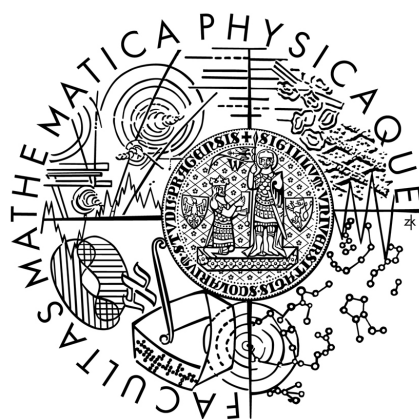


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Jakub Klener

Studium funkce prokaryotních homologů Nramp transportních proteinů

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Chaloupka Roman, Ph.D.,

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2009

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Romanu Chaloupkovi, Ph.D. za trpělivé zodpovídání všetečných otázek, pomoc v obsluze laboratorního zařízení a konzultace získaných výsledků. Dále pak mé díky patří RNDr. Evě Urbánkové, Ph.D. za občasnou pomoc a radu při práci v laboratoři.

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

V Praze dne

Jakub Klener

Obsah

1 Úvod	5
2 Teoretická část	7
2.1 Membránový transport	7
2.2 Rodina Nramp	8
2.2.1 Fylogenetické vztahy v rodině Nramp	9
2.2.2 Studované transportéry z rodiny Nramp/MntH	12
3 Použité metody a experimentální materiál	14
3.1 Měření intracelulárního pH	14
3.1.1 pHluorin	14
3.1.2 Experimentální podmínky pro měření vnitrobuněčného pH	15
3.2 Pufrační kapacita	17
3.2.1 Měření pufrační kapacity buněk pomocí slabých kyselin a zásad	17
3.3 Kvantifikace odpřaženého toku protonů proteinem MntH	18
3.4 Použité bakteriální kmeny	19
3.5 Příprava vzorků	19
4 Výsledky měření a diskuze	20
4.1 Počáteční intracelulární pH	20
4.2 Měření pufrační kapacity	21
4.3 Kvantifikace odpřaženého transportu protonů různými homology proteinů Nramp/MntH	23
4.4 Diskuze výsledků	26
5 Závěr	27
Seznam zkratk	28
Literatura	28

Název práce: Studium funkce prokaryotních homologů Nramp transportních proteinů

Autor: Jakub Klener

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

e-mail vedoucího: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstrakt: Proteiny rodiny Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) symportují dvojmocné kovové ionty spolu s protony přes buněčnou membránu do buňky [1]. Tato práce se zabývá kvantifikací toku protonů membránovým transportním proteinem MntH z *E. coli* a homologními transportéry z následujících organismů: *Erwinia chrysanthemi*, *Physcomitrella patens*, *Haloferrax volcanii*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus mutans* a *Xanthomonas campestris*. Tyto homologní proteiny příslušející k různým fylogenetickým skupinám rodiny Nramp byly studovány v bakteriích *E. coli* hyperexprimujících daný protein pomocí fluorescence pHluorinu – zeleného fluorescenčního proteinu citlivého na změny pH.

Klíčová slova: Nramp, MntH, intracelulární pH, pufrční kapacita, membránový transport

Title: Functional study of prokaryotic homologs of Nramp transport proteins

Author: Jakub Klener

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstract: Proteins from Nramp family (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) symports divalent metal ions together with protons through cell membrane into cell [1]. This work aims at quantification of proton flux mediated by membrane transport protein MntH from *E. coli* and homologous transporters from following organisms: *Erwinia chrysanthemi*, *Physcomitrella patens*, *Haloferrax volcanii*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus mutans* and *Xanthomonas campestris*. These homologous proteins belonging to different phylogenetic groups of Nramp family, was investigated in bacteria *E. coli* overexpressing given protein using fluorescence of pHluorin – pH sensitive variant of green fluorescent protein.

Keywords: Nramp, MntH, intracellular pH, buffering capacity, membrane transport

Kapitola 1

Úvod

Pro každou buňku je důležitá látková výměna s okolním prostředím, na níž se velkou měrou podílí membránové transportní proteiny. Mezi membránové transportéry patří i rodina Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein), která transportuje dvojmocné kovové ionty [1]. Zástupce této rodiny nalezneme v široké škále organismů, od bakterií až po člověka. Poruchy funkce těchto proteinů jsou spojeny s řadou chorob (například defekty myšího homologu DCT1, který je velmi podobný lidskému Nramp2, způsobují mikrocytární anémii [2, 3, 4], lidský Nramp1 se podílí na obraně proti mikrobiální infekci ve fagozómu [5, 6, 7, 8]). Proteiny z rodiny Nramp patří mezi sekundárně aktivní transportéry, konkrétně symportéry dvojmocných kovových iontů (například Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} [9], Cu^{2+} , Cd^{2+} [10], Ni^{2+} a Pb^{2+} [11]) a protonů nebo sodných kationtů [11, 12]. Kromě symportu protonů a dvojmocných kovových iontů jsou eukaryotní homology proteinů Nramp schopny za určitých podmínek katalyzovat i odpřažený transport protonů [11, 12, 13, 14, 15] či vykazovat proměnnou stechiometrii transportu [12]. Fylogenetickou analýzou bylo zjištěno, že rodina Nramp je tvořena třemi prokaryotními skupinami označovanými MntH A, B a C a dvěma skupinami eukaryotními [16, 17]. V této bakalářské práci jsme se zaměřili na studium odpřaženého transportu u vybraných homologních proteinů této rodiny. Rozdíly ve funkci mezi jednotlivými skupinami nám totiž mohou poskytnout cenné informace, které by mohly přispět k podrobnějšímu objasnění transportního mechanismu.

V rámci této práce byly studovány Nramp homology z následujících organismů: *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Haloferax volcanii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas campestris*, *Streptococcus mutans* a *Physcomitrella patens*. Tyto proteiny reprezentují fylogenetické skupiny MntH A, MntH A', MntH C α , C β a prototyp Nramp [16], kromě toho též jeden protein označovaný jako outgroup, tj. protein sekvenčně podobný, ale nepřináležející k této rodině [18]. Proteiny byly studovány v buněčném modelovém systému, bakteriích *E. coli* hyperexprimujících daný protein, pomocí sledování změn vnitrobuněčného pH vyvolaných právě transportem protonů skrze daný homolog Nramp. Změny vnitrobuněčného pH byly monitorovány pomocí změn excitačních spekter zeleného fluorescenčního proteinu citlivého na pH – pHluorinu.

Text práce je členěn do několika tematických celků. Teoretická část se zabývá membránovým transportem a podrobněji rodinou Nramp se zaměřením na již známé homology a jejich fylogenetické vztahy. V kapitole experimentální metody

nalezneme podrobnější rozbor měření intracelulárního pH a metody kvantifikace transportu protonů. Část zabývající se výsledky měření zpracovává naměřená data a kvantifikuje odpřažený tok protonů u studovaných homologů z rodiny transportních proteinů Nramp. A konečně závěr shrnuje nejdůležitější dosažené výsledky.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Membránový transport

O prvních buňkách pravděpodobně můžeme začít hovořit ve spojitosti s vytvořením membrány, která izolovala malé množství vodného roztoku zvaného cytoplazma od vnějšího prostředí. Membrána je rozhraním mezi cytoplazmou a okolím, tudíž se účastní veškeré látkové výměny buňky s vnějškem. Je tvořena dvojvrstvou membránových lipidů a je velmi tenká (30 Å) [19, str. 376], ale vzhledem k tomu, že vnitřek membrány je tvořen nepolárními řetězci mastných kyselin, je membrána pouze selektivně propustná.

Membránou mohou volně procházet jenom malé nepolární molekuly a dostatečně malé nenabitě polární molekuly, jako je třeba voda (18 Da). Pro všechny ionty a nabitě molekuly je však bez ohledu na jejich velikost samotná plazmatická membrána velmi silnou bariérou, a proto je jejich difúze skrz membránu velmi pomalá. Aby nabitě částice mohly projít skrz lipidovou dvojvrstvu, musí nejprve přestat interagovat s molekulami vody, a poté difundovat zhruba 30 Å [19, str. 391] tlustou vrstvou lipidu, ve kterém jsou velmi špatně rozpustné. Z toho vyplývá, že aktivační energie takového transportu je velmi vysoká. Transport těchto látek, které mohou být pro buňku velmi důležité, je proto zajišťován transmembránovými transportními proteiny.

Membránový transport katalyzovaný membránovými proteiny rozdělujeme na pasivní, jehož hnací silou je pouze elektrochemický gradient transportovaných látek, a aktivní, kdy látka může být transportována proti svému elektrochemickému gradientu buď na úkor energie ve formě ATP, potom se jedná o tzv. primárně aktivní transport, nebo kotransportována s jinou částicí, která prochází přes transportní protein membránou ve směru svého elektrochemického gradientu, čímž umožňuje průchod transportované látky i proti jejímu elektrochemickému gradientu. Takovýto typ transportu je označován jako sekundárně aktivní a podle směru, jímž jsou obě látky transportovány, ho označujeme jako antiport, pokud jsou kotransportovány v opačném směru, či jako symport, pokud obě částice procházejí stejným směrem.

U prokaryotických buněk má v tomto směru výsadní postavení elektrochemický gradient protonů Δp , který nazýváme protonmotivní silou a který představuje „hnací sílu“ jak pro syntézu ATP, tak pro nejrůznější sekundárně aktivní transportní proteiny v plazmatické membráně bakterií. Pro velikost protonmo-

tivní síly platí [20]:

$$\Delta p = \Delta V_m - Z\Delta pH, \quad (2.1)$$

kde $Z = 2,303RTF^{-1}$ (= 59 při 25 °C) převádí transmembránový rozdíl ΔpH na mV a ΔV_m je gradient elektrického potenciálu vzniklého různou koncentrací nábojů na periplazmatické a cytoplazmatické straně membrány a nazývá se membránový potenciál. Mezi sekundárně aktivní transportéry (symportéry), které využívají protonmotivní sílu patří i membránové transportní proteiny rodiny Nramp.

2.2 Rodina Nramp

Pro každou živou buňku jsou nepostradatelné přechodné kovy, které se podílejí na řadě důležitých životních procesů, například jsou častými kofaktory různých enzymů, které se účastní redoxních reakcí, jež jsou pro buňku velmi důležité. Navzdory tomu může být nadměrná koncentrace určitých kovů pro buňku škodlivá [1]. Kupříkladu redoxně aktivní kovy napadají strukturu DNA [21]. Dále je známo, že železo v přítomnosti aktivní formy kyslíku tvoří volné radikály, které poškozují buněčnou strukturu [22]. Jelikož nedostatek i nadbytek dvojmocných kovových iontů vyvolává v buňce nežádoucí reakce, musí být jejich intracelulární koncentrace dobře regulována. Součástí tohoto regulačního systému jsou také transportní proteiny z rodiny Nramp.

Proteiny z této rodiny transmembránových transportních proteinů (2.A.55 dle klasifikace TCDB¹), nazývané též Slc11 (z angl. SoLute Carrier 11) jsou široce zastoupeny v mnoha různých organismech od archeí, Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií [24, 25] přes kvasinky [26] a rostliny [27] až po živočichy [5, 28] a člověka [29, 30]. Jedná se o integrální membránové proteiny, které transportují dvojmocné kationty kovů v symportu s protony, hnací silou transportu je tedy elektrochemický protonový gradient [11, 12].

U člověka nalezneme dva odlišné paralogy proteinů Nramp. Protein Nramp2 (též Slc11a2, DCT1 či DMT1) se podílí na absorpci železa, symportuje Fe^{2+} s H^+ s afinitou kolem $6 \mu\text{M}$ respektive $1 \mu\text{M}$ [23]. Je známo, že některé mutace tohoto proteinu vedou u hlodavců k poruše feritinového cyklu, zhoršenému vstřebávání železa ve střevech a mikrocytární anémii [2, 3, 4]. Nramp1 (jinak také Slc11a1) hraje roli v imunitní odpovědi organismu na infekci [9, 31]. Bylo ukázáno, že myši s poškozeným Nramp1 jsou méně odolné vůči intracelulárním parazitům [5, 6, 7, 8]. Mechanismus však ještě není zcela probádán. Předpokládá se, že bakteriální MntH a Nramp1, exprimovaný na membráně fagozomu spolu soutěží o dvojmocné kovové ionty, které jsou důležité pro správnou funkci metaloenzymů. Právě metaloenzymy na straně intracelulárního patogenu se podílejí na odolnosti vůči oxidativnímu stresu, jemuž může být uvnitř fagocytické vakuoly hostitele vystaven [21, 32, 33].

U kvasinek jsou známy tři proteiny náležející k rodině Nramp, přičemž dva z nich se účastní transportu Mn^{2+} (Smf1p a Smf2p) a třetí, nazývaný Smf3p, se účastní mobilizace rezerv vnitrobuněčného Fe^{2+} [34, 35, 22].

¹mezinárodní klasifikační systém pro třídění membránových proteinů TCDB (Transport Classification Database) [23]

Bakteriální homology byly objeveny později, nejprve v enterobateriích *E. coli* a *Salmonella enterica*, které obsahují transportér Mn^{2+} , a pojmenovány MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) s ohledem na to, že jejich fyziologicky nejdůležitějším substrátem u bakterií je právě mangan [36, 37].

Zástupci rodiny Nramp mají v závislosti na délce 11–12 TMS (transmembránových segmentů). N-konec se nachází v cytoplazmě. Eukaryotické homology Nramp mají, s výjimkou kvasinkových Smf1p a Smf2p, 12 TMS, takže C-konec je na cytoplazmatické straně membrány, naopak prokaryotické homology a kvasinkové Smf1p a Smf2p jich mají 11 a C-konec nalezneme na periplazmatické straně membrány [38].

Systematickým studiem vlivu jednobodových mutací na funkci transportních proteinů Nramp byly identifikovány funkčně důležité oblasti jeho sekvence. Bylo objeveno, že extracelulární klíčka mezi 1. a 2. TMS obsahuje jak rezidua odpovídající za transport dvojmocného kovu Me^{2+} tak za transport H^+ , TMS3 zase pravděpodobně přispívá k navázání kovu, TMS4 a 6 jsou důležité pro spřažený transport kovu a protonu [22]. Ukazuje se, že mutace v TMS4 mají významný vliv na transport Fe^{2+} u DMT1 a způsobují mikrocytární anémii [3, 2].

Rodina proteinů Nramp sdílí s proteiny označovanými jako outgroup sekvence 28% reziduí [22], patrně díky existenci společného prapředka. Dá se tedy předpokládat, že rezidua neměnná v rodině Nramp a rozdílná s rovněž neměnnými rezidui ve skupině ougroup (jedná se o rezidua v TMS1, 6 a 11) [18], mohou být klíčová. Fakt, že proteiny rodiny Nramp byly nalezeny ve velmi širokém spektru organismů ukazuje, že živé organismy provází již od počátků evoluce [17]. Přesto se však zdá, že vývoj rodiny Nramp není zcela totožný s evolucí organismů v nichž jsou přítomny [16].

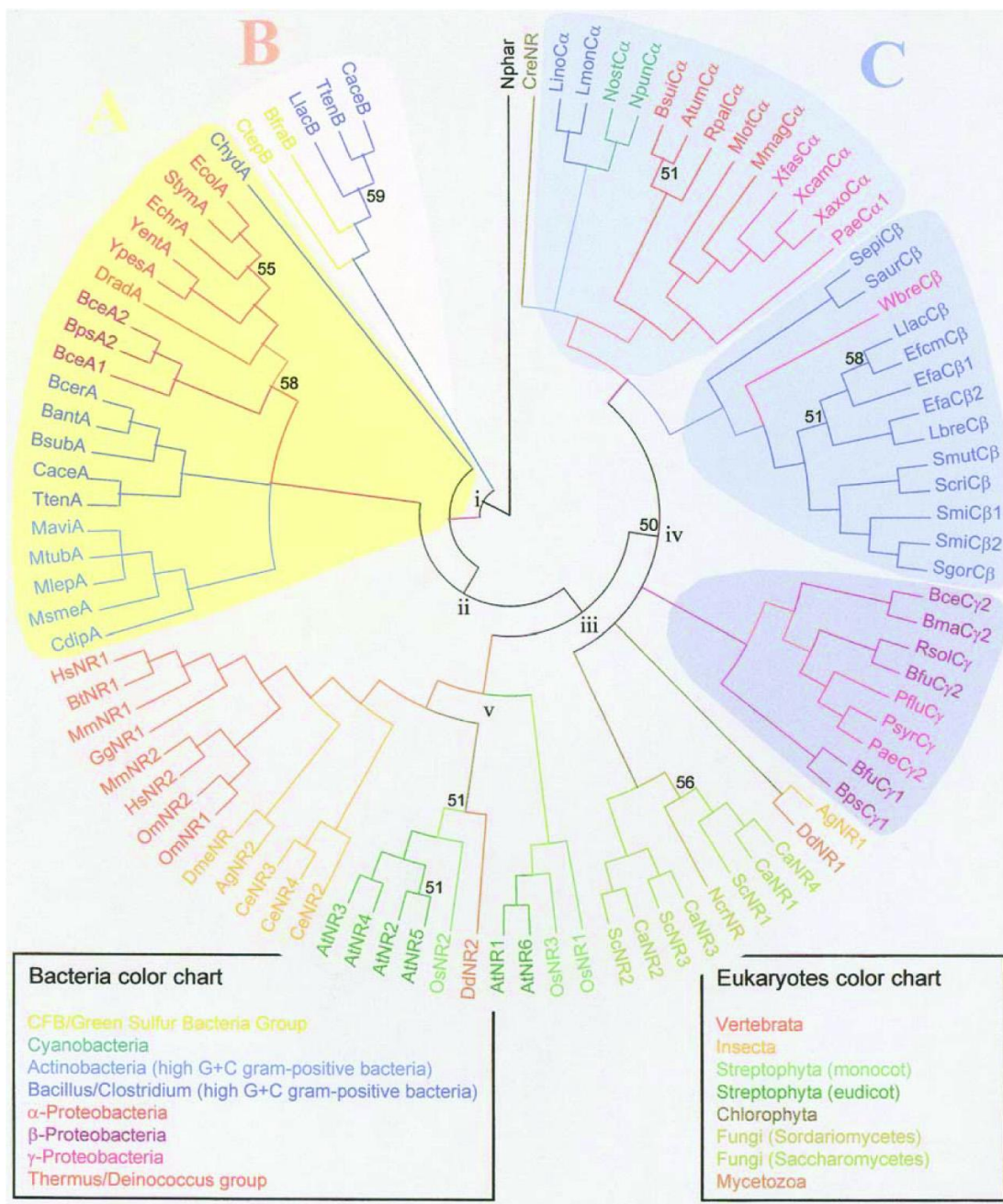
2.2.1 Fylogenetické vztahy v rodině Nramp

Detailní sekvenční analýzou bylo zjištěno, že rodina membránových transportních proteinů Nramp je složena z pěti fylogenetických skupin, dvou eukaryotních, nazývaných Nramp prototyp a Nramp archetyp a tří skupin prokaryotních označovaných MntH A, B a C, přičemž skupina C obsahuje vzhledem ke své relativně velké heterogenitě tři podskupiny $C\alpha$, $C\beta$ a $C\gamma$ [16].

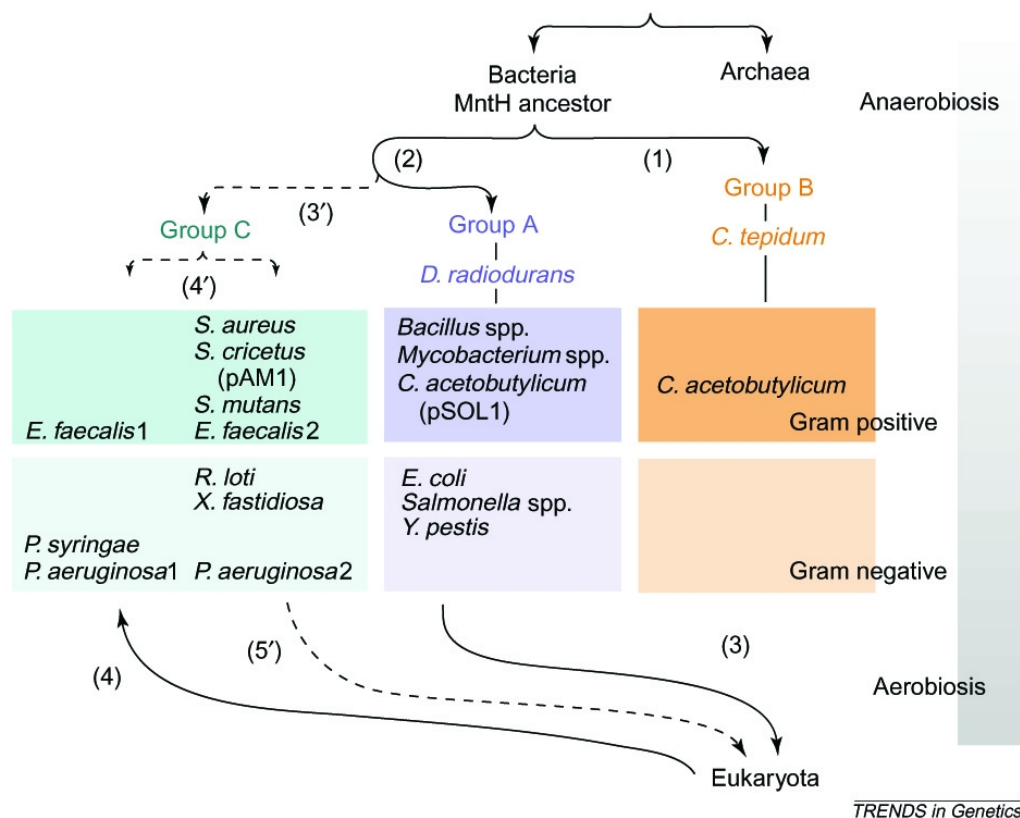
Ke skupině prototypu Nramp patří například transportní proteiny z měňavek, zelených a červených řas, kvasinek a bezobratlých, naproti tomu Nramp archetyp zahrnuje Nramp proteiny z rostlin, bezobratlých a obratlovců [16].

Proteiny skupiny MntH A se nacházejí jak v Gram-pozitivních, tak v Gram-negativních bakteriích. Jejich přítomnost v intracelulárních parazitech, jako *Salmonella enterica* serovar Typhimurium způsobující salmonelózu, by mohla naznačovat důležitou roli těchto proteinů během infekce, přestože se ukázalo, že odstranění genu kódujícího MntH v *Salmonella enterica* serovar Typhimurium nemělo vliv na virulenci v infikovaných myších [37]. MntH skupiny B vykazují relativně malou shodnost s ostatními MntH i eukaryotními členy této rodiny, což by mohlo znamenat, že jsou blíže prapředka celé rodiny Nramp. Mezi zástupce této skupiny patří například obligátně anaerobní fotoautotrofní zelené sírné bakterie (*Chlorobium tepidum*) [17].

Bylo zjištěno, že skupina MntH C vykazuje větší heterogenitu než zbylé dvě skupiny MntH a je podobnější eukaryotickým Nramp než MntH A a MntH B.



Obr. 2.1: Fylogenetický diagram rodiny membránových transportních proteinů Nramp ilustrující postupné oddělení linie bakteriálních (i) MntH B a (ii) MntH A, (iii) Nramp dělicích se dále na: (iv) Nramp prototyp, MntH C α , C β , C γ a kvasinkové Nramp a (v) Nramp rostlin a mnohobuněčných živočichů představující tzv. Nramp archetyp [16].



Obr. 2.2: Hypotéza vysvětlující evoluci rodiny membránových transportních proteinů Nramp/MntH (převzato z [17]). Předpokládá se, že skupina MntH B se mohla objevit v anaerobních organismech ještě před využitím manganu jako katalyzátoru při oxygenní fotosyntéze (1). Skupina A se mohla vyvinout vlivem selektivního tlaku způsobeného toxicitou kyslíku, aerobní metabolismus mohl upřednostnit proteiny s vyšší afinitou k manganu (2). Gen *mntH* eubakteriální skupiny A byl přenesen do eukaryot (3). Nakonec některé patogenní organismy mohly získat gen kódující Nramp, který chrání před oxidativním stresem, aby získaly výhodu během intracelulární infekce. Následně se pak tato výhoda rozšířila i mezi další úspěšné patogenní a symbiotické organismy (4) Alternativně je možno vysvětlit podobnost MntH skupiny C a eukaryotními proteiny Nramp sledem duplikací a ztrát genu (3'–5').

Někteří zástupci z Nramp prototyp (Nramp z protista *C. reinhardtii*) dokonce dosahují až 50% shody se zástupci z MntH C α (například s homology z *Nostoc* a *Listeria*) [16]. Transportéry ze skupiny MntH C α byly nalezeny ve fylogeneticky vzdálených druzích, jako například v sinicích (*Nostoc*) a Gram-pozitivních (*Listeria*) i Gram-negativních bakteriích (α a γ proteobakterie). Ve skupině MntH C β se nachází GC chudé (jejichž genom obsahuje málo guaninu a cytosinu) Gram-pozitivní bakterie (například ústní streptokoky a stafylokoky), ale výjimečně i Gram-negativní bakterie (*Wigglesworthia glossinidia*). Tato skupina se s prototypickou Nramp shoduje méně, než je tomu u skupin MntH C α a C γ , ačkoli vykazuje hydrofatický profil, který je bližší eukaryotickým Nramp než MntH A a B. K MntH C γ náleží homology z γ a β proteobakterií (např. *Burkholderia* a *Pseudomonas*) [16]. Podobnost některých proteinů skupiny MntH C s eukaryotickými

Nramp je také v rozporu s fylogenezí druhů, z nichž tyto proteiny pocházejí [16]. Ve skupině organismů exprimujících proteiny skupiny MntH C se navíc v porovnání s ostatními dvěma prokaryotními skupinami vyskytuje více organismů patogenních a endosymbiotických. Uvedené skutečnosti je možno vysvětlit pomocí horizontálního přenosu genů z eukaryot [16], hypotéza vysvětlující evoluci rodiny membránových transportních proteinů Nramp je podrobně znázorněna na Obr. 2.2.

2.2.2 Studované transportéry z rodiny Nramp/MntH

Z výsledků fylogenetické analýzy rodiny Nramp/MntH plyne, že proteiny skupiny MntH A jsou svou sekvencí blízké předkovi eukaryotních proteinů Nramp a bakteriální MntH C vznikly patrně horizontálním přenosem genů z eukaryot na prokaryota [18]. Proteiny ze skupiny MntH A tedy představují velmi dobrý prototypický model pro studium eukaryotních proteinů této rodiny. Stejně tak studium proteinů ze skupiny MntH C může být výborným nástrojem, který by mohl poskytnout cenné informace o blízkce příbuzných proteinech i o evoluci celé rodiny. [22].

Úkolem této bakalářské práce bylo prozkoumat jednu z funkčních charakteristik popsanou zatím jen u některých proteinů z rodiny Nramp na vybraných homologních proteinech z různých fylogenetických skupin. Pro tuto studii byly vybrány proteiny náležející k různým fylogenetickým skupinám z následujících organismů: *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Haloferax volcanii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas campestris*, *Streptococcus mutans* a *Physcomitrella patens*. Tyto proteiny reprezentují fylogenetické skupiny MntH A, MntH C a rovněž Nramp prototyp. Kromě toho byl také studován jeden zástupce skupiny outgroup, viz Tab. 2.1. Zkoumanou vlastností byl odpřažený tok protonů od toku Me^{2+} dříve popsaný u eukaryotních Nramp proteinů [11, 12, 13, 14] a nejnověji i u bakteriálního MntH z *E. coli* [15]. Odpřažený tok protonů jednotlivými homologními proteiny byl studován v buněčném modelovém systému bakterií *E. coli* hyperexprimujících studované proteiny pomocí sledování změn intracelulárního pH. Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je odpřažený transport protonů, zatím pozorovaný zejména u eukaryotních reprezentantů rodiny Nramp/MntH, vlastností zachovanou napříč různými fylogenetickými skupinami těchto proteinů, zejména však u vybraných bakteriálních homologů MntH.

Označení homologu Nramp	Fylogenetická skupina	Organismus původu
EcoliA	MntH A	<i>Escherichia coli</i> – fakultativně anaerobní Gram-negativní bičíkatá tyčinkovitá enterobakterie žijící v tlustém střevě teplokrevných živočichů.
SmarA	MntH A	<i>Serratia marcescens</i> – Gram-negativní tyčinkovitá enterobakterie, pro člověka patogenní (je odpovědná za některé nosokomiální nákazy).
SmarA'	MntH A	
HvoA	MntH A	<i>Haloferax volcanii</i> – halofilní zástupce Archeí, vyskytuje se v extrémně slaných podmínkách.
HvoO	outgroup	
Echry	MntH A	<i>Erwinia chrysanthemi</i> – Gram-negativní fakultativně anaerobní bacil, patří k enterobakteriím, je rostlinným patogenem, blízce příbuzný s <i>E. coli</i>
Xcamp	MntH C α	<i>Xanthomonas campestris</i> – proteobakterie odpovědná za různé rostlinné nemoci.
Smut	MntH C β	<i>Streptococcus mutans</i> – Gram-pozitivní fakultativně anaerobní bakterie způsobující dentální degradaci.
Physco prototype	prototype	<i>Physcomitrella patens</i> (česky čepenka odstálá) – hojně se vyskytující mech.

Tab. 2.1: Zkoumané homology Nramp/MntH²

²Negativní kontrola s prázdným plazmidem, tedy bakterie *E. coli* bez funkčního MntH proteinu, byla označena pBAD, bakterie *E. coli* exprimující příslušný homologní protein byly nazvány dle tohoto proteinu.

Kapitola 3

Použité metody a experimentální materiál

Funkce vybraných homologů transportních proteinů Nramp/MntH může být, díky tomu, že se jedná o symportéry dvojmocných kovových iontů a protonů, studována prostřednictvím sledování změn pH vyvolaných transportem. Jako modelový systém byly zvoleny bakterie *E. coli* hyperexprimující studovaný protein. Funkce daného proteinu může být mimo jiné monitorována pomocí vhodné metody umožňující měřit právě změny intracelulárního pH.

3.1 Měření intracelulárního pH

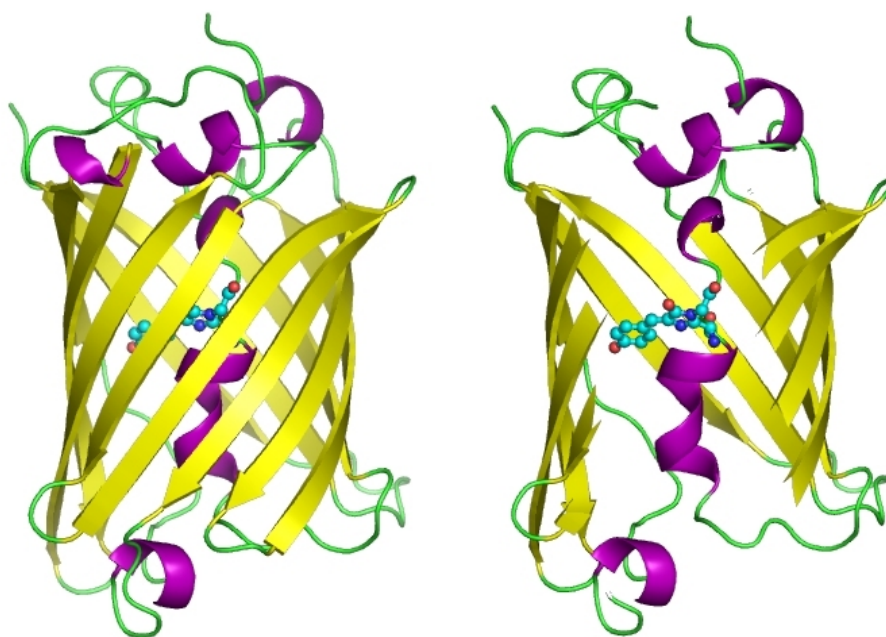
Jedním ze způsobů měření intracelulárního pH je použití fluorescenčních sond citlivých na změnu pH. Tato neinvazivní a nedestruktivní metoda poskytuje řadu výhod oproti tradičním metodám měření intracelulárního pH, jako jsou např. použití mikroelektrod (nevýhodou těchto metod je možnost poškození přirozených vlastností plazmatické membrány mikroelektrodou a navíc pro bakterie je tato metoda vzhledem k jejich malým rozměrům zcela nepoužitelná), měření akumulace radioaktivně značených slabých kyselin a zásad v buňce (zde zase vyvstávají problémy s kalibrací a také se nezaznamená průběh pH) nebo využití NMR kyseliny fosforečné, jejíž spektrum je závislé na pH [39]. Naproti tomu problémem při použití fluorescenčních sond může být dopravit tuto sondu do buňky [40, str. 19], tento problém však odpadá, je-li možno použít fluorescenční sondu, která je geneticky kódovaná.

3.1.1 pHluorin

Změnu v měření intracelulárního pH přinesl objev pH citlivé varianty zeleného fluorescenčního proteinu (GFP – viz *Obr. 3.1*) nazvaného pHluorin. Divoký typ GFP se skládá z 238 amino kyselin (26,9 kDa) a byl objeven u medúzy *Aequorea victoria*, která na modrém světle fluoreskovala zeleně. Spektrum GFP má 2 excitační pásy s maximem na 396 nm a na 475 nm [41].

GFP je typický β -barel skládající se z jednoho β -skládaného listu. Uvnitř β -barelu je chráněný α -helix nesoucí chromofor [42]. Těsné uspořádání β -barelu kolem chromoforu chrání jeho fluorescenci před zhášením vodou. Schéma proteinu se zvýrazněným chromoforem je na *Obr. 3.1*. Chromofor vzniká přibližně hodinu

po expresi autokatalytickou cyklizací a následnou oxidací postranních skupin tří aminokyselin: Ser65, Tyr66 a Gly67 [43].



Obr. 3.1: Model struktury zeleného fluorescenčního proteinu se zvýrazněným chromoforem [42]

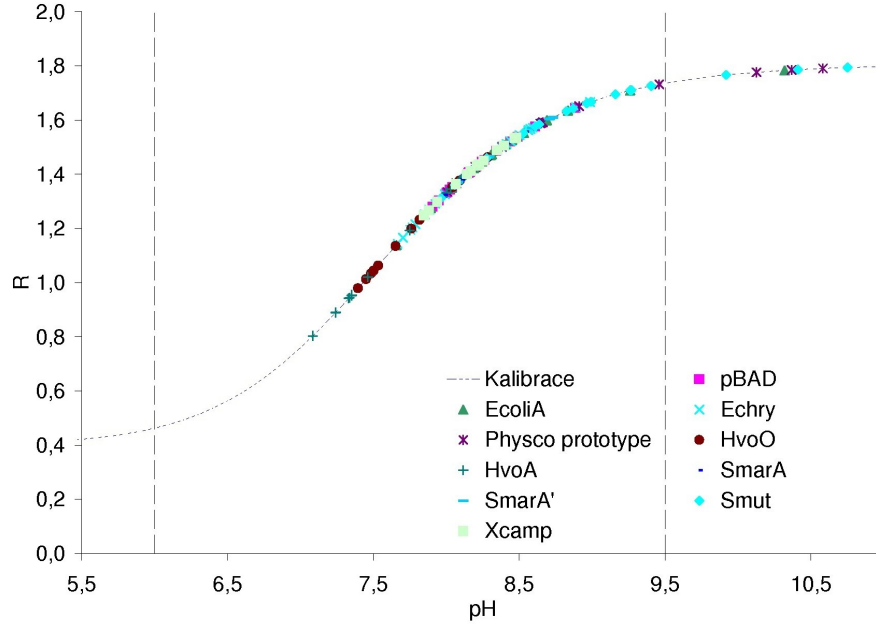
Pro měření vnitrobuněčného pH je důležitá pH-citlivá forma GFP, která se nazývá pHluorin. Vznikl systematickou mutací 7 klíčových reziduí Gln94, Arg96, His148, Ile167, Thr203, Ser205 a Glu222. Jeho excitační spektrum je značně odlišné, přesto má však také 2 excitační pásy jako wtGFP, přičemž pás 395nm odpovídá protonované a pás 475nm deprotonované formě [44].

Použití pHluorinu pro měření intracelulárního pH má řadu výhod. Jedná se, díky tomu, že fluorescenční sonda je exprimována přímo v cytosolu, o metodu prakticky neinvazivní schopnou sledovat vnitrobuněčné pH v reálném čase. Kromě toho excitační spektrum pHluorinu umožňuje měřit poměrově na dvou vlnových délkách, což zajišťuje nezávislost metody na množství fluorescenční sondy v cytosolu i v buněčné suspenzi.

3.1.2 Experimentální podmínky pro měření vnitrobuněčného pH

Intracelulární pH bylo měřeno pomocí spektrofluorimetru FluoroMax-2 (Jobin-Yvon SPEX) poměrově při excitaci na 410 a 470 nm (emise detekována na 520 nm), aby byla zajištěna nezávislost získaných hodnot na množství pHluorinu ve vzorku.

Kalibrace fluorescenční odpovědi pHluorinu na změny intracelulárního pH byla provedena pomocí protonoforu CCCP, který zajistí vyrovnání extracelulárního a intracelulárního pH, a sady pufrů o definovaných hodnotách pH. Takto získanými daty je možno proložit kalibrační křivku s předpisem (3.1), hodnoty



Obr. 3.2: Kalibrační křivka pHluorinu s vnesenými zěmřenými hodnotami intracelulárního pH. Je v ní vidět, že některá měření pro *EcoliA*, *Physco prototype* a *Smut* překračují hranici rozlišitelnosti pHluorinem (vyznačena svislou přerušovanou čarou).

kalibračních konstant jsou uvedeny v Tab. 3.1. Je vidět, že kalibrační křivku (viz Obr. 3.2) je možno použít v rozsahu hodnot pH od 6,0 do 9,5.

$$pH = K_{0,5} \left(\frac{R - C}{I_m - C - R} \right)^{\frac{1}{n_H}} \quad (3.1)$$

I_m	1,41
n_H	13,03
$K_{0,5}$	7,60
C	0,40

Tab. 3.1: Kalibrační konstanty fluorescenční odpovědi pHluorinu

Uvedenou metodu je tedy možno použít k měření změn intracelulárního pH vyvolaných transportem protonů transmembránovým proteinem MntH. Chceme-li ovšem kvantifikovat přímo tok protonů tímto proteinem dovnitř buněk, je třeba přihlídnout k tomu, že vnitrobuněčné pH podléhá striktní regulaci buňkou. Znamená to tedy, že změna intracelulárního pH vyvolaná transportem protonů přes MntH zahrnuje pouze část přetransportovaných protonů, druhá část protonů je buňkou efektivně pufována. Reálné množství transportovaných protonů je potom možno stanovit pouze v případě, kdy budeme schopni kvantifikovat pufrací kapacitu cytosolu.

3.2 Pufrační kapacita

Pro buňku je velmi důležité udržovat si stálé intracelulární pH, na kterém závisí mnoho životně důležitých procesů [39, 45, 46, 47] (například u eukaryotických buněk se pohybuje vnitrobuněčné pH v rozmezí 7,0–7,4 [48], u prokaryotických buněk se tento rozsah značně liší druh od druhu, vždy se však jedná o poměrně malé rozmezí [49]). Na značné stálosti intracelulárního pH se podílí skutečnost, že cytosol je poměrně silný pufr. Pufr je roztok slabých kyselin a jejich konjugovaných bazí, který po přidání malého množství kyseliny nebo zásady změny své pH pouze nepatrně. Pufrační kapacita byla proto původně definována jako množství silné kyseliny nebo zásady, které je třeba přidat do roztoku, aby se změnilo pH o jednotku. V situaci, kdy je nutno posoudit pufrační kapacitu cytosolu živé buňky je nutné pojem pufrační kapacity zobecnit tak, aby zahrnoval nejen pufrační kapacitu v tradičním fyzikálně-chemickém smyslu, nýbrž i veškeré aktivní buněčné procesy, které přispívají k regulaci pH (např. membránový transport). Definičním vztahem pufrační kapacity tedy je [50]

$$\beta = \frac{\Delta[\text{H}^+]}{\Delta\text{pH}}. \quad (3.2)$$

Z toho vyplývá, že pufrační kapacita je veličina, která udává, jakou je třeba způsobit změnu koncentrace protonů $\Delta[\text{H}^+]$ uvnitř systému aby došlo ke změně pH systému o jednotku.

Znalost intracelulární pufrační kapacity je důležitá pro kvantifikaci toku protonů. Jak je vidět ze vztahu (3.2), abychom mohli intracelulární pufrační kapacitu změřit, musíme provést definovanou změnu intracelulární koncentrace protonů a změřit jí odpovídající změnu pH. To se dá provést například přidáním slabé kyseliny do okolí buňky.

3.2.1 Měření pufrační kapacity buněk pomocí slabých kyselin a zásad

Pufrační kapacitu cytosolu je možno měřit přidáním slabé kyseliny do extracelulárního média díky tomu, že slabá kyselina plně nedisociuje a její nedisociovaná forma může procházet přes plazmatickou membránu. Přidání slabé kyseliny nám tedy umožní způsobit přesně danou změnu v koncentraci protonů uvnitř buňky, následná změna intracelulárního pH nutná pro stanovení pufrační kapacity dle vztahu (3.2) může být změřena pomocí pHluorinu. V cytosolu totiž kyselina disociuje, stejně jako vně buňky, v závislosti na svém pK_a , jak již bylo dříve popsáno [51]. Analogicky je možno použít slabou zásadu. Pro tuto práci byla zvolena slabá kyselina (kyselina propanová) zejména proto, že měření bylo prováděno v kyselých pufrech, čili $\text{pH}_0 > \text{pH}_e$ a tak kyselina disociuje více uvnitř buňky než ve vnějším prostředí. Měření byla prováděna na buňkách *E. coli*, jejichž přirozené vnitrobuněčné pH se pohybuje v rozmezí 7,4–7,8. Tyto enterobakterie jsou schopny růstu ve vnějším pH_e od 5,5 do 9 [52, 53, 39, 54, 55, 56, 57].

Koncentraci disociované kyseliny uvnitř buňky, která se rovná množství uvolněných protonů, je možno spočítat podle vztahu:

$$[\text{A}^-]_i = \frac{K_A[\text{HA}]_c[\text{H}^+]_e}{[\text{H}^+]_A(K_A + [\text{H}^+]_e)}, \quad (3.3)$$

kde $[\text{HA}]_c$ je celková koncentrace kyseliny, $[\text{H}^+]_e$ je koncentrace protonů vně buňky, kterou zjistíme z pH pufru, ve kterém jsou buňky a $[\text{H}^+]_A$ je koncentrace vodíkových kationtů uvnitř buňky před přidáním slabé kyseliny, kterou zjistíme z naměřeného pH. Vztah (3.3) již jen dosadíme do (3.2) a dostaneme tak pufráční kapacitu buňky, kterou označíme β_i . Detailní odvození vztahu pro výpočet množství disociované kyseliny je možno nalézt např. v [51]. Koncentrace jsou určeny z pH vztahem

$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}. \quad (3.4)$$

Celkovou koncentraci kyseliny spočteme ze znalosti objemu vzorku V_c a objemu přidávané kyseliny V_A

$$[\text{HA}]_c = \frac{V_A \rho_A}{M_A V_c}, \quad (3.5)$$

kde ρ_A je hustota použité kyseliny a M_A je její molární hmotnost.

Hodnotu pH_A je možno získat měřením pomocí pHluorinu, jeho fluorescenční odezva musí být ovšem kalibrována (viz. kapitola 3.1.2). Pufráční kapacita byla měřena přidáváním $40 \mu\text{l}$ $13,4 \text{ mM}$ kyseliny propanové do kyvety s buněčnou suspenzí o objemu 3 ml . Výsledná koncentrace této kyseliny v kyvetě tedy byla $176 \mu\text{M}$. Abychom odstranili vliv metabolismu na ΔpH_i , odečítali jsme hodnotu pH_A hned po jeho skoku, jak je ukázáno na *Obr. 4.2*. Z pH_A potom dle definice pH (3.4) získáme koncentraci, kterou dosadíme do vztahu (3.3) a následně do definice (3.2).

3.3 Kvantifikace odpřaženého toku protonů proteinem MntH

Jednou z možností, jak sledovat transport protonů proteinem MntH odpřažený od transportu dvojmocných kovových iontů, je porovnání změn intracelulárního pH po okyselení vnějšího média mezi bakteriemi obsahujícími funkční protein a bakteriemi představujícími negativní kontrolu, která funkční protein MntH neobsahuje. Okyselení vnějšího prostředí je možno provést například přidáním silné kyseliny. Se znalostí počátečního intracelulárního pH_0 a intracelulárního pH po přidání silné kyseliny pH_S pak již snadno, za použití definičního vztahu pH (3.4), lze odvodit výraz pro změnu koncentrace protonů v buňce

$$\Delta[\text{H}^+]_i = 10^{-\text{pH}_S} - 10^{-\text{pH}_0}. \quad (3.6)$$

Tímto způsobem je možno získat základní představu o odpřaženém transportu protonů proteinem MntH. Reálné množství transportovaných protonů lze zjistit jen se zohledněním pufráční kapacity buňky, jak je popsáno výše. Vyjdeme-li z definičního vztahu pufráční kapacity (3.2) a z předpokladu, že se tato v průběhu času příliš nemění, můžeme kvantifikovat množství transportovaných protonů do buňky dle vztahu:

$$\Delta[\text{H}^+]_\beta = (\text{pH}_0 - \text{pH}_S)\beta. \quad (3.7)$$

Význam použitých symbolů je stejný jako ve vztahu (3.6).

Změny vnitrobuněčného pH po přidání silné kyseliny byly monitorovány pomocí pHluorinu po dobu zhruba 400 s , viz *Obr. 4.4a*. Transport protonů skrz

membránu byl kvantifikován přibližně po uplynutí 340 s od přidání 13 μl 2 M kyseliny chlorovodíkové do kyvety s buněčnou suspenzí o objemu 3 ml. Výsledná koncentrace kyseliny v kyvetě tedy byla 8,6 mM. Změnu koncentrace protonů v buňce $\Delta[\text{H}^+]_i$ dostaneme dle vztahu (3.6). Reálné množství transportovaných protonů $\Delta[\text{H}^+]_\beta$ dostaneme za pomoci pufrální kapacity dle definice (3.2).

3.4 Použité bakteriální kmeny

Jako modelový organismus pro měření odpřaženého toku protonů různými homology proteinů z rodiny Nramp/MntH jsme použili bakterii *E. coli*, konkrétně její kmen DH11S $\Delta mntH$ (rezistence na kanamycin), který byl transformován dvěma plazmidy: pGBM6-pHL kódujícím pHLuorin (rezistence na spectinomycin) a pBAD-NX1.1 nesoucím gen pro příslušný homolog (rezistence na ampicillin). Expresi požadovaného Nramp byla indukována L-arabinózou [38].

Zkoumané homology jsou uvedeny v *Tab. 2.1* na straně 13. Bakterie obsahující prázdný plazmid, tzn. bakterie bez funkčního MntH homologu, které představovaly negativní kontrolu, jsme v rámci této práce označovali jako pBAD.

3.5 Příprava vzorků

Použité geneticky upravené *E. coli* byly uchovány v konzervách při teplotě -20°C a -80°C , odkud byly přeočkovány na agarovou misku s kultivačním médiem Luria–Bertani (LB): 1,5% agar, 1% Bacto-trypton, 0,5% bacto-yeast extrakt, 0,5% NaCl a antibiotika kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, spectinomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, na která jsou použité bakterie rezistentní. Na kultivační misce se bakterie nechaly přes noc kultivovat při teplotě 37°C a dále se skladovaly v lednici při 4°C , nejdéle však po dobu jednoho měsíce.

Z misky byla očkovací kličkou přeočkována jedna kolonie bakterií do 2 ml LB média obohaceného o uvedená antibiotika a poté se nechaly buňky 16–20 hodin při teplotě 37°C za stálého třepání (250 RPM) inkubovat. Následně byly narostlé buňky zředěny 1 : 100 do 2 ml, 10 ml nebo 20 ml LB média a za stejných podmínek dále kultivovány. Po 2 hodinách kultivace k nim byla přidána L-arabinóza, která indukuje expresi Nramp, na koncentraci 0,6‰. Buňky byly s arabinózou inkubovány ještě další hodinu. Sterilita byla zajištěna prací v blízkosti kahanu.

Nakonec byly narostlé bakterie centrifugovány při frekvenci 5 000 ot./min po dobu 2 min (pro 10 ml a 20 ml vzorku) nebo 10 000 ot./min po dobu 1 min (pro 2 ml vzorku) a dále byly dvakrát promyty v měřicím citrát-fosfátovém pufru o pH 5,5, vzniklém smícháním 25 mM kyseliny citrónové a 50 mM K_2HPO_4 . Nakonec byly buňky přemístěny do jednorázových spektroskopických kyvet s pufrém o objemu 3 ml tak, aby optická hustota buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm byla $0,20 \pm 0,02$. To nám zajistilo, že v každém vzorku bylo přibližně stejné množství bakterií. K měření optické hustoty bylo použito spektrometru Novaspec III.

Kapitola 4

Výsledky měření a diskuze

Jelikož hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je odpřažený transport protonů, zatím pozorovaný zejména u eukaryotních reprezentantů rodiny Nramp/MntH, vlastností zachovanou napříč různými fylogenetickými skupinami těchto proteinů, pokusili jsme se ve zvoleném modelovém organismu sledovat takové vlastnosti, u nichž bylo možno předpokládat, že by odpřaženým transportem protonů mohly být ovlivněny. U bakterií *E. coli* hyperexprimujících studované homology (viz *Tab. 2.1*) jsme tedy zkoumali jejich intracelulární pH, pufráční kapacitu a reakci na okyselení vnějšího prostředí.

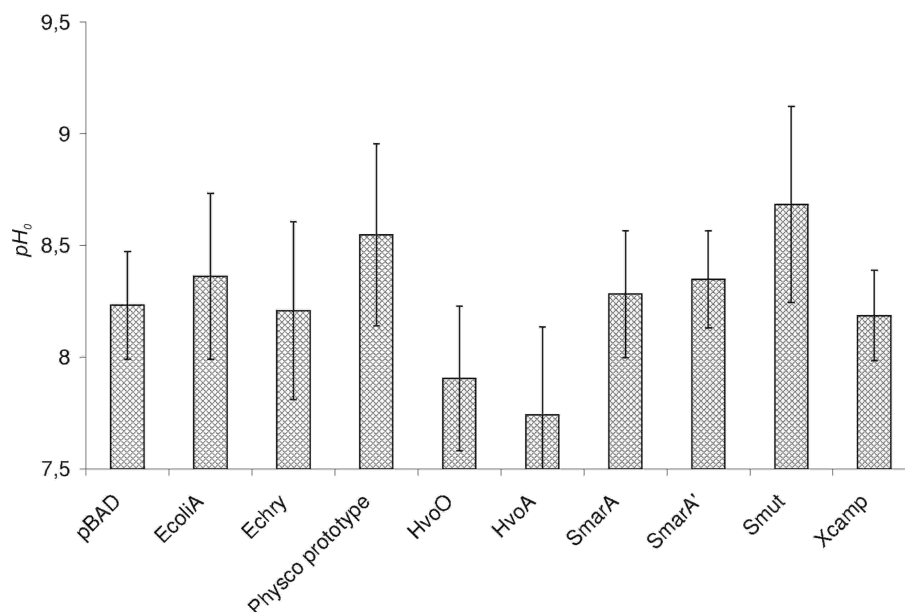
4.1 Počáteční intracelulární pH

Již dříve byla pozorována možná souvislost mezi intracelulárním pH bakterií *E. coli* hyperexprimujících MntH s odpřaženým transportem protonů tímto proteinem [58, 18]. Právě proto byl tento parametr jedním z předmětů našeho výzkumu.

U některých kmenů, konkrétně EcoliA, Physco prototype a Smut, byly počáteční hodnoty pH_0 na hranici citlivosti pHluorinu, která je, jak je vidět z *Obr. 3.2* v rozsahu pH přibližně od 6,0 do 9,5. Proto jsme byli nuceni část změřených dat, která se nevešla do tohoto intervalu, ze zpracování vyřadit.

Naměřené hodnoty pH_0 můžeme, jak je vidět v *Obr. 4.1*, rozdělit do několika skupin. Do první skupiny s intracelulárním pH vyšším než u negativní i pozitivní kontroly by se daly zařadit homology Physco prototype a Smut. Druhá skupina obsahuje transportéry HvoO a HvoA, které způsobují snížení pH_0 oproti negativní a pozitivní kontrole. U ostatních homologů (konkrétně u Xcamp, Echry, SmarA, SmarA') se pohybuje pH_0 v rozsahu mezi negativní kontrolou pBAD a pozitivní kontrolou EcoliA, které jsou si velmi podobné. Pro ověření, zdali pH_0 jednotlivých skupin vykazují signifikantní rozdíl s pozitivní a negativní kontrolou jsme použili dvojvýběrový Studentův t-test s různými rozptyly a s obvyklou pětiprocentní hladinou významnosti. Dle provedeného testu se z první skupiny signifikantně liší od obou kontrol pouze Smut, zatímco druhá skupina se liší signifikantně jak od pozitivní, tak od negativní kontroly, celá. Mezi kontrolami samotnými žádný signifikantní rozdíl není.

Jev, který je pozorován u HvoO a HvoA, tedy nižší pH_0 , byl popsán již dříve [58, 18] a mohl by poukazovat na to, že tyto homology, na rozdíl od ostatních, odpřažený transport protonů zprostředkovávají. Původ vyššího počátečního vni-



Obr. 4.1: Hodnoty počátečního pH jednotlivých kmenů

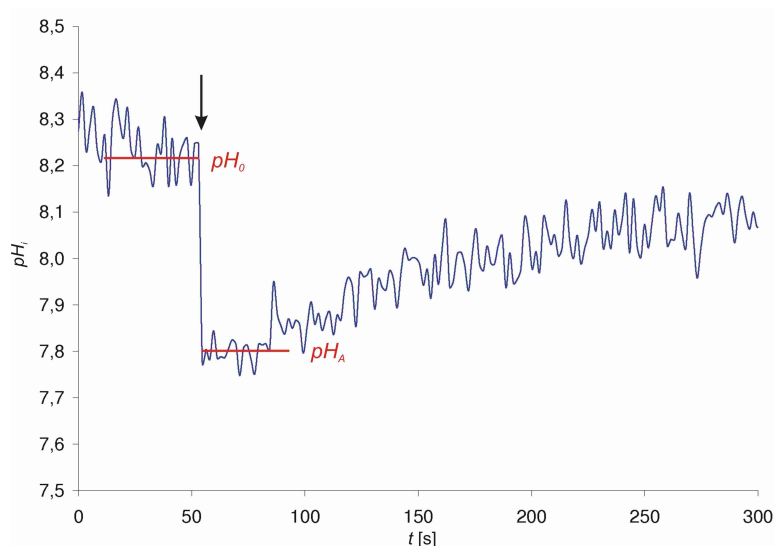
trobuněčného pH u Smut je nejasný. V obou případech by rozdílnost intracelulárního pH_0 od negativní kontroly mohla znamenat, že v buňce dochází k expresi daných homologů. U ostatních homologů z hodnoty počátečního intracelulárního pH o úrovni jejich exprese v buňce nic říci nemůžeme, takže nevíme, jestli shodnost pH_0 s negativní kontrolou může poukazovat na absenci těchto homologů na membráně či na skutečnost, že odpřažený transport nezprostředkovávají. Nicméně, EcoliA nevykazuje odlišnost v počátečním intracelulárním pH od negativní kontroly, přestože u něj byl odpřažený transport protonů prokazatelně pozorován [15].

Počátečním vnitrobuněčným pH negativní a pozitivní kontroly se zabývaly i jiné práce, takže je možné provést srovnání. V bakalářské práci I. Doležalové [58] se uvádí v pufru o pH_e 5,5 počáteční intracelulární pH $7,9 \pm 0,1$, v diplomové práci E. Strakové [51] se publikuje pro EcoliA hodnota pH_0 $8,06 \pm 0,06$ v pufru o pH_e 5,3 a $8,08 \pm 0,05$ pro pH_e 5,7, což se v rámci chyby shoduje s výsledky této práce (byl použit pufr o pH_e 5,5, hodnota pH_0 je $8,4 \pm 0,4$). V pufru o pH_e 4,7 [58, 18] a pH_e 5,0 [58] se taktéž, jako u nás, neprokázala signifikantní odlišnost mezi negativní a pozitivní kontrolou.

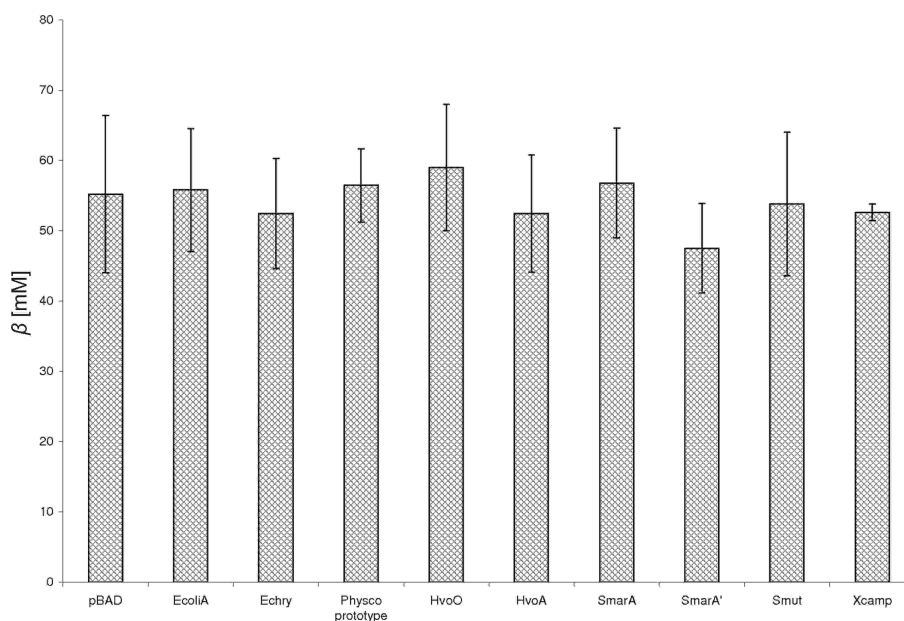
4.2 Měření puфраční kapacity

Předpokládali jsme, že přítomností MntH v plazmatické membráně by mohla být ovlivněna i puфраční kapacita cytosolu bakteriálních buněk, zejména pokud dochází k částečnému odpřažení transportu protonů od transportu dvojmočných kovových iontů. Puфраční kapacita byla stanovována způsobem popsáním v kapitole 3.2.1 na str. 18. Ukázkový průběh intracelulárního pH po přidání kyseliny propanové je zobrazen na Obr. 4.2.

Všechny puфраční kapacity jsou si dosti podobné a pohybují se většinou v rozsahu od 50 mM do 60 mM (viz Obr. 4.3). Nejvyšší puфраční kapacitu (59 ± 9) mM



Obr. 4.2: Ukázka skoku intracelulárního pH po přidání kyseliny propanové při měření pufrční kapacity. Okamžik přidání kyseliny je označen svíslou šipkou



Obr. 4.3: Hodnoty pufrčních kapacit jednotlivých kmenů

zde vykazují buňky hyperexprimující HvoO, nejnižší (47 ± 6) mM buňky hyperexprimující SmarA'. Referenční buňky s pBAD a EcoliA mají pro srovnání pufrční kapacity (55 ± 11) mM, respektive (56 ± 9) mM. Studentův t-test nám potvrdil, že žádný z měřených vzorků nemůžeme označit jako signifikantně odlišný od vzorků referenčních.

Ve srovnání s pufrčními kapacitami β uvedenými pro pozitivní kontrolu v pracích E. Strakové [51] (v pH_e pufru 5,3 je β (74 ± 9) mM, v pH_e 5,7 dokonce (98 ± 8) mM) a I. Doležalové [58] (76 ± 2 mM) je námi změřená hodnota (56 ± 9) mM znatelně nižší. Výše zmíněné práce se však zabývaly zejména extracelulárním pH 4,7 a 5,0. E. Straková [51] uvádí pro pozitivní kontrolu v pH_e 4,7 hodnotu pufrční kapacity 39 ± 5 a pro pH_e 5,0 hodnotu 75 ± 6 , v práci I. Doležalové [58] je uve-

dena v extracelulárním pH 4,7 pro pBAD, respektive EcoliA, hodnota pufráční kapacity 52 ± 11 , respektive 37 ± 4 a v pH_e 5,0 hodnota pufráční kapacity 47 ± 5 , respektive 67 ± 11 . Dále se v druhé zmiňované práci pro pH_e 4,7 a 5,0 uvádí, že buňky neexprimující MntH mají vyšší pufráční kapacitu, než buňky MntH exprimující. V našich experimentálních podmínkách však takovýto trend pozorován nebyl. To by se dalo interpretovat tak, že čím více se blížíme s extracelulárním pH intracelulárnímu pH, tím menší je protonový gradient na membráně, který je hnací silou odpřaženého toku protonů, a tak se vytrácí rozdíl mezi buňkami exprimujícími proteiny zprostředkovávající odpřažený transport protonů a proteiny, u kterých k tomuto jevu nedochází. Snižující se transportní schopnosti Nramp s rostoucím extracelulárním pH byly pozorovány již dříve, jak u transportu indukovaném kovy skrz eukaryotní DMT1 [59] a prokaryotní MntH [18], tak pro transport odpřažený skrz MntH [15]. Při vyšších pH_e má tedy pravděpodobně odpřažený tok protonů zkoumanými homology menší vliv na pufráční kapacity jednotlivých buněk, což je výhodné pro kvantifikaci odpřaženého toku za pomoci přidání silné kyseliny, protože pak lze získat počet transportovaných protonů přepočtem přes pufráční kapacitu bez obavy, že odpřažený transport je již započítán v pufráční kapacitě, a že by tedy byl uvažován dvakrát.

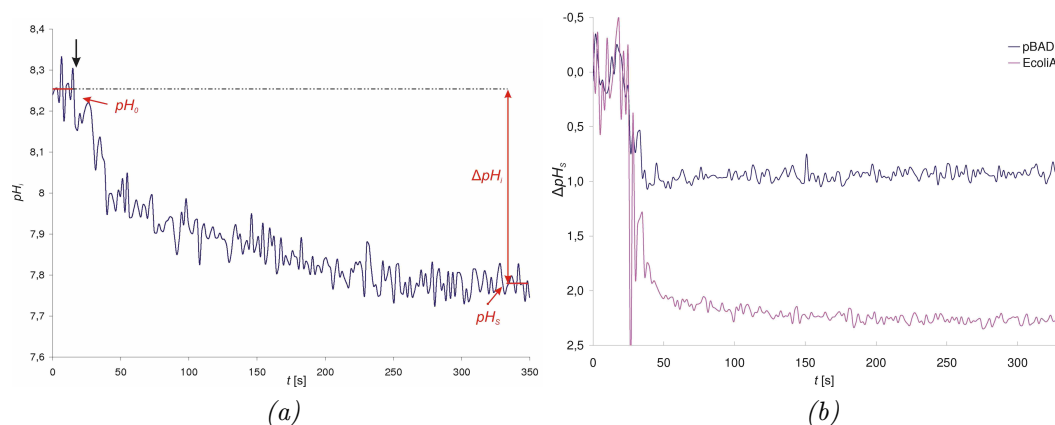
V našich výsledcích se také neprojevuje žádný výrazný trend závislosti pufráční kapacity na počátečním intracelulárním pH_0 u bakterií hyperexprimujících jednotlivé homology.

4.3 Kvantifikace odpřaženého transportu protonů různými homology proteinů Nramp/MntH

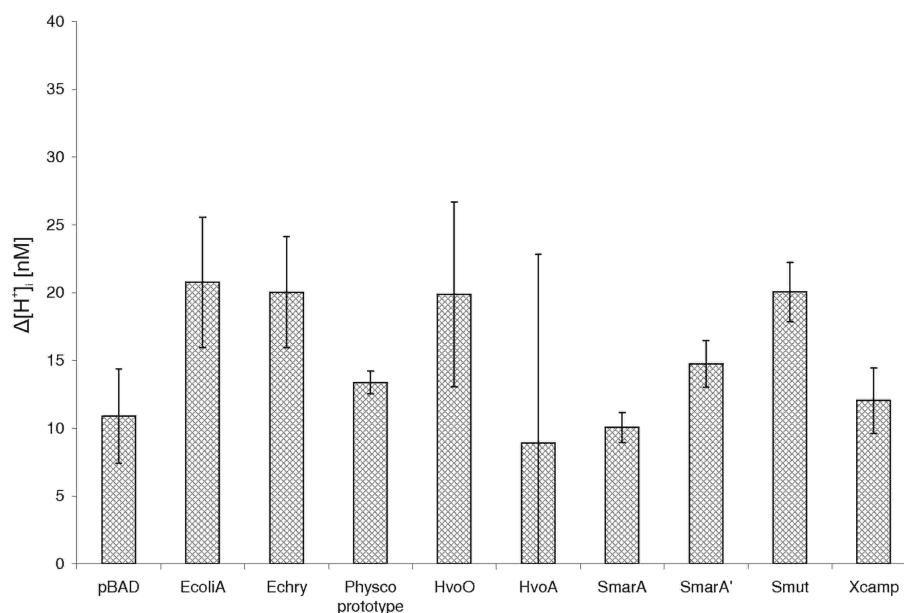
Odpřažený tok protonů byl pozorován u několika eukaryotních homologů proteinů Nramp exprimovaných v oocytech *Xenopus laevis* pomocí elektrofyziologických metod [11]. V nedávné době byl odpřažený transport protonů poprvé pozorován i u prokaryotního homologu MntH z *E. coli* hyperexprimovaném v bakteriích *E. coli* [15]. Zmíněný efekt byl studován pomocí fluorescence pHluorinu podobně jako v této práci.

Na rozdíl od dříve popsaných experimentů pro sledování odpřaženého transportu protonů [15], základní myšlenkou experimentu bylo pokusit se pozorovat zda okyselení extracelulárního média přidáním silné kyseliny vyvolá odpřažený tok protonů proteinem MntH, který by se měl projevit jako výraznější okyselení cytosolu buněk s funkčním proteinem než u buněk bez funkčního Nramp/MntH homologu. Typický průběh takového experimentu je možno vidět na *Obr. 4.4b*. Rozdíly v reakci na definované okyselení vnějšího média lze považovat za projev odpřaženého transportu protonů, a tudíž je možné tento postup použít ke sledování a porovnání tohoto efektu i u jiných homologů, pokud mohou být hyperexprimovány v našem modelovém systému. Pro toto porovnání byly použity oba postupy popsané v kapitole 3.3. Ukázkový průběh intracelulárního pH po přidání HCl je uveden na *Obr. 4.4a*

Nejprve se zaměříme na kvantifikaci odpřaženého toku protonů skrz studovaný homolog Nramp/MntH bez uvážení pufráční kapacity buňky. V *Obr. 4.5* můžeme rozpoznat skupinu homologů, které indukují skoro stejné hodnoty skoku



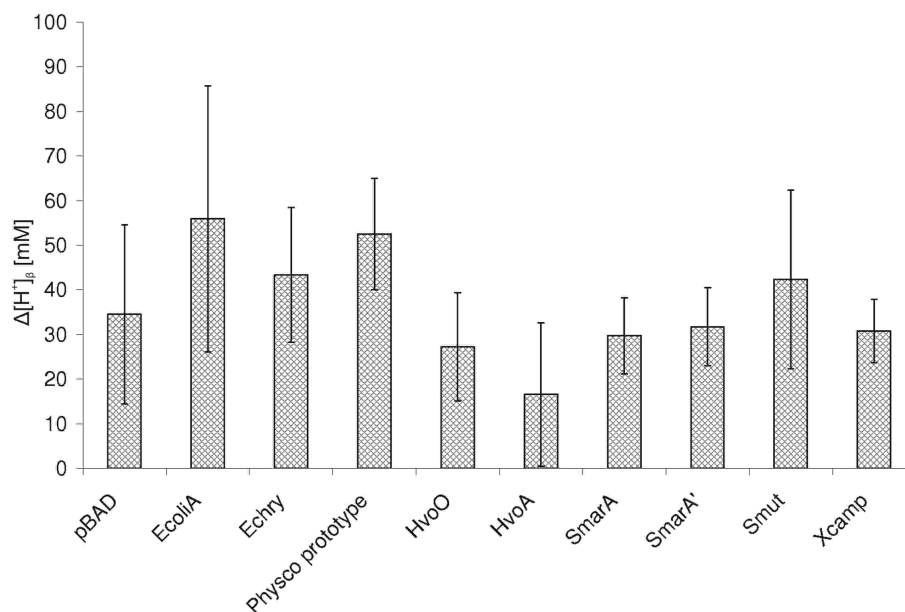
Obr. 4.4: Průběhy okyselování cytosolu po přidání kyseliny chlorovodíkové (a) s ukázkou odečtu měřených údajů, svíslá šipka znázorňuje okamžik přidání HCl. (b) Porovnání průběhu změny intracelulárního pH po přidání kyseliny chlorovodíkové ΔpH_s u negativní kontroly pBAD (bez funkčního MntH proteinu) a pozitivní kontroly EcoliA



Obr. 4.5: Shrnutí změn koncentrací protonů v buňce 340 s po přidání HCl

intracelulární koncentrace $\Delta[H^+]_i$; jako pozitivní kontrola EcoliA. Jedná se konkrétně o Echry, HvoO a Smut, ostatní homology (Physco prototype, SmarA, HvoA a Xcamp) dosahují podobných výsledků jako negativní kontrola pBAD. Výjimku tvoří SmarA', který se pohybuje na rozhraní těchto dvou skupin. Studentův t-test potvrdil signifikantní odlišnost první skupiny od negativní kontroly a odlišnost druhé skupiny od pozitivní kontroly nepotvrdil pouze u HvoA. Ani SmarA' studentův t-test do žádné skupiny nezařadil

Naměřené výsledky kvantifikace transportu protonů počítané přes pufrací kapacitu jsou shrnuty v Obr. 4.6. Podobné množství transportovaných protonů $\Delta[H^+]_\beta$ jako EcoliA má pouze Physco prototype, Echry a Smut se pohybují na rozhraní mezi pozitivní a negativní kontrolou, ostatní homology se chovají podobně



Obr. 4.6: Shrnutí počtu transportovaných protonů $\Delta[H^+]_{\beta}$ skrz membránu 340 s po přidání HCl

jako negativní kontrola. Podle výsledků studentova t-testu však není žádný homolog signifikantně odlišný ani od pozitivní ani od negativní kontroly. Pro tento typ zpracování změřených výsledků by tedy byl potřebný větší soubor dat. Skutečnost, že pro tento způsob zpracování přes pufrací kapacitu, na rozdíl od způsobu zpracování přímo přes koncentrace, nebyl soubor dat dostačující na signifikantní odlišení různých homologů, je dána tím, že zde je zvýšena experimentální chyba vlivem měření dalšího parametru – pufrací kapacity.

Je pozoruhodné, jak výrazný řádový rozdíl je mezi oběma způsoby zpracování. Zatímco změna koncentrace volných protonů uvnitř buňky získaná podle vztahu (3.6) se pohybuje v řádech $\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, změna celkové koncentrace získaná přepočtem přes pufrací kapacitu je o šest řádů vyšší. Tento fakt poukazuje na to, jak je buňka silně pufrovaná. Porovnáním Obr. 4.5 a Obr. 4.6 můžeme konstatovat, že ani kvalitativně nedávají obě metody stejné výsledky. Markantní rozdíl se projevuje hlavně u homologu Physco prototype a HvoA. O Physco prototype bychom dle přímého přepočtu přes pH mohli říci, že netransportuje žádné protony, kdežto při přepočtu přes pufrací kapacitu jsou jeho transportní vlastnosti stejné jako u EcoliA, u HvoO to je právě naopak. Vzhledem k tomu, že pufrací kapacity bakterií s jednotlivými homology jsou skoro stejné, je jedinou možnou příčinou takového rozdílu počáteční hodnota pH_0 bakterií s jednotlivými homology. Podstata odlišných výsledků obou metod spočívá v tom, že čím je vyšší pH_0 , tím má jednotková změna v pH díky logaritmické závislosti menší vliv na změnu koncentrace volných protonů. Také je zajímavé si povšimnout nápadné korelace mezi kvantifikací transportu přes pufrací kapacitu a počátečními pH_0 . Víme-li totiž, že pufrací kapacity jsou pro všechny studované vzorky prakticky shodné (viz kapitola 4.2), pak to znamená, že změna intracelulárního pH způsobená transportem protonů skrze MntH je korelována s počátečním intracelulárním pH.

4.4 Diskuze výsledků

Z naměřených výsledků tedy vyplývá, že homolog MntH z *E. coli* transportuje protony i v nepřítomnosti dvojmocného kovu, jak je vidět z měření poklesu vnitrobuněčného pH v reakci na přidání silné kyseliny v porovnání s negativní kontrolou (pBAD). Tento efekt se neodrazí ve změně počátečního intracelulárního pH ani v pufracní kapacitě, což je v souladu s výsledky uvedenými v diplomové práci L. Suré [15], kde se taktéž používal homolog MntH z *E. coli*. To by mohlo znamenat, že se jedná o vlastnost do určité míry zachovalou v rámci celé rodiny, neboť tato vlastnost byla pozorována i u eukaryotních Nramp [59].

U homologů z *S. marcescens* (SmarA i A') a *X. campestris* (Xcamp) není odprážený transport protonů v našich podmínkách pozorován, žádná z pozorovaných veličin (měření počátečního intracelulárního pH, pufracní kapacity a ani jeden ze způsobů kvantifikace toku protonů přes membránu) tomu nenasvědčuje. Nepřítomnost odpráženého toku protonů však může být způsobena problémy s expresí těchto homologů na plazmatické membráně. U Xcamp ale pozorujeme manganem a kadmíem indukovaný transport a u SmarA manganem indukovaný transport [Chaloupka, nepublikovaná data], z čehož vyplývá, že jsou na membráně exprimovány a nacházejí se ve funkčním stavu. Je tedy možno tvrdit, že Xcamp ani SmarA neumožňují transport protonů nezávislý na přítomnosti dvojmocného kovu. zatímco u SmarA' by mohl být negativní výsledek našich experimentů způsoben nepřítomností funkčních proteinů na plazmatické membráně. Homolog skupiny MntH A z *H. volcanii* patrně odprážený transport protonů rovněž neumožňuje, neboť se v reakci na snížení vnějšího pH choval jako negativní kontrola, i když vykazoval signifikantně nižší hodnotu počátečního intracelulárního pH, přičemž odlišné počáteční vnitrobuněčné pH od negativní kontroly by mohlo naznačovat, že daný homolog je na membráně exprimován.

Homology z *E. chrysanthemi* (Echry) a z *S. mutans* (Smut) odprážený transport protonů zprostředkovávají (viz kapitola 4.3), podobně jako transport protonů spřažený s transportem Me^{2+} [Chaloupka, nepublikovaná data], důvod zvýšení počátečního intracelulárního pH u Smut je však nejasný.

Překvapivé je, že homolog z *P. patens* (Physco prototype), představitel eukaryotního prototypu této rodiny (viz kapitola 2.2), odprážený transport protonů zprostředkovává (viz kapitola 4.3), přestože transport protonů spřažený s transportem dvojmocného kovu u něj nebyl pozorován [60]. Tento bezesporu zajímavý výsledek by vyžadoval další podrobnější výzkum.

Specifické výsledky byly dosaženy s homologem z *H. volcanii* (HvoO), proteinem z tzv. outgroup skupiny, který do Nramp rodiny nepatří, přestože vykazuje jistou sekvenční podobnost. O odpráženém toku protonů tímto proteinem by svědčilo snížené intracelulární pH (viz Obr. 4.1) a též reakce na přidání silné kyseliny, ovšem jen v případě, jsou-li výsledky přepočteny přímo z definice pH. Je-li započtena pufracní kapacita buněk, uvedený efekt se zcela ztrácí. Vzhledem k malému souboru dat však nejsou často rozdíly mezi jednotlivými kmeny statisticky signifikantní, pro definitivní vyřešení některých sporných otázek, které vyvstaly v této práci zejména v rámci diskuse by tedy bylo třeba získat ještě další dodatečná data.

Kapitola 5

Závěr

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je odpřažený transport protonů, zatím pozorovaný zejména u eukaryotních reprezentantů rodiny Nramp/MntH [11, 12, 13, 14, 15], vlastností zachovanou napříč různými fylogenetickými skupinami těchto proteinů. Ve zvoleném modelovém organismu byly tedy sledovány takové vlastnosti, u nichž bylo možno předpokládat, že by odpřaženým transportem protonů mohly být ovlivněny. U bakterií *E. coli* hyperexprimujících studované homology (Tab. 2.1) jsme tedy zkoumali jejich počáteční intracelulární pH, pufráční kapacitu a reakci na okyselení vnějšího prostředí způsobeného přidáním silné kyseliny.

Z naměřených výsledků vyplývá, že odpřažený transport protonů zprostředkovávají homology z *E. coli*, *E. chrysanthemi* a *S. mutans*. Zajímavým výsledkem je, že pozorujeme odpřažený transport protonů i představitele eukaryotního prototypu rodiny Nramp z *P. patens*, přestože transport protonů spřažený s transportem dvojmocného kovu u něj nebyl pozorován [60].

U MntH z *X. campestris* a *S. marcescens* (homolog z fylogenetické skupiny MntH A) se nám porovnáním s měřením kovem indukovaného transportu [Chaloupka, nepublikovaná data] podařilo prokázat, že odpřažený transport protonů nezprostředkovávají. Odpřažený transport protonů jsme nepozorovali ani u MntH z *H. volcanii* a *X. campestris* (homologu z fylogenetické skupiny MntH A'), což však může být způsobeno nepřítomností funkčních proteinů na membráně. Homolog z *H. volcanii* však snižoval počáteční intracelulární pH, což by mohlo na jeho přítomnost na membráně naznačovat.

Specifických výsledků bylo dosaženo u zástupce tzv. outgroup skupiny z *H. volcanii*, který do Nramp rodiny nepatří, přestože vykazuje jistou sekvenční podobnost. O odpřaženém toku tímto proteinem by svědčilo snížené intracelulární pH a též reakce na přidání silné kyseliny, ovšem jen v případě, jsou-li výsledky přepočteny přímo z definice pH. Je-li započtena pufráční kapacita buněk, uvedený efekt se zcela ztrácí.

Některé otázky, jako například existence odpřaženého toku protonů u homologu z *P. patens* nebo zvýšené počáteční intracelulární pH u Smut, budou vyžadovat ještě podrobnější prozkoumání.

Seznam zkratek

CCCP	karbonyl kyanid m-chlorfenylhydrazon
GFP	zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)
K_a	disociační konstanta
LB médium	..	Luria-Bertrani médium
MntH	proton-dependent manganese transporter
Nramp	natural resistance-associated macrophage protein
pH_A	intracelulární pH po přidání kyseliny propanové
pH_e	extracelulární pH
pH_i	intracelulární pH
pH_S	intracelulární pH po přidání kyseliny chlorovodíkové
pH_0	počáteční intracelulární pH (před přidáním kyseliny)
pHluorin	...	pH-citlivá forma GFP
R	poměr intenzit fluorescence pHluorinu v emisní vlnové délce 520 nm na excitačních vlnových délkách 410 nm a 470 nm
wtGFP	divoký typ GFP (Wild Type GFP)
β	pufrační kapacita
$\Delta[H^+]_i$	změna intracelulární koncentrace protonů vypočtená přímo dle rovnice (3.6)
$\Delta[H^+]_\beta$	množství transportovaných protonů přepočtené přes puфраční kapacitu dle rovnice (3.7)

AHOJ

Literatura

- [1] NAVO, Y. a NELSON, N.: *The NRAMP family of metal-ion transporters. Biochim. Biophys. Acta. Molecular cell research*, **1763**(7) (2006): 609–620, 0167-4889.
- [2] FLEMING, M. D.; TRENOR, C. C.; SU, M. A. aj.: *Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. Nat. Genet.*, **16** (1997): 383–386, 1546-1718.
- [3] FLEMING, M. D.; ROMANO, M. A.; SU, M. A. aj.: *Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95** (1998): 1148–1153, 1091-6490.
- [4] SU, M. A.; TRENOR III, C. C.; FLEMING, J. C. aj.: *The G185R Mutation Disrupts Function of the Iron Transporter Nramp2. Blood*, **92**(6) (1998): 2157–2163, 1528-0020.
- [5] VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K. aj.: *Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. Cell*, **73**(3) (1993-5-7): 469–485, 1097-4172.
- [6] JABADO, N.; JANKOWSKI, A.; DOUGAPARSAD, S. aj.: *Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. J. Exp. Med.*, **192** (2000-10-30): 1237–1248, 1540-9538.
- [7] JABADO, N.; CUELLAR-MATA, P.; GRINSTEIN, S. aj.: *Iron chelators modulate the fusogenic properties of Salmonella-containing phagosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100** (2003): 6127–6132, 1091-6490.
- [8] BOYER, E.; BERGEVIN, I.; MALO, D. aj.: *Acquisition of Mn(II) in Addition to Fe(II) Is Required for Full Virulence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Infect. Immun.*, **70** (2002): 6032–6042, 1098-5522.
- [9] SUPEK, F.; SUPEKOVA, L.; NELSON, H. aj.: *A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93** (1996): 5105–5110, 1091-6490.
- [10] LIU, X. F.; SUPEK, F.; NELSON, N. aj.: *Negative Control of Heavy Metal Uptake by the Saccharomyces cerevisiae BSD2 Gene. J. Biol. Chem.*, **272** (1997): 11763–11769, 1083-351X.

- [11] GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U. V. aj.: *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature*, **388** (1997): 482–488, 1476-4687.
- [12] CHEN, X.-Z.; PENG, J.-B.; COHEN, A. aj.: *Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. J. Biol. Chem.*, **274** (1999): 35089–35094, 1083-351X.
- [13] SACHER, A.; COHEN, A. a NELSON, N.: *Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in Xenopus laevis oocytes. J. Exp. Biol.*, **204** (2001): 1053–1061, 1477-9145.
- [14] MACKENZIE, B.; UJWAL, M. L.; CHANG, M.-H. aj.: *Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H⁺-coupled Fe²⁺ transport and uncoupled fluxes. Pflugers Arch.*, **451** (2006): 4, 1432-2013.
- [15] SURÁ, L.: *Studium transportních proteinů z rodiny Nramp* (2009), diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze.
- [16] RICHER, E.; COURVILLE, P.; BERGEVIN, I. aj.: *Horizontal Gene Transfer of “Prototype” Nramp in Bacteria. J. Mol. Evol.*, **57**(4) (2003): 763–376, 1432-1432.
- [17] CELLIER, M. F.; BERGEVIN, I.; BOYER, E. aj.: *Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. Trends Gen.*, **17**(7) (2001): 363–376, 0168-9525.
- [18] CHALOUPKA, R.; COURVILLE, P.; VEYRIER, F. aj.: *Identification of Functional Amino Acids in the Nramp Family by a Combination of Evolutionary Analysis and Biophysical Studies of Metal and Proton Cotransport in vivo. Biochemistry*, **44**(2) (2005): 726–733, 1520-4995.
- [19] LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. a COX, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 4. vydání (2004), 0-7167-4339-6.
- [20] AHMED, S. a BOOTH, I. R.: *Quantitative measurements of the proton-motive force and its relation to steady state lactose accumulation in Escherichia coli. Biochem. J.*, **200** (1981): 573–581, 1470-8728.
- [21] NELSON, N.: *Metal ion transporters and homeostasis. EMBO J.*, **18**(16) (1999): 4361–4371, 1460-2075.
- [22] COURVILLE, P.; CHALOUPKA, R. a CELLIER, M.: *Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. Biochem. Cell Biol.*, **84** (2006–12–01): 960–978, 1208-6002.
- [23] Membrane Transport Protein Classification Database.
URL <<http://www.tcdb.org>>
- [24] CELLIER, M.; PRIVE, G.; BELOUCHI, A. aj.: *Nramp defines a family of membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (1995): 10089–10093, 1091-6490.

- [25] CELLIER, M.; BELOUCHI, A. a GROS, P.: *Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp*. *Trends Genet.*, **12** (1996): 201–204, 0168-9525.
- [26] WEST, A. H.; CLARK, D. J.; MARTIN, J. aj.: *Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein*. *J. Biol. Chem.*, **267** (1992): 24625–24633, 1083-351X.
- [27] BELOUCHI, A.; CELLIER, M.; KWAN, T. aj.: *The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants*. *Plant Mol. Biol.*, **29** (1995): 1181–1196, 1573-5028.
- [28] GRUENHEID, S.; CELLIER, M.; VIDAL, S. aj.: *Identification and characterization of a second mouse Nramp gene*. *Genomics*, **25** (1995): 514–525, 1089-8646.
- [29] CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S. aj.: *Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNAcloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression*. *J. Exp. Biol.*, **180** (1994): 1741–1752, 1477-9145.
- [30] TABUCHI, M.; YOSHIMORI, T.; KAZUHITO, Y. aj.: *Human NRAMP2/DMT1, which Mediates Iron Transport across Endosomal Membranes, is Localized to Late Endosomes and Lysosomes in HEp-2 cells*. *J. Biol. Chem.*, **275** (2000): 22220–22228, 1083-351X.
- [31] SUPEK, F.; SUPEKOVA, L.; NELSON, H. aj.: *Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function*. *J. Exp. Biol.*, **200** (1997): 321–330, 1477-9145.
- [32] GOVONI, G. a GROS, P.: *Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections*. *Inflamm. Res.*, **47**(7) (1998): 277–284, 1420-908X.
- [33] MULERO, V.; SEARLE, S.; BLACKWELL, J. M. aj.: *Solute carrier 11a1 (Slc11a1; formerly Nramp1) regulates metabolism and release of iron acquired by phagocytic, but not transferrin-receptormediated, iron uptake*. *Biochem. J.*, **363** (2002): 89–94, 1470-8728.
- [34] PORTNOY, M. E.; LIU, X. F. a CULOTTA, V. C.: *Saccharomyces cerevisiae Expresses Three Functionally Distinct Homologues of the Nramp Family of Metal Transporters*. *Mol. Cell Biol.*, **20** (2000): 7893–7902, 1098-5549.
- [35] CULOTTA, V. C.; YANG, M. a HALL, M. D.: *Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, **4** (2005): 1159–1165, 1535-9786.
- [36] MAKUI, H.; ROIG, E.; COLE, S. T. aj.: *Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter*. *Mol. Microbiol.*, **35**(5) (2000): 1065–1078, 1365-2958.

- [37] KEHRES, D. G.; ZAHARIK, M. L.; FINLAY, B. B. aj.: *The NRAMP proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. Mol. Microbiol.*, **36**(5) (2000): 1085–1100, 1365-2958.
- [38] COURVILLE, P.; CHALOUPKA, R.; VEYRIER, F. aj.: *Determination of Transmembrane Topology of the Escherichia coli Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog. Biol. Chem.*, **279**(5) (2004-1-30): 3318–3326, 1431-6730.
- [39] SLONCZEWSKI, J. L.; ROSEN, B. P.; ALGER, J. R. aj.: *pH homeostasis in Escherichia coli: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**(10) (1981): 6271–6275, 1091-6490.
- [40] SLAVÍK, J.: *Fluorescent probes in Cellular and Molecular Biology*. CRC, 1. vydání (2004), 0-8493-6892-8.
- [41] HEIM, R.; CUBITT, A. B. a TSIEN, R. Y.: *Improvement of green fluorescent protein by site-directed mutations. Nature*, **373** (1995): 663–664, 1476-4687.
- [42] ORMÓ, M.; CUBITT, A. B.; KALLIO, L. aj.: *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. Science*, **273** (1996): 1392–1395, 1095-9203.
- [43] YANG, F.; MOSS, L. G. a PHILLIPS, G. N.: *The molecular structure of green fluorescent protein. Nat. Biotechnol.*, **14** (1996-9-30): 1246–1251, 1546-1696.
- [44] MIESENBÖCK, G.; ANGELIS, D. A. D. a ROTHMAN, J. E.: *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature*, **394** (1998-7-9): 192–195, 1476-4687.
- [45] LANE, M.: *Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. Theriogenolog*, **55**(1) (2001): 225–236, 0093-691X.
- [46] SANDERS, D. a SLAYMAN, C. L.: *Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism Neurospora. J. Gen. Physiol.*, **80** (1982): 377–402, 1540-7748.
- [47] SCHULDINER, S.; AGMON, V.; BRANDSMA, J. aj.: *Induction of SOS functions by alkaline intracellular pH in Escherichia coli. J. Bacteriol.*, **157**(2) (1986): 936–939, 1098-5530.
- [48] MADSHUS, I. H.: *Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. Biochem. J.*, **250** (1988): 1–8, 1470-8728.
- [49] BOOTH, I. R.: *Regulation of cytoplasmic pH in Bacteria. Microbiol. Rev.*, **49** (1985): 359–378, 0146-0749.
- [50] ROOS, A. a BORON, W. F.: *Intracellular pH. Physiol. Rev.*, **61** (1981): 296–434, 1522-1210.

- [51] STRAKOVÁ, E.: Studium faktorů ovlivňujících transport protonů transportním proteinem MntH (2007), diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze.
- [52] BOOTH, I. R.; MITCHELL, W. J. a HAMILTON, W. A.: *Quantitative analysis of proton-linked transport systems. The lactose permease of Escherichia coli. Biochem. J.*, **182** (1979): 687–696, 1470-8728.
- [53] KASHKET, E. R.: *Effects of K^+ and Na^+ on the proton motive force of respiring Escherichia coli at alkaline pH. J. Bacteriol.*, **163** (1985): 423–429, 1098-5530.
- [54] Etana, P.; BIBI, E.; ITO, M. aj.: *Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes*, **1717**(2) (2005): 67–88, 0005-2736.
- [55] KROLL, R. G. a BOOTH, I. R.: *The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in Escherichia coli. Biochem J.*, **216** (1983): 709–716, 1470-8728.
- [56] Hersh, B. M.; FAROOQ, F. T.; BARSTAD, D. N. aj.: *A glutamate-dependent acid resistance gene in Escherichia coli. J. Bacteriol.*, **178** (1996): 3978–3981, 1098-5530.
- [57] STANCIK, L. M.; STANCIK, D. M.; SCHMIDT, B. aj.: *pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in Escherichia coli. J. Bacteriol.*, **184** (2002): 4246–4258, 1098-5530.
- [58] DOLEŽALOVÁ, I.: Vliv exprese různých mutantů proteinu MntH na regulaci vnitrobuněčného pH bakterie *E. coli* (2008), bakalářská práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze.
- [59] DeFELICE, L. J. a GOSWAMI, T.: *Transporters as Channels. Annu. Rev. Physiol.*, **69** (2007): 87–112, 1545-1585.
- [60] ILLING, A. C.; COURVILLE, P.; CHALOUPKA, R. aj.: *Functional properties of a prototypical member of the NRAMP superfamily of metal-ion transporters. FASEB J.*, **20** (2006): A1278, 1530-6860.