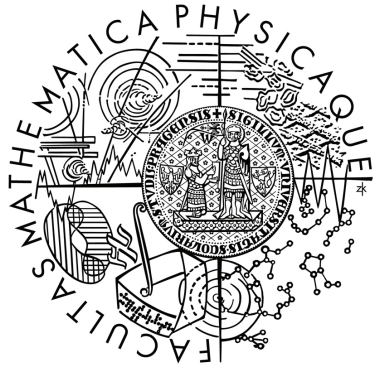
Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Ondřej Novák

Studium transportních a strukturních vlastností oligopeptidů pomocí fluorescenčních metod

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.**
Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

2010

Děkuji oběma vedoucím své diplomové práce paní RNDr. Evě Urbánkové, Ph.D. a panu RNDr. Romanu Chaloupkovi, Ph.D. za trpělivost, povzbuzování a všeobecně příkladné vedení při psaní této práce. Děkuji své rodině, přítelkyni a přátelům za emoční komfort a podporu, které mi při psaní této práce poskytovali.

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

V Praze dne Ondřej Novák

Obsah

1 Úvod **6**

1.1 Motivace 6

1.2 Cíl této práce 6

1.3 Členění práce 6

2 Teoretická část **7**

2.1 Membránový protein MntH 7

2.2 Fyzikálně-chemická rovnováha na membráně 8
2.2.1 Elektrochemický gradient 8
2.2.2 Vlastnosti lipidové dvojvrstvy 9

2.3 Fluorescenční spektroskopie 10
2.3.1 Jev fluorescence 10
2.3.2 Fluorofory, charakteristiky fluorescence 11

3 Materiál a metody **12**

3.1 Užité fluorescenční sondy 12
3.1.1 DiS-C_3(3) 12
3.1.2 Sodium Green 13
3.1.3 HPTS (pyranin) 14
3.1.4 PBFI 15

3.2 Příprava liposomů 16

3.3 Syntetizované oligopeptidy 17
3.3.1 Segment TMS3 17
3.3.2 Segment TMS6 18

3.4 Užité ionofory a kanály 19
3.4.1 Valinomycin 19
3.4.2 Nigericin 19
3.4.3 CCCP 20
3.4.4 Gramicidin D 20

3.5 Užité pufry 21

4 Výsledky měření **22**

4.1 Výsledky experimentů se sondou DiS-C_3(3) 22
4.1.1 Idea experimentu 22
4.1.2 Dosažené výsledky 22

4.2 Výsledky experimentů se sondou Sodium Green 37
4.2.1 Idea experimentu 37
4.2.2 Dosažené výsledky 37

4.3 Výsledky experimentů se sondou HPTS 42
4.3.1 Idea experimentu 42
4.3.2 Dosažené výsledky 42

4.4 Výsledky experimentů se sondou PBFI 51
4.4.1 Idea experimentu 51
4.4.2 Dosažené výsledky 51

5 Diskuse **57**

6 Závěr **59**

7 Literatura **60**

Přílohy **63**

A – Protokol přípravy liposomů **64**

B – Data kalibrace HTPS **66**

C – Experimenty s HPTS v kalibraci na volné sondě **67**

Název práce: *Studium transportních a strukturních vlastností oligopeptidů pomocí fluorescenčních metod*
Autor: *Ondřej Novák*
Katedra (ústav): *Fyzikální ústav UK*
Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.*
e-mail vedoucího: *roman.chaloupka@mff.cuni.cz*

Abstrakt: Bakteriální protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) je transmembránový protein, který se v plazmatické membráně chová jako symportér dvojmocných kovových iontů a protonů. O tomto proteinu bylo zjištěno, že se skládá z 11 transmembránových segmentů (*J. Biol. Chem.* 279(5) 3318-3326). Dva z nich (TMS3, TMS6) jsou samy o sobě schopny v planární lipidové membráně asociovat a vytvořit iontový kanál (*Biopolymers,* Vol. 93 / N.8, 718-726). V této práci blíže studujeme funkci iontového kanálu tvořeného peptidy odpovídajícími sekvencí třetímu resp. šestému transmembránovému segmentu (TMS3, TMS6) v modelových membránách – liposomech pomocí fluorescenčních sond. Konkrétně byly použity sondy : SodiumGreen a PBFI pro sledování transportu sodných resp. draselných iontů; DiS-C_3(3) a HPTS pro studium změn membránového potenciálu, resp. pH, způsobených transportem iontů přes membránu liposomů obsahujících TMS3 resp. TMS6. Parametry experimentů byly optimalizovány pro tento konkrétní účel, avšak některé použité sondy se bohužel ukázaly být nedostatečně citlivé, a tudíž pro tento účel nevhodné. Bylo prokázáno, že peptidy odpovídající TMS6 jsou schopny tvořit iontový kanál nejen v planární modelové membráně, ale i v liposomech. Z experimentů jednoznačně vyplývá, že tímto iontovým kanálem mohou téci monovalentní kationty, včetně protonů.

Klíčová slova: *MntH, transmembránový segment, iontový kanál, fluorescence, liposomy*

Title: *Transport and structure properties of oligopeptides studied by fluorescence methods*
Author: *Ondřej Novák*
Department: *Institute of Physics of Charles University*
Supervisor: *RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.*
Supervisor's e-mail address: *roman.chaloupka@mff.cuni.cz*

Abstract: Bacterial protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) is a transmembrane protein that acts as a symporter of divalent metal ions and protons. This protein is known to have 11 transmembrane segments [2]. Two of them (TMS3, TMS6) are known to be able to associate and form an ion channel in planar lipid membranes [1]. We studied the third and sixth transmembrane segment of MntH (TMS3, TMS6) using liposomes and fluorescence spectroscopy. More concretely, fluorescence probes SodiumGreen and PBFI were used in order to monitor changes in intraliposomal concentrations of sodium and potassium, respectively, mediated by TMS3 or TMS6 ion channel. Changes in membrane potential (or intraliposomal pH) induced by ion transport throughout TMS3 or TMS6 channel were detected using DiS-C_3(3) (or HPTS) fluorescence. The methods and experimental settings were optimised for this purpose, but some probes remains unfortunatelly insufficiently sensitive. It was demonstrated that peptides corresponding to TMS6 are able to form channels not only in planar model membranes but also in liposomes. It was clearly shown that TMS6 channel transports monovalent cations including protons.

Keywords: *MntH, transmembrane segment, ion channel, fluorescence, liposomes*

Kapitola 1

Úvod

1.1 Motivace

Bakteriální protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) je membránový protein, který se podílí na homeostázi dvojmocných kovů tím, že umožňuje jejich symport do buňky společně s protony. Bakteriální proteiny MntH patří spolu s eukaryotními proteiny Nramp (natural resistance-associated macrophage protein) do rodiny Slc11. Pro protein MntH z bakterie *E. coli* bylo zjištěno [1], že peptidy odpovídající sekvencí některým transmembránovým segmentům jsou schopny v modelové membráně vzájemně asociovat a vytvořit iontový kanál. Tuto vlastnost mají 3. i 6. transmembránový segment. Schopnost tvořených kanálů propouštět některé monovalentní ionty byla ukázána v práci [1]. Schopnost oligopeptidů utvořit kanál také výrazně závisí na pH [1]. Stechiometrie skládání oligopeptidů do funkčního kanálu byla odhadnuta na 4 až 6 [1].

1.2 Cíl této práce

Hlavním obecným cílem této práce je zavést dostupnou metodu pro studium transportu indukovaného zmíněnými oligopeptidy v liposomech jakožto modelovém systému. Jako nejvhodnější se pro tento účel jeví použití fluorescenční spektroskopie za různých experimentálních podmínek.
V rámci této práce bylo vyzkoušeno několik experimentálních uspořádání, všechny metody byly optimalizovány. Naším cílem bylo pomocí těchto metod zkoumat specifitu transportu peptidovými kanály.

1.3 Členění práce

Stručný souhrn teoretických vztahů využívaných v této práci je uveden v kapitole č.2. Parametry užitých materiálů a metod jsou sepsány v kapitole č.3. Hlavní experimentální výsledky jsou prezentovány v kapitole č.4. V kapitolách č.5, č.6, č.7 jsou pak diskuse, závěr a seznam užité literatury. Práce je ukončena přílohami.

Kapitola 2

Teoretická část

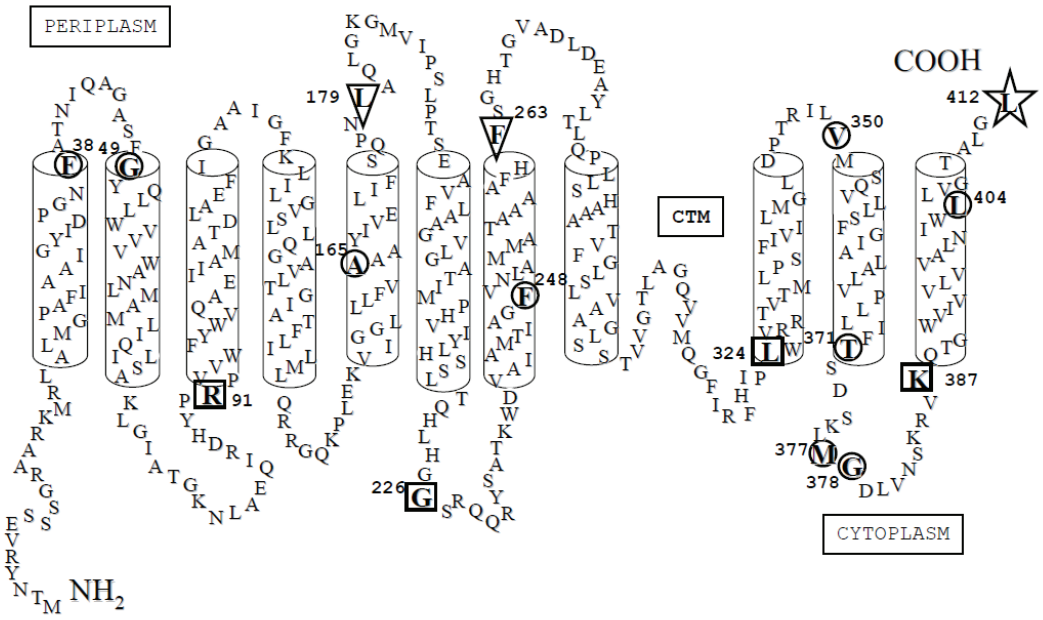
2.1 Membránový protein MntH

Rodina proteinů Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) zahrnuje sekundárně aktivní transportéry dvojmocných kovových iontů. Tyto transportéry jsou specifické např. pro mangan, železo, kobalt, kadmium, zinek, měď a nikl [1]. Proteiny z této rodiny se kromě role v metabolismu dvojmocných kovů uplatňují také v procesech vrozené imunity. Kromě eukaryot se vyskytují i u bakterií, příkladem je námi studovaný protein MntH (Proton-dependent Manganese Transporter). Na známých sekvencích proteinů této rodiny bylo ukázáno, že proteiny z rodiny Nramp jsou vysoce homologní. Studium proteinu MntH z bakterie *E. coli* je tak oprávněnou volbou vzhledem k výhodnosti modelu.

Bylo ukázáno, že protein MntH z bakterie *E. coli* je integrální membránový protein, který zahrnuje 11 transmembránových reziduí. Jeho primárním substrátem je mangan. N-konec proteinu je situován v cytoplazmě, C-konec je orientován do periplazmy [2]. Topologie proteinu je znázorněna na obr.2.1. Variací evolučně nejkonzervovanějších reziduí v rámci proteinu bylo odhadnuto, že pro transportní funkci důležitá místa se nacházejí na 1., 3., 4. a 6. transmembránovém segmentu (TMS1, TMS3 a TMS6) [8]. Šestý transmembránový segment (TMS6) je patrně pro transportní funkci velmi důležitý, proteiny MntH s mutací ve vybraných reziduích tohoto segmentu implikují zcela nefunkční protein [5].

Samotné nasyntetizované transmembránové segmenty membránových proteinů byly již v minulosti s úspěchem použity jako modely pro zkoumání interakce proteinu s lipidovou membránou a jeho strukturních vlastností [9]. Tímto experimentálním přístupem byla zjištěna řada důležitých poznatků např. o bakteriorhodopsinu [10] či glykophorinu A [11, 12]. Experimenty tohoto typu ukazují, že 3D-struktura samotných transmembránových segmentů je velmi podobná jejich 3D-struktuře v rámci nativního proteinu [13, 14, 15] a dále pak že struktura složená pouze z jednoho druhu transmembránového segmentu může nést podobné vlastnosti jako příslušný nativní protein [9]. Bylo zjištěno, že struktura složená z výše zmíněného transmembránového segmentu TMS6 bakteriálního proteinu MntH skutečně částečně přebírá některé z vlastností nativního proteinu [1].

Z eukariotních homologů byly z hlediska struktury studovány především transmembránové segmenty TMS3, TMS4 a TMS6 proteinu DMT1 např. [34], [35] (Nramp2) resp. např. [36] (Nramp1). K těmto měřením byly použity nejčastěji metody CD a NMR spektroskopie.



Obr. 2.1 : Topologie proteinu MntH, převzato z [2]

2.2 Fyzikálně-chemická rovnováha na membráně

2.2.1 Elektrochemický gradient

Středovaný pohyb nějakého solutu prostředím je vázán na jeho koncentrační gradient, resp. gradient chemického potenciálu. Není-li přítomna další síla působící proti koncentračnímu gradientu, snaží se systém o vyrovnání těchto koncentrací. Jako síla působící proti přesunu solutu po směru koncentračního gradientu může být přítomen gradient potenciálu (je-li solut iontem). Součet těchto dvou potenciálů se nazývá elektrochemický potenciál.
Mají-li dva body (bod 1 a bod 2) stejný elektrochemický potenciál, pak mezi nimi nedochází k makroskopickému přesunu solutu, mluvíme o rovnováze. Pro vztah mezi rozdílem elektrických potenciálů a příslušnými koncentracemi pak dostáváme tzv. Nernstovu rovnici

$$\Psi_{12} = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right) \tag{2.1}$$

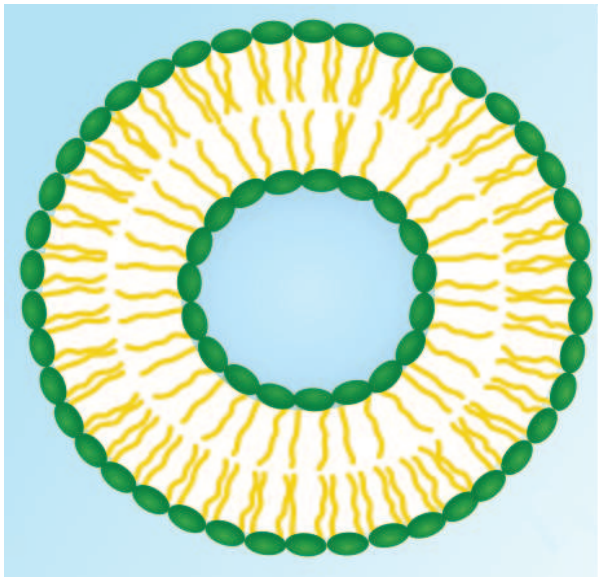
V případě, že se tyto body nacházejí na rozdílných stranách membrány propustné pro daný solut, pak koncentrace C_1 a C_2 mají význam koncentrací na jedné a druhé straně membrány a rozdíl potenciálů ψ_{12} je elektrickým napětím na membráně, tzv. membránový potenciál. Tato rovnice přesně určuje napětí na membráně, pakliže je membrána propustná pouze pro jeden uvažovaný solut. Pakliže je membrána propustná pro vícero různých solutů, musíme uvažovat složitější rovnici popisující výsledné elektrické napětí na membráně a to Goldman-Hodkin-Katzovu rovnici

$$\Psi_{12} = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{in}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{out}}\right) \quad (2.2)$$

kde značkou P značíme relativní propustnost pro konkrétní solut, značkou M^+ označujeme kationty a značkou A^- značíme anionty. Spodní indexy in a out značí pojmy vnitřní a vnější. Kompletní odvození a rozbor GHK-rovnice viz např. [3]

2.2.2 Vlastnosti lipidové dvojvrstvy

Lipidová dvojná vrstva, v tomto textu povětšinou stručně označovaná jako membrána, se skládá z amfipatických molekul, typicky převážně fosfolipidů. Tento fakt o jejích stavebních podjednotkách vysvětluje spontánnost její tvorby v polárním prostředí (hydrofobní interakce, viz též [7]). Uspořádání, kdy je střed lipidové dvojvrstvy silně hydrofobní, pak implikuje velmi nízkou propustnost membrány pro nabité částice [3]. Energeticky výhodným uspořádáním membrány jako celku je pak např. liposom (obr 2.2). Suspenze liposomů byla již mnohokrát užita jako modelový systém pro zkoumání dějů na buněčné membráně.



Obr. 2.2 : Nákres liposomu (Wikipedia.org)

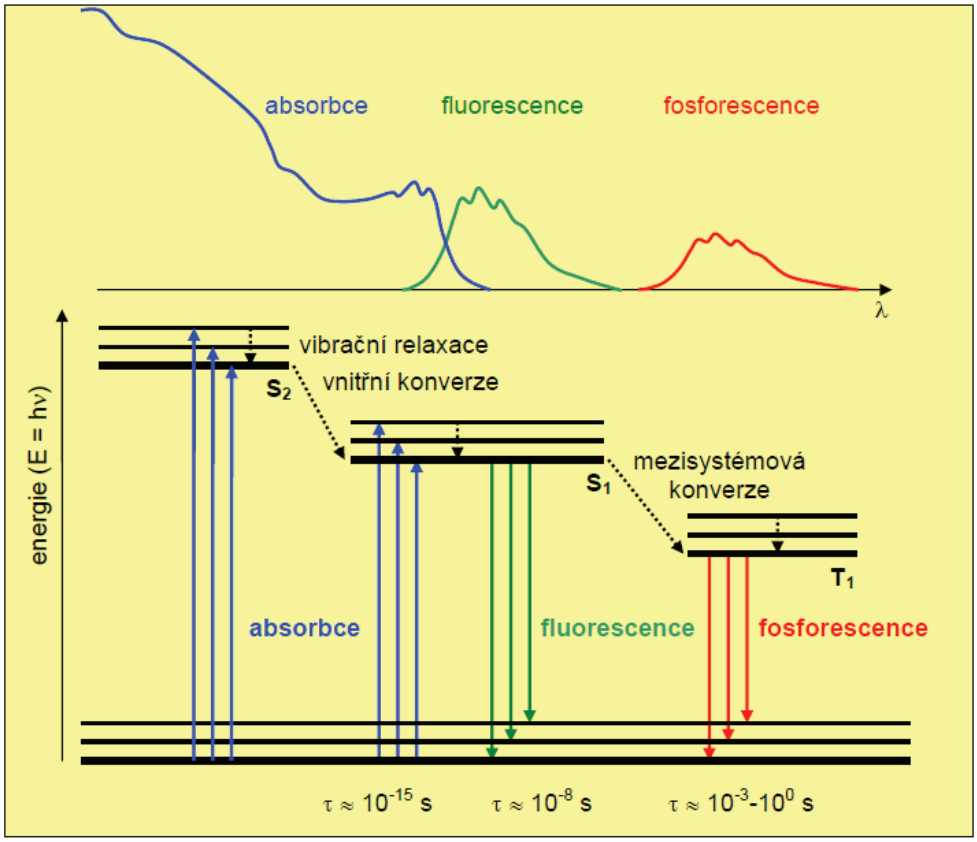
2.3 Fluorescenční spektroskopie

Metody fluorescenční spektroskopie se dnes hojně využívají nejen v mnoha biofyzikálních a biochemických oborech, ale velmi často také v klinické lékařské praxi. Celý obor má jeden významný společný jmenovatel a to, že k extrakci užitečné informace ze studovaného systému je použito nedestruktivní elektromagnetické záření. Díky tomuto faktu studované chemické či biologické objekty nedegradují, ve většině případů nejsou aplikací techniky fluorescenční spektroskopie ani významně ovlivněny. Tento nedestruktivní přístup pak umožňuje měřit na živých systémech, tedy používat techniky jako např. průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie živých buněk atd.

2.3.1 Jev fluorescence

Vykazuje-li látka přebytek záření nad vlastním tepelným vyzařováním a má-li toto záření konečnou dobu života, která převyšuje periodu světelných kmitů, pak říkáme, že látka vykazuje luminiscenci (viz též [4], [6]). Luminiscence vzniká, když molekula či atom látky přechází z excitovaného elektrovaného stavu do stavu základního.

Možné přechody mezi stavy luminiskující molekuly přehledně zobrazuje tzv. Jablonskiho diagram (Obr.2.3).



Obr. 2.3 : Jablonskiho diagram [6]

V diagramu na obr. 2.3 jsou silnými černými linkami znázorněny elektronové hladiny, tenkými pak příslušné vibrační hladiny. Modrými šipkami je znázorněná absorpce, která probíhá mezi singletními elektronovými hladinami. Zelenými šipkami je znázorněna fluorescence červenými pak fosforescence. V našich experimentech využíváme pouze fluorescence.

Vyzářený foton má obecně nižší energii a tedy vyšší vlnovou délku než foton absorbovaný. Toto pozorování vyjadřuje tzv. Stokesův zákon : $\lambda_{em} \geq \lambda_{ex.}$

Molekula, která se nachází v excitovaném elektronovém stavu, může do základního elektronového stavu přejít i nezářivě prostřednictvím jednotlivých vibračních relaxací. Čím je tato nezářivá relaxace častější, tím méně látka vykazuje fluorescenci. Jako vhodná kvantitativní veličina pro charakterizaci schopnosti fluorescence se ukazuje tzv. kvantový výtěžek Φ, který je definován jako počet vyzářených fotonů ku počtu fotonů absorbovaných.

Kvantový výtěžek může být významně snižován činidly, které u látek se schopností fluorescence podporují spíše nezářivou deexcitaci. V takovém případě mluvíme o zhášení fluorescence a o látkách takto působících jako o zhášedlech.

2.3.2 Fluorofory, charakteristiky fluorescence

Fluoroforem označujeme látku, která je schopna fluorescence. Můžeme rozlišit přirozený vlastní fluorofor, kterým máme na mysli látku přirozeně se vyskytující v přírodě, či synteticky připravený nevlastní fluorofor. Příkladem syntetického nevlastního fluoroforu jsou například různé deriváty fluoresceinu. Abychom mohli prostřednictvím fluorescenční látky nějaký systém studovat, musí s ním fluorescenční látka interagovat, resp. musí se na něj vázat. Pokud se na systém váže nekovalentně, pak mluvíme o fluorescenční sondě. Každý fluorofor má jisté charakteristiky fluorescence. Jedná se zejména o excitační spektrum, emisní spektrum a kvantový výtěžek. V neposlední řadě je také velmi důležitou vlastností fluorescenční sondy její náchylnost k fotodegradaci, tedy k její trvalé destrukci. Typická experimentálně užitečná sonda pak mění nějakou z výše zmíněných vlastností v závislosti na interakci s nějakým solutem či strukturou. Existuje tak celá řada fluorescenčních sond specificky citlivých například na konkrétní jednomocné kationty, dvojmocné kationty, anionty, pH atd. Tyto fluorescenční sondy jsou povětšinou cíleně navrhovány chemiky a tvořeny zcela synteticky. Sondy použité v této práci, jejich parametry a způsob jejich odezvy jsou sepsány v kapitole 3-Materiál a metody.

Kapitola 3

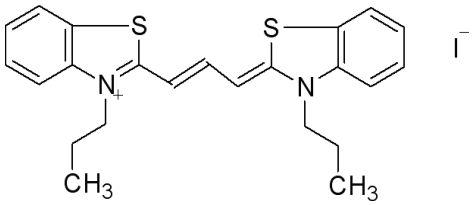
Materiál a metody

3.1 Užité fluorescenční sondy

Pro sledování transportních dějů na lipidové membráně liposomů byly zvoleny čtyři fluorescenční sondy. Každá z použitých fluorescenčních sond s sebou přináší i požadavek na specifické experimentální podmínky, které byly většinou stanovovány v naší laboratoři a dále optimalizovány v rámci této práce. Optimalizované experimentální podmínky jsou pro každou sondu popsány v kapitole s výsledky.

3.1.1 DiS-C_3(3)

Látka označovaná jako DiS-C_3(3) je ve vodě rozpustná fluorescenční sonda citlivá na membránový potenciál. Sonda je dodávána ve formě jodidové soli, která ve vodném roztoku disociuje (obr. 3.1). Po oddělení jodidového aniontu molekula sondy nese kladný náboj, je však stále dostatečně lipofilní, aby mohla volně procházet membránou liposomů. Sonda interaguje s hlavičkami fosfolipidů v membráně liposomů a interakcí s nimi mění (posouvá) své emisní spektrum [16]. Uvážíme-li konstantní vnitřní a vnější plochu liposomu, je pak poměr vázané a nevázané sondy závislý na její vnitřní a vnější koncentraci. Tyto koncentrace odpovídají potenciálu podle Nernstovy rovnice (obsáhle v [16]).



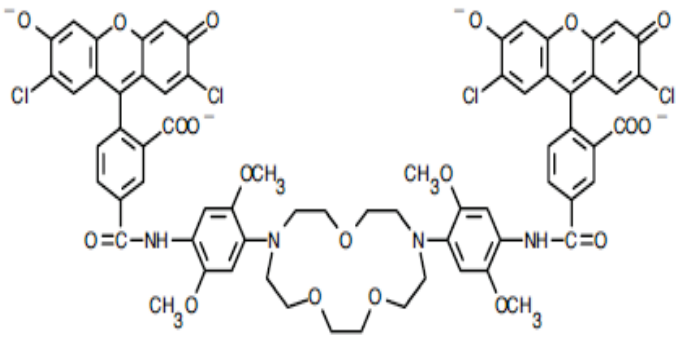
Obr. 3.1 : Strukturní vzorec sondy DiS-C_3(3) (ChemSketch)

Obvyklé označení	**Chemický název (anglicky)**
DiS-C_3(3)	3,3´dipropylthiacarbocyanine iodide
Detekce	**Molekulární hmotnost**
Membránový potenciál	520,49 Da
Efekt nesoucí informaci	**Druh záznamu**
Posun emisního spektra	Časově závislý poměr emisních intenzit na dvou vlnových délkách
Excitační vlnová délka	**Emisní vlnová délka**
515 nm	560 nm / 580 nm

Tab. 3.1 : Základní parametry experimentu se sondou DiS-C_3(3)

3.1.2 Sodium Green

Ve vodě rozpustná fluorescenční sonda Sodium Green byla zakoupena od firmy Molecular probes (Invitrogen) [17]. Sonda se prodává jako amonná sůl, po disociaci nese čtyřnásobný záporný náboj a neprochází lipidovou membránou. Molekula této sondy se skládá ze dvou fluoresceinů, které jsou připojeny k etherové korunce s kavitou velikostně nejlépe vyhovující právě sodnému kationtu. Sodný kation je koordinován kyslíky v etherové korunce. Při interakci se sodným kationtem molekula mnohonásobně zvýší svůj kvantový výtěžek a zároveň jen zanedbatelně posouvá své emisní spektrum [17].



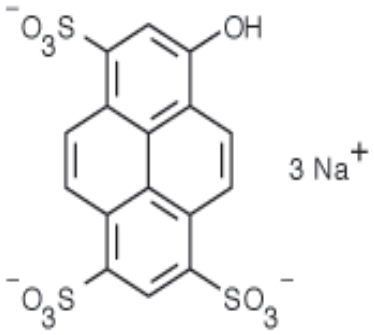
Obr. 3.2 : Strukturní vzorec sondy Sodium Green (www.probes.com)

Obvyklé označení	**Chemický název (anglicky)**
Sodium Green	tetra(tetramethylammonium) salt of Sodium Green
Detekce	**Molekulární hmotnost**
Na^+	1667,57 Da
Efekt nesoucí informaci	**Druh záznamu**
Vzrůst kvantového výtěžku při navázání Na^+	Časově závislý záznam emisní intenzity na jedné konkrétní vlnové délce resp. emisní spektrum
Excitační vlnová délka	**Emisní vlnová délka**
488 nm	532 nm

Tab. 3.2 : Základní parametry experimentu se sondou Sodium Green [17]

3.1.3 HPTS (pyranin)

Molekula HPTS, často také označována jako pyranin, je fluorescenční sonda citlivá na pH. Sonda má podobu trisodné soli, po disociaci nese tři záporné náboje a neprochází lipidovou membránou [18]. Tato látka je velmi dobře rozpustná ve vodě. Sonda HPTS výrazně mění své excitační spektrum v závislosti na své protonaci. Výhodou této látky je její velmi nízká cena.



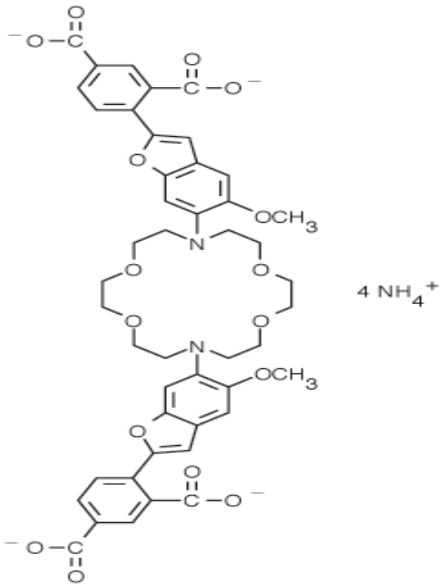
Obr. 3.3 : Strukturní vzorec sondy HPTS (www.probes.com)

Obvyklé označení	**Chemický název (anglicky)**
HPTS (pyranin)	8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (trisodium salt)
Detekce	**Molekulární hmotnost**
pH (H^+)	524,37 Da
Efekt nesoucí informaci	**Druh záznamu**
Změna tvaru excitačního spektra v závislosti na pH	Časově závislý poměr emisních intenzit při excitaci na dvou různých vlnových délkách
Excitační vlnová délka	**Emisní vlnová délka**
405 nm / 455 nm	520 nm

Tab. 3.3 : Základní parametry experimentu se sondou HPTS

3.1.4 PBFI

Fluorescenční sonda PBFI je látka citlivá na přítomnost draslíkových kationtů. Sonda se skládá ze dvou fluoroforů napojených na dusíkové atomy etherové korunky. Tato korunka je navržena tak, aby její kavita velikostně nejlépe vyhovovala draslíkovému kationtu. Při interakci s draslíkovým kationtem molekula zvýší svůj kvantový výtěžek.



Obr. 3.4 : Strukturní vzorec sondy PBFI (www.probes.com)

Obvyklé označení	**Chemický název (anglicky)**
PBFI	tetra(tetramethylammonium) salt of PBFI
Detekce	**Molekulární hmotnost**
K^+	950,99 Da
Efekt nesoucí informaci	**Druh záznamu**
Vzrůst kvantového výtěžku při navázání K^+	Časově závislý poměr emisních intenzit při excitaci na dvou různých vlnových délkách resp. emisní spektrum
Excitační vlnová délka	**Emisní vlnová délka**
340 nm / 380 nm	505 nm

Tab. 3.4 : Základní parametry experimentu se sondou PBFI [19]

3.2 Příprava liposomů

Liposomy, tedy membránové váčky, byly připravovány extruzí dle standardního protokolu [Příloha A]. Oproti tomuto protokolu se naše příprava lišila jen dobou, po kterou byly liposomy ponechány v evakuované baňce. V rámci přípravy našich liposomů byla tato doba zkrácena na cca 2-3 hodiny. Průměr takto vzniklých liposomů byl dán průměrem pórů filtru užitého pro extruzi (200nm), dle [25] se výsledný průměr takovýchto liposomů skutečně pohybuje kolem ≈ 200 nm. Liposomy byly připraveny z extraktu lipidů z *E.coli* zakoupeného od firmy Avanti Polar Lipids, Inc. Byly užity dvě různé koncentrace lipidů viz tab. 3.5.

Druh lipidů	E. coli extract	
Konc. lipidů.	0,4 mg/ml	10 mg/ml
Průměr liposomů	200 nm	200 nm

Tab. 3.5 : Základní parametry připravených liposomů.

V případě sond SodiumGreen, HPTS a PBFI byla vypočtená množství sondy přidána do pufru ve kterém se rozpouštěly lipidy po vysušení (viz protokol Příloha A). V tomto protokolu pak ještě na konci přibyl další úkon, odmytí sondy neuzavřené v liposomech pomocí gelové filtrace. Zde byly použity sloupce vlastní výroby (upravené plastové trubičky injekčních stříkaček), naplněné Sephadexem G-25 od firmy Sigma Aldrich. Průchod sloupcem byl urychlen umístěním sloupce do odstředivky. Míra odmytí každé sondy při každé přípravě je diskutována v příslušných výsledcích experimentů.

Obr. 3.5 : Strojek LiposoFast na extrusi od firmy Avanti (www.avantilipids.com)

3.3 Syntetizované oligopeptidy

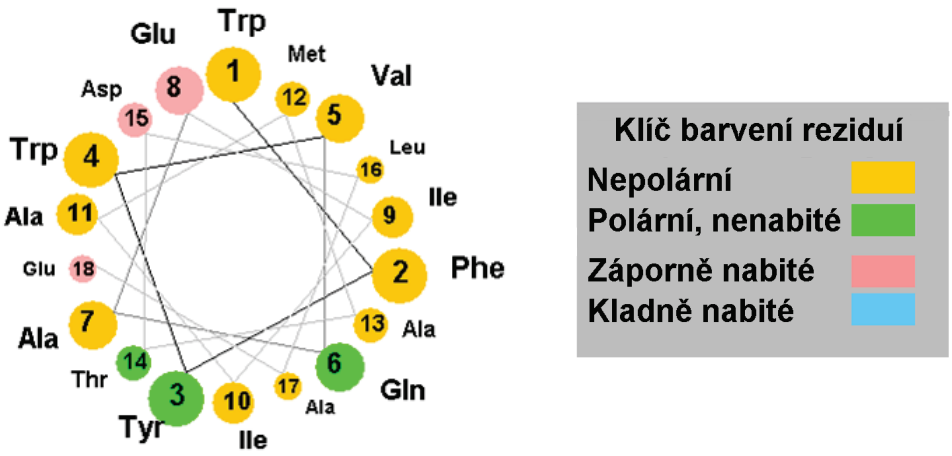
3.3.1 Segment TMS3

Transmembránový segment TMS3 proteinu MntH má dle [2] rozsah o dolním odhadu 22 reziduí. Rozsah tohoto transmembránového segmentu byl počítán pomocí hydropatického indexu [32]. Je zajímavé, že v rámci segmentu TMS3 se vyskytují i nabité aminokyseliny, konkrétně záporně nabité [20]. Existují indicie, že toto místo se v rámci celého proteinu podílí na vazbě dvojmocného kationtu [26]. V práci [1] bylo zjištěno, že tento segment je za přítomnosti dvojmocného kationtu (v případě [1] šlo o Mn^{2+}) schopen tvořit transmembránový kanál. V nativním proteinu je TMS3 orientován z cytoplasmy směrem do periplasmy. Samotný oligopeptid odpovídající segmentu TMS3 se do membrány integruje poměrně problematicky (viz CD spektra v [1]). Peptid je prakticky nerozpustný v běžných pufrech a zásobní roztoky tak byly připraveny v TFE. Pro účely našich experimentů byl tento oligopeptid syntetizován firmou Vidia s.r.o., Jesenice u Prahy. Oligopeptid byl syntetizován v délce 27 aminokyselinových reziduí, aby bylo zaručeno přemostění membrány. Syntetizovaná sekvence byla následující :

TMS3 : H-P_{90}RPVVWFYWVQAEIIAMATDLAEFIGA_{116}-NH_2.

Specifická hmotnost peptidu byla zkontrolována metodou hmotnostní spektroskopie. Čistota stanovená metodou HPLC ≈97,2 %.

Peptid byl ukončen amidem. Podtržené značky reziduí korespondují s vypočítaným rozsahem části TMS3 peptidu MntH v [2].



Obr. 3.6 : Kruhový diagram střední části oligopeptidu TMS3 [20]

3.3.2 Segment TMS6

Segment TMS6 má rozsah o dolním odhadu 26 reziduí [2]. Orientován je z periplasmy směrem do cytoplasmy. Tento transmembránový segment obsahuje kromě nepolárních aminokyselin a několika málo polárních aminokyselin také dvě histidinová rezidua (viz obrázek 3.7). Na základě studií proteinů mutovaných v těchto reziduích bylo zjištěno, že jsou tyto histidiny preferovány kladně nabité, kdy se patrně podílejí na udržování proteinu ve funkční konformaci [27]. V práci [1] bylo zjištěno, že tento segment je za určitých podmínek schopen tvořit transmembránový kanál. Tyto kanály vznikají s vyšší pravděpodobností než kanály tvořené segmenty TMS3 za stejných experimentálních podmínek [1]. V našich experimentech byly používány dvě formy oligopeptidů TMS6. První forma měla na C-konci volné zakončení, tedy –OH. U druhé formy byl C-konec ukončen jako amid. První forma je v textu nazývána TMS6-OH. Druhá forma je v textu označována jako TMS6-NH_2. Tyto oligopeptidy se od sebe liší zejména mírou a způsobem interakce s lipidovou membránou [31. Oligopeptidy s oběma druhy zakončení byly taktéž syntetizovány firmou Vidia s.r.o., Jesenice u Prahy. Oligopeptidy byly syntetizovány v délce 29 reziduí. Syntetizovaná sekvence byla následující :

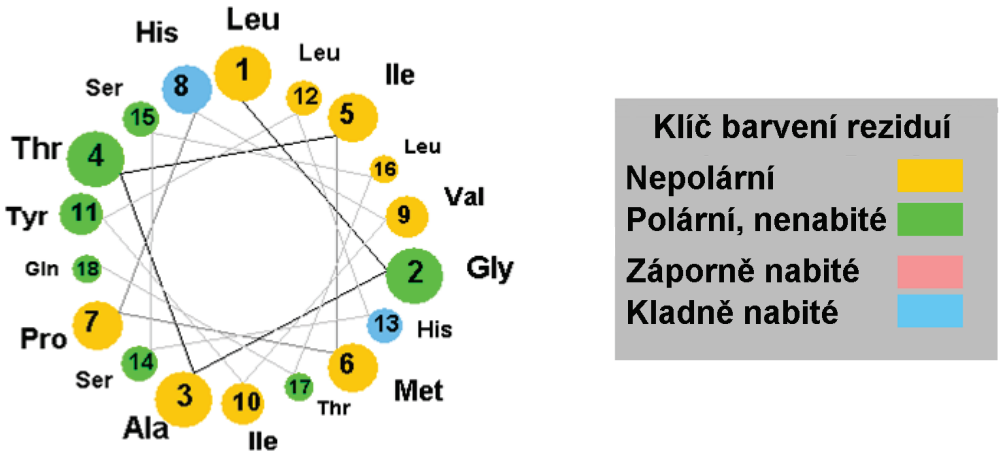
TMS6-OH : H-T_{193}SEAVFLAAGVLGATIMPHVIYLHSSLTQ$_{221}$-OH.

Čistota stanovená metodou HPLC ≈94,2 %.

TMS6-NH_2 : H-T_{193}SEAVFLAAGVLGATIMPHVIYLHSSLTQ$_{221}$-NH_2

Čistota stanovená metodou HPLC ≈95,2 %.

Specifické hmotnosti obou syntetizovaných oligopeptidů TMS6 byly zkontrolovány metodou hmotnostní spektroskopie. Podtržené značky reziduí opět korespondují s vypočítaným rozsahem části TMS6 peptidu MntH v [2].

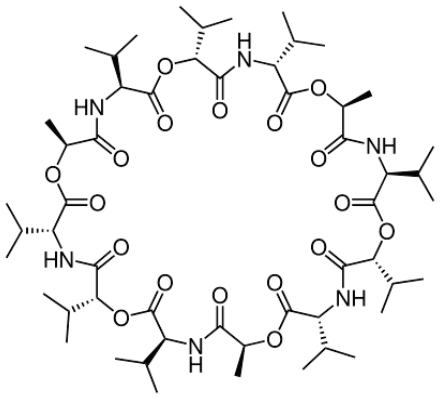


Obr. 3.7 : Kruhový diagram střední části oligopeptidu TMS6 [20]

3.4 Užité ionofory a kanály

3.4.1 Valinomycin

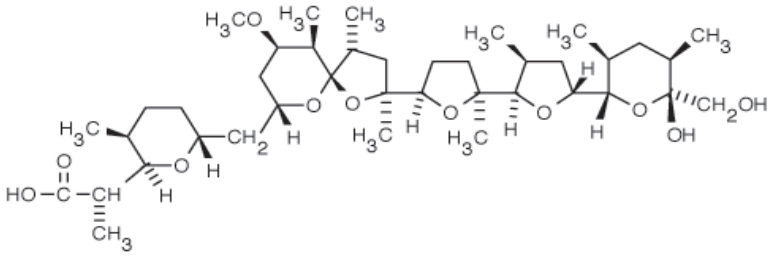
Valinomycin je v přírodě se vyskytující ionofor. Jde o makrocyklické antibiotikum poprvé izolované v roce 1955. Valinomycin selektivně transportuje draselné kationty přes lipidovou membránu a to i v přítomnosti sodných kationtů. Jeho selektivita pro draslíkové kationty oproti kationtům sodným je $\approx 10^4$ [21]. Strukturně se jedná o dodekadepsipeptid, samotný valinomycin nenese náboj. Valinomycin je dobře rozpustný v polárních i nepolárních rozpouštědlech. Další charakteristiky valinomycinu viz [22]. Bylo ukázáno, že valinomycin neovlivňuje nežádoucím způsobem fluorescenční odezvu žádné ze sond použitých v rámci této práce.



Obr. 3.8 : Strukturní vzorec valinomycinu (wikipedia.org)

3.4.2 Nigericin

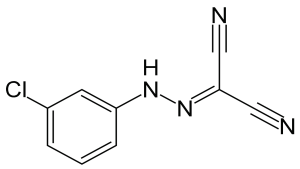
Ionofor označovaný jako nigericin je přírodní antibiotikum extrahované z bakterie rodu Streptomyces. Poprvé bylo toto antibiotikum získáno a vyčištěno v padesátých letech 20.stol. Nigericin se chová jako ionofor pro draselné kationty a protony, nejčastěji jako jejich antiportér. Selektivita nigericinu k ostatním monovalentním kationtům jde v pořadí $K^+ > Rb^+ > Cs^+ >> Na^+$ [23]. Nigericin je dobře rozpustný v polárních i nepolárních rozpouštědlech. Bylo ukázáno, že nigericin neinteraguje s žádnou z užitých sond (viz kapitola 4).



Obr. 3.9 : Strukturní vzorec nigericinu (www.probes.com)

3.4.3 CCCP

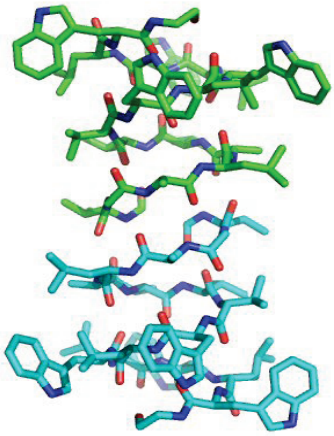
Protonofor CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) je strukturně nejjednodušším z užitých ionoforů. Molekula této látky je selektivním přenašečem protonů přes lipidovou membránu. Proton, jádro vodíku, se přes membránu přenáší tak, že se váže na dusík umístěný nejblíže k aromatickému cyklu. V takovémto stavu je molekula elektroneutrální. V případě, kdy proton není navázán, nese molekula protonoforu jeden záporný náboj. Tento náboj je významně delokalizován po konjugovaných vazbách. Molekula je stále dostatečně lipofilní, aby i v tomto stavu procházela membránou.



Obr. 3.10 : Strukturní vzorec protonoforu CCCP (wikipedia.org)

3.4.4 Gramicidin D

Gramicidin D je směs tří druhů oligopeptidů, gramicidinu A, gramicidinu B a gramicidinu C, které se nepatrně liší. Gramicidin A je zde však zastoupen v naprosto dominantním poměru. Gramicidin A je strukturně vzato lineární oligopeptid o 15 reziduích, kde se střídají D- a L-aminokyseliny. Oligopeptid tvoří takzvaný β-helix (6,3 rezidují na otočku, průměr kanálu 0,4 nm), který se integruje do membrány. Ten sám osobě není dost dlouhý, aby přemostil celou membránu a kanál utvoří až dimer těchto oligopeptidů (bylo ukázáno např. zde [33]). Ionty kanálem migrují přes centrální otvor [24]. Antibiotikum bylo poprve extrahováno v roce 1939. Je získáváno z půdní bakterie *Bacillus brevis*. Přesná terciální struktura je dnes známa [24]. V našich experimentech gramicidin interagoval s některými dalšími chemikáliemi, zejména fluorescenčními sondami. Toto je diskutováno v rámci výsledků příslušných experimentů.



Obr. 3.11 : Strukturní vzorec oligopeptidového kanálu Gramicidinu A (http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/)

3.5 Užité pufry

Při experimentech v rámci této práce bylo užito celkem 6 druhů pufru. pH pufrů bylo nastaveno pomocí koncentrovaného NaOH resp. KOH. Veškerá data jsou vynesena v následující tabulce. V dalším textu a grafech mohou být konkrétní pufry značeny číslem v kulaté závorce (první sloupec v následující tabulce), které daný pufr jednoznačně identifikuje.

Číslo	Sůl / koncentrace [mM]	Vlastní pufr / koncentrace [mM]	Nastavení pH pomocí	Výsledné pH pufru
(1)	NaCl / 100	Citrát / 10	NaOH	5,00
(2)	NaCl / 100	HEPES / 10	NaOH	7,00
(3)	KCl / 100	Citrát / 10	KOH	5,00
(4)	KCl / 100	HEPES / 10	KOH	7,00
(5)	Cholinchlorid / 100	Citrát / 10	NaOH	5,00
(6)	Cholinchlorid / 100	HEPES / 10	NaOH	7,00

Tab. 3.6 : Složení použitých pufrů.

Cholin chlorid viz [28], citrát viz [29] a HEPES viz [30].

Kapitola 4

Výsledky měření

Za účelem zkoumání transportních vlastností oligopeptidů TMS3, TMS6-OH a TMS6-NH_2 byly vytipovány čtyři různé fluorescenční sondy, které jsou citlivé na membránový potenciál resp. na koncentraci malých jednomocných iontů ve svém okolí. Cílem uvedených experimentů je pomocí těchto sond sledovat transportní děje přes lipidovou membránu připravených liposomů. Schopnost zkoumaných oligopeptidů tvořit kanály vodivé pro malé jednomocné ionty byla ukázána v pracích [1], [31]. Kapitola je členěna do podkapitol podle užitých fluorescenčních sond. Všechny experimenty byly temperovány na teplotu 20 ºC. Uvedená data jsou vždy reprezentativním vzorkem opakovaných měření z více různých příprav liposomů. Polarizací membrány je v celém textu rozuměn záporný potenciál uvnitř liposomů.

4.1 Výsledky experimentů se sondou DiS-C_3(3)

4.1.1 Idea experimentu

Jak bylo uvedeno v předcházející kapitole, DiS-C_3(3) je potenciálová redistribuční sonda. Díky kladnému náboji je sonda citlivá na membránový potenciál. Sonda interagující s hlavičkou fosfolipidu vykazuje emisní spektrum s maximem na 580 nm. Sonda neinteragující pak s maximem okolo 560 nm [16]. Měříme-li poměr emisních intenzit na těchto vlnových délkách v závislosti na čase, dostáváme informaci o časově závislém poměru množství interagující a neinteragující sondy a tím i informaci o membránovém potenciálu.

Idea experimentu se sondou DiS-C_3(3) je připravit vzorek, kde uvnitř a vně liposomů jsou pufry obsahující různý druh soli, a selektivním zprůchodněním membrány nastavovat membránový potenciál. Tento potenciál lze sledovat právě prostřednictvím sondy DiS-C_3(3).

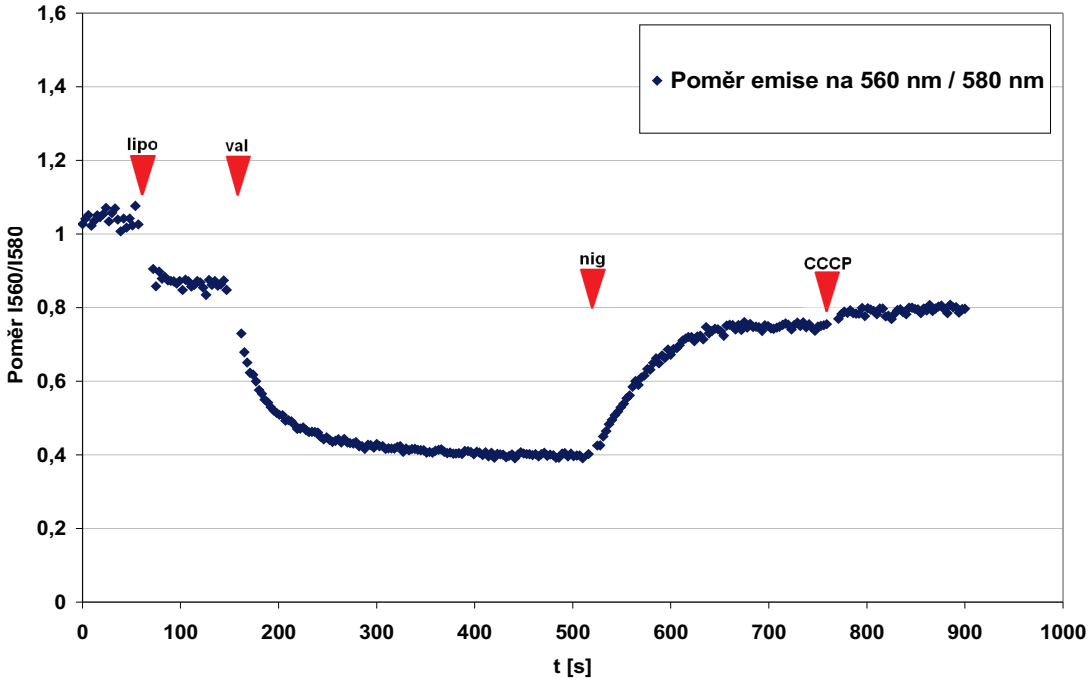
4.1.2 Dosažené výsledky

Redistribuční potenciálové sondy jsou bohužel obecně známy svou tendencí k adsorpci na stěny plastových kyvet a na teflonová míchátka [16]. Pozorovali jsme, že při užití plastových kyvet poklesne emisní intenzita cca o 10% během 500s, při použití teflonového míchátka je tento pokles za stejný čas cca 50 %. V obou případech pak dále neklesne. U sondy DiS-C_3(3) jsme tak nepozorovali tendenci k fotodegradaci. Při užití čisté křemenné kyvety intenzita emise sondy neklesá. Pro měření jsme však používali kyvety plastové s ohledem na to, že je u nich stále

garantována dokonalá čistota a nepřítomnost kontaminace ionofory. Měření se sondou DiS-C_3(3) byla prováděna při pH = 5,00 vnitřního i vnějšího pufru. S touto sondou byly používány liposomy o koncentraci 0,4 mg lipidů na 1ml zásobního roztoku vytvořené suspenze. Při měření se sondou DiS-C_3(3) jsme používali liposomy, které uvnitř obsahovaly pufr (3), tedy 100mM KCl a pH = 5,00.

Na obrázcích s více sadami dat a časovou osou byly některé ze sad posunuty v čase, tak aby byly v zákrytu v momentě přidání klíčové látky resp. kontroly k měřenému systému. Označení látky, na jejíž přidání jsou data synchronizována, je vždy napsáno v závorce na konci popisku k danému obrázku.

Experiment, je označen jako základní (obr.4.1), byl prováděn po každé přípravě liposomů určených k práci se sondou DiS-C_3(3), aby byla ověřena jejich kvalita. V tomto experimentu byly liposomy obsahující pufr (3) přidány do pufru (5), tedy 100mM cholinchlorid, pH = 5,00 (cholinové kationty jsou dále v textu označovány jako Cho^+). K tomuto systému pak byl po řadě přidán valinomycin, nigericin a CCCP (množství a výsledné koncentrace viz níže). Přidání jednotlivých látek je znázorněno červenými šipkami s intuitivní zkratkou konkrétní látky. Látky, které byly do kyvety přidány před zahájením měření, jsou v příslušné soupisné tabulce vždy ohraničeny černě, látky přidané v průběhu experimentu jsou pak ohraničeny šedě.



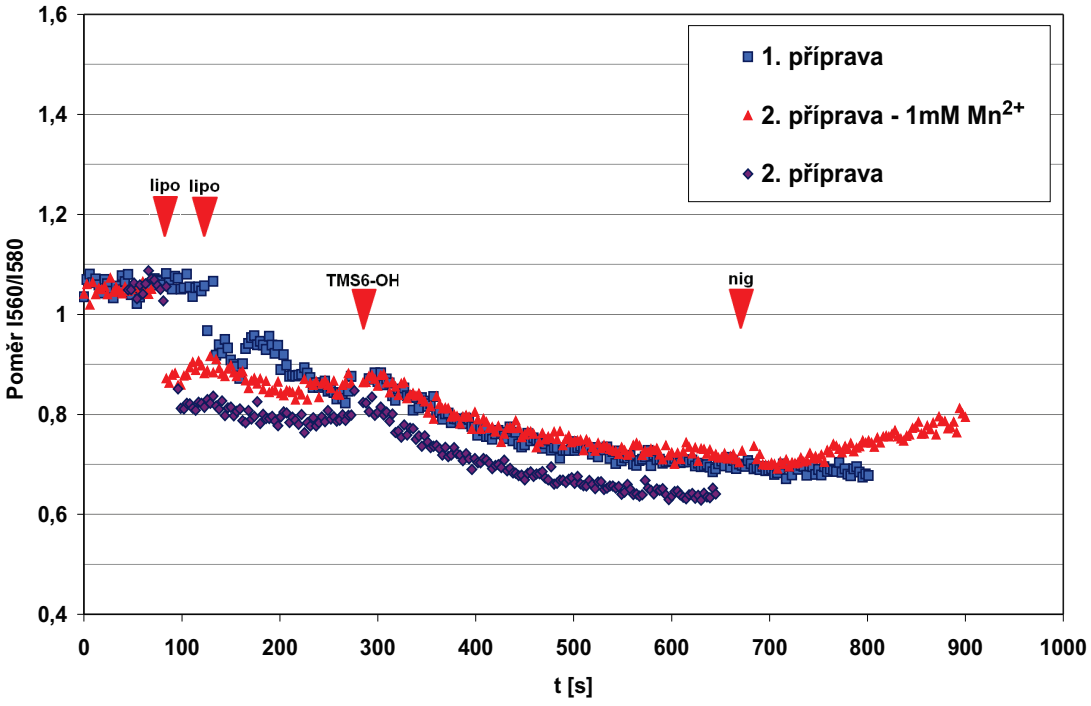
Obr. 4.1 : Graf základní experiment – časová závislost poměru emise na 560 nm / 580 nm.

Látka	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**Liposomy (3)**	**Valinomycin**	**Nigericin**	**CCCP**
Množství	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	5 µl 1.10^{-4}M	5 ul 1.10^{-3}M
Látka	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lipo.**	**Valinomycin**	**Nigericin**	**CCCP**
Výsledná koncentrace	99 mM Cho^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	$1,6.10^{-7}$M	$1,6.10^{-6}$M

Tab. 4.1 : Základní experiment – soupis užitých látek a jejich množství.

Základní experiment zpočátku ukazuje poměr spektrálních intenzit, který přísluší neinteragující sondě, která je rozpuštěna volně v okolním pufru. Po přidání suspenze liposomů se sonda přerozdělí mezi vnitřní a vnější prostor liposomů a část jí interaguje s hlavičkami fosfolipidů, sonda v interakci má maximum emise posunuté k 580 nm, takže celkový poměr poklesne. Po přidání valinomycinu, který zprůchodní membránu pro draslíkové kationty se buduje na membránách liposomů potenciál, na který reaguje kladně nabitá sonda DiS-C_3(3) vtokem do liposomů, vlivem její zvyšující se koncentrace uvnitř liposomů pak poměr spektrálních intenzit klesá. Přidáním nigericinu můžou membránou procházet kromě draslíkových kationtů i vodíkové kationty. Tím se nastaví obecně méně záporný membránový potenciál, který je dán GHK-rovnicí (viz kapitola 3), poměr tak opět vzroste. Na závěr tohoto experimentu je přidán ještě ionofor CCCP, který selektivně zvyšuje průchodnost membrány pro protony. Vodíkové kationty, protony, po přidání nigericinu nejprve kompenzovali výtok draselných kationtů z liposomů, jejich aktuální koncentrace uvnitř liposomů je tedy větší. Membránový potenciál, který by byl určen pouze jimi by tedy byl kladný. Zvýšení průchodnosti membrány pro protony přidáním CCCP tak dále depolarizuje membránu a spektrální poměr sondy ještě vzroste.

Schopnost oligopeptidu TMS6-OH zvýšit propustnost membrány pro malé ionty byla ověřena v následujícím experimentu (obr. 4.2). K venkovnímu cholinovému pufru s již rozpuštěnou sondou DiS-C_3(3) jsou přidány liposomy. Po chvilce, po kterou se sonda distribuuje mezi venkovním a vnitřním prostředím liposomů, je k systému přidán vodný roztok oligopeptidu TMS6-OH a to v takovém množství a koncentraci, aby se výsledná koncentrace oligopeptidu v kyvetě rovnala užívané koncentraci oligopeptidu TMS6-OH v práci [1], tedy $C_{TMS6\text{-}OH} \approx 1$ μM.



Obr. 4.2 : Ověření schopnosti oligopeptidu TMS6-OH zvýšit propustnost membrány pro některé malé ionty (synchronizace - TMS6-OH).

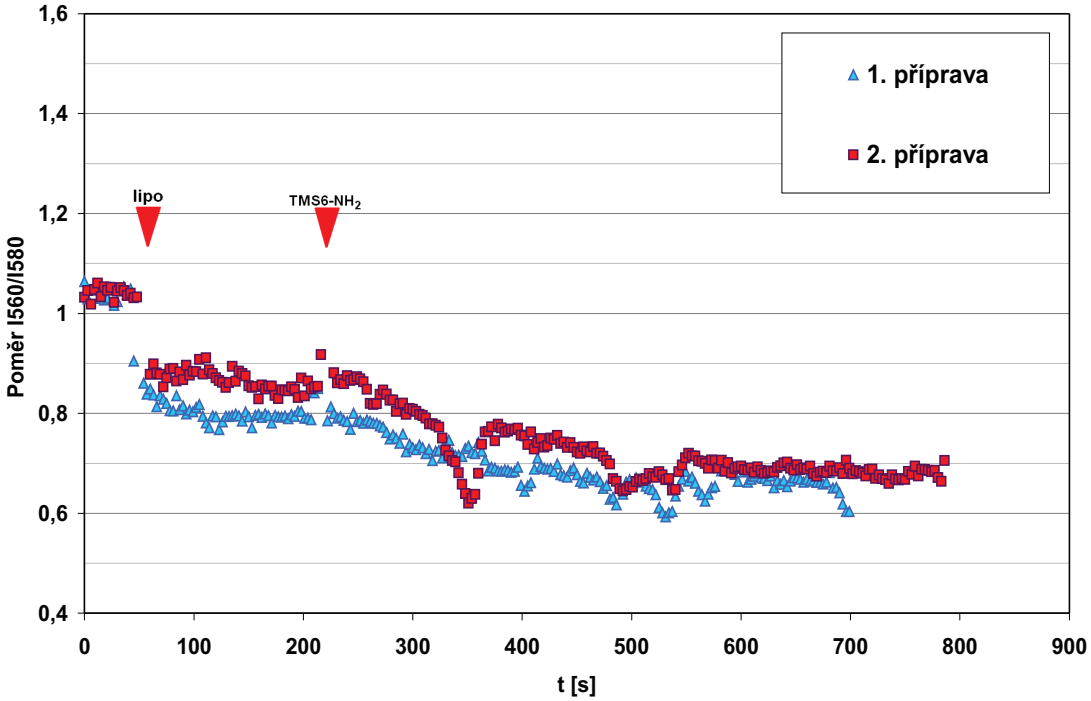
Předpokládáme-li, že cholinový kationt utvořenými kanály procházet nemůže kvůli své velikosti, pak přidání TMS6-OH zprůchodní membránu pro draselné kationty resp. pro chloridové anionty. Dle práce [1] jsou utvořené kanály mírně selektivní ve prospěch draselných kationtů vůči chloridovým aniontům. Koncentrace iontů, které mohou vlivem TMS6-OH procházet membránou není na obou stranách membrány symetrické, symetrii narušuje kladný draslík, kterého je před přidáním TMS6-OH uvnitř liposomů výrazně více než vně liposomů. Z posledních dvou poznatků plyne, že by se membrána přidáním TMS6-OH měla začít polarizovat, na což reaguje sonda vtokem do liposomů a poklesem poměru spektrálních intenzit. Na obrázku jsou vynesena data ze dvou různých příprav liposomů a pro druhou přípravu jsou vynesena data, kdy je do před začátkem měření přidán $MnCl_2$. Mezi jednotlivými přípravami jsou pozorovatelné rozdíly v hladině poměru spektrálních intenzit pro korespondující části křivky. Příprava není přísně deterministická a výsledné množství liposomů v suspenzi se může mírně lišit příprava od přípravy. Pro konkrétní přípravu je patrný rozdíl mezi daty s $MnCl_2$ a bez jeho přítomnosti. Data s $MnCl_2$ leží obecně výš. Je možné, že dvojmocný mangan nějakým způsobem interaguje s hlavičkami fosfolipidů na vnější straně liposomů a např. stericky je brání před interakcí se sondou DiS-C_3(3). Na konci jedné sady dat na Obr. 4.2 je k roztoku přidán ještě nigericin, který ukazuje že se po přidání TMS6-OH jedná skutečně o polarizaci membrány a ne o pouhou interakci TMS6-OH se sondou DiS-C_3(3). Interakce sondy DiS-C_3(3), která byla volně v pufru, s oligopeptidem TMS6-OH byla při několika experimentech vyloučena.

Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**$MnCl_2$**	**Liposomy (3)**	**TMS6-OH**	**Nigericin**
1.příprava	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	20 µl $1,65.10^{-4}$M	-
2.příprava – 1mM Mn^{2+}	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	3 µl 1M	15 µl	20 µl $1,65.10^{-4}$M	5 µl 1.10^{-4}M
2. příprava	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	20 µl $1,65.10^{-4}$M	-
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**$MnCl_2$**	**K^+ z okolí lipo.**	**TMS6-OH**	**Nigericin**
1.příprava	98 mM Cho^+	$2,0.10^{-7}$M	-	0,5 mM	$1,1.10^{-6}$M	-
2.příprava – 1mM Mn^{2+}	98 mM Cho^+	$2,0.10^{-7}$M	$9,8.10^{-4}$M	0,5 mM	$1,1.10^{-6}$M	$1,6.10^{-7}$M
2. příprava	98 mM Cho^+	$2,0.10^{-7}$M	-	0,5 mM	$1,1.10^{-6}$M	-

Tab. 4.2 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.2.

Podobný experiment jako s TMS6-OH (vyneseném na obrázku 4.2) byl proveden i s TMS6-NH_2. Tedy s oligopeptidem ukončeným amidem. Tento experiment je znázorněn na obrázku 4.3., přidané látky pak opět v příslušné tabulce. Na tomto obrázku jsou vynesena data ze dvou příprav liposomů. Po přidání roztoku TMS6-NH_2 v podstatě následuje stejný pokles poměru emisních intenzit sondy jako u experimentů s TMS6-OH. Interpretace zůstává v podstatě stejná jako u předchozího experimentu. Naměřená data při tomto poklesu jsou však výrazně neurovnaná. Toto lze interpretovat dvěma způsoby. Je možné, že amidem zakončený oligopeptid v nějakém směru destabilizuje systém liposomů. V prácích [1] a [31] bylo na datech z měření cirkulárního dichroismu ukázáno, že oligopeptid TMS6-NH_2 interaguje s lipidovou membránou jiným způsobem než oligopeptid TMS6-OH. Lze oponovat, že neurovnanost křivky může být způsobena nečistotami v přidaném roztoku TMS6-NH_2. Pro toto zdůvodnění hovoří i experiment, kdy bylo TM6-NH_2 přidáno k volné sondě v pufru a nestabilita křivky byla pozorována taktéž. Experiment byl po té

zopakován s nově připraveným roztokem TM6-NH_2 se stejným výsledkem. Je možné, že se amidovaný protein nějakým způsobem sráží a tvoří rozptylová centra, která pak náhodně vstupují do paprsku. Takovéto zdůvodnění by si ale žádalo více podkladů.



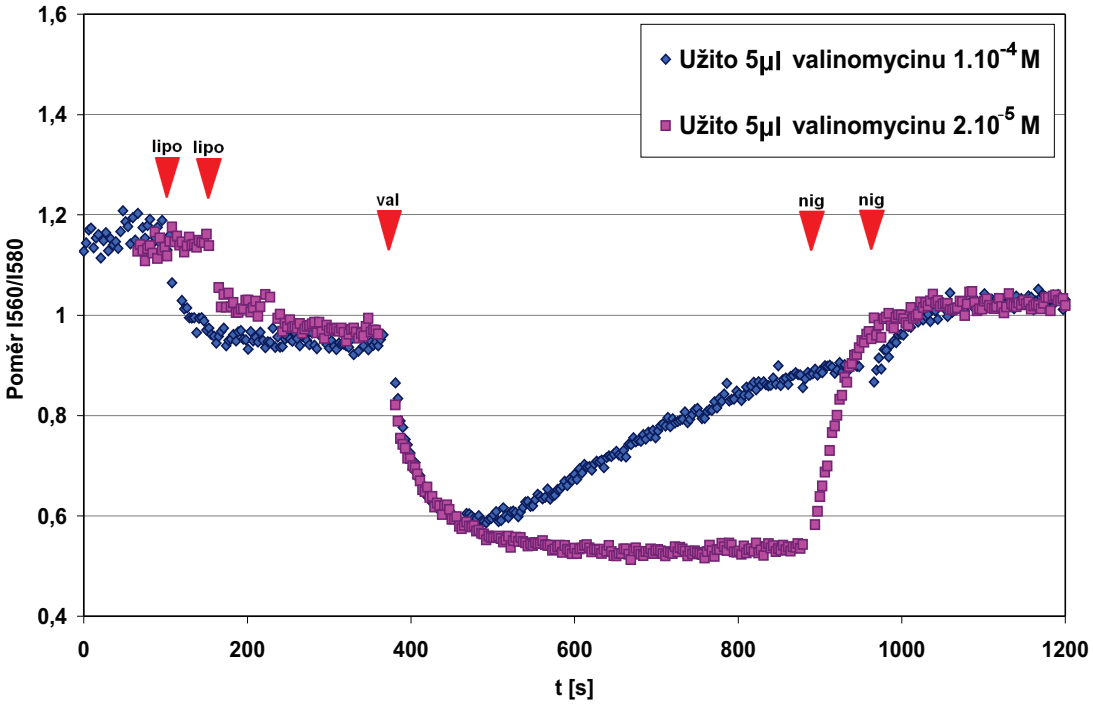
Obr. 4.3 : Ověření schopnosti oligopeptidu TMS6-NH_2 zvýšit propustnost membrány pro některé malé ionty (synchronizace - TMS6-NH_2).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	TMS6-NH_2
1.příprava	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	20 µl $1{,}65.10^{-4}$M
2. příprava	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	20 µl $1{,}65.10^{-4}$M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lipo.**	**TMS6-NH_2**
1.příprava	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$1{,}1.10^{-6}$M
2. příprava	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$1{,}1.10^{-6}$M

Tab. 4.3 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.3.

Jako vnější pufr byl také hojně využíván pufr sodný. Základní experiment v sodném pufru, analogický tomu v cholinovém pufru vyneseném na obr. 4.1, je znázorněn na obrázku 4.4. Na tomto obrázku jsou dvě sady dat měřených na liposomech stejné přípravy s tím rozdílem, že v jednom případě byl použit valinomycin o koncentraci 1.10^{-4}M a v druhém případě valinomycin o koncentraci 5x nižší. Selektivita valinomycinu pro draselné kationty oproti kationtům sodným je poměrně vysoká, z tohoto experimentu lze však dovodit, že sodné ionty jsou valinomycinem přenášeny taktéž v dosti velké míře. Po přidání většího množství valinomycinu se prudce nabuduje membránový potenciál vlivem vytékání draslíkových kationtů z liposomů. Potenciál je však vzápětí umenšován vtokem iontů sodných do liposomů, které jsou hnány koncentračním i elektrickým gradientem. Jak se koncentrace zmíněných iontů

na obou stranách membrány vyrovnávají, membrány se opět depolarizují. Při užití 5x zředěného valinomycinu tento jev v rozsahu časové základny měření nenastává. Námitka, že depolarizace u jedné ze sad dat je způsobena možnou kontaminací roztoku jiným ionoforem, je vyloučena na základě toho, že experiment dopadne stejně při užití valinomycinu stejné koncentrace zásobního roztoku v obou sadách dat s příslušně rozdílnými přidanými objemy.



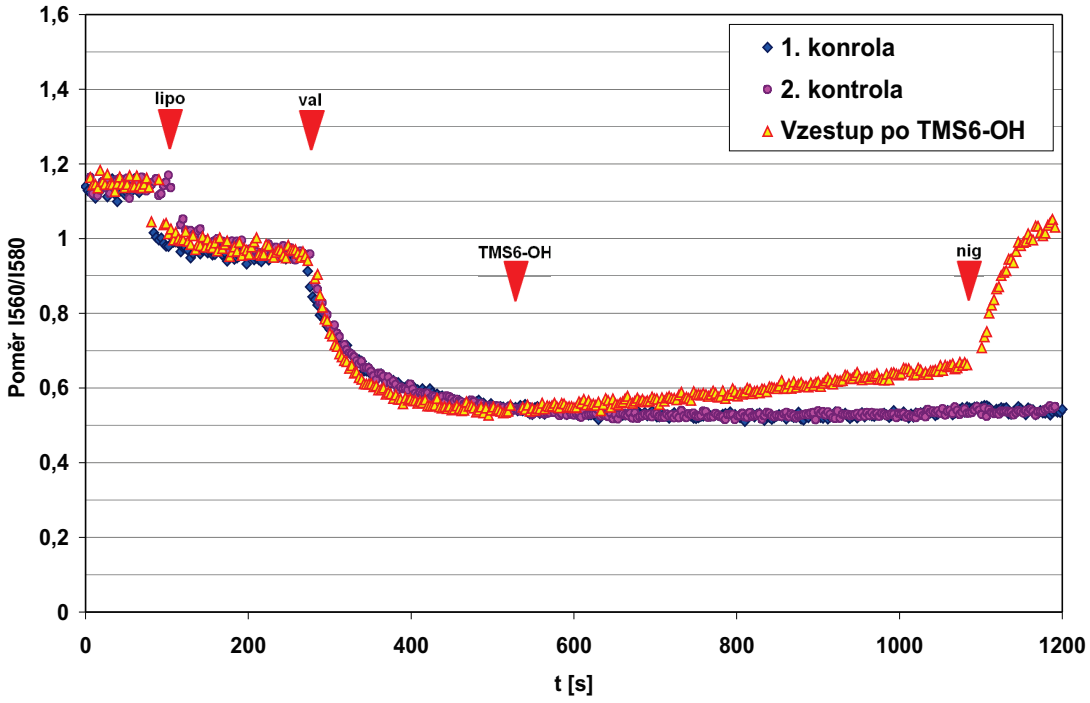
Obr. 4.4 : Ukázka vlastností valinomycinu a nalezení vhodného množství resp. výsledné koncentrace (synchronizace - valinomycin).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	Valinomycin	Nigericin
Užito 5 µl valinomycinu 1.10^{-4}M	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 1.10^{-4}M	5 µl 1.10^{-4}M
Užito 5 µl valinomycinu 2.10^{-5}M	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	5 µl 1.10^{-4}M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lipo.**	**Valinomycin**	**Nigericin**
Užito 5 µl valinomycinu 1.10^{-4}M	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$1{,}6.10^{-7}$M	$1{,}6.10^{-7}$M
Užito 5 µl valinomycinu 2.10^{-5}M	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3{,}3.10^{-8}$M	$1{,}6.10^{-7}$M

Tab. 4.4 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.3.

Předchozí experiment byl důležitý pro nalezení optimálního množství přidaného valinomycinu, aby po dobu experimentu nebyla pozorována rychlá depolarizace membrány a naměřená data tak mohla sloužit jako referenční křivka resp. kontrola. Uvážíme-li, že ihned po maximální polarizaci membrány valinomycinem přidáme k systému oligopeptid TMS6-OH, měla by se stát membrána permeabilní i pro jiné malé ionty a mohla by se začít depolarizovat. Toto bylo v experimentu vyneseném na obr. 4.5 skutečně pozorováno. Jako možné vysvětlení lze opět předložit zvýšení propustnosti membrány pro chloridové anionty. Přidáním výše zmíněného

oligopeptidu se také membrána může stát více propustnou pro sodíkové kationty, což taktéž může přispět k depolarizaci. Proti tomuto experimentu jsou na obr. 4.5 vyneseny dvě kontrolní křivky ze stejné přípravy liposomů, kde v bodě maximální polarizace po přidání valinomycinu nebyla přidána žádná další látka.

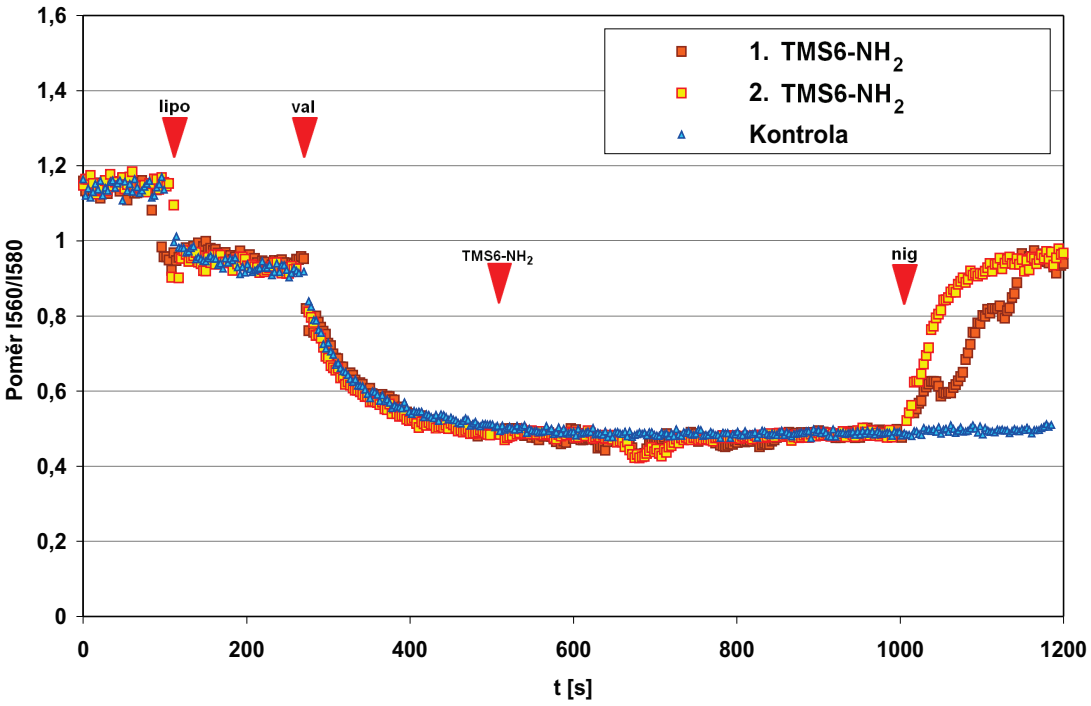


Obr. 4.5 : Depolarizace membrány po přidání roztoku TMS6-OH (synchronizace - valinomycin).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	Valinomycin	TMS6-OH	Nigericin
1.kontrola	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	-	-
2.kontrola	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	-	-
Vzestup po TMS6-OH	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	20 µl $1,65.10^{-4}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lip.**	**Valinomycin**	**TMS6-OH**	**Nigericin**
1.kontrola	99 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	-	-
2.kontrola	99 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	-	-
Vzestup po TMS6-OH	98 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	$1,1.10^{-6}$M	$1,6.10^{-7}$M

Tab. 4.5 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.5.

Stejný experiment jako v předchozím případě pro TMS6-OH (obr.4.5) byl proveden i pro oligopeptid TMS6-NH_2. Data jsou vynesena na obr. 4.6. Náznak depolarizace membrány však v tomto měření pozorován nebyl. Toto může být způsobeno rozdílnou interakcí těchto oligopeptidů s lipidovou membránou resp. rozdílnou stabilitou jimi tvořených kanálů [1], [31]. Křivky s TMS6-NH_2 oproti té s TMS6-OH byly opět poměrně kolísavé. Pro toto lze představit stejná interpretace jako v případě experimentů s budováním polarizace vynesených na obr. 4.3.

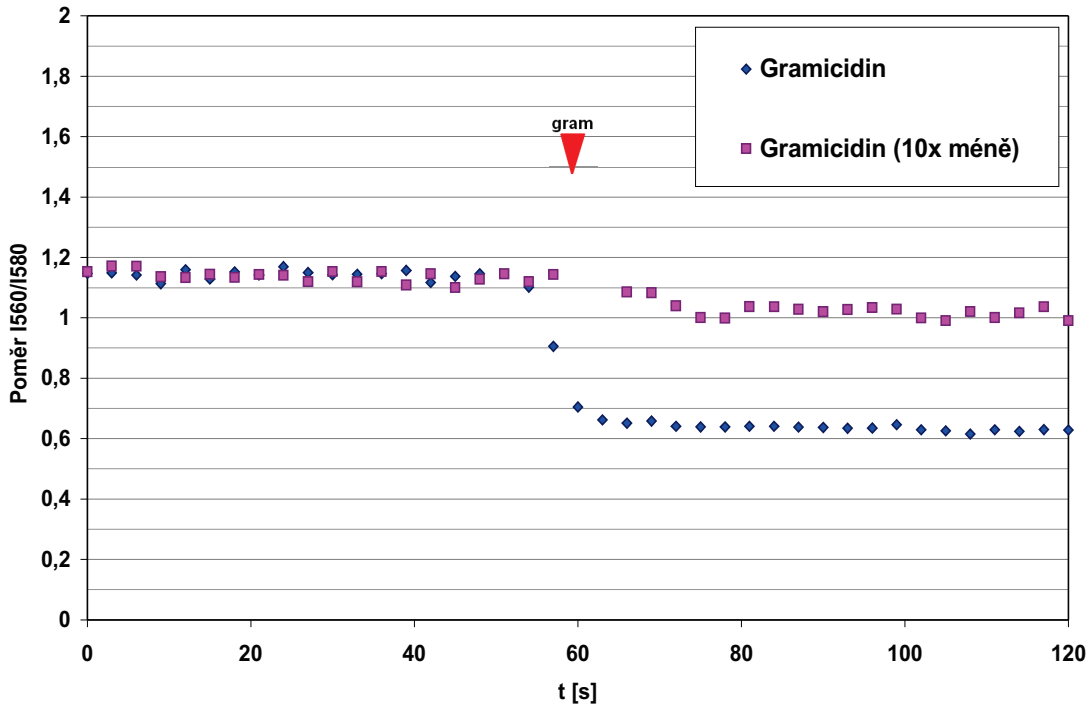


Obr. 4.6 : Absence depolarizace membrány po přidání roztoku TMS6-NH_2 (synchronizace - valinomycin).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	Valinomycin	TMS6-NH_2	Nigericin
1. TMS6-NH_2	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	20 µl $1,65.10^{-4}$M	5 µl 1.10^{-4}M
2. TMS6-NH_2	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	20 µl $1,65.10^{-4}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Kontrola	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	-	-
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lipo.**	**Valinomycin**	**TMS6-NH_2**	**Nigericin**
1. TMS6-NH_2	98 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	$1,1.10^{-6}$M	$1,6.10^{-7}$M
2. TMS6-NH_2	98 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	$1,1.10^{-6}$M	$1,6.10^{-7}$M
Kontrola	99 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3,3.10^{-8}$M	-	-

Tab. 4.6 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.6.

Jako velmi vhodná pozitivní kontrola k experimentům se studovanými oligopeptidy se jeví užití gramicidinu, jako peptidu, u něhož je schopnost tvorby kanálů v lipidové membráně dobře prostudována, např. [24]. V následujících experimentech užíváme tzv. gramicidin D (více viz materiály a metody). Problém však je, že gramicidin ve vyšších koncentracích interaguje se sondou DiS-C_3(3) a měření by tak bylo podstatně zkresleno. Na obr. 4.7 jsou vynesena data, kdy k volné sondě v pufru byla přidána dvě různá množství gramicidinu. V případě většího množství nastala podstatná nežádoucí interakce. V případě množství desetkrát menšího je tato interakce menší než deset procent aktuální hodnoty poměru spektrálních intenzit. Toto množství a příslušná výsledná koncentrace gramicidinu v kyvetě tím byla vzata jako horní hranice pro použití tohoto antibiotika společně se sondou DiS-C_3(3). Ve většině případů byl však gramicidin používán v menších koncentracích (viz níže).

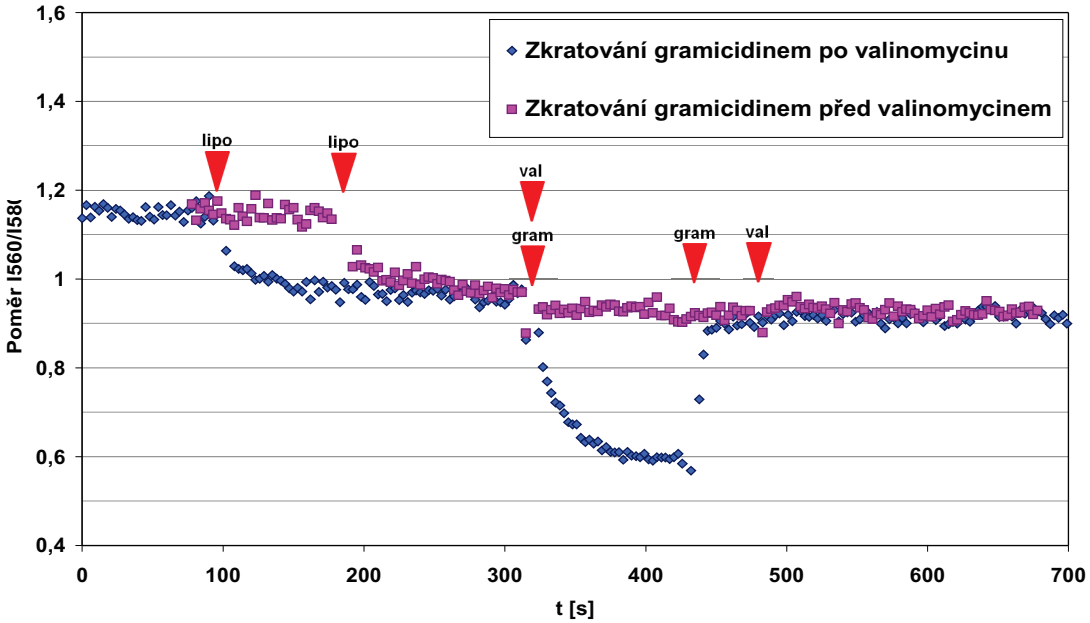


Obr. 4.7 : Naměřená interakce gramicidinu se sondou DiS-C_3(3).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Gramicidin
Gramicidin	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	20 µl $1{,}06.10^{-5}$M
Gramicidin (10x méně)	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	2 µl $1{,}06.10^{-5}$M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**Gramicidin**
Gramicidin	100 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	$7{,}0.10^{-8}$M
Gramicidin (10x méně)	100 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	$7{,}0.10^{-9}$M

Tab. 4.7 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.7.

Schopnost gramicidinu tvořit kanály v membráně byla ověřena dvěma způsoby, které jsou zaznamenány na obr. 4.8. Při jednom ze způsobů byl proveden experiment, kdy po přidání liposomů byl standardně přidán valinomycin. Po nabudování membránového potenciálu byla membrána „zkratována“ přidáním množství (horní hranice) gramicidinu. Z obr. 4.8 plyne, že membrána se okamžitě depolarizovala. V druhém experimentu bylo zaměněno pořadí gramicidinu a valinomycinu. Membrána byla nejprve „zkratována“ a pak byl přidán valinomycin, na který systém nereagoval. Bylo tedy ukázáno, že gramicidin má vliv na propustnost membrány.



Obr. 4.8 : Ověření schopnosti gramicidinu tvořit kanály v membráně (synchronizace - valinomycin resp. gramicidin).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	Valinomycin	Gramicidin
Zkratování gramicidinem po valinomycinu	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl 2.10^{-5}M	2 µl $1{,}06.10^{-5}$M
				Gramicidin	**Valinomycin**
Zkratování gramicidinem před valinomycinem	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	2 µl $1{,}06.10^{-5}$M	5 µl 2.10^{-5}M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lip.**	**Valinomycin**	**Gramicidin**
Zkratování gramicidinem po valinomycinu	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$3{,}3.10^{-8}$M	$7{,}0.10^{-9}$M
				Gramicidin	**Valinomycin**
Zkratování gramicidinem před valinomycinem	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$7{,}0.10^{-9}$M	$3{,}3.10^{-8}$M

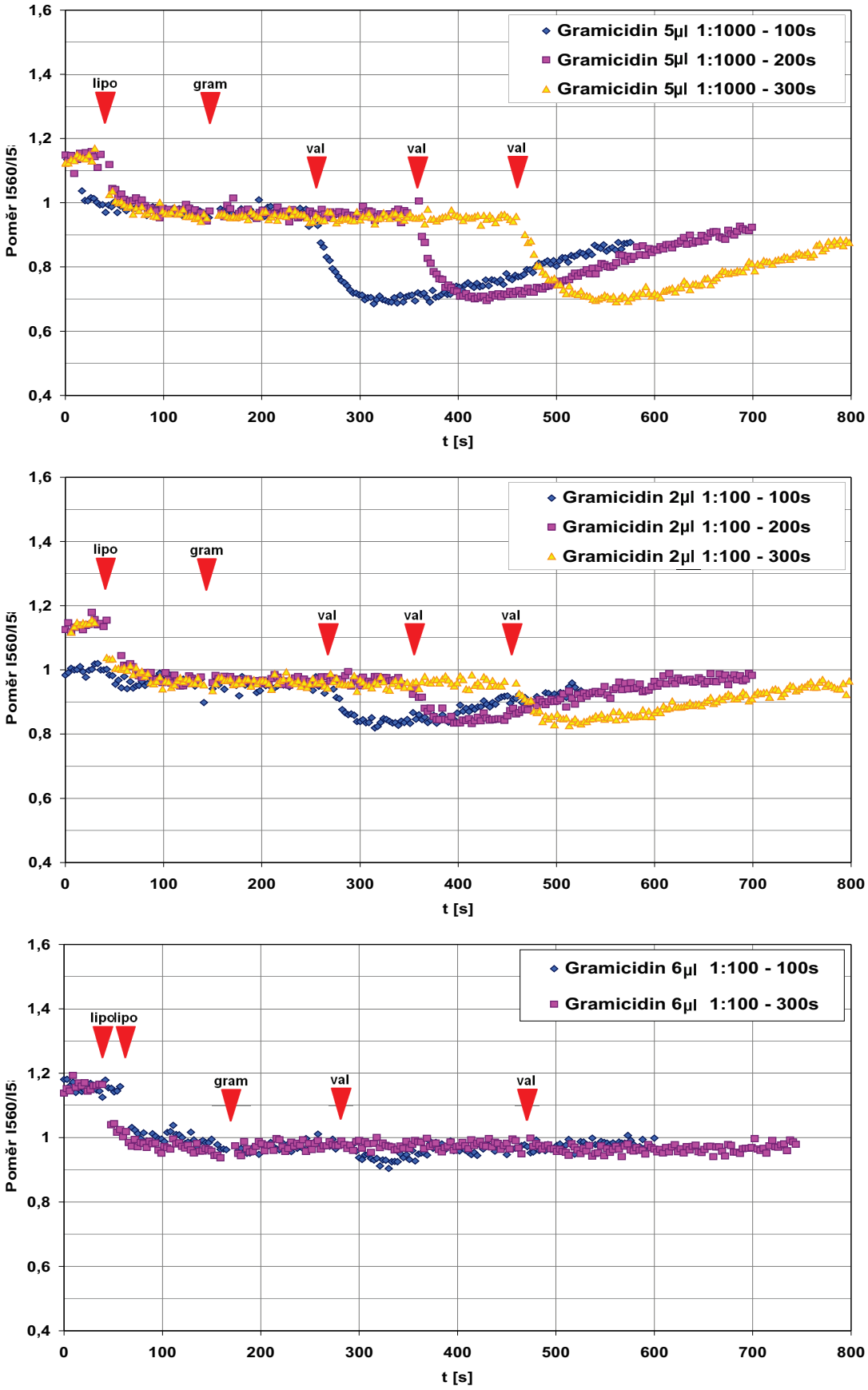
Tab. 4.8 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.8.

Lze předložit dvě poněkud odlišné interpretace dějů v našem měřeném systému.

1.) Přídavek gramicidinu ovlivňuje spolu s dalšími látkami membránový potenciál daný GHK- rovnicí (2.2). V té se mění propustnosti pro jednotlivé ionty vlivem přidávání různých ionoforů resp. oligopeptidů. Koncentrace sodíkových resp. draslíkových kationtů se však vně a uvnitř liposomů v průběhu měření příliš nemění.

2.) Gramicidin tvoří kanály v takovém počtu a s takovou vodivostí, že se koncentrace sodíkových a draselných kationtů vně a uvnitř liposomů vyrovnají. Na membráně pak není ani chemický ani elektrický gradient.

Rozhodnutí mezi těmito dvěma interpretaci do jisté míry závisí na vodivosti kanálů tvořených gramicidinem. Na základě měření se sondou PBFI (viz dále) je však pravděpodobné, že korektní je druhá interpretace.



Obr. 4.9 : Tři závislosti polarizace membrány po valinomycinu na době působení gramicidinu, tři výsledné koncentrace gramicidinu (synchronizace - gramicidin).

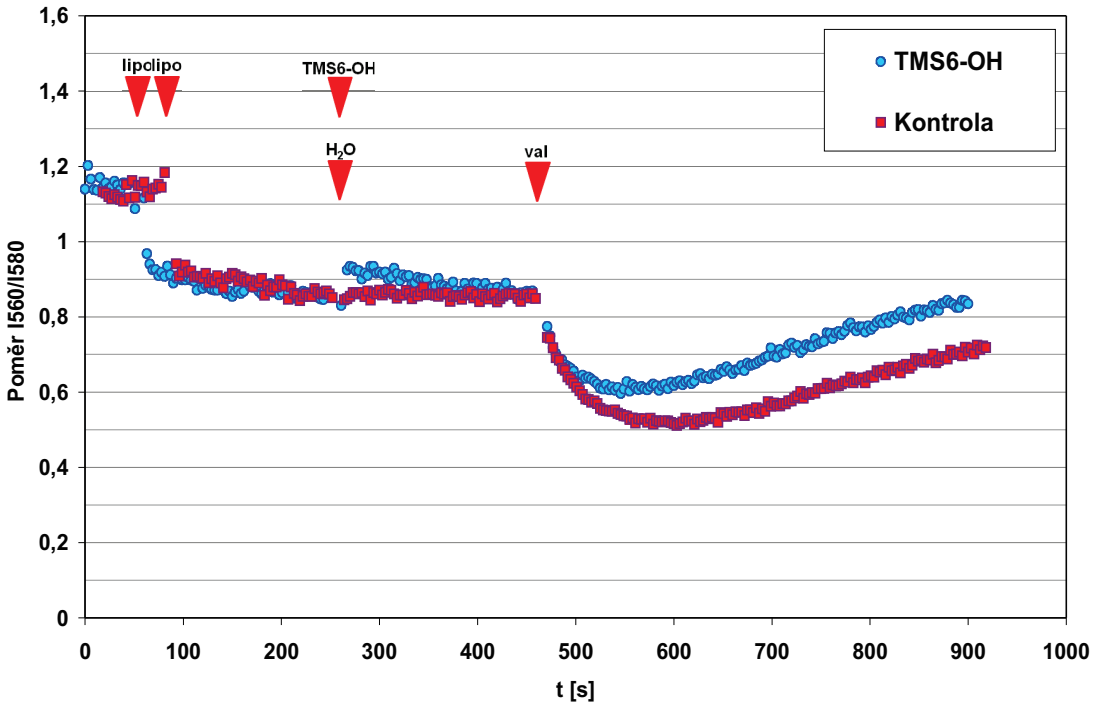
Na obrázku 4.9 jsou uvedeny tři grafy závislosti polarizace membrány po valinomycinu na době působení gramicidinu pro jeho tři různé výsledné koncentrace. Na základě těchto grafů lze říci, že hodnota membránového potenciálu, který je nabudován po přidání valinomycinu záleží na koncentraci přítomného gramicidinu. S vyšší koncentrací je absolutní hodnota nabudovaného potenciálu menší. Závislost potenciálu na době, po kterou byl systém liposomů ponechán působení gramicidinu, není zcela průkazná. Při bližším pohledu na grafy je možné vidět, že minima po valinomycinu zcela nepatrně stoupají s delším časem působení gramicidinu. Vzestup je však neprůkazný. Nepřítomnost stoupání minima po přidání valinomycinu v závislosti na době působení gramicidinu by mohla být argumentem pro první interpretaci této třídy experimentů. Na druhou stranu lze situaci vysvětlit tak, že gramicidin má vysokou afinitu k membráně, tedy že se okamžitě po přidání integruje do membrány a mezi liposomy se nepřemisťuje. Z tohoto hlediska může existovat velká část liposomů, kde se po čas experimentu neutvoří gramicidinový kanál a část liposomů, kde se kanál resp. kanály vytvoří a jejichž vnitřní koncentrace kationtů se vyrovná koncentraci vnější. Veličinu kterou prostřednictvím sondy DiS-C_3(3) sledujeme pro jednoduchost nazýváme membránový potenciál, ve skutečnosti však měříme něco jako střední membránový potenciál (středovaný přes všechny liposomy).

Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**Liposomy (3)**	**Gramicidin**	**Valinomycin**
Gramicidin 5µl 1:1000 – 100s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl $1{,}06.10^{-7}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 5µl 1:1000 – 200s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl $1{,}06.10^{-7}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 5µl 1:1000 – 300s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	5 µl $1{,}06.10^{-7}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 2µl 1:100 – 100s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	2 µl $1{,}06.10^{-6}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 2µl 1:100 – 200s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	2 µl $1{,}06.10^{-6}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 2µl 1:100 – 300s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	2 µl $1{,}06.10^{-6}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 6µl 1:100 – 100s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	6 µl $1{,}06.10^{-6}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Gramicidin 6µl 1:100 – 300s	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	6 µl $1{,}06.10^{-6}$M	5 µl 1.10^{-4}M
Legenda (bez ohledu na čas)	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lip.**	**Gramicidin**	**Valinomycin**
Gramicidin 5µl 1:1000	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$1{,}7.10^{-10}$M	$1{,}6.10^{-7}$M
Gramicidin 2µl 1:100	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$7{,}0.10^{-10}$M	$1{,}7.10^{-7}$M
Gramicidin 6µl 1:100	99 mM Na^+	$2{,}0.10^{-7}$M	0,5 mM	$2{,}1.10^{-9}$M	$1{,}6.10^{-7}$M

Tab. 4.9 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.9.

Podobný experiment jako byla série experimentů s gramicidinem byl proveden i s oligopeptidem TMS6-OH. V měření, které je zaznamenáno na obr.4.10, kdy vně liposomů byl sodný pufr byl k systému liposomů přidán oligopeptid TMS6-OH. Po 200 sekundách byl pak přidán valinomycin, který polarizoval membránu. Proti tomuto experimentu je vynesena kontrola, kdy byla místo oligopeptidu TMS6-OH přidána destilovaná voda. Při srovnání těchto dvou experimentů jsou patrné dva významné rozdíly. Po přidání TMS6-OH se poměr spektrálních intenzit sondy zvedne a zvolna klesá směrem zpět na původní hladinu. Toto by se s opatrností dalo

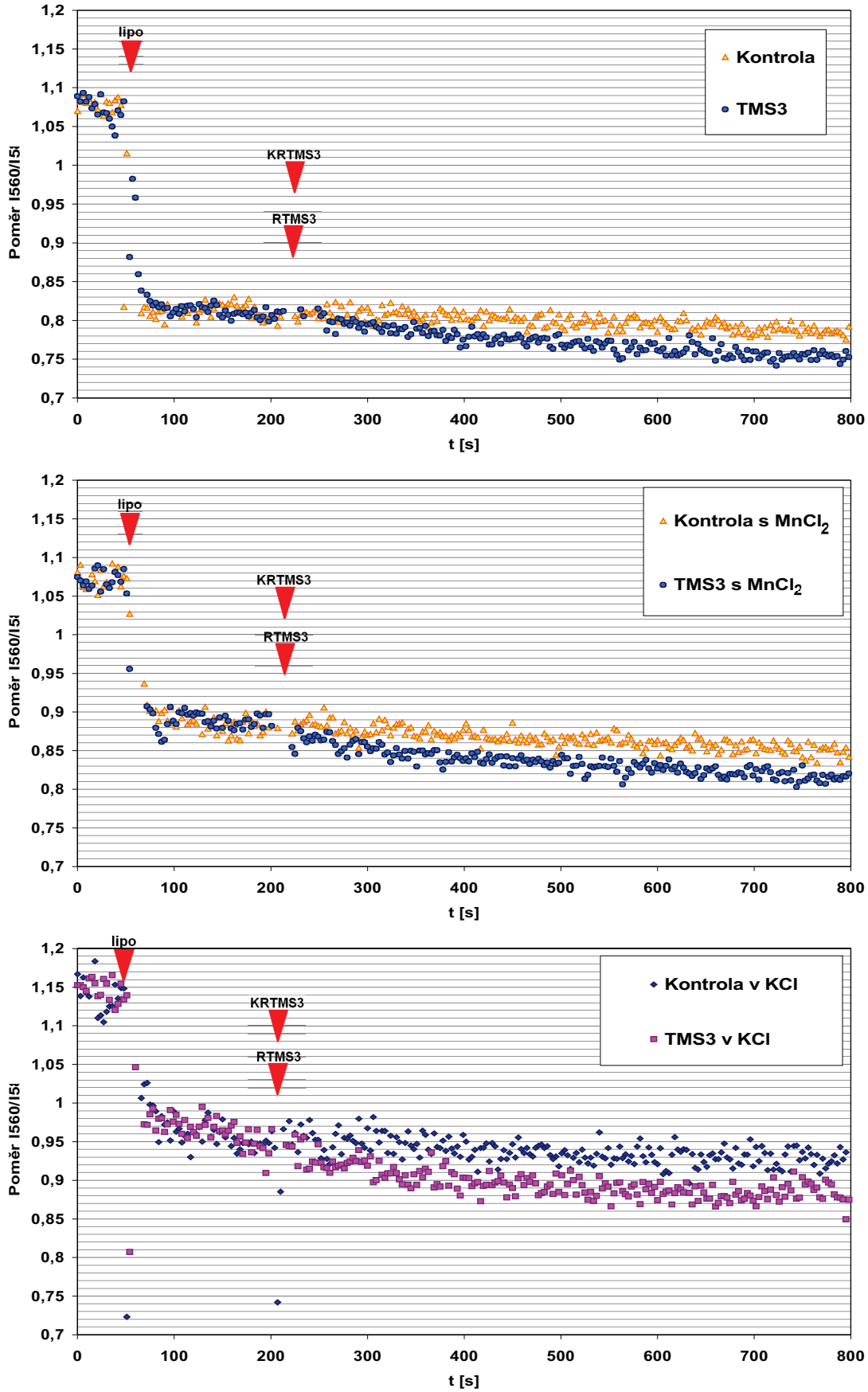
interpretovat tak, že kanály tvořené oligopeptidem TMS6-OH jsou poněkud více prostupné pro sodík než pro draslík. Vtékáním sodíku do liposomů se membrány polarizuje opačně, na což sonda reaguje vytékáním z liposomů a poměr spektrálních intenzit vzroste. Postupný pokles by pak mohl být dán poklesem tohoto opačného potenciálu vlivem kumulace sodíku uvnitř liposomů. Druhým rozdílem oproti kontrole je menší polarizace membrán liposomů vzorku s TMS6-OH po přidání valinomycinu. Tento změřený fakt by svědčil ve prospěch toho, že TMS6-OH tvoří kanály, které vyměňují ionty mezi vnějším a vnitřním prostředím liposomů.



Obr. 4.10 : Výměna vnitřních a vnějších iontů kanály tvořenými oligopeptidem TMS6-OH (synchronizace - valinomycin).

Legenda	Okolní pufr	DiS-C_3(3)	Liposomy (3)	TMS6-OH	H_20	Valinomycin
TMS6-OH	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	20 µl $1,65.10^{-4}$M	-	5 µl 1.10^{-4}M
Kontrola	3 ml (1)	6 µl 1.10^{-4}M	15 µl	-	20 µl	5 µl 1.10^{-4}M
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**K^+ z okolí lip.**	**TMS6-OH**	**H_20**	**Valinomycin**
TMS6-OH	98 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	$1,1.10^{-6}$M	-	$1,6.10^{-7}$M
Kontrola	98 mM Na^+	$2,0.10^{-7}$M	0,5 mM	-	N	$1,6.10^{-7}$M

Tab. 4.10 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.10.



Obr. 4.11 : Měření propustnosti membrány pro malé ionty vlivem oligopeptidu TMS3 (synchronizace - RTMS3 resp. KRTMS3).

Na obr. 4.11 jsou uvedeny experimenty se sondou DiS-C_3(3), kdy byl přidán oligopeptid TMS3. Vlivem přidaného oligopeptidu měl být teoreticky budován membránový potenciál na liposomech (Analogicky experimentům na obr. 4.2 a 4.3 s TMS6-OH resp. TMS6-NH_2). První z grafů na obrázku ukazuje velmi nepatrný pokles poměru spektrálních intenzit vlivem přidání roztoku TMS3 (značen RTMS3) resp. kontrolního roztoku k TMS3 (značen KRTMS3). Poměr po přidání roztoku s oligopeptidem klesl nepatrně více. Totéž bylo pozorováno na druhém grafu obrázku, kdy byl do každé kyvety před začátkem experimentu přidán $MnCl_2$. Třetí graf téhož obrázku však poukazuje na to, že jde patrně pouze o interakci TMS3 se sondou. Pokles poměru spektrálních intenzit vyšel stejně jako u ostatních grafů. Experiment zaznamenaný ve třetím grafu byl ale prováděn s draselným okolním i vnitřním pufrem, čili o budování potenciálu v průběhu měření nešlo. Kanály tvořené TMS3 jsme nepozorovali. V práci [1] resp. [31] bylo ukázáno že se oligopeptid TMS3 integruje do lipidové membrány poměrně obtížně a celkově tvoří kanály o nižší vodivosti než oligopeptidy TMS6. Oproti měřením v uvedených pracích jsme navíc byli nuceni nastavit desetkrát nižší výslednou koncentraci TMS3 z důvodu silné interakce s DiS-C_3(3).

Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**$MnCl_2$**	**Liposomy (3)**	**Roztok TMS3**	**Kontr. roztok TMS3**
Kontrola	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	-	20 µl
TMS3	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	20 µl	-
Kontrola s $MnCl_2$	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	3 µl 1M	15 µl	-	20 µl
TMS3 s $MnCl_2$	3 ml (5)	6 µl 1.10^{-4}M	3 µl 1M	15 µl	20 µl	-
Kontrola v KCl	3 ml (3)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	-	20 µl
TMS3 v KCl	3 ml (3)	6 µl 1.10^{-4}M	-	15 µl	20 µl	-
Legenda	**Okolní pufr**	**DiS-C_3(3)**	**$MnCl_2$**	**K^+ z okolí lip.**	**TMS3**	
Kontrola v KCl	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	-	0,5 mM	$1{,}1.10^{-7}$M	
TMS3	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	-	0,5 mM	$1{,}1.10^{-7}$M	
Kontrola s $MnCl_2$	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	$9{,}9.10^{-4}$M	0,5 mM	$1{,}1.10^{-7}$M	
TMS3 s $MnCl_2$	99 mM Cho^+	$2{,}0.10^{-7}$M	$9{,}9.10^{-4}$M	0,5 mM	$1{,}1.10^{-7}$M	
Kontrola v KCl	99 mM K^+	$2{,}0.10^{-7}$M	-	<<<	$1{,}1.10^{-7}$M	
TMS3 v KCl	99 mM K^+	$2{,}0.10^{-7}$M	-	<<<	$1{,}1.10^{-7}$M	

Tab. 4.11: Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.11.

Desetkrát nižší výsledné koncentrace přidaného TMS3 oproti analogickým přídavkům TMS6 byla volena z důvodu silné interakce TMS3 se sondou DiS-C_3(3).

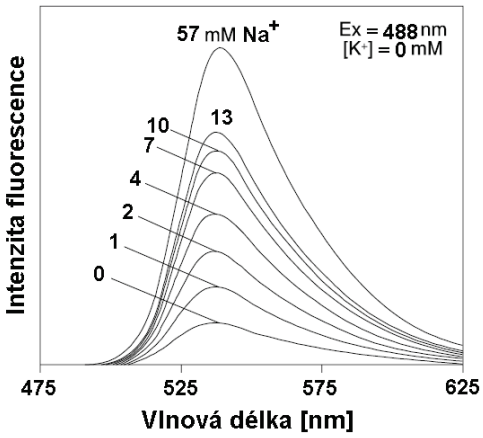
	165µM TMS3 v 30% TFE	**100% TFE**	**H2O**
Roztok TMS3	20 µl	-	180 µl
Kontrolní roztok TMS3	-	7 µl	193 µl

Tab. 4.12 : Složení roztoku TMS3 a kontrolního roztoku TMS3.

4.2 Výsledky experimentů se sondou Sodium Green

4.2.1 Idea experimentu

Sonda Sodium Green je citlivá na přítomnost sodíkových kationtů. Jako odpověď na zvyšující se koncentraci sodíkových kationtů zvyšuje svůj kvantový výtěžek [17]. Experiment byl koncipován tak, že sonda byla uzavřena do liposomů a v jejich okolí odmyta gelovou filtrací. Uvnitř liposomů byl pufr, který neobsahuje sodné kationty (cholinový resp. draselný). Vně liposomů naopak pufr se sodnou solí. Po permeabilizaci membrány pro sodíkové kationty, je očekáván nárůst kvantového výtěžku sondy. Při zvýšení koncentrace sodíku z 0 mM na 100 mM by sonda dle datového listu [17] měla zvýšit svou emisi na vln. délce 532 nm cca 5x.



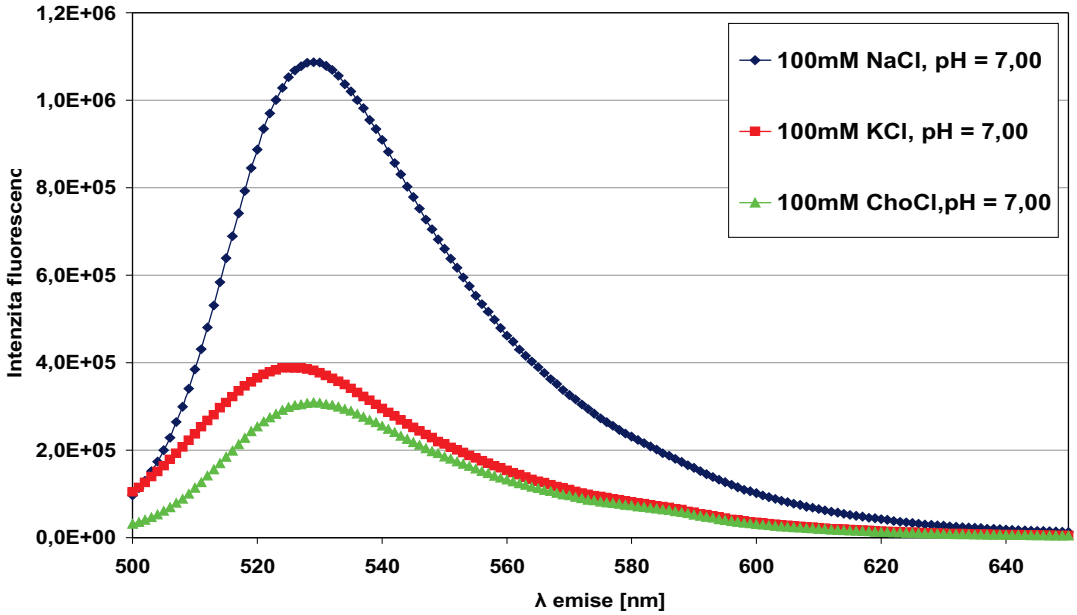
Obr. 4.12 : Reakce sondy Sodium Green na přítomnost sodíku dle katalogu[17]

4.2.2 Dosažené výsledky

Zjistili jsme, že tato sonda vykazuje silnou tendenci k adsorpci na stěny plastových kyvet a teflonových míchátek. V rozsahu běžně užívaných excitačních intenzit nebyla u této sondy pozorována tendence k fotodegradaci. Nevýhodou této sondy je také to, že je velmi málo citlivá při pH<6.

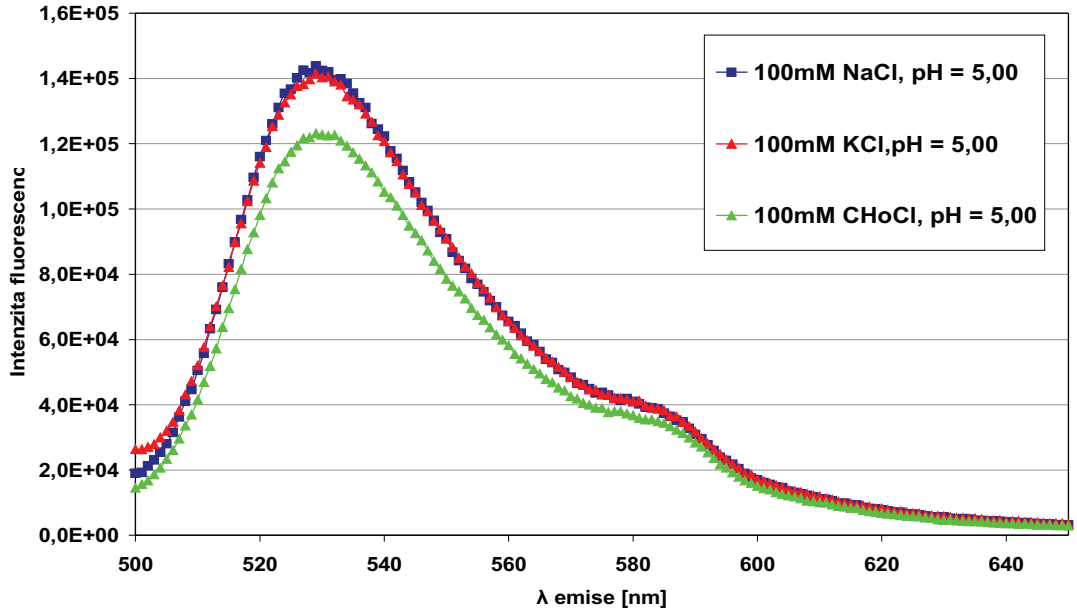
Informace o citlivosti a použitelnosti sond v katalogu výrobce jsou většinou udávány pro ideální případ, který je bohužel v rámci katalogu zpravidla blíže nespecifikován. Výrobci se hlavně zaměřují na design sond fungujících při fyziologickém pH, tedy kolem pH ≈ 7. Sondu jsme tedy nejprve testovali v pufru o pH = 7,00. První experimenty byly provedeny, bez liposomů pouze s volnou sondou v různých pufrech. V případě užití plastových kyvet, teflonových míchátek resp. plastových špiček nebyla v experimentu pozorována prakticky žádná odezva na změnu pufru, tedy skokovou změnu koncentrace sodíku. Sonda se patrně adsorbuje na všechny tyto předměty a nereaguje pak na přítomnost resp. nepřítomnost sodíku. Při použití skleněného materiálu místo plastového jsme docílili téměř „katalogové“ reakce na přítomnost sodíku (viz obr 4.13). Experimenty s volnou sondou SG pak byly prováděny za těchto podmínek. U sondy uzavřené v liposomech nepředpokládáme problém s výše zmíněnými artefakty. Vzhledem k citlivosti fotonásobiče jsme

v kalibračních měřeních (obr. 4.13 a 4.14) jako výslednou koncentraci volné sondy SG ve vzorku volili c = $1{,}0.10^{-8}$ M.



Obr. 4.13 : Reakce sondy SG na přítomnost různých kationtů při pH = 7,00.

V obrázcích 4.13 a 4.14 byla pro každou křivku zprůměrována data ze čtyř zvlášť připravených vzorků. Optimální pH (≈ 7) pro nejlepší odezvu sondy SG je pro naše experimenty poměrně nevhodné. Problém je v tom, že sonda není dostatečně citlivá při pH<6, což je pro naše účely nevyhovující zejména s ohledem na to, že u oligopeptidů TMS3 a TMS6 byla zjištěna transportní aktivita při pH ≈ 5, ale při pH ≈ 7 na oboustranách lipidové membrány transportní aktivita pozorována nebyla [1]. Při testech volné sondy v pufru při pH = 5,00 je i za jiných kontrolovaných okolností (křemenné kyvety, Hamiltonky atd.) citlivost na sodík velmi nízká (viz obr. 4.14).

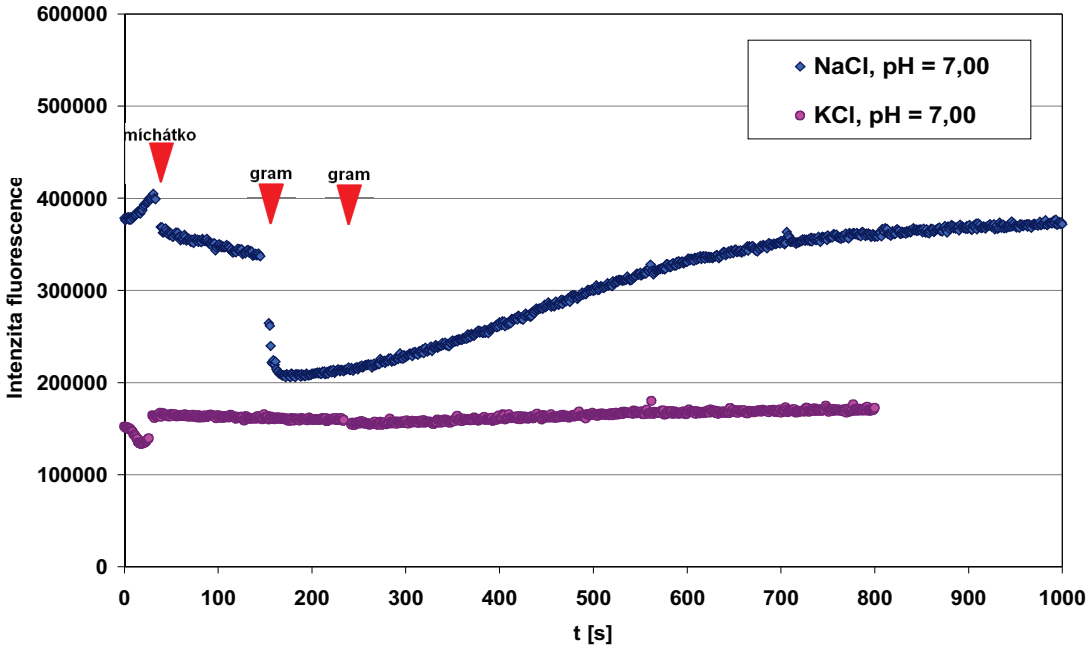


Obr. 4.14 : Reakce sondy SG na přítomnost různých kationtů při pH = 5,00.

Jak lze pozorovat na obrázku 4.14 sonda při nízkém pH ≈ 5 vykazuje prakticky stejnou odpověď na sodný pufr jako na pufr draselný.

Na volné sondě v sodném pufru o pH = 7,00 bylo ukázáno, že sonda v rámci námi užívaných koncentrací neinteraguje s valinomycinem ani s nigericinem. S gramicidinem interaguje tak, že je jím částečně zhášena její fluorescence. Sonda Sodium Green interaguje i s oligopeptidy TMS3 a TMS6-OH. Interakcí s oligopeptidy naopak její emise vzroste (data neuvedena).

Pro měření se sondou Sodium Green byly vždy připraveny liposomy, které obsahovaly vnitřní pufr (4), tedy draselný pufr o pH = 7,00. Koncentrace sondy SG uvnitř liposomů byla nastavena na $1{,}0.10^{-4}$M jakožto koncentrace sondy v roztoku lipidových membrán před extruzí (viz příloha A). Výsledné množství lipidů v připravené zásobní suspenzi liposomů bylo 10 mg/ml. Sonda vně liposomů byla odmyta pomocí gelové filtrace. Byly zvoleny dva počty průchodů suspenze připraveným filtračním sloupcem, 4 průchody resp.8 průchodů. Pro přípravu, kdy byla suspenze ponechána 4x projít připraveným sloupcem je níže uveden experiment s přidáním gramicidinu k systému liposomů v sodném resp. draselném pufru (4.15)

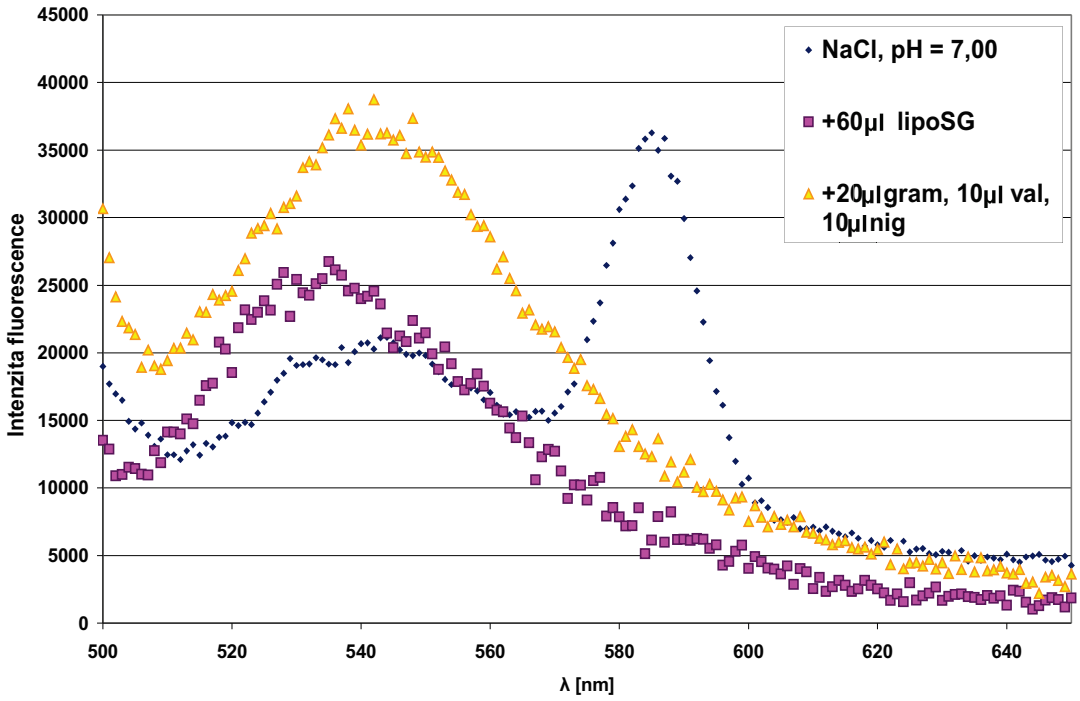


Obr. 4.15 : Reakce sondy SG na přítomnost sodíku resp. draslíku po přidání gramicidinu k systému liposomů, pH = 7,00.

Legenda	Okolní pufr	Liposomy SG (4)	Gramicidin
NaCl, pH=7,00	3 ml (2)	40 µl	30 µl $1{,}06.10^{-5}$M
KCl, pH=7,00	3 ml (4)	40 µl	30 µl $1{,}06.10^{-5}$M
Legenda	**Okolní pufr**	**K^+ z okolí lipo.**	**Gramicidin**
NaCl, pH=7,00	98 mM Na^+	1,3 mM	$1{,}0.10^{-7}$M
KCl, pH=7,00	99 mM K^+	<<<	$1{,}0.10^{-7}$M

Tab. 4.13 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.15.

Při experimentu v sodném pufru na obrázku 4.15 byla ještě před vlastním měřením do kyvety přidána suspenze liposomů. Dále bylo do kyvety nejprve přidáno míchátko s ohledem na to, že sonda uzavřená v liposomech by s míchátkem neměla nikterak interagovat. Po přidání míchátka však následuje pokles emisní intenzity, což se dá zdůvodnit pouze adsorpcí neodmyté sondy vně liposomů na míchátko, což je první indicie nedokonalého odmytí vnější sondy. Po přidání gramicidinu k systému následuje okamžitý výrazný pokles v intenzitě fluorescence a pomalý opětovný vzrůst až na hodnotu vyšší, než byla hodnota intenzity fluorescence po přidání míchátka. Toto lze interpretovat tak, že gramicidin nejprve zháší neodmytou sondu vně liposomů, následně se integruje do membrány a sondu dále nezháší. Gramicidin integrovaný do membrány pak vyrovnává koncentraci sodíku a draslíku vně a uvnitř liposomů. Koncentrace sodíku je teoreticky na obou stránách membrány nastavena na jeho původní vnější koncentraci, zatímco koncentrace draslíku oboustranně efektivně klesne na velmi malou hodnotu. To by mělo vést k zesílení emise sondy uzavřené uvnitř liposomů, což by vysvětlovalo to, proč se intenzita fluorescence po přidání gramicidinu vrátí výše než byla úroveň intenzity fluorescence po přidání míchátka. Ze všech těchto interpretací však plyne, že sonda nebyla dostatečně odmyta z vnějšího prostředí liposomů, což dokládá také druhá křivka na obr. 4.15, kde jsou vynesena data naměřená v draselném pufru. Kdyby byla sonda z vnějšího prostředí liposomů dokonale odmyta, měla by intenzita emise na začátku experimentu (pro stejné přidané množství liposomů stejné přípravy) být nezávislá na vnějším pufru. Pro sodný vnější pufr je ale výrazně větší než pro pufr draselný, poměr je dokonce srovnatelný s poměrem příslušných maxim na obr. 4.13, tedy dat měřených na volné sondě pouze v pufrech. Toto ukazuje, že sonda je po 4 průchodech sloupcem stále ve větším množství vně liposomů než uvnitř.



Obr. 4.16 : Reakce sondy SG na přítomnost sodíku resp. draslíku, pH=7,00, systém liposomů.

Okolní pufr	Liposomy SG (4)	Gramicidin	Valinomycin	Nigericin
3 ml (2)	60 µl	20 µl 1,06.10^{-5}M	10 µl 1.10^{-4}M	10 µl 1.10^{-4}M
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**	**Gramicidin**	**Valinomycin**	**Nigericin**
97 mM Na^+	1,9 mM	6,8.10^{-8}M	3,2.10^{-7}M	3,2.10^{-7}M

Tab. 4.14 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.16.

Pro 8 průchodů sloupcem nebylo využito měření časové, ale porovnání průměrovaných spekter (obr.4.16), kdy bylo důsledně odečítáno spektrum pozadí. Tento přístup byl nutný s ohledem na to, že vzorek po osminásobné filtraci vykazoval poměrně nízkou intenzitu fluorescence. Všechna data obrázku 4.16 jsou aritmetickými průměry dvou měření. Jako vnější byl použit sodný pufr. Nejprve je vyneseno naměřené pozadí, tedy spektrum čistého pufru, které bylo od ostatních dat odečítáno. Spektrum pozadí je zobrazeno, aby mohlo být srovnáno s intenzitou signálu od samotné sondy. Dále je vynesen signál sondy po přidání liposomů do kyvety. V grafu je dále vyneseno spektrum sondy po té, co byla membrány zprůchodněna pro sodné resp. draselné kationty (gramicidinem, valinomycinem, nigericinem). Můžeme pozorovat znatelný vzrůst intenzity ve spektru takovéhoto systému.

Míra odmytí vnější sondy u osminásobné filtrace není na základě provedených experimentů diskutována. Po osmi filtracích vykazuje systém i při užití poměrně velkého množství takto připravené suspenze liposomů pouze malou odezvu. Příspěvek emise samotné sondy na zaznamenávané intenzitě je již na stejné úrovni jako intenzita pozadí. Větší množství filtrací při nastavených výchozích koncentracích tedy nemá smysl. Navíc nelze jít směrem zvýšení počáteční koncentrace lipidů resp. sondy při přípravě liposomů. Příprava liposomů o vyšší koncentraci lipidů než 10 mg/ml je pro metodu extruze poměrně problematická. Znatelným zvýšením koncentrace sondy při přípravě liposomů by se zase finanční náklady na jeden experiment staly příliš vysokými.

4.3 Výsledky experimentů se sondou HPTS

4.3.1 Idea experimentu

Fluorescenční sonda HPTS mění své excitační spektrum v závislosti na pH ve svém okolí. Intenzita v absorbčním spektru při $\lambda = 405$ nm se v závislosti na pH příliš nemění. Oproti tomu intenzita v excitačním spektru při $\lambda = 455$ nm pro klesající pH padá téměř k nule. Poměr těchto dvou intenzit v excitačním spektru je dále značen jako I405/I455. Tento poměr je v závislosti na čase primárně využíván jako zdroj informace o pH v okolí sondy. Prostřednictvím kalibrace je měřený poměr obvykle převeden na odpovídající hodnotu pH. Na systému liposomů se sondou HPTS však nebyla zatím naměřena odpovídající kalibrace (viz závěr této podkapitoly) a výsledná data jsou na obrázcích vynesena jako poměr intenzit fluorescence – I_{405}/I_{455}. Hodnoty vertikální osy tak mají zatím pouze kvalitativní význam.

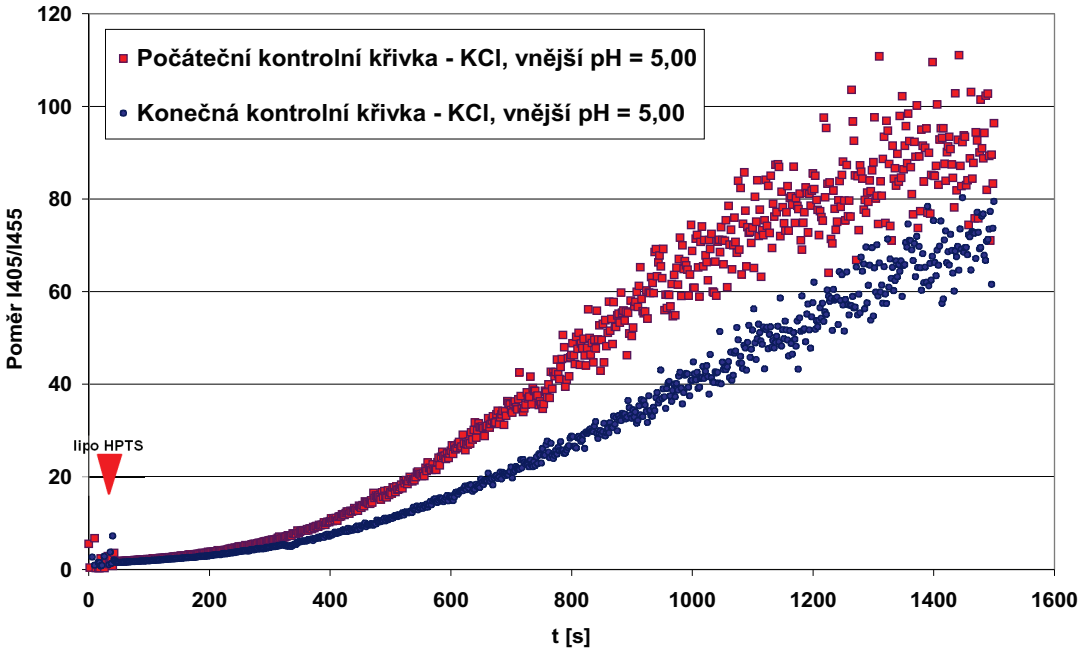
Cílem experimentů se sondou HPTS je měřit propustnost membrány pro protony způsobenou přidáním různých ionoforů resp. oligopeptidů. Sonda je uzavřena v liposomech spolu s pufrem o jistém pH, v okolí liposomu, kde je pufr obecně jiného pH, je sonda odmyta. Výsledky s přidanými ionofory resp. oligopeptidy jsou vynášeny proti křivkám spontánního vyrovnávání pH gradientu resp. kontrolám s rozpouštědlem přidané látky.

4.3.2 Dosažené výsledky

U sondy HPTS jsme nepozorovali zvýšenou tendenci k adsorpci na stěny kyvet ani na povrch míchátek. Měření byla prováděna s plastovými kyvetami, plastovými špičkami pipet a bez míchátek.

Pro měření se sondou HPTS byly vždy připraveny liposomy, které obsahovaly vnitřní pufr (4), tedy draselný pufr o pH = 7,00. Koncentrace sondy HPTS uvnitř liposomů byla nastavena na $1{,}0.10^{-2}$M jakožto koncentrace sondy v roztoku lipidových membrán před extruzí (viz příloha A). Výsledné množství lipidů v připravené zásobní suspenzi liposomů bylo 10 mg/ml. Sonda vně liposomů byla odmyta pomocí gelové filtrace na připravených sloupcích. Vzorek byl vždy filtrován 8x.

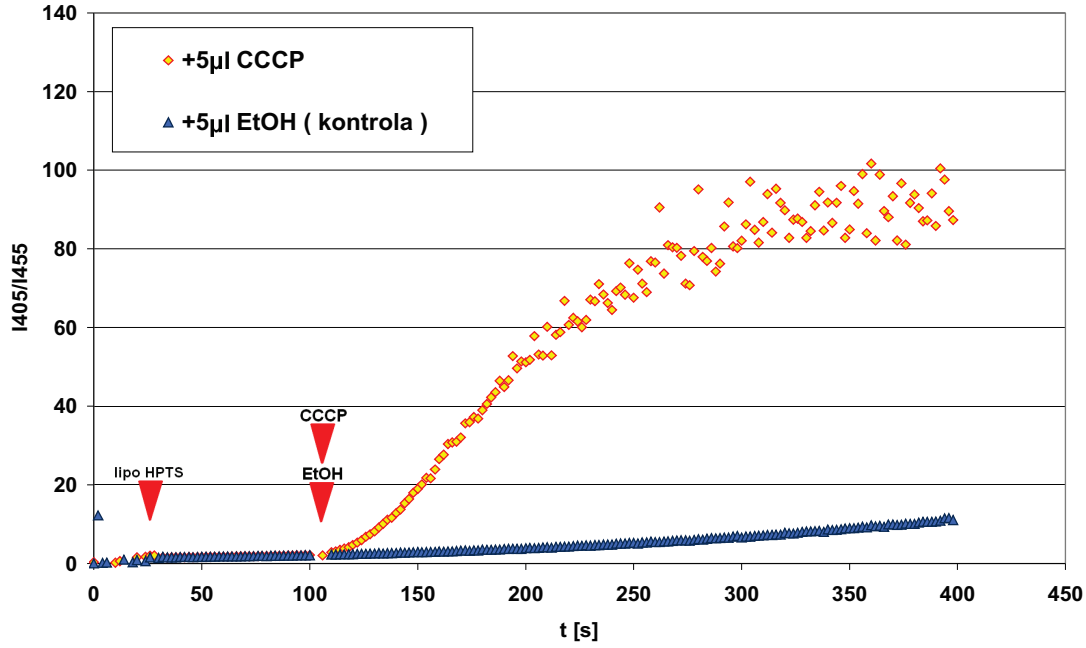
Na obr. 4.19 jsou křivky dvou naměřených kontrol, kdy byly liposomy přidány do draselného pufru o pH = 5,00. Tento experiment byl proveden okamžitě po odmytí okolní sondy od liposomů a pak po cca 10 hodinách, jako konečné měření s připraveným vzorkem. Je pozoruhodné, že mírně lépe drží pH-gradient liposomy po delším časovém odstupu od ukončení jejich přípravy. Tento rozdíl v přirozené propustnosti membrán liposomů v závislosti na době uplynulé od jejich přípravy však dále řešen není, jelikož v experimentech s HPTS uvedených níže jsou jako reference uvedeny kontrolní křivky, které byly naměřeny ihned po příslušném experimentu.



Obr. 4.17 : Odpověď HPTS na spontánní pokles pH uvnitř právě zfiltrovaných liposomů resp. táž závislost po 10 hodinách.

Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)
Počáteční kontrolní křivka – KCl, vnější pH = 5,00	3 ml (3)	20 µl
Konečná kontrolní křivka – KCl, vnější pH = 5,00	3 ml (3)	20 µl

Tab. 4.15 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.17.



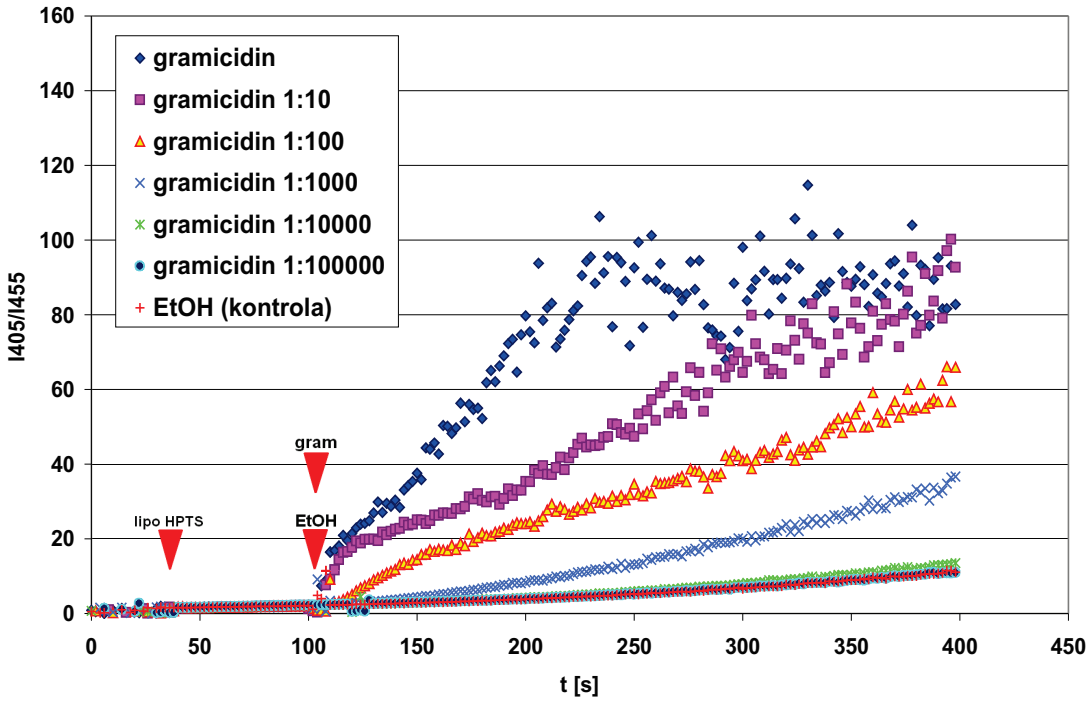
Obr. 4.18 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů pro vodíkové kationty protonoforem CCCP.

Na obrázku 4.18 je společně s kontrolou uveden experiment, kdy k systému liposomů v draselném pufru o pH = 5,00 byl přidán protonofor CCCP. Tento protonofor umožní protonům procházet membránou liposomů a pH-gradient je tak velmi rychle „zkratován“.

Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)	CCCP	EtOH
+5 µl CCCP	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1.10^{-3}M	-
+5 µl EtOH	3 ml (3)	20 µl	-	5 µl
Legenda	**Okolní pufr**	**K^+ z okolí lipo.**	**CCCP**	**EtOH**
+5 µl CCCP	100 mM K^+	<<<	$1,7.10^{-6}$M	N
+5 µl EtOH	100 mM K^+	<<<	-	N

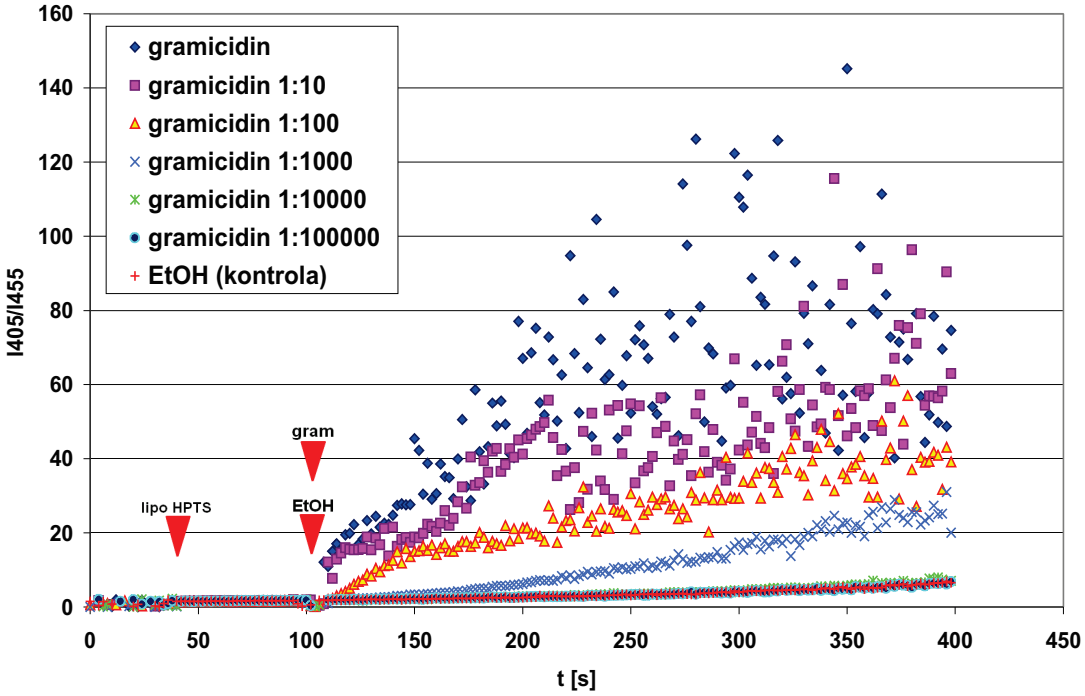
Tab. 4.16 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.18.

V následujícím experimentu, analogickém tomu s protonoforem CCCP, byl k systému přidán gramicidin, který učinil membránu obecně propustnou pro malé monovalentní kationty, tedy i protony. Odezva systému byla sledována pro 6 různých koncentrací přidaného gramicidinu (obr. 4.19). Byl pozorován podobný efekt jako po přidání CCCP na obr. 4.18. Křivky vývoje po přidání gramicidinu mají však, subjektivně řečeno, poněkud odlišný tvar. Je možné, že tento rozdíl souvisí s rozdílnou interakcí gramicidinu s membránou, než má protonofor CCCP. Gramicidin se do ní integruje, zatímco CCCP je procházejícím ionoforem. Lze také uvažovat o tom, že odlišný tvar křivek souvisí se stechiometrí gramicidinových kanálů, tedy s tím že funkční gramicidinový kanál je dimer [24].



Obr. 4.19 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů gramicidinovými kanály.

Na obr. 4.20 je uveden výsledek stejného experimentu jako na obr. 4.19, ale měřeného na liposomech jiné přípravy. Výsledek je předložen jako ukázka poměrně dobré reprodukovatelnosti tohoto experimentu.

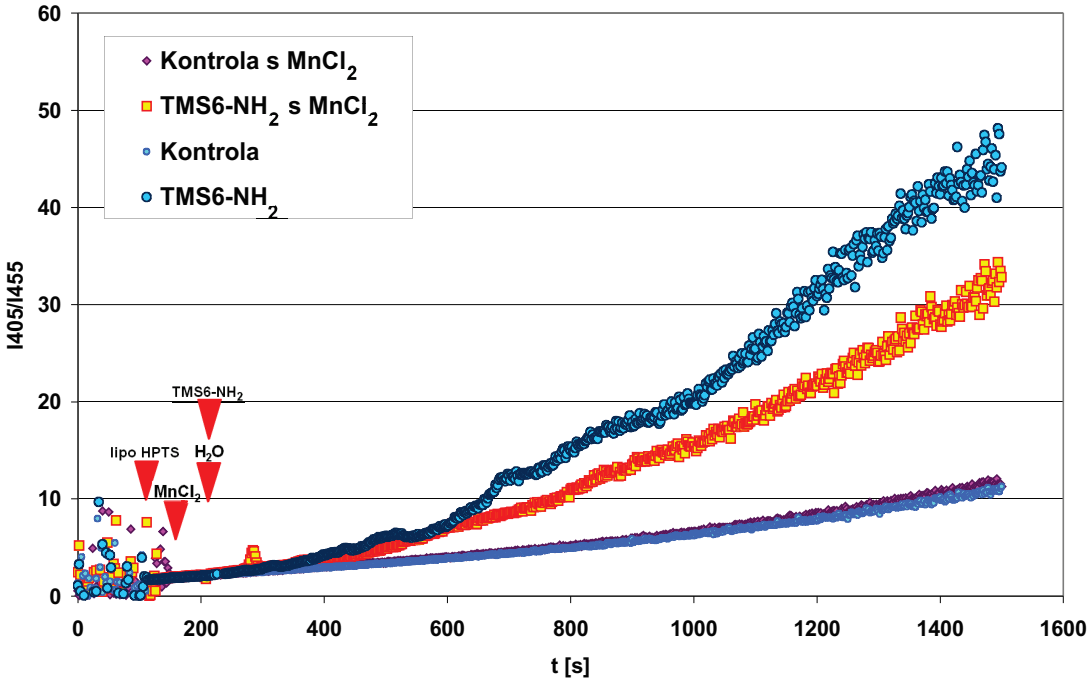


Obr. 4.20 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů gramicidinovými kanály (jiná příprava - horší signál/šum).

Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)	Gramicidin	EtOH
Gramicidin	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-5}M	-
Gramicidin 1:10	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-6}M	-
Gramicidin 1:100	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-7}M	-
Gramicidin 1:1000	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-8}M	-
Gramicidin 1:10000	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-9}M	-
Gramicidin 1:100000	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1,06.10^{-10}M	-
EtOH (kontrola)	3 ml (3)	20 µl	-	5 µl
Legenda	**Okolní pufr**	**K^+ z okolí lipo.**	**Gramicidin**	**EtOH**
Gramicidin	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-8}M	-
Gramicidin 1:10	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-9}M	-
Gramicidin 1:100	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-10}M	-
Gramicidin 1:1000	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-11}M	-
Gramicidin 1:10000	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-12}M	-
Gramicidin 1:100000	100 mM K^+	<<<	1,8.10^{-13}M	-
EtOH (kontrola)	100 mM K^+	<<<	-	N

Tab. 4.17 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.19 a 4.20.

Na obr. 4.21 jsou uvedeny experimenty s oligopeptidem TMS6-NH_2. Data všech čtyř uvedených křivek byla měřena ihned po sobě a to z jedné přípravy liposomů. Je vidět, že oligopeptid TMS6-NH_2 je patrně schopen tvořit kanály propustné pro protony. Oproti kontrolám je zde zcela markantní odstup (měření v přítomnosti Mn^{2+} i bez něj). Kontrolní křivky leží v těsné blízkosti. Křivky s TMS6-NH_2 se ale liší v závislosti na přítomnosti resp. absenci Mn^{2+}. Je pozoruhodné, že dle obr. 4.24 mají kanály tvořené TMS6-NH_2 v přítomnosti Mn^{2+} menší schopnost tvořit kanály než při jeho absenci. Je třeba si uvědomit, že měříme pouze informaci o průměrné hodnotě (průměr přes všechny liposomy). Jako důvod pozorované skutečnosti lze spíše předložit to, že v přítomnosti Mn^{2+} patrně vznikají kanály tvořené TMS6-NH_2 s menší pravděpodobností [31]. Rozdíl samotných vodivostí jednotlivých kanálů tvořených oligopeptidem TMS6-NH_2 změřen nebyl, u kanálů tvořených TMS6-OH však není rozdíl změřených vodivostí signifikantní [31].

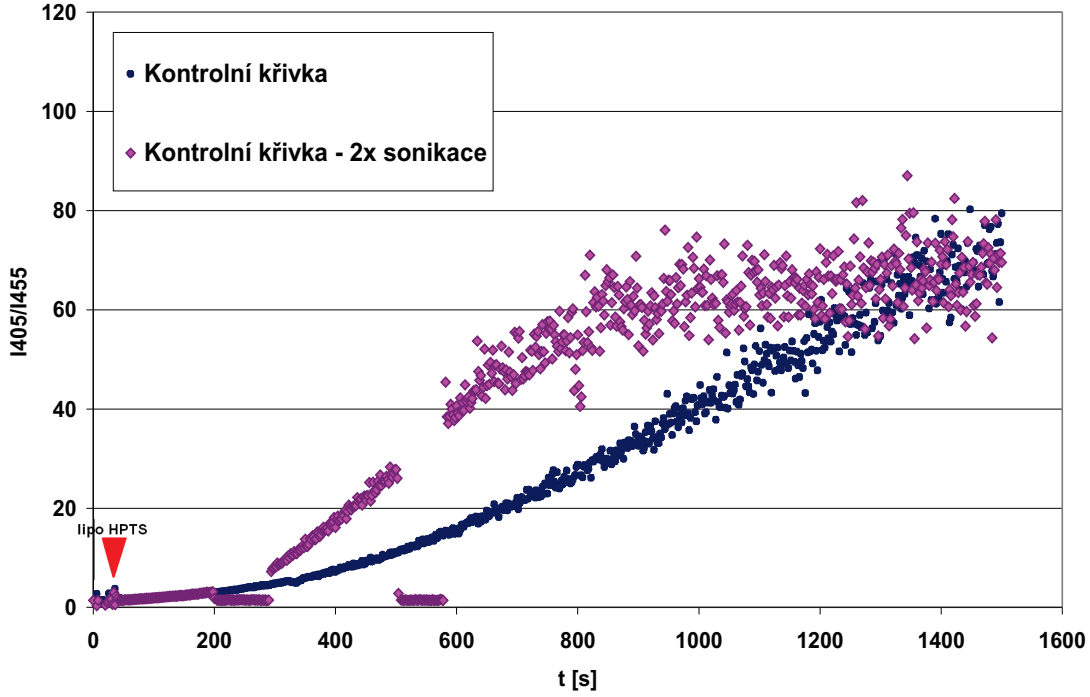


Obr. 4.21 : Rychlejší pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů kanály tvořenými TM6-NH_2.

Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)	$MnCl_2$	TMS6-NH_2
Kontrola s $MnCl_2$	3 ml (3)	20 µl	3 µl 1,0M	-
TMS6-NH_2 s $MnCl_2$	3 ml (3)	20 µl	3 µl 1,0M	40 µl 1,65.10^{-4}M
Kontrola	3 ml (3)	20 µl	-	-
TMS6-NH_2	3 ml (3)	20 µl	-	40 µl 1,65.10^{-4}M
Legenda	**Okolní pufr**	**K^+ z okolí lipo.**	**$MnCl_2$**	**TMS6-NH_2**
Kontrola s $MnCl_2$	99 mM K^+	<<<	9,8.10^{-4}M	-
TMS6-NH_2 s $MnCl_2$	99 mM K^+	<<<	9,8.10^{-4}M	2.2. 10^{-6}M
Kontrola	99 mM K^+	<<<	-	-
TMS6-NH_2	99 mM K^+	<<<	-	2.2. 10^{-6}M

Tab. 4.18 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.24.

Jako zajímavost je na obr. 4.22 uveden experiment, kde byly liposomy přidány do draselného pufru o pH = 5,00 a v průběhu vyrovnávání pH byly dvakrát vystaveny výkonné sonikaci. Naměřená data jsou porovnávána s kontrolní křivkou. Oproti kontrolní křivce je pro sonikovaný systém liposomů vidět větší rychlost poklesu pH gradientu. Je vidět, že sonikace tento systém může destabilizovat resp. permeabilizovat.

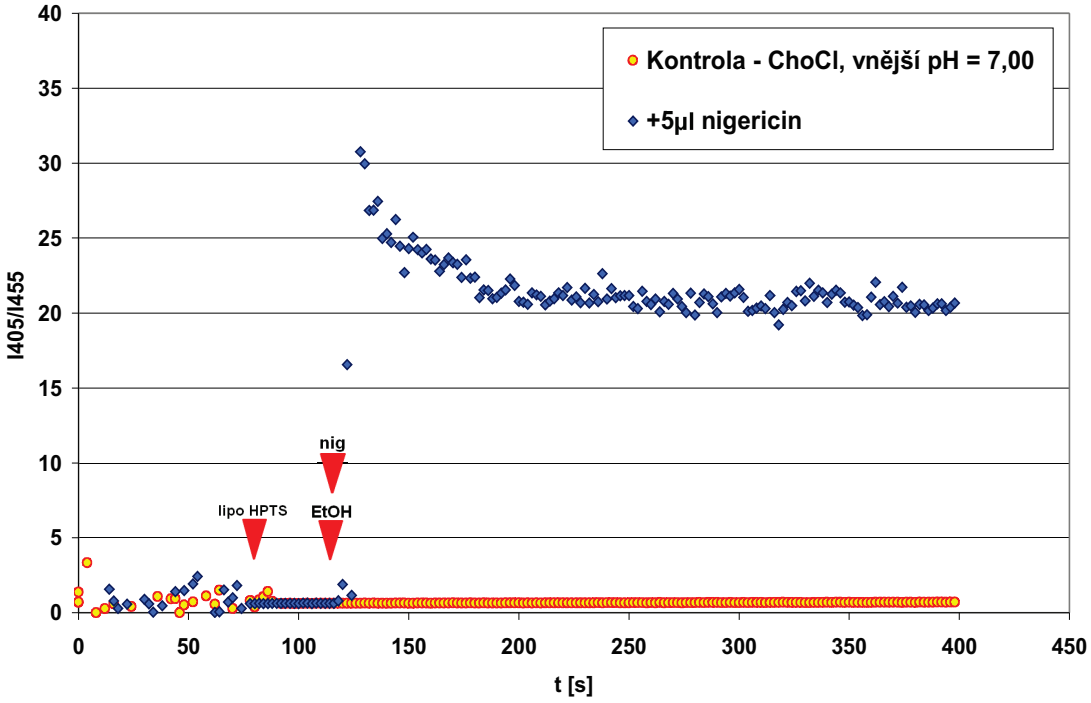


Obr. 4.22 : Rychlejší pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů výkonnou sonikací.

Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)
Kontrolní křivka	3 ml (3)	20 µl
Kontrolní křivka – 2x sonikace	3 ml (3)	20 µl

Tab. 4.19 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.22.

Dále je vyneseno měření (obr. 4.23), kdy je jako protiklad oproti předcházejícím experimentům dosaženo naopak nabudování pH gradientu. Liposomy byly přidány do cholinového pufru o pH = 7,00. Na počátku experimentu tedy na membráně nebyl pH-gradient. Přidáním nigericinu, který může přenášet K^+ i H^+ je pH-gradient nabudován. Draslíky mohou téci z liposomů ven, což je kompenzováno vtokem protonů do liposomů, pH uvnitř liposomů očekávaně klesne. V tomto případě se nigericin chová jako antiporter.

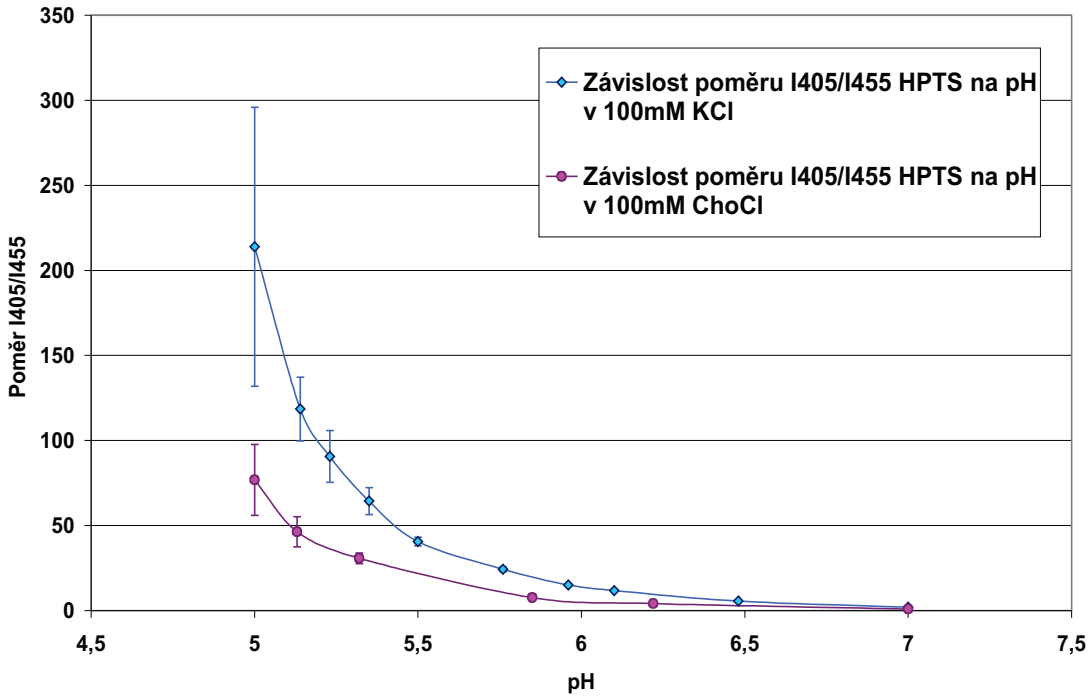


Obr. 4.23 : Pokles pH uvnitř liposomů vlivem přidaného nigericinu (antiport K^+/H^+).

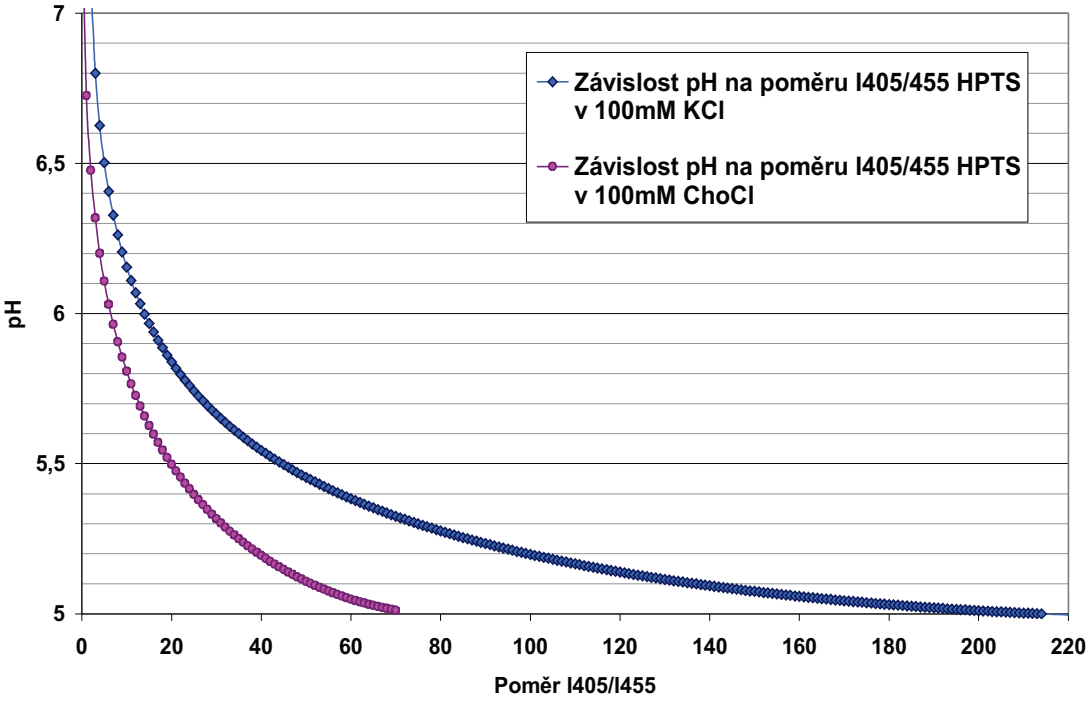
Legenda	Okolní pufr	Liposomy HPTS (4)	Nigericin	EtOH
Kontrola – ChoCl, vnější pH = 7,00	3 ml (3)	20 µl	-	5 µl
+5 µl nigericin	3 ml (3)	20 µl	5 µl 1.10^{-4}M	-
Legenda	**Okolní pufr**	**K^+ z okolí lipo.**	**Nigericin**	**EtOH**
Kontrola – ChoCl, vnější pH = 7,00	99 mM Cho^+	0,7 mM	-	N
+5 µl nigericin	99 mM Cho^+	0,7 mM	$1,7.10^{-7}$M	-

Tab. 4.20 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentu vyneseném na obr. 4.23.

Odezva sondy na různá pH byla kalibrována pouze na roztocích volné sondy v pufru o daném pH. Tato kalibrace byla provedena pro draselný pufr a pro pufr cholinový (obr. 4.24). Číselná data z této kalibrace jsou uvedena jako příloha B. Poměr pro každé pH byl stanoven 50x, uvedená chyba je směrodatná odchylka, tedy odmocnina z rozptylu naměřených hodnot. Závislost koncentrace H^+ na naměřeném poměru byla proložena polynomem třetího stupně pro oba pufry. Polynom nižšího stupně neinterpoloval křivku dostatečně přesně zatímco polynomy vyššího stupně již vykazovaly nežádoucí zákmity. Kalibrační křivka daná tímto polynomem opět převedená na jednotky pH je uvedena na obr. 4.25.



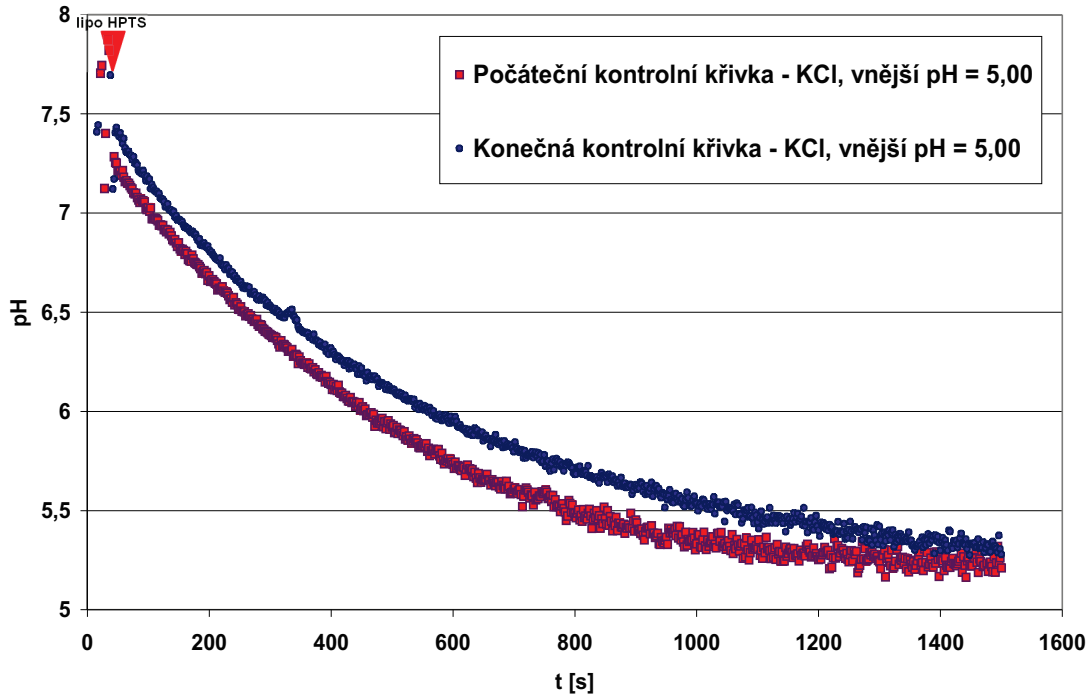
Obr. 4.24 : Naměřená kalibrační data pro sondu HPTS, 100mM KCl resp. 100mM ChoCl (proloženo pouze hladkou křivkou).



Obr. 4.25 : Inverzní kalibrační křivka sondy HPTS (vypočteno z interpolační funkce naměřených dat na obr 4.24)

Prostřednictvím vypočteného vztahu je pak kalibrována vertikální osa obrázku 4.26, na kterém jsou vynesena identická data jako na obrázku 4.17. Prozkoumáním obrázku 4.26 lze pozorovat, že kalibrace prostřednictvím volné sondy v pufru není korektní

pro systém liposomů. Na počátku experimentu sonda prostřednictvím kalibrace signalizuje stav, kdy v jejím okolí, tedy uvnitř liposomů, je pH ≈ 7,3 . Pro stav o tomto pH kdekoliv ve sledovaném systému není důvod. Po delším čase, odezva sondy úplně neodpovídá očekávanému poklesu pH uvnitř liposomů na pH = 5,00.



Obr. 4.26 : Spontánní pokles pH uvnitř čerstvě zfiltrovaných liposomů resp. táž závislost po 10 hodinách.

V první fázi experimentů se sondou HPTS bylo zjišťováno, zda efekt na propustnost membrány vlivem námi studovaných oligopeptidů lze vůbec touto sondou pozorovat. Výsledky tak byly ryze kvalitativního charakteru. Závěrem měření dat pro diplomovou práci byla naměřena orientační kalibrace volné sondy HPTS v pufrech daného pH.

Odpovídající by samozřejmě bylo provést kalibraci přímo na systému liposomů. Ta doposud provedena nebyla vlivem toho, že takové měření není možné zcela korigovat na pozadí (včetně rozptylu na liposomech). Pro měření se sondou HPTS totiž nebyly zvoleny zcela optimální podmínky akvizice dat, v důsledku čehož byla potencionální korekce na pozadí s liposomy pro kalibraci nutná (viz kapitola diskuse).

V příloze C jsou uvedeny některé obrázky z této podkapitoly (4.17 až 4.23), kde byla vertikální osa převedena na jednotky pH dle provedené ilustrační kalibrace (kalibrace sondy volně v pufrech o daném pH). Obrázky jsou číslovány analogicky svým předlohám.

4.4 Výsledky experimentů se sondou PBFI

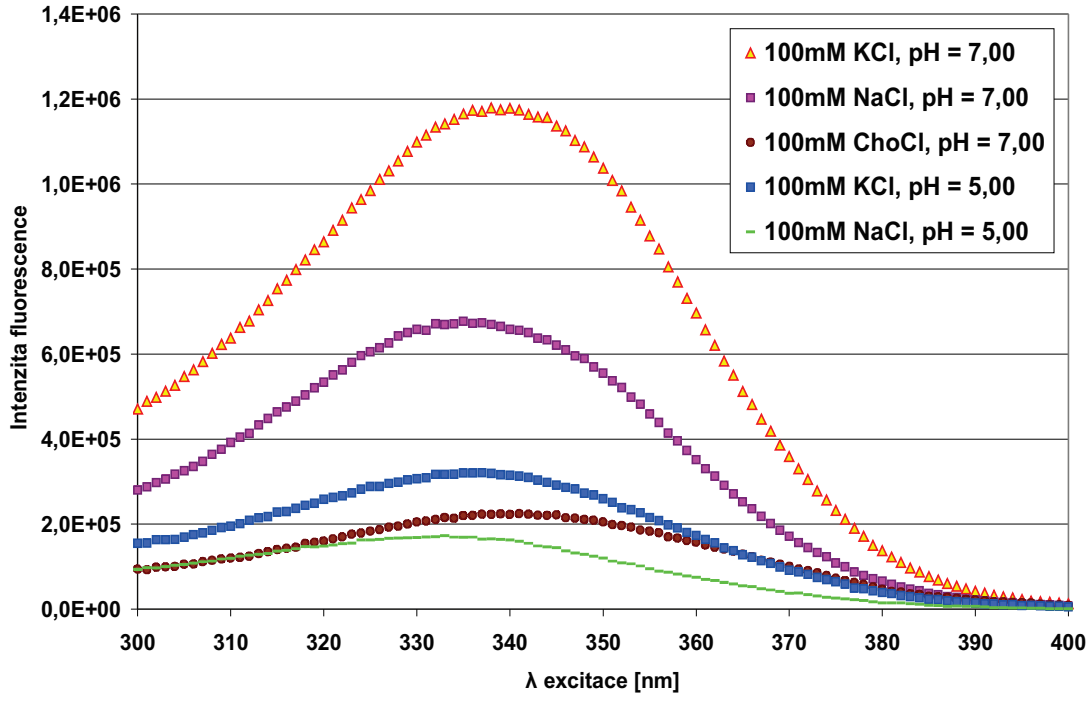
4.4.1 Idea experimentu

Fluorescenční sonda PBFI je citlivá na přítomnost draslíkových kationtů. Při interakci s nimi zvyšuje svůj kvantový výtěžek (excitace v rozmezí vlnových délek $\lambda = 300$ nm až $\lambda = 400$ nm). Idea experimentu je podobná jako u sondy Sodium Green jen s počáteční inverzní pozicí pufrů, tedy KCl uvnitř liposomů a NaCl resp. ChoCl vně liposomů. Přidáním různých látek, např. různých ionoforů, učiníme membránu propustnou pro různé malé ionty. Změny jejich koncentrací uvnitř liposomů by pomocí sondy PBFI měly být pozorovatelné.

4.4.2 Dosažené výsledky

U této sondy nebyla zjištěna zvýšená tendence k adsorpci na stěny kyvet ani na povrch míchátek. Nevýhodou této sondy je však nižší (ve srovnání se Sodium Green) citlivost při pH = 7,00. Na rozdíl od sondy SG však sonda PBFI při pH = 5,00 vykazuje mnohem vyšší poměr intenzit příslušných hodnot excitačního spektra při výskytu K^+ resp. Na^+ v okolí. Problémem však je obecně nižší intenzita fluorescence sondy PBFI při tomto nízkém pH (viz obr.4.27).

Při měření se sondou PBFI byly užívány plastové kyvety a plastové špičky pipet. Míchátka používána nebyla. Namísto měření v závislosti na čase byla odezva sondy zaznamenávána měřením sérií jejích excitačních spekter. Emise sondy byla měřena na konstantní vlnové délce $\lambda = 505$ nm

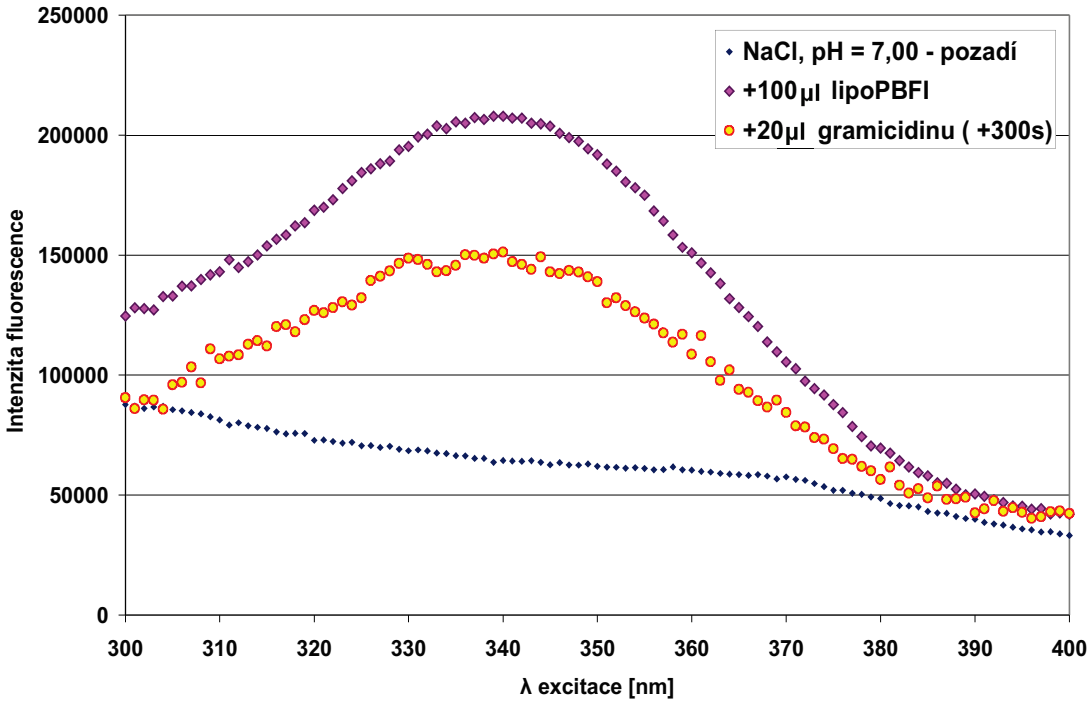


Obr. 4.27 : Kalibrace - změna excitačního spektra sondy PBFI v závislosti na přítomnosti různých kationtů pro dvě hodnoty pH.

Na obrázku 4.27 jsou vynesena naměřená kalibrační data pro sondu PBFI. Sonda byla rozpuštěna volně v různých pufrech, pozadí bylo všude odečteno. Koncentrace sondy byla pokaždé c = $3{,}3.10^{-8}$ M.

Pro měření se sondou PBFI byly vždy připraveny liposomy, které obsahovaly vnitřní pufr (4), tedy draselný pufr o pH = 7,00. Koncentrace sondy PBFI uvnitř liposomů byla nastavena na $1{,}0.10^{-4}$M jakožto koncentrace sondy v roztoku lipidových membrán před extruzí (viz příloha A). Výsledné množství lipidů v připravené zásobní suspenzi liposomů bylo 10 mg/ml. Sonda vně liposomů byla odmyta pomocí gelové filtrace. Vzorek byl vždy filtrován 8x.

Experiment, kdy přidání gramicidinu učinilo membránu propustnou pro malé monovalentní kationty je zobrazen na obrázku 4.28. Teoreticky se tak mohou na membráně liposomů měnit draselné kationty za kationty sodné. Při dostatečně vysoké rychlosti takovéto výměny poklesne koncentrace draselných kationtů uvnitř liposomů na koncentraci jejich okolí, tedy na velmi nízkou hodnotu. Koncentrace sodných kationtů uvnitř liposomů podstatně vzroste. Sonda PBFI na výměnu těchto iontů ve svém okolí reaguje poklesem kvantového výtěžku, což se projeví jako snížení intenzity v námi měřeném excitačním spektru. Tento výsledek ukazuje, že gramicidin přenáší ionty s poměrně velkou vodivostí. Nicméně v tomto experimentu byl gramicidin použit v řádově větší výsledné koncentraci než v experimentech se sondou DiS-C_3(3).



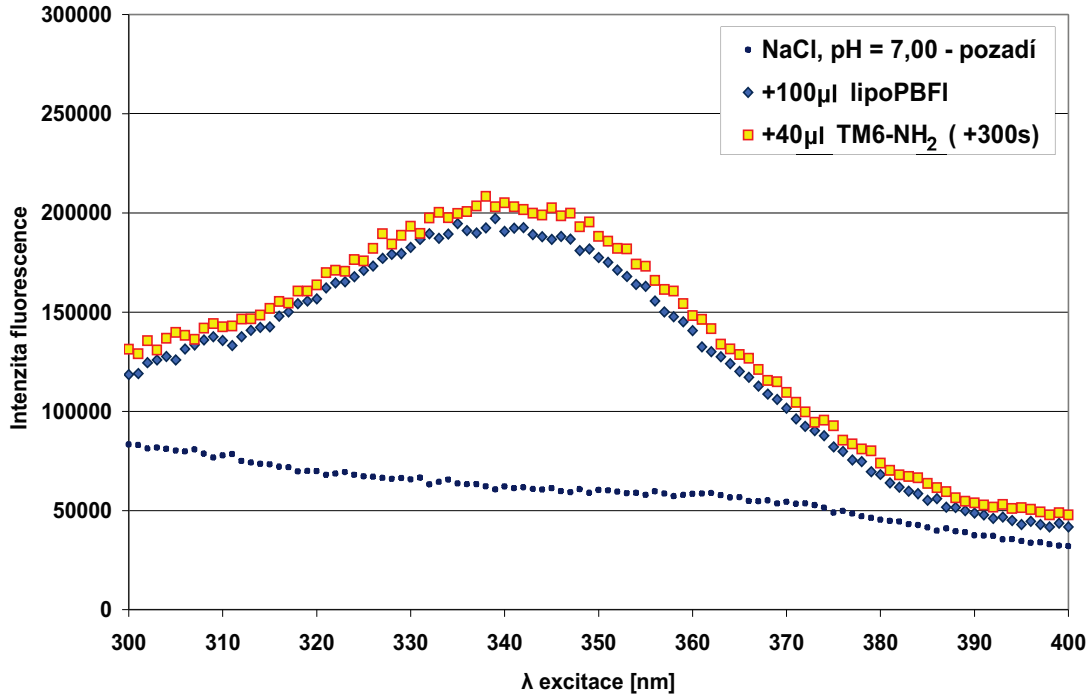
Obr. 4.28 : Obecný pokles v excitačním spektru sondy PBFI jako reakce na výměnu K^+ za Na^+ v jejím okolí, gramicidin, pH = 7,00.

Okolní pufr	Liposomy PBFI (4)	Gramicidin
3 ml (2)	100 µl	20 µl 1,06.10^{-5}M
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**	**Gramicidin**
96 mM Na^+	3,2 mM	6,8.10^{-8}M

Tab. 4.21 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.28.

Analogický experiment tomu s gramicidinem (obr. 4.28) byl také proveden s oligopeptidem TMS6-NH_2 (obr. 4 29). Bylo ponecháno identické pH a další podmínky, pouze místo gramicidinu byl užit TMS6-NH_2. Výsledek experimentu je dle očekávání na základě výsledků práce [1] negativní. Výsledné spektrum (po přidání TMS6-NH_2) leží v celém rozsahu dokonce mírně nad spektrem pufru se samotnými liposomy. To lze vysvětlit možnou tvorbou mikroskopických bublinek a rozptylem na nich. Tyto bublinky se po delším čase v kyvetě skutečně tvoří a při takto nízkých výstupních intenzitách signálu je jejich vliv patrný. Tento efekt byl pozorován i v jiných experimentech podobného typu (zde nejsou uvedeny).

.

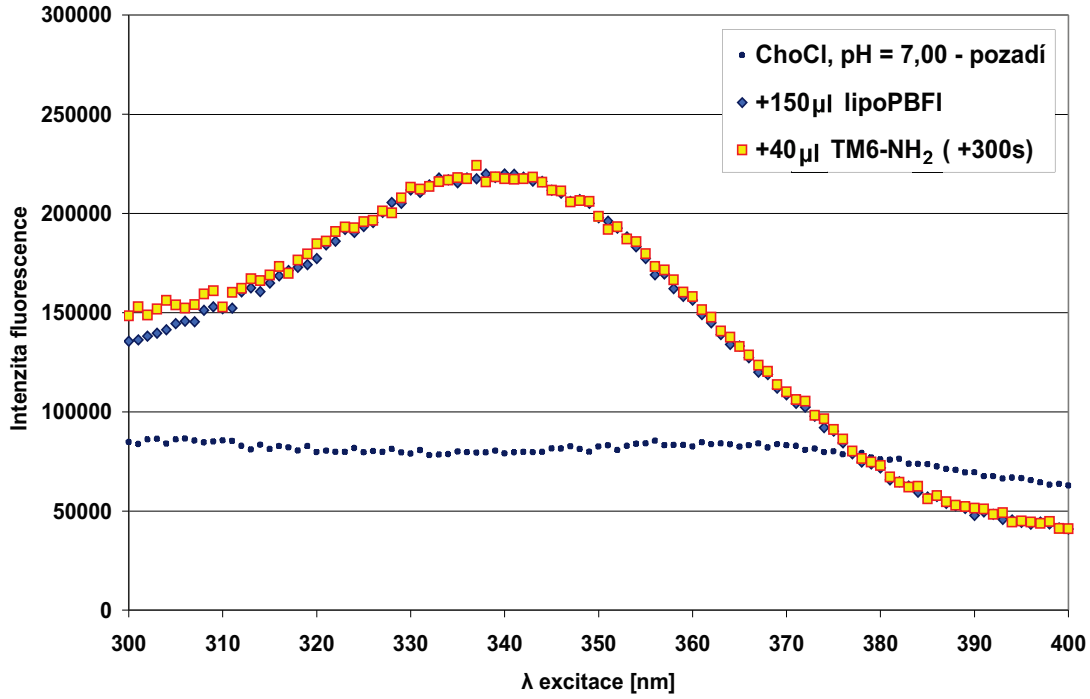


Obr. 4.29 : Nepozorovaný rozdíl v excitačním spektru sondy PBFI jako reakce na možnou výměnu K^+ za Na^+ v jejím okolí, TMS6-NH_2, pH = 7,00.

Okolní pufr	Liposomy PBFI (4)	TM6-NH_2
3 ml (2)	100 µl	40 µl 1,65.10^{-4}M
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**	**TM6-NH_2**
96 mM Na^+	3,2 mM	2,1.10^{-6}M

Tab. 4.22 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.29.

Experiment, kdy byl jako vnější pufr použit pufr cholinchloridový je uveden na obrázku 4.30. Oproti předchozímu experimentu proběhla jen záměna pufru. Smyslem tohoto pokusu bylo sledovat možnou výměnu draselných kationtů za kationty vodíkové vlivem TMS6-NH_2 s uvážením toho, že cholinové kationty projít nemohou. Pokles pH uvnitř liposomů by měl vést k poklesu resp. změně v excitačním spektru. Tato změna pozorovatelná není. Opět ve shodě s tím, že TMS6-NH_2 potřebuje specifické pH [1] na obou stranách membrány.

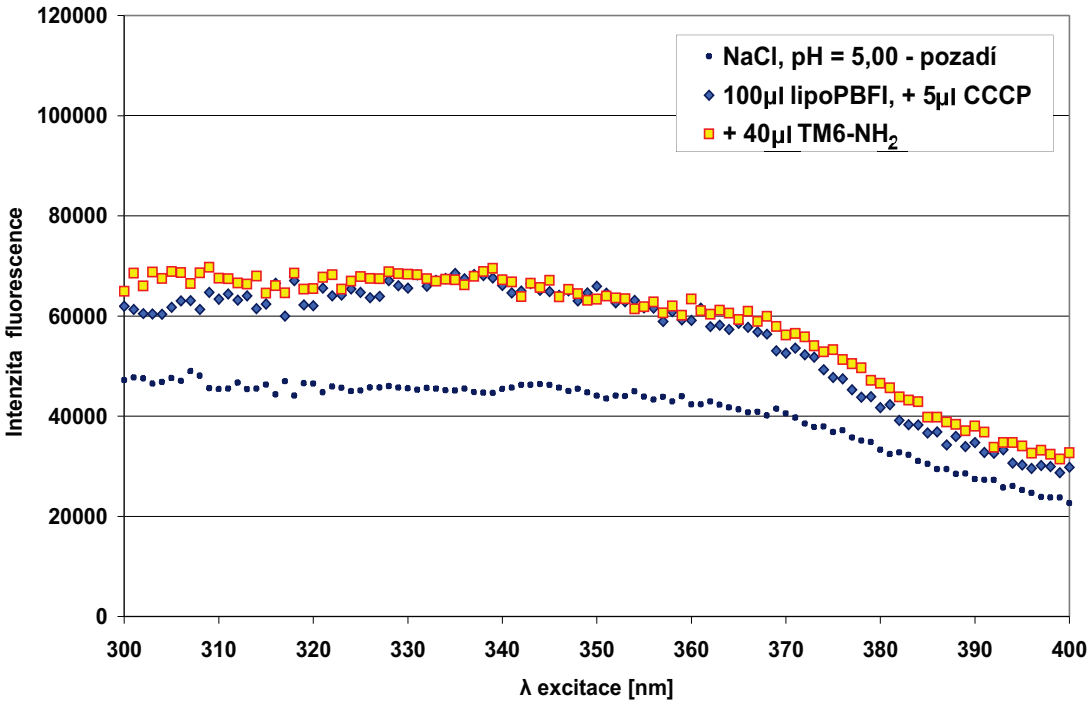


Obr. 4.30 : Neměnící se excitačním spektru sondy PBFI jako reakce na možný pokles pH v jejím okolí výměnou K^+/H^+, TMS6-NH_2.

Okolní pufr	Liposomy PBFI (4)	TM6-NH_2
3 ml (6)	150 µl	40 µl 1,65.10^{-4}M
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**	**TM6-NH_2**
94 mM Na^+	4,7 mM	2,1.10^{-6}M

Tab. 4.23 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.30.

V experimentu uvedeném na obrázku 4.31 bylo pomocí protonoforu CCCP nastaveno na obou stranách membrány pH = 5,00. Cílem experimentu bylo zjistit, zda kanály tvořené TMS6-NH_2 mají dostatečnou vodivost, aby po čas experimentu byly schopné významně změnit koncentraci draslíkových kationtů uvnitř liposomů (analogicky experimentu s gramicidinem obr. 4.28 při pH = 7,00). Z výsledku experimentu s TMS6-NH_2 při pH = 5,00 plyne, že tvořené kanály patrně takovou vodivost nemají, jelikož mezi spektry PBFI na obrázku 4.31 není v podstatě rozdíl.

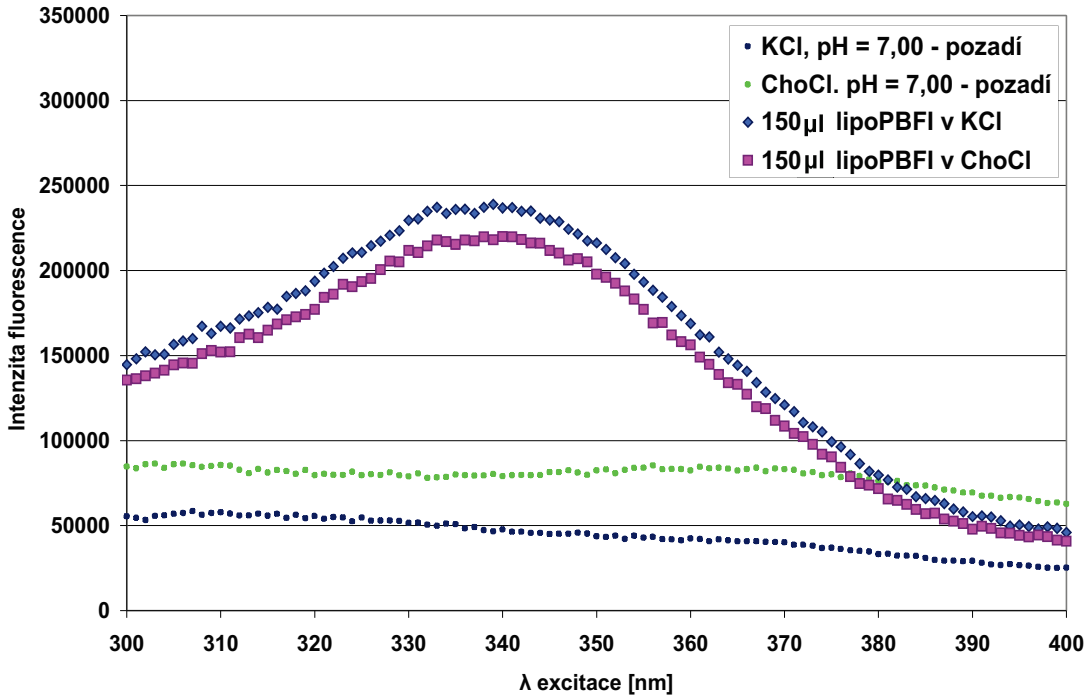


Obr. 4.31 : Nepozorován žádný pokles v excitačním spektru sondy PBFI jako reakce na výměnu K^+ za Na^+ v jejím okolí, TM6-NH_2, pH = 5,00.

Okolní pufr	Liposomy PBFI (4)	CCCP	TMS6-NH_2
3 ml (1)	100 µl	5 µl 1,0.10^{-3}M	40 µl 1,65.10^{-4}M
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**	**CCCP**	**TMS6-NH_2**
95 mM Na^+	3,2 mM	1,6.10^{-6}M	2,1.10^{-6}M

Tab. 4.24 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.31.

Pro kvalitativní zhodnocení míry odmytí sondy z vnějšího prostředí liposomů je na závěrečném obrázku této kapitoly (4.32) uvedena dvojice spekter sondy PBFI po osminásobné filtraci se dvěma rozdílnými vnějšími pufry. Spektrum systému liposomů v cholinovém pufru leží níže. To je očekávatelná pozice oproti analogickému spektru v pufru draselném. Míra tohoto rozdílu určují dokonalost odmytí sondy z vnějšího prostředí liposomů. V případě, kdy by křivky byly v dokonalém zákrytu, mohli bychom hovořit o dokonalém odmytí sondy z vnějšího prostoru. Sonda se vyskytuje pouze v liposomech a její odezva je tak nezávislá na vnějším pufru. Pro případ, kdy by poměr těchto maxim byl prakticky roven poměru maxim volné sondy v příslušných pufrech (kalibrační data obr. 4.27), by odmytí mělo být prohlášeno za velmi špatné až žádné. Sonda by se patrně v drtivém poměru nacházela mimo liposomy. Data na obrázku 4.32 potvrzují, že osminásobná filtrace na námi připravených sloupcích je pro případ sondy PBFI dostatečná.



Obr. 4.32 : Rozdíl v excitačním spektru sondy PBFI v reakci na různé druhy pufrů v okolí liposomů – míra odmytí sondy, pH = 7,00.

Okolní pufr	**Liposomy PBFI(4)**
3 ml (2)	150 µl
3 ml (6)	150 µl
Okolní pufr	**K^+ z okolí lipo.**
95 mM Na^+	4,8 mM
95 mM Cho^+	4,8 mM

Tab. 4.25 : Množství a výsledné koncentrace postupně přidaných látek v experimentech vynesených na obr. 4.32.

Kapitola 5

Diskuse

V průběhu celého textu je často odkazováno na práce [1] a [31], kde byly zkoumány identické syntetické oligopeptidy TMS3, TMS6-OH resp. TMS6-NH_2. Rozdíl mezi naším přístupem a přístupem užívaným v uvedených prácích (patch-clamp) je kromě metodiky měření také ve studovaném modelovém systému membrán, v němž se mohou eventuální iontové kanály tvořit. Většina prací, které studují problematiku podobného typu, používá jako modelový systém membránu planární, membránu na špičce patch-clampové pipety. Tyto špičky mají obvykle průměr kolem 1 μm, což odpovídá ploše membrány kolem $\approx 8.10^{-13}$ m^2. Námi připravené liposomy mají plochu membrány kolem $1{,}3.10^{-13}$ m^2. Tyto dvě čísla jsou tedy srovnatelná. Ve všech experimentech s oligopeptidy TMS6, které jsou uvedeny, byla výsledná koncentrace studovaných oligopeptidů nastavena na hodnotu $\approx$ 1 μM. Tato koncentrace byla užívána v pracích [1] a [31]. Z výše provedených úvah plyne, že pravděpodobnost, s jakou se v membráně konkrétního liposomu vytvoří iontový kanál z některého ze studovaných oligopeptidů, by měla být srovnatelná s pravděpodobnostmi tvorby iontového kanálu uvedenými ve výše zmíněných prácích. Např. v práci [31] se pravděpodobnost s jakou byly nalezeny funkční iontové kanály z oligopeptidů TMS6 pohybovala kolem 40 až 50 %. Pravděpodobnost s jakou se v konkrétním námi připraveném liposomu utvoří funkční kanál by tedy pro náš přístup měla být dostatečně vysoká. Otázkou zůstává, do jaké míry může tvorbě kanálů bránit skutečnost, že membrána liposomů není planární. Pro liposomy o takovém průměru jako je $\approx$ 200 nm a alfa-helixy relativně malého průměru však tento efekt patrně nebude rozhodující. Systém připravených liposomů je tak patrně použitelný pro studium oligopeptidů uvedeného typu.

V případě oligopeptidu TMS3, který byl používán v 10x nižší výsledné koncentraci než v práci [1] (kvůli silné interakci se sondou DiS-C_3(3)), při našich měřeních nebyla pozorována schopnost utvořit funkční kanál. Průběh experimentu s TMS3 (obr.4.11) se signifikantně nelišil od příslušné kontroly. Přítomnost kationtů Mn^{2+} neměla vliv na tento výsledek. V práci [1] bylo ukázáno, že segment TMS3 asociuje ve funkční kanál poměrně obtížně. Dále jsme zjistili, že segment TMS3, resp. TFE jako součást roztoku oligopeptidu, silně interaguje se sondou HTPS, což v podstatě znemožnilo tuto sondu s tímto oligopeptidem použít. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se tedy bohužel nedá jednoznačně rozhodnout zda by TMS3 ve srovnatelné koncentraci tvořil v liposomech iontové kanály podobně jako TMS6, či nikoliv. V planárních membránách iontové kanály tvořené oligopeptidem TMS3 pozorovány byly [31], ale s obecně nižší vodivostí, než měly obdobné kanály tvořené segmentem TMS6. Navíc tvorba kanálů z TMS3 byla podmíněna přítomností kationtů Mn^{2+}.

V této diplomové práci bylo ukázáno, že při pH = 5,00 (alespoň na jedné straně membrány) se v připraveném systému liposomů za přítomnosti oligopeptidů TMS6-OH resp. TMS6-NH_2 skutečně tvoří iontové kanály (obr. 4.2, 4.3, 4.21). Při měření se sondou DiS-C_3(3) nebylo pozorováno, že by tok těmito kanály byl ovlivněn přítomností Mn^{2+} (obr.4.2). Tyto kanály byly pozorovány pomocí sondy citlivé na membránový potenciál (DiS-C_3(3)) resp. sondy citlivé na pH (HPTS). Změny veličin, které detekují jmenované dvě sondy, jsou

v případě liposomů spojeny s transportem poměrně malého množství iontů přes membránu. Z výsledků měřených na sondě PBFI, tedy sondě citlivé na koncentraci draselných kationtů, bylo ukázáno (obr. 4.31), že kanály tvořené proteiny TMS6-NH_2 nemají patrně dostatečnou vodivost, aby po čas experimentu významně měnily koncentrace draselných kationtů, které před přidáním oligopeptidu byly na obou stranách membrány liposomů v mM koncentracích.

V experimentech se sondou HTPS (obr.4.21) se ukazuje, že kanály tvořené oligopeptidem TMS6-NH_2 jsou schopné přenášet protony. To je nový poznatek, který v experimentech na planárních membránách pozorován nebyl. V podstatě jde ale o schopnost, která je vlastní i nativnímu proteinu, který za určitých podmínek samotné protony bez Mn^{2+} transportuje (pro Nramp např. [37]). Podobný přenos protonů přes membránu v důsledku přidání TMS6-NH_2 byl námi pozorován pro více různých příprav liposomů. Pro jednu přípravu byly zaznamenány analogické experimenty i v přítomnosti Mn^{2+} (obr.4.21). Z tohoto experimentu plyne, že protony jsou přes membránu transportovány více v nepřítomnosti Mn^{2+}. Lze navrhnout interpretaci, že dvojmocný mangan nějakým způsobem interaguje s hlavičkami fosfolipidů v membráně, v důsledku čehož membránu „stíní". Vzhledem k nedostatečnému počtu opakování však není zřejmé, zda je pozorovaný rozdíl signifikantní.

Sonda Sodium Green se ukázala jako zcela nevhodná pro měření při pH ≈ 5. Při tomto pH je její citlivost na záměnu K^+/N^+ v jejím okolí minimální (4.14).

Sonda PBFI má sice při pH ≈ 5 různou odezvu v přítomnosti draslíkových kationtů než v přítomnosti kationtů sodných, ale její intenzita emise je příliš nízká (4.27). Tato sonda je poměrně nákladná a zvyšování její koncentrace při přípravě liposomů by učinilo náklady na jeden experiment příliš vysoké.

Jako velmi užitečné se pro provedené experimenty ukázaly sondy DiS-C_3(3) a HTPS.
Odezvy těchto sond jsou spojeny s již poměrně malým počtem iontů přenesených přes membránu liposomů, což je činí dostatečně citlivými i pro experimenty s kanály o nízké vodivosti. Další výhodou těchto sond je velmi nízká cena.

Poměr emisních intenzit HTPS při excitaci na vln. délkách I405/I455 nebyl vhodně zvolen. Problém nastává pří pH ≈ 5, kdy intenzita emise pro excitační vlnovou délku λ = 455 nm, kterou se v poměru dělí, klesne téměř na nulovou hodnotu. Řádově níže, než je pozadí samotného pufru. Po nutném odečtení pozadí jsou tak výsledky při nižších pH zatíženy poměrně velkým šumem. Vhodnější by patrně bylo zvolit pro jmenovatel sledovaného poměru excitaci na jiné vlnové délce.

Všechna měření byla prováděna na více přípravách liposomů s velmi dobrou reprodukovatelností výsledků (kvantitativně v rámci jedné přípravy, alespoň kvalitativně mezi přípravami navzájem). Kvantitativní rozdíly mezi přípravami mohly být způsobeny při přípravě samotných liposomů, po které se mohla výsledná koncentrace lipidů v připravené suspenzi liposomů mírně lišit.

Navržené metody nejsou příliš finančně nákladné a jsou poměrně snadno proveditelné. Nicméně experimenty uvedené v této práci ukázaly, že použití liposomů a fluorescenčních sond pro studování transportních vlastností představených oligopeptidů je metoda poměrně málo citlivá. V důsledku toho mohou být zjišťovány některé kvalitativní informace, ale měření kvantitativních charakteristik může být velmi problematické.

Kapitola 6

Závěr

Cílem této práce bylo vyvinou dostupnou metodu pro studium kanálů indukovaných oligopeptidy v modelovém systému liposomů pomocí fluorescenčních sond. Tyto metody měly být optimalizovány a s jejich pomocí měly být studovány transportní charakteristiky kanálů tvořených syntetickými oligopeptidy, které jsou svou sekvencí odpovídající transmembránovým segmentům TMS3 a TMS6 proteinu MntH bakterie *E. coli*.

Byly navrženy různé parametry experimentů a koncentrace použitých látek. Všechny tyto metody byly v rámci možností optimalizovány, viz tabulky a text u příslušných obrázků a grafů.

Bylo zjištěno že oligopeptid TMS6-NH_2 resp. TMS6-OH je schopen po přidání k systému liposomů tvořit funkční iontové kanály. Toto bylo pozorováno pomocí potenciálové sondy DiS-C3(3) resp. sondy HPTS, sondy citlivé na pH. Při měření se sondou DiS-C3(3) nebyl pozorován efekt přítomnosti kationtu $Mn2^{+}$ na rychlost s jakou byl budován membránový potenciál.

Pomocí sondy HPTS bylo nově zjištěno, že kanály tvořené oligopeptidem TMS6-NH_2 jsou vodivé i pro protony. Byl pozorován rozdíl v míře tohoto transportu v závislosti na přítomnosti kationtu $Mn^{2+.}$

V našich experimentech nebyly pozorovány iontové kanály tvořené oligopeptidem TMS3.

Bylo ukázáno, že uvedené metody nejsou dostatečně citlivé pro zjišťování kvantitativních transportních charakteristik, zejména kanálů s nižší vodivostí. Naopak některé kvalitativní informace jsou těmito metodami poměrně snadno zjistitelné.

Jako vhodný další směr optimalizace uvedených metod s liposomy by mohlo být vyzkoušení dalších sond, jejichž odezva je spojena s poměrně malým množstvím iontů přenášených přes membránu liposomů. Jistým přínosem by také bylo navržení dalších experimentálních uspořádání, kde by studované toky iontů byly určitým způsobem spřaženy s veličinou detekovatelnou sondami DiS-C3(3) a HTPS, které se již svou citlivostí osvědčily pro podobné experimenty.

Literatura

[1] Ňuňuková V., Urbánková E., Jelokhani-Niaraki M., Chaloupka R. (2010): Ion channel activity of transmembrane segment 6 of *Escherichia coli* proton-dependent manganese transporter, *Biopolymers,* Vol. 93 / N.8, 718-726.

[2] Courville P., Chaloupka R., Veyrier F., Cellier M.F.M. (2004): Determination of transmembrane topology of the Escherichia coli natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog, *J. Biol. Chem.* 279(5) 3318-3326.

[3] Njus D.,(2000) : Fundamental Principles of Membrane Biophysics, *Wayne State University, Detroit*.

[4] Prosser V. a kol. (1989) : Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha.

[5] Nevo Y., Nelson N. (2006) : The NRAMP family of metal-ion transporters, *Biochimica et biophysica acta* 1763, 609-620

[6] www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/principy.pdf (obsah z 3/2010)

[7] Alberts B. (1998) : Základy buněčné biologie : Úvod do biologie buňky, Espero, Ústí nad Labem

[8] Chaloupka R., Courville P., Veyrier F., Knudsen B., Tompkins T.A., 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 (2), 726-73

[9] Marsh D. (1996): Peptide models for membrane channels, *Biochem. J.* 315 (Pt 2),345-361.

[10] Hunt J. F., Earnest T. N., Bousche O., Kalghatgi K., Reilly K., Horvath C., Rothschild K. J., Engelman D. M. (1997) : A biophysical study of integral membrane protein folding, *Biochemistry*, 36 (49), 15156-15176.

[11] MacKenzie K. R., Engelman D. M. (1998) : Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycophorin A dimerization, *Proc Natl Acad Sci U S A* , 95 (7), 3583-3590.

[12] MacKenzie K. R., Prestegard J. H., Engelman D. M., (1997): A transmembrane helix dimer: structure and implications, *Science*, 276 (5309), 131-133.

[13] Oiki S., Danho W., Madison V., Montal M., (1988): M2 delta, a candidate for the structure lining the ionic channel of the nicotinic cholinergic receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (22), 8703-8707.

[14] Oblatt-Montal M., Reddy G. L.; Iwamoto T., Tomich J. M., Montal M., (1994) : Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of CFTR, the cystic fibrosis chloride channel, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (4),1495-1499.

[15] Yamaguchi H.,Jelokhani-Niaraki M., Kodama H. (2004): Second transmembrane domain of human uncoupling protein 2 is essential for its anion channel formation, *FEBS Lett*, 577 (1-2), 299-304.

[16] Večeř J., Heřman P., Holoubek A. (1997) : Diffusion membrane potential in liposomes:setting by ion gradients, absolute calibration and monitoring of fast changes by spectral shifts of Dis-C3(3) fluorescence maximum, *Biochimica et Biophysica Acta* 1325 _1997.155–164.

[17] http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp06900.pdf (obsah z 4/2010)

[18] http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/pH-Indicators/Probes-Useful-at-Near-Neutral-pH.html

[19] http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01262.pdf (obsah z 4/2010)

[20] Urbánková E. (2005) : Proposal of a new project: Transmembrane segments of MntH protein, interní materiál MFF UK.

[21] Zaitsev S. Y., Vereschetin V. P., Zubov V. P., Zeiss W., Möbius D. (1996) : Ionic selectivity of valinomycin in the dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. *Thin Solid Films* 284-285 (1996) 667-670

[22] Shirai O., Yamana H., Ohnuki T., Yoshida Y., Kihara S. (2004) : Ion transport across a bilayer lipid membrane facilitated by valinomycin. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 570 (2004) 219–226

[23] http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n7143pis.Par.0001.File.tmp/n7143pis.pdf

[24] Wallace B. A. (1998): Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *Journal of structural biology* 121, 123–141

[25] Basu S. C., Basu M., Liposome Methods and Protocols, Methods in Molecular BiologyTM, VOLUME 199, HUMANA PRESS

[26] Haemig H. A. H., Brooker R .J. (2004): Importance of conserved acidic residues in MntH, the Nramp homolog of Excherichia coli *J. Membrane biol.* 201: 97-107

[27] Lam-Yuk-Tseung S., Govoni G., Forbes J., Gros P. (2003) : Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6 *Blood* 101:3699-3707

[28] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=cs&N4=C7017|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (obsah z 7/2010)

[29] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=cs&N4=251275|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (obsah z 7/2010)

[30] http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/hepes-sodium-salt.html (obsah z 7/2010)

[31] Ňuňuková V. (2010) : Biophysical studies of membrane transport proteins from Nramp/MntH family and their function, disertační práce, MFF UK.

[32] Kyte J., Doolittle R.F. (1982) : A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology* Volume 157, Issue 1, 5 May 1982, Pages 105-132

[33] Harms G. S., Orr G., Montal M., Thrall B. D., Colson S. D., Lu H. P. (2003) : Probing Conformational Changes of Gramicidin Ion Channels by Single-Molecule Patch-Clamp, *Biophysical Journal*, Volume 85, Issue 3, September 2003, Pages 1826-1838

[34] Li H., Gu J.D., and Sun H. (2008): Structure, topology and assembly of a 32-mer peptide corresponding to the loop 3 and transmembrane domain 4 of divalent metal transporter(DMT1) in membrane-mimetic environments, *J. Inorg. Biochem*. 102 (2008) 1257-1266.

[35] Xiao S., Li J., Wang Y., Wang C., Xue R., Wang S., and Li F. (2010) : Identification of an "[alpha]-helix-extended segment-[alpha]-helix" conformation of the sixth transmembrane domain in DMT1, *BBA-Biomembranes* In Press,

[36] Qi H., Yang L., Xue R., Song Y., Wang S., and Li F. (2009) : The third and fourth transmembrane domains of Slc11a1: Comparison of their structures and positioning in phospholipid model membranes, *Biopolymers* 92 (2009) 52-64.

[37] Nevo Y., Nelson N. (2006) : The NRAMP family of metal-ion transporters, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research,* Volume 1763, Issue 7, July 2006, Pages 609-620

Přílohy

Příloha A

Protokol přípravy liposomů

1. Zvolte typ a vypočtěte množství lipidů, které je potřeba odebrat ze zásobních roztoků, aby byla dosažena požadovaná výsledná koncentrace lipidů v pufru.

2. Vyndejte zásobní roztok z mrazáku a nechte jej přejít do kap. skupenství.

3. Užitím Hamiltonovy stříkačky (lipidy jsou obvykle skladovány v chloroformu, který rozpouští plastové špičky) naberte požadované množství z vialky skrze gumové septum. [Po provedení odběru překryjte septum parafilmem a zásobní roztok ukliďte do ledničky.]

4. Umístěte odebraný roztok lipidů do vhodné baňky s kulatým dnem.

5. Za stálého otáčení pod mírným úhlem nechte chloroform odpařit. Z lipidů se na baňce vytvoří tenký film.

6. Překryjte lahvičku hliníkovou folií, tak aby lipidy byly v co největší tmě (Lipidy jsou citlivé na světlo, zejména jejich nenasycené vazby).

7. Nechte lipidy vysušit pod vakuem v exsikátoru po dobu 24 hodin.

8. Vyndejte baňku z exsikátoru a přidejte do ní vypočtené množství pufru.

9. Rozpusťte řádně lipidový film v baňce. Může být použit i sonikátor.

10. Dále bude třeba alespoň pětkrát provést zamražení a rozmražení obsahu baňky.

11. Vyfoukejte kyslík z baňky (O_2 může reagovat s dvojnými vazbami lipidů), pomocí mírného proudu N_2. Překryjte hrdlo lahvičky parafilmem, nebo utěsněte špuntem. (Pozor na vyskočení špuntu při proceduře rozmrazování a zmrazování, plyn v lahvičce mění teplotu a tedy i tlak.

12. Připravte tekutý dusík do termosky s širokým hrdlem a horkou vodu do velké kádinky.

13. Přidržujte baňku v tepelně izolovaných kleštích a střídavě ji nořte do tekutého dusíku a horké vody.

14. Krok 13 opakujte alespoň pětkrát. Vždy dbejte na to, aby celý obsah baňky přešel do pevného resp. do kapalného skupenství.

15. Po posledním cyklu kroku 13 je roztok připraven k extruzi.

16. Sestavte strojek na extruzi. Zvolením velikosti pórů filtru sevřeného mezi písty strojku volíme cílenou velikost liposomů. Dbejte na to, aby veškeré části strojku byly čisté.

17. Zkontrolujte, zda je filtr mezi pístky vycentrován.

18. Nejdříve skrze filtr několikrát protlačte pufr o stejném složení, jako byl přidán k lipidům, aby se namočily filtry.

19. Nasajte roztok lipidů do první stříkačky, zbavte se bublinek (s bublinkami jde filtrování obtížněji) a stříkačku upevněte zpět do strojku. Protlačte roztok lipidů skrze filtr z jedné stříkačky do druhé a zpět alespoň devatenáctkrát. Výsledný filtrát by měl skončit v druhé stříkačce (neobsahuje nečistoty).

20. Odpojte druhou stříkačku od strojku a umístěte roztok liposomů do tmavé lahvičky se septem.

21. Odstraňte bublinky z lahvičky se septem profouknutím mírným proudem N_2.

22. Lahvičku překryjte hliníkovou fólií a skladujte v ledničce o teplotě 4 ºC.

23. Nyní máte jednovrstvé liposomy.

Příloha B

Data kalibrace HPTS

Měřený poměr byl pro každé pH změřen 50x. Rozptyl a směrodatná odchylka byly vypočítány z tohoto statistického souboru.

pH	I405/I455	Rozptyl	Směr. odchylka	pufr
5,00	214	6700	82	Citrát
5,14	119	350	19	Citrát
5,23	90,7	230	15	Citrát
5,35	64,4	64	8,0	Citrát
5,50	40,7	6,4	2,5	Citrát
5,76	24,4	2,0	1,4	Citrát
5,96	15,2	0,33	0,57	HEPES
6,10	11,9	0,16	0,40	Citrát
6,48	5,63	0,018	0,13	HEPES
7,00	1,99	0,00068	0,026	HEPES

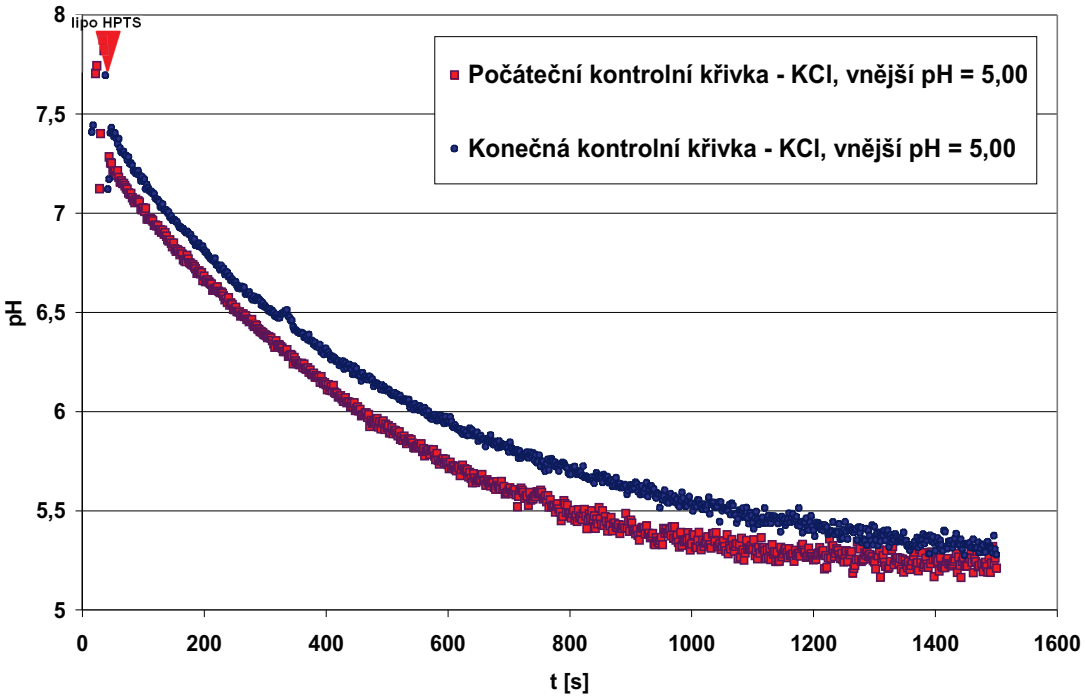
Tab. B1 : Kalibrační data sondy HPTS v pufru s 100mM KCl.

pH	I405/I455	Rozptyl	Směr. odchylka	pufr
5,00	76,9	430	21	Citrát
5,13	46,4	80	8,9	Citrát
5,32	30,8	9,5	3,1	Citrát
5,85	7,64	0,045	0,21	Citrát
6,22	4,17	0,012	0,11	Citrát
7,00	1,05	0,00023	0,015	HEPES

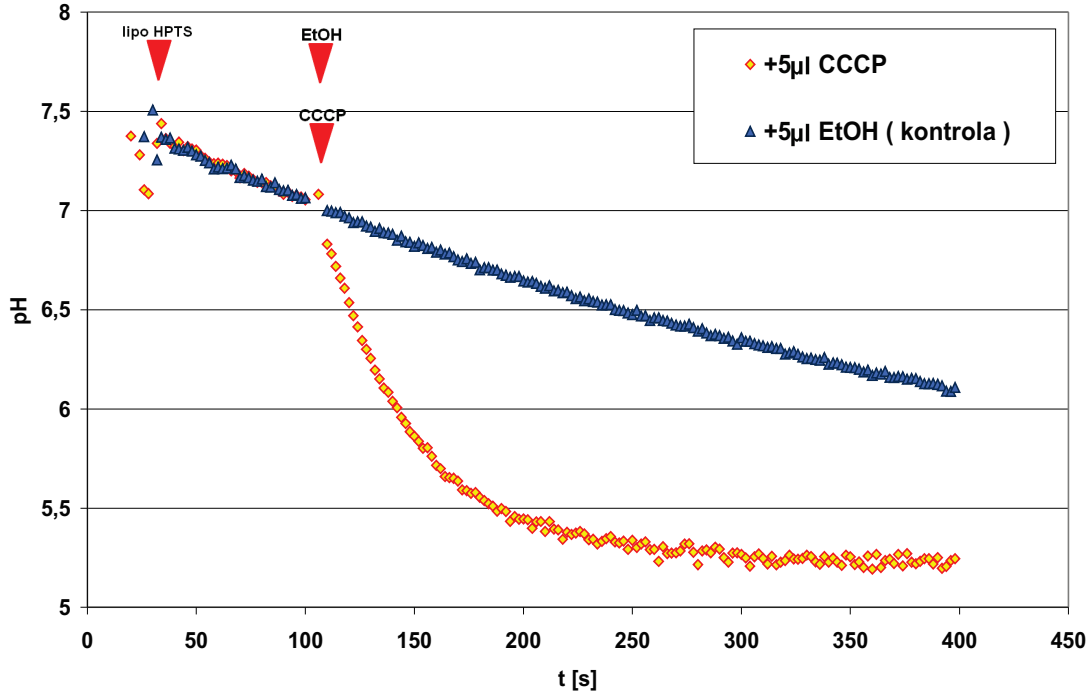
Tab. B2 : Kalibrační data sondy HPTS v pufru s 100mM ChoCl.

Příloha C

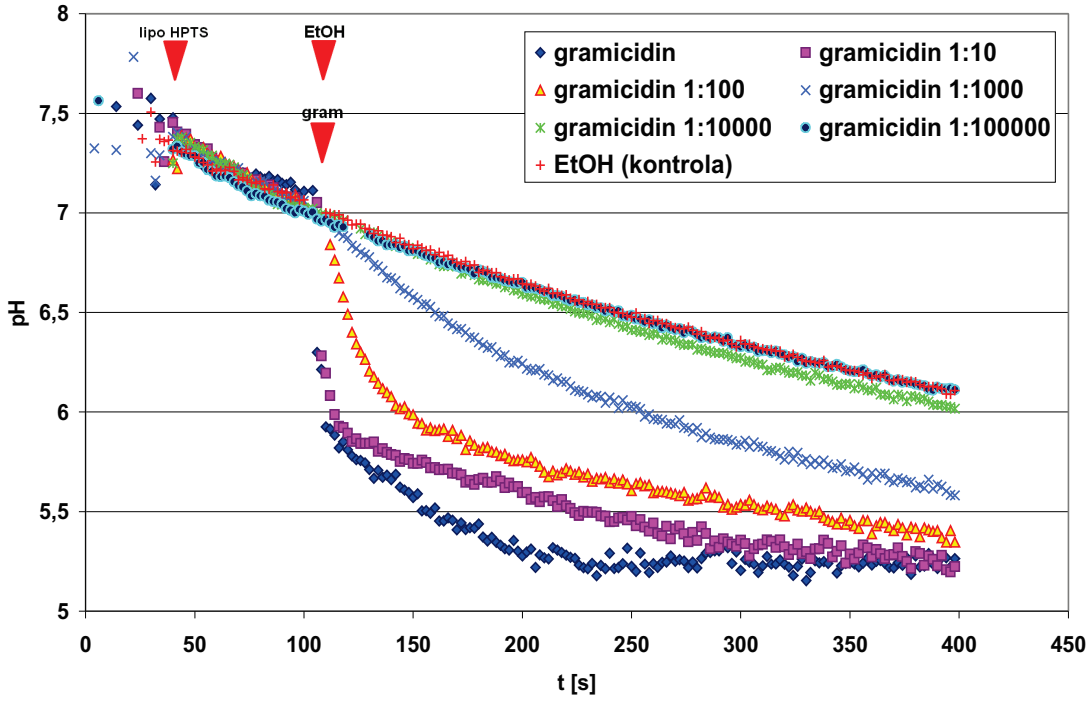
Experimenty s HPTS v kalibraci na volné sondě



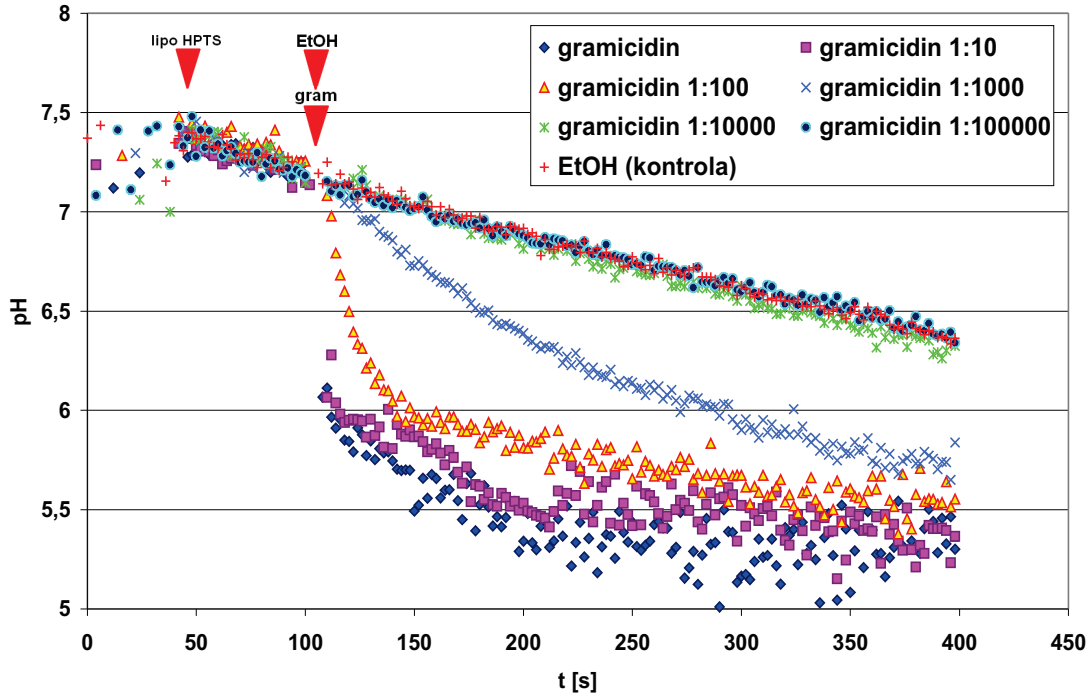
Obr. C-4.17 : Spontánní pokles pH uvnitř čerstvě zfiltrovaných liposomů resp. táž závislost po 10 hodinách.



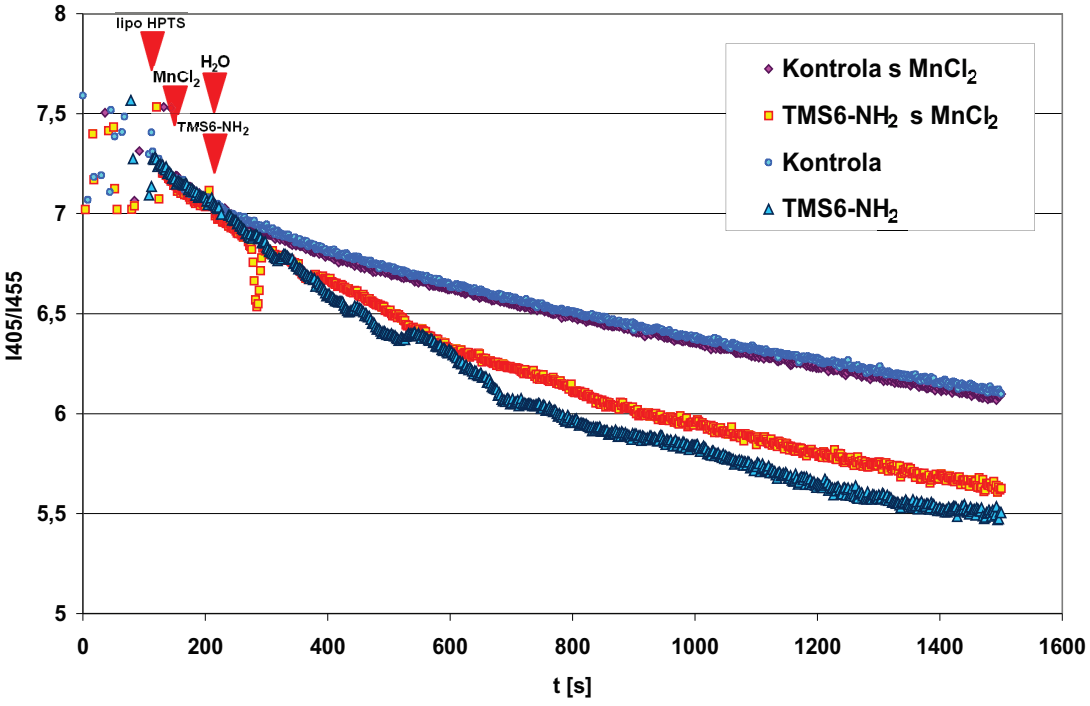
Obr. C-4.18 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů pro vodíkové kationty protonoforem CCCP.



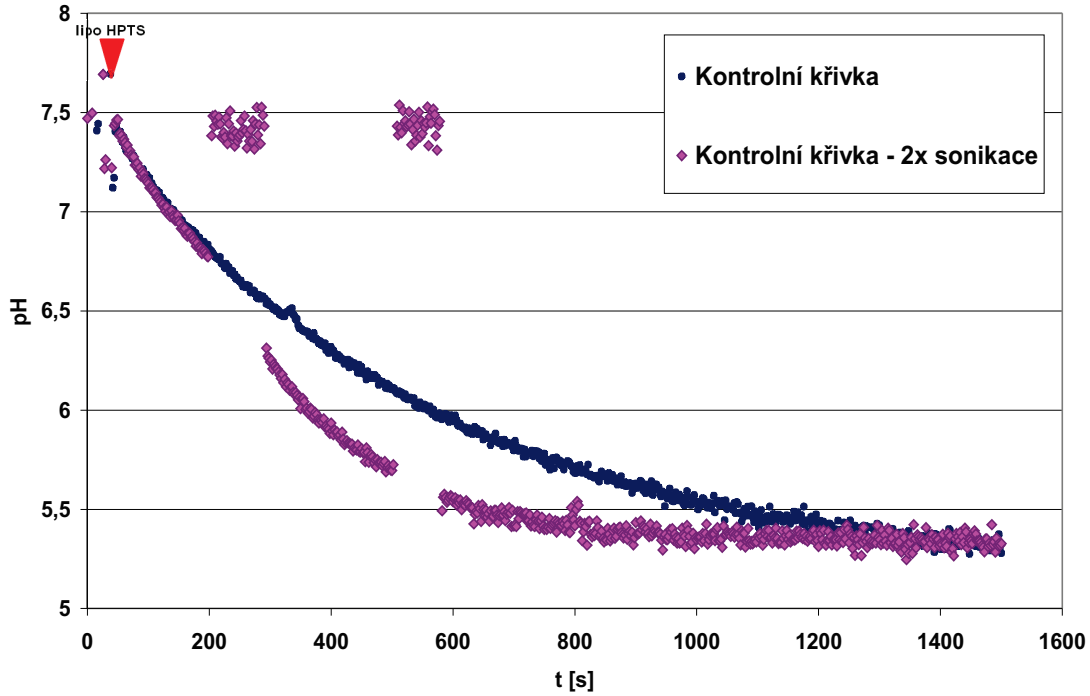
Obr. C-4.19 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů gramicidinovými kanály.



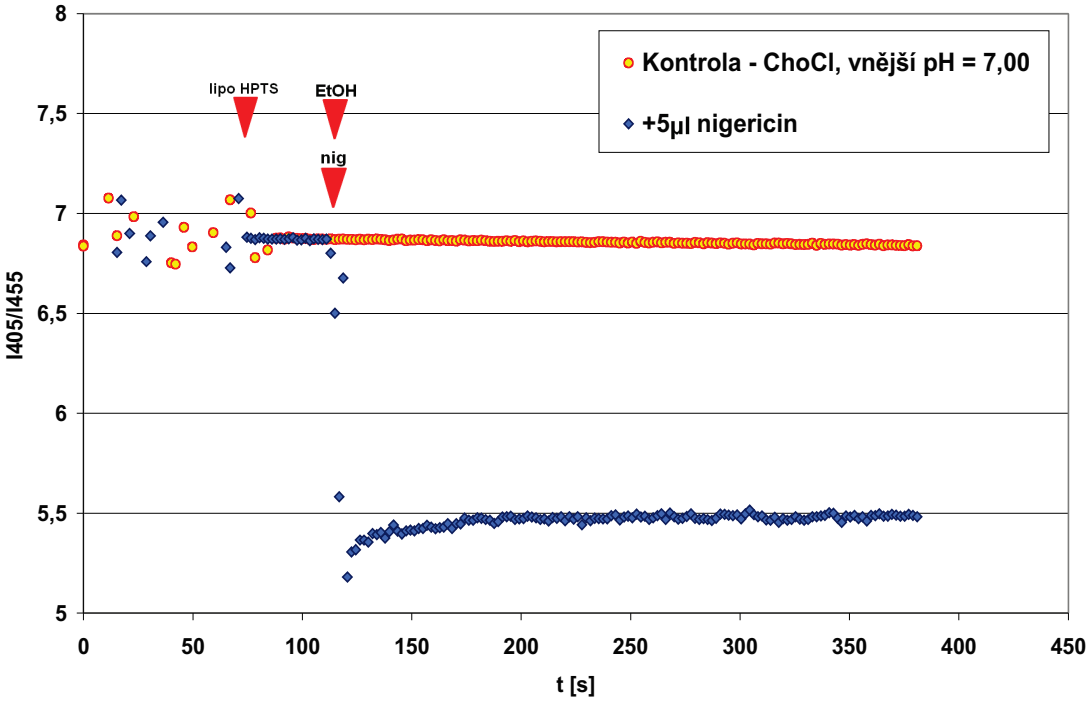
Obr. C-4.20 : Pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů gramicidinovými kanály (jiná příprava - horší signál/šum).



Obr. C-4.21 : Rychlejší pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů kanály tvořenými TM6-NH_2.



Obr. C-4.22 : Rychlejší pokles pH uvnitř liposomů po zvýšení propustnosti membrán liposomů výkonnou sonikací.



Obr. C-4.23 : Pokles pH uvnitř liposomů vlivem přidaného nigericinu (antiport K^+/H^+).