

# Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ .....	3
SEZNAM ZKRATEK .....	4
ÚVOD .....	5
<b>TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
1. Buněčný stres .....	7
1.1. Chemický stres – mechanizmy obrany .....	7
1.1.1. Aktivní transport toxických látek — mnohočetná léková rezistence .....	9
1.1.1.1. MDR pumpy využívající elektrochemický gradient .....	10
1.1.1.2. MDR pumpy rodiny ABC .....	12
2. Kvasinky - modelový organizmus eukaryontní buňky .....	18
2.1. Obal kvasinkové buňky – buněčná stěna a plazmatická membrána .....	18
2.2. MDR u kvasinek .....	21
2.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ABC transportéry .....	22
2.2.1.1. Rozdělení a molekulární architektura kvasinkových ABC proteinů: .....	25
2.2.1.2. Regulační mechanizmy PDR .....	25
2.2.1.3. ABC transportéry plazmatické membrány ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	31
2.2.1.4. Vakuolární ABC transportéry ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	36
2.2.1.5. Ostatní ABC proteiny ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	36
2.2.2. MDR u jiných kvasinek .....	37
3. Studium MDR transportérů .....	39
<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>41</b>
4. Materiál a metody .....	41
4.1. Chemikálie a zásobní roztoky .....	41
4.2. Roztoky a kultivační média .....	43
4.3. Použité kvasinkové kmeny .....	44
4.4. Udržování zásobních kultur a příprava buněk pro experiment .....	44
4.5. Výsevový test .....	45
4.6. Zónový test .....	45
4.7. Měření barvení buněk fluorescenční sondou diS-C3(3) – metoda barvicích křivek .....	46
4.8. Zpracování dat z fluorescenčních měření .....	48

<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	49
5. Výsledky a diskuze .....	49
5.1. Specifikace úkolů dizertační práce .....	49
5.2. Vliv chemického stresu na buňky kvasinek <i>S. cerevisiae</i> .....	50
5.2.1. Modelové barvicí křivky intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk .....	51
5.2.2. Reakce buněk na krátkodobé působení chemického stresu .....	55
5.2.3. Přežívání buněk vystavených působení biocidů, porovnání s výsledky fluorescenčních měření .....	59
5.3. Studium účinku chemických stresorů na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p kvasinky <i>S. cerevisiae</i> .....	60
5.3.1. Látky interagující s pumpou Pdr5p .....	62
5.3.2. Látky neinteragující s pumpou Pdr5p nebo Snq2p .....	69
5.3.3. Interakce protonoforu CCCP s buňkami .....	71
5.3.3.1. Vliv protonoforu CCCP na aktivitu H <sup>+</sup> -ATPázy .....	71
5.3.3.2. CCCP je substrátem pump Pdr5p a Snq2p .....	74
5.3.4. Lyzozomotropní látka MRG-12 inhibuje H <sup>+</sup> -ATPázu a je substrátem obou pump .....	78
5.3.5. Vliv 4-nitrochinolin 1-oxidu na transport sondy pumpou Snq2p .....	80
ZÁVĚR .....	82
LITERATURA .....	85
PŘÍLOHY .....	96

# SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

- Obr. 1.1:** Obranné mechanismy buňky proti působení chemického stresu
- Obr. 1.2:** Rozdělení MDR transportérů podle způsobu transportu
- Obr. 1.3:** Topologie a organizace domén ABC transportérů
- Obr. 2.1:** Molekulární organizace buněčné stěny kvasinky *S. cerevisiae*
- Obr. 2.2:** Schéma regulační sítě PDR a YAP
- Obr. 2.3:** Tří dimenzionální struktura dimeru Pdr5p v rozlišení 25 Å
- Obr. 3.1:** Strukturní vzorec fluorescenční sondy diS C3(3)
- Obr. 4.1:** Strukturní vzorce vybraných látek
- Obr. 5.1:** Charakter barvicích křivek intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk *S. cer.* DTXII
- Obr. 5.2:** Barvicí křivky modelových směsí intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk *S. cerevisiae* DTXII
- Obr. 5.3:** Simulace nárůstu permeabilizovaných a depolarizovaných buněk v suspenzi během měření
- Obr. 5.4:** Účinek Lonzabacu 12.100
- Obr. 5.5:** Účinek benzalkonium chloridu
- Obr. 5.6:** Účinek Genaminu CS302D
- Obr. 5.7:** Účinek 2-fenoxyethanolu
- Obr. 5.8:** Detekce aktivity pump a její změny
- Obr. 5.9:** FK506 inhibuje činnost pumpy Pdr5p
- Obr. 5.10:** Vliv buněčné stěny na zpoždění účinku FK506
- Obr. 5.11:** Vliv nízkých koncentrací FK506
- Obr. 5.12.:** Vliv koncentrace diS-C<sub>3</sub>(3) na účinek FK506
- Obr. 5.13:** Porovnání vlivu enniatinu B a rapamycinu na MDR pumpy s účinkem FK506
- Obr.5.14:** DM-11 není ani substrátem ani inhibitorem žádné z pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p.
- Obr. 5.15:** Inhibitor H<sup>+</sup>-ATPázy DM-11 snižuje potenciál buněk, avšak nemá vliv na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p.
- Obr. 5.16:** Protonofor CCCP aktivuje činnost H<sup>+</sup>-ATPázy
- Obr. 5.17:** Vliv růstové fáze na reakci intaktních buněk na přidání CCCP
- Obr. 5.18:** Rozlišení permeabilizovaných a intaktních buněk pomocí DM-11 a CCCP
- Obr. 5.19:** CCCP blokuje transport sondy diS C3(3) jak pumpou Pdr5p, tak Snq2p nezávisle na aktivitě H<sup>+</sup>-ATPázy

**Obr. 5.20:** CCCP je substrátem jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p

**Obr. 5.21:** MRG-12 inhibuje činnost H<sup>+</sup>-ATPázy

**Obr. 5.22:** MRG-12 inhibuje transport sondy diS C3(3) pumpami Pdr5p a Snq2p

**Obr. 5.23:** MRG-12 je substrátem pump Pdr5p a Snq2p

**Tab. 2.1:** Geny identifikované v *S. cerevisiae* kódující ABC proteiny

**Tab. 2.2:** Transkripční faktory Zn2Cys6 obsažené v regulační síti PDR

**Tab. 2.3:** Transkripční faktory bZip obsažené v regulační síti PDR

**Tab. 4.1:** Zásobní roztoky chemikálií

**Tab. 4.2:** Přehled použitých kvasinkových kmenů *S. cerevisiae*

**Tab. 5.1:** Doporučené koncentrace jednotlivých biocidů

**Tab. 5.2:** Inhibice růstu buněk *S. cerevisiae* DTXII vystavených biocidům po dobu 15 minut.

## SEZNAM ZKRATEK

ABC - ATP binding cassette

AK - aminokyselina

ARD - acid-rich activation domain

bZIP - basic-leucine zipper

CRD - cystein rich domain

DK - doporučená koncentrace

MDR - multi-drug resistance

MFS - major facilitator superfamily

MIC - minimum inhibitory concentration

MRP - multidrug resistance-associated protein

NBD - nucleotide binding domain

PDR - pleiotropic drug resistance

PDREs - pleiotropic drug resistance elements

P-gp - P-glykoprotein

PMF - protonmotive force

TMD - trans-membrane domains

TMS - trans-membrane segments

WT – wild type

# ÚVOD

Význam membránových transportních proteinů pro život buňky spočívá v jejich schopnosti zprostředkovávat transport potřebných látek do buňky (např. živiny), upravovat koncentrace iontů při udržování iontové homeostáze a rovněž odvádět škodlivé metabolity a toxické látky z buněk.

Činností membránových proteinů, které umožňují transport malých anorganických iontů, vzniká mezi vnitřní a vnější stranou membrány rozdíl elektrických potenciálů, tzv. **membránový potenciál**. Existence membránového potenciálu, která je těsně spjatá s neporušenou plazmatickou membránou je esenciální pro život buňky, a proto je velmi často používána jako citlivý parametr při studiu škodlivého účinku látek na buňky. U kvasinek, které jsou často používány jako model eukaryotických buněk, je membránový potenciál tvořen zejména gradientem protonů udržovaným činností tzv.  $H^+$ -ATPázy. Zablokování činnosti tohoto hlavního enzymu (např. účinkem léku/inhibitoru) může vést v konečném důsledku ke ztrátě schopnosti buněk se dále rozmnožovat.

Transportní membránové proteiny patřící do skupiny tzv. MDR (multidrug resistance) transportérů jsou zodpovědné za **mnohočetnou lékovou rezistenci buněk**. Tyto proteiny aktivně odstraňují cizorodé látky z buněk, a tím umožňují rezistenci buněk vůči širokému spektru různých strukturně a funkčně odlišných látek (léků, dezinfektantů atd.). Tyto pumpy jsou přítomny v prokaryontech, kvasinkových buňkách i v živočišných buňkách včetně lidských.

Plazmatická membrána je častým primárním místem účinku mnoha chemických stresorů. Účinek látek atakujících plazmatickou membránu se může v závislosti na způsobu interakce látky s membránou a na její koncentraci výrazně lišit: od pouhého ovlivnění membránového potenciálu až k permeabilizaci buněk. Současně může dojít i k ovlivnění (inhibici) činnosti MDR pump.

Hlavním cílem dizertační práce bylo studium vlivu různých chemických látek (léčiv, biocidů atd.) na činnost výše uvedených membránových transportních systémů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pomocí analýzy časového vývoje fluorescenční odpovědi sondy diS-C<sub>3</sub>(3). Fluorescenční metoda je vhodným nástrojem pro současné sledování vlivu látek na změny membránového potenciálu a aktivity pump. Další vývoj této metody by mohl významnou měrou napomoci při vyhledávání nových, účinných

antimikrobiálních látek i vhodných inhibitorů MDR pump, které by mohly být použity v klinické praxi.

Samotná dizertační práce je členěná do čtyř částí. Teoretický úvod je věnován mechanismu rezistence buněk vůči chemickému stresu s hlavním důrazem na činnost membránových transportních systémů pro odstraňování cizorodých látek z buněk, především u kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisie*. Metody a postupy použité v práci popisuje navazující kapitola. Ve třetí a nejrozsáhlejší kapitole jsou uvedeny a diskutovány nejdůležitější výsledky získané v dizertační práci. Význam a přehled dosažených výsledků je shrnut ve čtvrté části.

Práce vznikla v Oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu UK, kde byly provedeny veškeré experimentální práce včetně biologických testů.

# TEORETICKÝ ÚVOD

## 1. Buněčný stres

Všechny živé organizmy na Zemi jsou tvořeny buňkami, které jsou od svého okolí odděleny plazmatickou membránou, popřípadě dalšími obalovými strukturami. Vnitřek buňky představuje složitý, vysoce organizovaný systém, ve kterém probíhá obrovské množství různorodých, přísně řízených procesů. Živá buňka, jakkoliv je oddělena od okolí semipermeabilní membránou, představuje otevřený termodynamický systém, který je v neustálé interakci s okolím. Buňka z něj čerpá živiny, které pak v metabolických drahách upravuje pro své potřeby. Jsou-li podmínky, v nichž se buňka nachází, nepříznivé, vyvolávají buněčný stres, a v extrémnějších případech i smrt buňky. Faktorů, které působí různé druhy stresu, je celá řada (tepelný šok, osmotický stres, oxidativní stres, hladovění atd.) a buňky si během evoluce vyvinuly mechanismy, jak se těmto vlivům bránit. V závislosti na druhu stresu se mění patřičným způsobem metabolismus a další procesy v buňce. Odpověď buňky na konkrétní podnět v mnoha případech obnáší rozsáhlé změny v transkripci genů a jednotlivé mechanismy obrany se často uplatňují v různých vzájemných kombinacích.

### 1.1. Chemický stres – mechanismy obrany

Působení různých cizorodých látek — xenobiotik (např. antibiotika) může vyvolávat u buněk tzv. chemický stres. Tyto látky často bývají lipofilní a snadno procházejí cytoplazmatickou membránou přičemž uvnitř buněk pak mohou interagovat s molekulami, které jsou esenciální pro viabilitu buněk. Tomu se přirozeně organizmy, mají-li přežít, musí účinně bránit. Rezistence buněk k účinkům xenobiotik zahrnuje tyto molekulární principy (obr. 1.1):

- **Modifikace a degradace léčiv:** antibiotika mohou být enzymaticky inaktivována a degradována, dříve než dospějí ke svému cílovému místu

*Příklad: Rezistence bakterií vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (peniciliny, cefalosporiny) vlivem účinku  $\beta$ -laktamáz, které jsou schopny hydrolyzovat tato antibiotika. Tyto enzymy se navážou na antibiotika vazebnými místy obsahujícími aminokyselinu serin a otevřou  $\beta$ -laktamový kruh, který se pak již neváže na své zásahové místo. Některé bakterie tento enzym uvolňují do okolí, takže k inaktivaci dochází ještě mimo buňku.*

- **Modifikace cílového místa:** různé bodové mutace cílového genu nebo enzymatická modifikace vazebného místa pro antibiotikum vede k tomu, že se antibiotikum na pozměněné místo váže s malou afinitou nebo vůbec.

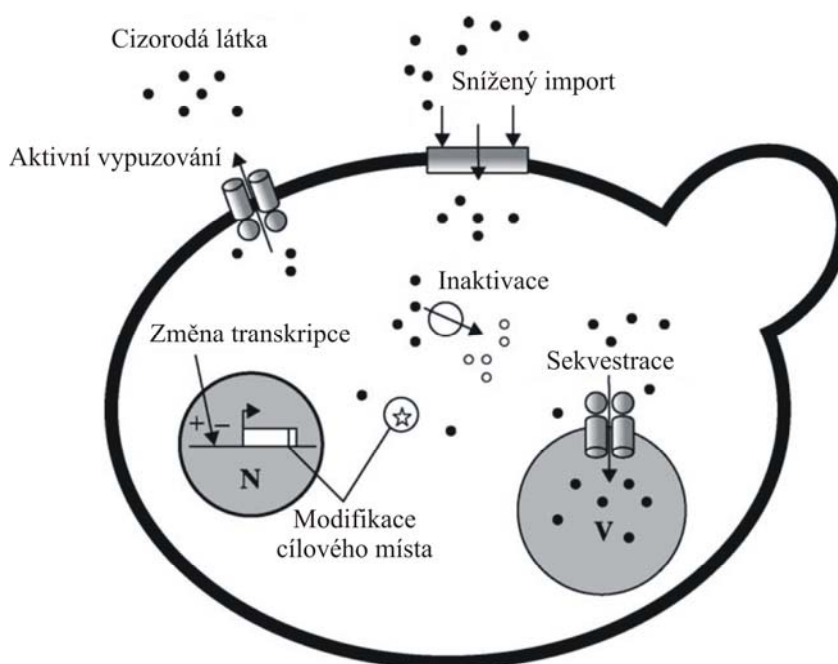
*Příklad:* Hojně používané azolové fungicidy (fluconazol, ketoconazol a itraconazol) specificky inhibují enzym cytochrom P450 14 $\alpha$ -demethylazu, patřící do dráhy ergosterolové biosyntézy. Jeho inhibice vede k hromadění meziprojektu (14-methylovaných sterolů) způsobující porušení membrány. Při bodové mutaci Y132H (substituce tyrosinu histidinem) zůstává aktivita enzymu nezměněna, ale nedochází již k vazbě azolu [1].

- **Zvýšení počtu cílových enzymů:** protein, jehož funkce je léčivem ovlivňována, se vyskytuje v buňce ve zvýšeném množství buď díky své zvýšené expresi, nebo díky genové amplifikaci, v důsledku čehož i po účinku léčiva zůstane v buňce dostačující množství funkčního proteinu.

*Příklad:* Po působení fluconazolu byla pozorována u kvasinky *Candida glabrata* zvýšená exprese genu kódujícího výše zmíněný enzym cytochrom P450 14 $\alpha$ -demethylazu [1, 2].

- **Zesílení opravných procesů DNA:**

*Příklad:* Užívaným chemoterapeutikem při léčbě některých nádorových onemocnění je cisplatina, která poškozuje DNA. V tkáních rezistentních vůči této látce byla, ve srovnání s tkáněmi citlivými, pozorována zvýšená exprese genu ERCC1, jehož produkt se účastní opravy DNA.



**Obr.1.1: Obranné mechanismy buňky proti působení chemického stresu**



- **Snížení importu léčiv:** toho lze dosáhnout snížením permeability cytoplazmatické membrány, popř. buněčné stěny, pro toxické látky. Na permeabilitu membrány má vliv zejména zastoupení membránových lipidů a proteinových kanálů – porinů.
- **Aktivní transport léčiv:** speciální membránové transportéry aktivně čerpají toxické látky ven z buněk nebo je sekvestrují do buněčných kompartmentů (například vakuol).

Zatímco konkrétní způsoby prvních čtyř mechanismů bývají často specifické pro rezistenci ke konkrétní látce (či skupině podobných látek) a jejich konkrétní molekulární podstata se liší organismus od organismu, poslední zmíněný mechanismus – aktivní transport látek z buněk – se ukazuje naopak jako společný pro řadu organismů a pomáhá jim v obraně proti širokému spektru různorodých látek.

### 1.1.1. Aktivní transport toxických látek — mnohočetná léková rezistence

Aktivní snižování intracelulární koncentrace toxických látek je pravděpodobně nejobecnější a nejrozšířenější způsob, jaký buňky používají v boji proti jejich účinku. Jejich vypuzování z cytozolu ven z buněk popřípadě do vakuol či jiných buněčných organel mají na svědomí speciální proteinové pumpy umístěné v membránách. Velká část z nich je lokalizována v cytoplazmatické membráně, kterou musejí všechny cytotoxické látky při svém vstupu do buněk projít. Ukazuje se, že mnohé z nich transportují (alespoň některé) své substráty přímo z vnitřní strany lipidní dvouvrstvy a nedovolují tak nežádoucím látkám v plné výši dále pronikat do buňky [3, 1].

Obecným rysem těchto pump je jejich široká substrátová specifita, díky níž tyto proteiny zprostředkovávají buňce jedním molekulárním mechanismem rezistenci vůči celému spektru strukturně i funkčně odlišných látek. Nadprodukce těchto proteinů vede k tzv. mnohačetné lékové rezistenci (**M**ulti-**D**rug **R**esistance, MDR). Pro ni je typické, že buňky, které získaly rezistenci vůči jednomu typu léčiva, jehož působení byly vystaveny, vykazují odolnost také vůči dalším látkám, kterým vystaveny nebyly a které mohou být funkčně a strukturně zcela nepodobny látce původně použité.

Klasický fenotyp MDR byl poprvé popsán u rakovinných buněk a jeho objasnění trvalo několik let. V roce 1968 byla izolována MDR linie buněk čínského křečka. O tři roky později byla pozorována snížená akumulace daunomycinu

(antracyklinové chemoterapeutikum) u MDR buněk [4]. Keld Danø poukazuje na možnost, že snížená permeabilita membrány pro daunomycin může být způsobena jeho aktivním vypuzováním [5], které je závislé na energii [6]. V roce 1976 zaznamenali Juliano a Ling korelaci mezi snižující se permeabilitou membrány a zvyšující se expresí 170 kDa těžkého glykoproteinu, který podle toho nazvali **P-glykoprotein** (P-gp). Izolace lidského genu MDR1, který kóduje P-glykoprotein se podařila až v roce 1986 a v roce 1990 byla prokázána jeho, již nějaký čas předpokládaná ATPázová aktivita [7].

Obdobný obranný mechanismus vyvinula celá řada organismů, včetně patogenních hub, parazitů a klinicky významných bakterií, jak gram-negativních, tak gram-pozitivních.

Podle zdroje energie používané pro transport substrátu se MDR pumpy dělí do dvou hlavních skupin (obr. 1.2):

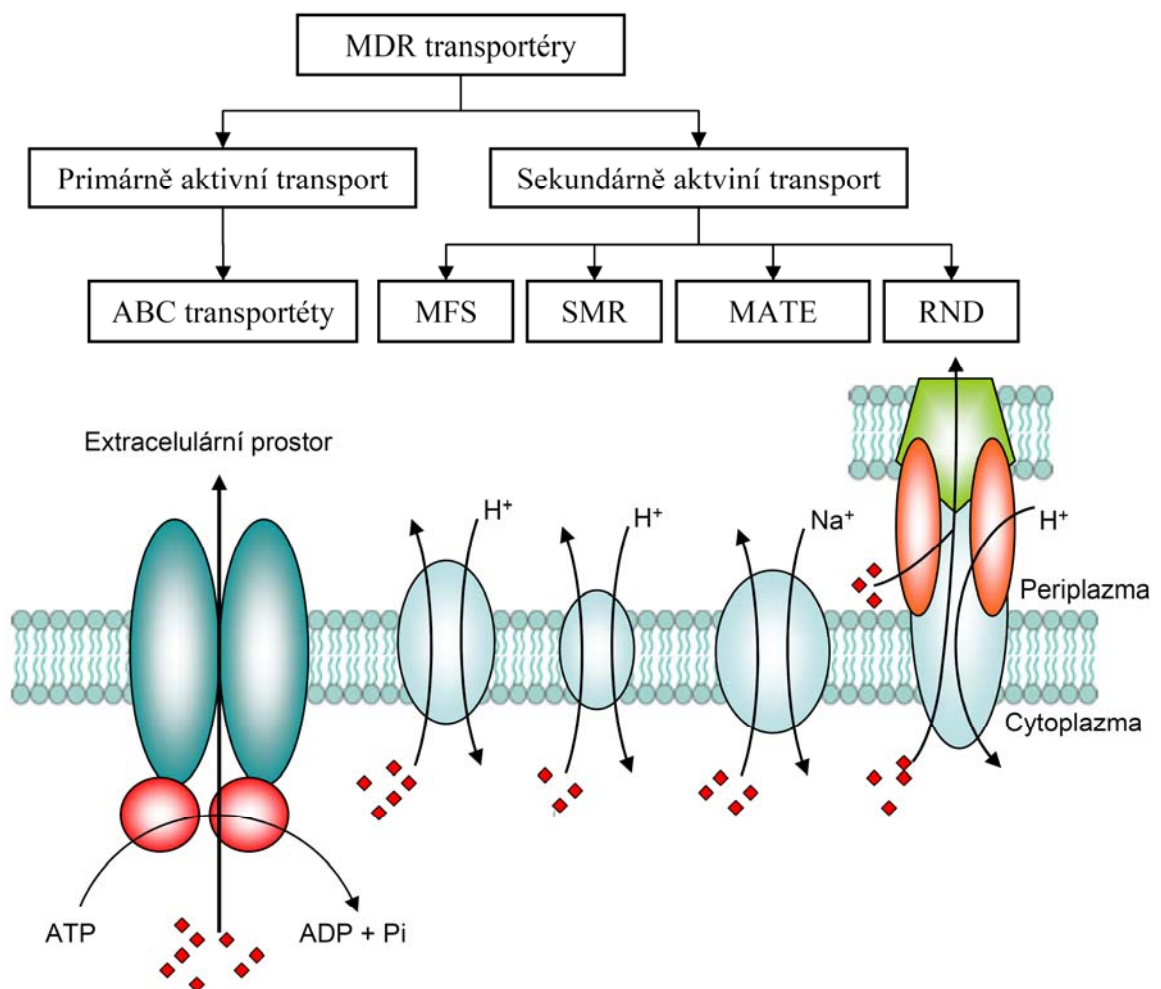
- sekundárně aktivní transportéry, které využívají transmembránového elektrochemického gradientu protonů (PMF - **protonmotive force**) nebo sodných iontů a fungují tedy jako antiporter „transportovaná látka versus  $H^+$  respektive  $Na^{++}$ “
- primárně aktivní transportéry využívající k energizaci transportu hydrolyzu ATP, patřící do velké rodiny ABC (**A**TP **B**inding **C**assete) transportních proteinů.

#### **1.1.1.1. MDR pumpy využívající elektrochemický gradient**

Na základě fylogenetické a funkční analýzy byly tyto transportéry rozděleny do několika skupin. Nejvýznamnější z nich, rodina **MFS** (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily) tvoří velkou, strukturně i funkčně homologickou skupinu transporterů, vyskytujících se jak u prokaryot, tak i eukaryot. Proteiny této rodiny se účastní MDR a zprostředkovávají transport mnoha dalších látek – jednoduchých cukrů, oligosacharidů, inozitolů, aminokyselin (AK), nukleotidů, organofosfátových esterů, metabolitů Krebsova cyklu a dalších. Transportéry se liší velikostí, ale častá je přítomnost 12 nebo 14 transmembránových segmentů (**T**rans-**M**embrane **S**egments – **TMS**) (obr. 1.2). Aminokyselinová sekvence je nejvíce konzervována v oblasti na N<sup>o</sup>

konci, která se zřejmě účastní protonové translokace, zatímco substrátová specifita je dána oblastí u C' konce [8, 9].

Další skupinou jsou velmi malé **SMR** (**S**mall **M**ultidrug **R**esistance)  $H^+$ -antiportery, které s velikostí okolo 110 AK představují nejmenší známé sekundární transportéry. Mají pouze 4 TMS a nevykazují žádnou homologii s MFS transportéry. Skupina **RND** (**R**esistance-**N**odulation **D**ivision) zahrnuje proteiny, mající 12 TMS a substrátovou specifitu širší než MFS nebo SMR pumpy. Poslední skupinou podílející se na MDR je skupina **MATE** (**M**embrane **A**ntiporter **T**oxin **E**xtrusion). Proteiny této rodiny využívají k energizaci transportu gradient sodných iontu. Existují ještě další odlišné skupiny PMF pump. Ty se podílejí například na transportu iontů (**M**etal **I**on **T**ransporters), AK či peptidů, ale žádný z nich nevykazuje aktivitu vedoucí k MDR [9-11].



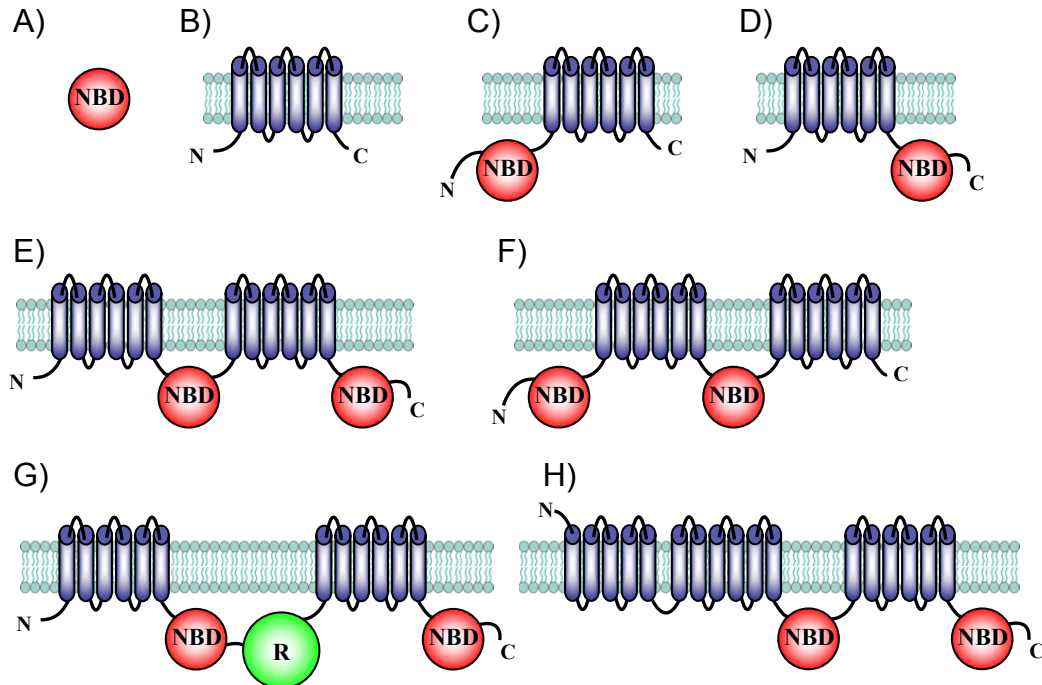
**Obr 1.2: Rozdělení MDR transportérů podle způsobu transportu**

### 1.1.1.2. MDR pumpy rodiny ABC

Transportní ABC proteiny patří do jedné z největších proteinových rodin, do rodiny ABC proteinů. Vyskytují se ve všech organizmech, od bakterie až po člověka, a všechny z nich sdílejí podobnou molekulární stavbu a organizaci domén. Jejich základní funkcí, kterou v buňkách plní, je primární transport přes membránu celé škály různorodých látek – ABC transportéry zprostředkovávají přenos iontů, těžkých kovů, karbohydrátů, cytostatik, chemoterapeutik, mykotoxinů a antibiotik, fosfolipidů, steroidů, glukokortikoidů, žlučových kyselin, pigmentů, peptidů, a dokonce i celých proteinů. Jejich substrátová specifita se pohybuje od velmi úzké až po velmi širokou, nescifickou [3]. Zprostředkovávají transport jak přes plazmatickou membránu, tak přes membrány buněčných kompartmentů. ABC transportéry bakterií se podílejí také na importu některých látek, které nemohou být přijaty difuzí, popřípadě fagocytózou. Rozdílnosti v umístění a ve specifitě se pak odrážejí ve fyziologické funkci, kterých ABC transportéry plní několik. Uplatňují se při transportu živin, sekreci proteinů, steroidů či udržování sterolové homeostáze [12, 13]. Silně konzervovanou funkcí je zajišťování buněčné detoxikace transportem xenobiotik ven z buněk nebo jejich sekvence ve vakuolách. Zdá se, že alespoň pro některé z nich je tato funkce tou hlavní, čemuž napovídá v některých případech i jejich umístění a způsob regulace. Například lidský MDR1 (P-gp) je silně exprimován v apikálních membránách střevního epitelu či v játrech a ledvinových kanálcích.

Avšak ani u transportérů prokazatelně zahrnutých v MDR není situace jednoznačná – jednou z jejich dalších fyziologických funkcí je účast na fosfolipidové homeostázi. Cytoplazmatická membrána všech živých buněk se vyznačuje asymetrickou distribucí fosfolipidů, která je specifická a jejíž porušení má dalekosáhlé fyziologické důsledky [14]. Asymetrickou distribuci udržují s membránou svázané translokátory, které je možné rozdělit do tří tříd podle typu účinku: obousměrné scramblasy, flipasy a flopasy (směrem k cytoplazmě respektive směrem ven). A právě v udržování membránové asymetrie se uplatňuje například lidský MDR1/P-gp, který funguje jako obecný lipidový translokátor pro různé fosfolipidy a sfingomyeliny. Produkty dalších lidských genů MDR2 a MDR3 se jeví spíše jako specifické translokátory fosfatidylcholinu v plazmatické membráně [15, 12]. Translokásovou aktivitu vykazují i MDR proteiny kvasinek, např. Pdr5p, Yor1p u *Saccharomyces cerevisiae* či Cdr1p, Cdr2p u patogenní *Candidy albicans* [12, 16]. Nejedná se však o všeobecnou vlastnost MDR proteinů, protože například u Snq2p (*Sacch. cerevisiae*),

blízkého homologu Pdr5p, a ani u řady dalších (Pdr10p, Pdr11p, Ycf1p, Pdr15p) nebyla fosfolipidová translokační aktivita pozorována.[17, 12].



**Obr. 1.3: Topologie a organizace domén ABC transportérů**

(A) Nukleotid vázající doména (NBD) obsahující Walker A a Walker B motiv spolu s ABC signaturou. (B) Transmembránová doména složená z šesti transmembránových  $\alpha$ -helixů (TMS<sub>6</sub>). (C) Konfigurace NBD-TMS<sub>6</sub>, např. Adp1p v *S. cerevisiae* nebo lidský ABC8 (ABCG1) a BCRP (ABCG2). (D) Konfigurace TMS<sub>6</sub>-NBD konfigurace, např. *S. cerevisiae* Pxa1p a Pxa2p; *Lactococcus lactis* LmrA; *Lactobacillus brevis* HorA; lidský TAP1 (ABCB2) a TAP2 (ABCG3). (E) Konfigurace (TMS<sub>6</sub>-NBD)<sub>2</sub>, např. *S. cerevisiae* Ste6p; *Plasmodium falciparum* pfMDR1; lidský MDR1 (ABCB1). (F) Konfigurace (NBD-TMS<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, např. *S. cerevisiae* Pdr5p. (G) Konfigurace TMS<sub>6</sub>-NBD-R-TMS<sub>6</sub>-NBD, R-doména plní regulační funkci, např. *S. cerevisiae* Ycf1p, lidský CFTR (ABCC7) (H) Konfigurace TMD<sup>0</sup>(TMS<sub>6</sub>-NBD)<sub>2</sub>, např. *S. cerevisiae* Yor1; lidský MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3).

#### 1.1.1.2.1. Molekulární struktura ABC transportérů

Typický ABC protein sestává obvykle ze čtyř domén, dvou vázajících nukleotid (Nucleotide Binding Domains – NBDs), a dvou transmembránových (Trans-Membrane Domains – TMDs), řazených v pořadí (NBD-TMD)<sub>2</sub> anebo opačně

(TMD-NBD)<sub>2</sub> (obr. 1.3). Některé ABC transportéry se vyskytují v poloviční variantě (jedna NBD a jedna TMD), jiné zase bez TMD (např. YEF3/RLI u *Saccharomyces cerevisiae* [18]). Mnohé z polovičních ABC transportérů tvoří homo- či heterodimery (např. transportér hemolysinu A, HlyB, u *Escherichia coli* [3]). U některých bakteriálních ABC transportérů jsou jednotlivé domény kódovány jako separátní polypeptidy, které pak tvoří dimery [12, 19-21].

**NBD** má hydrofilní charakter a interaguje s intracelulární smyčkou TMDs. Její přítomnost je nutná k energizaci membránového transportu, popřípadě jiných funkcí ABC proteinu hydrolyzou ATP. Skládá se z jádra (cca 215 AK), představujícího konzervovanou sekvenci. Doména je složená ze tří krátkých peptidových motivů. První dva, tzv. motiv Walker A bohatý na glycin (GxxGxGK-S/T, kde x je libovolná AK) a hydrofobní motiv Walker B (R-x<sub>(7-8)</sub>-h<sub>(4)</sub>-D, kde h značí hydrofobní AK) jsou přítomné ve všech proteinech vázajících nukleotidy [22]. Hydrofobní AK v motivu Walker B vytvářejí záhyb, na který se vážou nukleotidy. Třetím motivem je tzv. ABC-signatura (L/V-SGG), unikátní motiv, jenž je specifický pro rodinu ABC transportérů a nevyskytuje se u jiných ATP-vázajících proteinů [19]. Tato sekvence se jeví jako esenciální pro funkci ABC transportérů, mutace v ní samotné nebo v jejím okolí vedou k dysfunkci a k nemocem s ní souvisejícím (například k cystické fibróze) [23]. Její přesný význam však není znám. Ukazuje se (alespoň v případě P-gp), že ABC-signatura je umístěna proti Walkeru A z druhé NBD a interaguje s ním [24, 25], přičemž tato interakce je ovlivňována vazbou substrátů ovlivňujících ATPasovou aktivitu těchto pump (verapamil, cyklosporin A) [26].

**TMD** se skládá z několika segmentů tvořených  $\alpha$ -helixy procházejícími membránou. Nejčastěji obsahuje šest transmembránových průchodů, které společně vytvářejí translokační pór. TMD obsahuje specifické domény pro interakci s membránou a vazebné místo pro substrát. Je tedy určující pro substrátovou specifitu [12, 27], která však může být také ovlivněna i strukturou NBD [28].

### 1.1.1.2.2. Výskyt ABC transportérů od prokaryot k člověku — klinický význam

Přestože u **prokaryotních** organizmů je pro transport léčiv dominantní především skupina MFS transportérů [9, 27], lze u nich nalézt i několik ABC pump zajišťujících tuto funkci. Obecně se transportní ABC proteiny vyskytují jak u gram-pozitivních, tak u gram-negativních bakterií, ale pouze u prve zmíněných byla pozorována účast těchto pump na transportu léčiv, přičemž navíc bývají často specifické pro jedinou látku či skupinu příbuzných látek.

Prvně byl u prokaryot identifikován ABC transporter LmrA u druhu *Lactococcus lactis*. LmrA transportuje podobné spektrum jako lidský P-gp, s nímž je homologický (34 % na úrovni AK). Patří k proteinům s poloviční délkou, a aby byl funkční, musí vytvořit homodimer. Stejně jako P-gp (a další ABC proteiny) transportuje i některé lipidy. Významným faktem je, že ABC exportní systémy podílející se na rezistenci k anitibiotikům se vyskytují také u prokaryot patřící mezi lidské patogeny (např. *Staphylococcus aureus* (NorA6), *S. epidermis* nebo *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM7).

**U kvasinek a mikroskopických hub** se na MDR podílí jak ABC, tak MFS transportéry, avšak oproti bakteriím se více uplatňují proteiny z rodiny ABC. Nejvíce byla (nejen) v tomto ohledu prozkoumána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, jejíž genom obsahuje 23 genů kódujících ABC pumpu, lokalizované nejen v plazmatické membráně, ale i v membránách buněčných organel, kde se účastní rezistence buněk proti toxickým látkám, oxidativnímu stresu, sekrece feromonů a kontroly mitochondriálních a peroxizomálních funkcí. Výskyt obdobných proteinů a jejich účast na MDR byla prokázána i v patogenních kmenech kvasinek izolovaných z pacientů infikovaných invazivní kandidózou (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* či *C. krusei*) a rovněž u dalších patogenních kmenů jako *Aspergillus fumigatus* či *Cryptococcus neoformans*. Funkce a struktury těchto transportérů i jejich regulační mechanismy jsou si velmi podobné, a tak **výsledky získané na jednom druhu kvasinek (např. *S. cerevisiae*) jsou do značné míry aplikovatelné i na druhy další.**

Klinický problém představuje MDR při léčbě nemocí způsobených **protozoálními parazity**, jakým je například *Plasmodium falciparum*, původce často smrtelného onemocnění – malárie. V jeho genomu byly identifikovány tři geny kódující

ABC transportéry, dva homologní Phg1p, Phg2p a další PfGCN20. V kmenech rezistentních na chlorochin, používaný při léčbě malárie, se vyskytoval amplifikovaný gen pro Phg1p. Pozdější studie ukázaly, že Phg1p se vyskytuje v membráně vakuol, v cílovém místě chlorochinu, a jeho fyziologická funkce spočívá nejspíš v regulaci vakuolárního pH. U zbylých dvou ABC transportérů nebylo prokázáno spojení s MDR [27].

Významný je fenomén MDR i v případě lidských buněk, u nichž vede v konečném důsledku k selhávání nádorových terapií. Díky sekvenaci lidského genomu byly objeveny geny pro 48 různých ABC transportérů, které byly rozděleny podle fylogenetického charakteru do sedmi skupin (označených ABCA až ABCG) a z nichž nejméně 12 se účastní transportu léčiv [27]. Prvním objeveným a pravděpodobně z hlediska MDR nejdůležitějším je produkt genu MDR1 (skupina ABCB), již zmíněný P-gp, s typickou širokou substrátovou specifitou. Dále je to skupina transportérů MRP1-MRP6 (**M**ultidrug **R**esistance-associated **P**rotein), která patří do skupiny ABCC. Molekulární architektura proteinů této skupiny je odlišná od P-gp; na N' konci je před první TMD předřazena ještě jedna membránová doména sestávající z 5 TMS.

Z klinického hlediska jsou velmi významné i další lidské ABC proteiny, které se nepodílejí na MDR. Dysfunkce řady z nich vede k mnoha chorobám – cystická fibróza – mutace v genu CFTR (ABCC7, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), jejímž následkem je ucpání žlučových či tvorba vazkého hleny v plicích a tím způsobené respirační problémy; adrenoleukodystrofie způsobená špatnou funkcí proteinu ABCD1 vede k hromadění velmi dlouhých řetězců mastných kyselin v těle, které způsobují poškození mozku; Dubin-Johnsonův syndrom (cMOAT/MRP2/ABCC2) s poruchou transportu konjugovaného bilirubinu do žluče, Tangierova choroba (ABCA1) – porucha v transportu cholesterolu; Stargardtova makulární dystrofie – dědičná porucha centrálního vidění nebo Zellwegerův syndrom – porucha v biogenezi peroxizomů [12, 13, 29].

Rezistence vůči chemoterapeutikům představuje společný problém jak při léčbě pacientů s infekčním onemocněním, tak s onemocněním nádorovým. Velké usilí je již delší dobu věnováno nalezení **vhodného inhibitoru**, který by bylo možno podávat společně s používanými léčivy, což by mělo vést k mnohem snazší, účinnější a ekonomičtější léčbě. Látky, které by mohly ovlivňovat MDR, mohou účinkovat několika rozdílnými mechanismy: mohou to být vysoce afinitní substráty kompetující o transport s ostatními substráty nebo se může jednat o látky vázající se na vazebné



místo pro substrát a blokující tak jeho vazbu. Mohou také inhibovat ATPázovou aktivitu pumpy, popřípadě měnit konformaci transportního proteinu. Další možností, jak zvrátit MDR, může být také inhibice na úrovni translace či transkripce.

V minulosti již bylo nalezeno několik látek, které dokáží účinně blokovat funkci MDR pump. Například v případě P-gp to je blokátor kalciových kanálů verapamil nebo immunosupresant cyklosporin. Avšak jakkoliv jsou tyto látky velmi efektivní v *in vitro* experimentech, jejich klinické užívání (coby modulátoru MDR) je znemožněno toxicitou v koncentracích schopných účinně blokovat P-gp. Tato zjištění vedla k vývoji další generace inhibitorů, které měly mít stejnou inhibiční účinnost, ale současně výrazně nižší toxicitu (zkoušely se např. různé strukturní analogy verapamilu a cyklosporinu). *In vivo* experimenty však bohužel ukázaly, že tyto látky mění farmakokinetiku a distribuci spolupodávaného léčiva, které pak dosahovalo toxické koncentrace i ve zdravých tkáních. V současné době stále chybí látka, která by účinně modulovala pouze cílový MDR transportér bez dalších vedlejších efektů, stejně tak jako chybí citlivý experimentální nástroj, který by umožňoval rychle a účinně takové látky hledat.

## 2. Kvasinky - modelový organizmus eukaryontní buňky

Základním stavebním kamenem každého živého organismu je buňka. V závislosti na složitosti a vnitřním uspořádání se buňky dělí do dvou kategorií – prokaryontní a eukaryontní. Kvasinky patří mezi nejjednodušší eukaryontní buňky, a nejen proto se staly oblíbeným modelovým organismem. Jejich role coby vhodného experimentálního systému je dále umocněna jejich snadnou kultivací (srovnatelnou s prokaryontními organismy) či jednoduchou genovou manipulací (kvasinky mohou existovat v haploidním stavu), přičemž ale sdílí velmi podobné struktury a molekulární mechanismy buněčných pochodů s organismy daleko složitějšími a vyspělejšími. Lze v nich najít proteinové analogy z jiných organismů, a není tedy překvapivé, že funkce mnoha z nich (např. proteiny buněčného cyklu, některé signální proteiny atd.), důležitých v biologii člověka, byla poprvé objevena u kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Ta patří mezi nejprobádanější a nejčastěji používané kvasinky a byla prvním eukaryontním organismem, u nějž byla rozluštěna celá genová sekvence.

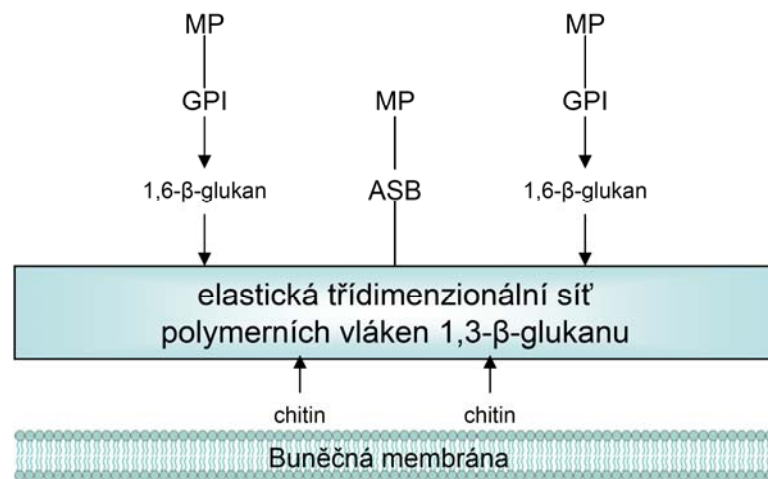
Kvasinky se vyskytují nejčastěji jako jednobuněčné organismy. Z hlediska metabolismu jich většina patří mezi fakultativně anaerobní organismy. Kvasinková buňka je od okolního prostředí oddělena cytoplazmatickou membránou, buněčnou stěnou a u některých druhů případně ještě pouzdrém.

### 2.1. Obal kvasinkové buňky – buněčná stěna a plazmatická membrána

Vnější vrstvou kvasinky je buněčná stěna, která chrání buňku před mechanickým poškozením, osmotickými vlivy a určuje její tvar. Je nezbytná při dělení buněk a zajišťuje komunikaci mezi buňkami. Na její syntézu vynakládá kvasinková buňka nemalé množství energie. Představuje až 30 % suché váhy kvasinek a je tvořena přibližně ze 70 % polymery glukózy (glukany), z 30 % glykosylovanými proteiny – mananproteiny a z asi 2 % N-acetylglukosaminem (chitin). Jednotlivé komponenty jsou navzájem kovalentně vázány. Složení není konstantní a mění se v závislosti na konkrétním kmeni, růstové fázi a kultivačních podmínkách, které ovlivňují její tloušťku a kvalitu. Například snížení koncentrace z 2 % glukózy v růstovém médiu na 0.2 % koncentraci vede u buněk *Saccharomyces cerevisiae* ke tvorbě přibližně 1,5krát tenčí stěny [30].

Glukóza vytváří 3D síť složenou z polymerních vláken  $\beta$ -1,3 glukanu, přilehlou k plazmatické membráně. Tato síť je elastická, je odpovědná za udržení tvaru buňky a je dále větvena amorfním  $\beta$ -1,6 glukanem. Mananproteiny, vázané k  $\beta$ -1,6 glukanům přes glykosylfosfatidylinositolovou kotvu nebo k  $\beta$ -1,3 glukanům vazbou labilní v alkalickém prostředí, se vyskytují ve střední a vnější vrstvě stěny. Chitin se vyskytuje ve vnitřní vrstvě buněčné stěny, s  $\beta$ -1,3 glukanem je propojen  $\beta$ -1,4 vazbou. Jeho distribuce je nerovnoměrná, nejvíce se vyskytuje v oblasti jizev vzniklých ve stěně v důsledku vegetativního rozmnožování – pučení.

Izolovaná buněčná stěna je propustná pouze pro malé molekuly (menší než 750 Da), ale díky své elasticitě je permeabilní u intaktních buněk i pro středně velké proteiny [31, 32].



**Obr. 2.1: Molekulární organizace buněčné stěny kvasinky *S. cerevisiae***  
 MP – mananprotein, GPI – glykosylfosfatidyl, ASB – vazba senzitivní k alkalickému prostředí

Plazmatická membrána odděluje vnitřek buňky od okolí a v eukaryotických organizmech, jako jsou kvasinky, vymezují biologické membrány také jednotlivé intracelulární orgány. Je tvořena lipidní dvojvrstvou s tloušťkou okolo 7 nm a membránovými proteiny, které plní různé funkce – především zajišťují transport látek a informací přes membránu, ale také katalyzují průběh chemických reakcí nebo mají funkci strukturní.

Původní model homogenní fluidní dvojvrstvy je dnes nahrazen modelem membrány s vysokou laterální kompartmentací, který je někdy také nazýván ráftovým modelem. V tomto modelu je lipidní dvojvrstva složena z mozaiky různých organizovaných mikrodomén sestávajících ze specifických lipidů a proteinů.

Mikrodomény obsahují vysoký podíl sterolů (v případě kvasinek se jedná především o ergosterol) a sfingolipidů s dlouhými nasycenými řetězci mastných kyselin. S jednotlivými typy mikrodomén mohou být asociovány konkrétní proteiny. V cytoplazmatické membráně buňky *Saccharomyces cerevisiae* byly dosud objeveny dva disjunktí laterální kompartmenty rozdílného složení. Jeden z nich hostí uracil permeázu Fur4p a dvě aminokyselinové permeázy, Can1p a Tat2p. Během depolarizace membrány dochází k jejich reverzibilní laterální migraci spolu s ergosterolem z původního kompartmentu a také dochází ke změnám složení a struktury membrány [33]. Druhá identifikovaná mikrodoména vytváří prostředí pro membránovou **H<sup>+</sup>-ATPázu Pma1p** – nejvíce exprimovaný membránový protein v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, který podle některých zdrojů čítá více než 25 % celkového počtu membránových proteinů [34]. Pma1p tvoří komplex se specifickými lipidy již během své syntézy v endoplazmatickém retikulu a jejich složení hraje roli v distribuci tohoto proteinu – zkrácení řetězce mastných kyselin těchto lipidů vede k tomu, že nově syntetizovaný protein je mylně dopraven do vakuoly a degradován, namísto toho, aby byl cílen na povrch buňky [34].

Pma1p patří do rodiny kationtových transportérů označovaných jako ATPázy typu P<sub>2</sub> a zajišťuje aktivní transport protonů z buněk. Je hlavním aktérem při udržování vnitrobuněčného pH a při budování membránového potenciálu, který je pro buňku esenciální. Nezbytný je pro funkci membránových symportních proteinů, které gradientu protonů využívají k energizaci svých procesů, například k přenosu živin a metabolitů (hexozové transportery Hxt1p-Hxt11p, další cukry Gal2p), k detoxikaci (Flr1p, Atr1p, Azr1p, Sng2p...) nebo k udržení kationtové homeostáze (Nha1p, Trk1p, Trk2p). Protein Pma1p je aktivován v přítomnosti slabých kyselin [35] nebo v přítomnosti glukózy [36]. Ta jej reguluje jak na úrovni transkripce (2–4krát, díky transkripčnímu faktoru Rap1p and Gcr1p), tak na úrovni posttranskripčních úprav (5-10krát, fosforylací serinu na C'-konci). Přítomnost glukózy způsobuje také konformační změny Pma1p a dochází k disociaci komplexu Pma1p-acetylovaný tubulín, který její aktivitu inhibuje [36]. Navíc se exprese Pma1p mění v průběhu buněčného cyklu. [34-39]

## 2.2. MDR u kvasinek

Tak jako u ostatních organismů i u kvasinek vzniká MDR především nadprodukcí aktivních membránových transportních proteinů. Na sklonku 60. a v průběhu 70. let byly izolovány kmeny kvasinek rezistentní vůči různým strukturně i funkčně odlišným metabolickým inhibitorům, například kvasinky rezistentní vůči chloramfenikolu byly méně citlivé též na tetracykliny [40, 41]. Tento fenotyp, analogický k fenotypu MDR u savčích buněk, byl u kvasinek souborně pojmenován jako **pleiotropic drug resistance, PDR**. V tu dobu bylo známo, že buňky s tímto fenotypem mají nižší intracelulární koncentraci těchto látek, a mělo se za to, že je to kvůli pozměněné permeabilitě cytoplazmatické membrány. V roce 1973 Rank a spolupracovníci [42] popsali kmen s jadernou mutací  $oli^{PR1-1}$ , který byl rezistentní vůči 17 mitochondriálním inhibitorům a vůči cykloheximidu, inhibitoru cytoplazmatické proteosyntézy. Snížený transport  $(^{14}C)$ -chloramfenikolu přes membránu pak vedl k úsudku, že tento gen způsobuje změny v permeabilitě membrány. O více než 10 let později (1987) [43] byl tento gen identifikován jako PDR1, gen kódující  $Zn_2Cys_6$  transkripční faktor [44].

V té době již izolovaný P-gp odpovědný za MDR u savčích nádorových buněk vedl k hledání obdobných mechanismů i u nižších organismů, včetně kvasinek. V roce 1989 byl v genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* identifikován ABC transportér Ste6p [45], homologní k lidskému P-gp, avšak oproti očekávání překvapivě nezprostředkovával PDR a mutace  $\Delta ste6$  vedla ke sterilitě pro MAT-a buňky. V roce 1990 publikoval Golin gen PDR5, jehož amplifikace vedla k hyperrezistenci [46], a o dva roky později jeho regulaci transkripčním faktorem Pdr1p [47]. Že tento gen kóduje membránový ABC transportér bylo publikováno v roce 1994, čtyři laboratoře jej izolovaly nezávisle na sobě, s využitím různých postupů (PDR5 byl klonován jako gen uplatňující se v rezistenci vůči cykloheximidu [48], gen zprostředkovávající rezistenci vůči mykotoxinům, jako je sporidesmin [49], k ceruleninu a cykloheximidu [50] a jako transportní protein steroidních hormonů [51]). **Spolu s Snq2p**, který byl identifikován o rok dříve [52], **patří Pdr5p mezi hlavní MDR pumpy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*** a mezi nejlépe probádané ABC transportéry u kvasinek vůbec. Úplná sekvenace genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pak vedla k identifikaci ještě dalších 30 ABC proteinů, z nichž některé se také podílejí na fenotypu PDR. Jejich přehled je uveden v samostatné kapitole 2.2.1. Na fenotypu MDR se dále podílejí také

proteiny z rodiny MFS transportérů. Genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje 28 předpokládaných MFS transportérů, z nichž část se účastní MDR. Prokázáno to bylo u antiporteru Flr1p, který zprostředkovává rezistenci na cerulenin, flukonazol, cykloheximid, NQO, benomyl, metotrexát a je pod kontrolou transkripčních faktorů Yap1p a Pdr3p. Na MDR mají dále vliv proteiny Atr1p (Aminotriazol, 4-NQO) a Sge1p (ethidium bromid, krystalová violet, metylmetansulfonát a 10-N-nonyl akridinová oranž) a některé další [9, 10, 53 - 55].

Mezi MFS patří také Hxt9p a Hxt11p, dva blízké hexozové transportéry přenášející monosacharidy. Lze u nich nalézt PDREs (elementy rozpoznávané regulační sítí PDR, viz kap. 2.2.1.2) a bazální exprese těchto pump je regulována faktory Pdr1p a Pdr3p. Jejich nadprodukce však paradoxně vede, na rozdíl od jiných cílových genů sítě PDR, ke zvýšení citlivosti na cykloheximid, NQO či sulfonmeturonmetyl a naopak, delece k nárůstu rezistence. [56]. Pravděpodobně tomu tak je z důvodu zvýšeného vstupu těchto látek do buněk, neboť hexozové transportéry zprostředkovávají spíše transport směrem do buněk nežli opačně [13, 1, 44].

### 2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* – ABC transportéry

Díky projektu sekvenace genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo v její výbavě identifikováno 30 různých genů kódujících ABC proteiny. (tab. 2.1) [3, 13, 21, 25, 39]. Část z nich (Pdr5p, Pdr12p, Snq2p, Ycf1p, Yor1p, Pdr15p) přispívá k fenotypu MDR a jejich delece vede k hypersenzitivě k antifungálním či jiným toxickým látkám [13, 18, 57 - 60].

Buněčná detoxikace, ať už se jedná o vypuzování cizorodých látek, nebo ochranu proti vedlejším efektům endogenních toxických metabolitů, není jedinou fyziologickou funkcí těchto proteinů, které se dále uplatňují při maturaci cytosolického Fe/S proteinu, transportu feromonu, v biogenezi peroxizomů, v odpovědi buněk na stres, v homeostázi lipidní dvojvrstvy plazmatické membrány nebo v regulaci mitochondriálních funkcí. [3].

Některé z nich vykazují homologii ke klinicky významným savčím ABC transportérům a studium jejich molekulárního mechanismu, kinetických vlastností, substrátové interakce a 3D struktury může pomoci při hledání nových diagnostických metod a postupů léčby nemocí spojených s (dys)funkcí těchto proteinů [18, 72].

Název	Alias	Systematický název	Lok.	Třída	topologie	Délka	Chromozom	Fenotyp	Funkce
Pdr5p	Sts1/ydr1/lem1 <i>Pleiotropic Drug Resistance</i>	YOR153W	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1511	XV	V, DS	MDR, transport steroidů
Snq2p	<i>Sensitivity to 4-Nitro Quinoline-N-oxide</i>	YDR011W	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1501	V	V, DS	MDR
Pdr12p		YPL058C	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1511	XVI	V	rezistence ke slabým kyselinám
Pdr15p		YDR406W	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1529	V	V	MDR, indukován stresem
Aus1p	<i>ABC protein involved in Uptake of Sterols</i>	YOR011W	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1394	XV	V zpomalení anaerobního růstu	import sterolů
Pdr11p		YIL013c	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1411	X	V zpomalení anaerobního růstu	MDR, import sterolů
Pdr10		YOR328W	PM	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1564	XV	V	MDR
Yor1p	YRS1 <i>Yeast Oligomycin Resistance</i>	YGR281W	PM	MRP/ CFTR	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	1477	VII	V, DS	MDR
Ste6p	<i>STERile</i>	YKL209C	PM	MDR	(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	1290	XI	sterilita	transport párovacího a-feromonu (MAT-a)
Ycf1p	<i>Yeast Cadmium Factor</i>	YDR135C	V	MRP/ CFTR	NTE(TMS <sub>6</sub> -R-NBD) <sub>2</sub>	1515	V	V zvýšená senzitivita ke kovům	transport glutathionových konjugátů
Bpt1p	<i>Bile Pigment Transporter</i>	YLL015W	V	MRP/ CFTR	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	1559	XII	V	transport glutathionových konjugátů těžkých kovů
Ybt1p	Bat1p <i>Yeast Bile Transporter</i>	YLL048C	V	MRP/ CFTR	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	1661	XII	V	
Atm1p	<i>ABC Transporter, Mitochondrial</i>	YMR301C	M	MDR	TMS <sub>6</sub> -NBD	694	XIII	*	
Mdl1p	<b>MultiDrug</b> resistance-Like	YLR188W	M	MDR	TMS <sub>6</sub> -NBD	696	XII	V	export peptidů generovaných při proteolýze mitochondriálních proteinů
Mdl2p		YPL270W	M	MDR	TMS <sub>6</sub> -NBD	820	XVI	V	
---		YOL075C	?	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1095	XV	V	neznámá funkce
Pxa1p	Ssh2/pal1/ pat2/lpi1 <i>PeroXisomal ABC-</i>	YPL147W	P	ALDP	TMS <sub>6</sub> -NBD	870	XVI	V	podjednotka heterodimeru (Pxa1p-Pxa2p), import dlouhých řetězců

	<i>transporter</i>								mastných kyselin do peroxizomů
Pxa2p	Ykl741/pat1	YKL188C	P	ALDP	TMS <sub>6</sub> -NBD	853	XI	V	viz Pxa1p
Adp1p	<i>ATP-Dependent Permease</i>	YCR011C	? PM	PDR*	TMS <sub>6</sub> -NBD-TMS <sub>7</sub>	1049	II	V	
---		YNR070W	?	PDR	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1333	XIV	V	
VMR1	<i>Vacuolar Multidrug Resistance</i>	YHL035C	?	MRP/CFTR	(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	1592	VIII	V senzitivita ke kadmiu	
NFT1	<i>New Full-length MRP-type Transporter</i>	YKR103W/ YKR104w	V	MRP/CFTR	TMS <sub>6</sub> -NBD- TMS <sub>6</sub> / NBD	1218 / 306	XI	V	
Yef3p	TEF3 <i>Yeast Elongation Factor</i>	YLR249W	R, C ?	YEF3	NBD <sub>2</sub>	1044	XII	*	translační elongační faktor 3 (EF), stimuluje vazbu aminoacyl-tRNA na ribozom uvolněním EF-1 $\alpha$ z ribozomálního komplexu
Gcn20	<i>General Control Nonderepressible</i>	YFR009W	C	YEF3	NBD <sub>2</sub>	752	VI	V	Positivní regulátor Gcn2p kinázové aktivity
HEF3	ZRG7 <i>Homolog of EF-3</i>	YNL014W	C?	YEF3	NBD <sub>2</sub>	1044	XIV	V	Translační EF-3
NEW1		YPL226W	?	YEF3	NBD <sub>2</sub>	1196	XVI	V, citlivost ke kovům a doxorubicinu	
ARB1	<i>ATP-binding cassette protein involved in Ribo-some Biogenesis</i>	YER036C	C, R	YEF3	NBD <sub>2</sub>	610	V	*	účastní se biogeneze ribozomu 40S a 60S
RLI1	<i>RNase L Inhibitor</i>	YDR091C	C, R	RLI	NBD <sub>2</sub>	608	IV	*	
---		YDR061W	?	?	NBD	539	IV	V	transkripce aktivována Yrm1p
CAF16	<i>CCR4 Associated Factor</i>	YFL028C	?	?	NBD	289	VI	V	součást transkripčního regulačního komplexu kontrolujícího iniciaci, elongaci a degradaci mRNA

**Tab 2.1: Geny identifikované v *S. cerevisiae* kódující ABC proteiny**

Použité zkratky:

Lokalizace (Lok.): PM – plazmatická membrána, M – mitochondrie, P – peroxizom, V – vakuola, R – ribozom, C – cytoplazma

Fenotyp: V – viabilní, DS – senzitivita k léčivům,



### 2.2.1.1. Rozdělení a molekulární architektura kvasinkových ABC proteinů:

Na základě fylogenetických studií byly kvasinkové ABC proteiny rozděleny do 6 různých tříd: podle podobnosti se savčími ABC proteiny byly tři z nich pojmenovány: MRP/CFTR (obr. 1.3G,H), MDR (obr. 1.3E) a ALDp (obr. 1.3D). Další podrodina je pak PDR (obr. 1.3F), která má obrácenou topologii oproti P-gp. Zástupci zbývajících dvou podrodin (YEF3 a RL1) nemají TMD, a proto netvoří transportéry [3, 12, 13, 18].

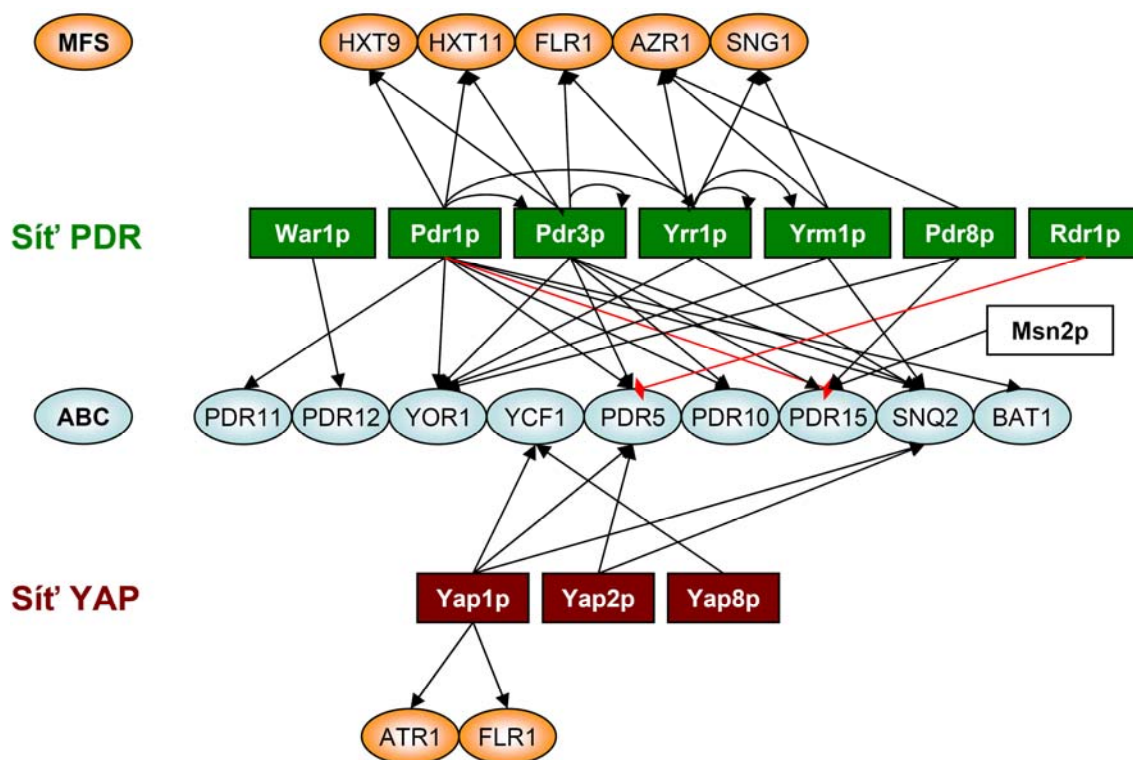
Stejně jako u ostatních ABC transportérů jsou tyto proteiny nejvíce konzervovány v NBD. Proteiny rodiny PDR, MRP/CFTR, MDR a ALDp mají minimálně 6 předpokládaných transmembránových segmentů a plnohodnotný ABC transportér má domény zdvojené v uspořádání  $(TMS_6-NBD)_2$  nebo v opačné konfiguraci  $(NBD-TMS_6)_2$ , s výjimkou proteinů z rodiny ALDp, které mají poloviční konfiguraci  $(TMS_6-NBD)$ .

Kvasinkové MRP/CFTR proteiny mají na N<sup>o</sup>-konci připojeno navíc ještě několik TMS nazývaných N-terminal extension (NTE) [18].

### 2.2.1.2. Regulační mechanismy PDR

V eukaryotických buňkách je exprese většiny genů řízena mnoha transkripčními faktory, které působí v kooperaci. Stejně je to i v případě genů účastnících se PDR. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se v buněčné odpovědi na chemický stres uplatňují především dvě regulační sítě, síť YAP a PDR (obr. 2.2)

Tyto dvě regulační sítě byly dlouhá léta považovány za zcela nezávislé, na konci devadesátých let však bylo pozorováno, že tomu tak není; u buněk rezistentních vůči diazaborinu díky zvýšené expresi genu YAP1, hlavního regulačního faktoru sítě YAP, se projevila tato rezistence pouze v přítomnosti funkčních genů PDR1 a PDR3, nikoliv u  $\Delta pdr1 \Delta pdr3$  [61]. Obě regulační sítě jsou ve skutečnosti funkčně propojené, některé funkce jedné regulační sítě mohou být ovlivněny nebo i zastoupeny druhou regulační sítí.



**Obr. 2.2: Schéma regulační sítě PDR a YAP.**

Černá šipka značí pozitivní regulaci daného genu, červená naopak. Obrázek znázorňuje vybrané cílové geny regulačních sítí PDR a YAP, jejichž produkty se podílejí na MDR.

### 2.2.1.2.1. Regulační síť PDR

Exprese většiny MFS a ABC transportérů podílejících se na PDR a některých dalších proteinů je pod kontrolou dvou homologních (36 % na úrovni AK [62]) fosfoproteinů Pdr1p a Pdr3p. Oba transkripční regulátory patří do rodiny tzv.  $Zn_2Cys_6$  – zinc finger regulátorů. Proteiny této rodiny obsahují šest vysoce konzervovaných cysteinů, které koordinují vazbu dvou atomů zinku umožňující patřičné sbalení DNA vazebné domény. Pdr1p a Pdr3p tvoří homo- a heterodimery a rozpoznávají geny obsahující v promotorové oblasti **P**leitotropic **D**rug **R**esistance **E**lements (PDREs) se shodnou konzervovanou sekvencí 5'-TCCG/aC/tGG/cA/g-3' [44, 63]. Cílové geny (díky stejnému rozpoznávacímu elementu) obou proteinů se překrývají a Pdr1p/Pdr3p jsou do jisté míry vzájemně zastupitelné, nikoli však zcela [64, 65].

Vazbu na DNA má na starosti již zmíněný bi-nukleární Zn klastr na N'-konci těchto proteinů, následován je „inhibiční“ doménou, která je složena z několika motivů a podílí se na inhibičním účinku těchto regulátorů. C'-konec tvoří **A**cid-**R**ich activation **D**omain (ARD), která představuje místo možné fosforylace. Význam fosforylace není

dosud zcela zřejmý, neboť zkrácená nefosforovatelná verze Pdr3p je stále alespoň částečně funkční [13].

Pro funkci a regulaci je významná centrální inhibiční doména proteinů Pdr1p a Pdr3p. Mutace v genu PDR1 (např. *pdr1-3* F815S) nebo PDR3 (např. *pdr3-7*), které vedly ke snížení citlivosti buněk k buněčným inhibitorům v důsledku nadprodukce MDR pump, byly ve většině případů lokalizovány v prvních dvou motivech této domény, kde pravděpodobně rušily její inhibiční účinek a/nebo v ARD, kde byla indukována hyperaktivace [13, 66].

Transkripce je těmito faktory ovlivněna jak pozitivně, tak negativně, a to dokonce i v případě účinku přes totožný PDREs, v závislosti na posttranslačních úpravách (fosforylaci) a především v závislosti na druhu dimerizace. Různé kombinace homo- a heterodimerů mohou regulovat různé geny a dimerizace hraje zřejmě důležitou roli v regulační funkci těchto proteinů. Například další  $Zn_2Cys_6$  regulátor Rdr1p funguje jako represor genu PDR5, a to jednak přímou interakcí s PDREs, ale také tvorbou heterodimeru s Pdr3p či Pdr1p, který pak kompetuje s dimerem Pdr1p/Pdr3p o vazbu na PDREs. Regulátor Stb1p velmi slabě tvoří homodimer a dimerizuje pouze s Pdr1p, s kterým tvoří aktivátor genu PDR5 a SNQ2. Naopak pouze homodimer tvoří protein Yrr1p [18, 67, 68].

Analýza úplné sekvenace genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vedla k rozpoznání 55  $Zn_2Cys_6$  regulátorů, avšak funkce mnohých z nich není dosud známa [69, 70] a samozřejmě jen některé z nich se podílejí na PDR. Kromě výše zmíněných pěti (Pdr1p, Pdr3p, Sbt1p, Rdr1p, Yrr1p) se jedná ještě o pozitivní regulátor Pdr8p, který stejně jako Yrr1p, se kterým má částečný (pět z osmi) překryv cílových genů, působí přes PDREs [71]. K potlačení transkripce cílových genů Yrr1p vede nadprodukce dalšího  $Zn_2Cys_6$  regulátoru – Yrm1p. Překvapivě však, při absenci genu YRR1 nadreguluje Yrmp1p 23 genů, z nichž 14 je pro Yrr1p cílových [72].

V nedávné době byl objeven další  $Zn_2Cys_6$  regulátor War1p, který je spjat s reakcí buněk na stres způsobený přítomností slabých kyselin. War1p tvoří homodimer a přes WAREs (weak acid response element) kontroluje expresi genu PDR12 (viz kap. 2.2.1.3). Jeho aktivace je velmi rychlá, spouštěná stresem indukovanou hyperfosforylací [73].

**Tab. 2.2: Transkripční faktory Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> obsažené v regulační síti PDR.**

Jméno/alias	Systemicky	Regulované geny
<b>PDR1</b> /AMY1/ANT1/BOR2/CYH3/NRA2/SMR2/TIL1/TPE1/TPE3	YGL013C	<b>PDR3</b> , <b>YRR1</b> , <b>PDR5</b> , <u><b>PDR10</b></u> , <b>PDR11</b> , <b>PDR15</b> , <b>SNQ2</b> , <b>YOR1</b> ; <b>HXT9</b> , <b>HXT11</b>
<b>PDR3</b> /AMY2/TPE2	YBL005W	<b>PDR3</b> , <b>PDR5</b> , <b>PDR10</b> , <b>PDR15</b> , <b>SNQ2</b> , <b>YOR1</b> ; <b>HXT9</b> , <b>HXT11</b> , <b>FLR1</b>
<b>YRR1</b> /PDR2	YOR162C	<b>YOR1</b> , <b>SNQ2</b> ; <b>FLR1</b> , <b>AZR1</b> , <b>SNG1</b>
YRM1	YOR172W	<b>YOR1</b> , <b>SNQ2</b> , <b>YRR1</b> ; <b>AZR1</b> , <b>SNG1</b>
PDR8	YLR266C	<b>PDR15</b> , <b>YOR1</b> ; <b>AZR1</b>
STB5	YHR178W	<b>PDR5</b> , <b>SNQ2</b>
RDR1	YOR380W	<u><b>PDR5</b></u>
WAR1	YML076C	<b>PDR12</b>

Barevné značení cílových genů podle typu/funkce: **ABC**, **MFS**, **regulační faktor**. Podtržení značí negativí regulaci [39, 62, 70, 71].

Hlavní funkcí sítě PDR je rezistence buněk vůči cizorodým látkám, čemuž také odpovídá spektrum cílových genů, jejichž transkripce je touto sítí ovlivněna. (viz tab.2.2 a obr. 2.2). Především se jedná o transportní systémy ABC a MFS podílející se na buněčné detoxikaci. Celkově byla pozorována v mutantech PDR1-3 a PDR3-7 nadprodukce 26 různých cílových genů [44]. Produkty genů regulovaných Pdr1p / Pdr3p se podílejí mimo PDR také na biosyntéze buněčné stěny či membránových lipidů. Například geny PDR16 a PDR17 mají ve své promotorové oblasti PDREs. Delece PDR16 nebo PDR17 vede k senzitivě k azolovým lékům, delece obou pak způsobí citlivost k nemalému počtu dalších látek. Současně s tím je i ovlivněno fosfolipidové a sterolové složení plazmatické membrány, stejně tak jako celkové lipidové složení. Azolová senzitivita  $\Delta$ PDR16 bude pravděpodobně způsobena poškozením syntézy sterolu a nárůst senzitivity u dvojitých mutantů je zapříčiněn celkovou změnou ve složení membrány. [1, 39, 74].

Za zmínku stojí také fakt, že samotný gen PDR3 obsahuje ve své promotorové oblasti dvě PDREs, a tedy reguluje sám sebe. Přítomnost PDREs hraje roli při nadregulaci jeho transkripce například během dysfunkce mitochondrií (jako je tomu třeba v  $\rho_0$  mutantech) nebo při nedostatku mitochondriální F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPázy. V  $\rho_0$  mutantech je díky zvýšené expresi Pdr3p indukována transkripce dalších genů, přičemž na této regulaci nemá Pdr1p žádnou účast [64].

Dvacet tři geny, které vykazovaly sníženou expresi v pdr1-3 a pdr3-7 mutantech ve srovnání s WT (například PDR12), neobsahují překvapivě PDREs.

K účinku Pdr1p, respektive Pdr3p dochází zřejmě nepřímo, působením přes dosud neznámé represory. [44].

Možnost fosforylace, různá úroveň dimerizace, autoregulační smyčky a přítomnost pozitivních či negativních koregulátorů ukazuje, jak komplexní a složitá je regulace PDR v kvasinkách.

#### 2.2.1.2.2. Regulační síť YAP

Regulační síť YAP je obdobná síti PDR. Uplatňuje se především v odpovědi na stresové podmínky a stejně tak zprostředkovává rezistenci na některé látky (cykloheximid, NQO, sulfometuronmetyl, kadmium a další). Regulační proteiny této sítě patří do rodiny „Basic-leucine zipper“ (bZIP family) a jsou podobné savčím regulačním faktorům AP-1 (odtud také název této sítě **Yeast AP-1**). Rozpoznávají sekvenci 5'-TTAG/CTAA-3' nazývanou **yAP-1 response element** – YRE, která je podobná sekvenci TGACTCA rozpoznávanou savčím AP-1. V *Saccharomyces cerevisiae* existuje 8 členů této rodiny, přičemž alespoň pět z nich (Yap1p, Cad1p, Yap8p, Cin5p, Yap6p) se uplatňuje v PDR a v toleranci k některým kovům a jejich solím a v odolnosti proti tepelnému šoku, oxidativnímu stresu a v rezistenci proti některým toxickým látkám. [1, 13, 39, 70, 75, 76]

**Tab. 2.3:** Transkripční faktory bZip obsažené v regulační síti YAP

Jméno/alias	Systematicky	Poznámka
YAP1/PAR1/ SNQ3/PDR4	YML007W	tolerance k oxidativnímu stresu, rezistence ke kadmiu a arzeniu, PDR
CAD1/YAP2	YDR423C	rezistence ke kadmiu, PDR
YAP3*	YHL009C	
CIN5/HAL6/ YAP4	YOR028C	PDR, odpověď na stresové podmínky
YAP5	YIR018W	akumulace železa ve vakuolách
YAP6/HAL7	YDR259C	tolerance k Na <sup>+</sup> a Li <sup>+</sup> , exprese genů carbohydrátového metabolismu
YAP7	YOL028C	
ARR1/YAP8/ ACR1	YPR199C	rezistence ke sloučeninám arzeniu

\* pozor na záměnu, název YAP3 se v literatuře objevuje i pro označení genu pro aspartátproteázy YPS1

Jako první z této sítě byl popsán v roce 1988 gen YAP1 (PAR1/SNQ3/PDR4), který byl následně v roce 1991 izolován [77] na základě rezistence k chelátům železa. Spolu s dalším genem YAP2 způsobují PDR a rezistenci k  $\text{Cd}^{2+}$  [78]. Gen YAP1 není pro buňku esenciální,  $\Delta yap1$  mutanti jsou životaschopní, ale vykazují zvýšenou citlivost na některé látky (např. NQO, cykloheximid, trenimon, kadmium), nejsou schopni růst při pH vyšším než 7 a dále jsou hypersenzitivní na oxidativní stres způsobený peroxidem vodíku [79]. Ke zvýšení vazby na DNA a regulaci transkripce v přítomnosti hydroperoxidů a tioloxidantů dochází především kvůli změně struktury existujícího proteinu a jeho lokalizace – za normálních podmínek se tento protein vyskytuje v cytoplazmě, během stresu je relokalizován do jádra. K tomu dochází díky tzv. cystein rich domain – CRD umístěné na C'-konci. Tu rozpoznává protein Cmr1p (poprvé pozorováno u *Schizosaccharomyces pombe*, kde Cmr1p transportoval homolog Yap1p, protein Pap1p), který transportuje Yap1p z jádra, avšak jeho vazba je inhibována oxidací. Odstranění CRD způsobuje setrvávání Yap1p v jádru a jeho vysokou aktivitu [75, 76, 80].

Druhým známým transkripčním aktivátorem regulační sítě YAP je produkt genu CAD1, více znám jako YAP2. Obdobně jako YAP1 se účastní PDR a rezistence vůči kadmiu, chelátům železa a zinku, ceruleninu, cykloheximidu a sulfometuronmethylu. Jeho aktivita je stimulována přítomností kadmia obdobně jako u Yap1p (a stejně tak Arr1p) a relokalizací v jádře [75, 81].

### 2.2.1.3. ABC transportéry plazmatické membrány (*Saccharomyces cerevisiae*)

Cytoplazmatická membrána tvoří první obrannou linii buněk, a není tedy překvapivé, že právě zde se nachází většina MDR proteinů. V následující kapitole jsou shrnuty ABC proteiny cytoplazmatické membrány, pro úplnost jsou uvedeny i některé, které se nepodílejí na fenoménu MDR.

Ste6p: Patří mezi první popsané nesavčí ABC transportéry homologní k lidskému P-gp (v roce 1989 [45]). Tento protein o velikosti 1290 AK v topologii (TMD-NBD)<sub>2</sub>, stejně jako u P-gp, transportuje malý peptid – párovací feromon a. Zajímavé je, že na rozdíl od svého lidského homologu se neuplatňuje v rezistenci buněk (*s výjimkou velmi nízké rezistence k peptidovému ionoforu valinomycinu* [13]); naproti tomu lidský MDR1/P-gp, je-li exprimován v *S. cerevisiae*, je schopen jej plně zastoupit v  $\Delta ste6$  mutantech, a k tomu navíc zprostředkovat rezistenci k FK520. [45] Ste6p je příkladem ABC pumpy transportující peptidy. Dalším takovým příkladem může být její homolog z *Candida albicans*, Hst6p, který je exprimován konstitutivně a pravděpodobně se také účastní pohlavního cyklu. [12] Ste6p je protein s krátkou dobou života, po extrakci feromonu je rychle endocytován a dopraven do vakuoly k degradaci [13]. Jeho exprese je pozitivně regulovaná přítomností feromonu a. U genu STE6 nebyl nalezen PDRE a delece PDR1 nevede ke sterilitě. Zdá se tedy, že STE6 není pod kontrolou Pdr1p, ačkoliv některé jeho mutace vedly ke zvýšení mRNA genu STE6 [54].

Pdr5p: Spolu s homologním Snq2p patří mezi nejlépe prozkoumané transportéry u kvasinek zprostředkovávající MDR. Byl identifikován v roce 1994 [48, 49], krátce po objevení Snq2p. Jeho nadprodukce vede ke vzniku PDR, díky transportu stovek strukturně i funkčně odlišných xenobiotik přes plazmatickou membránu [82]. Úroveň aktivity je nejvyšší v průběhu exponenciální fáze, během diauxie dochází k poklesu a ve stacionární fázi je téměř nulová. [83 - 85]. Jeho exprese je pozitivně regulována faktory Pdr1p a Pdr3p, z nichž alespoň jeden musí být přítomen. Přerušení genu PDR1 vede k výraznějšímu úbytku mRNA PDR5 nežli k přerušení PDR3. Za podmínek tepelného stresu je indukován faktory Yap1p a Yap2p [54].

Pdr5p má stejný mechanismus substrátového rozpoznávání a transportu jako P-gp, produkt lidského genu MDR1, ačkoliv má obrácenou topologii TMD a NBD, tedy od N'-konce začíná NBD a pak následuje prvních TMS<sub>6</sub>, zatímco u Pgp TMS<sub>6</sub>

předcházejí NBD [18, 57, 82]. Další zvláštností Pdr5p je bodová mutace v konzervované sekvenci walker A motivu v NBD1 (cystein namísto lysinu), která má za následek její nižší aktivitu [28].

V roce 2003 publikovali A. Ferreira-Pereira a kol. [57] první 3D strukturu v rozlišení 25Å, která odhalila, že Pdr5p se vyskytuje ve formě dimeru, ačkoliv dřívější studie naznačovaly, že Pdr5p je aktivní jako monomer [86]. Jak je patrné z obrázku 2.3 jednotlivé NBD jsou k sobě navzájem kolmé. Stejná asymetrie je předpokládána i u P-gp [87], CFTR [88] či Ste6p [57, 89].



**Obr. 2.3: Tří dimenzionální struktura dimeru Pdr5p v rozlišení 25 Å**

Dimér je složen ze tří částí: z domén zakotvených v membráně, ze čtyř odstávajících stonkových domén a ze 4 laloků tvořících NBD. Domény jsou různě orientovány (viz šipky) a předpokládá se, že během katalytického cyklu s ATP dochází k jejich rotačnímu pohybu.

ABC proteiny využívají k energizaci svých aktivit energie ATP. Pokusy s purifikovanou Pdr5p pumpou rovněž ukázaly její širokou specifitu v NTPázové aktivitě – pumpa Pdr5p je schopna hydrolyzovat také UTP, CTP a slabě také ITP a GTP [58] a je citlivá na inhibitory ATPázové aktivity vanadát a oligomycin, který však už neinhibuje Snq2p.

Za zmínku stojí, že na rozdíl od P-gp, který, je-li zbaven všech cysteinů, zůstává stále funkční a lokalizován ve vnější membráně, vede mutace C1427Y u Pdrp5p k jeho špatnému sbalení a zadržení v endoplazmatickém retikulu následované rychlou polyubikvitinací a degradací v proteasomech [90]. Náhodná *in vitro* mutagenese vedla k izolaci několika mutací Pdr5p s pozměněnou substrátovou specifikou. Tyto experimenty vedly k předpokladu, že substrátová specifita a citlivost k inhibitorům je



určena především TMS10 a s ním sousedící extracelulární kličkou 6 (mezi TMS11 a TMS12 [1, 13, 90, 91]). Na substrátové specifitě se může podílet také NBD, jak bylo ukázáno v nedávné studii [28] – bodová mutace H1068A v NBD vedla ke ztrátě schopnosti transportovat rhodamin, avšak nepozměnila transport jiných látek.

Pdr5p je krátce žijící protein s poločasem 60 až 90 minut, poté je ubiquitinován [92] a endocytózou dopraven do vakuoly ke konečné degradaci [93].

Substrátová specifita: Pdr5p transportuje široké spektrum strukturně a funkčně odlišných látek, většinou hydrofobních a kladně nabitých. Mezi substráty patří mykotoxiny, antifungální azoly, herbicidy, cykloheximid, sulfomethuronmetyl, léky na rakovinu (vinblastin, vincristin, taxol a verapamil) a steroidní hormony [3, 82, 94]. Přítomnost Pdr5p (a Snq2p) ovlivňuje také citlivost buněk ke kovovým kationtům jako  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  a  $\text{Mn}^{2+}$ , které, jsou-li obsaženy v médiu, indukují expresi genu PDR5 (a SNQ2). U  $\Delta pdr5\Delta snq2$  mutantů byla pozorována vyšší intracelulární koncentrace těchto iontů [95]. Pravděpodobně to však neznamená, že by Pdr5p nutně transportovala kovové kationty, spíše se jedná o změnu permeability membrány [13].

Rozsáhlá studie toxicity 349 látek [96] na kmenech s mutacemi v PDR5, SNQ2 a YOR1 ukázala, že se substrátová specifita pump kódovaných těmito geny částečně překrývá. [1, 82, 97]. Z inhibičních studií několika různých substrátů vyplývá přítomnost minimálně tří vazebných míst pro substrát. Nezávisle na tom, které vazebné místo je při rozpoznání substrátu využito, existuje korelace mezi velikostí substrátu a efektivitou transportu, přičemž optimální velikost je  $\sim 200\text{\AA}^3$ . Látky s  $< 90\text{\AA}^3$  vykazovaly poměr MIC (*Minimum Inhibitory Concentration* — *nejnižší účinná koncentrace*) u WT a  $\Delta pdr5$  blízký jedné. Horní hranice velikosti není známa. Oproti tomu nebyla pozorována žádná korelace mezi hydrofobicitou a efektivností transportu [82, 97 - 99].

Snq2: Byl první identifikovaný ABC transportér u kvasinek zprostředkovávající MDR (1993 [52]). Stejně tak jako Pdr5 (ke kterému je ze 40 % homologní na úrovni AK [12]) není pro buňku esenciální, jeho delece vede jen k senzitivitě na některé metabolické inhibitory. Oproti Pdr5p hydrolyzuje pouze ATP [13]. Optimum NTPázové aktivity je při pH 6–6.5, čímž se liší od Pdr5p, který je v rozsahu pH 6 až 9 konstantní v hydrolyze ATP [58].

Regulace exprese Snq2p je pod kontrolou minimálně pěti regulátorů, Pdr1p, Pdr3p, Yap1p, Yrr1p a Yrm1p. Přerušení genu PDR3 nemá tak výrazný vliv na snížení

mRNA genu SNQ2 jako přerušení genu PDR1 a i v případě přerušení obou je stále SNQ2 slabě transkribována vlivem Yrr1p. Na rozdíl od Pdr1p / Pdr3p kontroluje Yrr1p jak bazální transkripci, tak transkripci aktivovanou přítomností inhibitoru [13, 54, 100].

Yor1p: Je jediný ABC transportér z rodiny MRP/CFTR umístěný v plazmatické membráně. Jeho objev (1995 [101]) pomohl vysvětlit do té doby nejasnou vazbu mezi Pdr1p/Pdr3p a rezistencí na oligomycin, k němuž zprostředkovává rezistenci. Jedná se o homolog lidského MRP1 (30 %), CFTR (28 %) a vakuolárního Ycf1p, společně s kterým zprostředkovává rezistenci ke kadmii aktivním transportem kadmium-glutathionových komplexů\*. Na rozdíl od něj má však TMD na N'-konci (typickou pro MRP proteiny) menší. Tato doména zřejmě hraje roli v lokalizaci proteinu [18], neboť Yor1p se vyskytuje v plazmatické membráně, čímž se liší od všech ostatních transportérů podobných MRP v kvasince, jež se nacházejí ve vakuolární membráně. Jeho exprese je pod kontrolou Pdr1p/Pdr3p a Yrr1p (oproti Ycf1p, který je pod kontrolou Yap1p) [20].

V NBD1, v pozici 670 je umístěn fenylalanin, který je klíčový pro jeho funkci. Jeho delece vede k hromadění nestabilní varianty v endoplazmatickém retikulu a neschopnosti zprostředkovat rezistenci na oligomocin [18], podobně jako v jeho lidském analogu CFTR [54]. Jeho ATPázová aktivita *in vitro* je 15x nižší než u Pdr5p a je inhibována vanadátem.

Pdr10p: Je velmi blízký homolog Pdr5p, s 66% analogií. Má nízkou vegetativní expresi kontrolovanou Pdr1p a Pdr3p [102], je indukován stresem. Zatím nebyl identifikován žádný substrát této pumpy [3, 13, 54].

Pdr12p: Je blízký homolog Snq2p s 60% identitou [13] a Pdr5p (> 37 % AK), avšak má odlišnou substrátovou specifitu. Jeho úkolem je zajištění rezistence buněk vůči slabým organickým kyselinám (s délkou alifatického řetězce < C<sub>7</sub>), sekretovaným kompetitivními organizmy sdílejícími s kvasinkou životní prostor a často používaným také jako konzervační látky v potravinářském průmyslu (jmenovitě kyselina sorbová, benzoová či propionová). V prostředí s nižším pH se tyto látky dostávají v nedisociované formě do buněk pasivní difuzí přes membránu, uvnitř buněk v důsledku

---

\* pozn: glutathion je rozpustný tripeptid, který spontánně tvoří komplexy s kadmii, jeho syntéza je spouštěna přítomností kadmia [20]

vyššího pH disociují a uvolňují proton, čímž okyselují vnitřní prostředí, což vede k inhibici nezbytných metabolických pochodů (např. glykolýzy). Některé studie předpokládají, že při ukončení lag fáze musí intracelulární pH přesáhnout určitou prahovou hodnotu a účinek slabých kyselin tak může výrazně prodloužit tuto fázi [103, 104].

Přítomnost slabých kyselin v růstovém médiu vede k aktivaci více než 100 genů [105], dochází ke zvýšení aktivity  $H^+$ -ATPasy Pma1p a (mimo jiné) k indukci exprese dvou membránových proteinů, malého heat-shock proteinu Hsp30p regulujícího aktivitu  $H^+$ -ATPasy a transportéru Pdr12p, jehož indukce je extrémně rychlá – v řádu několika minut je její úroveň srovnatelná s úrovní nejčtetnějšího membránového proteinu, již zmíněného Pma1p [73]. Naopak v nepřítomnosti těchto kyselin je hladina tohoto proteinu velmi nízká a jeho bazální uroveň je pod kontrolou sítě PDR (Pdr1p a Pdr3p působí jako represory [44]). Úroveň jeho aktivity je dále negativně regulována  $Ca^{2+}$ -kalmmodulin-dependentní proteinkinázou Cmk1p [2, 12, 105 - 107].

Pdr15p: Jeho funkce není zcela prozkoumána, uplatňuje se v rezistenci vůči chloramfenikolu a polyoxyethylen 9-lauryletheru. Je silně indukován v přítomnosti látek poškozujících membránu (různé detergenty, lyzo-fosfolipidy), k nimž zvyšuje toleranci, což vede k úvahám o jeho možné účasti při odstraňování poškozených membránových lipidů [18, 3].

Jeho exprese je pod kontrolou Pdr1p a Pdr3p, na rozdíl od jeho nejbližšího homologu Pdr5p (74 % na úrovni AK [3]) jeho aktivita narůstá s koncem exponenciální fáze. Rozdílem je i to, že je silně indukován různými stresovými faktory, např. tepelným šokem, hladověním, nízkým pH, slabými kyselinami nebo vysokou osmolaritou. Indukce jeho exprese se obejde bez regulačních faktorů Pdr1p/Pdr3p, ale vyžaduje přítomnost obecného stresového faktoru Msn2p, který působí přímo na promotor Pdr15 [3, 13, 109].

Pdr11p a Aus1p: Jejich funkcí je transport exogenních sterolů při snížené endogenní biosyntéze, například během anaerobního růstu. Pravděpodobně zprostředkovávají nevezikulární přenos exogenního sterolu z plazmatické membrány do endoplazmatického retikula [109].

Úroveň Aus1p je zvýšena během vystavení účinku azolu, což by mohlo ukazovat na jeho schopnost transportovat léčiva. Jiná možnost je, že zabraňuje abnormálnímu rozložení lipidů v plazmatické membráně, ke kterému dochází při použití azolových léčiv v důsledku absence ergosterolu [3, 13, 18]

#### **2.2.1.4. Vakuolární ABC transportéry (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Hlavním úkolem kvasinkových MRP/CFTR proteinů je vakuolární sekvestrace toxických látek, těžkých kovů, metabolitů a xenobiotik, a slouží jako vnitřní, druhá obranná linie buněk.

Ycf1p: Zajišťuje detoxikaci buněk sekvestrací těžkých kovů a glutathion-S konjugátů (na které se vážou těžké kovy) do vakuoly, dále zprostředkovává diazaborinovou a arzenitovou rezistenci [91]. Protein Ycf1p je kvasinkovým orthologem lidského MRP1 (43% identita na úrovni AK) a MRP2, proteinů účastnících se fenotypu MDR nádorových buněk. Organizace domén zahrnuje regulační doménu (R-doménu) přítomnou v rodině CFTR, stejně tak jako NTE doménu typickou pro rodinu MRP. Doména NTE je nutná pro membránovou lokalizaci (viz kap 2.2.1.3) a o tom, že R-doména má funkci regulační, hovoří nutná fosforylace dvou jejích AK zbytků (Ser908 a Thr911) pro kadmiovou rezistenci [2, 13].

Bpt1p: Blízký homolog Ycf1p, taktéž se podílí na kadmiové detoxikaci a transportuje GS-konjugáty a volný glutathion.

Ybt1p: Substrátem tohoto transporteru jsou žlučové kyseliny a jeho funkce je pravděpodobně sekvestrace fungálních detergentů podobných žlučovým kyselinám a prevence před zhroucením membrány [13, 18].

#### **2.2.1.5. Ostatní ABC proteiny (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Mitochondriální membrána obsahuje tři ABC proteiny, Atm1p, Mdl1p a Mdl2p, přičemž všechny mají poloviční počet domén. První z nich transportuje z mitochondrií Fe/S klastry, prekursorů cytozolických (nikoliv mitochondriálních) Fe/S proteinů a funguje jako homodimer. Mutace v NBD vede ke snížení dimerové stability, delece ATM1 vede k neschopnosti růstu na nefermentovatelných zdrojích uhlíku.

Mdl1p tvoří také dimer a transportuje mitochondriální peptidy vzniklé při proteolýze proteinů z vnitřní mitochondriální membrány, a může hrát i roli při regulaci buněčné odolnosti vůči oxidativnímu stresu. Mdl2p se nepodílí na transportu peptidů a jeho funkce je zatím nejasná.

V membráně peroxizomů jsou lokalizovány dva ABC transportéry: Pxa1p a Pxa2p, poloviční ABC proteiny patřící do rodiny ALDp. Oba jsou homologní k lidskému Pmp70p, jehož dysfunkce vede ke smrtelné neurodegenerativní poruše adrenoleukodystrofií. Jsou blízce homologní také k lidskému ALDp, který je spojen s Zellwegerovým syndromem. Obě nemoci souvisejí s defektem peroxizomální funkce [13].

Kvasinky bez těchto pump nejsou schopné růst na médiích, kde jako zdroj uhlíku slouží mastné kyseliny (např. palmitová či olejová) a jejich funkce bude zřejmě spojená s peroxizomálním importem dlouhých řetězců mastných kyselin určených pro  $\beta$ -oxidaci. Jinou možností je, že fungují jako acyl-CoA flipáza.

ABC proteiny rodiny YEF3 a RLI nemají TMD, a nevyskytují se tudíž v membránách. Nejvíce studované byly Yef3p a Gcn20p. Yef3p funguje jako translační elongační faktor asociovaný s ribozomem a je pro buňku esenciální. ABC protein Gcn20p zřejmě reguluje utilizaci aminokyselin [13].

### 2.2.2. MDR u jiných kvasinek

Nejen kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ale pochopitelně i další druhy kvasinek mají ve své genetické výbavě ABC transportéry. U *Schizosaccharomyces pombe* bylo objeveno šest genů kódujících ABC transportéry a u dvou z nich byl prokázán podíl na fenotypu MDR (geny PMD1 a BFR1/HBA2). Rezistenci ke kadmii zprostředkovanou transportem komplexů fytochelatin- $\text{Cd}^{2+}$  do vakuol zajišťuje produkt genu HMT1. Transportér Mam1p sekretuje párový feromon M-faktor, stejně tak jako jeho homolog Ste6p v *S. cerevisiae*, který je schopen v  $\Delta\text{mam1}$  (sterilní fenotyp) jeho funkci nahradit [13, 27, 110].

V genomu klinicky významné kvasinky *Candida albicans* bylo identifikováno šest genů [111] kódujících ABC transportéry. Výskyt fenotypu MDR u této kvasinky je obzvláště problémová záležitost, neboť patogenní *C. albicans* způsobuje závažná infekční onemocnění a u osob s oslabeným imunitním systémem, jakými jsou například pacienti po transplantaci některého orgánu či HIV pozitivní pacienti, může být až život

ohrožující. Při léčbě jsou běžně používána antimykotická léčiva, z nichž mnohá (flukonazol, allylamin, morfolin, terbinafin, amorolfin) jsou substrátem některé ze dvou z 84 % homologních pump – Cdr1p (1995 [112]) a/nebo Cdr2p (1997 [113]), stejně tak jako další metabolické inhibitory. Cdr1p byl prvním MDR transportérem izolovaným z patogenní kvasinky a má stejnou topologii jako Pdr5p, již je strukturně i funkčně podobný, s drobnými rozdíly v substrátech (např. obě pumpy transportují cykloheximid a chloramfenikol, ale Cdr1p navíc mitochondriální inhibitor oligomycin). Obě pumpy (Cdr1p a Cdr2p) vykazují flopázovou aktivitu, která je inhibována flukonazolem či cykloheximidem, lze tedy uvažovat, že vazebné místo pro fosfolipidy bude společné s vazebným místem pro léčiva. Fosfolipidovou translokační aktivitu vykazuje i další ABC transportér Cdr3p, avšak oproti Cdr1p a Cdr2p působí opačným směrem (flipázová aktivita), což bývá dáváno do souvislosti s jeho neschopností vypuzovat léčiva [3, 12, 13, 16, 111, 114]. Stejně jako u *S. cerevisiae* i u *C. albicans* se v MDR uplatňují i MFS transportéry. Na základě rezistence k benomylu (tubulin-binding agent) a methotrexátu byl objeven gen CaMDR1, homologní k FLR1 a gen FLU1 zprostředkující rezistenci k flukonazolu.

MDR transportéry byly nalezeny i u dalších patogenních kvasinek, jako je *Candida glabrata* (CgCDR1 a CgCDR2, homology k CDR1, respektive CDR2 [115 - 117] a dále v azolové rezistenci se uplatňující PDH1, 72% homolog PDR5 [13]). Obdobně byly v *Candida dubliniensis* objeveny geny CdCDR1 a CdCDR2 [1, 115, 118 - 119].

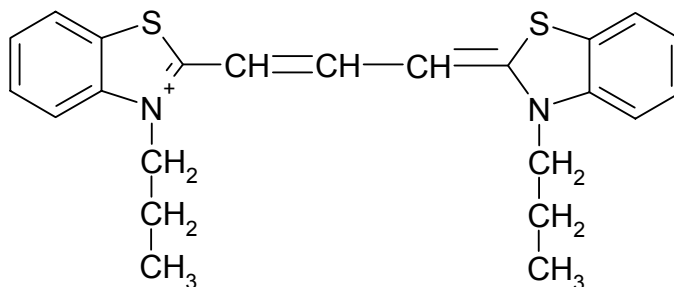
### 3. Studium MDR transportérů

MDR transportéry lze studovat z různých úhlů pohledu na různé úrovni a byla vyvinuta řada metod umožňujících poznávat jejich strukturně-funkční vztahy, regulaci jejich exprese, jejich substrátovou specifitu a fyziologické funkce [3].

Nemalá pozornost je věnována studiu jejich interakcí se substráty, a především s látkami modulujícími jejich aktivitu. K tomu je zapotřebí vhodným způsobem sledovat změnu jejich transportní aktivity. Většina metod, které umožňují tyto změny sledovat, je založena na porovnání akumulace zvolené referenční testovací látky, tzv. „benchmark“ substrátu, uvnitř buněk, popřípadě membránových vezikul, vystavených testované látce, a kontrolních vzorků. Nižší intracelulární (resp. intravezikulární) koncentrace u vzorků s testovanou látkou indikuje nižší aktivitu pump a naopak. Míra akumulace testovací látky může být pak stanovena různými postupy: na úrovni přežívání buněk zónovými nebo výsevovými testy (cykloheximid, cerulenin [120], nigericin) či stanovením pomocí radioaktivity (např. [<sup>3</sup>H]-chloramfenikol [121, 3H]-tritylimidazol [99]), anebo fluorescence (rhodamin [82], DiOC6 [65], fluorescein, doxorubicin, etidium bromid). Mnoho těchto metod má své nedostatky. Zónové a výsevové testy jsou zdlouhavé a neumožňují tak sledování okamžitých změn v aktivitě pump. Navíc testované látky mohou interagovat s agarem, což ztěžuje nebo přímo vylučuje jejich použití. Údaje o kinetickém chování byly často získány na zjednodušených systémech (membránových váčcích), bez kontextu s chováním celé buňky, anebo za zcela nefyziologických podmínek, dlouhodobou inkubací s vysokými koncentracemi testovací látky (například rhodaminu 6G).

Velmi slibnou se jeví metoda použitá a dále rozvíjená v předkládané dizertační práci, která jako testovací substrát („benchmark substrate“) využívá redistribuční potenciometrickou fluorescenční sondu diS-C<sub>3</sub>(3) (obr. 3.1). Sonda diS-C<sub>3</sub>(3) je kladně nabitá lipofilní molekula, která snadno proniká membránou do buněk. Díky náboji je její intracelulární koncentrace řízená membránovým potenciálem a po dosažení rovnováhy je poměr koncentrací dán Nernstovou rovnicí. Uvnitř buněk se sonda reverzibilně váže na vnitrobuněčné komponenty za současné změny svých spektrálních vlastností, čehož se dá vhodně využít pro její detekci. Jsou-li v membráně buněk přítomny funkční transportéry Pdr5p a/nebo Snq2p, je jimi sonda z buněk aktivně odstraňována. Výsledkem je nová, nižší intracelulární koncentrace sondy, která odráží

jednak velikost membránového potenciálu a jednak aktivitu těchto pump, a to za fyziologických podmínek a v reálném čase [85, 122] .



**Obr. 3.1: Strukturní vzorec fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3)**



# Materiál a metody

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Chemikálie a zásobní roztoky

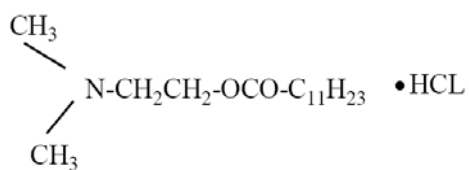
Pepton, glukóza, nigericin (NIG) a camptothecin pocházely od firmy Sigma-Aldrich; kvasničný extrakt a N,N-dimethylformamid (DMF) od firmy Fluka; agar od firmy Roth; kyselina citronová, glycerol a ethanol od firmy Lachema Brno; hydrogenfosforečnan sodný od firmy Lach-Ner; dezinfekční činidla Genamin CS302D, benzalkoniumchlorid (BAC), fenoxxyethanol (PHE) a lonzabac (LON) od firmy Schülke und Mayr, Norderstedt, SRN; FK506 a rapamycin od firmy LC Laboratories; enniatin B od firmy Alexis Biochemicals, 4-nitrochinolin 1-oxid (4-NQO) od firmy Supelco; 3-Propyl-2-[3-[3-propyl-2(3H)benzothiazolyliden]-1-propenyl] benzothiazolium jodid (diS-C<sub>3</sub>(3)) od firmy Molecular probes. Lyzozomotropní látky DM-11 a MRG-12 byly syntetizovány skupinou prof. Witeka (Wroclaw). Na obr. 4.1 jsou znázorněny strukturní vzorce vybraných látek. Tabulka 4.1 uvádí koncentrace zásobních roztoků, typ rozpouštědla a teploty, při kterých byly skladovány.

**Tab. 4.1:** Zásobní roztoky chemikálií

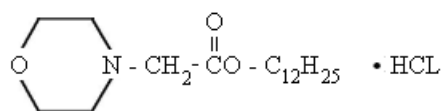
Chemikálie	Rozpouštědlo	Koncentrace	T [°C]
glukóza	H <sub>2</sub> O	40 % (m/m)	4
BAC	H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v)	4
Genamin CS302D	ethanol*	10 % (v/v)	4
Lonzabac 12.100	H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v)	4
2-Fenoxxyethanol	ethanol*	10 % (v/v)	4
DM-11	H <sub>2</sub> O	50 μM	4
MRG 12	ethanol*	30 a 3 mM	-20
diS-C <sub>3</sub> (3)	ethanol*	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup> M	-20
CCCP	DMF	10 mM	-20
Nigericin	ethanol*	20 μM	-20
Rapamycin	ethanol*	30 a 3 mM	-20
Enniatin	DMSO	3 mM	4
4-NQO	DMF	30 a 3 mM	4
FK506	ethanol*	30 a 3 mM	-20
C-P pufr†	H <sub>2</sub> O	10 mM	4

\* ethanol pro UV spektroskopii

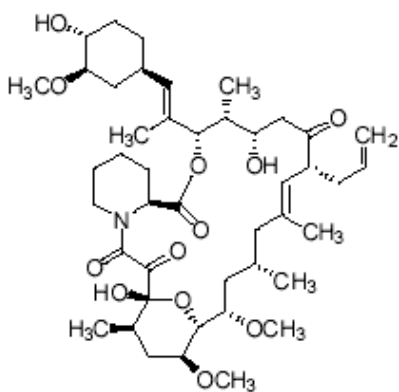
† viz kap. 4.2



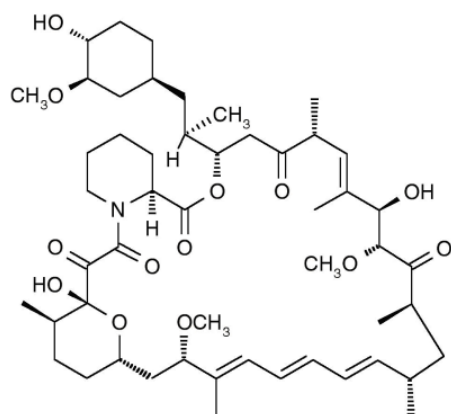
DM-11



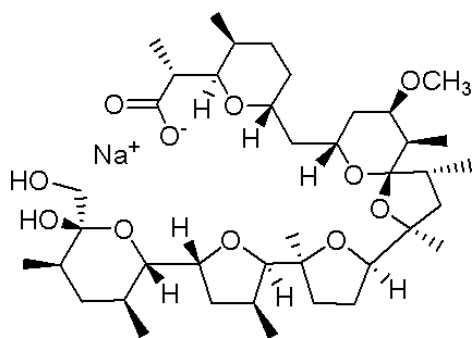
MRG-12



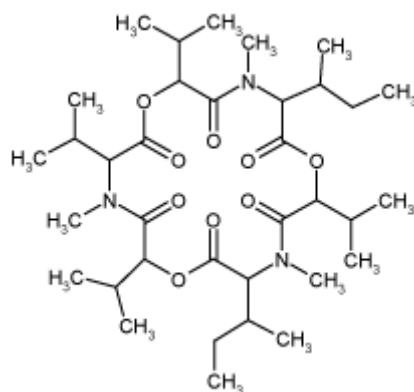
FK506



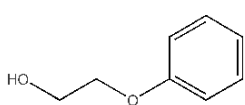
Rapamycin



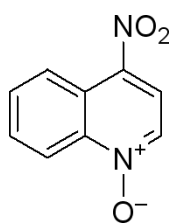
Nigericin (NIG)



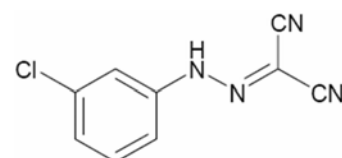
Enniatin B



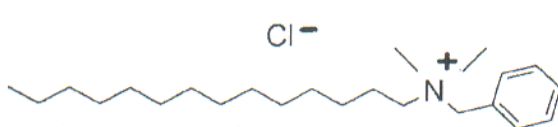
2-Fenoxyethanol



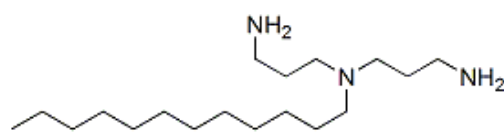
4-NQO



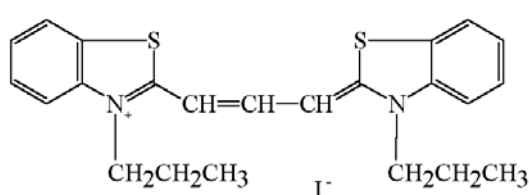
CCCP



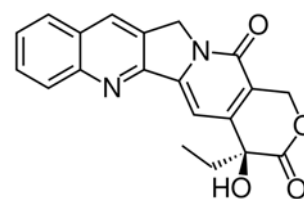
BAC



Lonzabac 12.100



diS-C3(3)



Camptothecin

Obr. 4.1: Strukturní vzorce vybraných látek.

## 4.2. Roztoky a kultivační média

### Kultivační médium YEP:

kvasničný extrakt.....	10 g
pepton.....	10 g
destilovaná voda.....	1000 ml

### Zamrazovací médium:

glycerol.....	60 g
glukóza.....	10 g
kvasničný extrakt.....	2 g
pepton.....	1 g
destilovaná voda.....	100 ml

### YPD agar

kvasničný extrakt.....	10 g
pepton.....	10 g
agar.....	10 g
glukóza.....	20 g
destilovaná voda.....	1000 ml

### YPGE agar

kvasničný extrakt.....	10 g
pepton.....	10 g
agar.....	10 g
glycerol.....	20 g
ethanol.....	10 g
destilovaná voda.....	1000 ml

### YPG agar

kvasničný extrakt.....	10 g
pepton.....	10 g
agar.....	10/20 g
glycerol.....	20 g
destilovaná voda.....	1000 ml

### Citrát-fosfátový (C-P) pufr

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O.....	3,6 g
destilovaná voda.....	1000 ml
titrováno kys. citronovou na požadované pH (měřeno pH metrem Delta 350, Mettler Toledo).	

### 4.3. Použité kvasinkové kmeny

Měření byla prováděna na kmenech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* DTXII ze sbírky katedry mikrobiologie a genetiky PřF UK a dále na kmenech *Saccharomyces cerevisiae* US50–18C, AD12, AD13, AD23, a AD1–3, které pocházejí ze sbírky UCL\*, viz tabulka 4.2:

**Tab. 4.2:** Přehled použitých kvasinkových kmenů *S. cerevisiae*

Kmen	Genotyp
US50-18C	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR 1-3, ura3, his1</i>
AD12	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR 1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, snq2<math>\Delta</math>::hisG</i>
AD13	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR 1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>
AD23	<i>Mat<math>\alpha</math>, PDR 1-3, ura3, his1, snq2<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>
AD1-3	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR 1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, snq2<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>
DTXII	divoký kmen

### 4.4. Udržování zásobních kultur a příprava buněk pro experiment

Kvasinkové kultury byly uchovávány při teplotě -80 °C v zamrazovacím médiu. Odtud byly přeneseny sterilní kličkou na YPG agar a inkubovány 2 dny při teplotě 30 °C (inkubátor Raven 2). Agarové misky s narostlou kulturou byly uchovávány při teplotě 5 °C maximálně jeden měsíc. Z agarové misky bylo odebráno malé množství ( $\sim 10^7$ ) buněk sterilní kličkou a přeneseno do 10 ml kultivačního média YEP s 2 % glukózou (0,5 ml 40 % zásobního roztoku do 10 ml YEP). Buňky byly poté aerobně kultivovány v reciproké třepací lázni (GFL 1083) při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Z takto vzniklého inokula byl zaočkován do čerstvého YEP média s 2% glukózou takový objem buněk, aby výsledná koncentrace buněk byla  $2,5 \cdot 10^6$  buněk na ml, čemuž odpovídá optická hustota (při  $\lambda = 578$  nm)  $O.D._{578} = 0,1$ . Kvasinky byly kultivovány v třepací lázni při 30 °C po různě dlouhou dobu, v závislosti na požadované fázi růstu. Pro další měření byla narostlá kultura dvakrát promyta vodou a resuspendována v C-P pufru o pH = 6 na výslednou  $O.D._{578} = 0,1$ .

\* UCL — *Université catholique de Louvain, Faculté des sciences agronomiques, Louvain-la-Neuve, Belgique*

#### 4.5. Výsevový test

Buňky testovaných kmenů narostlé do požadované fáze růstu byly dvakrát promyty v destilované vodě a resuspendovány ve 3 ml sterilního C-P pufru (pH = 6) na výsledné  $O.D._{578} = 0.1$ . Do vzorku byla přidána testovaná látka o dané koncentraci a po promíchání byly buňky se stresorem inkubovány definovanou dobu při pokojové teplotě za občasného promíchání. Buněčná suspenze byla dále 100x naředěna ve sterilní destilované vodě. Pro výsev bylo odebráno 10  $\mu$ l, nanášeno na misku s 1% YPD agarem a rozetřeno sterilní kličkou. Misky byly kultivovány 2 dny při 30 °C. Výsledný počet narostlých kvasinkových kolonií byl vztažen k počtu kolonií na kontrolním vzorku.

#### 4.6. Zónový test

Buňky testovaných kmenů narostlé do požadované fáze růstu byly dvakrát promyty v destilované vodě a resuspendovány ve sterilním C-P pufru (pH = 6). Do 1% YPD nebo YPGE „krycího“ agaru byl přidán takový objem resuspendovaných buněk v pufru, aby výsledná koncentrace buněk v agaru byla  $2,5 \cdot 10^6$  buněk na ml. Na připravenou agarovou plotnu s pevným 2% YPG agarem byl nanášen 1% agar vychlazený na teplotu 45 °C se zaočkovanou kulturou. Po zatuhnutí a vysušení byla na povrch agaru umístěna sterilní papírová kolečka (vyrobena z filtračního papíru Watman 300g/m<sup>2</sup>), na která byly nanášeny 2  $\mu$ l testované látky. Misky byly kultivovány 2 dny při teplotě 30 °C a poté byly vyfotografovány. Současně byla změřena velikost zóny inhibice růstu buněk kolem koleček. Při dvousubstrátových testech, ve kterých bylo sledováno, zda daná látka inhibuje transportní aktivitu některé ze studovaných pump, byl na stejné kolečko spolu se studovanou látkou přidán známý substrát dané pumpy (v případě Pdr5p a Yor1p nigericin, u Snq2p pak 4-NQO). Při aplikaci byl mezi přidáním první a druhé látky dodržen 15minutový časový odstup.

#### 4.7. Měření barvení buněk fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3) – metoda barvicích křivek

Kladně nabitá fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3) snadno prochází plazmatickou membránou a u buněk, u kterých je aktivita pump Pdr5p a/nebo Snq2p nulová, je jak její vstup, tak rovnovážná intracelulární koncentrace dána velikostí membránového potenciálu. Intracelulární koncentrace u buněk s aktivními pumpami je i přes jejich stejně vysoký membránový potenciál jako u bezpumpových kmenů velmi nízká v důsledku aktivního odstraňování sondy těmito pumpami z cytozolu.

Uvnitř buněk sonda interaguje s cytosolickými komponentami za současné změny spektrálních parametrů (vázaná sonda má spektrum posunuto o cca 10 nm směrem do červena a má větší kvantový výtěžek viz obr. 4.2 A). Naměřená spektra buněčné suspenze sestávají z příspěvku volné a vázané sondy a jejich proporce korespondují s jejich koncentracemi. Při vhodné volbě koncentrací a vlnových délek tak lze detegovat změny v koncentraci sondy v buňce pomocí změn polohy a velikosti maxima měřeného spektra. [122, 123]

Barvicí křivkou rozumíme závislost polohy maxima ( $\lambda_{\max}$ ) nebo intenzity ( $I_{\max}$ ) fluorescenčního signálu ze vzorku na čase od přidání fluorescenční sondy k buněčné suspenzi (obr. 4.2 B).

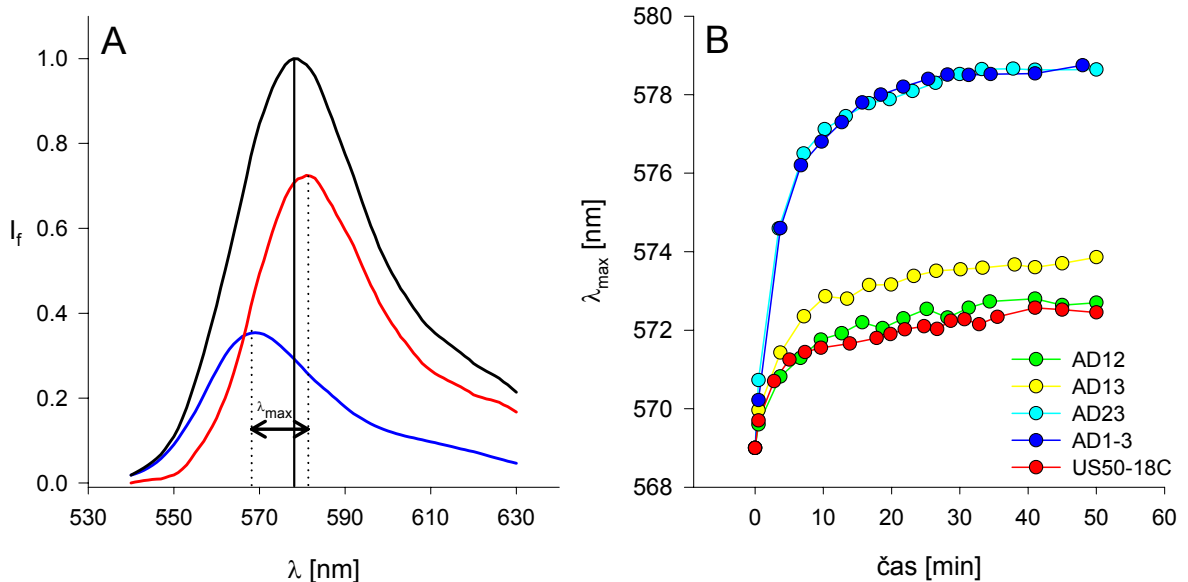
Účinek stresorů (inhibitorů) byl studován na základě porovnání barvicích křivek kontrolních vzorků a buněk ovlivněných danou látkou. Metoda barvicích křivek byla použita ve dvou různých módech:

- 1) přidání stresoru 10 minut před začátkem měření barvicí křivky
- 2) přidání stresoru k obarveným buňkám (obvyklý čas přidání 20. minuta)

Experimenty (není-li uvedeno jinak) byly prováděny za občasného míchání při pokojové teplotě s výslednou koncentrací fluorescenční sondy ve vzorku  $2 \cdot 10^{-8}$  M. Fluorescenční spektra byla měřena na spektrofluorimetru FluoroMax 3 (Jobin-Yvon). Excitační vlnová délka byla nastavena na 531 nm, emisní spektrum bylo měřeno v rozsahu 560—590 nm. Velikost šěrbin byla nastavena na 10 nm a při měření byl použit emisní filtr (cut off 540 nm) k eliminaci rozptýleného záření.

Obsluhu spektrofluometru zajišťoval program DataMax. Pro případ některých rutinních měření byl v rámci práce naprogramován skript, který všechny kroky

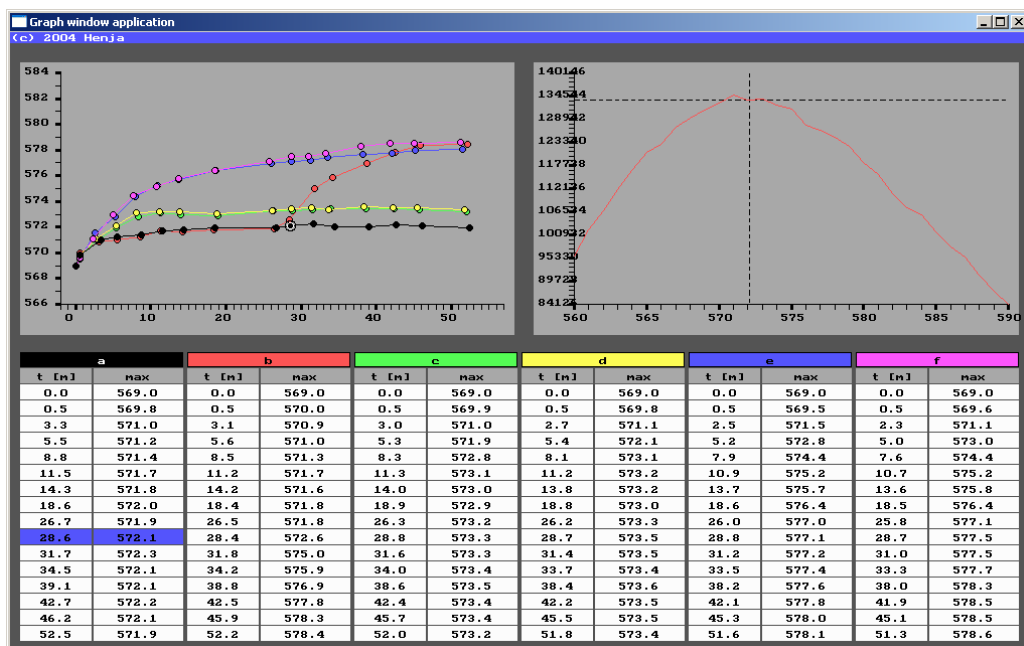
při měření automatizoval a naměřená spektra třídil podle jednotlivých vzorků a ukládal v chronologickém pořadí podle času změření.



**Obr. 4.2: Fluorescenční měření se sondou diS-C<sub>3</sub>(3)**

(A): Emisní spektra sondy diS-C<sub>3</sub>(3): spektrum volné sondy v C-P pufru (modrá), spektrum sondy v suspenzi buněk v C-P pufru (černá) a spektrum vázané sondy (červená) vypočtené odečtem spektra volné sondy od spektra sondy naměřeného ze suspenze buněk.

(B): Barvicí křivky kmenů **AD12**, **AD13**, **AD23**, **AD1-3** a **US50-18C** v exponenciální fázi růstu.



**Obr. 4.3: Program pro zpracování naměřených spekter.**

#### 4.8. Zpracování dat z fluorescenčních měření

Experimentální data byla zpracována pomocí programu HUGO, který byl v rámci dizertační práce speciálně pro tyto účely vyvinut. Ten naměřené spektrum proloží polynomem 3. stupně metodou nejmenších čtverců, vyloučí body, které se liší o více než 10 % od naitované hodnoty, okolí maxima ( $\pm 8$  nm) proloží znovu polynomem a z jeho parametrů vypočte maximum. Z takto stanovených hodnot  $\lambda_{\max}$  a  $I_{\max}$  z jednotlivých po sobě jdoucích spekter pak sestaví barvicí křivky. Program umožňuje zpracování až 8 barvicích křivek najednou, přičemž lze prohlížet a editovat jednotlivá spektra s možností ručních oprav vypočtených maxim (obr. 4.3).



# VÝSLEDKY A DISKUZE

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Specifikace úkolů dizertační práce

Rezistence buněk vůči používaným antibiotikům, dezinfektantům či biocidům představuje vážný problém při odstraňování mikrobiálních kontaminací stejně tak jako při léčbě rakoviny. Mikroorganismy (jak prokaryontní, tak eukaryontní) anebo rakovinné buňky si, především v důsledku výrazného zvýšení aplikace antibiotik v průběhu minulého století a s tím spojené selekce rezistentních kmenů, vybudovaly imunitu vůči řadě léčiv s odlišnou strukturou a funkcí účinku. Tento fenomén zvaný MDR (multidrug resistance) je spojen s aktivním transportem léčiv ven z buněk zprostředkovaným transmembránovými proteiny z rodiny ABC transportérů. Abychom mohli efektivně překonat rezistenci, je zapotřebí vyvinout nové léky, které nejsou substráty MDR pump nebo nalézt jejich inhibitory, jež by mohly být aplikovány společně s konvenčními chemoterapeutiky, jejichž účinek byl díky MDR snížen.

Předkládaná dizertační práce navazuje na výsledky získané v předchozích dizertačních pracích na školicím pracovišti a věnuje se studiu interakce chemických látek s kvasinkovými MDR pumpami a jejich dalším účinkům na buňku.

Hlavním cílem první části byl vývoj metody, která umožňuje rychlé a jednoduché stanovení míry poškození buněk vlivem chemického stresu, tj. od pouhého ovlivnění membránového potenciálu (= depolarizace) až po permeabilizaci buněčné membrány. V této části práce jsme se soustředili zejména na objasnění následujících otázek:

- Jak se liší barvicí křivky depolarizovaných a permeabilizovaných buněk od buněk intaktních?
- Jak se projeví v barvicích křivkách postupné narůstání frakce permeabilizovaných nebo depolarizovaných buněk a jak tento jev diagnostikovat?
- Jakým způsobem se projeví účinek některých běžně používaných biocidů na barvení buněk, zda je možné charakterizovat, v jaké fázi poškození se buňky nacházejí (intaktní, depolarizované nebo permeabilizované)?

- Jakým způsobem informace získaná pomocí rychlého fluorescenčních měření krátkodobého působení biocidů souvisí s jejich dlouhodobým účinkem a vlivem na přežívání buněk?

Druhá část je věnována rozšíření a modifikaci měřicího protokolu tak, aby bylo možné současně sledovat i účinek těchto látek na dvě hlavní MDR pumpy kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, pumpy Pdr5p a Snq2p. Aby bylo možné odlišit vliv stresorů na membránový potenciál od vlivu na transportní aktivitu dané pumpy, bylo zapotřebí použít soupravu 5 izogenních kmenů, které se liší přítomností jednotlivých pump, viz kapitola 4.3. Nezbytnými kroky této části práce bylo:

- ukázat citlivost metody pomocí barvení buněk vystavených účinku známého inhibitoru pump,
- nalézt diagnostický nástroj, který odliší permeabilizaci buněk od inhibice MDR pump.

## 5.2. Vliv chemického stresu na buňky kvasinek *S. cerevisiae*

Přítomnost některých chemických látek v okolním prostředí vyvolává v buňkách stres vedoucí k jejich poškození v různém rozsahu a na různé úrovni. Cílem dezinfekčních látek a léků je zajistit minimální přežití, pokud možno při velmi nízkých koncentracích. U mnoha látek, které se dnes používají k likvidaci mikrobiální kontaminace není znám přesný mechanismus jejich účinku, používají se ve vysokých koncentracích, ve kterých zasahují více míst najednou, s výsledem rozsáhlého poškození buněk. Jejich účinkem často dochází k poškození některých funkcí plazmatické membrány vedoucí ke ztrátě membránového potenciálu, či dokonce k její disrupci.

Jedním z cílů dizertační práce bylo vyvinout a optimalizovat měřicí protokol, který by umožňoval sledovat účinek chemického stresu na integritu membrány tak, aby jej bylo možné použít k snadnému hledání látek, které účinně a rychle poškozují mikrobiální buňky. Zajímalo nás, zda je možné z výsledků získaných pomocí vyvinutého fluorescenčního testu, tj. při krátkodobém působení těchto látek, usuzovat na jejich mikrobicidní účinnost, tj. zda jsou takové informace srovnatelné s informacemi získanými tradičními biologickými metodami, jako je výsevový či zónový test. Použili jsme fluorescenční metodu vyvinutou na školicím pracovišti, která využívá

fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3) (kap. 4.7) vstupující do buněk bez aktivních MDR pump v závislosti na velikosti membránového potenciálu.

Má-li být použita chemická látka skutečně účinná, je zapotřebí, aby poškozovala co možná nejširší spektrum buněk, tj. s různou odolností vůči lékům. Abychom se co nejvíce přiblížili reálné situaci, použili jsme v našich měřeních divoký kmen (*S. cerevisiae* DTXII) nacházející se v post-diauxické fázi růstu, ve které jsou buňky nejvíce odolné vůči chemickému stresu [124]. Nespornou výhodou této fáze je i skutečnost, že u post-diauxických buněk divokých kmenů nejsou pumpy Pdr5p a Snq2p exprimovány [85, 125], tj. nedochází k odstraňování sondy z cytozolu a k narušení přímého vztahu mezi velikostí membránového potenciálu a intracelulární koncentrací sondy. Díky tomu můžeme přímo sledovat účinek dané látky na plazmatickou membránu, neboť z charakteru barvení těchto buněk předem vystavených účinku dané látky lze rozeznat, zda její působení vede k depolarizaci, či dokonce k permeabilizaci membrány.

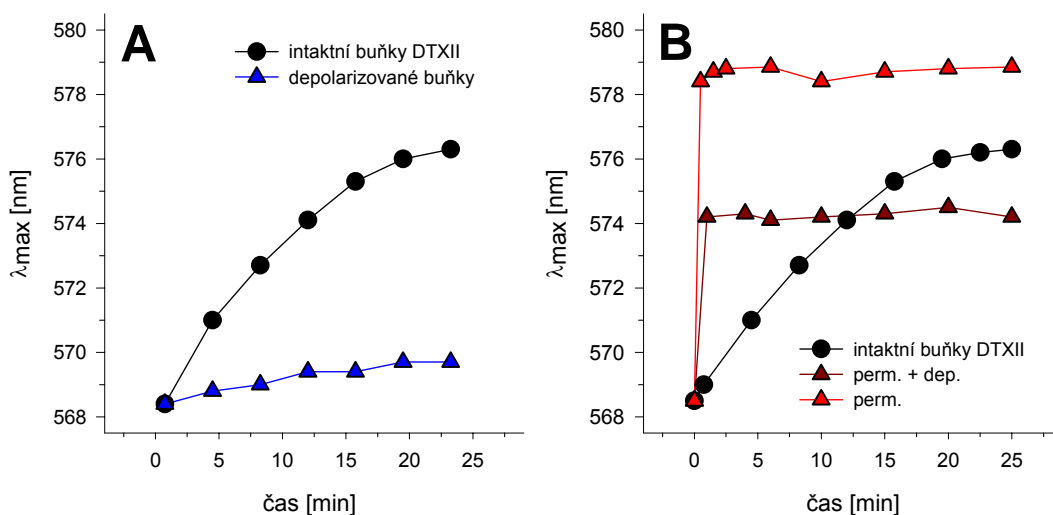
### **5.2.1. Modelové barvicí křivky intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk**

Abychom mohli rutinně interpretovat výsledky fluorescenčních měření a stanovit tak rozsah poškození membrány buněk vlivem chemických stresorů, je třeba od sebe jednoznačně odlišit barvení buněk s různou mírou poškození. Z tohoto důvodu bylo provedeno několik modelových experimentů simulujících situace, ke kterým po přidání stresorů může dojít.

Vstup sondy do buněk, jehož časový průběh je znázorněn barvicí křivkou (viz kap. 4.7), je u intaktních buněk kmene DTXII v post-diauxické fázi růstu řízen velikostí membránového potenciálu a dosahuje rovnovážné hodnoty během 20 minut (obr. 5.1A) a v případě, že jsou buňky depolarizované, je výsledná rovnovážná hodnota barvení úměrně nižší [30, 122]. Například post-diauxické buňky vystavené účinku protonoforu CCCP, který výrazně zvyšuje propustnost membrány pro protony a disipuje tak protonový gradient, se prakticky nebarví (obr. 5.1A), maximum fluorescenčního spektra ze suspenze buněk je srovnatelné s  $\lambda_{\max}$  volné sondy. To znamená, že membrána těchto buněk je úplně depolarizovaná.

V případě permeabilizovaných buněk ztrácí membrána charakter semipermeabilní bariéry, dochází k masivnímu výtoku iontů a membránový potenciál

klesá na nulu. Rovnováhy mezi koncentrací volné sondy uvnitř a vně buněk je dosaženo ve velmi krátkém okamžiku, ale hodnota  $\lambda_{\max}$  neodpovídá  $\lambda_{\max}$  volné sondy. Výtokem iontů dochází ke snížení jejich intracelulární koncentrace, v důsledku čehož se zvýší vazebná kapacita cytozolických komponent pro sondu [124] a maximum fluorescenčního spektra se posune do červené oblasti, jak je patrné na obr. 5.1B. Horní křivka reprezentuje barvení suspenze buněk, ve které jsou všechny buňky permeabilizované. Spodní křivka znázorňuje situaci, kdy je část buněk (20 %) v suspenzi permeabilizována a zbylá část depolarizována. Velikost posunu do červena je úměrná počtu permeabilizovaných buněk v suspenzi (přítomnost depolarizovaných buněk ve směsi  $\lambda_{\max}$  neovlivní).



**Obr. 5.1: Charakter barvicích křivek intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk *S. cer.* DTXII**

(A): Barvicí křivka intaktních buněk (černé symboly) a buněk předem depolarizovaných (modré symboly) pomocí 0,5 mM CCCP. Do 3 ml C-P pufru pH = 6 bylo přidáno 10  $\mu$ l zásobní suspenze buněk.

(B): Rychlý vstup sondy do permeabilizovaných buněk. Světle červené symboly – 10  $\mu$ l zásobní suspenze teplem permeabilizovaných buněk, tmavě červené - 2  $\mu$ l permeabilizovaných a 8  $\mu$ l depolarizovaných buněk. Černé symboly reprezentují barvicí křivku intaktních buněk.

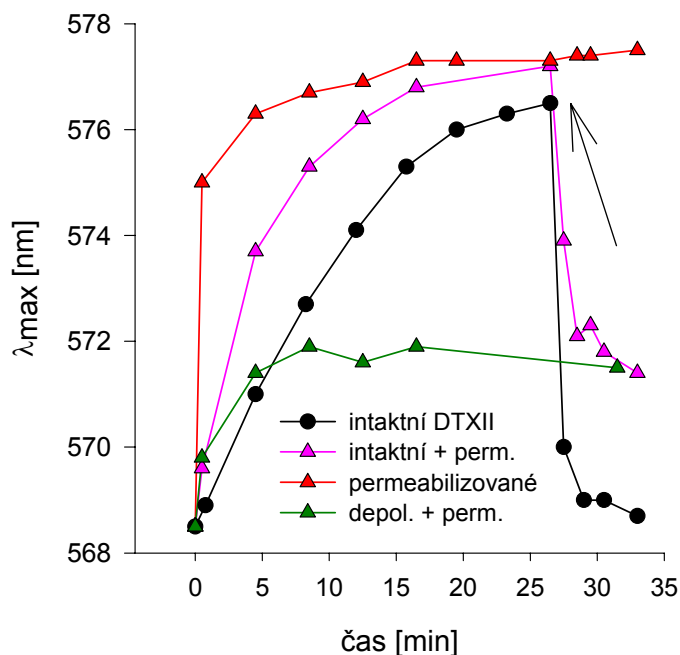
V reálném případě lze nalézt v suspenzi buněk vystavených účinku stresoru buňky ve všech třech stavech – **intaktní**, **depolarizované** a **permeabilizované**. Na obr. 5.2 jsou znázorněny výsledky modelového experimentu, ve kterém jsme použili směs intaktních buněk a buněk předem depolarizovaných (pomocí CCCP) nebo permeabilizovaných teplem v různém zastoupení. V případě, že suspenze obsahuje

intaktní a permeabilizované buňky, dochází bezprostředně po přidání sondy k posunu  $\lambda_{\max}$  do červena v důsledku rychlého vstupu sondy do permeabilizovaných buněk. Velikost tohoto okamžitého posunu  $\lambda_{\max}$  do červena odráží množství permeabilizovaných buněk ve vzorku (porovnej viz obr. 5.1B). Zbylé (intaktní) buňky v suspenzi, které se barví podle  $\Delta\psi$ , způsobují postupné zvyšování  $\lambda_{\max}$  a dosažení rovnovážné hodnoty za obvyklých 20 minut. Pro suspenzi buněk obsahující pouze permeabilizované a depolarizované buňky je charakteristické barvení doprovázené prvotním (okamžitým) nárůstem  $\lambda_{\max}$  (úměrně počtu permeabilizovaných buněk ve vzorku) následovaným slabým nárůstem  $\lambda_{\max}$  odpovídajícím barvení depolarizovaných buněk (jelikož se depolarizované buňky téměř nebarví, je obecně jejich příspěvek k fluorescenčnímu signálu zanedbatelný a je velmi těžké odhadnout jejich množství ve vzorku).

Jako diagnostický nástroj, který umožňuje u post-diauxických buněk rozlišit zastoupení intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk ve vzorku, jsme zvolili protonofor CCCP [122]. Jeho přidání k intaktním post-diauxickým buňkám způsobí pokles  $\lambda_{\max}$  v důsledku depolarizace na úroveň blízkou  $\lambda_{\max}$  volné sondy (obr. 5.2). Oproti tomu, je-li přidán k suspenzi permeabilizovaných či depolarizovaných buněk nebo jejich směsi, nedojde k žádné změně v úrovni barvení. Podle očekávání, v případě směsi permeabilizovaných a intaktních buněk klesne  $\lambda_{\max}$  právě na úroveň odpovídající barvení permeabilizované frakce ve směsi (obr. 5.2).

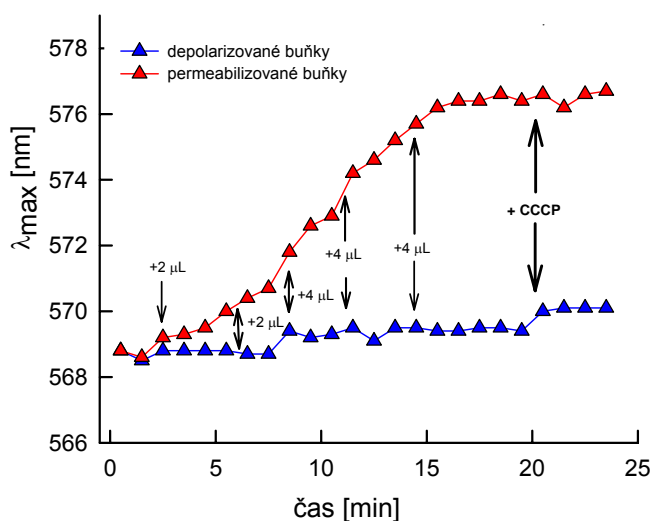
S ohledem na to, že během měření jsou látky, jejichž účinek je zkoumán, stále přítomny ve vzorku, může barvicí křivka odrážet situaci, kdy dochází k postupnému zvyšování počtu permeabilizovaných buněk ve vzorku. Takový případ jsme se pokusili modelovat experimentem na (obr. 5.3), v němž bylo do měřeného vzorku postupně přidáváno malé množství předem depolarizovaných nebo permeabilizovaných buněk. Postupné přidávání depolarizovaných buněk nemá žádný vliv na  $\lambda_{\max}$  fluorescenčního signálu, avšak přidávání permeabilizovaných buněk vedlo podle očekávání k postupnému narůstání  $\lambda_{\max}$ . Tento průběh barvení má obdobný charakter jako barvení intaktních buněk. K odlišení je proto nezbytné použít CCCP – permeabilizované buňky narozdíl od intaktních buněk nereagují na jeho přidání.

Postupnému nárůstu počtu permeabilizovaných buněk ve vzorku lze zabránit odstraněním stresoru z okolního média několikanásobným promytím suspenze. Tento postup pro zastavení účinku po dané době působení stresoru však nelze použít obecně, zásadní roli hraje způsob, jakým daná látka buňky permeabilizuje.



**Obr. 5.2: Barvicí křivky modelových směsí intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk *S. cerevisiae* DTXII**

Černé symboly představují barvení intaktních buněk, červené symboly platí pro buňky permeabilizované teplem, fialové barvení pro vzorek obsahující intaktní a permeabilizované buňky v poměru 7:1 a zelené symboly pro buňky předem depolarizované pomocí 0,1 mM CCCP společně s permeabilizovanými buňkami v poměru 7:1. Šipka označuje čas přidání CCCP ke všem vzorkům s výslednou koncentrací 10  $\mu$ M.



**Obr. 5.3: Simulace nárůstu permeabilizovaných a depolarizovaných buněk v suspenzi během měření**

Červené symboly znázorňují postupné přidávání (po 2 nebo 4  $\mu$ l) teplem permeabilizovaných buněk *S. cerevisiae* DTXII ke 3 ml CP pufru. Modré pak stejným postupem přidávané buňky depolarizované. Ve 20. minutě byl k oběma vzorkům přidán CCCP (tučná šipka).

### 5.2.2. Reakce buněk na krátkodobé působení chemického stresu

Na základě výsledků modelových experimentů jsme analyzovali vliv doporučených koncentrací několika komerčně vyráběných a široce používaných biocidů, které jsou běžně součástí např. dezinfekčních a farmakologických prostředků (ústních vod, očních kapek atd.). Konkrétní biocidy byly vybrány na základě spolupráce s německou firmou Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt a jejich seznam uvádí následující tabulka:

**Tab. 5.1:** Doporučené koncentrace jednotlivých biocidů.

Biocid	DK [% V/V]
<b>Benzalkonium chlorid</b> <i>Kationicky povrchově aktivní kvarterní amoniová látka. Její letální účinek je založen především na detergentním účinku na membránu. [126]</i>	<b>0,050</b>
<b>Genamin CS302D</b> <i>Obdobné účinky jako BAC, taktéž povrchově aktivní kvarterní amoniová látka.</i>	<b>0,030</b>
<b>2-Fenoxyethanol</b> <i>Užívá se jako aseptikum a pro dezinfekci povrchů a nástrojů. Účinek zahrnuje denaturaci cytoplazmatických bílkovin a koagulaci buněčného obsahu. Při nižších koncentracích účinkuje jako <math>K^+/H^+</math> antiporter a odpřahovač oxidativní fosforylace [127].</i>	<b>0,50</b>
<b>Lonzabac 12.100</b> <i>Terciální amin, obdobné užití a účinky jako 2-fenoxyethanol.</i>	<b>0,0050</b>

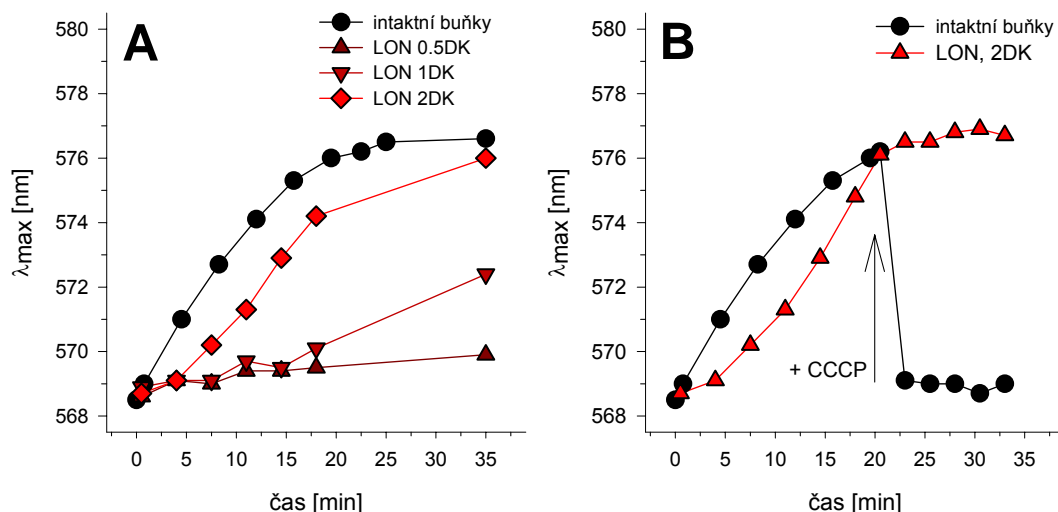
Z principu, na kterém je fluorescenční metoda založena, je zřejmé, že pro stanovení účinku daného biocidu je nutné, aby neinteragoval se sondou, popřípadě sám nebyl spektroskopicky aktivní v rozsahu používaných vlnových délek, neboť zůstává během měření v médiu. V takovém případě by mohlo dojít ke vzniku artefaktů ve fluorescenční odpovědi sondy a poloha maxima by mohla být zkreslena. V případě, že dochází k některému z uvedených jevů, je možné sledovat účinek látky na buňky pouze po jejím odstranění z média před přidáním sondy.

U žádného námi použitého biocidu nedocházelo ke znatelnému ovlivnění spektra sondy ani při použití 2x DK [128] .

#### **Lonzabac**

Při studování účinku Lonzacu byly buňky vystaveny působení několika jeho koncentrací 10 minut před přidáním sondy. Jak je patrné (obr. 5.4A), poloviční dávka doporučené koncentrace (DK) nevede k výraznému poškození (permeabilizaci) buněk, a to ani v průběhu dalších 40 minut během měření, buňky jsou pouze zcela

depolarizovány a  $\lambda_{\max}$  zůstává na úrovni volné sondy. Jiná situace nastává při použití DK a 2x DK – v těchto případech dochází v průběhu měření k nárůstu  $\lambda_{\max}$ , přičemž jeho rychlost a doba, za kterou k němu začne docházet, je závislá na použité koncentraci. Tento průběh barvení díky chybějící odezvě na CCCP ukazuje (obr. 5.4B), že k posunu v  $\lambda_{\max}$  k větším vlnovým délkám dochází v důsledku zvyšujícího se počtu permeabilizovaných buněk ve vzorku.



**Obr. 5.4: Účinek Lonzabacu 12.100**

(A): Buňky *S. cerevisiae* DTXII byly vystaveny působení několika různých koncentrací (0,5, 1 a 2x DK, červené symboly) Lonzabacu 10 minut před přidáním sondy diS-C3(3). Černé symboly představují barvení intaktních buněk

(B): Odpověď intaktních buněk (černě) a buněk vystavených 2x DK (červeně) na přidání CCCP (20. minuta barvení, výsledná koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ).

Koncentrace sondy:  $3 \cdot 10^{-8}$  M diS-C3(3).

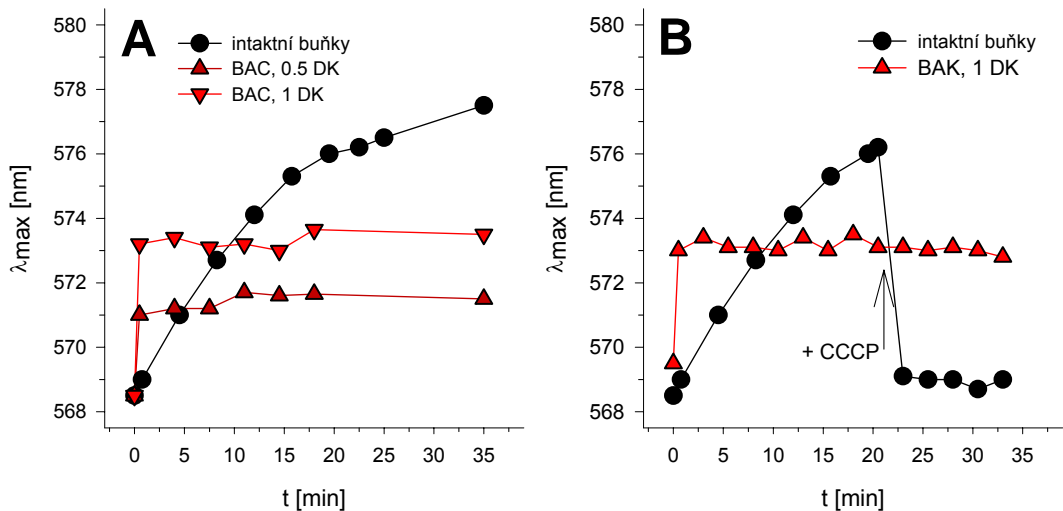
### Benzalkonium chlorid (BAC)

Desetiminutová inkubace buněk s BACem o koncentracích 0,1 DK a DK vede k poškození buněk. Svědčí o tom charakter fluorescenční odpovědi, který je typický pro barvení s různým zastoupením suspenze permeabilizovaných a depolarizovaných buněk – po přidání sondy do vzorku dochází k téměř okamžitému posunu  $\lambda_{\max}$  do červena a přidání protonoforu CCCP nezpůsobuje žádnou změnu v barvení. Výsledná velmi rychle ustavená rovnovážná hladina je posunuta více do červena pro vyšší koncentraci BAC (při zachování koncentrace buněk), což s ohledem na výsledky modelových experimentů znamená, že vzorek obsahuje větší množství permeabilizovaných buněk. Zbylé buňky jsou depolarizované, neboť se nebarví ani



nereagují na CCCP. Z průběhu barvicích křivek je zřejmé, že účinek je okamžitý a v průběhu měření se nemění poměr depolarizovaných a permeabilizovaných buněk ( $\lambda_{\max}$  zůstává konstatní).

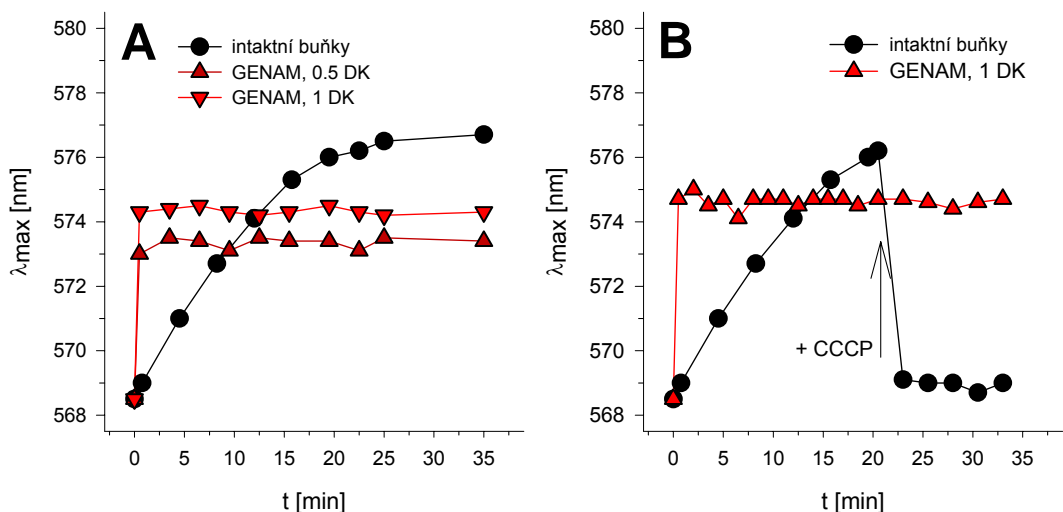
Obdobné výsledky jsme obdrželi také pro Genamin C302D (obr. 5.6).



**Obr. 5.5: Účinek benzalkonium chloridu**

(A): Buňky *S. cerevisiae* DTXII byly vystaveny působení několika různých koncentrací (0,5, 1x DK, červené symboly) BACu 10 minut před přidáním sondy diS-C3(3). Černé symboly představují barvení intaktních buněk.

(B): Odpověď intaktních buněk (černě) a buněk vystavených DK (červeně) na přidání CCCP (20. minuta barvení, výsledná koncentrace 10  $\mu$ M).



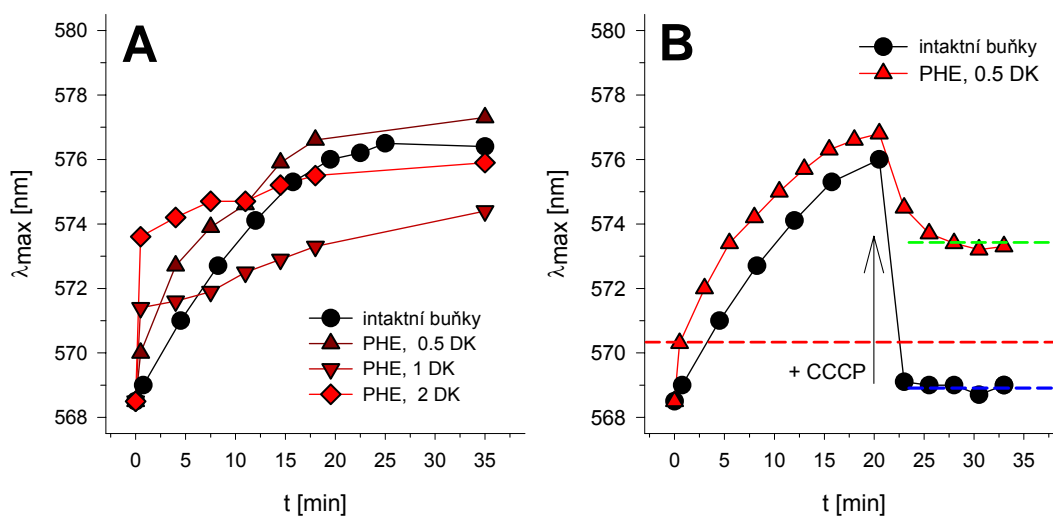
**Obr. 5.6: Účinek Genaminu CS302D**

(A): Buňky *S. cerevisiae* DTXII byly vystaveny působení několika různých koncentrací (0,5 a 1x DK, červené symboly) Genaminu CS302D 10 minut před přidáním sondy diS-C3(3). Černé symboly představují barvení intaktních buněk

(B): Odpověď intaktních buněk (černě) a buněk vystavených DK (červeně) na přidání CCCP (20. minuta barvení, výsledná koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ). Převzato z práce [124].

### 2-Fenoxyethanol

Účinek 2-fenoxyethanolu vede po 10 minutách působení na kvasinky ke vzniku populace permeabilizovaných buněk, jejichž počet je koncentračně závislý a je prezentován rychlým posunem do červena po přidání sondy k suspenzi buněk (obr 5.7A). Následný pomalý nárůst  $\lambda_{\text{max}}$  může znamenat buď postupně se zvyšující počet permeabilizovaných buněk ve vzorku, nebo představuje normální barvení intaktních buněk. Z charakteru reakce na přidání CCCP je zřejmé, že se uplatňují oba efekty. Pokles  $\lambda_{\text{max}}$  po přidání protonoforu k buňkám inkubovaným s 2-fenoxyethanolem v důsledku depolarizačního efektu CCCP svědčí o tom, že ve vzorku jsou i po 40 minutách účinku 2-fenoxyethanolu stále přítomny intaktní buňky, ale jejich počet je menší než na začátku barvení, neboť rovnovážná hodnota  $\lambda_{\text{max}}$  po přidání CCCP je vyšší než hodnota  $\lambda_{\text{max}}$  odrážející počet permeabilizovaných buněk po 10 působení 2-fenoxyethanolu z počátku barvicí křivky (srovnej červenou a zelenou přerušovanou linku na obr. 5.7B)



### Obr. 5.7: Účinek 2-fenoxyethanolu

(A): Buňky *S. cerevisiae* DTXII byly vystaveny působení několika různých koncentrací (0,5, 1 a 2x DK, červené symboly) 2-fenoxyethanolu 10 minut před přidáním sondy diS-C3(3). Černé symboly představují barvení intaktních buněk

(B): Odpověď intaktních buněk (černě) a buněk vystavených 0,5 DK (červeně) na přidání CCCP (20. minuta barvení, výsledná koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ).

Koncentrace sondy:  $3 \cdot 10^{-8}$  M diS-C3(3).

### 5.2.3. Přežívání buněk vystavených působení biocidů, porovnání s výsledky fluorescenčních měření

Výsledky získané pomocí fluorescenční metody (kap. 5.2.1) ukazují, že je možné v reálném čase pozorovat změny, ke kterým dochází na membráně kvasinkových buněk v důsledku působení chemického stresu. Z charakteru fluorescenční odpovědi buněk je možné rozeznat, v jaké fázi poškození se buňky nacházejí (intaktní, depolarizované nebo permeabilizované), přičemž metoda umožňuje sledovat i časové změny poměrů jednotlivých frakcí v suspenzi buněk. Hlavním cílem při optimalizaci fluorescenční metody bylo, aby mohla být použita pro rychlé získání informace o mikrobiocidním účinku dané látky. Zajímalo nás tedy, jestli a jakým způsobem informace získané pomocí krátkého fluorescenčních měření souvisejí s přežíváním buněk. Za tím účelem byly provedeny výsevové testy, s těmito výsledky: 15minutové působení 0,5 DK BACu na post-diauxické buňky *S. cerevisiae* DTXII vedlo k tomu, že nebyly schopny tvořit kolonie. Stejného výsledku bylo dosaženo i při použití Genaminu. Lonzabac byl shodně účinný při použití DK, avšak 0,5 DK vedlo k 33% přežívání buněk. 2-fenoxyethanol vykazoval kompletní smrtící účinek až při koncentraci 2 DK (tab. 5.2). Porovnání těchto výsledků s daty z fluorescenčních měření nás vede k závěru, že nedílnou součástí působení těchto biocidů je depolarizace membrány, která však sama o sobě, není-li dále doprovázena poškozením integrity membrány, není dostatečná k úplnému potlačení růstu buněk (viz Lonzabac 0,5 DK a DK).

**Tab. 5.2:** Inhibice růstu buněk *S. cerevisiae* DTXII vystavených biocidům po dobu 15 minut.

Biocid	Výsledná koncentrace ve vzorku [% V/V]	Přežití buněk [%]
Kontrola	---	100
Benzalkonium chlorid	0,025	0
	<b>0,050</b>	0
Genamin CS302D	0,015	0
	<b>0,030</b>	0
Lonzabac 12.100	0,0025	33
	<b>0,0050</b>	3
2-Fenoxyethanol	0,25	61
	<b>0,50</b>	32
	1,00	0

Buňky byly vysety na YEPD agar a kultivovány 48 hod při 30 °C. Kolonie byly počítány na 3–5 miskách pro každou koncentraci biocidu. Údaje jsou reprezentativní výsledky ze 2 experimentů. Červeně jsou vyznačeny doporučené koncentrace.

### 5.3. Studium účinku chemických stresorů na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p kvasinky *S. cerevisiae*

Jak již bylo zmíněno v úvodu, může být u mnohých látek určených k odstraňování mikrobiální kontaminace, ať už se jedná o léky, nebo dezinfekční přípravky, snížena vnitrobuněčná koncentrace přítomností transmembránových transportních proteinů, které odstraňují cizorodé látky z buněk ven. Nemalé usílí je proto v posledních letech věnováno studiu kinetických vlastností těchto pump a interakcí s látkami modulujícími jejich aktivitu s cílem nalézt vhodný inhibitor, který by v ideálním případě specificky interagoval pouze s cílovým proteinem s minimálními vedlejšími účinky na buňku. Pro vyhledávání potenciálních inhibitorů bylo k dnešnímu dni vyvinuto několik metod založených na obdobném principu. Akumulace daného substrátu těchto pump, u buněk inkubovaných s potenciálním inhibitorem je srovnána s akumulací substrátu u kontroly. Účinek inhibitoru se projeví zvýšenou akumulací substrátu v buňkách oproti kontrolním. Rozdílnou akumulaci v buňkách lze detegovat různými metodami, např. biologickými, jako je výsevový test, pomocí radioaktivně značených látek nebo pomocí intenzity fluorescence, která je úměrná koncentraci. Každá z dosud používaných metod má svá omezení, ani jedna z nich neumožňuje současně stanovit rozsah a způsob inhibice dané látky a její vedlejší účinky.

Námi používaná fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3), která pasivně vstupuje do buněk v závislosti na velikosti membránového potenciálu, je zároveň substrátem dvou hlavních pump kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, pump Pdr5p a Snq2p, které mají do značné míry shodné farmakokinetické vlastnosti s klinicky významnými analogy (Cdr1p a Cdr2p v *Candida albicans* či P-gp v nádorových buňkách). Již dříve byla využita ke studiu aktivity pump, především v závislosti na kultivačních podmínkách, jako je například stáří kultury nebo zdroj živin [84, 85, 129]. Naším cílem bylo ukázat, zda lze tímto způsobem také sledovat aktivitu MDR pump buněk vystavených působení chemických látek, které potenciálně modulují jejich aktivitu.

V experimentech uvedených v předchozí kapitole (kap. 5.2) jsme (záměrně) použili divoký kmen v post-diauxické fázi růstu, u něhož je aktivita pump nulová [84]. To nám umožnilo sledovat vliv chemických látek na viabilitu (permeabilizaci) buněk bez zkreslení výsledků sníženou intracelulární koncentrací sondy díky jejímu aktivnímu

transportu z buněk a i případnou inhibicí transportu sondy danou látkou (přímo či kompeticí).

Při současném sledování účinku látky na viabilitu (integritu obalové struktury) a na aktivitu pump je nutné umět pomocí fluorescenční metody odseparovat efekty způsobené látkou, vedoucí ke změně membránového potenciálu či integritě (permeabilitě) buněčné stěny a/nebo membrány od změn v aktivitě MDR pump. V našich měřeních jsme použili soupravu isogenních kmenů, lišících se v zastoupení genů kódujících jednotlivé ABC pumpy – geny PDR5, SNQ2 a YOR1 (více viz tab. 4.2). Všechny použité kmeny byly odvozeny od rodičovského kmene US5018-C s mutací *pdr1-3*, která vede k nadprodukci pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p [66] a má za následek také expresi těchto pump s poměrně vysokou aktivitou i v post-diauxické fázi [85].

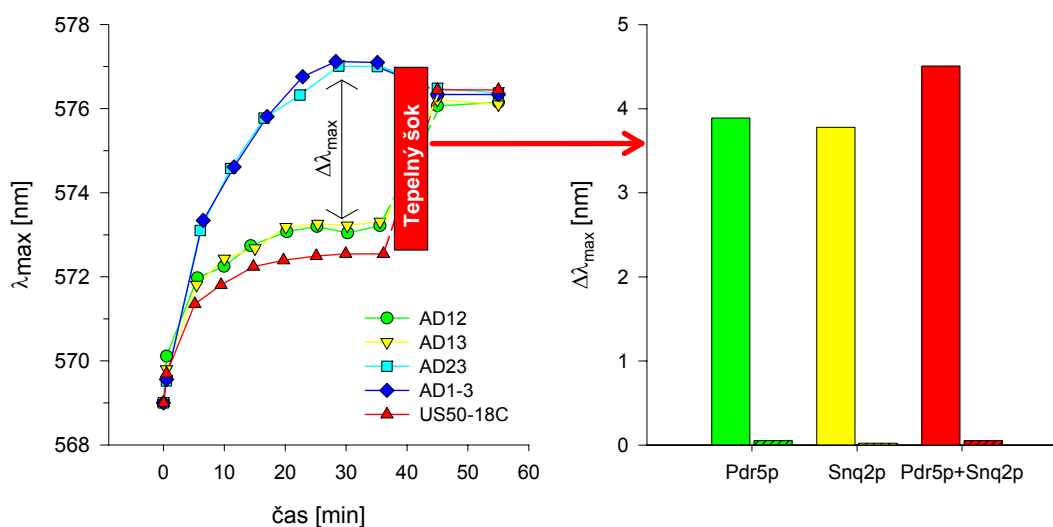
Kmeny AD1-3 a AD23, tzv. „bezpumpové“<sup>\*</sup> kmeny, postrádají v důsledku delece patřičných genů pumpy Pdr5p a Snq2p (a v případě prve zmíněného kmene ještě Yor1p). Vstup sondy a její rovnovážná koncentrace je tak řízena pouze membránovým potenciálem a tyto kmeny nám sloužily jako bezpumpová negativní kontrola.

Naopak, u kmenů majících pumpy Pdr5p a/nebo Snq2p (AD12, AD13, US5018-C) je v důsledku aktivního odstraňování sondy z buněk výsledná intracelulární koncentrace nižší než u výše zmíněných bezpumpových kmenů [122] a buňky se barví méně. Jelikož membránový potenciál pumpových a bezpumpových mutantů (s jinak stejným genetickým základem) nacházejících se ve stejné růstové fázi je totožný [122], je rozdílné barvení odrazem aktivity přítomných pump (obr. 5.8).

Způsob, jakým je možné detegovat inhibici těchto pump, je možné demonstrovat změnou barvení buněk po permeabilizaci jejich plazmatické membrány pomocí tepelného šoku. Barvicí křivky všech kmenů (pumpových i bezpumpových) se po aplikaci tepelného šoku setkají na stejné úrovni barvení, indikující totožnou intracelulární koncentraci sondy (obr. 5.8A), tj. nulovou aktivitu pump (obr. 5.8B). Inhibice transportu sondy z buněk je v tomto případě způsobena triviálním mechanismem – dochází k rychlému a nekontrolovanému vstupu sondy do buněk narušenou membránou a ke ztrátě energetického zdroje transportního procesu v důsledku úniku ATP.

---

<sup>\*</sup> Výrazem „bezpumpový“ jsou v této práci označovány kmeny postrádající ve své genetické výbavě geny pro pumpy Pdr5p a Snq2p; výraz se nijak nevztahuje k přítomnosti či absenci ostatních transportních systémů. A naopak výrazem „pumpový“ jsou míněny buňky s aktivní Pdr5p a/nebo Snq2p.



**Obr. 5.8: Detekce aktivity pump a její změny**

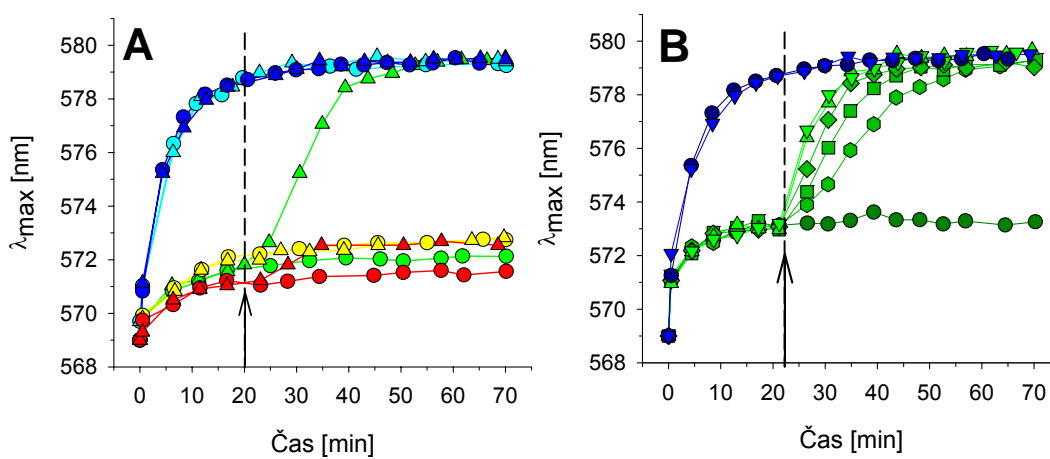
(A): Vliv permeabilizace vlivem tepelného šoku na barvení buněk kmenů AD12 (zeleně), AD13 (žlutě), AD23 (tyrkysově), AD1-3 (modře) a US (červeně). Koncentrace sondy byla  $3 \cdot 10^{-8}$  M. Výsledná hustota buněk v C-P pufru (pH = 6,0) byla  $O.D._{578} = 0,1$ . (B): Aktivita jednotlivých pump získaná odečtením rovnovážných hodnot barvicích křivek kmenů AD12 (**Pdr5p**), AD13 (**Snq2p**) a US50-18C (**Pdr5p a Snq2p**) od rovnovážných hodnot barvicích křivek bezpumpového kmene AD1-3.

### 5.3.1. Látky interagující s pumpou Pdr5p

Abychom ukázali použitelnost naší metody pro studium interakcí potenciálních inhibitorů, provedli jsme nejdříve pilotní experimenty s látkou, o níž je všeobecně známo, že je inhibitorem (substrátem) pumpy Pdr5p – s imunopresantem FK506 [86, 120]. Jak je vidět na obr. 5.9, přidání této látky k obarveným buňkám bezpumpových kmenů AD1-3 a AD23 nezpůsobí žádnou změnu v barvení vzhledem ke kontrole, to znamená, že daná látka neovlivňuje membránový potenciál. Shodné výsledky jsme obdrželi i při experimentu, ve kterém byly buňky bezpumpového kmene AD1-3 pre-inkubovány s FK506. Charakter barvení kontrolního a FK506 pre-inkubovaného kmene je shodný (obr. 5.10B), což s ohledem na diskuzi v kap. 5.2 vede k závěru, že FK506 nemá vliv ani na velikost membránového potenciálu ani na permeabilitu a integritu plazmatické membrány nebo buněčné stěny.

Přidání FK506 k obarvené suspenzi buněk kmene AD12 (obr. 5.9) vede k výraznému nárůstu barvení, které v konečném důsledku vede ke splynutí barvicí křivky s bezpumpovými mutanty (tj. mají shodnou intracelulární koncentraci sondy).

S ohledem na to, že kmeny AD1-3 a AD12 se liší pouze přítomností pumpy Pdr5p, je zřejmé, že přidání FK506 způsobí touto metodou měřitelné zablokování činnosti proteinu Pdr5p. To, že FK506 interaguje pouze s pumpou Pdr5p, nikoliv však s Snq2p, ukazují barvicí křivky buněk AD13 a US50-18C po přidání FK506. V případě buněk AD13 nedochází ke změně barvení vzhledem ke kontrole, u buněk kmene US50-18C způsobí přidání FK506 nárůst barvení na úroveň buněk AD13 v důsledku inhibice pumpy Pdr5p.



### Obr. 5.9: FK506 inhibuje činnost pumpy Pdr5p

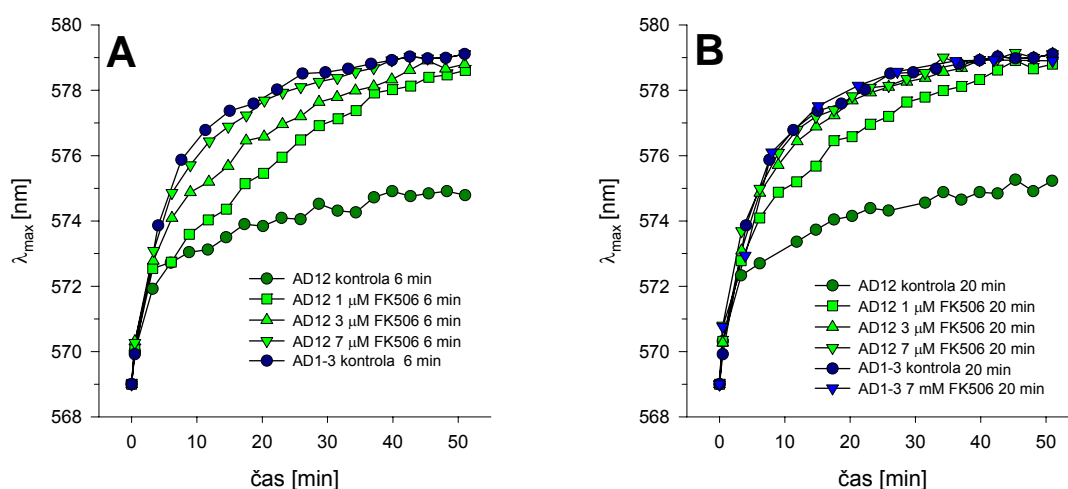
(A): Barvicí křivky raně exponenciálních buněk kmenů **AD12**, **AD13**, **AD23**, **AD1-3** a **US50-18C**, ke kterým byla přidána 5  $\mu\text{M}$  FK506 (trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez FK506.

(B): Barvicí křivky buněk kmene AD12 s různou koncentrací FK506: 0  $\mu\text{M}$  (—●—), 1  $\mu\text{M}$  (—○—), 3  $\mu\text{M}$  (—■—), 5  $\mu\text{M}$  (—◆—), 7  $\mu\text{M}$  (—▲—), 10  $\mu\text{M}$  (—▼—) a buněk bezpumpového kmene AD1-3: bez FK506 (—●—) a s 10  $\mu\text{M}$  FK506 (—▼—).

Šipka spolu s přerušovanou čarou označuje čas přidání FK506.

Z dalších experimentů vyplynulo (obr. 5.9B), že rychlost, s jakou dochází k nárůstu barvení buněk kmene AD12, je závislá na koncentraci přidané FK506. Při použití koncentrace 7  $\mu\text{M}$  a vyšších je rychlost vstupu sondy do buněk srovnatelná s rychlostí, s jakou vstupuje sonda do buněk u bezpumpových kontrol, a není již koncentračně závislá. Snižování koncentrace vede k prodlužování času potřebného k dosažení rovnovážné hodnoty, která je ale stále totožná s bezpumpovými kontrolami a v konečném důsledku je tedy činnost pump také zcela zablokována. Zpomalení účinku daného inhibitoru je způsobené přítomností buněčné stěny, kterou musí látka projít, přičemž rychlost průchodu je dána jejím koncentračním gradientem. Vliv buněčné stěny

na zpoždění účinku inhibitoru je lépe vidět, jsou-li buňky s látkou inkubovány různě dlouhou dobu před přidáním sondy (6 a 20 minut – viz obr. 5.10). V případě 6minutové pre-inkubace s FK506 dochází k úplné inhibici (tj. buňky kmene AD12 s inhibovanými pumpami se barví identicky s bezpumpovým mutantem AD1-3) pouze u nejvyšší zvolené koncentrace FK506 (7  $\mu\text{M}$ ). Pro nižší, 3  $\mu\text{M}$  koncentraci, je zapotřebí delšího času (20 minut) k dosažení plné inhibice pump a u nejnižší koncentrace (1  $\mu\text{M}$ ) není ani tato doba postačující k tomu, aby koncentrace FK506 v oblasti membrány byla dostatečná ke kompletní inhibici pump (obr. 5.10B).

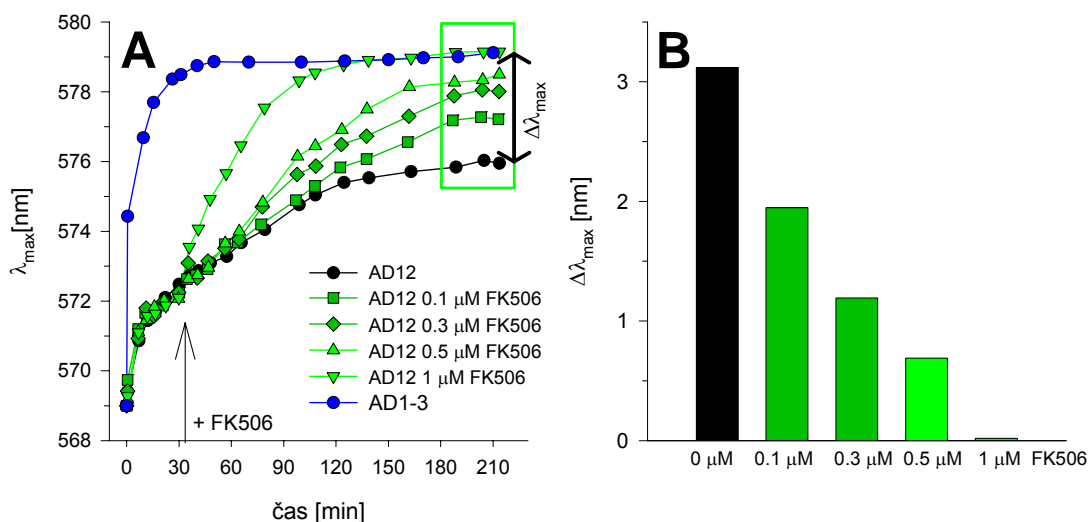


**Obr. 5.10: Vliv buněčné stěny na zpoždění účinku FK506**

Barvicí křivky exponenciálních buněk kmene **AD12** **AD1-3** inkubovaných 6 minut (A) a 20 minut (B) před přidáním sondy s FK506 o koncentraci: 1  $\mu\text{M}$  (čtverečky), 3  $\mu\text{M}$  (trojúhelníky) a 5  $\mu\text{M}$  (obrácené trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez FK506. Koncentrace sondy diS-C<sub>3</sub>(3) byla v obou případech  $3 \cdot 10^{-8}$  M.

Zajímalo nás rovněž, jak velká je inhibiční účinnost FK506. Použili jsme tedy velmi nízké (<1  $\mu\text{M}$ ) koncentrace FK506. Jak je patrné z obr. 5.11, při aplikaci takto nízkých koncentrací dochází pouze k částečné inhibici pump a rovnovážná intracelulární koncentrace leží mezi bezpumpovými kmeny a neovlivněným kontrolním vzorkem v závislosti na použité koncentraci. To znamená, že již nedochází k zablokování (saturaci) všech pump Pdr5p na membráně a sonda je částečně transportována z buněk.



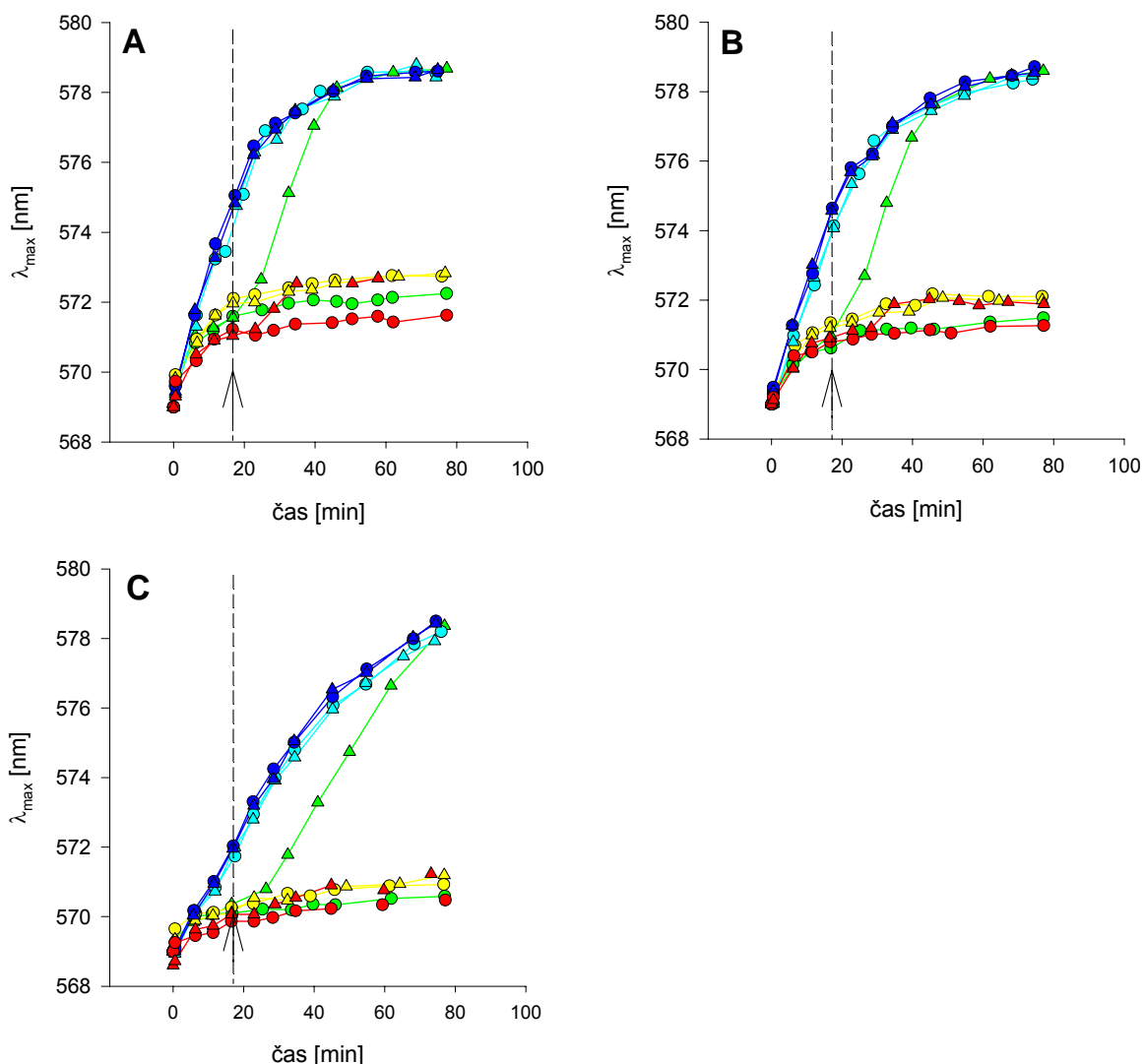


### Obr. 5.11: Vliv nízkých koncentrací FK506

(A): Barvicí křivky kmene AD12 s různou koncentrací FK506: 0,1 μM (čtverečky), 0,1 μM (kosočtverečky), 0,1 μM (trojúhelníky) a 1 μM (obrácené trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez FK506. Modře je označen bezpumpový kmen AD1-3. Šipka znázorňuje přidání FK506. Koncentrace sondy diS-C<sub>3</sub>(3) byla v obou případech 3·10<sup>-8</sup> M.

(B): Δλ<sub>max</sub> odrážející aktivitu pump, získaná odečtením rovnovážných hodnot λ<sub>max</sub> kmene AD12 od λ<sub>max</sub> bezpumpového kmene AD1-3 pro jednotlivé koncentrace FK506. Rovnovážné λ<sub>max</sub> byly počítány jako průměr hodnot označených zeleným rámečkem.

Vzhledem k tomu, že bylo dokázáno, že FK506 je substrátem pumpy Pdr5p a k inhibici dochází na úrovni kompetice [90], zajímalo nás, jaký je rozdíl v interakci (síle vazby) mezi FK506 a sondou. Provedli jsme sérii experimentů, při nichž jsme pro danou koncentraci FK506 použili různé koncentrace diS-C<sub>3</sub>(3) (v rozsahu 10<sup>-8</sup> až 10<sup>-6</sup>). Jak je patrné z obr. 5.12, i při koncentraci 100x vyšší, než je běžně používaná koncentrace sondy (10<sup>-6</sup>M), je inhibice transportu sondy úplná. Stejný výsledek, tj. vysoká afinita FK506 k vazebnému místu, byla zjištěna jak u exponenciálních, tak u post-diauxických buněk. Pro další experimenty byly vybrány buňky z exponenciální fáze růstu, protože jsou obecně citlivější [66] (výraznější vedlejší účinky látky, např. ovlivnění membránového potenciálu), a zejména aktivita pump v této fázi růstu je daleko vyšší než u buněk post-diauxických [85]. Bude-li inhibitor účinný v této fázi, lze jeho inhibiční účinek pak očekávat i v ostatních fázích.



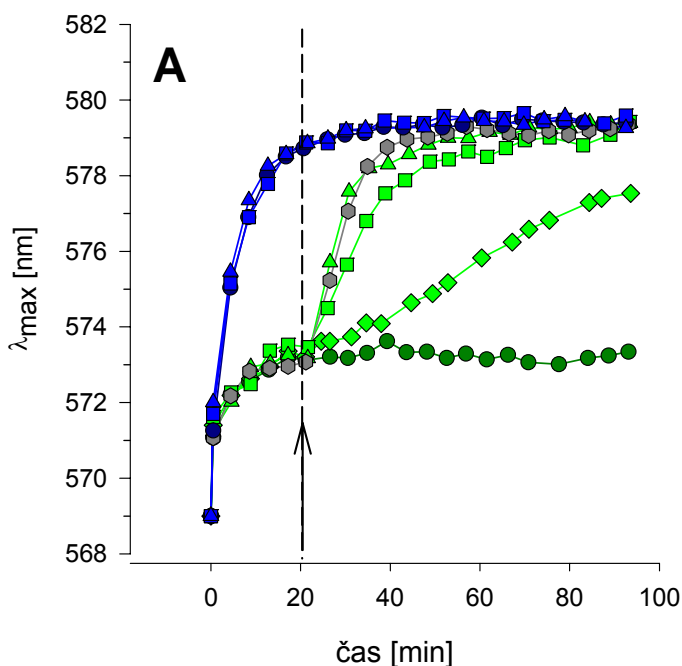
**Obr. 5.12: Vliv koncentrace diS-C<sub>3</sub>(3) na účinek FK506**

Barvicí křivky exponenciálních buněk kmenů **AD12**, **AD13**, **AD23**, **AD1-3** a **US50-18C**, ke kterým byla přidána 5  $\mu\text{M}$  FK506 (trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez FK506. Koncentrace fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3) byla (A)  $2 \cdot 10^{-8}$  M, (B)  $2 \cdot 10^{-7}$  M a (C)  $2 \cdot 10^{-6}$  M.

Výsledky FK506 jsme porovnali s účinkem dalšího známého inhibiotru Pdr5p, nedávno publikovaného enniatinu [130] a s účinkem imunopresantu rapamycinu, který je strukturně analogický k FK506 (obr. 4.1). O rapamycinu je známo, že stejně jako FK506 inhibuje činnost lidského P-glykoproteinu [131]. Na kvasinky *S. cerevisiae* působí tak, že je nevratně zablokuje v G1 fázi buněčného cyklu [132]. Takové kvasinky nejsou poté schopny se množit. Jeho případný vliv na pumpy Pdr5p a/nebo Snq2p nebyl dosud publikován.

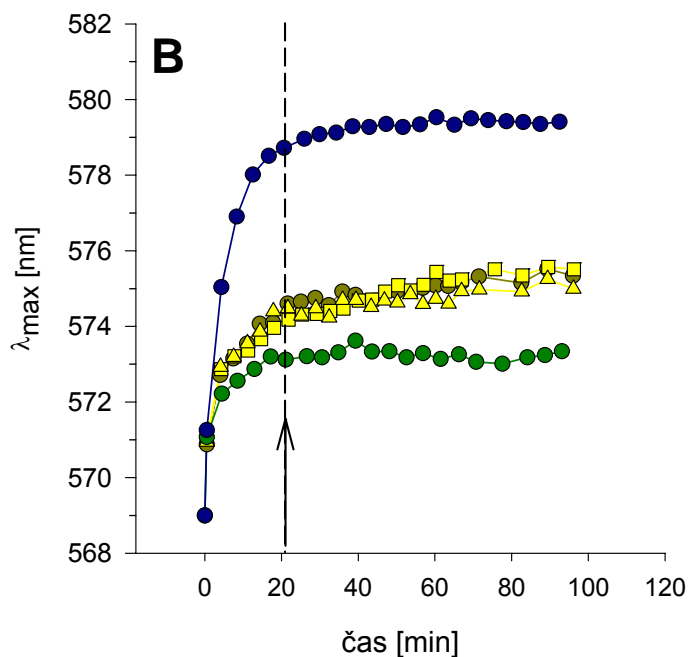
Jak je vidět z obr. 5.13, inhibiční účinek enniatinu je srovnatelný s účinkem FK506, zatímco tatáž koncentrace rapamycinu (5  $\mu\text{M}$ ) vede k mnohem pomalejšímu inhibičnímu účinku. Dokonce i při použití čtyřnásobně vyšší koncentrace je inhibice stále pomalejší oproti FK506 nebo enniatinu. Stejně tak jako FK506 ani enniatin či rapamycin neovlivňují činnost pumpy Snq2p a nemají vliv na velikost membránového potenciálu.

Přihlédneme-li k tomu, že FK506 a rapamycin si jsou strukturně velmi podobné, lze u nich očekávat srovnatelně rychlý průchod buněčnou stěnou. V takovém případě pomalejší barvení po přidání rapamycinu lze přičítat menší schopnosti inhibovat transport sondy pumpou Pdr5p. Je tedy patrné, že lze touto cestou určit, nejen zda daná látka ovlivňuje transport sondy pumpami Pdr5p a/nebo Snq2p, ale lze také porovnávat míru účinnosti jednotlivých inhibitorů mezi sebou.

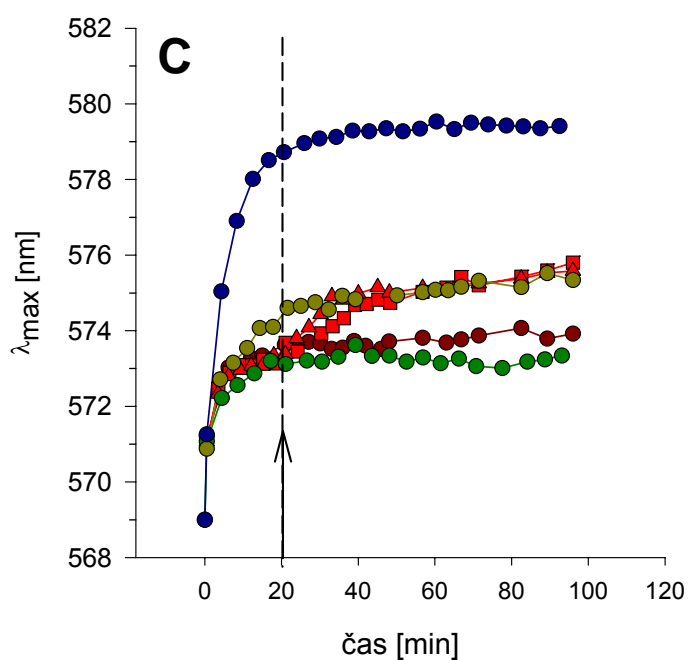


**Obr. 5.13: Porovnání vlivu enniatinu B a rapamycinu na MDR pumpy s účinkem FK506**

(A): Barvicí křivky exponenciálních buněk kmenů AD12 a AD1-3, ke kterým byl přidán: 5  $\mu\text{M}$  enniatin B (trojúhelníky), 5  $\mu\text{M}$  (kosočtverečky) a 20  $\mu\text{M}$  rapamycin (čtverečky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez inhibitorů. Šedé symboly hexagonu pak barvicí křivky exponenciálních buněk kmene AD12 s přidanou 5  $\mu\text{M}$  FK506 pro porovnání.



(B): Barvicí křivky buněk kmene **AD13** bez inhibitorů (kolečka), s 5  $\mu\text{M}$  rapamycinem (čtverečky) a 5  $\mu\text{M}$  enniatinem B (trojúhelníky). Modrá a zelená kolečka představují kontrolní vzorky kmenů AD12, respektive AD1-3 pro srovnání.



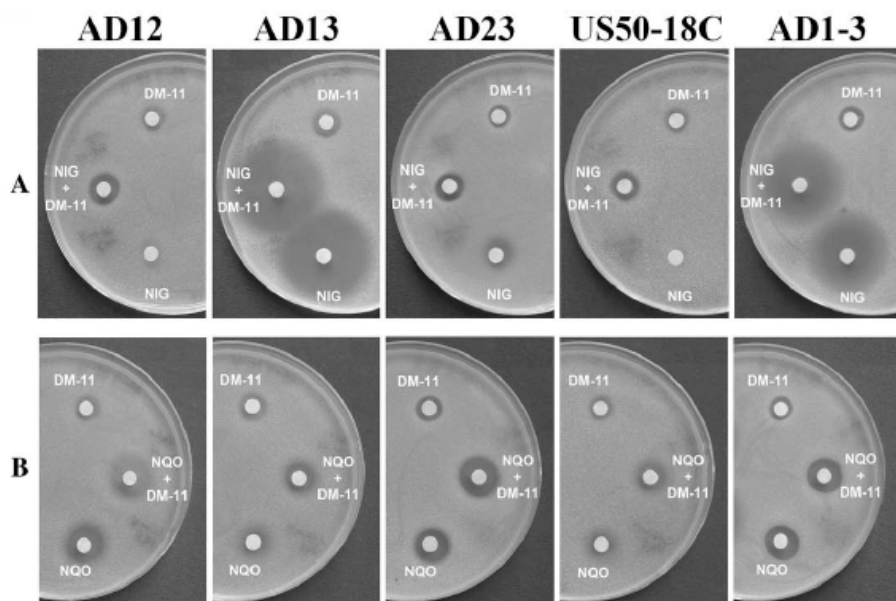
(C): Barvicí křivky buněk kmene **US50-18C** bez inhibitorů (kolečka), s 5  $\mu\text{M}$  rapamycinem (čtverečky) a 5  $\mu\text{M}$  enniatinem B (trojúhelníky). Modrá, zelená a žlutá kolečka představují kontrolní vzorky kmenů AD12, respektive AD13, respektive AD1-3 pro srovnání.

Šipka spolu s přerušovanou čarou označuje čas přidání inhibitorů. Koncentrace sondy diS-C<sub>3</sub>(3) byla v obou případech  $3 \cdot 10^{-8}$  M.

### 5.3.2. Látky neinteragující s pumpou Pdr5p nebo Snq2p

Dalším nezbytným krokem při vývoji metody bylo ukázat, jakým způsobem se projeví v barvicích křivkách účinek látek ovlivňujících membránový potenciál, avšak nemajících vliv na pumpy Pdr5p a Snq2p. Pro tento účel jsme vybrali látku DM-11, patřící do skupiny tzv. lyzozomotropních látek, které obecně na kvasinky působí tak, že inhibují činnost jejich vakuolární ATPázy, popřípadě dalších ATPáz. O látce DM-11 je známo, že inhibuje také pumpu Pma1p, plazmatickou H<sup>+</sup>-ATPázu, která je hlavním aktérem při budování membránového potenciálu [133]. Její inhibice vede k depolarizaci buněk, neboť již neobnovovaný protonový gradient tvořící hlavní složku membránového potenciálu je spotřebováván dalšími transportními procesy. Ačkoliv někteří autoři udávají, že delece genů PDR1, SNQ2 nebo YOR1 vede k zvýšené senzitivitě buněk vůči DM-11 [96, 134], a tyto pumpy tedy s DM-11 pravděpodobně interagují, naše výsledky takové závěry nepotvrzují. Ze zónových testů (obr. 5.14) je patrné, že velikost inhibiční zóny po přidání DM-11 je srovnatelná pro všechny kmeny, což znamená, že přítomnost pump nemá vliv na přežívání buněk vystavených účinku DM-11. Stejně tak nedochází k signifikantnímu zvětšení inhibiční zóny u kmenů exprimujících pumpy Pdr5p, Snq2p a/nebo Yor1p ve dvousubstrátovém testu (viz kap. 4.6), a je tedy zřejmé, že DM-11 ani není substrátem žádné z trojice těchto pump, ani je neinhibuje.

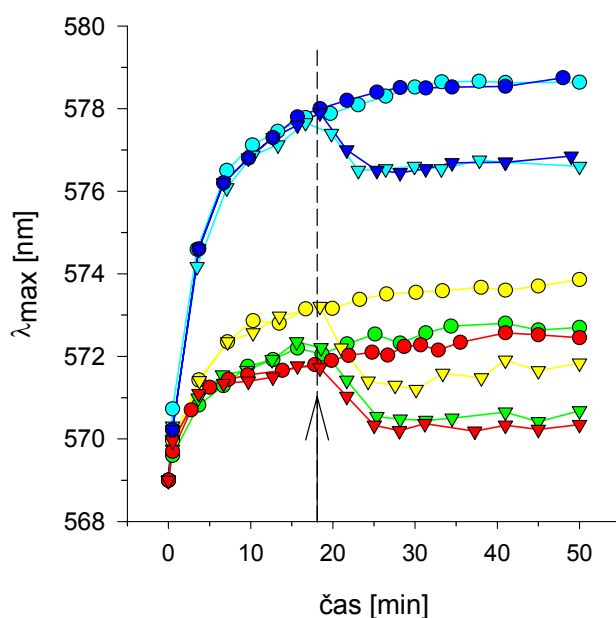
Z fluorescenčního měření vyplývá (obr. 5.15), že přidání DM-11 vede u pumpových i bezpumpových kmenů k posunu  $\lambda_{\max}$  do modré oblasti spektra, což svědčí o tom, že jeho působením dochází k poklesu membránového potenciálu. Rozdíl mezi barvením kontrolních buněk a buněk vystavených účinku DM-11 zůstává pro jednotlivé kmeny nacházející se ve stejné fázi růstu zachován, to znamená, že nedochází k ovlivnění aktivity pump (obr. 5.15), což je ve shodě se zjištěními získaných pomocí zónových testů.



**Obr.5.14: DM-11 není ani substrátem ani inhibitorem žádné z pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p**

(A): Zónové testy s YPG krycím agarem s kmeny AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p), AD23 (Yor1p), AD1-3 (negativní kontrola) a US50-18C (Pdr5p, Snq2p, Yor1p) vystavenými působení DM-11 (30 mM), nigericin (NIG, substrát pump Pdr5p a Yor1p, 20 mM) a jejich kombinaci.

(B): Shodné jako (A), jen místo nigericinu byl použit 4-nitrochinolin 1-oxid (4-NQO, substrát pumpy Snq2p, 3,16 mM).



**Obr. 5.15: Inhibitor  $H^+$ -ATPázy DM-11 snižuje potenciál buněk, avšak nemá vliv na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p**

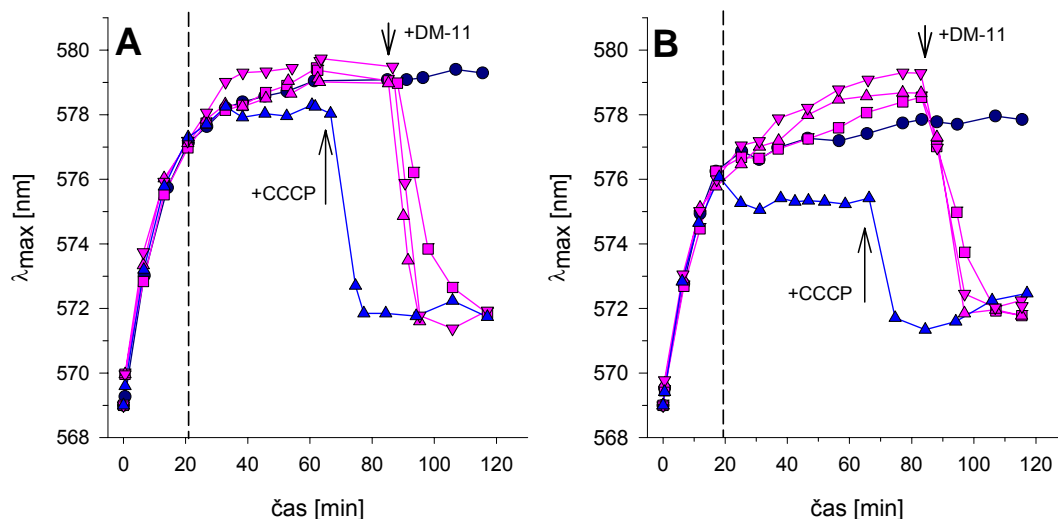
Barvicí křivky exponenciálních buněk kmenů **AD12**, **AD13**, **AD23**, **AD1-3** a **US50-18C**, ke kterým bylo přidáno 10  $\mu$ M DM-11 (trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání DM-11. Šipka spolu s přerušovanou čarou označuje čas přidání DM-11.

### 5.3.3. Interakce protonoforu CCCP s buňkami

Z principu metody je zřejmé, že přidání inhibitoru k některé z pump Pdr5p a/nebo Snq2p, vede k posunu maxima emisního spektra směrem do červena u buněk s aktivními pumpami, a v případě úplné inhibice ke splnutí barvicích křivek buněk pumpových a bezpumpových kmenů, tak jak je tomu v případě inhibitorů FK506, enniatinu a rapamycinu. Je však potřeba mít na paměti, že k posunu do červena po přidání látky, jejíž účinek zkoumáme, může dojít nejen díky inhibici pump, ale také v důsledku dalších efektů. Daná látka může buňky hyperpolarizovat, což se projeví zvýšeným vstupem sondy do buněk. V takovém případě však dojde k posunu do červena i u buněk bezpumpového kmene a diference mezi křivkami pumpových a bezpumpových kmenů zůstane zachována. Další příčinou je permeabilizace membrány buněk. Pro permeabilizované buňky je charakteristický mohutný výtok iontů z buněk, což má za následek nejenom zkratování membránového potenciálu, ale také změnu vazebné kapacity cytozolu pro sondu a s tím spojený nárůst koncentrace vázané sondy. Pumpy v takovém případě již nehrají v barvení buněk žádnou roli a  $\lambda_{\max}$  pumpových kmenů je srovnatelná s  $\lambda_{\max}$  bezpumpových kmenů (obr. 5.8).

#### 5.3.3.1. Vliv protonoforu CCCP na aktivitu $H^+$ -ATPázy

Abychom odlišili permeabilizované buňky od buněk intaktních, u kterých nárůst fluorescence do červena je způsoben skutečnou inhibicí MDR pump (popřípadě hyperpolarizací), použili jsme v prvních experimentech tohoto typu, stejně jako při studiu biocidů (viz kap. 5.2), protonofor CCCP. V případě, že se jedná o inhibici transportu sondy by intaktní buňky měly reagovat na depolarizační efekt protonoforu CCCP, zatímco v případě permeabilizovaných buněk tuto depolarizaci není možné pozorovat. Dospěli jsme ale k překvapivému zjištění – přidání CCCP nezpůsobilo u raně exponenciálních buněk kmene AD1-3 žádný očekávaný pokles  $\lambda_{\max}$ , a to při použití koncentrací v rozsahu 1-10  $\mu\text{M}$ . Naopak, nejvyšší použitá koncentrace CCCP vedla dokonce k posunu  $\lambda_{\max}$  směrem do červena. U pozdně exponenciálních buněk, které se barví na nižší hodnotu  $\lambda_{\max}$  v důsledku menšího membránového potenciálu [85], bylo zvýšení  $\lambda_{\max}$  ještě patrnější.



**Obr. 5.16: Protonofor CCCP aktivuje činnost  $H^+$ -ATPázy**

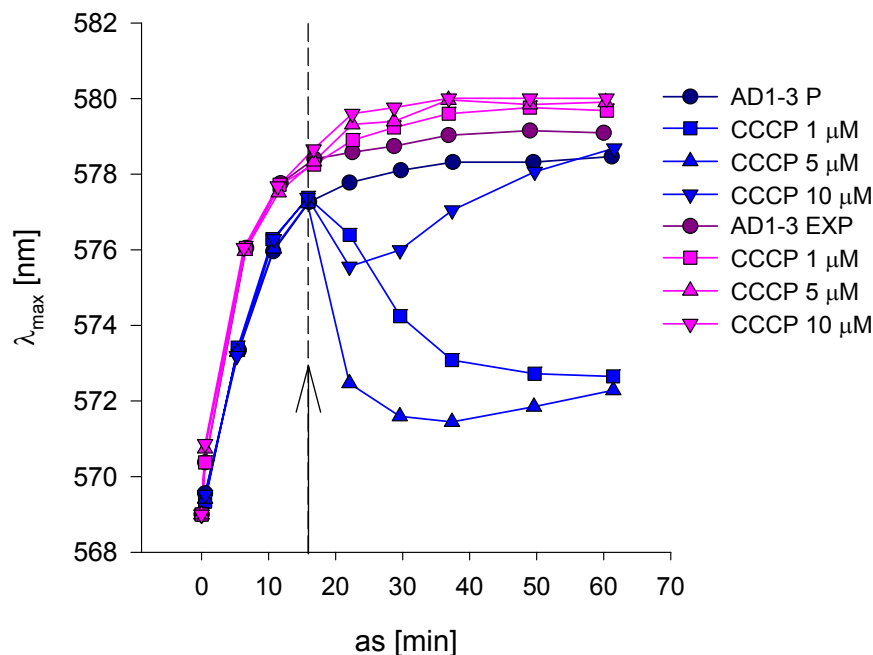
(A): Vliv CCCP a DM-11 na barvicí křivky raně exponenciálních buněk kmene AD1-3. CCCP byl přidán ve 20. minutě barvení (fialové symboly, přerušovaná čára označuje čas přidání) v koncentracích 1  $\mu$ M (čtverečky), 5  $\mu$ M (trojúhelníky) a 10  $\mu$ M (obrácené trojúhelníky), následné přidání DM-11 o koncentraci 10  $\mu$ M označuje šipka. Modré trojúhelníky reprezentují vzorek s opačnou sekvencí přidání. Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání čehokoliv.

(B): Vliv CCCP a DM-11 na barvicí křivky pozdně exponenciálních buněk kmene AD1-3. Symboly mají stejný význam jako v (A).

Jak bylo již řečeno výše, u bezpumpového kmene může dojít ke zvýšení  $\lambda_{\max}$  pouze ve dvou případech, při permeabilizaci buněk a při jejich hyperpolarizaci. Protonofor CCCP patří mezi lipofilní slabé kyseliny [135], které okyselují vnitřní prostředí buněk, a tím **indukují činnost  $H^+$ -ATPázy** [136]. Aktivaci tohoto enzymu protonoforem CCCP popsal již dříve také dos Passos [129]. Vzhledem k tomu, že použitá koncentrace CCCP nevede k nárůstu počtu mrtvých buněk ve vzorku (výsevový test [138 str. 96]), jeví se jako pravděpodobné vysvětlení absence depolarizačního efektu protonoforu velmi rychlá aktivace  $H^+$ -ATPázy, která dokonce vede k hyperpolarizaci membrány vzhledem ke kontrole.

K potvrzení tohoto předpokladu jsme zkusili před přidáním CCCP zablokovat funkci  $H^+$ -ATPázy jejím inhibitorem, již dříve zmíněnou látkou DM-11, a zabránit tak její možné aktivaci. V takovém případě, nejen že nedochází k hyperpolarizaci, ale přidání CCCP k buňkám způsobí výraznou depolarizaci. Konečná rovnovážná hodnota  $\lambda_{\max}$  je nezávislá na pořadí přidání obou látek (obr. 5.16).



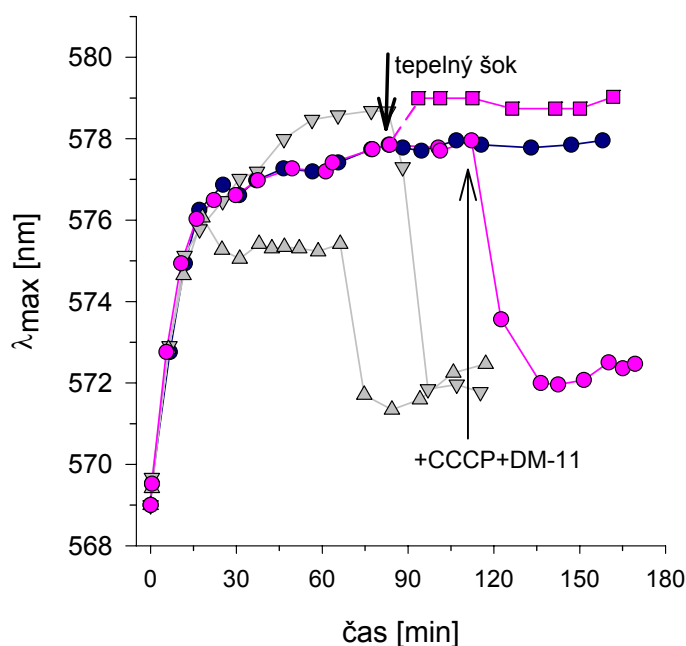


**Obr. 5.17: Vliv růstové fáze na reakci intaktních buněk na přidání CCCP**

Barvicí křivky **post-diauxických** a **exponenciálních** buněk kmene AD1-3 s různou koncentrací CCCP: 1  $\mu\text{M}$  (čtverečky), 5  $\mu\text{M}$  (trojúhelníky) a 10  $\mu\text{M}$  (obrácené trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez CCCP. Šipka spolu s přerušovanou čarou označuje čas přidání CCCP.

To, že CCCP rychle aktivuje  $\text{H}^+$ -ATPázu u exponenciálních buněk a že není možné pozorovat depolarizaci spojenou s přenosem protonů do buňky, je závažné zjištění, neboť CCCP se běžně používá jako diagnostický nástroj k posouzení buněčné integrity. Vzhledem k dřívejším experimentům zmíněným v kap 5.2, kdy přidání protonoforu CCCP vedlo k výrazné depolarizaci, bylo nutné zodpovědět otázku, co (kromě jiného použitého kmene) je příčinou těchto rozdílů. Při studiu účinku stresorů u divokého kmene jsme použili buňky v post-diauxické fázi, u kterých je aktivita pump nulová. Testovali jsme proto vliv růstové fáze buněk na rychlost aktivace  $\text{H}^+$ -ATPázy u AD1-3 buněk. Ukazuje se, že v případě post-diauxických buněk dochází k aktivaci  $\text{H}^+$ -ATPázy až při delších časech působení (obr. 5.17). Navíc je z obr. 5.17 také patrné, že rychlost aktivace závisí na použité koncentraci protonoforu, tedy jinými slovy na rychlosti acidifikace cytozolu. Můžeme tedy konstatovat, že lze zvolit experimentální podmínky (růstová fáze a koncentrace protonoforu), při kterých lze v omezeném časovém měřítku použít CCCP jako diagnostický nástroj pro stanování

intaktnosti buněk (tak jako v našem případě v kap. 5.2). V obecném případě se však jeví nezbytné užívat jej v kombinaci s DM-11 nebo jiným inhibitorem  $H^+$ -ATPázy. Obrázek 5.18 ilustruje současné přidání „CD — koktejlu“ složeného z 5  $\mu M$  CCCP a 10  $\mu M$  DM-11 k intaktním pozdně exponenciálním buňkám a k buňkám permeabilizovaným tepelným šokem. V případě intaktních buněk dochází k očekávanému posunu  $\lambda_{max}$  směrem k menším vlnovým délkám v důsledku depolarizace, zatímco barvení permeabilizovaných buněk zůstává beze změny.



**Obr. 5.18: Rozlišení permeabilizovaných a intaktních buněk pomocí DM-11 a CCCP**

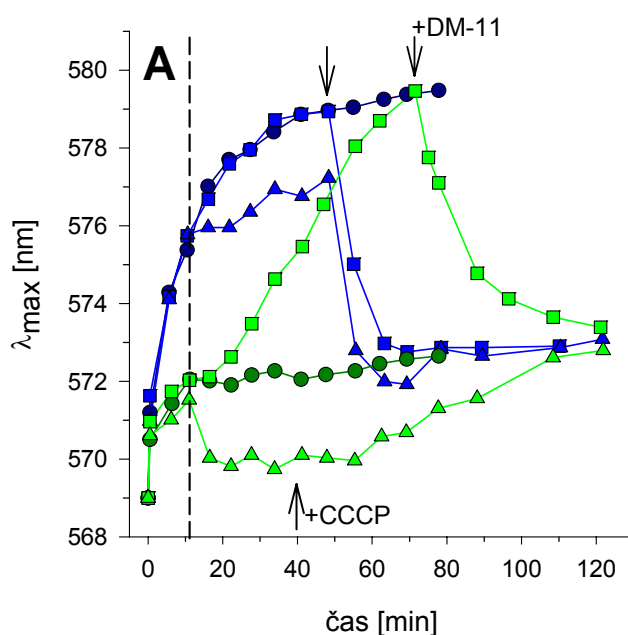
Současné přidání 5  $\mu M$  CCCP s 10  $\mu M$  DM-11 (označené šipkou nahoru) k intaktním buňkám kmene AD1-3 (fialová kolečka) a k buňkám permeabilizovaným tepelným šokem (fialové čtverečky). Modrá kolečka představují kontrolní vzorek bez přidání CCCP nebo DM-11. Šedé symboly byly pro srovnání převzaty z obr. 5.16 a znázorňují přidání 10  $\mu M$  DM-11 následované 5  $\mu M$  CCCP (trojúhelníky) a opačně (obrácené trojúhelníky).

### 5.3.3.2. CCCP je substrátem pump Pdr5p a Snq2p

Přidání CCCP ke kmenům AD12, AD13 a US50-18C, které exprimují pumpy Pdr5p a/nebo Snq2p způsobilo různě rychlý nárůst  $\lambda_{max}$  (obr. 5.19). Splnutí barvicích křivek pumpových a bezpumpových kmenů, ke kterému po chvíli dojde, svědčí o tom, že CCCP inhibuje transport sondy z buněk. Přestože aktivita obou pump je před přidáním CCCP srovnatelná, neboť se buňky barví na stejnou úroveň  $\lambda_{max}$ , je rychlost,

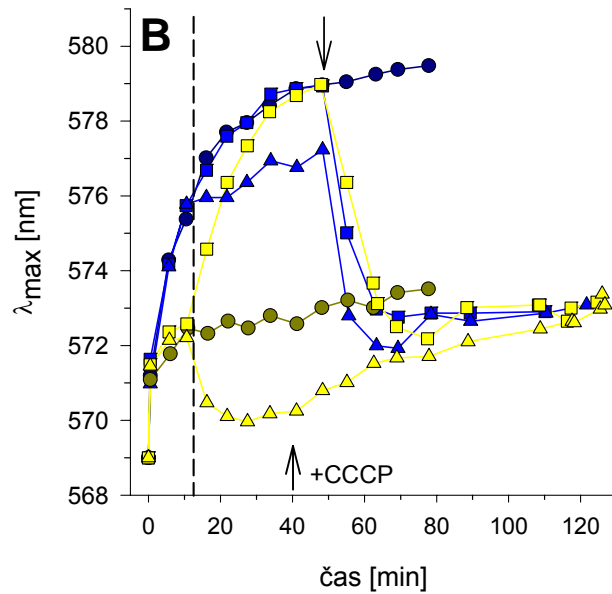
s jakou se dobarvují na úroveň kmene AD1-3 po aplikaci CCCP, různá. V případě kmene AD12 majícího pumpu Pdr5p je tato rychlost pomalejší než u kmene AD13 s pumpou Snq2p a rychlost nárůstu u kmene US50-18C majícího obě pumpy leží mezi nimi. Z toho lze usoudit, že schopnost CCCP inhibovat transport sondy z buněk je různá pro jednotlivé pumpy. Následná aplikace DM-11 k buňkám vystaveným účinku CCCP ukazuje, že buňky jsou intaktní a chovají se stejně jako negativní, bezpumpová kontrola.

Inhibice transportu sondy z buněk u kmenů exprimujících MDR pumpu Pdr5p a/nebo Snq2p představuje další efekt k již zmíněné aktivaci  $H^+$ -ATPázy, který doprovází účinek CCCP a uplatňuje se samozřejmě i u těchto kmenů. Samotnou inhibici pump znázorňují na obr. 5.19 barvicí křivky buněk, u kterých byla činnost  $H^+$ -ATPázy předem zablokována pomocí DM-11. Také v tomto případě je přidání CCCP doprovázeno nárůstem  $\lambda_{max}$  až na hodnotu  $\lambda_{max}$  negativní kontroly u všech pumpových kmenů.

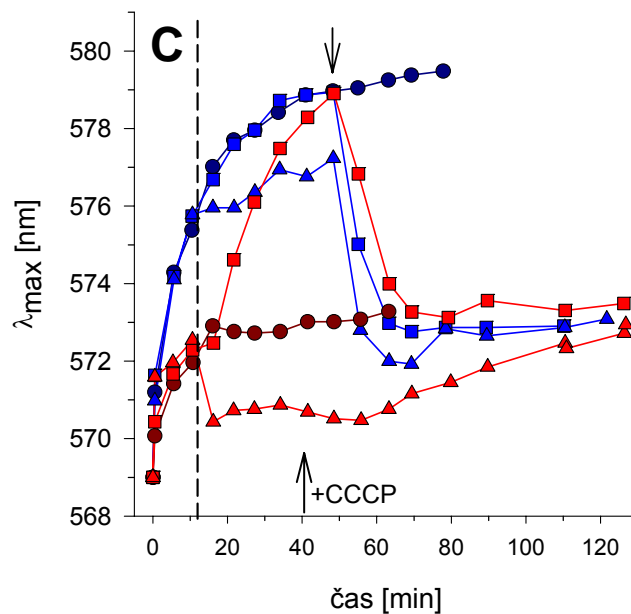


**Obr. 5.19: CCCP blokuje transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) jak pumpou Pdr5p, tak Snq2p nezávisle na aktivitě  $H^+$ -ATPázy**

(A): Vliv CCCP a DM-11 na barvení exponenciálních buněk kmene **AD12** (exprimujících pumpu Pdr5p) a negativní kontroly – bezpumpového kmene **AD1-3** nezávisle na pořadí přidání. K buňkám byl přidán 5  $\mu$ M CCCP ve 12. minutě (přerušovaná čára, čtverečky) následovaný přidáním 10  $\mu$ M DM-11 (první šipka směrem dolů znázorňuje čas přidání k buňkám AD1-3, druhá k buňkám AD12). Trojúhelníky prezentují opačnou sekvenci přidání, tedy ve 12. minutě 10  $\mu$ M DM-11 s následným 5  $\mu$ M CCCP (první šipka směrem dolů pro AD1-3, šipka směrem nahoru pro AD12). Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání DM-11 nebo CCCP.

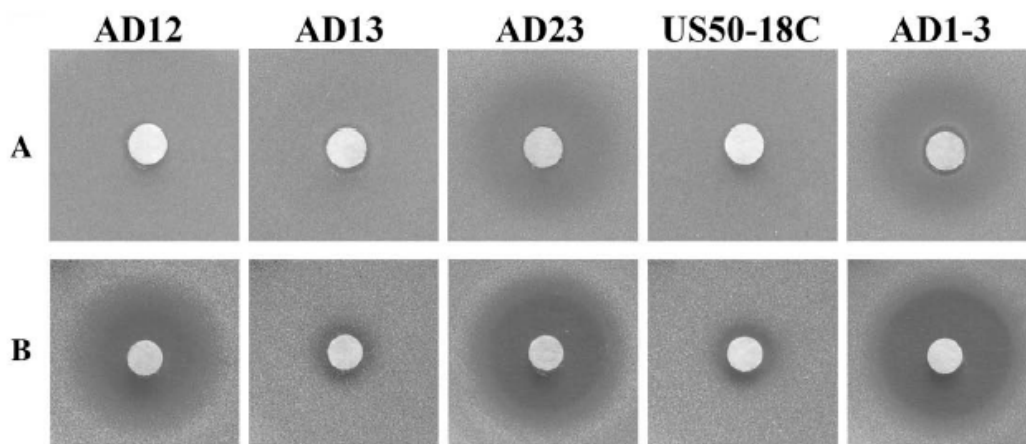


(B): Vliv CCCP a DM-11 na barvení exponenciálních buněk kmene **AD13** (exprimujících pumpu Snq2p) a negativní kontroly – bezpumpového kmene **AD1-3** (převzato pro srovnání z (A)) nezávisle na pořadí přidání. K buňkám byl přidán 5  $\mu\text{M}$  CCCP ve 12. minutě (přerušovaná čára, čtverečky) následovaný přidáním 10  $\mu\text{M}$  DM-11 (šipka směrem dolů). Trojúhelníky prezentují opačnou sekvenci přidání, tedy ve 12. minutě 10  $\mu\text{M}$  DM-11 s následným 5  $\mu\text{M}$  CCCP (šipka směrem dolů pro AD1-3, šipka směrem nahoru pro AD13). Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání DM-11 nebo CCCP.



(C): Vliv CCCP a DM-11 na barvení exponenciálních buněk kmene **US50-18C** (exprimujících pumpu Pdr5p a Snq2p) a negativní kontroly – bezpumpového kmene **AD1-3** (převzato pro srovnání z (A)) nezávisle na pořadí přidání. K buňkám byl přidán 5  $\mu\text{M}$  CCCP ve 12. minutě (přerušovaná čára, čtverečky) následovaný přidáním 10  $\mu\text{M}$  DM-11 (šipka směrem dolů). Trojúhelníky prezentují opačnou sekvenci přidání, tedy ve 12. minutě 10  $\mu\text{M}$  DM-11 s následným 5  $\mu\text{M}$  CCCP (šipka směrem dolů pro AD1-3, šipka směrem nahoru pro US50-18C). Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání DM-11 nebo CCCP.

Abychom zjistili příčinu inhibičního účinku CCCP, doplnili jsme fluorescenční měření zónovými testy (obr. 5.20), přičemž jsme použili různé druhy krycích agarů. V případě YPD agaru mají buňky přístup k fermentovatelnému zdroji uhlíku a aktivita pump je v takovém případě vyšší [85]. Vzhledem k tomu, že se u všech tří pumpových kmenů (AD12, AD13 a US), na rozdíl od kmenů AD23 a AD1-3, zóna nevytvořila, je zřejmé, že CCCP je substrát jak pumpy Pdr5p, tak pumpy Snq2p. Ze zón vytvořených při použití YPG agaru, který obsahuje nefermentovatelné zdroje uhlíku, je vidět, že CCCP je lépe transportován pumpou Snq2p oproti pumpě Pdr5p, neboť velikost zón kmenů exprimujících tuto pumpu (AD13, US50-18C) je výrazně menší. U kmene AD12 je velikost zóny srovnatelná s velikostí zóny u kmene AD1-3, avšak liší se transparentností. V případě buněk AD1-3 je zóna čistá, zatímco u kmene AD12 je mírně zakalená kvůli přítomnosti malé (vzhledem k ostatní části agaru) koncentrace buněk. Malý rozdíl mezi zónami u kmene AD1-3 a AD12 (oproti AD13) není způsoben nízkou aktivitou Pdr5p (ve srovnání s Snq2p), neboť nigericin je za stejných růstových podmínek stále plně odstraňován z buněk (obr. 5.14), ale nízkou afinitou k CCCP\*.



**Obr. 5.20: CCCP je substrátem jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p**

(A): Inhibiční zóny s krycím agarem YPD u kmenů exprimujících různé pumpy AD12 (Pdr5p), AD12 (Snq2p), AD23 (Yor1p), US50-18C (všechny tři pumpy) a kontrolního bezpumpového kmene AD1-3 vystavených účinku CCCP (10 mM).

(B): Inhibiční zóny s krycím agarem YPGE u kmenů exprimujících různé pumpy AD12 (Pdr5p), AD12 (Snq2p), AD23 (Yor1p), US50-18C (všechny tři pumpy) a kontrolního bezpumpového kmene AD1-3 vystavených účinku CCCP (5 mM).

\* To, že CCCP je mnohem slabší substrát pumpy Pdr5p než Snq2p, vysvětluje také důvod, proč v publikaci [82] nepozorovali zvýšenou senzitivitu k CCCP v  $\Delta$ PDR5 mutantech, neboť jejich použité kmeny měly stále v nadprodukci pumpy Snq2p.

Z těchto výsledků vyplývá, že metoda je schopna nejenom rozpoznat, zda daná látka inhibuje, či nikoliv transport sondy ven z buněk, ale je schopna i postihnout rozdíly v míře, jakou daná látka na jednotlivé pumpy působí.

#### **5.3.4. Lyzozomotropní látka MRG-12 inhibuje H<sup>+</sup>-ATPázu a je substrátem obou pump**

V rámci dizertační práce byl vyvinutou metodou zkoumán vliv několika dalších látek, u nichž jsme se domnívali, že by mohly ovlivňovat činnost některé ze studovaných pump. Jednou z testovaných sloučenin bylo MRG-12, které patří do skupiny lyzozomotropních látek. Z našich experimentů vyplývá (obr. 5.21), že po přidání MRG-12 k buňkám AD1-3 (jak exponenciálním, tak post-diauxickým) dochází k poklesu  $\lambda_{\max}$ , na stejnou úroveň jako v případě účinku DM-11. Vzhledem k tomu, že obě dvě látky patří do stejné kategorie lyzozomotropních látek, domnívali jsme se, že ke snížení membránového potenciálu buněk dochází v důsledku částečné disipace protonového gradientu jinými transportními procesy, který nemůže být obnovován v důsledku inhibice H<sup>+</sup>-ATPázy. Tuto naši domněnku jsme potvrdili přidáním protonoforu CCCP k exponenciálním buňkám po působení MRG-12, (obr. 5.21). Jak je z obrázku patrné, přidání CCCP vede k výrazné depolarizaci podobně jako v případě DM-11, zatímco přidání samotného CCCP k týmž buňkám vede k hyperpolarizaci, což svědčí o schopnosti MRG-12 inhibovat H<sup>+</sup>-ATPázu\*.

Podobně jako u CCCP vede přidání MRG-12 k exponenciálním buňkám pumpových kmenů (AD12, AD13 a US50-18C) ke koncentračně závislému posunu  $\lambda_{\max}$  do červena (obr. 5.22). Tento posun je výsledkem kompetitivní inhibice transportu sondy látkou MRG-12. Toto tvrzení je podpořeno:

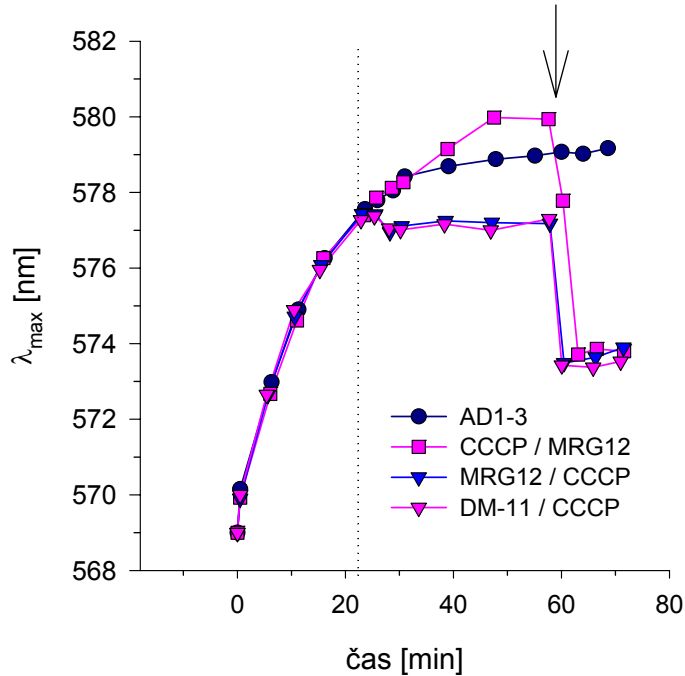
1. Výsledky zónových testů (obr. 5.23), které ukazují, že MRG12 je substrátem obou pump.
2. Poklesem  $\lambda_{\max}$  po přidání CD koktejlu k buňkám vystavených účinku MRG-12, který jednoznačně ukazuje, že MRG-12 nezpůsobuje permeabilizaci buněk.

Jak vyplývá z obr. 5.22, je rozsah inhibice transportu sondy jednotlivými pumpami odlišný. V případě buněk exprimujících pumpu Snq2p je úroveň obarvení po aplikaci MRG-12 nižší vzhledem k buňkám majících pouze pumpu Pdr5p,

---

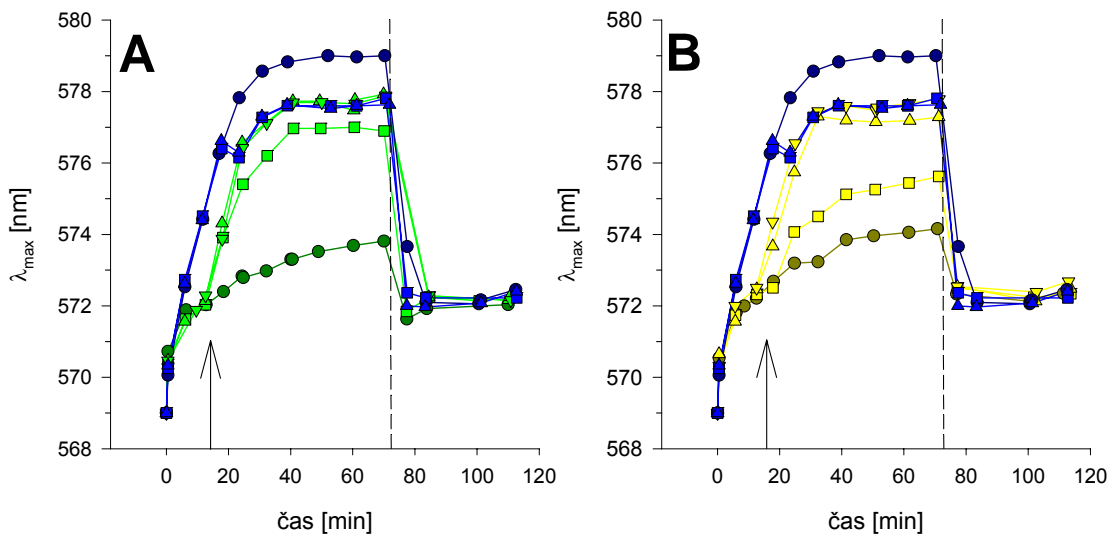
\* Pokud by MRG-12 neinhibovalo H<sup>+</sup>-ATPázu, došlo by po přidání CCCP k její aktivaci.

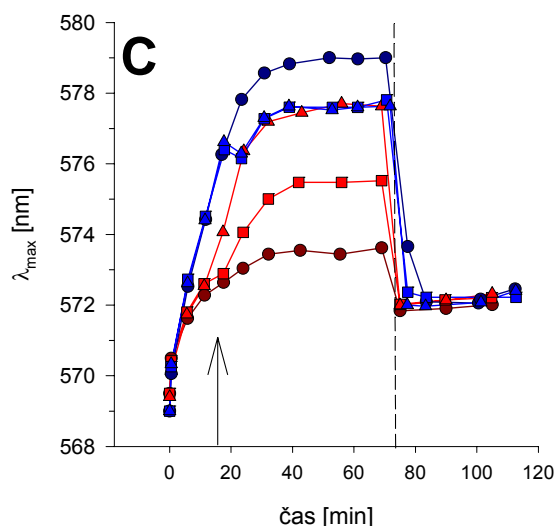
což svědčí o tom, že MRG-12 inhibuje účinněji transport sondy pumpou Pdr5p než Snq2p. Tento závěr potvrzují i výsledky zónových testů (obr. 5.23), ze kterých je rovněž patrné, že MRG-12 je silnějším substrátem Pdr5p než Snq2p.



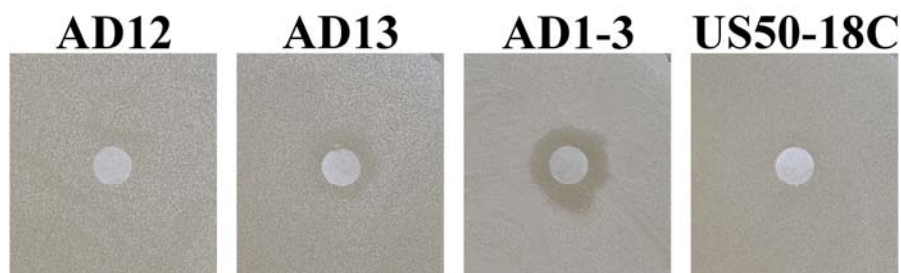
**Obr. 5.21: MRG-12 inhibuje činnost  $H^+$ -ATPázy**

Vliv 10  $\mu M$  MRG-12 na barvicí křivky exponenciálních buněk kmene AD1-3 s následným přidáním 10  $\mu M$  CCCP (fialové trojúhelníky). Čtverečky reprezentují opačné pořadí přidání. Porovnání s účinkem 10  $\mu M$  DM11 (modré trojúhelníky). Látky byly přidány ve 20. a 60. minutě barvení (přerušovaná čára a šipka označují čas přidání). Kolečka představují kontrolní vzorek bez přidání čehokoliv





**Obr. 5.22: MRG-12 inhibuje transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pumpami Pdr5p a Snq2p**  
 Vliv MRG-12 na barvicí křivky exponenciálních buněk kmenů **AD12** (A), **AD13** (B) a **US50-18C** (C) vzhledem k jeho vlivu na barvení negativní kontroly – bezpumpového kmene **AD1-3**. MRG-12 bylo přidáno v 16. minutě (šipka nahoru) v koncentracích: 5 μM (čtverečky), 10 μM (trojúhelníky) a 20 μM (obrácené trojúhelníky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez přidání MRG-12. Přerušovaná čára označuje čas přidání CD koktejlu.



**Obr. 5.23: MRG-12 je substrátem pump Pdr5p a Snq2p**  
 Inhibiční zóny s krycím agarem YPD u kmenů AD12, AD13, US50-18C a AD1-3 vystavených účinku MRG-12 (16 mM).

### 5.3.5. Vliv 4-nitrochinolin 1-oxidu na transport sondy pumpou Snq2p

Aby bylo možné používat fluorescenční metodu zcela univerzálně, tedy i pro sledování aktivity jednotlivých pump u buněk divokých kmenů, ke kterým neexistuje isogenní bezpumpová kontrola, bylo by zapotřebí mít k dispozici inhibitory jednotlivých pump, které by byly použity jako nezávislé „indikátory/testovací látky“



pro stanovení přítomnosti dané pumpy a její aktivity. V ideálním případě by tyto indikátory neměly ovlivňovat membránový potenciál buněk.

Takovým vhodným inhibítorem pumpy Pdr5p je výše uvedená látka FK506. Použitelnost dalších dvou zkoumaných látek, tj. protonoforu CCCP a lyozomotropní látky MRG-12, je pro tento záměr značně omezená nejenom vzhledem k jejich vlivu na membránový potenciál, ale zejména proto, že současně inhibují transport sondy u obou pump, což znemožňuje stanovit příspěvek aktivity pump nezávisle.

Vzhledem k tomu, že není znám žádný inhibítor pumpy Snq2p, zaměřili jsme se na nalezení látky-substrátu, která by účinně inhibovala transport sondy pumpou Snq2p a neměla žádný vliv na aktivitu pumpy Pdr5p.

Nejznámějším substrátem pumpy Snq2p je látka 4-NQO [52], kterou jsme již dříve používali v zónových testech jako indikátor možného ovlivnění aktivity pumpy Snq2p (viz obr. 5.14).

Zajímalo nás, jak přidání tohoto substrátu ovlivní transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pumpou Snq2p. Dospěli jsme k zajímavému výsledku, že 4-NQO neovlivňuje transport sondy pumpou Snq2p ani při koncentracích řádově desítky  $\mu\text{M}$  stejně jako v případě účinku DM-11 (ten ale není substrátem pumpy Snq2p), s tím rozdílem, že depolarizační vliv 4-NQO je ve srovnání s DM-11 zanedbatelný. Nelze jej proto použít pro stanovení aktivity pumpy Snq2p.

4-NQO je poměrně malá molekula (viz obr. 4.1) a zdá se tedy být přijatelné vysvětlení, že se váže do jiné části vazebného místa Snq2p a je transportována společně se sondou. Tento „kotransport“ dvou substrátů není u MDR pump neobvyklý a byl pozorován např. u Pdr5p [82, 97] nebo P-gp [139].

Ačkoliv jsme při vyhledávání látky, která by účinně inhibovala transport sondy pumpou Snq2p neuspěli (zkoušeli jsme i další známý substrát, camphotecin, se stejným negativním výsledkem), ukazují tyto výsledky i na nový směr při použití metody. Sledování schopnosti různých substrátů a jejich chemických modifikací inhibovat transport sondy by mohlo přispět k pochopení struktury vazebného místa/míst Snq2p, o kterém/ých je v současné době podstatně méně informací v porovnání s Pdr5p.

# ZÁVĚR

Hlavním cílem dizertační práce bylo studium vlivu chemického stresu na činnost membránových transportních systémů kvasinek. Pro studium byla zvolena účinná metoda měření membránového potenciálu a aktivity MDR pump pomocí potenciometrické redistribuční fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3). V průběhu této práce se podařilo zdokonalit měřicí protokol do té míry, že v současné době umožňuje s velkou citlivostí diagnostikovat účinek látek na buňky (od inhibice pump přes depolarizaci až k jejich permeabilizaci).

Výsledky byly již publikovány v renomovaných zahraničních časopisech (přílohy 1, 2) a prezentovány na mezinárodních konferencích (přílohy 3 - 12).

První část práce je věnována stanovení míry poškození plazmatické membrány buněk účinkem chemického stresu. Jedním z cílů této části dizertační práce bylo ověřit, zda by fluorescenční metoda mohla být rutinně používána v klinické praxi pro rychlé stanovení mikrobicidní/fungicidní aktivity biocidu.

Pomocí modelových experimentů, které simulovaly různé zastoupení intaktních, depolarizovaných a permeabilizovaných buněk v suspenzi, bylo možné analyzovat účinek vybraných stresorů (biocidů) a v kombinaci s výsledky výsevových testů formulovat tyto závěry:

- Nedílnou součástí působení biocidů je částečná nebo úplná depolarizace membrány.
- Pouhá depolarizace plazmatické membrány nevede k úplnému zabití všech buněk ve vzorku (neschopnost tvořit kolonie), pokud není doprovázena následným porušením integrity membrány.
- Působení některých biocidů vede k rychlému vzniku subpopulace permeabilizovaných buněk, přičemž nezanedbatelná část buněk v suspenzi zůstane **zcela intaktní**, s neovlivněným membránovým potenciálem.

Analýza časového vývoje barvení buněk po aplikaci stresorů ukázala, že fluorescenční metoda spolehlivě popisuje krátkodobý vliv biocidů na buněčnou membránu a lze ji s úspěchem použít jako diagnostický nástroj k posouzení jejich mikrobicidní účinnosti.

Druhá, stežejní část práce se zabývá možnostmi současného sledování vlivu stresorů na membránový potenciál buněk a na aktivitu dvou hlavních MDR pump kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, Pdr5p a Snq2p. Pro tento účel se ukázalo být optimální aplikovat stávající fluorescenční metodu (diS-C<sub>3</sub>(3) assay) na set izogenních kmenů, které se liší pouze přítomností jednotlivých pump. Nejdůležitější závěry této části práce jsou shrnuty níže:

- Pomocí známého inhibitoru (substrátu) pumpy Pdr5p, FK506, byla demonstrována použitelnost metody pro studium interakcí potenciálních inhibitorů. Rychlost, s jakou dochází po přidání inhibitoru k nárůstu barvení buněk kmene AD12 indikující inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p, je závislá na jeho koncentraci. Snižování koncentrace vede k prodlužování času potřebného k dosažení úplné inhibice. Tento výsledek dokumentuje, že metoda je vhodná ke stanovení minimální koncentrace léku s okamžitým inhibičním účinkem.
- Rozdíly mezi účinkem FK506 a dalšími známými inhibitory (substráty) pumpy Pdr5p (enniatin a rapamycin) umožnilo ukázat další, z klinického hlediska významné, využití vyvinuté fluorescenční metody, tj. porovnání míry účinnosti jednotlivých inhibitorů mezi sebou.
- Pomocí fluorescenční metody a zónových testů bylo jasně prokázáno, že lyzozomotropní látka DM-11, inhibitor H<sup>+</sup>-ATPázy, neinteraguje ani s jednou ze studovaných MDR pump. Tato skutečnost vnáší zcela nový pohled na některé starší studie, ve kterých byla tato látka považována za substrát daných pump.
- Při studiu interakce protonoforu CCCP s buňkami jsme dospěli ke dvěma velmi důležitým zjištěním, která výrazně změnila pohled na používání tohoto běžně používaného diagnostického nástroje pro posouzení intaktnosti buněk:
  - Přidání CCCP k raně exponenciálním buňkám bezpumpového kmene AD1-3 vede k rychlé aktivaci H<sup>+</sup>-ATPázy, což znemožňuje pozorovat depolarizaci spojenou s přenosem protonů do buňky. Jak vyplynulo z této práce, je v obecném případě nezbytné k pozorování depolarizačního účinku použít CCCP v kombinaci s DM-11 nebo jiným inhibitorem H<sup>+</sup>-ATPázy.

- CCCP je substrátem obou studovaných pump, tj. inhibuje transport sondy z buněk. Z analýzy výsledků vyplynulo, že metoda umožňuje nejenom rozpoznat, že daná látka inhibuje transport sondy oběma pumpami, ale je také schopna postihnout rozdíly v míře inhibice jednotlivých pump.
- Pomocí fluorescenční metody se nám podařilo nalézt látku patřící do kategorie lyzozomotropních látek, která podobně jako DM-11 inhibuje aktivitu  $H^+$ -ATPázy, ale na rozdíl od DM-11 je substrátem obou pump.
- Při studiu ovlivnění transportu sondy Snq2p jejími známými substráty jsme dospěli k překvapivému závěru, že může docházet k současnému transportu dvou substrátů touto pumpou. Výsledky naznačují další možnosti této metody. Sledování schopnosti různých substrátů a jejich chemických modifikací inhibovat transport sondy by mohlo přispět k pochopení struktury vazebného místa/míst Snq2p, o kterém/ých v současné době podstatně méně informací v porovnání s Pdr5p.

Nedílnou součástí dizertační práce bylo rovněž vytvoření programu HUGO (viz 4.8), který díky automatickému vyhodnocování polohy maxima fluorescenčního spektra minimalizuje vliv subjektivní chyby při manuálním odečtu  $\lambda_{max}$ .

## LITERATURA

- [1] Prasad R., Panwar S. a Smriti: *Drug Resistance in Yeast – an emergency scenario*; Adv. In microbial physiology 2002, vol 46: 156-189
- [2] Niimi M., Wada S., Tanabe K., Kaneko A., Takano Y., Umeyama T., Hanaoka N., Uehara Y., Lamping E., Niimi K., Tsao S., Holmes A.R., Monk B.C., Cannon .RD: *Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae*; Jpn J Infect Dis. 2005 Feb;58(1): 1-7
- [3] Ernst R., Klemm R., Schmitt L., Kuchler K.: *Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps*; Methods Enzymol. 2005; 400: 460-84
- [4] Ernst R., Klemm R., Schmitt L., Kuchler K.: *Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps*; Methods Enzymol. 2005; 400: 460-84
- [5] Keld D.: *Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells*; Biochim Biophys Acta. 1973 Oct 25;323(3): 466-83
- [6] See YP., Carlsen SA., Till J.E., Ling V.: *Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide*; Biochim Biophys Acta. 1974 Dec 10;373(2): 242-52
- [7] Germann UA., Willingham MC., Pastan I., Gottesman MM.: *Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus*; Biochemistry. 1990 Mar 6;29(9): 2295-303
- [8] Goffeau A., Park J., Paulsen IT., Jonniaux JL., Dinh T., Mordant P., Saier MH.: *Multidrug resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames within the major facilitator superfamily*; Yeast 1997; 13: 43-54
- [9] Paulsen IT., Brown M.H., Skurray RA.: *Proton dependent multidrug efflux systems*; Microb Rev 1996; 60: 575-608.
- [10] Paulsen I.T.: *Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution*; Current Opinion in Microbiology 2003; 6: 446–451
- [11] Bambeke F., Balzi E. a . Tulkens P.M.: *Antibiotic Efflux Pumps*; Biochemical Pharmacology 2000; vol. 60: 457–470
- [12] Prasad R., Panwar S.: *Physiological functions of multidrug transporters in yeast*; Current science, 2004 Jan 10; vol 86, NO.1: 62-73
- [13] Bauer. BE., Wolfger H., Kuchler K.: *Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance*; Biochimica et Biophysica Acta 1999; 1461: 217-236

- [14] Bevers EM., Comfurius P., Dekkers D.W., Zwaal RF.: *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*; Biochim Biophys Acta. 1999 Aug 18;1439(3): 317-30
- [15] Helvoort A., Smith AJ., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel AH., Borst P., van Meer G.: *MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine*; Cell. 1996; Nov 1;87(3): 507-17.
- [16] Smriti., Krishnamurthy S., Dixit BL., Gupta CM., Milewski S, Prasad R.: *ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen Candida albicans are general phospholipid translocators*; Yeast 2002; 19: 303-18.
- [17] Decottignies A., Grant AM., Nichols JW., de Wet H., McIntosh DB., Goffeau A.: *ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p*; J Biol Chem. 1998 May 15;273(20): 12612-22.
- [18] Jungwirth H., Kuchler K.: *Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging*; FEBS Letters 2006; 580:1131–1138
- [19] Higgins CF.: *ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man*; Annu. Rev. Cell Biol. 1992; 8: 67-113
- [20] Nagy Z., Montigny C., Leverrier P., Yeh S., Goffeau A., Garrigos M., Falson P.: *Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification*;
- [21] Holla I., Cole S.P., Kuchler K. a Higgins, C.: *ABC Proteins From Bacteria to Man*; Academic Press–Elsevier Science 2003
- [22] Walker JE., Saraste M, Runswick MJ. a Gay NJ.: *Distantly related sequences in the a- and f-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*; The EMBO Journal 1982; vol. I No.8: 945 - 951
- [23] Browne B., Clendon V. a Bedwell DM.: *Mutations within the First LSGGQ Motif of Ste6p Cause Defects in a-Factor Transport and Mating in Saccharomyces cerevisiae*; Journal of bacteriology 1996 Mar.; vol. 178, No. 6 :1712–1719
- [24] Loo TW., Bartlett MC. a Clarke DM.: *The “LSGGQ” Motif in Each Nucleotide-binding Domain of Human P-glycoprotein Is Adjacent to the Opposing Walker A Sequence*; The journal of biological chemistry 2002 Nov; 277, No. 44, 1: 41303–41306
- [25] Decottignies A, Goffeau A.: *Complete inventory of the yeast ABC proteins*; Nat Genet. 1997 Feb;15(2): 137-45.
- [26] Loo TW., Bartlett MC., Clarke DM.: *Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains*; J Biol Chem. 2003 Jan 17;278(3): 1575-8

- [27] Lage H.: *ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers*; Int J Antimicrob Agents. 2003 Sep;22(3): 188-99.
- [28] Ernst R, Kueppers P, Klein CM, Schwarzmüller T, Kuchler K, Schmitt L.: *A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5*; Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 1; 105(13): 5069-74
- [29] National institute of neurological disorders and stroke; [http://www.ninds.nih.gov/disorders/disorder\\_index.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/disorder_index.htm)
- [30] Gášková, D., Brodská, B., Heřman, P., Večeř, J., Malínský, J., Sigler, K., Benada, O., Plášek J.: *Fluorescent probing of membrane potential in yeast: the role of cell wall in assays with diS-C3(3)*; Yeast 1998, 14: 1189-1197
- [31] Lesage G., Bussey H.: *Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae*; Microbiol Mol Biol Rev. 2006 Jun;70(2): 317-43
- [32] Klis FM., Boorsma A. a De Groot PVJ.: *Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae*; Yeast 2006; 23: 185–202
- [33] Grossmann G., Opekarová M., Malinsky J., Weig-Meckl I., Tanner W.: *Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast*; EMBO J. 2007 Jan 10;26(1): 1-8
- [34] Toulmay A., Schneider R.: *Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: A model to study plasma membrane biogenesis in yeast*; Biochimie. 2007 Feb;89(2): 249-54
- [35] Holyoak CD., Stratford M., McMullin Z., Cole MB., Crimmins K., Brown AJ., Coote PJ.: *Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of Saccharomyces cerevisiae in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid*; Appl Environ Microbiol. 1996 Sep;62(9): 3158-64
- [36] Campetelli AN., Previtali G. arce CA., Barra HS., Casale CH.: *Activation of the plasma membrane H-ATPase of Saccharomyces cerevisiae by glucose is mediated by dissociation of the H(+)-ATPase-acetylated tubulin complex*; FEBS J. 2005 Nov;272(22): 5742-52
- [37] Malinska K., Malinsky J., Opekarova M., Tanner W.: *Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living S. cerevisiae cells*; J Cell Sci. 2004 Dec 1;117(Pt 25): 6031-41
- [38] Ambesi A a kol.: *Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase*; J Exp Biol 2000, 203(Pt 1): 155-60
- [39] *Saccharomyces* genome database; <http://yeastgenome.org>

- [40] Linnane AW., Lamb AJ., Christodoulou C., Lukins HB.: *The biogenesis of mitochondria, VI. Biochemical basis of the resistance of Saccharomyces cerevisiae toward antibiotics which specifically inhibit mitochondrial protein synthesis*; Proc Natl Acad Sci U S A. 1968 Apr;59(4): 1288-93
- [41] Wilkie D., Saunders G., Linnane AW.: *Inhibition of respiratory enzyme synthesis in yeast by chloramphenicol: relationship between chloramphenicol tolerance and resistance to other antibacterial antibiotics*; Genet Res. 1967 Oct;10(2): 199-203
- [42] Rank GH., Bech-Hansen NT.: *Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in S. cerevisiae*; Mol Gen Genet. 1973 Nov 2;126(2): 93-102
- [43] Balzi E., Chen W., Ulaszewski S., Capieaux E., Goffeau A.: *The multidrug resistance gene PDR1 from Saccharomyces cerevisiae*; J Biol Chem. 1987 Dec 15;262(35): 16871-9
- [44] DeRisi J., van den Hazel B., Marc P., Balzi E., Brown P., Jacq C., Goffeau A.: *Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants*; FEBS Lett. 2000 Mar 24;470(2): 156-60
- [45] John P. McGrath a Varshavsky A.: *The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein*; Nature. 1989 Aug 3;340(6232): 400-4
- [46] Leppert G., McDevitt R., Falco SC., Van Dyk TK., Ficke MB., Golin J.: *Cloning by Gene Amplification of Two Loci Conferring Multiple Drug Resistance in Saccharomyces*; Genetics. 1990 May;125(1): 13-20
- [47] Meyers S., Schauer W., Balzi E., Wagner M., Goffeau A., Golin J.: *Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5*; Curr Genet. 1992 May;21(6): 431-6
- [48] Balzi E., Wang M., Leterme S., Van Dyck L., Goffeau A.: *PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1*; J Biol Chem. 1994 Jan 21;269(3): 2206-14
- [49] Bissinger PH., Kuchler K.: *Molecular cloning and expression of the Saccharomyces cerevisiae STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance*; J Biol Chem. 1994 Feb 11;269(6): 4180-6
- [50] Hirata D., Yano K., Miyahara K., Miyakawa T.: *Saccharomyces cerevisiae YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance*; Curr Genet. 1994 Oct;26(4): 285-94
- [51] Kralli A., Bohen SP., Yamamoto KR.: *LEM1, an ATP-binding-cassette transporter, selectively modulates the biological potency of steroid hormones*; Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 9;92(10): 4701-5



- [52] Servos J., Haase E., Brendel M.: *Gene SNQ2 of Saccharomyces cerevisiae, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases*; Mol Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3): 214-8
- [53] Sa'-Correia I., Tenreiro S.: *The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of Saccharomyces cerevisiae genome sequence*; Journal of Biotechnology 2002; 98: 215-226
- [54] Michalková-Papajová D., Šubík J.: *Regulačná sieť PDR v mnohonásobnej rezistencii kvasiniek*; Biologické listy 2002; 67(2): 101-136
- [55] Pao SS., Paulsen IT., Saier MH Jr.: *Major facilitator superfamily*; Microbiol Mol Biol Rev. 1998 Mar;62(1): 1-34
- [56] Nourani A., Wesolowski-Louvel M., Delaveau T., Jacq C., Delahodde A.: *Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast Saccharomyces cerevisiae: involvement of two hexose transporters*; Mol Cell Biol. 1997 Sep;17(9): 5453-60
- [57] Ferreira-Pereira A., Marco S., Decottignies A., Nader J., Goffeau A., Rigaud JL.: *Three-dimensional reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae multidrug resistance protein Pdr5p*; J Biol Chem. 2003 Apr 4;278(14): 11995-9
- [58] Decottignies A., Kolaczkowski M., Balzi E a Goffeau A.: *Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast*; J Biol Chem. 1994 Apr 29;269(17): 12797-803
- [59] Rogers B., Decottignies A., Kolaczkowski M., Carvajal E., Balzi E. a Goffeau. A.: *The pleiotropic drug ABC transporters from Saccharomyces cerevisiae*; J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001; 2: 207-214
- [60] Sipos G. a Kuchler K.: *Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification*; Curr Drug Targets 2006; 7, 471-481
- [61] Wendler F., Bergler H., Prutej K., Jungwirth H., Zisser G., Kuchler K., Högenauer G.: *Diazaborine resistance in the yeast Saccharomyces cerevisiae reveals a link between YAP1 and the pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR3*; J Biol Chem. 1997 Oct 24;272(43): 27091-8
- [62] Delaveau T., Delahodde A., Carvajal E., Subik J., Jacq C. : *PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon*; Mol Gen Genet. 1994 Sep 1;244(5): 501-11
- [63] Mamnun Y.M., Pajaitan R., Mahe Y., Delahodde A. a Kuchler., K.: *The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo*; Mol. Microbiol. 2002; 46, 1429-1440
- [64] Devaux F., Carvajal E., Moye-Rowley S., Jacq C.: *Genome-wide studies on the nuclear PDR3-controlled response to mitochondrial dysfunction in yeast*; FEBS Lett. 2002 Mar 27;515(1-3): 25-8
- [65] Kolaczowska A., Kolaczkowski M., Goffeau A., Moye-Rowley WS.:

*Compensatory activation of the multidrug transporters Pdr5p, Snq2p, and Yor1p by Pdr1p in Saccharomyces cerevisiae*; FEBS Letters 2008; 582: 977–983

- [66] Carvajal E., van den Hazel HB., Cybularz-Kolaczewska A., Balzi E., Goffeau A.: *Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes*; Mol Gen Genet. 1997 Oct;256(4): 406-15
- [67] Akache B., MacPherson S., Sylvain MA., Turcotte B.: *Complex interplay among regulators of drug resistance genes in Saccharomyces cerevisiae*; J Biol Chem. 2004 Jul 2;279(27): 27855-60
- [68] Hellauer K., akache B., MacPherson S., Sirard E a Turcotte B.: *Zinc Cluster Protein Rdr1p Is a Transcriptional Repressor of the PDR5 Gene Encoding a Multidrug Transporter*; J Biol Chem. 2002 May 17; 277(20):17671–17676
- [69] Akache B., Wu K., Turcotte B.: *Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins*; Nucleic Acids Res. 2001 May 15;29(10): 2181-90
- [70] Akache B., Turcotte B.: *New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins*; J Biol Chem. 2002 Jun 14;277(24): 21254-60
- [71] Hikkel I., Lucau-Danila A., Delaveau T., Marc P., Devaux F., Jacq C.: *A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast*; J Biol Chem. 2003 Mar 28;278(13): 11427-32
- [72] Lucau-Danila A., Delaveau T., Lelaais G., Devaux F., Jacq C.: *Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon*; J Biol Chem. 2003 Dec 26;278(52): 52641-50
- [73] Kren A., Mamnun YM., Bauer BE., Schüller C., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori C., Piper P., Kuchler K.: *War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast*; Mol Cell Biol. 2003 Mar;23(5): 1775-85
- [74] van den Hazel HB., Pichler H., Matta MAD., a kol.: *PDR16 and PDR17, Two Homologous Genes of Saccharomyces cerevisiae, Affect Lipid Biosynthesis and Resistance to Multiple Drugs*; J Biol Chem. 199 Jan 22; 274(4): 1934–1941, 1999
- [75] Rodrigues-Pousada CA., Nevitt T., Menezes R. Azevedo D., Pereira J. amaral C.: *Yeast activator proteins and stress response: an overview*; FEBS Lett. 2004 Jun 1;567(1): 80-5
- [76] Moye-Rowley WS.: *Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences*; Eukaryot Cell. 2003 Jun;2(3): 381-9
- [77] Schnell N., Entian KD.: *Identification and characterization of a Saccharomyces cerevisiae gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators*; Eur J Biochem. 1991 Sep 1;200(2): 487-93

- [78] Hirata D., Yano K., Miyakawa T.: *Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in Saccharomyces cerevisiae*; Mol Gen Genet. 1994 Feb;242(3): 250-6
- [79] Micháľková-Papáľová D., Šubík J.: *Molekulárne mechanizmy mnohonásobnej rezistence kvasinek. Regulačná sieť YAP*; ., Biologické Listy 2001; 66: 253-282
- [80] Kuge S., Jones N., Nomoto A.: *Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress*; EMBO J. 1997 Apr 1;16(7): 1710-20
- [81] Furuchi T., Ishikawa H., Miura N., Ishizuka M., Kajiya K., Kuge S., Naganuma A.: *Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in Saccharomyces cerevisiae*; Mol Pharmacol. 2001 Mar;59(3): 470-4
- [82] Kolaczowski M., Vaerest M., Cybularz-Kolaczowski A., Soumilluion J., Konigs W. a Goffeau A.: *Anticancer drugs, ionophoric peptides and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p*; J. Biol. Chem. 1996; 271: 31543–31548
- [83] Mamnun Y.M., Schuller C. a Kuchler K.: *Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase*; FEBS Lett. 2004; 559: 111–117
- [84] Maláč J., Urbánková E., Sigler K., Gášková D.: *Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C3(3) fluorescence assay*; Int J Biochem Cell Biol. 2005 Dec;37(12):2536-43
- [85] Čadek R., Chládková K., Sigler K., Gášková D.: *Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of S. cerevisiae: effect of pump overproduction and carbon source*; Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1665: 111 –117
- [86] Egner R., Rosenthal FE., Kralli A., Sanglard D. a Kuchler K.: *Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter*; Mol. Biol. Cell 1998; 9: 523–543
- [87] Hrycyna CA., Ramachara M., Germann UA., Cheng PW., Pastan I., Gottesman MM.: *Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric*; Biochemistry 1999 Oct 19;38(42): 13887-99
- [88] Senior AE., Gadsby DC.: *ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR*; Semin Cancer Biol. 1997 Jun;8(3): 143-50
- [89] Proff C., Kölling R.: *Functional asymmetry of the two nucleotide binding domains in the ABC transporter Ste6*; Mol Gen Genet. 2001 Feb;264(6): 883-93
- [90] Egner R., Bauer B.E. a Kuchler K.: *The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility*; Mol. Microbiol. 2000; 35: 1255–1263

- [91] Wemmie JA., Szczypka MS., Thiele DJ., Moye-Rowley WS.: *Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1*; J Biol Chem. 1994 Dec 23;269(51): 32592-7
- [92] Egner R., Kuchler K.: *The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole*; FEBS Lett. 1996 Jan 8;378(2): 177-81
- [93] Egner R., Mahé Y., Pajaitan R., Kuchler K.: *Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in Saccharomyces cerevisiae*; Mol Cell Biol. 1995 Nov;15(11): 5879-87
- [94] Mahé Y., Lemoine Y., Kuchler K.: *The ATP Binding Cassette Transporters Pdr5 and Snq2 of Saccharomyces cerevisiae Can Mediate Transport of Steroids in Vivo*; J Biol Chem. 1996 Oct 11;271(41): 25167-72
- [95] Miyahara K., Mizunuma M., Hirata D., Eiko Tsuchiya., Miyakawa T.: *The involvement of the Saccharomyces cerevisiae multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance*; FEBS Lett. 1996 Dec 16;399(3): 317-20
- [96] Kolaczowski M., Kolaczowska A., Luczynski J., Witek S., Goffeau A.: *In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network*; Microb Drug Resist. 1998 Fall;4(3): 143-58
- [97] Golin J., Ambudkar SV., May L.: *The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates?*; Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 27;356(1): 1-5
- [98] Golin J. Ambudkar SV., Gottesman MM., Habib AD., Szczepanski J., Ziccardi W., May L.: *Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux*; J Biol Chem. 2003 Feb 21;278(8): 5963-9
- [99] Hanson L., May L., Tuma P., Keeven J., Mehl P., Ferenz M. Ambudkar SV., Golin J.: *The Role of Hydrogen Bond Acceptor Groups in the Interaction of Substrates with Pdr5p, a Major Yeast Drug Transporter*; Biochemistry. 2005 Jul 19;44(28): 9703-13
- [100] Cui Z., Shiraki T., Hirata D., Miyakawa T.: *Yeast gene YRR1, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene SNQ2*; Mol Microbiol. 1998 Sep;29(5): 1307-15
- [101] Katzmann DJ., Hallstrom TC., Voet M., Wysock W., Golin J., Volckaert G., Moye-Rowley WS.: *Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in Saccharomyces cerevisiae*; Mol Cell Biol. 1995 Dec;15(12): 6875-83

- [102] Wolfger HA., Mahé Y., Parle-McDermott A., Delahoddeb A. a Kuchler K.: *The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators*; FEBS Lett. 1997 Dec 1;418(3): 269-74
- [103] Imai., T. a Ohno., T.: *Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase*; J Biotechnol. 1995 Jan 15;38(2): 165-72
- [104] Lambert RJ., Stratford M.: *Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response*; J Appl Microbiol. 1999 Jan;86(1): 157-64
- [105] Schuller C., Mamnun Y.M., Mollapour M., Krapf G., Schuster M., Bauer B.E., Piper P.W. a Kuchler K.: *Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in Saccharomyces cerevisiae*; Mol. Biol. Cell 2004; 15: 706–720
- [106] Holyoak CD., Bracey D., Piper PW., Kuchler K. a Coote PJ.: *The Saccharomyces cerevisiae Weak-Acid-Inducible ABC Transporter Pdr12 Transports Fluorescein and Preservative Anions from the Cytosol by an Energy-Dependent Mechanism*; J. of bacteriology, 1999 Aug.; 181(15): 4644–4652
- [107] Piper PW., Mahe Y., Thompson S., Pajaitan R., Holyoak C., Egner C., Muehlbauer M., Coote P. a Kuchler K.: *The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast*; EMBO J. 1998; 17: 4257–4265
- [108] Wolfger H., Mamnun YM. a Kuchler K.: *The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification*; J. Biol.Chem. 2004; 279: 11593–11599
- [109] Li Y., Prinz WA.: *ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate nonvesicular, raft-modulated sterol movement from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum*; J Biol Chem. 2004 Oct 22;279(43): 45226-34
- [110] The *S. pombe* Genome Project; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pombe/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/)
- [111] Schuetzer-Muehlbauer M., Willinger B., Egner R., Ecker G., Kuchler K.: *Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from Candida albicans functionally expressed in yeast*; International Journal of Antimicrobial Agents 2003, 22: 291-300
- [112] Prasad R., Dewergifosse P., Goffeau A., Balzi E.: *Molecular cloning and characterization of a novel gene of Candida albicans, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals*; Curr Genet 1995;27: 320-9
- [113] Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J.: *Cloning of Candida albicans genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene*; Microbiology 1997;143: 405-16

- [114] Shukla S., Saini P., Smriti ., Jha S. Ambudkar SV., Prasad R.: *Functional characterization of Candida albicans ABC transporter Cdr1p*; Eukaryot Cell. 2003 Dec;2(6): 1361-75
- [115] Moran GP., Sanglard D., Donnelly SM., Shanley DB., Sullivan DJ., Coleman DC.: *Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in Candida dubliniensis*; Antimicrob Agents Chemother. 1998 Jul;42(7): 1819-30
- [116] Sanglard D., Ischer F., Calabrese D., Majcherczyk PA., Bille J.: *The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from Candida glabrata is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents*; Antimicrob Agents Chemother. 1999 Nov;43(11): 2753-65
- [117] Brun S., Bergès T., Poupard P., Vauzelle-Moreau C., Renier G., Chabasse D., Bouchara JP.: *Mechanisms of Azole Resistance in Petite Mutants of Candida glabrata*; Antimicrob Agents Chemother. 2004 May;48(5): 1788-96
- [118] Gulshan K., Moye-Rowley WS.: *Multidrug resistance in fungi*; Eukaryotic cell 2007, Nov; 6 (11): 1933-42
- [119] *Candida* genome Database; <http://www.candidagenome.org/>
- [120] Hiraga K., Wanigasekera A., Sugi H., Hamanaka N., Oda K.: *A novel screening for inhibitors of a pleiotropic drug resistant pump, Pdr5, in Saccharomyces cerevisiae*; Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Jul;65(7): 1589-95
- [121] Leonard PJ., Rathod PK., Golin J.: *Loss of function mutation in the yeast multiple drug resistance gene PDR5 causes a reduction in chloramphenicol efflux.*; Antimicrob Agents Chemother. 1994 Oct;38(10): 2492-4
- [122] Gášková D., Čadek R., Chaloupka R., Vacata V., Gebel J., Sigler K.: *Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane MDR transporters by diS-C3(3) fluorescence*; Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2002; 34: 931-937
- [123] Gášková D., Brodská B., Holoubek A., Sigler K.: *Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C3(3) assay.*; Int J Biochem Cell Biol. 1999 May;31(5): 575-84
- [124] Kamila Moquin *Závislost poškození kvasinkové buňky chemickým stresem na stavu buněčného obranného systému: MDR pump*; Dizertační práce, UK, MFF 2004
- [125] Gášková D., Čadek R., Chaloupka R., Plášek J., Sigler K.: *Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells : diS-C3(3) in yeast*; Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1511: 74-79
- [126] Russell AD., Hugo WB., Ayliffe GAJ: *Principles a Practice of Disinfection., Preservation a Sterilization*; Blackwell Science Oxford 1999; 3.edice: 5-123
- [127] *Microbial resistance and biocides - a review and consensus statement*; International Scientific Forum on Home Hygiene 2000, str. 6; <http://www.ifh-homehygiene.org>

- [128] Hendrych T.: *Studium oxidativního stresu v kvasinkách pomocí fluorescenčních sond*; Diplomová práce, UK, MFF, Praha 2002
- [129] Maláč J., Sigler K., Gášková D.: *Glucose-induced MDR pump resynthesis in respiring yeast cells depends on nutrient level.*; *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 11;337(1): 138-41
- [130] Hiraga K., Yamamoto S., Fukuda H., Hamanaka N., Oda K.: *Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328: 1119–1125
- [131] Arceci RJ., Stieglitz K., Bierer BE.: *Immunosuppressants FK506 and rapamycin function as reversal agents of the multidrug resistance phenotype*; *Blood* 1992; 80: 1528–1536
- [132] Heitman J., Movva NR., Hall MN.: *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*; *Science* 1991; 253: 905–909
- [133] Witek S., Goffeau A., Nader J., Łuczyński J., Lachowicz TM., Kuta B., Oblak E.: *Lysosomotropic aminoesters act as H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in yeast*; *Folia Microbiol. (Praha)* 1997; 42: 252–254
- [134] Witek S., Kolaczkowski M., Lachowicz TM., Kolaczowska A., Łuczyński J. a Goffeau A.: *“Soft” lysosomotropic compounds as new substrates of the yeast PDR network*; *Folia Microbiol. (Praha)* 1998; 43: 214–216
- [135] Kasianowicz J., Benz R., McLaughlin S.: *The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes*; *J. Membr. Biol.* 1984; 82: 179–190
- [136] Holyoak CD., Stratford M., McMullin Z., Cole MB., Crimmins K, Brown AJ., Coote PJ.: *Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of Saccharomyces cerevisiae in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid*; *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 3158–3164
- [137] J.B. dos Passos., M. Vanhalewyn., R.L. Braão., I.M. Castro., J.R. Nicoli., J.M. Thevelein: *Glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of the yeast Saccharomyces cerevisiae affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis*; *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1136: 57–67
- [138] Čadek R.: *Odpověď kvasinkové buňky na stres: úloha iontových gradientů při udržování integrity buněčné membrány*; Dizertační práce, UK, MFF, Praha 2004
- [139] Loo TW., Bartlett MC., Clarke DM.: *Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein*; *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41): 39706-10

# Přílohy

## Publikace

[1] Chladrková K, Hendrych T, Gasková D, Goroncy-Bermes P, Sigler K. *Effect of biocides on S. cerevisiae: relationship between short-term membrane affliction and long-term cell killing.*; Folia Microbiol (Praha). 2004;49(6):718-24.

[2] Hendrych T, Kodedová M, Sigler K, Gášková D. *Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the S. cerevisiae multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p*; Biochim Biophys Acta. 2009 Mar;1788(3):717-23

## Konferenční příspěvky

[3] Karel Sigler, Tomáš Hendrych, Kamila Chládková and Dana Gášková: Biocides and *S. cerevisiae* cells: from cell depolarization to impairment of membrane integrity and cell killing; *Proceedings of 32nd Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, 2004.

[4] D. Gášková, K. Chládková-Moquin, T. Hendrych and K. Sigler: Dependence of chemical stress-induced damage to yeast cells on the status of mdr pumps; *Proceedings of 33rd Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, 11-13 May, 2005, str.52.

[5] D. Gášková, K. Chládková-Moquin, T. Hendrych and K. Sigler: Impact of MDR pump performance on yeast cell damage caused by chemical stressors; BioTech 2005, 17.-19.5.2005 Wädenswil, Switzerland;

[6] Dana Gášková, Kamila Chládková, Tomáš Hendrych, Jan Maláč and Karel Sigler: A new test system for identifying interactions of potential inhibitors of *S. cerevisiae* MDR pumps: pump inhibition or competition for transport?; 23rd Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 23.9.'05, New Delhi, India;

[7] K. Sigler, K. Chládková-Moquin, T. Hendrych and D. Gášková: Are MDR pumps under all circumstances crucial for yeast cell survival under chemical stress?; 23rd Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 23.9.'05, New Delhi, India;

[8] Zlámalová M., Hendrych T., Pichová A., Gášková D., Sigler K.: Identifying interactions of bioactive compounds with *S. cerevisiae* MDR pumps *Proceedings of 34th Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, 2006.

[9] Hendrych Tomáš., Zlámalová Marta, Gášková Dana, Pichová Alena, Sigler Karel: Interactions of xenobiotics with *S. cerevisiae* MDR pumps; 24th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 2006, Prague;



[10] Drietomská A., Kodedová M., Hendrych T., Sigler K., Gášková, D.: Testing the effect of lysosomotropic compounds on *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of 35<sup>th</sup> Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, 16 – 18 May 2007, p. 82.

[11] Gášková D, Sigler K., Hendrych T., Kodedová M.: A novel screening system for identification of inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance pumps PDR5 and SNQ22; 26th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 8.9.'08, Braga, Portugal

[12] Kodedová M., Drietomska A., Hendrych T., Sigler K., Gášková D.: Fast estimation of modes of action of antimicrobials on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from MDR pump inhibition with a minimal effect on membrane potential up to cell permeabilization. Central European Symposium on Antimicrobial Resistance, Zadar, Chorvatsko, 2009