



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Shirin Sayedová

**Funkčná charakterizácia MDR pumpy
Pdr5p zodpovednej za mnohopočetnú
liekovú rezistenciu u kvasinky
*Saccharomyces cerevisiae***

Fyzikální ústav UK

Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.

Študijný program: Fyzika

Študijný obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Moja vďaka patrí predovšetkým vedúcej tejto práce doc. RNDr. Dane Gáškovej, CSc. za jej všestrannú pomoc, ochotu a venovaný čas. Ďalej by som rada poďakovala Bc. Tomášovi Bartlovi za pomoc s kultiváciou buniek a so zónovými testami. Taktiež moja vďaka patrí rodine za podporu počas štúdia.

Názov práce: Funkčná charakterizácia MDR pumpy Pdr5p zodpovednej za mnohopočetnú liekovú rezistenciu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Autor: Shirin Sayedová

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Jedným z hlavných dôvodov zlyhávania liečby infekcií spôsobených patogénnymi mikroorganizmami je nadmerná expresia membránových proteínov, ktoré aktívne odstraňujú lieky z buniek, čo vedie k fenoménu zvanému mnohopočetná lieková rezistencia MDR. V tejto práci sme sa zamerali na funkčnú charakterizáciu MDR pumpy Pdr5p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Overili sme, že je možné použiť diS-C₃(3) fluorescenčnú metódu na stanovenie väzbových miest, do ktorých sa substráty viažu vo väzbovej kapse pumpy ScPdr5p. Zamerali sme sa na štúdium väzbovej kapsy ScPdr5p pomocou triazolových derivátov: ravukonazolu, vorikonazolu a flukonazolu. Pomocou zónového testu sme ukázali, že všetky tri študované triazoly sú substrátmi pumpy ScPdr5p. Zistili sme, že tieto štruktúrne analógy majú výrazne odlišný vplyv na inhibíciu transportu potenciometrickej fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p, a taktiež, že ravukonazol s vorikonazolom vzájomne kompetujú o transport pumpou ScPdr5p. Využili sme fluorescenčný prístup k štúdiu väzby azolov do väzbovej kapsy pumpy ScPdr5p pomocou benchmark substrátov, ktoré sa viažu selektívne len do jedného väzbového miesta vo väzbovej kapse pumpy ScPdr5p, a podporili sme tak hypotézu, že ravukonazol a vorikonazol sa viažu do viac ako jedného väzbového miesta.

Kľúčové slová: kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, mnohopočetná lieková rezistencia, pumpa Pdr5p, fluorescenčná sonda diS-C₃(3)

Title: Functional characterization of MDR pump Pdr5p responsible for multiple drug resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Author: Shirin Sayedová

Institute: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc., Institute of Physics of Charles University

Abstract: One of the main reasons for the treatment failure of infections caused by pathogenic microorganisms is the overexpressing of efflux membrane proteins, which actively remove drugs from cells, leading to a phenomenon called multidrug resistance MDR. In this work, we focused on the functional characterization of the MDR pump Pdr5p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We have verified that diS-C₃(3) fluorescence method can be used to determine the binding sites where the substrates bind in the binding pocket of the pump *ScPdr5p*. We focused on the study of the *ScPdr5p* binding pocket using triazole derivatives: ravuconazole, voriconazole and fluconazole. Using disc diffusion assay, we showed that all three studied triazoles are substrates of the pump *ScPdr5p*. We have found that these structural analogs have a significantly different effect on the inhibition of the potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3) transport by the pump *ScPdr5p*, and also that ravuconazole and voriconazole compete with each other for transport by the pump *ScPdr5p*. We have used a fluorescent approach to study the binding of azoles to the binding pocket of pump *ScPdr5p* using benchmark substrates, that bind selectively to only one binding site in the binding pocket of the pump *ScPdr5p*, and we have supported the hypothesis that ravuconazole and voriconazole bind to more than one binding site.

Keywords: yeast *Saccharomyces cerevisiae*, multidrug resistance, pump Pdr5p, fluorescent probe diS-C₃(3)

Obsah

Úvod	3
1 Teoretická časť	4
1.1 Rezistencia patogénov voči liekom	4
1.1.1 Príčiny rezistencie kvasiniek voči liekom	4
1.1.2 Mnohopočetná lieková rezistencia	5
1.1.2.1 Účinok azolov	5
1.2 Plazmatická membrána	6
1.2.1 Membránové transportné proteíny	7
1.2.2 Priebeh transportu liečiva	8
1.3 Kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.3.1 Rast kvasinkovej kultúry	10
1.3.2 MDR pumpa Pdr5p	11
1.4 Membránový potenciál	12
1.4.1 Meranie membránového potenciálu u kvasiniek pomocou fluorescenčných sond	13
1.4.1.1 Potenciometrická fluorescenčná sonda diS-C ₃ (3) - nástroj pre meranie membránového potenciálu a aktivity MDR púmp	14
1.4.1.2 Využitie metódy farbiacich kriviek	18
2 Materiál a príprava vzoriek	21
2.1 Študované kmene	21
2.1.1 Kultivácia buniek	21
2.1.2 Príprava vzoriek k meraniu metódou farbiacich kriviek	22
2.2 Skúmané látky	23
2.3 Fluorescenčné merania	25
2.3.1 Spektrofluorometer	25
2.4 Biologické testy	25
2.4.1 Zónový test	26
3 Výsledky a diskusia	27
3.1 Špecifikácia úloh diplomovej práce	27
3.2 Overenie možnosti aplikácie diS-C ₃ (3) fluorescenčnej metódy pre stanovenie väzbových miest v <i>ScPdr5p</i> , do ktorých sa testovaný substrát viaže	29
3.2.1 Vplyv benchmark substrátov MTAE, TI a TBT na transport sondy pumpou <i>ScPdr5p</i>	29

3.2.2	Overenie možnosti použitia benchmark substrátov k stanoveniu väzbového miesta/miest testovaných substrátov využitím fluorescenčnej metódy	31
3.3	Funkčná charakterizácia väzbovej kapsy	
	MDR pumpy <i>ScPdr5p</i> pomocou triazolových štruktúrnych analógov	34
3.3.1	Určenie, že ravukonazol, vorikonazol a flukonazol sú substrátmi pumpy <i>ScPdr5p</i>	34
3.3.2	Určenie inhibičného účinku študovaných triazolov na transport sondy diS-C ₃ (3) pumpou <i>ScPdr5p</i> a ich vzájomná kompetícia o transport pumpu <i>ScPdr5p</i>	36
3.3.3	Štúdium väzby triazolov do väzbovej kapsy <i>ScPdr5p</i> pomocou benchmark substrátov využitím diS-C ₃ (3) fluorescenčnej metódy	40
	Záver	42
	Zoznam použitej literatúry	43
	Zoznam obrázkov	48
	Zoznam tabuliek	52
	Zoznam použitých skratiek	53

Úvod

Jeden z najväčších problémov, ktorým čelia lekári v boji proti infekciám spôsobených patogénnymi mikroorganizmami je neúčinnosť liečby. Často je potrebný súbor liekov na vyliečenie infekcie spôsobenej jediným patogénnym organizmom. Je to spôsobené tým, že sa v posledných desaťročiach začali vo vysokej miere užívať antibiotiká a antimykotiká k liečbe infekcií a mikroorganizmy si voči nim vyvinuli rezistenciu ako prirodzenú obranu proti látkam, ktoré ich poškodzujú a tým dochádza k neúčinnosti týchto liekov. Bolo vytvorených mnoho širokospektrálnych antibiotík, ktoré bojujú proti prokaryotickým baktériám, avšak u antimykotík je ich vývoj náročnejší, pretože v tomto prípade ide o eukaryotické organizmy, rovnako ako ľudia. Je preto potrebná opatrnosť pri vývoji nových liečiv, aby kvôli evolučnej príbuznosti neboli hubené aj ľudské bunky.

Jedným z najúčinnějších mechanizmov obrany bunky je nadprodukcia transmembránových proteínov, tzv. púmp, ktoré transportujú liek z bunky do vonkajšieho prostredia a tým znižujú jeho vnútrobunkovú akumuláciu. Tieto transportné proteíny sú schopné prenášať široké spektrum látok (liečiv) a je preto veľký záujem o študovanie ich činnosti a hľadanie ich účinných inhibítorov. Odolnosť voči viacerým liečivám si takto vytvárajú napríklad aj rakovinové bunky, čo spôsobuje neúčinnosť liečby chemoterapeutikami.

Táto práca je zameraná na štúdium transmembránového proteínu Pdr5p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý je za spotreby ATP schopný transportovať mnoho liečiv von z bunky, čím vysokou mierou prispieva k rezistencii buniek. Tento proteín je homologický s ľudským P-glykoproteínom, ktorý sa významne podieľa na rezistencii rakovinových buniek.

Napriek tomu, že je pumpa Pdr5p jedna z najpreštudovanejších, stále nie je objasnená presná štruktúra jej väzbovej kapsy, počet ani usporiadanie väzbových miest a špecifita transportovaných látok. V tejto práci nás preto zaujímala funkčná charakterizácia tejto pumpy, konkrétne bližšie preštudovanie jej väzbovej kapsy, v ktorej sa nachádzajú väzbové miesta pre transportované látky.

Využívali sme hlavne diS-C₃(3) fluorescenčnú metódu umožňujúcu sledovanie membránového potenciálu charakteristického pre živé bunky a aktivity pumpy v reálnom čase. Študovali sme viaceré azoly (lieky), u ktorých sme zisťovali, či sú prenášané sledovanou pumpou a do ktorých väzbových miest vo väzbovej kapse sa viažu. diS-C₃(3) fluorescenčnú metódu sme doplnili biologickými zónovými testami umožňujúcimi zistiť, či sa skúmané látky viažu do toho istého väzbového miesta, či viacerých miest.

1. Teoretická časť

1.1 Rezistencia patogénov voči liekom

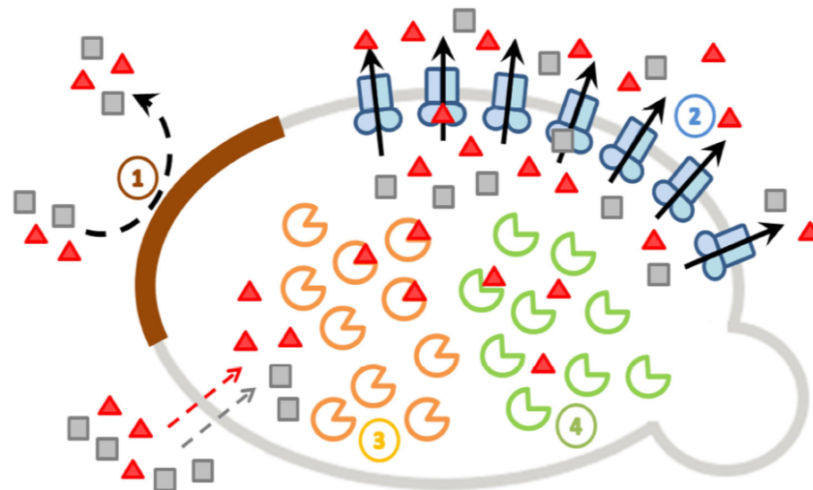
V dnešnej dobe sa ľudstvo čoraz viac potýka s infekciami, či už bakteriálnymi alebo kvasinkovými. Imunitný systém pacienta ako aj pokožka, či sliznica si s nimi v mnohých prípadoch dokáže poradiť, avšak riziko na zdravie pacienta sa značne zvyšuje so znižujúcou sa imunitou. Paradoxne, v mnohých prípadoch je to práve dôsledok pokrokov v medicíne. Zníženú imunitu majú mnohí pacienti, často tí, ktorí trpia iným vážnym ochorením ako napr. onkologickí, či HIV pozitívni pacienti. Pri transplantáciách sa bežne užívajú lieky na potlačenie imunity kvôli maximalizácii akceptácie transplantátu, avšak riziko infekcie sa výrazne zvyšuje a tým, žiaľ, aj úmrtnosť pacientov. Taktiež, časté užívanie širokospektrálnych antibiotík, či antimykotík vedie k vyššej rezistencii patogénnych mikroorganizmov voči týmto liečivám a tým sa stráca ich účinnosť. Patogény sa prirodzene bránia voči látkam, ktoré ich hubia a vytvárajú si voči nim rezistenciu.

1.1.1 Príčiny rezistencie kvasiniek voči liekom

Eukaryotické bunky, medzi ktoré patria aj kvasinkové bunky, sa bránia proti pre ne škodlivým látkam rôznymi spôsobmi. Zníženie prieniku množstva látky (lieku) do bunky docieli vhodnou zmenou zastúpenia lipidov a sterolov v plazmatickej membráne, či zmenou zloženia bunkovej steny. Na obrázku 1.1 znázornené číslom 1. Zníženie permeability membrány však nie je dostatočne efektívny spôsob obrany, pretože nedokáže úplne zabrániť nežiadúcim látkam preniknúť do bunky. Často je sprevádzaná ďalšími mechanizmami, ktoré slúžia k zníženiu účinnosti danej látky na minimum [1].

Medzi najúčinnnejšie metódy patrí nadprodukcia transmembránových proteínov, tzv. púmp. Na obrázku 1.1 znázornené číslom 2. Ich vysoký podiel na obrane bunky spočíva v tom, že aktívne pumpujú široké spektrum látok von z bunky. Zvyšné metódy sú často obmedzené len na úzke spektrum liečivých látok.

Ďalší možný mechanizmus je zvýšenie produkcie, či aktivity cieľového enzýmu liečiva, ktoré potom nie je schopné úplne inhibovať biochemickú reakciu, čím sa zníži jeho účinnosť. Často dochádza aj k enzymatickej modifikácii tak, aby sa afinita k liečivu výrazne znížila, ale jeho funkcia ostala nezmenená [2]. Na obrázku 1.1 znázornené číslom 3 a 4.



Obr. 1.1: Hlavné príčiny rezistencie kvasiniek voči liekom. Prevzaté z [3].

Táto práca sa zameria na bližšiu charakterizáciu jednej z púmp u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* práve pre jej nešpecifickosť, čo vedie k vysokej účinnosti obrany bunky proti rôznym liečivám.

1.1.2 Mnohopočetná lieková rezistencia

Jeden z najdôležitejších mechanizmov obrany bunky voči chemickým stresom je aktívne odstraňovanie cudzorodých látok von z bunky pomocou transmembránových proteínov. Ich nadprodukcia vedie k fenoménu nazvanému mnohopočetná lieková rezistencia, označovaná ako MDR (z anglického MultiDrug Resistance). Z bunky je pomocou nich odstraňované široké spektrum štruktúrne aj funkčne odlišných látok. Primárna funkcia púmp je chrániť bunku pred toxickým stresom (odpadové a cudzorodé látky). Nadmerná expresia púmp však vedie k zvýšenej odolnosti bunky voči liečbe antibiotikami, antimykotikami, či chemoterapeutikami a tým dochádza k zlyhaniu liečby ako infekcií spôsobených patogénnymi mikroorganizmami tak aj nádorových ochorení [4]. Práve z tohoto dôvodu dochádza po nadmernom a dlhodobom užívaní antibiotík alebo antimykotík k zníženiu ich účinnosti na liečbu pacienta.

1.1.2.1 Účinok azolov

Azolové antimykotiká sú syntetické látky, ktoré sú v dnešnej dobe bežnou súčasťou liečiv rôznych kvasinkových infekcií vďaka ich vysokej efektívnosti a nízkemu výskytu vážnych nežiadúcich účinkov na pacienta [5]. Azoly patria prevažne medzi fungistatiká, to znamená, že kvasinkové bunky prežívajú za prítomnosti azolu vo svojom prostredí do určitej koncentrácie, avšak nie sú schopné za jeho prítomnosti rásť ani sa množiť [6].

Základný mechanizmus účinku týchto zlúčenín je inhibícia cytochróm P_{450} 14 α -lanosterol demetylázy, ktorá je súčasťou biosyntetickej dráhy ergosterolu [6]. Premena kyseliny octovej na ergosterol z veľkej časti využíva rovnaké enzýmy ako biosyntetická dráha ľudského cholesterolu [7]. Dôsledkom tejto inhibície sa ergosterol časom vyčerpá a naviac dochádza k hromadeniu toxických sterolových medziproduktov, ktoré inhibujú rast kvasinkovej bunky [7]. Membrána je poškodená a tým môže byť ľahšie priepustná pre ďalšie liečivá.

Zo štruktúrneho hľadiska rozlišujeme deriváty imidazolu, medzi ktoré patria napr. klotrimazol, či bifonazol a deriváty triazolu, napr. ravukonazol, vorikonazol, či flukonazol. Triazolové zlúčeniny sú v porovnaní s imidazolovými viac selektívne a pomalšie metabolizované [8]. Preto majú malý vplyv na syntézu ergosterolu, ale aj ľudského cholesterolu a tým dochádza k menšiemu výskytu nežiadúcich účinkov na pacienta.

V praxi sa imidazolové deriváty využívajú lokálne prevažne v dermatológii, najčastejšie vo forme krému, či v gynekológii. Triazolové deriváty sú vhodné na liečbu systémových infekcií, nielen kožných mykóz, ale aj mykóz slizníc a vnútorných orgánov, podávané vo forme tabliet.

Hojné využívanie azolových zlúčenín však spôsobuje opačný efekt a vedie u patogénnych mikroorganizmov k vzniku MDR ako ich prirodzenej ochrany voči stresorom.

1.2 Plazmatická membrána

Plazmatická membrána nachádzajúca sa pod bunkovou stenou umožňuje transport živín, metabolitov a iónov do vnútra a von z bunky. Membránou sú obklopené aj samotné organely, vtedy hovoríme a tzv. vnútornej membráne.

Membrána je tvorená dvojitou vrstvou lipidov o hrúbke približne 5 nm. Prevažne obsahuje fosfolipidy, ale nachádzajú sa tam vo vysokom zastúpení aj glykolipidy, či steroly. Tieto amfipatické molekuly sa usporiadávajú tak, že hydrofilné hlavičky zabezpečujú polárny charakter membrány na jej povrchu a hydrofóbne chvostíky tvorené mastnými kyselinami zas hydrofóbny charakter vo vnútri vrstvy. Okrem lipidov sa v membráne nachádza množstvo špecifických proteínov, ktoré majú za úlohu transport látok cez membránu, katalyzáciu priebehu chemických reakcií, či slúžia ako receptory. Medzi najdôležitejšie patria steroly, v prípade kvasiniek je to ergosterol. Slúži ako bioregulátor membránovej permeability, fluidity a asymetrie a pre kvasinkovú bunku je esenciálny [9]. V ľudských bunkách sa namiesto ergosterolu nachádza cholesterol. Štruktúrne sa líšia, avšak funkciu plnia rovnakú.

Samotná dvojitá vrstva fosfolipidov je polopriepustná. Dokážu cez ňu prejsť malé nenabitú alebo hydrofóbne molekuly. Pre bunku je však nevyhnutný pre-

nos väčšieho spektra látok, hlavne živín, čo zabezpečujú transmembránové transportné proteíny.

1.2.1 Membránové transportné proteíny

Prechod cez membránu môže byť pasívny alebo aktívny. Pasívny transport je v smere koncentračného spádu a k prenosu nie je nutný prísun energie. Naopak, aktívny transport si energiu vyžaduje, pretože jeho smer je proti koncentračnému gradientu. Podľa zdroja energie sa rozlišujú primárne a sekundárne aktívne proteíny. Primárne aktívne proteíny získavajú energiu na presun látok cez membránu z hydrolýzy ATP (z anglického Adenosine TriPhosphate). V prípade, že k preneseniu látky proti spádu koncentračného gradientu je energia získaná z prenosu inej látky (napr. protónov) v smere koncentračného spádu, ide o sekundárne aktívne proteíny.

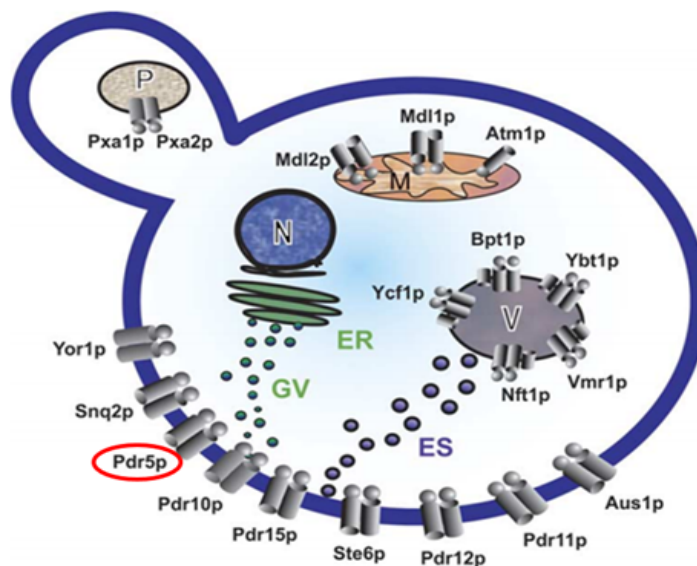
Superrodina MFS (z anglického Major Facilitators Superfamily) je jednou z rodín, ktorá sprostredkováva transport látok za využitia energie z elektrochemického gradientu protónov, prípadne iných látok cez bunkovú membránu. Do tejto superrodiny patria transportéry z prokaryotických aj eukaryotických organizmov. Spektrum prenášaných látok uniportom, symportom, či antiportom týmito proteínmi je široké. Transportujú ióny, cukry, aminokyseliny a taktiež lieky [10], čím sa podieľajú na obrane bunky.

Pumpy, ktoré boli zavedené v časti 1.1.1, patria hlavne medzi primárne aktívne proteíny. Proteíny superrodiny ABC (z anglického ATP-Binding Cassette) sa nachádzajú nielen v kvasinkách, ale aj vo všetkých ostatných organizmoch (bakteriálnych, rastlinných aj ľudských). Tieto pumpy primárne sprostredkovávajú prenos látok von z bunky, pričom prenášajú široké spektrum látok (cukry, aminokyseliny, vitamíny, ióny, lipidy, či antimykotiká, chemoterapeutiká a mnoho ďalších) [11]. Do superrodiny ABC patrí celkovo šesť rodín: MDR (z anglického MultiDrug Resistance), PDR (z anglického Pleiotropic Drug Resistance), PRP/CFTR (z anglického Multidrug Resistance-associated Proteins/Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), ALDp (z anglického AdrenoLeukoDystrophy protein), YEF3 (z anglického Yeast Elongation Factor 3) a RLI (z anglického RNase L Inhibitor). Najväčšia z nich je rodina PDR, ktorá má najväčší podiel na vzniku MDR u kvasiniek [12].

Väčšina ABC proteínov má podobnú štruktúru. Typický kvasinkový proteín ABC sa skladá z dvoch homológnych polovic. Každá obsahuje hydrofilnú doménu viažúcu nukleotid NBD (z anglického Nucleotide-Binding Domain) a hydrofóbnu doménu TMD (z anglického TransMembrane Domain) tvorenú šiestimi transmembránovými úsekmi [12]. NBD sú vzájomne tesne previazané a tvoria dimér obsahujúci dve väzbové miesta pre ATP [13]. Domény spoločne tvoria v membráne pór s veľkou väzbovou kapsou, ktorá obsahuje väzbové miesta pre transportované

látky.

ABC proteíny v eukaryotickej bunke sú znázornené na nasledujúcom obrázku 1.2. Vyobrazené sú membránové ABC proteíny lokalizované na povrchu bunky ako aj vo vakuole, mitochondriách, či peroxizómoch [14]. Vyznačená je pumpa Pdr5p, ktorej štúdium u kvasinky *S. cerevisiae* je náplňou tejto práce, jej bližší popis viď v časti 1.3.2.



Obr. 1.2: Lokalizácia membránových ABC proteínov v kvasinkovej bunke. N je jadro, V vakuola, ER endoplazmatické retikulum, GV Golgiho vezikuly, ES endozómy, M mitochondrie a P je peroxizóm. Prevzaté z [14].

1.2.2 Priebek transportu liečiva

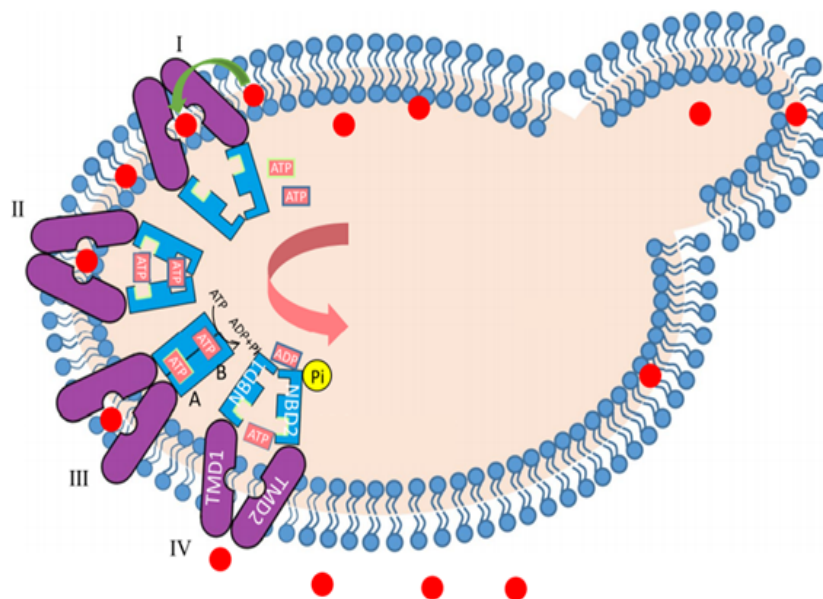
Transport substrátov cez membránu prebieha v štyroch krokoch, viď obr. 1.3. Vychádza sa zo stavu, kedy väzbová kapsa, ktorá je tvorená transmembránovými helixami, je otvorená smerom do cytoplazmy a z tejto strany má väzbové miesto vysokú afinitu na substrát.

- I Naviazanie substrátu z vnútra bunky do väzbového miesta TMD.
- II V dôsledku kroku I dôjde ku konformačnej zmene a umožní sa väzba dvoch ATP do väzbových miest v NBD.
- III Naviazanie ATP dodá energiu potrebnú ku konformačnej zmene oboch NBD tak, že sa priblížia a vzniká uzavretý dimér. Väzba substrátu na TMD teda vedie k naviazaniu ATP na TMD a to vedie k zníženiu aktivačnej energie na tvorbu uzavretého diméru. V tomto kroku dochádza k veľkej konformačnej zmene TMD. Väzbová kapsa transmembránovej časti proteínu, ktorá má naviazaný prenášaný substrát, sa otvorí smerom von z bunky a substrát

sa uvoľní. V tejto fáze sa afinita väzbového miesta na substrát výrazne znižuje a tým sa zabráni opätovnému naviazaniu substrátu z vonka bunky [15]. Hlavná konformačná zmena počas transportného cyklu teda nastáva po naviazaní ATP, následná hydrolýza ATP nemá tak veľký vplyv [16].

IV Hydrolýza naviazaného ATP iniciuje prechod proteínu do jeho základnej vnútrobunkovo orientovanej konfigurácie otvoreného diméru destabilizáciou uzavretého diméru NBD [13]. V poslednom kroku cyklu teda dochádza k postupnému uvoľňovaniu P_i a ADP, proteín sa vracia do základného stavu a následne je pripravený na zahájenie nového cyklu.

Bolo ukázané, že uvoľnenie P_i , zatiaľ čo ADP je stále naviazané, obnovuje vysokú afinitu väzbového miesta na substrát [17]. V prípade, že sa ADP neuvoľní, tak transportný cyklus nepokračuje [18]. V prípade niektorých transportérov môže naviazanie substrátu do vysokoafinitného väzbového miesta na TMD (krok 1) stimulovať uvoľňovanie ADP na konci jedného transportného cyklu a väzbu ATP na začiatku nasledujúceho [13].



Obr. 1.3: Priebeh transportu substrátu ABC pumpami v kvasinkovej bunke. (I) Naviazanie substrátu (červená guľôčka) z vnútra bunky do väzbového miesta TMD (označené fialovo). (II) Naviazanie oboch ATP do väzbových miest NBD (označené modro). (III) Dimerizácia NBD. Otvorenie väzbovej kapsy smerom von z bunky a uvoľnenie naviazaného substrátu. Hydrolýza ATP. (IV) Prechod proteínu do východzej polohy pre opätovné naviazanie liečiva. Prevzaté z [19].

1.3 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Pre výskumné účely tejto práce bola vybraná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, pretože je najjednoduchší modelový eukaryotický organizmus a zároveň ide o najbežnejší druh kvasinky. Hojne sa využíva v potravinárstve (pivné i vínne kvasinky, na výrobu pečiva, atď.), ako aj v iných odvetviach, napr. vo farmácii pri výrobe liekov.

Tento jednobunkový organizmus sa veľmi rýchlo množí (vegetatívne pučaním, ale aj pohlavne), je odolný a nenáročný na kultiváciu a preto je to najpreskúmanejší druh kvasinky. Bol to prvý eukaryotický organizmus, ktorého genóm bol kompletne sekvenovaný. Mnoho bunkových procesov je rovnakých ako u vyšších eukaryot a taktiež aj stavba je porovnateľná so stavbou ľudskej bunky. Preto je štúdium kvasiniek vhodné na pochopenie základných mechanizmov procesov prebiehajúcich v bunkách človeka. Vzhľadom na to, že kvasinka je jednobunkový organizmus, tak navyše obsahuje bunkovú stenu, ktorá ju chráni pred mechanickým poškodením a proti osmotickému tlaku a periplazmu, ktorá vyplňa priestor medzi bunkovou stenou a plazmatickou membránou.

1.3.1 Rast kvasinkovej kultúry

Rast kvasinkových kultúr v kvapalnom médiu obsahujúcom fermentovateľný substrát, napr. glukózu, prechádza rôznymi fázami, ktoré je možné vyjadriť pomocou rastovej krivky, viď obr. 1.4. Táto krivka udáva závislosť množstva buniek na čase, počas ktorého prebieha kultivácia. Množstvo buniek je vyjadrené pomocou optickej hustoty OD (z anglického Optical Density) v relatívnych jednotkách. Hodnota OD sa meria pomocou spektrofotometru na základe detekcie intenzity svetla po prechode vzorkou.

Rýchlosť rastu kultúry závisí na viacerých faktoroch. Napr. na zložení média, konkrétne obsahu cukru v ňom, na vlastnostiach samotnej kvasinky a v neposlednom rade na teplote. Najrýchlejší rast sa dosahuje pri teplote 30 °C.

Po zaočkovaní kultúry si bunky začnú získavať nutrienty z média avšak nedochádza k množeniu buniek, len k ich prispôbeniu k novému prostrediu. Doba, po ktorú bunková kultúra ostáva v tejto fáze závisí ako od zloženia média, tak aj od samotných buniek, predovšetkým ich veku. Tejto fáze hovoríme tzv. lag fáza.

Prechod k ďalšej fáze nastáva vtedy, keď sa bunky začnú množiť. Hovoríme o log fáze, či exponenciálnej fáze, pretože množenie má exponenciálny charakter. Bunky sa množia rýchlo, využívajú zásoby cukru z média až kým sa tieto zásoby živín nespotrebiajú.

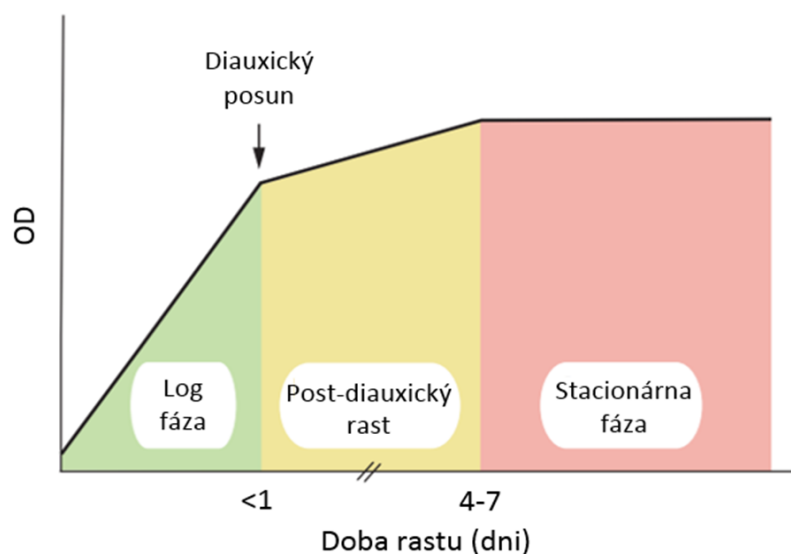
Následne dochádza k pozastaveniu rastu a bunky prispôbujú svoj metabolizmus do oxidatívneho módu, kedy sa adaptujú na využitie iného zdroja uhlíka, predovšetkým etanolu, či glycerolu [20]. Táto prechodová fáza je známa ako diau-

xický posun.

V post-diauxickej fáze dochádza k obnoveniu rastu kvasinkovej kultúry, avšak tento rast je výrazne pomalší ako v log fáze. Je to spôsobené tým, že bunky využívajú etanol, ktorý bol vyprodukovaný v predchádzajúcej fáze fermentácie.

Bunky vstupujú do stacionárnej fázy po vyčerpaní etanolu, dochádza k tomu priemerne za 4 až 7 dní od zaočkovania do média [21]. Dochádza k zastaveniu rastu kultúry a bunky sa pripravujú na stres hladovaním. V tejto fáze majú kvasinky silnejšiu bunkovú stenu a sú preto odolnejšie [22].

Približne po 10 dňoch od zaočkovania dochádza k odumieraniu buniek v dôsledku nedostatku živín.



Obr. 1.4: Rastové fázy kvasinky *S. cerevisiae* v glukózovom médiu [21].

1.3.2 MDR pumpa Pdr5p

Kvasinka *S. cerevisiae* má celkovo 31 génov, ktoré kódujú ABC proteíny [23]. Väčšina transportérov patrí do rodiny PDR, do ktorej sa radí aj proteín Pdr5p. Tento proteín má najväčší vplyv na vzniku MDR u kvasinky *S. cerevisiae* spolu s proteínom Snq2p a patria k najviac preskúmaným transportérom. Ďalšie proteíny zo superrodiny ABC sa výraznejšie prejavujú až za stresových podmienok (zníženie pH, zvýšenie osmolarity, hladovanie, či tepelný šok [24]). Lokalizácia týchto ABC proteínov v kvasinkovej bunke je znázornená na obrázku 1.2.

Proteín Pdr5p je veľký 160 kDa [25] a tvoria ho dve hydrofóbne transmembránové domény TMD a dve hydrofilné nukleotid viažúce domény NBD. Stavbu má podobnú ako väčšina transportérov patriacich do superrodiny ABC. Funkčný popis tohoto transmembránového proteínu sa zhoduje s popisom transportu liečiva uvedeným v časti 1.2.2.

Transportér je homologický s P-glykoproteínom, ktorý je hlavný ľudský MDR

transportér, ktorého nadmerná expresia u rakovinových buniek vedie k tomu, že až 40 % nádorov si vytvára rezistenciu voči liečbe chemoterapeutikami [4] a preto je tak vysoký význam ich štúdia.

Proteín Pdr5p je vysoko nešpecifický, prenášané substráty môžu mať rôznu štruktúru. To je jeden z hlavných dôvodov, prečo je pumpa Pdr5p predmetom viacerých výskumov. Bolo ukázané, že tento transportér nevyžaduje ionizáciu substrátov a je schopný prenášať látky, ktoré nemajú donory elektrónových párov [26].

Zároveň je prenos substrátu priamo závislý na jeho veľkosti. Minimálna veľkosť substrátu bola určená na 90 \AA^3 , optimálna je v rozmedzí $\sim 200\text{-}225 \text{ \AA}^3$ [26]. Malé molekuly sú schopné rýchlo difundovať cez membránu, pričom tie väčšie majú vyššiu pravdepodobnosť, že sa zachytia vo väzbovej kapse transportéru a teda, že môžu byť pumpou prenesené cez membránu von z bunky.

Ďalej bolo zistené, že väzbová kapsa pumpy Pdr5p obsahuje najmenej tri väzbové miesta pre substráty (liečivá), ktoré sa líšia od tých nachádzajúcich sa v ľudskom P-glykoproteíne [26]. Predpokladá sa, že jedno z väzbových miest využíva na naviazanie substrátu iba hydrofóbne interakcie. Substráty sú zároveň schopné interagovať aj s viac ako jedným väzbovým miestom [26].

1.4 Membránový potenciál

Membrána je polopriepustná, to znamená, že cez ňu dokážu prechádzať určité malé nepolárne molekuly. Prostredníctvom kanálov, či prenášačov sa sprostredkováva transport iónov, najčastejšie jednomocných katiónov H^+ , K^+ a Na^+ , ale aj napr. Ca^{2+} , Cl^- , prípadne malých nabitých molekúl. Pri transporte jednotlivých druhov iónov cez membránu, buď po koncentračnom gradiente alebo proti koncentračnému gradientu, dochádza k prenosu náboja, ktorý nie je úplne vykompenzovaný prenosom opačne nabitých iónov rovnakým smerom alebo súhlasne nabitých iónov opačným smerom. Tým sa vytvára medzi vonkajším a vnútorným prostredím bunky nielen chemická, ale aj nábojová nerovnováha, ktorej dôsledkom je rozdiel elektrických potenciálov medzi jednou a druhou stranou membrány. Toto elektrické napätie na membráne sa v bunkovej biológii nazýva membránový potenciál $\Delta\Psi$. Z vnútornej strany buniek je tento potenciál záporný.

Existencia membránového potenciálu ovplyvňuje mnoho procesov na bunkovej membráne, napr. transport živín do buniek. V mitochondriách a chloroplastoch je súčasťou protónmotívnej sily, ktorá poháňa syntézu ATP, teda ukladanie energie. Niektoré procesy sú membránovým potenciálom priamo riadené, napr. otváranie a zatváranie niektorých iónových kanálov, ktoré sprostredkovávajú prenos iónov cez membránu po spáde koncentračného gradientu. Preto je pre všetky živé bunky jeho existencia nevyhnutná. Je teda jedným zo základných atribútov vitálneho

stavu bunky.

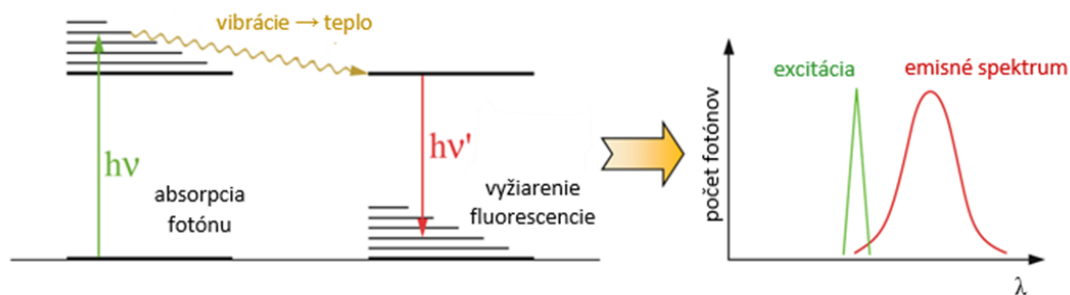
U kvasinky *S. cerevisiae*, ako aj všeobecne u kvasiniek, húb, či rastlín, tvorí membránový potenciál prevažne protónová pumpa H^+ -ATPáza. Tento transmembránový proteín, označovaný ako Pma1p, sprostredkováva prenos protónov cez membránu za spotreby ATP, čím vytvára a udržiava membránový potenciál. Táto pumpa tvorí u kvasiniek až 20 % všetkých membránových proteínov [27] a preto regulácia jej aktivity sa prejaví zmenou membránového potenciálu, čo má za následok zmenu pH vo vnútri bunky. Jej aktivácia je možná predovšetkým pridaním glukózy k bunkám [28], naopak pre inhibíciu sa pridáva 2-deoxy-D-glukóza [29]. U živočíšnych buniek má vysoký význam na vzniku membránového potenciálu pumpa Na^+/K^+ -ATPáza, ktorá funguje ako antiport. Súčasne pumpuje tri ióny Na^+ von z bunky a dva ióny K^+ do vnútra bunky proti ich koncentračnému gradientu za spotreby ATP.

1.4.1 Meranie membránového potenciálu u kvasiniek pomocou fluorescenčných sond

Prítomnosť bunkovej steny je hlavným dôvodom toho, prečo je meranie membránového potenciálu u kvasiniek klasickou priamou metódou pomocou mikroelektrod prakticky nemožné. Bunková stena totiž predstavuje veľmi pružnú a pevnú mechanickú bariéru pre vstup mikroelektrody do bunky. Prienik mikroelektrody do bunky obklopenej bunkovou stenou spôsobí jej rozsiahle mechanické poškodenie a kolaps membránového potenciálu.

Preto sú pre meranie membránového potenciálu u kvasiniek používané fluorescenčné sondy. Sú to silno fluoreskujúce organické molekuly, ktoré sú pridávané do vzorky zvonka. Existuje mnoho fluorescenčných indikátorov. Delia sa do dvoch hlavných skupín, rýchle (elektrochrómne) a pomalé (redistribučné). V molekulách sond dochádza k preusporiadaniu valenčných elektrónov v závislosti na membránovom potenciále, čo sa prejaví zmenami v absorpčných spektrách. Zmeny membránového potenciálu je možné týmito sondami sledovať rádovo v milisekundách (rýchle sondy) až v sekundách, či dokonca minútach (pomalé sondy) [30].

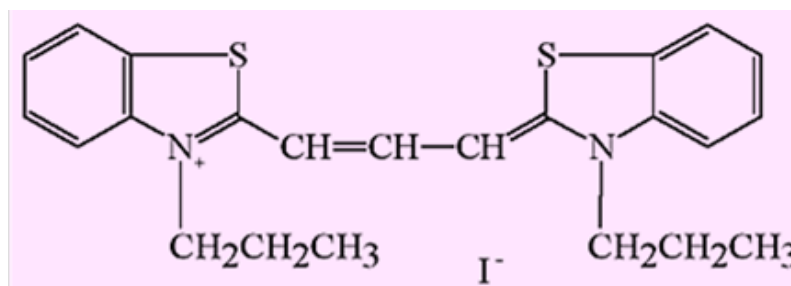
Tieto molekuly sú ožiarené vhodnou vlnovou dĺžkou, v dôsledku čoho dochádza k absorpcii fotónu a prechodu do vyššieho energetického stavu. Z excitovaného elektrónovo-vibračného stavu rýchlo relaxuje do najnižšieho excitovaného singletného stavu a následne nastáva emisiou fluorescencie prechod do základného elektrónového stavu so zvýšenou vibračnou energiou. Emitovaný fotón má nižšiu energiu a fluorescenčné spektrum je preto posunuté k dlhším vlnovým dĺžkam v porovnaní s budiacim žiarením, viď obr. 1.5. Fluorescenčné sondy sú schopné veľmi citlivo reagovať na zmenu prostredia (zmena pH, zmena koncentrácie nejakej látky, ai.), v ktorom sa nachádzajú zmenou merateľných parametrov emisie.



Obr. 1.5: Schéma znázorňujúca absorpciu fotónu po ožiarení svetlom, relaxáciu do najnižšieho excitovaného singletného stavu a následné vyžiarenie fluorescencie prechodom do základného stavu so zvýšenou vibračnou energiou (vľavo). Posun vlnovej dĺžky emisného spektra oproti vlnovej dĺžke excitácie (vpravo).

1.4.1.1 Potenciometrická fluorescenčná sonda diS-C₃(3) - nástroj pre meranie membránového potenciálu a aktivity MDR púmp

K sledovaniu membránového potenciálu kvasinkových buniek a aktivity MDR púmp lokalizovaných v membráne týchto buniek je v tejto práci využívaná fluorescenčná sonda diS-C₃(3). Konkrétne je to 3,3'-dipropylthiakarbocyanin jodid, ktorého štruktúrny vzorec je znázornený na obr. 1.6. Fluorescenčná metóda využívajúca túto jodidovú soľ bola vyvinutá na oddelení biofyziky Fyzikálneho ústavu UK v Prahe tímom doc. Gáškovéj (vedúcej tejto práce).



Obr. 1.6: Štruktúrny vzorec potenciometrickej sondy diS-C₃(3).

Táto jodidová soľ vo vodnom prostredí disociuje na kladne nabitú sondu, tzv. aktívnu formu. Výhodou tejto sondy je, že veľmi jednoducho prechádza do bunky. Zmenou jej vnútrobunkovej akumulácie je možné sledovanie zmien membránového potenciálu v reálnom čase a bez zmeny fyziologického stavu buniek. Táto molekula je lipofilná, jednoduchý priechod cez lipidovú časť membrány zabezpečuje prítomnosť hydrofóbných uhľovodíkových postranných reťazcov. Molekula sondy diS-C₃(3) je kladne nabitá a teda hnacou silou do vnútra bunky je aj existencia membránového potenciálu, ktorý je na vnútornej strane membrány záporný. Navyše, počiatočná koncentrácia sondy v bunke je nulová a preto do nej ľahko pre-

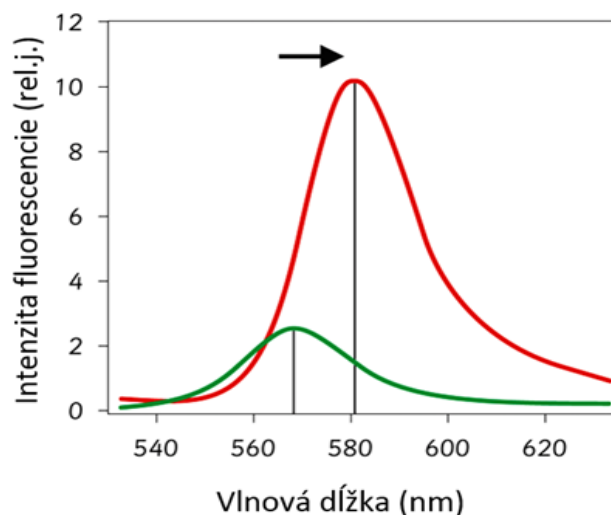
niká po spáde koncentračného gradientu. Celkovo ženie sondu do vnútra bunky tzv. elektrochemický gradient. Bunková stena, naopak, spomaľuje tento proces. Sonda preniká do bunky až do chvíle, kedy sa vyrovnajú elektrochemické potenciály molekúl sondy zvonka a zvnútra bunky. Spravidla dochádza k rovnováhe po niekoľkých sekundách, či minútach. V stave termodynamickej rovnováhy platí Nernstova rovnica 1.1. Tento vzťah udáva závislosť veľkosti membránového potenciálu $\Delta\Psi$ pre určitú koncentráciu sondy v médiu c_{out} na koncentrácii sondy vo vnútri bunky c_{in} .

$$\Delta\Psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}}, \quad (1.1)$$

kde $\Delta\Psi$ je veľkosť membránového potenciálu, R je plynová konštanta, T je absolútna teplota, z je valencia príslušného iónu, F je Faradayova konštanta, c_{in} je koncentrácia sondy vo vnútri bunky a c_{out} je koncentrácia sondy v médiu.

Pre meranie membránového potenciálu je potrebné selektívne stanovenie koncentrácie sondy mimo bunku a vo vnútri bunky. Vzťah medzi koncentráciou a intenzitou fluorescence je lineárny v prípade, že je nízka koncentrácia sondy. Zistenie intenzity fluorescence zvonka bunky a zvnútra bunky umožňuje získať informáciu o membránovom potenciále bunky pomerom týchto hodnôt.

Avšak, po prieniku sondy do bunky dochádza k jej väzbe na makromolekuly, prípadne k tvorbe nefluoreskujúcich agregátov, ak je vysoká koncentrácia sondy v bunke. V tomto prípade potom fluorescence neodpovedá skutočnej koncentrácii sondy. V prípade sondy diS-C₃(3) je tvorba agregátov zanedbateľná pri používaných koncentráciách, avšak reverzibilná väzba na makromolekuly v cytosóle má vysoký vplyv na intenzitu fluorescence. V dôsledku tejto väzby dochádza k spektrálnemu posunu maxima fluorescence až o 13 nm smerom do červenej oblasti spektra a taktiež dochádza k nárastu intenzity fluorescence sondy [31], viď obr. 1.7. To má za následok, že samotné zistenie intenzity fluorescence neumožňuje určiť koncentráciu sondy a teda ani membránový potenciál. K rovnováhe medzi voľnou a viazanou sondou v bunke dochádza veľmi rýchlo, rádovo v sekundách.

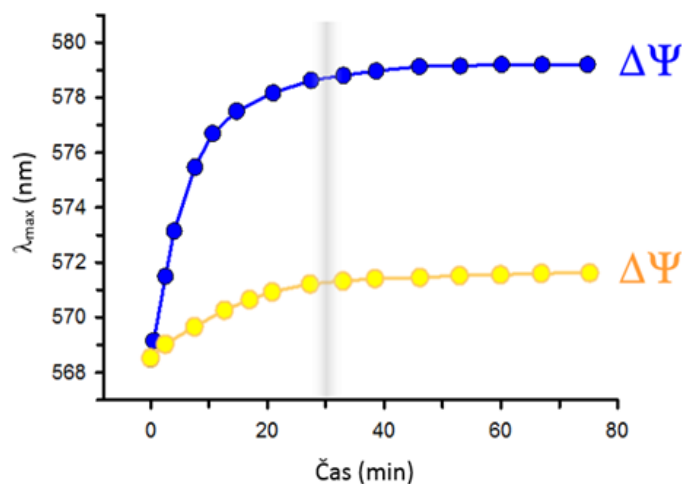


Obr. 1.7: Posun maxima a intenzity fluorescence po naviazaní sondy diS-C₃(3) na makromolekuly v cytosóle bunky. Fluorescenčné spektrum voľnej sondy je označené zelenou a fluorescenčné spektrum viazanej sondy červenou farbou.

V prípade, že je sonda pridávaná v omnoho nižších koncentráciách ako je koncentrácia makromolekúl, tak sú množstvá voľnej a viazanej sondy vo vnútri bunky vzájomne úmerné. To znamená, že pre určité rozmedzie použitej koncentrácie sondy ostáva konštantný pomer voľnej a viazanej sondy. V dôsledku toho ostáva konštantný posun maxima emisného spektra výslednej fluorescence [32] danej superpozíciou príspevkov od voľnej a od viazanej sondy. Tento posun maxima nezávisí na celkovej koncentrácii sondy. Mení sa teda iba intenzita fluorescence.

Pokiaľ teda pridávame potenciometrickú sondu diS-C₃(3) k suspenzii buniek, dochádza k jej prieniku do buniek a k okamžitej rovnováhe medzi voľnou a viazanou sondou. Prienik prebieha až do ustavenia elektrochemickej rovnováhy medzi koncentráciou voľnej sondy zvonka a zvnútra bunky, tiež nazývanej ako dynamická rovnováha. Pomer týchto koncentrácií odpovedá $\Delta\Psi$ a platí Nernstova rovnica 1.1. V prípade kvasinkových buniek, u ktorých sa nachádza bunková stena spomaľujúca prienik sondy cez membránu do vnútra bunky, je možné sledovať vstup sondy do buniek v čase pomocou monitorovania polohy maxima fluorescence, ktorá priamo odráža aktuálnu koncentráciu sondy v bunke. Závislosť polohy maxima fluorescence na čase sa nazýva farbiaca krivka, viď obr. 1.8. Spôsob jej merania je tzv. metóda farbiacich kriviek.

Z tvaru farbiacej krivky je možné vyčítať, po akom čase dôjde k ustaveniu rovnováhy medzi koncentráciou sondy zvonka a zvnútra bunky. V prípade kvasinky *S. cerevisiae* bola táto hodnota určená na približne 20-30 min [33]. Ďalej farbiace krivky umožňujú odlíšiť bunky, ktoré majú rôzny membránový potenciál, viď obr. 1.8.



Obr. 1.8: Farbiace krivky udávajúce závislosť polohy maxima fluorescencie na čase. Modrá farbiaca krivka prislúcha bunkám s vysokým membránovým potenciálom, žltá prislúcha bunkám s nízkym membránovým potenciálom v dôsledku vystavenia buniek stresoru interagujúceho s membránou. Ustavenie dynamickej rovnováhy je znázornené zvislou priamkou.

Pridanie stresoru k bunkám interagujúceho s membránou vedie k zníženiu membránového potenciálu, pričom nezáleží na tom, či bol pridaný k bunkám pred alebo až po pridaní fluorescenčnej sondy. Je teda možné sledovať časový vývoj maxima fluorescencie smerom k nižším vlnovým dĺžkam (do modrej oblasti spektra) po pridaní stresoru.

Metódou farbiacich kriviek je možné sledovanie nielen účinku stresoru v čase, ale aj činnosť iónových kanálov pasívne transportujúcich ióny cez membránu, čím menia hodnotu membránového potenciálu, ale aj činnosť púmp aktívne odstraňujúcich cudzorodé látky z bunky. Tieto pozorovania zmeny membránového potenciálu sa potom porovnávajú s mutantnými kmeňmi, ktoré neobsahujú dané kanály, či pumpy, prípadne sa použijú ich známe inhibítory, a tým sa získa obraz o aktivite študovaných transportných proteínov.

Bolo zistené, že sonda diS-C₃(3) je transportovaná hlavnými pumpami kvasinky *S. cerevisiae* [34]. Následne bolo ukázané, že dve hlavné pumpy tejto kvasinky, Pdr5p a Snq2p, aktívne odstraňujú túto fluorescenčnú sondu von z buniek [35]. Metóda farbiacich kriviek je preto vhodná aj na študovanie činnosti MDR púmp u kvasinkových buniek.

Aktivita pumpy sa zistí z diferencie farbenia kmeňa obsahujúceho danú pumpu a mutantného kmeňa bez pumpy. Membránový potenciál buniek totiž nie je ovplyvnený činnosťou týchto púmp a taktiež naopak, prítomnosť púmp v membráne neovplyvňuje jej hodnotu membránového potenciálu [35].

Veľkosť membránového potenciálu ako aj expresia a aktivita púmp Pdr5p a Snq2p sú vysoko závislé na veku buniek, tj. na rastovej fáze, v ktorej sa na-

chádzajú, viď obr. 1.4. V prípade starších buniek sa veľkosť ich membránového potenciálu znižuje [35]. Taktiež u starších buniek už nedochádza k expresii niektorých púmp, avšak po pridaní živín k bunkám (napr. glukózy) je možná ich resyntetizácia [36].

V rámci tejto práce sa k zisťovaniu inhibítorov pumpy Pdr5p využíva sonda diS-C₃(3), pretože bolo ukázané, že je substrátom všetkých troch identifikovaných väzbových miest tejto pumpy [37]. Zistenie prebiehalo na sérii experimentov za využitia ako sondy diS-C₃(3), tak aj substrátov pumpy Pdr5p viažúcich sa špecificky len do jedného z väzbových miest v jej väzbovej kapse.

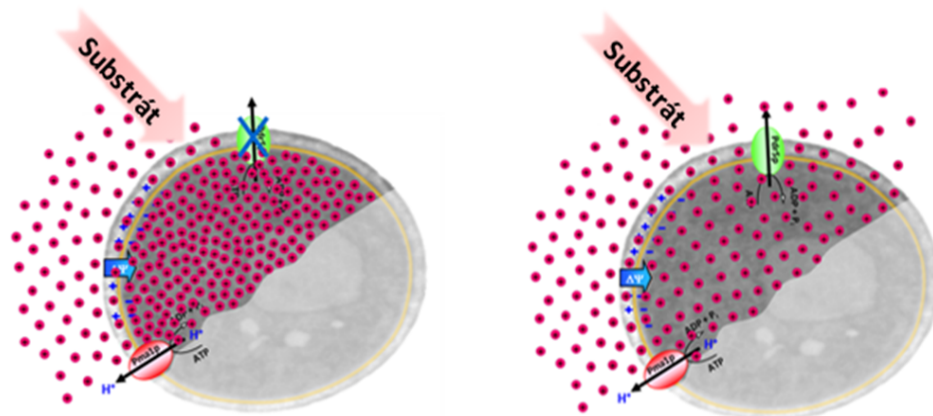
Sonda diS-C₃(3) je potenciálne veľmi prínosná aj k vyhľadávaniu inhibítorov a substrátov priamo na ľudských bunkách, pretože je substrátom taktiež P-glykoproteínu, ľudskej MDR pumpy.

1.4.1.2 Využitie metódy farbiacich kriviek

V tejto práci je využívaná metóda farbiacich kriviek za účelom detekcie, či je skúmaná látka (azol) substrátom pumpy Pdr5p a do ktorých väzbových miest v jej väzbovej kapse sa viaže.

Vezmime si bunky kvasinky *S. cerevisiae* neobsahujúce pumpu. Takýto kmeň sa označuje AD1-3. Po pridaní sondy diS-C₃(3) dochádza k jej prieniku do bunky až sa dosiahne dynamická rovnováha, viď obr. 1.9. Poloha maxima fluorescencie stúpa k vyšším vlnovým dĺžkam, smerom k červenej oblasti, viď obr. 1.10. V termodynamickej rovnováhe platí Nernstova rovnica 1.1. Po pridaní substrátu sa farbiaca krivka väčšinou nemení, pretože nie je možné pumpovanie žiadnej látky von z bunky. Môže však dôjsť k poklesu maxima fluorescencie v dôsledku interakcie s povrchovými štruktúrami mikroorganizmu.

V prípade, že si vezmeme bunky kvasinky *S. cerevisiae* obsahujúce pumpu Pdr5p, značené AD12, tak po pridaní sondy diS-C₃(3) taktiež dochádza k jej prieniku do bunky, ale vzhľadom na to, že je substrátom pumpy, tak ňou je vypudzovaná von z bunky, viď obr. 1.9. V tomto prípade už neplatí spomínaná Nernstova rovnica 1.1. Poloha maxima fluorescencie stúpa k vyšším vlnovým dĺžkam len minimálne. Po pridaní látky, ktorá je tiež substrátom pumpy Pdr5p dochádza ku kompetitívnej inhibícii transportu sondy. To znamená, že testovaná látka (azol) kompetuje so sondou o transport pumpou, v dôsledku čoho dôjde k navýšeniu maxima fluorescencie, viď obr. 1.10. Pokiaľ navýšenie dosiahne rovnakú hodnotu ako v prípade kmeňa AD1-3 (bez pumpy), tak dochádza k 100% inhibícii transportu sondy, hovoríme o tzv. úplnej inhibícii transportu sondy, kedy sa testovaná látka viaže do všetkých troch miest vo väzbovej kapse pumpy ako sonda. V prípade nižšieho navýšenia hovoríme o saturovanej inhibícii transportu sondy, kedy sa skúmaná látka neviaže do všetkých väzbových miest ako sonda.

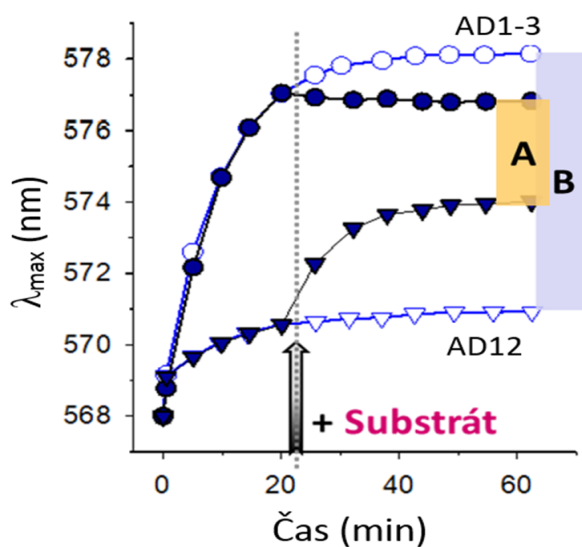


Obr. 1.9: Schematické znázornenie bunky *S. cerevisiae* po pridaní sondy diS-C₃(3) a ďalšieho substrátu pumpy Pdr5p. Kmeň AD1-3 (vľavo): vstup sondy (červené guľôčky) do bunky ovplyvňuje $\Delta\Psi$. Kmeň AD12 (vpravo): kompetitívna inhibícia transportu sondy substrátom cez pumpu Pdr5p.

Rozsah inhibície transportu sondy v % iným substrátom pumpy (študovanou látkou) je možné určiť pomocou maxima fluorescence, viď rovnica 1.2.

$$\text{Rozsah inhibície transportu sondy} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100, \quad (1.2)$$

kde A označuje rozdiel rovnovážnych hodnôt maxim fluorescence medzi kmeňmi AD1-3 a AD12 po pridaní substrátu a B je rozdiel rovnovážnych hodnôt maxim fluorescence týchto kmeňov bez pridaní substrátu, viď obr. 1.10. Pomer A/B predstavuje zvyškovú aktivitu pumpy po pridaní substrátu.



Obr. 1.10: Vývoj farbiacich kriviek pre kmene AD1-3 a AD12 po pridaní substrátu.

Metódou farbiacich kriviek je možné zistiť aj konkrétne miesta, do ktorých sa skúmaná látka viaže. Význam to má v prípade saturovanej inhibície transportu sondy. Využívajú sa známe substráty pumpy Pdr5p, ktoré sa selektívne viažu len do jej jedného konkrétneho väzbového miesta. Takéto látky nazývame benchmark substráty. Bolo zistené, že do miesta 1 vo väzbovej kapse kvasinky *S. cerevisiae* sa špecificky viaže látka 2-(metyl-trityl-amino)-etanol, označovaná ako MTAE, do miesta 2 sa viaže tritylimidazol, označovaný ako TI a do miesta 3 sa viaže tetra-butylcín, označovaný ako TBT [26, 38, 39]. Ich štruktúrne vzorce sú vyobrazené na obr. 2.3.

2. Materiál a príprava vzoriek

V tejto časti sa nachádza prehľad použitých chemikálií, postup prípravy kvasinkovej kultúry a merania fluorescenčnou metódou. Nasleduje stručný popis použitého spektrofluorometra. Na jej konci je uvedený popis doplnujúcich biologických testov.

2.1 Študované kmene

Táto práca sa zaoberá študovaním väzbovej kapsy jednej z hlavných púmp kvasinky *S. cerevisiae* Pdr5p. Z toho dôvodu bol k štúdiu vybraný kmeň AD12 obsahujúci iba skúmanú pumpu. Metóda farbiacich kriviek vyžaduje porovnanie s kmeňom bez obsahu púmp, viď 1.4.1.2 a preto ďalším skúmaným kmeňom bol kmeň AD1-3.

Kmeň	Genotyp	Poznámka
AD12	MAT α , PDR1-3, ura3, his1 yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG	Deletované pumpy Yor1p a Snq2p, nadprodukcia pumpy Pdr5p
AD1-3	MAT α , PDR1-3, ura3, his1 yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG, pdr5 Δ ::hisG	Deletované pumpy Yor1p, Snq2p a Pdr5p

Tabuľka 2.1: Použité kmene kvasinky *S. cerevisiae*.

Zásobné kvasinkové kultúry oboch kmeňov sú uchovávané zmrazené na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v médiu pozostávajúcom z glycerolu, glukózy, peptónu a kvasinkového extraktu, viď tab. 2.2.

Chemikália	Obsah	Výrobca
Glycerol	60 %	Lach-Ner
D-glukóza	10 %	Sigma
Peptón	20 %	Oxoid
Kvasinkový extrakt	10 %	Serva

Tabuľka 2.2: Zloženie zásobnej kvasinkovej kultúry.

2.1.1 Kultivácia buniek

Z konzerv obsahujúcich zásobné kvasinkové kultúry sa odoberie malé množstvo buniek pomocou sterilnej kľučky na Petriho misku obsahujúcu 2 % agar, viď

tab. 2.3. Následne sa nechá rásť v inkubátore pri teplote 30 °C po dobu 24 h. V našom prípade bol použitý inkubátor Incucell 55. Po inkubácii sú misky s obsahom kultúry kvasinky uskladňované v chladničke pri teplote 4 °C.

Následne sa vytvorí inokulum odobratím malého množstva kvasiniek z pripravenej misky pomocou sterilnej kľučky do 10 ml YPD média, viď tab.2.4, v Erlenmayerovej banke o objeme 50 ml. Tá sa nechá v trepacom kúpeli pri teplote 30 °C po dobu 24 h aeróbne kultivovať. Takto pripravené inokulum sa následne uchováva v chladničke pri teplote 4 °C.

Chemikália	Obsah	Výrobca
Kvasinkový extrakt	20 g	Serva
Peptón	10 g	Oxoid
Agar	10 g (20 g)	Roth
D-Glukóza	20 g	Sigma
Destilovaná voda	1000 ml	—

Tabuľka 2.3: Zloženie YPD agaru 1 % (2 %).

Chemikália	Obsah	Výrobca
Kvasinkový extrakt	20 g	Serva
Peptón	10 g	Oxoid
D-Glukóza	20 g	Sigma
Destilovaná voda	1000 ml	—

Tabuľka 2.4: Zloženie YPD média.

2.1.2 Príprava vzoriek k meraniu metódou farbiacich krieviek

Deň pred samotným meraním sa z vytvoreného inokula odoberie vhodné množstvo, v našom prípade 1-5 μ l, a zaočkuje do čerstvého 10 ml YPD média. Bunky sa nechajú kultivovať v trepacom kúpeli pri teplote 30 °C kým dosiahnu požadovanú fázu rastu, približne 22 h.

Tesne pred meraním sú vzorky pripravované z kultúry buniek kvasinky *S. cerevisiae* v exponenciálnej fáze rastu, hodnota OD je ideálna v rozpätí 4 až 8. V našom prípade bol použitý spektrofotometer Amersham Biosciences Novaspec III a svetelný zdroj o vlnovej dĺžke 578 nm, ktorý odpovedá žltej farbe vo viditeľnej oblasti svetla. Kalibrácia spektrofotometra udáva nulovú hodnotu na vzorke destilovanej vody. Následne sa bunky dvakrát premyjú destilovanou

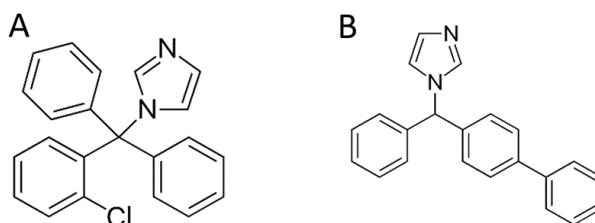
vodou a resuspendujú taktiež destilovanou vodou, prípadne C-P pufrom. Centrifugácia prebiehala po dobu 2 min rýchlosťou 3000 ot./min. Bunky sú vo vhodnom množstve pridané do pripraveného C-P pufru, viď tab. 2.5 tak, aby bola hodnota OD $0,125 \pm 0,003$. C-P pufer sa pred pridaním buniek ohrieva na teplotu 30 °C. Vzorky sa pripravujú napipetovaním 3 ml vzniknutej suspenzie buniek do každej z pripravených kyviek o optickej dráhe 1 cm.

Chemikália	Obsah	Výrobca
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Hydrogénfosforečnan disodný dodekahydrát)	3,6 g	Sigma
Destilovaná voda	1000 ml	—
Kyselina citrónová (bezvodá)	Titrácia na pH6	Penta

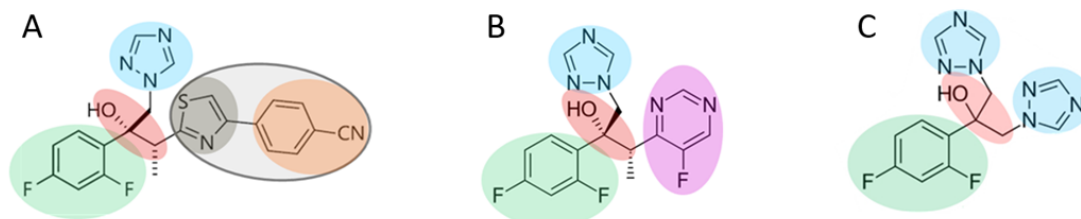
Tabuľka 2.5: Zloženie C-P pufru 10 mM.

2.2 Skúmané látky

Na štúdium funkcie väzbovej kapsy pumpy Pdr5p kvasinky *S. cerevisiae* boli použité viaceré azoly. Štruktúrne vzorce študovaných imidazolových derivátov (klotrimazol a bifonazol) sú znázornené na obr. 2.1. Skúmané triazolové deriváty boli tri: ravukonazol, vorikonazol a flukonazol, ktorých štruktúrne vzorce sú znázornené na obr. 2.2. Rovnakou farbou sú vyznačené rovnaké časti týchto troch látok, z čoho je vidieť, že všetky tri majú veľmi podobnú štruktúru, avšak aj malé rozdiely majú veľký vplyv na inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) cez pumpu Pdr5p. Všetky študované látky majú vysoký potenciál k liečbe rôznych infekcií spôsobených patogénnymi mikroorganizmami, napr. spomínané triazolové zlúčeniny boli vyhodnotené ako vysoko účinné pri liečbe kandidóz [40].

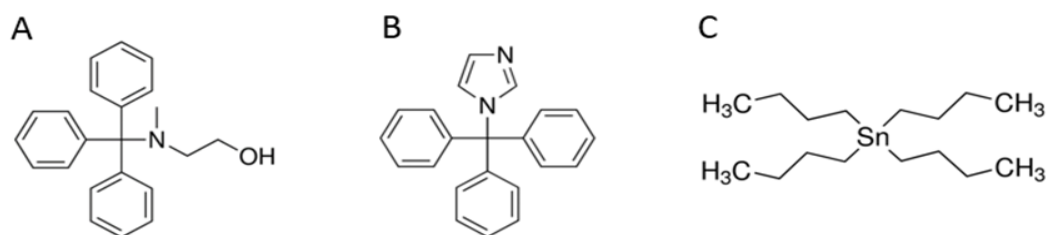


Obr. 2.1: Štruktúrne vzorce použitých imidazolových derivátov: (A) klotrimazol a (B) bifonazol.



Obr. 2.2: Štruktúrne vzorce použitých triazolových derivátov: (A) ravukonazol, (B) vorikonazol a (C) flukonazol.

Pre určenie konkrétneho väzbového miesta daného azolu, či viacerých väzbových miest, sú použité benchmark substráty. Ako už bolo uvedené v sekcii 1.4.1.2, viažu sa selektívne iba do jedného známeho väzbového miesta v kapse pumpy Pdr5p. V našom prípade sú použité benchmark substráty MTAE viažúce sa do miesta 1, TI viažúce sa do miesta 2 a TBT viažúce sa do miesta 3 vo väzbovej kapse pumpy Pdr5p. Ich štruktúrne vzorce sú uvedené na obr. 2.3.



Obr. 2.3: Štruktúrne vzorce použitých benchmark substrátov: (A) MTAE, (B) TI a (C) TBT.

Substrát	Výrobca	Rozpúšťadlo
diS-C ₃ (3) (3,3'-dipropylthiakarboocyanin jodid)	Fluka	Etanol (pre UV spektroskopiu)
Klotrimazol	Sigma	DMSO (Dimetylsulfoxid)
Bifonazol	Sigma	DMSO
Ravukonazol	Sigma	DMSO
Vorikonazol	Sigma	DMSO
Flukonazol	Sigma	DMSO
MTAE	Sigma	DMF (Dimetylformamid)
TI	Alfa.Aesar	DMF
TBT	Sigma	Acetón

Tabuľka 2.6: Prehľad použitých substrátov.

2.3 Fluorescenčné merania

Do pripravených kyviet s bunkovou suspenziou je 30 s pred prvým fluorescenčným meraním pridaná sonda diS-C₃(3). Jej štruktúrny vzorec a bližšia špecifikácia sú uvedené v sekcii 1.4.1.1. Používaná koncentrácia roztoku sondy je 3×10^{-6} M, ideálne množstvo jej pridávania k bunkovej suspenzii sú 4 μ l. Pri vyššej hodnote sú pumpy buniek AD12 príliš namáhané, čo sa prejavuje stúpaním intenzity a vlnovej dĺžky farbiacej krivky. Fluorescenčné spektrá sú merané pri izbovej teplote v intervaloch 5-10 min, záleží od množstva meraných vzoriek. Pred každým meraním je kyveta jemne pretrepaná.

Touto metódou je možné súčasné meranie viacerých vzoriek, v našom prípade 10 až 15. To znamená, že je možné sledovanie vývoja farbiacich kriviek v čase súčasne pre viaceré vzorky líšiace sa skúmaným kmeňom, pridaným azolom, či benchmark substrátom v rôznych časoch. Taktiež umožňuje merania v širokom koncentračnom rozmedzí pridávaných substrátov k bunkám. Merania prebiehali po dobu 90-100 min, kedy je už možné jednoznačné určenie rovnovážnej hodnoty farbiacej krivky pre každú skúmanú vzorku.

2.3.1 Spektrofluorometer

Pre merania fluorescenčných emisných spektier bol použitý spektrofluorometer FluoroMax[®]-4 od spoločnosti Horiba Jobin Yvon. Ako zdroj excitačného žiarenia je použitá xenónová lampa, excitačná vlnová dĺžka je 531 nm. Eliminácia rozptýleného svetla je zabezpečovaná oranžovým skleneným filtrom s cut-off vlnovou dĺžkou 540 nm. Emisné spektrá boli merané v rozsahu vlnových dĺžok 560-590 nm, pretože fluorescenčné spektrum voľnej sondy má maximum na 569 nm, maximum fluorescencie viazanej sondy sa posúva približne o 13 nm vyššie. Zmeranie jedného emisného spektra vzorky trvá 20 s. Namerané dáta sú k dispozícii prostredníctvom softvéru FluorEssence[™]. Viac informácií je možné nájsť v manuáli použitého spektrofluorometra¹.

2.4 Biologické testy

Fluorescenčné merania je vhodné doplniť biologickými testami. V tejto práci boli na podporu fluorescenčnej metódy farbiacich kriviek zvolené zónové testy, ktoré umožňujú stanoviť, či je študovaná látka substrátom danej pumpy.

¹https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/UserArea/Fluorescence/Manuals/FluoroMax4_4P_Manual_USB.pdf

2.4.1 Zónový test

Z pripraveného inokula, viď sekcia 2.1.1, je zaočkované vhodné množstvo (rádovo jednotky μ l) do 10 ml YPD média (tab. 2.4). Po kultivácii v trepacom kúpeli pri teplote 30 °C do požadovanej fázy rastu sa bunky dvakrát premyjú destilovanou vodou, centrifugácia prebiehala po dobu 2 min rýchlosťou 3000 ot./min. Bunky sa resuspendujú destilovanou vodou, prípadne C-P pufrom (tab. 2.5). Zo vzniknutej suspenzie sa vezme určité množstvo a pridá sa do 1 % YPD agaru (tab. 2.3) tak, aby výsledná koncentrácia bola 10^6 buniek/ml. 10 ml vzniknutého agaru s kvasinkovými bunkami o teplote približne 45 °C sa vyleje na Petriho misku o priemere 9 cm, na ktorej je stuhnutých 15 ml 2 % YPD agaru (tab. 2.3). Agar sa nechá stuhnúť, približne po dobu 20 min, a následne sa naň poukladajú kruhové terčičky z filtračného papiera. Na ne sa nanesie požadované množstvo skúmanej látky (azolu) a misky sa nechajú v inkubátore pri teplote 30 °C po dobu 48 hodín. V prípade štúdia kompetitívnej inhibície transportu dvoch rôznych substrátov cez skúmanú MDR pumpu sa obe látky nanesú na ten istý terčik v časovom rozmedzí 15 min. Po dobe inkubácie sú misky vyfotografované a sú študované veľkosti inhibičných zón.

Látka, ktorá bola aplikovaná na filtračný papierik počas doby inkubácie difunduje a vzniká v jeho okolí inhibičná zóna, tj. oblasť, kde nedochádza k rastu buniek. Jej veľkosť závisí od účinnosti danej látky pri inhibícii rastu buniek. Skutočnosť, či je skúmaná látka substrátom danej pumpy sa zistí z porovnania veľkosti inhibičných zón pre kmeň s obsahom púmp a pre kmeň bez nich. V prípade buniek s obsahom púmp, ktoré aktívne odstraňujú aplikovanú látku von z bunky, dochádza k zníženiu inhibičnej účinnosti danej látky, čo sa prejaví menšou, prípadne žiadnou inhibičnou zónou v okolí terčička. V prípade kompetitívnej inhibície dvoch substrátov je pozorovaná väčšia inhibičná zóna ako po pridaní každého z nich samostatne. Je to spôsobené faktom, že obe látky kompetujú o transport tou istou pumpou a teda sa v bunke hromadia viac.

3. Výsledky a diskusia

Bezpochyby najvýznamnejším z obranných systémov, ktoré si bunky (baktérie, kvasinky a živočíšne bunky vrátane ľudských) v priebehu evolúcie vyvinuli proti toxickým účinkom najrôznejších typov chemických látok je nadmerná produkcia membránových proteínov (púmp), ktoré sú zodpovedné za odstraňovanie cudzorodých látok z buniek. Tieto pumpy sú na rozdiel od iných **vysoko selektívnych** kanálov a púmp sprostredkovávajúcich transport fyziologicky relevantných látok (prijímanie živín, odstraňovanie odpadných látok a transport malých anorganických iónov a protónov) cez plazmatickú membránu **relatívne neselektívne**. Jedna taká pumpa je schopná odstraňovať široké spektrum rôznych štruktúrne a funkčne odlišných látok, liekov, a preto sú tieto pumpy zodpovedné za fenomén zvaný „mnohopočetná lieková rezistencia“ (anglicky MultiDrug Resistance). V dôsledku vysokej rezistencie buniek s nadprodukciou MDR púmp v plazmatickej membráne voči širokému spektru odlišných liečiv, predstavuje tento fenomén hlavný klinický problém pri liečbe kvasinkových a bakteriálnych infekcií a/alebo rakoviny.

U kvasiniek je za mnohopočetnú liekovú rezistenciu zodpovedná predovšetkým rodina ABC proteínov nazvaná PDR (viď sekcia 1.2.1). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú hlavnými MDR pumpami *ScPdr5p*, *ScSnq2p* a *ScYor1p*.

3.1 Špecifikácia úloh diplomovej práce

Otázkou, ktorá fascinuje vedcov už dlhú dobu je, prečo je substrátová špecifita týchto púmp tak málo obmedzená? Inými slovami, ako je možné, že jedna taká pumpa dokáže rozpoznať toľko rozdielnych látok ako cudzorodé a odstraňovať ich. Je všeobecne prijímané vysvetlenie, že transmembránové domény (TMD) ABC proteínov vytvárajú v membráne veľkú väzbovú kapsu, v ktorej sa nachádzajú rôzne väzbové miesta líšiace sa svojou afinitou k odlišným substrátom. Niektoré substráty sa môžu viazať do viac než jedného väzbového miesta a niektoré väzbové miesta sa môžu navzájom prekrývať. Do jednotlivých väzbových miest sa môžu viazať odlišné substráty a byť tak spoločne transportované z bunky. Znamená to teda, že dutina väzbovej kapsy je veľmi komplexná a dynamická štruktúra.

Čo sa týka znalostí o usporiadaní väzbovej kapsy, o počte väzbových miest a o interakciách s jej substrátmi patrí MDR pumpa *Pdr5p* u kvasinky *S. cerevisiae* (*ScPdr5p*) k najlepšie preštudovaným.

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo prispieť k rozšíreniu poznatkov o usporiadaní väzbovej kapsy pumpy *ScPdr5p*. Diplomová práca sa opiera o výsledky získané v rámci dizertačnej práce Mgr. Ivy Jančíkovej, Ph.D. [3], ktoré boli publikované v časopise *FEMS Yeast Research* [37]. V tejto štúdii zaoberajúcej sa po-

rovnaním usporiadania väzbovej kapsy *ScPdr5p* a *KlPdr5p* (u kvasinky *Kluyveromyces lactis*) bolo zistené, že fluorescenčná sonda $\text{diS-C}_3(3)$, ktorá je substrátom oboch púmp (rovnako ako púmp *ScSnq2p*, *CaCdr1p*, *CaCdr2p* a P-glykoproteínu [41]) sa viaže do všetkých troch doposiaľ identifikovaných väzbových miest vo väzbovej kapse pumpy *ScPdr5p*. Toto zistenie významnou mierou prispelo k možnosti použitia $\text{diS-C}_3(3)$ fluorescenčnej metódy pre stanovenie toho, či sa testovaný substrát viaže iba do niektorého/niektorých alebo do všetkých väzbových miest. Iba v prípade interakcie substrátu so všetkými väzbovými miestami, podobne ako u sondy $\text{diS-C}_3(3)$, dochádza pri dosiahnutí určitej koncentrácie substrátu k 100 % kompetitívnej inhibícii transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, čo bolo dokázané pomocou substrátov viažúcich sa špecificky iba do jedného z väzbových miest vo väzbovej kapse pumpy, tzv. benchmark substrátov (viď sekcia 1.4.1.2). U všetkých testovaných substrátov/azolov (klotrimazol, mikonazol, bifonazol, ketokonazol a itrakonazol) bola v tejto štúdii zistená saturačná a neúplná kompetitívna inhibícia transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, čo znamená, že žiadny z azolov sa neviaže do viac než dvoch väzbových miest vo väzbovej kapse *ScPdr5p* a je teda umožnená väzba sondy do zvyšných väzbových miest a jej kotransport spolu s azolom z buniek. Dôkaz, že žiadny z testovaných azolov sa skutočne neviaže do všetkých väzbových miest vo väzbovej kapse *ScPdr5p* bol prevedený pomocou zónových testov, v ktorých bola študovaná kompetícia azolov s benchmark substrátmi miest 1, 2 a 3. Bolo zistené, že itrakonazol sa viaže iba do jedného väzbového miesta (miesto 3), ostatné azoly sa viažu do dvoch väzbových miest (klotrimazol, mikonazol a ketokonazol do miest 1 a 2, bifonazol do miest 1 a 3). Naskytá sa otázka, či by nebolo možné získať tieto informácie priamo pomocou $\text{diS-C}_3(3)$ fluorescenčnej metódy, tj. pridanie benchmark substrátov jednotlivých väzbových miest, poprípade ich kombinácií, k bunkám po aplikácii azolu. V prípade pridania benchmark substrátu väzbového miesta, do ktorého sa testovaný azol neviaže, by malo dôjsť k nárastu inhibície transportu sondy (v ideálnom prípade k úplnej inhibícii).

Hlavným cieľom prvej časti predkladanej práce bolo preto overenie možnosti použitia fluorescenčnej metódy pre stanovenie väzbových miest vo väzbovej kapse *ScPdr5p*, do ktorých se testovaný substrát viaže.

V druhej časti práce sme sa zamerali na funkčnú charakterizáciu väzbovej kapsy *ScPdr5p* pomocou trojice azolov (ravukonazol, vorikonazol a flukonazol), ktoré majú podobnú štruktúru, ako je patrné z obr. 2.2. Použitie takéhoto prístupu pre štúdium väzbovej kapsy nie je nové, napr. v štúdii [26] bola k stanoveniu počtu väzbových miest použitá séria relatívne jednoduchých štruktúrne podobných substrátov.

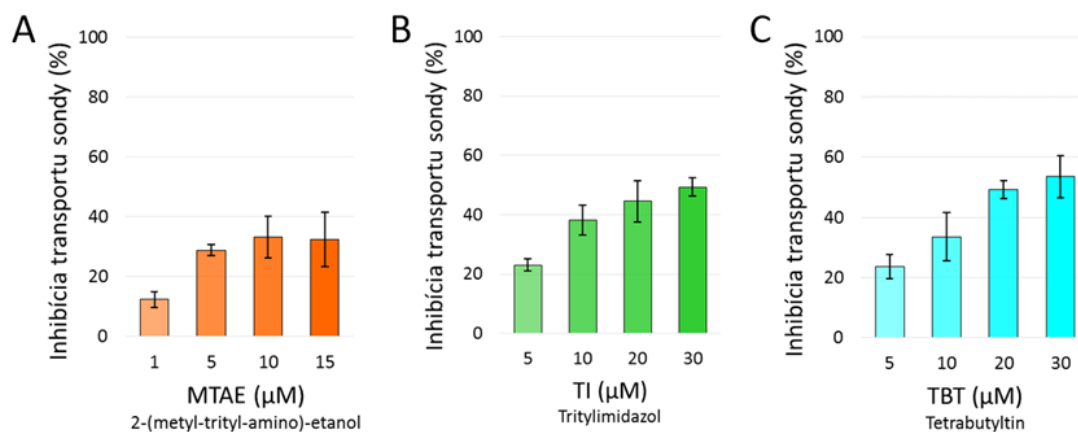
3.2 Overenie možnosti aplikácie diS-C₃(3) fluorescenčnej metódy pre stanovenie väzbových miest v *ScPdr5p*, do ktorých sa testovaný substrát viaže

Pre vylúčenie možnosti, že budú výsledky získané po aplikácii testovacích benchmark substrátov k bunkám opôsobených azolom ovplyvnené napríklad nevhodne zvolenou koncentráciou benchmark substrátov alebo rastovou fázou buniek, urobili sme overovacie experimenty analogické s experimentami v dizertačnej práci [3] a v publikácii [37]. Konkrétne sa jednalo o

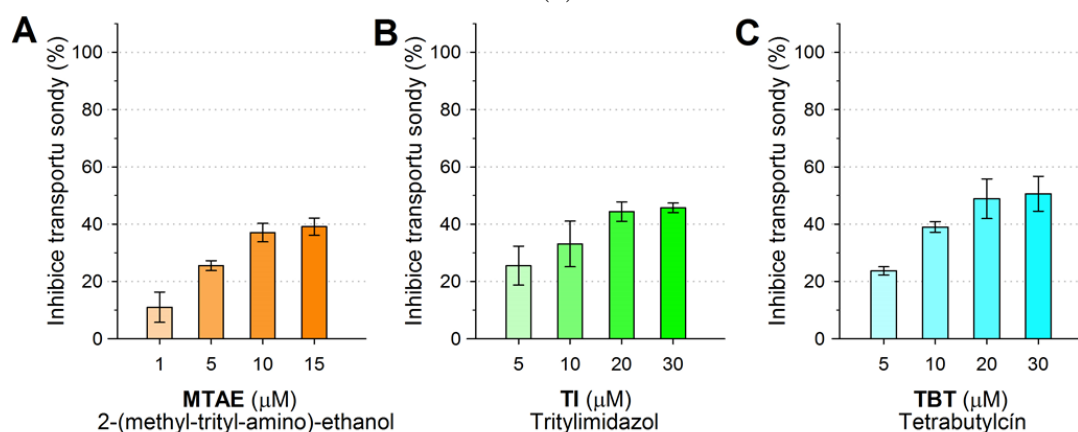
- stanovenie koncentračne závislého rozsahu inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po pridaní benchmark substrátov miesta 1 (MTAE), miesta 2 (TI) a miesta 3 (TBT) a
- potvrdenie úplnej inhibície transportu sondy diS-C₃(3) pumpou *ScPdr5p* po pridaní všetkých troch testovacích benchmark substrátov jednotlivých väzbových miest v saturačných koncentráciách.

3.2.1 Vplyv benchmark substrátov MTAE, TI a TBT na transport sondy pumpou *ScPdr5p*

Ako vyplýva z obrázku 3.1, v ktorom sú porovnané nami získané závislosti rozsahu inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* na koncentracii benchmark substrátov jednotlivých väzbových miest, MTAE, TI a TBT, (obr. 3.1a) s publikovanými (obr. 3.1b), dosiahli sme veľmi podobných výsledkov, tj. všetky benchmark substráty v oboch prípadoch spôsobujú saturačnú, neúplnú kompetitívnu inhibíciu transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, s rozsahom inhibície $\sim 40\%$ až 50% . Vzhľadom k tomu, že rozsah použitých koncentrácií všetkých benchmark substrátov bol v oboch prípadoch identický, mohli sme takisto konštatovať, že aj saturačné koncentrácie jednotlivých substrátov sú zhodné. To nás oprávnilo k tomu, že sme mohli urobiť rovnaký modelový experiment ako v [3, 37] na dôkaz úplnej (100%) inhibície transportu sondy po postupnom pridaní všetkých troch benchmark substrátov za rovnakých podmienok, tj. pri použití rovnakých saturačných koncentrácií jednotlivých benchmark substrátov (15 μM MTAE, 30 μM TI a 30 μM TBT), viď obr. 3.2. Ako je patrné z obrázku 3.2a, postupné pridanie všetkých troch benchmark substrátov k bunkám AD1-3 a AD12 vedie k splynutiu farbiacich kriviek buniek oboch kmeňov, teda k úplnej inhibícii transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, rovnako ako bolo zistené skôr, viď obr. 3.2b.

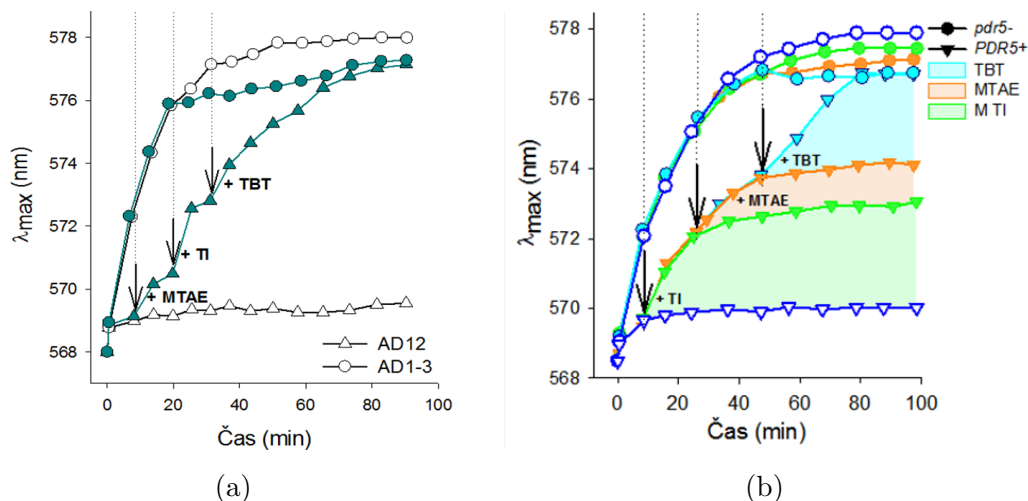


(a)



(b)

Obr. 3.1: MTAE, TI aj TBT spôsobujú saturačnú kompetitívnu inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) pumpou *ScPdr5p*. Porovnanie (a) nami získaných a (b) publikovaných [3, 37] závislostí rozsahu inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* na koncentracii benchmark substrátov: (A) MTAE (miesto 1), (B) TI (miesto 2) a (C) TBT (miesto 3). V oboch prípadoch boli všetky benchmark substráty pridané v 20. minúte farbenia, rozsah inhibície transportu sondy bol určený z rovnice 1.2. V prípade (a) boli stredné hodnoty a smerodajné odchýlky získané z dvoch nezávislých experimentov, v prípade (b) boli získané zo šiestich nezávislých experimentov. (b) Prevzaté z [37].



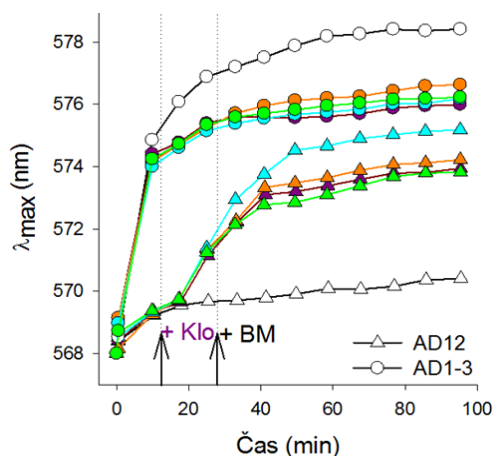
Obr. 3.2: Postupné pridanie MTAE, TI a TBT spôsobujú úplnú inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. Porovnanie (a) nami získaných a (b) publikovaných [3, 37] farbiacich kriviek kmeňov AD12 a AD1-3 po postupnom pridaní všetkých troch benchmark substrátov. Šípkami sú vyznačené časy ich pridania. V oboch prípadoch boli použité rovnaké saturačné koncentrácie: 15 μM MTAE, 30 μM TI a 30 μM TBT. Prázdne symboly reprezentujú farbenie kontrolných buniek bez pridania benchmark substrátov. K úplnej inhibícii dochádza nezávisle na poradí pridávaných benchmark substrátov, ako bolo ukázané aj v [3, 37]. (b) Prevzaté z [37].

3.2.2 Overenie možnosti použitia benchmark substrátov k stanoveniu väzbového miesta/miest testovaných substrátov využitím fluorescenčnej metódy

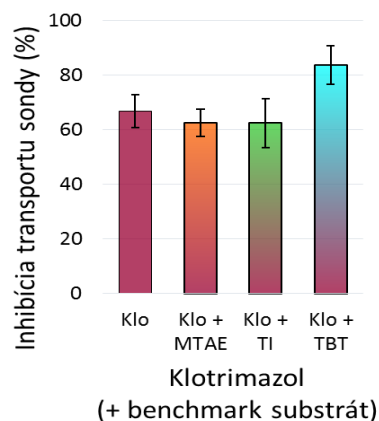
Pre overenie možnosti použitia benchmark substrátov pre stanovenie väzbových miest, do ktorých sa testovaný substrát/azol viaže, respektíve neviaže, iba pomocou diS-C₃(3) fluorescenčnej metódy sme vybrali klotrimazol a bifonazol. Dôvodom tohto výberu bola skutočnosť, že oba tieto azoly sa viažu do dvoch väzbových miest. Pokiaľ teda budú k bunkám pridané v saturačných koncentráciách [3, 37], malo by ideálne k dosiahnutiu úplnej inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p stačiť pridanie saturačnej koncentrácie jediného benchmark substrátu väzbového miesta, konkrétne toho, do ktorého sa neviaže testovaný azol. U klotrimazolu (väzba do miest 1 a 2 [3, 37, 26, 39]) by mal byť blokovaný transport sondy pridaním saturačnej koncentrácie TBT (miesto 3), u bifonazolu (väzba do miest 1 a 3 [3, 37]) by k inhibícii transportu sondy malo dôjsť po pridaní saturačnej koncentrácie TI (miesto 2). Naopak, pridanie benchmark substrátov miest 1 a 2 u klotrimazolu a miest 1 a 3 u bifonazolu by nemalo ovplyvniť rozsah inhibície transportu sondy diS-C₃(3).

Ako vyplýva z obrázku 3.3, z ktorého je patrný ako reálny priebeh experimentu sledovania vplyvu pridania benchmark substrátov k bunkám po aplikácii klotrimazolu, obr. 3.3a, tak porovnanie rozdielov v inhibícii transportu sondy samotného klotrimazolu a v kombinácii s benchmark substrátmi, obr. 3.3b, iba v prípade pridania TBT dochádza podľa očakávania k nárastu inhibície transportu sondy. Je potrebné podotknúť, že inhibícia nedosiahne 100 % a rovnako pridanie benchmark substrátov MTAE a TI rozsah inhibície ľahko znižuje. Podobne aj pri sledovaní vplyvu benchmark substrátov na rozsah inhibície bifonazolu dochádza k nárastu rozsahu inhibície iba v prípade, že je pridaný benchmark substrát miesta 2 (TI), do ktorého sa bifonazol neviaže, viď obr. 3.4. Ako možné vysvetlenie neúplnej inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po pridaní saturačnej koncentrácie benchmark substrátu, do ktorého sa azol neviaže je, že väzba azolu ovplyvňuje ako väzbu benchmark substrátu, tak aj väzbu sondy. To by mohlo byť vyvolané napríklad priestorovým prekrytím niektorých väzbových miest vo väzbovej kapsle *ScPdr5p*, kde prítomnosť jedného substrátu redukuje afinitu druhého [42, 38].

Záverom môžeme teda konštatovať, že naša myšlienka použitia diS-C₃(3) fluorescenčnej metódy pre identifikáciu väzbových miest, do ktorého/ktorých sa testovaný substrát viaže, pomocou benchmark substrátov jednotlivých väzbových miest je správna, ale nie je možné ju zatiaľ v tejto podobe použiť ako samostatný test. Je preto potrebné, aby boli výsledky aj naďalej kombinované s výsledkami zónového testu.

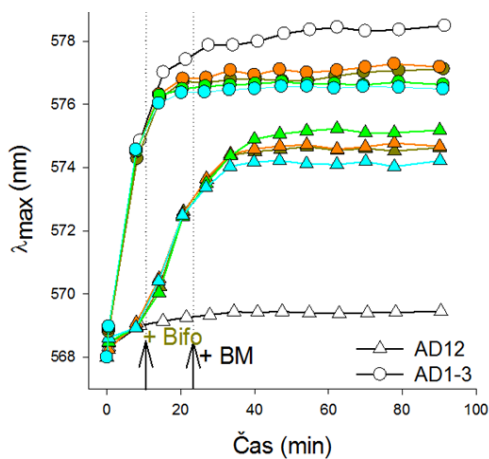


(a)

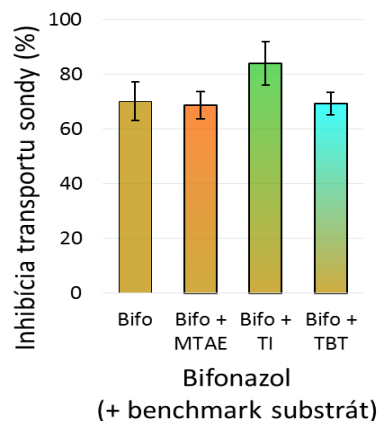


(b)

Obr. 3.3: Zvýšenie inhibície transportu sondy pumpu *ScPdr5p* po pridaní TBT k bunkám po aplikácii klotrimazolu. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3 po pridaní klotrimazolu v saturačnej koncentrácii 20 μM (fialová), klotrimazolu 20 μM a následne MTAE 15 μM (oranžová), klotrimazolu 20 μM a TI 30 μM (zelená) a klotrimazolu 20 μM a TBT 30 μM (modrá). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po pridaní klotrimazolu a následne jednotlivých benchmark substrátov určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z dvoch nezávislých experimentov.



(a)

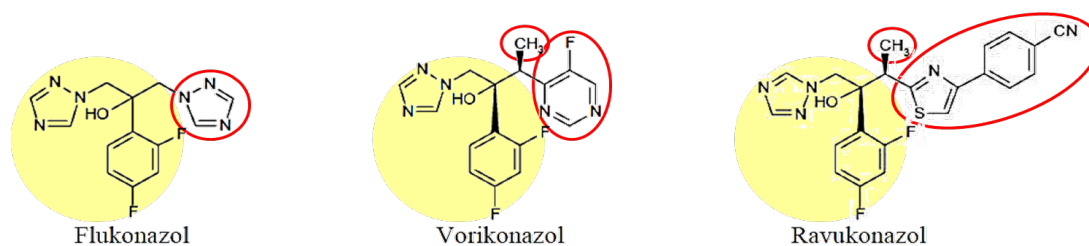


(b)

Obr. 3.4: Zvýšenie inhibície transportu sondy pumpu *ScPdr5p* po pridaní TI k bunkám po aplikácii bifonazolu. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3 po pridaní bifonazolu v saturačnej koncentrácii 12 μM (žltá), bifonazolu 12 μM a následne MTAE 15 μM (oranžová), bifonazolu 12 μM a TI 30 μM (zelená) a bifonazolu 12 μM a TBT 30 μM (modrá). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po pridaní bifonazolu a následne jednotlivých benchmark substrátov určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z dvoch nezávislých experimentov.

3.3 Funkčná charakterizácia väzbovej kapsy MDR pumpy *ScPdr5p* pomocou triazolových štruktúrnych analógov

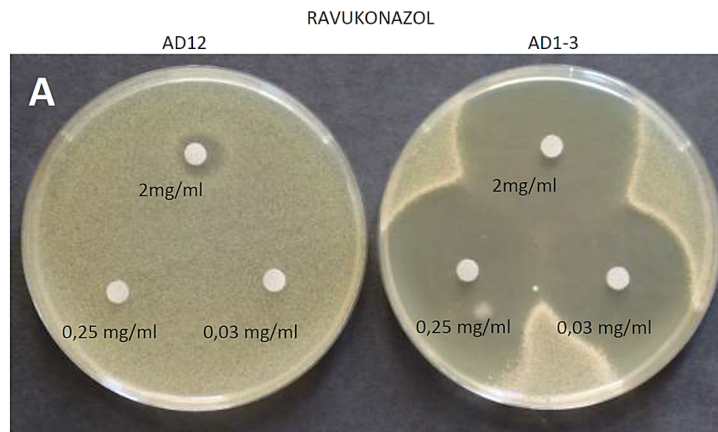
V druhej časti diplomovej práce sme sa zamerali na štúdium väzbovej kapsy pumpy *ScPdr5p* pomocou troch triazolov: flukonazolu, vorikonazolu a ravukonazolu, viď obr. 2.2. Dôvodom použitia tejto trojice azolov bola skutočnosť, že sa jedná o štruktúrne analógy, čo znamená, že majú podobnú štruktúru, ktorá sa navzájom líši iba určitou zložkou/zložkami (substituentom), viď obr. 3.5. Opätovné uvedenie štruktúrnych vzorcov triazolov v odlišnom grafickom prevedení je tu z dôvodu ľahšej orientácie v nasledujúcej diskusii výsledkov.



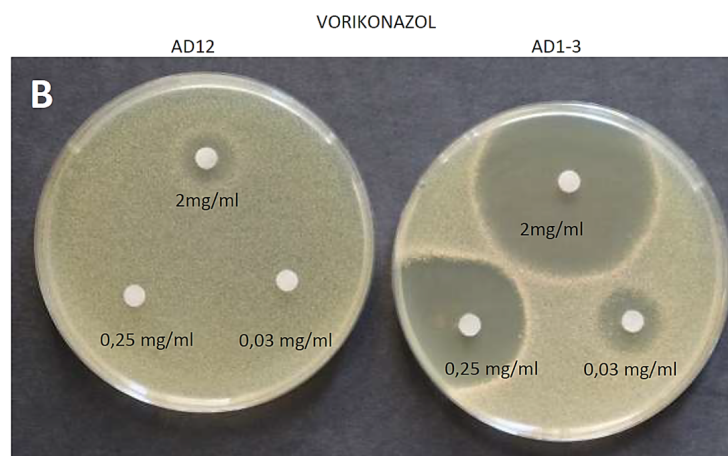
Obr. 3.5: **Flukonazol, vorikonazol a ravukonazol sú štruktúrnymi analógmi.** Žltou farbou sú vyznačené spoločné časti triazolov obsahujúce 1,2,4-triazol, propán-2-ol (hydroxylová skupina) a 1,3-difluorobenzén. Červenou sú označené odlišné zložky. U flukonazolu sa jedná o 1,2,4-triazol, u vorikonazolu o 5-fluoropyrimidín a metylovú skupinu a u ravukonazolu, ktorý má taktiež naviazanú metylovú skupinu, je substituentom 4-(1,3-thiazol-4-yl)benzonitril.

3.3.1 Určenie, že ravukonazol, vorikonazol a flukonazol sú substrátmi pumpy *ScPdr5p*

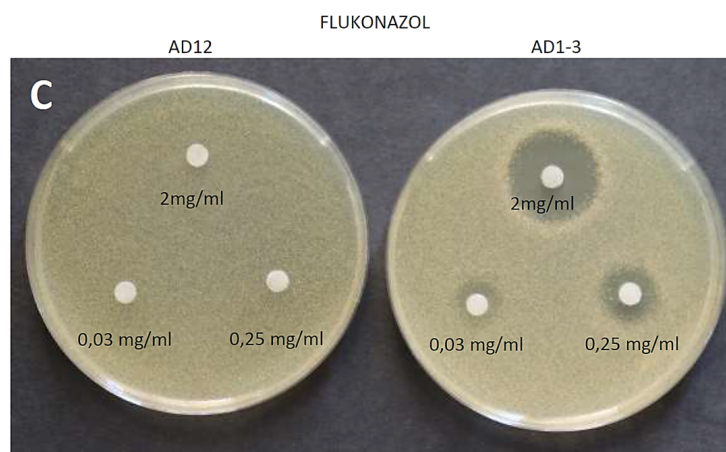
Aby bolo možné použiť diS-C₃(3) fluorescenčnú metódu pre štúdium vplyvu odlišných substituentov triazolov na ich schopnosť kompetitívne inhibovať transport sondy pumpou *ScPdr5p*, bolo potrebné overiť, že sú skutočne substrátmi pumpy. Ako vyplýva z porovnania veľkosti inhibičných zón buniek AD12 a AD1-3 vzniknutých účinkom ravukonazolu (obr. 3.6a), vorikonazolu (obr. 3.6b) a flukonazolu (obr. 3.6c), ktoré boli aplikované na terčik z troch rôzne koncentrovaných zásobných roztokov, sú všetky tri azoly substrátmi pumpy *ScPdr5p*. Inhibičné zóny u buniek AD1-3 (hlavne u najvyššej použitej koncentracii azolov) sú totiž výrazne väčšie ako u buniek AD12, u ktorých je inhibičná účinnosť azolov výrazne znížená vďaka aktívnemu odstraňovaniu azolov z buniek pumpou *ScPdr5p*.



(a)



(b)

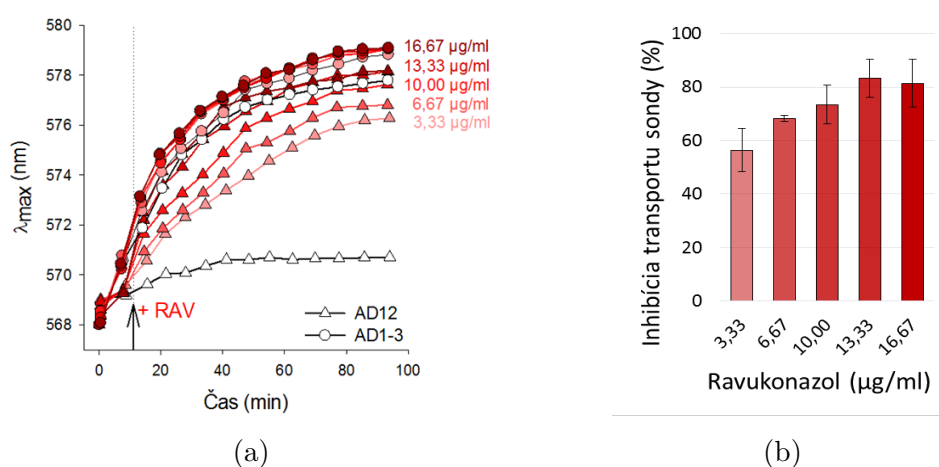


(c)

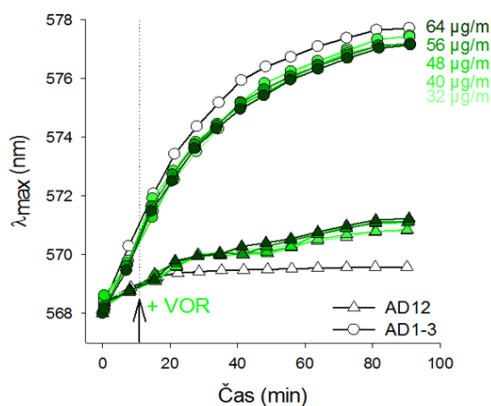
Obr. 3.6: Ravukonazol, vorikonazol a flukonazol sú substráty pumpy *ScPdr5p*. Inhibičné zóny buniek AD12 a AD1-3 vytvorené po aplikácii 3 μ l zásobných roztokov (a) ravukonazolu, (b) vorikonazolu a (c) flukonazolu. Použitá koncentrácia zásobného roztoku je uvedená pri terčíku na obrázkoch.

3.3.2 Určenie inhibičného účinku študovaných triazolov na transport sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p a ich vzájomná kompetícia o transport pumpu ScPdr5p

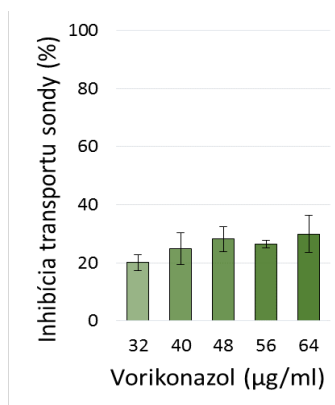
Pri meraní koncentračne závislého inhibičného účinku testovaných azolov na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p sme zistili, že ich schopnosť kompetovať so sondou o transport sa výrazne líši. Zatiaľ čo rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p sprostredkovaný ravukonazolom činí u saturačných koncentráciách ~80 %, obr. 3.7, u vorikonazolu iba ~30 % (aj pri koncentráciách cca 3x vyšších ako u ravukonazolu), obr. 3.8, a u flukonazolu sme inhibíciu pozorovali prakticky nulovú, obr. 3.9.



Obr. 3.7: Inhibičný účinok ravukonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný ravukonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní ravukonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané zo štyroch nezávislých experimentov.

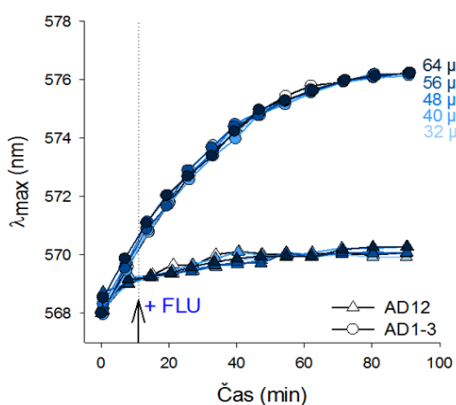


(a)

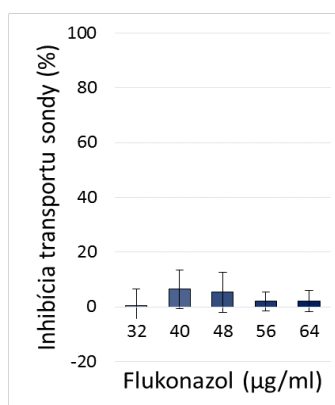


(b)

Obr. 3.8: Inhibičný účinok vorikonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný vorikonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní vorikonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.



(a)

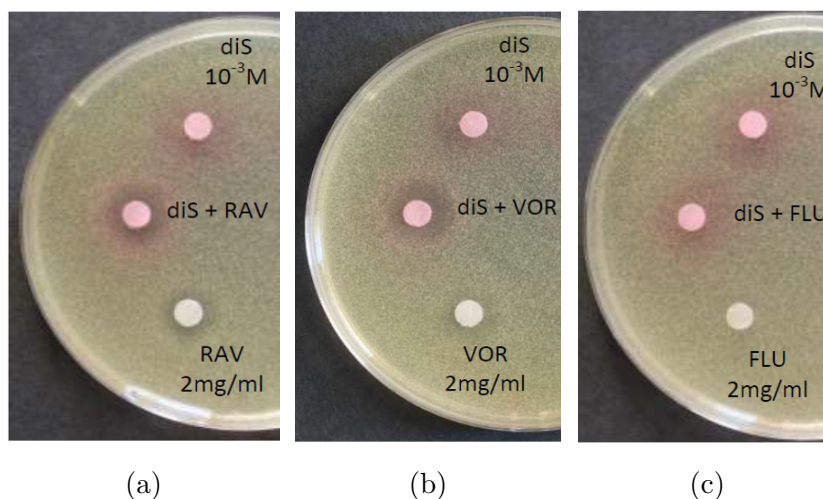


(b)

Obr. 3.9: Inhibičný účinok flukonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný flukonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní flukonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.

Rozdiely v schopnosti jednotlivých azolov kompetovať so sondou diS-C₃(3) o transport pumpou ScPdr5p stanovený pomocou fluorescenčnej metódy sme preukázali taktiež pomocou zónového testu, obr. 3.10. Iba po aplikácii ravikonazolu alebo vorikonazolu na jeden terčík spoločne so sondou dochádza u buniek AD12 k zväčšeniu veľkosti inhibičnej zóny v porovnaní so zónami vytvorenými v prí-

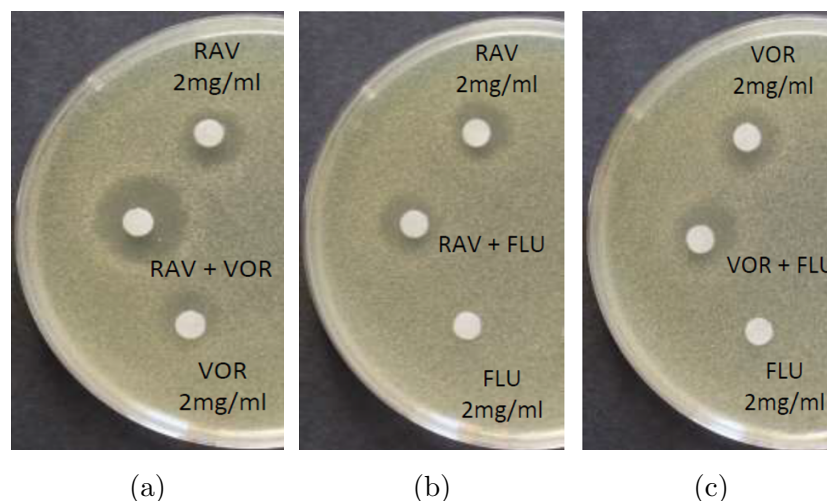
tomnosti samotného ravukonazolu/vorikonazolu alebo sondy, obr. 3.10a, 3.10b. V prípade flukonazolu nie je zväčšenie zóny po pridaní oboch substrátov na jeden terčik patrné, obr. 3.10c.



Obr. 3.10: **Kompetícia triazolov s fluorescenčnou sondou diS-C₃(3) o transport pumpou *ScPdr5p*.** Porovnanie inhibičných zón u buniek AD12 po pridaní triazolu a sondy na jeden terčik v porovnaní s pridaním samotného triazolu alebo sondy. (a) Pre ravukonazol, (b) pre vorikonazol a (c) pre flukonazol. Použité koncentrácie sú uvedené pri terčíkoch na jednotlivých obrázkoch.

Ako zhodne ukazujú výsledky fluorescenčného (obr. 3.9) a zónového testu (obr. 3.10c), flukonazol prakticky nekompetuje so sondou diS-C₃(3) o transport pumpou *ScPdr5p*. Nemôžeme ale vylúčiť, že by pri použití dramaticky vyšších koncentrácií mohla byť kompetícia pozorovaná, čo by bolo dôsledkom veľmi nízkej afinity flukonazolu k väzbovému miestu, či miestam vo väzbovej kapse *ScPdr5p*. Je ale nutné mať stále na pamäti, že flukonazol je substrátom tejto pumpy, viď obr. 3.6c, a teda musí interagovať aspoň s jedným väzbovým miestom. Ďalej je potrebné zdôrazniť, že u flukonazolu sú iba tri rôzne skupiny, ktoré sa môžu tejto interakcie zúčastňovať. Konkrétne sa jedná o 1,2,4-triazol, ktorý je v molekule flukonazolu zastúpený dvakrát, o hydroxylovú skupinu propán-2-olu a o 1,3-difluorobenzén, viď obr. 3.5. Samozrejme sa všetky tieto skupiny nachádzajú taktiež v molekule vorikonazolu a ravukonazolu a aj u nich by aspoň niektorá z nich mala byť zodpovedná za väzbu do väzbovej kapsy. Znamená to teda, že by aplikácia dvoch rôznych azolov na jeden terčik v zónovom teste mala viesť k zväčšeniu inhibičnej zóny oproti zónam vytvorených účinkom samotných azolov.

Spravili sme preto experiment pomocou zónového testu, v ktorom sme sledovali rôzne kombinácie azolov pridaných na jeden terčik, tj. ravukonazol s vorikonazolom, ravukonazol s flukonazolom a vorikonazol s flukonazolom, obr. 3.11. Ako vyplýva z obr. 3.11a, ravukonazol a vorikonazol spolu kompetujú, ale ani jeden z nich nekompetuje s flukonazolom, obr. 3.11b, 3.11c.



Obr. 3.11: **Vzájomná kompetícia študovaných triazolov o transport pumpou *ScPdr5p***. Porovnanie inhibičných zón u buniek AD12 po pridaní dvoch triazolov na jeden terčik v porovnaní s ich samostatným pridaním. (a) Pre ravukonazol s vorikonazolom, (b) pre ravukonazol s flukonazolom a (c) pre vorikonazol s flukonazolom. Použité koncentrácie sú uvedené pri terčikoch na jednotlivých obrázkoch.

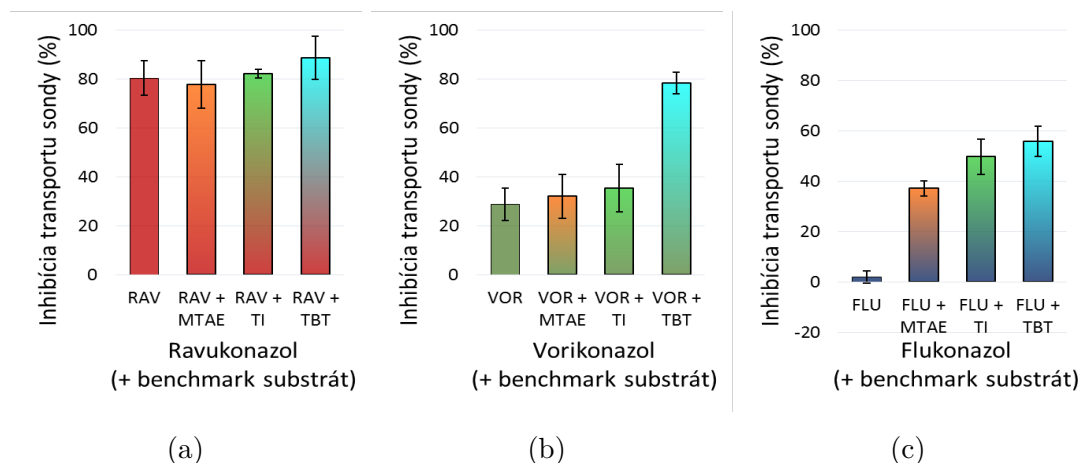
Hoci by možným vysvetlením neexistujúcej kompetície flukonazolu so sondou, obr. 3.9 a obr. 3.10c, mohlo byť to, že sa flukonazol viaže do doposiaľ neidentifikovaného väzbového miesta (miesto 4), do ktorého sa neviaže sonda, môžeme toto vysvetlenie vzhľadom k jeho nepozorovanej kompetícii s ravukonazolom a vorikonazolom, obr. 3.11b, 3.11c, vylúčiť. Logicky by sa totiž do toho miesta mali viazať ako ravukonazol, tak vorikonazol (vďaka identickým skupinám v molekule, viď obr. 3.5) a mala by byť pozorovaná ich kompetícia s flukonazolom.

Reálnejším vysvetlením, ktoré je podporované skutočnosťou, že ravukonazol aj vorikonazol vykazujú ďaleko väčší inhibičný efekt na transport sondy diS-C₃(3) pumpou *ScPdr5p* ako flukonazol, viď obr. 3.7, 3.8, 3.9, je, že ako ravukonazol, tak vorikonazol sa viažu taktiež do ďalšieho väzbového miesta alebo miest vo väzbovej kapse (napr. v dôsledku interakcie benzonitrilu u ravukonazolu a 5-fluoropyrimidínu u vorikonazolu). Touto väzbou tak môže dôjsť k orientácii substrátu vo väzbovej kapse, ktorá umožní „priamu“ interakciu triazolovej a/alebo difluorobenzénovej skupiny s príslušným väzbovým miestom. To by umožnilo pozorovať ich kompetíciu so sondou o transport týmto väzbovým miestom pri výrazne nižších koncentráciách ako u flukonazolu. Rovnako nemôžeme vylúčiť, že CH₃ skupina, viď obr. 3.5, hrá pri väzbe ravukonazolu a vorikonazolu do väzbovej kapsy určitú úlohu.

3.3.3 Štúdium väzby triazolov do väzbovej kapsy *ScPdr5p* pomocou benchmark substrátov využitím diS-C₃(3) fluorescenčnej metódy

Aby sme podporili našu hypotézu o väzbe ravukonazolu a vorikonazolu do viac ako jedného väzbového miesta, spravili sme prvé orientačné experimenty, v ktorých sme využili fluorescenčný prístup k štúdiu väzby azolov do väzbovej kapsy *ScPdr5p* pomocou benchmark substrátov zavedený v prvej časti diplomovej práce 3.2. V týchto experimentoch sme triazoly pridávali k suspenzii buniek 10 minút pred pridaním sondy a v cca 11. minúte farbenia sme aplikovali benchmark substráty v saturačnej koncentrácii. Ako je patrné z obr. 3.12a, pridanie benchmark substrátov k bunkám vystaveným účinku ravukonazolu nespôsobuje žiadne výrazné rozdiely v rozsahu inhibície transportu sondy, čo indikuje, že sa ravukonazol môže viazať do všetkých troch väzbových miest vo väzbovej kapse *ScPdr5p*. U vorikonazolu, obr. 3.12b, je výrazný nárast inhibície sprevádzaný iba po pridaní TBT, čo značí, že sa tento azol neviaže do miesta 3. V prípade flukonazolu, obr. 3.12c, je pozorovaný po pridaní všetkých troch benchmark substrátov nárast inhibície na úroveň odpovedajúcu rozsahu inhibície transportu sondy po pridaní samotných benchmark substrátov, viď obr. 3.1. Toto zistenie vzhľadom k predchádzajúcim výsledkom nie je prekvapivé a ako už bolo diskutované, súvisí s nedostatočnou koncentraciou flukonazolu.

Pre úplné objasnenie väzbových miest, do ktorých sa testované triazoly viažu, bude v budúcnosti samozrejme potrebné použiť zónové testy a v prípade flukonazolu taktiež vyskúšať výrazne vyššie koncentrácie. Molekulárne dynamické simulačné experimenty by taktiež mohli výraznou mierou prispieť k pochopeniu interakcie týchto substrátov s väzbovými miestami v *ScPdr5p*.



Obr. 3.12: Ravukonazol sa môže viazať do všetkých troch väzbových miest vo väzbovej kapse *ScPdr5p*, vorikonazol sa neviaže do miesta 3. Rozsah inhibície transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po pridaní (a) ravukonazolu v saturačnej koncentrácii $13,33 \mu\text{M}$ a následne jednotlivých benchmark substrátov v saturačných koncentráciách ($15 \mu\text{M}$ MTAE, $30 \mu\text{M}$ TI a $30 \mu\text{M}$ TBT), (b) vorikonazolu v saturačnej koncentrácii $64 \mu\text{M}$ a (c) flukonazolu v koncentrácii $64 \mu\text{M}$. Rozsah inhibície bol určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.

Záver

Zvyšujúci sa výskyt rezistentných kmeňov kvasiniek voči liečbe antimykotikami vedie k čoraz väčšiemu záujmu o vyvíjanie nových liečiv, voči ktorým by sa znížil výskyt rezistencie patogénnych mikroorganizmov. Hlavnou náplňou tejto práce bolo rozšíriť doposiaľ známe poznatky o väzbovej kapse MDR pumpy Pdr5p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a tým prispieť k vývoju nových liečiv.

Využívali sme hlavne diS-C₃(3) fluorescenčnú metódu, umožňujúcu sledovať aktivitu a zmeny membránového potenciálu MDR púmp a tým účinok inhibítorov v reálnom čase. Fluorescenčná metóda farbiacich kriviek bola doplnená biologickými zónovými testami, ktoré z porovnania veľkostí inhibičných zón umožňujú zistiť, či je skúmaná látka substrátom pumpy a navyše, či dva rôzne substráty kompetujú o transport pumpou.

V prvej časti tejto práce sme overili, že pomocou benchmark substrátov, viažúcich sa selektívne do jedného väzbového miesta vo väzbovej kapse pumpy ScPdr5p, je možné k identifikácii väzbových miest, do ktorých sa substráty viažu, používať metódu farbiacich kriviek. Najprv sme ukázali, že benchmark substráty MTAE, TI a TBT spôsobujú saturačnú inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p a že postupné pridanie všetkých troch benchmark substrátov spôsobuje úplnú inhibíciu. Následne sme diS-C₃(3) fluorescenčnou metódou pomocou benchmark substrátov potvrdili, že klotrimazol aj bifonazol sa viažu do známych väzbových miest.

V druhej časti sme k funkčnej charakterizácii pumpy ScPdr5p použili tri rôzne triazolové deriváty, ravukonazol, vorikonazol a flukonazol, ktoré sú štruktúrnymi analógmi. Pomocou zónových testov sme zistili, že všetky tri študované triazoly sú substrátmi pumpy ScPdr5p.

Následne bol pomocou metódy farbiacich kriviek určený inhibičný účinok jednotlivých triazolov. Ich schopnosť kompetovať so sondou diS-C₃(3) je odlišná, u ravukonazolu je najvyššia ~80 %, u vorikonazolu ~30 % a u flukonazolu v použitej koncentrácii je prakticky nulová. Zistené rozdiely v schopnosti kompetície týchto triazolov so sondou boli podporené taktiež zónovými testami, ktorými boli sledované aj ich vzájomné kompetície. Zistili sme, že ravukonazol kompetuje s vorikonazolom o transport pumpou ScPdr5p, ale ani jeden z nich nekompetuje s flukonazolom.

Ďalej sme pomocou diS-C₃(3) fluorescenčnej metódy využitím benchmark substrátov zistili, že ravukonazol sa môže viazať do všetkých troch identifikovaných väzbových miest vo väzbovej kapse pumpy ScPdr5p, vorikonazol sa neviaže do miesta 3 a u flukonazolu v použitých koncentráciách nebola pozorovaná väzba do žiadneho z väzbových miest.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Marcin Kolaczowski and André Goffeau. Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacology & therapeutics*, 76(1-3):219–242, 1997.
- [2] Theodore C. White, Kieren A. Marr, and Raleigh A. Bowden. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 11(2):382–402, 1998.
- [3] Iva Jančíková. *Studium transportních systémů mikroorganismů*. PhD thesis, Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, 2018.
- [4] Christopher F. Higgins. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137):749–757, 2007.
- [5] Pei-Lan Shao, Li-Min Huang, and Po-Ren Hsueh. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30(6):487–495, 2007.
- [6] Richard D. Cannon, Erwin Lamping, Ann R. Holmes, Kyoko Niimi, Koji Tanabe, Masakazu Niimi, and Brian C. Monk. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. *Microbiology*, 153(10):3211–3217, 2007.
- [7] Robert A. Akins. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical mycology*, 43(4):285–318, 2005.
- [8] Lucie Krausová, Jiří Grim, and Petr Pávek. Azolová antimykotika: mechanismy lékových interakcí. *Klin Farmakol Farm*, 23(2):86–89, 2009.
- [9] Mahmoud A. Ghannoum and Louis B. Rice. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4):501–517, 1999.
- [10] Stephanie S. Pao, Ian T. Paulsen, and Milton H. Saier Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1):1–34, 1998.
- [11] Anke Licht and Erwin Schneider. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology*, 6(5):785–801, 2011.
- [12] Rajendra Prasad and Snehlata Panwar. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Current science*, pages 62–73, 2004.

- [13] Christopher F. Higgins and Kenneth J. Linton. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*, 11(10):918–926, 2004.
- [14] Helmut Jungwirth and Karl Kuchler. Yeast ABC transporters—a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS letters*, 580(4):1131–1138, 2006.
- [15] Jitender Mehla, Robert Ernst, Rachel Moore, Adina Wakschlag, Mary Kate Marquis, Suresh V. Ambudkar, and John Golin. Evidence for a molecular diode-based mechanism in a multispecific ATP-binding cassette (ABC) exporter: Ser-1368 as a gatekeeping residue in the yeast multidrug transporter Pdr5. *Journal of Biological Chemistry*, 289(38):26597–26606, 2014.
- [16] Mark F. Rosenberg, Giles Velarde, Robert C. Ford, Catherine Martin, Georgina Berridge, Ian D. Kerr, Richard Callaghan, Andreas Schmidlin, Carol Wooding, Kenneth J. Linton, et al. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *The EMBO Journal*, 20(20):5615–5625, 2001.
- [17] Catherine Martin, Christopher F. Higgins, and Richard Callaghan. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 40(51):15733–15742, 2001.
- [18] Lea F. Payen, Mian Gao, Christopher J. Westlake, Susan PC. Cole, and Roger G. Deeley. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(40):38537–38547, 2003.
- [19] Xiao Bu, Jing-Yuan Lin, Jing Cheng, Dong Yang, Chang-Qing Duan, Mattheos Koffas, and Guo-Liang Yan. Engineering endogenous ABC transporter with improving ATP supply and membrane flexibility enhances the secretion of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels*, 13(1):1–14, 2020.
- [20] Jean François, Pilar Eraso, and Carlos Gancedo. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2, 6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European journal of biochemistry*, 164(2):369–373, 1987.
- [21] Paul K. Herman. Stationary phase in yeast. *Current opinion in microbiology*, 5(6):602–607, 2002.
- [22] Johannes G. De Nobel, Frans M. Klis, Jan Priem, Teun Munnik, and Herman Van Den Ende. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6(6):491–499, 1990.

- [23] Rajendra Prasad and Andre Goffeau. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annual review of microbiology*, 66:39–63, 2012.
- [24] Hubert Wolfger, Yasmine M. Mammun, and Karl Kuchler. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Research in microbiology*, 152(3-4):375–389, 2001.
- [25] John Golin, Zachary N. Kon, Chung-Pu Wu, Justin Martello, Leanne Hanson, Sherry Supernavage, Suresh V. Ambudkar, and Zuben E. Sauna. Complete inhibition of the Pdr5p multidrug efflux pump ATPase activity by its transport substrate clotrimazole suggests that GTP as well as ATP may be used as an energy source. *Biochemistry*, 46(45):13109–13119, 2007.
- [26] John Golin, Suresh V. Ambudkar, Michael M. Gottesman, Asif Dominic Habib, John Szczepanski, William Ziccardi, and Leopold May. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8):5963–5969, 2003.
- [27] Bruce Rogers, Anabelle Decottignies, Marcin Kolaczkowski, Elvira Carvajal, Elisabetta Balzi, and André Goffeau. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2):207–214, 2001.
- [28] Rogelio Lopes Brandão, Ieso M. Castro, Jomar B. Passos, Jacques R. Nicoli, and Johan M. Thevelein. Glucose-induced activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*, 138(8):1579–1586, 1992.
- [29] Diansheng Zhong, Li Xiong, Tongrui Liu, Xiuju Liu, Xiangguo Liu, Jing Chen, Shi-Yong Sun, Fadlo R. Khuri, Yaping Zong, Qinghua Zhou, et al. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35):23225–23233, 2009.
- [30] Jaromír Plášek and Karel Sigler. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 33(2):101–124, 1996.
- [31] Dana Gášková, Barbora Brodská, Petr Heřman, Jaroslav Večeř, Jan Malinský, Karel Sigler, Oldřich Benada, and Jaromír Plášek. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C₃(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(13):1189–1197, 1998.

- [32] D. Gášková, R. Čadek, R. Chaloupka, J. Plášek, and K. Sigler. Factors underlying membrane potential-dependent and-independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C₃(3) in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1511(1):74–79, 2001.
- [33] D. Gášková, B. Brodská, A. Holoubek, and K. Sigler. Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C₃(3) assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(5):575–584, 1999.
- [34] D. Gášková, R. Čadek, R. Chaloupka, V. Vacata, J. Gebel, and K. Sigler. Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C₃(3) fluorescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(8):931–937, 2002.
- [35] R. Čadek, K. Chládková, K. Sigler, and D. Gášková. Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1665(1-2):111–117, 2004.
- [36] J. Maláč, K. Sigler, and D. Gášková. Glucose-induced MDR pump resynthesis in respiring yeast cells depends on nutrient level. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1):138–141, 2005.
- [37] Iva Jančíková, Jakub Zahumenský, Yveta Gbelská, and Dana Gášková. Differences in the arrangement of the Pdr5p multidrug transporter binding pocket of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research*, 17(7), 2017.
- [38] Leanne Hanson, Leopold May, Pamela Tuma, James Keeven, Patrick Mehl, Michelle Ferenz, Suresh V. Ambudkar, and John Golin. The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter. *Biochemistry*, 44(28):9703–9713, 2005.
- [39] John Golin, Suresh V. Ambudkar, and Leopold May. The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates? *Biochemical and biophysical research communications*, 356(1):1–5, 2007.
- [40] Shawn A. Messer, Ronald N. Jones, and Thomas R. Fritsche. International Surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of clinical microbiology*, 44(5):1782–1787, 2006.
- [41] Lukáš Vel’as. *Sledování účinku medicínsky významných léčiv na aktivitu lidského P-glykoproteinu pomocí fluorescenčních sond*. Bachelor’s thesis, Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, 2015.

- [42] Claire Pascaud, Manuel Garrigos, and Stéphane Orłowski. Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochemical Journal*, 333(2):351–358, 1998.

Zoznam obrázkov

1.1	Hlavné príčiny rezistencie kvasiniek voči liekom. Prevzaté z [3]. . .	5
1.2	Lokalizácia membránových ABC proteínov v kvasinkovej bunke. N je jadro, V vakuola, ER endoplazmatické retikulum, GV Golgiho vezikuly, ES endozómy, M mitochondrie a P je peroxizóm. Prevzaté z [14].	8
1.3	Priebeh transportu substrátu ABC pumpami v kvasinkovej bunke. (I) Naviazanie substrátu (červená guľôčka) z vnútra bunky do väzbového miesta TMD (označené fialovo). (II) Naviazanie oboch ATP do väzbových miest NBD (označené modro). (III) Dimerizácia NBD. Otvorenie väzbovej kapsy smerom von z bunky a uvoľnenie naviazaného substrátu. Hydrolýza ATP. (IV) Prechod proteínu do východzej polohy pre opätovné naviazanie liečiva. Prevzaté z [19].	9
1.4	Rastové fázy kvasinky <i>S. cerevisiae</i> v glukózovom médiu [21]. . . .	11
1.5	Schéma znázorňujúca absorpciu fotónu po ožiarení svetlom, relaxáciu do najnižšieho excitovaného singletného stavu a následné vyžiarovanie fluorescencie prechodom do základného stavu so zvýšenou vibračnou energiou (vľavo). Posun vlnovej dĺžky emisného spektra oproti vlnovej dĺžke excitácie (vpravo).	14
1.6	Štruktúrny vzorec potenciometrickej sondy diS-C ₃ (3).	14
1.7	Posun maxima a intenzity fluorescencie po naviazaní sondy diS-C ₃ (3) na makromolekuly v cytosóle bunky. Fluorescenčné spektrum voľnej sondy je označené zelenou a fluorescenčné spektrum viazanej sondy červenou farbou.	16
1.8	Farbiace krivky udávajúce závislosť polohy maxima fluorescencie na čase. Modrá farbiaca krivka prislúcha bunkám s vysokým membránovým potenciálom, žltá prislúcha bunkám s nízkym membránovým potenciálom v dôsledku vystavenia buniek stresoru interagujúceho s membránou. Ustavenie dynamickej rovnováhy je znázornené zvislou priamkou.	17
1.9	Schematické znázornenie bunky <i>S. cerevisiae</i> po pridaní sondy diS-C ₃ (3) a ďalšieho substrátu pumpy Pdr5p. Kmeň AD1-3 (vľavo): vstup sondy (červené guľôčky) do bunky ovplyvňuje $\Delta\Psi$. Kmeň AD12 (vpravo): kompetitívna inhibícia transportu sondy substrátom cez pumpu Pdr5p.	19
1.10	Vývoj farbiacich kriviek pre kmene AD1-3 a AD12 po pridaní substrátu.	19

2.1	Štruktúrne vzorce použitých imidazolových derivátov: (A) klotrimazol a (B) bifonazol.	23
2.2	Štruktúrne vzorce použitých triazolových derivátov: (A) ravukonazol, (B) vorikonazol a (C) flukonazol.	24
2.3	Štruktúrne vzorce použitých benchmark substrátov: (A) MTAE, (B) TI a (C) TBT.	24
3.1	MTAE, TI aj TBT spôsobujú saturačnú kompetitívnu inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. Porovnanie (a) nami získaných a (b) publikovaných [3, 37] závislostí rozsahu inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p na koncentrácii benchmark substrátov: (A) MTAE (miesto 1), (B) TI (miesto 2) a (C) TBT (miesto 3). V oboch prípadoch boli všetky benchmark substráty pridané v 20. minúte farbenia, rozsah inhibície transportu sondy bol určený z rovnice 1.2. V prípade (a) boli stredné hodnoty a smerodajné odchýlky získané z dvoch nezávislých experimentov, v prípade (b) boli získané zo šiestich nezávislých experimentov. (b) Prevezaté z [37].	30
3.2	Postupné pridanie MTAE, TI a TBT spôsobujú úplnú inhibíciu transportu sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. Porovnanie (a) nami získaných a (b) publikovaných [3, 37] farbiacich kriviek kmeňov AD12 a AD1-3 po postupnom pridaní všetkých troch benchmark substrátov. Šípkami sú vyznačené časy ich pridania. V oboch prípadoch boli použité rovnaké saturačné koncentrácie: 15 μM MTAE, 30 μM TI a 30 μM TBT. Prázdne symboly reprezentujú farbenie kontrolných buniek bez pridania benchmark substrátov. K úplnej inhibícii dochádza nezávisle na poradí pridávaných benchmark substrátov, ako bolo ukázané aj v [3, 37]. (b) Prevezaté z [37].	31
3.3	Zvýšenie inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní TBT k bunkám po aplikácii klotrimazolu. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3 po pridaní klotrimazolu v saturačnej koncentrácii 20 μM (fialová), klotrimazolu 20 μM a následne MTAE 15 μM (oranžová), klotrimazolu 20 μM a TI 30 μM (zelená) a klotrimazolu 20 μM a TBT 30 μM (modrá). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní klotrimazolu a následne jednotlivých benchmark substrátov určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z dvoch nezávislých experimentov.	33

3.4	Zvýšenie inhibície transportu sondy pumpu <i>ScPdr5p</i> po pridaní TI k bunkám po aplikácii bifonazolu. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3 po pridaní bifonazolu v saturačnej koncentrácii 12 μ M (žltá), bifonazolu 12 μ M a následne MTAE 15 μ M (oranžová), bifonazolu 12 μ M a TI 30 μ M (zelená) a bifonazolu 12 μ M a TBT 30 μ M (modrá). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou <i>ScPdr5p</i> po pridaní bifonazolu a následne jednotlivých benchmark substrátov určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z dvoch nezávislých experimentov.	33
3.5	Flukonazol, vorikonazol a ravukonazol sú štruktúrnymi analógmi. Žltou farbou sú vyznačené spoločné časti triazolov obsahujúce 1,2,4-triazol, propán-2-ol (hydroxylová skupina) a 1,3-difluorobenzén. Červenou sú označené odlišné zložky. U flukonazolu sa jedná o 1,2,4-triazol, u vorikonazolu o 5-fluoropyrimidín a metylovú skupinu a u ravukonazolu, ktorý má taktiež naviazanú metylovú skupinu, je substituentom 4-(1,3-thiazol-4-yl)benzónitril.	34
3.6	Ravukonazol, vorikonazol a flukonazol sú substráty pumpy <i>ScPdr5p</i>. Inhibičné zóny buniek AD12 a AD1-3 vytvorené po aplikácii 3 μ l zásobných roztokov (a) ravukonazolu, (b) vorikonazolu a (c) flukonazolu. Použitá koncentrácia zásobného roztoku je uvedená pri terčiku na obrázkoch.	35
3.7	Inhibičný účinok ravukonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou <i>ScPdr5p</i>. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný ravukonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou <i>ScPdr5p</i> po pridaní ravukonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané zo štyroch nezávislých experimentov.	36
3.8	Inhibičný účinok vorikonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou <i>ScPdr5p</i>. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný vorikonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou <i>ScPdr5p</i> po pridaní vorikonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.	37

3.9	Inhibičný účinok flukonazolu na transport fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p. (a) Farbiace krivky buniek AD12 a AD1-3, ku ktorým bol v 11. minúte farbenia pridaný flukonazol v rôznych koncentráciách (uvedené v obrázku). (b) Príslušný rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní flukonazolu určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.	37
3.10	Kompetícia triazolov s fluorescenčnou sondou diS-C₃(3) o transport pumpou ScPdr5p. Porovnanie inhibičných zón u buniek AD12 po pridaní triazolu a sondy na jeden terčik v porovnaní s pridaním samotného triazolu alebo sondy. (a) Pre ravukonazol, (b) pre vorikonazol a (c) pre flukonazol. Použité koncentrácie sú uvedené pri terčikoch na jednotlivých obrázkoch.	38
3.11	Vzájomná kompetícia študovaných triazolov o transport pumpou ScPdr5p. Porovnanie inhibičných zón u buniek AD12 po pridaní dvoch triazolov na jeden terčik v porovnaní s ich samostatným pridaním. (a) Pre ravukonazol s vorikonazolom, (b) pre ravukonazol s flukonazolom a (c) pre vorikonazol s flukonazolom. Použité koncentrácie sú uvedené pri terčikoch na jednotlivých obrázkoch.	39
3.12	Ravukonazol sa môže viazať do všetkých troch väzbových miest vo väzbovej kapse ScPdr5p, vorikonazol sa neviaže do miesta 3. Rozsah inhibície transportu sondy pumpou ScPdr5p po pridaní (a) ravukonazolu v saturačnej koncentrácii 13,33 μM a následne jednotlivých benchmark substrátov v saturačných koncentráciách (15 μM MTAE, 30 μM TI a 30 μM TBT), (b) vorikonazolu v saturačnej koncentrácii 64 μM a (c) flukonazolu v koncentrácii 64 μM. Rozsah inhibície bol určený z rovnice 1.2. Stredné hodnoty a smerodajné odchýlky boli získané z troch nezávislých experimentov.	41

Zoznam tabuliek

2.1	Použité kmene kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	21
2.2	Zloženie zásobnej kvasinkovej kultúry.	21
2.3	Zloženie YPD agaru 1 % (2 %).	22
2.4	Zloženie YPD média.	22
2.5	Zloženie C-P pufru 10 mM.	23
2.6	Prehľad použitých substrátov.	24

Zoznam použitých skratiek

ABC ATP-Binding Cassette. 7, 8, 9, 11, 27, 44, 45, 46, 48

ADP Adenosine DiPhosphate. 9

ALDp AdrenoLeukoDystrophy protein. 7

ATP Adenosine TriPhosphate. 3, 7, 8, 9, 12, 13, 43, 44, 45, 48

C-P Citrate-Phosphate. 23, 26, 52

diS-C₃(3) 3,3'-DipropylThiaCarbocyanine iodide. 1, 2, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 48, 49, 50, 51

DMF DiMethylFormamide. 24

DMSO DiMethylSulfOxid. 24

HIV Human Immunodeficiency Virus. 4

MDR MultiDrug Resistance. 1, 2, 5, 6, 7, 11, 14, 17, 18, 26, 27, 34, 42, 46

MFS Major Facilitators Superfamily. 7

MTAE 2-(Methyl-Trityl-Amino)-Ethanol. 1, 20, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 41, 42, 49, 50, 51

NBD Nucleotide-Binding Domain. 7, 8, 9, 11, 48

OD Optical Density. 10, 22

PDR Pleiotropic Drug Resistance. 7, 11, 27

PRP/CFTR Multidrug Resistance-associated Proteins/Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator. 7

RLI RNase L Inhibitor. 7

S. cerevisiae Saccharomyces cerevisiae. 1, 3, 5, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 42, 44, 45, 46, 48, 52

TBT TetraButylTin. 1, 20, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 42, 49, 50, 51

TI TritylImidazole. 1, 20, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 41, 42, 49, 50, 51

TMD TransMembrane Domain. 7, 8, 9, 11, 27, 48

UV UltraViolet. 24

YEF3 Yeast Elongation Factor 3. 7

YPD Yeast extract Peptone Dextrose. 22, 26, 52