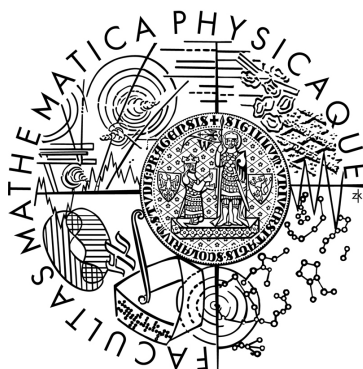


Univerzita Karlova v Praze

Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Radek Divín

Změny vnitrobuněčného pH kvasinek za stresových podmínek

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika (FBCHF)

Praha rok 2015

Úvodem bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc. Díky jehož radám, vedení, pomoci při získávání potřebných dat, konzultacím a vstřícnému vystupování bylo možné z části nahlédnout do zkoumané problematiky. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Daně Gáškové, CSc. za velmi cenné informace, navrhování experimentů podstatných pro hlubší proniknutí do dějů odehrávajících se v buňkách za stresových podmínek a celkovou pomoc s tématem diplomové práce. Velký dík patří také Mgr. Jakubu Záhumenskému, který mě prováděl veškerými úskalími biologické laboratoře, byl mým odborným dohledem při drtivé většině prováděných měření a neúnavným zdrojem informací. Díky jeho laboratorní práci, pomoci při kultivování buněk a přátelskému přístupu s notnou dávkou trpělivosti, bylo možné dospět až k sepsání diplomové práce. V neposlední řadě děkuji Mgr. Ivě Jančíkové za pomoc při zvládnutí některých základních laboratorních dovedností a přípravu živných médií. Na závěr děkuji celému FÚ UK za možnost využít biologické laboratoře a RNDr. Tomáši Hendrychovi, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty UK, Katedry genetiky a mikrobiologie, za přípravu a poskytnutí studovaných mutantních kmenů kvasinek AD1-3+pHluorin.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval 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 Praze dne 3. 4. 2015

podpis:

Název práce: Změny vnitrobuněčného pH kvasinek za stresových podmínek

Autor: Radek Divín

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

Abstrakt:

Specifické hodnoty intracelulárního pH (pH_i) mohou ovlivnit veškeré biochemické procesy v buňce, což je důvodem důležitosti studia změn intracelulárního pH za stresových podmínek. V práci bylo využito kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jakožto modelového organismu eukaryotních buněk. Monitorování intracelulárního pH buněk bylo prováděno metodou synchronního skenování fluorescence geneticky kódované fluorescenční sondy pHluorin, lokalizované v cytosolu buněk. Buňky byly vystaveny stresovým podmínkám vlivem chemických změn prostředí. Studovala se schopnost buněk udržet si stálou hodnotu intracelulárního pH v různě kyselých prostředích. Pozornost se věnovala také vlivu glukózy na optimalizování cytosolického pH. Práce se zabývá i změnami intracelulárního pH pod vlivem přítomnosti KCl v suspenzi. Dále se monitoroval pokles cytosolického pH buněk působením protonoforu CCCP. Vliv stresového prostředí na intracelulární pH byl studován z pohledu variací chemických látek a jejich množství v buněčné suspenzi a dále i z pohledu růstové fáze zkomaných buněk.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, vnitrobuněčné pH, pHluorin, stres fluorescence

Title: Changes of intracellular pH in yeast cells under stress conditions

Author: Radek Divín

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

Abstract:

Specific values of intracellular pH (pH_i) can affect all biochemical processes in a cell and this phenomenon is closely connected with the degree of importance of changes in the intracellular pH under the stress conditions. In the Master Thesis, the yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* were used as a model of organism eukaryotic cells. Monitoring of intracellular pH of the cells was performed by the method of synchronous fluorescence scan technique of genetically encoded fluorescent probes pHluorin which was located in the cytosol of the cells. The cells were exposed to stress conditions due to the chemical changes in the environment. Consequently, their ability to maintain a stable value of the intracellular pH in various acidic environments was studied in more detail. The attention was also focused on the impact on optimizing of glucose cytosolic pH. The work was centered on the changes in intracellular pH under the influence of the presence of KCl in suspension. Furthermore, the decrease of cytosolic pH of monitored cells by protonophore CCCP was investigated. The effect of stress environment on the intracellular pH was studied in terms of variations of chemicals and their quantity in the cell suspension and also in terms of growth phase of researched cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, intracellular pH, pHluorin, stress, fluorescence

Obsah

Úvod.....	1
1 Teoretická část.....	3
1.1 Kvasinky <i>Sacharomyces cerevisiae</i>.....	3
1.2 Zdroje energie a uhlíku.....	4
1.3 Zdroje dusíku.....	5
1.4 Proliferace: Mitotický buněčný cyklus.....	5
1.5 Růstová křivka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	6
1.5.1 Lag fáze.....	7
1.5.2 Exponenciální fáze.....	7
1.5.3 Diauxická fáze.....	8
1.5.4 Post-diauxická fáze.....	8
1.5.5 Stacionární fáze.....	8
1.5.6 Smrt buňek.....	9
1.6 pH v biologických systémech.....	9
1.6.1 Definice pH_i	9
1.6.2 Buněčná pufrační kapacita.....	10
1.6.3 Chemický potenciál a pH.....	11
1.6.4 Definice membránového potenciálu.....	12
1.6.5 Regulace cytosolického pH.....	12
1.6.6 Cytosolické pH, transport kationtů.....	14
1.7 Fluorescenční sondy.....	15
1.7.1 Využití fluorescenčních sond.....	15
1.7.2 Geneticky kódované fluorescenční sondy.....	15
1.7.3 GFP - green fluorescent protein.....	16
1.7.4 Protonový transfer v GFP.....	19
1.7.5 Faktory ovlivňující spektrální charakteristiky GFP.....	20
1.7.6 pHluorin.....	21
2 Metody a měření.....	22
2.1.1 Autofluorescence.....	22
2.1.2 Metoda synchronního skenování fluorescence.....	24

3	Experimentální část.....	26
3.1	Použité kmeny buněk a jejich kultivace.....	26
3.1.1	Kmen AD1-3 + poměrový pHluorin.....	26
3.1.2	Kultivace buněk a jejich příprava pro měření.....	26
3.2	Příprava pufrů a použité chemikálie.....	27
3.2.1	Pufry.....	27
3.2.2	CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone).....	28
3.2.3	Použité chemikálie.....	29
3.3	Měření optické hustoty (OD) suspenzí kvasinek.....	30
3.4	Měření fluorescence.....	30
3.4.1	Příprava buněk pro fluorescenční měření.....	30
3.4.2	Postup a technické vybavení pro měření fluorescence.....	31
4	Výsledky a diskuse.....	33
4.1	Měření růstových křivek.....	33
4.2	Měření intracelulárního pH kmene AD1-3+pHluorin.....	36
4.2.1	Kalibrace poměrů synchronskenu na intracelulární pH.....	36
4.2.2	Vliv hustoty suspenze na měření intracelulárního pH.....	37
4.2.3	Vliv typu pufru na intracelulární pH.....	38
4.2.4	Vliv pH pufru na intracelulární pH.....	40
4.2.5	Vliv stáří buněk na intracelulární pH.....	41
4.2.6	Vliv KCl a délky inkubace buněk v připravené suspenzi.....	42
4.2.7	Ovlivnění intracelulárního pH přítomností protonoforu CCCP.....	45
4.2.8	Vliv různých druhů cukrů na intracelulární pH.....	49
5	Závěr.....	51
	Seznam použité literatury.....	52
	Seznam tabulek.....	63
	Seznam použitých zkratk.....	64

Úvod

Intracelulární pH ovlivňuje veškeré biochemické procesy odehrávající se v buňce a tudíž osvojení si základních znalostí z této problematiky je nezbytným krokem pro pochopení procesů odehrávajících se v živých organizmech. Změnám intracelulárního pH bylo do dnešní doby věnováno velké množství pozornosti, avšak nelze říci, že se jedná o zcela prozkoumanou oblast a při studiu publikované literatury na témata změn intracelulárního pH je stále možno narazit na protichůdné výsledky, či výsledky způsobené doposud ne zcela objasněnými ději uvnitř buňky. Tato diplomová práce si neklade za cíl osvětlit doposud neobjasněné jevy uvnitř buněk, či publikovat převratné závěry. Práce byla pojata jako náhled na problematiku změn intracelulárního pH kvasinek za stresových podmínek a praktické seznámení se s biofyzikálním vědním oborem, což považuji za velký osobní přínos.

Jako testovaný organismus byl vybrán mutantní kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, jež byly pro svou jednoduchost, snadnou manipulovatelnost a rychlost reprodukce byly stanoveny jako modelový organismus pro eukaryota. Kvasinkám je věnována první třetina teoretické části. V experimentech využívaný mutantní kmen s označením AD1-3+pHluorin je specifický nedostatkem PDR (pleiotropic drug resistance) pump, jejichž studium hraje významnou roli k pochopení fenoménu vícečetné lékové rezistence.

Pomocí měření změn vnitrobuněčného pH, lze dávat do souvislosti vliv depolarizace buňky s vnitrobuněčnou koncentrací iontů H^+ . Membránový potenciál je hnací silou pro transport iontů a živin. Reguluje membránové proteiny a jako důsledek také reguluje pH uvnitř buňky. Teoretickým základem membránového potenciálu a intracelulárnímu pH je věnována druhý úsek teoretické části.

V závěru teoretické části je pojednáváno o geneticky kódovaných intracelulárních fluorescenčních sondách, které v současné době nacházejí široké uplatnění jako neinvazivní metodu pro studium procesů odehrávajících se v organizmech. Organismy se vyznačují jistou mírou autofluorescence, tudíž pro správnost výsledků je nutné tento jev potlačit popřípadě zcela odstranit odečtením autofluorescence z naměřených sychroskenů.

V praktické části této práce byl zkoumán vliv různých stresorů na intracelulární pH kvasinek AD1-3+pHluorin. Stresování buněk je možno provádět

různými změnami ať už fyzikálních podmínek (teplota, tlak, ..) nebo chemického složení prostředí v němž se buňky vyskytují. V rámci námi prováděných experimentů se využívalo stresorů v podobě chemických látek. Studovala se schopnost buněk udržet si stálou hodnotu intracelulárního pH v různě kyselých prostředích. Pozornost se věnovala také vlivu glukózy na optimalizování cytosolického pH. Práce se zabývá i změnami intracelulárního pH pod vlivem přítomnosti KCl v suspenzi. Dále se monitoroval pokles cytosolického pH buněk působením protonoforu CCCP. Vliv stresového prostředí na intracelulární pH byl studován z pohledu variací chemických látek v buněčné suspenzi ale i z pohledu růstové fáze zkomaných buněk.

1 Teoretická část

1.1 Kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*

Buňky patří k základním „stavebním kamenům“ každého živého organismu. Organismy lze třídit na základě komplexnosti jeho buněk. Rozlišovány jsou prokaryotní a eukaryotní organismy. Prokaryotní organismy se obvykle vyskytují jako jednobuněčné organismy s výjimkou některých bakterií, které během svého životního cyklu mohou procházet vícebuněčnými stádii (myxobacteria) [1]. Eukaryota jsou ve většině případů, není to však pravidlem, vícebuněčné organismy. Během vývoje eukaryotů se jejich buňky diferencují a adaptují na předem danou funkci, což má za následek, že tělo eukaryota je složeno z různých typů buněk. Nejjednodušším protagonistou eukaryotního organismu jsou jednobuněčné kvasinky, které mohou tvořit vícebuněčné systémy, kde každá buňka stále představuje jednotlivý organismus [2,3,4].

Saccharomyces cerevisiae náleží do říše hub oddělení vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*). Tento druh kvasinek patří mezi první objevené a izolované kvasinky, které jsou v současné době široce využívány člověkem například v pekařství, pivovarnictví a dalších odvětvích. *S. cerevisiae* se vyznačuje snadnou manipulací a rychlou reprodukcí v médiu s dostatkem živin.

Prvním přečtený a publikovaný genom eukaryotního organismu byl právě genom *Saccharomyces cerevisiae*, což se stalo roku 1996 [5]. Ve srovnání s vyššími eukaryotními organismy *S. cerevisiae* obsahuje pouze 13 000 000 párů bazí, které definují 6275 genů uspořádaných do 17 chromozomů. *S. cerevisiae* se může vyskytovat jak v diploidní, tak haploidní formě. Díky jednoduchosti jejich genomu a haploidní formě je za pomoci genetické manipulace poměrně snadné vytvoření nových mutantních kmenů s požadovanými vlastnostmi [6]. Mimoto buňky obsahují takzvaný 2 μm plasmid, díky němuž je možná snadná genetická manipulace. Kvasinky, vzhledem k evolučnímu vztahu k vyšším eukaryotním organismům, se vyznačují velkou podobností se spoustou procesů probíhajících v buňkách vyšších živočichů. Výsledky získané testováním *S. cerevisiae* lze tudíž extrapolovat na další eukaryotní buňky komplexnějších organismů [7]. Odhaduje se,

že kvasinkové buňky mají shodných 23% genomu se savčími buňkami, tudíž studium kvasinkových buněk může poskytnout důležité informace o lidských buňkách. Jako modelový organismus eukaryotických buněk jsou obecně uznávány právě kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae*, kterými se tato práce zabývá [5,2].

S. cerevisiae jsou typicky mírně elipsovitého tvaru, kde rozměr délky buňky se pohybuje v intervalu 5-10 μm . Kvasinky se mohou vyskytovat ve formě vyznačující se anaerobním i aerobním způsobem života. Za aerobních podmínek obvykle využívají fermentaci jako způsob získávání energie. Dýchání zde zaujímá pouze 10% uhlíkového metabolismu v médiu obsahující, glukózu. V kapalném médiu se obvykle vyskytují jako separované buňky, kdežto na pevném médiu tvoří kolonie. Kvasinky *S. cerevisiae* jsou mesofilním druhem, tudíž jsou schopny růst a množit se v rozmezí teplot 0 to 48 $^{\circ}\text{C}$, kde optimum se pohybuje v rozmezí 25-30 $^{\circ}\text{C}$ [2].

1.2 Zdroje energie a uhlíku

Metabolickou aktivitu můžeme rozdělit na anabolizmus a katabolizmus. Anabolizmus vede k syntéze složek buňky, při které se spotřebovává energie, zatímco katabolizmus představuje degradativní pochody vedoucí k tvorbě energie, kterou může následně využít anabolizmus. Toto je označováno jako energetické spřažení drah.

Jako každý živý organismus i kvasinky potřebují dostatečné množství specifických živin pro správný metabolismus a růst. Jako zdroj uhlíku a energie, jsou schopny využít široké spektrum sacharidů. Kvasinky jsou schopné zužitkovat veškeré druhy monosacharidů (glukóza, fruktóza, manóza, xylóza a galaktóza), dále disacharidy (laktóza, maltóza, sacharóza), eventuálně oligosacharidy (maltotrióza, rafinóza). Zdrojem uhlíku však pro kvasinky může být i mnoho dalších organických látek, jako například glycerol, laktáza, etanol, metanol nebo alkeny. Některé druhy kvasinek jsou schopny hydrolyzovat řadu polysacharidů (celulóza, xylany, škroby) s pomocí extracelulárních enzymů.

Poté co je glukóza transportována do buňky, dojde k její glykolýze. Výsledný pyruvát je následně přeměněn na etanol a CO_2 během procesu zvaného fermentace nebo na vodu a CO_2 v průběhu Krebsova cyklu. Množství pyruvátu, které probíhá

procesem fermentace a které prochází Krebsovým cyklem je závislé na vnějších podmínkách i druhu kvasinek. Dalším zdrojem uhlíku a energie, který fermentující kvasinky využívají je etanol. Etanol kvasinky jakožto živinu začnou využívat až teprve poté, co je glukóza z živného média vypotřebován a etanolu je v mediu dostatečné množství. Pokud vezmeme v úvahu růstovou křivku, toto nastává v diauxické fázi (viz. kapitola 1.5).

Produkty metabolismu kvasinek mohou být nejen CO_2 , etanol, H^+ , ale i glycerol, acetát, sukcinát atd. U různých kmenů lze poměry produktů ovlivnit kultivačními podmínkami.

1.3 Zdroje dusíku

Hlavním zdrojem dusíku jsou pro kvasinky amonné kationty NH_4^+ a aminokyseliny, jež jsou pro kvasinky nejspíše využitelným zdrojem dusíku. Pokud výše uvedené zdroje dusíku nejsou k dispozici, některé druhy kvasinek mohou zužitkovat také dusitany, dusičnany, močovinu, alantoin. Tyto látky jsou zpracovány v biosyntetických reakcích nebo katabolických procesech [2].

1.4 Proliferace: Mitotický buněčný cyklus

Pokud se v kapalném kultivačním mediu vyskytuje dostatečné množství potřebných živin k růstu kvasinek, jejich počet se zdvojnásobí přibližně každých sto minut. Nejobvyklejší způsob rozmnožování kvasinek je vegetativní rozmnožování prostřednictvím mitózy. Během mitotického cyklu se 17 chromozomů haploidní buňky duplikuje a následně přerozdělí do dvou buněk. *Saccharomyces cerevisiae* se množí pučením, při kterém vzniká na tzv. mateřské buňce z vychlípeniny v buněčné membráně nový jedinec tzv. dceřiná buňka. Jakmile je tvořící se dceřiná buňka dostatečně velká a schopna samostatného života, oddělí se od buňky mateřské. Dceřiná buňka je vždy o poznání menší než buňka mateřská, tudíž než se bude moci množit, musí nejprve zvětšit svou velikost. *S. cerevisiae* je schopna utvořit dceřinou buňku na jakémkoliv místě svého povrchu s výjimkou míst, kde již v minulosti jiná

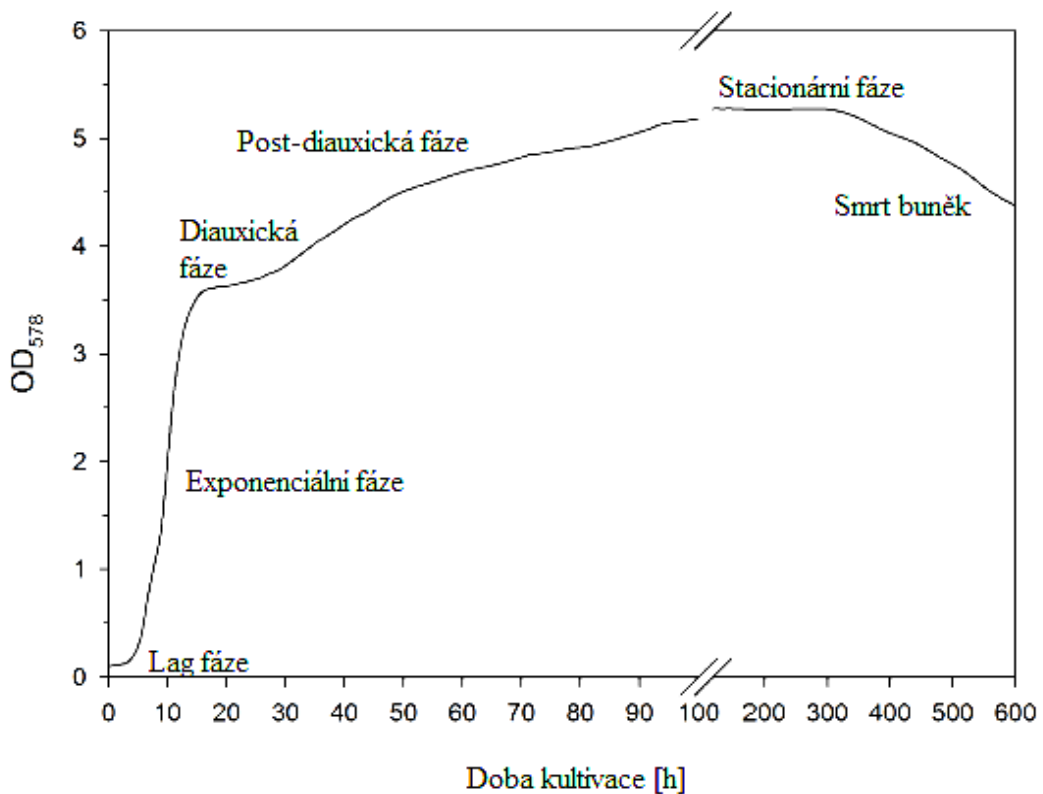
dceřiná buňka byla. To je způsobeno tím, že v místě, kde se oddělila předchozí dceřiná buňka, vzniká na povrchu membrány jizva.

Kvasinky nejsou za určitých podmínek prostředí schopny množení. Jako příklad lze uvést případ, kdy v kultivačním médiu jsou spotřebovány základní živiny. Po přidání potřebných živin růst kultury opět pokračuje. Dalším faktorem zastavujícím proliferaci dané buňky je přítomnost jiné kvasinkové buňky v jejím okolí, se kterou může splynout. Pokud jsou buňky, které jsou spolu schopny splynoutí, blízko u sebe, zastavuje se u obou klasický buněčný cyklus a dochází k fúzi buněk. Takto vzniklá buňka se může dělit pomocí mitózy ale i meiózy a to vést ke vzniku nové diploidní buňky respektive čtyř haploidních. Blíže se touto možností množení nebudeme zabírat, jelikož se tento princip v námi prováděných experimentech neobjevuje [8].

1.5 Růstová křivka *Saccharomyces cerevisiae*

Růst kultury v tekutém médiu a děje probíhající v kultuře mohou být přibližně odhadnuty na základě profilu takzvané „růstové křivky“. Růstová křivka znázorňuje poměr hustoty kultury, tedy množství a velikost buněk na kultivačním čase. Tato závislost je získána na základě měření optické hustoty zkoumané kultury (kapitola 4.1).

Podle růstových křivek i neznámých druhů kvasinek můžeme získat první informace o zkoumané kultuře. Pokud růstová křivka (obr. 1) obsahuje diauxickou fázi, jedná se o druh kvasinek schopných fermentace, pokud ne, tyto kvasinky fermentovat nemohou. Fermentující druhy kvasinek, mezi které patří i *S. cerevisiae*, se vyznačují šesti růstovými fázemi: lag fáze, exponenciální fáze, diauxická fáze, post-diauxická fáze, stacionární fáze, smrt buňky.



Obr. 1. Přibližné znázornění růstové křivky fermentujícího kmene kvasinek

1.5.1 Lag fáze

Po zaočkování kultury do nového média se buňky potřebjí adaptovat na nové prostředí. V době adaptace na prostředí shromažďují živiny a energii na nadcházející reprodukci. V této růstové fázi se počet kvasinek v kultuře nezvyšuje, avšak buňky zvětšují svou velikost [9]. Doba, po kterou kvasinky setrvávají v této fázi je závislá na teplotě, typu média a kmeni zkoumaných buněk.

1.5.2 Exponenciální fáze

V této fázi se kvasinky začínají velmi rychle množit. Dceřiné buňky nedorůstají velikosti mateřských buněk před mitotickým dělením, jsou tedy podstatně menší. Dochází k zdvojnásobení počtu buněk každé 2 až 3 hodiny, odtud tedy plyne název exponenciální fáze [10]. V médiu bohatém na fermentovatelné živiny, probíhá fermentace a časem se v médiu hromadí etanol. Při dostatku

fermentovatelného zdroje uhlíku nastává takzvaná katabolická represe, při které je potlačována transkripce genů, kódujících enzymy nezbytné pro využívání alternativních zdrojů uhlíku [11].

1.5.3 Diauxická fáze

Po vyčerpání glukózy z živného média, nemůže fermentace dále probíhat, tudíž v rostoucí kultuře dochází ke změnám v metabolismu buněk. Tato fáze se nazývá diauxickým posuvem. Katabolická represe se bez glukózy deaktivuje a kvasinky jsou schopny využívat alternativní zdroje uhlíku, jako jsou etanol a další produkty fermentace. Během tohoto období se kvasinky přestávají rozmnožovat a růst, aby se adaptovaly na nové podmínky [12].

1.5.4 Post-diauxická fáze

Kvasinky se přizpůsobily novým podmínkám a kultura začíná opět růst (buňky se množí a zvětšují svůj objem). Růst je však znatelně pomalejší než tomu bylo v exponenciální fázi.

1.5.5 Stacionární fáze

Kvasinkové buňky v této fázi spotřebovaly veškeré dostupné živiny v růstovém médiu a přecházejí do stacionární fáze. Bez potřebných živin je růst kultury zastaven. Kultura s dýchacím metabolismem kultivována na fermentovatelném zdroji uhlíku při 30 °C (*Saccharomyces cerevisiae*) dosáhne stacionární fáze okolo 4-7 dnů od zaočkování, v závislosti na živném médiu [13]. Ve stacionární fázi se buňky již nerozmnožují ani nerostou, snaží se pouze přežít do doby, než budou do média přidány další živiny. V tomto období jsou kvasinky mnohem odolnější vůči veškerým stresorům z okolí (faktorům měnící podmínky, ať už fyzikální či chemické). Mají tlustší buněčnou stěnu a jsou odolnější vůči lytickým enzymům [14].

1.5.6 Smrt buňek

Jakmile už buňky nejsou schopny udržet stacionární fázi, buňky začnou postupně umírat a metabolity se akumulují.

1.6 pH v biologických systémech

Intracelulární pH (pH_i) je jedním ze základních parametrů, jež všechny živé organismy různými mechanismy regulují, jelikož téměř všechny reakce v organismu jsou pH dependentní [15,16]. Intracelulární pH ovlivňuje buněčné funkce protonací popřípadě deprotonací slabých kyselin a zásad. V případě aminokyselin může pH_i ovlivnit jejich strukturu a tím i funkci celého proteinu. Hodnota pH hraje klíčovou roli v celkovém elektrochemickém gradientu, který je příčinou transportu mnoha nabitých molekul přes membrány buněk. Protonový gradient je dále zodpovědný za syntézu energetického zdroje ATP (adenosin-5'-trifosfát). Rozmanitost metabolických procesů probíhajících v buňce vyžaduje různé hodnoty pH v různých částech buňky (organelách), tudíž buňky jsou schopny určit hodnotu pH v daném místě buňky a toto pH regulovat ke svému prospěchu.

1.6.1 Definice pH_i

Ve vodném prostředí lze pH uvažovat jako:

$$pH = -\log(a_{H^+}) \quad (1)$$

a_{H^+} ... aktivita H^+ ve vodě

Avšak pro pH_i je tato definice zcela mylná, jelikož vnitřní prostředí buňky se značně liší od čistě vodného roztoku [16]. Pokud uvažujeme cytosolické pH rovno 7 objem cytosolického roztoku jako $\sim 48 \mu m^3$ [17,18,19], počet volných protonů H^+ se pohybuje okolo 3000. V kontrastu s tímto číslem je počet molekul proteinů, jež mohou být ovlivněny pH_i , který se pohybuje v řádech milionů [20]. Počet protonovatelných proteinů, ale i koncentrace kyselých metabolitů, které ovlivňují pH_i

je mnohem vyšší, než koncentrace volných H^+ , tudíž je nutno definici pH pro pH_i upravit.

Vnitřní prostředí obsahuje velké množství slabých kyselin i zásad, které mohou odevzdat popřípadě přijmout proton. Pro distribuci slabých kyselin nebo zásad se využívá rovnovážná konstanta K_a definována jako:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

K_a je kvantitativní vyjádření síly kyseliny v roztoku. Nyní lze pomocí Henderson-Hasselbachovy rovnice přepsat pH_i do podoby, jež lépe vystihuje pH uvnitř buňky:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

kde $pK_a = -\log_{10}(K_a)$. Hodnota pK_a je rovna pH hodnotě při které je 50% z množství slabé kyseliny disociováno.

Schopnost slabých kyselin slučovat se se slabými zásadami a tak reverzibilně darovat a přijímat proton z nich tvoří pufrací pár. Význam pufracích párů spočívá ve schopnosti přijmout malé množství protonů nebo hydroxidových iontů, aniž by se změnil počet volných protonů [17]. Z tohoto důsledku vyplývá i fakt, že pufr má tendence udržovat konstantní pH.

1.6.2 Buněčná pufrací kapacita

Buňka je tvořena slabě kyselými a slabě zásaditými molekulami, které se mohou vykazovat vlastnostmi pufru, tyto molekuly dohromady tvoří komplexní pufr s jistou pufrací kapacitou β [21,22]. β je definováno jako množství silné kyseliny nebo zásady A nutné ke zvýšení nebo snížení hodnoty pH roztoku o jednu jednotku.

$$\beta = \frac{[A]}{\Delta pH} \quad (4)$$

[A] ... koncentrace silné kyseliny, popřípadě zásady

Pufrační kapacita se mění v závislosti na změnách pH a svého maxima nabývá, když $\text{pH} = \text{p}K_a$. K pufrační kapacitě cytosolického roztoku přispívá spousta molekul: amino a karboxylové konce proteinových řetězců, nabitě skupiny některých peptidových reziduí, některé metabolity jako NH_3 , deprotonovaný fosfát a CO_2 [23,22]. Některé z těchto molekul jsou pak znázorněny v tab. 1.

Proteinový zbytek	$\text{p}K_a$	Proteinový zbytek	$\text{p}K_a$
$-\text{NH}_2$ konec	8,0	Asp, Glu	4,4
$-\text{COOH}$ konec	3,1	His	6,5
Cys	8,5	Lys	10,0
NH_3	9,2	Arg	12,0
PO_4H_2^-	2,1	$\text{PO}_4\text{H}_2^{2-}$	7,2
PO_4^{3-}	12,7	Tyr	10

Tab. 1. $\text{p}K_a$ základních molekul podílejících se na pufrační kapacitě.

Hodnota naměřené cytosolické pufrační kapacity závisí nejen na pH vnějšího pufru, ale i na jeho typu. Pro kvasinky *S. cerevisiae* inkubovaných v citrát-fosfátovém pufru $\beta = 50 \pm 15 \text{ mM}$ na jednotku pH [24].

1.6.3 Chemický potenciál a pH

V buňkách probíhá spousta dějů více či méně izolovaně, to v důsledku vede k specifickému pH většiny buněčných organel [25]. Vnitřní pH přímo souvisí s gradienty koncentrací různých iontů, které jsou klíčové pro funkci buňky. Gradient koncentrací H^+ uvnitř buňky přímo ovlivňuje transport živin ať už symportem či antiportem, navíc je zřejmé, že rozdíl pH na vnitřní membráně mitochondrií, vzniklý přesunem elektronů je klíčovým pro syntézu ATP [26,27,28]. Obecně sumací veškerých iontových gradientů napříč libovolnou membránou se utváří její membránový potenciál $\Delta\Psi$, který je hlavní hnací silou pro transport většiny iontů a živin, ale podílí se také například na laterální segregaci proteinů [29].

V kvasinkových buňkách se na $\Delta\Psi$ plasmatické membrány podílí převážně elektrochemický gradient protonů [30], ačkoliv nelze opomenout elektrochemický gradient způsobený ionty K^+ [31]. Rozvine-li se předchozí myšlenka utváření $\Delta\Psi$ plasmatické membrány, tak na tvorbě $\Delta\Psi$ se podílí zejména dva druhy protonových ATPáz v kvasinkových membránách. Jedná se o P-typ a V-typ [32]. Je dokázáno, že $\Delta\Psi$ vyvolaný protony ovlivňuje další pumpy, které přispívají k elektrochemickému gradientu [33]. Z tohoto plyne, že změna gradientu jednoho druhu iontu ovlivní gradienty i dalších druhů iontů. Proteiny nacházející se v různých organelách hrají svou roli v iontové homeostázi jednotlivých organel, což se vzhledem ke komplexnosti $\Delta\Psi$ projeví v celé buňce [34,35].

1.6.4 Definice membránového potenciálu

Membránový potenciál lze kvantifikovat pomocí Goldman-Hodgin-Katzovy rovnice:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_c [C_{out}] + \sum P_a [A_{in}]}{\sum P_c [C_{in}] + \sum P_a [A_{out}]} \quad (5)$$

kde $[C_{in}]$ ($[A_{in}]$) a $[C_{out}]$ ($[A_{out}]$) jsou molární koncentrace kationtů (aniontů), in-uvnitř, popřípadě out-z vnější strany membrány. P_c a P_a odpovídají permeabilním koeficientům příslušných iontů. Sumace probíhá přes veškeré druhy iontů, kterými v buňkách jsou, převážně: H^+ , K^+ , Na^+ a Cl^- .

1.6.5 Regulace cytosolického pH

Jak již bylo řečeno, pH_i je velmi závislé na množství živin v médiu a dalších metabolických podmínkách, jako je například acidifikace média během kultivace. Hlavním faktorem při regulaci cytosolického pH (pH_c) u *S. cerevisiae* je P_2 -typ H^+ -ATPázy Pma1p [36,37]. ATPázy typu P jsou membránové proteiny, které spojují děje jako je přenos kationtů přes membránu s hydrolýzou ATP. Kvasinky obsahují 16 druhů ATPáz typu P, přičemž dva z nich transportují protony skrze membránu

[38]. Pma1p, polypeptid velikosti 100 kDa, je jedním z nejhodněji se vyskytujících proteinů v plasmatických membránách a pumpách „pumpujících“ protony z buněk [39], kde jeden přemístěný H^+ odpovídá ATP hydrolyze [40]. Bylo dokázáno, že ATPasová aktivita má podstatný vliv na rychlost růstu buněk [41]. ATPázová aktivita koreluje s pH_c , tudíž bylo prokázáno, že některé mutantní kmeny obsahující gen Pma1 nejsou schopny růstu v nízkém pH nebo za přítomnosti slabé kyseliny, což naznačuje sníženou schopnost transport proton z buňky [42,43]. Exprese genetického úseku PMA1 je pod kontrolou transkripčního faktoru RAP1/TUF [44] a jeho exprese je ovlivněna dostupností zdroje uhlíku [45]. Regulace PMA1 je hlavně post-transkripční záležitost.

Ukázalo se, že glukóza vyvolává fosforylaci Pma1p [46], což zvyšuje jeho afinitu k ATP [47]. Aktivita pump závisí na pH jejich prostředí a roste při acidifikaci cytosolu, což přispívá ke stabilizaci intracelulárního pH [48]. *S. cerevisiae* obsahuje i druhý P_2 -typ H^+ -ATPázy, který je schopen nahradit funkci Pma1p pod vlivem promoteru PMA1 [49]. Jeho vliv na pH_i však má minoritní podíl. Největší podíl, jak již bylo řečeno, na regulaci pH_c má Pma1p, avšak další pumpy například vakuolární, sehrávají při regulaci cytosolického pH také velmi důležitou roli. Vakuolární typy H^+ -ATPáz (V-ATPáz) jsou zodpovědné za acidifikaci spousty organel: vakuoly, endosomy, Golgiho aparát [50].

Mezi P - typy a V- typy ATPáz jsou jisté rozdíly. V-typy se na rozdíl od P-typů ATPáz nevyskytují v plasmatické membráně. P-typ sestává z jedné podjednotky, kdežto V- typ se skládá přibližně z 14 podjednotek seskládaných do dvou subkomplexů, kde jeden komplex je zabudován v membráně a obsahuje protonový pór a druhý komplex vyčnívá mimo membránu a slouží k ATP hydrolyze. V- typ je zapojen do regulace pH_c , tím že pumpuje protony z cytosolu, vakuola se tímto okyseluje a zvyšuje se membránový potenciál na membráně vakuoly [51]. Pumpování protonů z cytosolu skrze membrány za spotřeby ATP, má zásadní význam jelikož díky generovanému $\Delta\Psi$ mohou být transportovány různé metabolity a jiné ionty.

1.6.6 Cytosolické pH, transport kationtů

Signifikantní roli pro pH_c homeostázi hrají výměny alkalických kationtů s H^+ . Většina transportérů zaměňující alkalické ionty za H^+ vyměňuje protony a kationty jako jsou Na^+ nebo K^+ skrze plazmatickou membránu. Hnací silou pro transport je protonový gradient vytvořený ATPázami [52]. Jak bylo řečeno v kapitole 1.6.5, hlavním přispěvatelem k $\Delta\Psi$ je Pma1p a jako hlavním elementem, co tento potenciál snižuje, jsou naopak transportéry K^+ (Trk1p a Trk2p) [32]. Tyto transportéry se podílejí na zvyšování pH_c a snižování $\Delta\Psi$ během homeostázy [52].

Na^+/H^+ antiport (Nah1p) také ovlivňuje homeostázu pH_c , sice minoritním podílem, ale sehrává velmi důležitou roli pro funkci buňky. Při nefunkčnosti Nha1p se pH_c zvyšuje [53]. Druhým Na^+/H^+ antiportem je Kha1p, který se vyskytuje v Golgiho aparátu [54]. Tento antiport se podílí na okyselování média současně s alkalizací pH_i [55]. Dalším Na^+/H^+ antiportem je Nhx1 vyskytující se v membráně endosomů a podílí se na snižování pH_c [56].

Jako poslední dva antiporty nutno zmínit Vnx1p a Vcx1p, které se nacházejí ve stěně vakuol. Vnx1p dokáže vyměnit jak Na^+ , tak K^+ za protony ve vakuole [57]. Vcx1p se vyznačuje antiportem $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, ale také výměnou K^+/H^+ [58]. V kvasinkách se vyskytují i další transportéry, které závisí na pH, ať už se jedná o symportéry živin/ H^+ nebo antiport Gef1p (Cl^-/H^+), ale pro tuto práci nejsou zásadní [59,60].

1.7 Fluorescenční sondy

1.7.1 Využití fluorescenčních sond

Fluorescenční sondy jsou fluorochromy, jež reagují na změnu vnějšího parametru změnou svého excitačního popřípadě emisního spektra, či kvantového výtěžku [61]. Využití fluorescenčních sond nachází široké uplatnění ať už v běžném životě (potravinářský průmysl), či pro vědecké aplikace. Ve vědních oborech jsou aplikovány například pro studium biologických membrán: změny membránového potenciálu, koncentrace určitých iontů, interakce látek s membránou, viskozity, fluidity membrány, teplotních, fázových přechodů membrány, membránového transportu a celkově vnitrobuňčného pH [62,63]. Fluorescenční sondy nacházejí uplatnění také v imunologických testech nebo celkově v zobrazovacích metodách [64,65].

Rozlišují se dva základní druhy fluorescenčních sond. Prvním jsou sondy synteticky připraveny v laboratorních podmínkách a následně vpraveny do cílových buněk. Druhým typem jsou geneticky kódované fluorescenční proteiny, jež jsou automaticky replikované přímo uvnitř buněk. V této studii bylo využito geneticky kódovaného fluorescenčního proteinu citlivého na pH, který je nazýván pHluorin.

Pro určení intracelulárního pH je nutné, aby se fluorescenční sonda nacházela v cytosolu, jelikož v organelách buňky není totožné pH s pH_c [66].

1.7.2 Geneticky kódované fluorescenční sondy

Geneticky kódované fluorescenční sondy vznikají přenesením části DNA kódující fluorescenční protein do buňky pomocí vhodného vektoru. Vektorem může být plasmid, virální DNA, či bakteriofág. Vzniklá rekombinační DNA, je dále přenesena do buňky, která již buňka samostatně produkuje fluorescenční protein [61]. V rámci této diplomové práce byl využit mutant zeleného fluorescenčního

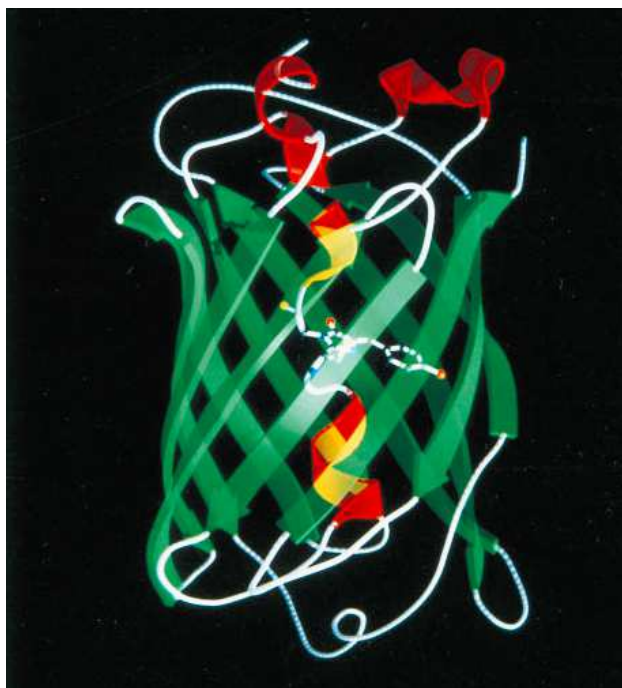
proteinu (GFP) a to poměrový p_Hluorin, který byl lokalizován v cytosolu, tudíž s jeho pomocí lze stanovit p_H_c.

1.7.3 GFP - green fluorescent protein

Význam GFP a jeho mutantů spočívá ve faktu, že splňuje širokou škálu požadavků, jimiž by měl fluorescenční protein pro experimentální využití disponovat. GFP se vyznačuje vysokou p_H citlivostí (zejména v okolí jeho p_{Ka}, která se pro různé mutace GFP pohybuje v rozmezí od 4,8 do 8 [67]) a díky odstínění chromoforu od okolí je i vysoce selektivní na změny p_H. Jeho fluorescence je velmi odolná vůči zhasnutí a velmi rychle reaguje na změny koncentrace protonů v okolí [68].

GFP byl poprvé objeven v medúze *Aequorea victoria*, vyznačující se bioluminiscenčním proteinem aequorinem emitujícím v modré části viditelného spektra, které dále excituje GFP jež emituje zelené světlo. Izolovaný GFP na denním světle absorbuje v ultrafialové části spektra a emituje zelené světlo [69,70].

Divoký typ GFP byl krystalografickou strukturní analýzou prezentován Yang et. Al roku 1996 [71].



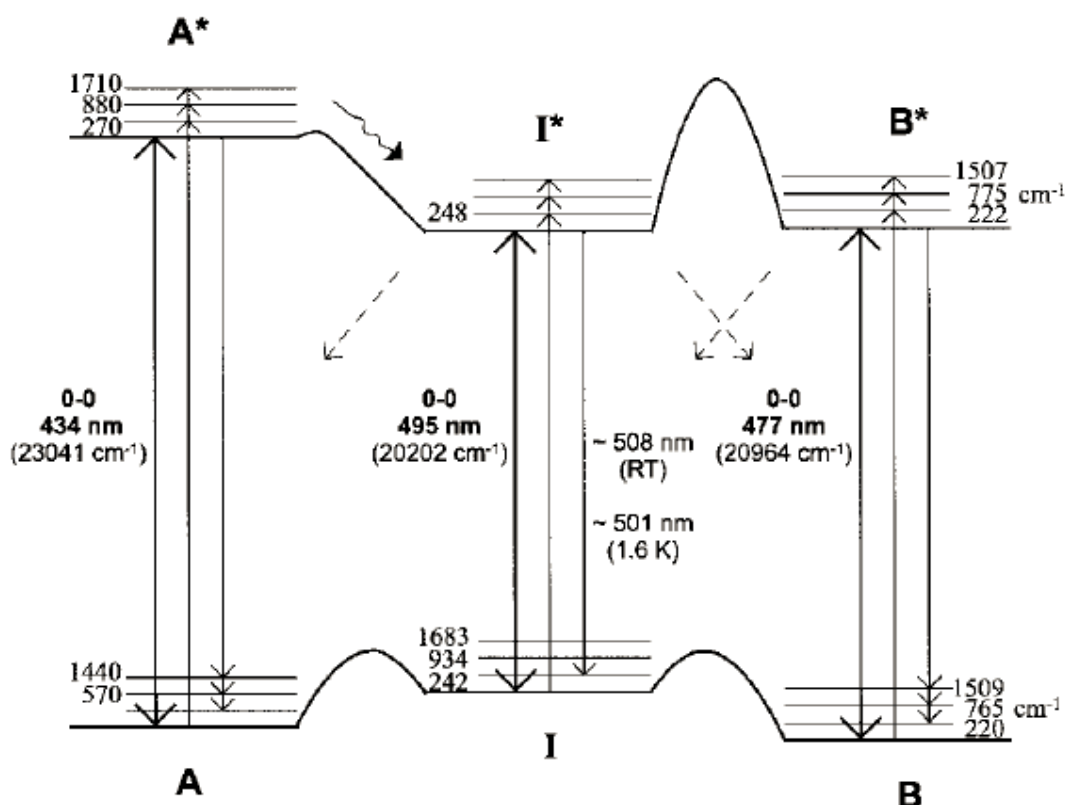
Obr. 2. Krystalograficky zjištěná struktura zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), převzato z [72].

U divokého GFP se jedná o stabilní jednovláknový řetězec složený z 238 reziduí s moleulovou hmotností 27 kDa [73]. Uvnitř válcové struktury složené z jedenácti antiparalelních β -listů prochází α -šroubovice. Na vrchní části jsou dále tři kratší α -šroubovice a vespod válce se vyskytuje velmi krátký helikální segment. Téměř válcová struktura má výšku 42 Å a průměr 24 Å [74] (viz.obr. 2).

Chromofor lokalizovaný dle obrázku uprostřed válcové struktury svírá s osou symetrie valce 60° a je tvořen post-translační autokatalytickou cyklizací třech aminokyselinových reziduí peptidového řetězce složeného z Gly67, Tyr66, Ser65 (v některých mutantech je nahrazen Thr65) [75,76]. Umístění chromoforu má příznivý vliv na odstínění od okolního rozpouštědla, což vede k vysokému kvantovému výtěžku fluorescence [74,76].

Divoký GFP v závislosti na kyselosti bezprostředního okolí přechází mezi dvěma stavy a to proponovanou formou, která absorbuje na 395 nm a emituje na 508 nm, a deprotonovanou formou, jež absorbuje na 475 nm a emituje na 503 nm [73]. Protonovaná a deprotonovaná forma se od sebe odlišují přítomností nebo absencí protonu v OH skupině navázané na aromatickém kruhu Tyr66 nacházejícím se v chromoforu GFP.

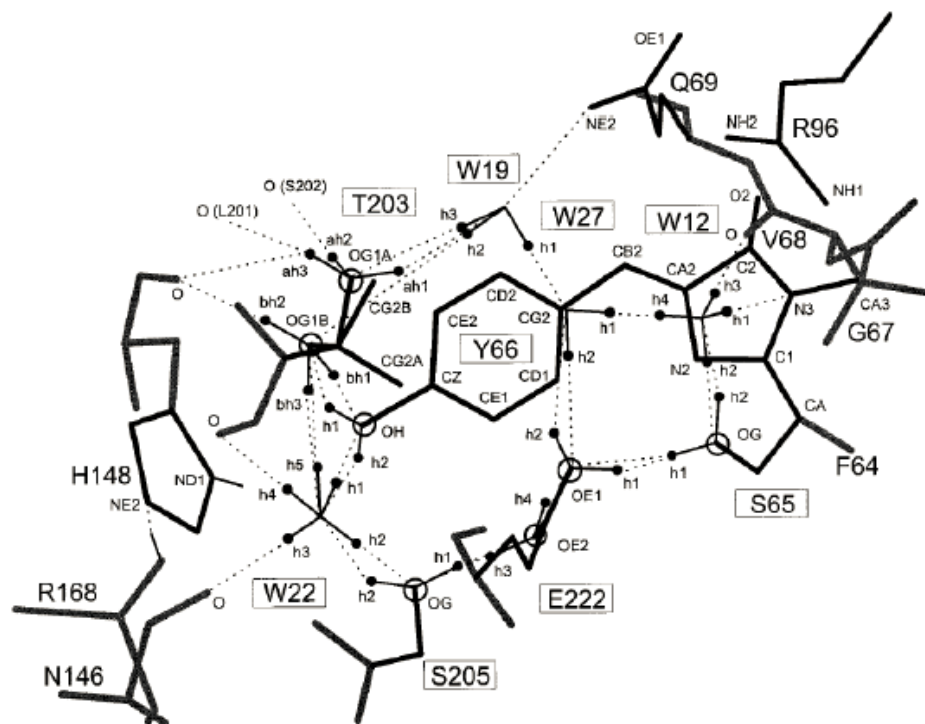
V GFP vlivem protonového transferu pomocí sítě vodíkových můstků dochází ke změnám fluorescenčních vlastností chromoforů. Pro následující popis mechanismu fluorescence GFP zavedeme jednoduché značení stavů chromoforu. A označuje proponovaný stav chromoforu, B je deprotonovaný stav. Mezi těmito stavy nastává přechodná forma I, jež je, stejně jako B, stavem deprotonovaným. Pomocí vodíkových můstků je proton přenášen od excitované hladiny A^* k excitované formě I^* . Přejít ze stavu I^* způsobuje fluorescenční emisi GFP na vlnové délce 508 nm [77].



Obr. 3. Schéma energetických hladin divokého fluorescenčního proteinu GFP. Čárkované šipky symbolizují nezářivé fotoindukované přechody. Vlnitá šipka ze stavu A* do stavu I* značí jedinou fotokonverzi mezi excitovanými stavy.. Převzato [77]

Energetický rozdíl je nejmenší pro nezářivý přechod z A* do I*. Pokud dojde k excitaci chromoforu zářením o vlnové délce 397 nm, objevuje se emisní spektrum o vlnových délkách v rozmezí 440-460 nm po dobu 120 fs. Emise byla způsobena zářivým přechodem z A* do A stavu. Populace A* klesá a zvyšuje se populace I* [78]. Následujícím krokem je mnohem intenzivnější zářivý přechod z formy I* do I. Největší energetická bariéra musí být překonána při nezářivém přechodu z B* do I*, z tohoto důvodu je konverze takřka zanedbatelná a tudíž excitace do B* nezpůsobí žádnou emisi vyvolanou přechodem I*. To je také důvodem pro emisní přechody z B* do B. Stav I* a B* jsou energeticky téměř identické z čehož vyplývá, že rozdíl mezi emisní pásy pocházející od přechodů z B* do B a přechodů z I* do I, je minimální. Z důvodů popsaných v tomto odstavci dále z obr. 4 je patrné, že v excitačním fluorescenčním spektru se vyskytují dvě maxima způsobeny přechody mezi stavy z A do A* a z B do B*, kdežto v emisním spektru figuruje jedno maximum téměř identické pro přechody z I* do I a z B* do B [61].

1.7.4 Protonový transfer v GFP



Obr. 4. Grafické model sítě vodíkových můstků pro přenos protonu. Převzato [79]

Rovnováha mezi protonovanou a deprotonovanou formou GFP je řízena sítí vodíkových můstků. Ta dovoluje přenos protonu mezi chromoforem a bočními řetězci proteinu GFP [80], kde se jedná především o rezidua Ser65, Gln69, Arg96, Thr203, Ser205 a Gln222 [73,78,79]. Molekulou s nejvyšším počtem spojení je voda, označována v literatuře [79] jako W22, která tvoří vazby vodíkovými můstky s pěti rezidui peptidického řetězce v jejím okolí. Pro přenos protonu sítí vodíkových můstků v excitovaném stavu se musí mírně změnit geometrie této sítě, což se děje na škále 5-20 ps [78]. V prvních pikosekundách po fotoexcitaci se vlivem nízkofrekvenčního pohybu rezidua Tyr66 a jeho přibližování se k molekule vody W22 vyvíjí síť vodíkových můstků, což způsobuje posun elektronové hustoty a poloh jader. Vliv vyšší elektronové hustoty je spojen s excitací z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu do nejnižšího nezaplňného molekulového orbitalu, tím dochází k přesunu elektronu z fenolového na imidazolový kruh, snižuje se pK_a rezidua Tyr66 a proton na fenolovém kruhu se stává „kyselějším“. Takto zesílená vazba mezi Tyr66 a W22 vytváří příznivější podmínky pro přenos protonu [78,79]. K přesunu protonu v GFP dochází mechanismem termálně aktivovaných

přeskoků protonu v síti vodíkových můstků mezi sousedními Tyr66 (donor) a finálním Gln222 (akceptor) [79]. Po zářivém přechodu z I^* do I se vlivem zpětného transferu protonu stav I vrátí do stavu A , jehož základní energie je nižší [73].

1.7.5 Faktory ovlivňující spektrální charakteristiky GFP

Je zřejmé, že kvantový výtěžek fluorescenčního GFP proteinu bude více či méně závislý na pH prostředí. Divoký typ GFP proteinu se v rozmezí pH 6-10 jeví jako poměrně stabilní, avšak v kyselějším prostředí, nežli je pH 6 jeho fluorescenční kvantový výtěžek klesá [80]. Tato stabilita kvantového výtěžku se u různých mutantů GFP projevuje v různých rozmezech.

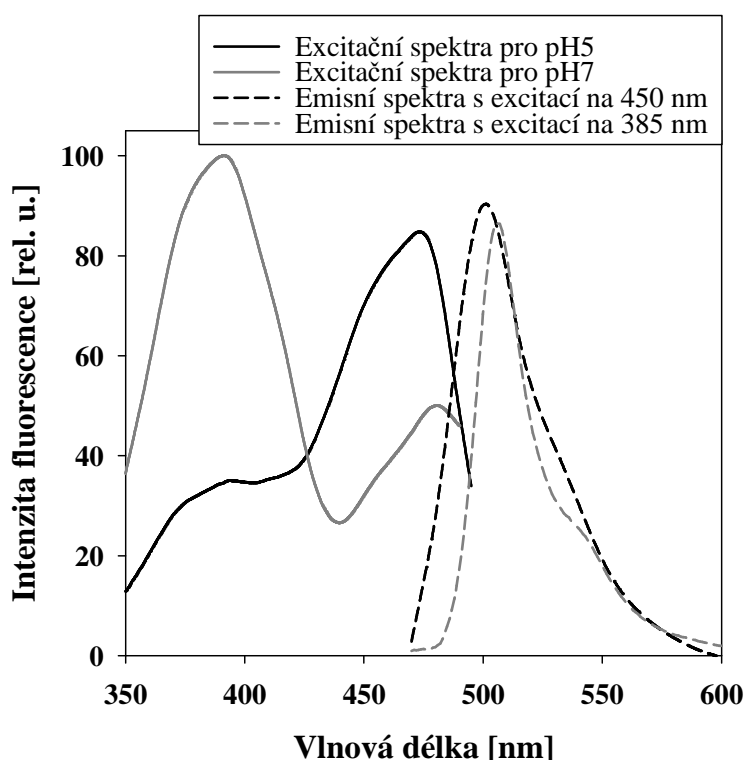
Vliv teploty, ve kterých se vzorek nachází, se v blízkém okolí pokojové teploty neprojevuje. Při výraznějších ochlazeních se však ukazuje, že se snižující se teplotou jsou excitační i emisní fluorescenční spektra užší a strukturnější [77]. Mění se intenzita jednotlivých excitačních píků a jejich případný posun v rámci vlnové délky se projevuje až při extrémně nízkých teplotách, které se však netýkají našich experimentů prováděných s živými buňkami.

Vliv ozařování vzorků různými vlnovými délkami se může při určitých intenzitách promítnout i do získaných naměřených hodnot. Krom fotovybělení, což se projeví v obou excitačních spektrech rovnoměrným snížením intenzity [70], může docházet také k fotoizomerizaci. Fotoizomerizace je nejmasivnější pro excitační záření v rozmezí vlnových délek 280 - 395 nm, ale dochází k ní v menší míře až do vlnových délek 490 nm [81]. V excitačních spektrech se tento efekt projevuje signifikantním snížením intenzity excitačního pásu na 395 nm a zvýšením intenzity na vlnové délce 475 nm, tudíž tato konformační změna zvýhodňuje deprotonovanou formu chromoforu. GFP je proti fotoizomerizaci a vybělování až dvakrát odolnější, než jiné fluorofory (např. fluorescein) [70].

1.7.6 pHluorin

Významným mutantem fluorescenčního GFP je pHluorin [82]. V našich experimentech byla používána jeho poměrová varianta. Poměrový pH luorin byl poprvé vytvořen a studován Miesenbockem a kol. v práci [82]. Tento mutant divokého typu GFP obsahuje bodové mutace S202H, E132D, S147E, N149L, N164I, K166Q, U167V, R168H a L220F, Protein vykazuje vratnou změnu v poměru intenzit pásů v excitačním spektru na vlnových délkách 410 nm a 470 nm v rozmezí pH 5,5 – 7,5 s délkou odezvy <20 ms. V. Ve vysokých pH je více populovaná fenolátová forma chromoforu excitovaná na vlnové délce 395 nm a v případě nízkých pH je zvýhodněna fenolová forma s maximum excitace na 475 nm [68]. Emisní maximum je na 505 nm (viz. Obr. 5) .

Poměrový pHluorin nachází v současné době široké využití pro studium dynamického vývoje pH různých intracelulárních prostředích buněk, jako jsou cytoplazma [83], mitochondrie [84], peroxizomy [85], klatrinové vezikuly [86], endozomy a Golgiho aparát [87] nebo také pro studium presynaptických sekrečních váčků [82].



Obr. 5. Excitační a emisní fluorescenční spektra poměrového pHluorinu pro hodnoty pH = 5 a pH = 7 s odečtenou autofluorescencí buněk. Zdroj: Prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc. – soukromé sdělení v rámci konzultace diplomové práce

2 Metody a měření

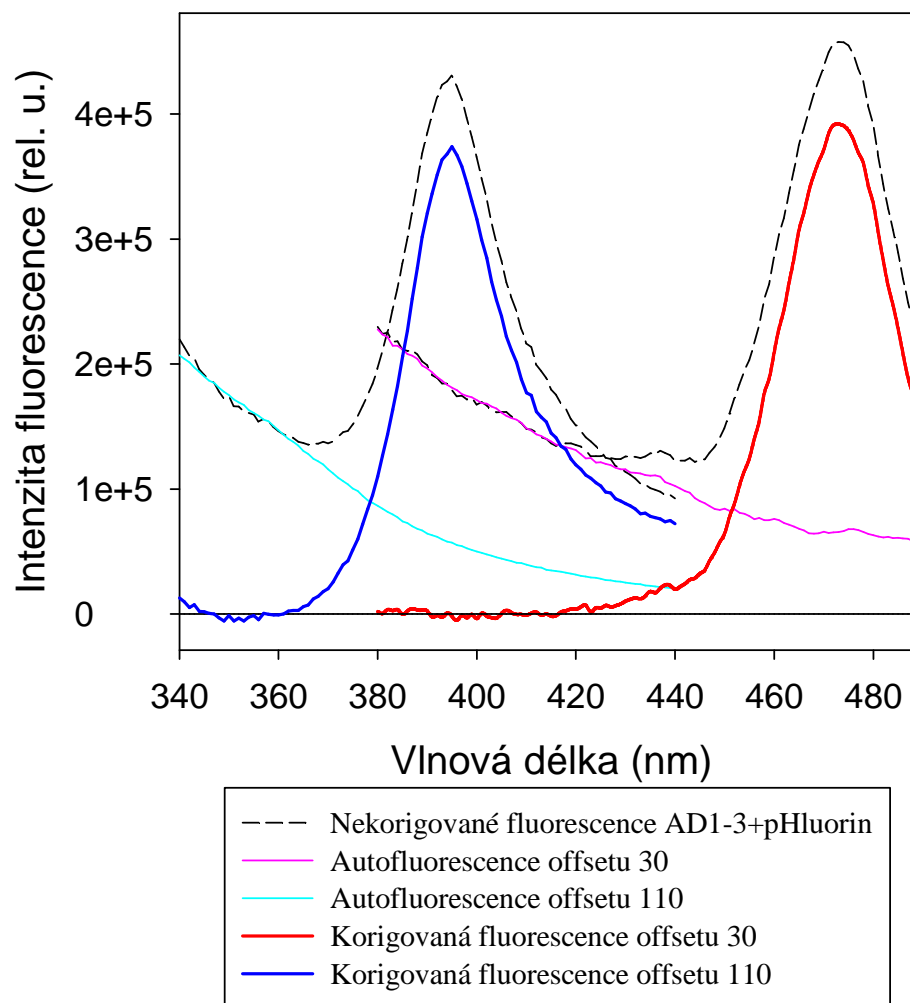
2.1.1 Autofluorescence

Při měření fluorescence kvasinkových kultur bez fluorescenční sondy je z naměřených spekter zřejmé, že se buňky vyznačují určitým množstvím autofluorescence. Autofluorescenční záření kvasinek lze rozdělit do dvou kategorií. V prvním případě se jedná o molekuly absorbující na vlnové délce 365 nm a širokým emisním pásem o maximu na 450-470 nm. Do druhé kategorie spadají molekuly se dvěma excitačními maximy na 385 nm a 440 nm a s emisí na 520 nm [88,89].

První případ autofluorescence tedy lze přisoudit NADH (nikotinamid-adenin-dinukleotid) jehož fluorescenční excitační maximum se pohybuje kolem 360 nm. Druhá část autofluorescenčních signálů se shoduje s excitačními a emisními spektry FMN (flavin mononukleotidu) [89].

Také pufr a jiné chemikálie se mohou vyznačovat nízkou mírou autofluorescence, kterou lze snadno odečíst z naměřených spekter pouhým změřením autofluorescence samostatného příslušného pufru (chemikálie) nebo jako suspenzi s buňkami (viz. následující odstavec).

Pro odečítání autofluorescence buňek se používá podobný postup, kdy se změří autofluorescence testovaného kmene, u něž chybí plasmid pro expresi fluorescenčního proteinu. V některých případech tato autofluorescence nemusí být totožná s autofluorescencí kmene obsahující fluorescenční protein, avšak na základě pozorovaných trendů synchronizace je možno tento nedostatek odstranit [90].



Obr. 6. Změřená excitační a emisní fluorescenční spektra metodou synchronního skenování fluorescence kmene AD1-3+pHluorin v citrát-fosfátovém pufru korigovaná o autofluorescenci buněk kmene AD1-3. Veškeré grafy a výpočty byly prováděny v programu SigmaPlot 11.0.

Obr. 6. Představuje naměřená data metodou synchronního skenování fluorescence (viz. kapitola 2.1.2). Pokud se podíváme na tyrkysovou a fialovou křivku, což jsou změřené hodnoty autofluorescence kmene AD1-3 bez pHluorinu resuspendované v citrát-fosfátovém pufru, lze v oblastech 340-360 nm a 380-420 nm pozorovat vynikající shodu těchto čar s čarami čárkovanými za oblastmi píku označující superpozici excitačních a emisních spekter fluorescence (jejich vzájemné násobní) kmene AD1-3 s pHluorinem (viz. kapitola 2.1.2). Tímto pozorováním vyplývá zřejmý závěr, že odstranění autofluorescenčního záření buněk lze pro daný

kmen provést pouhým odečtením jednotlivých autofluorescenčních křivek pro příslušný offset.

2.1.2 Metoda synchronního skenování fluorescence

Při měření fluorescenčních spekter existují tři základní možnosti jakým způsobem postupovat. První možností je excitovat vzorek konstantní vlnovou délkou λ_{ex} a skenovat spektrum emitované vlnové délky λ_{em} (emisní spektrum). Druhou možností je zvolit opačný přístup a skenovat excitační spektrum, zatímco sběr dat probíhá na fixní emisní vlnové délce (excitační spektrum).

Třetí variantou je metoda synchronně skenované fluorescence, kde probíhá současné skenování vlnové délky excitace i emise. Této metody je běžně využíváno ve třech módech [91,92].

1. Synchronní skenování fluorescence s konstantním vlnovým posunem (offsetem) $\Delta\lambda$ mezi excitační a emisní vlnovou délkou.
2. Synchronní skenování fluorescence s konstantním rozdílem energií. Skenuje se tak, aby se udržoval konstantní frekvenční rozdíl při současném posunu excitačního a emisního monochromátoru.
3. Synchronní spektrofluorometrie s variací úhlů. Při tomto módu se simultánně skenuje excitační a emisní monochromátor, přičemž $\Delta\lambda$ není zachováno konstantní [93].

Dále je podrobněji zmíněn princip synchronně skenované fluorescence s konstantním $\Delta\lambda$, jelikož právě ten byl použit ve všech experimentech pro měření fluorescence v rámci této práce. Roku 1978 Vo-Dinhem byla formulována teorie synchronně skenované fluorescence s konstantním offsetem řídící se následujícími rovnicemi [94].

$$\lambda_{ex} - \lambda_{em} = \Delta\lambda = konst \quad (6)$$

$$I_{syn}(\lambda_{em}) = K \cdot c \cdot d \cdot E_{ex}(E_{ex}) \cdot E_{em}(\lambda_{em}) \quad (7)$$

K ... konstanta popisující vlastnosti fluorimetru

c ... koncentrace fluoroforu ve vzorku

d ... tloušťka vzorku

E_{ex} ... excitační spektrum

E_{em} ... emisní spektrum

I_{syn} ... intenzita synchronně skenovaného spektra

Rovnici (7) lze díky (6) přepsat do následujících vztahů:

$$I_{syn}(\lambda_{em}) = K \cdot c \cdot d \cdot E_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda) \cdot E_{em}(\lambda_{em}) \quad (8)$$

$$I_{syn}(\lambda_{em}) = K \cdot c \cdot d \cdot E_{ex}(E_{ex}) \cdot E_{em}(\lambda_{ex} + \Delta\lambda) \quad (9)$$

Synchrosken závisí rovnocenným dílem na emisním i excitačním vlnové délce. V důsledku násobení E_{ex} a E_{em} dochází vhodnou volbou $\Delta\lambda$ k výraznému zúžení nenormalizovaných pásu v synchroskenu 5-10-krát oproti samotným excitačním či emisním spektrům. [95]. Díky tomu lze tuto metodu použít pro snažší odlišení jednotlivých příspěvků k celkové fluorescenci. Synchronním skenováním fluorescence lze výrazně zvýšit selektivitu a celkově přesnost měření pro analytické zpracování studovaných spekter a v mnoha případech efektivně potlačit autofluorescenci buněk a rušivých složek pozadí [95].

Aby se docílilo zmíněných výhod synchroskeny volí se interval $\Delta\lambda$ tak, aby odpovídal vzdálenosti mezi maximy excitace a emise pro daný fluorofor. Příkladem synchronně skenovaného spektra je obr. 6.

3 Experimentální část

3.1 Použité kmeny buněk a jejich kultivace

3.1.1 Kmen AD1-3 + poměrový pHluorin

Studium intracelulárního cytosolického pH bylo prováděno na kmeni kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae* označených jako AD1-3 (specifikace: *Mat α* , *pdr1-3*, *ura3*, *his1*, *yor1 Δ ::hisG*, *snq2 Δ ::hisG*, *pdr5 Δ ::hisG* [96]) s geneticky implementovanou fluorescenční sondou poměrového pHluorinu. Tyto kmeny jsou specifické, že trpí nedostatkem PDR (pleiotropních lékově rezistentních) pump *Pdr5p*, *Yor1p* a *Snq2p*, ale obsahují transkripční faktor pro expresi pumpy *Pdr1p* (*pdr1-3*) a gen kódující ATP phosphoribosyltransferase (*his1*) jak je zmíněno ve specifikaci kmene. Kmeny byly připraveny RNDr. Tomášem Hendrychem, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty UK, Katedry genetiky a mikrobiologie.

Kmen bez fluorescenční sondy byl používán jako kontrola autofluorescence buněk a růstových charakteristik. Pokud jsou v experimentální části zmíněny obecně buňky, vždy se myslí tento kmen.

3.1.2 Kultivace buněk a jejich příprava pro měření

Kvasinkové buňky byly kultivovány v plném živném médiu YPD (Yeast-Peptone-D-glucose), jehož složení je uvedeno v tab. 2. Důvodem kultivace v tomto médiu je jeho definované složení, díky němuž jsou minimalizovány fluktuace růstových podmínek jednotlivých vzorků buněk.

Látka	Množství [g/l]
YE (Yeast extract)	20
Pepton	10
Glukóza	20
agar (pro pevné médium)	20

Tab. 2. Složení použitého růstového minimálního média YPD

Složky média z tab. 2 byly rozpuštěny v destilované vodě a vzniklý roztok sterilně upraven autoklávováním. Pro přípravu živného média na Petriho miskách se k YPD médiu přidává agar. Misky jsou zaočkovány pomocí sterilní kličky z konzervy obsahující zamrazené buňky požadovaného kmene (-20°C). Petriho mísky jsou následně po dobu 2 dní udržovány při kultivační teplotě 30°C . Jakmile kultura naroste do požadovaného množství, jsou Petriho mísky s buňkami uskladněny v lednici při teplotě 4°C .

Inokulum-suspenze narostlých buněk v tekutém YPD médiu lze připravit dvěma způsoby. Prvním je odebrání buněk z připravených uskladněných Petriho misek a druhým způsobem je přímé odebrání buněk ze zamrazené konzervy. Obvykle se připravuje 10 ml inokula do 50 ml živného média v Erlenmayerově baňce. Baňka se následně uzavře prodyšnou tkaninou. Erlenmayerova baňka se vzniklou suspenzí buněk a živného média se ve vodní lázni o teplotě 30°C nechá protřepávat s rotační frekvencí 150 otáček za minutu přibližně 24-36 hodin. Takto vzniklá suspenze se může opět uskladnit v lednici nebo přeočkovat do nové Erlenmayerovy baňky s živným médiem a opět nechat kultivovat za stálého protřepávání ve vodní lázni (30°C) po dobu, dokud kultura nenaroste na požadované OD (optická hustota) při použité vlnové délce 578 nm. Růstová fáze přímo souvisí s naměřeným OD_{578} .

3.2 Příprava pufrů a použité chemikálie

3.2.1 Pufrы

Pro fluorescenční měření byly buňky resuspendovány v předem stanoveném pufru. Během experimentů bylo využíváno dvou druhů pufrů. Prvním a nejčastěji využívaným pufrém byl 10 mM (10 mM se myslí roztok koncentrace 10 mMol/l) citrát-fosfátový (dále už jen C-P) pufr. Tyto pufrы byly připravovány rozpuštěním 3,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v jednom litru destilované vody. Následným titrováním pomocí koncentrovaného roztoku kyseliny citrónové se ustanovuje konečné pH pufru. Druhým typem pufrů byly pufrы 25 mM MES-TEA, které

vznikaly rozpuštěním MES hydrátu ($C_6H_{13}NO_4S \cdot xH_2O$) v destilované vodě a následným titrováním pomocí TEA (tri-etanol-amin) na požadovanou hodnotu pH.

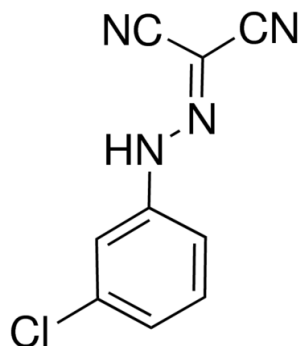
Pro změření kalibrační křivky intracelulárního pH byly používány kalibrační pufrы definovaného pH popsány v [83]. Složky kalibračních pufrů (viz. tab 3.) byly rozpuštěny v definovaném množství destilované vody a požadovaného pH bylo dosaženo titrováním pomocí NaOH.

Látka	Koncentrace [mM]	Množství [g/l]
MES	50	10,66
HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	50	11,9
KCl	50	3,73
NaCl	50	2,29
Ammonium acetát	200	15,4
2-deoxy-D-glukóza	10	1,64
Azid sodný (N_3Na)	10	0,65

Tab. 3. Složení kalibračních pufrů použitých pro kvasinky *S. cerevisiae*

3.2.2 CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)

Pro studium změn intracelulárního pH bylo velice důležité přidávání CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) od firmy Sigma-Aldrich (dále zkracováno jako SIGMA), který byl připraven rozpuštěním v N,N-dimethylformamide (DMF) firmy Sigma-Aldrich na 10 mM koncentraci.



Obr.7. Strukturální vzorec CCCP

CCCP je protonoforem, který zvyšuje permeabilitu cytoplasmatické membrány pro protony, čímž snižuje absolutní hodnotu membránového potenciálu a způsobuje tedy depolarizaci cytoplasmatické membrány [97]. Při koncentracích 5-10 μM , se prokázalo, že CCCP je schopen úplně depolarizovat plasmatickou membránu buněk *S. cerevisiae* [98]. CCCP je slabá lipofilická kyselina, která zůstává inkorporována v plazmatické membráně na rozdíl od jiných slabých kyselin, které vstupují do cytosolu [99]. CCCP způsobuje, že vnitřní prostředí buňky se stává kyselějším díky disociaci CCCP v plazmatické membráně. Uvolněné protony poté procházejí do buňky a způsobují rychlou aktivaci H^+ -ATPázy [100]. Aktivace H^+ -ATPázy má za následek maximální zvýšení membránového potenciálu, který je buňka schopna udržet [101].

CCCP je schopen kompetitivní inhibice některých hlavních pump jako jsou Pdr5p a Snq2p, což může vést k fenoménu vícečetné lékové rezistence [102].

3.2.3 Použité chemikálie

Látka	M_r [g/mol]	Výrobce	Látka	M_r [g/mol]	Výrobce
DMF	73,09	SIGMA	KCl	74,56	Fluka
D-manóza	180,16	SIGMA	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	164,16	SIGMA
D-fruktóza	180,16	SIGMA	Amonium acetát	77,08	SIGMA
D-glukóza	180,16	SIGMA	NaCl	58,44	SIGMA
YE		SERVA	CCCP	204,62	SIGMA
HEPES	238,13	SIGMA	NaOH	40	SIGMA
Agar		Roth	GLC. činidlo		Erba-Lachema
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358,14	SIGMA	Kys. citrónová	192,13	PENTA
			Azid sodný	65,01	SIGMA

GLC. činidlo ... Glukosa Liquid 1000

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$... 2-deoxy-D-glukóza

Tab. 4. Použité chemikálie během experimentů

3.3 Měření optické hustoty (OD) suspenzí kvasinek

Pro všechna měření byly používány polymethylmetakrylátové kyvety o objemu 4ml a rozměrech 1x1 cm (Kartell, Itálie). V případě měření růstových křivek bylo v iminárním boxu s přetlakovým odvětráváním přes HEPA filtry odebráno z Erlenmayerovy baňky sterilně nad kahanem 100 μ l suspenze s buňkami, která pak byla naředěna 2,9 ml destilované vody. Optická hustota těchto suspenzí byla následně měřena pomocí jednopaprskového kolorimetru Novaspec III (Amersham Biosciences) při vlnové délce 578 nm. V naměřených hodnotách OD_{578} jsme si ověřili, že vliv zbytkového živného média ani použití destilované vody namísto příslušného pufu se v rámci chyby určení OD_{578} neprojeví, jelikož samotná chyba určení je o řád vyšší. Pro zjištění skutečného OD_{578} buněk v médiu bylo nutné naměřenou hodnotu vynásobit 30, což vyplývá z poměru ředění suspenze s destilovanou vodou. Výslednou chybu určení OD stáří kultury uvažujeme jako $\pm 0,3$ jednotky OD. Pokud by se měřilo OD neředěné suspenze, docházelo by k přílišnému rozptylu světelného paprsku a výsledky měření by byly silně zkresleny.

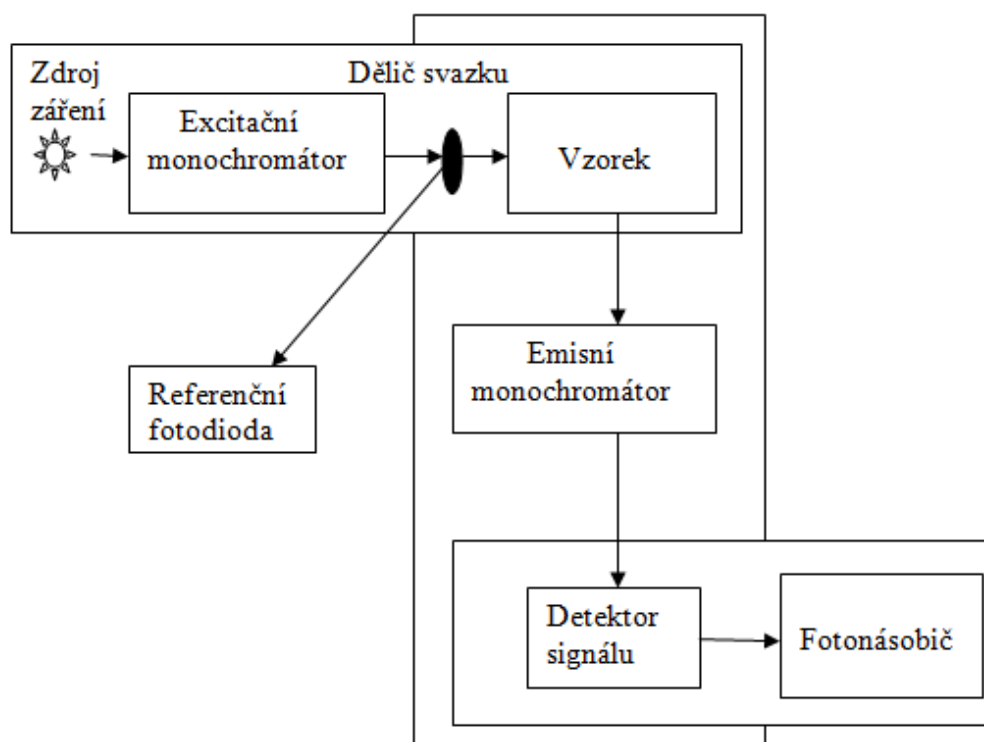
3.4 Měření fluorescence

3.4.1 Příprava buněk pro fluorescenční měření

Pro fluorescenční měření bylo po zjištění stáří (fáze) buněk nutno oddělit supernatant od kvasinek, což bylo prováděno centrifugací po dobu tří minut a frekvenci rotace 3000 otáček za minutu. Centrifugace se prováděla třikrát, kdy mezi jednotlivými centrifugacemi byly buňky promývány destilovanou vodou a po závěrečné centrifugaci byly kvasinky resuspendovány v požadovaném pufu. Množství resuspendovaných buněk bylo korigováno na základě změřených OD suspenze buněk s pufrem. Pokud není řečeno jinak, ve všech experimentech bylo do pufu přidáváno takové množství buněk, aby výsledná suspenze měla $OD = 0,5$. Toto OD suspenze zaručuje výborný poměr sigál/šum.

3.4.2 Postup a technické vybavení pro měření fluorescence.

Všechna fluorescenční měření probíhala na spektrofluorometru FluoroMax-3 od firmy Horiba-Jobin Yvon. Přístroj jako zdroj excitačního záření využívá xenonovou výbojku. Excitační svazek postupuje přes mřížkový monochromátor na vzorek v kyvetě. Fluorescence je snímána ve směru kolmém na směr excitačního svazku. Emisní vlnová délka je vybrána následujícím emisním mřížkovým monochromátorem. Schématické znázornění FluoroMaxu-3 je na obr. 8



Obr. 8. Schématické znázornění přístroje FluoroMax-3

Přístroj je schopen měřit excitační, emisní spektra i synchronně skenovaná spektra fluorescence s konstantním, libovolně volitelným offsetem $\Delta\lambda$.

Synchronně skenovaná fluorescenční spektra pro určení cytosolického pH byla snímána při offsetech odpovídajících Stokesovým posuvům fluorescence poměrového pHlorinu při excitaci jeho protonované a neprotonované formy. Pro pás protonovaného pHlorinu, jehož intenzita rostla s klesajícím pH_c , bylo nastaveno

$\Delta\lambda = 30$ nm. Pro druhý excitační pás odpovídající neprotonovanému pHlorinu, jehož intenzita za snižujícího se pH_c klesala, bylo nastaveno $\Delta\lambda = 110$ nm. Při offsetu 30 nm byla snímána oblast vlnových délek v rozmezí 380-490 nm, při offsetu 110 nm, byla skenována oblast 340-440 nm. Krok skenování byl 1 nm s integrační dobou 0,5 s. Excitační i emisní štěrbiny monochromátorů byly otevřeny na 3 nm. Díky tomuto nastavení bylo docíleno dostatečně rychlého snímání synchronně skenovaných spekter s velmi příznivým poměrem mezi fluorescenčním signálem a šumení pozadí.

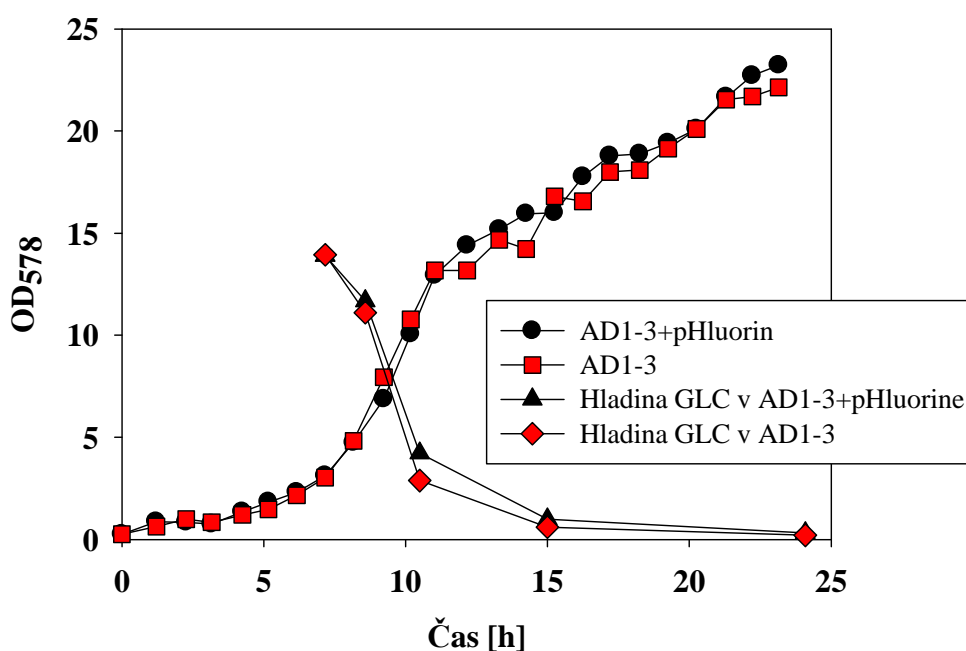
Od naměřených spekter byla odečtena autofluorescence (viz. kapitola 2.1.1) a na základě porovnání píků ze sychroskenů pro $\Delta\lambda = 30$ nm a $\Delta\lambda = 110$ nm byl určen poměr intenzit fluorescence jednotlivých excitačních pásů. Její poměr byl pomocí kalibrační křivky přepočten na pH cytosolu buňky (intracelulární pH).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Měření růstových křivek

Znát růstový profil zkoumaných kmenů kvasinek umožňuje přiřadit různé růstové fáze různým dobám kultivace za určitých podmínek a dávají nám první informace o fyziologii zkoumaných kmenů kvasinek. Z růstových křivek lze snadno na základě změření OD kultivační suspenze s rostoucími buňkami určit růstovou fázi buněčné kultury.

Pro potřeby prováděných experimentů bylo nutno nahlédnout, zda se kmeny AD1-3 a AD1-3+pHluorin zásadně neodlišují v biologických pochodech, tedy zda se genetická implementace fluorescenční sondy nějak neprojeví v charakteru růstových křivek.



Obr. 9. Porovnání růstových křivek a hladiny glukózy v kultivačním médiu kmene AD1-3 a jeho mutantu v podobě přidané fluorescenční sondy poměrového pHluorinu. Veškeré spojnice bodů mají pouze vodící funkci pro oko čtenáře, pokud není řečeno jinak.

Pro přehlednost v grafu nebyly zaneseny směrodatné odchylky získané statistickým zpracováním tří následných měření. Chyby určení OD_{578} pro signifikantní intervaly OD_{578} jsou zaneseny v tab. 4.

Interval měřených OD_{578}	Chyba určení OD_{578}
0-5	$\pm 0,27$
5-16	$\pm 0,31$
16 a více	$\pm 0,31$

Tab. 5. Chyby určení OD_{578} v růstových křivkách obr. 9.

Pro účely fluorescenčních experimentů bylo předmětem zájmu rozmezí $OD_{578} = 0-20$. Porovnáním profilu naměřených růstových křivek s křivkou z obr. 1. Lze přibližně přiřadit různým intervalům naměřeného OD_{578} příslušející růstové fáze, což je shrnuto v tab. 5.

Interval měřených OD_{578}	Růstová fáze
0-1,5	Lag fáze
1,5-14,4	Exponenciální
14,4-16	Diauxická
16 a více	Post-diauxická fáze následována stacionární fází

Tab. 6. Růstová fáze kmene AD1-3 v závislosti na naměřeném OD_{578} .

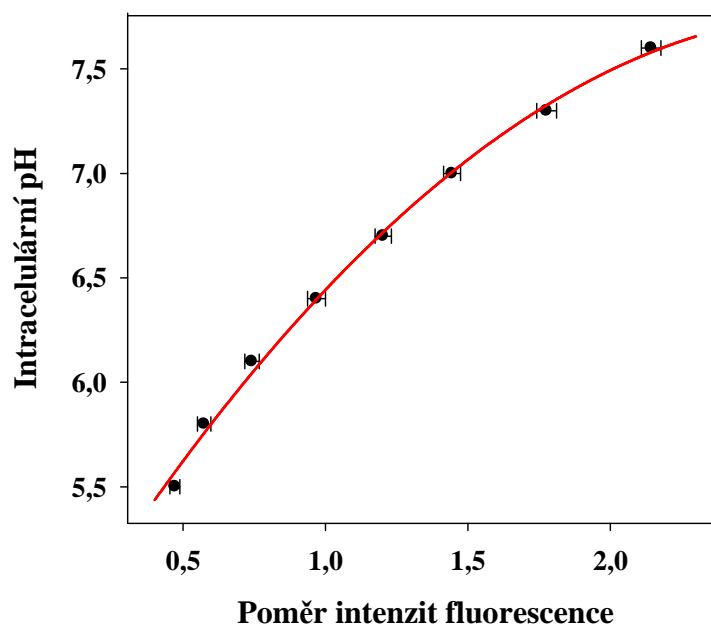
Při monitorování vývoje úbytku glukózy v živném médiu bylo postupováno následovně. Do kyvety obsahující 1 ml glukózového činidla (Glukasa Liquid 1000) bylo přidáno 10 μ l supernatantu získaného z testované suspenze buněk a růstového média (odstředěním buněk), po 20 minutách bylo přidáno 1 ml destilované vody a při kalibraci na kyvetu s destilovanou H_2O změřeno OD_{578} . Měření množství glukózy bylo prováděno za účelem orientačního určení, v jaké fázi se buňky nacházejí a pro přibližný odhad biologických pochodů uvnitř buněk.

Pro kmen obsahující pHluorin lze pozorovat mírně pomalejší pokles hladiny glukózy v živném médiu, což koresponduje s pozorováním exponenciální a post-diauxické fáze kmene AD1-3 bez pHluorinu a naznačuje poněkud pomalejší metabolismus a nižší ATPázovou aktivitu kmene obsahující pHluorin. Nutno však uvážit, doposud nezahrnutého zkreslení výsledků. Ke zkreslení došlo vlivem neidentické rychlosti manipulace se vzorky, lze předpokládat, že chyba určení OD_{578} zejména kolem exponenciální fáze růstu se pohybuje kolem 0,3 jednotky OD a lze tedy konstatovat, že jak růstové křivky, tak křivky znázorňující obsah glukózy v kultivačním médiu se v rámci této chyby měření shodují.

Po změření růstových křivek kmenů AD1-3+pHluorin a AD1-3, je pozorovaným výsledkem, že geneticky implementovaná fluorescenční sonda nemá vliv na růstové charakteristiky zkoumaných kmenů a tudíž jsou mutantní kmeny s fluorescenční sondou v hodné pro další studium intracelulárního pH.

4.2 Měření intracelulárního pH kmene AD1-3+pHluorin

4.2.1 Kalibrace poměrů synchronskenu na intracelulární pH



Obr. 10. Kalibrační křivka pHluorinu v kvasinkách *S. cerevisiae* získaná regresním proložením budů dle rovnice $f = y_0 + ax + bx^2 + cx^3$. Zdroj: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc., soukromé sdělení

Konstanty získané regresním fitem polynomem třetího stupně dle rovnice v popisku obr. 10. jsou zahrnuty v tab. 7.

Konstanta	Hodnota fitu
y_0	4,3033
a	3,1307
b	-1,1521
c	0,1283

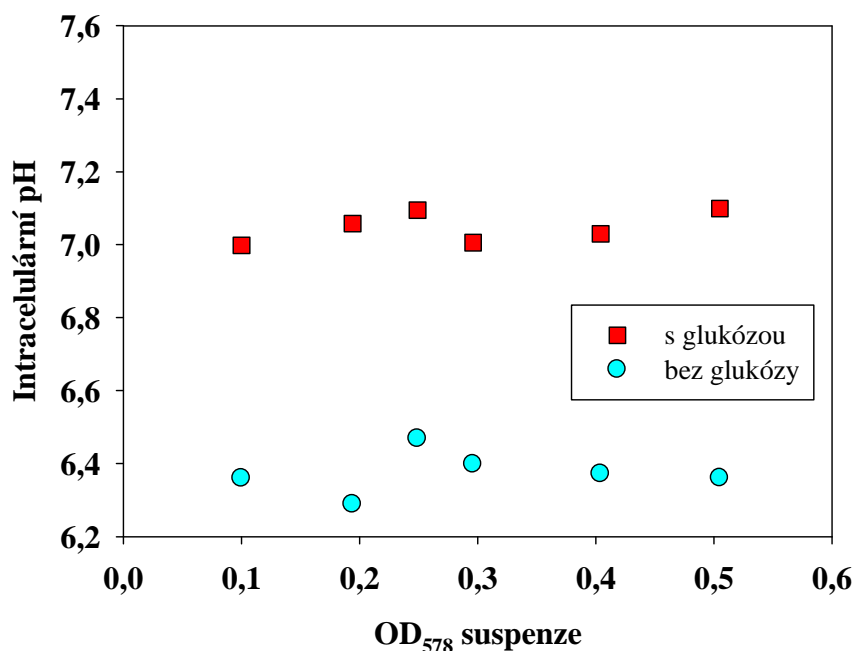
Tab. 7. Konstanty fitu z kalibrační křivky obr. 10.

Kalibrační křivka pro přepočet poměrů fluorescenčních intenzit píků získaných synchroskenem pro $\Delta\lambda = 30$ nm a $\Delta\lambda = 110$ nm na cytosolické pH, byla změřena prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc. v rámci experimentů pro připravované publikace. Postup pro kalibraci odezvy pHluorinu byl popsán v publikovaných pracích [83,103]. Princip spočívá ve vyrovnání pH suspenze s cytosolickým pH v buňkách. K tomuto účelu byly použity kalibrační pufrы z kapitoly 3.2.1, které permeabilizují plazmatické membrány buňek a tím dojde k vyrovnání pH cytosolu s pHsuspenze. V tomto i následujících odstavcích se intracelulárním pH myslí pH cytosolu, jelikož právě zde je lokalizován fluorescenční protein pHluorin.

4.2.2 Vliv hustoty suspenze na měření intracelulárního pH.

Pro ověření nezávislosti OD suspenze na naměřeném intracelulárním pH, které vyplývá z kap. 1.7.6 a 2.1.2 byl kmen AD1-3+pHluorin resuspendován v 25mM pufru MES-TEA o pH = 6 na různou konečnou hodnotu OD₅₇₈. U těchto vzorků bylo následně určeno intracelulární pH. Tento experiment byl opakován se vzorky kde byla přidána glukóza v množství potřebném na vytvoření 5 mM roztoku glukózy a testované suspenze. Po přidání glukózy (GLC) do vzorků se čekalo 15 minut, aby kvasinky stihly na přítomnost GLC zareagovat. Testované buňky se nacházely na předělu lag fáze a exponenciální fáze, vyjádřeno v jednotkách optické hustoty OD₅₇₈ = 3,9.

Pokud není řečeno jinak, uvažuje se chyba určení hodnoty intracelulárního pH jako $\pm 0,2$ jednotky pH. Chyba byla odhadnuta na základě zkušeností z opakovaných měření, při kterých dochází k mírným odchýlkám v neidentické rychlosti přípravy vzorků a fluktuacím způsobených faktem, že se jedná o práci s živými organismy.

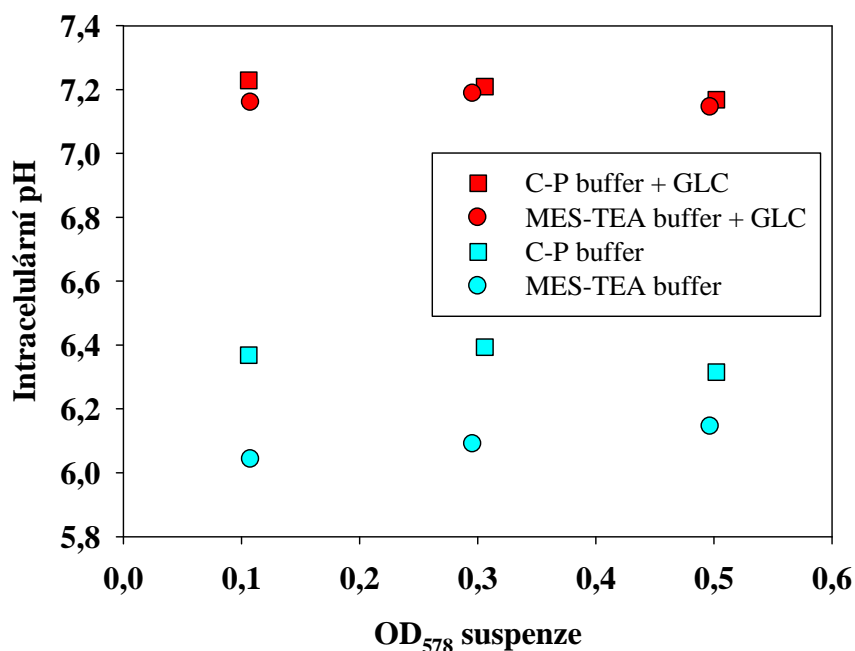


Obr. 11. Graf ověření nezávislosti OD suspenze na naměřené hodnotě pH_c. Pufr MES-TEA (pH=6), OD₅₇₈ = 3,9

Obr. 11 potvrdil předpoklad o nezávislosti OD suspenze na naměřených hodnotách intracelulárního pH. PHluorin tedy lze spolehlivě využívat pro monitorování intracelulárního pH aniž by artefakty související s měnící se mírou efektu rozptylu světla v různě hustých suspenzích zásadním vlivem ovlivnily výsledky měření.

4.2.3 Vliv typu pufru na intracelulární pH

Z důvodu resuspendování kvasinkových buněk v různých typech pufru bylo nutno stanovit, zda a v jaké míře se typ pufru projeví na intracelulárním pH buněk. Testovací pufr byly pufr: MES-TEA a C-P popsány v kapitole 3.2.1. Oba pufr byly titrovány na hodnotu pH = 6. Růstová fáze kvasinek OD₅₇₈ = 4,62.



Obr. 12. Rozdílnost reakcí kmene AD1-3+pHluorin na přítomnost 25 mM pufru MES-TEA (pH = 6) a 10 mM C-P pufru (pH = 6), OD₅₇₈ = 4,6.

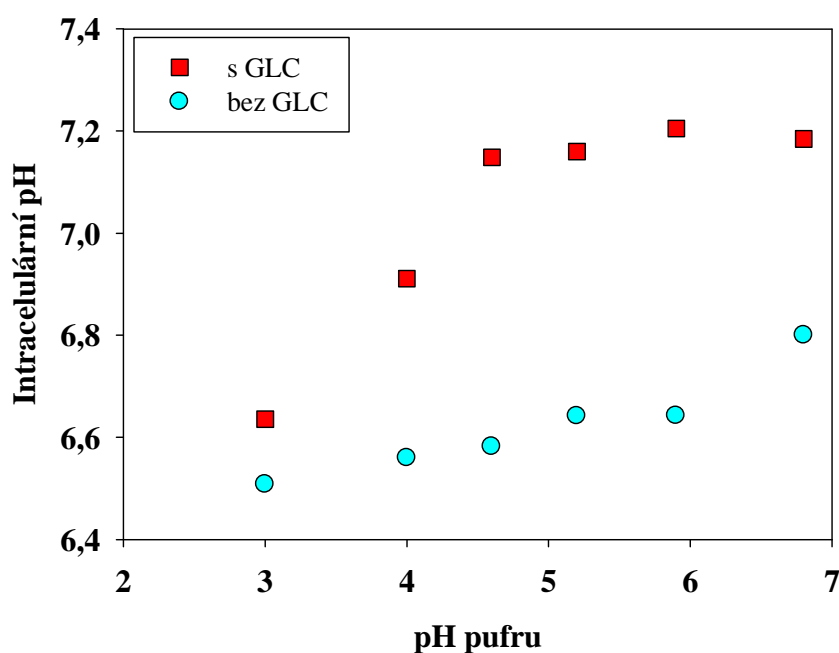
Zkratka GLC značí přítomnost glukózy, která i ve všech následujících experimentech (pokud není řečeno jinak) bude se suspenzí tvořit 5 mM roztok.

Z obr. 12 je patrné potvrzení kapitoly 4.2.2, že koncentrace resuspendovaných buněk má zanedbatelný vliv na měření pH_i. Po přidání glukózy se zvýšením ATPázové aktivity oba vzorky, nezávisle na použitém pufru, dostávají na hodnotu pH_i = 7,2 která je pro dané kvasinky považována za ideální hodnotu. Pro buňky bez GLC se vliv pufru mírně projevuje. Označení buňek v suspenzi bez GLC je mírně zavádějící, jelikož nelze přesně stanovit jaké množství energetických zdrojů se v buňce právě nachází. Tento rozdíl v intracelulárních pH v závislosti na pufru je zřejmě způsoben pasivní tokem iontů skrze plasmatickou membránu vlivem její mírné depolarizace. Tato depolarizace je zřejmě způsobena přítomností Na⁺ iontů vyskytujících se pouze v C-P pufru a mohou tak ovlivnit celkovou iontovou homeostázu. Tento jev byl neočekávaný a projevil se až při zpracování spekter, tudíž pro jeho přesné vysvětlení je zapotřebí dalšího studia. Kvasinky v C-P pufru bez GLC dosahují hodnot pH_i kolem 6,1 ± 0,2, kdežto v pufru MES-TEA se pH_i pohybuje kolem 6,4 ± 0,2.

Vliv přidání GLC do suspenze a následný výrazný nárůst pH_i , byl již dříve popsán v pracích [104,105], jejich dosažené výsledky se s prezentovaný výsledky zde shodují.

4.2.4 Vliv pH pufru na intracelulární pH

V dalších experimentech byla středem zájmu schopnost kvasinek udržovat si konstantní intracelulární pH v prostředích o různých hodnotách pH. Z teoretické části 1.6 je zřejmé, že protony jakožto nabitě částice nemohou volně difundovat skrze plazmatickou membránu do buňky, ale svou přítomností ovlivňují membránový potenciál a tím i činnost ATPáz a tak mohou ovlivnit pH_i .



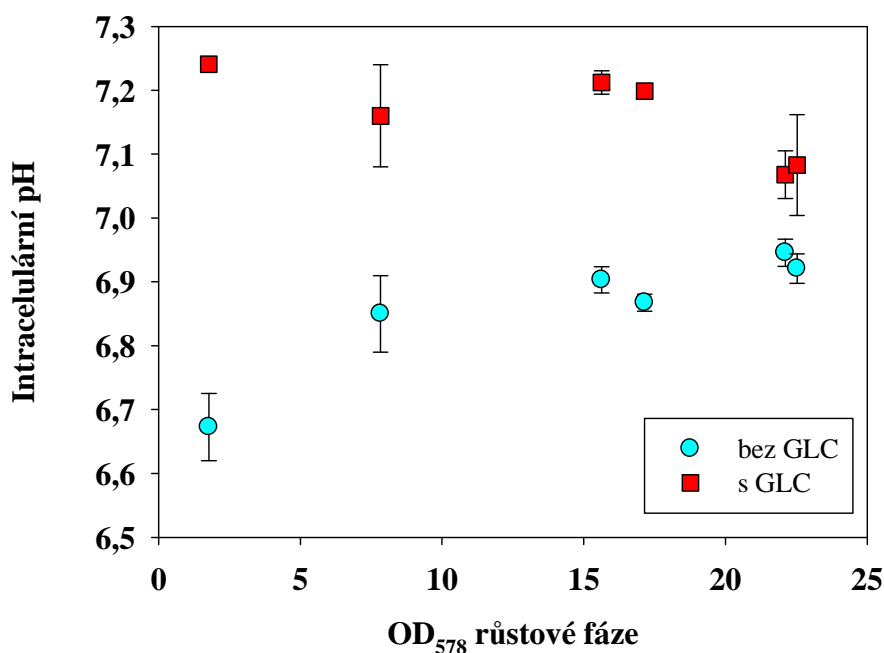
Obr. 13. Schopnost buněk udržet konstantní pH_i v různě kyselých prostředích. Pufr MES-TEA různého pH, $\text{OD}_{578} = 8,5$.

Závislost pH prostředí má na intracelulární pH kvasinek dle očekávání vliv jak ukazuje graf na Obr. 13. V rámci pufru tvořící prostředí o pH v rozmezí 3-6, se ve vzorcích neobsahující GLC daří udržovat homeostázi intracelulárního pH kolem hodnoty 6,6. Při dalším zvyšování absolutní hodnoty pH dochází i k navyšování pH_i . Vysvětlení poskytuje studie [105]. Důvodem je uvedena zvýšená koncentrace H^+ iontů vně buňky, což ovlivňuje membránový potenciál a tím i depolarizaci

membrány. Při dalším okyselování prostředí buňky tato depolarizace stále narůstá a buňka již není schopná udržet pH_i homeostázi. Tyto trendy vývoje pH_i jsou ve shodě s pracemi [66,105].

Pozorováním vývoje suspenze obsahující GLC, vzhledem k v vyšší aktivitě ATPáz dochází už při nízkých hodnotách pH pufru k výraznému nárůstu intracelulárního pH, tento trend má vzhledem k pH okolí lineární charakter. Vlivem GLC má buňka dostatek množství energie pro regulaci intracelulárního pH směrem k optimální hodnotě $pH_i = 7,2$. Při navýšení pH_i na hodnotu 7,2, kterého je buňka schopna dosáhnout i v pufru o pH = 4,5, zvyšování pH_i se zastaví a udržuje se konstantní, dokud má kvasinková buňka dostatek energetických zdrojů k udržení optimálního intracelulárního pH.

4.2.5 Vliv stáří buněk na intracelulární pH



Obr. 14. Vývoj intracelulárního pH během růstových fází kmene AD1-3+pHluorin v C-P pufru pH = 6.

Chybové úsečky zobrazeny v grafu z obr. 14 je nutno uvažovat s velkou rezervou, jelikož se jedná o statistické zpracování souboru pouze tří měření prováděných v jeden den. Vhodnější je uvažovat maximální chybu určení pH_i , což je

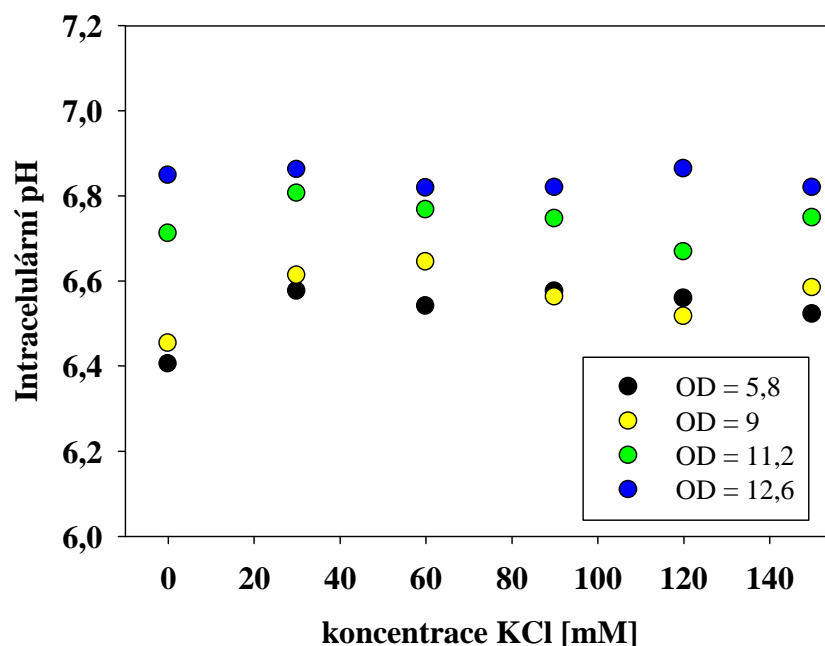
$\pm 0,9$ jednotky pH. Pokud by do grafu byly zahrnuty i výsledky z jiných experimentů chybové úsečky by dosahovaly hodnoty $\pm 0,2$ pH, která je obecně předpokládána u dalších experimentů této práce zahrnující měření pH_i .

Z teoretické části 1.1-1.5 lze předpokládat, že se stárnutím buňky se bude měnit i pH_i . Tuto závislost popisuje obr. 14. U vzorků bez obsahu glukózy dochází v průběhu vývoje buňky až do diauxické fáze (poslední měřený bod) k růstu intracelulárního pH. Toto pozorování odpovídá předpokladu, že během růstu buňky se mění i její vnitřní pH, které se snaží přiblížit optimální hodnotě avšak při nedostatku energetických zdrojů, musí buňka ekonomicky využívat energii pro regulaci intracelulárního pH a nedosáhne optimální hodnoty $\text{pH}_i = 7,2$. V oblasti diauxické a post-diauxické fáze již buňky zvyšují pH_i jen nepatrně a může se předpokládat, že se nažijí udržet konstantní $\text{pH}_i = 7$, které je blízké jejich optimální hodnotě intracelulárního pH a energeticky výhodné.

V případě vzorků obsahujících GLC, se ve shodě s předchozími výsledky projeví přítomnost GLC hodnotami intracelulárního pH pohybujících se kolem hodnoty 7,2 pH. Buňky při dostatečném množství zdroje energie ve svém okolí mohou využít větší množství energie k regulaci pH_i než tomu bylo u vzorků bez přidaného GLC a lépe tak regulovat své vnitřní pH. Jakmile se hodnota suspenze pohybuje kolem $\text{OD}_{578} = 16$ a výše, většina buněk v suspenzi se nachází v diauxické a post-diauxické fázi. Jejich metabolismus je již přizpůsoben pro využívání jiného zdroje energie než je glukóza (popsáno v oddíle 1.5.3) a tudíž se jejich citlivost vůči přidané glukóze snižuje a hodnoty pH_i se i za přidání GLC blíží hodnotám vzorků bez přidané GLC.

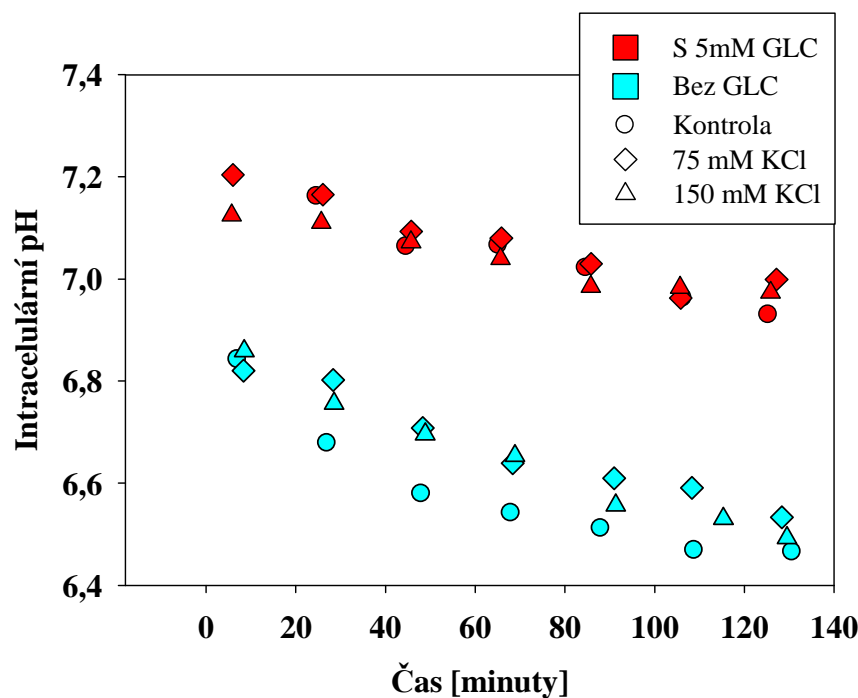
4.2.6 Vliv KCl a délky inkubace buňek v připravené suspenzi

Jelikož KCl je zdrojem K^+ a Cl^- iontů, bylo studováno, jaký vliv má koncentrace KCl na pH_i kvasinkových buněk AD1-3+pHluorin. Dalším testovaným parametrem byl vliv doby, po kterou byly kvasinky inkubovány v testované suspenzi.



Obr. 15. Vliv koncentrace KCl na intracelulární pH buněk resuspendovaných v C-P pufru pH = 6 bez přidání GLC.

Na obr. 15 je znázorněn vliv koncentrace KCl. Test probíhal na buňkách různého stáří. Stáří jednotlivých, obarevně odlišených sériích, buněk se pohybuje v rozmezí OD = 5,8-12,6. Specifické množství KCl bylo do měřených kyvet přidáváno dodatečně v takovém množství, aby výsledná suspenze obsahovala 30, 60, 90, 120 a 150 mM roztok KCl. Jako koncentrace 0 v obr. 15 je označena kontrolní kyveta (kontrolní kyvetou je i v dalších experimentech myšlena suspenze kvasinek a pufru bez dalších příměsí) tedy bez přídávého KCl. Vliv KCl byl zkoumán na buňkách různého stáří a ve všech případech se přítomnost KCl nijak významně neprojevila. Toto pozorování souhlasí s výsledky uvedenými v práci [106]. Avšak bez možnosti přesně určit kolik energetických zdrojů má buňka nastřádaných během kultivace, může docházet k velkým fluktuacím ve výsledcích a proto se námi dosažené výsledky mohou odlišovat od výsledků v pracích [107,108]. Nutno uvážit, že i vliv různých mutantních kmenů *S. cerevisie* může být příčinou neshody.



Obr. 16. Vliv délky inkubace buněk v C-P pufru pH = 6 a přítomnosti KCl v různých koncentracích. Růstová fáze $OD_{578} = 7,8$.

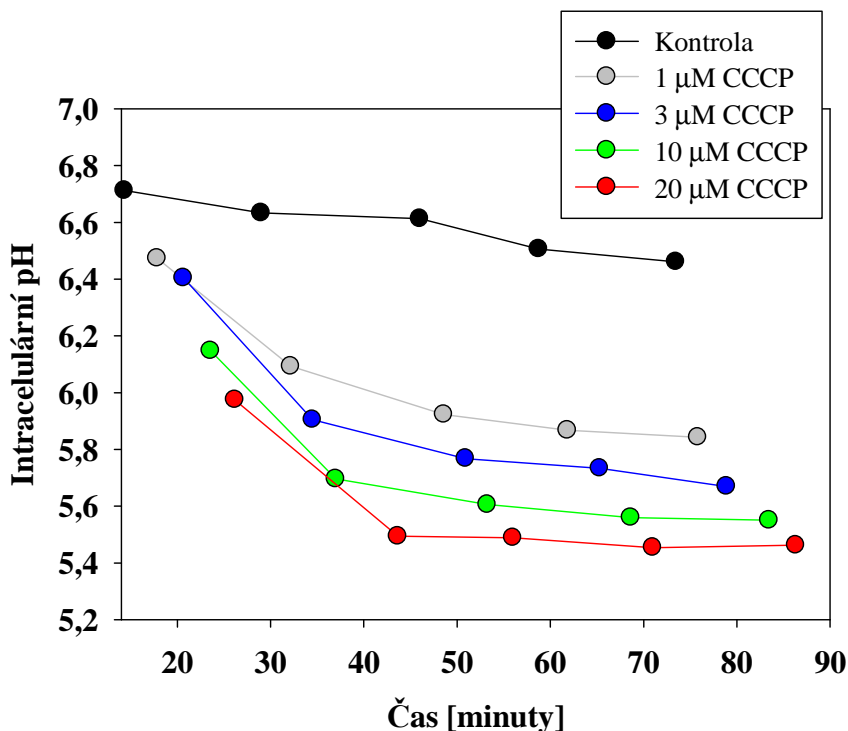
Testování vlivu délky inkubace kvasinek v C-P pufru o pH = 6 probíhalo na šesti kyvetách obsahující kvasinky v exponenciální růstové fázi ($OD_{578} = 7,8$). První trojice vzorků s různou koncentrací KCl (kontrola, 75 mM KCl a 150 mM KCl) se odlišovala od druhé trojice pouze obsahem 5 mM koncentrace glukózy.

Analýza obr. 16. ukazuje, že délka inkubace kvasinek v pufru jehož pH je různé od intracelulárního pH kvasinek má zásadní vliv na hodnotu intracelulárního pH. Z obr. 16 je možno usoudit, že buňky nejsou schopny udržet konstantní pH_i ani po krátkou dobu (dvacet minut) inkubace v pufru nižšího pH než je jejich intracelulární, přičemž jejich vnitřní pH má tendence s časem klesat směrem k úrovni pH pufru. Při vyšších koncentracích KCl se trend klesajícího pH_i jeví jako pozvolnější, narozdíl od suspenzí s nižší koncentrací KCl, toto tvrzení však nemusí být pravdivé, vzhledem k chybě určení intracelulárního pH, která (za pomoci dat z dalších experimentů) byla obecně stanovena na $\pm 0,1$ jednotky pH.

Porovnáním serií vzorků s přídavou glukózou a bez ní, je patrné že buňky s přídavou glukózou se snáze vyrovnávají s kyselějším prostředím, než je jejich intracelulárního pH. Což bylo diskutováno v předchozích experimentech.

4.2.7 Ovlivnění intracelulárního pH přítomností protonoforu CCCP

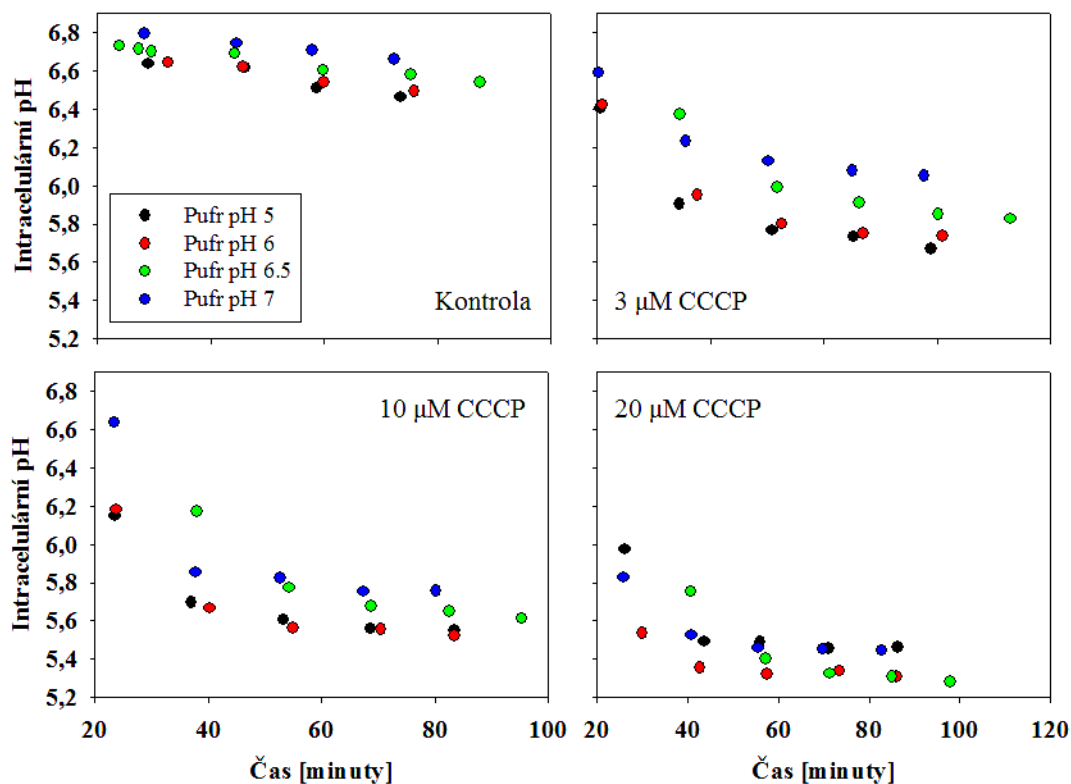
S protonoforem CCCP byla prováděna série měření, kdy se zkoumal vliv jeho různých koncentrací na intracelulární pH kvasinek AD1-3+pHluorin. Dále byl studován vliv CCCP na kvasinky v kontrakci s dalšími látky a to 25 mM roztoku KCl nebo 5 mM roztoku glukózy, popřípadě s pufrů různého pH. Tyto závislosti jsou vyneseny v grafech na obr. 17-21.



Obr. 17. Časový vývoj vlivu protonoforu CCCP v různých koncentracích na kvasinky. Koncentrace CCCP v suspenzi 1-20 μM roztok, stáří kultury $OD_{578} = 8,6$, C-P pufr pH = 7.

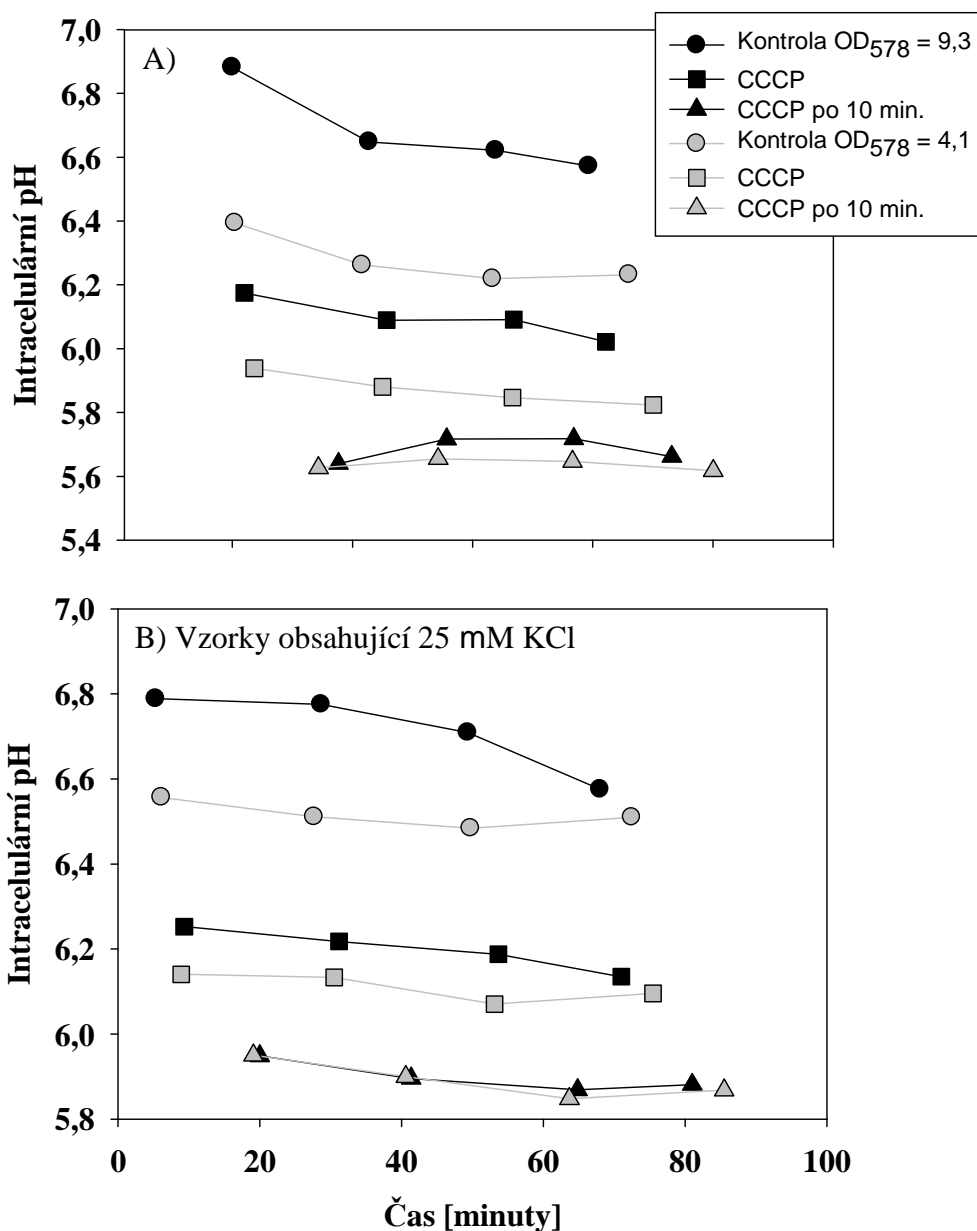
Vliv protonoforu CCCP v porovnání s měřenou kontrolou má signifikantní vliv již při koncentraci 1 μM. Přítomnost CCCP v suspenzi se projevuje v podobě exponenciálního poklesu intracelulárního pH v závislosti na délce inkubace buněk v jeho roztoku. Po padesáti minutách inkubace kvasinek v roztoku pufru a CCCP se hodnota pH_i ustaluje na hodnotách nižších než je pH okolního pufru. Konečné hodnoty pH_i podléhající vlivu koncentrace CCCP. To přímo souvisí s depolarizací plasmatické membrány vlivem CCCP (viz. 3.2.2). Lze pozorovat, že koncentrace 1 μM způsobí v čase 50 minut pokles intracelulárního pH v porovnání s intracelulárním pH kontroly o 0,7 jednotky pH, trojnásobná koncentrace CCCP o 0,9 jednotky pH, desetinásobná koncentrace o 1,1 jednotky pH a dvacetinásobně

vyšší koncentrace CCCP oproti počátečnímu 1 μM roztoku způsobí pokles intracelulárního pH v porovnání s kontrolním vzorkem v čase 50 minut už jen o 1,2 jednotky pH. Z toho lze usuzovat, že přítomnost CCCP v suspenzi se projeví značným snížením intracelulárního pH buněk již v malých koncentracích, přičemž vliv koncentrace CCCP na velikost snížení pH_i má logaritmický charakter.



Obr. 18. Vliv tří různých koncentrací CCCP (3 μM , 10 μM , 20 μM) v C-P pufrách o pH: 5; 6; 6,5; 7. Růstové fáze: modrá- $\text{OD}_{578} = 8,6$; zelená- $\text{OD}_{578} = 9,8$; červená- $\text{OD}_{578} = 9,9$; černá- $\text{OD}_{578} = 9,2$.

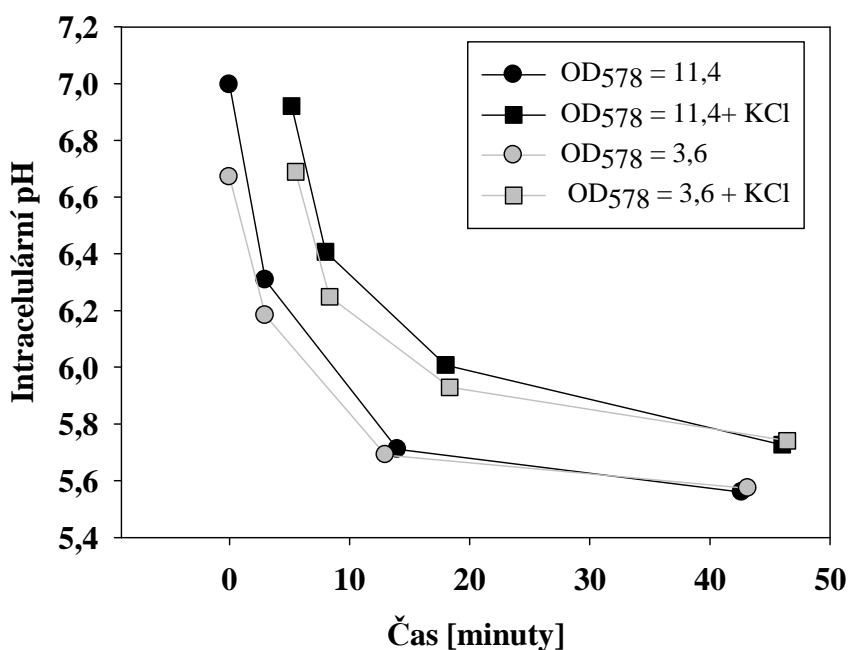
Všechny buňky testovaných vzorků se nacházejí v exponenciální růstové fázi velmi podobného OD, tudíž je možno předpokládat, že vzorky se různí pouze koncentrací CCCP a pH pufru, ve kterém jsou buňky resuspendovány. Dle očekávání, se vlivem přítomnosti CCCP snižuje hodnota pH_i a s rostoucí koncentrací CCCP se ustaluje velikost intracelulárního pH na nižší hodnotě. V grafech obr. 18 je možno pozorovat, že v případě vzorků s nižším pH pufru dochází s časem k výraznějšímu poklesu intracelulárního pH, než je tomu v případě vzorků s pufrů o pH = 6,5 – 7. Tento jev je však s rostoucí koncentrací CCCP potlačen.



Obr. 19. Vliv protonoforu CCCP, extracelulárního KCl a doby inkubace v C-P pufru (pH = 6) na intracelulární pH buněk v různých růstových fázích. Černá-OD₅₇₈ = 9,3; šedá-OD₅₇₈ = 4,1. CCCP – 10 μM roztok, KCl – 25 mM roztok.

Obr. 19. je pro přehlednost rozdělen do dvou grafů. A) a B). Graf A) popisuje vývoj intracelulárního pH pokud ke kontrolním vzorkům (kolečka) je přidán CCCP po různě dlouhé inkubaci v pufru. Tudíž se jedná o čtyři kyvety obsahující totožné suspenze které se liší pouze délkou inkubace než byl přidán CCCP. Jednotlivé kontrolní vzorky okamžitě po přidání CCCP byly proměřeny (čtverečky) a po deseti minutách od přidání CCCP byly vzorky proměřeny znova. Experiment z grafu B) se liší pouze přítomností 25 mM roztoku KCl, který kyvety obsahují již od počátku

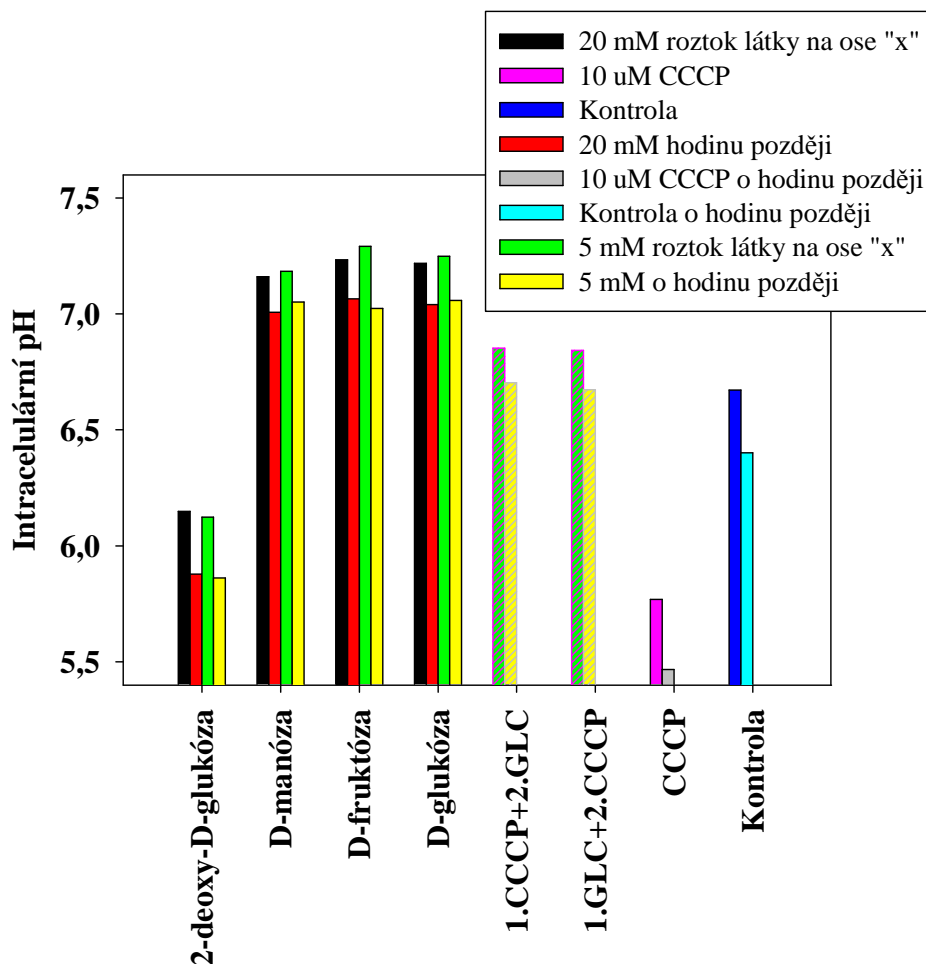
experimentu. V grafech A) i B) obr. 19 se vliv CCCP projevuje snížením intracelulárního pH. Po deseti minutách od přidání CCCP dochází u buněk různých růstových fází k potlačení vlivu jejich rozdílného stáří a hodnota intracelulárního pH dosahuje stejných hodnot a to i nehledě na délku předchozí inkubace v pufru bez CCCP. Při porovnání vlivu KCl na intracelulární pH za daných podmínek, je možno pozorovat, že zejména mladší buňky si za přítomnosti extracelulárního KCl ustanovují mírně vyšší vnitřní pH (oproti vzorkům z grafu A), které je bližší intracelulárnímu pH starších buněk na nich se přítomnost KCl neprojevuje tak výrazně. Tento jev lze pozorovat v grafu B jako menší rozdíl hladin tvořících spojnice mezi stejným tvarem spojených bodů pro šedou a černou barvu.



Obr. 20. Vliv přítomnosti KCl a protonoforu CCCP na intracelulární pH, (zleva) 1. bod každé spojnice - kontrola, 2. bod - ihned po přidání CCCP, 3. a 4. bod - časový vývoj s CCCP, růstové fáze buněk: černá-OD₅₇₈ = 11,4; šedá-OD₅₇₈ = 3,6. C-P pufr pH = 6, CCCP - 10 μM roztok, KCl - 25 mM roztok

V Obr. 20. každá spojnice čtyř tvarově i barevně identických bodů symbolizuje jednu testovanou kyvetu. Byly tedy dvě série po dvou kyvetách. V jednotlivých sériích byly stejně staré buňky, avšak jedna z kyvet vždy obsahovala 25 mM roztok KCl. První bod zleva symbolizuje kyvetu bez CCCP, druhý byl odměřen ihned po přidání CCCP a 3. a 4. bodem symbolizují časový vývoj kyvetu obsahující 10 μM roztok CCCP. Obr. 20 potvrzuje závěr vyvozený z obr. 19, že přítomnost KCl snižuje vliv CCCP na pokles intracelulárního pH buněk.

4.2.8 Vliv různých druhů cukrů na intracelulární pH



Obr. 21. Vliv různých cukrů na intracelulární pH. Látky z osy "x" slouží pro vytvoření 5 mM a 20 mM koncentrace roztoků, jež jsou opětovně proměřeny o hodinu později. V případě 1.CCCP+2.GLC se jedná o 5 mM roztok GLC a 10 μ M roztok CCCP se sousledností přimíchávání do suspenze naznačenou pořadovými číslovkami. Buňky jsou v exponenciální fázi ($OD_{578} = 10,77$), C-P pufr (5,23).

Měření intracelulárního pH buněk v suspenzích s obsahem D-manózy nebo D-fruktózy, popřípadě D-glukózy vykazují velmi podobné hodnoty pH_i . Intracelulární pH kvasinek v jejich roztocích dosahuje optimálních hodnot pH ($pH_i = 7,2$) bez rozdílu jestli je koncentrace cukru v roztoku 5 mM nebo 20 mM. Při druhém měření s hodinovým rozestupem od prvního měření hodnota pH_i v těchto třech případech poklesla shodně na $pH_i = 7$ (což koreluje se závěry kapitoly 4. 2. 6), přičemž intracelulární pH buněk je v 5 mM i v 20 mM roztocích příslušného cukru

shodné. Na základě tohoto pozorování je pro kvasinky možno použít D-manózu, D-fruktózu, popřípadě D-glukózu jako stejnohodnotný, zaměnitelný zdroj energie a uhlíku. V rámci měření (trvajících přibližně hodinu) se 5 mM koncentrace cukru jeví jako dostatečná koncentrace pro stimulaci mechanismu snažící se udržet optimální intracelulární pH.

2-deoxy-D-glukóza při porovnání s kontrolním vzorkem má za následek okyselení vnitrobuněčného pH. Tento jev nastává ještě ve větší míře v případě vytvoření 10 μ M roztoku CCCP, což vzhledem ke kapitole 3.2.2 a funkci CCCP jako protonoforu je očekávaný výsledek.

Vzorky 1.CCCP+2.GLC (popřípadě 1.GLC+2CCCP) byly připraveny následujícím postupem. Do 3 ml suspenze pufrované s buňkami byly přidány 3 μ l 10 mM roztoku CCCP, po 5 minutách bylo přidáno 5,8 μ l 40% roztoku GLC a vznikl 10 μ M roztok CCCP s 5 mM koncentrací glukózy. Po vyčkání dalších 5 minut aby kvasinky mohly zareagovat na dodanou gluózu byl vzorek odměřen (popřípadě GLC a CCCP byly přidávány v opačném pořadí). Z obr. 21. jasně vyplývá že pořadí ve kterém byly CCCP a glukóza přidány neovlivní výsledné naměřené intracelulární pH. Dále se ukazuje, že díky přítomnosti glukózy v suspenzi, kvasinky dokáží výrazně zmírnit vliv protonoforu CCCP.

5 Závěr

Synchroně skenovaná fluorescence se prokázala jako vynikající neinvazivní metoda pro sledování vnitrobuněčného pH. Díky této metodě je možné zvýšit citlivost fluorescenční sondy na široké škále studovaných pH a potlačit nežádoucí jevy zkreslující měření.

V souvislosti s reprodukovatelností měření je nutno konstatovat, že výsledky pro buňky energizované glukózou měly menší rozptyl než výsledky pro „hladovějící“ buňky (suspenze bez přidané glukózy). Toto pozorování by se dalo vysvětlit tím, že energizované buňky měly k dispozici dostatečné množství ATP a byly tak schopny lépe odolávat změnám vnějšího prostředí a udržovat své intracelulární pH v optimálních hodnotách $pH_i = 7,2$. Suspenze buněk bez přidané glukózy využívaly k udržení stabilního vnitřního prostředí zbytky cytosolického ATP, jehož množství není dobře definováno a mírně se liší pro jednotlivé vzorky, což způsobuje větší rozptyl naměřených hodnot a ztěžuje reprodukovatelnost výsledků.

V průběhu měření se prokázalo, že starší buňky mají vyšší intracelulární pH než mladší buňky za stejných podmínek, přičemž rozdíl může činit až 2,2 jednotky pH. Starší buňky se jeví i jako mírně odolnější vůči stresorům, než mladé buňky.

V práci byla potvrzena domněnka, že délka inkubace buněk v pufru má vliv na intracelulární pH buněk, které má tendence sledovat hodnoty svého okolí, pokud je zamezen přísun energetických zdrojů kvasinek.

Depolarizace plasmatické membrány vlivem přítomnosti KCl se v prováděných experimentech nepotvrdila, avšak depolarizace vlivem protonoforu CCCP nastává již při 1 μ M koncentracích. CCCP způsobuje prudký pokles intracelulárního pH, tento vliv je možné snížit přidáním glukózy do suspenze.

V závěru práce se prokázalo, že D-manóza popřípadě D-fruktóza jsou rovnocennou náhradou D-glukózy.

Ke výše zmíněným výsledkům je nutné podotknout, že prezentovaná data mají pouze popisný charakter, neboť na základě provedených měření nejsme jednoznačně schopni identifikovat transportní a regulační mechanismy, jež jsou zodpovědné za pozorované jevy.

Seznam použité literatury

1. **Kaiser, D.** Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2003, 1, 45-54
2. **Janderová, B. and Bendová, O.** *Úvod do biologie kvasinek*. 1999 (Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, Praha)
3. **Liu, H. P., Styles, C. A., and Fink, G. R.** *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FL08 a gene required for _lamentous growth. *Genetics* 144, 1996, 967-978.
4. **Dickinson, J. R.** 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology-Uk* 142, 1996, 1391-1397.
5. **Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G.** Life with 6000 genes. *Science* 1996, 274 (5287), 546, 563-546, 567
6. **Botstein, D.; Fink, G. R.** Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* 1988, 240 (4858), 1439-1443.
7. **Sychrova, H.** Yeast as model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol. Res.* 2004, 53 (Suppl 1), S91-98.
8. **Herskowitz, I.** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1988 Dec; 52(4): 536-553; PMCD: PMC373162.
9. **Kocková-Kratochvilová, A.** *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1982 (Vydavatelstvo Alfa, Bratislava).
10. **Alberghina, L., Smeraldi, C., Ranzi, B. M., and Porro, D.** (1998) Control by nutrients of growth and cell cycle progression in budding yeast, analyzed by double-tag flow cytometry. *Journal of Bacteriology* 180, 3864-3872.
11. **Hirimburegama, K., Durnez, P., Keleman, J., Oris, E., Vergauwen, R., Mergelsberg, H., and Thevelein, J. M.** Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae - cAMP is not involved as 2nd messenger. *Journal of General Microbiology*. 138, 1992,2035-2043.

12. **Francois, J., Eraso, P., and Gancedo, C.** Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European Journal of Biochemistry* 164, 1987, 369-373.
13. **Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., and Peck, V. M.** Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 19, 1996, 1159-1166.
14. **de Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munnik, T., and Vandenende, H.** The glucanase-soluble mannoproteins limit cell-wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 1990, 491-499.
15. **Casey, J.R., S. Grinstein, and J. Orlowski,** *Sensors and regulators of intracellular pH*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(1): p. 50-61.
16. **Dix, J.A. and A.S. Verkman,** *Crowding effects on diffusion in solutions and cells*. *Annu Rev Biophys*, 2008. **37**: p. 247-63.
17. **Orij, R., et al.,** *In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in Saccharomyces cerevisiae reveals a relation between intracellular pH and growth*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 1): p. 268-78.
18. **Sherman, F.,** *Getting started with yeast*. *Methods Enzymol*, 2002. **350**: p. 3-41.
19. **Perktold, A., et al.,** *Organelle association visualized by threedimensional ultrastructural imaging of the yeast cell*. *FEMS Yeast Res*, 2007. **7**(4): p. 629-38.
20. **Ghaemmaghami, S., et al.,** *Global analysis of protein expression in yeast*. *Nature*, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
21. **Pick, U., et al.,** *Polyphosphate-hydrolysis--a protective mechanism against alkaline stress?* *FEBS Lett*, 1990. **274**(1-2): p. 15-8.
22. **Orij, R., Brul, S., Smits, G. J.** Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. Oct 2011, **1810**(10), 933-944.

23. **Davis, B.D.**, *On the importance of being ionized*. Arch Biochem Biophys, 1958. **78**(2): p. 497-509.
24. **Marešová, L., Hošková, B., Urbánková, E., Chaloupka, R., Sychrová, H.** New applications of pHluorin- measuring intracellular pH of prototrophic yeast and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast*. Feb 2010, **27**, 317-32.
25. **A. Roos, W.F. Boron**, Intracellular pH, *Physiol. Rev.* 61 (1981) 296–434.
26. **B. Andre**, An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 11 (1995) 1575–1611.
27. **K. Nishimura, K. Igarashi, Y. Kakinuma**, Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1962–1964.
28. **P. Mitchell**, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* 191 (1961) 144–148.
29. **G. Grossmann, M. Opekarova, J. Malinsky, I. Weig-Meckl, W. Tanner**, Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast, *EMBO J.* 26 (2007) 1–8.
30. **D.S. Perlin, C.L. Brown, J.E. Haber**, Membrane potential defect in hygromycin resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 18118–18122.
31. **L. Maresova, E. Urbankova, D. Gaskova, H. Sychrova**, Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 1039–1046.
32. **A. Goossens, N. de La Fuente, J. Forment, R. Serrano, F. Portillo**, Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7654–7661.
33. **D. Seto-Young, D.S. Perlin**, Effect of membrane voltage on the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 1383–1389.

34. **C.L. Brett, M. Donowitz, R. Rao**, Does the proteome encode organellar pH? *FEBS Lett.* 580 (2006) 717–719.
35. **P. Chan, J. Lovric, J. Warwicker**, Subcellular pH and predicted pH-dependent features of proteins, *Proteomics* 6 (2006) 3494–3501.
36. **T. Ferreira, A.B. Mason, C.W. Slayman**, The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29613–29616.
37. **R. Serrano, M.C. Kielland-Brandt, G.R. Fink**, Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺⁺K⁺), K⁺- and Ca²⁺- ATPases, *Nature* 319 (1986) 689–693.
38. **P. Catty, A. de Kerchove d'Exaerde, A. Goffeau**, The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases, *FEBS Lett.* 409 (1997) 325–332.
39. **P. Morsomme, C.W. Slayman, A. Goffeau**, Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 133–157.
40. **D.S. Perlin, M.J. San Francisco, C.W. Slayman, B.P. Rosen**, H⁺/ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 248 (1986) 53–61.
41. **A. Ambesi, M. Miranda, V.V. Petrov, C.W. Slayman**, Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁽⁺⁾-ATPase, *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 155–160.
42. **F. Portillo, R. Serrano**, Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis, *Eur. J. Biochem.* 186 (1989) 501–507.
43. **J.H. McCusker, D.S. Perlin, J.E. Haber**, Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 4082–4088.
44. **E. Capieaux, M.L. Vignais, A. Sentenac, A. Goffeau**, The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7437–446.

45. **R. Rao, D. Drummond-Barbosa, C.W. Slayman**, Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase, *Yeast* 9 (1993) 1075–1084.
46. **A. Chang, C.W. Slayman**, Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport, *J. Cell Biol.* 115 (1991) 289–295.
47. **F. Portillo, P. Eraso, R. Serrano**, Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression, *FEBS Lett.* 287 (1991) 71–74.
48. **P. Eraso, C. Gancedo**, Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth, *FEBS Lett.* 224 (1987) 187–192.
49. **P. Supply, A. Wach, D. Thines-Sempoux, A. Goffeau**, Proliferation of intracellular structures upon overexpression of the PMA2 ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 19744–19752.
50. **P.M. Kane**, The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 177–191.
51. **G.A. Martinez-Munoz, P. Kane**, Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 20309–20319.
52. **L. Yenush, J.M. Mulet, J. Arino, R. Serrano**, The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression, *EMBO J.* 21 (2002) 920–929.
53. **H. Sychrova, J. Ramirez, A. Pena**, Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 171 (1999) 167–172.
54. **L. Maresova, H. Sychrova**, Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 588–600.
55. **J. Ramirez, O. Ramirez, C. Saldana, R. Coria, A. Pena, A** *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5860–5865.

56. **C.L. Brett, D.N. Tukaye, S. Mukherjee, R. Rao**, The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1396–1405.
57. **O. Cagnac, M. Leterrier, M. Yeager, E. Blumwald**, Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 24284–24293.
58. **T.C. Pozos, I. Sekler, M.S. Cyert**, The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 3730–3741.
59. **J. Horak**, Yeast nutrient transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1331 (1997) 41–79.
60. **N.A. Braun, B. Morgan, T.P. Dick, B. Schwappach**, The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 2342–2350.
61. **A. Vodáková**, Měření změn vnitrobuněčné koncentrace iontů v mikroorganismech, Praha, 2013. Diplomová práce na Fyzikální Ústav UK, Univerzita Karlova v Praze, Vedoucí práce prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.
62. **Proser, Václav a col.** *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3
63. **Bagatoli**, To see or not see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. Oct. 2006, **1758**(10), 1541-1556.
64. **Domaille, D. W., Que, E. L., Chang., C. J.** Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metal. *Nature Chemical Biology*. Mar 2008, **4**(3), 168- 75.
65. **Hemmilä, I., Laitala, V.** Progress in lanthanides as luminiscent probes. *Journal of Fluorescence*. Jul 2005, **15**(4), 529-542.
66. **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*. Mar 2005, **71**(3), 1515-1521.
67. **Tessa, N., Campbell and Francis Y. M. Choy.** The effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review. *Molecular Biology Today*. 2001, **2**(1), 1-4.
68. **Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., Verkman, A. S.** Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal*. Mar 1998, **74**, 1591-1599.
69. **Shimomura, O.** Structure of the chromophore of Aequore green fluorescent protein. *FEBS Letters*. Aug 1979, **104**(2), 220-222.
70. **Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., Tsien, R. Y.** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. Nov 1995, **20**, 448-455.
71. **Yang, F., Moss, L. G., Phillip, G. N. Jr.** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. Oct 1996, **14**(10), 1096-1246.
72. **Brejc, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M., Remington, S. J.** Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Biophysics*. Mar 1997, **94**, 2306-2311.
73. **Bizzarri, R., Serresi, M., Luin, S., Beltram, F.,** Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Feb 2009, **393**(4), 1107-1122.
74. **Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J.** Crystalline structure of the *Aequoria* green fluorescent protein. *Science*. Sep 1996, **273**(5280), 1392-1395.
75. Goodsell, David. RCSB Protein Data Bank.
<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=42>. Doi:
 10.2210/rcsb_pdb/mom_2003_6.
76. **Voityuk, A. A., Michel-Beyerle M.-E., Rösch, N.** Protonation effects on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of the absorption spectrum. *Chemical Physics Letters*. Jun 1997, **272**(3-4) 162-167.

77. **Creemers, T. M. H., Lock, A. J., Subramaniam, V., Jovin, T. M., Völker S.** Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning. *Nature structural biology*. Jun 1999, **6**(6), 557-560.
78. **Fang, Ch., Frontiera, R. R., Tran, R., Mathies, R. A.** Mapping GFP structure evolution during proton transfer with femtosecond Raman spectroscopy. *Nature*. Nov 2009, **462**(7270), 200-204.
79. **Scharnagl, C., Raupp-Kossmann, R., Fischer, S. F.** Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. *Biophysical Journal*. Oct 1999, **77**(4), 1839-1857.
80. **Brejck, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M., Memington, S. J.** Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequoria victoria green fluorescent protein. *Biophysics*. Mar 1997, **94**, 2306-2311.
81. **Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., Piston, D. W.** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*. Nov 1997, **73**(5), 2782-2790.
82. **Miesenbock, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E.** Visualising secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. Jul 1998, **394**(6689), 192-195
83. **Marešová, L., Hošková, B., Urbánková, E., Chaloupka, R., Sychrová, H.** New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast*. Feb 2010, **27**, 317-325.
84. **Vijayvergiya, C., De Angelis, D., Walther, M., Kuhn, H., Duvoisin, R. M., Smith, D. H., Wiedmann, M.** High-level expression of rabbit 15-lipoxygenase induces collapse of the mitochondrial pH gradient in cell culture. *Biochemistry*. Dec 2004, **43**(48), 15296- 5302.
85. **Jankowski, A., Kim, J. H., Collins, R. F., Daneman, R., Walton, P., Grinstein, S.** In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin. *Journal of Biological Chemistry*. Dec 2001, **276**(52), 48748-48753.

86. **Chaineau, M., Danglot, L., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T.** Role of HRB in Clathrin-dependent Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. Dec 2008, **283**(49), 34365-34373.
87. **Machen, T. E., Leigh, M. J., Taylor, C., Kimura, T., Asano, S., Moore, H. P. H.** pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Jul 2003, **285**(1), C205-C214.
88. **Billinton, N., Knight, A. W.** Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*. 2001, **291**, 175-197.
89. **Schneckenburger, H., Gessler, P., Pavenstädt-Grupp, I.** Measurements of mitochondrial deficiencies in living cells by microspectrofluorometry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Oct 1992, **40**(10), 1573-1578.
90. **Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S., Rao, R.** The yeast endosomal Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. Mar 2005, **16**, 1396-1405.
91. **Patra, D., Mishra, A. K.** Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. Dec 2002, **21**(12), 787-798.
92. **Andrade-Eiroa, Á., de-Armas, G., Estela, J.-M., Cerdà, V.** Critical approach to synchronous spectrofluorimetry I. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(8), 885-901.
93. **Lloyd, J. B. F.** Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature-physical Science*. 1971, **231**(20), 64-&.
94. **Vo-Dinh, T.** Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*. Mar 1978, **50**(3), 396-401.
95. **Plášek, J., Gášková, D., Večeř, J., Siegler, K.** Use of synchronously excited fluorescence to assess the accumulation of membrane potential probes in yeast cells. *Folia Microbiologica*. 2000, **45**(3), 225-229.
96. **A. Decottignies, A.M. Grant, J.W. Nichols, H. de Wet, D.B. McInstosh, A. Goffeau,** ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12612–12622.

97. **Gášková, D., Čadek, R., Chaloupka, R., Vacata, V., Gebel, J., and Sigler, K.** Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C₃(3) fluorescence. *International Journal of Bio-chemistry & Cell Biology* 34, (2002), 931-937.
98. **Sigler, K. and Hofer, M.** (1991) Activation of the plasma-membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by addition of hydrogen-peroxide. *Bio-chemistry International* 23, 861-873.
99. **Kasianowicz, J., Benz, R., and McLaughlin, S.** (1984) The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide meta-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *Journal of Membrane Biology* 82, 179-190.
100. **Pereira, M. B. P., Tisi, R., Fietto, L. G., Cardoso, A. S., Franca, M. M., Carvalho, F. M., Tropia, M. J. M., Martegani, E., Castro, I. M., and Brandao, R. L.** (2008) Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Research* 8, 622-630.
101. **Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J. P., and Coote, P. J.** (1996) Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic ux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3158-3164.
102. **Hendrych, T., Kodedová, M., Sigler, K., and Gášková, D.** (2009) Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1788, 717-723.
103. **Miesenböck G., Dino A. De Angelis & James E. Rothman.** Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*.9 July 1998, 394, 192-195.
104. **Orij, R., Postmus, J., Beek, A. T., Brul, S., Smits, G. J.** In vivo measurements of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology-SGM*. 2009, **155**, 268-278.

105. **Plášek, J., Gášková, D., Lichtenberg-Fraté, H.** Monitoring of real changes of plasma membrane potential by diS-C3(3) fluorescence in yeast cell suspensions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Oct 2012, **44**(5), 559-569.
106. **Babuka, D.** Odezva membránového potenciálu a intracelulárního pH kvasinek na změny extracelulární koncentrace K^+ . Praha, 2014.
Bakalářská práce na Fyzikální Ústav UK, Univerzita Karlova v Praze,
Vedoucí práce prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.
107. **Hošková, B.** *Vnitřní pH kvasinek a vliv transportu draselných iontů na jeho regulaci* Praha, 2009. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.
108. **Sychrová, H., Ramírez, J., Peña, A.** Involment of Hna 1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. Feb 1999, **171**(2), 197-172.

Seznam tabulek

Tab. 1. pKa základních molekul podílejících se na pufrací kapacitě.	11
Tab. 2. Složení použitého růstového minimálního média YPD	26
Tab. 3. Složení kalibračních pufrů použitých pro kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	28
Tab. 4. Použité chemikálie během experimentů.....	29
Tab. 5. Chyby určení OD ₅₇₈ v růstových křivkách obr. 9.	34
Tab. 6. Růstová fáze kmene AD1-3 v závislosti na naměřeném OD ₅₇₈	34
Tab. 7. Konstanty fitu z kalibrační křivky obr. 10.	36

Seznam použitých zkratek

a_{H^+}	aktivita H^+ ve vodě
A	kyselina popřípadě zásada
ATP	adenosin-5'-trifosfát (univerzální zdroj energie v organizmech)
ATPáza	protein lokalizovaný v buněčné membráně (transfer H^+ , hydrolýza ATP)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
β	pufrační kapacita
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorphenyl hydrazone - protonofor
$\Delta\Psi$	membránový potenciál
$\Delta\lambda$	offset, vzdálenost excitační a emisní vlnové délky při synchronně skenované fluorescenci
E_{ex} , E_{em}	excitační, emisní spektra
FMN	flavin mononukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
GLC	glukóza
K_a	rovnovážná konstanta
λ_{ex} , λ_{em}	excitační, resp. emisní vlnová délka
mM	koncentrace látky v mMol/l
NADH	nikotinamidadeninidinukleotid
OD	optická hustota
P_c	permeabilní koeficient
PDR	pleotropně lékově rezistentní pumpy (pro kvasinky obdoba pump zodpovídající u člověka za vícečetnou lékovou rezistenci)
YE	kvasinkový extrakt
YPD	směs kvasinek, peptonu, glukózy (růstové médium)
W22	voda, která tvoří vazby vodíkovými můstky s pěti rezidui peptidického řetězce v jejím okolí (v síti vodíkových můstků pro přenos protonu v GFP)