

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Radka Mužíková

***Mikroskopická měření
vnitrobuněčného pH kvasinek***

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí diplomové práce: *Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.*

Studijní program: *Biofyzika a chemická fyzika*

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. za podnětné, obětavé a trpělivé vedení mé diplomové práce. Dále vyjadřuji své díky Doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc. za pomoc s řešením problémů a Doc. RNDr. Daně Gáškové, CSc. za neocenitelné rady především v oblasti pěstování kvasinek.

Dále nemohu opomenout Mgr. Hanku Drápalovou, které vděčím za úvod do oblasti mikrobiologie a za užitečné rady a pomoc v mikrobiologické laboratoři. Stejně tak nemůže zůstat nezmíněna nezištná pomoc Mgr. Jana Maláče a Mgr. Tomáše Hendrycha, kteří mi trpělivě pomáhali řešit mnohé problémy v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své spolubydlící slečně Michaele Radové za pomoc s řešením rozličných problémů během sepisování práce.

Chtěla bych také poděkovat Nadaci nadaných za finanční podporu mého studia.

Závěrem bych chtěla vyjádřit dík všem lidem, kteří jakýmkoli způsobem přispěli k vzniku této práce a umožnili mi se věnovat dané problematice.

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

V Praze dne 19. 4. 2006


Radka Mužíková

Obsah

ÚVOD.....	5
1.1. KVASINKY JAKO MODELOVÝ SYSTÉM.....	5
1.1.1. <i>Struktura kvasinkové buňky</i>	5
1.1.2. <i>Rozmnožování a růst kvasinek</i>	9
1.1.3. <i>Publikované výsledky měření vnitrobuněčného pH</i>	12
1.2. FLUORESCENCE	14
1.2.1. <i>Fluorescenční sondy</i>	16
1.2.2. <i>Měření fluorescenční odezvy</i>	19
1.2.3. <i>Metody barvení buněk</i>	21
1.3. CÍLE PRÁCE	23
EXPERIMENTÁLNÍ METODY A MATERIÁL.....	24
2.1. POUŽITÝ MATERIÁL	24
2.1.1. <i>Chemikálie a fluorescenční sondy</i>	24
2.1.2. <i>Použité kmeny kvasinek</i>	24
2.2. PŘÍPRAVA BUNĚK	24
2.2.1. <i>Sterilizace a skladování zásobních kultur a roztoků</i>	24
2.2.2. <i>Pěstování buněk</i>	25
2.3. BARVENÍ BUNĚK.....	27
2.3.1. <i>Zařízení na elektroporaci</i>	27
2.3.2. <i>Standardní barvení buněk</i>	27
2.3.3. <i>Barvení buněk pro kalibraci</i>	28
2.4. MĚŘENÍ NA FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPU	28
2.4.1. <i>Použité filtry</i>	29
2.5. KONTROLA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK PO ELEKTROPORACI.....	30
2.5.1 <i>Kontrola pomocí mikroskopu</i>	30

2.5.2 Výsevový test.....	30
VÝSLEDKY A DISKUSE	32
3.1. OPTIMALIZACE ELEKTROPORACE PRO KMEN IL.....	32
3.1.1. <i>Optimalizace amplitudy napětí</i>	35
3.1.2. <i>Optimalizace délky pulsu.....</i>	36
3.1.3. <i>Optimalizace počtu pulsů</i>	37
3.1.4. <i>Používané elektroporační parametry</i>	38
3.1.5. <i>Kontrola přežívání buněk.....</i>	38
3.2. VLIV VYBĚLOVÁNÍ NA EXCITAČNÍ POMĚR.....	41
3.3. MIKROSKOPICKÁ KALIBRACE PH BUNĚK KMENE IL.....	43
3.4. MIKROSKOPICKÁ KALIBRACE PH BUNĚK KMENE PD	46
3.4.1. <i>Kalibrace energizovaných buněk.....</i>	47
3.4.2. <i>Kalibrace vyhladovělých buněk</i>	48
3.5. MĚŘENÍ VNITROBUNĚČNÉHO PH BUNĚK KMENE PD.....	51
3.5.1. <i>pH cytozolu.....</i>	52
3.5.2. <i>pH vakuoly.....</i>	54
ZÁVĚR	58
LITERATURA.....	59

Title: *Microscopic measurements of the intracellular pH in yeast cells*

Author: *Radka Mužíková*

Department: *Institute of Physics of the Charles University*

Author: *Radka Mužíková*

Supervisor: *Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.*

Supervisor's e-mail address: *herman@karlov.mff.cuni.cz*

Abstract:

This report is focused on microfluorometric measurements of the intracellular pH of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*. We used IL125-2B and commercially available bakers yeast (PD) strains as test subjects. Measurements were done with pH-sensitive fluorescence probe pyranin introduced to the cells by pulse electroporation. Electroporation parameters for the both cell strains were optimized. Then we performed the microscopic calibration of pyranin by the electroporative adjustment of pH in living cells. Calibration was done on both energized and starved cells. For the PD cells we performed intracellular pH measurements. The intracellular pH of the cell grown on the liquid YEPG medium was found to be around 6.8 and the value was homogenous across the cytosol. The pH value was found to be the same both for the adult and for the budding cells. Energized cells transported pyranin to vacuoles. Vacuolar pH was different in different cells and ranged from pH 5.0 to pH 6.1. Influence of photobleaching on the measured pH values was studied as well.

Keywords: *intracellular pH, yeast, fluorescence, pyranin, vacuolar pH*

Název práce: *Mikroskopická měření vnitrobuněčného pH kvasinek*

Autor: *Radka Mužíková*

Katedra (ústav): *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí diplomové práce: *Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.*

e-mail vedoucího: *herman@karlov.mff.cuni.cz*

Abstrakt:

Tato práce se zabývá mikroskopickým měřením vnitrobuněčného pH kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pomocí fluorescenčních sond. Jako předmět studia byly zvoleny kmeny IL 125 – 2B a komerčně dostupné pekařské droždí (PD). Měření bylo prováděno pomocí pH citlivé fluorescenční sondy pyraninu, obarvení buněk bylo provedeno pomocí pulzní elektroporace. Byly optimalizovány podmínky elektroporace pro oba používané kmeny a byl zkoumán vliv efektu vybělování na výsledky měření. Byla otestována metoda mikroskopické kalibrace sondy přímo uvnitř buněk pomocí nastavení vnitřního pH pomocí elektroporace na buňkách energizovaných i vyhladovělých. Pro kmen PD bylo provedeno několik sérií měření vnitrobuněčného pH. Zjistili jsme, že pH cytozolu buněk napěstovaných v tekutém YEPG mediu je 6,8 a je velmi homogenní. Tato hodnota je shodná pro buňky dospělé i pučící. V buňkách energizovaných byl pyranin transportován do vakuol. Změřené pH vakuol buněk kmene PD se lišilo u jednotlivých buněk a jeho hodnota se pohybovala v rozmezí 5,0-6,1 pH jednotky.

Klíčová slova: *intracelulární pH, kvasinky, fluorescence, pyranin, pH vakuol*

Úvod

1.1. Kvasinky jako modelový systém

Kvasinky jsou často využívány jako modelový systém při biofyzikálních výzkumech. Jsou to nejjednodušší eukaryotní organismy, tzn. nejjednodušší organismy, které mají jednotlivé kompartmenty buňky odděleny membránou. Jde také o vůbec první organismus, u kterého byla rozluštna celá sekvence DNA, konkrétně pro *Saccharomyces cerevisiae* v roce 1996 [10]. Kvůli jejich analogii se savčími buňkami bývá předmětem studia nejčastěji metabolismus, signální dráhy, transportní mechanismy, membránový potenciál, fluidita membrány, vnitrobuněčné pH, apod.

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, velmi snadné je jejich pěstování v tekutých růstových médiích. Jedná se o dostatečně rychle se množící organismus – generační doba (doba zdvojení, zdvojnásobení počtu buněk) je přibližně 2 hodiny. Kvasinkové buňky existují v haploidním i diploidním stavu, což usnadňuje možnost mutagenese.

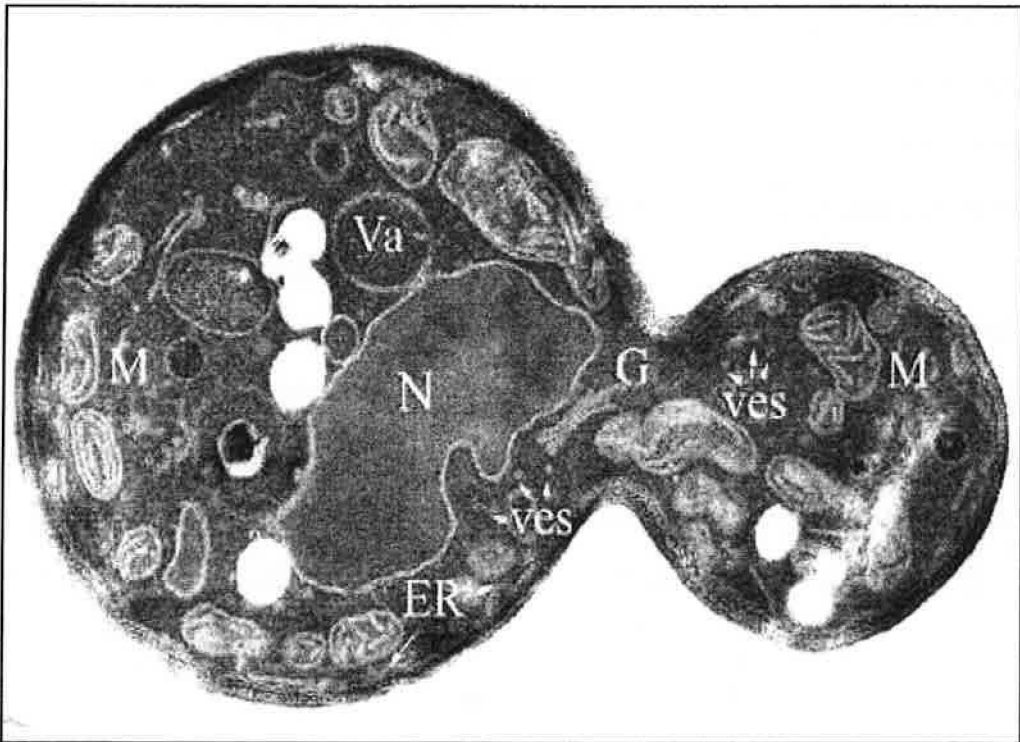
Kvasinky jsou organismy značně rozmanité – v současnosti je známo 457 druhů zařazených do 78 rodů, 15 druhů ze 4 rodů je patogenních [9].

1.1.1. Struktura kvasinkové buňky

Nejčastějším tvarem, který kvasinková buňka zaujímá, je rotační elipsoid. Tvar buňky je druhově charakteristický a závisí mimo jiného také na fázi růstu buňky. Pro *Saccharomyces cerevisiae* je typický tvar rotačního elipsoidu, délka buňky je 3-15 μm , šířka 3-4 μm , průměrný objem 175 μm^3 . Při nepříznivých podmínkách pro život buňky se zvyšuje poměr povrch/objem buňky, kdy díky relativně většímu povrchu pak buňka snáze přijímá živiny [9].

Základní části kvasinkové buňky

Základní části kvasinkové buňky jsou vyobrazeny na obrázku 1.1. Patří mezi ně především jádro, vakuola, buněčná stěna, mitochondrie a další organely popsané níže.



Obr. 1.1: Základní části kvasinkové buňky – N-jádro, M-mitochondrie, ER-endoplasmatické retikulum, Va-vakuola.

Buněčná stěna

Buněčná stěna (BS) určuje tvar buňky a chrání ji před vnějšími vlivy. Je propustná i pro velké molekuly (např. DNA), difusní rychlost molekuly buněčnou stěnou je ovlivněna velikostí molekuly.

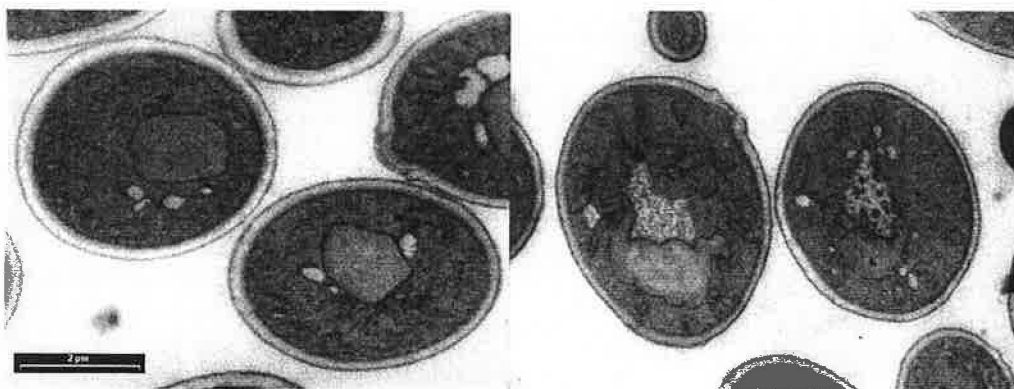
Základ buněčné stěny tvoří polysacharidy, až 80 % suché váhy, a to především glukany a manany. Glukan se vyskytuje ve dvou formách větvení ((1→6)glukan a (1→3)glukan), tyto dvě složky jsou zasítovány a tvoří základní kostru buněčné stěny. Nerovnoměrně je v buňce rozložen chinin a

to v místech jizev po buněčném dělení, viz. níže. Dále BS obsahuje proteiny, lipidy, fosfolipidy a další látky.

Buněčná stěna je záporně nabitá což umožňuje fixaci buněk na kladně nabitě povrchy. Je též značně elastická a vydrží snížení objemu buňky až o 50 %.

Tloušťka buněčné stěny je 150-400 nm a je značně závislá na kultivačních podmínkách. Jedním ze základních faktorů, které ovlivňují tloušťku BS je koncentrace glukózy v kultivačním médiu – viz obrázek 1.2. Při pozorování pod elektronovým mikroskopem se ukázalo, že při 0,2 % roztoku glukózy je stěna tenčí než při 2 %, vyšší koncentrace glukózy než 2 % však již nevedou k růstu tloušťky BS [4].

Vlastnosti BS mají za následek možné shlukování (aglutinaci, flokulaci) buněk. Zřejmě se jedná o interakci lektinového typu. V laboratorních podmínkách je tento jev nežádoucí (dochází k oddělení buněk od živného média a k chybám při měření OD), využívá se však při výrobě piva (čeření, kvasinkové buňky se po ukončení kvasného procesu uloží na dno nádoby) [9].



Obrázek 1.2: Kvasinky s různou tloušťkou buněčné stěny. Vlevo jsou kvasinky pěstované v standardním YEP médiu s 2 % roztokem glukózy, vpravo je použito totéž médium, obsah glukózy je snížen na 0,2 % roztoku. Snímky jsou pořizeny elektronovým mikroskopem.

Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je elastická membrána obklopující buňku. Propustná je pouze pro malé nenabitě molekuly, pro větší či nabitě látky je nutné využití specifických přenašečů. Membrána zabraňuje vniknutí cizorodých látek do buňky a je tak hlavní překážkou při zavádění fluorescenčních sond.

Jádro

Jádro je kulatý až laločnatý útvar, oddělený od zbytku buňky dvojitou membránou. Vlákno chromozomu, uložené uvnitř jádra, je oproti savčí DNA málo spiralizováno. Na jádru se diferencuje polární tělísko, které má vztah k tvorbě pupene. Při množení dochází u kvasinek k uzavřené mitóze, tzn. nerozpouští se jaderný obal.

Mitochondrie

Původně nejspíš nebyly součástí buňky, vznikly symbiózou s jiným organismem a kvasinkové buňky jsou dodnes schopny přežít i bez nich. Jejich hlavní funkcí je uvolňování energie uložené v ATP (dýchání) [18].

Vakuola

Vakuola je především zásobárnou živin v buňce. V počátečním stádiu života jich může buňka obsahovat více, později se však sloučí v jednu vakuolu o rozměru 0,3-3 μm . Vakuola je esenciální strukturou buňky, mutanty bez ní špatně přežívají. Její pH je nižší než pH cytozolu, přibližně 5,5 [2].

Cytozol

Cytozol je vodný roztok vyplňující vnitřek buňky, obsahuje množství rozpuštěných látek (proteiny, glykogen, makromolekuly) a také mikrozomy.

To jsou tělíska, která obsahují oxidační enzymy. Hodnota pH cytozolu se podle předchozích měření (např. [12], [15]) pohybuje v rozmezí 6,2-7,0.

Pouzdro

Kvasinkové pouzdro omezuje hydrataci buňky a její schopnost přijímat živiny. Pouzdro mají jen některé druhy kvasinek a většinou má vztah k patogenitě druhu [9].

1.1.2. Rozmnožování a růst kvasinek

Kvasinky se množí většinou pučením, některé druhy také přehrádečným dělením. Musíme rozlišovat mezi množením jednotlivých buněk a vývojem celé kultury kvasinek.

Buněčný cyklus kvasinek

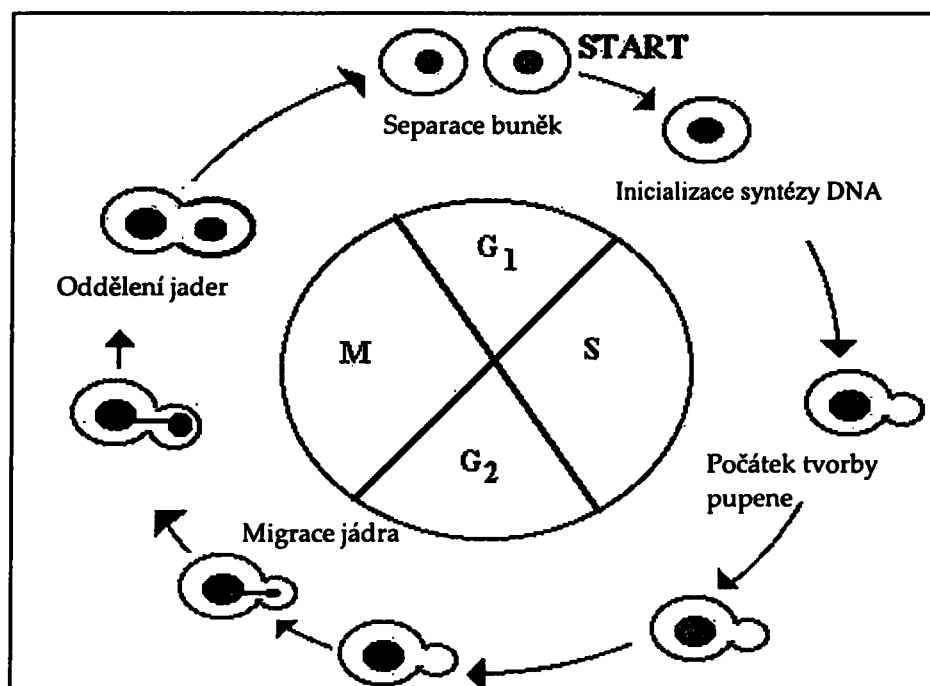
U *Saccharomyces cerevisiae* dochází k dělení pučením, na mateřské buňce se nejprve vytvoří pupen, z kterého potom vznikne dceřiná buňka. V místě dělení zůstane na mateřské i dceřiné buňce jizva obsahující chitin. Detekcí chitinu můžeme zjistit, kolikrát již buňka pučela. Průměrný počet pučení buňky je 24, maximální 43 [9]. Rozlišujeme 4 fáze dělení buňky – viz. obrázek 1.3.

G1 fáze – přípravný proces, buňka dorůstá do potřebné velikosti a připravuje se na replikaci DNA.

S fáze – buňka začíná pučet, replikuje se DNA a duplikuje se polární tělísko, které pak migruje do protilehlé polohy na jádře. Tvoří se dělicí vřeténko a buňka se připravuje na tvorbu pupene.

G2 fáze – příprava buňky na jaderné dělení, přemístění jádra do oblasti mezi mateřskou buňkou a pupenem.

M fáze – dělení jádra (zůstává zachována jaderná membrána – uzavřená mitóza), vlastní oddělení buňky.



Obrázek 1.3: Fáze dělení buňky

Růst buněčné kultury

Růst buněčné kultury je ovlivněn mnoha vnějšími podmínkami, především pak teplotou, obsahem živin v médiu a přístupem kyslíku.

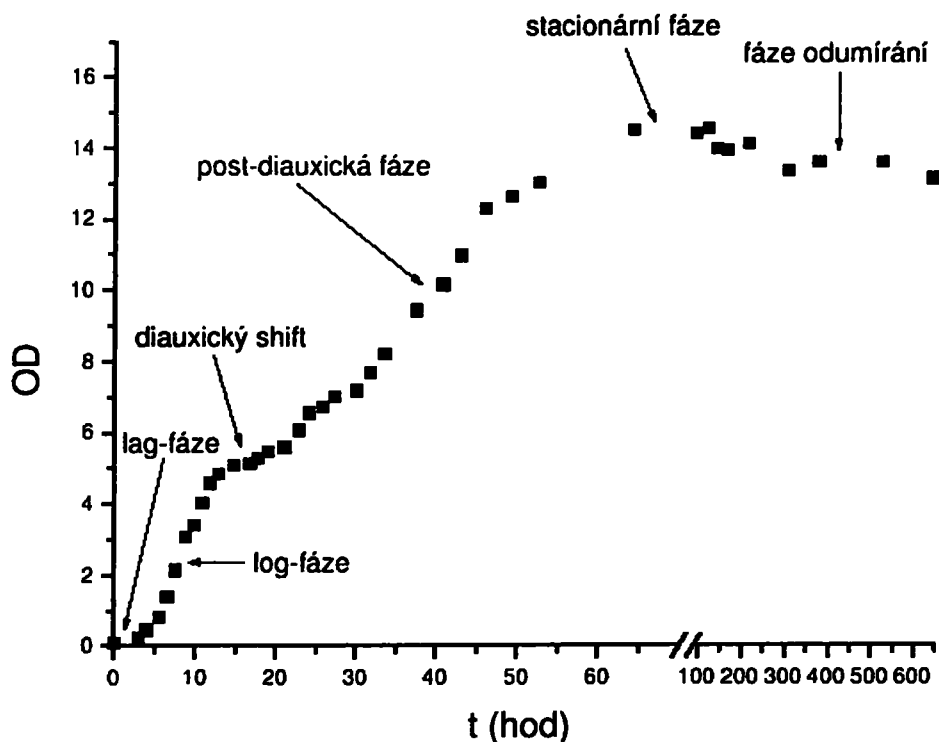
Při zaočkování buněk do kultivačního média se v něm vyskytují buňky v různých fázích buněčného cyklu, které se dále dělí a lze sledovat růst celé kultury. Posuzování růstu můžeme provádět např. pomocí počítání počtu buněk, hmotnosti biomasy, poklesu koncentrace některé látky v kultivačním médiu či nepřímo. Často se užívá nepřímého určování pomocí měření rozptylu světla, kdy měříme OD (z anglického optical density, optická hustota) suspenze buněk. Vynešením závislosti OD suspenze na čase

dostáváme tzv. růstovou křivku – viz. obrázek 1.4. Rozlišujeme tyto základní fáze růstu buněčné kultury:

Stacionární fáze – též nazývaná lag fáze. Toto je počáteční fáze, kdy se počet buněk nemění, kultura se přizpůsobuje novému růstovému médiu. Délka stacionární fáze závisí na okolních podmínkách, na míře asimilační adaptability kultury, v případě optimálních podmínek je minimální.

Exponenciální fáze – či tzv. log fáze, buňky se začínají prudce množit, nárůst jejich počtu je exponenciální. Buňky nestíhají dorůst a jsou menší.

Diauxická fáze – dochází živiny (glukóza), zpočátku můžeme pozorovat fázi zpomalení růstu, počet buněk se ustálí a stagnuje. Dochází ke zvětšování rozměrů buněk, buňky se přizpůsobují na jiný zdroj uhlíku, např. ethanol. Tato fáze je též nazývána diauxický shift.



Obrázek 1.4: Příklad růstové křivky kmene kvasinek (divoký kmen BY4742).

Post-diauxická fáze – nastává po vyčerpání prvotního zdroje uhlíku, buňky začnou růst na jiném zdroji uhlíku, často na ethanolu, který produkovaly v exponenciální fázi.

Stacionární fáze – dochází všechny zdroje uhlíku, zpočátku můžeme pozorovat fázi zpomalení růstu, počet buněk se ustálí a stagnuje, zvětšování rozměrů buněk.

Fáze odumírání, negativního přírůstku – rychlé odumírání buněk, průběh je podobný akceleraci v exponenciální fázi, probíhá však v opačném směru.

Průběh růstové křivky můžeme ovlivnit postupným přidáváním živin, např. metodou kontinuální kultivace, kdy živiny přidáváme neustále a buňky jsou tak dlouhou dobu v exponenciální fázi.

1.1.3. Publikované výsledky měření vnitrobuněčného pH

Pro měření vnitrobuněčného pH kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* se využívá množství fyzikálních metod. Využití fluorescenčních metod bývá velmi časté s využitím širokého spektra fluorescenčních sond. Níže uvádím některé dříve publikované výsledky.

První použití fluorescenčních sond pro měření vnitrobuněčného pH publikoval v roce 1982 Slavík [15]. Porovnal různé fluorescenční sondy a proměřil závislost vnitrobuněčného pH na pH okolního prostředí.

Valli [17] použil kvasinkový kmen CEN.PK 113-5D a metodu průtokové cytometrie s využitím fluorescenční sondy Carboxy SNARF-4F. Tato metoda spočívá v tom, že buňky po jedné protékají skenovacím zařízením, kde je barvivo excitováno a je zaznamenáván excitační poměr od jednotlivých buněk. Tento poměr je citlivý na pH. K obarvení buněk bylo použito barvivo v esterované formě, kdy samo volně proniká přes membránu a je uvnitř

buňky hydrolyzováno esterázami. Hydrolyzované barvivo již z buňky nemůže uniknout. Práce se zaměřila na rozdíly pH buněk v různých fázích růstu kultury. Nebyly prokázány výrazné změny intracelulárního pH v závislosti na růstové fázi. Intracelulární pH buněk bylo 6,5 v exponenciální fázi a 6,4 ve fázi stacionární.

Často bývají prováděna srovnání intracelulárního pH jednotlivých kmenů kvasinek. Haworth [6] srovnával vnitřní pH *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pombe*, jako sonda byl používán Carboxy SNARF-1. Při externím pH=7,0 naměřil intracelulární pH *S. pombe* 7,0 a *S. cerevisiae* 6,6.

Stejná výzkumná skupina charakterizovala tok protonů přes membránu [5]. Jako sonda byl využíván Carboxy SNARF-1 a byly monitorovány změny jeho intenzity při změně vnitrobuněčného pH. Byly používány kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. U kmene BJ4932 bylo naměřeno přirozené pH 6,8, u kmene DAUL1 pH 6,5. Byla též zkoumána změna vnitrobuněčného pH po přidání glukózy do suspenze. U obou testovaných kmenů vnitrobuněčné pH vzrostlo, u BJ4932 na hodnotu 7,3 a u kmene DAUL1 na hodnotu 7,1.

A. Peňa [12] se zabýval měřením vnitrobuněčného pH pomocí fluorescenční sondy pyraninu. Barvení buněk prováděl pomocí elektroporace, používal jeden puls o délce 3,1-3,5 ms. Výsledné změřené pH se pohybovalo kolem hodnoty 6,2.

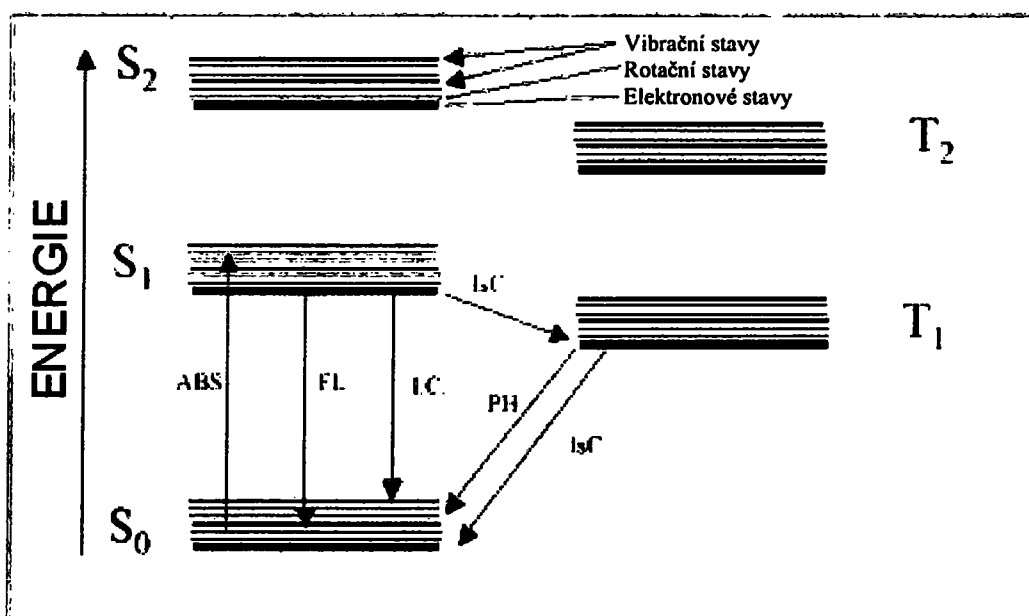
Stejnou metodu jako v této diplomové práci využila ve své diplomové práci Mgr. Hana Drápalová [3]. Měření prováděla v suspenzi na fluorescenčním spektrometru a naměřené vnitřní pH kmene PD se pohybovalo v rozmezí 6,3 – 6,4 pH jednotky. Stejně jako v [5] byla proměřena závislost vnitrobuněčného pH po přidání glukózy, byl zaznamenán nárůst pH na hodnotu 6,8.

Hodnota pH ve vakuolách je obtížněji změřitelná než pH cytozolu. Jejím měřením se zabývá např. V. Carmelo v [2]. Ten naměřil hodnotu pH vakuol

pro buňky v destilované vodě okolo 6 pH jednotek. V této práci ukázal též vliv okolního prostředí na vakuolární pH. Při inkubaci v kyselém prostředí kleslo vakuolární pH až na 4,4.

1.2. Fluorescence

Luminiscence je přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa, pokud toto vyzařování má konečnou dobu trvání, která výrazně převyšuje dobu světelných kmitů [14]. Doba života fluorescence je 0,1-100 ns. Rozlišujeme dva základní typy luminiscence - fluorescenci (přechod z vyšších singletních hladin do hladiny základní) a fosforescenci (přechod z tripletního stavu molekuly do stavu singletního, delší doba trvání – až jednotky sekund).



Obr. 1.5: Jablonského diagram – singletní stavy jsou označeny S, tripletní T. ABS značí absorpci světla, FL fluorescenci, PH fosforescenci, IsC je mezisystémová konverze, zkratkou I.C. je označena vnitřní konverze.

Chceme-li pozorovat fluorescenci, vyexcitujeme molekulu ze základního stavu S_0 do některého z vyšších singletních stavů. Z těch může molekula přejít zpět do základního stavu buď přechody nezářivými nebo zářivými.

Graficky je možné tyto změny elektronově vibračních stavů molekul vyjádřit pomocí tzv. Jablonského diagramu – viz obr. 1.5. Jsou v něm znázorněny singletní (vlevo) i tripletní (vpravo) stavy molekuly a možné přechody mezi nimi.

Nezářivé přechody

Rozeznáváme tři typy nezářivých přechodů mezi jednotlivými elektronově vibračními stavy molekuly.

Vnitřní konverze – přechod mezi dvěma stavy o stejné multiplicitě (mezi dvěma singletními stavy). Při fluorescenci dochází k přechodu molekuly vnitřní konverzí z vyšších singletních stavů do stavu S_1 , ze kterého pak molekula přejde zářivým přechodem do stavu základního (fluorescence).

Mezisystémová konverze – přechod mezi dvěma stavy o rozdílné multiplicitě (mezi stavem singletním a tripletním). U některých fluoroforů může dojít k přechodu molekuly ze singletního stavu S_1 do tripletního stavu T_1 a k následnému vyzáření fotonu (fosforescence).

Vibrační relaxace – dochází k přenosu nadbytku vibrační energie na okolní molekuly, mění se pouze vibrační stav molekuly, ne stav elektronový.

Zářivé přechody

Fluorescence – zářivý přechod z prvního excitovaného stavu S_1 (pouze výjimečně dochází k zářivým přechodům z vyšších singletních stavů) do základního stavu S_0 . Obvyklá doba od excitace molekuly do vyzáření fotonu je 0,1-100 ns.

Fosforescence – zářivý přechod z některého vyššího tripletního stavu molekuly (nejčastěji stavu T_1) do stavu základního. Pro fosforescenci je charakteristická delší doba dohasínání (10^{-4} - 10^2 s), která je způsobena tím, že přechod z tripletního do singletního stavu je spinově zakázaný.

Molekulu můžeme excitovat např. světelným zářením, chemicky či mechanicky. Při excitaci světlem dochází k tzv. Stokesově posuvu – vlnová délka λ vyzářeného záření je vždy vyšší než λ záření excitačního. To je v souladu se zákonem zachování energie, jelikož dochází k ztrátě části energie záření během vnitřní konverze molekuly (nezářivých přechodů) [14].

1.2.1. Fluorescenční sondy

U některých fluoreskujících látek můžeme pozorovat závislost fluorescenční odezvy na vlastnostech okolního prostředí. Interakcemi s mikrookolím fluoroforu dochází k posuvům energetických hladin molekuly, a tím ke změně fluorescenční odezvy. Pokud můžeme tyto změny vztáhnout ke konkrétním změnám mikrookolí je možné ze změny fluorescenčního signálu určit vlastnosti mikrookolí fluoreskující látky. Změny fluorescenční odezvy mohou být výrazné např. při změně polaridy prostředí, proto jsou fluoreskující látky často používány jako sondy pro měření polaridy prostředí. Možné je ale i využití fluorescenčních sond pro měření potenciálu na buněčných membránách, pH, viskozity, koncentrace látek v prostředí, apod. Výhodou využití fluorescenčních sond je bezkontaktnost a neinvazivnost metody. Fluorescenční sondy jsou často malé molekuly, které okolní systém výraznějším způsobem neovlivňují. Výhodou je také snadné zpracování získané informace - pokud víme, jaké změně systému odpovídá změna fluorescenčního signálu (tzn., že známe kalibrační křivku), je již vyhodnocení fluorescenčních změn velmi snadné a okamžité.

Fluorescenční sondy pro měření pH

pH je definováno jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů.

$$pH = - \log a_{H^+}$$

Při fyziologických procesech v buňce vznikají ionizací chemických skupin protony H^+ . Buňka může gradient H^+ na buněčné membráně a na membránách organel využít jako zdroj energie pro své životní procesy.

Řada fluoreskujících látek reaguje na změny pH okolního prostředí. Níže uvádím některé nejčastěji používané sondy pro měření vnitrobuněčného pH. Důležitou vlastností těchto sond je nejen možnost barvení buněk bez narušení jejich životních procesů, ale také vhodný rozsah citlivosti sondy a její nízká toxicita.

Fluorescein

Fluorescein je jednou z nejznámějších sond pro měření vnitrobuněčného pH. Dnes se však využívá jen zřídka. Častější je využití jeho derivátů. Nevýhodou fluoresceinu je jeho značný výtok z buněk, což komplikuje kvantitativní měření.

Carboxyfluorescein

Derivát fluoresceinu, který má velmi podobné spektrální vlastnosti jako fluorescein, jeho únik z buněk je však nižší. Je vyráběn i v esterované formě, která snadno prochází membránou. Uvnitř buňky je hydrolyzován esterázami a zůstává uvězněn v buňce (podrobněji viz. kapitola 1.2.3. Metody barvení buněk)

BCECF

Změny fluorescenčního spektra BCECF v závislosti na pH neumožňují vysoké rozlišení, což může být při měření fyziologických pH problém. Jedná se však o poměrovou sondu, tzn. že výsledek měření nezávisí na koncentraci

sondy v daném místě vzorku, nezávisí ani na výtoku sondy z buňky a na vybělování sondy. Barvení buněk probíhá jejich inkubací v roztoku s esterovaným BCECF. Uvnitř buňky opět probíhá hydrolyzace vnitrobuněčnými esterázami.

SNARE, SNAFL

Tyto sondy jsou vhodné pro excitační i emisní poměrová měření. Díky tomu je možné je použít například i v konfokální skenovací mikroskopii. Jsou citlivé v celém rozsahu fyziologického pH. Při delší inkubaci esterované formy SNARE-1 se hydrolyzovaná podoba sondy soustředí v mitochondriích a je tedy možné měřit mitochondriální pH [8].

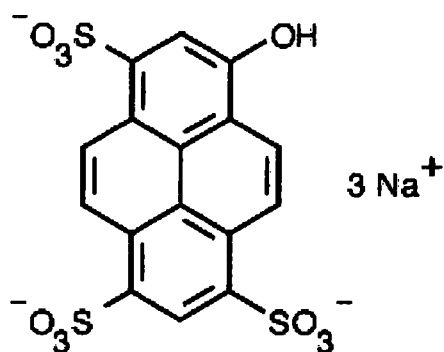
Carboxy SNAFL-1

Carboxy SNAFL-1 je možné využít pro excitační i emisní poměrová měření, oproti SNAFL-1 má však daleko vyšší kvantový výtěžek a k měření tedy postačuje nižší koncentrace sondy.

Pyranin

Pyranin můžeme v literatuře najít též pod názvem HPTS či H348. Chemicky se jedná o 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonovou kyselinu, jejíž struktura je ukázána na obrázku 1.6 a absorpční spektrum na obrázku 1.7. Pyranin je vhodný především pro excitační poměrová měření, která využívají excitace např. na 405 a 450 nm. Výhodou jeho použití je vysoká rozpustnost ve vodě a nízká cena.

Pyranin samovolně neprochází membránou, protože nese tři záporné náboje. To znesnadňuje barvení buněk, ke kterému je nutné využití invazivních metod (elektroporace či mikroinjekce). Po aplikaci však sonda z buňky neuniká. Pyranin má i mnoho dalších využití – používá se například k detekci fúzí membrán či měření pH různých organel.



Obrázek 1.6: Strukturální vzorec pyraninu (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina)

1.2.2. Měření fluorescenční odezvy

Fluorescenci můžeme měřit buď stacionární (vzorek excitujeme kontinuálně) nebo časově rozlišenou (pulzní excitace a sledování dohasínání fluorescence).

Stacionární měření fluorescence

Fluorofory excitujeme kontinuálně a sledujeme střední hodnotu intenzity fluorescence od všech excitovaných molekul.

měření intenzity - bývá nejjednodušším způsobem měření, může však být zkresleno mnoha vlivy – rozptylem světla na vzorku a aparatuře, fluktuacemi lampy, kterou vzorek excitujeme, koncentrací fluoreskující látky v jednotlivých částech vzorku, rozdílnou optickou drahou excitačního záření ve vzorku a dalšími faktory.

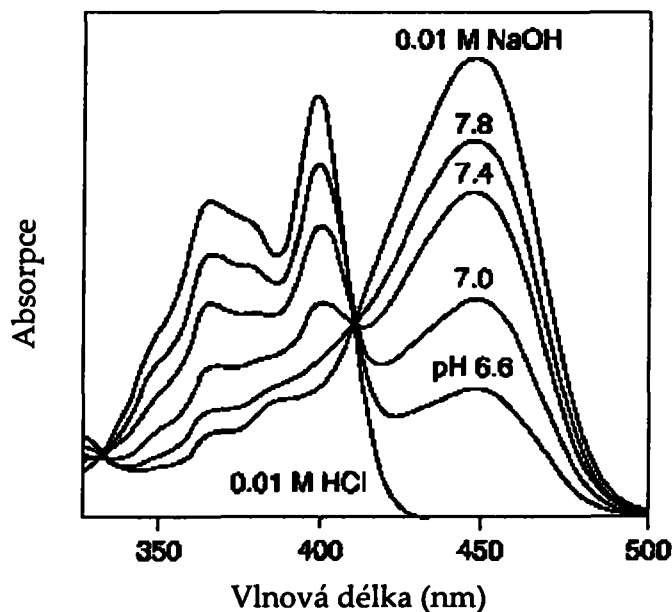
poměrová měření – měření intenzity fluorescenčního signálu na dvou vlnových délkách a vypočtení jejich poměru. Výhodné je, že při tomto způsobu měření nezávisí výsledný poměr intenzit na koncentraci sondy v jednotlivých částech vzorku. Měření tedy není limitováno tím, že rovnoměrné rozložení sondy v buňce nejsme schopni zajistit, je též

eliminován jak efekt úniku sondy z buňky, tak efekt vybělování sondy. Poměrový způsob měření je často využíván u fluorescenčních sond – spektrální posuvy emise nebo absorpce při změně okolního prostředí jsou snadno zaznamatelné pomocí běžných spektrometrů.

Můžeme měřit spektrum emisní – excitujeme jednou vlnovou délkou a zaznamenáváme emisi záření v určitém intervalu λ (při poměrovém měření stačí zaznamenat emisi na dvou různých vlnových délkách a vypočítat poměr naměřených hodnot). Druhým způsobem je měření excitační - měříme emisi na fixní vlnové délce λ_{em} a měníme vlnovou délku λ excitačního záření. Tato měření odrážejí spektrální závislost extinkčního koeficientu.

Makroskopická poměrová excitační měření

Na obrázku 1.7 vidíme absorpční spektra pyraninu při různém pH okolního prostředí. Při změně okolního prostředí dochází k výrazným změnám v absorpčním spektru pyraninu – maximum na 470 nm se s rostoucím pH snižuje a zároveň narůstá maximum na 405 nm. Emisní spektrum pyraninu je na okolním pH nezávislé, nemění se ani jeho poloha, ani tvar.



Obrázek 1.7 Absorpční spektra pyraninu při různých pH prostředí

Excitační poměrová měření provádíme tak, že excitujeme na dvou různých vlnových délkách (např. 405 a 450 nm), zaznamenáme intenzitu fluorescence na pevně zvolené vlnové délce (540 nm) a spočítáme poměr naměřených intenzit. Díky rozdílné absorpci při různých pH prostředí bude fluorescenční signál, a tedy i poměr závislý na pH prostředí, ve kterém se sonda vyskytuje. Nebude však záviset na její koncentraci.

Mikroskopická poměrová excitační měření

Mikroskopická měření provádíme analogicky jako měření makroskopická (excitujeme na dvou vlnových délkách, snímáme na jedné vlnové délce). Zaznamenáváme dvourozměrnou mapu intenzit při obou excitačních vlnových délkách a tyto mapy bod po bodu vydělíme. Získáme tak 2D mapu poměrů, která ukazuje na rozložení pH, a je nezávislá na koncentraci sondy. Při snímání je nutné, aby se oba snímky od sebe prostorově nelišily, tzn. aby nedocházelo k pohybu buněk, který by poměr intenzit zkreslil (ve dvou sousedních bodech může být jednak jiné pH, ale především jiná koncentrace sondy). Drobné posunutí obrázků vůči sobě se projeví jako stíny na okrajích buněk ve vypočteném poměrovém snímku, takový snímek tak není možné použít jako celek – poměr na okrajích buněk nevypovídá o pH v daném bodě.

1.2.3. Metody barvení buněk

Přes velké množství fluorescenčních sond vhodných pro měření rozličných vlastností je jich pouze malé množství vhodné pro měření na živých buňkách. Důvodem je cytoplazmatická membrána chránící buňku a zabraňující průniku sondy do buňky – propouští pouze malé nepolární molekuly. V literatuře je popsáno několik technik, které vstup sondy do

buňky umožňují. Nejvýhodnější jsou metody, které sondu v buňce „uvězní“ a je znemožněn její únik zpět do okolního média.

Metoda průniku v esterované formě

Mnoho sond je možné upravit na acetyl- či acetoxymethylestery. Ty jsou lipofilní a snadno tak pronikají přes membránu. Uvnitř buňky pak buněčné esterázy rozštěpí esterové vazby a negativně nabitá sonda zůstane uvězněna uvnitř buňky. Tato metoda je nejméně invazivní. Nevýhodou je, že pokud nedojde k včasnému hydrolyzování esterované sondy esterázami v cytozolu, dostane se sonda do organel, což může být nežádoucí. Další nevýhodou je, že ne všechny sondy je možné esterifikovat. Metoda je vhodná například pro aplikaci hojně využívaného fluoresceinu či jeho derivátů [16].

Metoda mikroinjekce

Sonda je do buňky aplikována pomocí mikropipety. Tato metoda je vhodná i pro velmi velké molekuly sondy. Aplikace je ale možná pouze do velkých buněk a dochází k jejich značnému narušení. Tato metoda byla využita například pro aplikaci konjugátů fluorescein-dextran [19].

Metoda elektroporace

Metoda elektroporace využívá krátké vysokonapěťové pulsy, které naruší membránu a vytvoří v ní póry. Těmi se do buňky dostanou i velké či nabitě molekuly.

Klasicky se při metodě elektroporace využívá jeden puls, který stačí na narušení membrány k průniku sondy do buňky. Tato metoda byla použita i pro vnik pyraninu do buněk *Saccharomyces cerevisiae*, délka pulsu se pohybovala v rozmezí 3,1-3,5 ms (viz. například [12]). V této podobě znamená elektroporace pro buňku velkou zátěž.

Ke snížení narušení buňky byla vyvinuta metoda zvaná pulzní elektroporace (pulse train electroporation). Při té není používán jeden dlouhý puls, ale série slabších a kratších pulsů, jejichž délka je řádově μs . Po aplikaci série pulsů se buňky chladí, dojde tak k rychlejšímu zacelení pórů. Při vhodné volbě napětí a počtu pulsů se nemění životaschopnost buňky. Výhodou je také to, že koncentrace sondy v buňce je po elektroporaci konstantní, látka z buňky nevytéká. Metoda je vhodná např. pro aplikaci pyraninu [3] [12].

1.3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je:

1. Optimalizovat metodu barvení buněk pomocí pulzní elektroporace pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Zkoumat vliv efektu vybělování sondy na výsledky měření vnitrobuněčného pH pomocí pyraninu.
3. Vypracovat metodu kalibrace fluorescenční sondy in vivo pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Porovnat kalibraci buněk energizovaných a buněk vyhladovělých.
4. Změřit vnitrobuněčné pH cytozolu a vakuoly vybraného kvasinkového kmene.

Experimentální metody a materiál

2.1. Použitý materiál

2.1.1. Chemikálie a fluorescenční sondy

Použitá glukóza a bactopecton byly od firmy Sigma; kvasničný extrakt pocházel od firmy Serva Feinbiochemica; agar byl dodán firmou Fluka, kyselina citrónová a hydrogenfosforečnan sodný pocházely od firmy Lachema. Pyranin byl vyroben firmou Molecular Probes a byl dodán v práškové formě.

2.1.2. Použité kmeny kvasinek

K experimentu jsme použili kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, kmeny IL 125-2B (laboratorní kmen bez mutací) a PD (komerčně dostupné pekařské droždí vyráběné firmou UNIFERN GmbH&Co., SRN).

2.2. Příprava buněk

2.2.1. Sterilizace a skladování zásobních kultur a roztoků

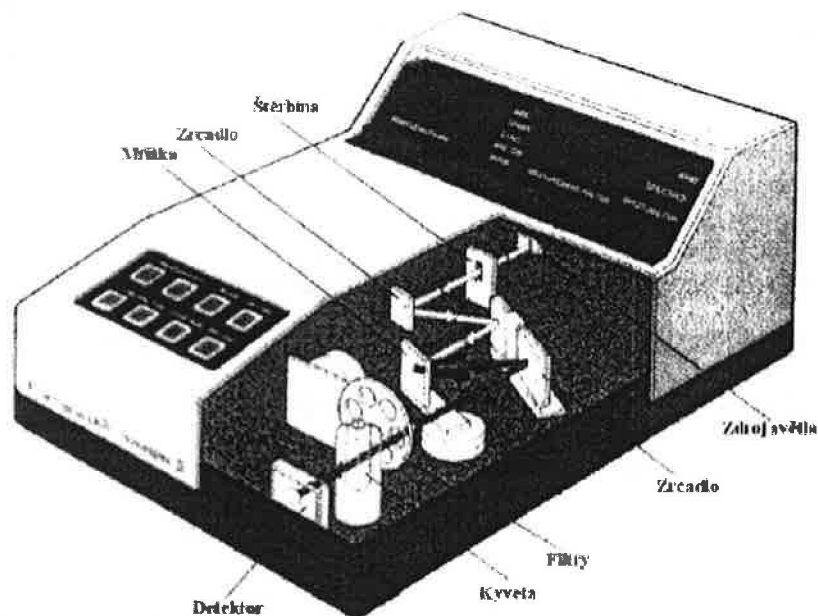
Kultivační média, agar a 40% roztok glukózy byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut.

Z pyraninu, dodaného v práškové formě, byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mM v destilované vodě.

Všechny zásobní roztoky a agarové misky byly uchovávány v lednici při teplotě 6°C. Stejně byly skladovány kvasinkové kultury na agarových miskách.

2.2.2. Pěstování buněk

Počet buněk v médiu jsme určovali pomocí měření absorbance, v dalším textu budeme používat označení OD (z anglického Optical Density, optická hustota). OD jsme měřili pomocí absorpčního spektrofotometru Spekol Novaspec II – viz. obrázek 2.1. OD 2,0 odpovídá koncentraci $5 \cdot 10^6$ buněk/ml suspenze.



Obrázek 2.1 Schéma absorpčního spektrofotometru Spekol Novaspec II, používaného pro určování koncentrace buněk v médiu pomocí měření OD.

Pro experimenty jsme používali buňky v exponenciální fázi.

Zásobní kultura kmene IL byla uchovávána na agarové plotně v lednici při teplotě 4-6°C a nová agarová miska byla připravena jednou měsíčně přeočkováním buněk. Pro měření bylo odebráno inokulum z agarové plotny a zaočkováno kličkou do sterilního kultivačního YEPG média (1 % yeast extraktu, 1 % bactopecton, 0,8 % glukóza v destilované vodě). Zaočkované inokulum jsme aerobně kultivovali v třepací lázni při teplotě 30°C po dobu cca 12 hodin. Buňky narostly přibližně na OD 3,0 a byly přeočkovány do nového YEPG média na OD 0,5 a dále kultivovány za stejných podmínek po dobu přibližně 4 hodin. Pro elektroporaci jsme používali buňky po přeočkování narostlé z OD 0,5 na OD 2,0.

Kmen PD jsme pro experimenty zvolili proto, že jeho růst je rychlejší než růst kmenů laboratorních. Používali jsme stejná YEP média jako pro kmen IL. Buňky PD jsme zaočkovávali do kultivačního média přímo v den měření na OD přibližně 0,5 a nechali aerobně růst při teplotě 30°C po dobu 3,5 až 4 hodin na OD 2,0.

Dodržování výše uvedených OD je důležité pro elektroporaci, která závisí na velikosti buněk a na konkrétním stádiu růstu, ve kterém se kultura kvasinek nachází.

Narostlé buňky jsme centrifugovali při 3000 otáčkách/min. po dobu 4 minut v centrifuze Heraeus MegaFuge 1.0. Sedimentované buňky byly promyty destilovanou vodou, opět stočeny a resuspendovány v destilované vodě. Pro barvení jsme používali suspenzi, ve které byla koncentrace buněk a destilované vody 1:1.

2.3. Barvení buněk

2.3.1. Zařízení na elektroporaci

Pro elektroporaci jsme použili pulzní elektroporátor sestavený na FÚ MFF UK. Elektroporátor se skládá z pulzního vysokonapěťového zdroje, časovacího zařízení a paměťového osciloskopu sloužícího pro monitorování pulsů. Časovací zařízení řídí vysílání VN impulsů o zvolené časové šířce a amplitudě. Časovou šířku můžeme volit v rozmezí 10 ns až 999 μ s, amplituda VN pulsu je volitelná v intervalu cca 500-2000 V. Dále je možné volit frekvenci aplikace pulsů. Charakteristiky pulsu jsou monitorovány pomocí osciloskopu. K barvení byla použita speciální kyveta se vzdáleností elektrod 2 mm. VN zdroj automaticky omezuje aplikované napětí podle vodivosti vzorku tak, aby proud procházející vzorkem nebyl příliš velký. Pro práci u horní hranice rozsahu VN pulsů je třeba redukovat vodivost vzorku (např. snížením koncentrace iontů v elektroporované suspenzi či snížením elektroporovaného objemu).

2.3.2. Standardní barvení buněk

Do připravené suspenze buněk (objem buněk:objem destilované vody 1:1) jsme přidali pyranin tak, aby jeho koncentrace byla 10 mM. Na suspenzi jsme aplikovali přesně definované vysokonapěťové pulsy, jejich přesné parametry jsou uvedeny níže. Elektroporované buňky jsme poté šestkrát promyli destilovanou vodou, čímž jsme odstranili barvivo vně buněk. Pokud jsme měření neprováděli ihned po elektroporaci uchovávali jsme obarvené buňky v lednici při teplotě 4-6°C.

2.3.3. Barvení buněk pro kalibraci

Pro nastavení daného pH potřebného pro kalibraci v buňkách jsme do suspenze buněk a destilované vody přidali 10 mM C-P pufr o přesně definovaném pH a výslednou směs jsme elektroporovali. Jelikož póry vytvořenými napětím do buňky proniká nejen barvivo, ale i pufr a protony, nastaví se v buňce pH shodné s vnějším prostředím potřebné pro kalibraci. Obarvené buňky jsme šestkrát promyli pufrům o stejném pH. Pro kalibraci jsme obvykle používali sérii 4 pufrů s pH v rozsahu 6,0-7,5.

2.4. Měření na fluorescenčním mikroskopu

K pozorování jsme používali invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX 70 s objektivem pro vodní imerzi. Jako excitační zdroj sloužila xenonová výbojka, jejíž světlo jsme upravili pomocí excitačních filtrů. Fluorescenční signál jsme po průchodu emisním filtrem buď pozorovali okulárem nebo zaznamenávali pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Camedia 5.0 Mpixel (barevné snímky pro optimalizaci elektroporace a kontrolu obarvení buněk). Přesné zaznamenání intenzit pro výpočet excitačního poměru bylo provedeno pomocí CCD kamery.

Vzorky pro mikroskopická měření jsme připravili nanesením 1,5 μ l suspenze buněk na podložní sklíčko, které jsme poté přikryli sklíčkem krycím.

2.4.1. Použité filtry

Propustnosti filtrů a dichroického zrcadla používaných při mikroskopickém měření jsou na obrázku 2.2.

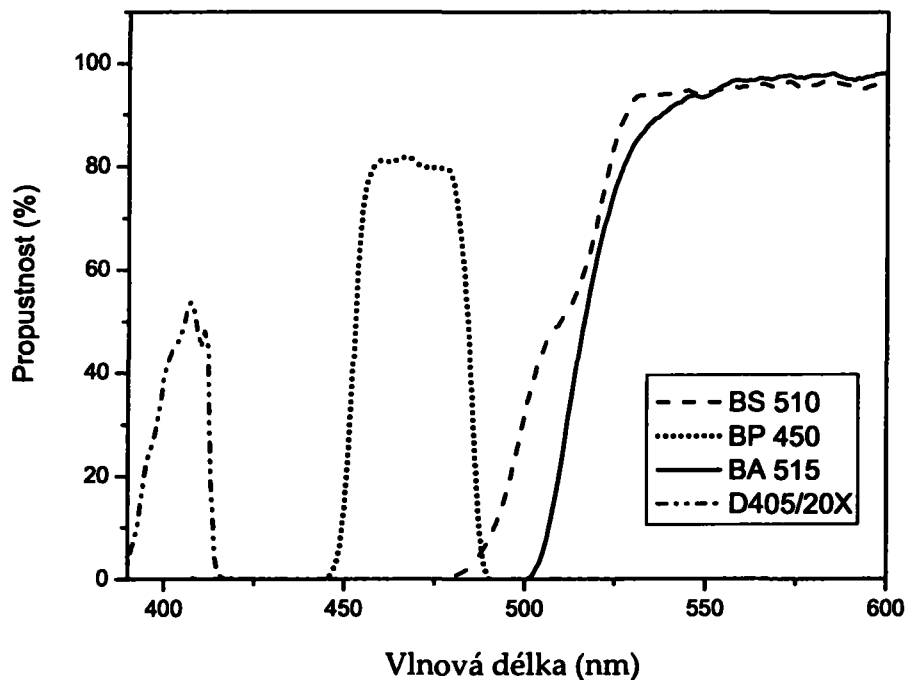
Používali jsme následující filtry:

Excitační filtr BP 450 – propouští excitační záření o vlnové délce 450-470 nm.

Excitační filtr D405/20X – propouští excitační záření o vln. délce 390-415 nm.

Dichroické zrcadlo BS 510 – propouští fluorescenci jdoucí od vzorku a excitační záření odráží zpět.

Emisní filtr BA 515 – propouští emisi záření od 500 nm.



Obrázek 2.2: Spektrální charakteristiky jednotlivých optických komponent fluorescenčního mikroskopu. BS 510 označuje dichroické zrcadlo, BA 515 emisní filtr, BP 450 a D405/20X excitační filtry.

2.5. Kontrola životaschopnosti buněk po elektroporaci

2.5.1 Kontrola pomocí mikroskopu

Životaschopnost buněk po elektroporaci můžeme kontrolovat při mikroskopických pozorováních pomocí propidium iodidu (PI). Je-li membrána buňky permanentně narušena, tj. jsou v ní póry, které již buňka není schopna zacelit, buňka již není schopná života. Vzniklými póry difunduje PI dovnitř buňky. Intenzita fluorescence PI navázaného na nukleové kyseliny je 20-30krát vyšší než intenzita fluorescence PI ve vodném roztoku. Okolí buněk tedy díky nízké intenzitě fluorescence vidíme jako černé. V buňkách s narušenou membránou se PI naváže na jadernou DNA a RNA v cytoplazmě a poškozené buňky silně červeně fluoreskují.

Tato kontrola je vhodná pro okamžité zjištění životaschopnosti buněk. To je důležité především pokud chceme pozorovat fyziologické procesy v buňkách či měřit přirozené pH živých buněk.

Při mikroskopických měřeních stačí do připravovaného vzorku k 1,5 μ l suspenze přidat 0,5 μ l 10 mM PI.

2.5.2 Výsevový test

Při kontrole pomocí propidium jodidu může dojít k tomu, že některé buňky nemají narušenou membránu a nejsou tudíž obarveny. Jsou však narušeny natolik, že umírají a nejsou schopny se dělit. Dlouhodobou životaschopnost buněk můžeme zjistit pomocí výsevového testu.

Suspenzi elektroporovaných buněk naředíme tak, abychom byli schopni pomocí pipety nabrat cca 150 buněk. Ty přeneseme na agarovou plotnu a rozetřeme na celou její plochu. Takto připravené misky kultivujeme po dobu

48 hodin při teplotě 30°C. Z každé životaschopné buňky během kultivace vyrostou kolonie o průměru 1-2 mm. Porovnáním počtu kolonií buněk elektroporovaných s kontrolním výsevem buněk bez elektroporace zjistíme, kolik procent buněk přežívá. Kontrolní výsev je nutné dělat z buněk stejně řaděných jako buňky elektroporované, aby byl zaručen stejný počet vysávaných buněk.

Kontrolu pomocí výsevového testu je vhodné provést po optimalizaci nastavení elektroporace. Slouží jako kontrola toho, že buňky nejsou dlouhodobě narušeny, jsou schopny dále se množit a všechny fyziologické procesy v nich probíhají stejně jako v buňkách neelektroporovaných.

Výsledky a diskuse

3.1. Optimalizace elektroporace pro kmen IL

Zvolený způsob barvení buněk pomocí elektroporace je metoda invazivní, pro buňku energeticky náročná (musí dojít k zacelování pórů). Při nevhodném nastavení parametrů pulsů dochází k jejímu nadměrnému narušení, které je již nevratné a pro kvasinkovou buňku fatální. Pokud chceme pozorovat buňky v dobrém fyziologickém stavu, který odpovídá stavu buněk neelektroporovaných, je nutné elektroporovat buňky co nejšetrněji. Na druhou stranu při malém narušení buněčné stěny nepostačují vzniklé póry k průniku dostatečného množství barviva do buňky, fluorescenční signál je pak velmi nízký a výsledek měření je značně zkreslen šumem.

Jako výchozí nastavení elektroporace, které jsme dále optimalizovali, jsme použili nastavení používané v práci H. Drápalové [3], která používala stejný kvasinkový kmen. Podmínky kultivace byly též shodné s našimi. Do suspenze buněk byl přidán pyranin na výslednou koncentraci 10mM, výsledná směs byla elektroporována v 2 mm kyvetě. Bylo použito napětí 1200 V, délka pulsu 50 μ s a bylo aplikováno 50 pulsů při frekvenci 2 Hz. Za těchto podmínek bylo obarvení buněk dobré, úmrtnost však dosahovala 30 %.

Při optimalizaci elektroporace byly elektroporovány buňky napěstované v tentýž den při různých nastaveních parametrů elektroporace. Pro mikroskopická měření byl k buňkám přidán propidium jodid pro rozlišení mrtvých buněk. PI může pronikat do mrtvých buněk a barvit chromatin. Do živých buněk PI neproniká. Z každého vzorku bylo pomocí digitálního fotoaparátu pořízeno několik dvojic mikroskopických snímků. Příklad

takových snímků vidíte na obrázku 3.1. Výběr snímaných míst byl náhodný. Vždy byl pořízen jeden fluorescenční snímek, na kterém bylo možno vidět zelené svítící buňky obarvené pyraninem a buňky mrtvé, obarvené PI, svítící červeně (obr. 3.1.A). Druhý snímek (3.1 B) je snímkem ve viditelném světle a sloužil pro zjištění celkového počtu buněk v zorném poli.

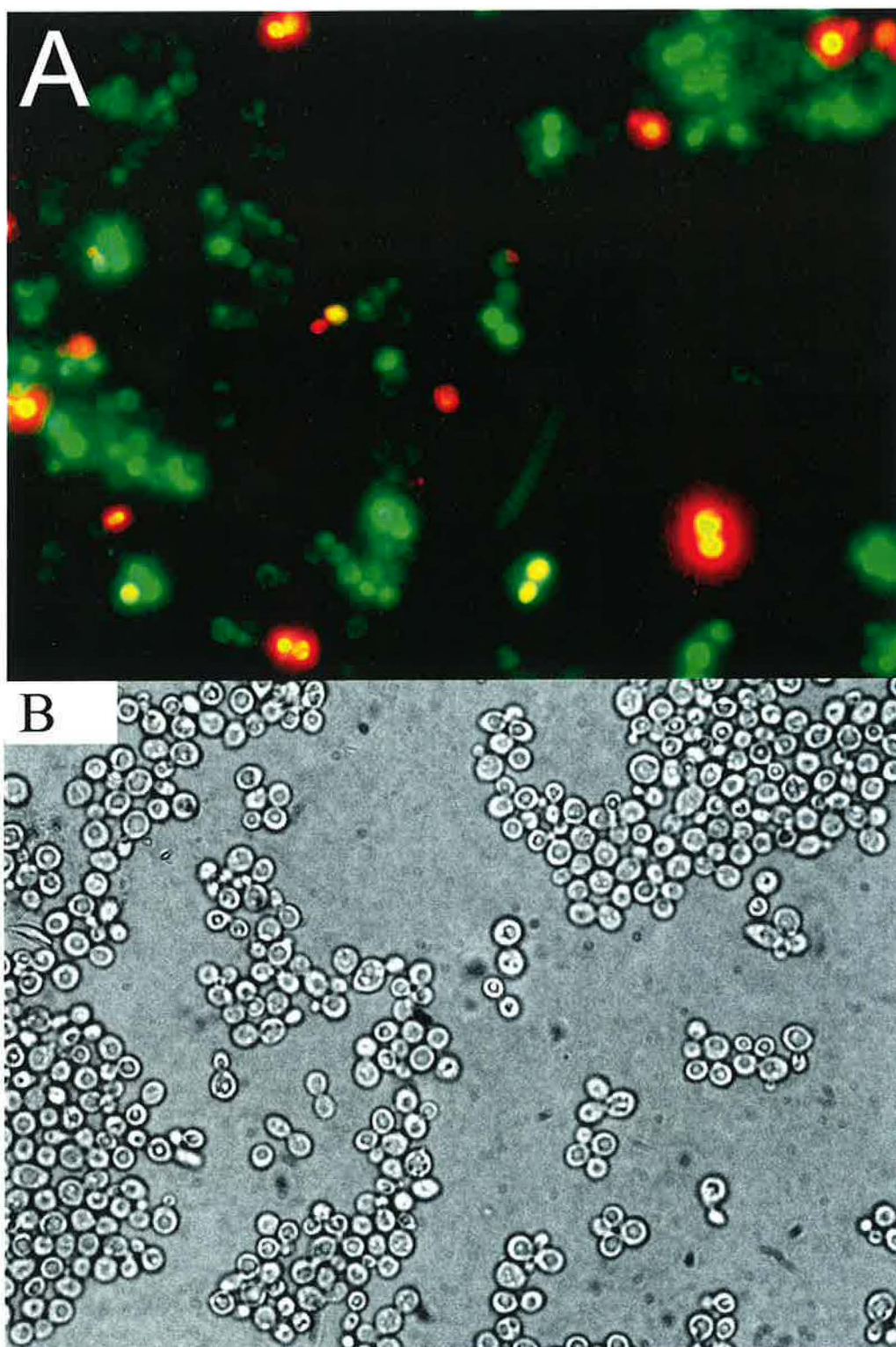
Snímky byly ručně vyhodnocovány – vždy byl spočítán počet všech buněk v zorném poli, buněk obarvených pyraninem a buněk mrtvých. Jejich zastoupení bylo vyjádřeno procentuálně (viz. obrázky 3.2-3.4). Součet frakce buněk obarvených a mrtvých může být v některých případech vyšší než 100 %. Je totiž možné, že buňka obarvená pyraninem je mrtvá a tudíž obarvená i PI. V tomto případě je započítána v obou frakcích.

Byly optimalizovány tři parametry elektroporace – amplituda aplikovaného napětí (viz. 3.1.1.), délka pulsu (viz. 3.1.2.) a počet pulsů (viz. 3.1.3.).

Množství elektroporovaných buněk je dáno konstrukcí elektroporátoru. Při vyšším množství elektroporované suspenze je její vodivost příliš vysoká a na elektrodách není možné udržet potřebné napětí nutné pro obarvení.

Používali jsme 10 mM koncentraci pyraninu. Z důvodu snížení vodivosti suspenze jsme při optimalizaci využili i 5 mM koncentraci barviva. Bylo zjištěno, že nižší koncentrace barviva nemá vliv na frakci obarvených buněk, výsledné obarvení jednotlivých buněk je však méně intenzivní.

Bylo zjištěno, že změna frekvence barvicích pulsů v rozsahu 1-2 Hz nemá vliv ani na obarvení buněk, ani na jejich přežívání. Při optimalizaci jsme tedy používali frekvenci 2 Hz.

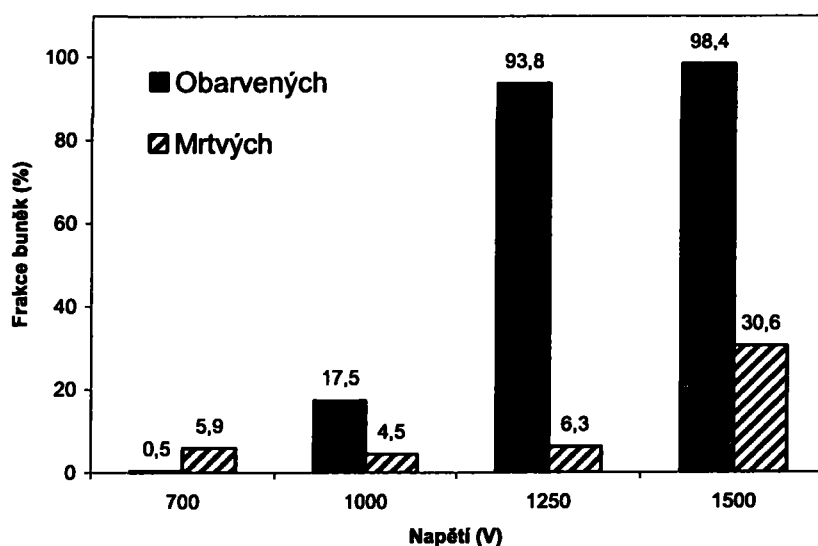


Obrázek 3.1: Příklad snímků při optimalizaci elektroporace pro buňky IL. A - fluorescenční snímek pro určení frakce obarvených buněk (zelené) a buněk mrtvých (červené), B - snímek ve viditelném světle pro určení celkového počtu buněk v zorném poli.

3.1.1. Optimalizace amplitudy napětí

Amplitudu napětí na elektroporátoru je možné měnit zhruba v rozsahu 500-2000 V. Při použití 2 mm kyvety toto napětí odpovídá intenzitě elektrického pole v rozsahu 250-1000 V/mm. Horní mez rozsahu dosažitelného napětí závisí na vodivosti elektroporované suspenze. My jsme měnili jsme napětí v rozsahu 700-1500 V. Vyšších hodnot nebylo při 10 mM koncentraci pyraninu možné dosáhnout. Na obrázku 3.2 lze vidět, že při nízkých napětích 700 V a 1000 V je stupeň obarvených buněk velmi nízký. Při 1250 V dojde k výraznému nárůstu frakce obarvených buněk až na 90-95 %. Při dalším zvyšování napětí již počet obarvených buněk neroste, zvyšuje se však počet buněk elektroporací poškozených.

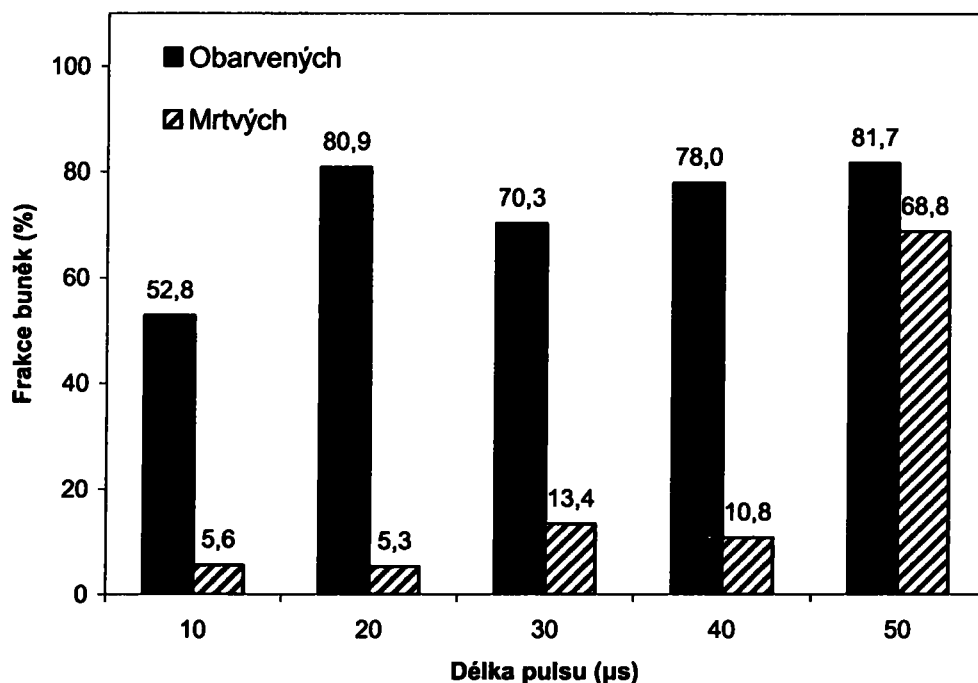
Na základě naměřených výsledků jsme za optimální hodnotu amplitudy napětí volili 1200-1250 V, tzn., že intenzita elektrického pole v kyvetě byla 600-625 V/mm.



Obrázek 3.2: Optimalizace amplitudy napětí při elektroporaci pro buňky IL, vzdálenost elektrod 2 mm, délka pulsu 20 μ s, 50 pulsů, frekvence 2 Hz, koncentrace pyraninu 5 mM.

3.1.2. Optimalizace délky pulsu

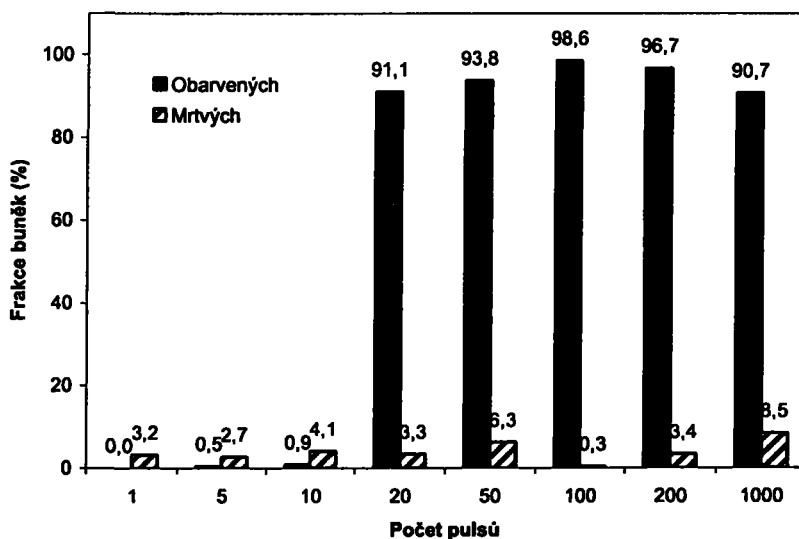
Při optimalizaci elektroporace jsme se rozhodli měnit délku VN pulsu v rozmezí 10-50 μs . Na obrázku 3.3 vidíme, že při délce pulsu 10 μs je obarveno 50 % buněk. Při použití 20 μs pulsů stupeň obarvení vzrůstá na 70 % při nezměněné úmrtnosti buněk. Se vzrůstající délkou pulsu se stupeň obarvení buněk již výrazně nemění. Pro poměrová měření je takovéto obarvení dostatečné. Puls dlouhý 50 μs pravděpodobně naruší buňky ireverzibilně, což je vidět z velkého nárůstu úmrtnosti buněk – až 70 %.



Obrázek 3.3: Optimalizace délky pulsu při elektroporaci pro kmen IL, napětí 1250 V, vzdálenost elektrod 2 mm, 50 pulsů, frekvence 2 Hz, koncentrace pyraninu 10 mM.

3.1.3. Optimalizace počtu pulsů

Pro zjištění závislosti stupně obarvení buněk na počtu VN pulsů jsme měnili počty pulsů v rozmezí 1-1000. Z obrázku 3.4 je vidět, že při aplikaci 1 až 10 pulsů k obarvení buněk nedochází, jelikož membrána není zřejmě výrazně narušena. Při použití 20 pulsů nastává prudký nárůst obarvení až na více jak 90 % a tento stupeň obarvení je konstantní i u vyšších počtů pulsů. Ani při aplikaci 1000 pulsů nedochází k výraznému zvýšení úmrtnosti buněk. Pulsy o délce 20 μs při amplitudě napětí 1250 V tedy narušují membránu buňky pouze natolik, že buňka je schopna vzniklé póry bez problémů zacelit. Při použití vyššího počtu pulsů ale roste intenzita fluorescence, protože do buněk nateče více barviva. Pro další experimenty jsme tedy volili optimální variantu (vzhledem k časové náročnosti aplikace vysokých počtů pulsů) a buňky jsme elektroporovali pomocí 100 pulsů, aplikovaných s frekvencí 2 Hz.



Obrázek 3.4: Optimalizace počtu pulsů při elektroporaci pro kmen *IL*, napětí 1250 V, vzdálenost elektrod 2 mm, délka pulsu 20 μs , frekvence 2 Hz, koncentrace pyraninu 5 mM.

3.1.4. Používané elektroporační parametry

Nastavení elektroporačních parametrů udává tabulka 3.1. Barvení bylo vždy prováděno v 2 mm kyvetě, objem barvených buněk byl 20 μ l. V tabulce 3.1 jsou uvedeny i parametry používané při barvení buněk PD. Rozdílnost parametrů je dána jednak různou odolností buněk a také jejich rozdílnou velikostí. U kmene PD jsme neprováděli kompletní optimalizaci, předpokládali jsme, že chování buněk bude podobné jako u kmene IL, pouze optimální hodnoty parametrů mohou být odlišné v závislosti na odolnosti buněk. Elektroporovali jsme tedy buňky PD při několika nejpravděpodobnějších nastaveních parametrů a vybrali jsme nejvhodnější z nich.

kmen	amplituda napětí	délka pulsu	počet pulsů	frekvence
IL	1200 V	20 μ s	100	2 Hz
PD	1000 V	20 μ s	100	2 Hz

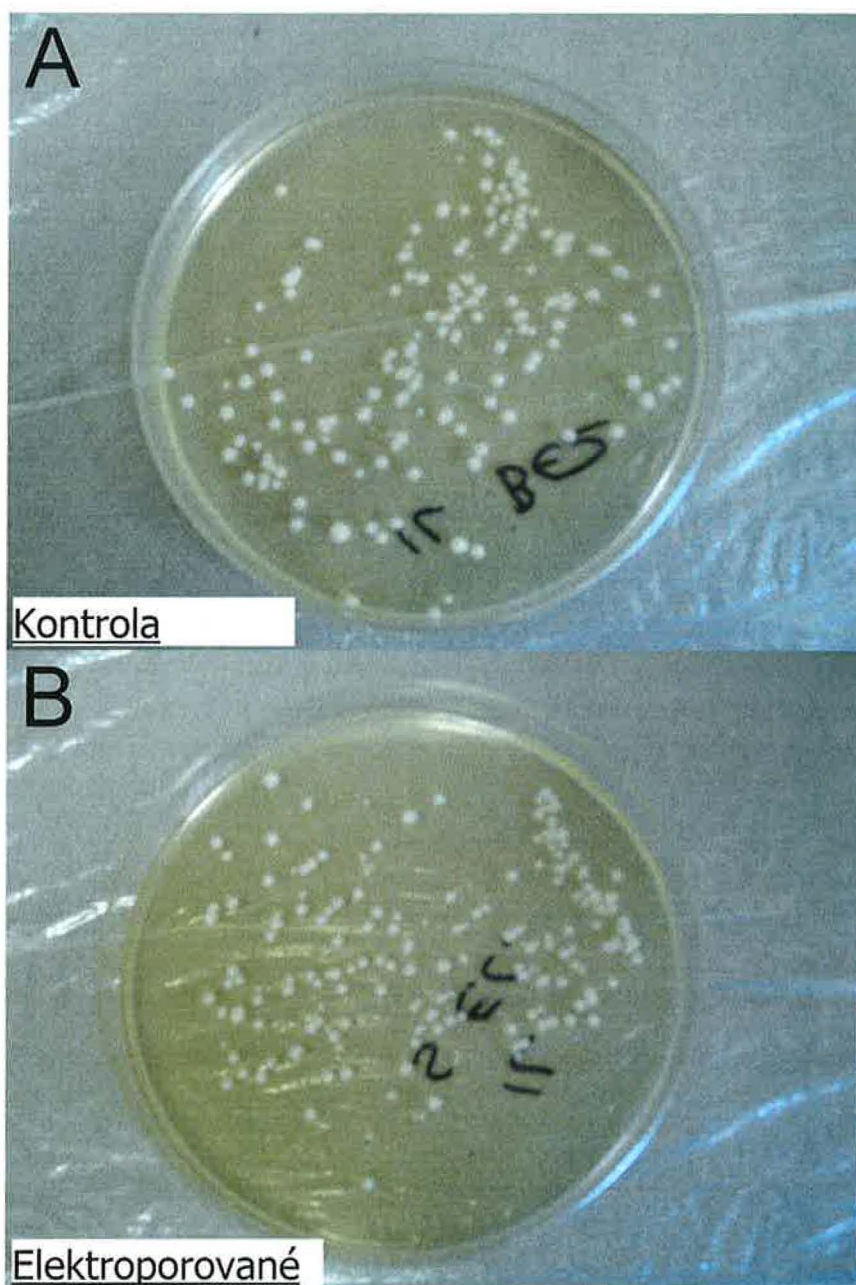
Tabulka 3.1: Parametry používané při elektroporaci

3.1.5. Kontrola přežívání buněk

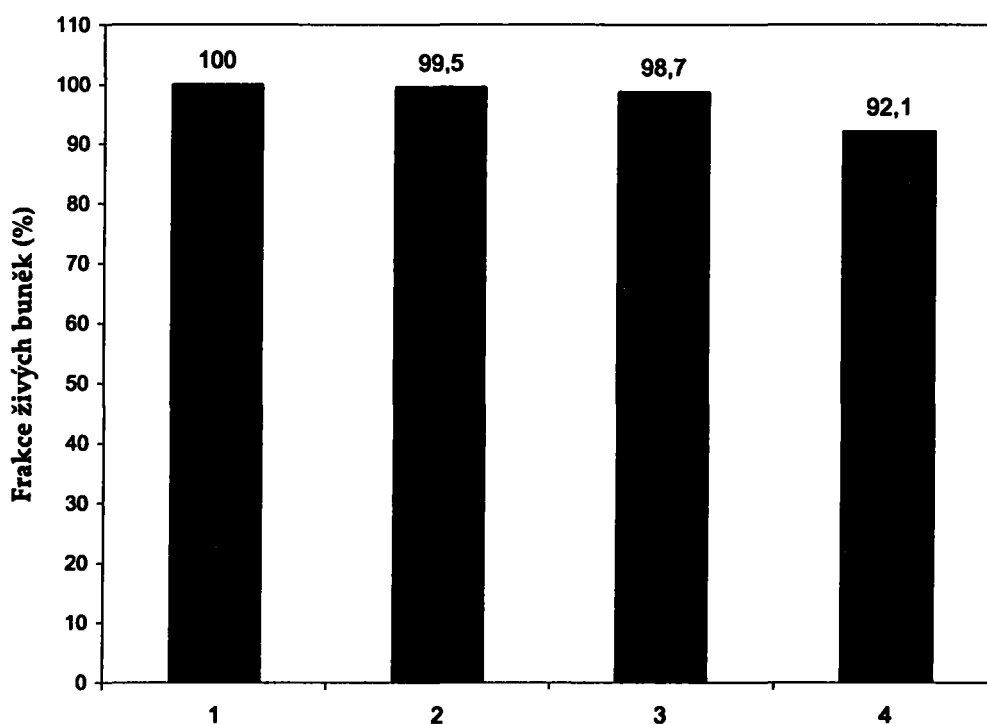
Pro kmen IL jsme se blíže zabývali přežíváním elektroporovaných buněk. Již při přípravě buněk jsou v médiu některé buňky mrtvé, v exponenciální fázi růstu to v našem případě bylo 0,5-1 % (kontrola pomocí PI). Po elektroporaci a promytí počet mrtvých buněk narostl. Při optimálním nastavení však tento nárůst nebyl dramatický – pouze na 2-5 % (kontrola pomocí PI).

Pro zjištění celkového fyziologického stavu a schopnosti kvasinek dále se množit byl proveden výsevový test. Tři agarové misky byly pokryty suspenzí elektroporovaných buněk a tři suspenzí buněk neelektroporovaných, misky byly kultivovány při teplotě 30°C. Po 48 hodinách

kultivace byly spočteny počty narostlých kolonií z buněk elektroporovaných a neelektroporovaných. Fotografie misek je uvedena na obrázku 3.5.



Obrázek 3.5: Výsevový test – kontrola přežívání buněk IL, obrázek A - výsev neelektroporovaných kvasinkových buněk, obrázek B - výsev buněk elektroporovaných (délka pulsu 20 μ s, 100 pulsů, napětí 1200 V, vzdálenost elektrod 2 mm, frekvence 2 Hz, koncentrace pyraninu 10 mM).



Obrázek 3.6: Kontrola úmrtnosti buněk pomocí výsevového testu. Sloupec 1 znázorňuje počet všech buněk v médiu, sloupec 2 frakci živých buněk bez aplikace elektroporace. Sloupce 3 a 4 jsou frakce živých buněk po aplikaci elektroporace. Sloupec 3 je kontrola pod mikroskopem pomocí PI, sloupec 4 vyjadřuje frakci buněk schopných se dále množit.

Dle výsevového testu elektroporace způsobila, že 7 % elektroporovaných buněk již nebylo schopno se množit. To znamená, že 5 % buněk, které nejsou při kontrole pomocí PI považovány za mrtvé, je elektroporací narušeno natolik, že umírají. Bylo také patrné, že kolonie elektroporovaných buněk jsou menší – elektroporace je pro buňky stresovým faktorem a prodlužuje jejich lag-fázi (dobu přizpůsobování se novým podmínkám, po kterou nejsou schopny se dělit).

Graficky je přežívání buněk znázorněno na obrázku 3.6. Je zřejmé, že optimalizované nastavení elektroporace je k buňkám šetrné, nezpůsobuje výrazné narušení kultury a fyziologického stavu buněk.

3.2. Vliv vybělování na excitační poměr

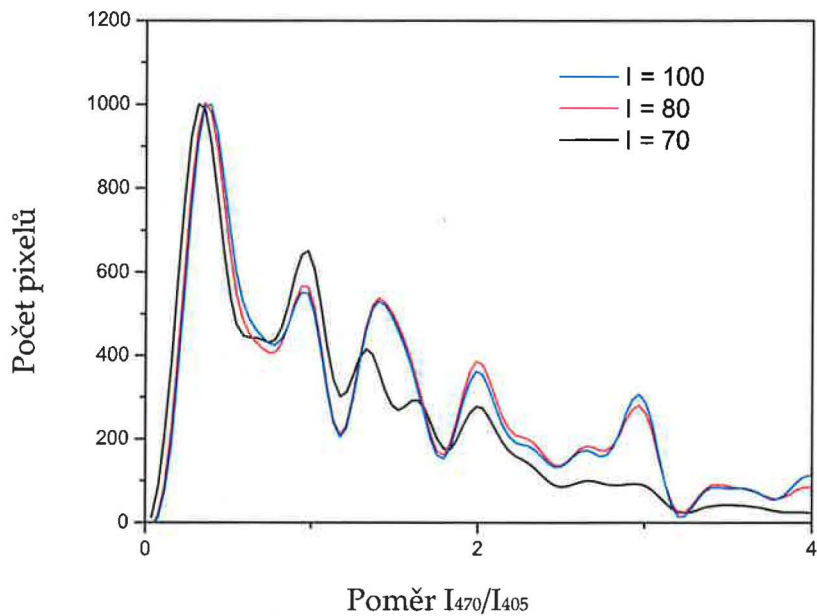
Při dlouhodobém osvětlení jednoho místa vzorku pozorujeme jev nazývaný vybělování sondy (anglicky photobleaching). Molekula fluorescenční sondy, osvětlená intenzivním světelným zdrojem, je působením světelné energie narušena a přestává fluoreskovat. Ověřovali jsme, do jaké míry má tento jev efekt na vypočtený poměr intenzit fluorescence.

Pro zjištění efektu vybělování na výsledný poměr intenzit jsme osvětlovali vybrané místo vzorku a pořídili jsme v časovém odstupu několik dvojic snímků pro výpočet poměru. Na obrázku 3.7 vidíme, že měříme-li rychle, tj. doba osvětlení mezi pořízením jednotlivých snímků není delší než 15 vteřin, je vliv vybělování malý a výsledný poměr se prakticky nemění. Budeme-li však vzorek osvětlovat dlouhodobě, tj. déle než 30 vteřin na jednom místě, dojde ke značnému vybělení a výraznému ovlivnění vypočteného poměru (viz. obrázek 3.8).

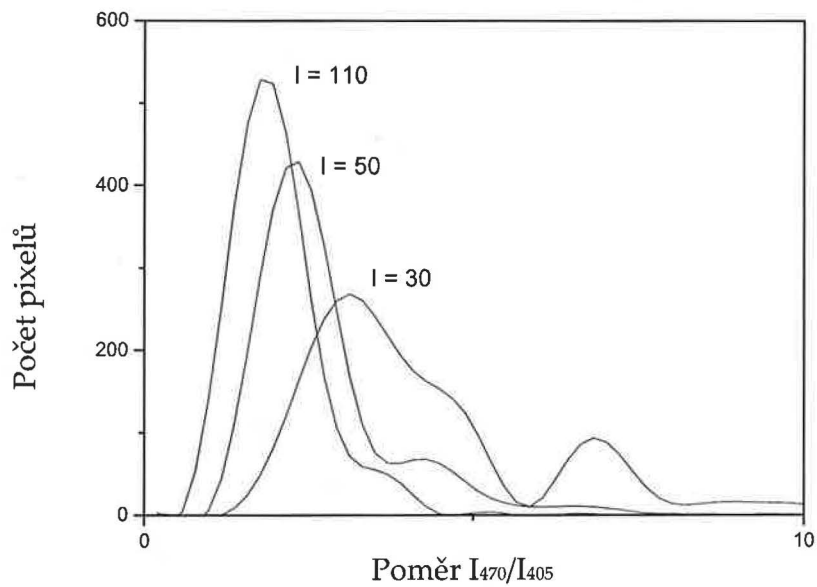
Z provedených měření vyplývá, že dlouhodobé osvětlování vzorku může znehodnotit výsledky měření. Je proto nutné pracovat rychle a snímky pořizovat bez prodlevy ihned po osvětlení vzorku, aby nedošlo k jeho vybělení. Mezi pořízením jednotlivých snímků je vhodné zdroj světla zaclonit, aby dávka osvětlení byla co nejmenší.

Při provádění pozorování bylo zjištěno, že při osvětlení zářením o vlnové délce 405 nm je vybělování daleko rychlejší. Hledání vhodných objektů pro snímkování jsme tedy prováděli při excitaci 470 nm, kdy byl efekt vybělování mnohem slabší.

Vliv vybělování byl nejvýraznější při kalibračním měření při kalibraci na vysoká pH. Kalibrační hodnoty pro pH 7,5 mohou být přes veškeré úsilí částečně zkresleny vybělením molekul sondy. Nejméně docházelo k vybělování při pH 6.0. Mechanismus tohoto efektu nám zatím není známý.



Obrázek 3.7: Vliv vybělování sondy na excitační poměr. Intenzity uvedené u křivek odpovídají snímku pořízenému při osvětlení zářením o vln. délce 470 nm. Doba osvětlení buněk mezi pořízením jednotlivých snímků při excitaci 470 a 405 nm je přibližně 15 vteřin.

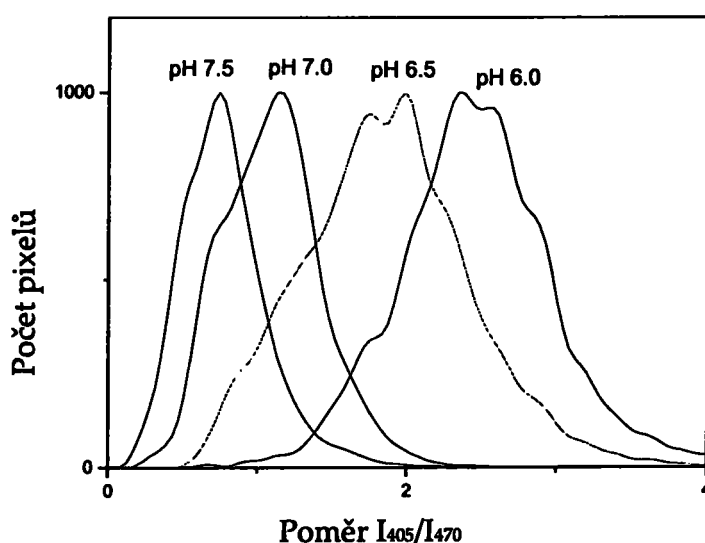


Obrázek 3.8: Vliv vybělování sondy na excitační poměr. Intenzity uvedené u křivek odpovídají snímku pořízenému při osvětlení zářením o vln. délce 470 nm. Doba osvětlení buněk mezi pořízením jednotlivých snímků při excitaci 470 nm a 405 nm je přibližně 45 vteřin.

3.3. Mikroskopická kalibrace pH buněk kmene IL

Chceme-li měřit pH kvasinkových buněk, musíme nejprve sestavit kalibrační křivku pyraninu, abychom mohli změny excitačního poměru převést na změny pH. Kalibraci však není možné provádět *in vitro*, protože sonda je ovlivňována nejen protony, ale v jisté míře i dalšími ionty a proteiny, které vnitrobuněčné prostředí obsahuje.

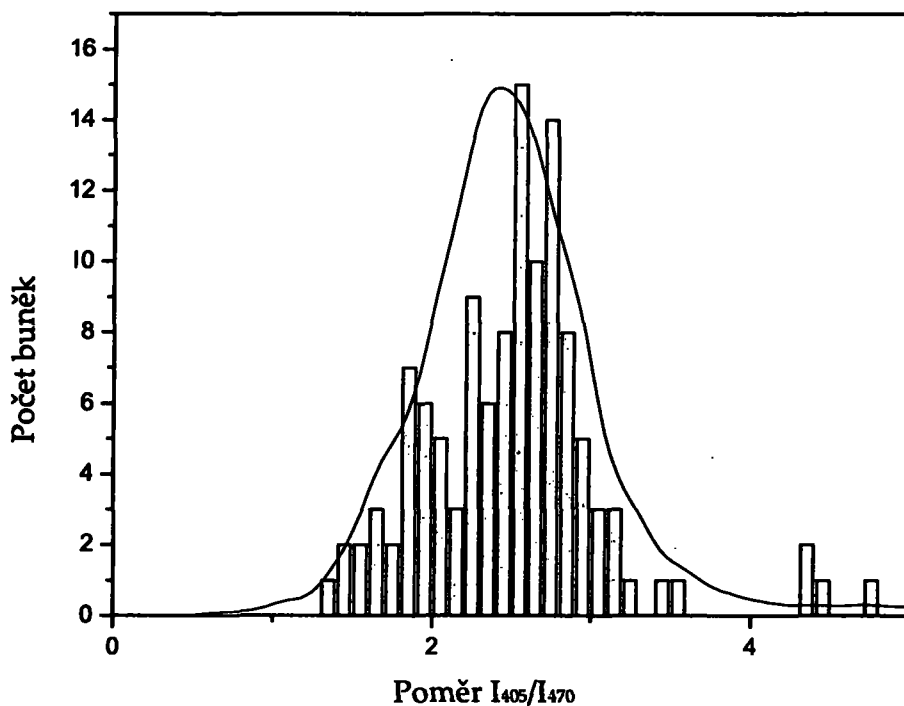
Byla proto vyvinuta metoda kalibrace pyraninu v kvasinkových buňkách spočívající v nastavení vnitrobuněčného pH na známou hodnotu pomocí elektroporace. Jak je popsáno v kapitole 2.3.3., barvili jsme buňky pro kalibraci sondy v pufru o známém pH. Během elektroporace tedy došlo nejen k obarvení buněk pyraninem, ale póry vzniklémi v buněčné membráně pronikly do buňky také protony a došlo tak k nastavení vnitřního pH. Buňky s nastaveným pH jsme i nadále uchovávali v pufru se shodným pH, aby nedocházelo ke spontánní změně pH vlivem protonového gradientu na membráně.



Obrázek 3.9: Kalibrace pyraninu pro buňky IL – histogramy ukazují rozdělení pH po kalibraci při jednotlivých pH. Histogramy jsou konstruovány z několika desítek buněk při každém pH.

Buňky s nastaveným pH jsme mikroskopicky proměřili a pomocí programu ImageJ bod po bodu vypočetli excitační poměr, který odpovídá pH v buňce. Do obrázku 3.9 jsme vynesli histogramy rozdělení poměru pro jednotlivé kalibrační pufrů. Je patrné, že při kalibraci na pH 7.5 je rozdělení poměrně homogenní, při nižších pH již mají křivky několik vedlejších maxim. Tato vedlejší maxima způsobují buňky, u kterých nebylo pH správně nastaveno nebo které měly ještě dostatek energie, aby nastavené vnitřní pH změnily. Tuto teorii potvrzuje obrázek 3.10, ve kterém vidíme srovnání dvou histogramů – čarou je vynesena histogram pixel po pixelu zkonstruovaný z několika snímků s mnoha buňkami, sloupce pak ukazují rozdělení střední hodnoty poměru pro celé buňky. Z vyhodnocení „buňka po buňce“ je vidět, že nedošlo ke kalibraci všech buněk. Buňky, ve kterých byl naměřen poměr (maximum histogramu) 2,8, byly nakalibrovány na pH 6,0, další frakce buněk má však excitační poměr okolo 1,8, což odpovídá vyššímu pH – buňky nebyly nakalibrovány a udržely si přirozené pH. Třetí frakce buněk má poměr vyšší než 4, to odpovídá nízkému pH okolí sondy – byla obarvena vakuola, u které nebylo elektroaktivně nastaveno vnitřního pH na požadovanou hodnotu.

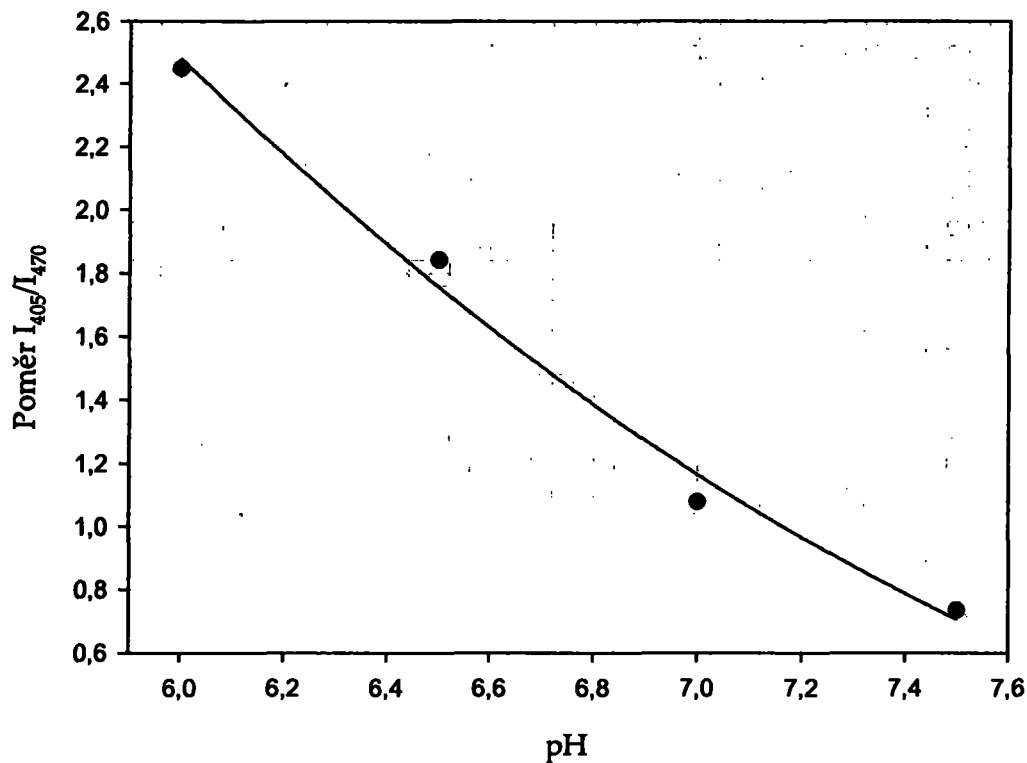
Porovnáním obou histogramů zjistíme, že jejich maxima i tvar se shodují. Při kalibraci tedy není nutné složitě vyhodnotit jednotlivé buňky a rozhodnout o jejich zařazení do kalibrace. Mnohem jednodušší metoda vyhodnocení celého snímku pixel po pixelu dává stejnou kalibrační křivku, jak jsme detailněji ukázali v článku [7].



Obrázek 3.10: Histogram excitačních poměrů odrážejících pH v jednotlivých buňkách pro kalibraci při pH 6,0 (sloupce). Pro porovnání je vynesena histogram konstruovaný pixel po pixelu (plná čára).

Kalibrační křivku pro pyranin získáme tak, že vyneseme maxima histogramů z obrázku 3.9 oproti nastavenému pH. Tyto hodnoty je možné dobře empiricky fitovat pomocí kvadratického polynomu. Kalibrační křivka pro pyranin v buňkách IL je ukázána na obrázku 3.11, invertujeme-li rovnici fitu, získáme empirické vyjádření závislosti pH na naměřeném excitačním poměru R:

$$pH = 8,986 - 1,839 \cdot \sqrt{R - 0,120} \quad (1)$$



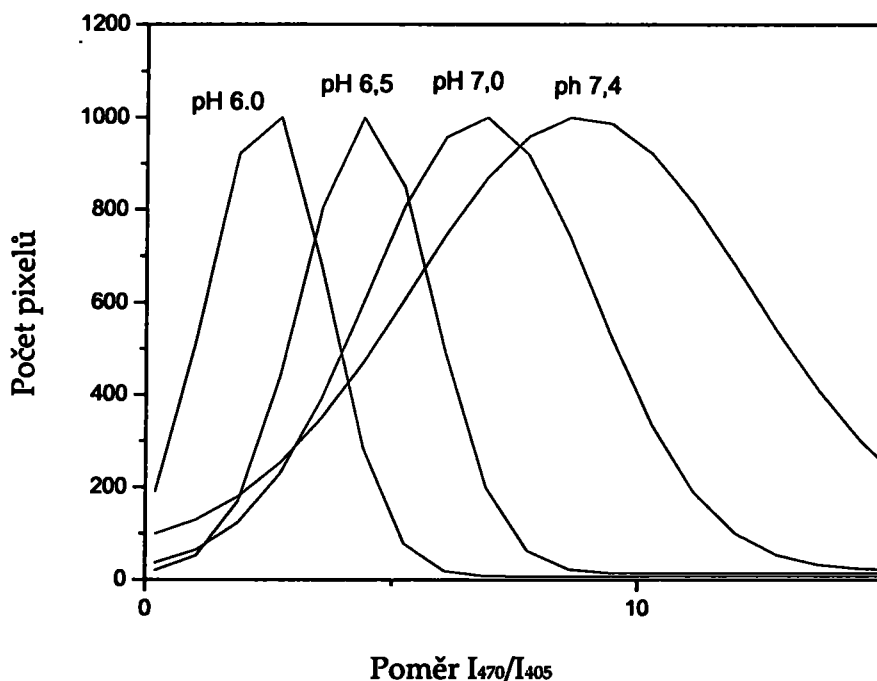
Obrázek 3.11 : Kalibrační křivka pyraninu pro měření pH v buňkách kmene IL, proložená křivka je polynom druhého stupně.

3.4. Mikroskopická kalibrace pH buněk kmene PD

Obecně kalibraci pyraninu nelze přenášet mezi různými kvasinkovými kmeny, jelikož složení cytozolu buněk nemusí být identické, a tudíž i kalibrační křivka pro rozdílné kmeny může být rozdílná. Kalibraci pyraninu v buňkách kmene PD jsme provedli při dvou různých podmínkách. Porovnávali jsme kalibraci buněk energizovaných a buněk vyhladovělých. Metodika provedení kalibrace byla stejná jako při kalibraci pH v buňkách IL.

3.4.1. Kalibrace energizovaných buněk

Energizovanými buňkami nazýváme buňky kalibrované v den jejich přípravy. Buňky jsou elektroporovány, kalibrovány a měřeny ihned poté, co narostly na potřebné OD. Předpokládáme, že by takto připravené buňky ještě mohly mít metabolickou energii pro aktivní změnu svého vnitřního pH. To bylo potvrzeno pozorováním buněk pod mikroskopem. Bylo pozorováno, že buňky ve zvýšené míře transportovaly pyranin do vakuol a vezikul (není ukázáno).

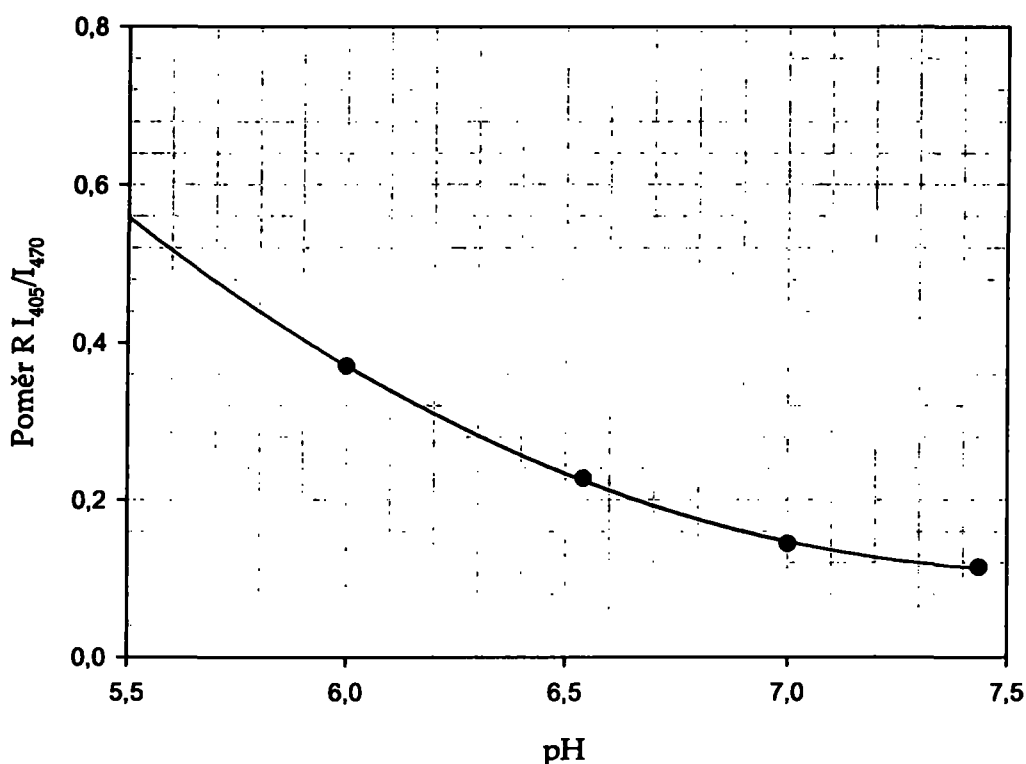


Obrázek 3.12: Kalibrace pyraninu pro buňky PD – histogramy ukazují rozdělení excitačních poměrů po kalibraci při jednotlivých pH.

Histogramy počtu pixelů vidíme na obrázku 3.12. Kalibrační křivku vzniklou vynešením poloh maxim histogramů proti kalibračním hodnotám pH pak ukazuje obrázek 3.13. Body byly opět proloženy polynomem druhého stupně.

Invertováním rovnice fitu získáváme kalibrační rovnici pro energizované buňky kmene PD:

$$pH = 7,598 - 3,133 \cdot \sqrt{R - 0,220} \quad (2)$$



Obrázek 3.13: Kalibrační křivka pro buňky PD při kalibraci v den přípravy buněk.

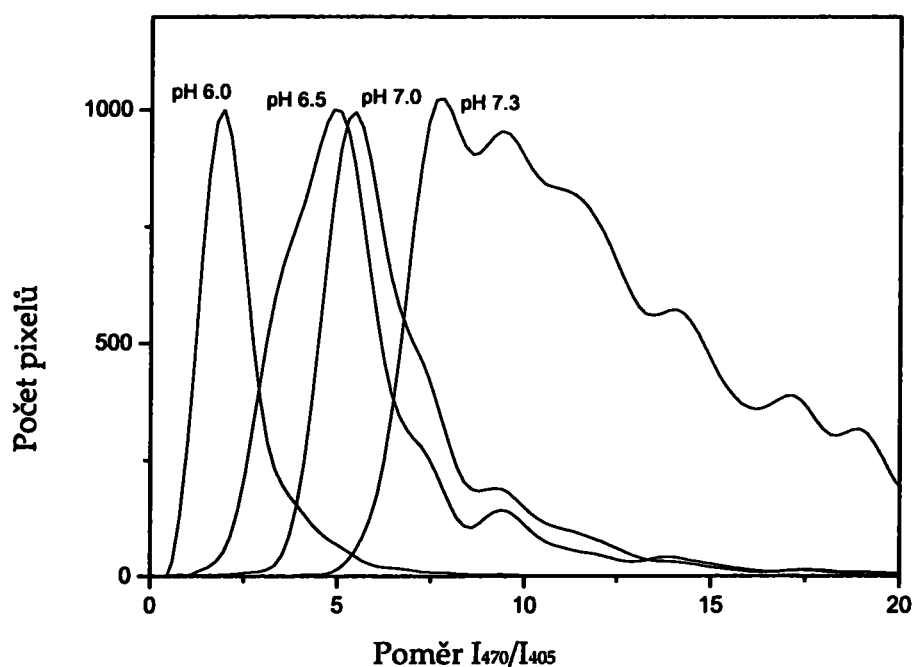
3.4.2. Kalibrace vyhladovělých buněk

Chceme-li dosáhnout toho, aby buňky již neměly energii pro redistribuci barviva a pro změnu svého vnitřního pH, je nutné je nechat vyhladovět. To jsme provedli tak, že narostlé buňky byly nechány 12-14 hodin v destilované vodě v třepací lázni při teplotě 30°C. Buňky tak měly optimální teplotu a přívod kyslíku a byly tedy nuceny dýchat. Probíhaly v nich všechny životní procesy. Buňkám však nebyl dodán vnější zdroj energie (živiny) a musely ji

tedy čerpat ze svých vnitřních zdrojů. Předpokládáme, že tak došlo ke snížení vnitřní energie buňky na minimum.

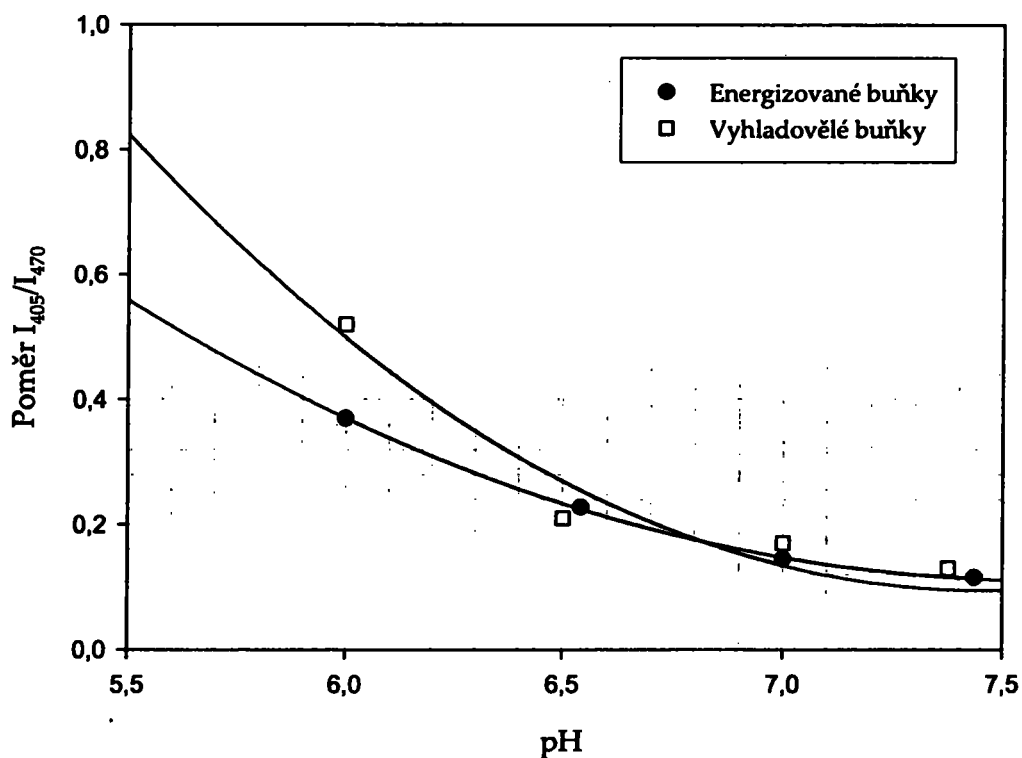
Takto připravené buňky jsme elektroporovali a okalibrovali.

Histogramy pro jednotlivá kalibrační pH vidíme na obrázku 3.14. U nejvyššího pH 7.3 je vidět vysoká nehomogenost naměřeného poměru. Ta není dána nekalibrovanými subpopulacemi buněk ve vzorku, ale vyšším vybělováním při tomto pH, kterému jsme ani při velmi rychlém měření nebyli schopni zabránit. Jako správnou hodnotu poměru pro toto pH budeme dále uvažovat hodnotu prvního maxima, která, jak bylo ukázáno, je nejméně ovlivněna efektem vybělování.



Obrázek 3.14: Kalibrace pyraninu pro PD buňky. Narostlé buňky byly ponechány 14 hodin v destilované vodě bez výživných látek, poté byly elektroporovány, nakalibrovány a okamžitě měřeny. Histogramy ukazují rozdělení excitačního poměru v buňkách pro jednotlivé kalibrační hodnoty pH.

Maxima histogramů jsme vynesli do grafu oproti kalibračním hodnotám pH a proložili jsme jimi polynom druhého stupně. V obrázku 3.15 vidíme srovnání kalibrace provedené na energizovaných a vyhladovělých buňkách PD. Při pH v rozmezí 6,5 – 7,5 pH jednotky nejsou mezi hodnotami obou kalibrací výrazné rozdíly. Při vnitřním pH 6,0 je patrný jasný rozdíl kalibrací. Hodnota poměru I_{405}/I_{470} pro buňky vyhladovělé je vyšší než pro buňky energizované. To je nejspíš způsobeno tím, že buňky energizované stačily mezi nastavením pH a měřením změnit hodnotu svého vnitřního pH. Použijeme-li kalibraci získanou na vyhladovělých buňkách můžeme odhadnout, že energizované buňky změnily své vnitřní pH z nastavené hodnoty 6,0 přibližně na 6,25.



Obrázek 3.15: Porovnání kalibrace energizovaných buněk PD a kalibrace provedené na vyhladovělých buňkách PD.

V dalších kapitolách jsme pro převedení excitačního poměru na pH použili kalibraci provedenou na vyhladovělých buňkách, která podle našeho názoru více odpovídá skutečnosti. Kalibrační rovnice pro tuto kalibraci má tvar:

$$\text{pH} = 7,454 - 2,290 \cdot \sqrt{R - 0,096} \quad (3)$$

Extrapolace do oblasti nižších pH je pouze orientační a její chybu odhadujeme na 0,2 pH jednotky. Pro přesnější určení pH v této oblasti by bylo nutné přidat do kalibračních měření další body v oblasti nižších pH.

Jelikož při kalibraci pyraninu v buňkách IL byli použity jiné filtry než při kalibraci v buňkách PD, nelze tyto kalibrace přímo srovnávat.

3.5. Měření vnitrobuněčného pH buněk kmene PD

Při elektroporativním barvení buněk pyraninem dochází především k obarvení cytozolu.

Při barvení vyhladovělých buněk sonda zůstává v cytozolu a neproniká do organel. Při pozorování pod mikroskopem můžeme v místech, kde se nachází vakuola, pozorovat tmavší místo.

Při barvení energizovaných buněk již není rozložení barviva tak homogenní. Buňka se snaží pro ni cizorodou látku eliminovat a transportuje ji do vakuoly a dalších organel. Po určité době tak dochází k výraznému obarvení vakuol. U některých buněk je možné pozorovat, že je obarvena pouze vakuola a v cytozolu barvivo není. Vysokou koncentraci barviva je též možné pozorovat v malých vezikulách, které buňka později vyloučí.

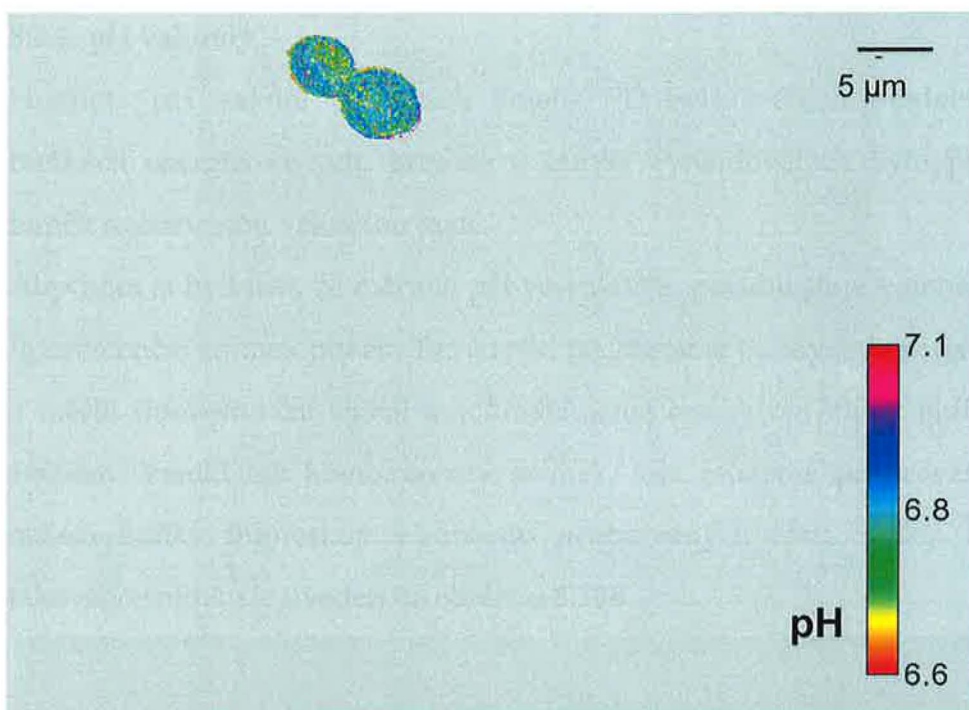
Pokud jsme energizované obarvené buňky ponechali přes noc v destilované vodě, došlo k přerozdělení barviva především do vakuol. Pokud byly buňky

resuspendovány v růstovém médiu s obsahem glukózy a kultivovány v třepací lázni při teplotě 30°C, začaly se dělit. Po cca dvanácti hodinách bylo pozorováno, že barvivo se rovnoměrně přerozdělilo do dceřiných buněk, v suspenzi bylo možné pozorovat i buňky velmi intenzivní, které se nejspíš nebyly schopny dělit. Koncentrace barviva v dceřiných buňkách již nebyla dostačující pro poměrová měření a z neznámého důvodu docházelo k daleko rychlejšímu vybělování sondy.

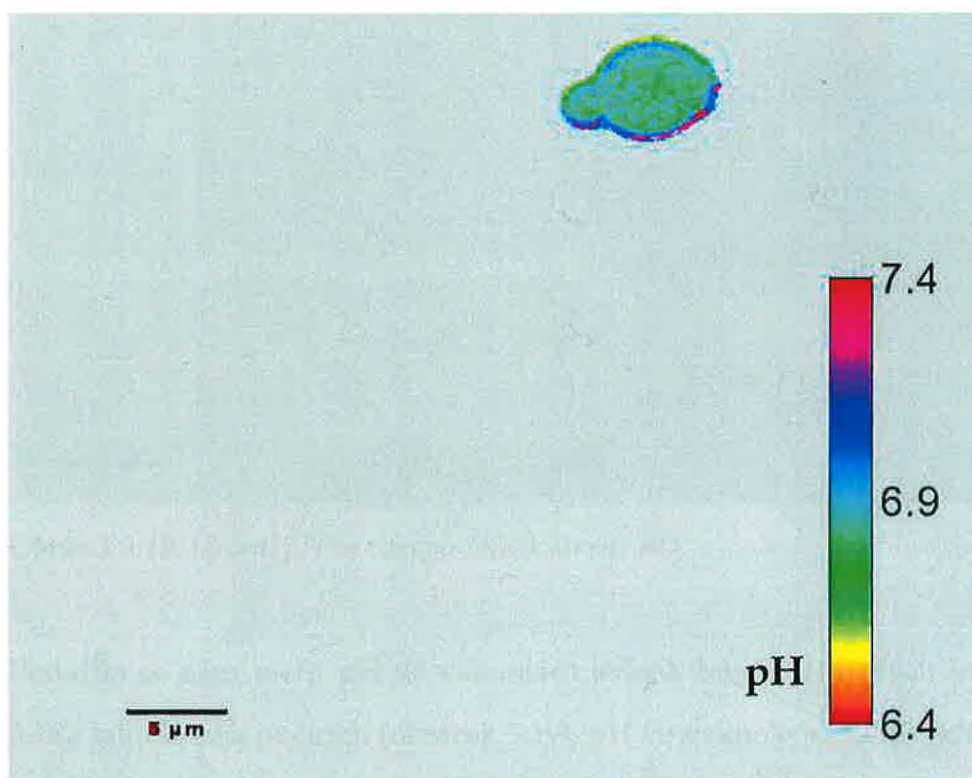
3.5.1. pH cytozolu

Hodnota pH cytozolu byla měřena na energizovaných i na vyhladovělých buňkách kmene PD. Hodnoty pH se při obou měřeních se shodovaly. Byly proměřeny jak buňky „dospělé“ (obrázek 3.16), tak buňky pučící (obrázek 3.17). Hodnoty pH cytozolu se dle výsledků měření v rámci buněčného cyklu nemění.

Rozložení pH v cytozolu buněk je homogenní jak v rámci jedné buňky, tak v rámci celé kultury buněk. Výsledná naměřená hodnota pH cytozolu je 6,8 (chybu určení této hodnoty můžeme odhadnout zhruba na 0,1 pH jednotky). Tato hodnota se shoduje s publikovanými výsledky, kdy pH cytozolu bylo v rozmezí 6,3-7,0 v závislosti na konkrétním kmenu kvasinek a růstové fázi kultury buněk. Při porovnání s prací H. Drápalové [3] vidíme, že při použití stejné metody a stejného kmene kvasinek jsme naměřili mírně vyšší hodnotu (Drápalová uvádí hodnotu pH cytozolu 6,3-6,4). To je způsobeno tím, že při makroskopickém měření je výsledkem střední hodnotou všech obarvených buněk a do tohoto výsledku mohou zasáhnout i buňky s obarvenou vakuolou, která má nižší pH. Při mikroskopickém měření vliv obarvených vakuol eliminujeme a naměřená hodnota pH tak může být o něco vyšší.



Obrázek 3.16: Určení pH v cytozolu buněk PD.

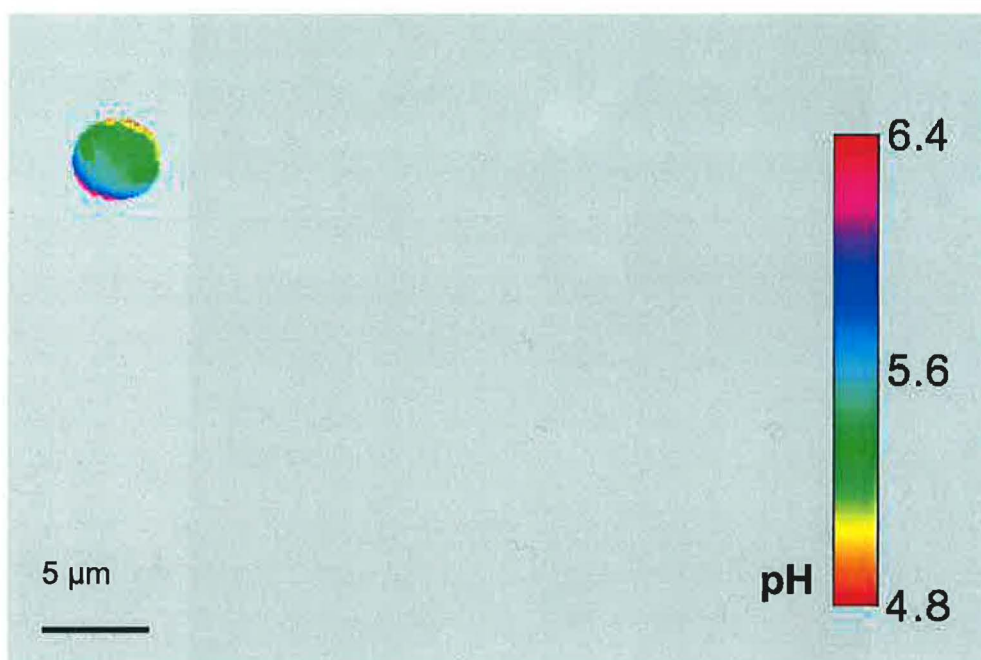


Obrázek 3.17: Určení pH cytozolu dělících se buněk pH. Barevná kontura nesignalizuje rozdílné pH v blízkosti membrány. Je to artefakt vzniklý mírným posuvem buňky mezi jednotlivými snímky. Do výpočtu střední hodnoty pH nebyly tyto oblasti započítány.

3.5.2. pH vakuoly

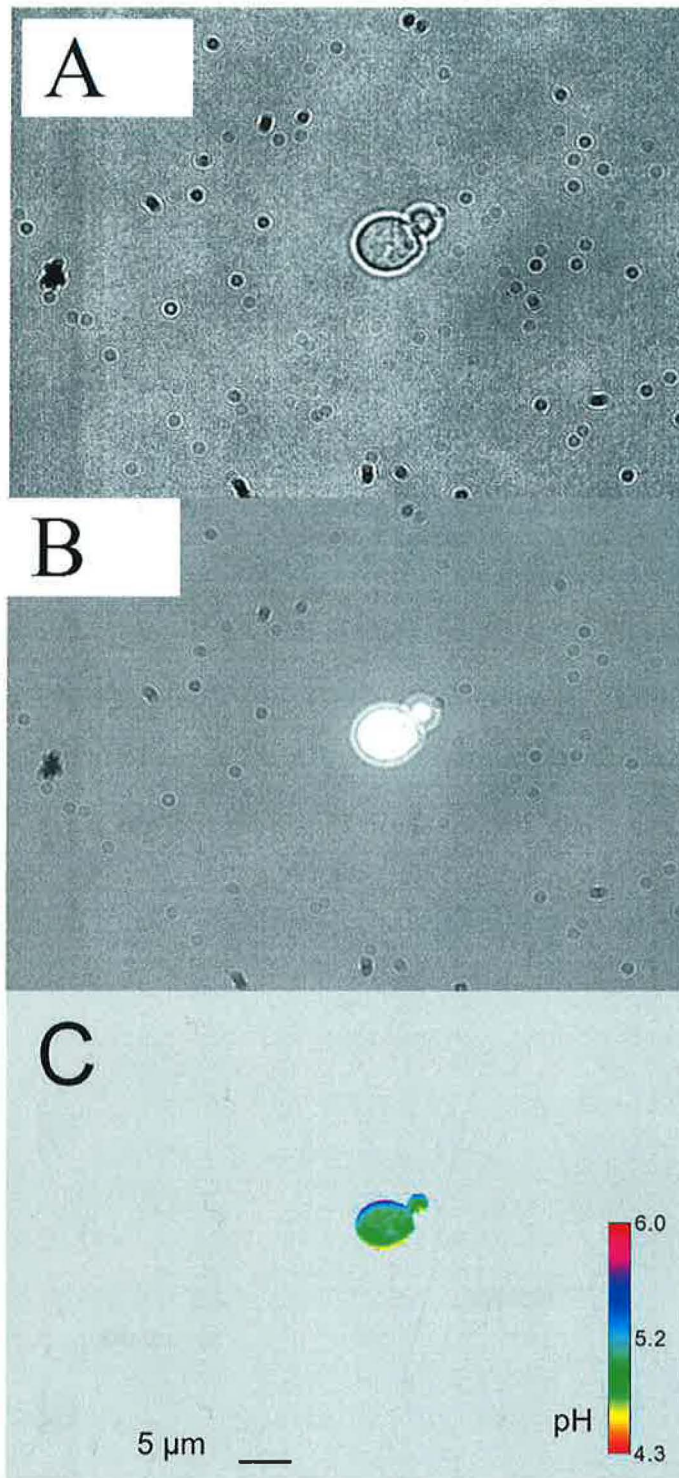
Hodnota pH vakuol v buňkách kmene PD byla měřena především na buňkách energizovaných, protože u buněk vyhladovělých bylo procento buněk s obarvenou vakuolou malé.

Abychom si byli jisti, že měříme pH ve vakuole, pořídili jsme kombinovaný fluorescenční snímek buněk. Ten vznikl tak, že jsme buňky jednak excitovali a měřili fluorescenční signál a současně jsme buňky osvětlili i viditelným světlem. Vznikl tak kombinovaný snímek, kde můžeme pozorovat, které oblasti buňky fluoreskují v kontextu neobarvených částí buňky. Příklad takového snímku je uveden na obrázku 3.19B.



Obrázek 3.18: Určení pH ve vakuole buněk kmene PD.

Podařilo se nám měřit pH ve vakuolách jednak buněk dospělých (obrázek 3.18), tak i buněk pučících (obrázek 3.19). pH ve vakuole jednotlivých buněk bylo homogenní, „stíny“ na okrajích vakuoly na obrázcích 3.18 a 3.19C nevypovídají o rozdílném pH, ale o drobném posunu snímků, ze kterých počítáme excitační poměr. Jako hodnotu pH vakuoly tedy musíme brát

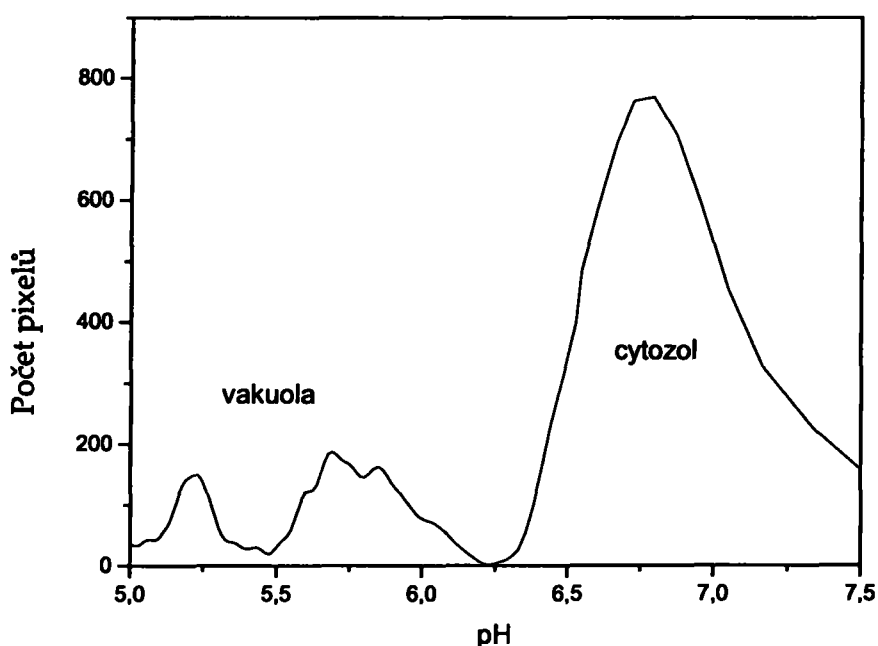


Obrázek 3.19: Měření pH ve vakuole kmene PD – pučící buňka. Snímek A je pořízen ve viditelném světle, snímek B je kombinovaný fluorescenční snímek, na kterém můžeme pozorovat, která oblast fluoreskuje v kontextu ostatních částí buňky. Na snímku C vidíme vypočtený poměr intenzit převedený podle kalibrace z kapitoly 3.4.2. na pH.

pouze hodnotu uprostřed vakuoly. Hodnota pH vakuol v rámci celé kultury nebyla homogenní, pohybovala se v rozmezí 5,0-6,1. Rozdílné pH vakuoly jednotlivých buněk je pravděpodobně způsobeno rozdílným fyziologickým stavem měřených buněk.

Na obrázku 3.20 je pro porovnání vyneseno pH cytozolu a vakuol buněk kmene PD, do histogramu bylo započteno cca 20 poměrových snímků cytozolu a vakuol. Je patrné, že rozložení pH cytozolu je homogenní. Distribuce pH ve vakuolách je velmi široká, pH je homogenní v rámci jedné vakuoly, může se však výrazně lišit buňku od buňky. Z daného počtu snímků není možné určit, zda rozložení pH ve vakuolách v rámci celé kultury buněk PD bude odpovídat znázorněné distribuci, pro toto by bylo nutné provést další měření většího počtu vakuol buněk.

Příklad snímku, který zachycuje jednak obarvený cytozol buněk a zároveň obarvené vakuoly, je uveden na obrázku 3.21.



Obrázek 3.20: Porovnání pH ve vakuolách a v cytozolu buněk kmene PD.

Závěr

Hlavní výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Byla provedena optimalizace pulzní elektroporace jako metody barvení buněk pro dva kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Pro kmeny PD i IL bylo dosaženo vysokého stupně obarvení, úmrtnost buněk během elektroporace byla snížena pod 10 %.
2. Byl zhodnocen vliv efektu vybělování sondy na výsledky měření vnitrobuněčného pH pomocí pyraninu. Při krátkých dobách osvětlení vzorku je vliv vybělování pyraninu zanedbatelný.
3. Byla vypracována metoda mikroskopické kalibrace pH na živých buňkách.
4. Byla provedena in vivo kalibrace fluorescenční odpovědi sondy v buňkách kmene PD a IL. Byla porovnána kalibrace na buňkách energizovaných a vyhladovělých.
5. Mikroskopicky bylo změřeno pH cytozolu buněk kmene PD. Naměřená hodnota je 6,8 a je homogenní ve všech buňkách buněčné kultury.
6. Mikroskopicky bylo změřeno pH vakuol buněk kmene PD. Naměřená hodnota se pohybuje v rozsahu 5,0-6,1 pH jednotky.

Literatura

- [1] Alberts, B., Bray, D. Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *The cell*, Garland Publishing, New York, 1998.
- [2] Carmelo, V., Santos, H., SaCorreia, I.: *Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1325 (1): 63-70 APR 3 1997
- [3] Drápalová, H.: *Studium vlivu stresových faktorů na intracelulární pH kvasinek pomocí fluorescenčních sond*, diplomová práce, FÚ UK, Praha 2005
- [4] Gášková, D., Brodská, B., Heřman, P., Večeř, J., Malínský, J., Sigler, K., Benada, O., Plášek, J.: *Fluorescent probing of membrane potential in walled cells; diS-C₃(3) assay in Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 14(1998): 1189-97.
- [5] Haworth, R.S., Lemire, B.D., Crandall, D., Cragoe Jr., E.J., Fliegel, L.: *Characterization of proton fluxes across the cytoplasmic membrane of the yeast Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1098 (1991): 79-89.
- [6] Haworth, R.S., Fliegel, L.: *Intracellular pH in Schizosaccharomyces-Pombe – comparison with Saccharomyces-Cerevisiae*, *Molecular and cellular biochemistry* 124 (2): 131-140 JUL 21 1993
- [7] Heřman, P., Drápalová, H., Mužíková, R., Večeř, J.: *Electroporative adjustment of pH in living yeast cells: ratiometric fluorescence pH imaging*, *Journal of Fluorescence*, vol. 15, No. 5: 763-768 September 2005
- [8] Invitrogen: *Probes Useful at Near-Neutral pH*, Handbook, Section 20.2, www.probes.com
- [9] Janderová, B., Bendová, O.: *Úvod do biologie kvasinek*, Karolinum, Praha, 1999.

- [10] Johnston M.: *Genome sequencing: The complete code for eukaryotic cell*, Current biology (1996), 6(5): 500-503
- [11] Maláč, J.: *Fluorescenční metody zkoumání stavu plazmatické membrány kvasinek za stresových podmínek*, diplomová práce, FÚ UK, Praha 2002.
- [12] Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., Calahorra, M.: *Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation*, Journal of Bacteriology, 177(4): 1017-1022.
- [13] Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., et al.: *Pyranine introduced by electroporation as an indicator of the internal pH of yeast*, Folia Microbiologica 39 (6): 538-539 1994
- [14] Prosser, V. a kol.: *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha 1989.
- [15] Slavík, J.: *Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes*, FEBS Lett., 140(1982): 22-26
- [16] Tsien, R. Y.: *Fluorescent indicators of ion concentrations*, Methods in Cell biology, Vol. 30 (1989)
- [17] Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D.: *Intracellular pH Distribution in Saccharomyces cerevisiae Cell Populations, Analyzed by Flow Cytometry*, Applied and Environmental Microbiology, March 2005, p. 1515-1521, Vol. 71, No. 3
- [18] Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha 1995.
- [19] Werner, R.: *Ion mapping in plant cells – methods and applications in signal transduction research*, Planta (2000), 210: 347-370