

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Metod PRELEC

**KEMIJSKO GENOMSKA ANALIZA ODZIVA  
EVKARIONTSKE CELICE NA CINKOV STRES**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Metod PRELEC

**KEMIJSKO GENOMSKA ANALIZA ODZIVA EVKARIONTSKE  
CELICE NA CINKOV STRES**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**CHEMICAL GENOMIC ANALYSIS OF EUKARYOTIC CELL'S  
RESPONSE TO ZINC STRESS**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Praktični del je bil opravljen v laboratoriju Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti (B2) na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je na seji dne 26. 6. 2007 sprejel temo in za mentorja diplomske naloge imenoval prof. dr. Uroša Petroviča, za recenzenta je bil na seji dne 11. 3. 2016 imenovan doc. dr. Matej Butala.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Uroš PETROVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 16. 9. 2016

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Metod PRELEC

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577.2(043.2)=163.6  
KG *Saccharomyces cerevisiae*/kemijska genomika/cinkov stres/membranska homeostaza  
AV PRELEC, Metod  
SA PETROVIČ, Uroš (mentor)/BUTALA, Matej (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2016  
IN KEMIJSKO GENOMSKA ANALIZA ODZIVA EVKARIONTSKE CELICE NA CINKOV STRES  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP X, 61 str., 2 pregl., 14 sl., 75 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI *Sacharomyces cerevisiae* je eden najboljše preučenih evkariontskih modelnih organizmov. Celične homeostaze ter povezani mehanizmi so odločilnega pomena za uspešno rast in razvoj celic. Še dodatno je to poudarjeno v primeru mikronutrientov, ki so s svojo funkcijo vključeni v številne pomembne celične procese. Takšen mikronutrient je tudi cink. S kemijsko genomsko analizo smo preučili odziv evkariontske celice na cinkov stres ter ovrednotili celične odzive v povezavi z membransko homeostazo. Celice kvasovke smo gojili pri prebitku, standardni koncentraciji in pri pomanjkanju cinka ter določili kemijsko genomski profil za to substanco. Skupno smo odkrili 289 delecijjskih mutant z značilnim odzivom na enega izmed pogojev: 259 z odzivom na prebitek ter 30 z odzivom na pomanjkanje cinka. V skupini odpornih mutant na povišane koncentracije cinka v okolju smo identificirali mutante z manjkajočimi geni *RIM9*, *RIM20* ter *RIM101*, ki kodirajo pomembne komponente signale poti *RIM101*, odgovorne za celični odziv na alkalno okolje. Zbrani podatki nakazujejo, da celični odzivi, sproženi preko poti *RIM101*, negativno vplivajo na adaptacijo celice na povišane koncentracije cinka v okolju. Identifikacija delecijjske mutante brez gena *INO1*, produkt katerega je odgovoren za sintezo inozitola, v skupini sevov odpornih na pomanjkanje cinka, je privedla do dognanja, da biosinteza inozitola pri nizkih koncentracijah cinka ne poteka preko delovanja *Ino1*, ampak iz fosfatidilinozitola. Izražanje gena *INO1* je uravnavano preko inhibicije kompleksa *Ino2/Ino4* z *Opi1*, ki se aktivira kot odgovor na spremenjene koncentracije fosfatidilinozitola/fosfatidiletanolamina zaradi delovanja produktov genov *PIS1* in *DPP1*. Izražanje slednjih je aktivirano ob nizkih koncentracijah cinka preko transkripcijskega aktivatorja *Zap1*. Cinkov stres ima tako tudi posledice za sintezo lipidov ter posredno vpliva tudi na membransko homeostazo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577.2(043.2)=163.6  
CX *Saccharomyces cerevisiae*/chemical genomics/zinc stress/membrane homeostasis  
AU PRELEC, Metod  
AA PETROVIČ, Uroš (supervisor)/BUTALA, Matej (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
PY 2016  
TI CHEMICAL GENOMIC ANALYSIS OF EUKARYOTIC CELL'S RESPONSE TO ZINC STRESS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 61 p., 2 tab., 14 fig., 75 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB *Sacharomyces cerevisiae* is one of the best-studied eukaryotic model organisms. Cellular homeostasis and its associated mechanisms are crucial for the successful growth and development of cells. This is further emphasized in the case of micronutrients, which are involved in a number of essential cellular processes. One of such micronutrients is zinc. Using chemical genomic analysis, we examined the response of eukaryotic cells to zinc stress and to evaluate the cellular responses in conjunction with the membrane homeostasis. Yeast cells were grown in excess, standard and zinc-depleted conditions and chemical genomic profile for the substance was determined. In total we found 289 deletion mutants with a significant growth response to one of the conditions: 259 responded to the excess and 30 responded to the depletion of zinc. In the group of mutants resistant to elevated concentrations of zinc we identified mutants with the missing genes *RIM9*, *RIM20* and *RIM101* that encode important elements of the RIM101 signal pathway, which is responsible for cellular response to alkaline environment. The data collected suggests that cellular responses triggered by the RIM101 pathway negatively affect the adaptation of the cells to elevated concentrations of zinc in the environment. Identification of a deletion mutant without the gene *INO1*, the product of which is responsible for the synthesis of inositol, in the group of strains resistant to zinc deficiency, has led us to conclude that the biosynthesis of inositol at low zinc concentrations is not carried out through the action of Ino1, but rather from phosphatidylinositol. *INO1* expression is regulated through the inhibition Ino2/Ino4 complex by Opi1 protein, which is activated in response to changing concentrations of phosphatidylinositol/phosphatidylethanolamine by the action of *PIS1* and *DPP1* gene products. Expression of the latter is activated at low zinc concentrations through the Zap1 transcription activator. Zinc stress thus influences lipid biosynthesis and consequently also affects the membrane homeostasis.

## KAZALO VSEBINE

str.

|  |             |
|--|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....                     | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b> .....                                 | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE</b> .....  | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....   | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO SLIK</b> .....   | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO PRILOG</b> .....   | <b>IX</b>   |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....  | <b>X</b>    |
| <br>   |             |
| <b>1 UVOD</b> .....  | <b>1</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA .....   | 1           |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b> .....   | <b>2</b>    |
| 2.1 OBIČAJNA KVASOVKA ( <i>Sacharomyces cerevisiae</i> ) .....             | 2           |
| 2.1.1 Splošno o kvasovki <i>S. cerevisiae</i> .....                        | 2           |
| 2.1.2 Taksonomija .....  | 3           |
| 2.1.2.1 Polna klasifikacija .....  | 3           |
| 2.1.3 Značilnosti organizma .....  | 3           |
| 2.1.3.1 Razmnoževanje .....  | 4           |
| 2.1.4 Genom .....  | 6           |
| 2.1.4.1 Predstavitev genoma kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 7           |
| 2.1.4.2 Sistematično označevanje odprtih bralnih okvirjev .....            | 8           |
| 2.1.5 Modelni organizem .....  | 8           |
| 2.1.6 Zbirka mutant .....  | 11          |
| 2.2 KEMIJSKO GENOMSKA ANALIZA .....  | 12          |
| 2.3 CINK .....   | 16          |
| 2.3.1 Cink ter kemijske lastnosti .....                                    | 16          |
| 2.3.2 Biološka vloga cinka .....   | 16          |
| 2.3.3 Homeostaza cinka .....   | 18          |
| 2.3.3.1 Vpliv pH na biološko razpoložljivost cinkovih ionov .....          | 20          |
| 2.3.4 Transport cinkovih ionov v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> .....       | 20          |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....  | <b>24</b>   |
| 3.1 MATERIAL .....   | 24          |
| 3.1.1 Kemikalije .....   | 24          |
| 3.1.2 Pribor .....   | 25          |
| 3.1.3 Programska oprema .....  | 25          |
| 3.1.4 Laboratorijska oprema .....  | 25          |
| 3.1.5 Gojišča .....  | 26          |
| 3.1.5.1 YPD .....  | 26          |
| 3.1.5.2 Pufran YPD .....   | 26          |
| 3.1.5.3 Definirana gojišča – CYCD, CYCD brez inozitola ter YCD .....       | 26          |
| 3.1.6 Sevi kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                  | 27          |
| 3.2 METODE .....   | 28          |
| 3.2.1 Splošne metode .....   | 28          |
| 3.2.1.1 Aseptičnost .....  | 28          |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 3.2.1.2      | Sterilizacija ter priprava steklovine, gojišč in raztopin .....              | 28        |
| 3.2.1.3      | Gojenje celic .....  | 28        |
| 3.2.1.4      | Odstranitev ostankov dvovalentnih ionov – keliranje .....                    | 29        |
| 3.2.1.5      | Dodajanje dvovalentnih ionov ter inozitola.....                              | 29        |
| <b>3.2.2</b> | <b>Določanje inhibitorne koncentracije cinka .....</b>                       | <b>30</b> |
| 3.2.2.1      | Sevi za določanje inhibitorne koncentracije .....                            | 30        |
| 3.2.2.2      | Izbira gojišča ter testnih pogojev – koncentracije $Zn^{2+}$ .....           | 30        |
| 3.2.2.3      | Potek določitve semi-inhibitorne koncentracije s testom z razredčinami ..... | 30        |
| <b>3.2.3</b> | <b>Izbira gojišča za preučevanje odziva na pomanjkanje cinka .....</b>       | <b>31</b> |
| <b>3.2.4</b> | <b>Presejalni test: kemijsko genomska analiza .....</b>                      | <b>31</b> |
| 3.2.4.1      | Manipulacija zbirke YKO z robotskim manipulatorjem .....                     | 31        |
| 3.2.4.2      | Izvedba.....   | 33        |
| 3.2.4.3      | Zajem ter analiza podatkov.....  | 34        |
| 3.2.4.4      | Analiza.....   | 35        |
| <b>3.2.5</b> | <b>Potrditveni testi - določanje rastnih krivulj .....</b>                   | <b>37</b> |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1          | DOLOČITEV INHIBITORNE KONCENTRACIJE $ZN^{2+}$ IONOV .....                    | 38        |
| 4.2          | PRESEJALNI TEST .....  | 39        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Pomanjkanje cinka .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Prebitek cinka .....</b>  | <b>41</b> |
| 4.3          | KOMBINACIJA VPLIVOV pH, PREBITKA CINKA TER SIGNALNE POTI RIM101.....         | 43        |
| 4.4          | VPLIV NA BIOSINTEZO LIPIDOV .....  | 46        |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7</b>     | <b>VIRI .....</b>  | <b>55</b> |
|              | <b>ZAHVALA</b>   |           |
|              | <b>PRILOGE</b>   |           |

## KAZALO PREGLEDNIC

|   | str. |
|---|------|
| Pregl. 1: Inkubacijski časi testnih ter kontrolnih plošč pri posameznem presejalnem testu ter smeri. .... | 32   |
| Pregl. 2: Pogoji za razvrstitev posamezne mutante kot občutljivo/odporno. ....                            | 35   |



## KAZALO SLIK

|  | str. |
|--|------|
| Sl. 1: Celični cikel kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (prirejeno po Alberts in sod., 2002: 37). ....  | 5    |
| Sl. 2: KanMX delecijaska kasete (Giaever in sod., 2002: 388).....  | 11   |
| Sl. 3: Kemijsko genomska analiza (prirejeno po Brenner, 2004).....   | 13   |
| Sl. 4: Primerjava kemijsko-genetskih in sintetsko-genetskih interakcij (prirejeno po Parsons in sod., 2004: 63).....   | 14   |
| Sl. 5: Prenašalci ter celični transport cinkovih ionov v kvasovki <i>S. cerevisiae</i> (Eide, 2006: 714).....  | 22   |
| Sl. 6: Primer zajete slike testne petrijevke po inkubaciji.....  | 32   |
| Sl. 7: Primerjava rasti kolonij sevov divjega tipa (WT), <i>zap1Δ</i> , <i>zrc1Δ</i> ter <i>zrt1Δ</i> pri različnih koncentracijah $Zn^{2+}$ .....   | 38   |
| Sl. 8: Širši procesi s številom pripadajočih genov oziroma ustreznih identificiranih delecijaskih mutant pri pomanjkanju cinka.....  | 40   |
| Sl. 9: Širši procesi s številom pripadajočih genov oziroma ustreznih identificiranih delecijaskih mutant pri prebitku cinka.....   | 41   |
| Sl. 10: Rastne krivulje mutante <i>rim9Δ</i> , rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT). ....  | 44   |
| Sl. 11: Rastne krivulje mutante <i>rim20Δ</i> , rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT). ....   | 44   |
| Sl. 12: Rastne krivulje mutante <i>rim101Δ</i> , rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT). ....  | 45   |
| Sl. 13: Rastne krivulje mutante <i>zap1Δ</i> , rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT). ....  | 45   |
| Sl. 14: Rastne krivulje divjega tipa (WT), mutant <i>ino1Δ</i> ter <i>zap1Δ</i> , pri običajni koncentraciji cinkovih ionov - 2,5 $\mu$ M (K), ob pomanjkanju – 50 nM (T) ter z različnimi koncentracijami inozitola. Levo 0 mg/l (pomanjkanje); sredina 2 mg/l (običajna koncentracija); desno 20 mg/l (10x koncentracija, prebitek)..... | 47   |

## **KAZALO PRILOG**

Priloga A: Identificirane mutante – prebitek cinkovih ionov

Priloga B: Identificirane mutante – pomanjkanje cinkovih ionov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|       |   |
|-------|---|
| ADH   | alkoholna dehidrogenaza   |
| DNA   | deoksiribonukleinska kislina  |
| EDTA  | etilendiamintetraocetna kislina (ang. Ethylenediaminetetra acetic acid) |
| ER    | endoplazemski retikulum   |
| GA    | Golgijev aparat   |
| HEPES | N-[2-hidroksietil]piperazin-N´-[2-etan-sulfonska kislina]               |
| MDR   | splošna odpornost na kemikalije (ang. MultiDrug Resistance)             |
| mtDNA | mitohondrijska DNA  |
| ORF   | odprti bralni okvir (ang. Open Reading Frame)                           |
| PA    | fosfatidna kislina  |
| PE    | fosfatidiletanolamin  |
| pH    | negativni desetiški logaritem koncentracije ionov $H_3O^+$              |
| PI    | fosfatidilinozitol  |
| ROS   | reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)                |
| rRNA  | ribosomska ribonukleinska kislina                                       |
| SD    | standardna deviacija  |
| SOD   | superoksid dismutaza  |
| tRNA  | prenašalna ribonukleinska kislina                                       |
| UV    | ultravijolična svetloba   |
| WT    | sev divjega tipa  |
| WT    | sev divjega tipa  |
| YKO   | (zbirka) delecijskih mutant (ang. Yeast Kock Out)                       |

## 1 UVOD

Običajna kvasovka (*Saccharomyces cerevisiae*) je organizem, brez katerega si sodobnega življenja skoraj ne moremo predstavljati, saj je prisotna pri pripravi številnih osnovnih prehranskih izdelkov, industrijskih procesih, pri proizvodnji farmakoloških učinkovin ter nenazadnje kot enocelični organizem predstavlja v znanstvenem svetu enega najboljše preučeni evkariontskih organizmov. Tudi zaradi izredno enostavnega gojenja na raznovrstnih substratih ter rasti v aerobnih kot anaerobnih pogojih, enostavnosti genskih manipulacij tega organizma ter ohranjenosti regulacijskih procesov tekom evolucije, se jo vedno bolj uporablja za preučevanje uravnavanja genskih mehanizmov ter nastanka številnih bolezni (Dashko in sod., 2014; Parsons in sod., 2003).

Kemijska genomika je eden izmed najbolj učinkovitih celostnih pristopov za identifikacijo tarč, na katere deluje preiskovana snov. Temelji na naboru mutant, ki pokrijejo celoten genom, tako da lahko iz odzivov mutant na preiskovano snov sklepamo na verjetne molekulske mehanizme delovanja kemikalije.

V našem primeru je bila preiskovana snov cink, esencialen mikronutrient z raznoliko biološko vlogo. Cink lahko tvori aktivni ali strukturni motiv v proteinih, deluje kot antioksidant ali prenašalec in sodeluje v številnih esencialnih procesih, na primer pri uravnavanju sinteze membranskih lipidov ali pri odzivu na stresne okoljske pogoje. Pri človeku je poznana vloga cinka v patogenezi številnih bolezni, vključno z diabetesom, ter pri nastanku imunskega odziva. Vsi molekulske mehanizmi delovanja cinka niso znani niti pri kvasovki niti pri človeku, zato smo uporabili kemijsko genomiko cinka na modelnem organizmu, kvasovki *S. cerevisiae*.

### 1.1 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge smo preučili vpliv prebitka ali pomanjkanja cinka na rast mutant kvasovke *S. cerevisiae* ter tako na genomski ravni identificirati procese povezane s cinkovimi ioni.

Hipoteza je bila: Cinkov stres vpliva na procese, vključene v zagotavljanje homeostaze membran kvasovke *S. cerevisiae*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OBIČAJNA KVASOVKA (*Sacharomyces cerevisiae*)

#### 2.1.1 Splošno o kvasovki *S. cerevisiae*

Običajna kvasovka z latinskim imenom *Sacharomyces cerevisiae* je vrsta, ki jo človek pozna in uporablja že tisočletja. K njeni uporabnosti in prepoznavnosti najbolj pripomore sposobnost fermentacije sladkorja, dopolnjuje pa enostavnost njenega gojenja ter njena razširjenost in razpoložljivost v naravi. Človek jo že tisočletja izkorišča za proizvodnjo alkoholnih pijač ter za vzhajanje testa pri peki. Tradicionalno uporabo na plodovih prisotnih divjih tipov kvasovk, predvsem pri proizvodnji alkoholnih pijač, je ob sočasnem razvoju učinkovitejših tehnoloških postopkov izpodrinila uporaba selektivno izbranih sevov, ki zagotavljajo želene lastnosti produkta ob kar najboljšem izkoristku ter konstantni kvaliteti. Poleg uporabe pri pridobivanju alkoholnih pijač ter peki, uporabljajo kvasovke v prehrambni industriji tudi kot dodatek k prehrani (Madigan in sod., 2003: 123). Zaradi splošne razširjenosti vrste ter uporabe lokalnih sevov je genetska raznolikost kvasovk, ki jih človek uporablja, izredno velika in kaže, da so sevi, ki se uporabljajo znotraj določenega geografskega območja oziroma znotraj posamezne panoge, bolj sorodni kot med različnimi panogami oziroma geografskimi območji. Raziskave kažejo tudi, da je človek skupaj s širjenjem posameznih panog širil tudi posamezne seve, ki so jih v tej panogi uporabljali (Legras in sod., 2007).

Kvasovka *S. cerevisiae* se je v zadnjih desetletjih uveljavila tudi na znanstveno-raziskovalnem področju v raziskavah molekularne in celične biologije evkariontov, kjer predstavlja enega najenostavnejših in najbolj preučen evkariontski modelni organizem. Prodor na to mesto ji je poleg same robustnosti organizma, enostavnosti gojenja v laboratoriju ter preprostosti in učinkovitosti genetskih manipulacij omogočila tudi določitev zaporedja baznih parov genoma, anotacija genov ter prosta dostopnost zbranih podatkov (Goffeau in sod., 1996; Kucharczyk in Rytka, 2001; Karathia in sod., 2011). Številne raziskave so poleg odkritja ter določitve delovanja številnih osnovnih procesov v kvasni celici omogočile boljše razumevanje biologije evkariontske celice in posledično tudi biologije človeka na podlagi preučevanja homologov človeških proteinov (Ostergaard in sod., 2000; Sun in sod., 2016).

## 2.1.2 Taksonomija

Kvasovke so kot netaksonomska kategorija opredeljene na podlagi morfoloških ter fizioloških značilnosti celic, ena najbolj znanih je sposobnost fermentacije sladkorjev in produkcije etanola, zato je ta skupina zelo heterogena in zajema vrste iz obeh skupin gliv, askomicet ter bazidiomicet. Kvasovke so enocelične glive in večina izmed njih je zaprtotrošnic - askomicet (Madigan in sod., 2003: 488).

### 2.1.2.1 Polna klasifikacija

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| Kraljestvo: | <i>Fungi</i>                    |
| Deblo:      | <i>Ascomycota</i>               |
| Poddeblo:   | <i>Saccharomycotina</i>         |
| Razred:     | <i>Saccharomycetes</i>          |
| Red:        | <i>Saccharomycetales</i>        |
| Družina:    | <i>Saccharomycetaceae</i>       |
| Rod:        | <i>Saccharomyces</i>            |
| Vrsta:      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

Klasifikacija povzeta po spletnem mestu Taxonomy browser, NCBI (Tax. brows., NCBI).

## 2.1.3 Značilnosti organizma

Kvasovka *S. cerevisiae* ima sferične do ovalne celice, ki tekom eksponentne faze rasti oblikujejo skupke ali klastre, ki vsebujejo nekoliko večje število celic na skupek pri haploidnih kot pri diploidnih celicah. Velikost celic je odvisna od faze rasti ter od seva. Diploidne celice so tako nekoliko večje ter ovalne oblike z merami okrog 5x6 µm, haploidne pa nekoliko manjše ter kroglaste s premerom približno 4 µm (Sherman, 2002).

Običajne kvasovke najboljše uspevajo v okolju, bogatem s sladkorji (glukozo), kjer lahko izvajajo dva nasprotujoča si načina kemoorganotrofnega metabolizma, fermentacijo ter respiracijo. Ena izmed najpomembnejši lastnosti kvasovke *S. cerevisiae* je, da lahko vzdržujejo fermentativni način metabolizma tako v anaerobnih kot tudi v aerobnih pogojih rasti. V aerobnih pogojih je sicer mogoča respiracija, vendar pa kvasovka *S. cerevisiae* vzdržuje fermentativni metabolizem, dokler je glukoza prisotna v visoki koncentraciji (Dashko in sod., 2014). Sposobnost fermentativnega načina presnove sladkorjev v aerobnih pogojih in pridobivanja energije z glikolizo poleg tvorbe za kvasno celico sicer

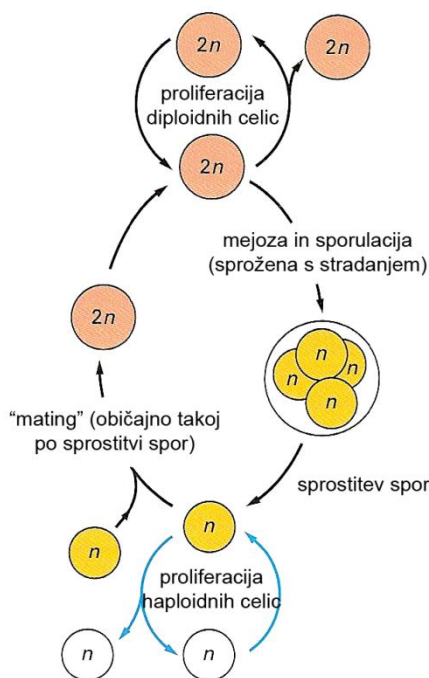
stranskega, a za človeka pomembnega produkta, etanola, omogoča celici tudi preživetje v primeru okvar mitohondrijskih proteinov, ki sodelujejo v procesih povezanih z respiracijo, naj si bo okvara nastala zaradi spontane mutacije ali zaradi genetskih manipulacij s strani raziskovalcev. Pri aerobnem metabolizmu lahko izkoriščajo tudi druge nefermentativne oblike ogljika, kot sta etanol ter glicerol. Poleg glukoze lahko kvasovka *S. cerevisiae* z ustreznimi modifikacijami metabolizma, doseženimi s klasičnim križanjem ali genetskimi metodami, izkorišča tudi druge, za kvasovko drugače nedostopne vire ogljika, kot so laktoza, malat, melobioza, ksiloza,  $\beta$ -glukani ter škrob in dekstrini (Ostergaard in sod., 2000). Cilj tovrstnih raziskav pri tako imenovanem metabolnem inženiringu je izraba alternativnih energetskih virov za rast organizma in/ali proizvodnjo komercialno zanimivih metabolnih produktov, katerih kvasovka sama ne more proizvajati.

#### 2.1.3.1 Razmnoževanje

Razmnoževanje kvasovke *S. cerevisiae* poteka tako spolno, torej z združitvijo dveh haploidnih celic nasprotnega paritvenega tipa v eno diploidno celico in ob ustreznih pogojih z nastankom štirih novih haploidnih celic prek mejoze, kot tudi nespolno z mitozo v procesu brstenja, ki je značilen za oba celična stadija. Način razmnoževanja je predvsem odvisen od okoljskih pogojev, saj se običajno razmnožujejo z brstenjem, spolno razmnoževanje in nastanek spor pa je odgovor na manj ugodno okolje (Alberts in sod., 2002: 37).

Pri spolnem razmnoževanju se dve haploidni celici nasprotnih paritvenih tipov, ki jih določata dva alela, *MATa* in *MAT $\alpha$* , združita in tvorita diploid. Celice izločajo paritvena faktorja *a* ter  $\alpha$ , ki služita kot signalni molekuli nasprotnemu tipu celice in prek receptorjev usmerjata polarizirano rast haploidov pri njuni združitvi (Alberts in sod., 2002: 969). Nastala diploidna celica se nato lahko prične nespolno razmnoževati z brstenjem in tako vzdržuje diploidno generacijo, ali pa vstopi v redukcijsko delitev, kar vodi v nastanek štirih haploidnih spor, nato pa se ob sprostitvi spor iz aska razvijejo nove haploidne celice (Slika 1). Paritveni tip pri kvasovki *S. cerevisiae* ni stalen in v naravnih sevih prihaja do njegove zamenjave (ang. »mating type switching«). Proces zamenjave paritvenega tipa je kompleksen, natančno uravnan in lahko nastopi z vsako novo generacijo, pri tem pa paritveni tip spremeni približno polovica haploidnih celic v populaciji (Haber, 1998).

Raziskave kažejo, da lahko zamenjavo tipa opravijo le celice, ki so se pred tem že vsaj enkrat delile (Strathern in Herskowitz, 1979).



Slika 1: Celični cikel kvasovke *S. cerevisiae* (prirejeno po Alberts in sod., 2002: 37).

Pri nespolnem razmnoževanju, brstenju, se na površini starševske celice tvori majhna izboklina, brst, ki se nato poveča in dokončno loči od matične celice (Madigan in sod., 2003: 488). Nespolno razmnoževanje z brstenjem poteka pri obeh tipih celic, haploidnih in diploidnih. Ob ustreznih rastnih pogojih brstenje omogoča praktično neomejeno vzdrževanje populacije v haploidni ali diploidni obliki. Mesto nastanka naslednjega brsta na materinski celici je odvisno od ploidnosti: pri haploidnih celicah nastane nov brst poleg prejšnjega, pri diploidnih pa večinoma na nasprotnem polu (Sherman, 2002). Razmnoževanje z brstenjem in nastanek dveh neenakih celic, večje materinske ter manjše hčerinske, dokazuje asimetričnost celične zgradbe, kljub zelo enostavni strukturi celice glede na ostale evkariontske organizme. Asimetrija kvasne celice je posledica polarne orientacije aktinskega citoskeleta v celici (Alberts in sod., 2002: 969).



#### 2.1.4 Genom

Genom kvasovke *S. cerevisiae* v haploidni obliki znaša nekoliko več kot 12 milijonov baznih parov, ki so razporejeni na 16 kromosomih. Poleg jedrnega kromosomalnega genoma poznamo pri kvasovki *S. cerevisiae* tudi naravni plazmid  $2\mu$  ter mitohondrijsko deoksiribonukleinsko kislino (DNA) (Sherman, 2002). Celotno zaporedje genoma izbranega referenčnega seva S288C je bilo objavljeno aprila 1996 (Goffeau in sod., 1996). Določitev in objava zaporedja je rezultat sodelovanja več laboratorijev iz Evrope, severne Amerike ter Japonske in je v času objave predstavljala prvi evkariontski ter hkrati največji genom z določenim zaporedjem nukleotidov. Prvotne analize so pokazale, da zaporedje kromosomske DNA sestavlja 12,068 kilobaznih parov, vsebovalo pa naj bi 6275 odprtih bralnih okvirjev, ORF-ov (iz ang. »Open Reading Frame«), od katerih naj bi le 5885 dejansko nosilo zapis za proteine (Goffeau in sod., 1996). Prvotno so za protein kodirajoče gene določili ORF-e, daljše od 100 kodonov. Tako identificirane ORF-e so nato tekom številnih raziskav testirali in odkrili nove ORF-e, popravili stare ter nekatere tudi izbrisali. Novo odkriti ORF-i so tudi krajši od 99 kodonov, vendar se le redki izmed njih v kvasni celici prevedejo v proteine (Fisk in sod., 2006).

Objavljeno zaporedje je sprva zajemalo le kromosomsko DNA, medtem ko je bila mitohondrijska DNA (mtDNA) do objave celotnega zaporedja leta 1998 nepopolna (Foury in sod., 1998). Pred tem je bilo znano le delno zaporedje mtDNA, sestavljeno iz več delnih zaporedij, pridobljenih iz nepovezanih sevov kvasovke *S. cerevisiae*. mtDNA zajema ~86 kilobaznih parov z 28 identificiranimi ORF-i. Za osnovo je bil uporabljen sev FY1679, ki je izogenski derivat seva S288C (Foury in sod., 1998).

Genom kvasovke *S. cerevisiae* je v primerjavi z drugimi evkariontskimi organizmi relativno majhen, a izredno kompakten. Z dolžino ~12 megabaznih parov se po velikosti in vsebnosti protein-kodirajoče kromosomske DNA, ki znaša približno 70%, lahko primerja z bakterijskimi genomi, v katerih lahko delež DNA, ki kodira proteine, preseže 90%. Ena izmed lastnosti genomov evkariontov so tudi introni, deli nekodirajočega zaporedja, ki prekinjajo protein-kodirajoče zaporedje (ekson) na več delov. Delež protein kodirajočih zaporedij, ki vsebujejo introne, je odvisen tudi od vrste in pri kvasovki znaša 4% (Madigan in sod., 2003: 178-79). V nasprotju z genomom kvasovke *S. cerevisiae* je humani genom

sestavljeno iz več kot  $3 \times 10^9$  baznih parov nukleotidov. Protein-kodirajoča zaporedja zasedajo le 1,2% genoma in v povprečju vsebuje vsako po 10 intronov. Število predvidenih protein-kodirajočih genov v humanem genomu je med 20 in 25 tisoč (International Human Genome Sequencing consortium, 2004).

#### 2.1.4.1 Predstavitev genoma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Glede na podatke »*Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot«, ki so objavljeni na spletnih straneh Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org>), je bilo 9. marca 2016 znanih skupno 6604 ORF-ov, od tega se jih 6572 nahaja v jedrnem genomu, 28 v mitohondrijskem genomu ter 4 na plazmidu  $2\mu$ . Skupna dolžina genoma kvasovke *S. cerevisiae* znaša 12.163.423 baznih parov, pri tem je dolžina mitohondrijske DNA 85.779 (~0,7%), dolžina kromosomske pa 12.071.326 baznih parov (99,2%). Genska informacija v jedru je razporejena v 16 kromosomov velikosti od 230.218 (kromosom I) do 1.151.933 (kromosom IV) baznih parov. Poleg ORF-ov, t.j. zaporedij, ki potencialno kodirajo proteine, se v genomu nahajajo tudi drugi zapisi, kot so na primer zaporedja za rRNA (27), tRNA (299), retrotranspozone in druge, tako znese skupno število vseh znanih elementov v genomu 7997.

ORF-i so porazdeljeni v tri ločene skupine, določene na podlagi stopnje verjetnosti, da dejansko kodirajo proteine. Pri tem je postavitve ORF-a v posamezno skupino osnovana na ročni potrditvi eksperimentalnih podatkov ter ohranjenosti zaporedja baznih parov: preverjeni ORF – v to skupino so uvrščeni ORF-i, ki so bili eksperimentalno potrjeni; neopredeljeni ORF – skupina, ki ima ortolog v vsaj eni vrsti ter obstaja velika verjetnost, da kodirajo protein, vendar še ni eksperimentalnih dokazov; dvomljivi ORF – skupina z nizko verjetnostjo, da bi kodirali protein, njihovo zaporedje ni ohranjeno v sorodnih vrstah ter ni eksperimentalnih dokazov, da bi kodirali protein (Hirschman in sod., 2006).

Od 6604 trenutno določenih ORF-ov je 5143 (78%) preverjenih, 677 (10%) jih je neopredeljenih, preostalih 784 (12%) ORF-ov je dvomljivih. Skupno neopredeljeni in dvomljivi ORF-i tako predstavljajo nekoliko manj kot četrtino vseh ORF-ov.

Število biološko pomembnih ORF-ov je stvar znanstvene debate že od določitve zaporedja kvasovke *S. cerevisiae* dalje in se z novimi eksperimentalnimi dokazi še vedno spreminja.

Dejstvo je, da je praktično nemogoče eksperimentalno dokazati, da je nek ORF dejansko nefunkcionalen, kajti vedno obstaja možnost, da kodira protein, ki je v celici prisoten le v nekaj kopijah ali pa se izrazi le v nekih specifičnih življenjskih pogojih (Fisk in sod., 2006).

#### 2.1.4.2 Sistematično označevanje odprtih bralnih okvirjev

Veliko število elementov, v tem primeru ORF-ov, zahteva tudi ustrezno sistematično označevanje. Pri kvasovki *S. cerevisiae* je uporabljena oblika YCRXXXw za označevanje posameznega gena oziroma ORF-a v genomu, kjer Y označuje kvasovko (ang. Yeast); C (ali A, B, itd.) označuje kromosom III (ali I, II, itd.); R (ali L) označuje desno (ali levo) (ang. Right / Left) stran kromosoma glede na centromero; XXX označuje relativno pozicijo začetka odprtega bralnega okvirja od centromere; in w (ali c) označuje 'Watsonovo' (ali 'Crickovo') verigo DNA. Vsak gen je, kjer je to mogoče, opisan tudi s standardnim tričrkovnim imenom (npr. ARG), ki mu sledi številka, npr. ARG2 (Sherman, 2002).

Za primer vzemimo ORF *YBL008W*, ki označuje *HIR1* (ang. Histone Regulation) je situiran na levi strani (L) kromosoma II (B), osmi ORF od centromere (008) na Watsonovi verigi (W).

#### 2.1.5 Modelni organizem

Pri izboru organizma za uporabo pri raziskavah je potrebno upoštevati številne lastnosti, kot so velikost, dostopnost, generacijski čas, razmeroma majhen genom, možnost manipulacije, ohranjenost mehanizmov in potencialna ekonomska uporaba. Kvasovka *S. cerevisiae* se je uveljavila kot modelni organizem, ker ustreza mnogim izmed teh kriterijev.

Kvasovka *S. cerevisiae* je v primerjavi z drugimi evkariontskimi celicami, predvsem pa s celicami višjih evkariontov, kjer še posebej izstopajo specializirane celice tkiv, zaradi enoceličnosti ter majhnosti, relativno enostaven organizem. Za analizo delovanja evkariontske celice na subcelični ravni je smiselno uporabiti kar najbolj enostaven enocelični organizem, saj se s tem izognemo motnjam, ki bi jih predstavljali razvojni mehanizmi mnogoceličnega organizma. Zaradi te enostavnosti lahko kvasovko *S.*

*cerevisiae* opredelimo kot minimalni evkariontski modelni organizem (Alberts in sod., 2002: 35).

Enostavnosti navkljub se v delu predstavljeni organizem ponaša z veliko robustnostjo, ki se kaže v sposobnosti preživetja ter posledično gojenja na enostavnih gojiščih ter pri raznolikih okoljskih pogojih. Prav ta sposobnost preživetja v raznolikih življenjskih pogojih, tako sestavi gojišč kot tudi variabilnosti drugih abiotskih dejavnikov, kot so na primer temperatura, koncentracije soli, vir ogljika itd., omogočajo izvajanje poizkusov v širokem spektru življenjskih pogojev (Alberts in sod., 2002: 36).

Kratek generacijski čas, primerljiv z bakterijskim, omogoča pridobitev velikega števila novih celic v zelo kratkem času. V optimalnih pogojih se celični cikel *S. cerevisiae* zaključi v 90 minutah na bogatem oziroma v 140 minutah na sintetičnem definiranem gojišču (Sherman, 2002). Kratek generacijski čas ima pomembno vlogo tudi z ekonomskega vidika, saj omogoča hitrejšo izvedbo in hkratno izvajanje več poskusov ter tako prihranek na sredstvih ter surovinah.

Možnost gojenja celic v haploidni ali diploidni obliki in možnost sprožitve prehoda med fazama z ustreznimi ravnimi pogoji ponuja možnosti, ki jih pri mnogih ostalih organizmih ne moremo izkoriščati. Haplidi omogočajo enostavno preučevanje recesivnih alelov, ki se običajno v diploidnih celicah, razen v primeru homozigota, zaradi morebitne dominancije alela v komplementarni verigi DNA, ne izrazijo. Po drugi strani diploidi omogočajo preučevanje esencialnih genov, saj ob deleciji ali mutaciji katerega izmed njih haploidna celica ne preživi ali ni viabilna zaradi defekta edine kopije izbranega gena. V diploidu se taka mutacija oziroma delecija esencialnega gena kompenzira z njegovo kopijo, oziroma alelom, na homolognem kromosomu (Alberts in sod., 2002: 36, 987).

Tekom evolucije so se ohranile številne osnovne biološke funkcije, kar se kaže v podobnem poteku številnih celičnih procesov v kvasovki in v višjih evkariontskih organizmih. Ta ohranjenost je še posebej opazna pri najbolj osnovnih celičnih procesih, kot so osnovni celični metabolizem ter celična delitev celice (Parsons in sod., 2003). Povezave se kažejo v ohranjenosti zaporedij številnih homolognih oziroma ortolognih proteinov, ki sodelujejo v podobnih oziroma istih procesih. Raziskave kažejo, da si več kot 40% kvasnih proteinov deli del ohranjenih zaporedij z vsaj enim znanim ali predvidenim človeškim

proteinom, vključno s številnimi proteini, povezanimi z boleznimi pri človeku (Baetz in sod., 2004; Parsons in sod., 2003). Na podlagi teh ugotovitev je kvasovka *S. cerevisiae* idealen organizem za preučevanje tarč zdravil za človeka ter biokemijskih poti, na katere vplivajo (Parsons in sod., 2003). Posebnega pomena je za razvoj zdravil za rakava obolenja, saj lahko številne mutacije povezane z rakavimi obolenji človeka izrazimo v kvasovki (Bennett in sod., 2000). Drugo pomembno področje je razvoj novih protiglivnih zdravil – antimikotikov. Zaradi svoje nepatogenosti ter sorodnosti z nekaterimi za človeka patogenimi vrstami gliv, na primer *Candida albicans* in *Aspergillus fumigatum*, lahko raziskave na kvasovki *S. cerevisiae* vodijo do odkritja novih tarč ter učinkovitejših protiglivnih zdravil (Parsons in sod., 2003).

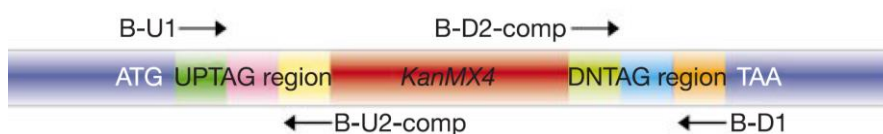
Vse omenjene lastnosti, vključno z znanim zaporedjem DNA, relativno majhnostjo genoma, ki je za evkariontski organizem izredno majhen, a vendar zadostuje za opravljanje vseh osnovnih nalog, nujnih za preživetje evkariontske celice (Alberts in sod., 2002: 37) ter enostavnost in natančnost genskih manipulacij – tuj genski material se v genom vgradi skoraj izključno s homologno rekombinacijo, kar omogoča natančno manipulacijo genskega materiala z usmerjanjem tuje DNA na točno določena mesta v genomu (Sherman, 2002) – so zasidrale kvasovko *S. cerevisiae* kot enega ključnih modelnih organizmov za genetske študije evkariontov. Poleg tega razpoložljivost zbirk delecijjskih mutant omogoča izvedbo eksperimentov na ravni celotnega genoma. Takšne raziskave omogočajo celosten vpogled v potencialne tarče posameznega testnega pogoja ter, z ustrežno analizo tako pridobljenih podatkov, v identifikacijo povezanih procesov ter produktov genov, ki v teh procesih sodelujejo. Posledično raziskave na genomski ravni vodijo v izbor nadaljnjih poizkusov za določitev neposrednih tarč, na katere vpliva preiskovani testni pogoj.

Raziskave na kvasovki *S. cerevisiae* so tako omogočile razumevanje mnogih ključnih procesov v celici, kot na primer celično delitev evkariontskih celic. Celična delitev je evolucijsko ohranjen proces, tako lahko mnoge komponente tega sistema delujejo izmenično v kvasnih in človeških celicah: če v kvasni mutanti z izbitim esencialnim genom, povezanim z delitvenim ciklom celice, nadomestimo manjkajoči gen s homolognim človeškim genom, se mutanti povrne normalna zmožnost delitve (Alberts in sod., 2002: 37).

### 2.1.6 Zbirka mutant

Zbirka delecijjskih mutant - YKO (iz ang. Yeast-Knock-Out) je zbirka sevov kvasovk, ki so jim sistematično iz genoma izbili po en gen na posamezni sev. Zbirka je sad sodelovanja več evropskih ter severnoameriških laboratorijev v skupnem projektu »*Saccharomyces* Genome Deletion Project« (Winzeler in sod., 1999).

Zbirko so pripravili tako, da so posameznemu sevu s postopkom homologne rekombinacije zamenjali po en ORF z genom za odpornost proti antibiotiku kanamicinu (*KanMX*). Kasete vsebuje poleg *KanMX*, ki nadomešča izbiti gen ter hkrati predstavlja selekcijski označevalec, še eno ali dve 20 baznih parov dolgi zaporedji nukleotidov (»UPTAG«, »DNTAG«), ki služita kot unikatna molekularna označevalca. Shematska zgradba kasete za odpornost proti kanamicinu je prikazana na sliki (Slika 2). Ta zaporedja, imenovana tudi »molekularne črtne kode«, dodane začetku in koncu gena za odpornost proti kanamicinu, so specifična za vsako posamezno mutanto (izbiti ORF) in omogočajo medsebojno ločevanje pri paralelni analizi več oziroma vseh sevov v kompetitivnem rastnem testu, kjer so vse mutante gojene skupaj v mešani kulturi. Pri analizi so nato molekularna označevalna zaporedja pomnožena z reakcijo z verižno polimerazo (PCR) ter hibridizirana s komplementarnimi zaporedji DNA na mikromreži. Pomembnejši kot je gen za rast pri danih pogojih, hitreje se zmanjšuje količina ustreznih molekularnih označevalnih zaporedij v vzorcu (Winzeler in sod., 1999; Giaever in sod., 2002).



Slika 2: Delecijjska kasete *KanMX* (Giaever in sod., 2002: 388).

Z biotinom označeni, za mutanto specifični začetni oligonukleotidi (B-U1, B-U2-comp, B-D1 in BD2-comp) se uporabljajo za pomnožitev unikatnih zaporedij UPTAG in DNTAG iz genomskih pripravkov pridobljenih ob uporabi mešanih kultur mutant. (ATG / TAA zaporedje nukleotidov; UPTAG region – regija UPTAG; DNTAG region – regija DNTAG; *KanMX4* - gen za odpornost proti antibiotiku kanamicinu)

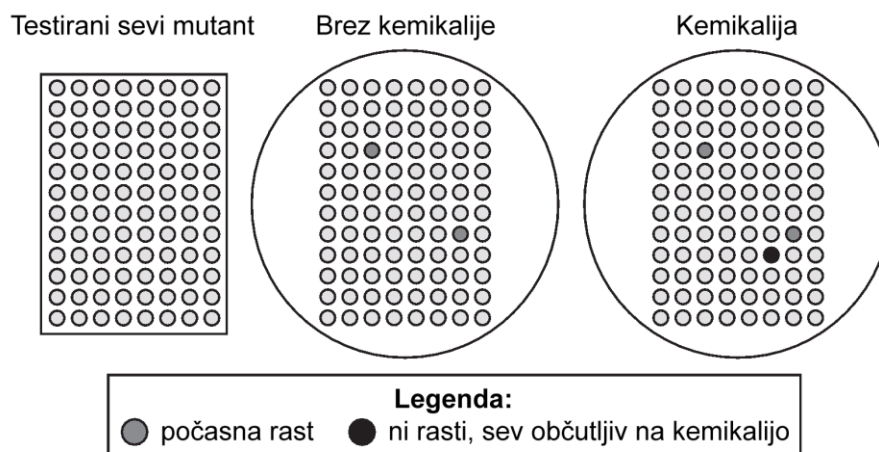
Skupaj so uspešno izbili 5916 genov, kar je 96,5% genov, ki so jih poizkusili izbiti. Ker je 18,7% (1105) genov esencialnih za rast kvasne celice na bogatem glukoznem gojišču, se končno število mutant giblje okoli 4800, odvisno od tipa zbirke. Narejene so bile 4 zbirke mutant YKO z različnim številom sevov: 4815 *MATa* in 4803 *MATα* haploidnih delecijjskih mutant, 4757 homozigotnih diploidnih delecijjskih mutant (brez neesencialnih) ter 5916 heterozigotnih diploidov (vključujoč esencialne in neesencialne gene) (SGDP, 2003). Esencialnost ter neesencialnost posameznega gena je opredeljena s sposobnostjo preživetja mutante na bogatem glukoznem gojišču pri standardnih pogojih (Giaever in sod., 2002).

## 2.2 KEMIJSKO GENOMSKA ANALIZA

Kemijsko genomska analiza je postopek, ki omogoča identifikacijo bioloških tarč preiskovane kemikalije v celici. Konkretno v našem primeru gre za celice delecijjskih mutant kvasovke *S. cerevisiae*.

Pri kemijsko genomske analizi testiramo občutljivost sevov iz zbirke YKO na kemikalijo, katero preiskujemo. Rezultati testa so osnovani na določitvi spremenljivih fenotipov – običajno hitrosti rasti – posameznih delecijjskih mutant zaradi vpliva izbrane kemikalije, ki je dodana gojišču (Parsons in sod., 2004). Shematski prikaz kemijsko genomske analize je podan na spodnji sliki (Slika 3).

S kemijsko genomske analizo lahko testiramo katero koli substanco, imenovano tudi motilec ali s tujko perturbator, ki zavira rast seva divjega tipa, najsibo to čista kemikalija ali ekstrakt naravnih produktov (Parsons in sod., 2004; Parsons in sod., 2006). Najpogosteje se pri testiranju uporablja semi-inhibitorne koncentracije izbrane substance, torej take koncentracije, ki delno zavrejo rast seva divjega tipa. Cilj postopka je identifikacija tarč testirane kemikalije, vendar pa najpogosteje ne identificiramo tarčnih genov neposredno, dobimo pa informacijo o tem, na katere procese oziroma poti ima kemikalija največji vpliv, v teh procesih pa je najverjetneje vključena tudi dejanska tarča kemikalije (Parsons in sod., 2004).



Slika 3: Kemijsko genomska analiza (prirejeno po Brenner, 2004).

Delecijske mutante se iz zbirke (levo), ki je gojena ločeno, prenese najprej na gojišče z kemikalijo (desno) ter zatem neposredno na gojišče brez dodane kemikalije. Gojišči sta nato inkubirani, dokler kolonije ne dosežejo velikosti, pri kateri se lahko izvede primerjava. S sivo barvo so označeni počasni rastoči sevi, s črno barvo pa sev, ki je občutljiv na testirano kemikalijo, kar je razvidno iz upočasnjene/ustavljene rasti na gojišču z dodano kemikalijo v primerjavi z gojiščem brez učinkovine.

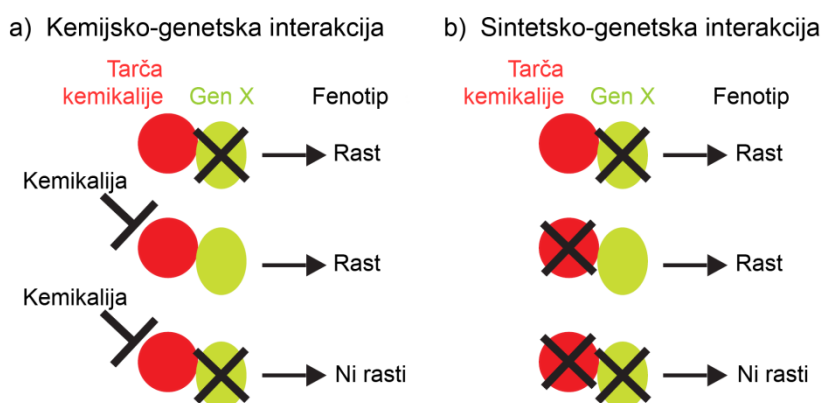
Testiranje kemikalije na živi celici, torej *in vivo*, je ena glavnih prednosti kemijsko genomske analize. Parsons in sod. (2003) navajajo naslednje tri prednosti: (i) tarča kemikalije se nahaja v celici, v svojem naravnem okolju, kjer zavzema svojo nativno konformacijo ter povezave z ostalimi celičnimi kofaktorji; (ii) je selektivna za kemikalije, ki prehajajo prek celične membrane v kvasno celico in učinkujejo, preden so deaktivirane ali izločene iz celice – zaradi podobnosti kvasnih ter sesalskih celic lahko precej kemikalij, ki prehaja v kvasne celice, vstopa tudi v sesalske oziroma človeške celice; (iii) ker se celice razmnožujejo, lahko test poljubno ponavljamo ter razširimo.

Na delitev, rast ter preživetje kvasne celice lahko kemikalija vpliva na različne načine. Med vsemi mehanizmi je najenostavnejši inhibicija encima, ključnega za rast in delitev celice s strani kemikalije; tak encim je na primer DNA polimeraza. V takem primeru pričakujemo, da se zapis za primarno tarčo kemikalije nahaja na esencialnem genu, nujnemu za preživetje haploidov, ter posledično neviabilnost te delecijske mutante (Brenner, 2004). Ker se za raziskave najpogosteje uporablja haploidno delecijsko zbirko mutant, torej zbirko, ki vsebuje le delecijske mutante ne-esencialnih genov, s testom



najpogosteje ne identificiramo neposrednih tarč preiskovane kemikalije, ampak celične procese v katerih sodeluje tarča, pogosto povezanih s transportom kemikalije in/ali njenim metabolizmom (Parsons in sod., 2004; Parsons in sod., 2006; Brenner, 2004; Giaever in sod., 2002). Za določitev pravih tarč ter procesov, na katere deluje preiskovana kemikalija, je potrebno upoštevati vse znane genetske interakcije identificiranih genov ter jih primerjati s kemijsko genetskim profilom te kemikalije (Parsons in sod., 2003; Parsons in sod., 2006).

Kemijsko genetski profili za kemikalije z zelo specifičnim delovanjem so sestavljeni le iz peščice mutant, katerih produkti izničeni genov so bistveni za procese, na katere posamezne kemikalije učinkujejo (Parsons in sod., 2004; Parsons in sod., 2006). V idealnem primeru ima kemikalija z zelo specifičnim delovanjem v celici le eno tarčo, kar je tudi pogoj za idealno zdravilo, hkrati pa ima minimalni učinek na ostale procese v celici. V teh pogojih ima inhibitorna kemikalija na kvasno celico divjega tipa zelo podoben učinek kot delecija gena, katerega produkt je tarča te kemikalije (Marton in sod., 1998).



Slika 4: Primerjava kemijsko-genetskih in sintetsko-genetskih interakcij (prirejeno po Parsons in sod., 2004: 63).

(a) Kemijsko-genetska interakcija: delecija mutanta, ki zaradi izbitnega gena X ne sintetizira specifičnega proteina (predstavljen s črnim X), lahko normalno raste v odsotnosti inhibitorne kemikalije, ob prisotnosti običajno subletalne koncentracije kemikalije je rast inhibirana, ker je tarča kemikalije v sintetsko-genetski interakciji s produktom izbitnega gena. (b) Sintetsko-genetska interakcija: delecija posameznega gena nima vpliva na fenotip mutante, vendar je dvojna delecija genov, katerih produkti so v interakciji, za mutanto usodna.

Parsons in sod. (2003, 2004) interpretirajo kemijsko-genetske interakcije pri mutantah, identificiranih s kemijsko genomsko analizo, na podlagi modela sintetsko-genetskih interakcij, kot je prikazano na sliki (Slika 4). Po tej razlagi naj bi bili izbiti aleli genov, ki kažejo kemijsko-genetske interakcije s specifično učinkovino, tudi sintetsko smrtni ali bolni, v kombinaciji z mutacijo v tarčnem genu te učinkovine.

Kemikalije imajo lahko specifično biološko aktivnost in s tem le eno ali nekaj tarč v celici, ali pa je njihova aktivnost širša in manj specifična. Podobno so tudi geni oziroma njihovi produkti lahko tarča le eni ali pa večjemu številu kemikalij. S testiranjem številnih substanc so bili identificirani geni, ki sodelujejo pri splošni odpornosti celice na kemikalije (ang.: »multidrug resistance« - MDR) (Parsons in sod., 2006; Hillenmeyer in sod., 2008). S testiranjem več kot 400 različnih substanc ter različnih okoljskih stresov na haploidnih ter heterozigotnih diploidnih delecijjskih mutantah kvasovke so identificirali skupno 561 MDR genov, torej genov, potrebnih za rast in razvoj v prisotnosti številnih raznolikih kemikalij (Hillenmeyer in sod., 2008).

Različne kemikalije s podobnim biološkim učinkom na celico imajo običajno zelo podobne kemijsko-genetske profile (Parsons in sod., 2006), kar nakazuje možnost napovedi molekulskega mehanizma delovanja preiskovane kemikalije v primeru, da poznamo mehanizem delovanja kemikalije z enakim biološkim učinkom.

Poleg mutant, na katere testirana kemikalija deluje inhibitorno, identificiramo s kemijsko genomiko še drugo skupino mutant, ki odstopa od povprečja. Ta skupina mutant kaže znake odpornosti na testirano kemikalijo in na testnih gojiščih z dodano kemikalijo lahko raste bolje kot na kontrolnih brez kemikalije. Mnoga zdravila vstopajo v celico kot neaktivne substance in celični mehanizmi jih nato pretvorijo v aktivno obliko z inhibitornim učinkom. V primerih, kjer je taka pretvorba omejujoča za nastanek toksičnosti, je pričakovana posledica enostavne mutacije z izgubo funkcije, npr. delecija ustreznega encima, ki to pretvorbo vrši, odpornost celice na kemikalijo, razen v primeru, ko je encim kodiran na esencialnem genu. Na kemikalijo nadpovprečno občutljive mutante bi lahko medtem identificirali kot specifične alele s »pridobljeno funkcijo« encimov, ki aktivirajo vnesene kemikalije oziroma zdravila. Prenosljivost, možnost opredelitve odporne mutante kot enostaven alel z izgubo funkcije (občutljiva delecijjska mutanta) je

velika prednost, saj na ta način postane velikost knjižnice mutant enaka številu neesencialnih genov (Brenner, 2004).

## 2.3 CINK

### 2.3.1 Cink ter kemijske lastnosti

Cink (Zn) je kovinski kemični element z atomsko maso 30, ki ga po kemičnih lastnostih uvrščamo med prehodne elemente. V periodnem sistemu se nahaja v 12. skupini 4 periode in predstavlja prvi element v 12. skupini periodnega sistema. V naravi ga najpogosteje najdemo v obliki rude sfalerita, cinkovega sulfida. V spojinah nastopa z oksidacijskimi števili 0, +1 in +2 ter ima 5 znanih izotopov. Človek uporablja cink že vsaj tri tisočletja kot sestavni del raznih spojin, na primer brona, kot čisti element oziroma v čistejši obliki je v uporabi v zadnjih stoletjih ob razvoju tehnik, ki omogočajo pridobivanje kovine ustrezne čistoče. V sodobnem času je cink najpogosteje uporabljen v industriji kot zaščita pred korozijo pri galvanizaciji oziroma pri vročem cinkanju. Izmed ostalih načinov uporabe cinka je pomembna izdelava cinkovih baterij, izdelava zlitin ter uporaba številnih cinkovih spojin za druge industrijske namene ter tudi farmacevtske ter prehranske namene (Wikipedia, Zinc).

Cink je po kemičnih lastnostih definiran kot dobra Lewisova kislina in v encimih deluje kot akceptor elektronov, kar ga naredi uporabnega kot katalitični agent pri hidroksilaciji ter številnih drugih encimskih reakcijah (NRC, 2000). V encimih tako največkrat sodeluje kot anorganski kofaktor v katalitičnem, torej aktivnem mestu proteina. Kot dobra Lewisova kislina hitro reagira z bazami, kot sta na primer hidroksidni ion ( $\text{OH}^-$ ) ter fosfatni ostanek ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ter druge, tako se v bazičnih raztopinah niža biološka razpoložljivost cinkovih kationov zaradi nastanka netopnih soli.

### 2.3.2 Biološka vloga cinka

Cink je esencialen mikroelement, potreben za preživetje vseh organizmov, tako rastlin, živali kot mikroorganizmov. Cink je potreben za delovanje velikega števila proteinov, kjer opravlja katalitično, kokatalitično ali strukturno vlogo (Alud, 2001).

Predvideva se, da je pri kvasovki *S. cerevisiae* cinkov ion esencialna katalitična komponenta več kot 300 različnih encimov in kritična komponenta strukturnih motivov, kot so na primer cinkovi prsti (Eide, 1998).

Andreini in sod. (2006) na podlagi raziskav zaporedja človeškega genoma navajajo, da cink potencialno veže oziroma je sestavni del vsaj 2800 potencialnih proteinov v človeškem proteomu. Pri tem naj bi bila velika večina tako identificiranih proteinov povezana z uravnavanjem izražanja genov.

Nekateri dobro znani in preučeni cinkovi metaloproteini so na primer: RNA-polimeraza, alkoholna dehidrogenaza (ADH), karbonska anhidraza ter alkalna fosfataza. Vloga cinka v encimih je običajno katalitična, vendar v nekaterih encimih cink nastopa tudi kot strukturna komponenta. Primer takega encima je baker-cinkova (Cu-Zn) supeoroksid dismutaza (SOD). V SOD ima katalitično vlogo bakrov ion, vloga cinkovega iona pa je striktno strukturna (NRC, 2000).

Pri človeku je neravnovesje, predvsem pomanjkanje, cinkovih ionov povezano s številnimi boleznimi. Tako je cink tesno povezan s pravilnim delovanjem imunskega sistema, od kožne pregrade do uravnavanja izražanja genov v limfocitih (Shankar in Prasad, 1998). Cink ima tudi ključno vlogo v prenosu signalov v centralnem živčnem sistemu (Frederickson in sod., 2000). Poleg omenjenih vlog, preko katerih vpliva na številne procese v celici, deluje cink tudi kot znotrajcelični antioksidant in pripomore k stabilizaciji membran (Bray in Bettger, 1990).

V kvasovki *S. cerevisiae* ima cink učinek na membrane tudi preko vplivov na fosfolipidni metabolizem z aktivacijo transkripcijskega aktivatorja Zap1. Protein Zap1 je eden poglavitnih od cinka odvisnih aktivacijskih faktorjev, ki se aktivira ob znižanih koncentracijah cinka. Porast koncentracije fosfatidilinozitola (PI) ter padec koncentracije fosfatidiletanolamina (PE) je posledica aktivacije izražanja Zap1-tarčnih genov *PIS1* ter *DPP1* oziroma njunih produktov. V procesu se zniža koncentracija fosfatidne kisline, ki preko inhibicije kompleksa Ino2/4 s sproščanjem proteina Opi1 prepreči izražanje genov *CHO1* ter *INO1*, katerih produkta sta vključena v sintezo lipidov (Carman in Han, 2007).

Pomanjkanje cinka pri človeku lahko vodi do motenj sinteze ter izločanja inzulina, tudi preko vpliva na sintezo, hrambo, pravilno zvijanje ter izločanje inzulina iz  $\beta$ -celic trebušne slinavke, saj ima strukturno vlogo v tvorbi založne oblike hormona, heksamere insulina (Dodson in Steiner, 1998). Adiponektin je podobno kot inzulin hormon z regulatornim vplivom na metabolizem pri človeku in deluje preko adiponektinskih receptorjev AdipoR1 ter AdipoR2. Strukturni analogi adiponektinskih receptorjev so pri kvasovkah kodirani z geni *IZH1/2/3/4* (iz angl. Implicated in Zinc Homeostasis), katerih delecije izzovejo od cinka odvisne fenotipe in katerih izražanje je, z izjemo *IZH3*, uravnava tudi z aktivacijo proteina Zap1 oziroma s koncentracijo cinka (Karpichev in sod., 2002).

Cink je, kljub svoji razširjenosti v okolju, v celici prisoten kot mikronutrient v nizkih koncentracijah. Posledično je zaradi njegove raznovrstne vloge v organizmu ter tudi potencialne toksičnosti, če je prisoten v prevelikih koncentracijah, potrebno natančno uravnavanje koncentracije v celici. To zahteva kompleksne mehanizme za vzdrževanje koncentracije znotraj fizioloških mej, saj je v nasprotnem primeru rast in razvoj organizma omejena (Finney in O'Halloran, 2003). Organizmi so tako opremljeni z obilico proteinov, udeleženih pri uravnavanju cinkove homeostaze, vključno z membransko vezanimi cinkovimi transporterji, cink-kelirajočimi proteini ter vsaj enim na cink odzivnim transkripcijskim aktivatorjem.

### **2.3.3 Homeostaza cinka**

Celice za uspešno rast potrebujejo določeno količino cinka, ki jo imenujemo »cinkova kvota«. Kvota je definirana kot celokupna količina cinka v celici, ki je potrebna za njeno optimalno rast (Outten in O'Halloran, 2001). Kvote variirajo glede na organizem in tako za bakterijo *Escherichia coli* znaša okoli  $10^5$  atomov cinka na celico (Outten in O'Halloran, 2001), za kvasovko *S. cerevisiae* znaša ocena okrog  $1,5 \times 10^7$  atomov na celico (MacDiarmid in sod., 2000), medtem ko potrebujejo sesalske celice, gojene v tkivnih kulturah, približno  $2 \times 10^8$  atomov na celico (Palmiter in Findley, 1995). Ob upoštevanju volumna posameznih tipov celic so si koncentracije cinka v celici izredno podobne, tako vsaka izmed vrednosti ustreza 0,1-0,5 mM celokupni celični koncentraciji cinka (Eide, 2006). V večini celičnih tipov so koncentracije cinka zelo podobne, z izjemo redkih tipov specializiranih celic, ki akumulirajo večje količine cinka kar je posledica specializirane

vloge cinka v njih. Takšni so na primer nekateri tipi nevronov ter celice prostate pri človeku (Frederickson in sod., 2000; Costello in Franklin, 1998). Eide (2006) predlaga to veliko podobnost v celičnih koncentracijah cinka kot posledico ohranjene vloge cinkovih ionov v celični biokemiji.

Od cinka odvisni metaloproteini se nahajajo v citoplazmi evkariontske celice ter v mnogih organelih, vključno z jedrom, endoplazemskim retikulom (ER), Golgijevim aparatom (GA), sekretornih veziklih ter mitohondrijih. Zaradi takšne splošne razširjenosti cinkovih ionov ter posledično velike odvisnosti od njih potrebuje celica učinkovit sistem akumulacije ter distribucije cinka (Eide, 2006).

Celice so tako razvile mehanizme za vzdrževanje cinkove homeostaze, ki zagotavljajo relativno konstantno koncentracijo cinka znotraj celice ne glede na zunanje pogoje. Najpomembnejši del uravnavanja koncentracije cinkovih ionov v celici je pogosto vezan na vnos cinka iz okolja v celico skozi celično membrano, kot na primer pri kvasovki *S. cerevisiae* (Eide, 2006). Pomembni so še mehanizmi za izločanje odvečnega cinka iz celice ter za shranjevanje presežkov cinkovih ionov v vakuoli, katere lahko nato v primeru pomanjkanja celica mobilizira v citoplazmo ter tudi v celice potomke (Simm in sod., 2007).

Poleg omenjenih mehanizmov imajo pri uravnavanju koncentracije prostih cinkovih ionov v citoplazmi zelo pomembno vlogo tudi metalotioneini, to so proteini, ki vežejo proste cinkove ione ter jih nato po potrebi sproščajo nazaj v citoplazmo (Kelly in sod., 1996). Metalotioneini poleg cinka vežejo tudi druge kovinske ione; imajo na primer visoko afiniteto do  $\text{Cu}^{2+}$  ionov. V splošnem imajo visoko afiniteto vezave za dvovalentne ione ter težke kovine, kot je na primer kadmij in s tem ščitijo celico pred poškodbami. Poleg tega sodelujejo tudi pri zaščiti pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS; iz angl. Reactive Oxygen Species) ter pred ionizirajočim sevanjem (Floriańczyk, 2007).

Cinkovi ioni se v celicah akumulirajo tudi v t.i. »cinkosomih« (Haase in Beyersmann, 1999; Haase in Beyersmann, 2002), z membrano omejenih veziklih, ki so prisotni v sesalskih ter tudi v kvasnih celicah (Devirgiliis in sod., 2004). Pri kvasovki je akumulacija cinka ob njegovem presežku odvisna od transporterja Zrt1 in ne od transporterjev Zrc1 ali

Cot1, ki ju najdemo v vakuolni membrani (Devirgiliis in sod., 2004). Vloga slednjih naj bi bila detoksifikacija presežka cinka (Palmiter in sod., 1996).

Transport cinka v ter iz različnih celičnih razdelkov zahteva nabor ustreznih prenašalnih proteinov, odgovornih za nemoten transport ionov v prave razdelke. Večina prenašalcev cinkovih ionov pri evkariontih spada v dve družini, ZIP (SLC39) ter CDF/ZnT (SLC30). Pripadniki družine prenašalcev ZIP (iz ang. Zrt-, Irt- like Protein) brez znane izjeme prenašajo cinkove in/ali druge kovinske ione iz ekstracelularnega prostora ali lumna organelov v citoplazmo. Medtem transporterji CDF/ZnT (iz ang. Cation Difusion Facilitator – kationski pospeševalec difuzije; ZnT je oznaka sesalskih transporterjev) delujejo v nasprotju s prenašalci ZIP, saj prenašajo cink in/ali druge kovinske ione iz citoplazme v lumen celičnih organelov ali iz celice navzven (Eide, 2006).

#### 2.3.3.1 Vpliv pH na biološko razpoložljivost cinkovih ionov

Prosti cinkovi ioni ob višanju vrednosti pH tvorijo netopne okside ter fosfate, kar znižuje koncentracijo razpoložljivih ionov v citoplazmi (Basta in sod., 2005; Martínez in Motto, 2000; Sandrin in Maier, 2003). Koncentracija razpoložljivega cinka je tako močno odvisna od okoljskega pH, da je v alkalnem mediju količina razpoložljivega cinka, torej prostih  $Zn^{2+}$  ionov, mnogo manjša kot v enakem mediju, uravnanem na kisel pH (Amich in sod., 2010). Poleg tega zvišanje pH poveča toksičnost cinka za mikroorganizme (Hahne in Kroontje, 1973). Mehanizem, s katerim pH poveča toksičnost cinka, še ni dobro raziskan, vendar domnevajo, da lahko vključuje adsorpcijo velikih količin cinka na celično površino (Sandrin in Maier, 2003) in/ali tvorbo toksičnih spojin v obliki topnih hidrosiliranih cinkovih ionov, kot je na primer  $ZnOH^+$  (Hahne in Kroontje, 1973). Znižanje količine biološko razpoložljivih cinkovih ionov zaradi visokih vrednosti pH ima potencialno podobne učinke kot dejansko pomanjkanje cinka v raztopini z vrednostmi pH blizu nevtralnimi.

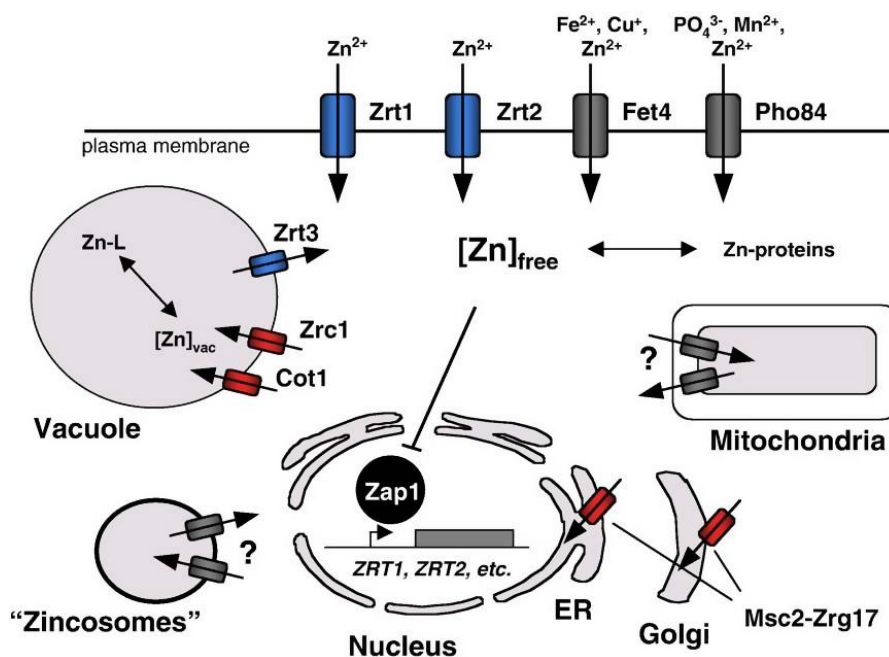
#### 2.3.4 Transport cinkovih ionov v kvasovki *S. cerevisiae*

Kvasna celica ima štiri sisteme za vnos cinkovih ionov v celico prek celične membrane, to so transmembranski transporterski proteini, produkti genov *ZRT1*, *ZRT2*, *FET4* ter *PHO4*. Produkt gena *ZRT2* kodira nizko afinitetni transporter za cink (Zhao in sod., 1996a), ki je najbolj učinkovit v pogojih, ko je v okolju zadostna koncentracija cinkovih ionov. V

nasprotju s produktom gena *ZRT2* pa je produkt gena *ZRT1* visoko afinitetni transporter, ki je aktiven ter odgovoren za preživetje celice v pogojih pomanjkanja cinkovih ionov (Zhao in sod., 1996b). Tretji sistem predstavlja transporter, produkt gena *FET4*, ki je poleg vnosa cinka v celico odgovoren tudi za vnos železovih (Fe) ter bakrovih (Cu) ionov (Waters in Eide, 2002). Izražanje teh treh genov je, tako kot še številnih drugih, uravnava s transkripcijskim faktorjem Zap1, produktom gena *ZAP1*, ki se veže na regulatorni element ZRE (iz ang. Zinc Response Element). Protein Zap1 pozitivno uravnava (aktivira) njihovo izražanje in je tako odgovoren za vzdrževanje cinkove homeostaze v celici (Lyons in sod., 2000). Četrty in zadnji sistem je povezan z genom *PHO84*, ki zelo verjetno kodira visoko afinitetni fosfatni transporter (Jensen in sod., 2003). Mutacija gena *PHO84* povzroči zmanjšanje akumulacije cinka v celici, kar nakazuje vlogo Pho4p pri vnosu cinkovih ionov ob transportu fosfatov. Čeprav ima sistem verjetno majhno afiniteto do cinkovih ionov, je močno induciran ob pomanjkanju fosfatov in ima tako pomembno vlogo pri cinkovi homeostazi v rastnih pogojih z nizko razpoložljivostjo fosfatov (Bun-Ya in sod., 1991). Slika 5 predstavlja poenostavljen pregled transporta cinkovih ionov v kvasovki *S. cerevisiae*.

Vakuola v kvasni celici predstavlja ločen celični razdelek v katerem lahko celica shrani velike količine cinkovih ionov, koncentracije cinka v njej variirajo in lahko dosežejo skoraj 100 mM  $Zn^{2+}$  (Simm in sod., 2007). Za transport cinka iz citoplazme v vakuolo in s tem za detoksifikacijo celice sta odgovorna membranska prenašalna proteina Zrc1 ter Cot1. Vakuola je tako pomembna za shranjevanje cinkovih ionov, ki se lahko nato preko prenašalca Zrt3 ob aktivaciji z Zap1 mobilizirajo ob omejujočih pogojih (MacDiarmid in sod., 2003).





Slika 5: Prenašalci ter celični transport cinkovih ionov v kvasovki *S. cerevisiae* (Eide, 2006: 714).

Člani družine prenašalcev ZIP so prikazani z modro, člani družine CDF pa z rdečo barvo. Hipotetični prenašalci ali znani prenašalci drugih družin prenašalcev so prikazani v sivi barvi. Transkripcijski aktivator Zap1, prikazan s črno barvo, je odgovoren za pozitivno uravnavanje izražanja mnogih tarčnih genov v s cinkom omejenih celicah. Zn<sup>2+</sup> je v vakuoli verjetno vezan z nekim ligandom (L), kar pospeši njegovo shranjevanje. (vacuole – vakuola; zincosomes – cinkosomi; nucleus – jedro; ER – endoplazemski retikulum, Golgi – Golgijev aparat, mitochondria – mitohondrij; [Zn]<sub>free</sub> – prosti cink; [Zn]<sub>vac</sub> – cink v vakuoli; Zn-proteins – metaloproteini z vezanim cinkom; plasma membrane – celična membrana).

Gen *ZAP1* kodira za poglavitni regulator cinkove homeostaze. transkripcijski faktor Zap1p, ki poleg petih zgoraj omenjenih transporterjev (produkte genov *ZRT1*, *ZRT2*, *FET4*, *ZRC1* ter *ZRT3*), uravnava še izražanje 42 drugih genov (Lyons in sod., 2000). Izražanje gena *ZAP1* je samo-uravnano, saj njegov promotor vključuje ZRE, kar vzpostavi pozitivno povratno zanko, da se njegovo izražanje poveča ob pomanjkanju cinka. Deaktivacija proteina Zap1 nastopi ob vezavi cinkovih ionov na protein ob zvišanju intracelularnih koncentracij cinkovih ionov.

Izražanje genov *ZRC1* ter *ZRT3* je pozitivno uravnvano z aktivacijo transkripcijskega faktorja Zap1 ob pomanjkanju cinka. Čeprav aktivacija sistema za odstranjevanje cinka iz citoplazme ob omejujočih pogojih zveni protislovno, predstavlja aktivacija membranskega

prenašalca Zrc1 preventivni ukrep za zaščito celice pred previsoko koncentracijo cinka oziroma še posebej pred tako imenovanim »cinkovim šokom«, kjer ima vakuola eno ključnih vlog (MacDiarmid in sod., 2003). Vakuola, proteina Zrc1 ter Cot1 so tako nujni za preživetje cinkovega šoka. Raziskave kažejo na prisotnost dodatnega, verjetno nizko-afinitetnega ter manj učinkovitega sistem za vnos cinkovih ionov iz citoplazme v vakuolo, ki pripomore k vnosu cinka v vakuolo med cinkovim šokom (Simm in sod., 2007).

Cinkov šok je skrajna oblika cinkovega stresa, ki ga povzroči nihanje koncentracije cinkovih ionov v okolju. Cinkov šok nastane, ko celice, gojene v gojišču z omejujočo koncentracijo cinkovih ionov, ponovno izpostavimo cinku. Ker imajo s cinkom omejene celice zelo velik potencial za vnos cinka, lahko že dodatek majhne količine cinkovih ionov povzroči kopičenje zelo visokih koncentracij te kovine v citoplazmi celice (Simm in sod., 2007). Tak nenaden porast koncentracije cinkovih ionov v citoplazmi ima seveda toksične učinke na samo celico in privede do aktivacije oksidativnega stresnega odziva celice.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije

- 96% etanol - EtOH
- Adenin sulfat (Serva, Nemčija)
- Agar (Sigma-Aldrich, ZDA)
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma, ZDA)
- Kazamino kisline (Difco, ZDA)
- Chelex 100 - natrijeva oblika (Sigma, ZDA)
- $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Nemčija)
- Deionizirana voda
- EDTA (etilendiamintetraoetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid); Serva, Nemčija)
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma, ZDA)
- Glukoza (Fluka, Nemčija)
- HCl (Merck, Nemčija)
- HEPES (N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etan-sulfonska kislina]; Serva, Nemčija)
- inozitol (Fluka, Switzerland)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Kvasni ekstrakt (Sigma, ZDA)
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Nemčija)
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Sigma, ZDA)
- NaOH (Merck, Nemčija)
- Pepton (Sigma, ZDA)
- Triptofan (Fluka, Nemčija)
- Uracil (Serva, Nemčija)
- YNB (Yeast Nitrogen Base) brez dvovalentnih ionov in inozitola (Formedium, VB)
- YNB (Yeast Nitrogen Base) z amonijevim sulfatom, brez fosfatov, brez dvovalentnih ionov: Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn (MP Biomedicals, ZDA)
- $\text{ZnCl}_2$  (Sigma, ZDA)

### 3.1.2 Pribor

- 0,2 µm sterilni filtri, Minisart NML (Sartorius AG, ZDA)
- Avtomatske pipete: P-2, P-20, P-200 in P-1000 (Gilson, Francija)
- Avtomatski pipeti, multikanalni: 10 in 100 µl (Eppendorf, Germany)
- Injekcijske brizge (5 in 10 ml)
- Mikrocentrifugirke, 1,5ml (Sarstedt, Nemčija)
- Mikrotiterne plošče z 96 jamicami (s pokrovom)
- Nastavki za pipete 20 / 200 / 1000 µl (Sarstedt, Nemčija)
- Pipetor - Accu-Jet pro (BrandTech, ZDA)
- Pravokotne sterilne petrijevke, OmniTray (Nalge Nunc International, ZDA)
- Steklovina (epruvete, erlenmajerice, merilni valji, čaše, steklenice)
- Sterilni plastični nastavki za pipetor za enkratno uporabo
- Ostali drobni laboratorijski pribor

### 3.1.3 Programska oprema

- Excel 2010 (Microsoft, ZDA)
- GenePix® 5 Microarray Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices, ZDA)

### 3.1.4 Laboratorijska oprema

- Avtoklav
- Deionizator vode Direct-Q 5 (Millipore, ZDA)
- Električni stresalnik IKA MS 3 basic (IKA, USA)
- Hladilnik, 4°C (Gorenje, Slovenija)
- Inkubator (omara, 30°C)
- Inkubator (stresalnik, 30°C)
- Magnetno mešalo MM-531 (Tehtnica, Slovenija)
- Magnetno mešalo z grelcem Rotomix SPH-10 (Tehtnica, Slovenija)
- Merilec absorbance Sunrise (Tecan, Švica)
- optični čitalec Epson Perfection V700 photo (Epson, Japonska)
- pH meter
- Robotski mikro-manipulator (Adept Plus, Postojna in IJS)

- Spektrofotometer
- Tehnica PC2000 (Mettler, Švica)
- Tehnica Vibra AJH-4200CE (Tehnica, Slovenija)

### 3.1.5 Gojišča

#### 3.1.5.1 YPD

Gojišče YPD je bogato neselektivno gojišče, ki vsebuje vsa potrebna hranila za uspešno rast kvasovke v ugodnih razmerjih, tako da nobeno izmed hranil ni limitirajoči faktor rasti za kvasovko *S. cerevisiae*.

Sestavine za gojišče YPD (za 1 liter gojišča):

- |                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| - kvasni ekstrakt   | 10g                    |
| - pepton            | 20g                    |
| - glukoza           | 20g                    |
| - agar              | 20g (za trdno gojišče) |
| - deionozirana voda | do 1l                  |

Zn<sup>2+</sup> ione smo v skladu z eksperimentom v gojišče dodali kot ustrezen volumen sterilne 1M raztopine ZnCl<sub>2</sub> tik pred razlivanjem v petrijevke pri trdnih gojiščih oziroma tik pred uporabo pri tekočih gojišč.

#### 3.1.5.2 Pufran YPD

Sestava tekočega pufranega YPD je kot je opisano v točki 3.1.4.1 z razliko v dodatku pufra, N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etan-sulfonska kislina] (HEPES) v končni koncentraciji 150 mM, pH umerjen na pH 4, 6 ter 8. z dodatkom 1M HCl oziroma 10M NaOH.

#### 3.1.5.3 Definirana gojišča – CYCD, CYCD brez inozitola ter YCD

Uporabljeni osnovni definirani gojišča so minimalna gojišča za kvasovke, kjer smo dodatno namenoma uporabili vire dušika z odstranjenimi dvovalentnimi ioni. Za odstranitev morebitnih ostankov Zn<sup>2+</sup> ter drugih dvovalentnih ionov smo gojišča CYCD še

dotatno kelirali. Divalentne ione smo nadomestili tik pred razlivanjem trdnih gojišč oziroma tik pred uporabo v primeru tekočih.

### 3.1.5.3.1 *CYCD*

Sestavine za gojišče *CYCD* (za 1 liter gojišča):

|   |                        |
|---|------------------------|
| - YNB brez divalentnih ionov ter $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 5,1g                   |
| - kazamino kisline  | 5g                     |
| - glukoza   | 20g                    |
| - adenin sulfat   | 0,1g                   |
| - uracil  | 0,1g                   |
| - triptofan   | 0,1g                   |
| - agar  | 20g (za trdno gojišče) |
| - deionizirana voda                                       | do 1l                  |

### 3.1.5.3.2 *CYCD brez inozitola*

Sestava gojišča *CYCD* brez inozitola je identična gojišču *CYCD* (točka 3.1.4.3), le da smo kot vir dušika namesto YNB brez divalentnih ionov ter  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  uporabili YNB brez divalentnih ionov in inozitola.

### 3.1.5.3.3 *YCD - prehodno gojišče*

Sestava gojišča *YCD* je identična gojišču *CYCD* (točka 3.1.4.3.1), vendar z izpuščenim postopkom keliranja.

## 3.1.6 Sevi kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Zbirko delecijjskih mutant BY4741 smo uporabili pri presejalnem testu ter za določitev rastnih krivulj z izjemo divjega tipa, kjer smo uporabili sev BY4742:

**BY4742** - divji tip (WT, angl. »wild type«):

Sev je haploid z genotipom: *MAT $\alpha$* ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*.

**BY4741** - zbirka YKO (»Yeast Knock-Out«) - zbirka delecijjskih mutant kvasovke *S. cerevisiae*:

Mutante so haploidi z genotipom: *MAT $\alpha$* ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *met15 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*; *xxx $\Delta$ ::Kan<sup>r</sup>*. *xxx $\Delta$ ::Kan<sup>r</sup>* predstavlja gen, ki je v posamezni mutanti izbit in zamenjan s kaseto za odpornost proti kanamicinu.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Splošne metode

#### 3.2.1.1 Aseptičnost

Pri delu smo upoštevali splošne aseptične smernice dela. Delovno površino smo pred pričetkom dela razkužili s 70% etanolom, poskuse smo izvajali v aseptičnem območju v bližini prižganega plinskega gorilnika ter odprte plošče s kulturami oziroma plošče s svežimi gojišči čim krajši čas izpostavljali možnim okužbam. Prostor in površine v okolici robotskega manipulatorja ter tudi njegovo notranjost smo pred delom obdelali z ultravijoličnim (UV) sevanjem.

#### 3.2.1.2 Sterilizacija ter priprava steklovine, gojišč in raztopin

Toplotno stabilne sestavine gojišč smo zatehtali v ustrezno posodo, jih raztopili v del  $\text{dH}_2\text{O}$  ter posodo pokrili. Glukozo smo raztopili v delu  $\text{dH}_2\text{O}$  v primerni posodi ter jo sterilizirali ločeno od ostalih komponent.

Komponente trdnih gojišč za kvasovke ter večje količine tekočih gojišč smo avtoklavirali 20 minut pri 120 kPa in 121 °C ter jih nato primerno ohlajene (cca 60 °C) po dodatku glukoze ter ostalih dodatkov previdno razlili v ustrezne petrijevke, v primeru tekočih gojišč pa stekleničke za hrambo tesno zaprli.

Ostale raztopine, predvsem založne raztopine ionov ter manjše količine tekočih gojišč, smo sterilizirali s filtracijo prek filtra z 0,2  $\mu\text{m}$  porami.

Steklovina je bila suho sterilizirana 2 uri pri 160 °C, s tem da smo steklovino, ki je bila namenjena eksperimentom z nizkimi koncentracijami cinkovih ionov, pred tem temeljito sprali najprej z 10 mM etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) ter nato še z deionizirano vodo.

#### 3.2.1.3 Gojenje celic

Vse celice smo gojili v inkubatorjih pri temperaturi 30 °C. Čas inkubacije smo prilagodili hitrosti rasti celic in s tem povečevanju kolonij na posameznem gojišču oziroma hitrosti rasti posameznih testiranih sevov pri določanju rastnih krivulj.

Prekonočne kulture smo pripravili tako, da smo v epruveto odmerili 2 ml ustreznega svežega tekočega gojišča ter nato dodali cepilno zanko kvasnih celic izbranega seva in kulturo nato gojili v stresalniku pri 250 obratih na minuto tekom noči.

#### 3.2.1.4 Odstranitev ostankov dvovalentnih ionov – keliranje

Za odstranitev morebitnih ostankov cinkovih ter drugih dvovalentnih ionov smo uporabili keleks (Chelex-100) v koncentraciji 20 g/L.

Trdna gojišča smo pripravili tako, da smo v sterilizirano delno ohlajeno gojišče dodali ustrezno količino keleksa, katerega smo sterilizirali ločeno. Kelirali smo 5 ur ob mešanju na zmerno ogrevanem magnetnem mešalu (60 °C), da smo ohranili gojišče tekoče in zagotovili ustrezno mešanje zrn ter učinkovito keliranje. Ob koncu keliranja smo zaradi večje gostote zrn keleksa gojišče enostavno odmerili v ustrezno pripravljeno steklovino, kjer smo gojišče z dodatkom ustreznih ionov dokončno pripravili za razlivanje v petrijevke.

Tekoča gojišča smo kelirali preko noči pri temperaturi 4 °C ob mešanju na magnetnem mešalu. Tako pripravljeno gojišče brez dvovalentnih ionov ter inozitola smo nato sterilizirali z filtracijo preko 0,2 µm filtra in ga do uporabe shranili v plastičnih centrifugirkah.

#### 3.2.1.5 Dodajanje dvovalentnih ionov ter inozitola

Dvovalentne ione ter inozitol smo v gojišča dodajali v obliki koncentriranih steriliziranih raztopin, do želenih končnih koncentracij. V trdna gojišča smo raztopine aseptično dodali po avtoklaviranju, jih dobro premešali ter razlili v petrijevke, medtem ko smo tekoča gojišča ustrezno dopolnili tik pred uporabo.

V gojišča CYCD, CYCD brez inozitola ter YCD smo dodali preostale manjkajoče dvovalentne ione do običajnih koncentracij za kvasovke: 0,9 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,25 µM Cu<sup>2+</sup>, 1,23 µM Fe<sup>3+</sup>, 7 mM K<sup>+</sup>, 4,1 mM Mg<sup>2+</sup> in 2,65 µM Mn<sup>2+</sup>. Istočasno smo v gojišča glede na zahteve testa dodali tudi Zn<sup>2+</sup> v obliki raztopine ZnCl<sub>2</sub> ter inozitol (pri gojišču CYCD brez inozitola) do ustreznih koncentracij.



### 3.2.2 Določanje inhibitorne koncentracije cinka

#### 3.2.2.1 Sevi za določanje inhibitorne koncentracije

Za določitev inhibitorne koncentracije cinka smo izbrali štiri seve kvasovke *S. cerevisiae*: divji tip (WT) ter delecijske seve *zrt1Δ*, *zap1Δ* ter *zrc1Δ*. Seve smo izbrali na podlagi opisanih povezanosti produktov izbitih genov z zagotavljanjem cinkove homeostaze v kvasni celici.

#### 3.2.2.2 Izbira gojišča ter testnih pogojev – koncentracije $Zn^{2+}$

Kontrolno gojišče je predstavljalo osnovno gojišče YPD, medtem ko smo za testno gojišče uporabili YPD z dodanimi  $Zn^{2+}$  ioni v za kvasovko *S. cerevisiae* visokih koncentracijah 4 mM, 6 mM ter 8 mM. Tipična koncentracija  $Zn^{2+}$  ionov v YPD pri pH 5,5-6 je 2,5  $\mu$ M in zadostuje za njihovo normalno rast. Relativno visoke koncentracije smo izbrali, ker smo želeli, da izbrana koncentracija poleg občutljivih mutant deloma zavre tudi rast divjega tipa. Na ta način smo želeli določiti semi-inhibitorno koncentracijo cinkovih ionov za kvasovko *S. cerevisiae* na tem gojišču. Semi-inhibitornost divjega tipa je tudi pogoj za identifikacijo skupine mutant, ki pri danem pogoju uspevajo bolje kot divji tip – torej so odporne.

#### 3.2.2.3 Potek določitve semi-inhibitorne koncentracije s testom z razredčinami

V epruvete smo odpipetirali po 2 ml tekočega gojišča YPD in nato s cepilno zanko nacepili izbrane seve ter jih ob stresanju inkubirali čez noč pri 30 °C. V 2 ml svežega gojišča smo prenesli 50  $\mu$ l homogene prekonočne kulture in inkubirali dodatne 4 ure. S spektrofotometrom smo izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 600 nm ( $OD_{600}$ ) v epruveh tako pridobljenih posameznih kultur ter jih nato ustrezno redčili s sterilnim svežim gojiščem na najnižjo izmerjeno optično gostoto. Pri tem smo za določitev števila celic na ml kulture upoštevali podatek, da pri divjih tipih v rangu  $OD_{600} < 1$ , 0,1 enote  $OD_{600}$  sovpada s približno  $3 \times 10^6$  celicami/ml kulture (Trecu in Winston, 2008). Nato smo pripravili redčitve kultur od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$  tako, da smo v mikrocentrifugirke odmerili 0,9 ml  $dH_2O$  ter v prvo dodali 0,1 ml osnovne kulture (razredčina  $10^{-1}$ ), dobro premešali ter prenesli 0,1 ml te razredčene kulture v naslednjo mikrocentrifugirko z 0,9 ml  $dH_2O$  (razredčina  $10^{-2}$ ). Ta korak smo ponavljali do razredčine  $10^{-6}$  ter pred vsakim prenosom

kulturo temeljito premešali. Po 3  $\mu$ l posamezne kulture testiranih sevov smo prenesli na trdna gojišča s testnimi koncentracijami cinkovih ionov ter na kontrolno gojišče brez dodanega cinka ter jih inkubirali na 30 °C 48 ur.

### **3.2.3 Izbira gojišča za preučevanje odziva na pomanjkanje cinka**

V predhodnih testiranjih rasti celic na tipičnih osnovnih definiranih gojiščih z YNB (ang. Yeast Nitrogen Base) smo opazili, da so bile številne kolonije, ki so zrasle na ploščah, kljub podaljšani inkubaciji (4 dni in več), premajhne za detekcijo s to metodo, kar je onemogočilo pridobitev uporabnih podatkov o rasti celic na podlagi velikosti kolonij. Ta učinek je bil še bolj izrazit na gojišču brez dodanega cinka. Za doseganje ustreznega prirasta kolonij v časovnem intervalu 3-4 dni smo gojišča osnovali na YNB ob dodatku aminokislin adenin, triptofan ter uracil v koncentracijah 0,1g/l. V trdna kontrolna gojišča smo  $Zn^{2+}$  ione dodali v 4x običajni koncentraciji, 10  $\mu$ M namesto normalnih 2,5  $\mu$ M, kot je bilo uporabljeno za tekoča, dodatno smo v testna gojišča dodali  $Zn^{2+}$  v minimalni koncentraciji 50 nM. Modifikacije gojišč so omogočile ustrezno rast ter detekcijo skoraj vseh kolonij na testnem gojišču, kljub še vedno zelo omejeni rasti kolonij, v primerjavi z rastjo na kontrolnem in še posebej z bogatim gojiščem, kot je gojišče YPD.

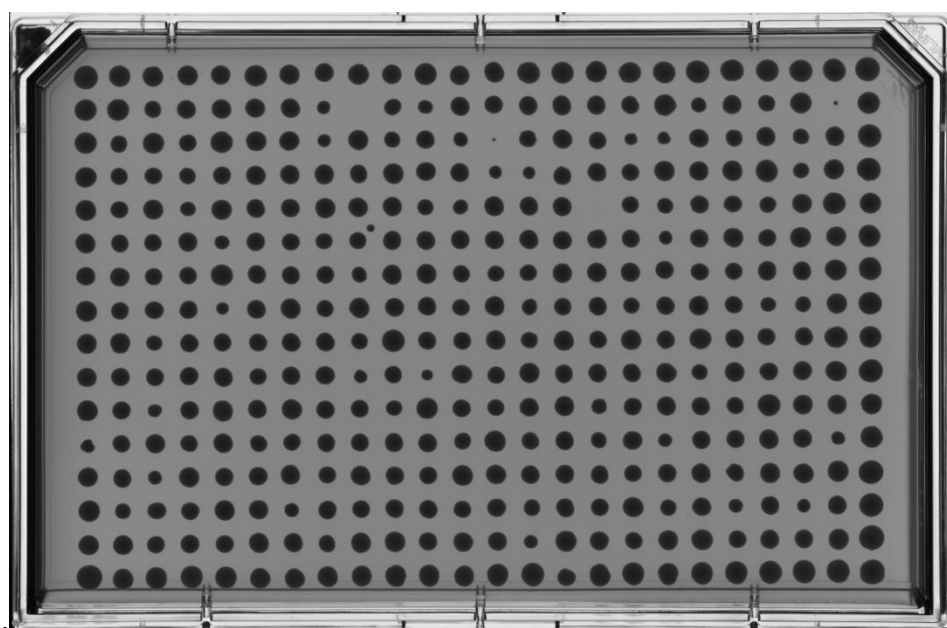
### **3.2.4 Presejalni test: kemijsko genomska analiza**

#### **3.2.4.1 Manipulacija zbirke YKO z robotskim manipulatorjem**

Zbirko haploidnih delecijских mutant smo podvojili z računalniško vodenim robotskim manipulatorjem, napravo, ki omogoča prenos vseh sevov hkrati z osnovne agarne plošče na eno ali več svežih in tako omogoča hitro, natančno ter enostavno pomnoževanje plošč. Programski vmesnik manipulatorja omogoča hitro ter enostavno prilagajanje metode dela trenutnim potrebam. Sistem je podprt tudi s sistemom za avtomatsko čiščenje prenašalne glave v petih korakih: dH<sub>2</sub>O z gobico, 70% etanol, 70% etanol z ultrazvokom (sonifikator), 96% etanol ter sušenje z vročim zrakom.

Za izvedbo presejalnega testa smo uporabili 14 plošč haploidnih mutant zbirke YKO s po 384 kolonijami. Zaradi večjega skupnega števila plošč, uporabljenih pri posamezni ponovitvi testa, smo pri ravnanju tako s testnimi kot s kontrolnimi ploščami zbirke YKO posvečali veliko pozornost pravilni orientaciji plošč ter natančnemu nameščanju na

delovno površino robotskega manipulatorja. Paziti smo morali tudi, da posameznih plošč nismo zamešali med seboj, pri tem je pripomoglo ustrezno označevanje baz petrijevok, kjer smo vsako označili z oznako gojišča ter zaporedno številko plošče iz zbirke YKO. Jasno smo označili tudi dogovorjeno oglišče petrijevke, kar je služilo kot označevalec položaja kolonije z referenčno oznako pozicije 1,1 in s tem olajšalo orientacijo plošč ob zajemu podatkov na optičnem čitalcu. Slika 6 prikazuje primer ene izmed plošč z opisom postavitve mutant.



Slika 6: Primer zajete slike testne petrijevke po inkubaciji.

Primer prikazuje ploščo št.1 po 48 urni inkubaciji pri 30 °C na gojišču YPD, 8 mM Zn<sup>2+</sup>. Struktura posamezne plošče je sledeča: 24 vrstic, 16 stolpcev, skupno 384 kolonij; gornja leva pozicija označuje referenčno mesto 1.1 (vrstica.stolpec); obodne kolonije predstavljajo divji tipi (WT), kateri se uporabijo za določitev relativne hitrosti povečevanja kolonij delecijjskih mutant na posamezni plošči; centralne kolonije predstavljajo posamezne delecijjske mutante.

Plošče smo replicirali tako, da smo ob pomoči robotskega manipulatorja prenesli seve iz osvežene izvorne plošče zbirke YKO najprej na prvo ter nato še neposredno na drugo ploščo, čemur je vsakič sledil cikel čiščenja. Zaradi ustrezne velikosti prenašalnih igel na glavi manipulatorja smo hkrati prenašali 96 mutant, tako smo za prenos ene celotne plošče potrebovali 4 cikle.

### 3.2.4.2 Izvedba

Za vsak posamezni rastni pogoj smo presejalni test izvedli trikrat. Dvakrat smo plošče pomnožili v smeri YKO-TEST-KONTROLA, enkrat pa v smeri YKO-KONTROLA-TEST. Z večkratno ponovitvijo testa ter z uporabo dveh zaporedij odtisov smo zmanjšali možnost ter vpliv napak v rezultatih, predvsem pa smo zmanjšali število lažno pozitivnih rezultatov. Smer odtisa YKO-KONTROLA-TEST dodatno omogoča boljšo identifikacijo delecijskih mutant, ki so na dani rastni pogoj relativno bolj odporne, saj se ob drugem zaporednem odtisu na ploščo prenese manj celic.

Pri presejalnem testu s prebitkom cinkovih ionov je kontrolno gojišče predstavljalo osnovno gojišče YPD brez dodanih cinkovih ionov, testno gojišče pa gojišče YPD z 8 mM koncentracijo  $Zn^{2+}$ .

Za presejalni test s pomanjkanjem cinkovih ionov smo kot kontrolno gojišče uporabili CYCD z 10  $\mu M$   $Zn^{2+}$ , testno gojišče pa gojišče CYCD s cinkom v končni koncentraciji 50 nM.

Zaradi sposobnosti kvasnih celic, da lahko cinkove ione shranjujejo v vakuoli in jih tudi predajo potomkam ob brstenju, smo kvasne celice z namenom znižanja intracelularnega cinka najprej prenesli iz plošče zbirke YKO na ploščo s prehodnim gojiščem, gojiščem YCD, katero smo nato inkubirali za 72 ur. Tako pripravljene plošče ter smo nato uporabili kot izvirne plošče za prenos na testna ter kontrolna gojišča.

Plošče so bile do zajema podatkov inkubirane pri 30 °C skladno s priloženo preglednico (Preglednica 1).

Preglednica 1: Inkubacijski časi testnih ter kontrolnih plošč pri posameznem presejalnem testu ter smeri.

| <b>Test ter smer nanosa</b>           | <b>Test</b> | <b>Kontrola</b> |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|
| Prebitek $Zn^{2+}$ ; TEST-KONTROLA    | 72 ur       | 48 ur           |
| Prebitek $Zn^{2+}$ ; KONTROLA-TEST    | 48 ur       | 96 ur           |
| Pomanjkanje $Zn^{2+}$ ; TEST-KONTROLA | 96 ur       | 72 ur           |
| Pomanjkanje $Zn^{2+}$ ; KONTROLA-TEST | 96 ur       | 72 ur           |

### 3.2.4.3 Zajem ter analiza podatkov

Za zajem podatkov smo uporabili optični čitalnik z opcijo presevnega zajema slike. Odprte plošče s kolonijami smo položili na stekleno površino optičnega čitalca, in sicer z dnom navzgor. Pri tem smo z vodili zagotovili vedno isto pozicijo ter orientacijo plošče, kar nam je olajšalo ter pospešilo zajem podatkov in nadaljnje manipulacije zajetih slik. Slike smo za vsako ploščo posebej zajeli za uporabo preseвне osvetlitve v sivinski tehniki ter jih zaradi zahtev uporabljene analizne programske opreme naknadno pretvorili v 16-bitno barvno globino ter v negativ.

Tako pridobljene slike so predstavljale osnovni blok informacij, katere smo nato analizirali s programom GenePix, namenjenemu računskemu analiziranju slik. V našem primeru kolonija mutant prestavlja motnjo pri prehodu svetlobe skozi gojišče, zato je na sliki območje obarvano temnejše, večja kolonija predstavlja večje območje, debelejša pa večjo motnjo pri prehodu svetlobe in s tem temnejšo barvo. Tako lahko na podlagi števila pikslov ter vrednosti, ki jo stopnja sivine posameznega piksla predstavlja, določimo površino ter arbitrarni volumen posamezne kolonije.

S pomočjo programa GenePix smo z uporabo ustrezno pripravljenega seta mrež z anotirano vsako posamezno pozicijo mutante na posamezni plošči YKO ter setom za določitev vrednosti ozadja (gojišče) za vsako ploščo določili vrednosti posameznih elementov (kolonij celic) ter pripadajočih vrednosti ozadij ter jih izvozili v ustrezni obliki za nadaljnjo statistično obdelavo.

V programu Microsoft Excel smo nato na podatkih, pridobljenih v prejšnjem koraku, uporabili nabor ustrezno prirejenih makrov za avtomatizacijo celotnega postopka. Najprej smo izračunali arbitrarni volumen posameznih kolonij na vsaki plošči z upoštevanjem vrednosti ozadja, katero se je odštelo od vrednosti kolonije. Sledil je izračun razmerja med arbitranim volumenom kolonije posamezne delecijske mutante ter povprečnim arbitranim volumenom kolonij sevov divjega tipa na pripadajoči plošči. Tako pridobljeno razmerje predstavlja relativno velikost kolonije oziroma fitnes mutante pri danem pogoju glede na sev divjega tipa.

S primerjavo tako pridobljenih (relativnih) vrednosti fitnesa iste delecije mutante ( $\Delta$ ) z vrednostmi pri testnih vrednost ( $rel.fitnes.t$ ) ter kontrolnih pogojih ( $rel.fitnes.k$ ) smo izračunali relativni pogojnostni fitnes ( $rel.pog.fitnes$ ; Enačba 1). Relativni pogojnostni fitnes nam pove, ali je posamezna mutanta občutljiva na izbrani testirani rasti pogoju (vrednost manjša od 1), oziroma ali pri tem pogoju uspeva bolje kot sev divjega tipa (vrednost večja od 1). Mutante, na katere testirani rasti pogoju ne vpliva oziroma se nanj ne odzovejo, imajo vrednost tega razmerja  $\sim 1$ .

$$rel.pog.fitnes(\Delta) = \frac{rel.fitnes.t(\Delta)}{rel.fitnes.k(\Delta)} \quad \dots (1)$$

Razvoj postopka ter analitske metode, uporabljene pri izvajanju presevnega testa ter analizi pridobljenih podatkov, je rezultat predhodnega diplomskega dela, kjer so na voljo podrobnejši podatki o postopkih ter o statističnem ozadju metode (Kaferle, 2008; bioRxiv (2016) 031443).

#### 3.2.4.4 Analiza

Mutante, katerih odziv na izbrane testne pogoje je bil značilno drugačen od kontrolnih, smo določili tako, da smo za vsako izmed ponovitev posameznega poizkusa neodvisno določili mediano ter standardno deviacijo (SD), upoštevajoč rezultate vseh mutant pripadajoče ponovitve. Nato smo določili meje: blažji meji pri mediana $\pm$ SD ter strožji meji pri mediana $\pm$ 2SD. Te meje smo uporabili kot osnovo za razvrstitev posameznih mutant v kategorijo odpornih ali občutljivih na testiran rasti pogoju. Mutante, katerih vrednosti razmerja so od povprečja odstopale manj kot 1 SD, nas za določanje značilno drugačnih mutant niso zanimale.

Za identifikacijo seva kot odpornega ali občutljivega na rasti pogoju pri celotnem eksperimentu smo sev razvrstili glede na frekvenco razporeditev seva tekom treh ponovitev v posamezna območja določena z mejami. Preglednica 2 podaja pogoje za razporeditev v posamezno skupino – za uvrstitev v skupino odpornih oziroma občutljivih, je sev moral izpolniti enega od zapisanih pogojev.

Tri ponovitve poizkusa v dveh smereh prenosa kvasnih celic zmanjša vpliv napak ter odstopanj zaradi naključja, tako imenovanih lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov. Uporaba dveh smeri nanosa celic je pomembna, ker za občutljive mutante pri smeri nanosa kontrola-test pričakujemo večje število lažno negativnih rezultatov, saj se na drugo ploščo prenese manj celic kot na prvo. Enako velja za smer test-kontrola v primeru odpornih sevov. V povezavi s čim več ponovitvami poizkusa lahko močno ublažimo napake, ki jih prinesejo lažno pozitivni rezultati.

Preglednica 2: Pogoji za razvrstitev posamezne mutante kot občutljivo/odporno.

| <b>OBČUTLJIVI</b>                | <b>ODPORNI</b>                      |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| $3x < -2SD$                      | $3x > +2SD$                         |
| $2x TK < -2SD$ , $KT$ nevtralen  | $2x > +2SD$ , 1x pod mejo detekcije |
| $KT$ in $TK < -2SD$ , $TK < -SD$ | $KT > +2SD$ , $2x TK > +SD$         |
| $1x TK < -2SD$ , $2x < -SD$      | $2x TK > +2SD$ , $KT > +SD$         |
| $1x KT < -2SD$ , $2x < -SD$      | $3x > +SD$                          |
| $3x < -SD$                       |                                     |

Opomba: SD - standardna deviacija posamezne ponovitve; TK - identificiran pri TEST-KONTROLA smeri; KT - identificiran pri KONTROLA-TEST smeri; črta razmejuje pogoje z nižjo zanesljivostjo pravilne razvrstitve. Primer: sev identificira kot občutljiv po pogoju  $2x TK < -2SD$ ,  $KT$  nevtralen – fitness seva identificiranega pri obeh ponovitvah smeri TEST-KONTROLA z vrednostjo manjšo kot meja mediana - 2SD, fitness seva pri ponovitvi KONTROLA-TEST v nevtralnem območju (znotraj blažjih mej mediana +/- SD).

Tako zbrana tabela podatkov predstavlja kemijsko-genomski profil kvasovke *S. cerevisiae* za izbrani motilec oziroma testni pogoj.

Z ustreznimi orodji, dostopnimi na spletu, smo nato analizirali tako identificirane seve oziroma gene, ki jih ti sevi predstavljajo ter povezave med njimi ter drugimi geni. Na ta način lahko preverimo odzive genov, ki pripadajo posameznim družinam ali procesom ter sklepamo na povezave med njimi. Pri analizi ter anotaciji rezultatov smo si pomagali s sledečimi spletnimi orodji:

- Generic Gene Ontology (GO) Term Finder  
URL: <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>
- SGD Gene Ontology (GO) Slim Mapper  
URL: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>

### 3.2.5 Potrditveni testi - določanje rastnih krivulj

Posamezne izbrane mutante, ki smo jih tekom presejalnega testa identificirali kot značilno drugačne v primerjavi z divjim tipom, smo dodatno preverili s specifičnimi potrditvenimi testi z določitvijo rastnih krivulj. Rastne krivulje izbranih sevov smo določali z meritvijo absorbance v tekočih kulturah. Za delo smo uporabili merilec absorbance z opcijama stresanja in gretja vzorcev Sunrise (Tecan, Švica) ter mikrotitrne ploščice s 96 jamicami v katere smo odmerili ustrezna gojišča ter celice izbranih delecijjskih mutant.

Testno petrijevko smo pripravili tako, da smo v posamezno jamico s pipeto oziroma z multikanalno pipeto odmerili 270  $\mu$ l ustreznega gojišča, vnesli 3  $\mu$ l umerjene homogene prekonočne kulture izbranih sevov ter inkubirali vzorce pri 30 °C ter stresanju.

Podatke o absorbanci pri valovni dolžini 595 nm smo zajeli vsaki 2 minuti, kolikor je trajal posamezni cikel (stresanje 110s, 1s za umiritev ter merjenje 9s). Trajanje celotnega poizkusa smo prilagodili hitrosti rasti sevov in smo ga prekinili, ko je velika večina sevov dosegla stacionarno fazo rasti.

Celotni postopek, od nadzora rastnih pogojev in zajemanja podatkov do njihovega shranjevanja v ustrezni obliki, je bil nadzorovan preko računalniškega programskega vmesnika z možnostjo neposrednega spremljanja poteka testa za vseh 96 merilnih mest. Končni rezultati so bili podani v obliki tabele s prikazom optične gostote vzorca (OD) v času za vsako posamezno pozicijo ter nato pretvorjeni v ustrezni grafični prikaz spremembe OD tekom časa.

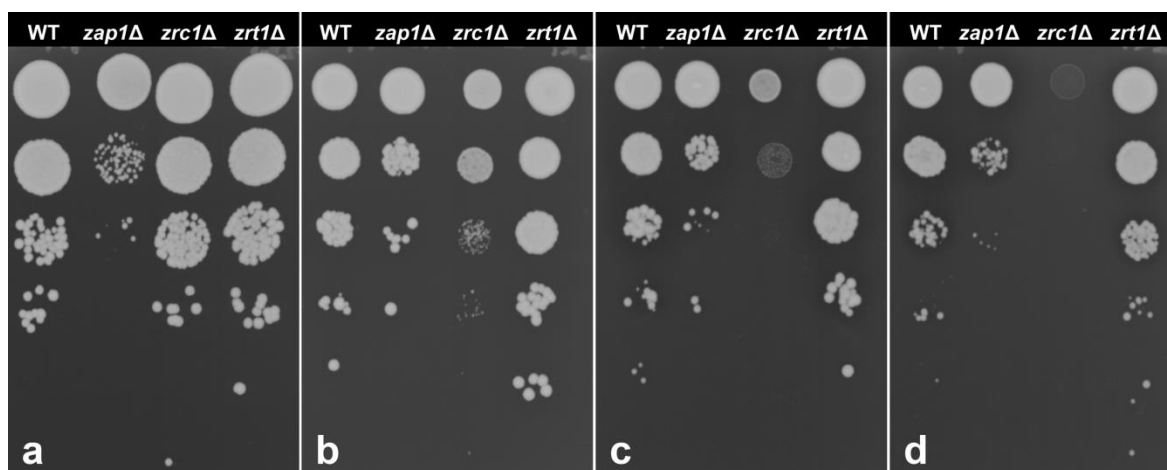
Pri vseh testih smo vzporedno z delecijjskimi mutantami izbranih genov kot referenčni sev uporabili sev divjega tipa (WT).



## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČITEV INHIBITORNE KONCENTRACIJE $Zn^{2+}$ IONOV

Od izbranih delecijjskih mutant se je pri serijskem testu z razredčinami za najobčutljivejšo na prebitek cinka izkazala mutanta *zrc1Δ*, ki je po 48 urah inkubacije pri 6 mM  $Zn^{2+}$  kazala močno upočasnjeno rast, pri 8 mM pa rasti tega seva praktično ni bilo (Slika 7). Zrc1 je poleg Cot1 odgovoren za transport cinka iz citoplazme v vakuolo (MacDiarmid in sod., 2000) in s tem za razstrupljanje celice. Povečana občutljivost celic brez Zrc1 ob prebitku cinka je pričakovana in služi kot pozitivna kontrola.



Slika 7: Primerjava rasti kolonij sevov divjega tipa (WT), *zap1Δ*, *zrc1Δ* ter *zrt1Δ* pri različnih koncentracijah  $Zn^{2+}$ .

Gojišča: (a) kontrola (brez dodatka), (b) 4 mM, (c) 6 mM ter (d) 8 mM  $Zn^{2+}$ . Testirani sevi (od leve proti desni): divji tip (WT), *zap1Δ*, *zrc1Δ* in *zrt1Δ*. Razredčine si sledijo od čiste kulture (na vrhu), prek razredčine  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$  (spodaj).

Mutanta *zrt1Δ* z izbitim genom za visoko afinitetni cinkov prenašalec Zrt1 (Zhao in sod., 1996b) se je po odpornosti izkazala za primerljivo sevu divjega tipa (WT) pri celotnem razponu koncentracij cinka, ki smo jih preverili. Opažanje je skladno s funkcijo Zrt1, ki je odgovoren za vnos cinka v celico ob njegovem pomanjkanju. Pri tem je potrebno poudariti, da je rast tako seva WT kot seva *zrt1Δ* pri dodatku cinka delno zavirana (Slika 7) kar se kaže v počasnejši rasti kolonij ob dodatku cinka, torej manjših kolonijah v primerjavi s kontrolnim gojiščem.

Opazili smo tudi povečano občutljivost seva *zap1Δ*, ki je lahko posledica njegove široke vloge v celici. Zap1 namreč poleg uravnavanja membranskih proteinov, vpletenih v

homeostazo cinka ob njegovem pomanjkanju, sodeluje tudi pri aktivaciji številnih drugih proteinov (Lyons in sod., 2000).

Na podlagi zbranih rezultatov smo, skladno s semi-inhibitornim vplivom na sev WT ter na popolnoma zavrto rast najobčutljivejšega seva *zrc1Δ*, za izvedbo kemijsko genomskega poizkusa s prebitkom določili medij z 8 mM cinkom.

## 4.2 PRESEJALNI TEST

Za pridobitev širšega vpogleda na učinek pomanjkanja ter prebitka cinka na rast nabora sevov z izbranim posameznim genom smo opravili kemijsko genomsko analizo. Na ta način smo določili delecije mutante, ki so občutljive oziroma odporne na testirane koncentracije cinka v okolju v primerjavi z referenčnim sevom. Skladno s predhodnimi testiranjimi smo za pogoj prebitka cinka v testnem gojišču uporabili gojišče YPD z dodano koncentracijo cinka, določeno z metodo z razredčinami. Kontrola pa je predstavljalo nemodificirano gojišče YPD s standardnimi koncentracijami cinka. Za test s pomanjkanjem cinka smo uporabili definirano gojišče, kot je opisano v metodah. Poseben poudarek smo dali semi-inhibitornemu učinku na sev divjega tipa, kar je razlog za izbor 50 nM koncentracijo cinka v testnih ploščah za test s pomanjkanjem cinka, medtem ko smo za kontrolo uporabili 10  $\mu$ M, znotraj območja optimalnega za kvasne celice (MacDiarmid in sod., 2000).

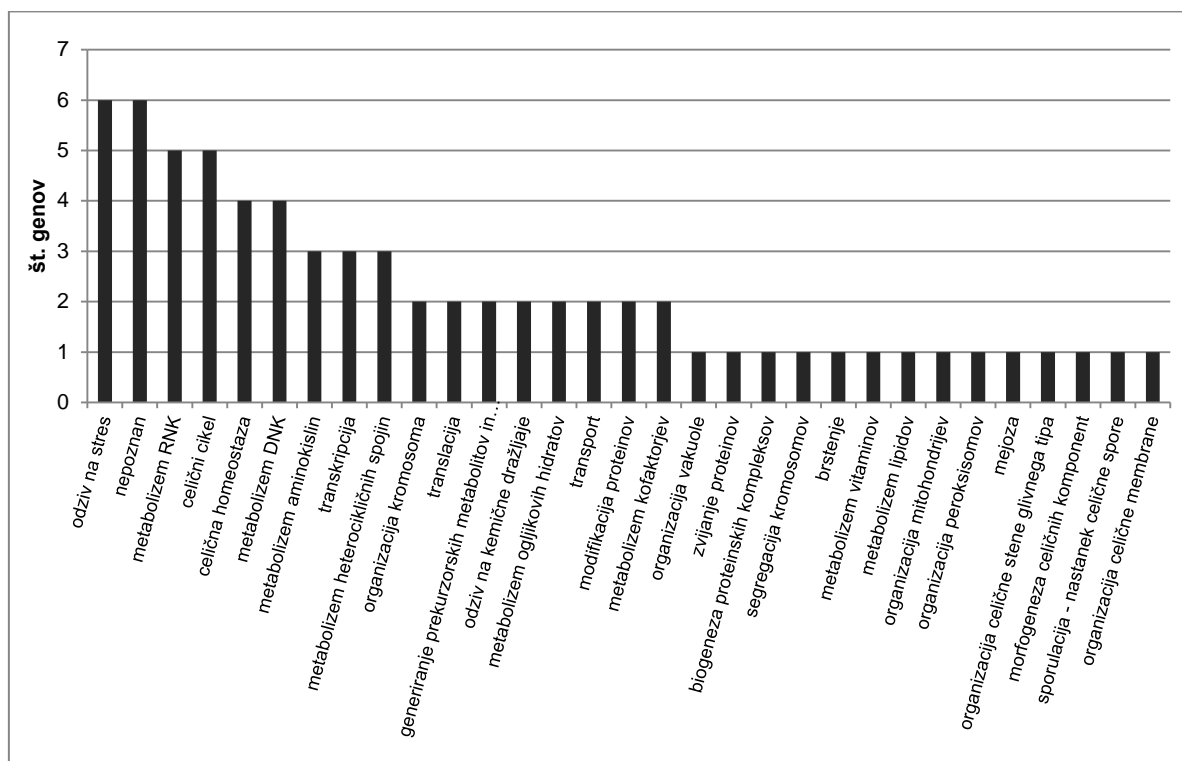
Skupno smo v kemijsko genomski analizi obeh pogojev motenja cinkovega ravnovesja identificirali 289 mutant z znatno spremenjenim odzivom glede na divji tip, pri tem pa poudarjamo, da skupno število vključuje tudi 31 mutant, katerih ORF je opredeljen kot dvomljiv ter 18 mutant z neopredeljenim ORF-om.

Zbrani rezultati analize ob prebitku cinka so prikazani v Prilogi A, medtem ko so rezultati, pridobljeni pri pogoju pomanjkanja cinka, prikazani v Prilogi B.

### 4.2.1 Pomanjkanje cinka

Od skupno 30 identificiranih sevov ob pomanjkanju cinka smo identificirali več odpornih kot občutljivih sevov, 27 v primerjavi s 3, pri čemer se je 22 odpornih sevov z relativnim pogojnostnim fitnessom višjim od 2 izkazalo za visoko značilne (Priloga B). S spletnim

orodjem GO Slim Mapper smo določili širše procese, v katerih sodelujejo produkti genov, katere predstavljajo v poskusu identificirane mutante (Slika 8).



Slika 8: Širši procesi s številom pripadajočih genov oziroma ustreznih identificiranih delecijjskih mutant pri pomanjkanju cinka

Po pričakovanjih glede na funkcijo proteina, ki ga izbiti gen kodira, smo kot na cink občutljivo mutanto identificirali *zrt1Δ*. Protein Zrt1 je visoko-afinitetni transporter cinkovih ionov, lociran na celični membrani in je odgovoren za privzem večine cinka, še posebej to velja v pogojih, ko je le-ta omejen (Zhao in sod., 1996b). Zrt1 je pozitivno uravnavan prek transkripcijskega faktorja Zap1, z njegovo aktivacijo ob pomanjkanju cinka. Poleg seva *zrt1Δ* smo kot občutljiva identificirali še sev z izbranim genom *ADH4*, ki kodira od cinka odvisno dehidrogenazo, aktivirano ob pomanjkanju cinka (Yuan, 2000), ter sev z izbranim genom *TSA1*, kateri kodira tioredoksin peroksidazo, ki v celici deluje kot antioksidant, uravnavan z Zap1 (Wu in sod., 2007).

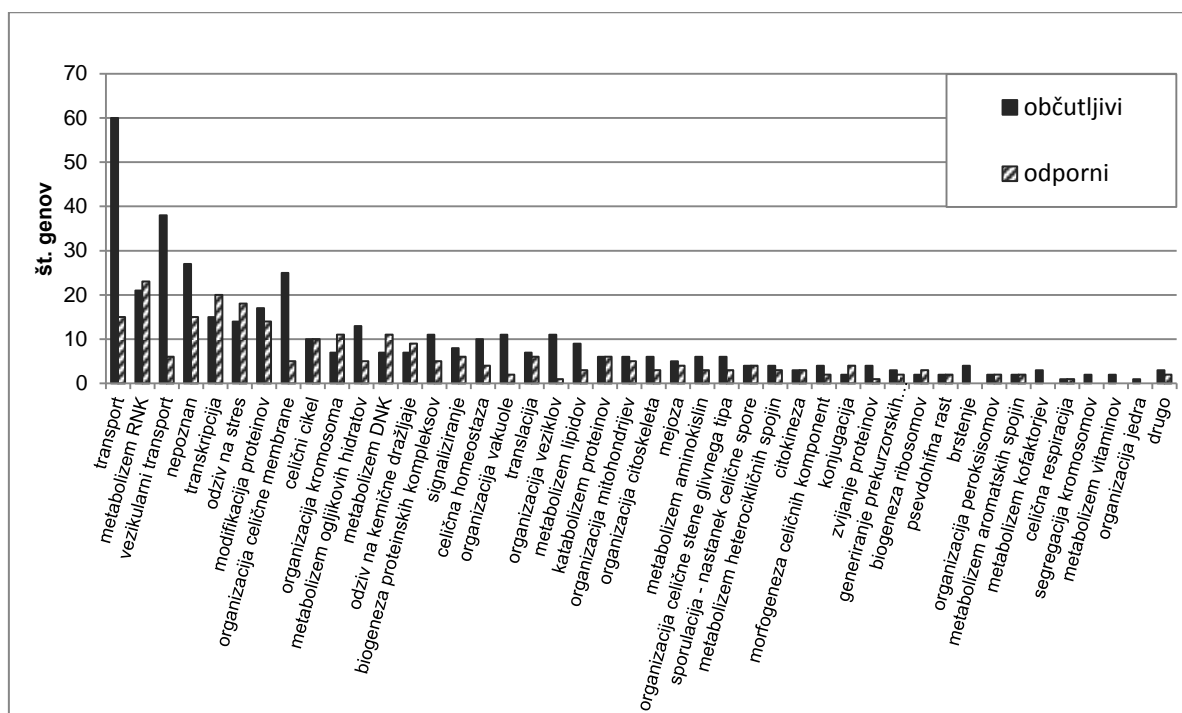
Med procesi, v katere se razvrščajo geni, pripadajoči sevom odpornim na pomanjkanje cinka, izstopajo procesi odziva na stres (vpleteni geni *ATG2*, *EXO1*, *MET18*, *SML1*, *TRR2*), celične homeostaze (*MMT2*, *TRR2* ter *VPH1*) ter sinteza lipidov (*CEM1*, *INO1*).

Gena *VPH1* ter *MMT2* GO Term Finder uvršča tudi v proces kationske homeostaze, vendar z vednostjo  $p=1$ . Zanimiva je odpornost mutante z manjkajočo mitohondrijsko tioredoksin reduktazo, saj bi glede na funkcijo antioksidanta pričakovali slabšo rast zaradi slabše zaščite pred stresom, povezanim s pomanjkanjem cinka.

Kot izredno zanimiv za nadaljnje raziskovanje izpostavljamo gen *INO1*, ki kodira inozitol-3-fosfat sintazo, encim z izrednim pomenom za sintezo lipidov.

#### 4.2.2 Prebitek cinka

Pri prebitku cinka smo identificirali bistveno več mutant z značilno drugačnim odzivom kot pri pomanjkanju. Tako je od skupno 259 identificiranih sevov občutljivost izkazalo 161 mutant, odpornost pa 98 (Priloga A). Pri tem ima sev z najbolj izrazito odpornostjo sev z izbrisanim genom *SIN3* - *sin3Δ* (rel.pog.fitness=2,86), opazno manjše odstopanje fitnessa kot sev *spo20Δ* (4,59), najodpornejši sev pri pomanjkanju cinkovih ionov. Širše procese v katerih sodelujejo produkti genov, ki predstavljajo identificirane mutante, smo določili s spletnim orodjem GO Slim Mapper (Slika 9). Iz njih je razvidno na katere procese ima prebitek cinka največ vpliva.



Slika 9: Širši procesi s številom pripadajočih genov oziroma ustreznih identificiranih delecijjskih mutant pri prebitku cinka

Kot izstopajoč in pomemben rezultat, oziroma kot pozitivna kontrola metode je bil med na prebitek cinka občutljivimi sevi identificirana mutanta *zrc1Δ*. Rezultat je bil pričakovan, saj gen *ZRC1* nosi zapis za transporter, odgovoren za privzem cinka iz citoplazme v vakuolo in tako preprečiti prekomerno kopičenje v citoplazmi (MacDiarmid in sod., 2000). *Zrc1* je med drugim tudi eden izmed prenašalnih proteinov, ki so pozitivno uravnani z aktivacijo Zap1. To je navidezno protislovno, a se lahko pojasni z namenom zaščite ob cinkovem šoku in nenadnem porastu koncentracij citosolnega cinka. Analiza z GO Slim Mapper ter GO Term Finder je izpostavila skupno 75 genov povezanih s transportom, pri tem je izpostavljena skupina 44 genov povezanih z vezikularnim transportom ( $p=2,22 \times 10^{-8}$ ), 38 identificiranih pri pogoju s pomanjkanjem cinka. Izpostavljena skupina je splošni indikator celičnega stresa (Hillenmeyer in sod., 2008), kar je glede na testne pogoje pričakovani rezultat. Drugi pomembnejši izpostavljeni procesi so proces organizacije celične membrane (30 genov,  $p=3,08 \times 10^{-3}$ ), organizacije veziklov (12 genov), odziva na stres (32 genov), odziva na kemične dražljaje (16 genov), celične homeostaze (14 genov, vključen gen *VPH1*) ter drugi. Z GO Term Finder je bil izpostavljen tudi proces sinteze manana, ki je ključen za sintezo celične stene. Kot občutljivi sta bili tu identificirani mutanti z manjkajočima genoma *HOC1* ter *MNN10* (Jungmann in sod., 1999). Produkta teh dveh genov sta del manoziltransferaznega kompleksa, odgovornega za podaljševanje mananske verige.

V procesu celične homeostaze je uvrščena tudi občutljiva mutanta z manjkajočim genom *VPH1*, ki je bila zaznana tudi kot odporna na pomanjkanje cinka. To nakazuje, da je pravilno delovanje vakuolne ATP-aze pomembno za uravnavanje citosolne koncentracije cinka (MacDiarmid in sod., 2002). Kot odporno na pomanjkanje cinka ter hkrati občutljivo na prebitek, smo identificirali tudi mutanto *ypr170cΔ*, ki pa ima izbrisan dvomljiv ORF.

Pri testu s prebitkom cinka smo identificirali mutanti *slm3Δ* in *yll056cΔ*, ki sta bili v obeh primerih, tako pri prebitku kot pri pomanjkanju cinka, identificirani kot odporni. Gen *YLL056C* nima opredeljenega znanega biološkega procesa, produkt gena *SLM3* pa sodeluje pri translaciji: je tRNA-specifična 2-tiouridilaza, ki je del histondeacetilaznih kompleksov Rpd3S ter Rpd3L (Bernstein in sod., 2000). Pri tvorbi histondeacetilaznega kompleksa

Rpd3L sodelujejo tudi identificirani geni, ki so anotirani v procesu histonske deacetilacije ( $p=1,053 \times 10^{-2}$ ): geni *CTI6*, *RXT2*, *DEP1*, *UME1* ter zgoraj omenjeni gen *SLM3*.

Z analizo smo odkrili tudi zelo pomembno skupino odpornih mutant, katerih produkti izbranih genov so odgovorni za odgovor na pH ( $p=6,205 \times 10^{-2}$ ) ter za odgovor na abiotske dražljaje ( $p=0,13261$ ), in sicer mutante z manjkajočimi geni *RIM9*, *RIM20* ter *RIM101*. Produkti teh treh identificiranih genov so del signalne poti RIM101, ki ima poglobljeno vlogo pri prilagoditvi celic na alkalen pH (Boysen in sod., 2006), zato smo jih označili kot primerne kandidate za podrobnejše analize. Drugi širši celični procesi identificirani z GO Slim Mapper, ki so močno zastopani v tej skupini so: metabolizem RNA (23 genov), transkripcija (20 genov), procesi modifikacije proteinov (14 genov), odgovor na stres (18 genov) ter transport (15 genov).

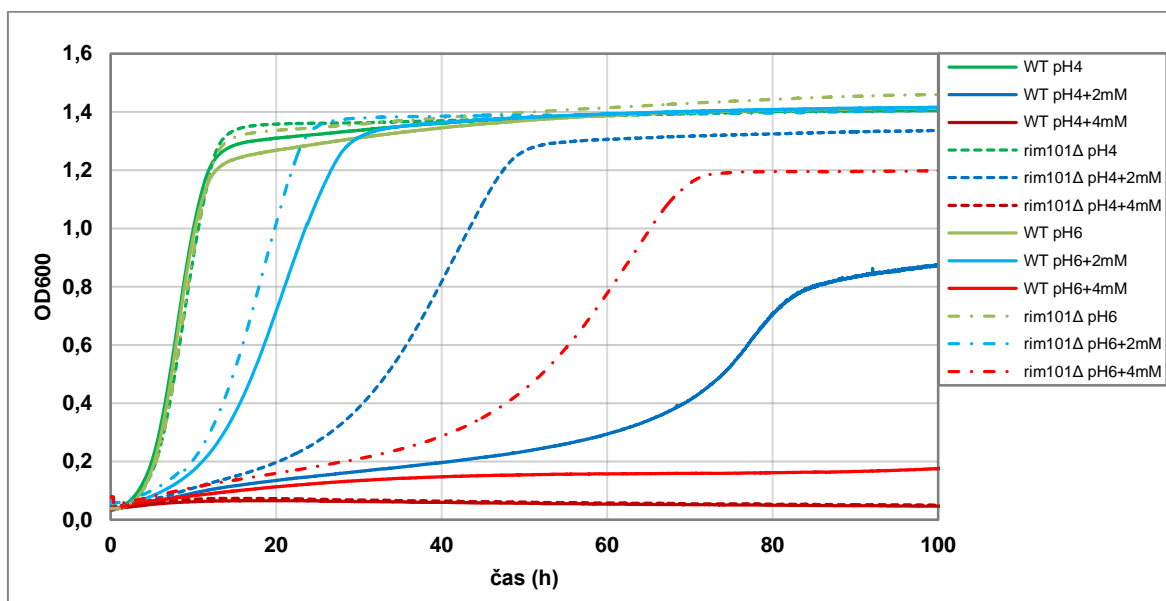
Omembe vredno je, da so produkti izbranih genov pri najbolj občutljivih sevih vključeni v procese, ki so v prvi vrsti povezani s celično homeostazo, transportom, organizacijo membran (celična, vakuolna). Po drugi strani so produkti izbranih genov pri najodpornejših sevih – čeprav so nekateri tudi povezani s taistimi procesi – v splošnem bolj heterogeni in udeleženi predvsem v metabolnih procesih. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je občutljivost sevov na povišane koncentracije cinka tesno povezana z motnjami v homeostazi membran ter s stabilnim transportom ter prenosom signalov.

#### 4.3 KOMBINACIJA VPLIVOV PH, PREBITKA CINKA TER SIGNALNE POTI RIM101

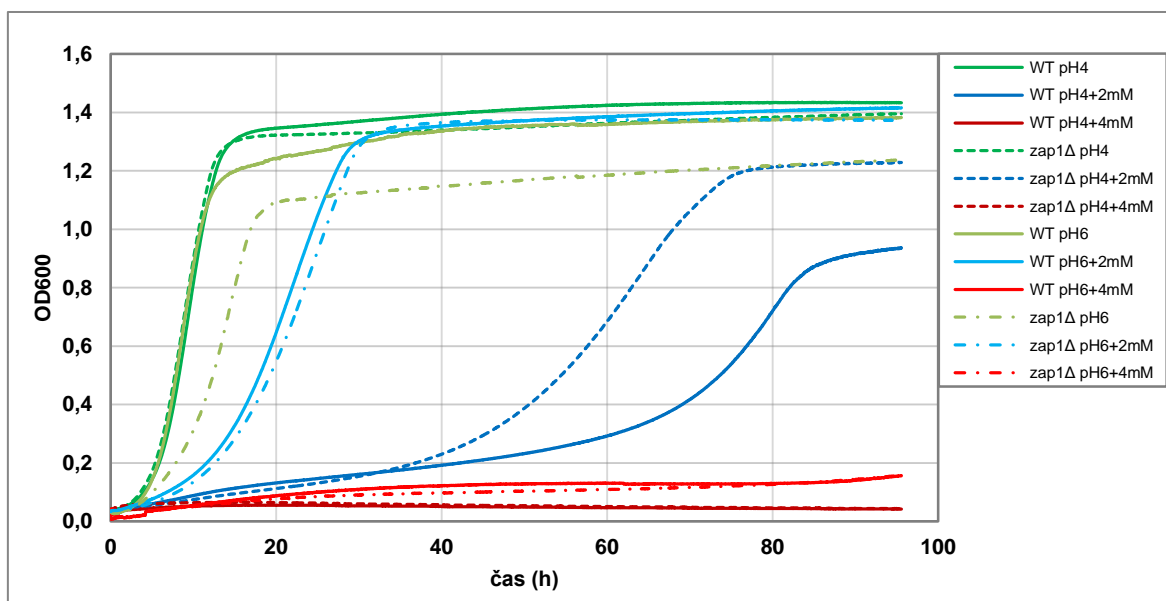
Med mutantami, odpornimi na povišane koncentracije cinka v okolju, smo identificirali tri, katerih produkti pripadajočih genov so del signalne poti RIM101. Tem mutantam smo določili rastne krivulje z namenom potrditve rezultatov osnovnega presejalnega testa ter podrobnejše raziskave, kako so medsebojno povezani celični odzivi na visok pH ter povišane koncentracije cinka v okolju. Tako smo testirali mutante z manjkajočim genom *RIM101*, *RIM20* ter *RIM9*; vsak izmed njih ima drugačno vlogo v signalni poti RIM101. Poleg omenjenih delecijских mutant smo testirali tudi sev z manjkajočim genom *ZAP1*.

Celice delecijских mutant smo gojili v tekočem gojišču, v pufranem gojišču YPD (YPD s 150 mM HEPES) pri pH 4 ter pri pH 6. Višjih pH vrednostih gojišču zaradi oboritve





Slika 12: Rastne krivulje mutante *rim101Δ*, rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT).



Slika 13: Rastne krivulje mutante *zap1Δ*, rasle pri pH 4 ali pH 6 ter povišani koncentraciji cinka (2 mM ali 4 mM), v primerjavi s sevom divjega tipa (WT).

Iz zbranih rezultatov je razvidno, da je sev divjega tipa bolj odporen na povišane koncentracije cinka pri višjih pH okolja, specifično je ta razlika izpostavljena pri 2 mM koncentraciji cinka v gojišču. Pri 4 mM cinku je razlika sicer opazna, ampak ne moremo trditi, da je značilna, saj celice ne preidejo v eksponencialno fazo rasti.



Vse tri testirane mutante, *rim11Δ*, *rim20Δ* ter *rim9Δ*, so imele skoraj identičen profil rasti krivulj. Tako so se vse izkazale za odporne na povišane koncentracije cinka pri pH6, kar predstavlja pozitivno kontrolo rezultatom presejalnega testa, ter v primerjavi z referenčnim sevom še toliko bolj pri pH4, z izjemo pogoja pri pH4 + 4 mM cinka, kjer je bila rast zavrnjena pri vseh sevih.

Podoben odgovor na stresne dejavnike smo opazili tudi pri mutanti *zap1Δ*, vendar je manj izražen, saj mutanta raste značilno hitreje v primerjavi z WT le ob 2 mM prebitku cinka pri pH 4, medtem ko je pri pH 6 rast primerljiva (Slika 13).

Delecija kateregakoli izmed treh genov RIM je tako povečala odpornost celice na povišane koncentracije cinka, še posebej pri nižjih pH. Povečana odpornost pri deleciji genov poti RIM101 tako nakazuje na negativni vpliv povezanih celičnih odzivov za adaptacijo na pogoje povišanega cinka v okolju.

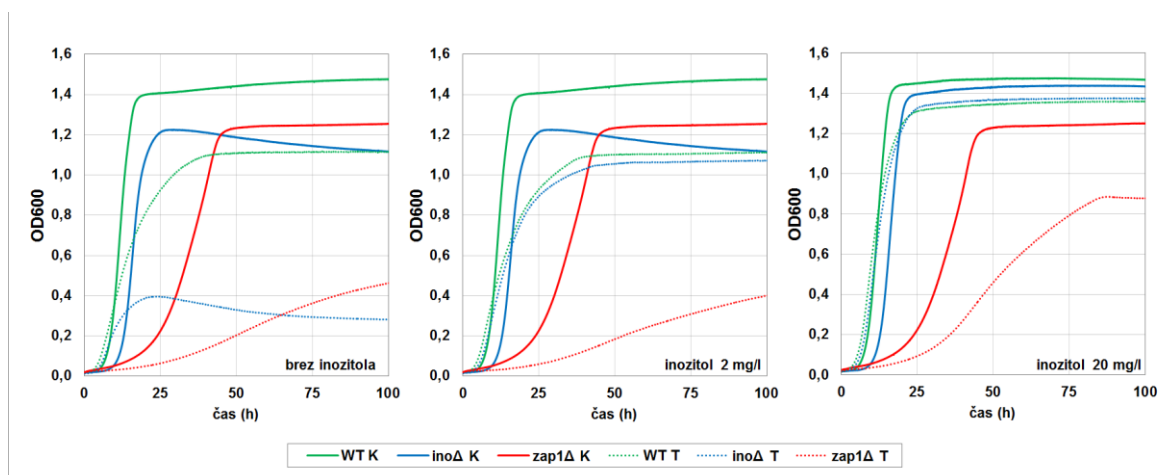
#### 4.4 VPLIV NA BIOSINTEZO LIPIDOV

Tekom poskusa smo analizirali odziv delecijske mutante z manjkajočim genom *INO1*, identificirane kot odporne na pomanjkanje cinka, na kombinacijo pomanjkanja cinka ter različnih koncentracij inozitola v gojišču. Vzporedno smo testirali tudi delecijsko mutanto *zap1*, saj je protein Zap1 vpleten tudi v sintezo PI preko aktivacije genov *PIS1* ter *DPP1* (Carman in Han, 2007) in tako posredno tudi v sintezo lipidov. Želeli smo ugotoviti povezavo med proteinom Ino1, inozitolom in proteinom Zap1 ter analizirati zahteve po inozitolu ob pomanjkanju cinka.

Pri testu smo uporabili tekoče gojišče CYCD brez inozitola. Inozitol smo dodali v koncentracijah 0 mg/l (pomanjkanje), 2 mg/l (normalna koncentracija, kontrola) ter 20 mg/l (10x normalna koncentracija, prebitek). Cinkovi ioni so bili dodani v koncentracijah 2,5 μM (kontrolno gojišče) ter 50 nM (testno gojišče, pomanjkanje). Predkulture so bile prehodno gojene v tekočem gojišču YCD z namenom zmanjšanja vpliva cinka, akumuliranega v izvornih celicah (vakuoli).

Sev divjega tipa je pri nižjih koncentracijah inozitola ter pomanjkanju cinka rasel nekoliko počasneje kot pri kontrolnih pogojih, medtem ko pomanjkanje inozitola ni imelo nobenega vpliva na celično rast pri običajnih pogojih (Slika 14; levo ter sredina). Rast pri povišani

koncentraciji inozitola v gojišču je pozitivno vplivala na vse izmed treh sevov, tako pri običajni koncentraciji cinka kot, še bolj izrazito, pri gojišču brez dodanega inozitola (Slika 14; desno). To bi lahko pomenilo, da celice za prilagoditev na stresne pogoje zaradi pomanjkanja cinka potrebujejo višje koncentracije inozitola.



Slika 14: Rastne krivulje divjega tipa (WT), mutant *ino1Δ* ter *zap1Δ* pri običajni koncentraciji cinkovih ionov - 2,5 μM (K), ob pomanjkanju – 50 nM (T) ter z različnimi koncentracijami inozitola. Levo 0 mg/l (pomanjkanje); sredina 2 mg/l (običajna koncentracija); desno 20 mg/l (10x koncentracija, prebitek).

Proti pričakovanjem je tudi relativno dobra rast seva *ino1Δ* na gojišču brez inozitola ob pomanjkanju cinka. To si razlagamo s porastom koncentracije PI, alternativnega vira inozitola, kot posledico aktivacije proteina Zap1 ob nizkih koncentracijah cinka ter njegovega pozitivnega vpliva na sintezo PI prek aktivacije prepisa gena *PIS1* (Carman in Han, 2007). Pri tem je bila hitrost rasti mutante *zap1Δ* ob pomanjkanju cinka zavrta, kar je bilo tudi pričakovati. Kar preseneča je, da kljub prisotnemu genu *INO1* nismo opazili delne rešitve mutante, kot pri sevu *ino1Δ*. To nakazuje na neposredno vpletenost proteina Zap1 v regulacijo sinteze PI ter mogoče tudi posredno vpletenost v uravnavanje izražanja gena *INO1*.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V naši raziskavi smo hoteli na genomski ravni določiti odziv evkariontske celice na cinkov stres. Pri tem se stres nanaša na pogoje, ko je cink v okolju izven običajnih koncentracij za preiskovani organizem. S kemijsko genomiko, metodo, ki omogoča določitev potencialnih tarč oziroma, natančneje, procesov, v katerih dejanska tarča sodeluje na podlagi merjenja sprememb fenotipa, smo tako želeli ločeno določiti kemijsko genomski profil za posamezni pogoj cinkovega stresa: pomanjkanje oziroma prebitek. Na podlagi tako zbranih rezultatov se nato lahko sklepa na potencialne vplive posameznega testnega pogoja na celične procese ter zastavi ustrezne specifične poizkuse za identifikacijo pravih tarč kemikalije, v našem primeru cinka. Poleg splošnega pristopa za identifikacijo vseh mutant z značilno drugačnim odzivom na enega izmed testiranih pogojev smo se osredotočili na mutante, katerih izbiti geni so vključeni v procese membranske homeostaze.

Kot preiskovani organizem smo uporabili običajno kvasovko *S. cerevisiae*, ki je zaradi razpoložljivosti zbirke delecijjskih mutant, dostopnih drugih eksperimentalnih podatkov ter zelo enostavnega gojenja zelo primerna za izvedbo našega eksperimenta. Tako smo celice mutant gojili v definirani mrežni razporeditvi na trdnem gojišču (Slika 6), kot merljiv fenotip pa smo uporabljali volumen (velikost) kolonije, ki sovpada s številom celic v koloniji, določenim po izbranem času inkubacije s postopkom, specifično razvitim z namenom hitrega ter enostavnega testiranja, zbiranja ter analize podatkov (Kaferle, 2008; bioRxiv (2016) 031443).

Najprej smo določili ustrezne testne pogoje, saj je od njihove pravilne izbire močno odvisen končni rezultat. Idealni testni pogoj bo deloval semi-inhibitorno na sev divjega tipa, ki ima referenčni fitnes pri posameznem pogoj, vendar bo značilno spremenil hitrost rasti občutljivih sevov. Semi-inhibitornost na sev divjega tipa omogoča ovrednotenje tudi mutant, ki so relativno bolj odporne na rastni pogoj. Pri izboru smo morali biti pazljivi, da nismo izbrali prestrogih pogojev, saj morajo biti kolonije primerne velikosti za nemoteno detekcijo pri analitski metodi.

Z metodo razredčitvene vrste (Slika 7) smo za pogoj prebitka cinka določili testno gojišče YPD z 8 mM dodano koncentracijo cinka ( $ZnCl_2$ ), za kontrolno gojišče pa smo uporabili

standardno bogato gojišče YPD. Odločitev smo osnovali na podlagi skoraj popolne inhibicije delecije mutante *zrc1*; protein Zrc1 je membranski transporter cinka iz citoplazme v vakuolo (MacDiarmid in sod., 2000) ter *zrc1*Δ znan občutljivi sev na pomanjkanje cinka (MacDiarmid in sod., 2003). V primeru pomanjkanja cinka smo medij CYCD osnovali na podlagi semi-inhibitornega odziva celic divjega tipa. Hkrati smo hoteli doseči dovolj hitro pomnoževanje kvasnih celic, tudi občutljivih mutant, da je bila mogoča nemotena detekcija večine kolonij na testnih ploščah po inkubaciji 72-96 ur. Da smo zagotovili te pogoje, smo tekom razvoja gojišče obogatili z dodatkom nukleobaz adenin sulfata, uracila ter aminokislina triptofana v koncentracijah 0,1 g/l, ter dodatkom cinka v testno gojišče v 50 nM končni koncentraciji. V kontrolnem gojišču smo uporabili 10 μM končno koncentracijo cinkovih ionov.

Test vsakega izmed pogojev smo izvedli trikrat: dvakrat v smeri odtisa celic YKO-TEST-KONTROLA ter enkrat v nasprotni smeri YKO-KONTROLA-TEST. Uporaba dveh smeri nanosa je ključnega pomena za omilitev problema lažno negativnih (smer T-K) ter lažno pozitivnih rezultatov (smer K-T), zaradi možnosti, da se pri zaporednih odtisih na prvo ploščo odtisne več celic kot na drugo. Po inkubacijah testnih plošč skladno s preglednico 1 smo podatke zajeli ter jih analizirali. Najprej smo določili velikost posameznih kolonij, nato relativni fitnes mutant v primerjavi z divjim tipom na posamezni plošči, nazadnje pa še relativni pogojnostni fitnes s primerjavo relativnih fitnesov pri testnem pogoju oziroma pri pripadajočem kontrolnem pogoju (prilogi).

Uporaba postopka, kjer najprej izračunamo razmerje med vrednostjo posamezne kolonije ter povprečno vrednostjo kolonij seva divjega tipa pri vsakem pogoju posebej ter šele nato primerjamo pogoja med seboj, ublaži vpliv morebitnih napak, ki lahko nastanejo zaradi manjših razlik v osnovni sestavi gojišč, nihanja oziroma razlike v temperaturnih pogojih tekom inkubacije med posameznimi ploščami in podobno. Take situacije bi lahko značilno vplivale na končni rezultat, če bi opazovali le absolutne vrednosti po posamezni mutanti. Kot primer situacije lahko navedem splošno spremenjeno rast vseh kolonij na eni izmed testnih ali kontrolnih plošč zaradi lokalno različne temperature v inkubatorju, ki bi brez uporabe (dvojnih) relativnih fitnesov občutno spremenila hitrost rasti sevov na pripadajoči plošči.

Kot zadnji korak analize smo izvedli oceno relevantnosti odstopanja relativnih pogojnostnih fitnessov posameznih mutant od srednje vrednosti (mediane) tega parametra vseh mutant. Tako smo za razvrstitev upoštevali le vrednosti z odstopanjem več kot enkratne vrednosti standardne deviacije (1 SD) oziroma 2 SD za strožji pogoj, kar smo izračunali neodvisno pri vsakem setu podatkov za posamezno ponovitev. Glede na razporeditev mutant v posamezno skupino (odstopanje od mediane: več kot 2 SD; med 1 in 2 SD; manj kot 1 SD) ter na pogostost pojavljanja v njej smo določili nabor pogojev (Preglednica 2), izmed katerih mora biti zadovoljen vsaj eden za določitev mutante kot občutljive ali odporne na izbrani pogoj. Skupno smo tako identificirali 285 edinstvenih mutant, ki se značilno odzovejo na enega ali oba izmed pogojev (prilogi). Mutante genov *VPH1*, *SLM3*, *YLL056C* ter *YPR170C* pa smo določili pri obeh pogojih. Pripadnost posameznega seva oziroma pripadajočega gena določeni skupini procesov smo analizirali s spletnimi orodji GO Slim Mapper (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>) ter Go Term Finder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>).

Za potrditvene teste smo uporabili določanje rastnih krivulj, meritve naraščanja števila celic v času, v tekočih gojiščih na podlagi optične gostote (OD) medija s celicami (Trecu in Winston, 2008), kar je merilec absorbance avtomatsko poročal na podlagi izmerjene absorbance pri 595 nm. Pri tej metodi kontinuirano spremljamo naraščanje koncentracijo celic v suspenziji. Le-ta se s časom zvezno spreminja in je sorazmerna hitrosti rasti celic, hitrost rasti pa je fitness seva mikroorganizma pri danih pogojih. Na ta način je metoda primerljiva z metodo merjenja volumna kolonij, ki smo jo uporabili pri presejalnem testu na trdnih gojiščih. Glede na hitrost dela, enostavnost, avtomatiziranost ter ponovljivost se je metoda izkazala za zanesljivo ter primerno za izvajanje tovrstnih poskusov, paziti pa moramo na morebitne razlike v rasti oziroma občutljivosti celic na testirane pogoje, saj se lahko biološka razpoložljivost kemikalij, v našem primeru cinka, razlikuje med trdnim ter tekočim gojiščem.

Pri ovrednotenju rezultatov moremo poudariti, da je adaptacija na skrajne biološko sprejemljive koncentracije cinka v okolju zelo zapleten celični proces in vpliva na številne biokemične poti. Tako kot osnova adaptacije na spremenjene koncentracije cinka ter

vzpostavljanja homeostaze delujejo procesi, ki zagotavljajo ustrezne koncentracije cinkovih ionov v citoplazmi, in sicer ob pomanjkanju s privzemom iz okolja ali sproščanja iz vakuole, pri prebitku cinka pa v nastopi privzem v vakuole (Eide, 2006). Tako imenovana prva linija obrambe pred cinkovim neravnovesjem skrbi le za ohranjanje citosolnega cinka v običajnih mejah za organizem in je zelo občutljiva na okvare posameznih komponent. Mutante dveh ključnih proteinov z znanimi povezavami s cinkovim stresom, proteina *Zrc1* (MacDiarmid in sod., 2003) ter *Zrt1* (Zhao in sod., 1996b), smo tako izkoristili kot kontrolne seve pri našem eksperimentu.

Skladno z zapisanim izpostavimo najprej delecijsko mutanto brez gena *VPH1*, ki je bila identificirana kot občutljiva na prebitek, kakor tudi kot odporna na pomanjkanje cinka. Produkt gena kodira podenoto  $V_0$  vakuolne ATP-aze, pravilno delovanje katere omogoča uravnavanje kislosti vakuole, ki je ključnega pomena za pravilno delovanje membranskih encimov ter posledično za uravnavanje citosolne koncentracije cinka (MacDiarmid in sod., 2002).

Ustrezno uravnavanje izražanja genov je naslednji korak celične adaptacije na spremenjene koncentracije cinka v okolju oziroma celici. Pri kvasovki *S. cerevisiae* je ta korak večinoma nadzorovan prek transkripcijskega aktivatorja *Zap1* (Zhao in Eide, 1997), ki se aktivira ob pomanjkanju cinka v citoplazmi. Protein *Zap1* tako ob pomanjkanju cinka aktivira izražanje gena *ZRT1*, ki kodira visoko afinitetni cinkov transporter (Zhao in sod., 1996b), ter gena *ZRT2*, ki kodira nizkoafinitetni membranski transporter (Zhao in sod., 1996a). Kontraindiktorno, ampak z namenom zaščite celice pred potencialnim cinkovim šokom ob nenadnem vdoru cinka, protein *Zap1* aktivira tudi izražanje gena *ZRC1*, ki nosi zapis za cinkov transporter na vakuolni membrani s funkcijo privzema cinka v vakuolo (MacDiarmid in sod., 2003). Zanimivo je, da kljub širokemu vplivu na izražanje genov ob pomanjkanju cinka, seva *zap1Δ* tekom kemijsko genomske analize nismo identificirali kot seva z značilno drugačnim odzivom na katerega izmed pogojev, čeprav bi lahko pričakovali njegovo uvrstitev med občutljive mutante pri pogoju pomanjkanje cinka.

Uravnavanje fosfolipidnega metabolizma, ki je ključna za vzdrževanje homeostaze membran, je povezano tudi s cinkom (Carman in Han, 2007), kar smo potrdili z identifikacijo seva *ino1Δ* v skupini na pomanjkanje cinka odpornih mutant (Priloga B). Z

rastnimi krivuljami pri različnih vrednostih pH ter koncentracijah inozitola smo dognali, da sev *ino1Δ* relativno dobro uspeva ob pomanjkanju inozitola ter nizkih koncentracijah cinka (Slika 14), kar lahko pripišemo povišanim koncentracijam PI, alternativnemu viru inozitola, kot posledici aktivacije proteinov Pis1 (PI sintaza) ter Dpp1 (diacilglicerol piropfosfat fosfataza) s strani transkripcijskega aktivatorja Zap1. Dodatno se ob znižanih nivojih fosfatidne kisline (PA) kot posledice delovanja proteina Dpp1 aktivira tudi protein Opi1, ki inhibira prepis genov *INO1* in *CHO1* preko negativne regulacije kompleksa Ino2/Ino4. Na ta način je cink preko aktivacije proteina Zap1 ter spremenjenim razmerjem koncentracij [PI]/[PA] posredno povezan z uravnavanjem sinteze lipidov preko produktov genov *INO1* ter *CHO1*.

Tekom analize smo odkrili številne komponente signalne poti RIM101. Ta pot ima odločilno vlogo pri poročanju o povišani vrednosti pH v okolju. Na primer, v skupini odpornih mutant na povišane koncentracije cinka smo odkrili mutante z manjkajočimi geni *RIM9*, *RIM20* ter *RIM101*. Glede na to, da je lipidni metabolizem vezan na pH vrednost v celici (Young in sod., 2010), smo izvedli poskus z določitvijo rastnih krivulj pri različnih vrednostih pH ter koncentracijah cinka. Pridobljeni rezultati za vse tri testirane delecije mutante RIM pri povišani koncentraciji cinka v okolju kažejo zelo podoben profil rasti in tako pri pH 6 vse kažejo znake odpornosti na dodani cink, kar je še bolj izpostavljeno pri pH 4 (Slika 10, Slika 11, Slika 12). Presenetljivo pa je sev *zap1Δ*, katerega smo testirali paralelno, imel zelo podoben rastni profil z delecijскими sevi RIM (Slika 13). Glede na to, da signalna pot RIM101 sodeluje pri zaznavi alkalnega okolja, zaradi precipitacije cinka nismo mogli ovrednotiti rasti pri pH 8. Ne glede na to zbrani rezultati kažejo, da imajo celične prilagoditve sprožene preko signalne poti RIM101 negativen vpliv na odpornost pri povišanih koncentracijah cinka. Za pojasnitev molekulskega mehanizma bodo potrebne nadaljnje raziskave.

Z raziskavo smo pokazali, da je cinkov stres, predvsem pomanjkanje cinka, preko aktivacije transkripcijskega aktivatorja Zap1, povezan s sintezo lipidov (Slika 14). Povezava je posredna, preko izražanja genov *PIS1* ter *DPP1* ter posledično spremenjenimi koncentracijami PI, ki uravnavajo izražanje gena *INO1*, enega ključnih encimov v sintezi lipidov.

Tako smo potrdili delovno hipotezo: Cinkov stres vpliva na procese, vključene v zagotavljanje homeostaze membran kvasovke *S. cerevisiae*.



## 6 POVZETEK

Tekom raziskave smo uspešno določili kemijsko-genomski profil za pogoj cinkovega stresa, tako za prebitek ( $ZnCl_2$ ) kot tudi za njegovo pomanjkanje. Izbrane rezultate smo potrdili z drugo metodo, in sicer z določitvijo rastnih krivulj v tekočem gojišču.

Številni geni, identificirani v kemijsko-genomskem pregledu, so razvrščeni v biološke procese, ki sodelujejo v odzivu na stresne pogoje, procese transporta, vključno z vezikularnim, ter procese uravnavanja ter organizacije membran ter organelov. To nakazuje vpliv cinkovega stresa tudi na procese, vpletene v membransko homeostazo.

Celični odzivi, sproženi prek aktivacije signalne poti RIM101, kažejo negativne vplive pri adaptaciji celice na povišane koncentracije cinka. Za določitev specifičnih mehanizmov bi bile potrebne dodatne raziskave.

Cinkov stres, predvsem pomanjkanje cinka, je povezan z regulacijo izražanja gena *INO1*, ki nosi zapis enega ključnih encimov v sintezi lipidov. Protein Ino1 je posledično reguliran prek inhibicije kompleksa Ino2/Ino4 z Opi1, kateri se sprošča kot odgovor na spremenjene koncentracije PI/PA zaradi delovanja produktov genov *PIS1* ter *DPPI*. Izražanje slednjih je aktivirano ob nizkih koncentracijah cinka prek transkripcijskega aktivatorja Zap1.

## 7 VIRI

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York, Garland Science: 1463 str.
- Alud D. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* 14, 3-4:271–313
- Amich J., Vicentefranqueira R., Leal F., Calera J.A. 2010. *Aspergillus fumigatus* Survival in Alkaline and Extreme Zinc-Limiting Environments Relies on the Induction of a Zinc Homeostasis System Encoded by the *zrfC* and *aspf2* Genes. *Eukaryotic Cell*, 9, 3: 424–437
- Andreini, C., Banci L., Bertini I., and Rosato A. 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5, 1: 196-201
- Baetz K., McHardy L., Gable K., Tarling T., Reberioux D., Bryan J., Andersen R.J., Dunn T., Hieter P., Roberge M. 2004. Yeast genome-wide drug-induced haploinsufficiency screen to determine drug mode of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 101, 13: 4525-4530
- Basta N.T., Ryan J.A., Chaney R.L. 2005. Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *Journal of Environmental Quality*, 34,1:49–63
- Bennett R.J., Noirot-Gros MF., Wang J.C. 2000. Interaction between Yeast Sgs1 Helicase and DNA Topoisomerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35: 26898-26905
- Bernstein B.E., Tong J.K. , Schreiber S.L. 2000. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 25: 13708-13
- Boysen, J. H., Mitchell A. P. 2006. Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 3: 1344–1353
- Bray T.M., Bettger W.J. 1990. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biolgy & Medicine*, 8, 3: 281-291
- Brenner C. 2004. Chemical genomics in yeast. *Genome Biology*, 5, 9: 240
- Bun-Ya M., Nishimura M., Harashima S., Oshima Y. 1991. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 6: 3229–3238

- Carman G.M., Han G.-S. 2007. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 3: 322–330
- Costello L.C., Franklin R.B. 1998. Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. *Prostate*, 35, 4: 285–296
- Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J. 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14, 6: 826–832
- Devirgiliis C., Murgia C., Danscher G., Perozzi G. 2004. Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, 1: 58–64
- Dodson G., Steiner D. 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*; 8, 2: 189-194
- Eide D.J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 7: 711-722
- Finney L.A., O'Halloran T.V. 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, 300, 5621: 931-936
- Fisk D.G., Ball C.A., Dolinski K., Engel S.R., Hong E.L., Issel-Tarver L., Schwartz K., Sethuraman A., Botstein D. 2006. The *Saccharomyces Genome Database Project*. *Saccharomyces cerevisiae S288C genome annotation: a working hypothesis*. *Yeast*, 23, 12: 857-865
- Floriańczyk B. 2007. Metallothioneins and its role in metal regulation, binding of reactive oxygen species, apoptosis and cell differentiation. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 1, 1: 16-18
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440, 3: 325-331
- Frederickson C.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J., Thompson R.B. 2000. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition*, 130, 5S Supl: 1471S-1483S
- Giaever G., Chu A.M., Ni Li, Connelly C., Riles L., Véronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., André B., Arkin A.P., Astromoff A., El Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Güldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kötter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M.,

- Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzeler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W., Johnston M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 6896: 387-391
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274, 5287: 563-567
- Haase H., Beyersmann D. 1999. Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. *Biometals*, 12, 3: 247-254
- Haase H., Beyersmann D. 2002. Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 4: 923-928
- Haber J.E. 1998. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics*, 32: 561-599
- Hahne H. C. H., Kroontje W. 1973. Significance of pH and chloride concentration on behaviour of heavy metal pollutants: mercury (II), cadmium (II), zinc (II), and lead (II). *Journal of Environmental Quality*, 2, 4: 444-450
- Hillenmeyer M.E., Fung E., Wildenhain J., Pierce S.E., Hoon S., Lee W., Proctor M., St-Onge R.P., Tyers M., Koller D., Altman R.B., Davis R.W., Nislow C., Giaever G. 2008. The chemical genomic portrait of yeast: Uncovering a phenotype for all genes. *Science*, 320, 5874: 362-365
- Hirschman J.E., Balakrishnan R., Christie K.R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Engel S.R., Fisk D.G., Hong E.L., Livstone M.S., Nash R., Park J., Oughtred R., Skrzypek M., Starr B., Theesfeld C.L., Williams J., Andrada R., Binkley G., Dong Q., Lane C., Miyasato S., Sethuraman A., Schroeder M., Thanawala M.K., Weng S., Dolinski K., Botstein D., Cherry J.M. 2006. Genome Snapshot: a new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic Acids Research*, 34 (Database issue): D442-D445
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431: 931-945

- Jensen L.T., Ajuja-Alemanji M., Culotta V.C. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 43: 42036–42040
- Jungmann J., Rayner J.C., Munro S. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10: 6579-85
- Kaferle P. 2008. Razvoj bioinformatike podpore za visoko-zmogljivostne genetske eksperimente: uporaba na primeru valprojske kisline: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Kemijo in Kemijsko Tehnologijo: 226 str.
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* 6, 2: e16015. doi:10.1371/journal.pone.0016015: 10 str.
- Karpichev I.V., Cornivelli L., Small G.M. 2002. Multiple Regulatory Roles of a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Protein, Encoded by YOL002c, in Lipid and Phosphate Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 22: 19609-19617
- Kelly E.J., Quaipe C.J., Froelick G.J., Palmiter R.D. 1996. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *The Journal of Nutrition*, 126, 7: 1782-1790
- Kucharczyk R., Rytka J. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* - a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 4:1025-1042
- Legras J.L., Merdinoglu D., Cornuet J.M., Karst F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16, 10: 2091-2102
- Lyons T.J., Gasch A.P., Gaither L.A., Botstein D., Brown P.O., Eide D.J. 2000. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 97, 14: 7957-7962
- MacDiarmid C.W., Milanick M.A., Eide D.J. 2002. Biochemical Properties of Vacuolar Zinc Transport Systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 43: 39187–39194
- MacDiarmid C.W., Milanick M.A., Eide D.J. 2003. Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 17: 15065-15072

- MacDiarmid, C.W., Gaither L.A., Eide D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Molecular Biology Organization Journal*, 19, 12: 2845-2855
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of microorganisms*. 10th ed.. Upper Saddle River, Pearson Education Inc.: 1019 str.
- Martínez C.E., Motto H.L. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, 107, 1: 153-158
- Marton M.J., Derisi J.L., Bennett H.A., Iyer V.R., Meyer M.R., Roberts C.J., Stoughton R., Burchard J., Slade D., Dai H., Bassett Jr D.E., Hartwell L.H., Brown P.O., Friend S.H. 1998. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays.. *Nature Medicine*, 4, 11: 1293-1301
- NRC - United States National Research Council, Institute of Medicine. 2000. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. National Academies Press: 442-455
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. 2000. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, 1:34-50
- Outten C.E., O'Halloran T.V. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 292, 5526: 2488-2492
- Palmiter R.D., Cole T.B., Findley S.D. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *The EMBO Journal*, 15, 8: 1784-1791
- Palmiter R.D., Findley S.D. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *The EMBO Journal*, 14, 4: 639-649
- Parsons A.B., Brost R.L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G.W., Kane P.M., Hughes T.R., Boone C. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nature Biotechnology*, 22, 1: 62-69
- Parsons A.B., Geyer R., Hughes T.R., Boone C. 2003. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Progress in Cell Cycle Research*, 5: 159-166
- Parsons A.B., Lopez A., Givoni I.E., Williams D.E., Gray C.A., Porter J., Chua G., Sopko R., Brost R.L., Ho C.H., Wang J., Ketela T., Brenner C., Brill J.A., Fernandez G.E., Lorenz T.C., Payne G.S., Ishihara S., Ohya Y., Andrews B., Hughes T.R., Frey B.J.,

- Graham T.R., Andersen R.J., Boone C. 2006. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell*, 126, 3: 611-625
- Sandrin T.R., Maier R.M. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111, 8: 1093–1101
- Shankar A.H., Prasad A.S. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 2S Supl: 447S-463S
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast, *Methods in Enzymology*, 350: 3-41
- Simm C., Lahner B., Salt D., LeFurgey A., Ingram P., Yandell B., Eide D.J. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryotic Cell*, 6, 7: 1166-1177
- Strathern J.N., Herskowitz I. 1979. Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. *Cell*, 17, 2: 371-381
- Sun S., Yang F., Tan G., Costanzo M., Oughtred R., Hirschman J., Theesfeld C.L., Bansal P., Sahni N., Yi S., Yu A., Tyagi T., Tie C., Hill D.E., Vidal M., Andrews B.J., Boone C., Dolinski K., Roth F.P. 2016. An extended set of yeast-based functional assays accurately identifies human disease mutations. *Genome research*, 6, 5: 670-680
- Treco D. A., Winston F. 2008. Growth and Manipulation of Yeast. *Current Protocols in Molecular Biology* 82:13.2.1-13.2.12
- Waters B.M., Eide D.J. 2002. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression in response to iron, zinc, and oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 37: 33749-33757
- Winzeler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Stroms R.K., Veronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., Davis R.W. 1999. Functional characterization of the *S.cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 5429: 901-906

- Wu C.Y., Bird A.J., Winge D.R., Eide D.J. 2007. Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 4: 2184-2195
- Young B.P., Shin J.J., Oriji R., Chao J.T., Li S.C., Guan X.L., Khong A., Jan E., Wenk M.R., Prinz W.A., Smits G.J., Loewen C.J. 2010. Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science*, 329, 5995: 1085-1088.
- Yuan D.S. . 2000. Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by transposon tagging. *Genetics*, 156, 1: 45-58
- Zhao H., Eide D.J. 1997. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology*, 17; 9: 5044–5052
- Zhao, H., Eide D. 1996a. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 38: 23203-23210
- Zhao, H., Eide D. 1996b. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 93, 6: 2454-2458

## **SPLETNI VIRI**

Saccharomyces Genome Deletion Project (SGDP) (jan. 2003)

URL: [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/) (15. mar. 2010)

Taxonomy browser (*Saccharomyces cerevisiae*), NCBI

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4932&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (31. maj 2016)

Wikipedia, Zinc (30.mar.2016)

URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc> (1. apr.2016)

Zackrisson M., Hallin J., Ottosson L-G., Dahl P., Fernandez-Parada E., Ländström E., Fernandez-Ricaud L., Kaferle P., Skyman A., Omholt S., Petrovič U., Warringer J., Blomberg A. Scan-o-matic: high-resolution microbial phenomics at a massive scale. 2016. bioRxiv 031443; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/031443>

URL: <http://biorxiv.org/content/early/2015/11/12/031443> (12. nov. 2015)



## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Urošu Petroviču, ker mi je omogočil nabiranje izkušenj v laboratoriju Inštituta Jožef Stefan in opravljanje diplomskega dela pod njegovim mentorstvom.

Zahvaljujem se doc. dr. Mateju Butali za temeljit pregled ter popravke diplomskega dela.

Zahvaljujem se dr. Mojci Mattiazzi Ušaj, ki me je uvajala v laboratorijsko delo, Petri Kaferle ter dr. Janezu Kokošarju za vso pomoč, napotke ter priporočila pri delu v laboratoriju. Z delom v laboratoriju sem pridobil neprecenljive izkušnje.

Hvala tudi staršema ter sestri za vso podporo ter neizmerno potrpežljivost tekom študija in nenazadnje, ker ste verjeli vame!

## PRILOGE

### PRILOGA A: Identificirane mutante – prebitek cinkovih ionov

P – potrjen ORF, N – neopredeljen ORF, D – dvomljiv ORF, T-K – odtis celic v smeri test-kontrola, K-T – odtis celic v smeri kontrola-test; \*\* - odstopanje od mediane več kot 2SD, \* - odstopanje od mediane med 1SD ter 2SD; Vrednosti T-K/1, T-K/2 ter K-T predstavljajo relativni pogojnostni fitness delecijske mutante izbranega gena določenega pri posamezni ponovitvi poizkusa, POVP. predstavlja povprečno vrednost rel. pog. fitnessov treh ponovitev poskusa.

| #  | ORF            | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|----|----------------|----------------|---------|--|---------|---------|---------|-------|
| 1  | <i>YER072W</i> | <i>VTC1</i>    | P       | transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole   | 0,03 ** | 0,04 ** | 0,03 ** | 0,03  |
| 2  | <i>YOR306C</i> | <i>MCH5</i>    | P       | transport  | 0,03 ** | 0,04 ** | 0,03 ** | 0,03  |
| 3  | <i>YIR033W</i> | <i>MGA2</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, metabolizem lipidov  | 0,02 ** | 0,04 ** | 0,04 ** | 0,04  |
| 4  | <i>YGL212W</i> | <i>VAM7</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole, organizacija veziklov   | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,03 ** | 0,04  |
| 5  | <i>YJR033C</i> | <i>RAV1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, biogeneza proteinskih kompleksov, celična homeostaza                         | 0,03 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,04  |
| 6  | <i>YPR194C</i> | <i>OPT2</i>    | P       | transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole   | 0,03 ** | 0,04 ** | 0,05 ** | 0,04  |
| 7  | <i>YOR270C</i> | <i>VPH1</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov, celična homeostaza   | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,04  |
| 8  | <i>YKL041W</i> | <i>VPS24</i>   | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija veziklov, katabolizem proteinov  | 0,04 ** | 0,04 ** | 0,05 ** | 0,04  |
| 9  | <i>YML001W</i> | <i>YPT7</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole                          | 0,04 ** | 0,06 ** | 0,03 ** | 0,04  |
| 10 | <i>YJL029C</i> | <i>VPS53</i>   | P       | transport, vezikularni transport   | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,05  |
| 11 | <i>YKL081W</i> | <i>TEF4</i>    | P       | translacija  | 0,04 ** | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,05  |
| 12 | <i>YGR092W</i> | <i>DBF2</i>    | P       | modifikacija proteinov, celična homeostaza   | 0,06 ** | 0,04 ** | 0,04 ** | 0,05  |
| 13 | <i>YOL006C</i> | <i>TOP1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, celični cikel, organizacija kromosoma, metabolizem DNK, segregacija kromosomov | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,05  |
| 14 | <i>YBR131W</i> | <i>CCZ1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija celične membrane                                | 0,06 ** | 0,06 ** | 0,03 ** | 0,05  |
| 15 | <i>YMR123W</i> | <i>PKR1</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov   | 0,04 ** | 0,06 ** | 0,06 ** | 0,05  |
| 16 | <i>YDR378C</i> | <i>LSM6</i>    | P       | metabolizem RNK, biogeneza ribosomov   | 0,05 ** | 0,07 ** | 0,05 ** | 0,05  |
| 17 | <i>YBR200W</i> | <i>BEM1</i>    | P       | odziv na kemične dražljaje, morfogeneza celičnih komponent, konjugacija  | 0,07 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,05  |
| 18 | <i>YGL081W</i> | <i>YGL081W</i> | N       | nepoznan   | 0,08 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,06  |
| 19 | <i>YGL124C</i> | <i>MON1</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,08 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,06  |
| 20 | <i>YFR019W</i> | <i>FAB1</i>    | P       | metabolizem lipidov  | 0,09 ** | 0,06 ** | 0,04 ** | 0,07  |
| 21 | <i>YMR243C</i> | <i>ZRC1</i>    | P       | transport, celična homeostaza, metabolizem aminokislin   | 0,13 ** | 0,04 ** | 0,04 ** | 0,07  |
| 22 | <i>YJL012C</i> | <i>VTC4</i>    | P       | transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole   | 0,15 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,08  |
| 23 | <i>YER123W</i> | <i>YCK3</i>    | P       | transport, vezikularni transport, modifikacija proteinov   | 0,16 ** | 0,05 ** | 0,04 ** | 0,08  |
| 24 | <i>YER111C</i> | <i>SWI4</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija   | 0,18 ** | 0,04 ** | 0,04 ** | 0,08  |
| 25 | <i>YOL088C</i> | <i>MPD2</i>    | P       | zvižanje proteinov   | 0,18 ** | 0,04 ** | 0,03 ** | 0,09  |
| 26 | <i>YAL026C</i> | <i>DRS2</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, biogeneza ribosomov                           | 0,06 ** | 0,05 ** | 0,16 ** | 0,09  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #  | ORF              | GEN              | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI   | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|----|------------------|------------------|---------|---|---------|---------|---------|-------|
| 27 | <i>YPL261C</i>   | <i>YPL261C</i>   | D       | nepoznan  | 0,19 ** | 0,06 ** | 0,04 ** | 0,10  |
| 28 | <i>YDR080W</i>   | <i>VPS4I</i>     | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, biogeneza proteinskih kompleksov, organizacija vakuole, organizacija veziklov                                      | 0,13 ** | 0,13 ** | 0,03 ** | 0,10  |
| 29 | <i>YPR173C</i>   | <i>VPS4</i>      | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, biogeneza proteinskih kompleksov, organizacija veziklov  | 0,18 ** | 0,05 ** | 0,07 ** | 0,10  |
| 30 | <i>YDR477W</i>   | <i>SNF1</i>      | P       | odziv na stres, modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov, signaliziranje, translacija, psevdohifna rast  | 0,16 ** | 0,10 ** | 0,05 ** | 0,10  |
| 31 | <i>YNL064C</i>   | <i>YDJ1</i>      | P       | transport, katabolizem proteinov, organizacija mitohondrijev, zvijanje proteinov  | 0,09 ** | 0,08 ** | 0,13 ** | 0,10  |
| 32 | <i>YOR322C</i>   | <i>LDB19</i>     | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane   | 0,03 ** | 0,05 ** | 0,23 *  | 0,11  |
| 33 | <i>YDL006W</i>   | <i>PTC1</i>      | P       | metabolizem RNK, odziv na stres, modifikacija proteinov, odziv na kemične dražljaje, signaliziranje, organizacija mitohondrijev, konjugacija  | 0,05 ** | 0,25 ** | 0,04 ** | 0,11  |
| 34 | <i>YPL179W</i>   | <i>PPQ1</i>      | P       | modifikacija proteinov, translacija   | 0,28 ** | 0,04 ** | 0,03 ** | 0,12  |
| 35 | <i>YHL025W</i>   | <i>SNF6</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, organizacija kromosoma, metabolizem DNK   | 0,21 ** | 0,06 ** | 0,09 ** | 0,12  |
| 36 | <i>YGL105W</i>   | <i>ARC1</i>      | P       | metabolizem RNK, translacija, metabolizem aminokislin   | 0,21 ** | 0,10 ** | 0,06 ** | 0,12  |
| 37 | <i>YEL031W</i>   | <i>SPF1</i>      | P       | transport, celična homeostaza   | 0,25 ** | 0,05 ** | 0,06 ** | 0,12  |
| 38 | <i>YDR173C</i>   | <i>ARG82</i>     | P       | metabolizem RNK, transkripcija, metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem lipidov, metabolizem aminokislin   | 0,26 ** | 0,07 ** | 0,05 ** | 0,12  |
| 39 | <i>YKL212W</i>   | <i>SAC1</i>      | P       | metabolizem lipidov   | 0,04 ** | 0,30 *  | 0,03 ** | 0,13  |
| 40 | <i>YLR371W</i>   | <i>ROM2</i>      | P       | transport, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija celične membrane, signaliziranje, organizacija citoskeleta, organizacija celične stene glivnega tipa, brstenje       | 0,24 ** | 0,08 ** | 0,07 ** | 0,13  |
| 41 | <i>YDR126W</i>   | <i>SWF1</i>      | P       | transport, vezikularni transport, modifikacija proteinov, organizacija celične membrane, organizacija vakuole, sporulacija - nastanek celične spore, morfogeneza celičnih komponent | 0,29 ** | 0,09 ** | 0,04 ** | 0,14  |
| 42 | <i>YOR106W</i>   | <i>VAM3</i>      | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija vakuole, organizacija veziklov  | 0,17 ** | 0,21 ** | 0,05 ** | 0,14  |
| 43 | <i>YPL161C</i>   | <i>BEM4</i>      | P       | signaliziranje, organizacija citoskeleta  | 0,05 ** | 0,39 *  | 0,04 ** | 0,16  |
| 44 | <i>YJL204C</i>   | <i>RCY1</i>      | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane   | 0,18 ** | 0,30 *  | 0,04 ** | 0,17  |
| 45 | <i>YGR022C</i>   | <i>YGR022C</i>   | D       | nepoznan  | 0,48 *  | 0,04 ** | 0,02 ** | 0,18  |
| 46 | <i>YGL020C</i>   | <i>GET1</i>      | P       | transport, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija celične membrane, odziv na kemične dražljaje, celična homeostaza, organizacija mitohondrijev                         | 0,04 ** | 0,46 *  | 0,04 ** | 0,18  |
| 47 | <i>YER119C-A</i> | <i>YER119C-A</i> | D       | nepoznan  | 0,07 ** | 0,06 ** | 0,41 *  | 0,18  |
| 48 | <i>YOL090W</i>   | <i>MSH2</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, celični cikel, metabolizem DNK, mejoza  | 0,10 ** | 0,42 *  | 0,04 ** | 0,19  |
| 49 | <i>YLR268W</i>   | <i>SEC22</i>     | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija veziklov  | 0,26 ** | 0,06 ** | 0,25 *  | 0,19  |
| 50 | <i>YOR245C</i>   | <i>DGA1</i>      | P       | metabolizem lipidov   | 0,44 ** | 0,09 ** | 0,04 ** | 0,19  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #  | ORF            | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|----|----------------|----------------|---------|--|---------|---------|---------|-------|
| 51 | <i>YDR271C</i> | <i>YDR271C</i> | D       | nepoznan   | 0,16 ** | 0,37 *  | 0,06 ** | 0,20  |
| 52 | <i>YJR044C</i> | <i>VPS55</i>   | P       | transport, vezikularni transport   | 0,49 *  | 0,05 ** | 0,05 ** | 0,20  |
| 53 | <i>YDL077C</i> | <i>VAM6</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, biogeneza proteinskih kompleksov, organizacija vakuole, organizacija veziklov           | 0,18 ** | 0,21 ** | 0,21 *  | 0,20  |
| 54 | <i>YDR269C</i> | <i>YDR269C</i> | D       | nepoznan   | 0,24 ** | 0,31 *  | 0,05 ** | 0,20  |
| 55 | <i>YJL124C</i> | <i>LSM1</i>    | P       | metabolizem RNK  | 0,27 ** | 0,30 *  | 0,04 ** | 0,20  |
| 56 | <i>YFL054C</i> | <i>YFL054C</i> | N       | transport  | 0,39 ** | 0,18 ** | 0,06 ** | 0,21  |
| 57 | <i>YDR162C</i> | <i>NBP2</i>    | P       | odziv na stres   | 0,23 ** | 0,36 *  | 0,04 ** | 0,21  |
| 58 | <i>YJR034W</i> | <i>PET191</i>  | P       | biogeneza proteinskih kompleksov, organizacija mitohondrijev   | 0,28 ** | 0,32 *  | 0,04 ** | 0,21  |
| 59 | <i>YOR070C</i> | <i>GYP1</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,05 ** | 0,52 *  | 0,08 ** | 0,22  |
| 60 | <i>YDR245W</i> | <i>MNN10</i>   | P       | modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov, citokineza  | 0,20 ** | 0,40 *  | 0,05 ** | 0,22  |
| 61 | <i>YER156C</i> | <i>YER156C</i> | N       | nepoznan   | 0,16 ** | 0,05 ** | 0,45 *  | 0,22  |
| 62 | <i>YJL165C</i> | <i>HAL5</i>    | P       | modifikacija proteinov, celična homeostaza   | 0,39 ** | 0,24 ** | 0,03 ** | 0,22  |
| 63 | <i>YEL003W</i> | <i>GIM4</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov   | 0,34 ** | 0,32 *  | 0,03 ** | 0,23  |
| 64 | <i>YMR003W</i> | <i>YMR003W</i> | N       | nepoznan   | 0,61 *  | 0,06 ** | 0,04 ** | 0,23  |
| 65 | <i>YHR079C</i> | <i>IRE1</i>    | P       | odziv na stres, modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov, odziv na kemične, signaliziranje, organizacija celične stene glivnega tipa      | 0,34 ** | 0,05 ** | 0,32 *  | 0,24  |
| 66 | <i>YKLI17W</i> | <i>SBA1</i>    | P       | organizacija kromosoma, metabolizem DNK, zvijanje proteinov  | 0,41 ** | 0,06 ** | 0,25 *  | 0,24  |
| 67 | <i>YGLI48W</i> | <i>ARO2</i>    | P       | metabolizem aminokislin, metabolizem aromatskih spojin   | 0,22 ** | 0,46 *  | 0,04 ** | 0,24  |
| 68 | <i>YPR051W</i> | <i>MAK3</i>    | P       | modifikacija proteinov   | 0,56 *  | 0,09 ** | 0,08 ** | 0,24  |
| 69 | <i>YJL117W</i> | <i>PHO86</i>   | P       | transport, vezikularni transport, zvijanje proteinov   | 0,19 ** | 0,04 ** | 0,51 *  | 0,25  |
| 70 | <i>YPR030W</i> | <i>CSR2</i>    | P       | transport, metabolizem RNK, vezikularni transport, transkripcija, organizacija celične membrane, organizacija celične stene glivnega tipa                | 0,62 *  | 0,06 ** | 0,06 ** | 0,25  |
| 71 | <i>YMR202W</i> | <i>ERG2</i>    | P       | drugo  | 0,20 ** | 0,31 *  | 0,24 *  | 0,25  |
| 72 | <i>YFL032W</i> | <i>YFL032W</i> | D       | nepoznan   | 0,23 ** | 0,04 ** | 0,50 *  | 0,26  |
| 73 | <i>YML008C</i> | <i>ERG6</i>    | P       | drugo  | 0,40 ** | 0,08 ** | 0,32 *  | 0,26  |
| 74 | <i>YML104C</i> | <i>MDM1</i>    | P       | organizacija mitohondrijev   | 0,44 ** | 0,31 *  | 0,04 ** | 0,26  |
| 75 | <i>YML013W</i> | <i>UBX2</i>    | P       | transport, katabolizem proteinov   | 0,26 ** | 0,32 *  | 0,23 *  | 0,27  |
| 76 | <i>YGL252C</i> | <i>RTG2</i>    | P       | organizacija kromosoma, signaliziranje   | 0,46 ** | 0,04 ** | 0,31 *  | 0,27  |
| 77 | <i>YER155C</i> | <i>BEM2</i>    | P       | signaliziranje, organizacija citoskeleta, organizacija celične stene glivnega tipa, brstenje   | 0,45 ** | 0,05 ** | 0,34 *  | 0,28  |
| 78 | <i>YJL053W</i> | <i>PEP8</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,34 ** | 0,46 *  | 0,04 ** | 0,28  |
| 79 | <i>YDR108W</i> | <i>GSG1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija celične membrane, celični cikel, organizacija veziklov, mejoza, organizacija peroksisomov | 0,45 ** | 0,06 ** | 0,36 *  | 0,29  |
| 80 | <i>YDR089W</i> | <i>YDR089W</i> | N       | organizacija celične membrane  | 0,24 ** | 0,37 *  | 0,27 *  | 0,29  |
| 81 | <i>YHR108W</i> | <i>GGA2</i>    | P       | transport, vezikularni transport, katabolizem proteinov  | 0,35 ** | 0,05 ** | 0,51 *  | 0,30  |
| 82 | <i>YPR170C</i> | <i>YPR170C</i> | D       | nepoznan   | 0,55 *  | 0,34 *  | 0,03 ** | 0,31  |
| 83 | <i>YDR260C</i> | <i>SWMI</i>    | P       | modifikacija proteinov, celični cikel, katabolizem proteinov, sporulacija - nastanek celične spore, morfogeneza  | 0,48 *  | 0,26 ** | 0,20 *  | 0,31  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF            | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI   | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|-----|----------------|----------------|---------|---|---------|---------|---------|-------|
|     |                |                |         | celičnih komponent  |         |         |         |       |
| 84  | <i>YGL147C</i> | <i>RPL9A</i>   | P       | translacija   | 0,49 *  | 0,25 ** | 0,22 *  | 0,32  |
| 85  | <i>YLR334C</i> | <i>YLR334C</i> | D       | nepoznan  | 0,63 *  | 0,05 ** | 0,28 *  | 0,32  |
| 86  | <i>YML062C</i> | <i>MFT1</i>    | P       | transport, metabolizem RNK, transkripcija, metabolizem DNK  | 0,58 *  | 0,37 *  | 0,03 ** | 0,33  |
| 87  | <i>YDR431W</i> | <i>YDR431W</i> | D       | nepoznan  | 0,66 *  | 0,26 ** | 0,07 ** | 0,33  |
| 88  | <i>YPL100W</i> | <i>ATG21</i>   | P       | transport, odziv na stres, modifikacija proteinov, organizacija celične membrane, organizacija veziklov                           | 0,50 *  | 0,44 *  | 0,05 ** | 0,33  |
| 89  | <i>YJL154C</i> | <i>VPS35</i>   | P       | transport, vezikularni transport  | 0,42 ** | 0,37 *  | 0,21 *  | 0,33  |
| 90  | <i>YPR160W</i> | <i>GPH1</i>    | P       | metabolizem ogljikovih hidratov, generiranje prekuzorskih metabolitov in energije   | 0,39 ** | 0,31 *  | 0,31 *  | 0,34  |
| 91  | <i>YCL063W</i> | <i>VAC17</i>   | P       | organizacija vakuole  | 0,44 ** | 0,54 *  | 0,04 ** | 0,34  |
| 92  | <i>YOL129W</i> | <i>VPS68</i>   | P       | transport, vezikularni transport  | 0,37 ** | 0,60 *  | 0,06 ** | 0,34  |
| 93  | <i>YOL018C</i> | <i>TLG2</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija veziklov, metabolizem lipidov                       | 0,28 ** | 0,40 *  | 0,39 *  | 0,36  |
| 94  | <i>YOR209C</i> | <i>NPT1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem kofaktorjev, metabolizem vitaminov                | 0,48 *  | 0,05 ** | 0,55 *  | 0,36  |
| 95  | <i>YPR050C</i> | <i>YPR050C</i> | D       | nepoznan  | 0,68 *  | 0,33 *  | 0,06 ** | 0,36  |
| 96  | <i>YPR197C</i> | <i>YPR197C</i> | D       | nepoznan  | 0,51 *  | 0,31 *  | 0,26 *  | 0,36  |
| 97  | <i>YDR508C</i> | <i>GNP1</i>    | P       | transport   | 0,70 *  | 0,31 *  | 0,07 ** | 0,36  |
| 98  | <i>YML097C</i> | <i>VPS9</i>    | P       | transport, organizacija vakuole   | 0,41 ** | 0,39 *  | 0,29 *  | 0,37  |
| 99  | <i>YJL004C</i> | <i>SYS1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija veziklov   | 0,39 ** | 0,35 *  | 0,36 *  | 0,37  |
| 100 | <i>YML038C</i> | <i>YMD8</i>    | P       | transport   | 0,42 ** | 0,28 *  | 0,40 *  | 0,37  |
| 101 | <i>YPR064W</i> | <i>YPR064W</i> | D       | nepoznan  | 0,55 *  | 0,51 *  | 0,04 ** | 0,37  |
| 102 | <i>YPR148C</i> | <i>YPR148C</i> | P       | nepoznan  | 0,53 *  | 0,25 ** | 0,32 *  | 0,37  |
| 103 | <i>YGL054C</i> | <i>ERV14</i>   | P       | transport, vezikularni transport, celični cikel, sporulacija - nastanek celične spore, citokineza, brstenje                       | 0,05 ** | 0,53 *  | 0,53 *  | 0,37  |
| 104 | <i>YPL070W</i> | <i>MUK1</i>    | P       | nepoznan  | 0,59 *  | 0,04 ** | 0,51 *  | 0,38  |
| 105 | <i>YFL036W</i> | <i>RPO41</i>   | P       | metabolizem RNK, transkripcija, organizacija mitohondrijev, generiranje prekuzorskih metabolitov in energije, celična respiracija | 0,63 *  | 0,14 ** | 0,38 *  | 0,38  |
| 106 | <i>YNL153C</i> | <i>GIM3</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov  | 0,59 *  | 0,52 *  | 0,05 ** | 0,38  |
| 107 | <i>YDR500C</i> | <i>RPL37B</i>  | P       | translacija   | 0,70 *  | 0,05 ** | 0,41 *  | 0,39  |
| 108 | <i>YJR040W</i> | <i>GEF1</i>    | P       | celična homeostaza  | 0,37 ** | 0,29 *  | 0,52 *  | 0,40  |
| 109 | <i>YER179W</i> | <i>DMC1</i>    | P       | celični cikel, metabolizem DNK, mejoza  | 0,69 *  | 0,05 ** | 0,46 *  | 0,40  |
| 110 | <i>YGL251C</i> | <i>HFMI</i>    | P       | celični cikel, organizacija kromosoma, metabolizem DNK, mejoza  | 0,40 ** | 0,43 *  | 0,37 *  | 0,40  |
| 111 | <i>YPL180W</i> | <i>TCO89</i>   | P       | odziv na stres, metabolizem ogljikovih hidratov, signaliziranje, organizacija celične stene glivnega tipa                         | 0,63 *  | 0,34 *  | 0,25 *  | 0,41  |
| 112 | <i>YER145C</i> | <i>FTR1</i>    | P       | transport, celična homeostaza   | 0,57 *  | 0,27 *  | 0,39 *  | 0,41  |
| 113 | <i>YLR386W</i> | <i>VAC14</i>   | P       | metabolizem lipidov   | 0,52 *  | 0,49 *  | 0,23 *  | 0,41  |
| 114 | <i>YDR414C</i> | <i>ERD1</i>    | P       | modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov   | 0,57 *  | 0,41 *  | 0,27 *  | 0,42  |
| 115 | <i>YPR096C</i> | <i>YPR096C</i> | P       | nepoznan  | 0,63 *  | 0,36 *  | 0,26 *  | 0,42  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF              | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|-----|------------------|----------------|---------|--|---------|---------|---------|-------|
| 116 | <i>YLR261C</i>   | <i>VPS63</i>   | D       | transport  | 0,39 ** | 0,48 *  | 0,38 *  | 0,42  |
| 117 | <i>YCL062W</i>   | <i>YCL062W</i> | N       | neanotirano; ORF je del YCL063W (VAC17)  | 0,53 *  | 0,57 *  | 0,16 ** | 0,42  |
| 118 | <i>YDR354W</i>   | <i>TRP4</i>    | P       | metabolizem aminokislin, metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem aromatskih spojin   | 0,46 ** | 0,44 *  | 0,36 *  | 0,42  |
| 119 | <i>YNL296W</i>   | <i>YNL296W</i> | D       | metabolizem RNK, transkripcija, sporulacija - nastanek celične spore   | 0,61 *  | 0,46 *  | 0,20 *  | 0,42  |
| 120 | <i>YDR202C</i>   | <i>RAV2</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov, celična homeostaza   | 0,30 ** | 0,45 *  | 0,54 *  | 0,43  |
| 121 | <i>YDR165W</i>   | <i>TRM82</i>   | P       | metabolizem RNK  | 0,47 *  | 0,46 *  | 0,36 *  | 0,43  |
| 122 | <i>YGL109W</i>   | <i>YGL109W</i> | D       | nepoznan   | 0,55 *  | 0,34 *  | 0,41 *  | 0,43  |
| 123 | <i>YIL040W</i>   | <i>APQ12</i>   | P       | transport, organizacija celične membrane, metabolizem lipidov, organizacija jedra  | 0,70 *  | 0,40 *  | 0,21 *  | 0,44  |
| 124 | <i>YJL121C</i>   | <i>RPE1</i>    | P       | metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem kofaktorjev   | 0,46 ** | 0,52 *  | 0,36 *  | 0,44  |
| 125 | <i>YJR025C</i>   | <i>BNA1</i>    | P       | metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem kofaktorjev, metabolizem vitaminov   | 0,55 *  | 0,33 *  | 0,47 *  | 0,45  |
| 126 | <i>YPL051W</i>   | <i>ARL3</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,48 *  | 0,39 *  | 0,48 *  | 0,45  |
| 127 | <i>YKR001C</i>   | <i>VPS1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, organizacija citoskeleta, organizacija peroksisomov   | 0,48 *  | 0,52 *  | 0,37 *  | 0,46  |
| 128 | <i>YDR203W</i>   | <i>YDR203W</i> | D       | nepoznan   | 0,45 ** | 0,40 *  | 0,54 *  | 0,46  |
| 129 | <i>YPR126C</i>   | <i>YPR126C</i> | D       | nepoznan   | 0,65 *  | 0,31 *  | 0,43 *  | 0,46  |
| 130 | <i>YJL042W</i>   | <i>MHP1</i>    | P       | organizacija citoskeleta, organizacija celične stene glivnega tipa   | 0,66 *  | 0,37 *  | 0,38 *  | 0,47  |
| 131 | <i>YBR164C</i>   | <i>ARL1</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,52 *  | 0,51 *  | 0,38 *  | 0,47  |
| 132 | <i>YLR039C</i>   | <i>RIC1</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,34 ** | 0,61 *  | 0,45 *  | 0,47  |
| 133 | <i>YBL094C</i>   | <i>YBL094C</i> | D       | nepoznan   | 0,59 *  | 0,57 *  | 0,27 *  | 0,48  |
| 134 | <i>YNL299W</i>   | <i>TRF5</i>    | P       | metabolizem RNK  | 0,72 *  | 0,43 *  | 0,29 *  | 0,48  |
| 135 | <i>YDL232W</i>   | <i>OST4</i>    | P       | modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov  | 0,55 *  | 0,60 *  | 0,29 *  | 0,48  |
| 136 | <i>YFL049W</i>   | <i>SWP82</i>   | P       | transkripcija, organizacija kromosoma, katabolizem proteinov   | 0,66 *  | 0,25 ** | 0,54 *  | 0,48  |
| 137 | <i>YCR077C</i>   | <i>PAT1</i>    | P       | metabolizem RNK, translacija, segregacija kromosomov   | 0,72 *  | 0,34 *  | 0,40 *  | 0,48  |
| 138 | <i>YCR024C-A</i> | <i>PMP1</i>    | P       | transport  | 0,66 *  | 0,52 *  | 0,29 *  | 0,49  |
| 139 | <i>YDR158W</i>   | <i>HOM2</i>    | P       | metabolizem aminokislin  | 0,61 *  | 0,34 *  | 0,52 *  | 0,49  |
| 140 | <i>YGR108W</i>   | <i>CLB1</i>    | P       | celični cikel, organizacija citoskeleta, mejoza  | 0,66 *  | 0,39 *  | 0,45 *  | 0,50  |
| 141 | <i>YGL253W</i>   | <i>HXK2</i>    | P       | transport, metabolizem RNK, transkripcija, metabolizem ogljikovih hidratov, odziv na kemične dražljaje, generiranje prekuzorskih metabolitov in energije                                   | 0,48 *  | 0,56 *  | 0,47 *  | 0,50  |
| 142 | <i>YJL214W</i>   | <i>HXT8</i>    | P       | transport  | 0,60 *  | 0,53 *  | 0,39 *  | 0,50  |
| 143 | <i>YKR042W</i>   | <i>UTH1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, organizacija kromosoma   | 0,66 *  | 0,46 *  | 0,40 *  | 0,50  |
| 144 | <i>YOR085W</i>   | <i>OST3</i>    | P       | modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov, biogeneza proteinskih kompleksov  | 0,45 ** | 0,03 ** | 1,05    | 0,51  |
| 145 | <i>YGR141W</i>   | <i>VPS62</i>   | P       | transport  | 0,70 *  | 0,38 *  | 0,46 *  | 0,51  |
| 146 | <i>YKL048C</i>   | <i>ELM1</i>    | P       | odziv na stres, modifikacija proteinov, celični cikel, metabolizem ogljikovih hidratov, odziv na kemične dražljaje, citokineza, morfogeneza celičnih komponent, psevdohifna rast, brstenje | 0,42 ** | 0,24 ** | 0,88    | 0,51  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF              | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|-----|------------------|----------------|---------|--|---------|---------|---------|-------|
| 147 | <i>YPL260W</i>   | <i>YPL260W</i> | N       | nepoznan   | 0,69 *  | 0,50 *  | 0,37 *  | 0,52  |
| 148 | <i>YKR035W-A</i> | <i>DID2</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,61 *  | 0,50 *  | 0,45 *  | 0,52  |
| 149 | <i>YIL090W</i>   | <i>ICE2</i>    | P       | drugo  | 0,65 *  | 0,54 *  | 0,38 *  | 0,52  |
| 150 | <i>YPL041C</i>   | <i>YPL041C</i> | N       | nepoznan   | 0,70 *  | 0,46 *  | 0,42 *  | 0,53  |
| 151 | <i>YIL103W</i>   | <i>DPH1</i>    | P       | modifikacija proteinov   | 0,56 *  | 0,56 *  | 0,54 *  | 0,55  |
| 152 | <i>YCR027C</i>   | <i>RHB1</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,51 *  | 0,60 *  | 0,55 *  | 0,56  |
| 153 | <i>YIL025C</i>   | <i>YIL025C</i> | D       | nepoznan   | 0,66 *  | 0,45 *  | 0,57 *  | 0,56  |
| 154 | <i>YLL029W</i>   | <i>FRA1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na kemične dražljaje   | 0,67 *  | 0,48 *  | 0,54 *  | 0,56  |
| 155 | <i>YMR209C</i>   | <i>YMR209C</i> | N       | nepoznan   | 0,62 *  | 0,61 *  | 0,48 *  | 0,57  |
| 156 | <i>YDR072C</i>   | <i>IPT1</i>    | P       | metabolizem lipidov  | 0,71 *  | 0,49 *  | 0,51 *  | 0,57  |
| 157 | <i>YJR053W</i>   | <i>BFA1</i>    | P       | celični cikel  | 0,68 *  | 0,49 *  | 0,55 *  | 0,57  |
| 158 | <i>YMR175W</i>   | <i>SIP18</i>   | P       | nepoznan   | 0,67 *  | 0,58 *  | 0,49 *  | 0,58  |
| 159 | <i>YBR298C</i>   | <i>MAL31</i>   | P       | transport  | 0,66 *  | 0,60 *  | 0,50 *  | 0,59  |
| 160 | <i>YML071C</i>   | <i>COG8</i>    | P       | transport, vezikularni transport   | 0,63 *  | 0,58 *  | 0,58 *  | 0,60  |
| 161 | <i>YJR075W</i>   | <i>HOC1</i>    | P       | metabolizem ogljikovih hidratov  | 0,68 *  | 0,58 *  | 0,54 *  | 0,60  |
| 162 | <i>YOL004W</i>   | <i>SIN3</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, modifikacija proteinov, celični cikel, organizacija kromosoma, metabolizem DNK   | 2,75 ** | 2,52 ** | 3,32 ** | 2,86  |
| 163 | <i>YNL054W</i>   | <i>VAC7</i>    | P       | metabolizem lipidov  | 2,04 ** | 3,42 ** | 2,67 ** | 2,71  |
| 164 | <i>YFL023W</i>   | <i>BUD27</i>   | P       | translacija  | 2,42 ** | 2,05 ** | 3,66 ** | 2,71  |
| 165 | <i>YOR078W</i>   | <i>BUD21</i>   | P       | metabolizem RNK, biogeneza ribosomov   | 1,70 ** | 1,53 *  | 4,77 ** | 2,67  |
| 166 | <i>YHR185C</i>   | <i>PFS1</i>    | P       | sporulacija - nastanek celične spore, morfogeneza celičnih komponent   | 2,01 ** | 3,49 ** | 2,11 ** | 2,54  |
| 167 | <i>YLR035C</i>   | <i>MLH2</i>    | P       | odziv na stres, celični cikel, metabolizem DNK, meja   | 1,81 ** | 2,80 ** | 2,71 ** | 2,44  |
| 168 | <i>YLR373C</i>   | <i>VID22</i>   | P       | katabolizem proteinov  | 1,70 ** | 2,42 ** | 3,05 ** | 2,39  |
| 169 | <i>YCR063W</i>   | <i>BUD31</i>   | P       | metabolizem RNK, celični cikel, citokineza   | 1,94 ** | 2,44 ** | 2,75 ** | 2,38  |
| 170 | <i>YBR105C</i>   | <i>VID24</i>   | P       | transport, vezikularni transport, organizacija celične membrane, metabolizem ogljikovih hidratov, organizacija vakuole, organizacija veziklov, katabolizem proteinov                           | 2,53 ** | 2,64 ** | 1,82 *  | 2,33  |
| 171 | <i>YOR061W</i>   | <i>CKA2</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, modifikacija proteinov   | 2,19 ** | 2,58 ** | 2,12 ** | 2,30  |
| 172 | <i>YBR095C</i>   | <i>RXT2</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma, konjugacija  | 1,78 ** | 2,14 ** | 2,92 ** | 2,28  |
| 173 | <i>YOR008C</i>   | <i>SLG1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija celične membrane, signaliziranje, organizacija citoskeleta, organizacija celične stene glivnega tipa, organizacija peroksisomov | 2,57 ** | 1,74 ** | 2,16 ** | 2,16  |
| 174 | <i>YER118C</i>   | <i>SHO1</i>    | P       | odziv na stres, signaliziranje, pseudohifna rast   | 2,11 ** | 2,22 ** | 2,11 ** | 2,15  |
| 175 | <i>YJR009C</i>   | <i>TDH2</i>    | P       | metabolizem ogljikovih hidratov, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije   | 1,66 ** | 2,09 ** | 2,64 ** | 2,13  |
| 176 | <i>YOL111C</i>   | <i>MDY2</i>    | P       | transport, organizacija celične membrane, odziv na kemične dražljaje, morfogeneza celičnih komponent, konjugacija  | 2,22 ** | 1,67 ** | 2,49 ** | 2,13  |
| 177 | <i>YDR330W</i>   | <i>UBX5</i>    | P       | katabolizem proteinov  | 1,82 ** | 2,26 ** | 2,24 ** | 2,11  |
| 178 | <i>YOR118W</i>   | <i>RTC5</i>    | P       | nepoznan   | 1,73 ** | 1,94 ** | 2,65 ** | 2,11  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF              | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|-----|------------------|----------------|---------|--|---------|---------|---------|-------|
| 179 | <i>YAL013W</i>   | <i>DEP1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma, metabolizem DNK, metabolizem lipidov | 2,51 ** | 2,20 ** | 1,60 *  | 2,10  |
| 180 | <i>YJL159W</i>   | <i>HSP150</i>  | P       | organizacija celične stene glivnega tipa   | 1,45 *  | 2,35 ** | 2,47 ** | 2,09  |
| 181 | <i>YBR126C</i>   | <i>TPS1</i>    | P       | odziv na stres, metabolizem ogljikovih hidratov  | 2,15 ** | 2,21 ** | 1,88 ** | 2,08  |
| 182 | <i>YOL016C</i>   | <i>CMK2</i>    | P       | modifikacija proteinov, signaliziranje   | 1,76 ** | 1,72 ** | 2,70 ** | 2,06  |
| 183 | <i>YBR147W</i>   | <i>RTC2</i>    | P       | nepoznan   | 2,04 ** | 2,40 ** | 1,71 *  | 2,05  |
| 184 | <i>YOR128C</i>   | <i>ADE2</i>    | P       | metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem aromatskih spojin  | 1,43 *  | 2,16 ** | 2,44 ** | 2,01  |
| 185 | <i>YOL007C</i>   | <i>CSI2</i>    | P       | nepoznan   | 1,25 *  | 1,97 ** | 2,78 ** | 2,00  |
| 186 | <i>YNL070W</i>   | <i>TOM7</i>    | P       | transport, organizacija celične membrane, organizacija mitohondrijev   | 1,81 ** | 1,92 ** | 2,20 ** | 1,98  |
| 187 | <i>YAL048C</i>   | <i>GEM1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, organizacija mitohondrijev   | 1,45 *  | 2,58 ** | 1,83 *  | 1,95  |
| 188 | <i>YNL145W</i>   | <i>MFA2</i>    | P       | odziv na kemične dražljaje, signaliziranje, konjugacija  | 1,56 ** | 1,81 ** | 2,40 ** | 1,93  |
| 189 | <i>YDR363W-A</i> | <i>SEM1</i>    | P       | transport, vezikularni transport, celični cikel, biogeneza proteinskih kompleksov, katabolizem proteinov             | 1,48 ** | 1,81 ** | 2,27 ** | 1,85  |
| 190 | <i>YOR082C</i>   | <i>YOR082C</i> | D       | nepoznan   | 1,57 ** | 1,60 *  | 2,34 ** | 1,84  |
| 191 | <i>YDR359C</i>   | <i>EAF1</i>    | P       | odziv na stres, organizacija kromosoma, metabolizem DNK, biogeneza proteinskih kompleksov                            | 1,88 ** | 1,86 ** | 1,72 *  | 1,82  |
| 192 | <i>YLR372W</i>   | <i>SUR4</i>    | P       | transport, vezikularni transport, metabolizem lipidov  | 1,33 *  | 1,44 *  | 2,56 ** | 1,78  |
| 193 | <i>YBL061C</i>   | <i>SKT5</i>    | P       | odziv na stres, metabolizem ogljikovih hidratov, citokineza  | 1,74 ** | 1,94 ** | 1,65 *  | 1,77  |
| 194 | <i>YNL311C</i>   | <i>YNL311C</i> | P       | katabolizem proteinov, metabolizem aminokislin   | 1,71 ** | 1,58 *  | 1,99 ** | 1,76  |
| 195 | <i>YHR041C</i>   | <i>SRB2</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na kemične dražljaje   | 1,71 ** | 1,85 ** | 1,72 *  | 1,76  |
| 196 | <i>YHR152W</i>   | <i>SPO12</i>   | P       | celični cikel, mejoza  | 1,28 *  | 2,26 ** | 1,73 *  | 1,76  |
| 197 | <i>YLR185W</i>   | <i>RPL37A</i>  | P       | translacija  | 1,49 ** | 1,42 *  | 2,32 ** | 1,74  |
| 198 | <i>YFR055W</i>   | <i>IRC7</i>    | N       | metabolizem DNK, celična homeostaza  | 1,55 ** | 1,57 *  | 2,09 ** | 1,74  |
| 199 | <i>YER129W</i>   | <i>SAK1</i>    | P       | modifikacija proteinov, metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem DNK   | 1,39 *  | 1,95 ** | 1,87 ** | 1,74  |
| 200 | <i>YNL226W</i>   | <i>YNL226W</i> | D       | drugo  | 1,38 *  | 1,83 ** | 1,99 ** | 1,73  |
| 201 | <i>YOR172W</i>   | <i>YRM1</i>    | P       | transport, metabolizem RNK, transkripcija, odziv na kemične dražljaje  | 1,81 ** | 1,36 *  | 2,01 ** | 1,73  |
| 202 | <i>YBR144C</i>   | <i>YBR144C</i> | D       | nepoznan   | 1,56 ** | 1,78 ** | 1,79 *  | 1,71  |
| 203 | <i>YGR122W</i>   | <i>YGR122W</i> | N       | metabolizem RNK, transkripcija   | 1,42 *  | 1,64 *  | 2,05 ** | 1,70  |
| 204 | <i>YMR044W</i>   | <i>IOC4</i>    | P       | organizacija kromosoma   | 1,65 ** | 1,85 ** | 1,59 *  | 1,70  |
| 205 | <i>YDR156W</i>   | <i>RPA14</i>   | P       | metabolizem RNK, transkripcija   | 1,36 *  | 1,40 *  | 2,32 ** | 1,70  |
| 206 | <i>YIL101C</i>   | <i>XBP1</i>    | P       | odziv na stres   | 1,24 *  | 1,97 ** | 1,88 ** | 1,69  |
| 207 | <i>YEL033W</i>   | <i>MTC7</i>    | D       | nepoznan   | 1,57 ** | 1,76 ** | 1,74 *  | 1,69  |
| 208 | <i>YLR418C</i>   | <i>CDC73</i>   | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma, metabolizem DNK                      | 1,28 *  | 2,06 ** | 1,73 *  | 1,69  |
| 209 | <i>YNL101W</i>   | <i>AVT4</i>    | P       | transport  | 1,23 *  | 1,74 ** | 2,07 ** | 1,68  |
| 210 | <i>YIL035C</i>   | <i>CKA1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, modifikacija proteinov   | 1,51 ** | 1,66 *  | 1,85 *  | 1,67  |
| 211 | <i>YNR031C</i>   | <i>SSK2</i>    | P       | odziv na stres, modifikacija proteinov, signaliziranje, organizacija citoskeleta                                     | 1,62 ** | 1,42 *  | 1,97 ** | 1,67  |
| 212 | <i>YDR435C</i>   | <i>PPM1</i>    | P       | modifikacija proteinov, biogeneza proteinskih kompleksov   | 1,41 *  | 1,72 ** | 1,88 ** | 1,67  |
| 213 | <i>YCR028C-A</i> | <i>RIM1</i>    | P       | metabolizem DNK, organizacija mitohondrijev  | 1,93 ** | 1,34 *  | 1,73 *  | 1,67  |

se nadaljuje...



... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF              | GEN              | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI   | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|-----|------------------|------------------|---------|---|---------|---------|---------|-------|
| 214 | <i>YPR070W</i>   | <i>MED1</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija  | 1,55 ** | 1,65 *  | 1,79 *  | 1,66  |
| 215 | <i>YBR095C</i>   | <i>RXT2</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma, konjugacija   | 1,52 ** | 2,12 ** | 1,33    | 1,66  |
| 216 | <i>YMR039C</i>   | <i>SUB1</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres  | 1,48 ** | 1,83 ** | 1,64 *  | 1,65  |
| 217 | <i>YOR167C</i>   | <i>RPS28A</i>    | P       | transport, translacija, biogeneza ribosomov   | 1,38 *  | 1,46 *  | 2,10 ** | 1,65  |
| 218 | <i>YOR141C</i>   | <i>ARP8</i>      | P       | odziv na stres, organizacija kromosoma, metabolizem DNK   | 1,77 ** | 1,54 *  | 1,64 *  | 1,65  |
| 219 | <i>YEL030W</i>   | <i>ECM10</i>     | P       | transport, organizacija mitohondrijev, zvižanje proteinov   | 1,37 *  | 1,91 ** | 1,63 *  | 1,64  |
| 220 | <i>YOR193W</i>   | <i>PEX27</i>     | P       | organizacija peroksisomov   | 1,42 *  | 1,33 *  | 2,16 ** | 1,64  |
| 221 | <i>YLR055C</i>   | <i>SPT8</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma  | 1,48 ** | 1,55 *  | 1,86 ** | 1,63  |
| 222 | <i>YOR293W</i>   | <i>RPS10A</i>    | P       | transport, translacija, biogeneza ribosomov   | 1,51 ** | 1,82 ** | 1,56 *  | 1,63  |
| 223 | <i>YOR030W</i>   | <i>DFG16</i>     | P       | pseudohifna rast  | 1,51 ** | 1,33 *  | 2,04 ** | 1,63  |
| 224 | <i>YDL033C</i>   | <i>SLM3</i>      | P       | metabolizem RNK, metabolizem heterocikličnih spojin   | 1,66 ** | 1,39 *  | 1,82 *  | 1,62  |
| 225 | <i>YPL181W</i>   | <i>CTI6</i>      | P       | transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma, metabolizem DNK  | 2,07 ** | 1,35 *  | 1,45 *  | 1,62  |
| 226 | <i>YCL050C</i>   | <i>APA1</i>      | P       | drugo   | 1,57 ** | 1,42 *  | 1,81 *  | 1,60  |
| 227 | <i>YDR380W</i>   | <i>ARO10</i>     | P       | metabolizem aminokislin, metabolizem heterocikličnih spojin, metabolizem aromatskih spojin  | 1,26 *  | 1,41 *  | 2,12 ** | 1,60  |
| 228 | <i>YGR189C</i>   | <i>CRH1</i>      | P       | organizacija celične stene glivnega tipa  | 1,91 ** | 1,42 *  | 1,48 *  | 1,60  |
| 229 | <i>YOL107W</i>   | <i>YOL107W</i>   | N       | nepoznan  | 1,39 *  | 1,34 *  | 2,05 ** | 1,60  |
| 230 | <i>YMR193C-A</i> | <i>YMR193C-A</i> | D       | nepoznan  | 1,27 *  | 2,06 ** | 1,45 *  | 1,60  |
| 231 | <i>YJR059W</i>   | <i>PTK2</i>      | P       | transport, celični cikel, celična homeostaza  | 1,24 *  | 1,53 *  | 2,00 ** | 1,59  |
| 232 | <i>YIL173W</i>   | <i>VTH1</i>      | P       | transport, vezikularni transport  | 1,50 ** | 1,46 *  | 1,81 *  | 1,59  |
| 233 | <i>YHR206W</i>   | <i>SKN7</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, odziv na kemične dražljaje  | 1,45 *  | 1,54 *  | 1,75 *  | 1,58  |
| 234 | <i>YLL056C</i>   | <i>YLL056C</i>   | N       | nepoznan  | 1,34 *  | 1,76 ** | 1,64 *  | 1,58  |
| 235 | <i>YLR294C</i>   | <i>YLR294C</i>   | D       | generiranje prekurzorskih metabolitov in energije, celična respiracija  | 1,22 *  | 1,61 *  | 1,91 ** | 1,58  |
| 236 | <i>YGL215W</i>   | <i>CLG1</i>      | P       | odziv na stres  | 1,31 *  | 1,35 *  | 2,00 ** | 1,55  |
| 237 | <i>YLR402W</i>   | <i>YLR402W</i>   | D       | nepoznan  | 1,22 *  | 1,52 *  | 1,88 ** | 1,54  |
| 238 | <i>YPL139C</i>   | <i>UME1</i>      | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, celični cikel, organizacija kromosoma, mejoza   | 1,36 *  | 1,65 *  | 1,60 *  | 1,54  |
| 239 | <i>YKL208W</i>   | <i>CBT1</i>      | P       | metabolizem RNK, biogeneza proteinskih kompleksov   | 1,40 *  | 1,62 *  | 1,59 *  | 1,53  |
| 240 | <i>YNL015W</i>   | <i>PBI2</i>      | P       | organizacija celične membrane, organizacija vakuole   | 1,40 *  | 1,53 *  | 1,64 *  | 1,53  |
| 241 | <i>YGR026W</i>   | <i>YGR026W</i>   | N       | nepoznan  | 1,49 ** | 1,33 *  | 1,74 *  | 1,52  |
| 242 | <i>YEL007W</i>   | <i>YEL007W</i>   | N       | nepoznan  | 1,25 *  | 1,76 ** | 1,49 *  | 1,50  |
| 243 | <i>YMR179W</i>   | <i>SPT21</i>     | P       | metabolizem RNK, transkripcija  | 1,49 ** | 1,57 *  | 1,44 *  | 1,50  |
| 244 | <i>YDR515W</i>   | <i>SLF1</i>      | P       | celična homeostaza, translacija   | 1,30 *  | 1,57 *  | 1,62 *  | 1,50  |
| 245 | <i>YHL027W</i>   | <i>RIM101</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na stres, celični cikel, odziv na kemične dražljaje, mejoza, sporulacija - nastanek celične spore, citokineza | 1,28 *  | 1,47 *  | 1,74 *  | 1,50  |
| 246 | <i>YHR009C</i>   | <i>YHR009C</i>   | N       | nepoznan  | 1,44 *  | 1,58 *  | 1,45 *  | 1,49  |
| 247 | <i>YOR275C</i>   | <i>RIM20</i>     | P       | sporulacija - nastanek celične spore  | 1,33 *  | 1,49 *  | 1,63 *  | 1,48  |

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A

| #   | ORF            | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI  | T-K /1  | T-K /2  | K-T    | POVP. |
|-----|----------------|----------------|---------|--|---------|---------|--------|-------|
| 248 | <i>YPR077C</i> | <i>YPR077C</i> | D       | nepoznan   | 1,39 *  | 1,52 *  | 1,54 * | 1,48  |
| 249 | <i>YDR321W</i> | <i>ASP1</i>    | P       | metabolizem aminokislin  | 1,24 *  | 1,68 ** | 1,52 * | 1,48  |
| 250 | <i>YMR063W</i> | <i>RIM9</i>    | P       | sporulacija - nastanek celične spore   | 1,29 *  | 1,66 *  | 1,49 * | 1,48  |
| 251 | <i>YIL153W</i> | <i>RRD1</i>    | P       | odziv na stres, celični cikel, metabolizem DNK, organizacija citoskeleta       | 1,31 *  | 1,40 *  | 1,68 * | 1,47  |
| 252 | <i>YGR135W</i> | <i>PRE9</i>    | P       | biogeneza proteinskih kompleksov, katabolizem proteinov                        | 1,39 *  | 1,40 *  | 1,59 * | 1,46  |
| 253 | <i>YBL064C</i> | <i>PRX1</i>    | P       | odziv na stres, odziv na kemične dražljaje, celična homeostaza                 | 1,42 *  | 1,41 *  | 1,54 * | 1,45  |
| 254 | <i>YNR045W</i> | <i>PET494</i>  | P       | translacija, organizacija mitohondrijev  | 1,24 *  | 1,47 *  | 1,62 * | 1,45  |
| 255 | <i>YIL157C</i> | <i>FAR1</i>    | P       | celični cikel, odziv na kemične dražljaje, signaliziranje, konjugacija         | 1,30 *  | 1,41 *  | 1,63 * | 1,44  |
| 256 | <i>YCR011C</i> | <i>ADP1</i>    | P       | transport  | 1,52 ** | 1,35 *  | 1,46 * | 1,44  |
| 257 | <i>YOR113W</i> | <i>AZF1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, odziv na kemične dražljaje                     | 1,26 *  | 1,37 *  | 1,66 * | 1,43  |
| 258 | <i>YOR123C</i> | <i>LEO1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, modifikacija proteinov, organizacija kromosoma | 1,24 *  | 1,55 *  | 1,50 * | 1,43  |
| 259 | <i>YNR004W</i> | <i>YNR004W</i> | N       | nepoznan   | 1,39 *  | 1,35 *  | 1,55 * | 1,43  |

## PRILOGA B: Identificirane mutante – pomanjkanje cinkovih ionov

P – potrjen ORF, N – neopredeljen ORF, D – dvomljiv ORF, T-K – odtis celic v smeri test-kontrola, K-T – odtis celic v smer kontrola-test; \*\* - odstopanje od mediane več kot 2SD, \* - odstopanje od mediane med 1SD ter 2SD, nz – ni zaznana (vrednost pod mejo detekcije); Vrednosti T-K/1, T-K/2 ter K-T predstavljajo relativni pogojnostni fitness delecijske mutante izbranega gena določenega pri posamezni ponovitvi poizkusa, POVP. predstavlja povprečno vrednost rel. pog. fitnessov treh ponovitev poskusa.

| #  | ORF            | GEN            | TIP ORF | IDENTIFICIRANI BIOLOŠKI PROCESI   | T-K /1  | T-K /2  | K-T     | POVP. |
|----|----------------|----------------|---------|---|---------|---------|---------|-------|
| 1  | <i>YML028W</i> | <i>TSA1</i>    | P       | odziv na stres, celični cikel, celična homeostaza, metabolizem DNK, translacija, odziv na kemične dražljaje, zvižanje proteinov                 | 0,34 *  | 0,65 *  | 0,59 ** | 0,53  |
| 2  | <i>YGL256W</i> | <i>ADH4</i>    | P       | metabolizem aminokislin, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije transport  | 0,49 *  | 0,70 *  | 0,58 ** | 0,59  |
| 3  | <i>YGL255W</i> | <i>ZRT1</i>    | P       |   | 0,54 *  | 0,63 *  | 0,88 *  | 0,68  |
| 4  | <i>YMR017W</i> | <i>SPO20</i>   | P       | morfogeneza celičnih komponent, sporulacija - nastanek celične spore nepoznan   | 6,40 ** | 5,66 ** | 1,71 ** | 4,59  |
| 5  | <i>YDR541C</i> | <i>YDR541C</i> | N       |   | 4,16 ** | 7,82 ** | 1,49 *  | 4,49  |
| 6  | <i>YIL145C</i> | <i>PAN6</i>    | P       | metabolizem aminokislin, metabolizem kofaktorjev, metabolizem vitaminov   | nz      | 4,82 ** | 3,92 ** | 4,37  |
| 7  | <i>YJR099W</i> | <i>YUH1</i>    | P       | modifikacija proteinov  | 2,45 ** | 7,63 ** | 1,55 *  | 3,88  |
| 8  | <i>YMR085W</i> | <i>YMR085W</i> | N       | nepoznan  | 2,71 ** | 6,86 ** | 1,94 ** | 3,84  |
| 9  | <i>YNR010W</i> | <i>CSE2</i>    | P       | metabolizem RNK, celični cikel, transkripcija, organizacija kromosoma, segregacija kromosomov   | 4,53 ** | nz      | 2,68 ** | 3,61  |
| 10 | <i>YDR293C</i> | <i>SSD1</i>    | P       | organizacija celične stene glivnega tipa  | 6,79 ** | 2,28 ** | 1,52 *  | 3,53  |
| 11 | <i>YML058W</i> | <i>SML1</i>    | P       | odziv na stres, organizacija mitohondrijev  | 2,95 ** | 5,59 ** | 1,75 ** | 3,43  |
| 12 | <i>YIL128W</i> | <i>MET18</i>   | P       | odziv na stres, metabolizem RNK, metabolizem DNK, metabolizem aminokislin, transkripcija  | 5,01 ** | 2,91 ** | 1,78 ** | 3,23  |
| 13 | <i>YLL056C</i> | <i>YLL056C</i> | N       | nepoznan  | 4,02 ** | 2,82 ** | 2,76 ** | 3,20  |
| 14 | <i>YKL139W</i> | <i>CTK1</i>    | P       | metabolizem RNK, transkripcija, translacija, modifikacija proteinov   | 3,21 ** | 2,36 ** | nz      | 2,79  |
| 15 | <i>YJL153C</i> | <i>INO1</i>    | P       | metabolizem ogljikovih hidratov   | 3,73 ** | 2,24 ** | 1,93 ** | 2,63  |
| 16 | <i>YKL046C</i> | <i>DCW1</i>    | P       | brstenje  | 1,97 *  | 3,56 ** | 2,16 ** | 2,56  |
| 17 | <i>YHR106W</i> | <i>TRR2</i>    | P       | odziv na stres, celična homeostaza, odziv na kemične dražljaje  | 2,70 ** | 3,16 ** | 1,78 ** | 2,54  |
| 18 | <i>YDL121C</i> | <i>YDL121C</i> | N       | nepoznan  | 2,68 ** | 3,15 ** | 1,52 *  | 2,45  |
| 19 | <i>YPL224C</i> | <i>MMT2</i>    | P       | celična homeostaza  | 3,14 ** | 2,13 *  | 1,79 ** | 2,36  |
| 20 | <i>YOR270C</i> | <i>VPH1</i>    | P       | celična homeostaza, biogeneza proteinskih kompleksov  | 2,85 ** | 1,91 *  | 2,30 ** | 2,36  |
| 21 | <i>YJL098W</i> | <i>SAP185</i>  | P       | metabolizem RNK, celični cikel  | 3,05 ** | 2,35 ** | 1,66 ** | 2,35  |
| 22 | <i>YMR222C</i> | <i>FSH2</i>    | P       | nepoznan  | nz      | 2,58 ** | 1,99 ** | 2,29  |
| 23 | <i>YMR145C</i> | <i>NDE1</i>    | P       | metabolizem heterocikličnih spojin, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije, metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem kofaktorjev | nz      | 2,61 ** | 1,73 ** | 2,17  |
| 24 | <i>YML035C</i> | <i>AMD1</i>    | P       | metabolizem heterocikličnih spojin  | 2,85    | 2,05 *  | 1,54 *  | 2,15  |
| 25 | <i>YNL242W</i> | <i>ATG2</i>    | P       | odziv na stres, transport, organizacija vakuole, organizacija peroksisomov, organizacija celične membrane                                       | 1,89 *  | 2,90    | 1,57 *  | 2,12  |
| 26 | <i>YDL033C</i> | <i>SLM3</i>    | P       | metabolizem RNK, metabolizem heterocikličnih spojin   | 2,79 ** | 1,70 *  | 1,51 *  | 2,00  |
| 27 | <i>YOR033C</i> | <i>EXO1</i>    | P       | odziv na stres, celični cikel, metabolizem DNK, organizacija kromosoma  | 2,21 *  | 1,81 *  | 1,64 ** | 1,89  |
| 28 | <i>YLR219W</i> | <i>MSC3</i>    | P       | celični cikel, metabolizem DNK, mejoza  | 2,02 *  | 1,80 *  | 1,69 ** | 1,84  |
| 29 | <i>YER061C</i> | <i>CEM1</i>    | P       | metabolizem lipidov   | 2,14 *  | 1,79 *  | 1,58 *  | 1,83  |
| 30 | <i>YPR170C</i> | <i>YPR170C</i> | D       | nepoznan  | 2,21 *  | 1,85 *  | 1,43 *  | 1,83  |