

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Petra Matunová

Srovnání fluorescenčních sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jaromír Plášek CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: obecná fyzika

Praha 2012

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví CSc., za ochotu, vstřícný přístup a odborné rady, které mi byly poskytovány. Dále bych chtěla poděkovat paní prof. RNDr. Daně Gáškové CSc. za vypůjčení literatury a paní laborantce Ivaně Benešové za kultivaci kvasinek a za pomoc při orientaci v laboratoři. Děkuji i panu RNDr. Ivanu Barvíkovi, Ph.D. za pomoc s molekulárně-dynamickou simulací. Na závěr bych chtěla poděkovat své mamince za podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

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

V dne

Podpis autora

Název práce: Srovnání fluorescenčních sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek.

Autor: Petra Matunová

Katedra: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jaromír Plášek CSc.

Abstrakt:

Membránový potenciál představující napětí na membráně je důležitý parametr pro studium buněčných procesů. Pomocí karbocyaninových sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5), označovaných společným názvem 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, lze monitorovat změny membránového potenciálu buněk, které jsou příliš malé pro zavedení mikroelektrod. Tyto změny lze sledovat v jednotkách mV. Spektrální analýza buněčných suspenzí kvasinek *S. cerevisiae* s fluorescenčními sondami umožňuje stanovit koncentrace extracelulárního a intracelulárního fluorescenčního barviva, z jejichž znalosti lze určit hodnoty změn membránového potenciálu, které je možné vyvolat vnějšími podněty. Součástí práce je porovnání akumulace obou fluorescenčních sond a také experimenty zacílené na sledování vlivu vybraných látek a jejich měnících se koncentrací na volnou a vázanou složku barviva.

Klíčová slova: membránový potenciál, kvasinky, *S. cerevisiae*, fluorescenční sondy

Title: The comparison of the performance of carbocyanine dyes diS-C₃(3) a diS-C₃(5) in fluorescent probing of yeast cell membrane potential

Author: Petra Matunová

Department: Fyzikální ústav UK

Supervisor: prof. RNDr. Jaromír Plášek CSc., Fyzikální ústav UK

Abstract:

Membrane potential represents a voltage across a membrane and it is an important parameter that helps to describe processes in cells. Carbocyanine fluorescent probes diS-C₃(3) and diS-C₃(5), for which a common short chemical name 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide is used, are suitable for monitoring membrane potential changes of cells in which microelectrodes can not be used because of a small size of the cells. These changes can be measured on the scale of mV. A spectral analysis of cell suspensions containing a fluorescent probe makes it possible to determine the ratio of extracellular and intracellular concentrations of the probe. Using it we can calculate the value of membrane potential changes which can be induced by an outer stimulus. This Bc. thesis presents a comparison of the rate of accumulation of the above mentioned fluorescent probes in yeast cells, as well as experiments aimed for studying an influence of different substances and their various concentrations on free and bound component of the dye.

Keywords: membrane potential, yeast, *S. cerevisiae*, fluorescent probes

Obsah

1	Úvod	2
2	Fluorescence	3
2.1	Definice fluorescence	3
2.2	Elektronové přechody	4
2.3	Absorpce a emise	6
2.3.1	Emisní a excitační spektra	6
2.4	Spektrofluorimetrie	8
3	Kvasinky	11
3.1	Základní charakteristiky a rozdělení	11
3.2	Struktura kvasinky	11
4	Materiály a metody	14
4.1	Materiály	14
4.2	Kultivace kvasinek a příprava vzorků pro měření	15
4.2.1	Metoda synchronně skenované fluorescence	16
4.2.2	Spektrofluorimetr	18
5	Výsledky	19
5.1	Excitační, emisní a synchronní fluorescenční spektra	19
5.2	Sledování akumulace sond diS-C ₃ (3) a diS-C ₃ (5) v buněčném médiu	21
5.3	Příklady použití fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) při kvantita- tivním měření změn membránového potenciálu	32
5.3.1	Depolarizace buněk <i>S. cerevisiae</i> při acidifikaci média . . .	32
5.3.2	DM-11	32
5.3.3	CCCP	33
5.3.4	Butanol	35
6	Diskuze	38
6.1	Sledování akumulace sond diS-C ₃ (3) a diS-C ₃ (5) v buněčném mediu	38
6.2	Příklady použití fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) při kvantitativním měření změn membránového potenciálu	39
7	Závěr	41
	Seznam použité literatury	42
	Přílohy	43

1. Úvod

V práci je prezentována metoda synchronně skenované fluorescence (SFS) spočívající v registraci intenzity fluorescence za současného snímání fluorescenčních excitačních i emisních spekter s konstantním rozdílem mezi nimi. Rozkladem spekter získaných ze spektrofluorimetrických měření lze zjistit poměr barviva, které se navázalo do buněk a toho, které zůstalo volné mimo buňky, viz [8]. Nernstova rovnice potom spojuje tyto koncentrace barviva s membránovým potenciálem.

Na membráně existuje vždy v rovnovážném stavu klidový membránový potenciál. To je důsledkem nepropustnosti membrány pro nabitě částice, které pro přechod do buňky potřebují specifické kanály či přenašeče. Na membráně tak existuje napětí v řádu několika desítek mV. Toto napětí je pro buňky velice důležité, protože udržuje její osmotickou rovnováhu a zásadní látky jako např. proteiny nebo fosfáty uvnitř buňky. Přidáním vhodné látky je možné změnit vnější koncentraci iontů a porušit tak rovnováhu, přičemž systém reaguje redistribucí iontů přes membránu. Pokud vzorek obsahuje fluorescenční sondu, je možné sledovat tyto změny pomocí spektrofluorimetru.

V první části byly monitorovány právě tyto přechody mezi rovnováhami a odpovídající změny membránového potenciálu v buněčných suspenzích s fluorescenčními sondami. Následně byl již v rovnovážném stavu sledován vliv různých látek na membránový potenciál buněk.

Jako buňky sloužily kvasinky *S. cerevisiae* a její mutantní kmeny, které jsou vzhledem ke svým příhodným vlastnostem často používané nejen k výzkumným účelům, ale i např. v potravinářství. Relativně snadno se kultivují a i přes to, že jsou to eukaryotní organismy, jejich struktura se do jisté míry podobá buňkám rostlin a živočichů. Navíc se kvasinky *S. cerevisiae* vyznačují existencí speciálních buněčných pump, které je dělají rezistentní vůči nejrůznějším látkám.

2. Fluorescence

2.1 Definice fluorescence

Elektrony v molekulách a v kondenzovaných látkách mohou být různými způsoby excitovány do vzbuzených (excitovaných) stavů. Excitované stavy však nejsou termodynamicky rovnovážné a elektrony proto po určité době přejdou do stabilního základního stavu o nejnižší energii. Při těchto přechodech může dojít k emisi fotonů, kterou nazýváme luminiscence. V případě, že k excitaci došlo v důsledku absorpce fotonů, mluvíme o fotoluminiscenci. V dalším výkladě se již omezíme jen na fotoluminiscenci organických molekul.

Luminiscence se dělí na fluorescenci a fosforescenci, viz [1]. Fluorescence označuje emitované záření, které doprovází spontánní energetický přechod elektronu z excitovaného singletního elektronového stavu S_n do základního singletního stavu S_0 . Přechod z excitovaného do základního stavu spojený s emisí fotonu však lze také vyvolat dopadajícím světelným zářením. Potom mluvíme o stimulované emisi. Doba dohasínání fluorescence je velice krátká, přibližně 10^{-8} s.

Fluorescence je pozorována jen během buzení a po jeho skončení už prakticky ne.

Oproti tomu fosforescence je přechod z excitovaného tripletního stavu T_n do základního singletního stavu S_0 . Doba dohasínání je delší, než u fluorescence, spadá do rozmezí $10^{-6} - 1$ s.

Zářivé přechody molekul do nižších energetických stavů (tj. přechody spojené s emisí fotonů) však nejsou jediné způsoby de-excitace. Excitované stavy molekul mohou zanikat i procesy nezářivými, k nimž patří:

- vnitřní konverze, neboli přímý návrat do základního stavu bez emise fluorescence
- mezisystémová konverze
- vibrační relaxace
- konformační změny
- mezimolekulární přenos excitační energie

- vytvoření excimeru, exciplexu
- fotochemická transformace.

Některé z těchto procesů (konkrétně tvorba excimerů a Foersterův přenos excitační energie) mohou vést k vyzáření fluorescence, která překryje původní fluorescenci excitované molekuly.

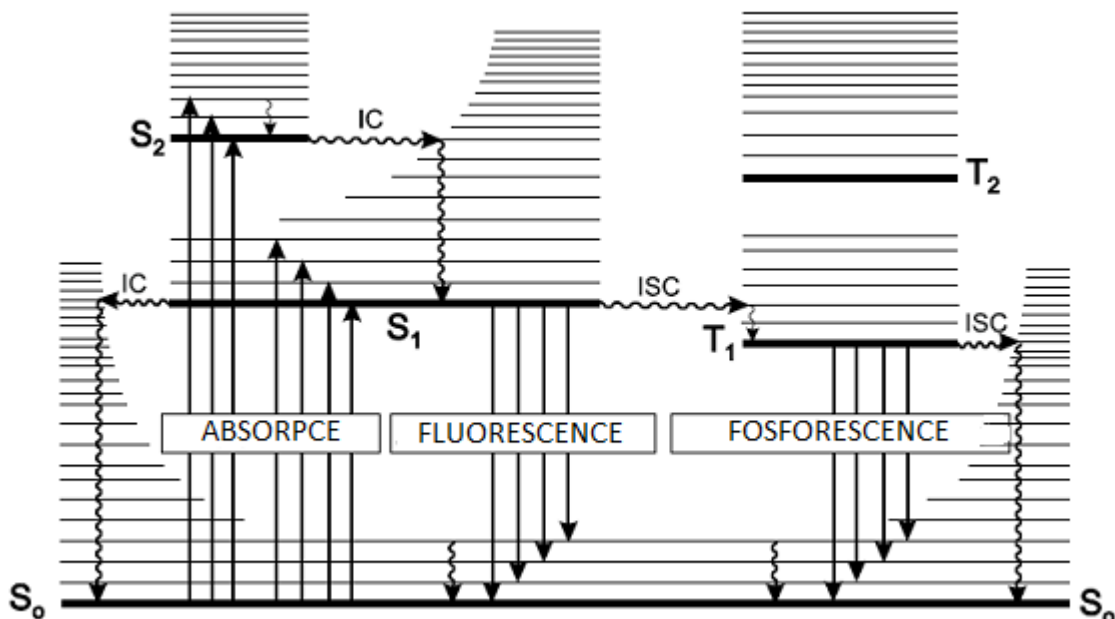
Fluorescence je využívána při zkoumání struktur a dynamiky hmoty na molekulární a supramolekulární úrovni. Prostřednictvím fluorescenčních molekul, která mají význam fluorescenčních sond, lze mimo jiné měřit i membránový potenciál, citlivý parametr buněčné vitality. Membránový potenciál je výraz pro elektrický potenciál přes membránu, resp. napětí na membráně. Vzniká v důsledku nerovnoměrně rozdělené koncentrace iontů uvnitř a vně membrány. Fluorescenční charakteristiky sond závisí na membránovém potenciálu.

2.2 Elektronové přechody

Definujme nejdříve pojem elektronového přechodu. Je to jev, při kterém je elektron po absorpci fotonu povýšen z orbitalu ve kterém se nachází v základním stavu molekuly do vyššího neobsazeného orbitalu. Jsou možné přechody jen mezi singletními a nebo jen mezi tripletními stavy. Rozlišení na singletní a tripletní stavy je provedeno z hlediska jejich multiplicity. Fosforescence, která by měla být z tohoto důvodu zakázaná, je vysvětlena spin-orbitální interakcí.

Elektronové přechody jsou velmi rychlé ve srovnání s charakteristickými časy vyskytujícími se u molekulárních vibrací. Lze proto předpokládat dle Frank-Condonova principu, že pozice jader se v molekule během přechodu nemění a zůstává tak zachována původní vzdálenost mezi jádry atomů .

Perrin-Jablonského diagram na obr.2.1 ukazuje schéma možných přechodů. Vertikální šipky odpovídají přechodům z nejnižšího vibračního energetického stavu S_0 , ve kterém je nejčastěji molekula za pokojové teploty, do vyššího stavu S_i , $i = 1, 2, \dots$. Symbol IC označuje vnitřní konverzi a ISC označuje mezisystémovou konverzi. Fluorescence doprovází nejčastěji přechod ze stavu S_1 do stavu S_0 a proto její charakteristiky nezávisí na excitační vlnové délce.



Obrázek 2.1: Perrin-Jablonského diagram, převzato z [1]

Pro popis elektronových přechodů se zavádí (v analogii s poločasem rozpadu u radioaktivního rozpadu) střední doba života excitovaných stavů. Určuje jak dlouho je možné pozorovat daný jev. Pro dobu života τ excitovaného stavu S_1 platí:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{ic} + k_{isc}} \quad (2.1)$$

kde k_r značí rychlostní konstantu pro přechod $S_1 \rightarrow S_0$ s emisí fluorescence, k_{ic} značí rychlostní konstantu vnitřní konverze $S_1 \rightarrow S_0$ a k_{isc} značí rychlostní konstantu mezisystémové konverze.

Rychlostní konstanta k_r je konstanta úměrnosti mezi intenzitou fluorescence a okamžitou koncentrací molekul, které jsou po vybuzení stále excitovány.

Vedle doby života se zavádí fluorescenční kvantový výtěžek Φ_F . Je definován následovně:

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{ic} + k_{isc}} = k_r \tau \quad (2.2)$$

Veličiny vystupující ve vzorci se vztahují k přechodu $S_1 \rightarrow S_0$.

Fluorescenční kvantový výtěžek udává jak velká část excitovaných molekul se vrací zpět do základního stavu s emisí fluorescence. Lze také říci, že je to poměr počtu emitovaných fotonů ku počtu absorbovaných fotonů.

K elektronovým přechodům je ještě užitečné poznamenat, že u konjugovaných systémů (často tvořících základ fluorescenčních sond), kde π elektrony jsou v rámci molekuly delokalizovány, platí, že čím více π elektronů systém obsahuje, tím je nižší energie $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů a tím je větší vlnová délka absorpčního pásu. Zde π^* značí antivazebný π orbital a $\pi \rightarrow \pi^*$ poté přechod π elektronu mezi danými orbitaly.

2.3 Absorpce a emise

Míra absorpce světla při dané vlnové délce λ je charakterizována veličinami *absorbance* A a *transmittance* T . Jsou definovány následovně:

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda) \quad (2.3)$$

$$T(\lambda) = \frac{I^\lambda}{I_0^\lambda} \quad (2.4)$$

kde I_0^λ a I^λ značí vstupující a vystupující intenzitu světla.

V běžných experimentech s fluorescencí organických molekul v roztocích splňuje absorbance Beer–Lambertův zákon:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda} = \epsilon(\lambda)lc \quad (2.5)$$

kde $\epsilon(\lambda)$ je *molární dekadický absorpční koeficient*, l je tloušťka absorbujícího prostředí a c značí koncentraci absorbující látky.

Závislost molárního absorpčního koeficientu na vlnové délce světla se nazývá absorpční spektrum.

2.3.1 Emisní a excitační spektra

Emisní spektrum udává, jak závisí intenzita fluorescence na vlnové délce emise při konstantní vlnové délce excitačního záření.

Excitační spektrum udává jak závisí intenzita fluorescence na vlnové délce excitace při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Tato spektra je obvyklé prezentovat v relativních jednotkách, např. normované na jednotkovou intenzitu v maximum nebo na jednotkový integrál. Méně častěji se z důvodů obtížné měřitelnosti udává vyjádření pomocí kvantových výtěžků.

Definujme dále pojem ustáleného stavu. Je to stav, během kterého pod konstantním ozařováním zůstává koncentrace molekul v excitovaném stavu stejná. Je s ním výhodné pracovat při zavádění veličin udávajících spektrální charakteristiky.

Platí, že intenzita fluorescence na absorbovaný foton je v ustáleném stavu rovna fluorescenčnímu kvantovému výtěžku.

Pro fluorescenční kvantový výtěžek Φ_F lze psát dle [1]:

$$\Phi_F = \int_0^{\infty} F_{\lambda}(\lambda_F) d\lambda_F \quad (2.6)$$

kde F_{λ} značí intenzitu fluorescence v ustáleném stavu na absorbovaný foton a λ_F je vlnová délka emitovaných fotonů. F_{λ} vyjadřuje emisní nebo fluorescenční spektrum, protože odráží rozdělené pravděpodobnosti přechodů z nejnižšího vibračního stavu S_1 do vibračního stavu S_0 . Každá sloučenina má jiné emisní spektrum.

Pro intenzitu fluorescence I_F v ustáleném stavu platí:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F_{\lambda}(\lambda_F) I_A(\lambda_E) \quad (2.7)$$

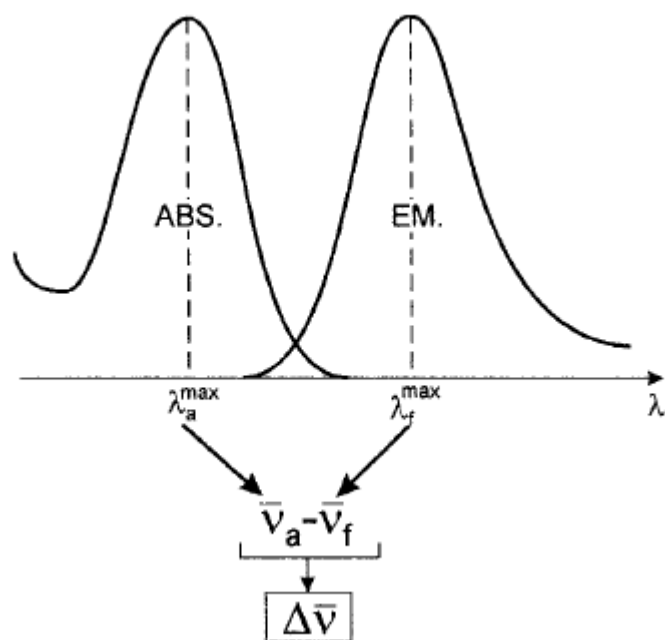
kde k je faktor úměrnosti závislý na podmínkách měření, I_A absorbovaná intenzita daná rozdílem intenzit vstupujícího a vystupujícího světla, λ_E značí vlnovou délku excitačního světla.

Při vyšších koncentracích fluorescenční složky hraje roli efekt vnitřního filtru, kdy je intenzita záření v odlehlejších místech vzorku zmenšena o část, která je absorbována v excitační nebo emisní dráze. Intenzity, které dostáváme z experimentu jsou navíc úměrné spektrálním šířkám štěrbin.

Následně je uvedena důležitá charakteristika ukazující podobnost fluorescenčního a absorpčního spektra. Fluorescenční spektrum je posunuto oproti absorpčnímu spektru do vyšších vlnových délek, resp. nižších energií. Děje se tak v důsledku energetických ztrát způsobených vibrační relaxací v excitovaném stavu. Rozdíl mezi maximem prvního absorpčního pásu a maximem fluorescenčního spektra se nazývá Stokesův posuv. Vyjadřuje se zpravidla pomocí rozdílů vlnočtů, které odpovídají rozdílům vlnových délek:

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f \quad (2.8)$$

Stokesův posuv je znázorněn na obr.2.2. Na tomto obrázku je schematicky znázorněno, že absorpční a emisní spektra organických molekul bývají často zrcadlově symetrická.



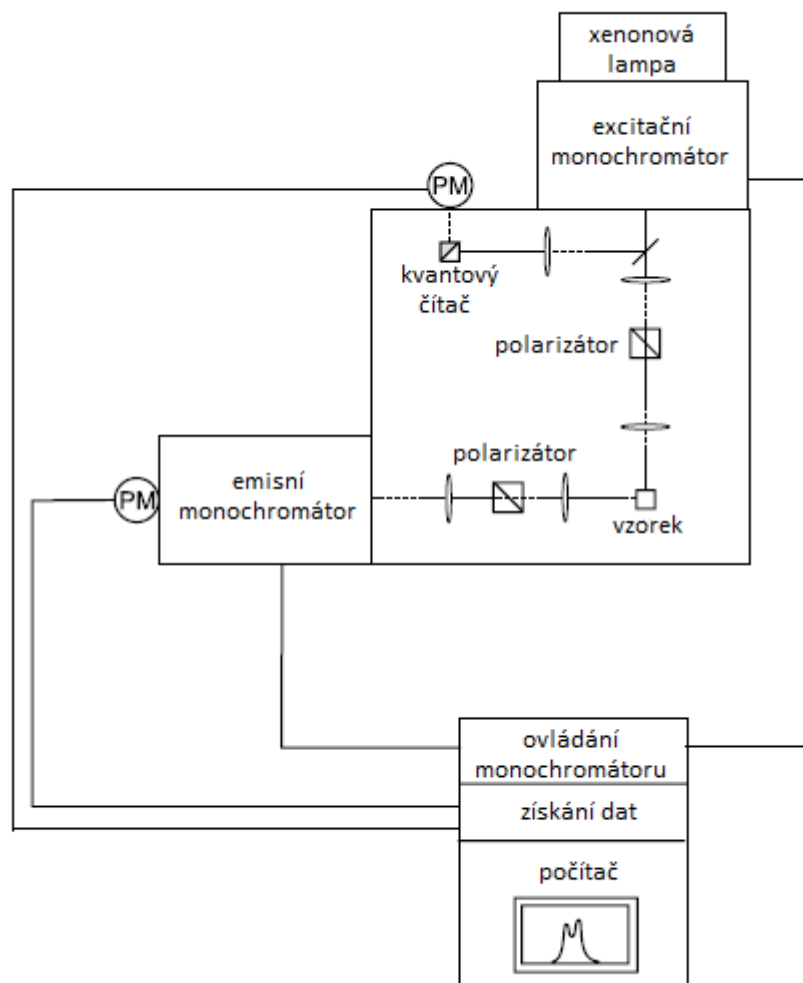
Obrázek 2.2: Stokesův posuv, převzato z [1]

2.4 Spektrofluorimetrie

Emisní a excitační spektra jsou zaznamenávána pomocí spektrofluorimetru, viz schéma na obr. č.2.3. Zdrojem excitačního světla je v našem případě xenonová lampa, která emituje záření v rozmezí od přibližně 220 nm až do infračervené oblasti. Záření prochází nejdříve přes excitační monochromátor, který vybírá excitační vlnovou délku. Následně dopadá na vzorek, nejčastěji kyvetu s roztokem. Fluorescence je poté zaznamenávána ve směru kolmém na směr šíření excitačního paprsku. Po průchodu emisním monochromátorem je její intenzita měřena fotonásobičem. Monochromátory jsou ovládány počítačem, díky čemuž je zajištěno automatické skenování vlnových délek. Pro případ měření polarizované fluorescence lze mezi vzorek a monochromátory ještě umístit polarizátory.

Před měřením se nastavuje buďto vhodná vlnová délka excitačního záření pomocí excitačního monochromátoru nebo vlnová délka na emisním monochromátoru podle toho, zda chceme měřit emisní či excitační spektrum. Dále je možné nastavit šířky štěrbin monochromátorů, které mají vliv na spektrální rozlišení a na citlivost měření. Čím jsou štěrbiny užší, tím je spektrální rozlišení lepší, ale o to menší je intenzita záření.

Před začátkem měření je nutné zkontrolovat správnost nastavení



Obrázek 2.3: Spektrofluorimetr, převzato z [1]

vlnových délek monochromátorů. Excitační monochromátor lze kalibrovat s využitím znalosti spektra xenonové lampy, které má pro vlnovou délku $\lambda = 467$ nm výrazný pík. Podobně lze kalibrovat i emisní monochromátor, který má jasný pík pro vlnovou délku $\lambda = 397$ nm.

Pro získání uspokojivých a dále použitelných výsledků je třeba provést korekci naměřených spekter, které jsou zkresleny výše vyjmenovanými způsoby.

Nepřesnost excitačních spekter je dána změnami intenzity excitačního světla plynoucích ze závislosti intenzity výbojky na vlnové délce a na efektivitě excitačního monochromátoru. Data měřená kvantovým čítačem umožňují korigovat vliv obou těchto efektů. Poměr fluorescenčního signálu měřeného fotonásobičem ku signálu z kvantového čítače nebo fotodiody jako funkce excitační vlnové délky v principu zajišťuje správné excitační spektrum, viz [1].

Emisní spektra jsou ovlivněna fotonásobičem a závislostí emisního monochromátoru na vlnových délkách. Potřebné korekce jsou dodávány výrobcem.

Pro získání co nejlepších fluorescenčních spekter je třeba používat málo koncentrované roztoky, aby se co nejméně projevil efekt vnitřního filtru. V opačném případě je nutné měřená spektra na tento efekt korigovat.

Jako shrnutí lze uvést, že fluorimetrie je velmi citlivá metoda. Měření je ale zkomplikováno několika příčinami:

- závislost vlnových délek na: intenzitě výbojky, efektivitě monochromátorů nebo na citlivosti detekce
- polarizace světla
- ovlivnění signálu odraženým a rozptýleným světlem.

3. Kvasinky

3.1 Základní charakteristiky a rozdělení

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy rostlinného typu, viz např. [2]. Patří mezi vyšší houby a zpravidla bývají jednobuněčné. V procesu zvaném kvašení spotřebovávají uhlík. Žijí ve vodném prostředí s dostatkem kyslíku a živin. Utvářejí kolonie, které sedimentují na povrchu pevného média.

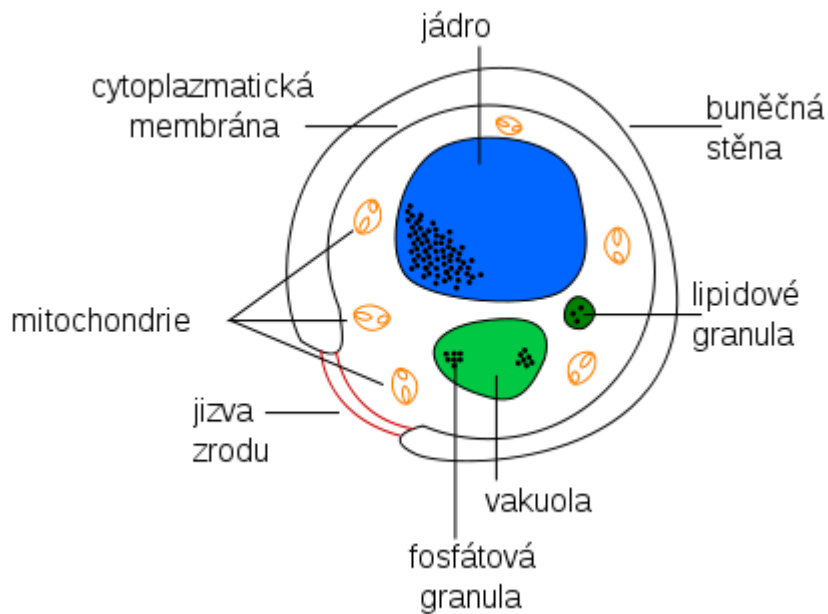
Rozměr kvasinek se pohybuje v rozmezí 3 – 15 μm . Rozmnožují se pučením, což spočívá ve vytvoření pupenu na mateřské buňce, rozdělení buněčných organel včetně jádra a jejich následném přestěhování do pupenu. Poté vzniká plasmatická membrána a buněčná stěna a dochází k oddělení dceřiné buňky.

Je výhodné se zabývat právě kvasinkami, protože jsou relativně jednoduché a lze z jejich vlastností vyvodit mnoho užitečného pro člověka. Podstatné množství informací o kvasinkách bylo objeveno s využitím kvasinky *S. cerevisiae*. Tato kvasinka je významný modelový organismus z několika důvodů: rychle se množí, je možné s ní zacházet mikrobiologickými metodami, a dají se z ní připravit různé mutantní kmeny. Ty lze křížit a analyzovat po genetické stránce. Ukázala se např. analogie se savčí buňkou. Kvasinka *S. cerevisiae* byla použita i pro naše účely.

3.2 Struktura kvasinky

Buňka kvasinky je typická eukaryotní buňka, jejíž vnitřní obsah je rozdělen do různých částí a od vnějšího prostředí oddělen povrchovými konstrukcemi. Její struktura, schematicky znázorněná na obr.3.1 , zahrnuje:

- buněčnou stěnu, neboli pevnou strukturu na povrchu kvasinky složenou z polysacharidů a z proteinů, která plní ochrannou a podpůrnou funkci, jsou na ní patrné jizvy po pučení a hraje roli při shlukování buněk
- pouzdro, což je síť polysacharidových mikrofibril vycházejících z buněčné stěny, nevyskytuje se u všech druhů kvasinek a je-



Obrázek 3.1: Struktura kvasinky, převzato z [3]

ho funkce zatím není zcela jasná, ale pravděpodobně souvisí s přežitím kvasinky v nepříznivých podmínkách

- plasmatickou membránu, která ohraničuje buňku a skládá se z lipidové dvojvrstvy obsahující ukotvené proteiny
- jádro, které má řídicí úlohu, nachází se ve středu buňky a obsahuje jadérko v němž jsou prekursori ribosomální RNA
- mitochondrie, kde vzniká energie ve formě ATP využitelná v celé buňce; jejich vlastnosti v buňce kvasinky závisí na různých genetických faktorech nebo např. na růstové fázi
- vakuolu, představující zásobárnu látek; u kvasinky jak počet, tak velikost vakuol závisí na různých faktorech
- peroxisomy, což je typ organel, které obsahují nejrůznější enzymy
- cytoskelet, představující proteinová vlákna; má podpůrnou funkci, transportuje látky a hraje roli při buněčném dělení.

Vzhledem k malým rozměrům kvasinek je většinou nutné používat k měření jejich membránového potenciálu nepřímé metody, např. fluorescenční sondy. Použití mikroelektrod by mohlo vést ke zničení nebo poškození kvasinek.

V prováděných experimentech byly použity kvasinky *S. cerevisiae* a to konkrétně kmen US a mutantní kmeny AD 1-3, AD12 a AD13. Mutantní kmeny *S. cerevisiae* se liší tím, jaké Multi Drug Resistance (MDR) proteiny byly vymazány z jejich genu. MDR proteiny jsou typ membránových proteinů, které odstraňují cizorodé látky z buněk, a ty se tak stávají odolné vůči řadě různých látek. Kvasinky US jsou jako jediné z použitých kmenů v tomto ohledu nezměněné. Kmen AD1-3 neobsahuje pumpu Pdr5p, Snq2p a Yor1pz, kmeny AD12 obsahují Pdr5p a AD13 mají Snq2p, viz [7].

4. Materiály a metody

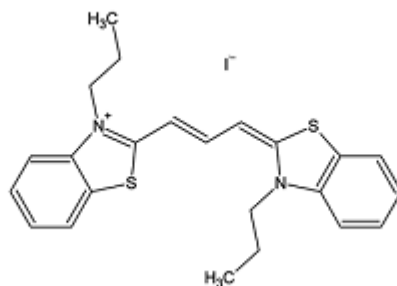
4.1 Materiály

Jako fluorescenční sondy byla použita dvě karbocyaninová barviva diS-C₃(3) a diS-C₃(5), často označované pod stejným chemickým názvem: 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, dle [4]. diS-C₃(3), neboli 3-propyl-2-[3-[3-propyl-2(3H)benzothiazolylidene]-1-propenyl]benzothiazolium iodide, má sumární vzorec C₂₃H₂₅IN₂S₂, molekulovou hmotnost 520,49, CAS no. 53336-12-2, Sigma-Aldrich katalog no. 318434. diS-C₃(5), neboli 3-propyl-2-[5-[3-propyl-2(3H)benzothiazolylidene]-1-propenyl]benzothiazolium iodide, má sumární vzorec C₂₅H₂₇IN₂S₂, molekulovou hmotnost 546,53 CAS no. 53213-94-8 a Sigma-Aldrich katalog no. 43608. Strukturální vzorce sond jsou znázorněny na obr.7.1 a 7.2. V liposomech se váží nekovalentně do nepolárních částí membrány, zatímco v celých buňkách dominuje jejich vazba na proteiny v cytosolu. Obě uvedená barviva patří do kategorie sond s pomalou odezvou, viz [6]. Jejich transmembránová distribuce je doprovázena fluorescenčními změnami.

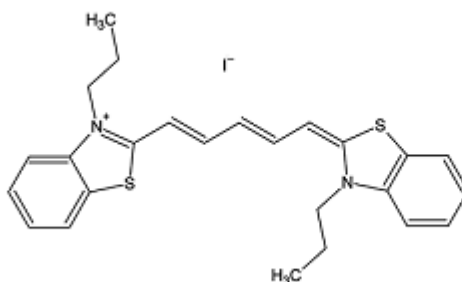
Dá se také říci, že to jsou ionty, které vstupováním do buněk reagují na aktuální membránový potenciál, přičemž rovnováhy je dosaženo během několika minut. Ukládání barviva uvnitř buněk a následující vazba na proteiny vyvolává změnu spektrofluorescenčních parametrů. Je však nutné pracovat jen s malými koncentracemi barviva, aby se zamezilo nejednoznačným výsledkům plynoucích z vytváření agregátů barviva uvnitř buněk. Dále je vhodné vedle intenzity brát v úvahu i tvar a další charakteristiky fluorescenčního spektra.

Fluorescenční sondy zakoupené od společnosti Fluka byly přidávány do vzorků ve formě 20 μM roztoku s ethyl alkoholem pro UV spektroskopii. V příloze je pro zajímavost uvedena molekulárně-dynamická simulace pronikání sond buněčnou membránou.

Dále byly použity následující chemikálie: kyselina citronová a D-glukóza - Penta (Česká republika), kvasinkový extrakt a chlorid draselný - Fluka, cholin chlorid - Sigma, pepton - Sigma, citrát-fosfátový (CP) pufr (hydrogenfosforečan sodný Na₂HPO₄ - Lachema a destilovaná voda), CCCP (karbonyl kyanid 3-chlorfenylhydrazon) - Serva, butanol - Sigma, DM-11 (dimethylaminoethyl ester s 11



Obrázek 4.1: Strukturální vzorec diS-C₃(3), převzato z [4]



Obrázek 4.2: Strukturální vzorec diS-C₃(5), upraveno na základě [4]

uhlíkovým alifatickým řetězcem) - syntetizovaný Dr. S. Wittechem, Univerzita Wroclav, albumin - Sigma , HCl - Lachema. Vyjmenované chemikálie mimo pepton (Cell Culture Tested), CCCP, DM-11 a butanol byly p.a. (pro analysis) kvality, k výzkumným účelům.

4.2 Kultivace kvasinek a příprava vzorků pro měření

Kvasinky *S. cerevisiae* včetně mutantních kmenů byly připravovány v YEPG mediu (1% extraktu kvasinek, 1% peptonu, 2% glukózy) při teplotě 30° po dobu 24 h. Do 20 ml aktuálně připraveného YE-PG média bylo přidáno 150 μM inokula a hlavní kultura rostla do 20 hodin. Následně byly buňky sklizeny a dvakrát centrifugovány. Po první centrifugaci byly promyty destilovanou vodou a po druhé rozředěny v CP pufru (pH = 6,2).

Vzorky pro měření fluorescence byly připraveny suspendováním promytých buněk v konkrétním mediu (CP pufr se 2% v.v. glukózy, plus případné reagentie, jejichž vliv na membránový potenciál byl

studován) v 1×1 cm fluorimetrické UV kyvetě (Kartell, Itálie), obsahující CP pufr s 2% glukózy, v takovém množství, aby hodnota optické hustoty (OD) měřená při vlnové délce $\lambda = 578$ nm byla v rozmezí 0,2 – 0,3. Suspenze ve fluorimetrické kyvetě byla nejprve ručně protřepána a poté bylo měřeno SFS spektrum autofluorescence, které bylo při zpracování výsledků odečítáno od spektra buněčné suspence se sondou. Po 4 minutách inkubace buněk s glukózou bylo přidáno 40 nM fluorescenční sondy a vzorek byl během 18 min čekání na ustavení rovnovážné koncentrace barviva v buňkách několikrát ručně protřepán. Následně bylo změřeno SFS spektrum (viz níže) a případně pro vyvolání depolarizace přidáno $150 \mu\text{l}$ 2M KCl a po dalších 18 min bylo spektrum měřeno znovu. V experimentech, jejichž cílem bylo monitorovat časovou závislost ukládání barviva v buňkách byla SFS spektra opakovaně měřena po 1 – 2 min.

V případě studia závislosti membránového potenciálu na pH média bylo pH buněčných suspenzí měřeno pomocí pH-metru inoLab pH 720 s SenTix 81 elektrodou, WTW, Německo.

4.2.1 Metoda synchronně skenované fluorescence

Pro měření spekter byla použita metoda synchronně skenované fluorescence, SFS. Ta spočívá v registrování intenzity fluorescence za současného skenování emisních i excitačních fluorescenčních vlnových délek, přičemž jejich rozdíl (offset, $\Delta\lambda$) zůstává konstantní, viz [4]. Pokud je offset nastaven na rozdíl mezi vlnovými délkami odpovídající maximům emisního i excitačního spektra, je pík výsledného spektra užší a má větší intenzitu než samotné emisní nebo excitační spektrum barviva, viz [5].

Ze získaných spekter metodou SES je možné kvantitativně stanovit změny membránového potenciálu buněk v jednotkách mV. K tomuto účelu je zapotřebí nejprve vyhodnotit změny poměru koncentrací sondy akumulované uvnitř buněk a nacházející se v médiu. Využívá se přitom odlišných spektrálních vlastností volného (nacházejícího se v pufru mimo buňky; příspěvek volné sondy uvnitř buněk lze zanedbat pro jejich malý relativní objem) a vázaného (uvnitř buněk na proteiny v cytosolu) fluorescenčního barviva. Rozkládáním spekter, naměřených v buněčných suspenzích, na lineární kombinaci normovaných modelových spekter fluorescence volné a

vázané sondy pak získáme poměry odpovídající relativním intenzitám příspěvků fluorescence volné a vázané sondy.

Rozklad spekter znamená fitovat experimentálně získaná SFS spektra $F(\lambda)$ do rovnice

$$F(\lambda) = AF_F(\lambda) + BF_B(\lambda) \quad (4.1)$$

kde $F_F(\lambda)$, resp. $F_B(\lambda)$ jsou spektra normalizovaná na výšku píku volného resp. vázaného barviva a A a B jsou koeficienty jejich zastoupení ve spektru $F(\lambda)$.

Naměřená spektra byla touto metodou zpracovávána programem SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., USA). Lineární rozklad spekter byl založen na fitování metodou nejmenších čtverců. Modelové spektrum $F_B(\lambda)$ bylo získáno z SES měření v roztoku s 2% albuminu. Poté byla v rámci empirických aproximací odečtena $F_F(\lambda)$ komponenta z celkového spektra. Tato procedura byla prováděna několikrát a nakonec pro další použití ve fitovacích procedurách byly brány zprůměrované hodnoty.

Pro sondu diS-C₃(3) byla již modelová spektra k dispozici, viz [5], ale pro sondu diS-C₃(5) je bylo nutné získat výše popsaným způsobem, viz 5.4.

Jelikož pro dostatečně nízké koncentrace fluorescenční sondy platí, že koncentrace vázané sondy je přímo úměrná intracelulární koncentraci volné sondy, lze tyto poměry dát do souvislosti s membránovým potenciálem pomocí Nernstovy rovnice:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[c]_{ext}}{[c]_{int}} \quad (4.2)$$

kde $\Delta\psi$ je membránový potenciál, R je plynová konstanta, T je termodynamická teplota buňky, F je Faradayova konstanta, $[c]_{ext}$ a $[c]_{int}$ jsou koncentrace volné sondy vně a uvnitř buněk, viz [4].

Výhodou SFS je, možnost monitorovat změny koncentrace vázaného barviva, jejichž znalost je nezbytná pro výpočet membránového potenciálu, přičemž není nutné buňky separovat z média nebo provádět extrakční analýzu. Dále jsou potlačeny nechtěné spektrální složky dané odraženým světlem nebo autofluorescencí buněk.

Pomocí této metody je také možné získat kvantitativní informace např. o depolarizaci membrány, což je jev, během něhož dochází k náhlé změně polarizace. Je ho možné zachytit pomocí měření časových závislostí, kde je vidět ustanovení nové rovnováhy po redis-

tribuci barviva plynoucí z vnějšího podnětu, např. ze změny vnější koncentrace iontů.

4.2.2 Spektrofluorimetr

K měření spekter byl použit spektrofluorimetr Fluoromax-3 od firmy Jobin-Yvon Horiba, USA. Rozsah detektoru byl 200 – 980 nm s přesností 0,5 nm. Integrovaný čas bylo možné nastavit od 0,001 do 160 s a délku kroku od 0,0625 do 100 nm. Bylo měřeno s 13 nm offsetem mezi λ_{ex} a λ_{em} a se šterbinami šířky 2,3 nm. Délka kroku byla nastavena na 5 nm, jen pro měření referenčních spekter vázaného barviva došlo k zjemnění na 1 nm.

Měřený spektrální rozsah se pohyboval v rozmezí 520 – 590 nm v případě sondy diS-C₃(3) a v rozmezí 600 – 720 nm u sondy diS-C₃(5). Výsledkem měření bylo 15, resp. 25 spektrálních bodů, které byly 7× naměřeny s integračním časem 0,5 s a poté zprůměrovány, aby se vylepšil poměr signálu k šumu. Zvolený postup má oproti běžnějšímu zvýšení integrační doby výhodu v tom, že výsledná spektra jsou méně ovlivněna fluktuacemi signálu spojenými se vznikem a pohybem submilimetrových bublin v buněčné suspenzi.

5. Výsledky

5.1 Excitační, emisní a synchronní fluorescenční spektra

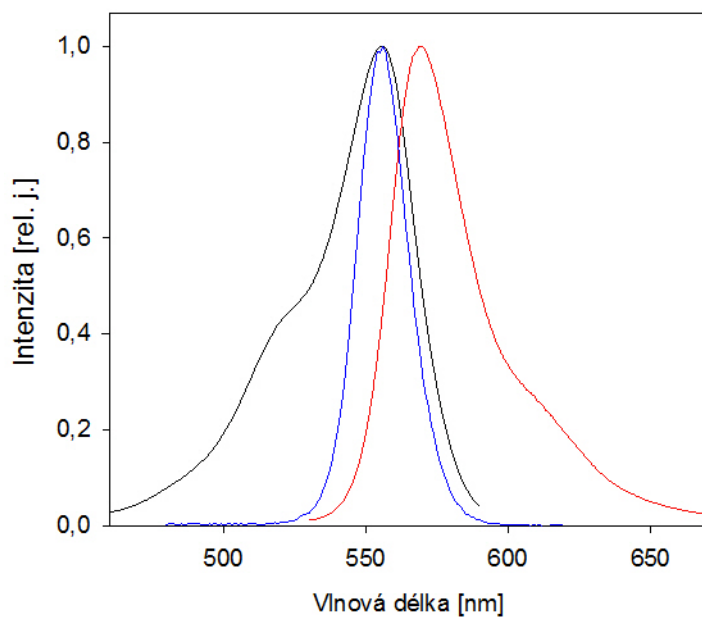
V první sadě experimentů byla jako ilustrace spektrálních vlastností použitých sond měřena excitační, emisní a synchronní fluorescenční spektra vzorku obsahujícího 1,2 μl sondy diS-C₃(3) a CP pufr. Po zkalibrování spektrofluorimetru, což předcházelo každému souboru měření, byla nejdříve pro každý typ spektra měřena pozadí v CP pufru, následně byla přidána sonda a postupně měřena všechny tři spektra. Synchronní spektrum bylo měřeno s 13 nm offsetem odpovídajícím Stokesovu posunu excitačního a emisního spektra diS-C₃(3).

Výsledky jsou uvedeny v grafu 5.1, kde jsou uvedena excitační, emisní a synchronní spektra normovaná na jednotkovou intenzitu v maximu opravená o pozadí. Z grafů je patrná zrcadlová symetrie excitačních a emisních spekter a lze si také všimnout, že pík odpovídající synchronnímu spektru je užší ve srovnání se zbylými dvěma závislostmi.

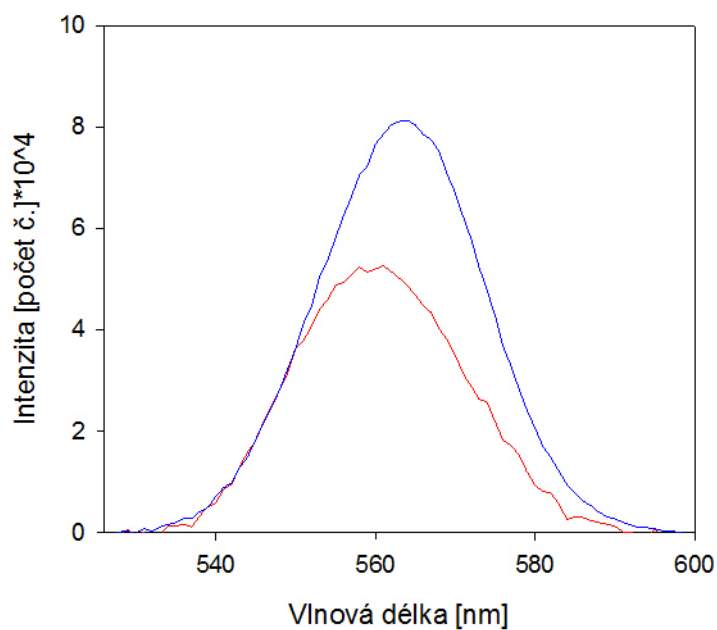
V grafu 5.2 jsou znázorněny synchronní spektra fluorescence vzorku obsahujícího 3 ml destilované vody, 30 μl buněk (OD = 0,3) a 9 μl barviva diS-C₃(3). S postupnou akumulací barviva pozorujeme posun spektra do červené oblasti k vyšším vlnovým délkám v důsledku vazby sondy na buněčné komponenty.

Po seznámení se sondou diS-C₃(3) byla zahájeny experimenty i se sondou diS-C₃(5). Jako první byla měřena synchronní spektra kvasinek *S. cerevisiae* (kmen US, doba růstu 1 den) pro hodnoty OD 0,2, 0,25 a 0,3. Výsledky jsou uvedeny v grafu 5.3. Se vzrůstajícím OD pozorujeme posun spekter do oblasti vyšších vlnových délek a zároveň pokles intenzity fluorescence. Ten není způsoben nižším kvantovým výtěžkem, neboť roli hraje strmě klesající spektrální závislost citlivosti fotonásobiče pro vlnové délky větší než přibližně 650 nm, na kterou nebyla z důvodů náročnosti udělána korekce.

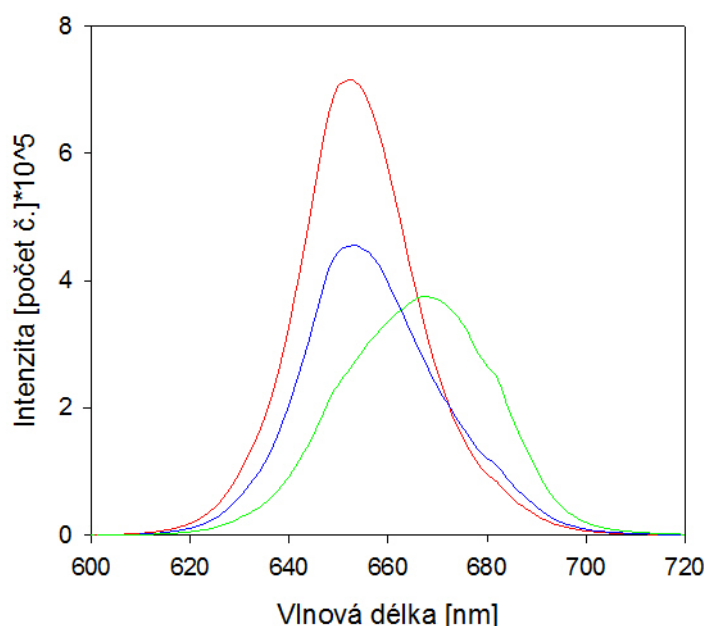
Následně byla měřena modelová fluorescenční synchronní spektra diS-C₃(5) s kvasinkami *S. cerevisiae* kmene US v roztoku s albuminem a též v pufru bez buněk. Pomocí těchto spekter byly získány



Obrázek 5.1: Excitační, emisní a synchronní spektra diS-C₃(3) v pufru normovaná na jednotkovou intenzitu v maximu. Černá čára: excitační spektrum, červená čára: emisní spektrum, modrá čára: synchronní spektrum.



Obrázek 5.2: Synchronní spektra buněčné suspenze (OD = 0,3) s 9 μ l diS-C₃(3). Červená čára: ihned po přidání sondy, modrá čára: po ustanovení rovnováhy.



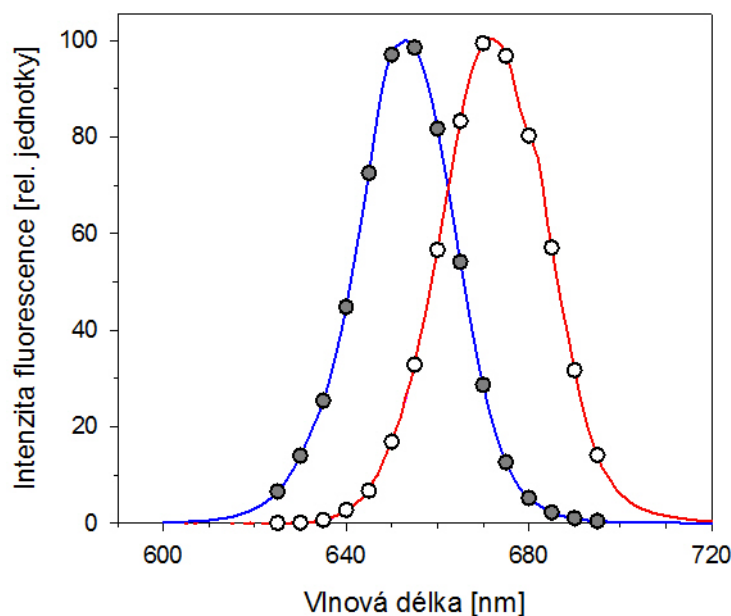
Obrázek 5.3: Synchronní spektra diS-C₃(5) roztoku s kvasinkami *S. cerevisiae* kmene US pro tři různé hodnoty OD. Červená čára: OD = 0,2, modrá čára: OD = 0,25, zelená čára: OD = 0,3.

referenční hodnoty pro rozklady spekter sondy diS-C₃(5). Procedura probíhala stejně jako pro sondu diS-C₃(3), viz [5]. Synchronní spektra sondy diS-C₃(5) byla měřena s 13 nm offsetem, jako u sondy diS-C₃(3), ačkoliv bychom správně měli brát hodnotu 15 nm. Dovolí nám to však měřit spektra obou sond zároveň. Spektra jsou uvedena v grafu 5.4.

5.2 Sledování akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v buněčném médiu

Měření časových závislostí vzorku přináší možnost sledovat ukládání barviva do buněk vedoucí k ustálenému rovnovážnému stavu. Pokud rovnováhu porušíme, např. změnou vnější koncentrace iontů, dojde k depolarizaci membrány a k následnému přechodu k rovnováze nové.

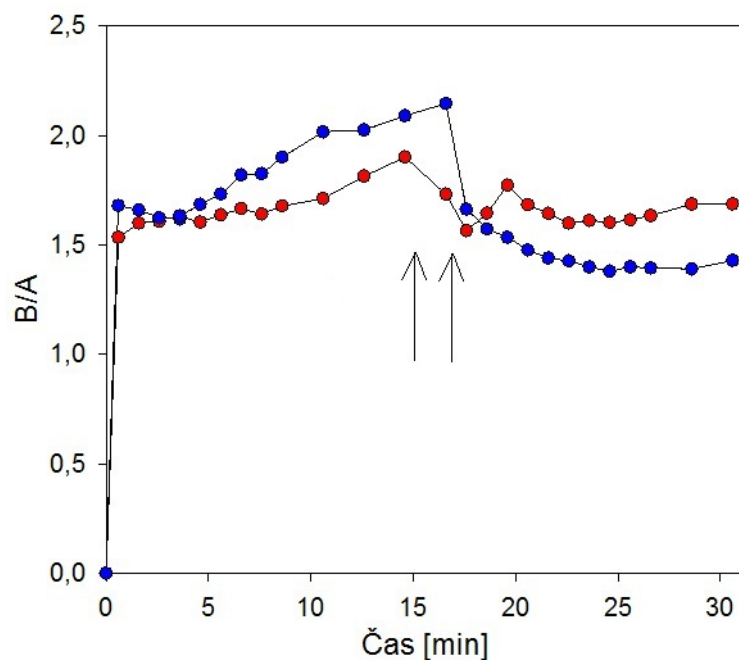
Byly provedeny řady experimentů prováděných za účelem sledování akumulace fluorescenčních sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) a jejich odezvy na depolarizaci vyvolanou 150 mM KCl při různých



Obrázek 5.4: Synchronní spektra vzorku diS-C₃(5) využité k získání referenčních hodnot pro rozklady spekter diS-C₃(5). Bílé kroužky: spektrum měřené v buněčném roztoku s albuminem, šedé kroužky: spektrum v pufru.

způsobech přidávání obou sond k buněčným suspenzím a to konkrétně: 1) odděleně ve dvou různých experimentech, 2) s oběma sondami současně, 3) s jednou sondou přidanou na začátku a druhou se zpožděním 10 min a naopak. Tyto kombinace byly opakovány pro buňky *S. cerevisiae* kmenů US (grafy 5.5, 5.6, 5.7, 5.8), AD1-3 (grafy 5.9, 5.10, 5.11) a AD13 (grafy 5.12, 5.13, 5.14, 5.15). Změny potenciálu, které nastaly po přidání 150 mM KCl shrnuje tabulka 5.1. Proškrtnutá políčka odpovídají případům kdy hodnoty nebylo možné získat z provedeného měření (např. nedošlo k ustanovení rovnováhy) a vzhledem k omezenému času, který byl k dispozici pro bakalářskou práci, se nestihlo experiment opakovat.

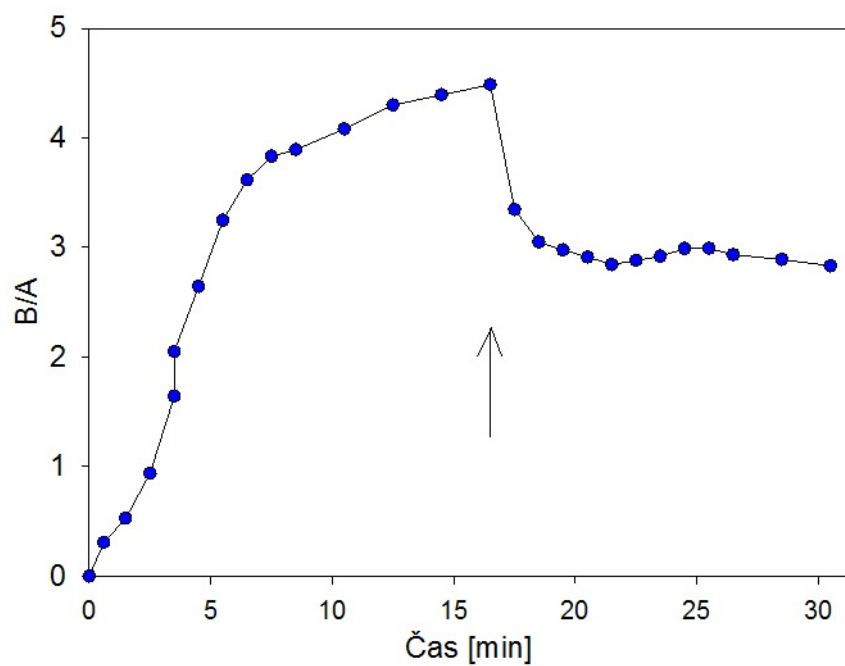
Měření probíhala postupem popsáním v kapitole 4.2. Na spektrofluorimetru byly snímány vlnové délky v rozsahu 520 - 590 nm pro sondu diS-C₃(3) a v rozsahu 600 - 720 nm pro diS-C₃(5).



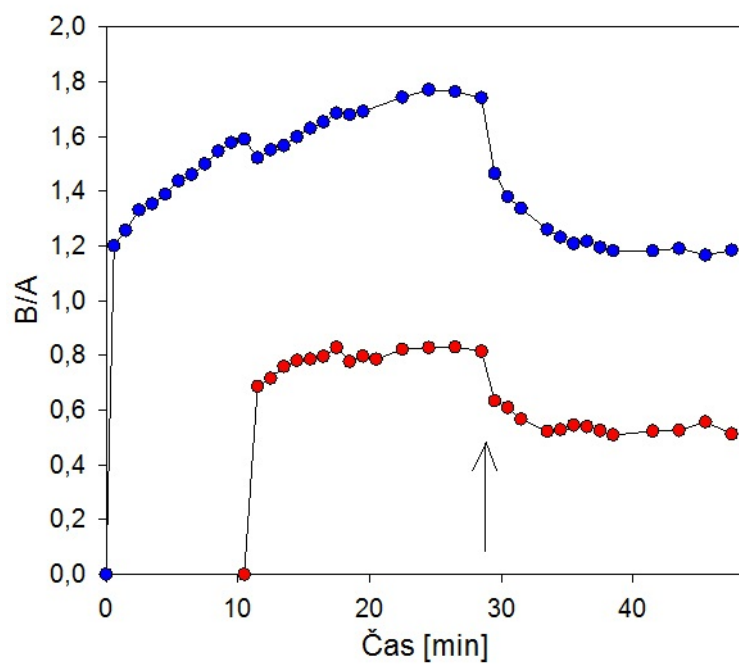
Obrázek 5.5: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen US) ve dvou oddělených experimentech: červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka vlevo značí přidání 150 mmol/l KCl do buněčné suspenze s diS-C₃(3) a šipka vpravo značí přidání 150 mmol/l KCl do buněčné suspenze s diS-C₃(5).

	separovaně		současně		diS-C ₃ (5) a po 10 min diS-C ₃ (3)		diS-C ₃ (3) a po 10 min diS-C ₃ (5)	
	diS-C ₃ (3)	diS-C ₃ (5)	diS-C ₃ (3)	diS-C ₃ (5)	diS-C ₃ (3)	diS-C ₃ (5)	diS-C ₃ (3)	diS-C ₃ (5)
US	2,5	9,7	-	10,4	11,3	10,1	12	9,6
AD1-3	-	8,0; 14,0	8,4	8,4	-	-	-	-
AD13	-	-	12,1	8,6	5,4	6,5	10,9	11,6

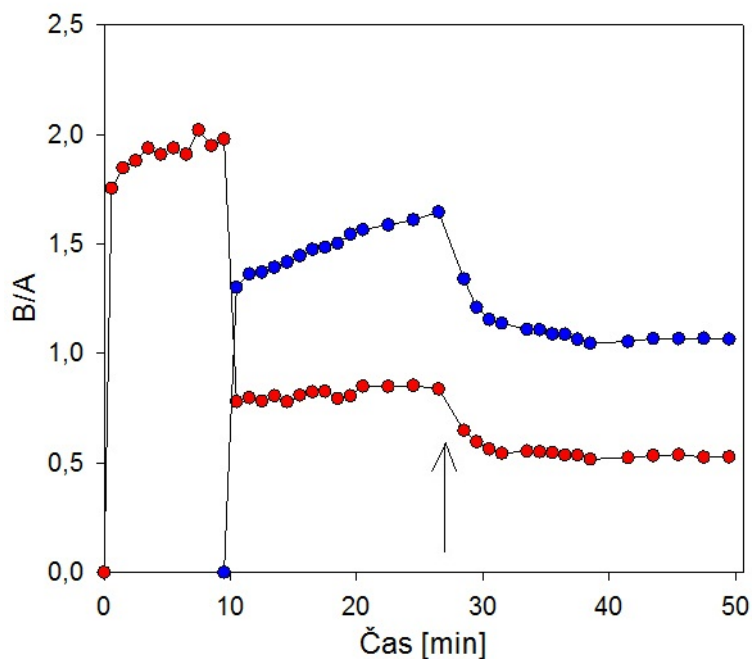
Tabulka 5.1: Hodnoty změn membránového potenciálu po přidání 150 mM KCl do buněčné suspenze.



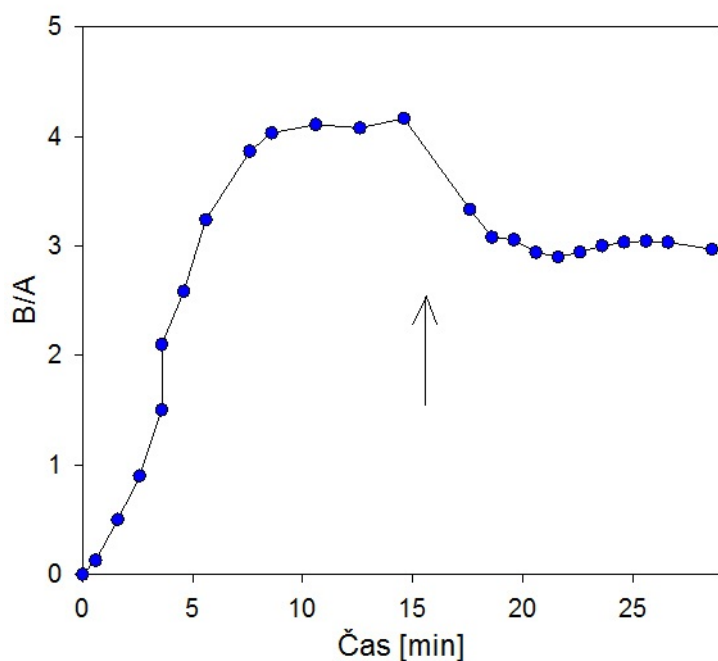
Obrázek 5.6: Časová závislost akumulace sondy diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen US), ve vzorku byla současně diS-C₃(3), která zde vzhledem k neustanovení rovnováhy není uvedena: modré kroužky - vypočítané hodnoty, šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



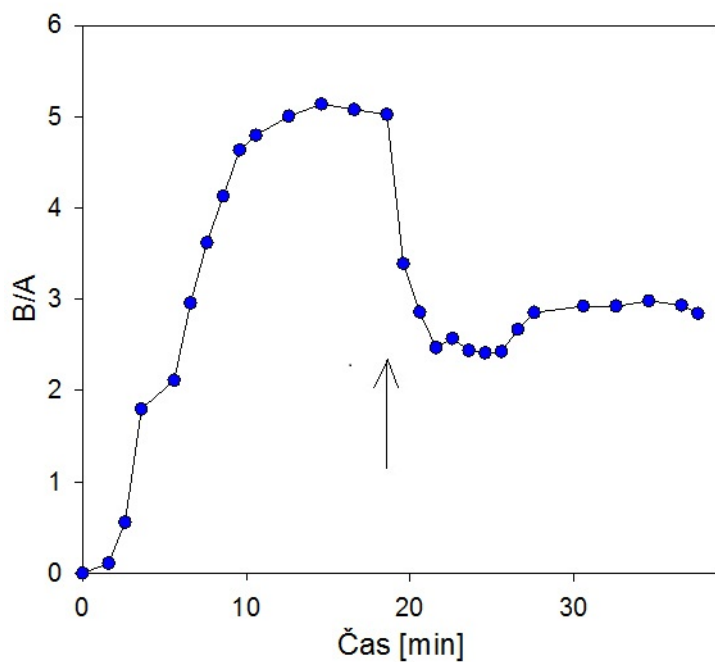
Obrázek 5.7: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen US), postupně barveno sondou diS-C₃(5) k níž byla po 10 min přidána sonda diS-C₃(3): červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



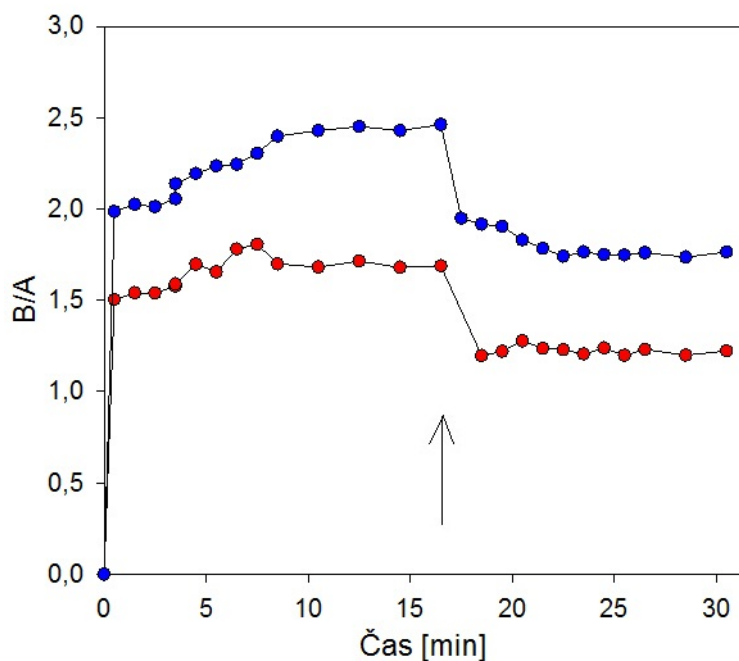
Obrázek 5.8: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen US), postupně barveno sondou diS-C₃(3) k níž byla po 10 min přidána sonda diS-C₃(5): červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



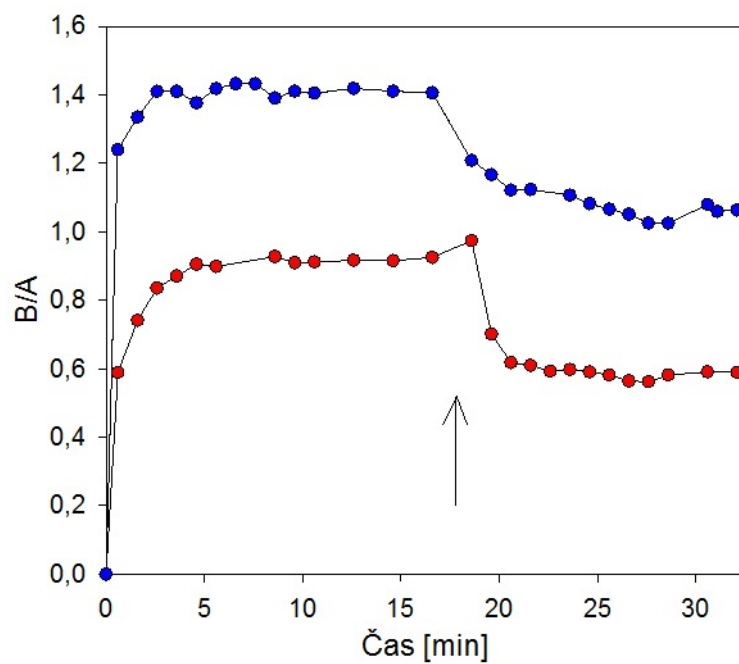
Obrázek 5.9: Časová závislost akumulace sondy diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen AD1-3): modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



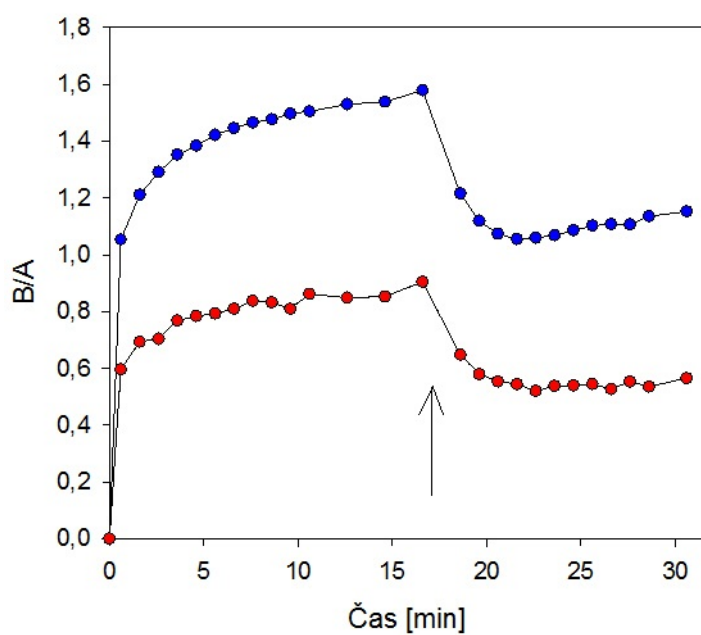
Obrázek 5.10: Časová závislost akumulace sondy diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen AD1-3): modré kroužky - vypočítané hodnoty), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



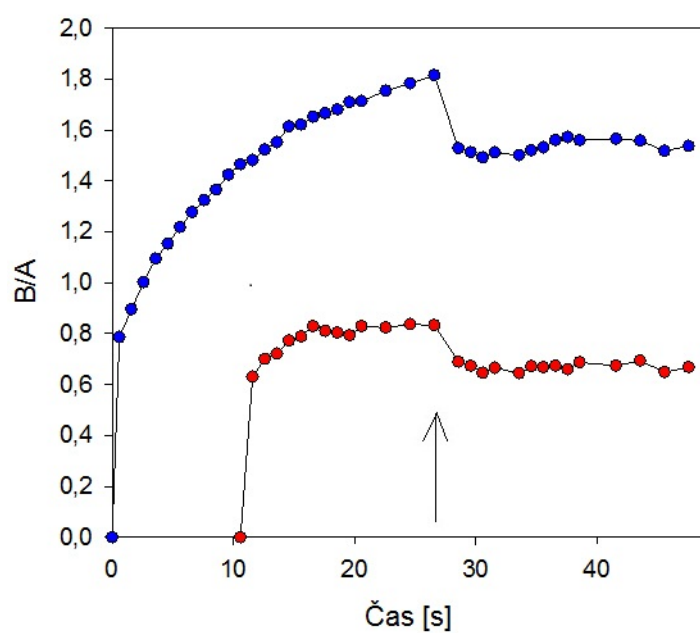
Obrázek 5.11: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen AD1-3), obě sondy přidány současně: červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



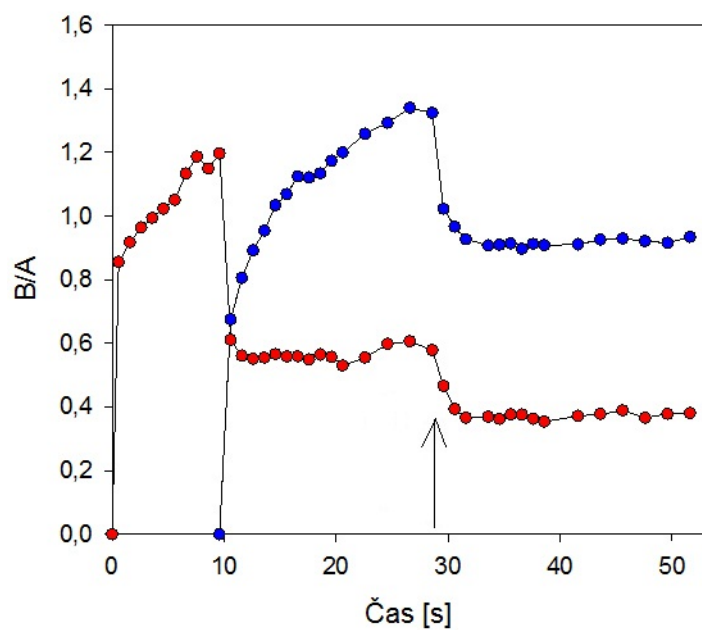
Obrázek 5.12: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kváskách *S. cerevisiae* (kmen AD13) ve dvou oddělených experimentech: červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



Obrázek 5.13: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kvasinkách *S. cerevisiae* (kmen AD13), obě sondy přidány současně : červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



Obrázek 5.14: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kváskách *S. cerevisiae* (kmen AD13), postupně barveno sondou diS-C₃(5) k níž byla po 10 min přidána sonda diS-C₃(3): červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).



Obrázek 5.15: Časová závislost akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v kváskách *S. cerevisiae* (kmen AD13), postupně barveno sondou diS-C₃(3) k níž byla po 10 min přidána sonda diS-C₃(5): červené kroužky - diS-C₃(3), modré kroužky - diS-C₃(5), šipka značí přidání KCl do buněčné suspenze (150 mmol/l).

5.3 Příklady použití fluorescenční sondy diS-C₃(3) při kvantitativním měření změn membránového potenciálu

V této kapitole jsou uvedeny výsledky sledování depolarizace buněčné suspenze vyvolané postupně látkami HCl, DM-11, CCCP, butanolem a dále odezvy na případné přidání KCl v průběhu měření. Účel experimentů byl zároveň osvojit si techniku měření změn membránového potenciálu. Uvedené látky byly vybrány z důvodu jejich použití v experimentech probíhajících v době řešení této bakalářské práce na oddělení biofyziky, FÚ UK v rámci širších experimentálních souvislostí. Experimenty byly prováděny pouze se sondou diS-C₃(3), protože na rozdíl od sondy diS-C₃(5) již byla vyzkoušena v řadě měření uskutečněných v rámci FÚ UK a existuje tedy představa, jak se chová v nejrůznějších roztocích. Kvasinky *S. cerevisiae* byly připravovány standardním způsobem popsáním v kapitole 4.2. Na spektrofluorimetru byl nastaven režim, který měřil 7 × 15 bodů, přičemž výsledné spektrum bylo průměrem těchto sedmi snímání.

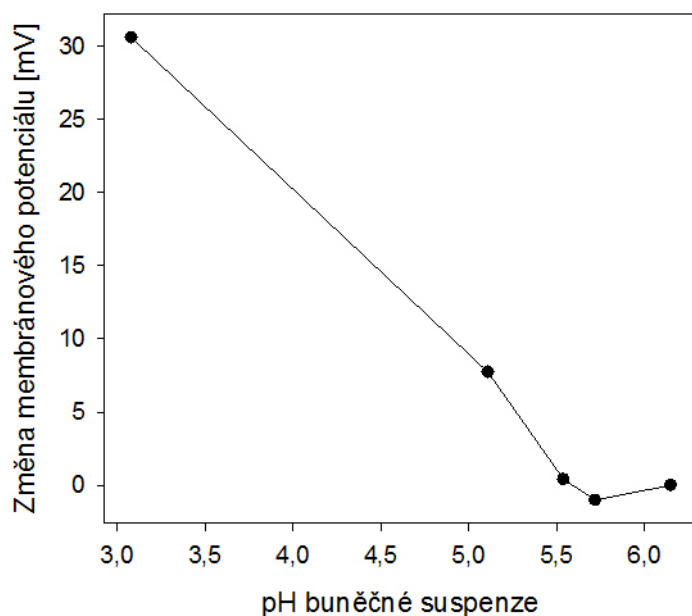
5.3.1 Depolarizace buněk *S. cerevisiae* při acidifikaci média

Fluorescenční spektra závisejí na hodnotě pH vzorku, jak je vidět z grafu 5.16, kde je znázorněna závislost změn membránového potenciálu na hodnotě pH vzorku. Je zjevné, že se vzrůstající kyselostí vzorku klesá koncentrace barviva v buňkách. Bylo připraveno 5 vzorků, každý obsahující 3 ml CP pufry, 150 μl glukózy a postupně 0, 25, 40, 55 a 70 μl 0,5 M HCl. Měření probíhalo s kvasinkami *S. cerevisiae* (OD = 0,3).

5.3.2 DM-11

DM-11 patří do skupiny lyzozomotropních látek. V buněčné suspenzi způsobuje inhibici H⁺-ATPázy, což je buněčná pumpa, která transportuje vodíkové kationty H⁺ ven z buňky, v důsledku čehož dochází k poklesu membránového potenciálu buněk.

Měření bylo uskutečněno i pro vzorek bez buněk, kde se ukázalo, že samotná fluorescence sondy není ovlivněna (výsledky neuvedeny).



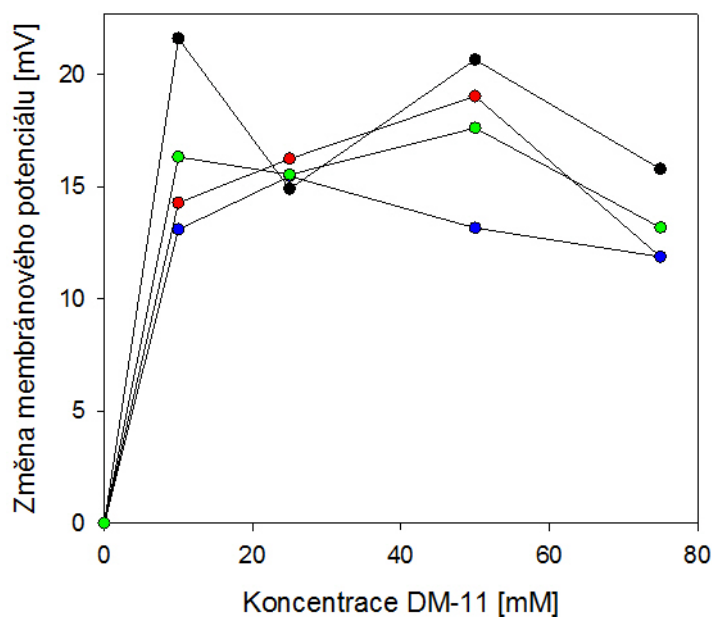
Obrázek 5.16: Depolarizace buněk *S. cerevisiae* jako důsledek acidifikace buněčného média. Černé kroužky odpovídají vypočítaným hodnotám.

Grafy 5.17 a 5.18, ukazují závislost depolarizace vzorku na různých koncentracích DM-11. Bylo měřeno s kvasinkami *S. cerevisiae* kmene AD1-3 a US. Jako referenční stav, od kterého byly odečítány změny membránového potenciálu byl brán stav s nulovou koncentrací DM-11. Hodnoty depolarizace byly vynášeny jako kladná čísla.

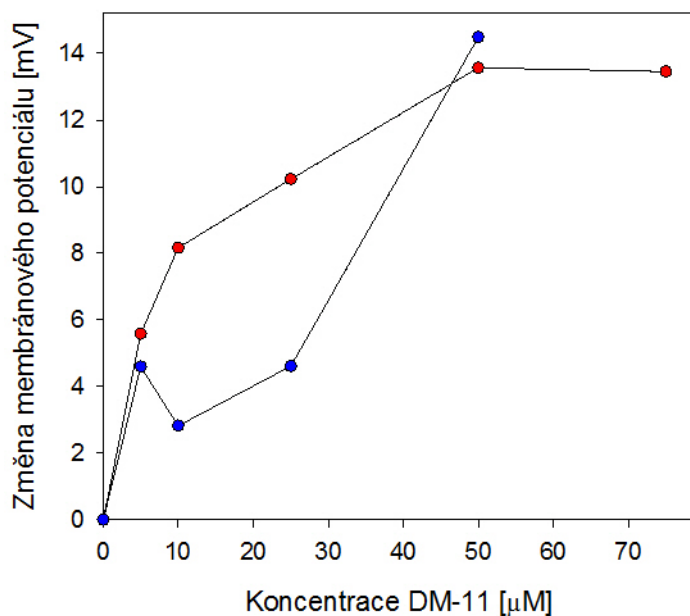
5.3.3 CCCP

CCCP je protonofor, který zkratováním protonového elektrochemického gradientu přes buněčnou membránu způsobuje depolarizaci. Pokud přidáme do buněčné suspenze s CCCP i KCl, dostaneme efekt depolarizace ještě výraznější.

Byla měřena závislost depolarizace na různých koncentracích CCCP, která je znázorněna v grafech 5.19, 5.20, 5.21 a 5.22. Měření byla uskutečněna pro různé kmeny kvasinek *S. cerevisiae*. Do vzorků připravených způsobem uvedeným v kapitole 4.2. byla po změření spektra autofluorescence přidána sonda diS-C₃(3), po 18 minutách bylo měřeno spektrum a ihned potom bylo do vzorků přidáno 150 mM KCl. Po dalších 18 min bylo spektrum změřeno znovu. Jako referenční stav byl podobně jako u DM-11 brán stav s nulovou kon-



Obrázek 5.17: Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* (kmen AD1-3) na různých koncentracích DM-11. Černé kroužky: doba růstu kvasinek $t = 20\text{h}$, $\text{OD} = 0,25$; červené kroužky: $t = 22\text{h}$, $\text{OD} = 0,21$, modré kroužky: $t = 23\text{h}$, $\text{OD} = 0,22$; zelené kroužky: průměrné hodnoty.



Obrázek 5.18: Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* (kmen US) na různých koncentracích DM-11. Červené kroužky: doba růstu kvasinek $t = 28,5\text{h}$, $\text{OD} = 0,21$; modré kroužky: $t = 7\text{h}$, $\text{OD} = 0,13$.

	depolarizace KCl [mV]	depolarizace CCCP [mV]	
		3 μ M	10 μ M
US + 150 mM KCl	-	17,9	26
US + 0 KCl	50,9	5,5	7,2

Tabulka 5.2: Závislost depolarizace na různých koncentracích CCCP a KCl v buněčné suspenzi *S. cerevisiae* (kmen US, OD = 0,2, doba růstu t = 30 h), vzorky obsahují 0 nebo 150 mM KCl.

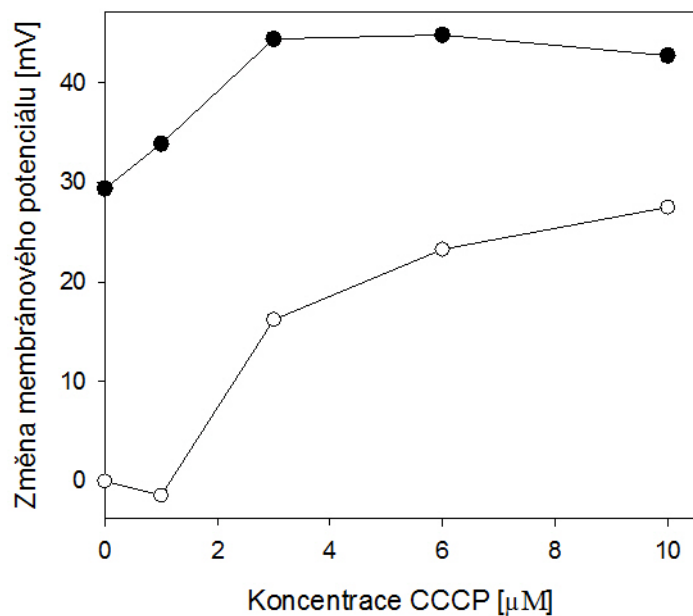
centrací CCCP.

Tabulka 5.2 udává hodnoty změn membránového potenciálu vzorku s kvasinkami *S. cerevisiae* (kmen US, OD = 0,2, doba růstu t = 30 h) a s 0 nebo 150 mM KCl. Tabulka odpovídá experimentu, ve kterém po změření pozadí a po 18 min od přidání sondy diS-C₃(3) bylo změřeno synchronní spektrum, poté bylo přidáno buď 3 nebo 10 μ M CCCP a za dalších 18 min bylo změřeno spektrum s CCCP.

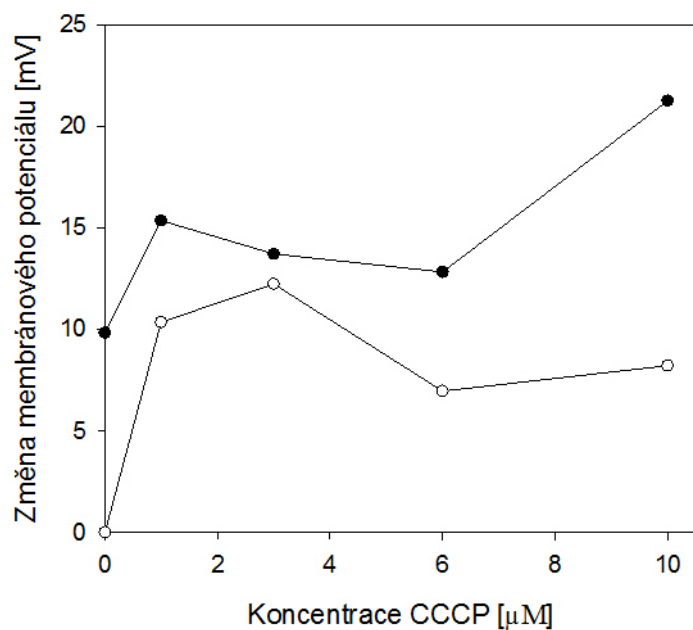
5.3.4 Butanol

Butanol je alkohol o sumárním vzorci C₄H₉OH, který v pufru s fluorescenční sondou snižuje intenzitu její volné složky a zvyšuje složku odpovídající sondě vázané v buňkách. Přidáním butanolu do buněčné suspenze proto dostáváme falešnou hyperpolarizaci, neboli falešné zvýšení membránového potenciálu, které je nutné korigovat vhodnou úpravou výsledků snižující podíl vázané ku volné složky sondy. Tuto korekci se nám však nepodařilo nalézt z důvodů velkých fluktuací intenzity fluorescence v čase.

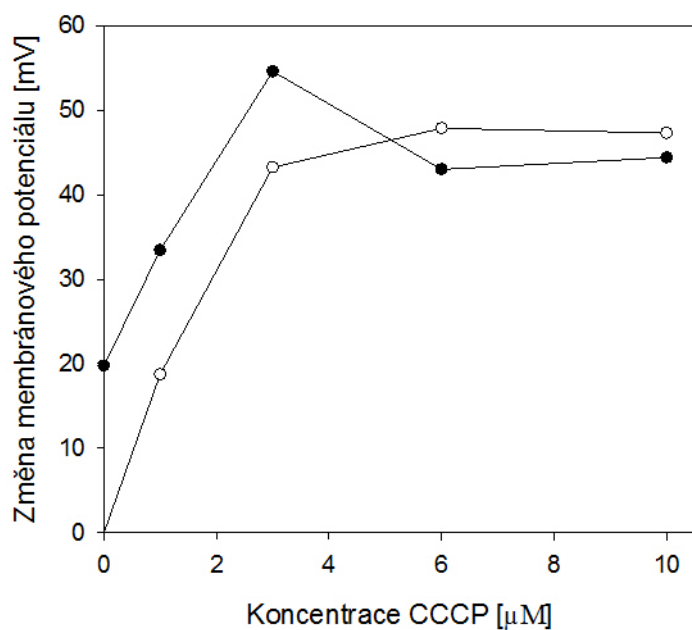
V experimentech jsme chtěli přidáním 150 mM KCl vyvolat efekt depolarizace nebo pomocí 150 mM cholinu zvýšit iontovou sílu a tím vyvolat depolarizaci. Ze získaných výsledků lze alespoň říci, že samotný cholin depolarizaci nezpůsobí (data neuvedena).



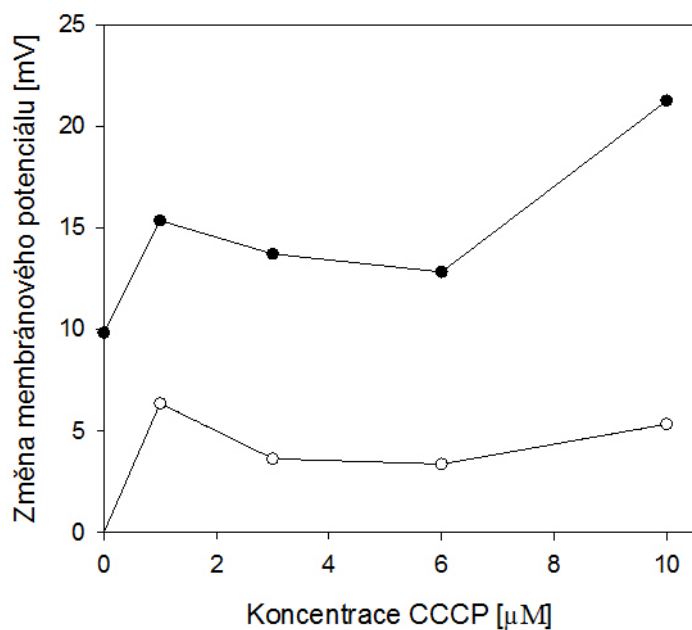
Obrázek 5.19: Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* na různých koncentracích CCCP. Bílé kroužky: US, doba růstu $t = 25\text{h}$, $\text{OD} = 0,25$; černé kroužky: US po přidání 150 mM KCl.



Obrázek 5.20: Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* na různých koncentracích CCCP. Bílé kroužky: AD1-3, doba růstu $t = 31\text{h}$, $\text{OD} = 0,23$; černé kroužky: AD1-3 po přidání 150 mM KCl.



Obrázek 5.21: Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* na různých koncentracích CCCP. Bílé kroužky: AD12, doba růstu $t = 30\text{h}$, $\text{OD} = 0,23$; černé kroužky AB 12 po přidání 150 mM KCl



Obrázek 5.22: 3) Závislost změn membránového potenciálu buněčné suspenze kvasinek *S. cerevisiae* na různých koncentracích CCCP. Bílé kroužky: AD13, doba růstu $t = 31\text{h}$, $\text{OD} = 0,25$; černé AD13 po přidání 150 mM KCl .

6. Diskuze

V průběhu všech měření bylo důležité používat stejné pufrů o stejné hodnotě pH, protože i malá změna iontové síly by mohla ovlivnit fluorescenční intenzity, potenciál na povrchu buněk je velmi citlivý na změny iontové síly buněčného média.

6.1 Sledování akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v buněčném médiu

Z experimentů zacílených na sledování akumulace sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) v buněčném médiu je patrné, že rovnováha mezi vnitřním a vnějším prostředím se ustanoví přibližně po 18 minutách od ovlivnění buněčného roztoku vnějším podnětem, v našem případě přidáním 150 mM KCl. Tento relativně dlouhý časový interval je důsledkem odstraňování sondy z buněk pomocí MDR pump a vliv má i přítomnost buněčné stěny u kvasinek *S. cerevisiae*, kterou musí částice překonávat. Oproti akumulaci je depolarizace relativně rychlý proces, jak ukazují grafy uvedené v kapitole 5.2.

Po přidání fluorescenční sondy je z některých grafů patrný relativně ostrý přechod do rovnovážného stavu bez posupného navyšování intracelulární složky barviva. To je nejspíše způsobeno špatným odhadem časové prodlevy (0,6 min) mezi přidáním sondy a zahájením měření, které samo o sobě trvalo přibližně 1 min. Smyslem těchto experimentů však nebylo sledovat, zda se různé druhy kvasinek *S. cerevisiae* barví různě rychle, ale monitorovat změny před a po přidání KCl, čemuž uvedený nedostatek nebránil.

Z grafů odpovídajícím buňkám US je vidět dobrá shoda pro obě sondy a to i při různých způsobech aplikace. Grafy odpovídající kvasinkám AD1-3 a AD13 dávají podobné hodnoty depolarizace jako kvasinky US a i u nich se hodnoty u obou sond dobře shodují, jak je nejlépe vidět z tabulky 5.1. Případné odlišnosti mohou být zapříčiněny tím, že barvivo vstupující do buněk je vzápětí odstraňováno MDR pumpami, které se liší od kmene použitých kvasinek. U mutantních kmenů, které mají vymazané některé pumpy by tedy měla být koncentrace sondy uvnitř buněk nižší, než u nezměněných kmenů. Na aktivitu pump mají vliv různé růstové fáze kvasinek,

různé kmeny narostou za stejný čas na různé hodnoty optické hustoty OD.

Vyhodnocením změn membránového potenciálu, např. z grafů 5.12 a 5.13 dostáváme rozdíl mezi oběma sondami přibližně 3 mV. Tento výsledek je v souladu faktem, že hodnoty koeficientů nebyly brány v ustáleném stavu, čemuž odpovídá chyba přibližně 15%, znamenající 4 mV. Celkově je ale vidět, že obě sondy dávají velmi podobné hodnoty a pokud se liší, pak je rozdíl ve většině případů způsoben právě popsáním nedostatkem.

V grafech 5.8 a 5.15 je vidět ostrý skok depolarizace sondy diS-C₃(3) ihned po přidání diS-C₃(5). To souvisí s Försterovým přenosem excitační energie vznikajícím v důsledku dipól-dipólové interakce fluorochromů, pokud jsou v těsné blízkosti, např. navázané na stejný protein. Dochází k potlačení vázané složky diS-C₃(3) v důsledku navázání sondy diS-C₃(5).

Z grafů 5.7, 5.13, 5.14 a 5.15 se zdá, že sonda diS-C₃(3) dosahuje dříve rovnováhy než sonda diS-C₃(5). Tomu nasvědčují i tři grafy, kde je znázorněna jen diS-C₃(5). Zachycená akumulace je relativně pomalá, přičemž tak pozvolný průběh pro diS-C₃(3) naměřen nebyl. Znamenalo by to, že sonda diS-C₃(3) je z buněk méně odstraňována buněčnými pumpami. Navíc u sondy diS-C₃(5) vychází téměř ve všech případech vyšší poměr B/A vázané ku volné složce barviva.

Uskutečněné experimenty naplňují naše očekávání ohledně podobných výsledků od obou sond. Pro potvrzení pozorované shody je však nutné opakováním experimentů získat větší statistický soubor.

6.2 Příklady použití fluorescenční sondy diS-C₃(3) při kvantitativním měření změn membránového potenciálu

Z důvodu zajištění ustáleného stavu byla spektra měřena vždy po 18 min od přidání fluorescenční sondy nebo od vyvolání depolarizace.

Výsledky měření depolarizace vyvolané změnami pH odpovídají výsledkům z měření s kvasinkami *Rhodotodula glutinis*, viz [4], hodnota depolarizace je ale o polovinu menší.

Výsledky měření s DM-11 v grafu 5.17 nejlépe ukazují, že pro nenulové koncentrace DM-11 hodnota depolarizace velmi rychle vystoupá na hodnotu kolem 17 mV a poté zůstává téměř konstantní i pro vyšší koncentrace DM-11. V grafu 5.18 není uvedena závislost, jejíž hodnoty depolarizace vyšly přibližně dvakrát větší než u zbylých dvou vyobrazených měření, což jsou příliš vysoké hodnoty vzhledem k tomu, že podmínky experimentů se výrazně nelišily. Tento výsledek, jenž nebyl víckrát pozorován, považujeme za chybu v realizaci konkrétního experimentu, jejíž příčinu se nám nepodařilo odhalit.

Experimenty s CCCP daly obdobné výsledky. Při hodnotách koncentrace CCCP kolem $3 \mu\text{M}$ začíná být hodnota depolarizace konstantní a to i po přidání KCl, který však absolutní hodnotu depolarizace zvyšuje přibližně o 10 mV. V grafu 5.19 je naznačeno, že pro vyšší hodnoty koncentrace CCCP se k sobě hodnoty změn membránového potenciálu kvasinek s a bez KCl začínají přibližovat. Z tabulky 5.2 je vidět, že depolarizace způsobená KCl dominuje depolarizaci vyvolané CCCP.

7. Závěr

Práce nejdříve v teoretickém úvodu seznamuje se základními poznatky o fluorescenci na úrovni atomů a elektronových přechodů, s vlastnostmi absorpčních a emisních spekter, s fluorimetrií a na konec s biologií kvasinek.

V praktické části byla věnována velká pozornost srovnání akumulace použitých fluorescenčních sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5). Z několika sérií měření s kvasinkami *S. cerevisiae* a jejich mutantními kmeny bylo zjištěno, že i fluorescenční sonda diS-C₃(5) dává podobné výsledky jako již známá sonda diS-C₃(3), které jsou použitelné a prakticky ekvivalentní pro měření depolarizace buněk.

Dále byl sledován vliv látek DM-11, CCCP a butanolu na membránový potenciál buněk a reakce na následné přidání KCl. Ačkoliv pro efekt butanolu nebyla nalezena korekce, buněčné suspenze s diS-C₃(3) a DM-11 nebo CCCP dávaly uspokojivé výsledky, kdy hodnoty depolarizace byly již od nízkých koncentrací látek přibližně konstantní. Efekt depolarizace způsobený KCl byl výraznější, než při použití DM-11 nebo CCCP.

Použitá metoda synchronně skenované fluorescence se osvědčila jako účinný nástroj fluorescenční spektroskopie. Získaná spektra vedou na kvantitativní určení změn membránového potenciálu, ačkoliv přímé hodnoty membránového potenciálu získat nelze. Výsledky se obecně ukázaly jako dobře reprodukovatelné a resistantní vůči změnám výchozích podmínek v prezentovaném rozsahu. Nelze však srovnávat změny membránového potenciálu mezi různými druhy kvasinek nebo mezi kvasinkami pěstovanými pod různými podmínkami.

Seznam použité literatury

- [1] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: Principles and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBNs: 3-527-60024-8.
- [2] JANDEROVÁ, Blanka, BENDO VÁ, Olga. *Úvod do biologie kvasinek*. Nakladatelství Karolinum, Praha 1999.
- [3] WIKIPEDIA, Kvasinka, [online]. [http :
//upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Yeast_cell
_cs.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Yeast_cell_cs.svg).
- [4] PLÁŠEK, Jaromír, GÁŠKOVÁ Dana, LICHTENBERG-FRATÉ, Hella, HÖFER Jost Ludwig Milan. *Quantitative Assessment of Membrane Potential Changes by Fluorescent Probe in Yeast*. J. Bioenerg. Biochem. 2012, zasláno do tisku.
- [5] PLÁŠEK, Jaromír, GÁŠKOVÁ Dana, VEČEŘ, Jaroslav, SIGLER Karel. *Use of Synchronously Excited Fluorescence to Assess the Accumulation of Membrane Potential Probes in Yeast Cells*. Folia Microbiol. 45 (3), 225-229 (2000), [http: //www. biomed, cas. cz/mbu/fovia/](http://www.biomed.cas.cz/mbu/fovia/)
- [6] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurověděch*, [online]. [http :
//www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm](http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm), 2003.
- [7] MOQUIN, Kamila. *Závislost poškození kvasinkové buňky chemickým stresem na stavu buněčného obranného systému: MDR pump*. Praha, 2004. Disertační práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy. Vedoucí disertační práce Assoc. Prof. RNDR. Dana Gášková, CSc.
- [8] . PLÁŠEK, Jaromír, SIGLER Karel. *Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis*. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 33 (1996) 101-124.

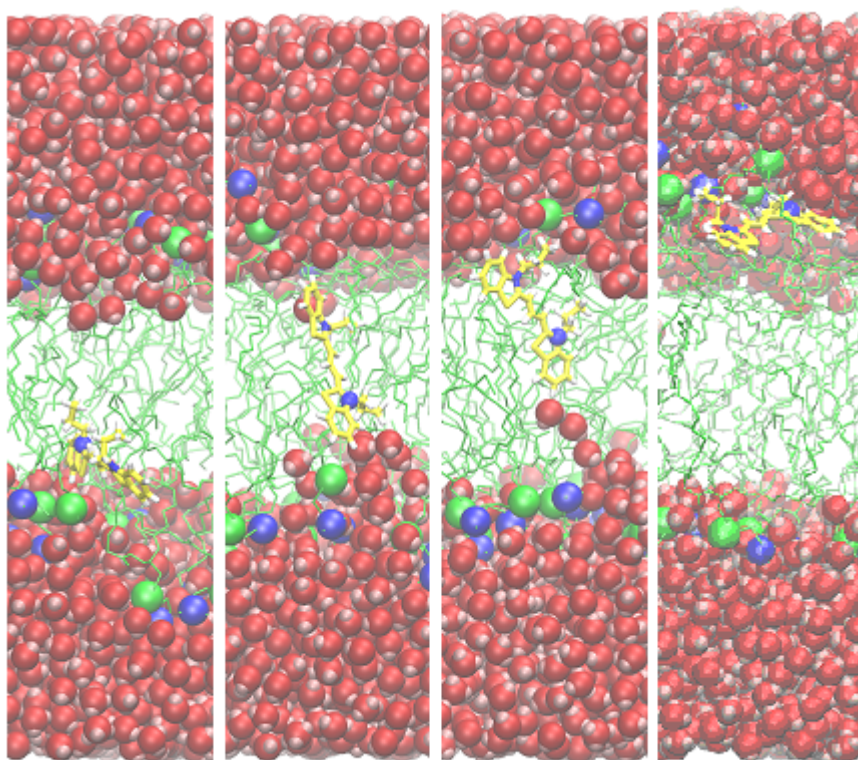
Přílohy

1. Molekulárně-dynamická simulace

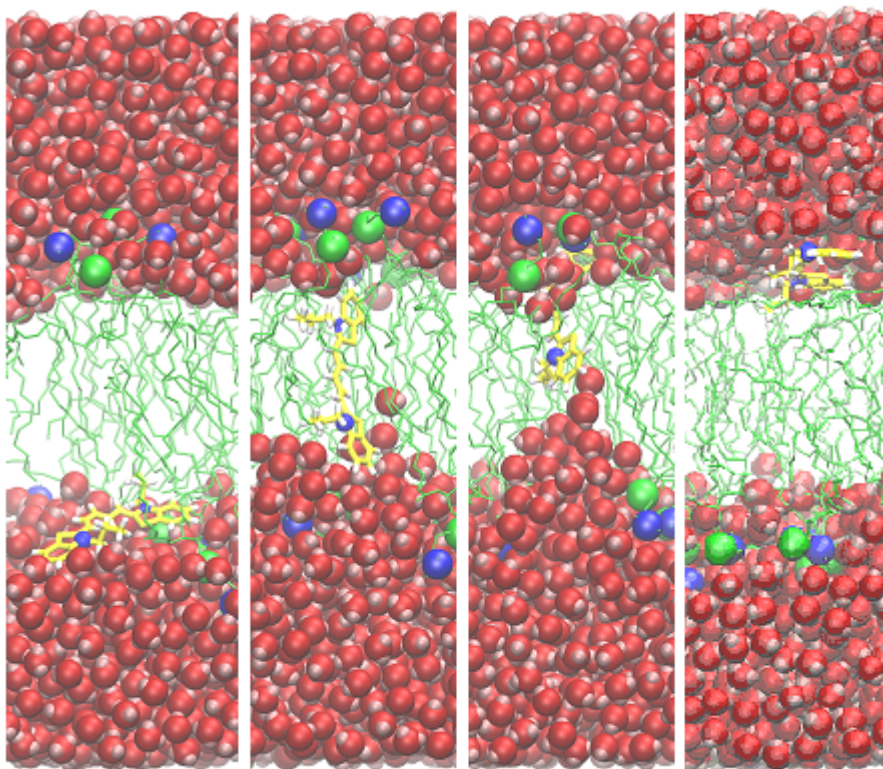
Jako zajímavost uvádíme vybrané snímky z molekulárně-dynamické simulace pronikání fluorescenčních sond diS-C₃(3) a diS-C₃(5) buněčnou membránou, viz 7.1 a 7.2. Simulace pro obě sondy vyšly velmi podobně. V oblastech poblíž rozhraní voda – membrána preferují sondy orientaci rovnoběžnou s povrchem membrány. Uvnitř membrány se sondy reorientují kolmo k povrchu membrány, do které vstupují nejprve jejich nenabitě hydrofobní části. Hydrofilnější části sond (odlišeny prostřednictvím dusíkového atomu zobrazeného jako kulička) nesoucí náboj +1 setrvává déle v kontaktu s rozhraním voda – membrána. Při dalším pohybu sond směrem nahoru je v důsledku toho následují molekuly vody vzájemně interagující prostřednictvím vodíkových vazeb. Po průchodu sond membránou se u rozhraní s vodou sondy opět reorientují rovnoběžně s povrchem membrány. Uvnitř vodní obálky jsou orientace sond zcela náhodné.

Lokalizace sondy v membráně však hraje roli hlavně u liposomů, na rozdíl od celých buněk.

Použitý software: ChemBioOffice a VMD (příprava simulovaného systému), NAMD a ACEMD (molekulárně-dynamické simulace). Pro fluorescenční sondy byly nezbytné silové konstanty vygenerovány prostřednictvím modulu Antechamber/AMBER a silového pole GAFF. Pro zbytek simulovaného systému bylo použito silového pole CHARMM.



Obrázek 7.1: Molekulárně-dynamická simulace pronikání sondy diS-C₃(3) buněčnou membránou (modelovým fragmentem fosfolipidové dvojvrstvy POPC).



Obrázek 7.2: Molekulárně-dynamická simulace pronikání sondy diS-C₃(5) buněčnou membránou (modelovým fragmentem fosfolipidové dvojvrstvy POPC).