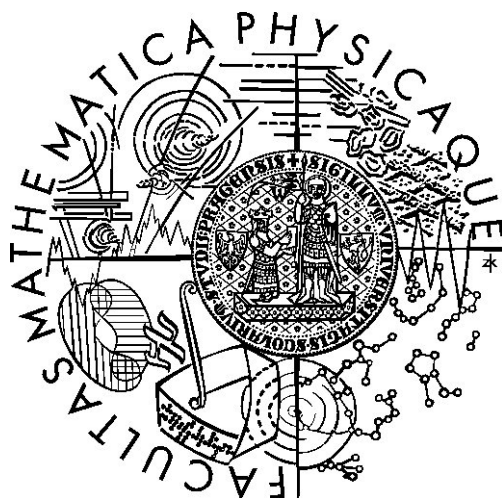


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Lucie Surá

Studium transportních proteinů z rodiny Nramp

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, biofyzika a chemická fyzika

2009

Ráda bych vyjádřila svou vděčnost vedoucímu své práce RNDr. Romanovi Chaloupkovi, Ph.D. za zodpovědné vedení práce a za podněty, které vedly k vylepšení textu. Děkuji také RNDr. Evě Urbánkové, Ph.D. za cenné rady a pomoc v laboratoři. Oba mají zásluhu na tom, že na oddělení biofyziky panuje příjemné a tvůrčí pracovní prostředí. Báře, Ince, Ivě a Věře bych ráda poděkovala za ochotu s jakou mi vždy, když bylo třeba, pomohly v laboratoři. Za podporu morální, psychickou i finanční pak děkuji ještě rodičům, Vlastovi a Ondrovi.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne

Lucie Surá

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část	8
2.1	Přenos látek přes biologické membrány	8
2.2	Rodina membránových transportních proteinů Nramp	9
2.3	Eukaryotní homology Nramp	10
2.4	Prokaryotní homology Nramp	11
2.5	Transportní protein MntH bakterie <i>E. coli</i> (EcoliA)	13
2.6	Přenašeče versus kanály	16
3	Experimentální metody a materiál	19
3.1	Fluorescenční měření	19
3.1.1	pHluorin	19
3.1.2	Měření vnitrobuněčného pH	21
3.2	Kvantifikace transportu protonů proteinem MntH	22
3.2.1	Tradiční způsob zpracování dat	22
3.2.2	Zpracování dat přepočtem přes pufráční kapacitu	22
3.2.3	Měření vnitrobuněčné pufráční kapacity	23
3.3	Arrheniova aktivační energie	24
3.4	Měření kinetiky odpřaženého transportu protonů	25
3.5	Použité roztoky	26
3.6	Použité bakteriální kmeny	27
3.7	Pěstování bakterií	27
4	Výsledky a diskuse	29
4.1	Odpřažený transport protonů divokým typem MntH	29
4.2	Vliv jednobodových mutací na odpřažený transport protonů	32
4.2.1	Tradiční způsob zpracování dat	34
4.2.2	Zpracování dat přepočtem přes pufráční kapacitu	36

4.3	Aktivační energie odpřaženého transportu protonů	39
4.4	Vliv iontů na transport protonů divokým typem MntH	43
4.4.1	21 °C – tradiční způsob zpracování dat	45
4.4.2	21 °C – zpracování dat přepočtem přes pufrační kapacitu	46
4.4.3	31 °C – tradiční způsob zpracování dat	47
4.4.4	31 °C – zpracování dat přepočtem přes pufrační kapacitu	49
4.5	Možnost pozorovat odpřažený transport protonů je souhrou více faktorů	55
5	Závěr	57
	Seznam zkratk	59
	Literatura	60

Název práce: Studium transportních proteinů z rodiny Nramp

Autor: Lucie Surá

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

e-mail vedoucího: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstrakt: Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) je funkčně konzervovaná rodina transportních proteinů, které využívají protonmotivní sílu k přenosu dvojmocných kovových iontů přes membránu. V předkládané práci byly zkoumány transportní vlastnosti prokaryotního Nramp homologu – MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) bakterie *Escherichia coli*. Transport protonů přes MntH byl sledován pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (pHluorinu) citlivého na změny pH. Nalezli jsme experimentální podmínky, které umožnily sledovat odpřažený transport H^+ přes MntH. Odpřažený transport H^+ byl dříve popsán u eukaryotních Nramp proteinů, avšak toto je vůbec poprvé, kdy byl pozorován u prokaryotního homologu. Zjistili jsme, že tento odpřažený transport H^+ je závislý na pH a citlivý na teplotu. Odpřažený transport H^+ je také ovlivňován specifickými jednobodovými mutacemi funkčně důležitých reziduí Asp³⁴, His²¹¹ a Asn⁴⁰¹. Druhá část práce se zaměřila na vliv dvojmocných iontů, které nejsou substrátem MntH, na transportní vlastnosti MntH. Ukázali jsme, že přítomnost většího množství vápníku nebo hořčíku vede k zesílení transportu H^+ indukovaného kovem, na odpřažený transport H^+ působí vápník naopak jako inhibitor.

Klíčová slova: MntH, Nramp, membránový transportní protein, dvojmocné kovové ionty, vápník

Title: Study of transport proteins of the Nramp family

Author: Lucie Surá

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstract: The Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (Nramp) form functionally conserved family of proton-dependent divalent metal ion transporters. In the present study, we investigated transport properties of a prokaryotic Nramp homolog – MntH transporter from *Escherichia coli*. H^+ transport mediated by MntH was monitored in a bacterial model system using pH-sensitive green fluorescent protein (pHluorin). Our experimental conditions enabled us to observe an uncoupled H^+ transport mediated by MntH. Uncoupled H^+ flux had been previously described in eukaryotic Nramp proteins, nevertheless this is the first observation of this phenomenon in a prokaryotic homolog. We demonstrated that the uncoupled H^+ transport is pH- and temperature- dependent. The uncoupled transport H^+ is also affected by specific single-point mutations at functionally important residues Asp³⁴, His²¹¹ and Asn⁴⁰¹. The second part of the work focused on effect of different ions, which are not MntH substrates, on transport properties of MntH. It was shown that addition of excess calcium or magnesium resulted in increase of H^+ transport induced by divalent metal ions, but on the other hand our data suggest that calcium inhibits uncoupled H^+ transport.

Keywords: MntH, Nramp, membrane transport protein, divalent metal ions, calcium

Kapitola 1

Úvod

Rodina membránových transportních proteinů Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) hraje důležitou roli v homeostázi dvojmocných kovových iontů v řadě organismů. Velká pozornost je věnována eukaryotním zástupcům této rodiny, protože jejich aktivita souvisí se schopností organismu vzdorovat infekčním onemocněním [1]. Pochopení mechanismu, jakým proteiny Nramp fungují, by mohlo vést také k novým terapeutickým přístupům v léčbě neurologických onemocnění, jako jsou Alzheimerova či Parkinsonova choroba [2]. Zástupci rodiny Nramp jsou všeobecně považováni za symportní membránové proteiny přenášející přes membránu kovové ionty za využití elektrochemického gradientu protonů [3]. Námi studovaný prokaryotní protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) je považován za vhodný modelový systém ke studiu Nramp proteinů díky své sekvenční podobnosti s předkem eukaryotních proteinů této rodiny [4].

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu iontů (zejména vápníku) na kovem indukovaný transport protonů proteinem MntH bakterie *Escherichia coli*. Při hledání vhodného experimentálního prostředí pro uskutečnění tohoto měření jsme našli podmínky, ve kterém se nám daří pomocí spektroskopických metod sledovat odpřažený tok protonů proteinem MntH.

Teoretická část práce se zabývá obecněji membránovými transportními proteiny a jejich klasifikací, podrobněji potom zejména Nramp rodinou s důrazem na shrnutí známých skutečností o bakteriálních homolozích této rodiny. Rozebírá také nejnovější studie, které odhalily kanálu podobný mechanismus přenosu u transportních proteinů dříve řazených mezi přenašeče. Kapitola Experimentální metody a materiál vysvětluje postupy zvolené pro studium transportu protonů a také okolnosti, které vedly k odhalení experimentál-

ních podmínek vhodných pro sledování odpřaženého toku protonů. Kapitola Výsledky a diskuze se skládá ze dvou hlavních částí. V první prezentujeme výsledky měření odpřaženého transportu protonů divokým typem MntH a jeho vybranými jednobodovými mutacemi, včetně vyhodnocení aktivační energie transportu. Ve druhé se věnujeme problematice vlivu iontů na odpřažený i kadmiem indukovaný spřažený transport protonů divokým typem MntH. V závěrečné kapitole shrnujeme dosažené poznatky a nejpodstatnější závěry této práce.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Přenos látek přes biologické membrány

Buněčná membrána plní funkci přepážky, která může regulovat průchod molekul do a ven z buňky. Pro většinu hydrofilních molekul vytváří hydrofobní vnitřek lipidové dvojvrstvy účinnou bariéru. Přes lipidovou dvojvrstvu mohou volně procházet pouze malé hydrofobní molekuly (O_2 , CO_2 , N_2) nebo malé nenabitě polární molekuly (H_2O , glycerol, etanol) [5]. Většina ostatních látek prostupuje volnou difuzí přes membránu příliš pomalu a proto často hovoříme o tom, že je membrána pro tyto látky nepropustná. Pro buňku je životně důležité, aby byla schopna tyto látky (větší polární molekuly, ionty, nabitě molekuly...) přenášet přes membránu s dostatečnou rychlostí. Toto v buňce zajišťují membránové transportní proteiny, které procházejí skrz membránu a vytvářejí tak průchody pro specifické látky. Dle způsobu přenosu substrátu lze membránové transportní proteiny rozdělit na dvě hlavní skupiny a to přenašečové proteiny a kanály [5].

Rozdíl mezi přenašeči a kanály je jednak v mechanismu přenosu látek přes membránu, ale také v jejich selektivitě. Přenašečové proteiny vykazují vysokou selektivitu a často přenášejí pouze jeden typ molekuly. Transportovanou látku navážou na jedné straně membrány a po sérii konformačních změn ji uvolní na druhé straně membrány. Pokud je látka přenášena ve směru svého elektrochemického gradientu, jedná se o pasivní transport, který probíhá samovolně bez nutnosti dodávat energii. Při přenosu pouze jednoho substrátu hovoříme o uniportu. Na rozdíl od kanálů umí přenašeče spřáhnout přenos látky přes membránu s reakcí uvolňující energii a díky tomu uskutečňovat přenos látek proti jejich elektrochemickému gradientu. V takovém případě se

jedná o aktivní transport, který se dělí na primárně aktivní (využívá chemickou energii, např. hydrolýza ATP) a sekundárně aktivní (energie z elektrochemického gradientu). Sekundárně aktivní transport bývá označován jako kotransport. Přenos látky, která jde proti svému elektrochemickému gradientu, je při kotransportu spřažen s přenosem jiné látky, která jde naopak ve směru svého elektrochemického gradientu. Pokud jsou látky přenášeny přes membránu ve stejném směru hovoříme o symportu, pokud v opačném jedná se o antiport [5].

Kanály vytváří v membráně hydrofilní otvor různých velikostí. Velké kanály nacházejí své uplatnění v mezibuněčných spojích nebo ve vnějších membránách mitochondrií či chloroplastů. Na plazmatické membráně živočišných i rostlinných buněk lze nalézt úzké vysoce selektivní iontové kanály. Tyto kanály vykazují vysokou iontovou selektivitu, která závisí na průměru a tvaru kanálu a na rozmístění nabitých aminokyselin v jeho stěnách. Protože při přenosu substrátu nedochází k velkým konformačním změnám, rychlost přenosu skrz kanálové proteiny je až stokrát vyšší než pomocí přenašečových proteinů [6].

Kanály na rozdíl od přenašečů neumí uskutečňovat aktivní transport. Proto přenos látek přes membránu pomocí kanálů je vždy pasivní, uskutečňovaný ve směru elektrochemického gradientu dané látky. Některé kanálové proteiny jsou hradlovány. Hradlovaný kanál umí reagovat na specifický podnět tím, že se otevře. Takovými podněty mohou být změny membránového potenciálu, mechanický stres nebo navázání ligandu [5].

2.2 Rodina membránových transportních proteinů Nramp

Proteiny Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein), jinak také SLC11 (SoLute Carrier 11) tvoří rodinu membránových transportních proteinů, jejichž hlavní funkcí je transport dvojmocných kovových iontů (Me^{2+}) jako je Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} [8], Cu^{2+} , Cd^{2+} [9], Ni^{2+} , Pb^{2+} [10] přes membránu. Využívají k tomu energii uloženou v elektrochemickém gradientu protonů [3]. Jedná se tedy o sekundárně aktivní transportéry uskutečňující symport Me^{2+} s H^+ . Substrátem přenosu těchto přenašečových proteinů nejsou Mg^{2+} a Ca^{2+} . V databázi TCDB (Transport Classification Database) [11] nalezneme rodinu Nramp pod označením 2.A.55. Proteiny této rodiny byly popsány v celé řadě organismů od savců [1, 12], přes rostliny [13] a kvasinky [14]

až po bakterie [15, 16].

2.3 Eukaryotní homology Nramp

Jako první byly v roce 1992 naklonovány geny *SMF1* a *SMF2* kvasinek [14]. Ukázalo se, že *SMF1* a *SMF2* jsou zapojeny do odezvy organismu na stres způsobený nedostatkem Mn^{2+} a hrají důležitou roli v jeho příjmu.

Využitím Smf1p specifických protilátek bylo ukázáno, že Smf1p je lokalizován na plazmatické membráně kvasinek [8], kde umožňuje Mn^{2+} vstup do buňky. Buňky s deletovaným *SMF1* hromadí stejné množství Mn^{2+} jako buňky s funkčním Smf1p a navíc nevykazují vážnou poruchu v aktivitě enzymů využívajících mangan jako kofaktor. Smf1p proto nemůže být jediný transportní systém umožňující Mn^{2+} vstup do buňky [17], ale na akumulaci Mn^{2+} v buňce se pravděpodobně podílí i přenašeče jiných látek, např. jiných kovů. Tyto transportní systémy pro kovy jako jsou Fe^{2+} , Cu^{2+} či Zn^{2+} mají k Mn^{2+} nižší afinitu. Jejich podíl na příjmu Mn^{2+} buňkou je tedy závislý na koncentracích příslušných kovů ve vnějším prostředí [18].

Naopak buňky s nefunkčním Smf2p mají vážně porušenou schopnost Mn^{2+} hromadit a zpřístupňovat ho pro buněčné procesy. Smf2p je lokalizován uvnitř buňky a umožňuje odtok Mn^{2+} z vnitrobuněčných váček. Zdá se, že tyto váčky mohou představovat jakousi zásobárnu či přechodné úložiště pro kov směřující do Golgiho aparátu či mitochondrie [18].

Dalším zástupcem rodiny Nramp v kvasinkách je *SMF3*. Je exprimován na membráně vakuoly a je regulován pomocí Fe^{2+} . Jeho delece nemá vliv na příjem Mn^{2+} , což ukazuje na jeho úlohu při přenosu Fe^{2+} z vakuoly do cytosolu a na udržení celkové homeostáze Fe^{2+} v buňce [4, 19].

V roce 1993 se podařilo naklonovat myší gen zodpovědný za rezistenci vůči infekci mykobakterií [1], která způsobuje tuberkulózu. Protein kódovaný tímto genem byl nazván Nramp1. Exprese *NRAMP1* je přísně regulována a omezena pouze na fagocyty. Nramp1 je integrální membránový fosfoglykoprotein. Předpokládá se, že obsahuje dvanáct transmembránových segmentů a je exprimován na membránu váček patřících k endocytické dráze. Tyto váčky mohou fúzovat s membránou fagosomu [20]. Nramp1 přenáší Me^{2+} z fagosomu do cytoplazmy a tím omezuje přístup cizorodého mikroorganismu, pohlceného při fagocytóze, k životně důležitým živinám (jako je Fe^{2+} , Mn^{2+} a Co^{2+}), kterých je v lumenu fagosomu omezené množství [21]. Tím se Nramp1 stává jedním z obranných mechanismů organismu proti mikrobům [4].

Naopak *NRAMP2* (někdy označovaný též jako *DCT1* či *DMT1*) je exprimován na buněčný povrch různých buněk. Nramp2 můžeme také nalézt v brzkých [22] i pozdních endosomech [23] několika typů buněk. Nachází se například na apikální membráně buněk epitelu ledvin a dvanáctníku, kde zodpovídá za příjem Fe^{2+} z potravy [10]. Ukázalo se, že Nramp2 je hlavní systém střeva savců, který umožňuje příjem Fe^{2+} a který není založen na transferinu [21]. Mutace proteinu Nramp2 nebo snížená exprese *NRAMP2* způsobuje mykrocytární anemii [24]. Studie na oocytech drápatky (*Xenopus laevis*) ukázaly, že *NRAMP2* kóduje transportní systém závislý na protonmotivní síle s vysokou afinitou k Fe^{2+} [12], který funguje jako symportér protonů s širokou škálou substrátů, jako jsou Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} a další přechodové kovy [10].

Orthology *NRAMP1* a *NRAMP2* byly identifikovány již v řadě organismů včetně žab, ptáků a savců [4]. Proteiny rodiny Nramp mají pravděpodobně svůj původ v prokaryotních organismech. Jak v gram-pozitivních tak v gram-negativních bakteriích byl popsán protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter), který je funkčním homologem eukaryotních Nramp proteinů [25]. To ukazuje na možný přenos genu z endosymbiotické organely bakteriálního původu do jádra eukaryotní buňky. Právě proto je MntH z *E. coli* přináležející ke skupině MntH A zajímavý modelový systém rodiny Nramp, který může být využit při studiu mechanismu transportu této funkčně i sekvencně konzervované rodiny [4].

2.4 Prokaryotní homology Nramp

Pro příjem a výdej esenciálních kovů si bakterie vyvinuly sofistikovaný systém. Ten zahrnuje i transportní systémy pro chelátované nebo volné kovy [26]. Příjem železa je pro mikroby během infekce velmi důležitý, konkrétně pro vnitrobuněčné parasites, kteří se dostanou dovnitř makrofágů. Tam totiž hostitelský a patogenní organismus soupeří o stejnou vnitrobuněčnou zásobu dvojmocných kovových iontů [7, 27]. Makrofág používá kovové ionty pro syntézu toxických kyslíkových radikálů (oxidativní stres) a jako kofaktory pro detoxikativní systémy na svou obranu. Podobně, železo je esenciální živina pro růst intracelulárních mikrobů a dohromady s manganem je důležitým kofaktorem pro jejich enzymatické antioxidační obranné systémy [28].

Existuje několik recepčních systémů pro chelataci Fe^{3+} , jako je např. hem, které jsou pro růst patogenu důležité. U enterobakterií (čeleď bakterií, které jsou gram-negativní a většinou žijí v trávicím traktu obratlovců [29]) se tyto systémy skládají z receptoru na vnější membráně, který potřebuje energii,

aby umožnil vstup chelatovaného Fe^{3+} do periplazmy. Navíc je třeba dalšího ATP-dependentního transportního systému k následnému přenosu Fe^{3+} do cytoplazmy [30]. Naopak, rozpustné Fe^{2+} volně difunduje do periplazmatického prostoru a může být importováno do cytoplazmy jak hlavním ATP-dependentním vysoce afinitním FeoB systémem [30], tak také při nízké koncentraci Mg^{2+} pomocí H^+ -dependentního CorA systému [31, 32].

Systémy pro import Fe^{2+} do buňky hrají důležitou roli v mikrobiální patogenезi, a to jak v invazi, tak i ve vnitrobuněčném přežití a množení [33]. Při experimentech v 90. letech se ukázalo, že kromě známých systémů pro příjem Fe^{3+} a Fe^{2+} existuje ještě minimálně jeden důležitý transportér Fe^{2+} do buněk. Vědělo se totiž, že aby si bakterie zajistily příjem železa více způsoby, sekretují do svého okolí reduktasu železa ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) [34]. U mutantních buněk s pozměněným systémem pro příjem Fe^{3+} (*entB*, *tonB*) nebo Fe^{2+} (*feoB*) byla pozorována zvýšená sekrece extracelulární reduktasy železa. Toto ukázalo na existenci dalšího systému enterobakterií pro příjem Fe^{2+} , který bylo nutno identifikovat.

Makuimu a kol. [35] se na *E. coli* podařilo ukázat, že hledaným transportním systémem je funkční homolog eukaryotních Nramp proteinů, který pojmenovali MntH (Proton-dependent Manganese Transporter). Z jejich experimentů, kdy měřili množství radioaktivně značeného kovu (Mn^{2+} a Fe^{2+}) akumulovaného v buňce za určitou dobu, vyplynulo, že MntH vykazuje vyšší afinitu k Mn^{2+} než k Fe^{2+} . To proč tomu tak je, může být vyvozeno ze znalosti běžné koncentrace těchto kovů v organismu. V periferních tkáních i krvi je totiž železa 1000 krát více než manganu [36]. Vyšší afinita MntH k manganu patrně kompenzuje jeho nižší fyziologické koncentrace.

Stejně jako eukaryotní homology i MntH transportuje široké spektrum substrátů a umožňuje vnitrobuněčnou akumulaci různých dvojmocných kationtů kromě již zmíněného Fe^{2+} a Mn^{2+} také Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} a v menší míře také Ni^{2+} a Cu^{2+} [35]. Jeho schopnost transportu je závislá na protonmotivní síle stejně jako u eukaryotních proteinů Nramp. Ukazuje se, že správná činnost proteinu MntH u některých bakterií úzce souvisí s patogenitou, která je esenciálně závislá na enzymech využívajících Mn^{2+} [37]. Proteiny MntH jsou popsány v gram-negativních (*E. coli* [35], *Salmonella typhimurium* [38]) a také v gram-pozitivních bakteriích (*Mycobacterium tuberculosis* [25], *Staphylococcus aureus* [39]).

V prokaryotních organizmech byla pomocí detailní fylogenetické analýzy popsána existence tří skupin proteinů MntH (MntH A, B a C) [40]. Tyto skupiny vykazují značnou sekvenční rozmanitost, která může být důsledkem

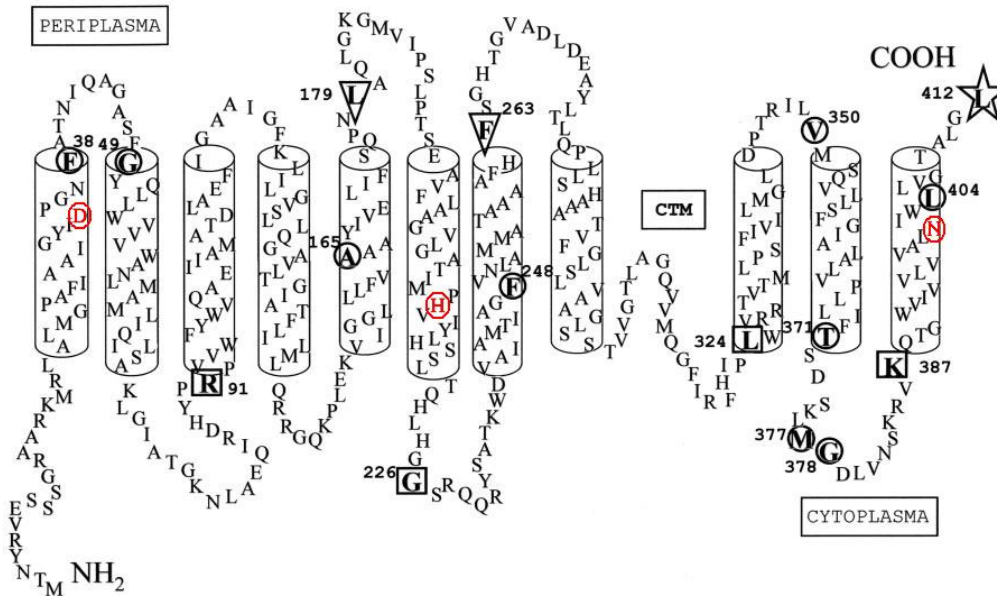
evolučního procesu. Některé výsledky studie [40] podporují hypotézu, která předpokládá, že eukaryotní proteiny rodiny Nramp vznikly horizontálním přenosem MntH A genu z prokaryot na eukaryota. Navíc se zdá, že poté došlo ke zpětnému přenosu eukaryotního Nramp genu na prokaryota, čímž vznikly proteiny MntH skupiny C.

2.5 Transportní protein MntH bakterie *E. coli* (EcoliA)

Gram-negativní bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) disponuje transportním proteinem označovaným v této práci jako EcoliA, který patří do MntH A skupiny. Byl popsán v roce 2000 jako membránový protein transportující dvojmocné kovové ionty s širokou škálou přenášených substrátů: Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} a Zn^{2+} [35]. Následně byla určena jeho transmembránová topologie [41, 42] a byly provedeny studie k určení vztahu mezi jeho strukturou a funkcí [43, 44, 45].

Transportní protein MntH je cílován na plazmatickou membránu *E. coli*, kde umožňuje průchod kovových kationtů z periplazmy do cytoplazmy za využití energie elektrochemického gradientu H^+ . K predikci transmembránové topologie EcoliA byly použity jak experimentální tak výpočetní metody. Pomocí několika metod založených na různých vzájemně komplementárních přístupech [46, 47, 48, 49] byla předpovězena topologie s N koncem v cytoplazmě, 11 transmembránovými segmenty a C koncem v periplazmě. Tato topologie je v dobré shodě s transmembránovou topologií eukaryotních homologů Nramp.

Ve studii [41] byly pro potvrzení této výpočtem předpovězené struktury použity enzymy schopné ukázat cytoplazmatické respektive periplazmatické umístění. Aktivita těchto enzymů souvisí se stranou membrány, na které se nachází. Proteiny vzešlé z inzerce Blam (β -laktamasa) či z fúze s Cat (chloramfenikol acetyltransferasa) pak svou aktivitou určují orientaci jednotlivých transmembránových domén zkoumaného proteinu. Zatímco Cat je aktivní pouze v cytoplazmě, Blam způsobuje resistenci na ampicillin, pouze pokud se nachází v oblasti přístupné periplazmatickému prostoru [50, 51]. Celkem bylo provedeno 16 takovýchto analýz, které potvrdily existenci 11 transmembránových segmentů EcoliA a orientaci dle obrázku 2.1. Smyčky mezi transmembránovými doménami 1 a 2, 5 a 6, 7 a 8, 9 a 10 byly identifikovány pomocí β -laktamasy, jsou tedy orientovány do periplazmy. Vystavení cytoplazmatickému prostoru vykazovaly smyčky mezi transmembránovými segmenty 2 a 3,



Obrázek 2.1: Transmembránová topologie proteinu *MntH* bakterie *E. coli*. Červeně jsou vyznačena místa jednobodových mutací *MntH*, která byla zkoumána v této práci. Černým kroužkem a čtverečkem označena místa vzniku fúzních proteinů (náhodných či řízených) s *Cat*. Trojúhelníkem jsou označeny inserce *Blam*. Převzato z [41].

6 a 7, 8 a 9, 10 a 11.

Topologie *EcoliA* s 11 transmembránovými segmenty se podobá více kvaskinkovým homologům *Nramp*, protože zvířecí a rostlinní zástupci rodiny *Nramp* mají transmembránových segmentů 12. Pro správnou strukturu a funkci proteinů *Nramp* jsou však pravděpodobně nejdůležitější transmembránové segmenty 1 – 10, které tvoří jakési hydrofobní jádro a jsou zachovány napříč rodinou *Nramp* [41].

K určení fylogenetické diverzity rodiny *Nramp* byla provedena detailní sekvenční analýza. Ta vedla k rozpoznání pěti fylogenetických skupin, třech bakteriálních (*MntH* A, B, C) a dvou eukaryotních [40, 52]. Rodina *Nramp* sdílí mnoho zachovávaných se reziduí ($\approx 28\%$ identita v aminokyselinové sekvenci). Existuje hypotéza předpokládající, že rezidua, která jsou společná rodině *Nramp*, ale odlišná a současně invariantní v tzv. „outgroup“ (skupina pro-

teinů, které mají podobnou strukturu jako proteiny Nramp, ale nemají stejnou transportní funkci), jsou důležitá pro funkci těchto proteinů. Byla identifikována 4 takováto rezidua v 1., 6., a 11. transmembránovém segmentu (Asp³⁴ a Asn³⁷, His²¹¹, Asn⁴⁰¹). U proteinu EcoliA byly provedeny bodové mutace a vzniklé mutantní kmeny (D34G, N37T, H211Y, N401T) byly podrobeny dalšímu výzkumu, kde byla zjišťována míra exprese na plazmatické membráně a ovlivnění transportní funkce v porovnání s transportérem divokého typu EcoliA [44].

Experimenty odhalily u mutantů na reziduích Asp³⁴ a Asn³⁷ podstatné utlumení schopnosti přenášet Me²⁺ a utlumení Cd²⁺ a Mn²⁺ indukovaného okyselení vnitrobuněčného prostředí. Asp³⁴ mutanti vykazovali velmi malou citlivost na Me²⁺ a žádný Me²⁺ indukovaný transport H⁺. Mutace Asn³⁷ byly na přítomnost Me²⁺ trochu více citlivé a N37T vykazovaly Cd²⁺ indukované vnitrobuněčné okyselení. Tato data potvrdila velký význam 1. transmembránového segmentu, C-konce a smyčky mezi 1 a 2 transmembránovým segmentem pro transport jak Me²⁺ tak H⁺, což bylo ukázáno i pro krysí Nramp2 [53] a EcoliA v jiné studii [43].

Záměna His²¹¹ za tyrosin z „outgroup“ snížila citlivost transportéru ke kovům v zónových testech. Transport H⁺ byl pozorován pouze s Cd²⁺. Pokud byl His²¹¹ nahrazen alaninem, byla mírně ovlivněna citlivost na Me²⁺ a výrazněji omezena schopnost Me²⁺ indukovaného transportu H⁺. Mutace N401T vykazovala nárůst Cd²⁺ indukovaného vnitrobuněčného okyselení, a jeho pokles s jakýmkoli jiným testovaným kovem. Navíc pokud bylo zvýšeno vnější pH, v odezvě na přítomnost Mn²⁺, Co²⁺ a Fe²⁺ se obnovil transport H⁺ v původní míře. Toto ukazuje na možný význam Asn⁴⁰¹ na spřažení Me²⁺ a H⁺ kotransportu.

V této studii [41] se ukázalo, že rezidua Asn³⁷ a His²¹¹ jsou důležité jak pro strukturu tak funkci proteinu EcoliA a pravděpodobně interagují přímo s dvojmocnými kovovými ionty. Jedenáctý transmembránový segment a Asn⁴⁰¹ naopak ukazují svoji důležitost při transportu protonů indukovaném přítomností Me²⁺. Data získaná studiem prokaryotního MntH bakterie *E. coli* jsou v dobré shodě s poznatky o eukaryotním homologu Nramp2, které ukazují důležitost první a šesté transmembránové domény pro správnou funkci proteinu [53, 54].

2.6 Přenašeče versus kanály

Přestože rozdíl mezi kanály a přenašeči je markantní, poslední dobou se ukazuje, že hranice mezi těmito dvěma druhy transportních proteinů není tak zřetelná, jak se původně zdálo [55]. Klasický model kotransportu je model střídavého přístupu („alternating access model“). Ten předpokládá, že kotransport je doprovázen velkými konformačními změnami transportního proteinu. Tento model stojí na desítkách let výzkumu a zdá se věrohodný, protože lze díky němu vysvětlit mnoho vlastností pozorovaných u takového transportu. V rozporu s tímto tradičním modelem však nové experimenty ukazují, že v přenašečových proteinech lze pozorovat i kanálu podobný mechanismus přenosu a naopak. Tuto hypotézu podporují jak přímá tak nepřímá měření. Byly provedeny experimenty, při kterých byl pozorován proud přenašeči tak veliký, že jej nelze popsat jinak, než jako kanálu podobný mechanismus [55]. Naopak rentgenová strukturní analýza pomohla odhalit, že ClC-ec1 (prokaryotní homolog chloridového kanálu ClC) ve skutečnosti funguje spíše jako H^+/Cl^- antiportní přenašeč [56].

Model, který se snaží zahrnout pozorované kanálu podobné vlastnosti přenašečů, navrhli Su a kol. [57]. Jejich „multi-substrate single-file“ model vychází z předpokladu, že protein tvoří v plazmatické membráně nerozvětvenou cestu s několika vazebnými místy pro substráty. Substráty mohou skákat mezi roztokem a vazebným místem, nebo jednotlivými vazebnými místy s rychlostní konstantou, která je ovlivněna obsazeností jednotlivých vazebných míst. Pokud je mezi dvěma navázanými substráty volné vazebné místo, jsou do něj substráty přitahovány. Pokud jsou substráty navázány na sousední vazebná místa, odpuzují se. Pro nabitě substráty je rychlostní konstanta navíc ovlivněna membránovým potenciálem. Su a kol. provedli simulace „multi-substrate single-file“ modelu se třemi vazebnými místy pro reálné transportní proteiny a porovnali data ze simulací s experimentálními. Ukázali, že jejich model může být použit k interpretaci symportu se stálou stechiometrií, k vysvětlení odpráženého toku substrátu a že se jím dá vysvětlit také na napětí závislá variabilní stechiometrie transportu. „Multi-substrate single-file“ model je schopen vysvětlit kanálu podobné vlastnosti přenašečů pomocí lokální substrát-substrátové interakce bez nutnosti globálních konformačních změn, nevyrovňuje se však s fenoménem antiportu. Pro symportní proteiny ho však můžeme vidět jako alternativu ke klasickému modelu střídavého přístupu.

Při studiu DMT1 (kryší homolog Nramp2) prováděném na oocytech drápatky (*Xenopus*) pomocí dvou mikroelektrodové „voltage-clamp“ analýzy se

ukázaly zajímavé transportní vlastnosti tohoto proteinu [10]. Za přítomnosti Me^{2+} byl pozorován satureovatelný proud s kinetikou Michaelise a Mentenové. Avšak při snížení extracelulárního pH byl proud směrem do buňky pozorován i při absenci dvojmocných kovových iontů. Zdá se tedy, že DMT1 funguje jednak jako $\text{H}^+/\text{Me}^{2+}$ kotransportér a také jako H^+ uniportér, umožňující prokluz protonů nezávisle na transportní dráze pro dvojmocné kovy.

Chen a kol. se ve své práci [58] zabývali bližším studiem prokluzu protonů. Při výzkumu DMT1 souběžně využili jak „voltage-clamp“ analýzu tak měření množství vnitrobuněčného Me^{2+} za použití radioizotopů. Rozhodli se určovat poměr celkového Fe^{2+} indukovaného proudu ku množství $^{55}\text{Fe}^{2+}$, které bylo přeneseno do buňky. Ukázalo se, že při konstantních vnějších podmínkách (10 mM $^{55}\text{Fe}^{2+}$, pH 5,5) je tento poměr závislý na membránovém potenciálu. Při +10 mV tento poměr ukazoval na stechiometrii transportu 1:1. Avšak při zvyšování negativního membránového potenciálu hodnota tohoto poměru neočekávaně rostla (20:1 při -80 mV). Což je v rozporu s neměnnou stechiometrií 1:1 kotransportu H^+ s Fe^{2+} a ukazuje to na stechiometrii variabilní. Dále se ukázalo, že výše zmiňovaný poměr není ovlivňován odstraněním extracelulárního Na^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} nebo vnitrobuněčného Cl^- . Lineární, nesatureovatelná kinetika tohoto odpřaženého H^+ proudu ukazuje na kanálový nebo pórový mechanismus přenosu. Stechiometrie kotransportu H^+ s Me^{2+} je s největší pravděpodobností variabilní a určena poměrem koncentrací $[\text{H}^+]_{\text{vně}} : [\text{H}^+]_{\text{uvnitř}}$ stejně jako $[\text{Me}^{2+}]_{\text{vně}} : [\text{Me}^{2+}]_{\text{uvnitř}}$, a zdá se být více závislá právě na poměru koncentrací protonů.

Chen a kol. se ve své práci [58] zabývali také studiem Smf1p, což je kvasinkový homolog DMT1. Ukázali, že transportér kovových iontů Smf1p je elektrogenní a vykazuje satureovatelnou kinetiku transportu Michaelise a Mentenové stejně jako DMT1. Na rozdíl od DMT1 však u SMF1 Na^+ inhibuje přenos dvojmocných kovových iontů do buňky. Při absenci kovových iontů, Na^+ indukuje u SMF1 silný proud směrem do buňky při -50 mV. U SMF1 je při absenci kovových iontů a membránovém potenciálu -50 mV pozorován silný proud do buňky vyvolaný přítomností Na^+ . Tento Na^+ proud se dá inhibovat jak přítomností Me^{2+} tak zvýšením koncentrace H^+ . Je nesatureovatelný, což ukazuje na kanálu podobný mechanismus přenosu. A navíc je možno ho inhibovat i přítomností Ca^{2+} , na rozdíl od H^+ s Fe^{2+} kotransportu, který inhibován pomocí Ca^{2+} není. Zdá se tedy, že transport pomocí Smf1 probíhá dvěma hlavními způsoby: spřažený transport protonů s dvojmocnými kovy a odpřažený kanálu podobný mechanismus, který umožňuje průchod Na^+ . Z experimentu vyplynulo, že tuto dráhu mohou kromě Na^+ využívat i jiné ionty,

jako je Li^+ , K^+ a Rb^+ a dokonce i Ca^{2+} . Chen a kol. dále spekulují, že tato dvojí identita může být vlastní nejen pro DMT1 a Smf proteiny, ale i jiné členy Nramp rodiny. Protein DMT1 zkoumali také Xu a kol. [59]. Objevili, že spontánní jednobodová mutace G185R Dmt1 vede k významnému omezení schopnosti transportovat Fe^{2+} a navíc k vytvoření nové transportní cesty pro Ca^{2+} , která má vlastnosti Ca^{2+} kanálu.

Přestože se množí důkazy o existenci mechanismu odpraženého toku nebo kanálů v přenašečích [60, 61, 62], biologická funkce tohoto jevu není zcela objasněna. Odpražený tok molekul spojený s kotransportním procesem byl označen jako mechanismus molekulárního prokluzu („molecular slip mechanism“) [55]. Spekuluje se, že odpražený tok molekul přináší transportnímu systému určitou míru pružnosti. Buňka exprimující takovéto transportní systémy se může díky tomu neustále přizpůsobovat proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Pokud je gradient látky přes plazmatickou membránu pohánějící kotransport příliš velký, chrání molekulární prokluz buňku před akumulací kovů, které jsou pro ni ve vyšších koncentracích toxické [27]. Zdá se tedy, že mechanismus molekulárního prokluzu umožňuje jistý druh pufrování či poskytuje samočinnou autoregulaci odlišnou od jiných způsobů buněčné regulace koncentrace látek v cytosolu. To napomáhá udržovat stabilitu a přispívá k homeostázi v buňce, navzdory občasným náhlým změnám koncentrace substrátů nebo jiných látek ve vnějším prostředí [55, 63].

Kapitola 3

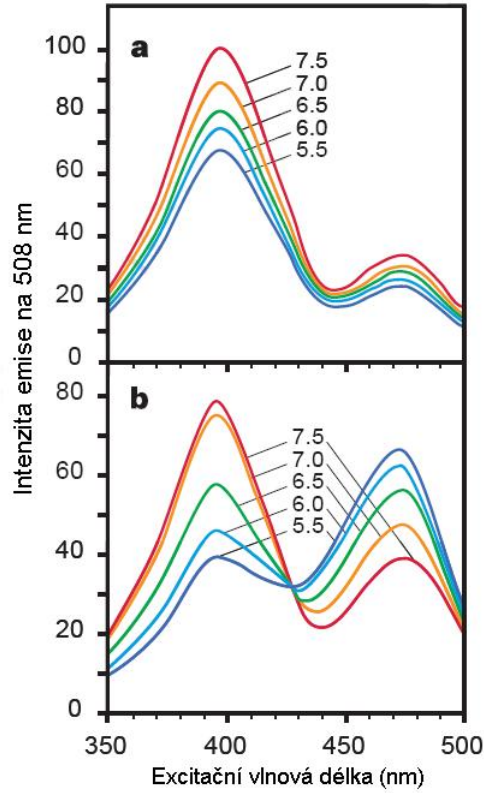
Experimentální metody a materiál

3.1 Fluorescenční měření

3.1.1 pHluorin

Pro sledování změn vnitrobuněčného pH jsme využívali fluorescenční sondu pHluorin. Jak už bylo popsáno výše, námi studovaný MntH je membránový transportní protein přenášející do buněk Me^{2+} společně s H^+ . Příliv protonů do buňky způsobuje okyselování vnitrobuněčného prostoru, cytosolické pH se tedy snižuje.

Byly vyvinuty sofistikované metody pro sledování vnitrobuněčného pH. Mezi ně patří i ty, které pracují s fluorescenčními sondami, jejichž excitační spektrum je citlivé na pH. Moderní způsob určování vnitrobuněčného pH u bakterií využívá fluorescenční sondu nazývanou pHluorin. Jedná se o mutant zeleného fluorescenčního proteinu (green fluorescent protein – GFP), který se skládá z 11 antiparalelních skládaných listů tvořících β -barel. Uvnitř této struktury je chráněný α -helix, který nese fluorofor. Aktivní forma fluoroforu vzniká přibližně hodinu po expresi proteinu autokatalickou cyklizací a oxidací tří aminokyselin Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ a Gly⁶⁷ [64]. Systematickým mutováním klíčových reziduí, které se podílejí na přenosu protonů, byl nalezen protein citlivý na změny pH. V jeho excitačním spektru se nacházejí dva pásy. Protonované formě odpovídá pás na 395 nm a deprotonované pás s maximem na 475 nm [65]. V závislosti na pH okolního prostředí se mění intenzita těchto pásů. (viz obrázek 3.1), což po kalibraci umožňuje určovat pH v rozmezí přibližně 5,5 až



Obrázek 3.1: Fluorescenční excitační spektra pro různé hodnoty pH. a) divoký typ GFP, b) pHluorin. Převzato z [65].

8,5. Měření touto metodou sice vyžaduje, aby buňky, které chceme sledovat, nesly plasmid s genetickým kódem pro pHluorin. Nespornou výhodou této fluorescenční sondy však je, že je exprimována přímo v buňce. Tím je vyřešen poměrně obtížný problém s doručováním sondy do cytosolu.

Studie [66] ukázala, že měření pomocí pHluorinu poskytuje rychlou neinvazivní metodu kontinuálního určování vnitrobuněčného pH, která je ideální pro kinetické studie jak na gram-negativních tak i na gram-positivních bakteriích. Pokud je navíc použit poměr mezi intenzitou fluorescence na dvou různých excitačních vlnových délkách, stává se měření nezávislé na koncentracích pHluorinu v jednotlivých buňkách. Tato metoda je již využívána při studiu proteinu MntH [42, 44, 45]. Umožňuje přímé sledování kinetiky transportu protonů indukovaného přidáním kovu.

3.1.2 Měření vnitrobuněčného pH

Vnitrobuněčné pH bakterií bylo měřeno nepřímo pomocí spektrofluorimetru FluroMax-2 (Jobin-Yvon SPEX). Tento spektrofluorimetr používá jako zdroj excitačního záření xenonovou lampu, fluorescenční signál je pak na spektrum vyzařované lampou korigován. Kinetiky transportu byly měřeny pomocí poměrového měření. Vzorek byl střídavě excitován na 410 nm (S_1) a 470 nm (S_2). Emise byla u obou excitací snímána na 520 nm.

Výsledný poměr $R = S_1/S_2$ byl posléze přepočítáván na vnitrobuněčné pH pomocí kalibrace získané během měření provedených v letech 2004 – 2008. Při stanovování kalibrační křivky byl využit protonofor CCCP (carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazone), který permeabilizuje membránu pro protony a umožňuje vyrovnaní intracelulárního pH s extracelulárním. Změřená data byla fitována pomocí vztahu

$$R = \frac{I_{max}pH^{n_H}}{K_{0,5} + pH^{n_H}} + konst \quad (3.1)$$

kde získané hodnoty pro jednotlivé konstanty jsou uvedeny v tabulce 3.1. Po úpravě získáváme vztah

$$pH = K_{0,5} \sqrt[n_H]{\frac{R - konst}{I_{max} + konst - R}} \quad (3.2)$$

který nám umožňuje přepočítávat naměřené hodnoty R na pH .

Tabulka 3.1: Kalibrační konstanty pro přepočet R na pH pro pHluorin

I_{max}	= 1,408078
n_H	= 13,02885
$K_{0,5}$	= 7,602061
konst	= 0,400793

Jsme tedy schopni monitorovat vnitrobuněčné pH bakterií a také změny ve vnitrobuněčném pH, způsobené transportem H^+ . Při interpretaci výsledků se však objevuje problém, jak tento transport kvantifikovat. Změny ve vnitrobuněčném pH totiž neodpovídají skutečnému množství protonů, přenesených pomocí MntH. Značná část přenesených protonů je totiž buňkou spotřebována (buňka má složitý systém na udržení vnitrobuněčného pH [67]) a nepřispívá tak ke změně vnitrobuněčného pH, které pomocí pHluorinu sledujeme.

Tento problém se snaží řešit metodika zpracování výsledků, zahrnující do výpočtu pufrací kapacitu buněk (viz kapitola 3.2.2) [68].

3.2 Kvantifikace transportu protonů proteinem MntH

3.2.1 Tradiční způsob zpracování dat

Hodnotu vnitrobuněčného pH je možno přepočítat na koncentraci protonů dvěma způsoby. První způsob vychází z definice pH a dále v textu bude označován jako tradiční způsob zpracování dat. Tento způsob neuvažuje pufrací schopnost buněk a započítává pouze protony, kterých se buňka není schopna pufracími procesy zbavovat dostatečně rychle. Tyto protony pak přispívají ke změně vnitrobuněčného pH. Tradiční způsob zpracování dat vychází z rovnice

$$\Delta[H^+] = 10^{-pH_1} - 10^{-pH_0} \quad (3.3)$$

kde pH_0 respektive pH_1 označuje počáteční respektive konečné pH [41].

3.2.2 Zpracování dat přepočtem přes pufrací kapacitu

Druhý způsob, který můžeme využít při přepočtu změny pH na změnu v koncentraci protonů, se snaží ve výsledcích zohlednit pufrací schopnost buněk a započítat všechny protony, které prošly skrz MntH. Snaží se tedy započíst i ty protony, které sice prošly skrz MntH, ale nepřispěly ke změně vnitrobuněčného pH, protože živá buňka této změně zabránila díky pufrací schopnosti cytosolu a dalším aktivním procesům. Tento způsob zpracování využívá k přepočtu pufrací kapacitu.

Směs slabé kyseliny nebo slabé báze a její soli vytváří systém (označovaný jako pufr), který je za určitých podmínek schopen udržovat stabilní pH, jestliže se k němu přidává kyselina nebo zásada. Přidané ionty H^+ či OH^- reagují s přítomnými konjugovanými bázemi A^- či kyselinami HA a díky tomu nedochází k tak výrazné změně pH. Pro zajištění stabilního vnitřního prostředí, které je nutné k optimálnímu fungování biologických molekul, jsou vnitrobuněčné kapaliny silně pufrány [6]. Míru schopnosti pufrat popisuje pufrací kapacita (β) obecně definována jako

$$\beta = \frac{\Delta[A^-]}{\Delta pH} \quad (3.4)$$

kde $\Delta[A^-]$ označuje množství silné disociované kyseliny, kterou musíme do roztoku přidat, aby došlo ke změně ΔpH . Analogicky platí pro přidání silné báze.

Bakterie disponují sofistikovaným systémem na udržení vnitrobuněčného pH zahrnující pufrální schopnost cytosolu a aktivní procesy homeostázy snažící se minimalizovat změny vnitrobuněčného pH [67], čímž je zkruseno námi sledované měření transportu H^+/Me^{2+} . Pro eliminaci tohoto zkruslení byla vyvinuta metoda, která je podrobně rozebrána v práci [68]. Jejím základem je určení intracelulární pufrální kapacity buněk. Ta se stanovuje přidáním slabé kyseliny nebo zásady, které způsobí definovaný skok v koncentraci protonů uvnitř buněk. Ze změřené změny pH, a známých vlastností kyseliny (hustota, koncentrace, objem, molární koncentrace a disociační konstanta) jsme pak schopni stanovit β buněk za daných podmínek.

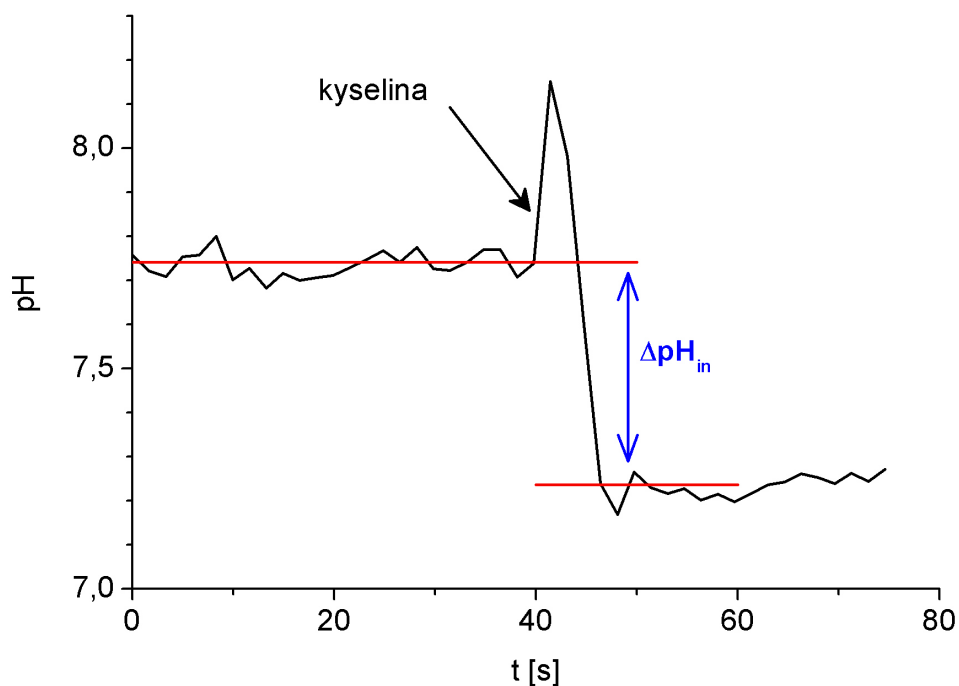
Ze známé pufrální kapacity můžeme určit množství protonů $\Delta[H^+]$ přenesených do buněk pomocí MntH použitím tohoto vztahu

$$\Delta[H^+] = \beta \Delta pH \quad (3.5)$$

kde ΔpH vyjadřuje změnu vnitrobuněčného pH během transportu. Výpočet koncentrace protonů pomocí vztahu (3.5) označujeme dále v textu jako zpracování dat pomocí přepočtu přes pufrální kapacitu. Abychom mohli tento způsob přepočtu dat používat, naměřili jsme pro dané bakteriální kmeny za daných experimentálních podmínek jejich intracelulární pufrální kapacitu.

3.2.3 Měření vnitrobuněčné pufrální kapacity

Pufrální kapacita bakterií byla určována pomocí přidávání slabé kyseliny. Ke vzorku buněk byla přidána kyselina propanová ve finální koncentraci 134 μM až 1,34 mM. Přidání kyseliny způsobuje skokové snížení vnitrobuněčného pH (viz obrázek 3.2). Ze znalosti množství a vlastností přidávané propanové kyseliny a ze skoku ve vnitrobuněčném pH jsme určili pufrální kapacitu buněk pomocí vzorce (3.4). Vycházíme z předpokladu, že pufrální kapacita buněk se může lišit pro jednotlivé zkoumané bakteriální kmeny i pro různé podmínky měření. Proto byla pufrální kapacita určována zvlášť pro různé složení pufrů, pro různé teploty a různé bakteriální kmeny.



Obrázek 3.2: Měření pufrční kapacity při 31 °C. Přidání definovaného množství kyseliny propanové do kyvety se suspenzí buněk způsobuje měřitelnou změnu ve vnitrobuněčném pH.

3.3 Arrheniova aktivační energie

Energetickou bariéru chemické reakce můžeme charakterizovat pomocí Arrheniovy aktivační energie. V případě transportu pak můžeme hovořit o aktivační energii transportu E_a . Je možné ji určit z teplotní závislosti transportu dle rovnice

$$k = Ae^{-(\Delta E_a/RT)} \quad (3.6)$$

kde A je konstanta závislá na charakteru reakce, T termodynamická teplota, R molární plynová konstanta a k je rychlostní konstanta [69]. Naměřenou závislost změny koncentrace protonů na teplotě jsme fitovali funkcí (3.6) a z parametrů fitu jsme získali hodnotu aktivační energie.

3.4 Měření kinetiky odpraženého transportu protonů

Pro první experimenty jsme zvolili pufr M (20 mM MES, 70 mM NaCl, 30 mM KCl, pH 5,5). Ukázalo se, že vnitřní pH bakterií divokého typu je vysoce závislé na čase, která uplynula od jejich stáčení a promývání v pufru M. Při stáčení a měření v citrát-fosfátovém pufru nebývá takovýto pokles vnitrobuněčného pH bez přítomnosti kovových iontů, které by indukovaly symport, pozorován. Proto vznikla domněnka, že pokles vnitrobuněčného pH úzce souvisí s prostředím, které vytváří pufr MES s chloridovými solemi. Aby byl získán definovaný počátek procesu, který se v tomto prostředí odehrává, byl pro stáčení a promývání bakterií dále používán citrát-fosfátový pufr o pH 5,5. První kontakt bakterií s pufr M, tak nastával až v měřící kyvetě. Tím se podařilo docílit poměrně stabilního počátečního pH bakterií.

Provedli jsme sérii experimentů s divokým typem *EcoliA*, jednobodovými mutacemi D34G, H211Y, N401G a negativní kontrolou pBAD s cílem zjistit vliv teploty na pozorovaný pokles vnitrobuněčného pH. Bakterie jsme stáčeli za pokojové teploty v citrát-fosfátovém pufru o pH 5,5 (viz tabulka 3.2) a poté jsme je přidávali do měřících kyvet s pufr M vytemperovaných na požadovanou teplotu. Poměrový signál fluorescence R má na počátku měření značné fluktuace vzhledem k tomu, že bakterie se dostávají do nového prostředí a v kyvetě se teprve rozmíchávají. K ustálení dochází přibližně po minutě, a proto byl za počáteční bod měření kinetik odpraženého transportu zvolen čas 1,5 minuty po smíchání bakterií s pufr M. Ve výsledcích uvádíme chybové úsečky v grafech jako směrodatné odchylky.

V druhé části práce (kapitola 4.4) byly bakterie promývány i měřeny v pufru MS (100 mM MES, 30 mM KCl, pH 5,5). Na vliv iontů byl testován divoký typ MntH (*EcoliA*) a negativní kontrola (pBAD). Měření v čistém pufru MS bez příměsí dalších látek označujeme jako kontrolu. Vliv přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} jsme studovali tak, že jsme pufr MS obohatili o 10 mM CaCl_2 nebo 10 mM MgCl_2 . Bakterie byly na měření připraveny standardním způsobem popsaným v kapitole 3.7 a ihned po promytí probíhalo samotné měření. Vnitřní pH bakterií jsme zaznamenávali ve čtyřech časech. Ihned po smíchání do měřící kyvety, abychom mohli srovnat jednotlivá měření, zda nedochází k signifikantním rozdílům v počátečním pH. Po 500 s pak začínalo samotné měření, kdy do určených vzorků bylo přidáváno Cd^{2+} . Od tohoto okamžiku jsme pak zaznamenali vnitrobuněčné pH ještě po dalších 500 s a 1000 s. Měření probíhalo buď při pokojové teplotě nebo při 31 °C. Během měření při 31 °C

jsme bakterie po promytí přidávali do kyvet s pufrém, které byly vytemperovány na 31 °C. Během měření byly udržovány na této teplotě jak při pobytu ve spektrofluorimetru tak mimo něj.

Provedli jsme také sérii měření, která proběhla v jiných experimentálních podmínkách (myšleno složení pufrů) než v pufru M nebo pufru MS. Při těchto měřeních jsme postupovali stejně jako při měření v pufru M, tzn. promývání bakterií probíhalo v citrát-fosfátovém pufru (o iontové síle 0,07 M a pH 5,5; viz tabulka 4.5) a samotná měření pak probíhala v příslušném pufru, jehož vliv na samovolný pokles vnitrobuněčného pH byl studován. Výsledky prezentované v kapitole 4.5 jsou výsledky měření na divokém typu MntH (EcoliA), jehož $\Delta[H^+]$ a ΔpH jsou korigovány na negativní kontrolu (pBAD). Měření probíhalo při 31 °C, postupovali jsme stejně jako u měření za definované teploty v pufru M (popsáno výše).

3.5 Použité roztoky

Tabulka 3.2: Použité pufrы

Označení	pH	Složení
Pufr M	5,5	20 mM MES, 70 mM NaCl, 30 mM KCl
Pufr M o pH 5,9	5,9	20 mM MES, 70 mM NaCl, 30 mM KCl
Pufr M o pH 6,3	6,3	20 mM MES, 70 mM NaCl, 30 mM KCl
Pufr MS	5,5	100 mM MES, 30 mM KCl
Citrát-fosfátový pufr	5,5	12 mM kyselina citrónová, 27 mM K_2HPO_4
–	5,5	16 mM kyselina citrónová, 15 mM K_2HPO_4 , 22 mM Na_2HPO_4
–	5,5	15 mM kyselina citrónová, 30 mM KCl, 70 mM NaCl, 35 mM NaOH

- antibiotika, koncentrace zásobních roztoků
 - kanamycin 30 mg/ml
 - ampicillin 100 mg/ml
 - spektinomycin 100 mg/ml
- L-arabinóza, finální koncentrace v médiu 0,06 %

- kyselina propanová
- Luria-Bertani médium pro pěstování bakterií (LB médium)
 - 10 g Bacto-trypton, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl v 1 l destilované vody
- další použité látky
 - různé koncentrace CdCl₂, CaCl₂, MgCl₂, NaCl

3.6 Použité bakteriální kmeny

Měření byla prováděna na bakteriálních kmenech odvozených od mateřského kmene *E. coli* DH11S Δ MntH, tzn. s nefunkčním vlastním MntH. Tento mateřský kmen byl modifikován dvěma plasmidy.

- Plasmidem pGBM6-pHL [41] nesoucím gen pro pHluorin byly modifikovány všechny používané bakteriální kmeny.
- Plasmidem pBAD [41] nesoucím gen pro MntH divokého typu *E. coli*. Případně jednobodové mutace MntH nebo prázdný plasmid pBAD představující negativní kontrolu.

Tabulka 3.3: Přehled použitých kmenů *E. coli*

Kmen	MntH na plasmidu pBAD	mutace MntH
<i>E. coli</i> A	ano	ne, divoký typ
pBAD	ne	prázdný plasmid
D34G	ano	Asp ³⁴ → Gly
H211Y	ano	His ²¹¹ → Tyr
N401G	ano	Asn ⁴⁰¹ → Gly

3.7 Pěstování bakterií

Při pěstování bakterií jsme používali sterilní materiál a pracovali výhradně sterilně. Buňky ze zásobního roztoku byly přeočkovány na Petriho misku s agarem (1,5 % agar v LB médiu s antibiotiky). Kultivací přes noc v 37 °C vyroste

na misce kolonie buněk. Takováto miska uchovávaná v lednici při teplotě 4 °C pak sloužila pro přípravu vzorků maximálně měsíc. Bakterie byly z kolonie na Petriho misce přeočkovávány do LB média s antibiotiky. Před zaočkováním byla do LB média čerstvě přidána antibiotika na finální koncentraci : 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ spektomycin. Do růstového média se přidávají pro selektování požadovaných bakteriálních kmenů. Mateřský kmen *E. coli* DH11S ΔmntH je rezistentní vůči kanamycinu, geny pro rezistenci vůči ampicillinu se nacházejí na plasmidu pBAD a pro rezistenci vůči spektinomycinu na plasmidu pGBM6-pHL.

Bakterie přeočkované z pevného média do 2 ml LB média s antibiotiky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a 250 rpm. Ráno byla kultura ve stacionární fázi přidána v poměru 1:100 do čerstvého LB média s antibiotiky. Po 2 hodinách kultivace byla k bakteriím přidána 0,06 % L-arabinóza, která indukuje expresi proteinu MntH. Další 1 hodinu byly bakterie kultivovány v přítomnosti L-arabinózy a poté sklizeny. Bakterie se v té době nacházely v exponenciální fázi růstu [70].

Z růstového média byly bakterie získány pomocí centrifugace při frekvenci 5000 otáček za minutu po dobu 2 minut. Následně byly dvakrát promyty v pufru, jehož druh závisel na typu měření. Po každém promytí byly buňky zcentrifugovány a nakonec resuspendovány v pufru, ve kterém probíhalo promývání.

Všechna měření probíhala v jednorázových kyvetách, kde objem vzorku činí 3 ml. Množství buněk přidaných do vzorku bylo vždy voleno tak, aby při vlnové délce 600 nm byla optická hustota vzorku 0,2. Tímto bylo zajištěno přibližně stejné množství buněk u všech vzorků.

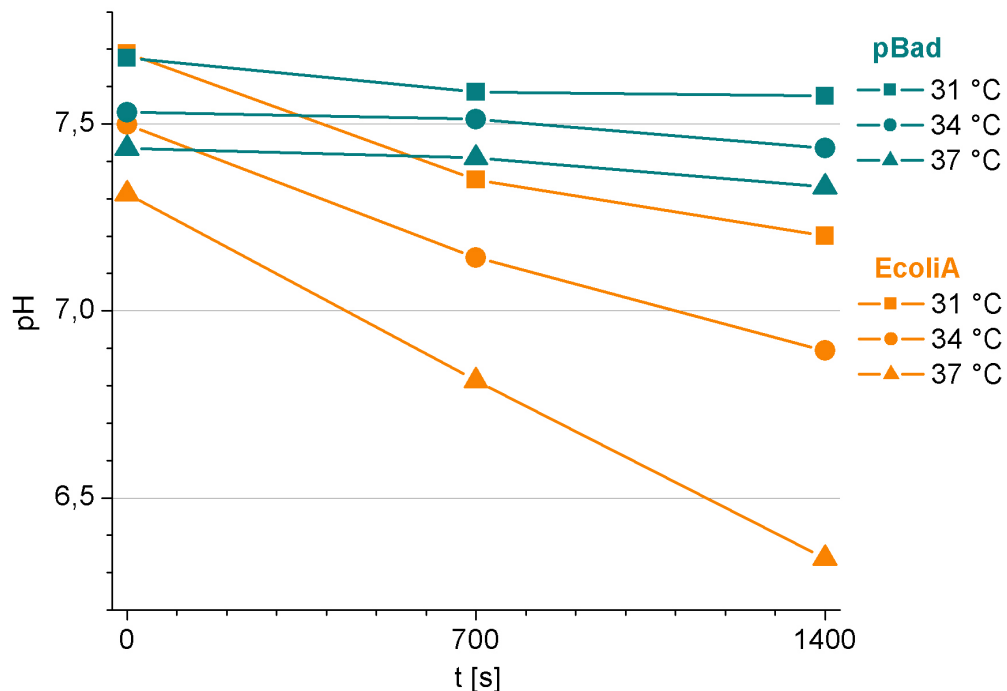
Kapitola 4

Výsledky a diskuse

Cílem této diplomové práce bylo zvláště posoudit vliv iontů na kovem indukovaný transport protonů v bakteriálních kmenech exprimujících MntH. Zejména nás zajímal vliv vápníku. Tento iont se ve studiích [45, 71] ukázal jako zásadní pro stimulaci příjmu substrátu do RSOV, tento efekt však prozatím nebyl popsán při studiu MntH *in vivo*. Doposud byl ke studiu transportu H^+ skrz MntH používán citrát-fosfátový pufr [41, 44], který však vytváří s Ca^{2+} nerozpustné soli. Proto bylo nutno nalézt nové vhodné experimentální podmínky, ve kterých by bylo možno pozorovat vliv Ca^{2+} . Kovem indukovaný transport protonů se daří sledovat pouze při dostatečném pH gradientu přes membránu. Oblast pH, ve které je možno měřit, se proto nachází mezi pH 4,5 a pH 6,0. V této oblasti není výběr vhodných pufrů široký. Jeden z mála v hodných pufrů, který jsme si nakonec také zvolili pro měření, je MES. Umožňuje měření od pH 5,5 a navíc neinteraguje s dvojmocnými kovovými ionty, což je důležitá požadovaná vlastnost.

4.1 Odpřažený transport protonů divokým typem MntH

Díky přechodu k novým experimentálním podmínkám jsme objevili samovolný pokles vnitrobuněčného pH bakterií, který je specifický pouze pro bakterie exprimující MntH. Domníváme se, že za pozorovaný pokles vnitrobuněčného pH může transportní proces probíhající na proteinu MntH. Protože v našich vzorcích není přítomen kov, který by indukoval spřažený symport protonů s kovem, vysvětlujeme si pozorovaný pokles pH jako odpřažený transport

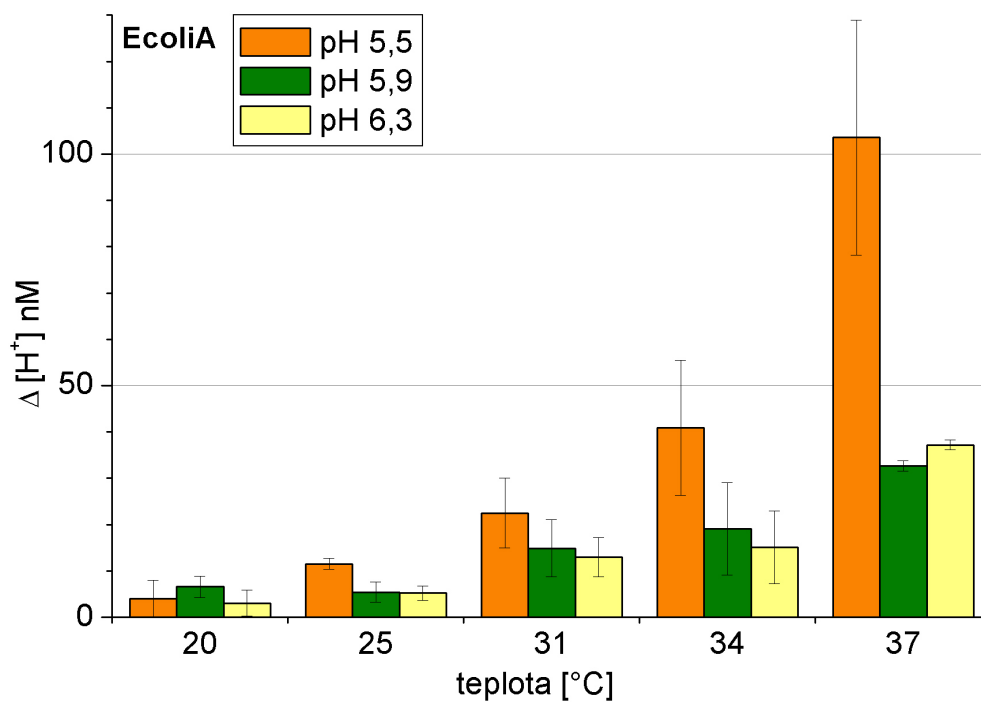


Obrázek 4.1: Kinetika odpraženého transportu protonů v pufru M. Vnitrobuněčné pH bakterií kmene pBAD a EcoliA bylo zaznamenáváno ve třech časech. Graf prezentuje průměrné hodnoty ze 4 – 8 kultivací. Pro názornost jsou získané experimentální body pospojovány. Pro přehlednost neuvádíme chybové úsečky jejichž velikost se pohybuje od 0,04 do 0,18 jednotek pH.

(uniport) protonů.

Rozhodli jsme se prostudovat teplotní závislost odpraženého transportu protonů. Ukázalo se, že u bakterií s divokým typem transportního proteinu MntH EcoliA dochází se zvyšující se teplotou k výraznějším poklesům vnitrobuněčného pH (viz obrázek 4.1). Zatímco průměrná změna v koncentraci protonů za 700 s pro kmen pBAD byla asi jen 1 nM a v čase 1400 s přibližně 2 nM. To ukazuje, že děj, který je pozorován, se opravdu odehrává právě na transportním proteinu MntH.

Abychom zjistili, jak je jev poklesu vnitrobuněčného pH ovlivňován pH gradientem přes plazmatickou membránu, připravili jsme si pufr M také s pH 5,9 a s pH 6,3. Vzhledem k tomu, že optimální vnitrobuněčné pH námi použí-



Obrázek 4.2: Odprážený transport protonů v 700 sekundě. Je ukázána závislost na pH pufru M a teplotě. Data pochází z měření na kmeni *EcoliA* a jsou korigována na *pBAD*. Bylo použito tradiční zpracování dat. Data pro pH 5,5 pochází ze 4 až 6 kultivací, pro pH 5,9 a 6,3 se jedná o data ze 2 až 3 kultivací s výjimkou hodnoty pro 37 °C a pH 5,9, kde bylo k dispozici pouze jedno měření. Hodnoty $\Delta[H^+]$ pro *pBAD*, které byly pro výsledný graf od $\Delta[H^+]$ pro *EcoliA* odečítány, pocházejí z obdobného počtu kultivací jako *EcoliA* a pro všechny teploty a pH pufru se v čase 700 s i 1400 s pohybovaly do 10 nM.

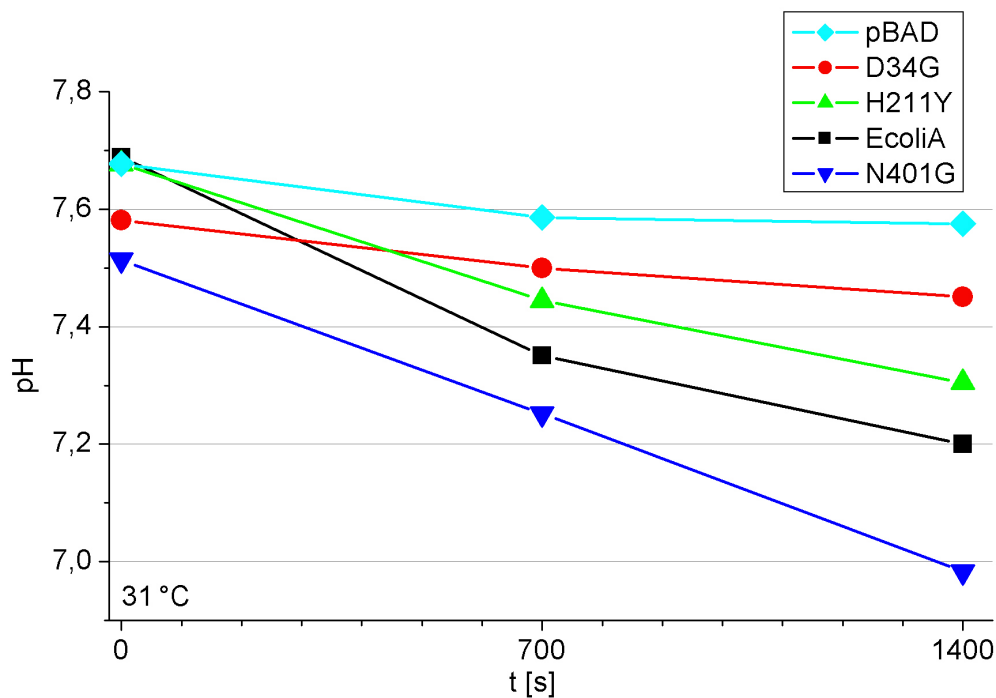
vaných bakteriálních kmenů je přibližně 7 až 8, pufr o pH 5,5 vytváří větší pH gradient přes plazmatickou membránu než pufr o pH 6,3. Provedené experimenty ukázaly, že menší pH gradient přes plazmatickou membránu způsobuje slabší pokles vnitrobuněčného pH v čase při všech měřených teplotách. Velikost toku substrátu přes plazmatickou membránu je závislá na velikosti hnací síly tohoto toku [6]. V případě odpřaženého transportu protonů je touto hnací silou elektrochemický gradient přes plazmatickou membránu. Bylo popsáno, že Me^{2+} indukovaný spřažený transport H^+ skrz eukaryotní DMT1 (blíže v kapitole 2.3) je signifikantně větší v pH 5,5 než v pH 7,5 [55]. Stejný efekt byl popsán i pro MntH při srovnání extracelulárního pH 4,7 a pH 5,5 či pH 6 [44]. Námí sledovaný pokles v odpřaženém transportu při přechodu do vyššího pH je tak ve schodě s publikovanými daty o vlivu pH gradientu přes membránu na transportní proces.

Obrázek 4.2 shrnuje teplotní závislost poklesu vnitrobuněčného pH pro divoký typ *EcoliA* za 700 s korigovaného na negativní kontrolu pBAD. Změna v pH je přepočítána na koncentraci protonů tradičním způsobem zpracování dat, tedy dle vzorce (3.3). Korekcí na pBAD je myšleno očištění změny koncentrace protonů pro divoký typ od jevů nesouvisejících s ději na transportním proteinu MntH. To bylo provedeno prostým odečtením průměrné $\Delta[\text{H}^+]$ pro pBAD od průměrné $\Delta[\text{H}^+]$ pro *EcoliA*, samozřejmě zvlášť pro jednotlivé teploty a pH pufrů.

Podíváme-li se na obrázek 4.2 vidíme, že se vzrůstající teplotou a snižujícím se pH se zvyšuje množství protonů přenesených do buněk. Tento efekt zvyrazňuje vyšší pH gradient přes plazmatickou membránu. Bylo by tedy zajímavé, kdybychom mohli měřit i v menším pH než 5,5. Bohužel používaný pufr MES nám umožňuje měřit pouze v rozsahu od pH 5,5 do pH 6,7.

4.2 Vliv jednobodových mutací na odpřažený transport protonů

Rozhodli jsme se, že by bylo zajímavé proměřit odpřažený transport protonů i u vybraných jednobodových mutací MntH z *E. coli*. Zejména u těch mutací MntH, u kterých se již dříve v literatuře o částečném odpřažení transportu H^+ od Me^{2+} spekulovalo [44]. Takovou mutací je N401G, která byla vybrána pro studium odpřaženého transportu protonů společně s mutacemi H211Y a D34G, které také vykazují zajímavé transportní vlastnosti (více v kapitole 2.5). Při experimentu jsme postupovali stejným způsobem jako při mě-



Obrázek 4.3: Kinetika odpřaženého transportu protonů pro mutantní kmeny *MntH* v pufru M. Vnitrobuněčné pH bakterií kmenů *pBAD*, *D34G*, *H211Y*, *EcoliA* a *N401G* bylo zaznamenáváno ve třech časech. Graf prezentuje průměrné hodnoty ze 4 – 8 kultivací. Pro názornost jsou získané experimentální body pospojovány. Pro přehlednost neuvádíme chybové úsečky jejichž velikost se pohybuje od 0,01 do 0,15 jednotek pH.

ření odpřaženého transportu protonů s divokým typem *MntH* (popsáno v kapitole 3.4). Odpřažený transport protonů u bakteriálních kmenů s funkčním transportním proteinem *MntH* je v buňkách indukovan změnou prostředí, kdy se buňky dostávají do pufru M.

Kinetiku odpřaženého transportu protonů jsme i pro mutace *MntH* měřili při různých teplotách. Ilustrativní obrázek kinetiky při 31 °C je v obrázku 4.3, kde lze pozorovat rozdíly mezi jednotlivými bakteriálními kmeny.

Zatímco odpřažený transport protonů je znám u eukaryotních homologů rodiny *Nramp* [10, 58] (popsáno v kapitole 2.6), u prokaryotních zástupců této rodiny zatím nebyl popsán. Proto nemáme při jeho pozorování žádnou

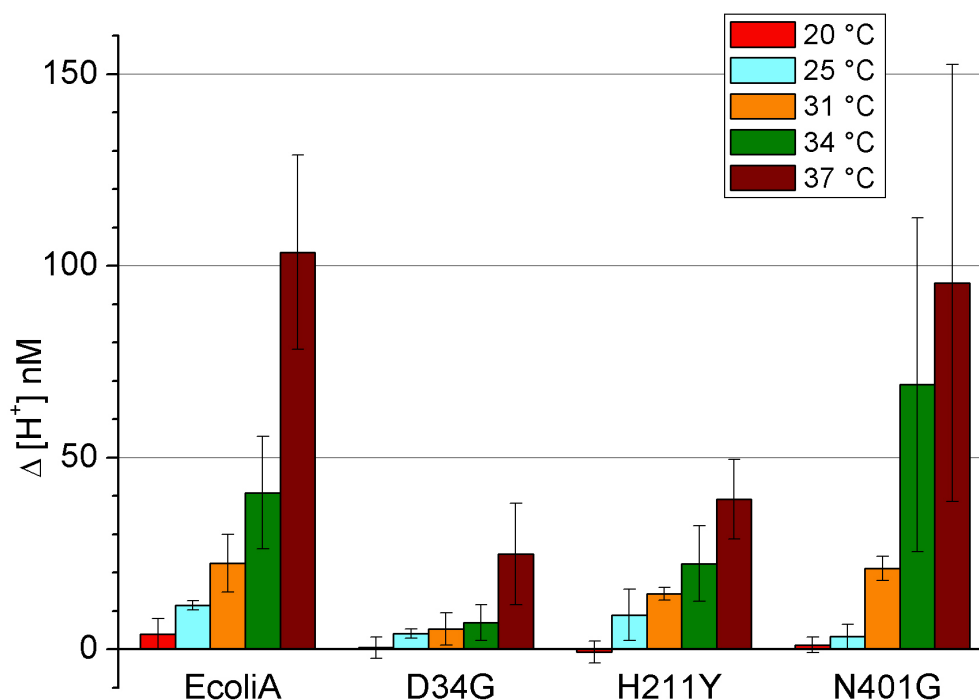
možnost srovnání ani pro divoký typ MntH ani pro testované jednobodové mutace MntH. Nicméně o studovaných proteinech jsou známy údaje o spřaženém transportu protonů s kovy. Získány byly dvěma přístupy, sledováním transportu H^+ indukovaného Cd^{2+} a sledováním akumulace Cd^{2+} pomocí radioaktivního značení. Porovnáme-li tedy s nimi naše výsledky získané sledováním transportu H^+ bez přítomnosti kovu, jsme schopni dobře posoudit roli zkoumaných reziduí v transportním procesu.

4.2.1 Tradiční způsob zpracování dat

Nejprve jsme naše měření s vybranými mutacemi MntH zpracovali tradičním způsobem zpracování dat (popsáno v kapitole 3.2.1). Obrázek 4.4 shrnuje výsledky tohoto zpracování. Bohužel při vyšších teplotách jsme zaznamenali také větší rozptyl jednotlivých měření. Při všech experimentech jsme se snažili postupovat stejně a květy byly temperovány během měření jak ve spektrofotometru tak i v době, kdy byly mimo měřicí přístroj. Přesto jsme pravděpodobně ve vzorcích při vyšších teplotách, kdy bylo nutno udržovat větší rozdíl oproti teplotě v laboratoři, neudrželi dostatečně stabilní teplotu po celou dobu měření.

Nejnovější studie odhalila, že reziduum Asp³⁴ je nezbytná pro spřažení transportu H^+ a Cd^{2+} , snižuje afinitu ke Cd^{2+} , ale zachovává na pH nezávislý transport Cd^{2+} [45]. Reziduum Asp³⁴ je také pravděpodobně důležitou součástí H^+ transportní dráhy. Naše experimenty ukazují, že jeho chování v nepřítomnosti Me^{2+} je velmi podobné negativní kontrole. To potvrzuje, že reziduum Asp³⁴ hraje velmi důležitou roli v transportní cestě pro protony. Mutace D34G způsobuje prakticky úplnou ztrátu schopnosti transportovat protony. Jak v 700 s tak v 1400 s jsou naměřené $\Delta[H^+]$ méně než 10 nM. Výjimku tvoří hodnota 16 nM v čase 1400 s při 34 °C a hodnoty v 700 s i v 1400 s při 37 °C. Ukazuje se, že částečná schopnost odpřaženého transportu H^+ se proteinu s mutací D34G vrací v blízkosti fyziologické teploty 37 °C.

Reziduum His²¹¹ se zdá být důležité pro strukturu a funkci proteinu MntH a existuje hypotéza, že interaguje přímo s dvojmocnými kovovými ionty [44]. Z našich experimentů můžeme pozorovat, že kmen H211Y má částečně utlu-menou schopnost odpřaženého transportu protonů v porovnání s divokým typem EcoliA. Zdá se tedy, že reziduum His²¹¹ ovlivňuje také transportní cestu pro protony, alespoň tedy při jejich odpřaženém transportu. Popsaný pokles schopnosti odpřaženého transportu pozorujeme při všech sledovaných teplotách.



Obrázek 4.4: Odpražený transport protonů v 700 s pro mutace MntH. Všechny zobrazené hodnoty jsou korigovány na pBAD. Jednotlivá data pochází ze 2 až 3 kultivací, během nichž proběhlo dohromady 4 až 6 měření. Pouze hodnota pro D34G při 25 °C pochází pouze z jedné kultivace, během které byla provedena dvě měření.

Posledním ze zkoumaných mutací byla N401G. Z literatury víme, že mutace na Asn⁴⁰¹ vede ke snížení počátečního vnitrobuněčného pH [44] v porovnání s divokým typem. Tento fenomén, který jsme pozorovali také při našich měřeních (viz obrázek 4.3), je připisován probíhajícímu transportu H⁺. Reziduum Asn⁴⁰¹ je pravděpodobně zásadní pro strukturu a funkci MntH a důležité při spřažení transportního cyklu H⁺ s Me²⁺. Při našem studiu odpraženého transportu protonů mutací N401G jsme zaznamenali velký rozptyl naměřených hodnot. Dá se říci, že v rámci chyby měření vykazuje tento kmen stejnou schopnost odpraženého transportu protonů jako divoký typ EcoliA.

Tradiční způsob zpracování dat započítává jen malou část protonů přenesených MntH a neuvažuje případnou rozdílnou pufrací schopnost buněk.

Rozdíl v transportních schopnostech mezi jednotlivými mutacemi MntH tak může být zkreslen (více v 3.2.2). Ve snaze oprostit naše výsledky od tohoto zkreslení, provedli jsme zpracování dat také přepočtem přes pufracní kapacitu. Pro přepočet přes pufracní kapacitu jsme vybrali pouze data získaná při 31 °C. Pře této teplotě již lze dobře pozorovat rozdíly mezi jednotlivými mutacemi MntH a zároveň je při této teplotě relativně menší rozptyl dat než při teplotách vyšších.

4.2.2 Zpracování dat přepočtem přes pufracní kapacitu

Při teplotě 31 °C jsme určili pufracní kapacitu zvláště pro všechny testované bakteriální kmeny. Výsledky ze 3 – 6 kultivací ukazuje tabulka 4.1.

Tabulka 4.1: Pufracní kapacita při 31 °C měřená v pufru M (20 mM MES, 30 mM KCl, 70 mM NaCl, pH 5,5).

Kmen	β [mM]
EcoliA	141 ± 15
D34G	129 ± 9
H211Y	157 ± 32
N401G	111 ± 16
pBAD	122 ± 8

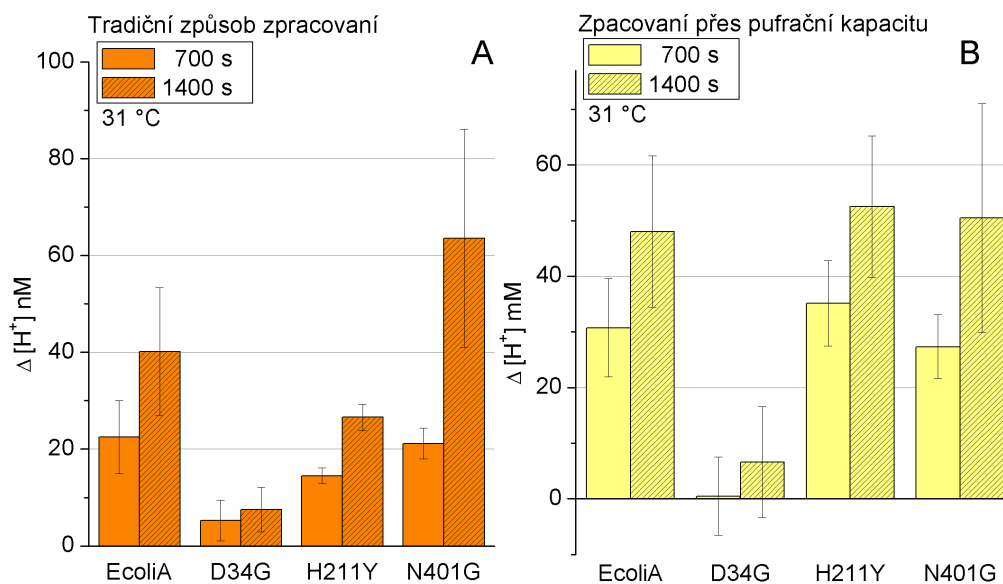
Námi naměřené pufracní kapacity jsou relativně velké (≈ 130 mM) ve srovnání s pufracními kapacitami naměřenými v práci [68], kde ovšem měření probíhalo v citrát-fosfátovém pufru a v pH 5,3. Pro kmen EcoliA naměřili $\beta \approx 75$ mM. Schopnost buněk udržovat stabilní vnitřní pH je určitě ovlivňováno vnějším pH prostředí i jeho složením. Vyšší pufracní kapacitu jsme pravděpodobně naměřili z několika důvodů. Jednak jsme měření prováděli v pH 5,5. Vyšší externí pH znamená pro buňky menší pH gradient přes plazmatickou membránu a tím i snadnější udržování cytosolického pH. Vliv složení pufru na pufracní kapacitu lze také očekávat. Je prokázáno, že například určitá koncentrace K^+ je pro pufracní schopnost buněk velice důležitá [72]. Navíc naše měření probíhalo při 31 °C. Vyšší teplota, která je zároveň bližší fyziologické teplotě pravděpodobně pufracní schopnost buněk zvyšuje také. Systémy zodpovědné právě za pufrování cytosolu se dostávají blíž své optimální teplotě a díky tomu mohou fungovat efektivněji.

Shodně s prací [68] jsme pro negativní kontrolu (pBAD) naměřili podobnou hodnotu pufrální kapacity jako má EcoliA a pro kmen N401G nižší pufrální kapacitu než má EcoliA. V práci [68] se současně spekuluje o tom, že za menší naměřenou pufrální kapacitu kmene N401G může odpřažený transport protonů od transportu kovů, toto tvrzení však není podloženo žádnými experimentálními důkazy. Pozorování odpřaženého transportu protonů umožnilo až nalezení experimentálních podmínek popsanych v této práci. Naše výsledky ukazují, že skrz mutovaný N401G opravdu probíhá odpřažený transport protonů, avšak v 700 sekundě v rámci chyby srovnatelně velký jako skrz EcoliA.

Z tabulky 4.1 můžeme vidět, že pro mutaci D34G vychází pufrální kapacita v rámci chyby shodně s pufrální kapacitou pBAD. To dobře souhlasí s faktem, že kmen D34G se při 31°C chová i při transportu protonů velmi podobně jako pBAD. Pufrální kapacita kmene H211Y se zdá být poněkud vyšší než kmene EcoliA. Tento rozdíl ale není dle t-testu statisticky významný.

Určené pufrální kapacity z tabulky 4.1 byly použity pro přepočtení naměřených ΔpH na $\Delta[\text{H}^+]$ dle rovnice (3.5). Následnou korekci na pBAD jsme ovšem provedli jiným způsobem než při tradičním zpracování dat. Tradiční zpracování dat má tu výhodu, že změny koncentrace protonů ve vyšších pH se v něm projeví méně markantně než v nižších pH. To vede zejména u kmene pBAD, u kterého dochází k malým změnám koncentrace protonů ve vyšších pH, k efektivnímu zmenšení rozptylu dat, který je pak ve srovnání s rozptylem dat pro kmeny exprimující MntH zanedbatelný. To umožňuje při tradičním zpracování dat provést korekci na pBAD prostým odečtením hodnoty $\Delta[\text{H}^+]$ pBAD od hodnot $\Delta[\text{H}^+]$ kmenů exprimujících MntH. Při přepočtu pomocí pufrální kapacity jsme se ovšem dostali do situace, kdy rozptyl dat kmene pBAD byl podstatně větší než rozptyl dat kmenů exprimujících MntH (výjimku tvoří kmen EcoliA, který má rozptyl hodnot ΔpH srovnatelný s pBAD). Pokud bychom provedli korekci na pBAD prostým odečtením průměrné hodnoty kmene pBAD od průměrných hodnot pro kmeny exprimující MntH, rozptyl hodnot pBAD by se nám přenesl do chyb výsledných korigovaných dat.

Proto jsme zvolili pro korekci na pBAD v tomto případě jinou cestu. Vycházeli jsme z předpokladu, že přes veškerou snahu nejsme schopni pro buňky zajistit při každé kultivaci naprosto stejné podmínky. Korekci na pBAD (prováděna po přepočtu přes kmenově příslušnou pufrální kapacitu z hodnot $\Delta[\text{H}^+]$) jsme proto neprovedli z hodnot zprůměrovaných z několika kultivací, ale pro každou kultivaci zvlášť. Tím jsme získali korigované hodnoty $\Delta[\text{H}^+]$ pro kmeny exprimující MntH z jednotlivých kultivací a ty jsme poté zprůměro-



Obrázek 4.5: Odpražený transport protonů při 31 °C. Porovnání tradičního způsobu zpracování dat (A) se zpracováním dat pomocí přepočtu přes pufrací kapacitu (B).

vali. Porovnání výsledků tohoto zpracování s výsledky z tradičního zpracování dat uvádí obrázek 4.5.

Porovnáme-li hodnoty $\Delta[H^+]$ získané tradičním zpracováním dat a zpracováním dat pomocí pufrací kapacity vidíme, že pozorujeme kvalitativní rozdíl pro kmeny H211Y a N401G vůči EcoliA. Kmen D34G nevykazuje při 31 °C signifikantní změnu vnitrobuněčné koncentrace protonů a tato skutečnost se přepočtem přes pufrací kapacitu nezměnila. Avšak $\Delta[H^+]$ kmenů H211Y a N401G je při tradičním způsobu zpracování dat aspoň v 1400 s rozdílná od $\Delta[H^+]$ EcoliA. Přepočtem přes pufrací kapacitu byl tento rozdíl smazán.

Možné vysvětlení je minimálně dvojí. Prvním možným vysvětlením je, že zpracování přes pufrací kapacitu započítává vliv pozměněných transportních vlastností mutovaných kmenů dvakrát, tyto dva vlivy se poté navzájem kompenzují. Poprvé je odpražený transport protonů patrně zohledněn použitím odlišných pufracích kapacit pro jednotlivé mutace a divoký typ. Podruhé se odpražený transport protonů projevuje jako odlišné hodnoty ΔpH , které jsou pro mutace MntH jiné než pro EcoliA právě díky odlišným transportním vlastnostem mutací MntH. Znamená to tedy, že zvětšení odpraženého transportu

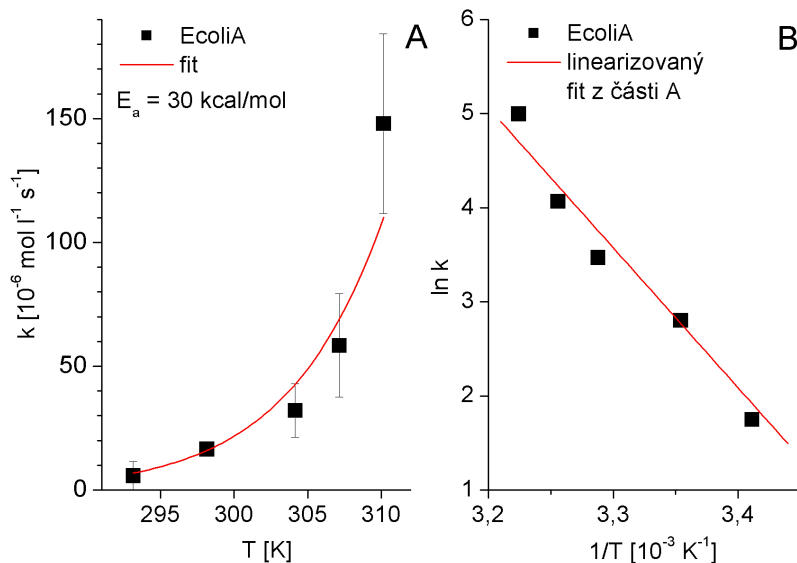
by se mělo projevit zvětšením pozorovaného ΔpH (resp. $\Delta[\text{H}^+]$ vypočteného tradičně – pomocí vzorce 3.3) a/nebo snížením pufrací kapacity. Ukazuje se tedy, že pro bakteriální kmeny, jejichž pufrací kapacita je odlišná od pufrací kapacity negativní kontroly (pBAD), není zpracování přes pufrací kapacitu přímočaré a je třeba uvažovat zda jev, který studujeme a jehož ΔpH přepočítáváme, není již započítán právě v pufrací kapacitě. Pokud bychom pro přepočet přes pufrací kapacitu použili u všech kmenů hodnotu pufrací kapacity kmene EcoliA (případně pBAD nebo jejich průměr), rozdíly mezi jednotlivými kmeny by se zachovaly tak, jak je vidíme při tradičním zpracování dat (obrázek 4.5).

Za druhé můžeme uvažovat takto. Pokud bychom přijali výsledek přepočtu přes pufrací kapacitu jako fakt a předpokládali, že v časech řádů stovek sekund není mezi kmeny EcoliA a H211Y respektive N401G rozdíl v množství H^+ , přenesených odpráženým transportem, tak by efekt sníženého respektive zvýšeného množství přenesených protonů, který pozorujeme u H211Y respektive N401G při tradičním zpracování dat, byl pouze efektem změněné pufrací schopnosti buněk, kterou jsme opravdu jinou naměřili. Což by znamenalo, že mutace H211Y a N401G vedou ke změnám v transportní činnosti MntH, která vede ke změně pufrací kapacity, ale zároveň tyto mutace nevedou k pozorovatelným změnám v odpráženém transportu protonů. Toto vysvětlení se proto jeví jako sporné.

4.3 Aktivační energie odpráženého transportu protonů

Skutečnost, že máme proměřen odprážený transport H^+ při různých teplotách, nám umožňuje pokusit se určit aktivační energii tohoto transportu. Tu jsme určovali fitováním (s vahou danou rozptylem dat) experimentálních dat funkcí (3.6). Protože námi sledovaný efekt je relativně slabý, určit rychlostní konstantu jako počáteční rychlost by bylo velmi obtížné. Nejkratší čas, pro který jsme zaznamenávali údaj o množství přenesených protonů, byl 700 s po iniciaci odpráženého transportu. Jako rychlostní konstantu k jsme proto dosadili na pBAD korigovanou změnu v koncentraci protonů za 700 s určenou tradičním způsobem zpracování dat, tedy pomocí rovnice (3.3), dělenou 700 s.

Určovat aktivační energii má smysl pouze u kmenů, pro které jsme naměřili aspoň při vyšších teplotách nenulové změny v koncentraci protonů. Aktivační energii jsme tedy určovali pro divoký typ EcoliA a jednobodové mutanty

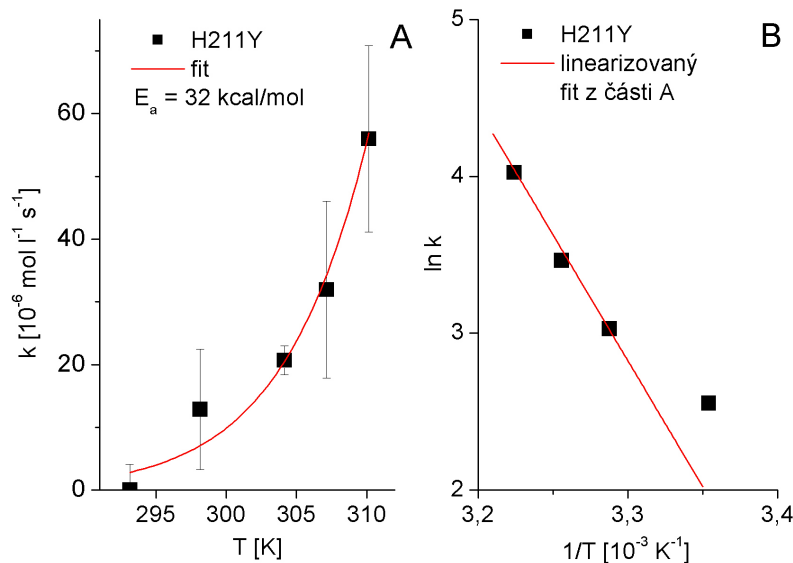


Obrázek 4.6: Arrheniův graf pro *EcoliA*. Experimentální data jsou korigovaná na negativní kontrolu (pBAD). Část B ukazuje linearizovaný graf z části A, tak jak je Arrheniův graf zpravidla uváděn. Podrobnosti uvedeny v textu.

H211Y a N401G. Obrázky 4.6, 4.8, 4.7 ukazují v částech A fit funkcí (3.6) a z něj určenou hodnotu aktivační energie E_a . V částech B těchto grafů prezentujeme linearizovaná data z části A, tak jak se Arrheniovy grafy zpravidla uvádějí. Prokládaná přímka v částech B je pouze linearizovaný fit z části A, nejedná se tedy o nový fit linearizovaných dat. Mutace H211Y má při 20 °C prakticky shodnou hodnotu ΔH^+ jako negativní kontrola (pBAD), tudíž tento bod leží v nule.

Určené aktivační energie odpřaženého transportu H^+ shrnuje tabulka 4.2. Nemáme k dispozici žádná publikovaná data odpřaženého transportu H^+ , se kterými bychom námi určené aktivační energie mohli srovnat. Ty existují pouze pro spřažený transportu Me^{2+} s H^+ , získané byly za stejných podmínek dvěma různými metodami. První metoda sledovala tok protonů do buněk indukovaný Cd^{2+} [68]. Druhá sledovala akumulaci radioaktivně značeného substrátu (Cd^{2+}) v buňkách [45]. V tabulce 4.2 nabízíme srovnání s těmito daty.

Pro divoký typ (*EcoliA*) jsme určili aktivační energii odpřaženého transportu H^+ 30 kcal/mol, tedy zhruba dvojnásobnou hodnotu než jaká byla

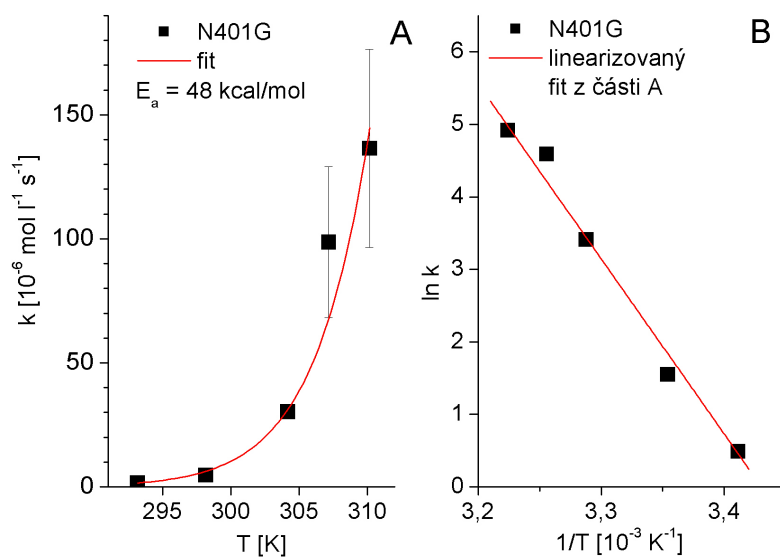


Obrázek 4.7: Arrheniův graf pro H211Y. Experimentální data jsou korigovaná na pBAD. Část B ukazuje linearizovaný graf z části A, tak jak je Arrheniův graf zpravidla uváděn. Podrobnosti uvedeny v textu.

zjištěna při sledování spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$. Obě metody sledování spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ poskytují podobnou hodnotu aktivační energie (viz tabulka 4.2). To že námi určená E_a odpřaženého transportu H^+ je vyšší než E_a spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ je v souladu s představou, že odpřažený transport H^+ není primární funkcí proteinu MntH a jde tedy přes větší energetickou bariéru než spřažený transport H^+ s Me^{2+} .

Námi určená aktivační energie odpřaženého transportu protonů H211Y je v rámci chyby stejná jako aktivační energie spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ H211Y určená pomocí sledování transportu protonů. Skutečnost, že hodnota aktivační energie spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ H211Y určená pomocí sledování akumulace radioaktivního Cd^{2+} je nižší, naznačuje, že mutace H211Y má větší vliv na transportní cestu pro kovy než na transportní cestu pro protony. To je v souladu s hypotézou [41, 45], že mutace H211Y má vliv na vazebné místo pro dvojmocné kovy.

Aktivační energii mutace N401G nemáme možnost porovnat s E_a spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ přímočaře. Informace o hodnotě aktivační energie existují pouze pro konzervativnější mutaci rezidua Asp⁴⁰¹ N401T. Mutace



Obrázek 4.8: Arrheniův graf pro N401G. Experimentální data jsou korigovaná na pBAD. Část B ukazuje linearizovaný graf z části A, tak jak je Arrheniův graf zpravidla uváděn. Podrobnosti uvedeny v textu.

Tabulka 4.2: Aktivační energie transportu protonů

Kmen	EcoliA	H211Y	N401G	N401T
Námi určená E_a [kcal/mol] odpráženého transportu H^+	30 ± 3	32 ± 6	48 ± 4	–
E_a [kcal/mol] spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ získané sledováním vnitrobuněčného pH [70]	≈ 13	≈ 36	–	≈ 9
E_a [kcal/mol] spřaženého transportu $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ získané sledováním akumulace radioaktivního Cd^{2+} [45]	≈ 17	≈ 15	–	≈ 15

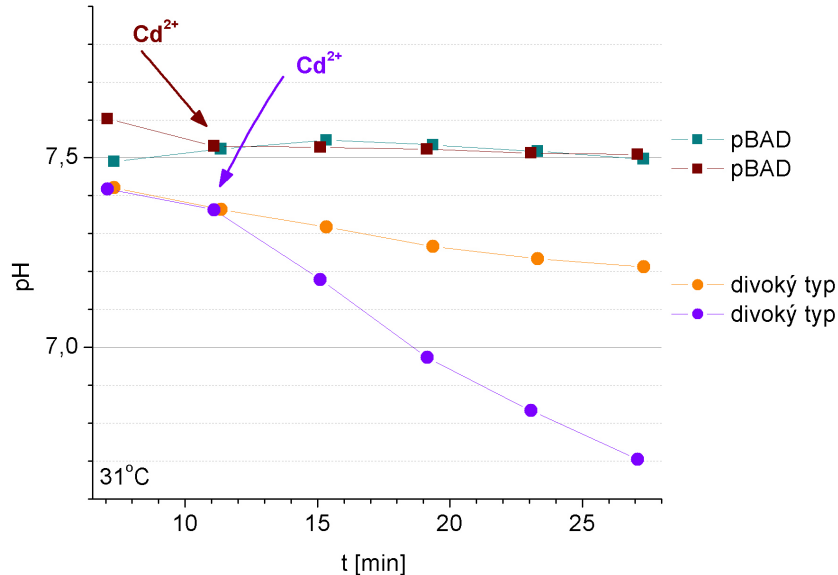
N401T má aktivační energii spřaženého transportu H^+/Cd^{2+} srovnatelnou s divokým typem a to při obou výše zmíněných použitých metodách. Dříve jsme ukázali (v kapitole 4.2.1), že odpřažený transport H^+ mutace N401G je v rámci chyby srovnatelný s odpřaženým transportem H^+ divokého typu EcoliA. Po vyhodnocení jsme však zjistili, že jejich aktivační energie se liší. E_a odpřaženého transportu H^+ N401G je vyšší než E_a odpřaženého transportu H^+ divokého typu. To společně s informací o E_a spřaženého transportu H^+/Cd^{2+} poukazuje na význam rezidua Asp⁴⁰¹ v transportní cestě pro protony. Studie [44] ukázala, že aktivita transportu kovů mutace N401G se podobá aktivitě transportu kovů divokého typu EcoliA. Takovouto podobnost jsme pozorovali také my u odpřaženého transportu H^+ .

4.4 Vliv iontů na transport protonů divokým typem MntH

V další části diplomové práce jsme sledovali, jaký vliv má přítomnost iontů na transport protonů a to jak odpřažený tak spřažený s Me^{2+} . Naším hlavním zájmem bylo posoudit vliv Ca^{2+} . Jako kontrolu k dvojmocnému iontu Ca^{2+} jsme zvolili Mg^{2+} . Oba tyto ionty jsme používali ve formě chloridových solí. Abychom vyloučili možnost, že pozorujeme efekt právě chloridů, probíhaly pokusy také s adekvátním množstvím NaCl, tak aby se koncentrace chloridů ve vzorcích s $CaCl_2$, s $MgCl_2$ a s NaCl shodovala.

Jako iont indukující spřažený transport protonů s Me^{2+} bylo vybráno kadmium. Protože jsme chtěli sledovat vliv vápníku nemohli jsme použít postup a experimentální prostředí etablované v první části diplomové práce. Do měřících kyvet se nám totiž společně s bakteriemi dostávalo i malé množství citrát-fosfátového pufru, ve kterém probíhalo promývání bakterií. Jak se ukázalo i toto malé množství se váže s Ca^{2+} a znemožňuje nám kvantifikovat vliv Ca^{2+} na transportní proces.

Od promývání v citrát-fosfátovém pufru bylo tedy upuštěno a pro promývání a měření byl používán výhradně pufr obsahující MES. Konkrétně byl zvolen 100 mM MES s 30 mM KCl, který označujeme jako pufr MS. Na obrázku 4.9 je ukázáno jak probíhala měření, při kterých se současně sledovala kinetika odpřaženého transportu H^+ bez přítomnosti kovu a kinetika transportu H^+ v přítomnosti Cd^{2+} . Při všech experimentech byla souběžně měřena také negativní kontrola (pBAD), tak abychom na ni mohli naměřená data korigovat.

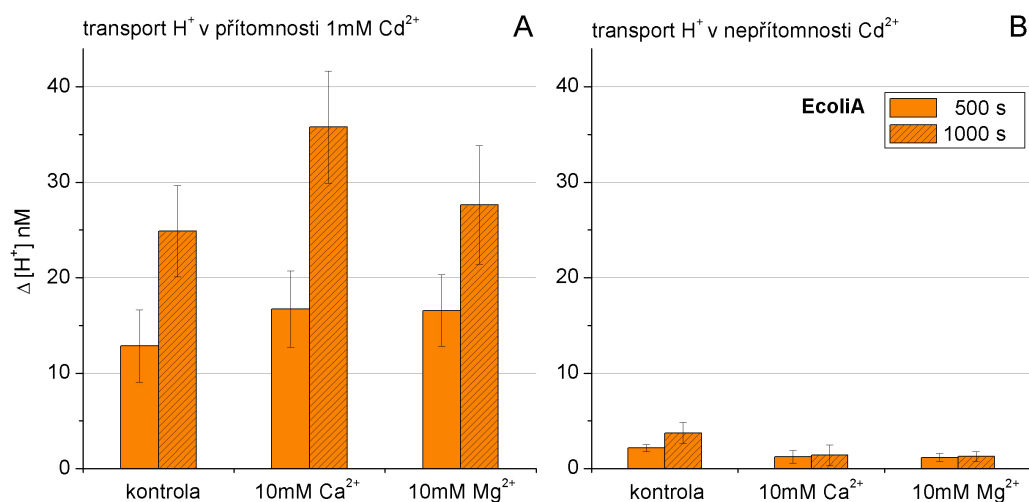


Obrázek 4.9: Kinetika odpráženého transportu H^+ a spřaženého transportu H^+ indukovaného přítomností Cd^{2+} . Vnitřní pH bakterií bylo monitorováno vždy po 4 minutách. Čas nula je okamžikem přidání bakterií do měřících kyvet. Graf představuje průběh jednoho typického experimentu. Po přidání Cd^{2+} do vzorku s divokým typem (*EcoliA*) vidíme výraznější pokles vnitrobuněčného pH, který odpovídá kovem indukovanému spřaženému transportu protonů. U vzorku *EcoliA* bez Cd^{2+} je vidět pozvolný pokles vnitrobuněčného pH, který odpovídá odpráženému transportu protonů.

Vliv iontů na transport protonů v přítomnosti a nepřítomnosti Cd^{2+} jsme se rozhodli posuzovat při dvou různých teplotách. Při pokojové teplotě (v našem případě cca 21 °C) a při 31 °C. Měření při pokojové teplotě mělo potlačit odprážený tok protonů tak, abychom za přítomnosti Cd^{2+} sledovali pouze spřažený transport protonů s Cd^{2+} . Měření při 31 °C mělo transport protonů v přítomnosti kovu zvýraznit a zároveň mělo posloužit jako ukazatel vlivu iontů na odprážený tok protonů v nepřítomnosti Cd^{2+} , který je již při 31 °C pozorovatelný.

4.4.1 21 °C – tradiční způsob zpracování dat

Při pokojové teplotě jsme studovali vliv Ca^{2+} a Mg^{2+} na transport protonů divokým typem MntH. Výsledky měření jsou ukázány na obrázku 4.10. Všechny výsledky se týkají EcoliA a byly korigované na negativní kontrolu (pBAD). Při této teplotě se naměřené hodnoty změny koncentrace protonů u pBAD v 500 i v 1000 s pohybovaly do hodnoty 4 nM. Měření v čistém pufru MS označujeme v grafech jako kontrolu, měření v pufru MS s přidávanými ionty označujeme množstvím a názvem daného iontu.



Obrázek 4.10: Transport protonů divokým typem MntH při pokojové teplotě, tradiční způsob zpracování dat. Část A ukazuje transport protonů v přítomnosti 1 mM Cd^{2+} , část B transport protonů v nepřítomnosti Cd^{2+} . Data pochází ze 2 – 4 kultivací. Data jsou korigována na negativní kontrolu (pBAD), pro kterou se hodnoty $\Delta[\text{H}^+]$ pohybovaly v 500 s i 1000 s do 4 nM.

Dle očekávání jsme při pokojové teplotě v nepřítomnosti Cd^{2+} neměřili zřetelný transport protonů ani v 500 s ani v 1000 s (viz obrázek 4.10 část B). Avšak v přítomnosti Cd^{2+} se nám podařilo pozorovat transport H^+ (část A obrázku 4.10), který tedy můžeme označovat jako spřažený transport H^+ indukovaný Cd^{2+} . Vzorok, do kterých bylo přidáváno 1 mM CdCl_2 , ukázaly měřitelný pokles vnitrobuněčného pH. V 500 s pozorujeme, že oproti kontrole vzorky s Ca^{2+} a Mg^{2+} vykazují větší změnu v koncentraci protonů. Výsledky jsme podrobili dvouvýběrovému t-testu s rovností rozptylů, který ukázal, že

statisticky významný rozdíl mezi těmito hodnotami není. V 1000 s se však hodnoty změny koncentrace protonů více rozešly a po aplikaci dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů byl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a vzorkem s Ca^{2+} . Vzorek s Mg^{2+} se v 1000 s nachází svou hodnotou $\Delta[\text{H}^+]$ přibližně uprostřed mezi kontrolou a vzorkem s Ca^{2+} . Dle t-testu není statisticky významný rozdíl ani mezi vzorkem s Mg^{2+} a kontrolou, ani mezi vzorkem s Mg^{2+} a vzorkem s Ca^{2+} . Toto je pravděpodobně způsobeno tím, že vzorek s Mg^{2+} pochází pouze ze dvou kultivací. Předpokládáme, že pokud bychom měření opakovali vícekrát, přiblížila by se také hodnota vzorku s Mg^{2+} v 1000 s k hodnotám vzorku s Ca^{2+} tak, jak je tomu při 31 °C (viz kapitola 4.4.3).

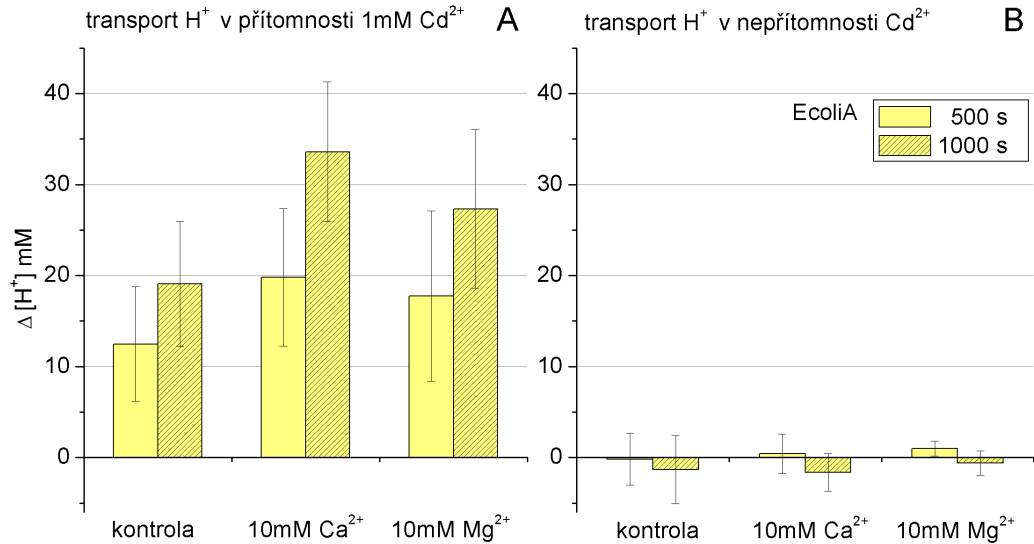
Při pokojové teplotě nepozorujeme v pufru MS signifikantní odprážený transport protonů ale pouze sprážený transport protonů indukovaný Cd^{2+} . Přítomnost 10 mM Ca^{2+} způsobuje statisticky významné zesílení spráženého transportu H^+ indukovaného Cd^{2+} .

4.4.2 21 °C – zpracování dat přepočtem přes pufrální kapacitu

Pufrální kapacitu jsme určovali postupem popsaným výše (v kapitole 3.2.3) zvlášť pro jednotlivé bakteriální kmeny a jednotlivá složení pufru. Výsledky shrnuté v tabulce 4.3 pochází z 5 kultivací. Mezi jednotlivými pufrálními kapacitami není statisticky významný rozdíl. Jejich hodnoty byly využity pro přepočet změny vnitrobuněčného pH v 500 s i 1000 s pomocí vzorce (3.5). Následovalo odečtení hodnot $\Delta[\text{H}^+]$ kmene pBAD od $\Delta[\text{H}^+]$ kmene EcoliA, tedy korekce na negativní kontrolu (pBAD). Výsledky popsaného zpracování

Tabulka 4.3: Pufrální kapacita při pokojové teplotě měřená v pufru MS (100 mM MES, 30 mM KCl, pH 5,5) a jeho modifikacích.

Pufr	Kmen	β [mM]
MS	EcoliA	85 ± 15
MS + 10 mM CaCl_2	EcoliA	97 ± 13
MS + 10 mM MgCl_2	EcoliA	100 ± 20
MS	pBAD	92 ± 9
MS + 10 mM CaCl_2	pBAD	88 ± 16
MS + 10 mM MgCl_2	pBAD	102 ± 9

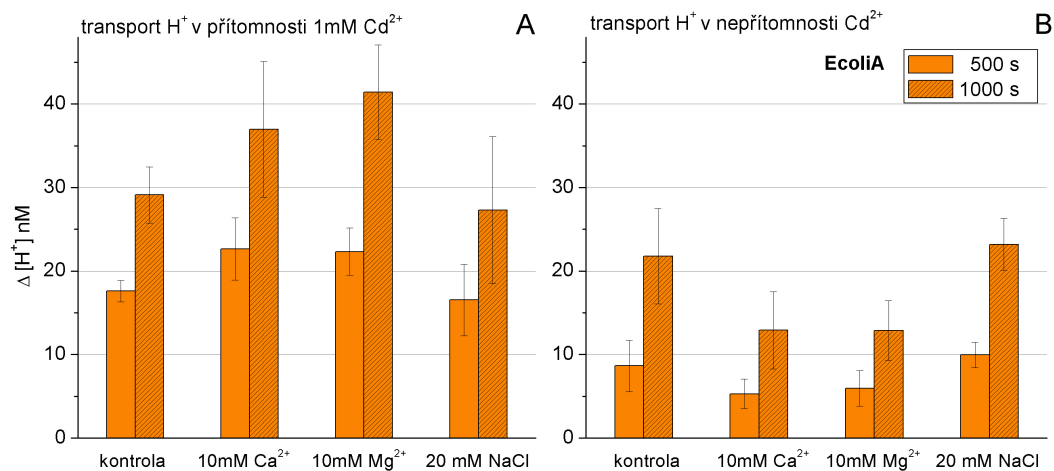


Obrázek 4.11: Transport protonů divokým typem *MntH* při pokojové teplotě, zpracování dat přepočtem přes pufrací kapacitu. Data jsou korigována na negativní kontrolu (*pBAD*). Část A ukazuje transport protonů v přítomnosti 1 mM Cd²⁺, část B transport protonů v nepřítomnosti Cd²⁺. Data pochází ze 2 – 4 kultivací. Pufrací kapacitu, která byla při přepočtu použita, uvádí tabulka 4.3.

dat uvádí obrázek 4.11. Kvalitativně tento graf vypadá podobně jako obrázek 4.10, který vychází z tradičního zpracování dat. Při tomto zpracování se však zvýraznily rozdíly mezi hodnotami $\Delta[\text{H}^+]$ kontroly a vzorku s Ca²⁺. Zdá se tedy, že vápník opravdu ovlivňuje kovem indukovaný transport protonů a pokud se započítá pufrací schopnost buněk je tento vliv ještě výraznější. Přepočet přes pufrací kapacitu nám navíc poskytl odhad skutečného množství protonů přenesených pomocí *MntH* přes plazmatickou membránu.

4.4.3 31 °C – tradiční způsob zpracování dat

Při 31 °C jsme provedli experimenty, při kterých jsme posuzovali vliv CaCl₂, MgCl₂ a NaCl na transport proteinem *MntH*. Studovali jsme jednak změnu vnitrobuněčného pH bakterií bez přítomnosti kovu (odpřažený transport H⁺) a také změnu vnitrobuněčného pH po přidání 1 mM Cd²⁺ (transport protonů



Obrázek 4.12: Transport protonů divokým typem *MntH* při 31 °C, tradiční způsob zpracování dat. Část A ukazuje transport protonů v přítomnosti Cd^{2+} , část B transport protonů v nepřítomnosti Cd^{2+} . Data pro kontrolu a vzorky s Ca^{2+} pochází z 5 – 8 kultivací. Data pro vzorky s Mg^{2+} a Na^+ pochází ze 3 – 5 kultivací. Data jsou korigována na negativní kontrolu (*pBAD*), $\Delta[\text{H}^+]$ kmene *pBAD* se pohybovala v 500 s do 5 nM a v 1000 s do 10 nM.

v přítomnosti Cd^{2+}). Vyšší teplota při měření měla usnadnit a tedy zviditelnit právě odpřažený transport H^+ a zároveň zvýraznit transport H^+ v přítomnosti Cd^{2+} .

Pokud naměřená data zpracujeme tradičním způsobem (pomocí rovnice (3.3)) získáme obrázek 4.12, kde můžeme pozorovat velmi zajímavý trend. Podíváme-li se na transport H^+ v přítomnosti Cd^{2+} v levé části grafu, vidíme, že stejně jako při pokojové teplotě přítomnost Ca^{2+} a Mg^{2+} ve vzorcích způsobila zesílení tohoto transportu. Protože vzorek s NaCl toto zesílení oproti kontrole neukázal, lze se domnívat, že za efektem zesílení stojí opravdu Ca^{2+} a Mg^{2+} a ne Cl^- . Ovšem ještě zajímavější je část B obrázku 4.12. Zde se díváme na výsledky pokusů bez přítomnosti kovu, tedy na odpřažený transport H^+ a vidíme trend naprosto opačný než v přítomnosti Cd^{2+} v části A. Vzorky s Ca^{2+} a Mg^{2+} na rozdíl od kontroly a vzorku s Na^+ dosáhly pozorovatelně menší změny v koncentraci H^+ jak po 500 s tak zejména po 1000 s. Ukázalo se tedy, že Ca^{2+} a Mg^{2+} mají na transport proteinem *MntH* prokazatelný vliv, tlumí odpřažený transport H^+ a zesilují transport H^+ v přítomnosti Cd^{2+} .

4.4.4 31 °C – zpracování dat přepočtem přes pufrací kapacitu

Pro 31 °C jsme taktéž naměřená data přepočítali přes pufrací kapacitu. Při teplotě 31 °C jsme naměřili změny vnitrobuněčného pH po přidání kyseliny propanové opět zvlášť pro kmeny EcoliA a pBAD a ty přepočítali na pufrací kapacitu. Výsledky shrnuje tabulka 4.4 a pocházejí z 5 – 7 kultivací s výjimkou pufracích kapacit pro prostředí pufru MS + 20 mM NaCl, které pochází pro EcoliA ze 4 a pro pBAD ze 3 kultivací.

Tabulka 4.4: Pufrací kapacita při 31 °C měřená v pufru MS (100 mM MES, 30 mM KCl, pH 5,5) a jeho modifikacích.

Pufr	Kmen	β [mM]
MS	EcoliA	109 ± 8
MS + 10 mM CaCl ₂	EcoliA	108 ± 11
MS + 10 mM MgCl ₂	EcoliA	121 ± 13
MS + 20 mM NaCl	EcoliA	116 ± 15
MS	pBAD	107 ± 12
MS + 10 mM CaCl ₂	pBAD	130 ± 8
MS + 10 mM MgCl ₂	pBAD	115 ± 5
MS + 20 mM NaCl	pBAD	129 ± 11

Pro kmen EcoliA v různých prostředích vyšla pufrací kapacita v rámci chyby stejně. Srovnatelná je i pufrací kapacita EcoliA a pBAD v čistém pufru MS. Hodnota pufrací kapacity naměřená v pufrach s 10 mM Ca²⁺ a 20 mM NaCl zejména pro pBAD je poněkud vyšší, což by mohlo souviset s rolí Ca²⁺ a Na⁺ v systémech napomáhajících buňce vyrovnat se s náhlou změnou pH.

Pokud pomocí t-testu porovnáme naměřené pufrací kapacity pro pBAD a EcoliA v jednotlivých prostředích zvlášť, statisticky významný rozdíl odhalíme pouze u jedné takovéto dvojice souborů dat. Konkrétně se jedná o EcoliA a pBAD v prostředí pufru MS + 10 mM Ca²⁺. Průměrná hodnota pufrací kapacity pBAD je v tomto prostředí o 20 % vyšší než průměrná hodnota pufrací kapacity EcoliA. I při určování pufrací kapacity se tedy projevila výsadní role Ca²⁺ na protein MntH.

Domníváme se, že se zde nacházíme v jiné situaci než při řešení problému s N401G (problém s přepočtem přes pufrací kapacitu diskutován v kapitole 4.2.2). Tehdy jsme pozorovali zvětšení Δ pH (odpřaženého transportu H⁺)

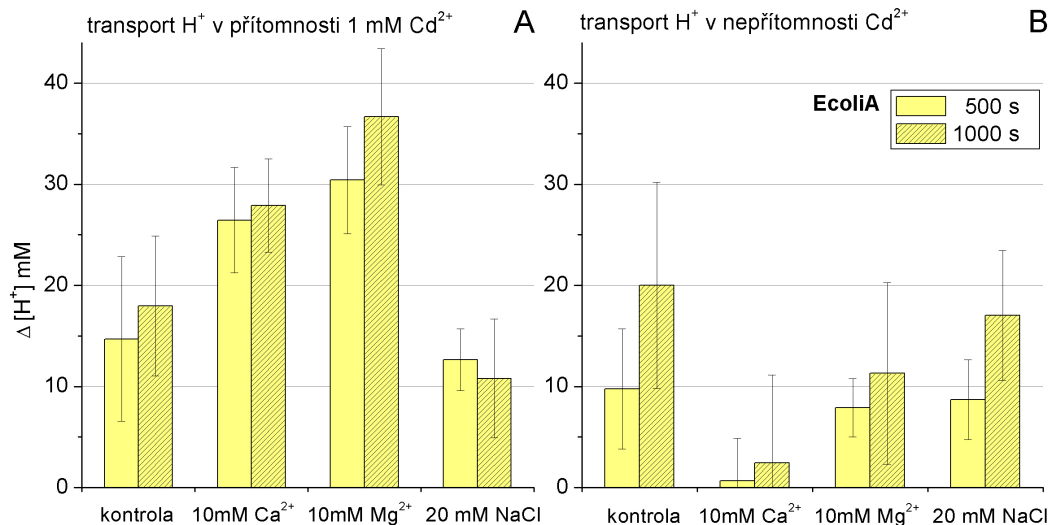
a zároveň snížení pufrční kapacity. Při přepočtu ΔpH odpřaženého transportu H^+ přes pufrční kapacitu tak došlo ke vzájemné kompenzaci těchto efektů, které jsou jen dvěma projevy téhož jevu. Zatímco v případě přítomnosti Ca^{2+} se nacházíme v opačné situaci, pozorujeme slabší odpřažený transport H^+ než má kontrola bez Ca^{2+} a zároveň nižší pufrční kapacitu. Tyto dva vlivy se při přepočtu přes pufrční kapacitu navzájem nekompensují, ale patrně naopak zesilují. Uvědomujeme si, že $\Delta[\text{H}^+]$ určené přepočtem přes pufrční kapacitu může být díky tomu nadhodnocené. Přesto jsme se rozhodli přepočet přes pufrční kapacitu provést normálním způsobem. Tedy provést přepočet přes pufrční kapacitu pomocí hodnoty pufrční kapacity naměřené v daném prostředí na daném bakteriálním kmeni.

Pro přepočet ΔpH transportu protonů v přítomnosti Cd^{2+} byly taktéž využity pufrční kapacity z tabulky 4.4. Výsledný obrázek 4.13 můžeme porovnávat s obrázkem 4.12, který ukazuje stejná data přepočítaná tradičním způsobem. Zaměříme se nejprve na část B, tedy odpřažený transport protonů. Rozdíl oproti tradičnímu zpracování dat je zřetelný zvláště u vzorku s Ca^{2+} , kde vidíme oproti obrázku 4.12 prakticky nulovou změnu v koncentraci protonů. Po přepočtu přes pufrční kapacitu vznikl rozdíl mezi vzorky s Ca^{2+} a Mg^{2+} , který jsme při tradičním způsobu zpracování nepozorovali. Zdá se tedy, že pokud započítáme pufrční schopnost buněk ukáže se, že jediný ze zkoumaných iontů, který má na odpřažený transport H^+ vliv je Ca^{2+} . Přítomnost Ca^{2+} tlumí odpřažený tok protonů prakticky na nulu, lépe řečeno na hodnotu srovnatelnou se změnou vnitrobuněčné koncentrace protonů negativní kontroly (pBAD).

Podíváme-li se na část A obrázku 4.13, tedy transport H^+ v přítomnosti Cd^{2+} , vidíme kvalitativní podobu s částí A grafu 4.12. Pouze vzorek s Mg^{2+} má větší $\Delta[\text{H}^+]$ než vzorek s Ca^{2+} . To nás přivedlo na myšlenku pokusit se graficky znázornit příspěvek transportu H^+ v nepřítomnosti Cd^{2+} (odpřažený transport H^+) k transportu H^+ v přítomnosti Cd^{2+} (realizováno v obrázku 4.14).

Je jistě zajímavou otázkou, zda odpřažený transport H^+ pokračuje i v přítomnosti Cd^{2+} . Pokud ano, pak transport v přítomnosti Cd^{2+} , který měříme, je tvořen jak odpřaženým transportem H^+ tak spřaženým transportem H^+ indukovaným Cd^{2+} . Do jaké míry a jestli vůbec přispívá odpřažený transport H^+ k celkovému množství přenesených protonů při transportu H^+ v přítomnosti Cd^{2+} , můžeme pouze spekulovat.

Model střídavého přístupu („alternating access model“) dobře popisuje symport dvou substrátů, kdy předpokládá, že po navázání obou substrátů



Obrázek 4.13: Transport protonů divokým typem *MntH* při 31 °C, zpracování dat přepočtem přes pufrční kapacitu. Část A ukazuje transport protonů v přítomnosti 1 mM Cd^{2+} , část B transport protonů v nepřítomnosti Cd^{2+} . Data pro kontrolu a vzorky s Ca^{2+} pochází z 5 – 8 kultivací. Data pro vzorky s Mg^{2+} a Na^+ pochází ze 3 – 5 kultivací. Data jsou korigována na negativní kontrolu (*pBAD*). Pufrční kapacitu, která byla při výpočtu použita uvádí tabulka 4.4.

na jedné straně membrány dochází ke konformačním změnám a ty vedou k uvolnění substrátů na druhé straně membrány. Tento model dobře vysvětluje konstantní stechiometrii kotransportu, nevyrovnává se však s fenoménem molekulárního prokluzu („molecular slip mechanism“) [55]. Naše data ukazují, že stejně jako eukaryotní homology rodiny Nramp, také *MntH* umožňuje kromě spřaženého transportu $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ ještě odpřažený transport H^+ . Abychom mohli na odpřažený transport H^+ aplikovat model střídavého přístupu, museli bychom předpokládat, že se transportér může „překlápět“ také pouze s jedním navázaným substrátem. Aby takovýto mechanismus mohl fungovat a odpovídat naměřeným datům, musela by být pravděpodobnost přenosu (konformační změny) při navázání pouze jednoho substrátu velmi výrazně menší než pravděpodobnost přenosu (konformační změny) při navázání obou substrátů. Zeslabení odpřaženého transportu v přítomnosti Ca^{2+} pak můžeme vysvětlit jako efekt interakce Ca^{2+} s proteinem *MntH*, který vede

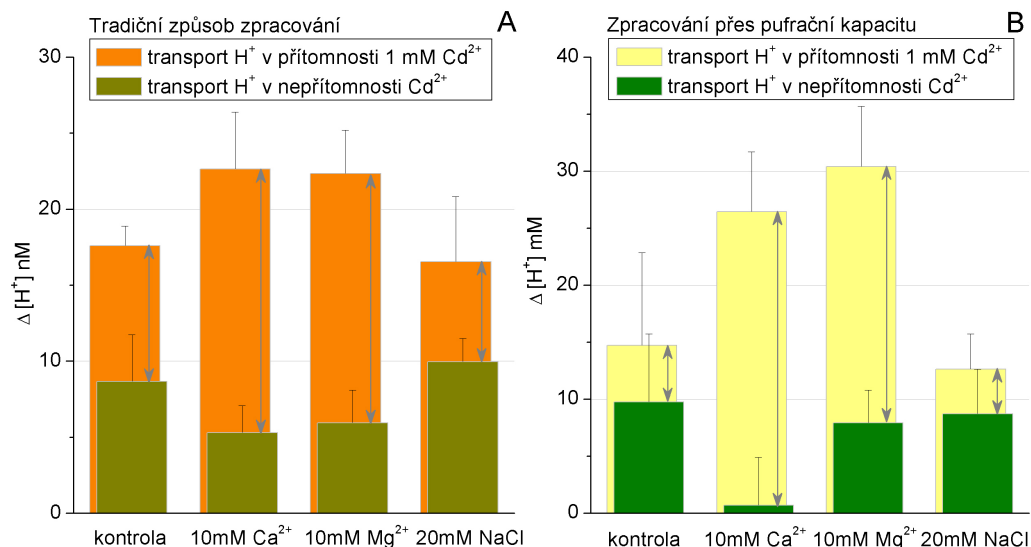
k zablokování možnosti „překlápět“ se, pokud je navázán pouze jeden substrát.

Model střídavého přístupu můžeme použít také pro popis dat získaných za přítomnosti Cd^{2+} . Transport H^+ v přítomnosti Cd^{2+} probíhá dle tohoto modelu jako spřažený symport s pevně danou stechiometrií. V přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} se transport H^+ zesiluje. To by mohlo být způsobeno tím, že Ca^{2+} a Mg^{2+} jsou MntH také transportovány, byť s malou afinitou. Z pokusů bez přítomnosti Cd^{2+} však víme, že transport H^+ se v přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} nezesiluje (což by naznačovalo jejich transport), ale naopak zeslabuje. Navíc používáme velmi vysokou koncentraci Cd^{2+} , při které je již transport v saturaci a další přidávání substrátu by nemělo mít na intenzitu transportu vliv. Ca^{2+} ani Mg^{2+} tedy pravděpodobně pomocí MntH transportovány nejsou (alespoň ne v symportu s H^+). Jak si tedy na úrovni modelu střídavého přístupu vysvětlit zesílení transportu H^+ v přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} ?

Jednak je možné, že tyto ionty nějakým způsobem (např. přímou interakcí s proteinem MntH) ovlivňují afinitu MntH k substrátu (v našem případě Cd^{2+}), ten se pak lépe navazuje na vnější straně membrány nebo/a naopak lépe uvolňuje na vnitřní straně membrány. Toto zvýšení afinity by poté opravdu mělo v experimentu za následek zesílení transportu H^+ v přítomnosti Ca^{2+} (či Mg^{2+}). Také bychom mohli předpokládat, že MntH potřebuje na vnější straně membrány navázat, kromě určitého počtu H^+ , víc než jeden iont Cd^{2+} . MntH by měl například dvě vazebná místa pro Me^{2+} a dvě pro H^+ . Pak bychom mohli vysvětlit zesílení transportu v přítomnosti Ca^{2+} (či Mg^{2+}) pomocí modelu střídavého přístupu takto: Vápník (nebo hořčík) sám o sobě nemůže být substrátem přenosu MntH, ale pokud je přítomno Cd^{2+} , může Ca^{2+} (či Mg^{2+}) využít druhé vazebné místo pro Me^{2+} a být tak společně s Cd^{2+} a H^+ transportováno. Ca^{2+} (či Mg^{2+}) by tak efektivně zvyšoval koncentraci substrátu v okolí MntH a díky tomu by byl zesílen transport H^+ , ovšem pouze pokud bychom se nenacházeli s koncentrací Cd^{2+} v saturaci.

Pomocí modelu střídavého přístupu jsme tedy schopni vysvětlit zesílení transportu H^+ indukovaného Cd^{2+} v přítomnosti Ca^{2+} (či Mg^{2+}). Pokud připustíme, že transportér může s malou pravděpodobností přecházet konformačními změnami také pokud je navázán pouze jeden substrát, může tento model popsat také odpřažený transport H^+ .

Su a kol. navrhli model transportu, který označují jako „multi-substrate single-file“. Tento model nerozlišuje mezi spřaženým a odpřaženým transportem, předpokládá jednu transportní cestu sestavenou z řady vazebných míst,



Obrázek 4.14: Transport protonů při 31 °C v 500 s. Porovnání tradičního způsobu zpracování dat (A) se zpracováním dat pomocí přepočtu přes pufrací kapacitu (B). Šipky označují pravděpodobný podíl sprzęženého transportu H⁺ s Cd²⁺ na celkovém množství protonů přenesených v přítomnosti Cd²⁺.

kteřé využívají oba substráty. Tento model je schopen popsat námi získaná data jak v přítomnosti Cd²⁺ tak v jeho nepřítomnosti. Jednoduchý model, který navrhli Su a kol. v práci [57], neuvažuje přítomnost dalšího iontu (v našem případě Ca²⁺ či Mg²⁺), který by ovlivňoval transportní vlastnosti proteinu. Nemůžeme ho proto využít k interpretaci dat v přítomnosti Ca²⁺, Mg²⁺ či Na⁺.

Další model, který byl použit k popisu eukaryotního proteinu Nramp, je model navržený v práci [3]. Ten předpokládá, že navázání Me²⁺ iontů na vazebná místa v transportním proteinu vede ke konformačním změnám, které umožňují tok protonů proteinem. Tuto konformaci označují jako „semi-channel“ a předpokládají, že díky ní může protein uskutečňovat současně sprzęžený transport Cd²⁺/H⁺ a molekulární prokluz H⁺. Tento model tedy vyžaduje přítomnost Me²⁺ k tomu, aby mohlo docházet k prokluzu protonů proteinem. Vzhledem k tomu, že my pozorujeme od sprzęženého transportu H⁺ bez přítomnosti kovu ani tento model není schopen popsat námi naměřená data.

V obrázku 4.14 jsme šipkami označili, jaký může být přínos spřaženého transportu $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ do celkového množství přenesených protonů v přítomnosti Cd^{2+} za 500 s. Pokud tedy předpokládáme, že v přítomnosti Cd^{2+} se zachovává odpřažený transport H^+ a k němu se přidává spřažený transport H^+ s Cd^{2+} .

Jak již bylo zmíněno výše, vliv Ca^{2+} na transportní protein MntH byl prozatím pozorován pouze na RSOV, kde jeho milimolární koncentrace překvapivě způsobuje aktivaci transportu Cd^{2+} [45], případně Mn^{2+} [71]. Naše měření na *E. coli* ukázala, že Ca^{2+} ve vzorcích způsobuje zesílení transportu protonů v přítomnosti Cd^{2+} . Pozorujeme tedy obdobný efekt jako byl popsán na RSOV. Na obrázku 4.14 vidíme, že Ca^{2+} (při tradičním způsobu zpracování dat také Mg^{2+}) má vliv také na transport H^+ v nepřítomnosti Cd^{2+} . Odpřažený transport H^+ je přítomností Ca^{2+} respektive Mg^{2+} blokován. Podobná inhibice odpřaženého toku H^+ způsobená Ca^{2+} byla popsána u eukaryotního DCT1 [10], kde při 5 mM koncentraci Ca^{2+} pozorovali zablokování odpřaženého transportu H^+ . Tento efekt však nebyl pozorován s 5 mM Mg^{2+} , jehož přítomnost neměla na odpřažený transport H^+ vliv. S tímto výsledkem (efekt má jen Ca^{2+} ne Mg^{2+}) jsou v souladu naše data po přepočtu přes pufrční kapacitu (obrázek 4.13).

Bylo by jistě zajímavé, posoudit vliv Ca^{2+} na transport MntH sledováním akumulace Cd^{2+} . Pak bychom měli možnost rozhodnout, zda Ca^{2+} je nebo není substrátem přenosu (u eukaryotních Nramp popsáno, že Ca^{2+} substrátem přenosu být může [59], navíc má Ca^{2+} iontový poloměr velmi podobný iontovému poloměru Cd^{2+} [73]). Pokud by vápník substrátem přenosu byl, množství akumulovaného Cd^{2+} v přítomnosti Ca^{2+} by se nemělo zvýšit. Pokud by Ca^{2+} substrátem přenosu nebyl, množství přeneseného Cd^{2+} by se v jeho přítomnosti mělo zvýšit adekvátně zvýšení množství přenesených protonů. Vzhledem k tomu, že již zmíněné pokusy na RSOV probíhaly pomocí sledování akumulace Cd^{2+} a Mn^{2+} , lze se domnívat, že pravděpodobnější je druhá nabízená varianta. Ca^{2+} pravděpodobně není substrátem přenosu MntH, ale jeho transportní činnost ovlivňuje nepřímou. Lze si také těžko představit, jakým mechanismem by Ca^{2+} jako substrát přenosu mohl blokovat transport H^+ v nepřítomnosti Cd^{2+} . Z našich experimentů vyplývá, že na transport v přítomnosti Cd^{2+} má podobný vliv jako Ca^{2+} také Mg^{2+} . Iontový poloměr Mg^{2+} je podstatně menší než iontový poloměr Ca^{2+} a Cd^{2+} a je tedy méně pravděpodobné, že by mohl využívat stejná vazebná místa. Tyto argumenty společně ukazují, že Ca^{2+} pravděpodobně interaguje s MntH (např. ovlivňuje jeho konformaci a stabilitu) tak, že uzavírá transportní cestu

pro prokluz protonů a současně stabilizuje transportní dráhu pro spřažený transport $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$. V této úloze může být Ca^{2+} částečně zastoupen Mg^{2+} . Mg^{2+} stejně jako Ca^{2+} svou přítomností v pufru způsobuje zesílení transportu H^+ v přítomnosti Cd^{2+} . Při započítání pufracní schopnosti buněk se však ukázalo, že Mg^{2+} pravděpodobně nemá schopnost blokovat odpřažený transport tak jako Ca^{2+} .

4.5 Možnost pozorovat odpřažený transport protonů je souhrou více faktorů

Během našich experimentů jsme si položili otázku, proč v pufru MES pozorujeme samovolný pokles vnitrobuněčného pH u *EcoliA*, když v běžně používaném citrát-fosfátovém pufru tento fenomén pozorován není. Při hledání odpovědi na otázku jsme vyzkoušeli mnoho experimentálních prostředí (různých pufrů). Abychom eliminovali proměnné, které mají na samovolný pokles vnitrobuněčného pH vliv, všechna měření jsme prováděli při 31 °C a všechny testované pufrы měly pH 5,5. Zajímali jsme se zda za samovolným poklesem vnitrobuněčného pH v pufru M stojí spíše přítomnost chloridových solí nebo přítomnost MESu. Experimenty, které jsme za tímto účelem provedli, nebyly průkazné a ukázalo se, že problém je komplexnější. Přivedly nás také k zájmu o iontovou sílu pufrů, ve kterých měření provádíme. Zdálo se totiž, že právě vyšší iontová síla pufru M oproti citrát fosfátovému pufru stojí za fenoménem poklesu vnitrobuněčného pH. Připravili jsme proto citrát-fosfátový pufr o vyšší iontové síle (0,10 M) a zjistili, že samovolný pokles vnitrobuněčného pH pozorujeme i zde. Avšak domněnka, že za schopnost či neschopnost pozorovat pokles vnitrobuněčného pH může pouze velikost iontové síly se nepotvrdila (možno vidět v tabulce 4.5), protože pufr MS (100 mM MES, 30 mM KCl) umožňuje jev pozorovat, ale jeho iontová síla je pouze 0,05 M.

V tabulce 4.5 nabízíme přehled několika vybraných pufrů, ve kterých jsme zkoumali intenzitu odpřaženého transportu H^+ . Jedná se o měření s divokým typem *EcoliA*, které jsou opět korigovány na pBAD. U pufru M a pufru MS se jedná o průměrné výsledky ze 7–8 měření. U zbylých pufrů založených na kyselině citrónové se jedná o data z 1–2 měření. Počáteční vnitrobuněčné pH je označováno jako pH_0 .

Celkem jsme provedli pokusy v 10 pufrách (vybrané reprezentativní výsledky v tabulce 4.5) a zjistili, že jednoznačného původce samovolného poklesu vnitrobuněčného pH nelze určit. Pravděpodobně velmi záleží na vybalanco-

Tabulka 4.5: Přehled výsledků odpřaženého transportu protonů za 700 s v různých experimentálních prostředích při 31 °C.

Pufr	iont. síla [M]	pH ₀	ΔpH	Δ[H ⁺] [nM]
Pufr M – 20 mM MES, 30 mM KCl, 70 mM NaCl	0,10	7,7	0,24	19
Pufr MS – 100 mM MES, 30 mM KCl	0,05	7,7	0,12	13
12 mM kyselina citrónová, 27 mM K ₂ HPO ₄	0,07	8,3	0,07	1
16 mM kyselina citrónová, 15 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM Na ₂ HPO ₄	0,10	8,1	0,30	11
15 mM kyselina citrónová, 30 mM KCl, 70 mM NaCl, 34,5 mM NaOH	0,16	7,9	0,15	6

vání složení pufru. Pokud už v daném prostředí odpřažený transport H⁺ probíhá mají bakterie nižší počáteční pH, které po přepočtu na Δ[H⁺] zvýrazňuje změny. Při 31 °C jsme různě intenzivní samovolný pokles vnitrobuněčného pH pozorovali prakticky ve všech testovaných pufrch. V tomto smyslu je jaksi unikátní a výjimečný právě citrát-fosfátový pufr běžně používaný při měření transportu protonů transportním proteinem MntH [41, 44], ve kterém je tento jev velmi slabý nebo neprobíhá vůbec.

Pokles vnitrobuněčného pH, který sledujeme, je jinými slovy zvyšování koncentrace protonů uvnitř buněk. Protože tento fenomén není pozorován u negativní kontroly, můžeme si být jisti, že zvyšování vnitrobuněčné koncentrace protonů probíhá díky ději na MntH – odpřaženému transportu protonů. Proteinem MntH by teoreticky mohly být transportovány také jiné ionty, pomocí pHluorinu však sledujeme změny v koncentraci protonů a tak případný transport jiných iontů není touto metodou viditelný.

Kapitola 5

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem proteinu MntH bakterie *E. coli*, který patří do rodiny membránových transportních proteinů Nramp. V první části práce jsme studovali odpřažení transportu protonů u divokého typu proteinu MntH a jeho vytipovaných jednobodových mutací, u kterých se již dříve spekulovalo o odpřažení transportu H^+ od transportu Me^{2+} . V druhé části práce byl posuzován vliv iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} a Na^+), které nejsou substrátem MntH, na transport protonů divokým typem MntH a to jak odpřažený tak také spřažený indukovaný Cd^{2+} . Transportní vlastnosti proteinu MntH jsme studovali na bakterii *E. coli* s hyperexprimovaným MntH metodou využívající fluorescenční protein pHluorin, který umožňuje měřit změny ve vnitrobuněčném pH.

Nalezli jsme experimentální prostředí, ve kterém se nám podařilo sledovat transport protonů specifický pouze pro kmeny exprimující funkční MntH. Tento objev je zásadní, zejména uvážíme-li, že je to vůbec poprvé, kdy byl odpřažený transport protonů pozorován u prokaryotního homologu Nramp proteinů. Ukázali jsme, že odpřažený transport protonů je závislý na pH gradientu přes plazmatickou membránu a je intenzivnější, blíží-li se teplota fyziologické teplotě bakterie *E. coli* (37 °C). Pro divoký typ MntH a vybrané jednobodové mutace byla provedena měření závislosti odpřaženého transportu protonů na teplotě a z nich byla určena aktivační energie transportu. Aktivační energie odpřaženého transportu protonů divokého typu MntH je vyšší než publikovaná aktivační energie spřaženého transportu H^+/Me^{2+} [45]. Tato skutečnost koreluje s představou, že primární funkcí MntH je transport kovů. Transport samotných protonů jde proto přes větší energetickou bariéru.

Pozorování kinetiky transportu protonů a srovnání aktivačních energií

zkoumaných mutací MntH nám poskytuje informace o vztahu struktury a funkce MntH. Transportní vlastnosti mutace D34G se podobají transportním vlastnostem negativní kontroly. Částečná schopnost odpřaženého transportu protonů se tomuto proteinu vrací pouze v blízkosti 37 °C. Tato mutace má tedy fatální vliv nejen na spřažený transport H^+/Me^{2+} [44], ale jak jsme ukázali také na odpřažený transport protonů. Při studii kinetiky odpřaženého transportu protonů jsme ukázali úlohu rezidua His²¹¹ v transportní cestě pro protony, při vyhodnocení a porovnání aktivační energie [45] mutace H211Y se projevila také jeho role v transportní cestě pro kovy. Je tedy velmi pravděpodobné, že reziduum His²¹¹ je významné jak pro správnou funkci tak i pro strukturu MntH. Měření s mutací N401G mají, oproti měření s divokým typem, velký rozptyl a lze se domnívat, že za to může strukturní role Asn⁴⁰¹. Poměrně vysoká aktivační energie odpřaženého transportu protonů ukazuje na důležitost rezidua Asn⁴⁰¹ v transportní cestě pro protony.

Druhá část diplomové práce se zabývala vlivem iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+) na transportní vlastnosti MntH. Poprvé bylo na živých buňkách popsáno, že přítomnost vápníku nebo hořčíku vede ke zvýšení množství protonů přenesených pomocí MntH v přítomnosti Cd^{2+} . Toto zjištění je zajímavé, zejména protože u eukaryotního homologu Nramp byl popsán opačný efekt. Přítomnost srovnatelného množství Ca^{2+} vedla u DCT1 k částečné inhibici transportu indukovaného Fe^{2+} [10]. Naopak na odpřažený transport protonů působí Ca^{2+} jako inhibitor. Tato inhibiční schopnost Ca^{2+} na odpřažený transport byla již popsána u eukaryotního DCT1. Přestože vápník s největší pravděpodobností není substrátem přenosu MntH, má velmi zajímavou a potenciálně důležitou úlohu při ovlivňování jeho transportních vlastností. Protože je MntH považován za „prototyp“ Nramp proteinů, je možné, že vápník ovlivňuje transportní vlastnosti také ostatních proteinů této sekvenčně konzervované rodiny.

Hlavním přínosem této diplomové práce tedy je, že se vůbec poprvé podařilo pozorovat odpřažený transport protonů prokaryotním homologem proteinů Nramp rodiny a prokázat ovlivnění jak spřaženého tak odpřaženého transportu protonů proteinem MntH *E. coli* přítomností dvojmocných iontů, které nejsou tímto přenašečem transportovány. Oba tyto závěry jsou zásadní a mohou být využity při dalším studiu struktury a funkce MntH.

Seznam zkratek

Blam	β -laktamasa
Cat	Chloramfenikolacetyltransferasa
DCT1	Divalent Cation Transporter 1
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
LB médium	Luria-Bertani médium
MntH	Proton-dependent Manganese Transporter
Nramp	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
SLC11	SoLute Carrier 11
RSOV	Right-Side Out Vesicles
TCDB	Transport Classification Database

Literatura

- [1] Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73, 469–485.
- [2] Cheah, J. H., Kim, S. F., Hester, L. D., Clancy, K. W., Patterson, S. E., Papadopoulos, V., Snyder S. H. 2006. NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*. 51, 431–440.
- [3] Nevo, Y., Nelson, N. 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 609–620.
- [4] Courville, P., Chaloupka, R., and Cellier, M. F. M. 2006. Recent progress in structure–function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem. Cell Biol.* 84, 960–978.
- [5] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Garland Science, New York and London.
- [6] Kodíček M., Karpenko V. 2002. *Biofyzikální chemie*. Academia. 168–169, 210–214.
- [7] Jurado, R.L. 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 25: 888–895.
- [8] Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., Nelson, N. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5105–5110.

- [9] Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N., Culotta, V. C. 1997. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene, J. Biol. Chem. 272: 11763–11769.
- [10] Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., Hediger, M. A. 1997. Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal-ion transporter, Nature 388:482–488.
- [11] <http://www.tcdb.org>
- [12] Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., and Gros, P. 1995. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. Genomics 25, 514–525.
- [13] Belouchi, A., Cellier, M., Kwan, T., Saini, H. S., Leroux, G., and Gros, P. 1995. The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. Plant Mol. Biol. 29, 1181–1196.
- [14] West, A. H., Clark, D. J., Martin, J., Neupert, W., Hartl, F. U., and Horwich, A. L. 1992. Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. J. Biol. Chem. 267, 24625–24633.
- [15] Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 10089–10093.
- [16] Cellier, M., Belouchi, A., and Gros, P. 1996. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp, TIG 12, 201–204.
- [17] Luk, E., Culotta, V. C. 2001. Manganese superoxide dismutase in *S. cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. J. Biol. Chem. 276:47556–47562.
- [18] Culotta, V. C., Yang, M., and Hall, M. D. 2005. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell, 4: 1159–1165.
- [19] Portnoy, M. E., Liu, X. F. and Culotta, V.C. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the NRAMP family of metal transporters. Mol. Cell Biol. 20: 7893–7902.

- [20] Vidal, S. M., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S., and Gros, P. 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol.* 157: 3559–3568.
- [21] Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., and Gros, P. 2000. Natural resistance to intracellular infections: Natural Resistance–Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* 192, 1237–1248.
- [22] Gruenheid, S., Cannone-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D. J., Grinstein, S. and Gros, P. 1999. The iron transport protein Nramp2 is an integral membrane protein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* 189:831–841.
- [23] Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamagushi, K., Yoshida, T. and Kishi, F. 2000. Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J. Biol. Chem.* 275:22220–22228.
- [24] Fleming, M. D., Trenor, C. C. III, Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., Andrews, N. C. 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16:383–386.
- [25] Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D., and Krishna, S. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J. Exp. Med.* 190: 717–724.
- [26] Gueriot, M. L. 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* 48: 743–772.
- [27] Nelson, N. 1999. Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* 18: 4361–4371.
- [28] Christianson, D. W. 1997. Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67: 217–252.
- [29] <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae>, obsah z 7.1.2009.

- [30] Braun, V., Hantke, K., and Koster, W. 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* 35: 67–145.
- [31] Gibson, M. M., Bagga, D. A., Miller, C. G., and Maguire, M. E. 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co^{2+} resistance on the CorA Mg^{2+} transport system. *Mol Microbiol* 5: 2753–2762.
- [32] Hantke, K. 1997. Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179: 6201–6204.
- [33] Tsolis, R. M., BaEumler, A. J., Heffron, F., and Stojiljkovic, I. 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* 64:4549–4556.
- [34] Vartivarian, S. E., and Cowart, R. E. 1999. Extracellular iron reductases: identification of a new class of enzymes by siderophoreproducing microorganisms. *Arch Biochem Biophys* 364: 75–82.
- [35] Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* 35, 1065–1078.
- [36] Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J., and Gherardini, F. C. 1999. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10887–10892.
- [37] Papp-Wallace, K. M. and Maguire, M. E. 2006. Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 187-209.
- [38] Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., Maguire, M. E. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* 36:1085–1100.
- [39] Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Cox, A. G., Ingham, E., Peacock, S., Foster, S. J. 2002. MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Mol. Microbiol.* 44, 1269–12886.

- [40] Richer, E., Courville, P., Bergevin, I., and Cellier, M. F. 2003. Horizontal gene transfer of „prototype“ Nramp in bacteria. *J. Mol. Evol.* 57, 363–376.
- [41] Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., and Cellier, M. F. M. 2004. Determination of Transmembrane Topology of the *Escherichia coli* Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog. *J. Biol. Chem.* 279, 3318–3326.
- [42] Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melen, K., Drew, D., and von Heijne, G. 2005. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 308: 1321–1323.
- [43] Haemig, H. A. and Brooker, R. J. 2004. Importance of conserved acidic residues in MntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* 201, 97–107.
- [44] Chaloupka, R., Courville, P., Veyrier, F., Knudsen, B., Tompkins, T. A., and Cellier, M. F. 2005. Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport *in vivo*. *Biochemistry* 44, 726–733.
- [45] Courville, P., Urbankova, E., Rensing, C., Chaloupka, R., Quick, M., Cellier M. F. M. 2008. Solute carrier 11 cations symport requires distinct residues in transmembrane helices 1 and 6. *J. Biol. Chem.* 283: 9651–9658.
- [46] Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* 33, 3038–3049.
- [47] Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 19;305, 567–580.
- [48] Rost, B., Fariselli, P., and Casadio, R. 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* 5, 1704–1718.
- [49] Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.

- [50] Broome-Smith, J. K. and Spratt, B. G. 1986. A vector for the construction of translational fusions to TEM β -lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene* 49, 341–349.
- [51] Zelazny, A. and Bibi, E. 1996. Biogenesis and topology of integral membrane proteins: characterization of lactose permease-chloramphenicol acetyltransferase hybrids. *Biochemistry* 35, 10872–10878.
- [52] Cellier, M. F. 2001. Bacterial genes controlling manganese accumulation in microbial transport systems. Edited by G. Winkelmann. Wiley-VCH. Weinheim. pp. 325–345.
- [53] Cohen, A., Nevo, Y., and Nelson, N. 2003. The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 10694–10699.
- [54] Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J., and Gros, P. 2003. Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood* 101, 3699–3707.
- [55] DeFelice, L. J. and Goswami, T. 2007. Transporters as channels. *Annu. Rev. Physiol* 69, 87–112.
- [56] Accardi, A. and Miller, C. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* 427, 803–807.
- [57] Su, A., Mager, S., Mayo, S.L., Lester, H.A. 1996. A Multi-Substrate Single-File Model for Ion-Coupled Transporters. *Biophysical Journal* 70, 762–777.
- [58] Chen X. Z., Peng J. B., Cohen A., Nelson H., Nelson N., Hediger M. A. 1999. Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* 274:35089–94.
- [59] Xu H., Jin J., DeFelice L., Andrews N. C., Clapham D. E. 2004. A Spontaneous, Recurrent Mutation in Divalent Metal Transporter-1 Exposes a Calcium Entry Pathway. *PloS Biology* 2: 378–386.
- [60] Wadiche, J. I., Kavanaugh, M. P. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *J. Neurosci.* 18:7650–61.

- [61] Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. R., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 375(6532):599-603.
- [62] Carvelli, L., McDonald, P. W., Blakely, R. D., DeFelice, L. J. 2004. Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16046–51.
- [63] Nelson, N., Sacher, A., Nelson, H. 2002. The significance of molecular slips in transport systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:876–81.
- [64] Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N. Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251.
- [65] Miesenbock, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- [66] Olsen, K. N., Budde, B. B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B., Jakobsen, M., and Ingmer, H. 2002. Noninvasive Measurement of Bacterial Intracellular pH on a Single-Cell Level with Green Fluorescent Protein and Fluorescence Ratio Imaging Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4145-4147.
- [67] Booth I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 49, 359–378.
- [68] Straková, Eva. 2007. Studium faktorů ovlivňujících transport protonů transportním proteinem MntH. Diplomová práce, MFF UK, Praha.
- [69] Marangoni, A. G. 2003. *Enzyme Kinetics, A Modern Approach*. A John Wiley & Sons, Inc. 14–19.
- [70] Beranová, L. 2007. Studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných kovů. Diplomová práce, MFF UK, Praha.
- [71] Bhattacharyya, P., 1970. Active Transport of Manganese in Isolated Membranes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104, 1307–1311.
- [72] Nakamura, T., Tokuda, H., and Unemoto, T. 1984. K^+/H^+ antiporter functions as a regulator of cytoplasmic pH in a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, *Biochim. Biophys. Acta* 776, 330–336.

- [73] Nies, D. H., Silver S. 2007. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 118–137.