1*. I zdánlivě pomalý výstup  $K^+$  z buněk naměřený u buněk obsahujících *ZrNha1p* je zřejmě zcela dostačující pro umožnění růstu buněk za přítomnosti vyšších koncentrací  $K^+$  v médiu (viz obr. 5).

Získané výsledky potvrzují, že zvýšená tolerance k přítomnosti NaCl a KCl kmene BW31 produkujícího *ZrNha1p* v porovnání s negativní kontrolou (obr. 5) je dána aktivním exportem sodných resp. draselných kationtů z buněk *S. cerevisiae*.

Výše uvedené výsledky ukazují funkci přenašečů exprimovaných heterologně v *S. cerevisiae*. Abychom zjistili, zda tyto proteiny zastávají v *Z. rouxii* stejné funkce, jako když jsou heterologně exprimovány v *S. cerevisiae*, studovali jsme podíl přenašečů na halotoleranci buněk *Z. rouxii* prostřednictvím sledování fenotypu delečních mutantů.

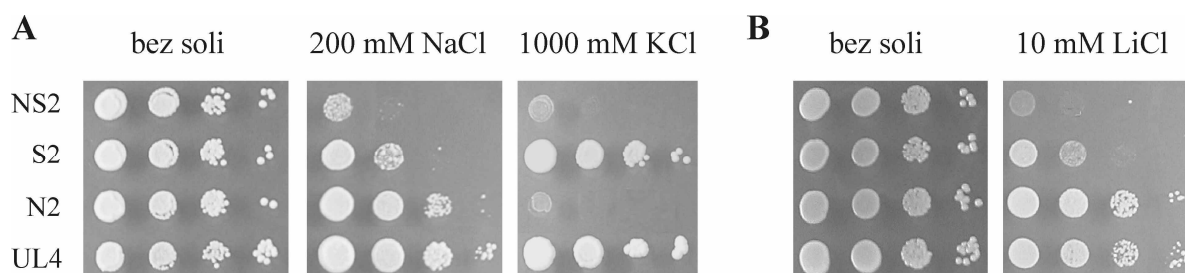
#### 5.3.2.4. Delece genů *ZrSOD2-22* a *ZrNHA1* v *Z. rouxii*

Ve kmeni *Z. rouxii* UL4 byly pomocí metody využívající deleční kazety *loxP-kanMX-loxP* (viz publikace č. 4) vytvořeny delece genů *ZrSOD2-22* a/nebo *ZrNHA1*, a byly tak připraveny mutantní kmeny *ura3 Zrsod2-22Δ::loxP* (S2), *ura3 Zrnha1Δ::loxP* (N2) a *ura3 Zrsod2-22Δ::loxP Zrnha1Δ::loxP* (NS2). Pro přípravu delečních kazet byly využity oligonukleotidy SOD2-22kanf a SOD2-22kanr (pro delecí *ZrSOD2-22*) a NHA1kanf a NHA1kanr (pro delecí *ZrNHA1*; viz kap. 4.2.2. tab. 1). Delece genů byly ověřeny prostřednictvím PCR.

#### 5.3.2.5. Vliv delecí *ZrSOD2-22* a *ZrNHA1* na halotoleranci buněk *Z. rouxii*

Podíl přenašečů *ZrSod2-22p* a *ZrNha1p* na halotoleranci buněk *Z. rouxii* byl sledován prostřednictvím růstu delečních mutantů S2, N2 a NS2 za přítomnosti solí NaCl a KCl (200 – 2000 mM) na bohatém médiu YPG a na minimálním médiu YNB-NH<sub>4</sub> s uracilem. Růst mutantů v přítomnosti LiCl (10 – 60 mM) byl sledován pouze na médiu YNB-NH<sub>4</sub> s uracilem, protože již velmi mírná koncentrace LiCl (10 mM) v médiu YPG znemožňovala růst rodičovského kmene *Z. rouxii* UL4, a tedy i od něj odvozených mutantních kmenů. Tento rozdíl v toleranci k LiCl buněk rostoucích v médiu YPG oproti buňkám rostoucím v médiu YNB-NH<sub>4</sub> spočívá zřejmě v tom, že médium YPG má vyšší pH (cca 6.2) než YNB-NH<sub>4</sub> (cca 4.8), tj. ve vnějším prostředí buněk rostoucích v médiu YPG se nachází nižší koncentrace protonů, a proteiny tak nemohou fungovat efektivně v důsledku snížené hnací síly gradientu protonů přes membránu, již ke své funkci využívají.

Obr. 8 ilustruje toleranci kmenů S2, N2 a NS2 ke zvýšené koncentraci solí v médiu. Delece *ZrSOD2-22* snížila schopnost buněk růst v médiu obsahujícím zvýšenou koncentraci NaCl nebo LiCl, ale neměla vliv na růst buněk v přítomnosti KCl (viz růst S2). Samotná delece *ZrNHA1* zhoršila schopnost růstu buněk v přítomnosti zvýšené koncentrace KCl, a do menší míry také NaCl nebo LiCl (viz růst N2; na vybraném obrázku není zhoršení růstu v médiu s LiCl patrné; rozdíl oproti kontrole byl zřejmý až za vyšších koncentrací LiCl, viz dále). Delece obou přenašečů zároveň růst buněk v médiích s NaCl nebo LiCl v porovnání s jednotlivými delecemi ještě více omezila (viz růst NS2).



Obr. 8. Růst kmenů *Z. rouxii* postrádajících *ZrSod2-22p* (S2), *ZrNha1p* (N2) nebo oba přenašeče (NS2) a kmene UL4 (pozitivní kontrola) za přítomnosti zvýšené koncentrace solí na médiu YPG (A) a YNB-NH<sub>4</sub> (B).

Delece *ZrSOD2-22* zhoršila schopnost růstu buněk v přítomnosti NaCl na obou typech médií (YPG i YNB-NH<sub>4</sub>) obdobně – i na médiu YNB-NH<sub>4</sub> bylo pozorováno obdobné omezení růstu jako na YPG (viz obr. 8). Na růst buněk v přítomnosti KCl neměla delece vliv ani na jednom typu médií, v médiu s LiCl (testován byl pouze růst v YNB-NH<sub>4</sub>) byl růst buněk *Zrsod2-22Δ* výrazně omezen (viz obr. 8).

Samotná delece *ZrNHA1*, na rozdíl od jejího zásadního vlivu na toleranci buněk ke KCl (na médiu YNB-NH<sub>4</sub> bylo pozorováno obdobné omezení růstu jako na médiu YPG, viz obr. 8), ovlivnila toleranci buněk k NaCl nebo LiCl jen mírně. Vliv na toleranci buněk k NaCl byl pozorován pouze na médiu YPG (buňky nerostly za vyšší než 400 mM koncentrace NaCl, oproti buňkám kontrolního rodičovského kmene UL4, který slabě roste až do koncentrace 1 M NaCl); na médiu YNB-NH<sub>4</sub> rostly buňky stejně dobře jako kontrolní kmen. V médiu YNB-NH<sub>4</sub> s LiCl bylo omezení růstu buněk se samotnou delecí *ZrNHA1* pozorováno až za velmi vysokých koncentrací LiCl (40 mM). Na médiu YNB-NH<sub>4</sub> s NaCl nebo LiCl je zřejmě efekt mutace *Zrnha1Δ* komplementován druhým z přenašečů. Médium YPG již vzhledem k vyššímu pH nedovoluje přenašeči *ZrSod2-22p* pracovat tak účinně jako médium YNB-NH<sub>4</sub>, a delece *ZrNHA1* se pak projeví zhoršeným růstem buněk v přítomnosti solí. Vliv delece *ZrNHA1* na růst buněk v médiích s NaCl a LiCl byl zásadní v buňkách, které již postrádaly i *ZrSOD2-22* (viz růst NS2, obr. 8).

Pro růst buněk v přítomnosti KCl byl tedy důležitý pouze *ZrNha1p*, nikoli *ZrSod2-22p*, a delece *ZrSOD2-22* měla větší vliv na toleranci buněk vůči Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> než delece *ZrNHA1* (což je v souladu s výsledky prezentovanými na obr. 5, kde je patrná vyšší schopnost proteinu

ZrSod2-22 eliminovat sodné nebo lithné kationty z cytoplasmy). Proteiny ZrNha1p a ZrSod2-22p se tedy ve funkci eliminace sodných a lithných kationtů z buněk navzájem doplňují.

Pro ověření, že zjištěný fenotyp mutantních kmenů *Z. rouxii* N2 a S2 byl způsoben právě chybějícím přenašečem, jsme provedli komplementaci mutace opětovným vložením genu na plasmidu.

#### **5.3.2.6. Komplementace mutací *Zrsod2-22Δ* a *Zrnha1Δ* vložením genu na plasmidu**

Vzhledem k tomu, že ani jeden z plasmidů YEp352 nebo pGRU1 nesoucí příslušné geny nebylo možno použít pro transformaci kmenů *Z. rouxii*, protože nejsou schopny se v buňkách *Z. rouxii* pomnožovat (Ushio *et al.*, 1988), byly geny *ZrSOD2-22* a *ZrNHA1* pod kontrolou promotoru *ScNHA1* vloženy do plasmidu pZEU (episomální plasmid *Z. rouxii* připravený pro v rámci této práce, viz publikace č. 4). Plasmidem pZEU\_*ZrNHA1* byl pak transformován kmen *Z. rouxii* N2 a plasmidem pZEU\_*ZrSOD2-22* kmen S2.

Byly provedeny kapkové testy růstu transformantů na médiích YNB-NH<sub>4</sub> se zvýšenou koncentrací solí. Transformované kmeny na těchto médiích rostly stejně dobře nebo i mírně lépe než kmen kontrolní (UL4 transformovaný plasmidem pZEU). Tento mírný rozdíl mohl být způsoben tím, že geny byly exprimované z mnohokopiového plasmidu pZEU, takže se v buňkách transformantů nalézalo více produktů genů kódujících přenašeče než v rodičovském kmeni.

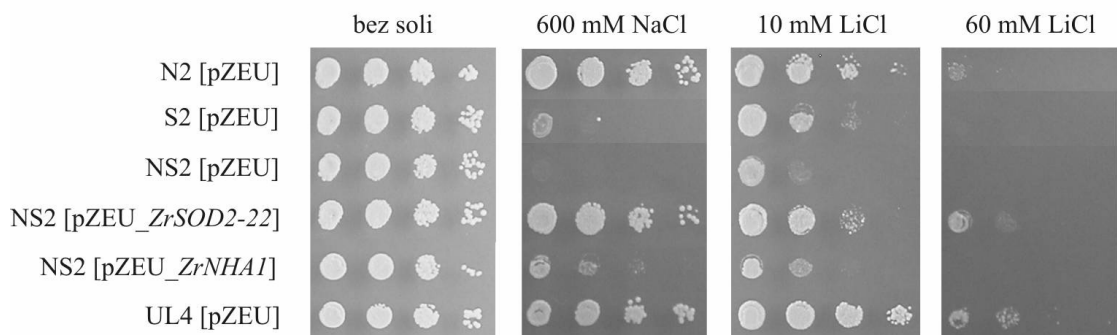
Tento výsledek potvrdil, že geny vnesené na plasmidu plně komplementovaly mutace *Zrsod2-22Δ* resp. *Zrnha1Δ*, a tedy že pozorovaný fenotyp citlivosti kmenů S2 a N2 vůči solím (viz obr. 8 a kap. 5.3.2.5.) je způsoben právě delecí genů *ZrSOD2-22* resp. *ZrNHA1*.

*ZrSod2-22p* byl důležitý pro růst buněk *Z. rouxii* v přítomnosti zvýšené koncentrace NaCl nebo LiCl, ale nikoli KCl. Protein ZrNha1p naopak udává buňkám toleranci ke všem třem testovaným kationtům, i když na toleranci buněk k Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> se podílí v menší míře než *ZrSod2-22p*. Totéž bylo pozorováno i při heterologní expresi obou proteinů v *S. cerevisiae* (viz obr. 5). Proteiny tak mají v *Z. rouxii* shodné substrátové specifity jako při heterologní expresi v *S. cerevisiae*.

### 5.3.2.7. Vzájemná komplementace funkcí *ZrSod2-22p* a *Zrnha1p*

Abychom zjistili, do jaké míry jsou přenašeče schopny komplementovat své funkce eliminace sodných nebo lithných kationtů, provedli jsme pokus, ve kterém jsme pozorovali, do jaké míry zvýšená exprese jednoho z přenašečů umožní komplementovat halosenzitivní fenotyp mutanta *Z. rouxii* NS2 (tj. postrádajícího oba přenašeče). Geny jsme v mutantním kmeni NS2 exprimovali z mnohokopiového plasmidu pZEU.

Kmen NS2 transformovaný plasmidem pZEU\_*ZrNHA1* tak obsahoval několik kopií genu *ZrNHA1* a žádnou *ZrSOD2-22*, a naopak kmen NS2 transformovaný plasmidem pZEU\_*ZrSOD2-22* obsahoval několik kopií genu *ZrSOD2-22* a žádnou *ZrNHA1*. Obr. 9. ukazuje schopnost růstu transformantů za vyšší koncentrace solí v médiu.



Obr. 9. Růst buněk kmene NS2 (*Zrnha1Δ Zrsod2-22Δ*) exprimujících *ZrNHA1* nebo *ZrSOD2-22* z plasmidu pZEU nebo obsahujících prázdný vektor pZEU (negativní kontrola) a kmenů N2 (*Zrnha1Δ*), S2 (*Zrsod2-22 Δ*) a UL4 obsahujících prázdný vektor pZEU (pozitivní kontroly) na médiu YNB-NH<sub>4</sub> obsahujícím zvýšené koncentrace NaCl nebo LiCl.

Z obr. 9 je zřejmé, že přenašeč *ZrNha1p* je schopen částečně komplementovat mutaci *Zrsod2-22Δ*: růst kmene NS2 obsahujícího plasmid pZEU\_*ZrNHA1*, tj. několik kopií genu *ZrNHA1* a žádnou *ZrSOD2-22*, je totiž v médiu obsahujícím 600 mM NaCl mírně lepší než růst kmene s delecí *ZrSOD2-22* (obsahujícího tedy pouze gen *ZrNHA1* na chromosomu; viz růst S2 [pZEU]). Obdobný efekt přítomnosti několika kopií *ZrNha1p* na růst kmene S2 [pZEU] za přítomnosti LiCl však nebyl pozorován. Přenašeč *ZrNha1p* tak fenotyp mutace *Zrsod2-22Δ* na médiu s LiCl není zřejmě vzhledem ke své nízké kapacitě schopen komplementovat, nicméně při absenci *ZrSOD2-22* je pro růst buněk v přítomnosti i nižších

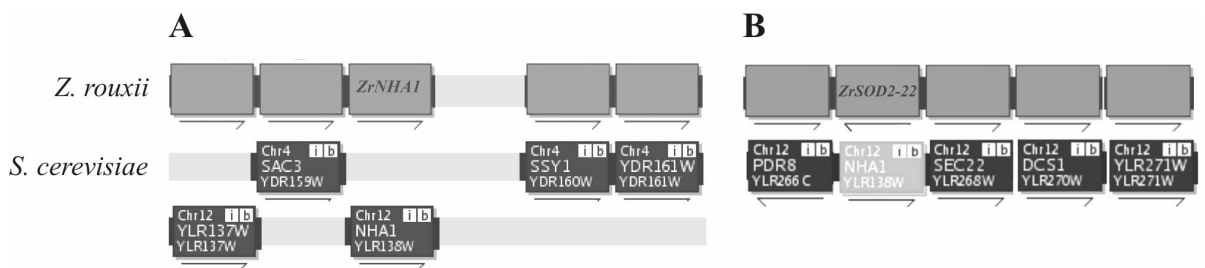


koncentrací LiCl jako je 10 mM vyžadován (viz rozdíl růstu kmenů S2 [pZEU] a NS2 [pZEU], obr. 9, a též viz obr. 8). Přítomnost více kopií genu *ZrSOD2-22* na druhou stranu do velké míry komplementuje mutaci *Zrnha1Δ*, což je vidět na růstu buněk za vysoké koncentrace LiCl (60 mM; srovnej růst kmenů NS2 [pZEU\_*ZrSOD2-22*] a UL4 [pZEU]). Při růstu na médiu s KCl vzhledem ke své substrátové specifitě omezené na Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> *ZrSod2-22p* fenotyp mutace *Zrnha1Δ* nekomplementoval.

Tyto výsledky ukazují, že zvýšená exprese *ZrNha1p* je schopna částečně komplementovat mutaci *Zrsod2-22Δ* při růstu buněk za vyšší koncentrace NaCl a zvýšená exprese *ZrSod2-22p* zase mutaci *Zrnha1Δ* při růstu buněk za vyšší koncentrace LiCl. Přenašeče jsou tak schopny se nejen funkčně vzájemně doplňovat, ale při růstu za zvýšené koncentrace NaCl a LiCl i alespoň částečně komplementovat své funkce. K přesnému určení funkcí přenašečů v buňkách *Z. rouxii* bude zapotřebí podrobnější analýzy (např. studium exprese genů za různých podmínek).

### 5.3.2.8. Fylogenetický vztah *ZrSOD2-22* a *ZrNHA1*

Abychom zjistili fylogenetický vztah genů *ZrNHA1* a *ZrSOD2-22*, porovnali jsme uspořádání (synteny) ORFů je obklopujících s uspořádáním homologů těchto ORFů a genu *ScNHA1* na chromosomech blízké příbuzné kvasinky *S. cerevisiae* (obr. 10).



**Obr. 10.** Srovnání synteny ORFů obklopujících geny *ZrNHA1* (A) a *ZrSOD2-22* (B) s uspořádáním jejich pravděpodobných homologů na chromosomech *S. cerevisiae*. Systém zobrazení byl převzat z Yeast Gene Order Browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob>). Obdélníky představují ORFy - velmi tmavě šedá barva představuje ORFy *S. cerevisiae* vykazující syntenické uspořádání se svými homology v *Z. rouxii*, šedá barva ORFy *Z. rouxii* a světle šedá barva gen *S. cerevisiae* nevykazující syntenické uspořádání se svým homologem v *Z. rouxii*; šipky znázorňují orientaci čtecích rámců; šedé spojnice obdélníků (ORFů) představují nekódující oblasti DNA.

Zjistili jsme, že uspořádání ORFů na úseku DNA obsahujícím *ZrNHA1* je podobné uspořádání pravděpodobných homologů kvasinky *S. cerevisiae* nacházejících se na chromosomech IV a XII. Fakt, že se homology ORFů nacházející se v *Z. rouxii* na jednom chromosomu nacházejí v *S. cerevisiae* na chromosomech dvou, je v souladu s hypotézou, že genom *Z. rouxii* ve své historii neprodělal celkovou duplikaci (viz kap. 2.4.1.)

ORFy nacházející se v okolí genu *ZrSOD2-22* vykazují stejné uspořádání jako jejich homology nacházející se v *S. cerevisiae* na chromosomu XII na jiném místě než je gen *ScNHA1*. Obr. 10 tedy naznačuje, že gen *ZrSOD2-22* patrně vznikl duplikací předka genu *ZrNHA1*, a inzercí kopie na jiné místo genomu. Nejnovější data analýzy genomu *Z. rouxii* (veřejnosti zatím nepřístupná databáze Génolevures 3) potvrzují, že geny *ZrNHA1* a *ZrSOD2-22* leží každý na jiném chromosomu.

### 5.3.2.9. Závěr

V této kapitole dizertační práce jsme zjistili, že  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -transportní protein *Z. rouxii* *ZrSod2-22p*, který byl dosud studován pouze prostřednictvím heterologní exprese v *S. cerevisiae*, umožňuje buňkám *Z. rouxii* růst za vyšších koncentrací NaCl nebo LiCl, ale nemá vliv na růst buněk za vyšších koncentrací KCl. Tím jsme potvrdili jeho funkci v eliminaci sodných nebo lithných, ale nikoli draselných kationtů z buněk, v souladu s dříve popsanou aktivitou tohoto přenašeče heterologně exprimovaného v buňkách *S. cerevisiae* (Kinclová *et al.*, 2002).

Prohledáním dosud neanotované databáze Génolevures 3 obsahující kompletní sekvenci genomu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> jsme našli gen kódující nový  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -transportní protein *Z. rouxii*. Gen jsme nazvali *ZrNHA1* na základě sekvenční podobnosti jím kódovaného proteinu s *ScNha1p*. Protein *ZrNha1p* jsme funkčně charakterizovali jako přenašeč plasmatické membrány, který umožňuje růst buněk *Z. rouxii* za vyšších koncentrací KCl, NaCl i LiCl. Analýza transportní kapacity a fenotypu buněk *S. cerevisiae* exprimujících *ZrNHA1* potvrdila funkci přenašeče v eliminaci všech třech typů kationtů (tj.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Li}^+$ ) z buněk.

Analýza delečních mutantů *Z. rouxii* postrádajících *ZrSod2-22p* a/nebo *ZrNha1p* ukázala, že na toleranci buněk *Z. rouxii* k NaCl či LiCl se podílí *ZrSod2-22p* do větší míry než *ZrNha1p*. Totéž ukázalo i sledování fenotypu buněk *S. cerevisiae* exprimujících tyto přenašeče

a měření transportní kapacity pro  $\text{Na}^+$  buněk *S. cerevisiae* obsahujících *ZrNha1p*, která se ukázala být slabší než kapacita buněk *S. cerevisiae* obsahujících *ZrSod2-22p*.

Porovnáme-li transportní kapacitu obou přenašečů *Z. rouxii* a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportéru *S. cerevisiae* *ScNha1p*, jako nejúčinnější systém transportující sodné i draselné kationty se ukázal být *ScNha1p* (*ZrSod2-22p* netransportuje  $\text{K}^+$  vůbec). I zdánlivě pomalý výstup kationtů z buněk naměřený u buněk obsahujících *ZrNha1p* však umožnil růst buněk za přítomnosti vyšších koncentrací solí v médiu. *ZrSod2-22p* ze všech tří transportérů nejúčinněji zajistil růst buněk *S. cerevisiae* ve vysoké koncentraci  $\text{NaCl}$  nebo  $\text{LiCl}$ .

Sledování fenotypu delečních mutantů dále ukázalo, že oba přenašeče *Z. rouxii* se funkčně doplňují a mohou částečně komplementovat své funkce v eliminaci sodných nebo lithných kationtů z buněk.

Analýza uspořádání genů na chromosomech naznačila, že *ZrSOD2-22* patrně vznikl duplikací předka genu *ZrNHA1*, a jeho inzercí na jiné místo genomu.

Kvasinka *Z. rouxii* (kmen CBS 732<sup>T</sup>) tedy obsahuje kromě proteinu *ZrSod2-22p* eliminujícího z buněk toxické kationty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  (tj. s úzkou substrátovou specifitou) i další přenašeč z rodiny  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportérů plasmatické membrány (*ZrNha1p*), který transportuje kromě  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  i  $\text{K}^+$  (tj. má širokou substrátovou specifitu), a může se tak v buňkách podílet na udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $\text{K}^+$ , stálého buněčného objemu nebo pH cytoplasmy.

Přítomnost dvou typů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiportních systémů (jednoho s úzkou a druhého se širokou substrátovou specifitou) byla již detekována ve dvou druzích kvasinek - *Y. lipolytica* (Papoušková a Sychrová, 2006) a *S. pombe* (Papoušková a Sychrová, 2007). Přenašeče těchto dvou druhů však byly studovány pouze prostřednictvím heterologní exprese v *S. cerevisiae*. *Z. rouxii* tak představuje první kvasinku, ve které byla funkce obou antiportních systémů charakterizována.

## 5.4. Sekvence a anotace genomu *Z. rouxii*

Během projektu Génolevures 3 byla sekvenována genomová DNA čtyř kvasinkových druhů, *Z. rouxii*, *S. kluyveri*, *K. thermotolerans* a *K. lactis*. Pro každý druh byly vytvořeny plasmidové knihovny obsahující inzerty o velikosti 3 - 5 kbp, které byly sekvenovány metodou „shotgun“ (Dujon *et al.*, 2004). Na základě překrývajících se sekvencí inzerťů byly fragmenty uspořádány do úseků odpovídajících chromosomům. Kde toho bylo zapotřebí (např. v případě úseků obsahujících repetitivní sekvence), bylo pro zjištění návaznosti sekvencí využito knihoven připravených v umělých bakteriálních chromosomech (BAC). Byly identifikovány geny a funkční elementy DNA. Veškeré predikce vytvářel počítačový program vyvinutý speciálně pro potřeby projektu. K predikci funkce translačních produktů program využíval srovnání se známými proteiny *S. cerevisiae* a dalších kvasinek, jejichž DNA byla sekvenována v projektu Génolevures 2. Nalezené homologie pak vedly k seřazení nově identifikovaných ORFů představujících pravděpodobně strukturní geny do funkčních rodin (spolu s již známými geny). Poté následovala anotace manuální, tj. informace získané prostřednictvím počítačového programu byly ověřovány a doplňovány konkrétní osobou, členem konsorcia. Tyto manuální anotace byly rozděleny do několika fází. Fáze jedna se zabývala anotacemi funkčních rodin vytvořených programem. Fáze dva se zabývala anotací identifikovaných ORFů, které netvořily funkční rodiny. Nezávisle na těchto dvou fázích probíhaly anotace funkčních elementů DNA (tj. funkčních úseků nekódujících proteiny). V době sepsání této dizertační práce byl proces anotací v závěrečné fázi.

Součástí práce bylo nejprve připravit genomovou DNA *Z. rouxii* pro potřeby sekvenování. Samotná sekvenace pak byla provedena v rámci centra Génoscope v Paříži (partner projektu Génolevures). Získané sekvence byly členům konsorcia Génolevures zpřístupněny v neveřejné databázi. Z následného procesu anotací se autorka této dizertační práce podílela na fázi jedna, tj. na úpravě anotací funkčních rodin navržených programem.

### 5.4.1. Příprava DNA *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> pro sekvenaci

Buňky kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> byly napěstovány v bohatém médiu YPG a byla izolována genomová DNA v agarozových bločcích metodou přípravy DNA k analýze karyotypu prostřednictvím PFGE, tj. způsobem, který umožňuje izolaci kompletních

nepoškozených chromosomů (nedochází ke zlomům). Připravená DNA byla odeslána do centra Génoscope k sekvenování.

## 5.4.2. Anotace

Manuální anotace genomů kvasiek *Z. rouxii*, *S. kluyveri*, *K. lactis* a *K. thermotolerans* byly prováděny na serveru Génolevures, k němuž byl přístup chráněn heslem. Každý člen konsorcia Génolevures, který se účastnil anotací fáze 1, měl přiděleno několik desítek funkčních rodin, dohromady tvořících tzv. „lot“ (obr. 11).

The screenshot shows the Génolevures Curation interface. On the left, there is a search and creation form. On the right, a table displays the progress of various annotation lots across three phases: Phase 1, Phase 1.1, and Phase 2. Each lot is represented by a horizontal bar where green indicates manually verified annotations and red indicates those not yet verified. Lot 11 is highlighted with a red circle.

Phase 1	Phase 1.1	Phase 2
lot_1	lot_15bis	lot_Saki0H
lot_2	lot_10bis	lot_Zyro0G
lot_0	lot_20bis	lot_Klla0E
lot_12	lot_19bis	lot_Saki0F
lot_3	lot_21bis	lot_Klla0F
lot_13	lot_18bis	lot_Klla0C
lot_17	lot_14bis	lot_Saki0B
lot_14	lot_16bis	lot_Zyro0C
lot_4	lot_7bis	lot_Saki0A
lot_15	lot_13bis	lot_Klh0G
lot_20	lot_9bis	lot_Klh0C
lot_21	lot_8bis	lot_Zyro0B
lot_7	lot_12bis	lot_Saki0C
lot_8	lot_17bis	lot_Klla0A
lot_19	lot_1bis	lot_Saki0D
lot_bis	lot_3bis	lot_Klla0A
lot_new	lot_2bis	lot_Zyro0D
lot_9	lot_11bis	lot_Klh0B
lot_11	lot_4bis	lot_Zyro0A
lot_18	lot_6bis	lot_Saki0E
lot_5	lot_0bis	lot_Saki0G
lot_16	lot_5bis	lot_Klla0B
lot_10		lot_Zyro0E
lot_6		lot_Zyro0E
		lot_Klla0D
		lot_Klh0D
		lot_Klh0H
		lot_Klh0E
		lot_Klh0F

**Obr. 11.** Anotace fáze 1 - úvodní strana obsahující grafické zobrazení probíhajících anotací. Sloupec Phase 1 odpovídá anotacím prováděným ve fázi 1. Sloupce Phase 1.1. a Phase 2 odpovídají následujícím etapám anotací Génolevures 3, které nebudou v této práci diskutovány. Poměr zelené a červené barvy symbolizuje poměr manuálně ověřených (zeleně) a dosud neověřených (červeně) anotací navržených programem. Autorka této práce se podílela na anotacích sekvencí zahrnutých do lot 11 (v červeném rámečku).

Poklepáním na odpovídající lot (v případě této dizertační práce č. 11) se zobrazil seznam genových rodin určených k manuální anotaci (Obr 12.).

### Curation todo list "lot.11"

Phase 1

demontigny@gem.u-strasbg.fr

TO DO (1)	s·c·r·l·t·k·d·y	DONE (152)	s·c·r·l·t·k·d·y
(001) <u>GLC.1437</u>	2 2 1 1 1 1 1 0	(001) <u>GLR.1633</u> : <u>vGLR.1633</u>	1 1 0 1 0 1 0 0
		(002) <u>GLR.1062</u> : <u>vGLR.1062</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(002) <u>GLR.2369</u> : <u>vGLR.2369</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(003) <u>GLR.978</u> : <u>vGLR.978</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(003) <u>GLC.1458</u> : <u>vGLC.1458</u>	1 1 2 2 2 1 1 1
		(004) <u>GLR.498</u> : <u>vGLR.498</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(004) <u>GLC.1473</u> : <u>vGLC.1473</u>	2 2 3 1 2 1 0 0
		(005) <u>GLR.2396</u> : <u>vGLR.2396</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(005) <u>GLC.1608</u> : <u>vGLC.1608</u>	1 1 0 1 1 1 1 0
		(006) <u>GLR.2514</u> : <u>vGLR.2514</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(006) <u>GLC.1402</u> : <u>vGLC.1402</u>	1 1 3 3 3 1 1 1
		(007) <u>GLR.1063</u> : <u>vGLR.1063</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(007) <u>GLR.2416</u> : <u>vGLR.2416</u>	1 1 1 0 1 1 0 1
		(008) <u>GLR.1198</u> : <u>vGLR.1198</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(008) <u>GLR.2515</u> : <u>vGLR.2515</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(009) <u>GLR.2628</u> : <u>vGLR.2628</u>	0 1 1 1 1 1 0 0
		(009) <u>GLC.1364</u> : <u>vGLC.1364</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(010) <u>GLR.2389</u> : <u>vGLR.2389</u>	0 1 1 1 1 1 0 0
		(010) <u>GLC.1012</u> : <u>vGLC.1012</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(011) <u>GLR.3363</u> : <u>vGLR.3363</u>	0 1 0 1 1 1 0 0
		(011) <u>GLC.1031</u> : <u>vGLC.1031</u>	1 1 1 1 1 1 1 2
		(012) <u>GLR.3451</u> : <u>vGLR.3451</u>	1 0 1 0 0 1 0 0
		(012) <u>GLC.1257</u> : <u>vGLC.1257</u>	1 1 1 1 1 1 0 1
		(013) <u>GLR.1325</u> : <u>vGLR.1325</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(013) <u>GLR.2368</u> : <u>vGLR.2368</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(014) <u>GLR.333</u> : <u>vGLR.333</u>	1 1 1 1 0 1 0 1
		(014) <u>GLC.1373</u> : <u>vGLC.1373</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(015) <u>GLR.973</u> : <u>vGLR.973</u>	0 0 11 6 7 2 0 0
		(015) <u>GLC.1525</u> : <u>vGLC.1525</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(016) <u>GLR.548</u> : <u>vGLR.548</u>	1 1 1 1 1 1 0 0
		(016) <u>GLC.1251</u> : <u>vGLC.1251</u>	1 1 1 1 1 1 0 1
		(017) <u>GLR.197</u> : <u>vGLR.197</u>	1 1 1 1 1 1 1 1
		(017) <u>GLR.610</u> : <u>vGLR.610</u>	1 1 1 1 1 1 2 1
		(018) <u>GLR.981</u> : <u>vGLR.981</u>	1 1 1 1 1 1 1 1

**Obr. 12.** Seznam funkčních rodin připravených k anotacím patřících do lot 11. Levý sloupeček „TO DO“ je seznamem funkčních rodin, jež dosud nebyly manuálně anotovány, pravý „DONE“ je soupisem již ověřených anotací. Sloupečky s·c·r·l·t·k·d·y. značí, v kolika oblastech (lokusech) DNA v daném organismu (s, *S. cerevisiae*; c, *C. glabrata*, r., *Z. rouxi*; l, *S. [Lachancea] kluyveri*; t, *K. thermotolerans*, k, *K. lactis*, d, *D. hansenii*, y, *Y. lipolytica*) byly programem identifikovány ORFy kódující protein patřící do příslušné funkční rodiny. V tomto konkrétním případě zbývala jediná rodina, u jejíchž členů nebyla manuálně ověřena správnost anotací navržených programem (GLC.1437, v červeném rámečku).

Při poklepání na název rodiny se zobrazil seznam úseků DNA, ve kterých byly identifikovány ORFy patřící do rodiny, a srovnání proteinových sekvencí již známých členů rodiny (obr. 13.).

### GLC.1437

This group contains 9 genes or gene loci.

[Refresh](#)

The genes in this group also refer to 1 other group: [vGLC.1437](#)

The included and excluded genes overlap alignments to 2 other groups: [GLC.1436](#) [GLC.2028](#)

This group is in [lot.11](#). It is derived from GL2 family [GLC.1437](#).

T-DIFFER: Version\_4.45 (Sun Jun 25 23:45:47 2006)  
 Cédric Notredame  
 CPU TIME: 31 sec.  
 SCORE=53

\*  
 \*\* AVG \*\*

CAGL0G01607g	: 55
GLC1437343g	: 55
DEHA0C18150g	: 51
YIL095W	: 51
YNL020C	: 55

CAGL0G02607g  
 CAGL0G03432g  
 DEHA0C18150g  
 YIL095W  
 YNL020C

cons

- Actions**
- ♦ Mark group GLC.1437 as [DONE](#)
  - ♦ View the [multiple alignment](#) in this window
  - ♦ Show [sequences](#) for GLC.1437
  - ♦ [Search again](#) for members and realign (refresh)

Validate these annotations // Select all · Clear all · Reset // Copy GO terms \*

Copy group define

**Homolog group annotation**  (change name here)

Define (for the family as a whole) GO terms (add terms here)

homolog group vGLC.1437 derived from GLC.1437 protein kinase activity  
kinase activity  
catalytic activity

<input type="checkbox"/>	<b>Locus 1 -- <a href="#">locus.Klla0E.3768</a></b> -- Please validate a gene in <a href="#">locus.Klla0E.3768</a> before continuing member vGLC.1437	
<input type="checkbox"/>	<b>Locus 2 -- <a href="#">locus.Klh0G.10866</a></b> -- Please validate a gene in <a href="#">locus.Klh0G.10866</a> before continuing member vGLC.1437	
<input type="checkbox"/>	<b>Locus 3 -- <a href="#">locus.Saki0E.15378</a></b> -- Please validate a gene in <a href="#">locus.Saki0E.15378</a> before continuing member vGLC.1437	
<input type="checkbox"/>	<b>Locus 4 -- <a href="#">locus.Zyro0A.19269</a></b> -- Please validate a gene in <a href="#">locus.Zyro0A.19269</a> before continuing member vGLC.1437	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Gene 5 -- <a href="#">CAGL0G01607g</a></b> in groups <a href="#">vGLC.1437</a> , <a href="#">GLC.1437</a> member vGLC.1437	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Gene 6 -- <a href="#">CAGL0J03432g</a></b> in groups <a href="#">vGLC.1437</a> , <a href="#">GLC.1437</a> member vGLC.1437	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Gene 7 -- <a href="#">DEHA0C18150g</a></b> in groups <a href="#">vGLC.1437</a> , <a href="#">GLC.1437</a> member vGLC.1437	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Gene 8 -- <a href="#">YIL095W</a></b> in groups <a href="#">vGLC.1437</a> , <a href="#">GLC.1437</a> member vGLC.1437	
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Gene 9 -- <a href="#">YNL020C</a></b> in groups <a href="#">vGLC.1437</a> , <a href="#">GLC.1437</a> member vGLC.1437	

Validate these annotations // Select all · Clear all · Reset // Copy GO terms \*

**Obr. 13.** Funkční rodina GLC.1437. V levé horní části je stručný popis rodiny, v pravém horním rámečku pak srovnání sekvencí translačních produktů již známých genů zařazených do rodiny. V dolní části je seznam členů rodiny. Červeně jsou zvýrazněny rámečky informující o oblastech DNA, ve kterých program identifikoval ORFy, jejichž anotace nebyly dosud manuálně ověřeny (Locus 1 – 4). Název lokusu obsahuje zkratku názvu druhu, ze kterého pochází, a pozici na chromosomu. Zbývajících 5 členů rodiny jsou již známé geny ostatních druhů kvasinek, jejichž genomy byly anotovány v projektu Génolevures 2 (Gene 5 - 9). V případě této skupiny byl tedy v každém ze čtyř druhů analyzovaných v Génolevures 3 identifikován jeden lokus DNA obsahující ORF zařazený na základě homologie sekvencí do této funkční rodiny.

Při poklepání na název lokusu určeného k manuální anotaci se zobrazila informace o jeho umístění na chromosomu a o nalezených „modelech“ genu, tj. nalezených ORFech. Program o přítomných ORFech referuje jako o nalezených mRNA. V mnoha případech program identifikoval pouze jeden ORF, a tedy navrhl jeden model genu (jednu mRNA), v mnoha jiných případech však program identifikoval dva a více modelů; např. navrhl přítomnost intronu a několik možností jeho umístění (navržena tedy byla přítomnost několika různých mRNA). Úkolem pracovníka provádějícího manuální anotace pak bylo vybrat „správný“ model genu. Pokud program identifikoval více možností vytvoření mRNA, a tedy i více možností utvoření proteinu, byla vybrána ta mRNA, jež pokrývala co možná nejdelší oblast lokusu, a jejíž translační produkt byl nejpodobnější ostatním členům rodiny. Proces anotací bude v této práci detailně popsán na příkladě, ve kterém program identifikoval v lokusu mRNA bez intronů. Takovým příkladem je lokus Klla0E.3768 (obr. 14. a viz též obr. 13., kde se tento lokus nachází jako první v seznamu členů funkční rodiny GLC.1437).



locus Klla0E.3767 ←

**locus.Klla0E.3768**

Locus [Klla0E](#) from 756205 to 758634

Found 4 mRNA genes overlapping *locus.Klla0E.3768*.

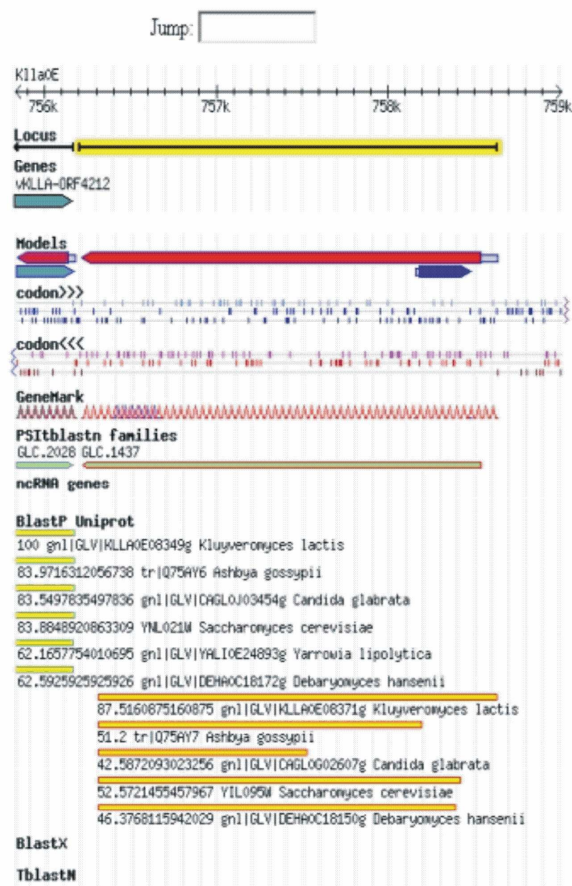
0 Validated genes

4 Gene models

• <a href="#">KLLA-ORF4209</a>	777 aa	53%
• <a href="#">KLLA-ORF4206</a>	125 aa	
• <a href="#">KLLA-ORF4208</a>	106 aa	
• <a href="#">KLLA-ORF4207</a>	100 aa	

Actions

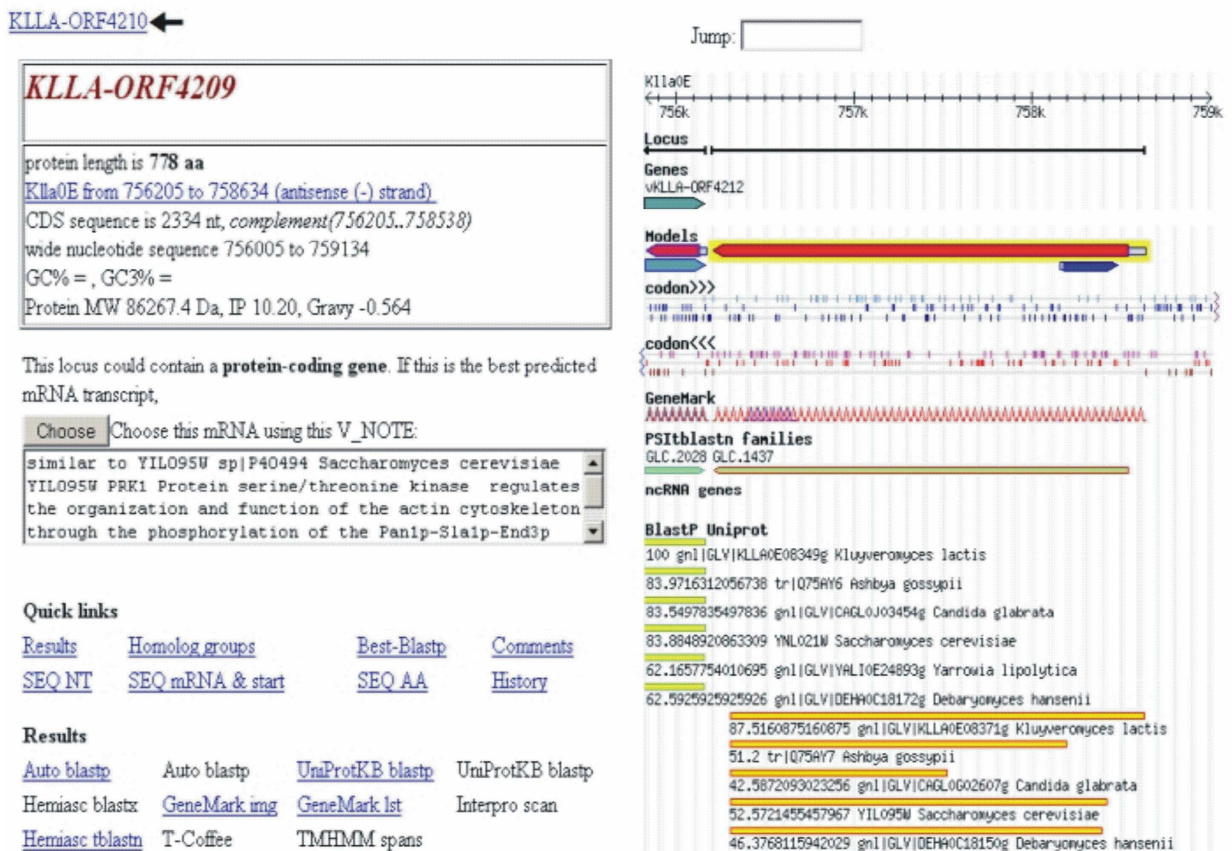
- Mark locus.Klla0E.3768 as [DONE](#)



Update image

**Obr. 14.** Locus *Klla0E.3768*. V levém rámečku je seznam navržených modelů genů (Gene models), tj. mRNA, které program identifikoval jako nacházející se v lokusu či do něj zasahující (celkem 4). Je udána také délka jimi kódovaných proteinů. Vpravo je pak zobrazení umístění modelů genů na DNA. Vpravo nahoře je graficky znázorněn chromosom, na kterém se lokus nachází. Anotovaná oblast lokusu je zvýrazněna žlutě. Pod ní jsou seřazeny identifikované a již manuálně anotované geny zasahující do lokusu (zde *Klla-ORF4212*), následují návrhy modelů genů. Modrá barva značí model nacházející se na řetězci 5'→3', červená na řetězci komplementárním (3'←5'). Údaje níže informují o rozložení všech ORFů v lokusu, o pravděpodobnosti, zda určitý ORF kóduje protein (grafické znázornění vytvořené programem GeneMark; <http://exon.gatech.edu/GeneMark>), a o nalezených homologiích v rámci genomů ostatních kvasinek (BlastP Uniprot). V tomto případě se ve žlutě vyznačeném úseku určeném k manuální anotaci nacházejí dva modely genu (dvě mRNA), jeden pokrývající celý úsek komplementárního řetězce, druhý, podstatně kratší, pokrývající část řetězce 5'→3'. Grafická informace z programu GeneMark naznačuje, že ona dlouhá mRNA (na rozdíl od krátké) bude pravděpodobně kódovat protein.

Poklepáním na konkrétní model genu (ve vybraném případě mRNA pokrývající celou délku lokusu Klla0E.3768, viz obr. 14) se zobrazil název ORFu (ve vybraném případě Klla-ORF4209) a informace o proteinu, který by vznikl translaací kódující sekvence (coding sequence, CDS). Program na základě srovnání proteinové sekvence s již známými proteiny ostatních druhů kvasinek navrhl, k jakému genu je identifikovaný ORF homologní, tj. jakou funkci by protein mohl v organismu zastávat (obr. 15.).



**Obr. 15.** Klla-ORF4209. Rámeček vlevo nahoře podává informace o vlastnostech CDS a kódovaného proteinu. Rámeček pod ním informuje, k jakému známému genu byla srovnáním sekvencí translačních produktů nalezena nejvyšší homologie (zde byl gen vyhodnocen jako podobný YIL095w *S. cerevisiae*). Níže jsou pak odkazy na vlastnosti sekvence a její srovnání s jinými sekvencemi. V pravé části obrázku je žlutě zvýrazněn model genu, jinak je pravá část totožná s pravou částí obr. 14.

Úkolem pracovníka provádějícího anotace bylo vybrat správný model genu a ověřit, zda je počítačem určená podobnost ORFu se známým genem vskutku korektně stanovená, popřípadě data opravit. K tomu sloužily informace poskytnuté srovnáním sekvence identifikovaného proteinu se známými proteiny z databáze UniProtKB. Tímto srovnáním bylo např. možno zjistit, zda program korektně navrhl začátek proteinové sekvence (tj. např. nezaměnil počáteční aminokyselinu methionin [Met] za jiný Met nacházející se uvnitř proteinového řetězce, např. kvůli tomu, že „přehlédl“ intron na 5' konci). Dále bylo možno zjistit, zda jsou si proteiny podobné v celé své délce, a zastávají tak patrně v organismu podobnou funkci, nebo zda nalezené homologie pokrývají jen určité oblasti, a jinak se jedná o proteiny odlišné (případ funkčních domén, např. transmembránových). Procentuální vyčíslení shody (identity) aminokyselinových sekvencí nově identifikovaného proteinu a jemu nejvíce podobného známého proteinu z jiné kvasinky určovaly, jakým způsobem bude nalezená podobnost zanesena do databáze. Pokud byla shoda vyšší než 80 %, do rámečku informujícího o nalezených homologiích se zapsalo „highly similar to“ (velmi podobný); v případě, že shoda byla mezi 50 - 80 %, bylo uvedeno „similar to“ (podobný) a při shodě 30 - 50 % bylo zapsáno „weakly similar to“ (vykazující malou míru podobnosti s). Pokud byla shoda nalezena jen v určitých oblastech proteinu (případ funkčních domén), byla nalezená homologie uvedena jako „some similarities with“ (zčásti podobný).

Nově identifikované sekvence v rámci funkčních rodin obvykle nacházely své homologní protějšky hned v několika ze známých druhů kvasinek. Jako referenční byl v takovém případě brán protein (resp. gen) kvasinky *S. cerevisiae*. Pouze pokud byl anotovaný protein výrazně podobnější proteinu z jiné kvasinky než *S. cerevisiae*, byl v rámečku popisujícím nalezenou homologii uveden gen této kvasinky.

Po ověření (případně opravení) anotací provedených programem byla informace o nově identifikovaném genu uložena (poklepnutím na tlačítko „choose“ v rámečku informujícím o nalezené homologii, viz obr. 15.). Anotace genu tak byla ukončena, a mohlo být přikročeno k anotaci dalšího člena rodiny. Po ověření anotací u všech členů funkční rodiny byly pak uloženy informace o celé rodině (poklepnutím na tlačítko „validate these annotations“, viz obr. 13. úplně dole vlevo). Ta se pak na úvodní stránce přesunula ze sloupečku „TO DO“ do sloupečku „DONE“ (viz obr. 12.).

Po dokončení anotací fáze 1 (anotace genových rodin) proběhla fáze 2 (anotace ORFů, které netvořily rodiny). Anotace ostatních funkčních elementů probíhaly nezávisle na těchto dvou fázích. V době sepsání dizertační práce byl proces anotací v závěrečné fázi. Po dokončení procesu anotací bude databáze veřejně zpřístupněna a informace o sekvencích obdržené v průběhu anotací budou konsorciu Génolevures sloužit jako data pro vypracování srovnávacích studií majících za cíl odhalit mechanismy podílející se na molekulární evoluci kvasinkových genomů, a potažmo tak evoluci eukaryotického genomu vůbec.

## 6. Souhrn

V této dizertační práci jsme se pokusili přispět k lepšímu porozumění vlastnostem osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii*.

Prvotním úkolem bylo připravit pro kvasinku *Z. rouxii* soubor metod genového inženýrství, které byly dosud velmi limitované, a neumožňovaly tak studium specifických vlastností *Z. rouxii*, k nimž patří právě vysoká osmotolerance.

Podařilo se nám vytvořit protokol pro účinnou transformaci *Z. rouxii* elektroporací. Připravili jsme auxotrofní mutantní kmeny odvozené od typového kmene *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> obsahující různé kombinace mutací *ura3*, *leu2* nebo *ade2*. Izolovali jsme a funkčně charakterizovali centromery *Z. rouxii* a připravili první centromerové vektory pro *Z. rouxii* obsahující různé auxotrofní selekční geny (*ScURA3*, *ZrLEU2*, *ZrADE2*) a polylinker. Vyhledali jsme dostupné informace o přirozeném plasmidu *Z. rouxii* pSR1, a na jejich základě využili část jeho sekvence pro konstrukci episomálních plasmidů *Z. rouxii*, obsahujících různé auxotrofní selekční geny (*ScURA3*, *ZrLEU2*, *ZrADE2*) a polylinker. Vytvořili jsme systém pro vícenásobnou delecí genů v *Z. rouxii* prostřednictvím deleční kazety *loxP-kanMX-loxP* namnožené PCR a plasmidu exprimujícího recombinasu *cre*. Ověřili jsme využití GFP pro lokalizaci proteinů v *Z. rouxii*, a pro tento účel připravili plasmid pZGFP. Zjistili jsme, že v *Z. rouxii* je možno použít gen *MPRI* *S. cerevisiae* jako pomocný selekční gen, a dále že v *Z. rouxii* nelze využít promotor *ScGAL1* pro regulovanou expresi genů, protože při růstu buněk na glukose není reprimován. Poznatky jsem publikovali či odeslali k publikování (viz publikace č. 1 - 4).

Připravili jsme tak soubor nástrojů umožňující v *Z. rouxii* expresi genů z různých plasmidů za pomoci různých druhů selekce, přípravu vícenásobných delečních mutantů a určení lokalizace proteinů v buňkách. Tento soubor byl vytvářen ve kmeni s genetickým pozadím CBS 732<sup>T</sup>, což je typový kmen *Z. rouxii*, jehož kompletní sekvence genomu bude v brzké době veřejně přístupná.

Typový kmen CBS 732<sup>T</sup> patří spolu s kmenem ATCC 42981 k nejčastěji studovaným kmenům *Z. rouxii*. Při optimalizaci transformačního protokolu pro *Z. rouxii* jsme zjistili, že deriváty těchto dvou divokých kmenů vyžadují odlišné podmínky pro rozvolnění jejich buněčných povrchů, což naznačovalo odlišné složení či strukturu buněčných stěn. Fakt, že k

úspěšné elektroporaci kmenů bylo zapotřebí buňky kultivovat za mírného solného stresu, naznačoval, že se budou vlastnosti osmotolerantní a vlastnosti buněčné stěny *Z. rouxii* navzájem ovlivňovat. Tyto dva divoké kmeny jsme proto porovnali z hlediska jejich vlastností týkajících se osmotolerance a složení a struktury buněčných stěn. Zjistili jsme, že kmen ATCC 42981 je osmotolerantnější než CBS 732<sup>T</sup>, produkuje více glycerolu, který je používán v kvasinkách jako osmoregulační látka, a, na rozdíl od kmene CBS 732<sup>T</sup>, je schopen glycerol asimilovat. Buňky méně osmotolerantního kmene CBS 732<sup>T</sup> měly rigidnější buněčnou stěnu než buňky osmotolerantnějšího ATCC 42981. Elasticitější stěna ATCC 42981 může pravděpodobně flexibilněji reagovat na změny osmotického tlaku, a tak přispívat k vyšší osmotoleranci tohoto kmene. ATCC také obsahoval více chromosomů (8) než CBS 732<sup>T</sup> (7), a jeho genom byl celkově větší. Námi zjištěné skutečnosti byly v souladu s nedávno publikovanou hypotézou, že kmen ATCC 42981 je ve skutečnosti kmenem hybridním (James *et al.*, 2005). Rozdíly nalezené ve vlastnostech dvou nejčastěji studovaných kmenů *Z. rouxii* jsme zpracovali do dvou publikací (viz publikace č. 5 a 6).

K osmotoleranci kvasinek výrazně přispívají udržováním iontové homeostáze proteiny s funkcí přenašečů alkalických kovů jako jsou Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry. Část dizertační práce byla proto věnována studiu těchto přenašečů kvasinek, zvláště pak *Z. rouxii*.

Pro zjištění významu konkrétních oblastí Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů kvasinek pro jejich funkci jsme porovnali sekvence Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportérů patnácti různých druhů kvasinek homologních k proteinům Nha1p, Nhx1p a Kha1p *S. cerevisiae* z hlediska jejich fylogenetické konzervovanosti. Identifikovali jsme konzervované aminokyselinové zbytky či celé motivy (zvláště na úrovni transmembránových domén), které vypovídají o významu těchto oblastí pro funkci přenašečů. Fylogenetická analýza ukázala, že proteiny Nhx1p jsou příbuzné savcím a rostlinným přenašečům, proteiny Kha1p jsou podobné bakteriálním přenašečům a proteiny Nha1p tvořili samostatnou skupinu. Recentní výsledky naznačují, že homology Nha1p se nacházejí i v lidském genomu (Brett *et al.*, 2005). Výsledky analýzy jsme publikovali (viz publikace č. 7).

Při vyhledávání genů kódujících Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiportéry v dostupných databázích obsahujících sekvenované genomy kvasinek jsme u dvou druhů, *S. pombe* a *Y. lipolytica*, zjistili přítomnost dvou genů kódujících tyto proteiny. Kolegyně Mgr. Klára Papoušková zjistila, že tyto kmeny obsahují každý vždy jeden přenašeč transportující pouze Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>, a

druhý transportující i  $K^+$ . Tyto přenašeče tak patrně hrají rozdílné role v buněčné fyziologii. V *Z. rouxii* byl dosud identifikován pouze přenašeč  $Na^+$  a  $Li^+$  (*ZrSod2-22p*), a proto bylo důvodné předpokládat, že i kvasinka *Z. rouxii* bude obsahovat  $Na^+/H^+$ -antiportér rozeznávající  $K^+$  jako svůj substrát. Využili jsme proto přístupu do zatím neveřejné databáze Génolevures 3 obsahující kompletní sekvenci genomu *Z. rouxii* pro vyhledání možných dalších genů kódujících  $Na^+/H^+$ -antiportéry. Identifikovali jsme nový  $Na^+/H^+$ -transportní protein *Z. rouxii*, který jsme nazvali *ZrNha1p*, a ten funkčně charakterizovali heterologní expresí v *S. cerevisiae*. Zjistili jsme, že má schopnost eliminovat z buněk jak sodné a lithné, tak i draselné kationty. Jelikož přenašeč *ZrSod2-22* byl dosud studován také pouze heterologní expresí v *S. cerevisiae*, sledovali jsme prostřednictvím nástrojů genového inženýrství vytvořených v této práci funkci obou transportérů přímo v *Z. rouxii*, abychom potvrdili jejich transportní specifitu zjištěnou v buňkách *S. cerevisiae*.

Potvrdili jsme, že přenašeč *ZrSod2-22p* je důležitý pro růst *Z. rouxii* v přítomnosti zvýšené koncentrace  $Na^+$  či  $Li^+$ , ale nikoli  $K^+$ , a naopak *ZrNha1p* je důležitý hlavně pro toleranci vysoké vnější koncentrace iontů  $K^+$ . Sledování fenotypu mutantů *Z. rouxii* s delecí těchto antiportérů ukázalo, že oba přenašeče *Z. rouxii* mohou částečně komplementovat své funkce v eliminaci sodných nebo lithných kationtů z buněk. Kvasinka *Z. rouxii* tak obsahuje kromě přenašeče s úzkou substrátovou specifitou (*ZrSod2-22p*), který zřejmě slouží hlavně k eliminaci toxických kationtů z buněk, též přenašeč se širokou substrátovou specifitou (*ZrNha1p*), jenž vzhledem ke své kapacitě exportovat draselné kationty hraje důležitou roli též v udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu nebo pH cytoplasmy. Analýzou synteny genů (tj. pořadí genů na chromosomu) jsme zjistili, že gen *ZrSOD2-22* vznikl patrně duplikací předka genu *ZrNHA1* a inzercí kopie do jiného místa genomu.

Poslední kapitola výsledkové a diskuzní části dizertační práce je věnována podílu autorky na průběhu sekvenace a anotace genomu *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup> v projektu Génolevures 3, který se v rámci studia evoluce eukaryotního genomu zabývá sekvenací a anotací genomů čtyř kvasinkových druhů patřících do *Kluyveromyces spp.* nebo tomuto rodu blízké příbuzných. Předci těchto druhů kvasinek se vši pravděpodobností neprodělali duplikaci celého genomu tak, jak tomu bylo u předka *S. cerevisiae* nebo *C. glabrata*, a z toho důvodu jsou evolučně

zajímavé. Data získaná během anotací budou veřejně přístupná a budou sloužit k analýze, jež má za cíl objasnit mechanismy mikroevoluce eukaryotického genomu.

Stanovené cíle práce (viz kap. 3) se podařilo splnit. Připravené nástroje genomového inženýrství budou sloužit k dalšímu studiu vlastností kvasničky *Z. rouxii* týkajících se osmotolerance, v případě oddělení Membránového transportu konkrétně antiportérů *ZrSod2-22* a *ZrNha1*, jejichž funkci v buňkách *Z. rouxii* bychom v budoucnu rádi podrobněji ozřejmili (např. sledováním regulace exprese příslušných genů či biogeneze/degradace jejich produktů za různých podmínek).

V brzké době dostupná celková sekvence genomu a v této práci vytvořený soubor nástrojů genomového inženýrství činí z kvasinky *Z. rouxii* ideální organismus pro studium osmotolerance, a z hlediska toho, že se jedná o kvasinku, která ve své evoluční historii neprodělala celkovou duplikaci genomu, i zajímavý model pro studium evoluce kvasinkového genomu.



## 7. Seznam použitých symbolů a zkratek

A	báze adenin
ADP	adenosindifosfát
ARS	autonomně se replikující sekvence
ATCC	americká kolekce typových kultur
ATP	adenosintrifosfát
AZC	L-azetidin-2-karboxylát
ARS	autonomně se replikující sekvence
BAC	umělý bakteriální chromosom
bp	páry bazí
CBS	holandská centrální databáze houbových kultur
CDE	úsek centromery s konzervovanou sekvencí
cDNA	deoxyribonukleová kyselina získaná umělým přepisem z mRNA
CDS	kódující sekvence
DMSO	dimethylsulfoxid
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol
EB	elektroporační pufr
FG	signální dráha filamentárního vegetativního růstu
GFP	zelený fluorescenční protein
HOG	signální dráha regulace syntézy glycerolu
kbp	stovky párů bazí
MAPK	mitogenně aktivovaná protein kinasa
MAT	párovací lokus
Met	aminokyselina methionin
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerasová řetězcová reakce
PEG	polyethylenglykol
PFGE	pulzní gelová elektroforeza

PKA	signální dráha protein kinasy A
PKC	signální dráha protein kinasy C
rDNA	ribozomální deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
STRE	stress response element
SVG	signální dráha sterilního vegetativního růstu
T	báze thymin
TE	pufř Tris-EDTA
TMS	transmembránová oblast
YAC	umělý kvasinkový chromosom
YEp	episomální kvasinkový plasmid
YRp	kvasinkový plasmid obsahující pouze ARS
YCp	centromerový kvasinkový plasmid

## 8. Seznam literatury

- Alani, E., Cao, L., Kleckner, N. (1987) A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**: 541-545.
- Alderton, A.J., Burr, I., Muhlschlegel, F.A., Tuite, M.F. (2006) Zeocin resistance as a dominant selective marker for transformation and targeted gene deletions in *Candida glabrata*. *Mycoses* **49**: 445-451.
- Ali, R., Brett, C.L., Mukherjee, S., Rao, R. (2004) Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem* **279**: 4498-4506.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., Loureiro-Dias, M.C. (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int J Food Microbiol* **56**: 191-197.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M., Nombela, C. (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Real, E., Wojda, I., Bebelman, J.P., Mager, W.H., Siderius, M. (2001) Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol Microbiol* **41**: 717-730.
- Araki, H., Jearnpipatkul, A., Tatsumi, H., Sakurai, T., Ushio, K., Muta, T., Oshima, Y. (1985) Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *J Mol Biol* **182**: 191-203.
- Araki, H., Oshima, Y. (1989) An autonomously replicating sequence of pSRI plasmid is effective in two yeast species, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **207**: 757-769.
- Arguelles, J.C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**: 217-224.
- Arnold, W.N. (1974) Expression of cryptic beta-fructofuranosidase in *Saccharomyces rouxii*. *J Bacteriol* **120**: 886-894.
- Astromskas, E., Cohn, M. (2007) Tools and methods for genetic analysis of *Saccharomyces castellii*. *Yeast* **24**: 499-509.

- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* **79**: 137-157.
- Bansal, P.K., Mondal, A.K. (2000) Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1* delta strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 81-88.
- Banuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**: 2749-2758.
- Banuelos, M.A., Ramos, J., Calero, F., Braun, V., Potier, S. (2002) Cation/H<sup>+</sup> antiporters mediate potassium and sodium fluxes in *Pichia sorbitophila*. Cloning of the *PsNHA1* and *PsNHA2* genes and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 1365-1372.
- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D. (1990) *Yeasts, characteristics and identification, 2nd edn*. Cambridge & New York: Cambridge University Press.
- Bettinger, B.T., Clark, M.G., Amberg, D.C. (2007) Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1637-1648.
- 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. *Mol Microbiol* **53**: 1743-1756.
- Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., Posas, F. (2000) Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **20**: 3887-3895.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 431-434.
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuveglise, C., Munsterkotter, M., Guldener, U., Mewes, H.W., Van Helden, J., Dujon, B., Gaillardin, C. (2003) Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* **31**: 1121-1135.
- Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G.Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L., Lacroute, F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* **7**: 609-615.

- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., Stevens, T.H. (2000) The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 4277-4294.
- Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R. (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-239.
- Brown, A.J., Tuite, M.F. (1998) *Methods in microbiology: Yeast gene analysis* **26**. London: Academic Press.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F., Casse, F. (2004) Characterization of *AtCHX17*, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant J* **39**: 834-846.
- Clarke, L., Carbon J. (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* **287**: 504-509.
- Clarke, L. (1998) Centromeres: proteins, protein complexes and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 212-218.
- Costaglioli, P., Meilhoc, E., Masson, J.M. (1994) High-efficiency electrotransformation of the yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Curr Genet* **27**: 26-30.
- Dani, G.M., Zakian, V.A. (1983) Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3406-3410.
- De Backer, M.D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., Luyten, W.H. (1999) Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* **15**: 1609-1618.
- De Craene, J.O., Soetens, O., Andre, B. (2001) The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J Biol Chem* **276**: 43939-43948.
- de Jonge, P., de Jongh, F.C., Meijers, R., Steensma, H.Y., Scheffers, W.A. (1986) Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. *Yeast* **2**: 193-204.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confaniolero, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul,

- R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J.L. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Dujon, B. (2005) Hemiascomycetous yeasts at the forefront of comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 614-620.
- Dujon, B. (2006) Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genet* **22**: 375-387.
- Eddy, A.A., Williamson, D.H. (1957) A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature* **179**: 1252-1253.
- Faber, K.N., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M., Ab, G. (1994) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* **25**: 305-310.
- Feldmann, H. (2000) Genolevures-a novel approach to 'evolutionary genomics'. *FEBS Lett* **487**: 1-2.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A. (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p, is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.
- Fickers, P., Le Dall, M.T., Gaillardin, C., Thonart, P., Nicaud, J.M. (2003) New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods* **55**: 727-737.
- Fincham, J.R. (1989) Transformation in fungi. *Microbiol Rev* **53**: 148-170.
- Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A., Kurlandzka, A. (2005) The functioning of mammalian ClC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem J* **390**: 655-664.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., Tanaka, Y. (2004) Function, intracellular localisation and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol* **45**: 146-159.
- Futcher, A.B. (1986) Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* **119**: 197-204.

- Futcher, B., Carbon, J. (1986) Toxic effects of excess cloned centromeres. *Mol Cell Biol* **6**: 2213-2222.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Banuelos, M.A., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 363-368.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Duran, A., Roncero, C. (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol* **182**: 2428-2437.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Valle, R., Duran, A., Roncero, C. (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**: 6186-6190.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., Fink, G.R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1480-1485.
- Gietz, R.D., Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R.D., Woods, R.A. (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**: 816-820, 822-816, 828.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**: 31-34.
- Gift, E.A., Weaver, J.C. (1995) Observation of extremely heterogeneous electroporative molecular uptake by *Saccharomyces cerevisiae* which changes with electric field pulse amplitude. *Biochim Biophys Acta* **1234**: 52-62.
- Gonzalez-Hernandez, J.C., Cardenas-Monroy, C.A., Pena, A. (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **21**: 403-412.
- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113 -129.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1264-1300.

- Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C., Dohlman, H.G. (2007) A systems-biology analysis of feedback inhibition in the *sho1* osmotic-stress-response pathway. *Curr Biol* **17**: 659-667.
- Haro, R., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**: 189-191.
- Hayashi, M., Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **139**: 797-803.
- Hernandez-Lopez, M.J., Rande-Gil, F., Prieto, J.A. (2006) Hog1 mitogen-activated protein kinase plays conserved and distinct roles in the osmotolerant yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Eukaryot Cell* **5**: 1410-1419.
- Heus, J.J., Zonneveld, B.J., de Steensma, H.Y., van den Berg, J.A. (1993) The consensus sequence of *Kluyveromyces lactis* centromeres shows homology to functional centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 355-362.
- Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1929-1933.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H. (1990) Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1386-1391.
- Hoffman, C.S., Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hohmann, S., Mager, W.H. (1997) *Yeast Stress Responses*. Georgetown, Texas, U.S.A.: R. G. Landes Company.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., Kielland-Brandt, M.C. (2000) *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **37**: 108-124.
- Hosono, K. (1992) Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Gen Microbiol* **138**: 91-96.



- Hutchison, H.T., Hartwell, L.H. (1967) Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. *J Bacteriol* **94**: 1697-1705.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y., Watanabe, Y. (1998) Characterization of a second gene (*ZSOD22*) of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of *ZSOD2* and *ZSOD22* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1167-1174.
- Iwaki, T., Tamai, Y., Watanabe, Y. (1999) Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* gene. *Microbiology* **145**: 241-248.
- Iwaki, T., Kurono, S., Yokose, Y., Kubota, K., Tamai, Y., Watanabe, Y. (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCV1* and *ZrGCV2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **18**: 737-744.
- Iwata, S., Tomita, M., Yamato, S. (1996) Alteration of cell-wall chitin of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Ferment Bioeng* **81**: 171-173.
- James, S.A., Bond, C.J., Stratford, M., Roberts, I.N. (2005) Molecular evidence for the existence of natural hybrids in the genus *Zygosaccharomyces*. *FEMS Yeast Res* **5**: 747-755.
- Janderová, B., Bendová, O. (1999) *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum.
- Jansen, M., Veurink, J.H., Euverink, G.J., Dijkhuizen, L. (2003) Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Res* **3**: 313-318.
- Jearnpipatkul, A., Araki, H., Oshima, Y. (1987a) Factors encoded by and affecting the holding stability of yeast plasmid pSR1. *Mol Gen Genet* **206**: 88-94.
- Jearnpipatkul, A., Hutacharoen, R., Araki, H., Oshima, Y. (1987b) A cis-acting locus for the stable propagation of yeast plasmid pSR1. *Mol Gen Genet* **207**: 355-360.

- Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., Young, P.G. (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J* **11**: 1631-1640.
- Jiang, B., Ram, A.F., Sheraton, J., Klis, F.M., Bussey, H. (1995) Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Mol Gen Genet* **248**: 260-269.
- Johnston, J., Hilger, F., Mortimer, R. (1981) Variation in frequency of transformation by plasmid YRp7 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **16**: 325-329.
- Johnston, J.R., Curran, L., Contopoulou, R.C., Mortimer, R.K. (1989) Electrophoretic karyotyping of commercial brewing and distilling strains of *Saccharomyces* and of other yeasts. *Yeast* **5 Spec No**: S255-259.
- Kagami, T., Suzuki, M. (2005) Molecular and functional analysis of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene of *Rosa hybrida*. *Genes Genet Syst* **80**: 121-128.
- Khan, N.C., Sen, S.P. (1974) Genetic transformation in yeasts. *J Gen Microbiol* **83**: 237-250.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. (2001a) The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol* **88**: 151-158.
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S., Sychrová, H. (2001b) Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**: 656-668.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. (2002) Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H<sup>(+)</sup> antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**: 1225-1232.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Flegelova, H., Sychrová, H. (2004) Rice Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiol* **49**: 519-525.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Zavřel, M., Sychrová, H. (2005) Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *J Biol Chem* **280**: 30638-30647.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Sychrová, H. (2006) Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* **49**: 229-236.

- Kinclová-Zimmermannová, O., Zavřel, M., Sychrová, H. (2006) Importance of the seryl and threonyl residues of the fifth transmembrane domain to the substrate specificity of yeast plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *Mol Membr Biol* **23**: 349-361.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Kooistra, R., Hooykaas, P.J., Steensma, H.Y. (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **21**: 781-792.
- Kosa, P., Gavenciakova, B., Nosek, J. (2007) Development of a set of plasmid vectors for genetic manipulations of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Gene* Apr 18.
- Krantz, M., Becit, E., Hohmann, S. (2006) Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* **49**: 137-151.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (1998) *The yeasts, a taxonomic study*. New York: Elsevier.
- Kwon, H.B., Yeo, E.T., Hahn, S.E., Bae, S.C., Kim, D.Y., Byun, M.O. (2003) Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) and trehalose-6-phosphate phosphatase (TPS2) from *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res* **3**: 433-440.
- Labbe, S., Thiele, D.J. (1999) Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods Enzymol* **306**: 145-153.
- Lages, F., Silva-Graca, M., Lucas, C. (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* **145**: 2577-2585.
- Lansford, R., Bearman, G., Fraser, S.E. (2001) Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy. *J Biomed Opt* **6**: 311-318.
- Lee, B.N., Elion, E.A. (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12679-12684.
- Lenassi, M., Vaupotic, T., Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. (2007) The MAP kinase *HwHog1* from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns. *Saline Systems* **3**: 3.

- Lucas, C., Da Costa, M., Van Uden, N. (1990) Osmoregulatory active sodium - glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187-191.
- Mager, W.H., Siderius, M. (2002) Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* **2**: 251-257.
- Malik, H.S. (2006) A hitchhiker's guide to survival finally makes CENs. *J Cell Biol* **174**: 747-749.
- Marešová, L., Sychrová, H. (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600.
- Marešová, L., Sychrová, H. (2006) *Arabidopsis thaliana CHX17* gene complements the *kha1* deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 1167-1171.
- Marquez, J.A., Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**: 89-92.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**: 234-242.
- Matsuzaki, H., Araki, H., Oshima, Y. (1988) Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1. *Mol Cell Biol* **8**: 955-962.
- Meilhoc, E., Masson, J.M., Teissie, J. (1990) High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology* **8**: 223-227.
- Mishra, N.C., Tatum, E.L. (1973) Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3875-3879.
- Mohsen, H., Olivier, C., Toshio, Y., Said, H., Abdelwahed, G., Eduardo, B. (2007) A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant Cell Physiol* Apr 26.
- Moran, J.W., Witter, L.D. (1979) Effect of sugars on D-arabitol production and glucose metabolism in *Saccharomyces rouxii*. *J Bacteriol* **138**: 823-831.
- Munro, C.A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M.D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A.J., Gow, N.A. (2007) The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways coordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **63**: 1399-1413.

- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R. (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**: 26145-26152.
- Nass, R., Rao, R. (1998) Novel localization of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **273**: 21054-21060.
- Nass, R., Rao, R. (1999) The yeast endosomal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145**: 3221-3228.
- Nehrke, K., Melvin, J.E. (2002) The NHX family of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **277**: 29036-29044.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**: 841-845.
- Neves, L., Lages, F., Lucas, C. (2004) New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **565**: 160-162.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**: 773-786.
- Norbeck, J., Blomberg, A. (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* **272**: 5544-5554.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2005) Characterization of the ion transport activity of the budding yeast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1712**: 185-196.
- Oliveira, R.P., Lages, F., Lucas, C. (1996) Isolation and characterization of mutants from the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila* defective in  $\text{H}^+/\text{glycerol}$  symport activity. *FEMS Microbiol Lett* **142**: 147-153.
- Oppenoorth, W.F. (1960) Modification of the hereditary character of yeast by ingestion of cell-free extracts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **26**: 129-168.
- Orlowski, J., Grinstein, S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* **447**: 549-565.

- Papoušková, K., Sychrová, H. (2006) *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* **580**: 1971-1976.
- Papoušková, K., Sychrová, H. (2007) *Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H antiporters differing in their substrate specificity. *FEMS Yeast Res* **7**: 188-195.
- Pettersson, N., Filipsson, C., Becit, E., Brive, L., Hohmann, S. (2005) Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol Cell* **97**: 487-500.
- Platará, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., Arino, J. (2006) The transcriptional response of the yeast Na<sup>(+)</sup>-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**: 36632-36642.
- Příbylová, L. (2002) *Fyziologická charakterizace osmotolerantní kvasinky Zygosaccharomyces rouxii a optimalizace transformačního protokolu*. Diplomová práce. Praha.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrová, H. (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**: 89-93.
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M.C., Ramos, J. (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005-4009.
- Proft, M., Struhl, K. (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351-361.
- Pullikuth, A.K., Aimanova, K., Kang'ethe, W., Sanders, H.R., Gill, S.S. (2006) Molecular characterization of sodium/proton exchanger 3 (*NHE3*) from the yellow fever vector, *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* **209**: 3529-3544.
- Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Coria, R., Pena, A. (1998) A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Bacteriol* **180**: 5860-5865.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290-8300.

- Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamas, M., Serrano, R., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067-1083.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., Morschhauser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**: 119-127.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1-30.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Ronicke, V., Graulich, W., Mumberg, D., Muller, R., Funk, M. (1997) Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **283**: 313-322.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor laboratory press.
- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C., Gow, N.A. (1997) A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**: 3539-3546.
- Sanyal, K., Baum, M., Carbon, J. (2004) Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11374-11379.
- Schacherer, J., Tourrette, Y., Souciet, J.L., Potier, S., De Montigny, J. (2004) Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* **14**: 1291-1297.
- Schoondermark-Stolk, S.A., ter Schure, E.G., Verrips, C.T., Verkleij, A.J., Boonstra, J. (2002) Identification of salt-induced genes of *Zygosaccharomyces rouxii* by using *Saccharomyces cerevisiae* GeneFilters. *FEMS Yeast Res* **2**: 525-532.
- Sherman, D., Durrens, P., Iragne, F., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J.L. (2006) Genolevures complete genomes provide data and tools for comparative genomics of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res* **34**: D432-435.

- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6896-6901.
- Shichiri, M., Hoshikawa, C., Nakamori, S., Takagi, H. (2001) A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae* Sigma1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J Biol Chem* **276**: 41998-42002.
- Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., Arino, J. (2001) A screening for high copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **276**: 29740-29747.
- Soong, T.W., Yong, T.F., Ramanan, N., Wang, Y. (2000) The *Candida albicans* antiporter gene *CNHI* has a role in Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport, salt tolerance and morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1035-1044.
- Storici, F., Coglievina, M., Bruschi, C.V. (1999) A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 271-283.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., Davis, R.W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 1035-1039.
- Suga, M., Hatakeyama, T. (2001) High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast* **18**: 1015-1021.
- Sun, S., Nguyen, L.H., Harold Ross, O., Hollis, G.F., Wynn, R. (2002) Quantitative analysis of c-myc-tagged protein in crude cell extracts using fluorescence polarization. *Anal Biochem* **307**: 287-296.
- Swaminathan, S., Mašek, T., Molin, C., Pospíšek, M., Sunnerhagen, P. (2006) Rck2 is required for reprogramming of ribosomes during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **17**: 1472-1482.
- Sychrová, H., Braun, V., Souciet, J.L. (1999) Molecular cloning and sequence analysis of *Zygosaccharomyces rouxii* *ADE2* gene encoding a phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase. *Yeast* **15**: 1399-1402.
- Sychrová, H., Braun, V., Potier, S., Souciet, J.L. (2000a) Organization of specific genomic regions of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Pichia sorbitophila*: comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1377-1385.



- Sychrová, H., Braun, V., Souciet, J.L. (2000b) Sequence and organization analyses of a *Zygosaccharomyces rouxii* DNA fragment containing the *HIS3* gene. *Yeast* **16**: 581-587.
- Sychrová, H. (2001) Molecular cloning and sequence analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* *LEU2* gene encoding a beta-isopropylmalate dehydrogenase. *Yeast* **18**: 989-994.
- Sychrová, H. (2004) Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53**: S91-98.
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.H., Bock, K.W., Conejero, G., Li, X., Twell, D., Ward, J.M., Hirschi, K.D. (2004) Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* **136**: 2532-2547.
- Takagi, H., Shichiri, M., Takemura, M., Mohri, M., Nakamori, S. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* sigma 1278b has novel genes of the N-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance. *J Bacteriol* **182**: 4249-4256.
- Tang, X.M., Kayingo, G., Prior, B.A. (2005) Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. *Yeast* **22**: 571-581.
- Thome, P.E. (2007) Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**: 229-235.
- Thompson, J.R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., Kelly, R. (1998) An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast* **14**: 565-571.
- Toh-e, A., Tada, S., Oshima, Y. (1982) 2-micrometers DNA-like plasmids in the osmophilic haploid yeast *Saccharomyces rouxii*. *J Bacteriol* **151**: 1380-1390.
- Ushio, K., Tatsumi, H., Araki, H., Toh-e, A., Oshima, Y. (1988) Construction of a host-vector system in the osmophilic haploid yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Ferment Technol* **66**: 481-488.
- van der Sluis, C., Wolken, W.A., Giuseppin, M.L., Tramper, J., Wijffels, R.H. (2000) Effect of threonine, cystathionine, and the branched-chain amino acids on the metabolism of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 292-300.
- van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. (1993) The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J Gen Microbiol* **139**: 1047-1054.

- van Zyl, P., Kilian, S.G., Prior, B.A. (1990) The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 231-235.
- Velková, K., Sychrová, H. (2006) The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**: 27-34.
- Vežinhet, F., Blondin, B., Hallet, J.N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial-DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**: 568-571.
- Volkert, F.C., Wilson, D.W., Broach, J.R. (1989) Deoxyribonucleic acid plasmids in yeasts. *Microbiol Rev* **53**: 299-317.
- Vondrejs, V. (2003) *Genové inženýrství III*. Praha: Karolinum.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419.
- Wang, Z.X., Kayingo, G., Blomberg, A., Prior, B.A. (2002) Cloning, sequencing and characterization of a gene encoding dihydroxyacetone kinase from *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL2547. *Yeast* **19**: 1447-1458.
- Watanabe, Y., Shiramizu, M., Tamai, Y. (1991) Molecular cloning and sequencing of plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase gene from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biochem* **110**: 237-240.
- Watanabe, Y., Miwa, S., Tamai, Y. (1995) Characterization of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **11**: 829-838.
- Watanabe, Y., Iwaki, T., Shimono, Y., Ichimiya, A., Nagaoka, Y., Tamai, Y. (1999) Characterization of the Na<sup>(+)</sup>-ATPase gene (*ZENAI*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* **88**: 136-142.
- Watanabe, Y., Hirasaki, M., Tohnai, N., Yagi, K., Abe, S., Tamai, Y. (2003) Salt shock enhances the expression of *ZrATP2*, the gene for the mitochondrial ATPase beta subunit of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* **96**: 193-195.

- Watanabe, Y., Tsuchimoto, S., Tamai, Y. (2004) Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**: 505-510.
- Watanabe, Y., Oshima, N., Tamai, Y. (2005) Co-expression of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-antiporter and H<sup>(+)</sup>-ATPase genes of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **5**: 411-417.
- Watanabe, Y., Yamaguchi, M., Sanemitsu, Y., Tamai, Y. (1991) Characterization of plasma membrane proton-ATPase from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* cells. *Yeast* **7**: 599-606.
- Wojda, I., Alonso-Monge, R., Bebelman, J.P., Mager, W.H., Siderius, M. (2003) Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology* **149**: 1193-1204.
- Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yang, X.X., Hawle, P., Bebelman, J.P., Meenhuis, A., Siderius, M., van der Vies, S.M. (2007) Cdc37p is involved in osmoadaptation and controls high osmolarity-induced cross-talk via the MAP kinase Kss1p. *FEMS Yeast Res* Apr 20.
- Zaragoza, O. (2003) Generation of disruption cassettes in vivo using a PCR product and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Methods* **52**: 141-145.

## 9. Résumé de thèse de Doctorat en co-tutelle

### 1. Introduction

*Zygosaccharomyces rouxii* est une levure osmotolérante appartenant à la classe des hémiascomycètes. Elle se classe dans la zone charnière séparant les espèces *S. cerevisiae sensu lato* des *Kluyveromyces* (de Montigny *et al.*, 2000). Cette position phylogénétique particulière en fait un organisme de choix pour le projet de génomique comparative des hémiascomycètes, Génolevures 3 (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>). L'annotation actuellement en cours permettra de préciser sa position.

La capacité de *Z. rouxii* à résister à des fortes pressions osmotiques conduit à ce qu'elle soit souvent trouvée comme contaminant d'aliments riches en sels ou en sucres comme les sirops, le miel et les confitures. Cette levure est aussi employée dans des processus fermentaires pour la fabrication de produits alimentaires orientaux.

La réponse d'une cellule à un stress osmotique dépend principalement du métabolisme du glycérol et de sa régulation (Hohmann, 2002). En effet, lors d'une augmentation de la pression osmotique, la cellule subit une fuite d'eau et une perte de volume qui vont être compensées par une accumulation de glycérol. Cette pression osmotique constitue donc le signal pour l'augmentation *in vivo* de la synthèse du glycérol, la diminution de son excrétion par diffusion ou encore sa réimportation après avoir été perdu par diffusion.

Le stress osmotique est en majorité causée par des hautes concentrations de sucres ou de sels (NaCl, KCl). Une forte concentration d'ions dans le milieu va entraîner leur diffusion vers l'intérieur de la cellule suivant leur gradient de concentration et perturber ainsi l'équilibre homéostatique. Le maintien de la concentration intracellulaire des ions, compatible avec le fonctionnement cellulaire, est assuré chez *S. cerevisiae* par des mécanismes de transport actif. La protéine membranaire codée par le gène *ScNHA1* (Prior *et al.*, 1996) va permettre l'efflux d'ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup> en utilisant le flux entrant de protons (H<sup>+</sup>). Les gènes orthologues de *ScNHA1* chez *Z. rouxii* (*ZrSOD2-22*, *ZrSOD2*, *ZrSOD22*) codent quant à eux des perméases exportant les ions sodium et lithium mais pas ceux du potassium (Kinclová *et al.*, 2001, 2002, Iwaki *et al.* 1998).

Si plusieurs études physiologiques et biochimiques ont été réalisées chez *Z. rouxii* (Jansen *et al.*, 2003; Martorell *et al.*, 2007; van Zyl *et al.*, 1990), les connaissances en génétique sont limitées. Seuls quelques gènes de *Z. rouxii* ont été clonés et caractérisés, par exemple les gènes *ZrHOG1* (Iwaki *et al.*, 1999), *ZrFPS1* (Tang *et al.*, 2005) et *ZrGPD1* (Iwaki *et al.*, 2001) impliqués dans la réponse au stress, ou encore le gène *ZrSOD2-22* (Kinclová *et al.*, 2001) codant l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La plupart de *Z. rouxii* gènes a été caractérisés par complémentation de fonction chez *S. cerevisiae*. Les études de l'expression de ces gènes ou la caractérisation d'autres impliqués dans les phénomènes d'osmotolérance ne sont possibles chez *Z. rouxii* que s'il existe un ensemble d'outils génétiques et moléculaires permettant de réaliser directement dans cette espèce des études de génétique réverse. La connaissance de son genome et sa position phylogénique vont encore renforcer d'avantage l'intérêt de disposer de tels outils.

L'objectif de ce travail de thèse a été double. Le premier objectif a consisté à mettre au point un ensemble d'outils génétiques et moléculaires permettant de réaliser chez *Z. rouxii* des études de génétique réverse. Le second était d'étudier l'osmotolérance de *Z. rouxii*. Pour ce dernier point, nous avons caractérisé et comparé deux souches de *Z. rouxii* CBS 732 et ATCC 42981 montrant une structure des parois cellulaires et des propriétés osmotolérantes différentes. Nous avons étudié également l'importance des antiporters  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans l'osmotolérance de *Z. rouxii*. Enfin, nous avons complété ce travail par une approche de génomique comparative des gènes de levures codant les cations métalliques alcalins/ $\text{H}^+$  antiporteurs et par la participation à l'annotation du genome de *Z. rouxii* dans le cadre du projet Génolevures 3.

Ce travail de thèse sera présenté sous la forme de sept manuscrits (publié, sous presse ou soumis) et de deux chapitres décrivant les résultats non-publiés.

## **2. Principaux résultats obtenus**

### **2.1. Construction d'outils génétiques et moléculaires de *Z. rouxii***

Ce travail a conduit à la construction de plusieurs outils de génétique et de biologie moléculaire permettant l'utilisation de *Z. rouxii* comme organisme modèle. L'isolement et la caractérisation de six mutants d'auxotrophie comme *ura3*, *leu2*, *ade2* et la mise au point de protocoles de transformation par électroporation ont été les premières étapes indispensables à

la construction d'un ensemble de plasmides spécifiques de *Z. rouxii*. Nous avons construit un ensemble de plasmides de type épisomal présents à haut nombre de copies grâce à la présence de l'origine de réplication du plasmide endogène pRS1 de *Z. rouxii*.

Nous avons isolé 4 fragments d'ADN de cette levure présentant un % important d'identité au niveau nucléotidique et une organisation similaire aux centromères de *S. cerevisiae*. Deux d'entre-eux ont été analysés plus particulièrement et leur fonction de centromères ont été prouvées expérimentalement chez *Z. rouxii*. Ces éléments nous ont permis de construire un ensemble de plasmides centromériques qui lorsqu'ils sont introduits chez *Z. rouxii* vont être présents en copie unique.

De la même manière, nous avons conçu un vecteur permettant de réaliser des fusions GFP dans le but de localiser *in vivo* les protéines d'intérêt. Enfin, nous avons mis au point les outils et les conditions expérimentales permettant le remplacement de gènes en une étape par un mécanisme de recombinaison homologue. Grâce à ces travaux, à la construction d'une cassette *loxP-kanMX-loxP* et d'un plasmide exprimant une recombinase *cre*, il est possible à présent de déléter chez *Z. rouxii* un ou plusieurs gènes d'intérêts et d'en étudier ainsi le phénotype.

## **2.2. Etude des propriétés osmotolérantes de *Z. rouxii***

Deux souches de laboratoire de *Z. rouxii* sont généralement utilisées dans les différentes approches utilisant cette espèce, CBS 732<sup>T</sup> et ATCC 42981. La souche ATCC 42981 étant plus osmotolérante que CBS 732<sup>T</sup>, il était intéressant d'étudier les différences génomiques et génétiques de ces souches dans le but de comprendre cette variabilité.

Une analyse du caryotype électrophorétique a révélé un polymorphisme important entre ces deux souches. La souche ATCC 42981 porte un chromosome surnuméraire. Sur le plan de la structure, on peut observer des différences au niveau de leurs parois cellulaires. Celles-ci présentent en effet une résistance variable vis à vis d'enzymes lytiques comme la Zymolyase et la Lyticase qui découlent de différences de structure. La souche moins osmotolérante, CBS 732<sup>T</sup>, possède une paroi plus rigide que celle de la souche ATCC 42981 qui est plus élastique. Les deux souches sont plus osmotolérantes que *S. cerevisiae* et produisent moins de glycérol sous les conditions de stress osmotique, indiquant l'existence d'un mécanisme capable de retenir ou de réimporter le glycérol perdu par diffusion. La souche ATCC 42981, mais pas

CBS 732<sup>T</sup>, est aussi capable d'assimiler glycérol. Les résultats obtenus sont en accord avec une hypothèse que ATCC 42981 est une souche hybride.

### 2.3. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporteurs

A partir des banques de données publics, nous avons recherché les différents gènes codant pour les cations /H<sup>+</sup> antiporteurs c'est à dire les orthologues des gènes *NHA1*, *NHX1* ou *KHA1* de *S. cerevisiae*. L'analyse *in silico* de ces séquences a permis de montrer la conservation de domaines protéiques qui sont très vraisemblablement important dans le fonctionnement de ces antiporteurs. La comparaison phylogénétique de celles-ci avec les protéines de type antiporteur de bactéries, de plantes et de mammifères a indiqué que les protéines Nhx sont proches des antiporteurs de plantes et de mammifères tandis que les protéines Kha sont proches de ceux des bactéries. Par contre, les protéines Nha1 forment une famille spécifique. Récemment, les homologs Nha1 étaient identifié aussi dans le génome humain (Brett *et al.*, 2005).

Le gène *ZrSOD2-22* codant pour l'antiporteur Nha1p de *Z. rouxii* CBS 732<sup>T</sup>, qui a été étudié jusqu'à présent uniquement en contexte hétérologue chez *S. cerevisiae*, a été délété chez *Z. rouxii*. L'analyse phénotypique du mutant obtenu a confirmé la fonction de ce gène dans la tolérance aux ions Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup>. En explorant la base de données Génolevures 3, un second gène appartenant à la famille des antiporteurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> a été identifié chez *Z. rouxii* et nommé *ZrNHA1*. Nous avons montré que cette protéine a une localisation membranaire. Nous avons construit des mutants de délétion *Zrnha1Δ* et *Zrsod2-22Δ* et le mutant double *Zrnha1Δ Zrsod2-22Δ* de *Z. rouxii*. L'analyse phénotypique de ces mutants et les mesures de l'efflux des cations en contexte hétérologue chez *S. cerevisiae* ont prouvé que *ZrNha1p* était capable de transporter l'ion K<sup>+</sup>, mais aussi Na<sup>+</sup>, et de participer à la tolérance de la cellule aux ions K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup>. En présence des ions Na<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup>, les deux antiporteurs apparemment complètent l'un l'autre. La levure *Z. rouxii* possède donc deux antiporteurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>: Un avec une large spécificité de substrat (*ZrNHA1*) et un autre avec une spécificité de substrat plus étroite (*ZrSOD2-22*). L'analyse de synténie des gènes avoisinant *ZrNHA1* et *ZrSOD2-22* suggère que *ZrSOD2-22* résulte d'une duplication génique et insertion dans une nouvelle région du génome.

### 2.4. Séquençage et annotations de *Z. rouxii* génome

*Z. rouxii* fait partie des espèces étudiées dans le cadre du projet de génomique comparative Génolevures 3. Nous avons donc participé à l'annotation des différents génomes des 4 espèces appartenant ou proche du groupe des *Kluyveromyces*. Ce travail a représenté un bon complément de formation dans le cadre de cette thèse.

### 3. Conclusion et perspectives.

Les outils génétiques et moléculaires ainsi que l'amélioration des techniques, notamment de transformation, mis au point lors de ce travail de thèse nous ont permis d'avancer dans la compréhension du phénomène d'osmotolérance de *Z. rouxii*. Nous avons pu préciser le rôle des antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans ce phénomène. La levure *Z. rouxii* possède deux types de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteurs: l'un avec une large spécificité de substrat (*ZrNHA1*) et l'autre avec une spécificité plus étroite (*ZrSOD2-22*). L'analyse *in silico*, grâce aux banques de données, des cations métaux alcalins  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteurs pour l'ensemble des génomes de levures séquencés a permis de localiser les régions clés pour le fonctionnement de ces transporteurs.

La connaissance de la séquence complète du génome et les outils conçus dans ce travail permettent d'utiliser à présent la levure *Z. rouxii* comme modèle expérimental au même titre que *S. cerevisiae*. Les approches expérimentales qui pourront être développées *in vivo* permettront ainsi de renforcer les approches de génomique comparative.

### 4. Références

- Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R. (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-239.
- de Montigny, J., Straub, M., Potier, S., Tekaia, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F., Souciet, J. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Lett* **487**: 52-55.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y., Watanabe, Y. (1998) Characterization of a second gene (*ZSOD22*) of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from salt-tolerant yeast



- Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of *ZSOD2* and *ZSOD22* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1167-1174.
- Iwaki, T., Tamai, Y., Watanabe, Y. (1999) Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* gene. *Microbiology* **145**: 241-248.
- Iwaki, T., Kurono, S., Yokose, Y., Kubota, K., Tamai, Y., Watanabe, Y. (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **18**: 737-744.
- Jansen, M., Veurink, J.H., Euverink, G.J., Dijkhuizen, L. (2003) Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Res* **3**: 313-318.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. (2001) The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol* **88**: 151-158.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. (2002) Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H<sup>+</sup> antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**: 1225-1232.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**: 234-242.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrová, H. (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**: 89-93.
- Tang, X.M., Kayingo, G., Prior, B.A. (2005) Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* *Fps1p* homologue. *Yeast* **22**: 571-581.
- van Zyl, P., Kilian, S.G., Prior, B.A. (1990) The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 231-235.

## 10. Přílohy

### 10.1. Sekvence proteinu *ZrNha1*

1 MVWGQLEPTK AHVAYACIGV FSSIFSLVSL FIKERLYIGE SMVAGAFGLI  
51 VGPCLDWFN PISWGDTDAI TLEITRIVLC LQVFVAVEL PRKYMWKHWL  
101 SVTMLLVPM TFGWLIIGLF VWIVIPGLNF SHSLLVAACI TATDPILAQS  
151 VVSGKFAERV PGHLRNLLSA ESGCNDGLAF PFIYLSLYLI MHPRQGGEIV  
201 KDWICITILW ECLFGCLLGC VIGYCGRAI RFAEEKIID RESFLAFYVW  
251 LTFMCAGFGS ILGVDDLTS FSAGAAFAWD GWFSERTKES NVSTVIDVLL  
301 NYAYFVYFGA IIPWQHFNDP VIGLDIWRLI ILAIIIVIFLR RIPAVLLLLKP  
351 LIPDIKSWRE AVFVGHFGPI GVGAVFASLT ARAQLETQAE PHEETPLEIL  
401 PEKGSKHQI IWVIWPITCF FILTSIIVHG SSVAIITLGR HLNTITLTKT  
451 FTTNTTNGNG KSSWMQRLPA LEKSGRSFSL QRVDTEAPSF SGQTAVETSG  
501 VPYTPAGGMK RGRKNRRNKR RKELLHVLSG NGTNEEELND LGRERLQREK  
551 EARAATFALS TAANRGTKND TLEAEGQTPG GSDSTEQVAS NEPTKSDIDI  
601 MNREETVHAI SGLDELARDR EHGEINLIEG GGEEEDLGAI STPRSQTED  
651 IDEKLSR**G**ES ETGSRRSAES ERMRKIREEE EQAHVAYAED DQLIA**A**ENAEG  
701 EVIDEARYNK PRKDEEHGLH PHHHAQHEND GESPIIRSDS NRSQHSSLS  
751 LKRVLSPKFE GKLQDKMRRS SSYRRANKYY AYKIDNQLII EDKEGEVLRR  
801 YKINT**R**TSGN DKKKPEEKSG TAGGKVMNKA LSAVGIKNRS APNNPEGNVS  
851 PTRGEENLKM VRNPTPAKD SYRRPEELEN DEQGD<sup>3</sup>DDYE DEGEDSNDED  
901 NRDSYDDNYT DDSEEDGEER DNVDGDSTSV RSNESE**S**AVE RERRLNALGH  
951 FSAPRDQDDE EEPPTPLEAQ AQSGAKNSTT KKVKDSLGRK FHLK

Aminokyselinové zbytky lišící se od sekvence *ZrNHA1* v databázi Génolevures 3 jsou zvýrazněny.

## 10.2. Srovnání sekvencí ScNha1p, ZrSod2-22p a ZrNha1p

		101		150
ScNha1p	(101)	VSVTMLLLPVMTAGWLIIGLFVWILIPGLNFSASLLISACITATDPILAQ		
ZrNha1p	(100)	LSVTMLLVPMVTFGWLIIGLFVWIVIPGLNFSHSLVAACITATDPILAQ		
ZrSod2-22p	(100)	LSVTMLLVPMVTSGLVIALFVWILVPLNFPASLLMGACITATDPVLAQ		
Consensus	(101)	LSVTMLLVPMVMTAGWLIIGLFVWILIPGLNFSASLLIAACITATDPILAQ		
		151		200
ScNha1p	(151)	SVVSGKFAQRPVPHLRNLLSAESGCNDGMAFFFLFSMNLILHPNGREI		
ZrNha1p	(150)	SVVSGKFAERVPGLHRNLLSAESGCNDGLAFPFYIYLSLYLIMHPQGGEI		
ZrSod2-22p	(150)	SVVSGTFAQKVPGLHRNLLSCESGCNDGLAFPFVFLSIDLLLYPGRGGEI		
Consensus	(151)	SVVSGKFAQRPVPHLRNLLSAESGCNDGLAFPFIFLSI LILHPNGGGEI		
		201		250
ScNha1p	(201)	VKDWICVTILYECLFGCLLGCFIGYVGRITIRFAEKKNIIDRESFLAFYV		
ZrNha1p	(200)	VKDWICITILWECLFGCLLGCVIIGYCGRRAIRFAEEKIIDRESFLAFYV		
ZrSod2-22p	(200)	VKDWICVTILWECIFGSIIGCIIGYCGRKAIRFAEGKRIIDRESFLAFYL		
Consensus	(201)	VKDWICVTILWECLFGCLLGCIIIGYCGRKAIRFAE KIIDRESFLAFYV		
		251		300
ScNha1p	(251)	VLAFMCAGFGSILGVDDLLVSFAAGATFAWDGWFSSQKTQESNVSTVIDLL		
ZrNha1p	(250)	VLTFCAGFGSILGVDDLLTSFSAGAAFAWDGWFSEKESNVSTVIDVL		
ZrSod2-22p	(250)	ILALTCAGFGSMLGVDDLLVSFFAGTAFAWDGWFATKTHESNVSNVIDVL		
Consensus	(251)	VLAFMCAGFGSILGVDDLLVSFAAGAAFAWDGWF S KT ESNVSTVIDVL		
		301		350
ScNha1p	(301)	LNAYFYFYFGAIIPWQHFNDPVIIGLDIWRLLIILAIIVIFLRRIPAVMLLR		
ZrNha1p	(300)	LNAYFVYFGAIIPWQHFNDPVIIGLDIWRLLIILAIIVIFLRRIPAVLLLK		
ZrSod2-22p	(300)	LNAYFYVYLGSIIPWKDFNNADIGLDVWRLLIILSLVVI FLRRIPAVLLLK		
Consensus	(301)	LNAYFYVYFGAIIPW FNNADIGLDVWRLLIILSIVVI FLRRIPAVLLLK		
		351		400
ScNha1p	(351)	PLIPDIKSWREALFVGHFGPIGVGAIFAAILARGELESTFS-DEETPLNV		
ZrNha1p	(350)	PLIPDIKSWREAVFVGHFGPIGVGAVFASLTARAQLETQAEPEETPLEI		
ZrSod2-22p	(350)	PLIPDIKSWREAMFVGHFGPIGVGAVYAAIISKSQLSHLT-DEETPLNY		
Consensus	(351)	PLIPDIKSWREALFVGHFGPIGVGAVFAAIIARAQLES S DEETPLNI		
		401		450
ScNha1p	(400)	VPSKEESKHWOIACIWPITCFFIVTSIIIVHGSSVAIITLGRHLNTITLT		
ZrNha1p	(400)	LPEKG-SKHWOIIVWIPITCFFILTSIIIVHGSSVAIITLGRHLNTITLT		
ZrSod2-22p	(399)	TPGKG-SKHQAMACLWPITCFIITSVIVHGSSVAIIMLGRYLNTVTLT		
Consensus	(401)	LP KG SKHWQIACIWPITCFFIITSIIIVHGSSVAIITLGRHLNTITLT		
		451		500
ScNha1p	(450)	KTFTTHTTNGDNGKSSWQRLPSLDKAGRSFSLHRMDTQMTLSGDEGEAE		
ZrNha1p	(449)	KTFTTNTTNGN-GKSSWQRLPALEKSGRSFSLQRVDTPEAPSFS-----		
ZrSod2-22p	(448)	AAPTSTRASTS-TKNSWLQSLPPFDKSGRPFSLQRLDKETSPTPG-----		
Consensus	(451)	KTFTT TNG GKSSWQRLPALDKSGRSFSLQRLDTE S S		
		501		550
ScNha1p	(500)	EGGGRKGLAGGEDEEGLNNDQIGSVATSGIPARPAGGMPPRRRKLRSRKEKR		
ZrNha1p	(492)	-----GQT-----AVE--TS--GVPYTPAGGMKR----GRK----		
ZrSod2-22p	(492)	-----QIDVRTSGMIAAPALGMRQR-----		
Consensus	(501)	G VATSGIPA PAGGMKRR RK		
		551		600
ScNha1p	(550)	LNRRQKLRNKGREIFSSRSKNEMYDDDELNDLGRERLQKEKEARAATFAL		
ZrNha1p	(515)	-NRRNKRKELLHVLVSGNGTN----EELNDLGRERLQREKEARAATFAL		
ZrSod2-22p	(512)	--WRQKLHG-----N----KETESDIEMSDLQRQREEHTGTIDL		
Consensus	(551)	NRRQKLR I S N DEELNDLGRERLQREKEARAATFAL		
		601		650
ScNha1p	(600)	STAVNTQRNEEIGMGGDEEEDYTPPEKEYSDNYNNTPSFESSERS---SS		
ZrNha1p	(560)	STAAVRGTNKDTLEAEGQTPGGSDSTEQVASNEPTKSDIDIMNREETVHA		
ZrSod2-22p	(545)	NDTTTETLGTNARTPGLAQ-----RSKVNIMNRTEVTNT		
Consensus	(601)	STA N N D A A G A N KS IDIMNRSETV S		

		651		700
ScNhalp	(647)	LRGRTYVPRNRYDGEETES	EIESEDEME-----	NE
ZrNhalp	(610)	ISGLDELARDREHGEINLI	EGGGEEEDLGAISTPRSQT	TEDIDEKLSRGE
ZrSod2-22p	(580)	IYGLDKLADDTENHDVYHV	ETSRVHDIG-----	SSHDDVYTYE
Consensus	(651)	I GLD LARDRE GEI IE EDEI		D L E
		701		750
ScNhalp	(677)	SER-SMASSEERRIRKMK	EEEMKPGTAYLDGNRM	IENKQGEILNQVDIE
ZrNhalp	(660)	SETGSRRSAESERMRI	REEEQAHVAYAEDDQL	IENAEGEVIDEARYN
ZrSod2-22p	(618)	FDADSIDSLERERIK	LLREQEQQAYIAYTED	NQVIIENRQGEILEYARSH
Consensus	(701)	SE SI SAE ERIRKIREEE	QAHIA Y EDNQLIIEN	KQGEILD AR
		751		800
ScNhalp	(726)	DRNEARDDEVSVDSTA	HSSLTMTNLSSSSG-----	GRLKRILTPTS
ZrNhalp	(710)	KPRKDEEHGLPHPHHA	QHENDGESPIIRSDSN	RSRGHSSLSLKRVLSPKF
ZrSod2-22p	(668)	NDG-VRDAEAGSHNQ	GRHKRAS-----S-----	
Consensus	(751)	RD EL H A H S I S S		LKRILSP
		801		850
ScNhalp	(769)	LGKIHSLVDKKGDKN	KNSKYHAFKIDNLLI	ENEDGDVIKRYKINPHKSD
ZrNhalp	(760)	EGKLQDKMRRSSSYR	RANKYYAYKIDNQLI	EDKEGEVLRRYKINTRTSG
ZrSod2-22p	(690)	P--PLERLRQITNEACK	TKYAYKVGNDLIVE	DES GEEFRRYRISP HGG--
Consensus	(801)	GKI DKLRK S K SKYY	AYKIDN LIIEDEDE	GEVIRRYKINPH S
		851		900
ScNhalp	(819)	DDKSKNRPRN----	DSVVSRALTAVGLKSK	ANSVPPP-----VDEEK
ZrNhalp	(810)	NDKKKPEEKSGTAGG	KVMNKALSAVGIKNRS	APNNPEGNVSPTRGEENLK
ZrSod2-22p	(737)	--KRKIKKKN---	INNPVSSVLSMGI	TK-----P-
Consensus	(851)	DKK K KN VVSKAL	SAVG I K A P	D K
		901		950
ScNhalp	(858)	AIEGPSRKGPMLKKR	TLPAPPRGVQDSL	DLEDEPSSEEDLGDSYNMDD
ZrNhalp	(860)	MVRNPTPAPKDSYRR	PELENDQGD	DDYEDGEDSNDEDNRDSYDDNY
ZrSod2-22p	(762)	-----RRVPE--	RKNHSLHSEDEMA	DEAESEENYGDSDDLALFVKDH
Consensus	(901)	I PSR P KK SLL	ADD G DD E EDE S	DED DSY DH
		951		1000
ScNhalp	(908)	SEDYDDN-----	AYESETEFERQRL	NALGEMTAPADQDD
ZrNhalp	(910)	TDDSEEDGEERDNVD	GDSTSVRSNESES	AVERRRLNALGHFSAPRDQDD
ZrSod2-22p	(805)	AD-----		
Consensus	(951)	SDD DD A ESES	ER RRLNALG	SAP DQDD
		1001		1043
ScNhalp	(943)	EELPPLPVEAQTGND	GPSTAEGKKQKSA	AVKSALSCTLGLNK
ZrNhalp	(960)	EEEEPTPLEAQA-QS	-----GAKNSTTK	VKDSLGRKFHLK-
ZrSod2-22p	(807)	-----		
Consensus	(1001)	EE PP PLEAQ N	G K S	VK AL K L

Červeně, aminokyselinové zbytky konzervované ve všech třech antiportérech;  
 modře, aminokyselinové zbytky konzervované alespoň ve dvou antiportérech;  
 zeleně, aminokyselinové zbytky vykazující podobnost s konsenzuální sekvencí;  
 černě, aminokyselinové zbytky nevykazující podobnost.

K analýze byl využit program Vector NTI (Invitrogen).

### 10.3. Seznam autorčiných publikací a rukopisů

#### La liste de publications de l'auteur de thèse

##### Publikované práce nebo práce v tisku/Publié ou sous presse:

Příbylová, L., Straub, M.L., Sychrová, H., de Montigny, J. (2007): Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors. *Chromosome Res* (v tisku/sous presse; DOI 10.1007/s10577-007-1136-z)

Příbylová, L., Farkaš, V., Slaninová, I., de Montigny, J., Sychrová, H. (2007): Differences in osmotolerant and cell wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains. *Folia Microbiol* (v tisku/sous presse)

Příbylová, L., de Montigny, J., Sychrová, H. (2007): Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* **24**(3): 171-80

Příbylová, L., Papoušková, K., Zavřel, M., Souciet, J.-L., Sychrová, H. (2006): Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison. *Folia Microbiol* **51**(5): 413 – 424

Příbylová, L., Sychrová, H. (2006): Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *MPRI* gene encoding N-acetyltransferase in *Zygosaccharomyces rouxii* confers resistance to L-azetidine-2-carboxylate. *Folia Microbiol* **51**(3): 203 – 209

Příbylová, L., Sychrová, H. (2003): Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation. *J Microbiol Methods* **55**(2): 481 – 4

##### Rukopisy odeslané k recenznímu řízení/Soumis:

Příbylová, L., de Montigny, J., Sychrová, H. (2007): Development of tools for genetic manipulation in *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res*

##### Připravované rukopisy/En préparation:

Příbylová, L., Papoušková, K., de Montigny, J., Sychrová, H.: Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporters.