

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DISERTAČNÍ PRÁCE



RNDr. Marie Kodedová

**Studium činnosti mikrobiálních MDR pump pomocí fluorescenčních sond: stanovení účinku potenciálních inhibitorů**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: 4F4 Biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika

Praha 2011

Na tomto místě bych ráda parafrázi částí básně Karla Hynka Máchy vyjádřila vděčnost dvěma výjimečným ženám, bez nichž by tato práce stěží mohla vzniknout,

vedoucí své disertační práce, doc. RNDr. Daně Gáškové, CSc.

*Ty jsi radou svojí vedla k činu,  
Tys mne vedla – zmizely nesnáze,  
A já opět mohla dále jíti po života dráze.*

a své mamince

*Bez Tebe co bych byla počala sobě,  
Celé štěstí své, své živobyті,  
Vše já děkuji, Tobě,  
Vše čím jsem, i čím mám ještě býti.*

Ráda bych poděkovala vedoucí mé disertační práce doc. RNDr. Daně Gáškové, CSc. také za projevenou důvěru a za možnost uskutečnění řady vědeckých snů, Ing. Karlu Siglerovi, DrSc. za spolupráci při sepisování publikací, Mgr. Tomáši Hendrychovi, Ph.D. za vytvoření programu, který mi značně pomohl při vyhodnocování tisíců fluorescenčních spekter, jichž bylo zapotřebí k realizaci této práce. Dále patří mé díky laborantce, paní Ivaně Benešové, za technickou spolupráci a všem ostatním členům oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu za přátelskou pracovní atmosféru. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat doc. Marwanu K. Al-Shawimu, Ph.D. z University of Virginia Health Sciences Center (USA) za darování plazmidu s lidským P-glykoproteinem a RNDr. Haně Sychrové, DrSc. a její laborantce Pavle Herynkové z Fyziologického ústavu AV ČR za pomoc při transformaci kvasinek tímto plazmidem. Děkuji také Mgr. Ladislavu Bendovi a Mgr. Kamilu Maláčovi za pomoc při modelování struktur některých testovaných látek. Rovněž bych ráda poděkovala mgr inž. Izabele Łącké a prof. dr hab. inž. Sławomiru Milewskému z Katedry farmaceutické technologie a biochemie, Politechnika Gdańska (Polsko) za darování chalkonových derivátů.

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

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

V Praze dne 2. února 2011

Název práce: Studium činnosti mikrobiálních MDR pump pomocí fluorescenčních sond: stanovení účinku potenciálních inhibitorů

Autor: RNDr. Marie Kodedová

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc., Fyzikální ústav UK

**Abstrakt:** Nadměrné používání antimykotik v posledních letech vedlo ke vzniku rezistence vůči těmto látkám. Tudíž je zapotřebí vývoj nových antimykotik s různými mechanismy účinku, které by překonaly mnohačetnou lékovou rezistenci (MDR). Výhodou povrchově aktivních látek je jejich nízká toxicita pro hostitele a malá pravděpodobnost vzniku lékové rezistence.

V disertační práci jsme vyvinuli metodu využívající potenciometrickou fluorescenční sondu diS-C<sub>3</sub>(3), substrát dvou hlavních MDR pump *S. cerevisiae*, Pdr5p a Snq2p. Pomocí této vysoce citlivé fluorescenční metody můžeme v reálném čase sledovat změny jak v aktivitě obou pump, tak v membránovém potenciálu. Díky ní můžeme efektivně vyhledávat inhibitory MDR pump s minimálními vedlejšími účinky na integritu plazmatické membrány a porovnávat efektivitu různých inhibitorů. Nové účinné inhibitory MDR pump by mohly být používány společně s antimykotiky, jež jsou substráty MDR pump. Metoda může být využita také ke stanovení mechanismu účinku povrchově aktivních látek a jejich nejnižších účinných koncentrací.

**Klíčová slova:** fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3), membránový potenciál, inhibitory MDR pump, povrchově aktivní látka, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Title: Study of the performance of microbial MDR pumps by fluorescent probes: effect of potential inhibitors

Author: RNDr. Marie Kodedová

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Dana Gášková, CSc., Institute of Physics

**Abstract:** The current increased use of antifungal agents has resulted in the development of resistance to these drugs. Search for new antifungals with different mechanisms of action overcoming the multidrug resistance is thus underway. Surface-active antifungals have the advantages of minimizing host toxicity and the emergence of drug resistance.

We have developed a fluorescence method based on the use of the potentiometric fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3), substrate of two major *S. cerevisiae* MDR pumps, Pdr5p and Snq2p. It allows us to monitor with high sensitivity and in real time changes in the activities of both pumps and also in membrane potential. We present here an efficient strategy for identifying pump inhibitors with minimal side effects on membrane integrity, and compare the potencies of different inhibitors towards MDR pumps. New efficient inhibitors of MDR pumps could potentially be used in conjunction with current antimicrobials that are MDR pump substrates. The method can be also used to determine the mechanism of action of surface-active drugs and their lowest effective concentrations.

**Keywords:** fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3), membrane potential, inhibitors of MDR pumps, surface-active drug, yeast *Saccharomyces cerevisiae*



# Obsah

Úvod .....	1
<b>1. Teoretická část .....</b>	<b>2</b>
1.1. Boj s patogeny .....	2
1.2. Léková rezistence .....	4
1.2.1. Mnohačetná léková rezistence .....	6
1.3. Mechanismy účinku antimykotik a jejich použití .....	10
1.3.1. Buněčná stěna kvasinek .....	11
1.3.1.1. Syntéza chitinu a její inhibitory .....	12
1.3.1.2. Inhibitory syntézy $\beta$ -1,3-glukanu .....	13
1.3.1.3. Mannoproteiny .....	14
1.3.2. Plazmatická membrána .....	15
1.3.2.1. Polyeny .....	18
1.3.2.2. Azolové deriváty .....	21
1.3.2.3. Allylaminy, thiokarbamáty a morfoliny .....	23
1.3.2.4. $H^+$ -ATPáza .....	24
1.3.3. Vnitrobuněčné cíle antimykotik .....	26
1.3.3.1. Inhibice syntézy nukleových kyselin .....	26
1.3.3.2. Inhibitory syntézy proteinů .....	27
1.3.3.3. Některá další antimykotika .....	27
1.3.3.4. Lyzozomy, vakuoly a lyzozomotropní látky .....	28
1.4. Měření membránového potenciálu .....	30
1.4.1. Membránový potenciál .....	30
1.4.2. Metody měření membránového potenciálu .....	31
1.4.3. Měření membránového potenciálu a změn aktivity MDR pump (Pdr5p a Snq2p) pomocí fluorescenční sondy diS-C <sub>3</sub> (3) .....	34
<b>2. Materiál a metody .....</b>	<b>36</b>
2.1. Chemikálie a materiál .....	36
2.2. Kultivační média a roztoky .....	41
2.3. Sada použitých kvasinkových kmenů .....	43
2.3.1. Příprava kmenů nesoucích plazmidů s lidským P-gp .....	45
2.4. Příprava a uchovávání kvasinkových kultur .....	49
2.4.1. Příprava a uchovávání zásobních kvasinkových kultur .....	49
2.4.2. Příprava vzorků pro měření .....	49
2.5. Měření růstových křivek .....	50
2.6. Biologické metody .....	50
2.6.1. Výsevový test .....	50
2.6.2. Zónový test .....	51
2.7. Stanovení obsahu glukózy v živných médiích během růstu kvasinkových kultur ..	51
2.7.1. Měření koncentrace glukózy v tekutých médiích .....	52
2.7.2. Stanovení obsahu glukózy v pevných půdách .....	52
2.8. Stanovení míry permeability plazmatické membrány buněk pomocí UV absorpce	53
2.9. Měření barvení buněk fluorescenční sondou diS-C <sub>3</sub> (3) .....	54
2.9.1. Metoda barvicích křivek .....	54
2.9.2. Měření časově závislého účinku látek na kvasinky pomocí fluorescenční sondy diS-C <sub>3</sub> (3) .....	55

<b>3. Výsledky a diskuse</b> .....	<b>56</b>
3.1. Specifikace úkolů disertační práce .....	56
3.2. Vyhledávání inhibitorů pump Pdr5p a Snq2p pomocí metody barvicích křivek .	57
3.2.1. Látky interagující s pumpou Pdr5p .....	58
3.2.2. Látky, které nemají vliv na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p .....	62
3.2.3. Vliv CCCP a FCCP na kvasinkové buňky .....	63
3.2.3.1. Protonofor CCCP aktivuje H <sup>+</sup> -ATPázu v plazmatické membráně kvasinek .....	63
3.2.3.2. CCCP a FCCP jsou substráty jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p .....	65
3.2.4. Vliv lyzozomotropních látek na aktivitu H <sup>+</sup> -ATPázy a MDR pump .....	68
3.3. Stanovení mechanismu a rychlosti účinku povrchově aktivních látek na kvasinky	73
3.3.1. Vliv detergentů na obalové struktury kvasinek .....	73
3.3.1.1. Koncentračně závislý účinek SDS na kvasinek .....	73
3.3.1.2. Triton X-100 nepoškozuje buněčnou stěnu kvasinek na rozdíl od SDS .....	76
3.3.2. Určení efektivností nystatinu a dvou forem amfotericinu B v permeabilizaci kvasinkových membrán .....	77
3.3.3. Porovnání účinků komerčních biocidů .....	79
3.3.3.1. Oktenidin dihydrochlorid (ODDC) .....	79
3.3.3.2. Chlorhexidin .....	81
3.3.3.3. Benzalkonium chlorid (BAC) .....	82
3.4. Studium účinku látek ovlivňujících aktivitu kvasinkové H <sup>+</sup> -ATPázy .....	85
3.5. Interakce MDR inhibitorů s cílovými proteiny .....	87
3.5.1. Kompetitivní inhibice dvou substrátů versus reálná inhibice pump .....	88
3.5.2. Vliv flukonazolu a ketokonazolu na transport sondy diS-C <sub>3</sub> (3) pumpami Pdr5p a Snq2p .....	90
3.6. Nové aplikace diS-C <sub>3</sub> (3) fluorescenční metody .....	92
3.6.1. Kvasinky produkující lidský P-glykoprotein jako model pro studium MDR v nádorových buňkách .....	92
3.6.2. Kvasinky <i>S. cerevisiae</i> jako model pro studium mechanismu účinku nově syntetizovaných antifungálních látek proti patogenním kvasinkám .....	94
<b>Závěr</b> .....	<b>100</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>102</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>115</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>116</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>118</b>

# Úvod

Většinu našich životů trávíme v mírumilovném soužití se zástupci říše hub. Od pradávna využíváme jejich chutných darů v podobě lesních hub, ušlechtilých plísní při výrobě sýrů, pekařského droždí a kvašených nápojů, především piva a vína. V říši hub se naneštěstí vyskytují také patogenní organismy napadající rostliny i živočichy, tito škůdci každoročně zničí nemalou část celosvětové úrody obilovin, kukuřice, sóji a dalších potravin. Avšak v některých případech se mohou houby obrátit přímo proti nám samotným. Jakmile je imunitní systém člověka oslaben, je naše křehká tělesná schránka vydána na pospas útokům miliard mikroorganismů. Z do té doby komenzálně žijících organismů se rázem stávají patogeny, které dokážou v případě zanedbání léčby člověka i zabít.

Roku 1929 ukázal sir Alexander Fleming objevem penicilinu lidstvu cestu, jak bojovat s bakteriálními infekcemi. Od té doby byla vyvinuta celá kolekce různých antibiotik včetně širokospektrálních. Vývoj antimykotik není zdaleka tak jednoduchý. Patogeny z říše hub jsou stejně jako lidé eukaryotní organismy na rozdíl od prokaryotních bakterií. Díky této evoluční příbuznosti není snadné vytvořit taková léčiva, která by nezahubila s patogenem i lidského hostitele. Navíc houbové buňky si v průběhu evoluce osvojily řadu způsobů, které jim umožnily přežít v nepříznivých podmínkách a které jim nyní pomáhají k získání odolnosti a rezistence vůči antimykotikům.

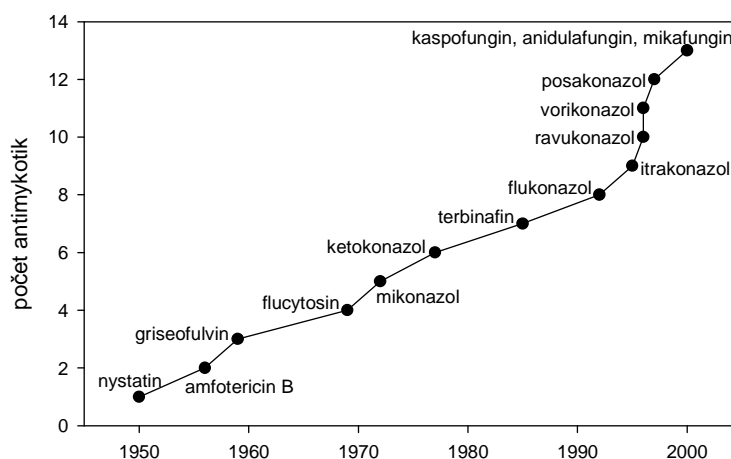
Léková rezistence je vedle patřičné specifčnosti interakce tou největší komplikací při vývoji nových antifungálních léčiv. Mnohačetná léková rezistence zprostředkovaná membránovými transportními proteiny tzv. MDR pumpami je jen jedním z mnoha obranných systémů patogenních mikroorganismů. V disertační práci jsme se zaměřili nejen na studium fungování těchto transportérů, hledání jejich účinných inhibitorů, které by usnadnily léčbu mykóz, ale i na studium mechanismu působení tzv. povrchově aktivních látek, které dokážou zabít kvasinkové buňky, aniž by do nich musely proniknout, a tudíž se nemohou stát ani terčem jejich obranných systémů, včetně MDR pump. Touto prací bychom rádi alespoň trochu přispěli k hledání nových léčiv. Vyvinuli jsme novou fluorescenční metodu, pomocí níž je možné detailně detekovat průběh působení povrchově aktivních látek na kvasinky, ale i interakci inhibitorů MDR pump, Pdr5p a Snq2p, s cílovými proteiny. Otestovali jsme také řadu nově syntetizovaných látek, mezi nimiž jsme našli vhodné adepty pro rozšíření dosud ne příliš početné skupiny antimykotik.

# 1. Teoretická část

## 1.1. Boj s patogeny

Osm set milionů let evoluce vytvořilo ~ 1,5 milionu druhů hub, které zaujímají mnoho odlišných ekologických nik, avšak pouze 307 druhů je patogenních pro člověka. Z 1415 známých druhů lidských patogenů tvoří houby 22 % a jsou tak druhou nejpočetnější skupinou po bakteriích (38 %) (1).

Mezi nejvýznamnější houbové patogeny ohrožující člověka patří *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* a *Cryptococcus neoformans* (2). Pokožka, sliznice a imunitní systém obvykle poskytují dostatečně silnou ochranu, avšak oslabený imunitní systém dramaticky zvyšuje nebezpečí infekce. Paradoxně je tento fenomén výsledkem pokroků v medicíně, tj. léčby nádorových onemocnění chemoterapeutiky, rozsáhlého používání širokospektrých antibiotik, podávání léků potlačujících imunitu při transplantacích orgánů a katetrizace pacientů. Velkou rizikovou skupinou jsou i HIV pozitivní osoby, přes 90 % z nich trpí houbovými infekcemi. Mykózy lze léčit relativně širokou paletou antimykotik (tabulka 1-1). Preventivní používání fungistatických azolů jako je flukonazol však vede k častějšímu výskytu vlastní nebo získané rezistence v klinických izolátech. Navzdory skutečnosti, že v současné době je k dispozici širokospektrálnější třetí generace azolových léčiv a bohatší třída echinokandinů (obr. 1-1), zůstává kandidóza čtvrtou nejčastější infekcí krevního řečiště vyskytující se v nemocnicích a je smrtící pro 40 % nakažených pacientů, zatímco aspergilóza je příčinou úmrtí až u 80 % zasažených pacientů (3).



**Obr. 1-1** Půlstoletí vývoje antimykotik (zpracováno podle (4))

Rostoucí výskyt rezistentních kmenů patogenních kvasinek a plísní, při jejichž léčbě selhávají dosud známé léky, i poměrně malý počet systémových antimykotik s řadou vážných vedlejších účinků si žádá neustálé hledání nových efektivnějších a vůči pacientovi šetrnějších léčiv. Jakákoliv nová antifungální látka musí být účinná proti co možná nejširšímu spektru druhů. Zároveň by však zásah jejího buněčného cíle měl buňku rychle zahubit, jedině tak se lze vyhnout vzniku lékové tolerance i rezistence

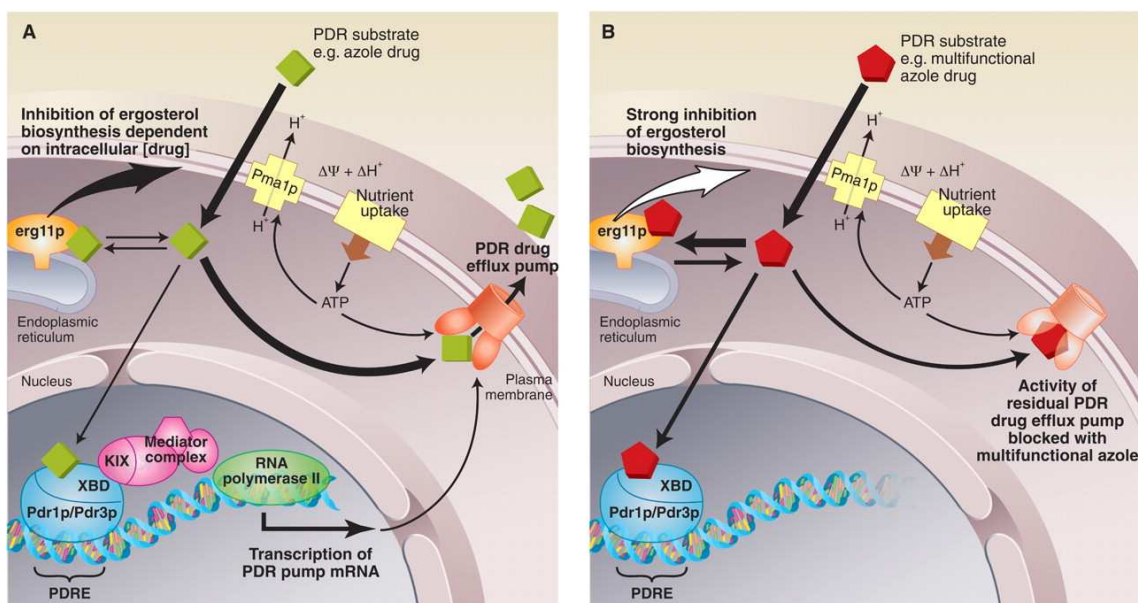
způsobené odstraňováním léčiva z buňky. Proto se pátrání po nových cílech zaměřuje na geny, které jsou široce rozšířené v říši hub, ale nejsou přítomné v savčích buňkách.

Nepatogenní kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je ideální eukaryotický organismus pro studium genové exprese a dalších životních pochodů. Tento jednobuněčný organismus má relativně malý zcela sekvenovaný genom o více než 6100 genech lokalizovaných na 16 chromozomech (5,6). 240 genů *S. cerevisiae*, které jsou považované za esenciální, kóduje produkty, jež jsou zachované alespoň ze 40 % napříč širokou škálou hub, včetně houbových patogenů *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Cryptococcus neoformans* (7). Jen asi 50 těchto genů vykazuje menší než 40 % homologii s lidskými proteiny. Pokud je cíl sdílen mezi hostitelem a patogenem, kladou se dodatečná omezení na selektivitu a toxicitu potenciálních antifungálních látek. To velmi zužuje zdánlivě rozsáhlý repertoár potenciálních cílů, které byly vyhledány ze studií genomů *C. albicans* a *S. cerevisiae*.

O složitosti problému vypovídá i následující příklad. Jednou z esenciálních struktur houbové buňky je plazmatická protonová pumpa (Pma1p), která vytváří elektrochemický gradient, jenž houby potřebují pro iontovou rovnováhu, přísun živin, a tvorbu energie. Pma1p inhibitory jsou fungicidní, nepřímo blokují aktivitu ABC i MFS pump (8), přesto byla odhalena značná rezistence vůči nim (3). Proto je nezbytné nejen vyhledávání nových buněčných cílů a antimykotik, ale i vymyšlení strategií boje s rezistencí patogenních organismů (obr. 1-2).

Tabulka 1-1: Mechanismus působení některých klinicky používaných antifungálních látek (3,9)

Třída antimykotik	Klinicky používané léčivo	Primární molekulární cíl (mechanismus účinku)
polyeny	nystatin	ergosterol v buněčné membráně (zvýšení permeability cytoplazmatické membrány a oxidační poškození)
	amfotericin B	
imidazoly a triazoly	mikonazol	biosyntéza ergosterolu, lanosterol C-14 demetyláza, Erg11p (fungistatická inhibice biosyntézy ergosterolu a hromadění toxických sterolových intermediátů)
	ketokonazol	
	flukonazol	
	itrakonazol	
	posakonazol	
	vorikonazol ravukonazol	
fluorovaná pyrimidinová báze	flucytosin	RNA a DNA biosyntéza (chybné začlenění 5-fluorouracilu)
allylaminy a thiokarbamáty	naftifin	biosyntéza ergosterolu, skvalenepoxidáza, Erg1p (fungistatická inhibice biosyntézy ergosterolu)
	terbinafin	
	tolnaftát	
morfolin	amorolfin	inhibuje sterol C-14 reduktázu a C-8 izomerázu; pouze první z nich je esenciální
echinokandiny	kaspofungin	biosyntéza buněčné stěny, $\beta$ -1,3-glukansyntetáza, Fks1/2p (fungicidní či fungistatická inhibice biosyntézy $\beta$ -1,3-glukanu)
	mikafungin	
	anidulafungin	



**Obr. 1-2** Obejití PDR dráhy v houbách. **(A)** V buňkách s klinicky významnou rezistencí vůči azolovým látkám vyžaduje vysoká úroveň transkripce genů PDR pump účast RNA polymerázy II, která závisí na antimykotikem indukované interakci mezi Pdr1p/Pdr3p a mediatorovým komplexem. Pumpy snižují vnitrobuněčnou koncentraci léčiva pod úroveň, která je nutná k inhibici azolového cíle Erg11p, a dovolují tak normální buněčný růst. **(B)** Navázání multifunkčního azolu k XBD doméně Pdr1p/Pdr3p blokuje expresi genů PDR pump, současně molekuly azolu inhibují odstraňování látky obsazením vazebného místa ve zbylých pumpách. Vnitrobuněčná koncentrace léku je tudíž postačující k zablokování biosyntézy ergosterolu v endoplazmatickém retikulu. Snížený obsah ergosterolu v membránách, tvorba toxických metylovaných sterolů a oxidační poškození zahubí houbovou buňku. Nebo mohou antimykotika inhibovat plazmatickou  $H^+$ -ATPázu Pma1p, tím naruší elektrochemický gradient na plazmatické membráně a omezí přísun živin. Buňky rychle umírají kvůli omezené buněčné zásobě energie a ztrátě iontové rovnováhy. Částečná inhibice aktivity Pma1p se projeví na aktivitě jak MFS, tak ABC transportérů a zvýší účinnost azolových látek (3).

## 1.2. Léková rezistence

Vývoj lékové rezistence je obrannou reakcí buněk na selektivní tlak vyvolaný nejrůznějšími typy chemických látek – antibiotiky, antimykotiky, dezinfekčními prostředky, cytostatiky, detergenty, těžkými kovy apod. V průběhu věků se tato schopnost vyvinula u prokaryotních i eukaryotních organismů a pomohla jim přežít v nepříznivých podmínkách a prosadit se v evolučních soubojích. V dnešní době však tento fenomén značně komplikuje léčbu bakteriálních a houbových infekcí, ale i rakoviny.

Stále častěji se setkáváme s případy **klinické lékové rezistence**, kdy infekce přetrvává navzdory antimikrobiální terapii. Léková rezistence závisí nejen na citlivosti patogenních organismů, jejich buněčných a molekulárních mechanismech rezistence, ale také na hostiteli, na stavu jeho imunitního systému, na lokalizaci<sup>1</sup> a vážnosti infekce či na přítomnosti cizích těles – potenciálních ložisek infekce – jako jsou katétrů, a v neposlední řadě na vlastnostech léčiva. Živnou půdou pro vývoj lékové rezistence jsou

<sup>1</sup> Podle místa napadení rozlišujeme povrchové neboli lokální mykózy postihující sliznice, kůži a nehty, a systémové mykózy, které zachvacují vnitřní orgány a krevním řečištěm se šíří po celém organismu hostitele.

v tomto ohledu fungistatická léčiva, výrazně bezpečnější jsou preparáty s fungicidními účinky, jež patogenní organismy přímo zahubí. Důležité je taktéž dávkování a farmakokinetika (vstřebávání, distribuce, aj.) samotných antimykotik i jejich interakce s ostatními společně podávanými léčivy (10).

Výskyt klinické rezistence tedy do jisté míry závisí na *in vitro* rezistenci daného patogenu. Některé druhy jsou přirozeně odolnější vůči působení antimykotik, mají tzv. **primární** (vlastní) rezistenci, zatímco u jiných druhů se může vyvinout **sekundární rezistence** v reakci na vystavení vlivu antimikrobiální látky.

Několik buněčných faktorů může vést k rozvoji houževnatých a obtížně léčitelných houbových infekcí. Předně dochází k nahrazování široce rozšířeného druhu *Candida albicans* druhy přirozeně rezistentnějšími jako je *Candida krusei* a *Candida glabrata*, popřípadě rezistentnějšími kmeny *C. albicans*. Vedle této primární rezistence hrozí vznik sekundární rezistence, je-li daný kmen vystaven dlouhodobému selektivnímu tlaku chemické látky. Genetické mutace se s poměrně nízkou frekvencí (obvykle  $10^{-6}$  až  $10^{-8}$ /gen) objevují náhodně ve všech organismech. Nicméně v obrovské populaci kvasinkových buněk mohou specifické náhodné mutace, které učiní buňky o něco málo rezistentnější, svým nositelům poskytnout konkurenční výhodu. Jestliže mutace negativně neovlivňují celkový fyziologický stav buněk, mutovaný kmen přetrvá i poté, co selektivní tlak pomine. Zrovna tak mohou buňky pouze dočasně změnit svůj fenotyp v přítomnosti toxické látky a rychle se navrátit k původnímu fenotypu, jakmile ustoupí selektivní tlak. Citlivost patogenů je také závislá na buněčném typu, např. *Candida albicans* je dimorfní organismus existující v kvasinkové a hyfové podobě, kromě toho se u ní rozlišují dva sérotypy, kmeny sérotypu B jsou citlivější k azolům, ale rezistentnější k flucytosinu než kmeny sérotypu A (10).

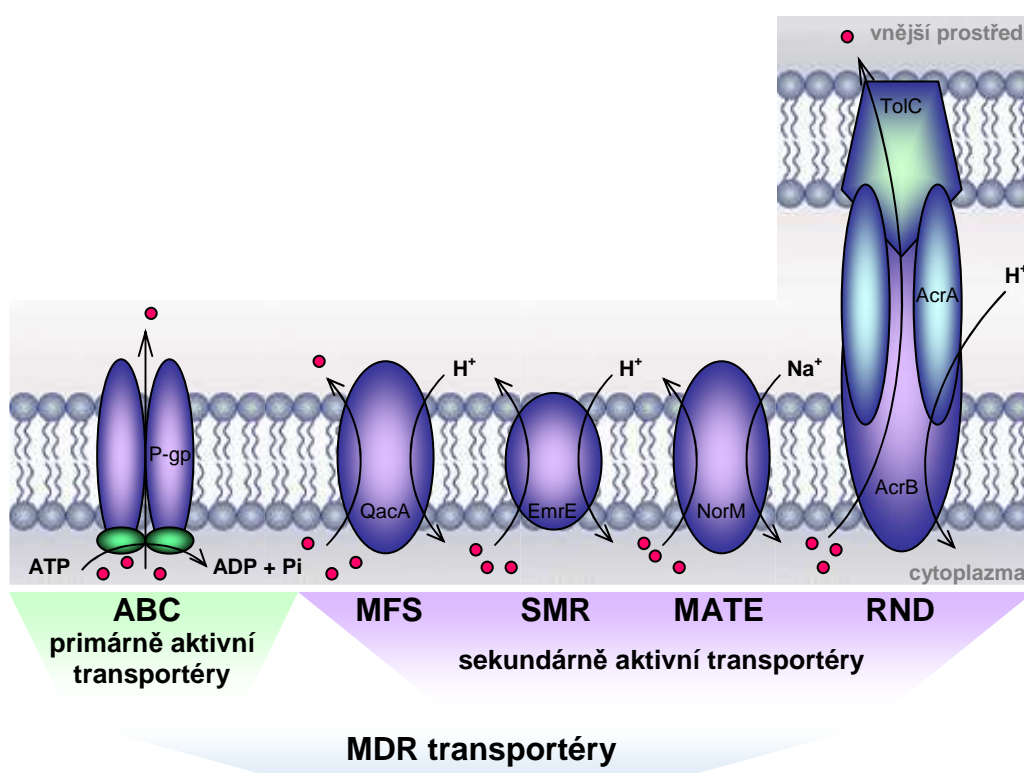
K vývoji lékové rezistence v eukaryotických buňkách přispívá řada molekulárních mechanismů. Mnohdy houbové buňky pozmení zastoupení lipidů a sterolů v plazmatické membráně či složení buněčné stěny natolik, že výrazně omezí průnik antimykotik do buněk, nebo molekuly léčiva chemicky modifikují či enzymaticky degradují. Anebo se naopak úpravy zajišťující lékovou rezistenci soustřeďují na cílový enzym antimykotik. Běžné jsou bodové mutace v příslušných genech, které sice zabrání navázání molekuly léčiva, ale ponechají enzymu jeho funkci, popřípadě zvýšená produkce či aktivita daných proteinů, v takovém případě nejsou antimykotika schopna inhibovat biochemickou reakci v plné míře. Nežádá se změny dotknou i jiných enzymů v téže biosyntetické dráze, a ty pak kompenzují výpadek činnosti zasaženého enzymu (10,11). Nejdůležitějším mechanismem rezistence je patrně odstraňování molekul léčiva membránovými transportními proteiny, tzv. MDR pumpami. Tyto proteiny představují univerzální systém zajišťující mnohačetnou lékovou rezistenci (*multidrug resistance*, odtud zkratka MDR) vůči množství strukturně nepodobných chemických látek v buňkách bakterií, kvasinek, ale i nádorových buňkách člověka (12).

Rezistence řady klinicky izolovaných kmenů patogenních kvasinek je často způsobena kombinací hned několika výše zmíněných mechanismů rezistence. Nejen díky tomu jsou rezistentní organismy leckdy odolné jak vůči účinkům látky, již byly vystaveny a která u nich indukovala sekundární rezistenci, tak také vůči spoustě látek, s nimiž se nikdy neseťkaly (10). Tato **křížová rezistence** značně komplikuje již tak dost složitou léčbu mykóz, neboť výrazně zužuje spektrum léčiv, které lze nasadit do boje proti jejich původcům.

### 1.2.1. Mnohočetná léková rezistence

Aktivní odstraňování léčiv je hlavním mechanismem rezistence u patogenních organismů. Transportní proteiny aktivně odstraňují antimikrobiální látky z buněk a tím zabraňují tomu, aby jejich vnitrobuněčná koncentrace přesáhla toxickou úroveň. Podle zdroje energie, který využívají k transportu substrátu, se MDR pumpy rozdělují do dvou hlavních kategorií (obr. 1-3):

- 1) primárně aktivní transportéry, které získávají energii z hydrolýzy ATP a řadí se tedy do rodiny ABC proteinů, jež obsahují tzv. ATP-vazebnou kazetu (*ATP-binding cassette*);
- 2) sekundárně aktivní transportéry, které využívají transmembránového elektrochemického gradientu protonů (*proton motive force*), popřípadě sodných kationtů. Tyto PMF proteiny přenášejí molekuly cizorodých látek ven z buněk a současně  $H^+$  ( $Na^+$ ) do buněk.



**Obr. 1-3** Rozdělení MDR transportérů. Početná rodina ABC proteinů (např. P-glykoprotein) získává energii z hydrolýzy ATP. Skupiny MFS, SMR a RND obsahují sekundární transportéry využívající elektrochemický protonový gradient, jako jsou QacA ze *Staphylococcus aureus*, EmrE a AcrB z *E. coli*. AcrB tvoří proteinový komplex spolu s kanálem TolC ve vnější bakteriální membráně a proteinem AcrA. MATE rodina zahrnuje transportéry využívající gradient  $Na^+$  jako je NorM z *Vibrio parahaemolyticus*.

V bakteriálních buňkách protonové antiportery jasně převažují nad ABC proteiny, u eukaryotických buněk naopak zastávají dominantní roli v mnohačetné lékové rezistenci ABC proteiny. Skupina PMF transportérů se dále dělí do několika proteinových rodin: MFS (*major facilitator superfamily*), RND (*resistance-nodulation-cell division*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), jejíž zástupci využívají jako zdroj energie gradient  $Na^+$ , a SMR (*small multidrug resistance*), proteiny z této rodiny jsou vůbec nejmenšími známými sekundárními transportéry a vyskytují se výhradně u prokaryot (13-16).



Tabulka 1-2: Přehled ABC proteinů v *Saccharomyces cerevisiae* (12,17-20)\*

Protein	Délka	Topologie	Substrát/funkce	Lokalizace
<b>MDR rodina</b>				
Ste6p	1290	(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	transport <i>a</i> -faktoru	PM, G, E
Atm1p	694	TMS <sub>6</sub> -NBD	Fe(S)-proteiny	M
Mdl1p	696	TMS <sub>6</sub> -NBD	peptidy	M
Mdl2p	820	TMS <sub>6</sub> -NBD	peptidy	M
<b>PDR rodina</b>				
Pdr5p	1511	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	antimykotika, fosfolipidy	PM
Pdr10p	1564	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	detergenty	PM
Pdr15p	1529	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	detergenty, herbicidy	PM
Snq2p	1501	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	mutagenní látky, léčiva	PM
Pdr12p	1511	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	slabé organické kyseliny	PM
Pdr11p	1411	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	transport sterolů	PM
Aus1p	1394	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	transport sterolů	PM
Adp1p	1049	TMS <sub>2</sub> -NBD-TMS <sub>7</sub>		
YNR070w	1333	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>		
YOL075c	1095	(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>		
<b>MRP/CFTR rodina</b>				
Yor1p	1477	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	oligomycin, fosfolipidy	PM
Ycf1p	1515	NTE(TMS <sub>6</sub> -R-NBD) <sub>2</sub>	glutathionové konjugáty Cd <sup>2+</sup>	vakuola
Ybt1p	1661	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	žlučové kyseliny	vakuola
Bpt1p	1559	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>	nekonjugovaný bilirubin, Cd	vakuola
Vmr1p	1592	NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>		vakuola
Nft1p	1524	(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>		
<b>ALDP rodina</b>				
Pxa1p	870	TMS <sub>6</sub> -NBD	β-oxidace mastných kyselin	peroxisom
Pxa2p	853	TMS <sub>6</sub> -NBD	β-oxidace mastných kyselin	peroxisom
<b>YEF3/RLI rodina</b>				
Yef3p	1044	NBD <sub>2</sub>	interakce s aminoacyl-tRNA	Rib?, C?
Gcn20p	752	NBD <sub>2</sub>	interakce s tRNA a Gcn2p	polysomy
Hef3p	1044	NBD <sub>2</sub>		C?
New1p	1186	TMS <sub>3</sub> -NBD <sub>2</sub>		
Kre30p	610	NBD <sub>2</sub>		
Rli1p	608	NBD <sub>2</sub>		
<b>Neklasifikované</b>				
YDR061w	539	NBD		
Caf16p	289	NBD		

\* NBD *nucleotide-binding domain*, NTE *N-terminal extension*, R *regulační doména*, TMS *transmembránový segment*, PM *plazmatická membrána*, G *Golgiho vácíky*, E *endosom*, C *cytoplazma*, Rib *ribozom*, M *mitochondrie*

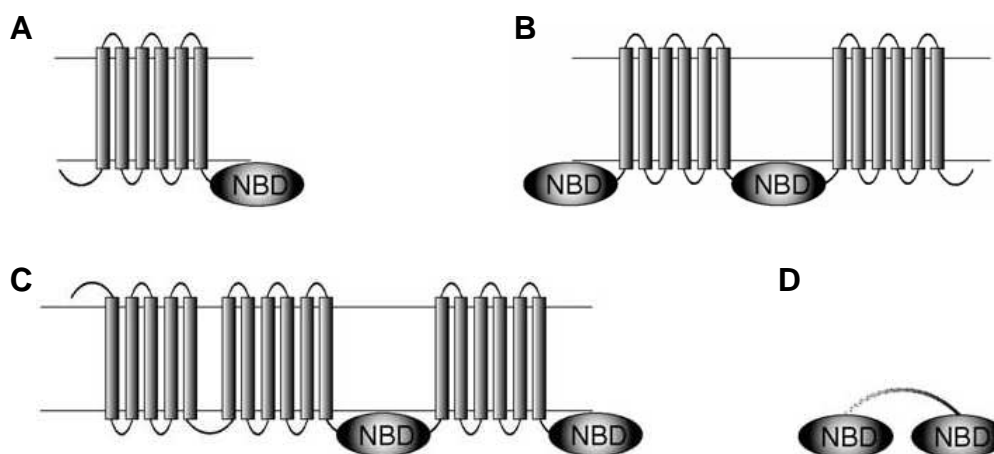
Nejvýznamnější skupinou PMF transportérů je patrně MFS rodina čítající více než 300 členů, jež se kromě mnohačetné lékové rezistence účastní i transportu cukrů, meziproductů Krebsova cyklu, fosfátů a oligosacharidů. Proteiny mívají 12 nebo 14 transmembránových segmentů (TMS). Nejznámějším představitelem proteinů s 12 TMS je nejspíše CaMdr1p zprostředkovávající rezistenci vůči flukonazolu, benomylu,

cykloheximidu, NQO a dalším látkám v kvasince *Candida albicans*. V *S. cerevisiae* se na lékové rezistenci podílejí dva MFS proteiny s 14 TMS, Atr1p (z jeho substrátů jmenujeme alespoň aminotriazol, NQO) a Sge1p (např. krystalová violet, ethidium bromid) (15).

V genomu *S. cerevisiae* bylo identifikováno 28 genů kódujících MFS transportéry a 30 genů pro ABC proteiny, z nichž pouze 23 obsahuje transmembránové segmenty, a tudíž by mohlo fungovat jako membránové transportéry. *S. cerevisiae* tedy disponuje 51 transportéry, které by mohly přispívat k lékové rezistenci buněk. Patogenní kvasinky rodu *Candida* budou mít pravděpodobně obdobný počet MDR pump (10).

Třicet ABC proteinů *S. cerevisiae* je rozděleno do 6 rodin (tabulka 1-2) mimo jiné podle sekvenční podobnosti s lidskými protějšky: MDR (*multidrug resistance*), PDR (*pleiotropic drug resistance*), MRP/CFTR (*multidrug resistance-related protein / cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ALDP (*adrenoleukodystrophy protein*), YEF3 (*yeast elongation factor 3*) a RLI (*RNase L inhibitor*). Pouze transportéry z rodin PDR, MRP/CFTR a MDR se účastní mnohačetné lékové rezistence (21).

ABC proteiny jsou zpravidla tvořeny ze čtyř domén: dvou membránových, každé sestávající ze šesti transmembránových segmentů (TMS), a dvou domén vázících nukleotidy (NBD), některé proteiny obsahují navíc několik membránových segmentů na N-konci (NTE) (obr. 1-4, tabulka 1-2). Existuje však i řada proteinů, jež mají jen po jedné membránové a nukleotidové doméně. Hydrofilní NBD, jež je vytvořena z přibližně 250 reziduí, obsahuje několik konzervovaných motivů, *Walker A* a *Walker B* motivy, které se nalézají i ve všech ostatních proteinech vázících nukleotidy, a *ABC signaturu* či *C motiv*, jež je typický pro ABC proteiny, a tzv. *centrální region* mezi *Walker A* a *Walker B* (21). Membránové domény naopak zajišťují vazbu substrátů a jejich transport přes membránu (18).

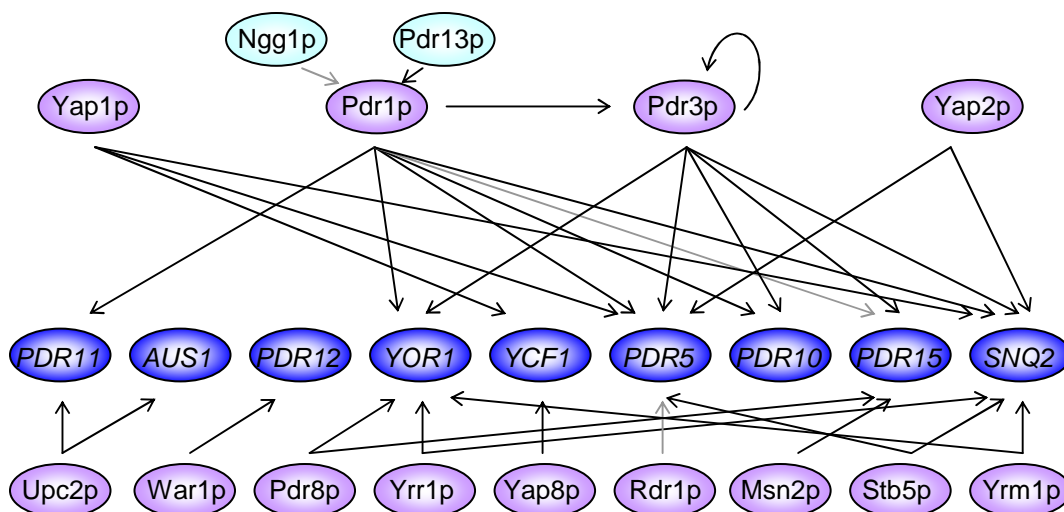


**Obr. 1-4** Předpokládaná topologie a organizace domén ABC proteinů. (A) Membránová topologie a organizace domén TMS<sub>6</sub>-NBD kvasinkových ABC proteinů z rodin MDR a ALDP. (B) Organizace domén (NBD-TMS<sub>6</sub>)<sub>2</sub> proteinů z rodiny PDR. (C) Konfigurace domén NTE(TMS<sub>6</sub>-NBD)<sub>2</sub> proteinů ze skupiny MRP/CFTR. (D) Schematické zobrazení domén NBD<sub>2</sub> proteinů z rodiny YEF3/RLI. NBD – nukleotid vázící doména, transmembránová doména je složena ze 6  $\alpha$ -šroubovic (TMS<sub>6</sub>), NTE – *N-terminal extension*. Převzato z (19).

Konkrétní aminokyselinové složení jednotlivých membránových  $\alpha$ -šroubovic (TMS), spojovacích smyček i NBD má zcela zásadní vliv na funkci daného transportéru. Prostřednictvím bodových mutací byly v aminokyselinové sekvenci

proteinu Pdr5p *S. cerevisiae* identifikovány aminokyseliny ležící v NBD, v TMS10 a v extracelulární smyčce 6 spojující TMS11 a TMS12, které určují spektrum transportovaných substrátů a citlivost proteinu k inhibitorům (22,23). Na základě různých analýz (22-24) se navíc předpokládá existence až třech částečně se překrývajících a zároveň nezávislých vazebných míst, které propůjčují Pdr5p schopnost transportovat stovky strukturně i funkčně odlišných látek z řad klinicky používaných antimykotik, herbicidů a zemědělských fungicidů, až po protirakovinová léčiva a lidské steroidní hormony (25). Obrovský potenciál Pdr5p odstraňovat cizorodé látky z buněk je částečně i dílem široké nukleotidové specifčnosti tohoto proteinu, vedle ATP může Pdr5p hydrolyzovat také CTP, GTP, UTP a ADP, podobně všestranný je např. lidský P-glykoprotein (26).

Pdr5p je patrně nejlépe prostudovaný MDR transportér *S. cerevisiae*. Zatímco Pdr5p a Snq2p se vyskytují v plazmatické membráně v hojném počtu, jiných členů PDR rodiny (Pdr10p, Pdr12p a Pdr15p) je výrazně méně a teprve stresové podmínky podnítl jejich zvýšenou produkci. Pdr15p je nejbližší homolog Pdr5p, jejich primární sekvence jsou ze 74 % identické, kdežto s Snq2p sdílí Pdr5p pouze 37 %. Oproti Pdr5p je produkce pumpy Pdr15p výrazně indukována za stresových podmínek (nízké pH, hladovění, vysoká osmolarita nebo tepelný šok) a její zastoupení roste v okamžiku, kdy buňky vstupují do diauxické fáze růstu. Pdr15p a Pdr10p odpovídají za toleranci kvasinek k látkám narušujícím membránu a k detergentům (18). Pdr12p, nejbližší homolog Snq2p, zprostředkovává odstraňování aniontů slabých organických kyselin používaných ke konzervaci potravin jako je kyselina benzoová, sorbová či propionová (27).



**Obr. 1-5** Schéma regulace ABC transportérů zodpovědných za mnohačetnou lékovou rezistenci v *S. cerevisiae*. Modře zakreslené geny představují cílové geny transkripčních regulátorů zobrazených nad a pod nimi ve fialové barvě. Pdr1p, Pdr3p, Yap1p a Yap2p jsou hlavními transkripčními faktory regulačních sítí PDR a YAP, jež obsahují taktéž transportéry MFS typu, které zde nejsou vyobrazeny. Černé šipky symbolizují pozitivní regulaci, zatímco šedé negativní. Zpracováno podle (19).

MDR pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p zajišťují rezistenci kvasinek vůči nepřebornému množství látek, jejich substrátové profily se do jisté míry překrývají, ale samozřejmě existují i látky, které jsou odstraňovány výhradně jen jednou pumpou z této trojice, např. exkluzivním substrátem Snq2p je NQO, po němž byl tento protein také pojmenován (*sensitivity to N-nitroquinoline-N-oxide*) (25). Vedle odstraňování cizorodých látek se Pdr5p a Yor1p účastní i translokace lipidů z vnitřního do vnějšího

listu plazmatické membrány a pomáhají tak regulovat permeabilitu membrány (28), tato schopnost však není vlastní všem MDR transportérům. Yor1p je jediný člen MRP rodiny nacházející se v plazmatické membráně, všechny ostatní MRP transportéry se nalézají ve vakuolární membráně. Yor1p byl původně izolován jako protein zajišťující rezistenci vůči oligomycinu (*yeast oligomycin resistance*) (18).

V případě, že potenciálně nebezpečná látka proklouzne MDR pumpám usazeným v plazmatické membráně, má kvasinková buňka připraven v záloze ještě druhý obranný mechanismus, a to sice MDR transportéry ve vakuolární membráně, které transportují toxické látky a metabolity do vakuoly, kde jsou poté zneškodněny. Tudiž členové MRP/CFTR rodiny, jako je Ycf1p, Bpt1p a Ybt1p, představují druhou obrannou linii (18).

Celá soustava MDR transportérů ABC i MFS typu je složitě regulována (viz obr. 1-5) prostřednictvím dvou regulačních sítí, PDR a YAP, které kromě MDR pump sdružují řadu transkripčních faktorů, mezi nimiž zaujímají proteiny s motivem zinkového prstu typu Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>, Pdr1p a Pdr3p, výsadní postavení. Tyto proteiny se váží na tzv. PDRE sekvence (*pleiotropic drug resistance elements*) v promotorových oblastech cílových proteinů. Obdobně fungují regulátory ze sítě YAP, jež rozpoznávají sekvenci označovanou jako YRE (*YAP1 response element*). Podobně bohatý a přísně regulovaný systém MDR transportérů se nachází i v patogenních kvasinkách jako je *C. albicans* (12,18).

### 1.3. Mechanismy účinku antimykotik a jejich použití

V klinické praxi se v současné době používají tyto hlavní skupiny systémových antimykotik: polyeny, azolové deriváty, allylaminy, thiokarbamáty, flucytosin a nedávno už i u nás registrované echinokandiny (tabulka 1-1). Polyenová antibiotika, azoly, allylaminy a thiokarbamáty jsou cíleny proti ergosterolu, hlavnímu sterolu v plazmatické membráně kvasinek, flucytosin narušuje syntézu nukleových kyselin a posledně jmenované echinokandiny inhibují syntézu β-1,3-glukanu buněčné stěny. V tabulce 1-3 a v následujících kapitolách je uveden přehled antimykotik podle jejich místa účinku.

Tabulka 1-3: Zařazení antimykotik podle místa účinku

Místo účinku	Cílová struktura	Antimykotika
buněčná stěna	mannoproteiny	benanomiciny, pradimiciny
	β-glukan	echinokandiny, pneumokandiny
	chitin	nikkomyciny, polyoxiny
buněčná membrána	ergosterol	polyenová antibiotika
		azolové deriváty
		allylaminy, thiokarbamáty, morfoliny
cytoplazma	aminoacyl/tRNA syntetáza	cispentacin
	proteosyntéza	deriváty sordarinu
jádro	DNA	grisany
		flucytosin

Antimykotika, která působí fungicidně na povrchové struktury patogenních kvasinek (buněčnou stěnu a plazmatickou membránu), jsou s ohledem na lékovou rezistenci perspektivnější než fungistatické přípravky, jejichž cílové struktury jsou ukryty hluboko uvnitř buňky, neboť nezavádávají patogenním organismům tolik příležitostí k vytvoření rezistence.

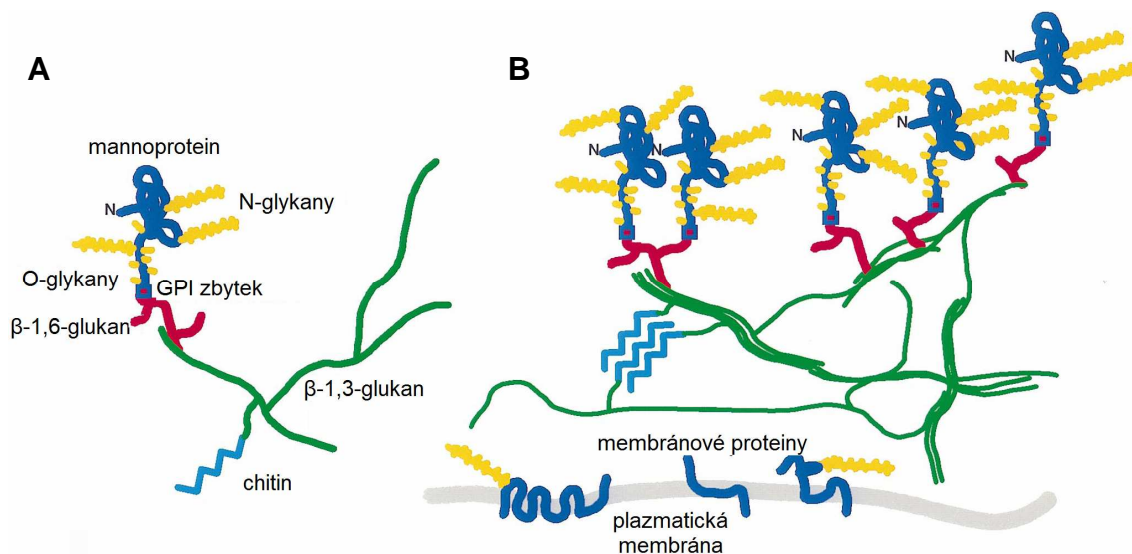
### 1.3.1. Buněčná stěna kvasinek

Charakteristickým znakem všech houbových buněk je buněčná stěna, která v jejich životě zastává řadu důležitých funkcí. Buněčná stěna určuje tvar buňky, propůjčuje ji mechanickou odolnost, aby mohla vzdorovat osmotickému tlaku a čelit nepřízní prostředí. Na druhou stranu si buněčná stěna zachovává dostatečnou pružnost, která umožňuje růst a dělení buněk. Buněčná stěna dovoluje kvasinkám interagovat s jejich okolím, zprostředkovává vzájemnou adhezi buněk (flokulaci) i přilnavost k substrátu (tvorbu biofilmu), slouží jako sensorové centrum vysílající podněty pro aktivaci signálních drah uvnitř buňky. Vedle ochrany buňky před toxickými látkami, antimykotika nevyjímaje, zajišťuje buněčná stěna také interakci s imunitním systémem hostitele a je určujícím faktorem virulence. Avšak toto zdánlivě neproniknutelné brnění je zároveň i Achillovou patou všech hub. Narušení buněčné stěny má hluboký dopad na růst a morfologii houbové buňky, často končí její smrtí. Jelikož se hlavní součásti buněčné stěny nevyskytují v savcích buňkách, jsou jejich struktury a syntéza vynikajícími cíli antimykotik (29).

Buněčná stěna hub se výrazně liší od rostlinné buněčné stěny, jejímž základním kamenem je celulóza. Do konstrukce buněčné stěny je zapojeno přibližně 1200 genů *S. cerevisiae* (30), kvasinka na tento proces samozřejmě vynakládá nemalé množství energie. V závislosti na růstových podmínkách činí masa buněčné stěny 10 – 25 % sušiny z celkové hmoty buňky. Buněčná stěna je tvořena glykoproteiny (mannoproteiny se podílejí 30 – 50 % na hmotnosti stěny) a polysacharidy, převážně glukany a chitinem.  $\beta$ -1,3-glukan zaujímá 30 – 45 % hmoty stěny,  $\beta$ -1,6-glukan 5 – 10 % a chitin 1,5 – 6 % (30). Není proto divu, že obsah glukózy v médiu má vliv na kvalitu buněčné stěny (31). Glykoproteiny jsou *N*- i *O*-glykosylovány a v mnoha případech opatřeny glykosylfosfatidylinozitolovou (GPI) kotvou, jež je uchycena v plazmatické membráně. Glukany, dlouhé přímé řetězce několika desítek glukózových reziduí pospojovaných  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,6 vazbami, a chitin, složený z řetězců *N*-acetylglukosaminových reziduí spojených  $\beta$ -1,4 vazbami, propůjčují buněčné stěně její pevnost (32). Kromě těchto základních vazeb jsou všechny typy polymerů dále kovalentně pospojovány mezi sebou, viz obr. 1-6 (29).

Přesné složení kvasinkové buněčné stěny a spolu s ním také její vlastnosti se proměňují v závislosti na růstových podmínkách (např. při stresu se dramaticky zvyšuje obsah chitinu), na buněčné formě (příkladem je dimorfní patogenní kvasinka *Candida albicans*, která se vyskytuje v kvasinkové i hyfové podobě) nebo na fázi růstu kultury (post-diauxické buňky mají méně propustnou buněčnou stěnu než exponenciální buňky a jsou celkově odolnější vůči působení degradujících enzymů, neboť jejich buněčné stěny obsahují šestinásobné množství disulfidických můstků) (30). Nová antimykotika by proto měla být do jisté míry univerzální, aby byla účinná pokud možno za všech okolností. Glukany, chitin a některé další součásti buněčné stěny jsou specifické a zároveň esenciální pro život zástupců říše hub, tudíž jsou vhodnými cíli antimykotik. Leč mannoproteiny nejsou ani esenciální, ani jedinečné, *O*- a *N*-glykosylované proteiny se objevují napříč všemi eukaryoty (33). Dodnes byly do klinické praxe zavedeny pouze

inhibitory syntézy  $\beta$ -1,3-glukanu a mnohem více cílů zůstává nevyužito (34), podrobněji se touto problematikou zabírají následující kapitoly.



**Obř. 1-6** Vztahy mezi součástmi buněčné stěny *S. cerevisiae*. **(A)** Základní jednotka s jednotlivými komponentami. Mannoprotein je obarven modře, oligosacharidy jsou zakresleny žlutě. Zobrazeno je pouze několik větvičích bodů glukanů. Chitin se může vázat také na  $\beta$ -1,6-glukan. **(B)** Spojení základních jednotek tvoří buněčnou stěnu. Význam barev je totožný s částí (A).  $\beta$ -1,3-glukanové řetězce jsou spleteny do trojitých šroubovic a chitin je zachycen jako krystalová mikrodoména. Spojení mannoproteinů disulfidickými a jinými vazbami není vyznačeno. Převzato a upraveno z (35).

### 1.3.1.1. Syntéza chitinu a její inhibitory

Chitin, dlouhý přímý homopolymer *N*-acetylglukosaminových reziduí (GlcNAc) spojených  $\beta$ -1,4 vazbami, je minoritní, ale strukturně velice důležitou součástí buněčné stěny. Chitin tvoří pouze 1 – 2 % sušiny buněčné stěny kvasinek, kdežto u vláknitých hub, jako je *Aspergillus*, činí jeho podíl 10 – 20 % (29). Množství chitinu v buněčné stěně kolísá u patogenní dimorfní kvasinky *C. albicans* od méně než 1 % v kvasinkové formě, kde je primárně lokalizován v místě septa a jizvách po pučení, až po 10 – 20 % v myceliové formě (33). Chitin výrazně přispívá k celkové pevnosti buněčné stěny, jakmile je narušena jeho syntéza, přestává být buňka osmoticky stabilní (29).

Chitin je syntetizován na vnitřním povrchu plazmatické membrány, bezprostředně po syntéze procházejí jeho mikrovlákna skrze plazmatickou membránu do extracelulárního prostoru, kde v těsné blízkosti membrány krystalizují jako  $\alpha$ -chitin. Polymerizace GlcNAc je katalyzována chitinovými syntetázami, integrálními membránovými enzymy, ze substrátu UDP-*N*-acetylglukosaminu (34). V *S. cerevisiae* existují tři chitinové syntetázy, Chs1p, Chs2p a Chs3p (36). Chs1p je neesenciální opravný enzym (37), Chs2p je zapojena v tvorbě primárního septa u dělících se buněk a Chs3p syntetizuje přibližně 80 – 90 % veškerého chitinu v buněčné stěně, včetně chitinového prstence během pučení (36). Současná delece všech tří genů *CHS1* – 3 je letální (29).

Syntéza chitinu je úzce spjata s buněčným cyklem kvasinek. Místo budoucího pučení je na konci  $G_1$  fáze buněčného cyklu označeno chitinovým prstencem, jenž je dílem Chs3p a určuje průměr krčku mezi mateřskou buňkou a pupenem. Buněčná stěna se v místě pupenu zeslabí a vznikne maličký pupen, který postupně roste ( $S$ ,  $G_2$  fáze). V okamžiku zformování primárního septa Chs2p syntetázou se stává pupen nezávislý na



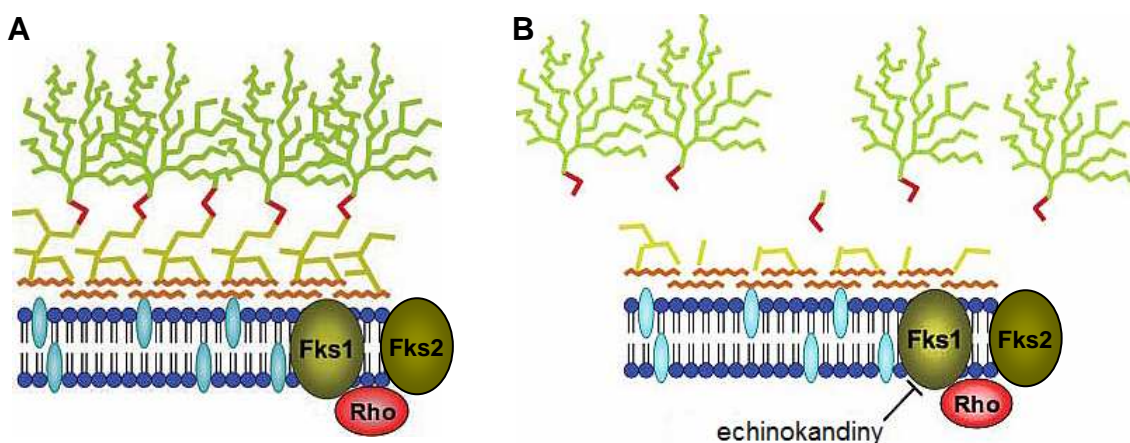
mateřské buňce (závěr mitózy), primární septum překryje z obou stran sekundární septum a následně chitináza z dceřiné buňky rozpustí primární septum a spolu s ostatními degradačními enzymy umožní dceřiné buňce opustit mateřskou buňku, na níž zanechá jizvu po pučení, a na dceřiné buňce mnohem méně viditelnou jizvu zrodu (30).

Nejznámějšími inhibitory chitinové syntézy jsou nikkomyciny (nikkomycin X, nikkomycin Z) a polyoxiny (polyoxin D), nukleosid-peptidová antibiotika produkovaná bakteriemi rodu *Streptomyces*, a jejich syntetické deriváty. Nikkomyciny a polyoxiny působí jako analogy substrátu UDP-*N*-acetylglukosaminu a kompetitivně inhibují chitinsyntetázu, Chs1p a Chs3p kvasinky *S. cerevisiae* jsou citlivější k nikkomycinům než Chs2p (38,39). *Candida albicans* a jiné lékařsky významné kvasinky jsou však rezistentní vůči těmto antibiotikům, nejspíše kvůli jejich slabé prostupnosti do buněk skrz cytoplazmatické membrány (40,41), proto se často používají společně s jinými antimykotiky či jako fungicidy v zemědělství (29,42).

### 1.3.1.2. Inhibitory syntézy $\beta$ -1,3-glukanu

Glukany jsou hlavní součástí kvasinkové buněčné stěny. Dlouhá vlákna  $\beta$ -1,3-glukanu, svíjející se do trojšroubovic, jsou tvořena glukózovými rezidui spojenými  $\beta$ -1,3 vazbami. Místa jsou na tuto kostru z  $\beta$ -1,3-glukanu napojeny kratší postranní řetězce  $\beta$ -1,6-glukanu (32).

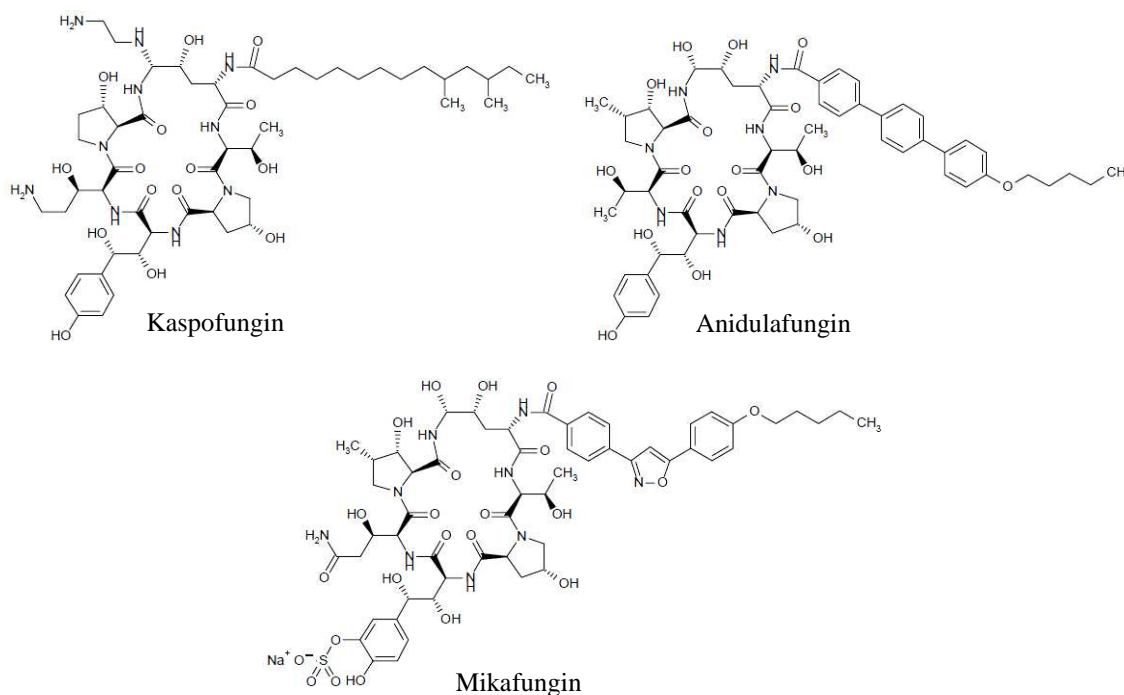
Podobně jako chitin je i  $\beta$ -1,3-glukan syntetizován enzymovým komplexem umístěným v plazmatické membráně.  $\beta$ -1,3-glukansyntetáza *S. cerevisiae* obsahuje dvě katalytické podjednotky, Fks1p a Fks2p, jež využívají UDP-glukózu jako substrát, a regulační GTPázový protein Rho1p (33,43,44) (obr. 1-7A). Pouze současné poškození obou genů *FKS1* a *FKS2* je pro buňku letální. *FKS* a *RHO1* geny si zachovávají vysoký stupeň identity mezi různými druhy hub (29).



**Obr. 1-7** Echinokandiny inhibují  $\beta$ -1,3-glukansyntetázu. (A) V plazmatické membráně jsou zasazeny katalytické podjednotky  $\beta$ -1,3-glukansyntetázy kódované geny *FKS1* a *FKS2* v *S. cerevisiae* a *FKS1* genem v *C. albicans*, *C. neoformans* a *A. fumigatus*. *RHO1* kóduje pozitivní regulátor aktivity enzymu. Chitin je zakreslen hnědě,  $\beta$ -1,3-glukan žlutozeleně,  $\beta$ -1,6-glukan červeně, mannoproteiny zeleně. (B) Echinokandiny inhibují činnost  $\beta$ -1,3-glukansyntetázy, výsledkem je ztráta integrity buněčné stěny. Význam barev je totožný s částí (A). Upraveno podle (45).

Vývoj specifických inhibitorů houbové  $\beta$ -1,3-glukansyntetázy patřících mezi akuleaciny, pneumokandiny, echinokandiny, papulakandiny či kyselé terpenoidy, u nichž byla tato schopnost v minulosti zaznamenána, byl dosud úspěšně završen klinickými zkouškami pouze v případě kaspofunginu, mikafunginu a anidulafunginu

(obr. 1-8). Tyto tři látky jsou nástupci cilofunginu odvozeného od echinokandinu B, jenž dosáhl v 80. letech 20. století dokonce druhé fáze klinických zkoušek, ale kvůli toxicitě byl zavržen. Zmiňovaná tři antibiotika schválená pro klinické používání jsou v podstatě chemicky upravené sekundární metabolity hub; kaspofungin je derivátem pneumokandinu B<sub>0</sub>, mikafungin a anidulafungin jsou odvozeny od echinokandinu B (46). Tyto inhibitory glukonové syntézy nekompetitivně inhibují činnost  $\beta$ -1,3-glukansyntetázy svou vazbou na Fks1p (obr. 1-7B), výsledkem je buněčná lyze (29,47), mají však také sekundární efekty na jiné části buněk včetně redukce obsahu ergosterolu a lanosterolu v plazmatické membráně a zvýšení množství chitinu v buněčné stěně (11). Využívají se zejména při léčbě aspergilózy a kandidózy, např. účinnost kaspofunginu proti původcům těchto chorob je srovnatelná s amfotericinem B či s posakonazolem. Žádný z echinokandinů však není efektivní vůči *Cryptococcus neoformans* nebo *Trichosporon beigelii* kvůli relativně nízkému obsahu  $\beta$ -1,3-glukanu v jejich buněčných stěnách (7,48). Rezistence vůči echinokandinům zatím vzniká jen ojediněle, na vině jsou mutace ve *FKS1* genu (2,49), zřejmě nejsou tyto látky odstraňovány ani MDR pumpami patogenních organismů (47). Toxicita spojená s echinokandiny je vzácná, neboť jejich mechanismus účinku je specifický pro houbové buňky,  $\beta$ -1,3-glukan se totiž v savčích buňkách vůbec nenachází (50).



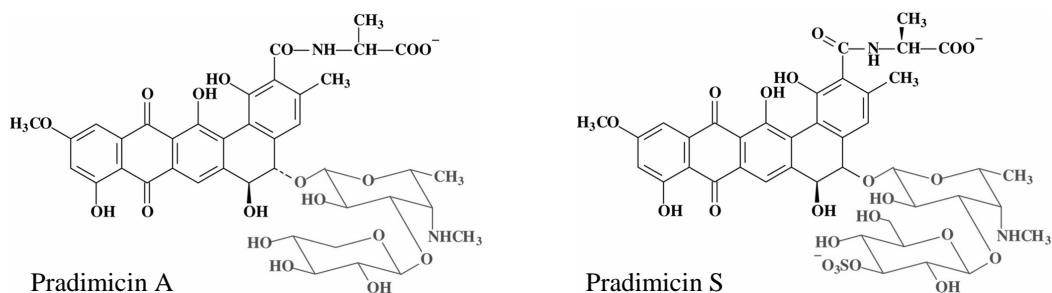
**Obr. 1-8**    Struktury klinicky používaných inhibitorů syntézy  $\beta$ -1,3-glukanu (46)

### 1.3.1.3. Mannoproteiny

Proteiny tvoří 30 – 50 % sušiny buněčné stěny kvasinek *S. cerevisiae* a *C. albicans*, u vláknitých hub dosahuje jejich podíl jen 20 – 30 %. Většinu proteinů buněčné stěny *S. cerevisiae* představují tzv. mannoproteiny, které jsou bohatě *N*- a *O*-glykosylovány sacharidovými řetězci mannanů. Mannoproteiny z nejkrajovějších částí buněčné stěny bývají kovalentně spojeny s  $\beta$ -1,3-glukanem. Některé proteiny buněčné stěny jsou navíc opatřeny glykosylfosfatidylozitolovou (GPI) kotvou, jež je poutá k plazmatické membráně (29).



Byť jsou mannoproteiny velice důležitou součástí buněčné stěny kvasinek, není pravděpodobné, že by mohla být jejich syntéza selektivně inhibována, protože proces syntézy glykosylovaných proteinů v kvasinkách se až příliš podobá syntéze v savčích buňkách (33). Samotné struktury mannoproteinů jsou však cílem benanomicinů (benanomicin A) a pradimicinů (pradimicin A, B, C, D, E, M, N, O, P, Q, S, FS, FB) (obr. 1-9), jež vytvářejí spolu s vápníkem nerozpustné komplexy s koncovou manózou oligosacharidů a mimoto narušují také plazmatickou membránu (33,51). Ač jsou tyto látky účinné proti kryptokokózám, kandidózám a aspergilózám, nejsou vhodné k léčbě systémových mykóz, poněvadž mají negativní vliv na funkci jater (29,48).



**Obr. 1-9** Strukturální vzorce dvou pradimicinů. Části molekul, kterými se vzájemně liší pradimiciny A, S a další deriváty, mají světlejší odstín.

V současné době se pátrá po specifických inhibitech několika dalších potenciálních zásahových míst v buněčné stěně. Nadějně se jeví např. nejruznější transferázy, jejichž úkolem je spojovat jednotlivé stavební kameny buněčné stěny dohromady přímo v extracelulárním prostoru. Velkou výhodou inhibitorů transferáz by byla skutečnost, že by nemusely procházet plazmatickou membránou, aby dosáhly svého cíle, a přesto by působily fatální škody na struktuře buněčné stěny (29).

### 1.3.2. Plazmatická membrána

Eukaryotické buňky jsou od okolního prostředí odděleny plazmatickou membránou, přibližně 7,5 nm silnou lipidickou dvojvrstvou, v níž jsou zasazeny proteiny, které zprostředkovávají transport živin, metabolitů a iontů přes membránu, enzymaticky katalyzují rozličné chemické reakce nebo slouží jako receptory, jež předávají signály o stavu okolí dovnitř buňky. Správné funkce membrány jsou závislé na její tekutosti, kterou určuje její lipidové složení. Hlavními lipidovými součástmi eukaryotických membrán jsou fosfolipidy, sfingolipidy a steroly (ergosterol v kvasinkách, cholesterol v buňkách savců). Syntéza lipidů v kvasinkách se velice podobá syntéze v savčích buňkách, přesto mezi nimi existují jisté rozdíly, které byly úspěšně využity při vývoji antimykotik.

Nejhojněji jsou v plazmatické membráně *S. cerevisiae* zastoupeny fosfolipidy fosfátidylcholin, fosfátidylinozitol, fosfátidyletanolamin a fosfátidylserin. Jediný známý rozdíl v biosyntéze kvasinkových a savčích fosfolipidů byl zaznamenán v syntéze fosfátidylserinu, která probíhá v kvasinkách z CDP-diacylglycerolu a v savčích buňkách z fosfátidyletanolaminu a serinu (52). Kdežto při syntéze sfingolipidů a především ergosterolu je zapotřebí hned několika enzymatických reakcí, které se nenalézají v biosyntetických drahách sfingolipidů a cholesterolu v savčích buňkách.

Sfingolipidy jsou esenciální součástí cytoplazmatické membrány jak v savčích, tak v kvasinkových buňkách. Rané kroky biosyntézy vedoucí k ceramidu, respektive

fytoceramidu v houbách, jsou společné pro oba typy organismů, proto jsou sice inhibitory těchto kroků (jako jsou sfingofunginy, lipoxamycin, myriocin, fumonisiny a australifunginy) schopné hubit široké spektrum hub, ale zároveň jsou toxické pro hostitele (52,53). Následující reakce jsou již specifické pro houby. Ceramid je přeměňován na inozitolfosforylceramid připojením inozitolfosfátu, tuto reakci katalyzuje fosfatidylinozitol:ceramid fosfoinozitol transferáza kódovaná genem *AUR1* v *S. cerevisiae*. Aureobasidiny (aureobasidin A, basifungin, aj.), khafrefungin a rustmicin inhibují činnost tohoto enzymu s fungicidními následky u řady patogenů (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatididis* a některých druhů *Aspergillus*) (48,52,53).

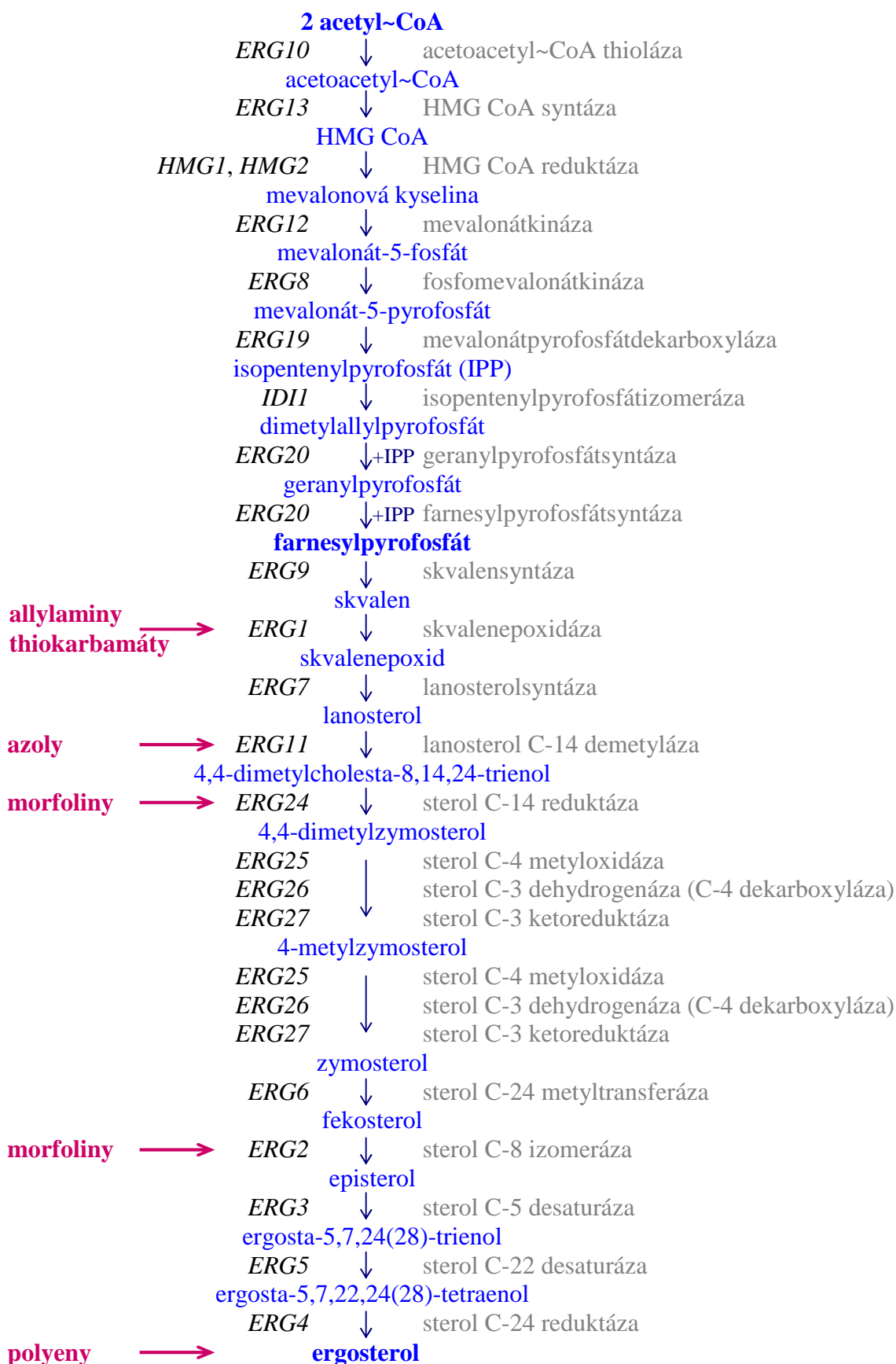
Největší úsilí při vývoji nových antimykotických léčiv bylo vynaloženo na studium syntézy sterolů, jež jsou důležitými regulátory membránové permeability a fluidity. Steroly jsou esenciální součástí všech eukaryotických membrán, ergosterol se strukturně odlišuje od svého živočišného protějšku, cholesterolu, i hlavních rostlinných sterolů, sitosterolu a stigmasterolu. Obecným rysem všech těchto sterolů je přítomnost hydroxylové skupiny na C-3, ztělesňující jedinou hydrofilní část molekuly, díky níž mohou steroly zaujmout patřičnou orientaci v membráně. Modifikace membránových sterolů v kvasinkách mají dalekosáhlé následky, mimo jiné ovlivňují aktivitu membránově vázaných ATPáz (52).

Biosyntetická dráha ergosterolu a její koncový produkt jsou cíli většiny současných antimykotik, a to jak zemědělských fungicidů, tak léčiv. Polyeny (nystatin, amfotericin B, aj.), se váží přímo na molekuly ergosterolu v plazmatické membráně, ostatní sloučeniny, včetně azolů, allylaminů a morfolinů, inhibují specifické kroky v dráze biosyntézy ergosterolu.

Ergosterolová biosyntéza se skládá z více než dvaceti reakcí (obr. 1-10), začíná syntézou acetoacetyl-CoA ze dvou molekul acetyl-CoA, první část dráhy končí vznikem farnesylypyrofosfátu, ústředního meziprojektu, který je výchozí surovinou několika esenciálních drah. Navíc jsou farnesylové a příbuzné geranylové a geranylgeranylové jednotky nezbytné pro post-translační modifikace proteinů, které potřebují hydrofobní membránové kotvy pro správné umístění a funkci. Z těchto důvodů jsou mutace v tomto úseku dráhy letální.

Taktéž mutace v druhé polovině dráhy jsou letální, není-li vzniklý meziprojekt schopen funkčně nahradit ergosterol. Jelikož se kvasinky bez sterolů neobejdou, jsou první tři kroky vedoucí k syntéze lanosterolu esenciální, neboť se až do tohoto okamžiku nevytvořila žádná sterolová molekula. Je třeba podotknout, že inhibice syntézy na libovolném místě této části dráhy, nezabrání dalším enzymům v upravování nevhodně pozměněných substrátů, výsledkem zablokování některého kroku je tudíž nahromadění několika sterolových struktur, které nejsou přirozenými meziprojekty dráhy a dokonce mohou být pro buňky toxické (52). Na tomto principu je založen i mechanismus účinku azolů, ty sice inhibují činnost enzymu Erg11p, ale teprve Erg3p přetvoří onen meziprojekt v toxický sterol. Chybějící či nefunkční desaturáza (Erg3p) je tudíž jednou z příčin rezistence patogenních hub vůči azolům (45).

Poslední dva enzymy dráhy (obr. 1-10), Erg5p a Erg4p, vytvářejí steroly, které jsou strukturně velice blízké konečnému ergosterolu a kvasinky bez problémů snášejí jejich zařazení do plazmatické membrány. Enzymy kódované geny *ERG5* a *ERG4* tedy nejsou vhodné pro vývoj nových antimykotik, naopak slibně se v tomto ohledu jeví Erg6p, jenž se nenachází v dráze syntézy cholesterolu.

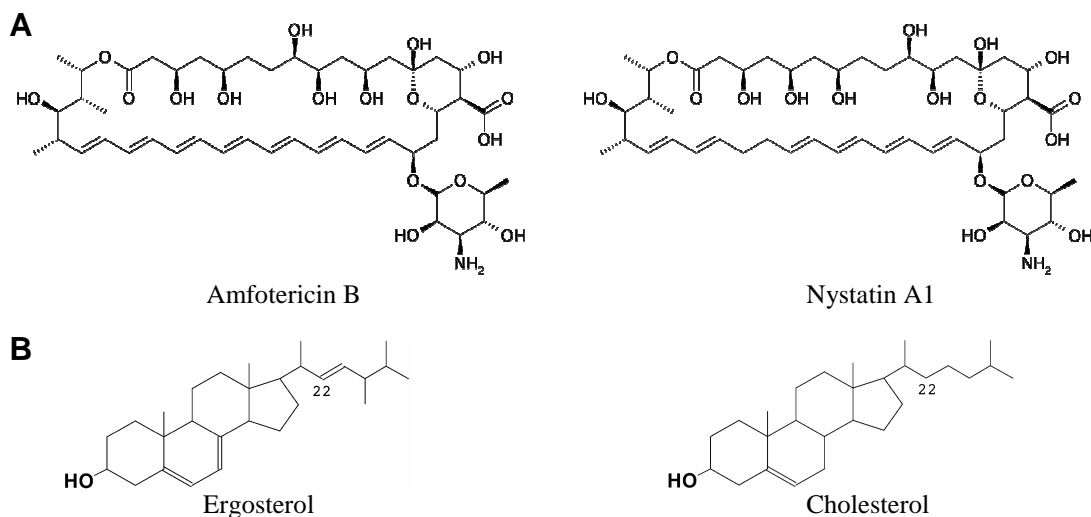


**Obr. 1-10** Dráha biosyntézy ergosterolu *Saccharomyces cerevisiae*. Antimykotika inhibují různé enzymy (šedě) zapojené do syntézy ergosterolu. Produkty jednotlivých reakcí jsou vyznačeny modře, reakce jsou katalyzovány enzymy kódovanými příslušnými geny (černé) (9,52,54).

### 1.3.2.1. Polyeny

Polyenová antibiotika (amfotericin B, nystatin, kandacidin, natamycin (pimaricin), metylpartricin a trichomycin), produkovaná druhy *Streptomyces*, jsou fungicidní a vysoce účinná v hubení nejširšího spektra druhů patogenních kvasinek a vláknitých hub ze všech klinicky používaných antifungálních látek. Uplatňují se v léčbě vážných systémových infekcí i rozličných povrchových mykóz. Leč tato efektivnost nystatinu a amfotericinu B je vykoupena vážnými vedlejšími účinky (chronickými i akutními), jež se vyskytují dokonce i při mírných terapeutických dávkách. Tyto vedlejší efekty souvisejí se vzájemnou podobností buněk patogenu a hostitele, která představuje limitující faktor obzvláště v léčbě systémových mykóz.

Polyeny tvoří komplex s ergosterolem (pór) v plazmatické membráně, zvyšují permeabilitu membrány a způsobují tak vytékání vnitrobuněčného obsahu (iontů, zejména  $K^+$ , a malých molekul) a následně buněčnou smrt (55). Předpokládá se, že k jejich fungicidní aktivitě přispívá také oxidační poškození buněk (56). Klinicky užitečné polyeny (obr. 1-11) mají vyšší afinitu k ergosterolu než k jeho savčímu protějšku, cholesterolu, a jsou proto méně toxické pro savčí buňky (57).



**Obr. 1-11** (A) Struktury některých klinicky používaných polyenů. (B) Struktury sterolů s označením vazby, která má vliv na interakci polyenů se steroly.

**Amfotericin B** je antibiotikum izolované z aktinomycet *Streptomyces nodosus*. Z dvou set známých polyenů je amfotericin B jediný, jehož toxicita je dostatečně omezená, aby jej bylo možné podávat intravenózně. Amfotericin B, doposud považovaný za „zlatý standard“ v léčbě většiny vážných invazních houbových infekcí, má široké spektrum účinku.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Spektrum amfotericinu B pokrývá většinu kvasinek zodpovědných za lidské infekce (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon beigeli*) a plísni (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium marneffei*, *Fusarium* spp., *Bipolaris* spp., *Cladophialophora* spp., *Exophiala* spp., Zygomycetes (*Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mucor* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus* spp., *Saksenaia vasiformis*)) (58).

Rezistence vůči amfotericinu B je poměrně vzácná ( $MIC > 2 \text{ mg/l}$ )<sup>1</sup>, nejčastěji bývá způsobena změnou struktury membránových lipidů, zejména sterolů (59) řídčejí pak fosfolipidů, nebo snížením obsahu ergosterolu v membráně (60), dále se může uplatnit zvýšená katalázová aktivita se sníženou citlivostí k oxidačnímu poškození (61).<sup>2</sup>

Spíše než rezistence byla vždy hlavním faktorem omezujícím používání amfotericinu B, vedle špatné rozpustnosti ve vodě, jeho nefrotoxicita<sup>3</sup>, jež vzniká v 24 – 80 % léčení. Předpokládá se, že příčinou je zúžení ledvinových cév indukované amfotericinem B (63).

Ve snaze zlepšit terapeutické vlastnosti amfotericinu B byly vyvinuty nové lipidové preparáty (tabulka 1-4), které jsou méně toxické než micelární deoxycholátová suspenze amfotericinu B (Fungizone) a dovolují tudíž vyšší dávkování a efektivnější léčbu (56,63,65-70). Tyto různé lipidové preparáty amfotericinu B se liší ve svých farmakokinetických profilech. Podstatně nižší toxicita AmBisomu ve srovnání s ostatními preparáty dovoluje jeho nasazení u zvířat s normální i s potlačenou imunitou při léčbě vážných systémových infekcí (70), a to jak intracelulárních (leishmanióza a histoplazmóza), tak extracelulárních (kandidóza a aspergilóza) (71).

Tabulka 1-4: Nejznámější preparáty amfotericinu B (AMB) a nystatinu vhodné pro intravenózní podávání polyenů a jejich střední jednorázové smrtelné dávky ( $LD_{50}$ ) pro myši (56,63,65,66,68-70)

Název	Složení (molární poměr složek)	Částice	$LD_{50}$ [mg/kg]
Fungizone	AMB, detergent deoxycholát sodný, pufr	koloidní disperze v roztoku glukózy	3
Amphotec (USA), Amphocil (Evropa)	AMB, cholesteryl sulfát (1:1), molekuly AMB vsunuty mezi 2 vrstvy cholesteryl sulfátu	koloidní diskovité struktury o průměru 120 – 140 nm, 4 nm silné	36
Abelcet	AMB, dimyristoylfosfátidylcholin, dimyristoylfosfátidylglycerol (5:7:3)	stužky 1,6 – 6 $\mu\text{m}$	> 40
AmBisome	AMB, hydrogenovaný sojový fosfátidylcholin, cholesterol, distearoylfosfátidylglycerol (2:10:5:4)	unilamelární liposom 80 nm	> 175
Anfogen	stejné chemické složení jako AmBisome	větší částice než AmBisome	17
Nyotran	nystatin A1, dimyristoylfosfátidylcholin, dimyristoylfosfátidylglycerol (1:7:3)	multilamelární liposom 0,1 – 3 $\mu\text{m}$	

Jako přenašeče amfotericinu B byly testovány i detergenty Triton X-100 a lauryl ester sacharózy, které umožňují tvorbu komplexů amfotericinu B s ergosterolem, ale nikoli s cholesterolem. Tento ester snižuje toxicitu amfotericinu B pro savčí buňky až

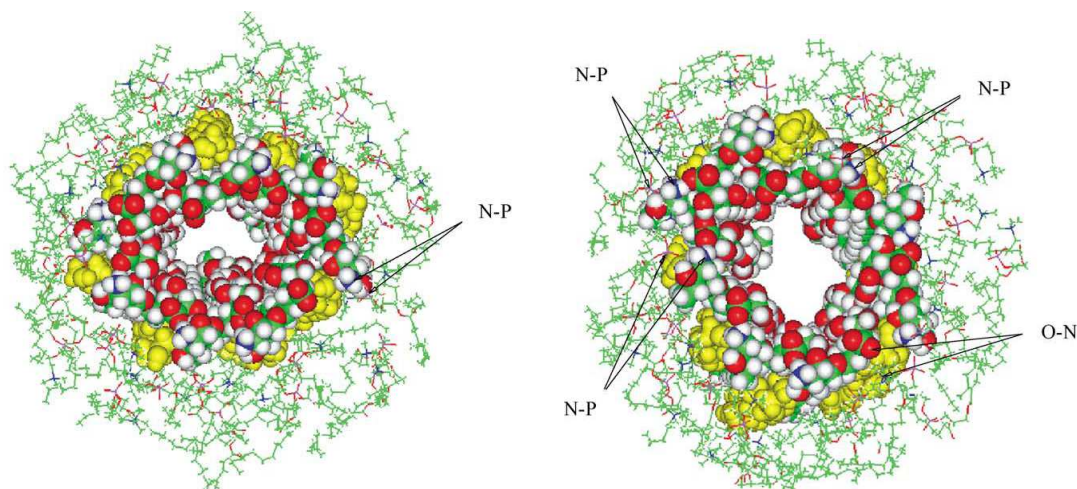
<sup>1</sup> MIC = minimální inhibiční koncentrace

<sup>2</sup> Roste počet případů rezistence vůči amfotericinu B u druhů *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* a *C. krusei*) (60), rezistence byla zaznamenána u *Trichosporon beigelii* (62), *Malassezia furfur*, taktéž u *Scedosporium apiospermum* a *S. prolificans*, stejně jako u *Fusarium* spp. a některých kmenů *Sporothrix schenckii* (58,63). Přesto amfotericin B a tetraenový polyen natamycin inhibují růst druhů *Fusarium* mnohem lépe než mikonazol či itraconazol a zcela neúčinný flucytosin (64).

<sup>3</sup> nefrotoxicita = poškození ledvin

1000× více než pro buňky hub a jeho toxicita pro myši je výrazně nižší ve srovnání s Fungizonem (56).

Amfotericin B se může vázat k ergosterolu či cholesterolu dvěma způsoby. Na tvorbě vodíkových vazeb se podílí hydroxylové skupiny sterolů a aminová skupina aminocukru (56,72). Molekulárně dynamické simulace dokazují, že tato interakce je silnější v případě ergosterolu (73). Druhý typ interakce, postihující rigidní řetězec sedmi konjugovaných dvojných vazeb amfotericinu B a celou sterolovou molekulu, je zajišťován nespécifickými van der Waalovými silami. Konformační analýzy ukazují, že většina ergosterolových konformerů má rovný válcovitý tvar, který dovoluje těsnější kontakt mezi polyeny a ergosterolem, na rozdíl od cholesterolu, jehož postranní řetězec bez dvojných vazeb na C-22 je flexibilnější a propůjčuje tak molekule cholesterolu esovitý tvar. Van der Waalovy síly jsou rozhodující pro silnější afinitu amfotericinu B k ergosterolu, jehož konformace je neobyčejně příhodná pro tento druh interakce (56).



**Obr. 1-12** Molekulárně dynamická simulace membránového póru amfotericinu B s cholesterolem (vlevo) a s ergosterolem (vpravo). Molekuly amfotericinu B a sterolů jsou znázorněny jako kuličky, molekuly dimyristoylglycerofosfátidylcholinů pak jako tyčinky. Sterolové molekuly jsou žluté. Černé šipky ukazují vypočtené interakce amfotericinu B a lipidů v případě, že je vzdálenost mezi dusíkem amfotericinu B (modře) a fosforem lipidu (růžově) nebo mezi aminovým dusíkem lipidu (modře) a kyslíkem karboxylové skupiny amfotericinu B (červeně) menší než 4 Å (73).

Zdá se, že přítomnost druhé dvojných vazeb v steroidovém jádře nemá vliv na interakci sterolů s polyeny. Naopak jako dominantní faktor se jeví struktura alkylového řetězce. Přítomnost dvojných vazeb v pozici C-22 a absence objemného substituentu má klíčový význam pro kanálovou propustnost (72).

Osm molekul amfotericinu B spolu s osmi molekulami sterolů vytváří v plazmatické membráně pór o průměru 7 – 10 Å. Hydrofilní vnitřek kanálu je lemován hydroxylovými skupinami polyenu, zatímco řetězec hydrofobních konjugovaných dvojných vazeb amfotericinu B lne ke sterolům a lipidům v membráně. Ergosterolový kanál je stabilnější a poněkud širší než cholesterolový (obr. 1-12), proto je i jeho iontová vodivost větší (73).

**Nystatin**, syntetizovaný *Streptomyces noursei*, byl prvním antifungálním polyenovým antibiotikem objeveným na počátku 50. let 20. století, obsahuje tři biologicky aktivní složky, A1, A2 a A3. Nystatin je strukturně velice podobný amfotericinu B (obr. 1-11). Karboxylové skupiny a aminoskupiny amfotericinu B a nystatinu jsou v totožném postavení, a lze tudíž předpokládat, že vodíkové vazby sterolů s nystatinem jsou stejně silné jako s amfotericinem B. Oproti tomu byla zjištěna

slabší nespecifická vazba sterolů a nystatinu majícího řetězec tvořený čtyřmi a dvěma dvojitými vazbami než vazba amfotericinu B s řetězcem sedmi konjugovaných dvojných vazeb, a navíc, že tato snížená schopnost nespecifické vazby se steroly narušuje více interakci s cholesterolem v savčích buňkách než s ergosterolem v membránách hub (56). Tato snížená cytotoxicita vysvětluje menší ledvinovou toxicitu nystatinu (66).

Studiem interakce nystatinu s fosfolipidovými váčky bylo zjištěno, že nystatin tvoří agregáty (kanál) z  $8 \pm 2$  molekul (74,75). Nystatin projevuje svou antibiotickou aktivitu dvoustupňovým mechanismem: při nízkých koncentracích, povrchově-adsorbované monomerní molekuly antibiotika rozrušují lipidový obal, mění permeabilitu na ergosterol bohatých liposomů. Po dosažení kritického prahu, mechanismus účinku nystatinu přechází na klasický model tvorby transmembránových vodních kanálů (75).

Obdobně jako amfotericin B má nystatin silnou a širokospektrální fungicidní aktivitu, uplatňuje se zejména v terapii povrchových mykóz kůže a sliznic. Problémy s jeho rozpustností a toxicitou dosud bránily jeho využití v systémové léčbě invazních houbových infekcí. V nedávné době byl však zahájen klinický vývoj multilamelárního liposomálního preparátu Nyotran (tabulka 1-4), který je méně toxický pro savčí buňky, ale zachovává si antifungální aktivitu samotného nystatinu (66).

Amfotericin B vyvolává velmi podobnou (76 %) expresi genů v kvasinkových buňkách jako nystatin (76). Navzdory této i strukturní podobnosti obou látek byly izolovány kmeny kvasinek, u nichž byla rezistence vůči nystatinu spojena se změnou v zastoupení sterolů v membráně, zatímco rezistence k amfotericinu B souvisela s modifikací buněčné stěny (77).

### 1.3.2.2. Azolové deriváty

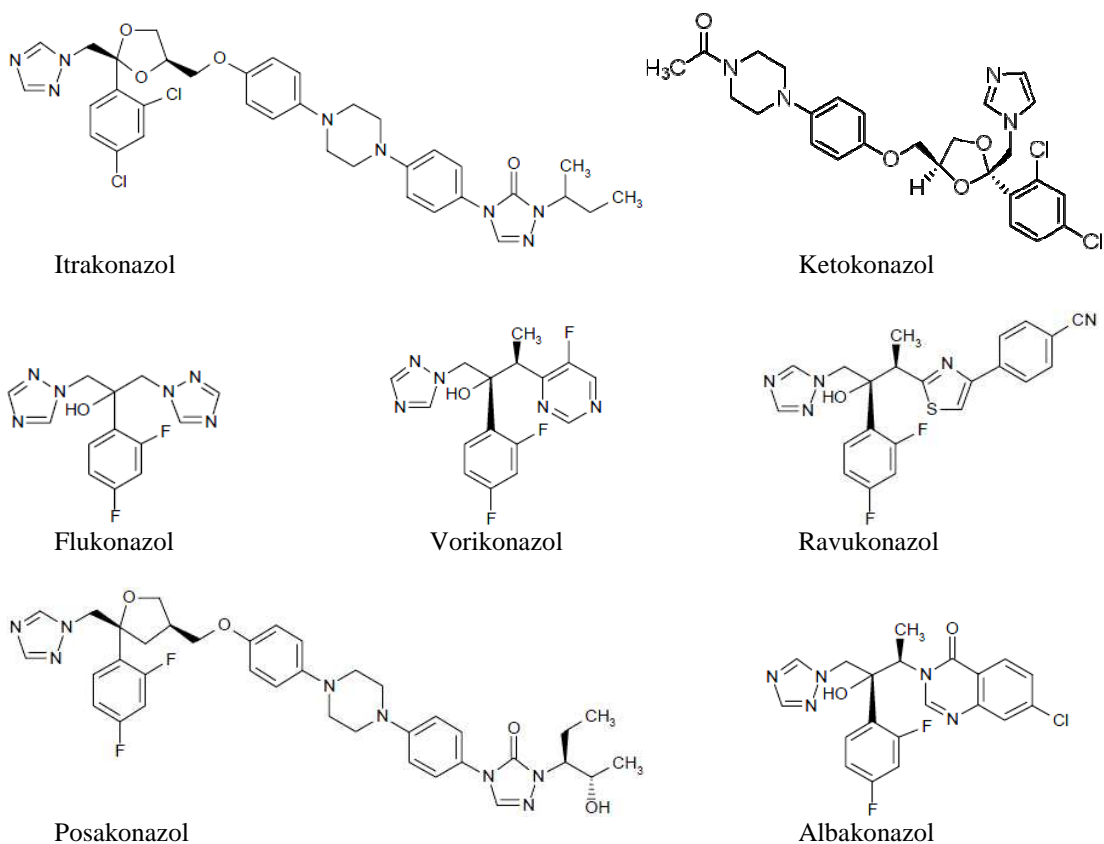
První klinicky užitečné azolové deriváty (klotrimazol, mikonazol a ekonazol) byly syntetizovány roku 1969, od té doby jsou azoly nejrychleji se rozšiřující skupinou antifungálních látek (78). Rozdělují se na imidazoly (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol, ekonazol, oxikonazol, flutrimazol, fentikonazol) a triazoly (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) podle toho, zda obsahují dva nebo tři dusíkové atomy v pětičlenném azolovém kruhu (obr. 1-13). Azolová antimykotika mají fungistatickou širokospektrální aktivitu, která zahrnuje většinu kvasinek a vláknitých hub. Inhibují biosyntézu ergosterolu na úrovni C-14 demetylase, tuto reakci katalyzuje enzym cytochrom P450 dependentní lanosterol C-14 demetyláza (P450<sub>DM</sub>) kódovaná genem *ERG11* (obr. 1-10). Azolová antimykotika se váží prostřednictvím dusíkového atomu v imidazolovém nebo triazolovém kruhu na atom železa v hemu, který je umístěn v aktivním místě tohoto enzymu (79). Zbytek azolové molekuly interaguje osobitým způsobem s apoproteinem. Přesný tvar aktivního místa se liší jak mezi jednotlivými druhy hub, tak mezi mnoha savčími P450 enzymy. Tudíž charakter interakce azolové molekuly s různými typy P450 enzymů určuje rozsah inhibičního účinku daného azolu u různých druhů patogenních hub, ale i toxicitu pro hostitele, neboť obdobné P450 enzymy katalyzují syntézu cholesterolu v játrech savců (46,47). Interakce imidazolů s houbovými a se savčími enzymy P450 je méně specifická v porovnání s triazolami, proto je používání imidazolů omezeno na léčbu povrchových mykóz (50) a k léčbě invazivních systémových mykóz se využívají triazoly jako je flukonazol, itrakonazol, vorikonazol nebo posakonazol (2).

U některých druhů hub azoly inhibují vedle aktivity Erg11p také činnost sterol C-22 desaturázy (Erg5p; obr. 1-10), poněvadž i tento enzym obsahuje cytochrom P450



(80). Výsledkem inhibice lanosterol C-14 demetylázy je nedostatek ergosterolu, nahromadění lanosterolu a jiných 14-metylovaných sterolů v plazmatické membráně (obr. 1-14). Tyto nepřírozené, ba některé i toxické, steroly nejsou schopny plně funkčně nahradit chybějící ergosterol; narušená plazmatická membrána je náchylnější k dalšímu poškození a pozměněná fluidita membrány negativně ovlivňuje aktivitu některých životně důležitých membránově vázaných enzymů včetně těch, co syntetizují komponenty buněčné stěny (52).

Ze tří nových klinicky používaných triazolů se posakonazol velice podobá itrakonazolu, zatímco vorikonazol a ravukonazol jsou blízkými příbuznými flukonazolu (obr. 1-13). Ač se zdají být strukturální rozdíly mezi deriváty malé, právě ony určují antifungální účinek a šíři spektra, míru lékové interakce se současně podávanými léčivými či toxický potenciál (47). Např. závažné lékové interakce doprovázejí až 95 % případů, kdy jsou pacienti léčeni kombinací azolů s dalšími léčivými, důsledkem těchto interakcí bývá buď selhání terapie, nebo naopak vystupňování nežádoucích účinků léčiv (81).

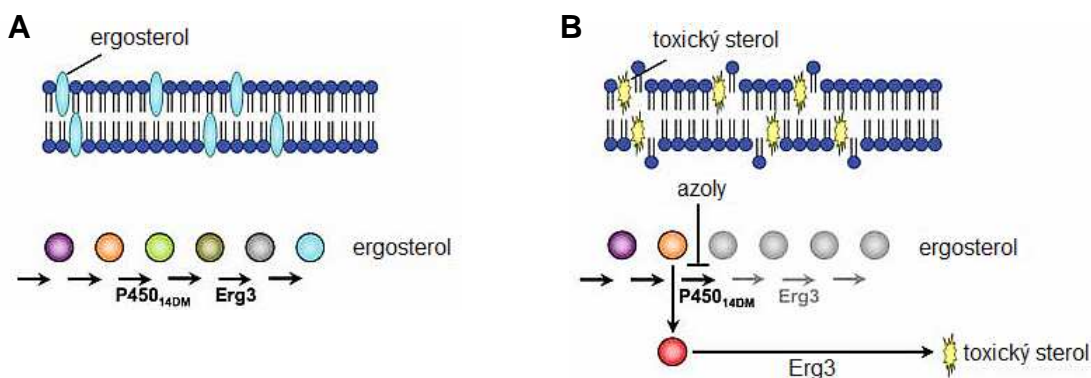


**Obr. 1-13** Struktury klinicky používaných azolových derivátů (46)

Jedním z důvodů neustálého syntetizování nových azolových derivátů je kromě snahy o vylepšení jejich farmakologických parametrů i poměrně rychlý vznik rezistence vůči stávajícím azolovým antimykotikům. Pouhých pět let po zavedení flukonazolu bylo z infikovaných pacientů izolováno překvapivě velké množství rezistentních kmenů rodu *Candida* ( $MIC \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ) (2,33). Druhá širokospektrálnější generace triazolů je aktivní i proti kvasinkám rodu *Candida* rezistentním vůči flukonazolu, mimo to vorikonazol a posakonazol inhibují růst *C. neoformans* a také plísní *Aspergillus*, *Scedosporium* a *Fusarium* (50). Křížová rezistence mezi flukonazolem a širokospektrálními triazolami (vorikonazol, posakonazol, itrakonazol) je spojena s nárůstem exprese genů MDR pump (2).



U některých patogenů byly zaznamenány různé kombinace mechanismů rezistence vůči azolovým derivátům (viz kapitola 1.2.). Rezistence kvasinek *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* vzniká nejčastěji kvůli nedostatečné koncentraci léčiva uvnitř buňky v důsledku snížené propustnosti membrány pro azolové molekuly, nebo díky aktivnímu odstraňování azolů MDR pumpami z buněk (49) (až 85 % klinicky izolovaných a vůči flukonazolu rezistentních kmenů *C. albicans* vykazuje mnohačetnou lékovou rezistenci způsobenou nadprodukcí ABC proteinů Cdr1p a Cdr2p a MFS transportéru Mdr1p (3)). V hojné míře se při vzniku rezistence k azolům uplatňují mutace v dráze biosyntézy ergosterolu, konkrétně mutace v *ERG11*, jejichž výsledkem je snížená afinita enzymu k azolům, ale přetrvávající schopnost katalyzovat demetylacii, nebo nadprodukce cílového enzymu, popřípadě kompenzační mutace v *ERG3*, které zabrání nahromadění toxických sterolů v plazmatické membráně (11,49,53,82-84).



**Obr. 1-14** Mechanismus působení azolových derivátů. (A) Plazmatická membrána hub a schematické znázornění biosyntézy ergosterolu, která probíhá v endoplazmatickém retikulu. (B) Azolové deriváty inhibují cytochrom P450<sub>14DM</sub> (taktéž známý jako lanosterol 14 $\alpha$ -demethyláza; kódovaný *ERG11* genem v *C. albicans* a *C. neoformans*), takto blokují produkci ergosterolu a způsobují nahromadění toxického sterolového intermediátu v membráně. Převzato a upraveno z (45).

### 1.3.2.3. Allylaminy, thiokarbamáty a morfoliny

Azolové deriváty jsou v současné době nejpočetnější, ale zdaleka ne jedinou skupinou antimykotik, jež specificky inhibují některý z kroků biosyntézy ergosterolu. Allylaminy (naftifin, terbinafin) a thiokarbamáty (tolnaftát, tolciplát) inhibují tuto dráhu dokonce ještě v ranější fázi než azoly (viz obr. 1-10). Jejich fungicidní účinek spočívá v nekompetitivní inhibici skvalenepoxidázy (Erg1p), následné nahromadění skvalenu v membráně vede k výrazné změně jejích vlastností a narušení některých životně důležitých funkcí (85). Benzylaminový derivát butenafin má podobný mechanismus účinku jako allylaminy, vedle toho je při vyšších koncentracích schopný i přímého poškození buněčné membrány (86). Mutace v *ERG1* genu popřípadě jeho zvýšená exprese vedou k rezistenci vůči těmto látkám (46,49). Naftifin, terbinafin a butenafin se používají především v dermatologii proti dermatofytům. Terbinafin lze využít k léčbě dermatofytů i v případě, že je nutná systémová terapie (50). Thiokarbamáty patří dnes k už překonaným antimykotikům proti dermatofytům, nedosahují totiž takových výsledků jako azoly (4).

Jediným zástupcem morfolinů v lidské medicíně je amorolfin, ostatní morfoliny (fenpropimorf, tridemorf, aj.) našly své využití v zemědělství jako fungicidy (87). Morfoliny inhibují dva kroky, Erg24p a Erg2p, v syntéze ergosterolu, které následují až po reakci, jež je terčem azolů (viz obr. 1-10). Výsledkem jejich fungistatického působení je nahromadění ignosterolu v plazmatické membráně a změna vlastností membrány (87). Amorolfin se používá při léčbě kožních a slizničních infekcí

vyvolaných dermatofyty a kvasinkami. Rezistence vůči amorolfinu nebyla u lidských patogenů zaznamenána, toxicita morfolinů však zabraňuje jejich systematickému použití (4,47,51).

#### 1.3.2.4. $H^+$ -ATPáza

Plazmatická  $H^+$ -ATPáza je nový nadějný cíl antifungálních léčiv.  $H^+$ -ATPáza patří do rodiny ATPáz P-typu, jejichž charakteristickým znakem je schopnost tvořit  $\beta$ -aspartylfosfátový intermediát během katalytického cyklu, při němž přenášejí kationty proti jejich elektrochemickému gradientu používající ATP jako zdroj energie. Rodina P-ATPáz obsahuje širokou paletu kationtových pump např. bakteriální  $K^+$ -,  $Cd^{2+}$ - a  $Cu^{2+}$ -ATPázy,  $Ca^{2+}$ -ATPázy ze živočišných, houbových a rostlinných buněk, a živočišné  $Na^+,K^+$ - a  $H^+,K^+$ -ATPázy. Bylo sekvenováno na 200 genů kódujících P-ATPázy. U všech eukaryotických P-ATPáz se předpokládá shodná sekundární struktura s dvěma velkými hydrofilními doménami a deseti transmembránovými segmenty (88).

$H^+$ -ATPáza v plazmatické membráně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je velice důležitá pro fungování různých buněčných systémů: pumpováním protonů ven z buňky nejen reguluje vnitrobuněčné pH, ale také vytváří elektrochemický protonový gradient, který je nezbytný pro příjem živin sekundárním aktivním transportem (88). Jako ostatní členové  $P_2$  podrodiny je kvasinková  $H^+$ -ATPáza (100 kDa, 918 aminokyselin) ukotvená v lipidové dvojvrstvě deseti transmembránovými helixy, které tvoří cestu pro transport iontů (89), do cytoplazmy pak zasahuje její malá a velká smyčka (obr. 1-15).  $H^+$ -ATPáza kvasinek a jiných hub neobsahuje glykosylovanou  $\beta$ -podjednotku nacházející se v savčích  $Na^+,K^+$ - a  $H^+,K^+$ -ATPázách. Dva malé proteolipidy, Pmp1p a Pmp2p, izolované spolu se 100 kDa katalytickým polypeptidem hrají pravděpodobně regulační roli (90). Aktivita  $H^+$ -ATPázy je silně regulována s ohledem na esenciální roli enzymu a na skutečnost, že jako nejhojnější protein v plazmatické membráně spotřebuje až 20 % buněčného ATP (88,89).

Ačkoliv má *S. cerevisiae* dva geny, *PMA1* a *PMA2*, kódující z 89 % identické plazmatické  $H^+$ -ATPázy, které jsou funkčně zaměnitelné, je pouze gen *PMA1* esenciální pro životaschopnost a růst buněk. Proto buňky s jakoukoliv mutací, která redukuje aktivitu Pma1p  $H^+$ -ATPázy pod cca 20 %, nejsou schopné růstu (90). Gen *PMA2* je za normálních růstových podmínek exprimován na třístokrát nižší úrovni než *PMA1*. Výrazné zvýšení transkripce *PMA2*, přestože zdaleka nedosahuje transkripce *PMA1*, je pozorováno pouze během přechodu z post-diauxické do stacionární fáze růstu, kdy buňky trpí nedostatkem zdrojů uhlíku (91).

Nepostradatelnost Pma1  $H^+$ -ATPázy pro život kvasinek ji činí ideálním cílem antimykotik. Iontové pumpy z rodiny ATPáz P-typu jsou již terčí klinicky používaných léků, např. srdečních glykosidů a protivředových léků, které blokují  $Na^+,K^+$ -ATPázu, respektive žaludeční  $H^+,K^+$ -ATPázu. Tyto vysoce enzymově specifické látky interagují s extracelulárním povrchem svého cílového enzymu. Specificita a mechanismus účinku těchto dobře zavedených terapeutik svědčí o možnosti vyvinout podobné typy inhibitorů houbové  $H^+$ -ATPázy. Specifické inhibitory  $H^+$ -ATPázy schopné působit z vnější strany buňky by byly velice cennými antifungálními látkami především kvůli závažnému klinickému problému lékové rezistence způsobené MDR pumpami, jako je Cdr1p. Extracelulárně směřované látky neprocházejí skrz buněčnou membránu, a proto se nemohou stát ani substráty těchto pump. Vysoký stupeň sekvenční podobnosti mezi různými houbovými *PMA* geny naznačuje, že by takovýto inhibitor mohl mít širokospektrální účinek. Naopak relativně nízká identita (< 30 %) mezi houbovými

*PMA* geny a jejich savčími protějšky dává naději, že by nalezené látky mohly rozpoznat dva typy příbuzných enzymů (92-94).

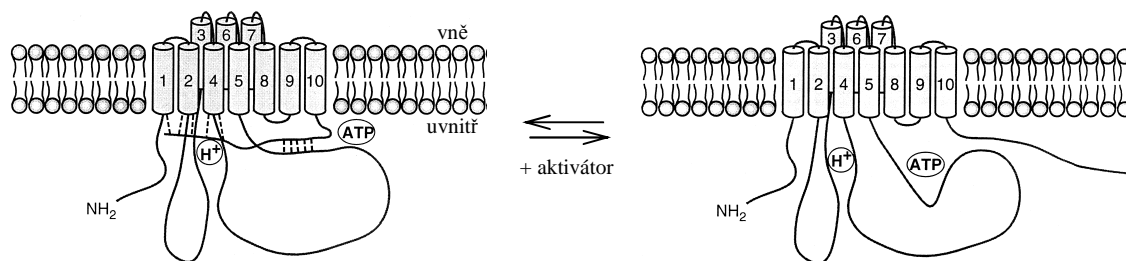
Tato teorie byla podpořena úspěšným otestováním omeprazolu (inhibitoru žaludeční  $H^+, K^+$ -ATPázy) jako inhibitoru  $H^+$ -ATPázy kvasinek. Omeprazol se kovalentně váže na SH- skupiny na vnější straně proteinu a inhibuje tak buněčný růst kvasinek *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Bohužel je jeho fungicidní účinek závislý na nízkém pH (94). Nedávno však byl v tomto směru učiněn významný pokrok, když byl vyvinut nový širokospektrální povrchově aktivní fungicid BM2, který vedle specifické inhibice kvasinkové  $H^+$ -ATPázy navíc ještě blokuje rezistenci kvasinek vůči azolovým antimykotikům (8).

Zasáhnout lze i jiná citlivá místa tohoto životně důležitého enzymu. Orthovanadát, klasický inhibitor P-ATPáz, působí jako konformační analog anorganického fosfátu ( $P_i$ ) a blokuje tak reakční cyklus ATPázy v E2 konformaci, v níž má enzym nízkou afinitu k ATP (90). Jinou alternativu představuje inhibice některého z procesů nezbytného pro její správnou regulaci a funkci, viz např. studie (95). Z tohoto pohledu se jeví zajímavě společné rysy různých aktivačních procesů popsaných níže.

V buňkách kvasinek je aktivita protonové pumpy regulována jak na transkripční (96), tak post-translační úrovni mnoha faktory (detailní výklad lze nalézt např. v (88)). První důkaz o regulaci Pma1 byl popsán v roce 1983 Serranem (97). Aktivita enzymu je regulována na post-translační úrovni dvěma hlavními faktory: cukry a kyselostí (88). Glukózová aktivace  $H^+$ -ATPázy vede k rychlému nárůstu  $V_{max}$  hydrolýzy ATP a poklesu  $K_m$  pro ATP (97). Acidifikace média během růstu kvasinkové kultury způsobuje pokles v cytosolovém pH, které má za následek aktivaci enzymu, při níž se však, na rozdíl od glukózové aktivace, mění pouze parametr  $K_m$  (98,99).

Přestože je aktivace  $H^+$ -ATPázy vyvolaná glukózou nejprozkoumanější, existují i jiné cukry schopné aktivovat  $H^+$ -ATPázu kvasinek, např. fruktóza, manóza, maltóza a trehalóza. Naopak nemetabolizované analogy glukózy D-xylóza, 3-O-metylgukóza, 2-deoxyglukóza ji neaktivují (97,100). Mezi další faktory zvyšující aktivitu enzymu patří např. přítomnost slabých organických kyselin (99,101), či nedostatek dusíku v růstovém médiu (88).

Pro aktivaci ATPázy jsou důležitá dvě regulační místa nacházející se v C-konci proteinu; první, Arg-909 a Thr-912, je esenciální pro změny parametru  $V_{max}$ , zatímco druhé, Ser-899 a Glu-901, je nutné pro změny  $K_m$ . Fosforylace Ser-911 a Thr-912 zmírňuje inhibiční interakci karboxylového konce s aktivním místem  $H^+$ -ATPázy při její glukózové aktivaci (89). Ačkoliv je jisté, že C-konec obsahuje hlavní regulační domény účastnící se aktivace  $H^+$ -ATPázy (jeho delece vede ke konstitutivně aktivovanému stavu enzymu), předpokládá se, že taktéž N-konec může hrát roli v modulaci aktivity (88,102,103).



**Obr. 1-15** Model aktivace kvasinkové plazmatické  $H^+$ -ATPázy. Ve stavu s nízkou aktivitou (vlevo) C-konec interaguje s aktivním místem enzymu a omezuje přístup substrátu. Aktivátor spouští modifikaci C-konce, uvolňuje inhibiční interakci a dovoluje ATPáze zaujmout aktivnější konformaci (vpravo) (88).

Na základě těchto výsledků byl navržen model aktivace  $H^+$ -ATPázy (obr. 1-15), podle něhož v klidovém stavu C-konec proteinu omezuje jak přístup protonů k jejich transportnímu místu, tak adenosin trifosfátu k ATP-vazebné doméně. Aktivátory modifikují C-konec fosforylací, která uvolňuje inhibiční interakci, a dovolí  $H^+$ -ATPáze zaujmout aktivnější konformaci (88,102).

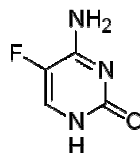
Protonofory, jako jsou 2,4-dinitrofenol a karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon (CCCP), taktéž spouštějí *in vivo* aktivaci  $H^+$ -ATPázy kvasinek (104). Přestože intenzita efektu způsobená CCCP není tak výrazná jako v případě glukózy, sdílí oba aktivační procesy jisté společné rysy; fosfolipáza C a proteinkináza C se účastní obou procesů, zatímco glukózový receptor Snf3p a G protein Gpa2p, přenášející signál o fosforylaci cukru, jsou zapojeny pouze do glukózové aktivace ATPázy (95,105). Oba aktivační procesy jsou propojeny s dalšími signálními a metabolickými drahami v kvasinkách (podrobněji viz studie (95,104,106)).

### 1.3.3. Vnitrobuněčné cíle antimykotik

#### 1.3.3.1. Inhibice syntézy nukleových kyselin

Flucytosin (5FC) se od svého zavedení do klinické praxe v roce 1968 používá k léčbě kandidóz a jiných invazivních mykóz (2). Flucytosin (tabulka 1-1, obr. 1-16) je do buňky aktivně transportován cytosinpermeázou a až v buňce je deaminován cytosindeaminázou na 5-fluorouracil (5FU), přeměněn uracilfosforibosyltransferázou na 5-fluorouridinmonofosfát, dále fosforylován a začleněn do RNA jako falešná báze. Tímto způsobem narušuje flucytosin syntézu proteinů, zároveň však 5FC zasahuje i do replikace DNA, jelikož se z 5FU po přeměně v 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát stává silný inhibitor thymidylátsyntetázy, která se účastní syntézy DNA. Flucytosin je relativně netoxický pro savčí buňky díky nepřítomnosti nebo velice slabé aktivitě jejich cytosindeaminázy. Na druhou stranu je 5FU široce používaný při léčbě rakoviny (46,53).

Využití samotného fluoropyrimidinu flucytosinu, který interferuje se syntézou DNA i RNA, je poněkud omezeno kvůli častému výskytu primární rezistence a rovněž běžnému a rychlému vývoji sekundární rezistence, proto se flucytosin používá především v kombinaci s amfotericinem B k léčbě kryptokokové meningitidy a kandidózy (9,50). Primární rezistence je obvykle způsobena nefunkční cytosindeaminázou. Sekundární rezistence k flucytosinu může vycházet z mutací v jakémkoliv enzymu, který je potřebný pro jeho funkci, tj. v cytosinpermeáze (kódované genem *FCY2*), která přenáší flucytosin do buňky, nebo v cytosindeamináze (kódované genem *FCY1*), která jej přetváří na 5-fluorouracil, nebo v uracilfosforibosyltransferáze (kódované genem *FURI*), která jej transformuje z 5-fluorouracilu na 5-fluorouridinmonofosfát (11,49).



Obr. 1-16 Struktura 5-fluorocytosinu

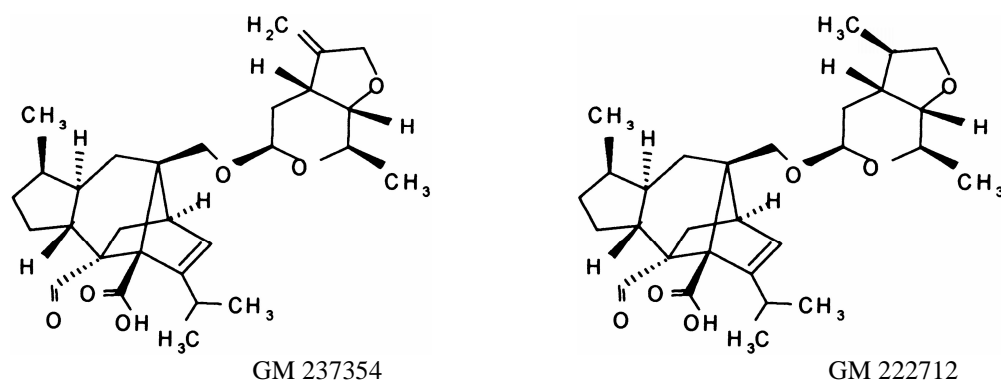
Z nově vyvíjených antifungálních látek inhibujících nukleové kyseliny jmenujme alespoň dvě. Yatakemycin, izolovaný ze *Streptomyces*, je chemicky příbuzný

protirakovinným duokarmycinům, jejichž mechanismus účinku je založen na alkylnaci DNA. Icofungipen (PLD-118, dříve znám jako BAY 10-8888) je derivát cispentacinu, cyklické  $\beta$ -aminokyseliny původně izolované z *Bacillus cereus*. Icofungipen inhibuje enzym isoleucyl-tRNA syntetázu, který je životně důležitý pro syntézu proteinů (46).

### 1.3.3.2. Inhibitory syntézy proteinů

Stejně jako savčí buňky potřebují i kvasinky pro zdárný průběh syntézy proteinů dva elongační faktory, EF-1 a EF-2. V kvasinkách byl nalezen navíc ještě elongační faktor 3 (EF-3), který se však v savčích buňkách nevyskytuje. Tento 120 – 125 kDa velký protein se nachází ve většině hub, včetně *C. albicans* a *P. carinii*, poškození jeho genu je pro organismus letální. EF-3 obsahuje dvě ABC domény, má ATPázovou aktivitu a napomáhá kvasinkové 40S ribozomální podjednotce při prodlužování peptidového řetězce. Nicméně zatím nebyly objeveny žádné inhibitory tohoto esenciálního proteinu (53).

O to překvapivější bylo nalezení selektivních inhibitorů EF-2 patřících do rodiny sordarinů (obr. 1-17), neboť EF-2 kvasinky *C. albicans* vykazuje více než 85 % identitu s lidským proteinem, a proto nebyl na základě studií lidského a kvasinkového genomu vyhodnocen jako vhodný cíl pro návrh nových antimykotik (47). Předpokládá se, že sordarinům přidává na jejich specifičnosti kromě interakce s EF-2 i interakce s ribozomem (48). Právě vysoká selektivita a relativně snadná příprava nových sordarinových derivátů je příslibem perspektivního vývoje tohoto typu antimykotik (46).



**Obr. 1-17** Struktury inhibitorů syntézy proteinů – deriváty sordarinu GM 237354 a GM 222712

Řada proteinů podstupuje různé úpravy, které čerstvě syntetizované proteiny nasměrují na místo určení anebo je jiným způsobem dotvoří do jejich funkční podoby. Na příklad myristylace, bez níž se neobejde spousta hub včetně patogenů *C. albicans* a *C. neoformans* (48,53), obnáší přesun myristátu, nasycené mastné kyseliny s 14 atomy uhlíku, z koenzymu A ke koncovému glycinu proteinů. Enzym *N*-myristoyltransferáza, která katalyzuje tuto reakci, je selektivně inhibována benzothiazoly (UK-356,417, UK-362,091, UK-370,753) (46).

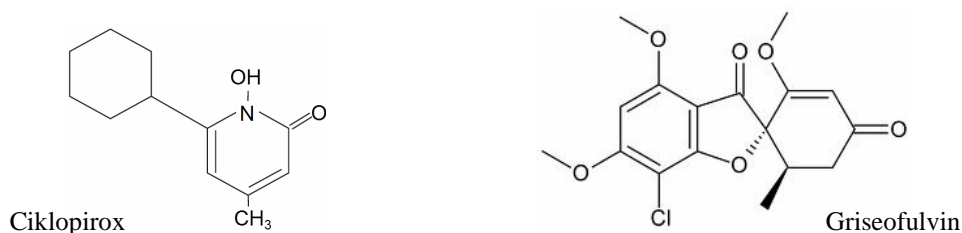
### 1.3.3.3. Někteří další antimykotika

Aminokyselinový analog **cispentacin** je aktivně transportován aminokyselinovými transportéry do buněk, kde interaguje s aminoacyl-tRNA syntetázou (107). Mezi jiné aminokyselinové analogy s antifungální aktivitou patří

RI-331, jež inhibuje homoserindehydrogenázu, enzym, který se nenachází v savčích buňkách, a azoxybacillin, který inhibuje biosyntézu aminokyselin obsahujících síru (53).

Mikrotubuly jsou dynamické polymery  $\alpha\beta$  tubulinových dimerů, které tvoří vysoce organizovanou buněčnou kostru ve všech eukaryotických buňkách a hrají nepostradatelnou roli v buněčné morfologii, v dělení buněk, ale i v buněčném transportu a signalizaci. Formování mikrotubulů je inhibováno griseofulvinem, zemědělským fungicidem benomylem, nebo látkami využívanými k léčbě rakoviny – vinkristinem a vinblastinem; depolymerizace je inhibována taxolem (53). **Griseofulvin** patří k nejstarším antimykotikům, je odvozen od tricyklického grisanu a produkován různými druhy plísní *Penicillium*. Griseofulvin se hromadí v keratinových vrstvách pokožky, kde inhibuje růst houbových buněk (108). Působí na řadu dermatofytů, dnes je však postupně vytlačován inhibitory biosyntézy ergosterolu kvůli svým nežádoucím vedlejším účinkům a obtížnému vstřebávání (4,51).

**Ciklopirox** (obr. 1-18), respektive jeho sůl s olaminem (ciklopiroxolamin), mění permeabilitu membrány, čímž narušuje transport klíčových látek do buněk, a tak inhibuje syntézu proteinů, RNA a DNA. Výhodou této lokálně podávané látky je, že působí účinně nejen na dermatofyty a kvasinkové mikroorganismy, ale také na řadu Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií a dokonce na trichomonády, navíc má také protizánětlivé účinky a dobře proniká i do hlubších vrstev kůže a nehtů, proto jej lze využít k léčbě těžkých případů kožních mykóz, které jsou komplikovány bakteriálními infekcemi a záněty (4,109,110).



**Obr. 1-18** Chemická struktura ciklopiroxu (109) a griseofulvinu

#### 1.3.3.4. Lyzozomy, vakuoly a lyzozmotropní látky

Lyzozomy jsou malé membránami obklopené buněčné organely mající kyselé vnitřní pH (pH ~ 5), které je optimální pro funkci široké škály hydrolytických enzymů, jimiž jsou tyto organely naplněné. Hydrolázy jsou schopné hydrolyticky degradovat makromolekuly (nukleové kyseliny, proteiny a polysacharidy) pouze při nízkém pH, jež je uvnitř lyzozomů. Tato skutečnost chrání buňku před sebezničením v důsledku náhodného úniku enzymů do cytosolu, jehož pH je neutrální.

Díky nízkému pH může do lyzozomů vstupovat a hromadit se v nich řada sloučenin, včetně léků, v koncentracích několikanásobně vyšších než v extracelulární tekutině. Pokud se látky nahromadí uvnitř lyzozomů v dostatečně vysokých koncentracích, mohou narušit lyzozomální membránu a zapříčinit tak nekontrolovaný výtok hydrolytických enzymů, a to může vést až k buněčné smrti. Naopak v některých případech je akumulace užitečná, obzvláště pokud látka má působit uvnitř lyzozomu. Někdy se však léčiva zachytí v lyzozomech a vyloučí ven z buňky dříve, než dosáhnou svého terapeutického cíle. Tento jev je jedním z projevů mnohačetné lékové rezistence (MDR) a je alespoň částečně výsledkem protonace kyselých léčiv, která významně omezuje průchod léčiv skrz membránu lyzozomu (111).

Vakuoly hrají důležitou roli v regulaci pH a osmotických poměrů uvnitř kvasinkových buněk, v degradaci proteinů, ve skladování aminokyselin, malých iontů a polyfosfátů. Vakuoly kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* mají kyselé pH (pH ~ 5,5) v důsledku činnosti vakuolární H<sup>+</sup>-ATPázy. H<sup>+</sup>-ATPáza V-typu přenáší protony do vnitřku vakuoly za současné hydrolýzy ATP a buduje elektrochemický gradient protonů, dále je zapojena v regulaci pH cytoplazmy a acidifikaci jiných organel. Na regulaci pH cytoplazmy se podílí také H<sup>+</sup>-ATPáza umístěná v plazmatické membráně, která transportuje protony ven z buňky. Její zablokování vanadátem nebo orthofosfátem způsobuje okyselení cytosolu a vakuol. V-ATPázové inhibitory jako jsou makrolidová antibiotika (bafilomycin A1 nebo konkanamycin A) naopak indukují vakuolární alkalizaci. V-ATPáza je specificky inhibována folimycinem, antifungální látkou strukturně příbuznou s bafilomycinem (112). Tyto látky blokují acidifikaci vnitrobuněčných organel a tím ovlivňují dopravu proteinů uvnitř buněk.

Termín „lyzozomotropní látky“ zavedl belgický cytolog a biochemik Christian René de Duve, který mimo jiné objevil lyzozomy a peroxizomy, roku 1974. Neprotonovaná forma lyzozomotropních látek, které jsou povětšinou slabé báze, snadno proniká buněčnými membránami a protonovaná forma se hromadí v kyselých buněčných organelách – vakuolách, lyzozomech nebo endozomech. Při pH vyšším než je pK<sub>a</sub> dané látky, převládá její neprotonovaná forma, tudíž při vyšších hodnotách vnějšího pH procházejí látky plazmatickou membránou snadněji a jejich koncentrace ve vakuolách se zvyšuje. Když koncentrace lyzozomotropní látky ve vakuolách dosáhne kritické micelární koncentrace, začne látka působit jako detergent a zničí tonoplast (membránu vakuoly). To má za následek výtok vakuolárních hydrolytických enzymů do buňky a její autolýzu (113).

Existuje mnoho sloučenin, které se po nahromadění v lyzozomech chovají jako detergenty, jsou amfifilní a obsahují alespoň jeden bazický dusík. U některých z nich byla zjištěna biologická aktivita a schopnost efektivně zabíjet nádorové buňky a mikroorganismy, jiné byly použity jako anti-MDR léčiva. Účinek těchto detergentů na *Saccharomyces cerevisiae* závisí na velikosti polární hlavičky (PY > DM > DE > PP >> PYI > MR > MO >> PI) a délce alkylového řetězce sloučeniny, aminoundekany ( $n = 11$ ) inhibují růst kvasinek ve větší míře než aminoestery s kratším ( $n = 9$ ) nebo delším ( $n = 13$ , popřípadě 15) uhlíkovým řetězcem (114,115). Obdobná závislost platí i pro aminoestery (DMG- $n$ ) a jejich kvartérní amoniové soli (DMGM- $n$ ), u nichž maximálního účinku dosahují látky s dvanácti uhlíkovými řetězci (116). Schopnost 2-dimethylaminoesterů mastných kyselin (např. DM-11 a DM-13) inhibovat růst kvasinek je jasně závislá na pH, zvyšuje se s rostoucím pH (117). Toto chování je charakteristickým rysem lyzozomotropních látek (118). Jejich hemolytická účinnost je v souladu se schopností inhibovat růst *Saccharomyces cerevisiae* (114) a dobře souhlasí s hodnotami pK<sub>a</sub> jednotlivých sloučenin (113). Látky, které jsou označovány jako tzv. slabé lyzozomotropní látky, se v buňkách snadno degradují na netoxické metabolity (111).

Prof. Witek s kolegy syntetizovali nové lyzozomotropní látky (zkoumáním vlivu některých z nich na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsme se podrobněji zabývali i v této práci – kapitola 3.2.4), které se mimo jiné lišily svými párovými ionty (bromidy, chloridy, metylsulfáty). Je známo, že sloučeniny s různými párovými ionty interagují s biologickými i modelovými membránami s různou účinností. Bromidové a chloridové ionty patří k iontům zvyšujícím rozpustnost látky v roztoku. Účinek bromidů je výrazně silnější než účinek chloridů. Aktivita DMMS- $n$  ( $N,N$ -dimethylaminoesterů metylsulfátů mastných kyselin) je velmi podobná aktivitě DMM- $n$  ( $N,N$ -dimethylaminoesterů bromidů mastných kyselin). Jelikož se tyto látky liší pouze v párovém iontu,

umožňují bromidové a metylsulfátové párové ionty interakci těchto typových řad lyzozomotropních látek ve stejné míře (111).

Lyzozomotropní látky patří mezi fungicidy, jejich letální účinek na buňky je spjat se změnou vnitrobuněčného pH. Po vstupu do kvasinkových buněk způsobují vnitrobuněčné okyselení pravděpodobně inhibicí plazmatické  $H^+$ -ATPázy (např. série 2-dimethylamino (DM-*n*) a pyrrolidin (PY-*n*) etylesterů nasycených mastných kyselin (115,119) a omezením aktivního pumpování protonů z buněk, zřejmě interferují i s funkcí V-typové ATPázy, čímž vyvolávají vakuolární alkalizaci a posléze buněčnou smrt (113). Některé lyzozomotropní látky jako jsou *N,N*-dimethylalanin (DMAL-12) a *N,N*-dimethylglycin (PYG-12) estery mají dvojitý mechanismus účinku – silně ovlivňují jak  $H^+$ -ATPázu v plazmatické membráně, tak V-ATPázu (113). DMAL-12 účinně inhibuje aktivitu plazmatické  $H^+$ -ATPázy v *S. cerevisiae* již při koncentraci  $IC_{50} = (15,1 \pm 1,2) \mu M$  (to jest koncentrace látky vyvolávající 50 % inhibici aktivity  $H^+$ -ATPázy), jeho derivát DM-11 dosáhne stejné míry inhibice při téměř dvojnásobné koncentraci  $IC_{50} = (29,2 \pm 0,3) \mu M$  (120). Na rozdíl od aminoesteru DMAL-12 deformuje kvartérní amoniová sůl DMALM-12 povrchové struktury kvasinek zejména buněčnou stěnu, nicméně oba tyto alaninové deriváty narušují strukturu vakuol (118).

Dodecyl-*N,N*-dimethylglicinát (DMG-12) a jeho kvartérní amoniová sůl dodecyloxykarbonylmethyl-*N,N,N*-trimethylamonium chlorid (IM) inhibují plazmatickou  $H^+$ -ATPázu kvasinek při srovnatelných koncentracích  $IC_{50} = 25 \mu M$ , respektive  $20 \mu M$ . Avšak tyto dvě chemikálie se vzájemně liší ve svém vlivu na mitochondriální ATPázu. Kvartérní amoniová sůl, reprezentovaná IM, inhibuje mitochondriální enzym výrazněji ( $IC_{50} = 43 \mu M$ ) než DMG-12 ( $IC_{50} = 230 \mu M$ ). Inhibice mitochondriální ATPázy DMG-14 a DMG-16 nedosáhla 50 % ani při nejvyšší testované koncentraci, tj.  $320 \mu M$  (115).

Aminoestery (DMG-12 nebo DMAL-12) se liší od svých kvartérních amoniových solí (DMGM-12 nebo DMALM-12) ve schopnosti inhibovat plazmatickou  $H^+$ -ATPázu a mitochondriální ATPázu. Plazmatická  $H^+$ -ATPáza je inhibována kvartérními amoniovými solemi i aminoestery, mitochondriální ATPáza je sice inhibována kvartérními amoniovými solemi, avšak je jen slabě citlivá nebo naprosto necitlivá vůči aminoesterům (116).

O spouště lyzozomotropních látek (např. AT-12, EPT-8, DM-11, DM-13, DE-11, PY-11, PYI-11) se taktéž předpokládá, že jsou substráty PDR transportérů Pdr5p, Snq2p a Yor1p *S. cerevisiae* (121).

## 1.4. Měření membránového potenciálu

### 1.4.1. Membránový potenciál

Veškeré živé buňky, živočišné, rostlinné i jednobuněčné organismy, jsou od vnějšího prostředí odděleny plazmatickou membránou. Přes tuto membránu vstupují do buňky živiny a odcházejí ven produkty metabolismu. Plazmatická membrána udržuje gradienty koncentrací malých anorganických iontů (především  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ) nebo protonů, v jejichž důsledku existuje mezi vnější a vnitřní stranou membrány rozdíl elektrických potenciálů, který nazýváme membránový potenciál.

Udržování transmembránového gradientu koncentrací anorganických iontů slouží primárně k zajištění osmotické rovnováhy buněk. Membránový potenciál, jehož existence je s tímto gradientem svázána, však současně slouží jako zdroj energie pro



řadu významných buněčných procesů. Pohání transmembránový transport živin a metabolitů (např. cukrů a aminokyselin). V buněčných organelách mitochondriích a chloroplastech je membránový potenciál součástí tzv. protonmotivní síly, která pohání syntézu adenosintrifosfátu (ATP), který je bezprostředním zdrojem snadno uvolnitelné chemické energie.

Vznik transmembránových iontových gradientů a tím i membránového potenciálu umožňují elektrogenní iontové pumpy. V membránách buněk rostlin, bakterií a hub je hlavní elektrogenní pumpou protonová ATPáza. V živočišných buňkách zastává tuto důležitou roli Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza, která s využitím energie získané štěpením molekul ATP pumpuje proti směru gradientů elektrochemických potenciálů tři ionty Na<sup>+</sup> ven z buňky a současně dva ionty K<sup>+</sup> do buňky. Výslednou hodnotu membránového potenciálu však neurčují elektrogenní pumpy, nýbrž vysoce selektivní iontové kanály, na jejichž množství a parametrech závisí elektrické vlastnosti buněčných membrán. Tyto kanály nastaví konečnou hodnotu tzv. klidového membránového potenciálu skrze ustálené hodnoty iontových proudů, jež v podstatě směřují ke zrušení iontových gradientů a dosažení termodynamicky rovnovážného stavu (122).

#### 1.4.2. Metody měření membránového potenciálu

Membránový potenciál je jednou z charakteristik živých buněk. Klasickou metodou stanovení membránového potenciálu živých buněk je přímé měření transmembránového napětí pomocí mikroelektrody zapíchnuté do buňky. Nevýhodou měření pomocí mikroelektrod je riziko zkratování membrány nedokonalým kontaktem mezi povrchem elektrody a membránou. Navíc v případě buněčných organel (jako jsou např. mitochondrie) a v případě malých buněk nelze mikroelektrody použít pro jejich relativně velký průměr.

K měření membránového potenciálu lze použít i některou z nepřímých metod, založených na redistribuci malých lipofilních kationtů z okolního média dovnitř buňky. Prototypem takových potenciometrických sond je tetrafenylfosfonium (TPP<sup>+</sup>). Po přidání do média se tyto sondy akumulují v buňkách, do kterých proudí tak dlouho, dokud není dosaženo rovnosti elektrochemických potenciálů sondy v médiu a uvnitř buněk. Poměr intracelulárních a extracelulárních koncentrací kationické sondy je dán Nernstovou rovnicí

$$\frac{c_i}{c_o} = e^{-\frac{zF\Psi}{RT}}, \quad (1-1)$$

kde  $z$  je počet nábojů,  $F$  Faradayova konstanta,  $\Psi$  membránový potenciál,  $R$  plynová konstanta a  $T$  absolutní teplota. Rovnovážný poměr koncentrací sondy uvnitř a vně buňky  $\frac{c_i}{c_o}$  je pak mírou membránového potenciálu testovaných buněk.

V případě TPP<sup>+</sup> byl tento poměr původně stanovován pomocí radioaktivních izotopů sondy. V současnosti se používá elektrochemické měření úbytku sondy v buněčném médiu pomocí iontově selektivní TPP<sup>+</sup> elektrody. TPP<sup>+</sup> sonda je používána převážně k monitorování změn mitochondriálního membránového potenciálu v suspenzích izolovaných mitochondrií. Problematické je měření na celých buňkách, neboť při měření poklesu koncentrace sondy v buněčném médiu nelze poznat, do jaké míry k němu vedle efektu závislého na potenciálu plazmatické membrány přispívá též vazba sondy na povrch buněk a na intracelulární makromolekuly nebo její dodatečná akumulace v buněčných organelách (mitochondriích) (122).

Membránový potenciál v buněčných suspenzích lze měřit i pomocí řady fluorescenčních indikátorů, které jsou podle mechanismu a rychlosti své odpovědi na membránový potenciál a rozsahu buněčných charakteristik, jež jsou schopné sledovat, řazeny do dvou skupin, a to rychlé (elektrochromní), nebo pomalé (redistribuční, či nernstovské) fluorescenční sondy. Rychlá elektrochromní barviva mohou reagovat na transmembránové elektrické pole jak díky difúzním potenciálům, tak díky pevným nábojům na površích membrán. V molekulách těchto sond dochází k potenciálově závislým přeuspořádáním valenčních elektronů, které jsou doprovázeny změnami v absorpčních spektrech. Rychlá barviva mohou sledovat změny v membránovém potenciálu v řádu milisekund, zatímco pomalá barviva v řádu sekund nebo dokonce minut. Mezi rychlá barviva patří např. merocyanin 540, di-4-ANEPPS a di-8-ANEPPS (123).

Tabulka 1-5: Příklady redistribučních sond (123)

Označení a chemický název	Spektrální vlastnosti*	
	absorpce $\lambda_{\max}$ (nm)	emise $\lambda_{\max}$ (nm)
<b>Karbocyaniny (kationická barviva):</b>		
diO-C <sub>5</sub> (3) 3,3'-dipentyloxakarbocyanin jodid	484	500
diI-C <sub>5</sub> (3) 1,1'-dipentyl-3,3,3',3'-tetrametylindokarbocyanin jodid	546	575
diS-C <sub>3</sub> (5) 3,3'-dipropylthiodikarbocyanin jodid	651	675
diS-C <sub>3</sub> (3) 3,3'-dipropylthiokarbocyanin jodid	556	588
JC-1 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin jodid	514	529
<b>Oxonoly (anionická barviva):</b>		
diBAC <sub>4</sub> (3) bis-(1,3-dibutylbarbiturová kyselina) trimethin oxonol	493	516
oxonol VI bis-(3-propyl-5-oxoisoxazol-4-yl) pentamethin oxonol	599	634
<b>Rhodaminy (kationická barviva):</b>		
TMRM tetrametylrhodamin metylester	549	573
TMRE tetrametylrhodamin etylester	549	574
Rhodamin 123	507	529

\* Absorpční maximum se vztahuje k nejsilnějšímu dlouhovlnnému absorpčnímu píku, spektra byla měřena v metanolu.

Pomalá barviva poskytují informaci o rozdílu v elektrochemickém potenciálu mezi vnitrobuněčným a vnějším vodným prostředím (transmembránový potenciál) pomocí svého napětově závislého rozdělení mezi vnějším médiem a cytosolem (31). Redistribuční sondy lze rozdělit do tří hlavních skupin: karbocyaniny, oxonoly a deriváty rhodaminu, jejich příklady jsou uvedeny v tabulce 1-5. Všechny pomalé sondy mají náboj delokalizovaný po celé struktuře molekuly, což jim umožňuje snadno prostupovat buněčnými membránami. Permeabilita barviv může být modulována různými strukturálními znaky, které ovlivňují jejich hydrofobicitu, jako je délka dvou alkylových řetězců karbocyaninových barviv. Obecně platí, že čím jsou alkylové řetězce delší, tím je odpověď sondy rychlejší. Podobná závislost existuje také u oxonolů. Např. u oxonolu VI, který obsahuje dva propylové řetězce, bylo zjištěno, že reaguje mnohem

rychleji na změny membránového potenciálu v unilamelárních fosfolipidových váčcích než oxonol V, u něhož byly propylové řetězce nahrazeny fenylovými. Také průchod různých rhodaminových barviv (rhodamin 123, rhodamin 6G a TMRM) přes mitochondriální vnitřní membránu je přímo úměrný relativní lipofilitě daného barviva.

Kationické redistribuční sondy snadno procházejí skrz plazmatické nebo mitochondriální membrány a hromadí se v cytosolu nebo v mitochondriální matrix v reakci na vnitřní záporný membránový potenciál. Redistribuce barviva mezi vnějším médiem a cytosolem nebo mezi cytosolem a vnitřkem buněčných organel, jako jsou mitochondrie, pokračuje, dokud není dosaženo rovnovážného stavu. To může trvat 30 i více minut. V rovnováze se poměr koncentrací barviva přes polarizovanou membránu řídí Nernstovou rovnicí (1-1) (123). V buňkách nebo mitochondriích s vysokým membránovým potenciálem se hromadí velké množství kationického barviva, naopak menší akumulace odráží depolarizaci membrány.

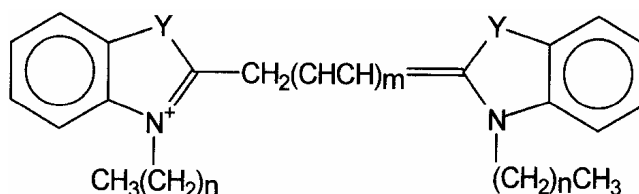
Hromadění kationických barviv v mitochondriích je kontrolováno plazmatickým i mitochondriálním membránovým potenciálem. Molekuly barviva vstupují do mitochondrií v dvoukrokovém procesu; plazmatický membránový potenciál řídí tok molekul barviva z média do cytosolu a následně probíhá redistribuce barviva přes mitochondriální membránu. Vstup barviva do buněk pokračuje, dokud nejsou ustanoveny obě rovnováhy, a to jak napříč plazmatickou, tak mitochondriální membránou. Celkové množství barviva v buňce, včetně mitochondrií, je silně závislé na velikosti obou membránových potenciálů. Pokud je membránový potenciál mitochondrií s plně funkčním dýchacím řetězcem vyšší než plazmatický membránový potenciál, vede to k většímu nahromadění kationických redistribučních barviv uvnitř mitochondrií (124).

Akumulace redistribučních barviv v buňkách řízená membránovým potenciálem je stanovována pomocí sledování změn v intenzitě fluorescence. Tyto změny mohou být důsledkem dvou odlišných fyzikálních jevů: (i) tvorby nefluoreskujících dimerů nebo vyšších agregátů barviva díky zvýšené koncentraci barviva v cytosolu či v mitochondriální matrix, anebo (ii) změn v absorpčních i v emisních spektrech způsobených vazbou barviva na cytosolové makromolekuly a membrány organel, tyto spektrální efekty jsou obvykle doprovázeny změnami v době života i v kvantovém výtěžku sond.

Při vhodně zvolených nízkých koncentracích redistribučních fluorescenčních sond platí přímá úměra mezi jejich koncentrací a pozorovanou intenzitou fluorescence. Někdy se však záměrně volí koncentrace sondy tak vysoká, že při akumulaci v buňkách a organelách dochází ke vzniku nefluoreskujících agregátů, a tudíž ke zhášení fluorescence při hyperpolarizaci studovaných objektů. Takový experimentální protokol se používá např. při měření plazmatického membránového potenciálu pomocí sondy diS-C<sub>3</sub>(5) nebo při monitorování změn mitochondriálního potenciálu pomocí rhodaminu 123. Avšak vysoké koncentrace sondy jsou zpravidla pro buňky toxické (123). Na rozdíl od sondy diS-C<sub>3</sub>(5), která má pentamethinový můstek, má sonda diS-C<sub>3</sub>(3), se svým trimethinovým můstkem, menší tendenci agregovat a její fluorescenční signál je významně ovlivněn navázáním na buněčné struktury (lipidy, proteiny, membrány, nukleové kyseliny, atd.) (125). Spektrální posuvy zapříčiněné interakcí fluorochromu s buněčnými makromolekulami byly nalezeny i u mnoha jiných redistribučních fluorescenčních sond, např. diS-C<sub>3</sub>(5) nebo diO-C<sub>3</sub>(5), ale i u elektrochromního barviva di-4-ANEPPS (126).

Obecně platí, že spektrální vlastnosti všech karbocyaninů jsou dány povahou druhého heteroatomu v jejich heterocyklických kruzích (tj. O, I nebo S) a počtem methinových skupin v můstcích mezi těmito kruhy (viz obr. 1-19 a tabulka 1-5), avšak

jsou prakticky necitlivé k délce alkylových řetězců připojených k dusíkovým atomům v oněch heterocyklických kruzích. V řadě diO-C<sub>2</sub>(3), diI-C<sub>2</sub>(3), diS-C<sub>2</sub>(3) se vlnová délka emisního maxima ve vodných roztocích posouvá od 496 nm přes 556 nm k 568 nm, tj. od zelené do oranžové oblasti spektra. Délka oligomethinového můstku ovlivňuje nejen polohu emisního maxima (pokud můstek oddělující aromatické kruhy obsahuje pět členů namísto tří, posune se fluorescenční maximum přibližně o 100 nm k delším vlnovým délkám), ale i nárůst intenzity fluorescence po navázání karbocyaninů na proteiny (u pětičlenného můstku není nárůst zdaleka tak výrazný) (123).



**Obr. 1-19** Struktura cyaninového barviva s obecným vzorcem diY-C<sub>n+1</sub>(2m + 1), kde Y značí druhý heteroatom, n + 1 je počet uhlíkových atomů v alkylových řetězcích a 2m + 1 je počet uhlíkových atomů v můstku mezi heterocyklickými kruhy (127).

### 1.4.3. Měření membránového potenciálu a změn aktivity MDR pump (Pdr5p a Snq2p) pomocí fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3)

Vazba sondy diS-C<sub>3</sub>(3) na buněčné součásti je doprovázena změnami v jejích spektroskopických vlastnostech: (1) maximum fluorescenční emise vázané sondy je posunuté směrem k delším vlnovým délkám přibližně o 10 nm ve srovnání s maximem emise volné sondy ( $\lambda_{\max} = 569$  nm) a (2) intenzita fluorescence značně vzroste díky prodloužení doby života a zvětšení kvantového výtěžku (obr. 1-20) (123). Interakce diS-C<sub>3</sub>(3) s buněčnými komponentami je naprosto reversibilní a dynamická; a změna v koncentraci volné sondy v cytosolových nebo mitochondriálních oddílech buňky způsobí rychlé (v řádu sekund) obnovení rovnováhy mezi volnou a vázanou sondou (126). Jinými slovy koncentrace vázané sondy je přímo úměrná koncentraci volné sondy v buňce.

Na oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu UK v Praze byla vyvinuta efektivní fluorescenční metoda, kterou je možné v reálném čase sledovat změny v membránovém potenciálu v kvasinkových i bakteriálních buňkách (31,128). Tato metoda využívá spektrální vlastnosti sondy diS-C<sub>3</sub>(3); její maximum fluorescenční emise ( $\lambda_{\max}$ ) a intenzita fluorescence v maximu ( $I_{\max}$ ) odpovídají na změny v membránovém potenciálu v suspenzi mikroorganismů, viz např. (129-132). Parametr  $\lambda_{\max}$  je méně ovlivněn vazbou sondy na stěny květy a možným vybělováním fluorescence než např. intenzita fluorescence.

Díky velice rychlému ustanovení rovnováhy mezi volnou a vázanou sondou uvnitř buněk je poloha  $\lambda_{\max}$  měřeného fluorescenčního signálu přímo úměrná okamžité koncentraci sondy v buňkách. To znamená, že časová závislost polohy  $\lambda_{\max}$  po počátečním přidání sondy k buňkám sleduje časový průběh pronikání sondy do buněk. Tento časový průběh ukazuje podstatně pomalejší dosažení rovnováhy mezi vnitrobuněčným a vnějším rezervoárem volné sondy, která je kontrolována velikostí membránového potenciálu (124).

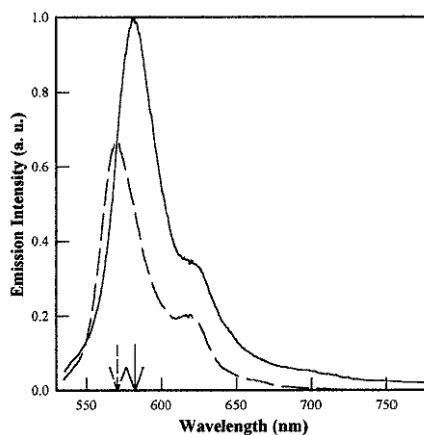
Vyvinutá fluorescenční metoda využívá sledování časového průběhu posuvů ve fluorescenčním maximu  $\lambda_{\max}$  po přidání sondy k buňkám, tzv. barvicí křivky. Změny ve velikosti membránového potenciálu, např. díky účinku okolních faktorů nebo látek

(vnější pH, tepelný šok, přítomnost glukózy, KCl, protonoforů jako je CCCP, atd.), se projeví změnou koncentrace sondy v buňkách. Membránová depolarizace je doprovázena snížením vnitrobuněčné koncentrace sondy a modrým posuvem v  $\lambda_{\max}$ , hyperpolarizace vede naopak ke zvýšení koncentrace sondy uvnitř buněk a červenému posuvu v  $\lambda_{\max}$ . Červený posuv je charakteristický taktéž pro permeabilizaci buněk (126), sonda již nereaguje na velikost membránového potenciálu, nýbrž na ztrátu integrity membrány.

Rychlost barvení kvasinek a jiných buněk s buněčnou stěnou je zpomalena buněčnou stěnou, která slouží jako pasivní bariéra (129). Redistribuce sondy mezi médii a kvasinkovými protoplasty trvá přibližně 5 min, ale v intaktních buňkách 10 až 30 min, protože buněčná stěna působí jako bariéra znesnadňující pronikání sondy do buněk. Bariérové vlastnosti buněčné stěny souvisejí s její tloušťkou: buňky pěstované v 0,2 % glukóze mají tenčí stěnu ( $0,175 \pm 0,015$   $\mu\text{m}$ ,  $n = 30$ ) a tudíž se barví mnohem rychleji a maximum fluorescence  $\lambda_{\max}$  je posunuté více do červena než u buněk pěstovaných v 2 % glukóze (tloušťka buněčné stěny  $0,260 \pm 0,043$   $\mu\text{m}$ ,  $n = 44$ ) (31).

V uplynulých letech byl pomocí vyvinuté fluorescenční metody sledován účinek různých stresových faktorů na kvasinky *S. cerevisiae*: konkrétně působení killer toxinu K1 na citlivé buňky S6/1 (133), aktivních komponent dezinfekčních prostředků (biocidů) (134), antibiotika nystatin (128,133), inhibitoru  $\text{H}^+$ -ATPázy (128). Touto metodou byl taktéž prokázán pokles membránového potenciálu během přechodu buněk na oxidativní metabolismus po vyčerpání glukózy z růstového média (v pozdní exponenciální a diauxické růstové fázi), který naznačuje sníženou aktivitu  $\text{H}^+$ -ATPázy (130), nebo rozdílná velikost membránového potenciálu u buněk divokých kmenů odlišného genetického základu a rozdíly ve velikosti membránového potenciálu u respirujících kvasinek rostoucích na fermentovatelných (glukóza, fruktóza) a nefermentovatelných (etanol, glycerol) zdrojích uhlíku (132).

V neposlední řadě bylo zmiňovanou metodou zjištěno, že fluorescenční odpověď sondy diS-C<sub>3</sub>(3) na membránový potenciál je rozhodujícím způsobem ovlivněna činností MDR pump, protože sonda je z kvasinek *S. cerevisiae* odstraňována ABC pumpami Pdr5p a Snq2p a může být tudíž využita pro studium jejich činnosti (130). Toto odstraňování sondy vede ke snížení její koncentrace v buňkách s aktivními MDR pumpami ve srovnání s mutanty nemajícími pumpy. Aktivita pump může být tedy stanovena pomocí odečtení barvicích křivek pumpových kmenů od křivky kmene, který pumpy postrádá.



**Obr. 1-20** Emisní spektrum samotné sondy diS-C<sub>3</sub>(3) v citrát-fosfátovém pufru (přerušovaná čára) a spektrum sondy diS-C<sub>3</sub>(3) v koncentrované suspenzi kvasinkových buněk ( $10^7$  buněk/ml) v citrát-fosfátovém pufru pH 4,6 (plná čára). Druhé spektrum je identické se spektrem získaným z buněčného lysátu. Koncentrace sondy  $10^{-7}$  M. Šipky ukazují polohy příslušných maxim fluorescenční emise (31).

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Chemikálie a materiál

Tabulka 2-1: Složky kultivačních médií a roztoků

Chemikálie	M <sub>w</sub> [g.mol <sup>-1</sup> ]	Výrobce
kvasinkový extrakt	-	Serva
pepton	-	Oxoid
agar	-	RNDr. Jan Kulich, s.r.o.
glycerol	92,10	Lach-Ner, s.r.o.
etanol čistý 96 %	46,07	P-lab, a.s.
glukóza bezvodá p.a.	180,16	Penta
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.	358,14	Lach-Ner, s.r.o.
kyselina citrónová (bezvodá)	192,13	Lachema
kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin a bez síranu amonného	-	ForMedium
kompletní aminokyselinová směs	-	
aminokyselinová směs bez leucinu	-	
síran amonný	132,14	Sigma
adenin	135,13	Fluka

Zásobní roztoky všech chemikálií rozpuštěných v destilované vodě a zásobní roztoky NQO, nigericinu, gramicidinu A, flukonazolu, ketokonazolu, amfotericinu B a nystatinu jsme uchovávali při teplotě 4°C. Látky rozpuštěné v etanolu, DMSO a DMF jsme uchovávali při teplotě -18°C, mimo jiné i zásobní roztok fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3) (10<sup>-5</sup> M).

Micelární suspenze amfotericinu B (Fungizone) se skládala přibližně z 45 % amfotericinu B, z 35 % deoxycholátu sodného a z hydrogenfosforečnanu disodného rozpuštěného v destilované vodě. BAC (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>RCI) obsahoval různé homology (R = C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> až C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>), převažovala však varianta C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>Cl, proto je BAC v této podobě zobrazen i na obrázku 2-1 F.

Tabulka 2-2: Rozpouštědla a činidlo pro stanovení koncentrace glukózy v médiích

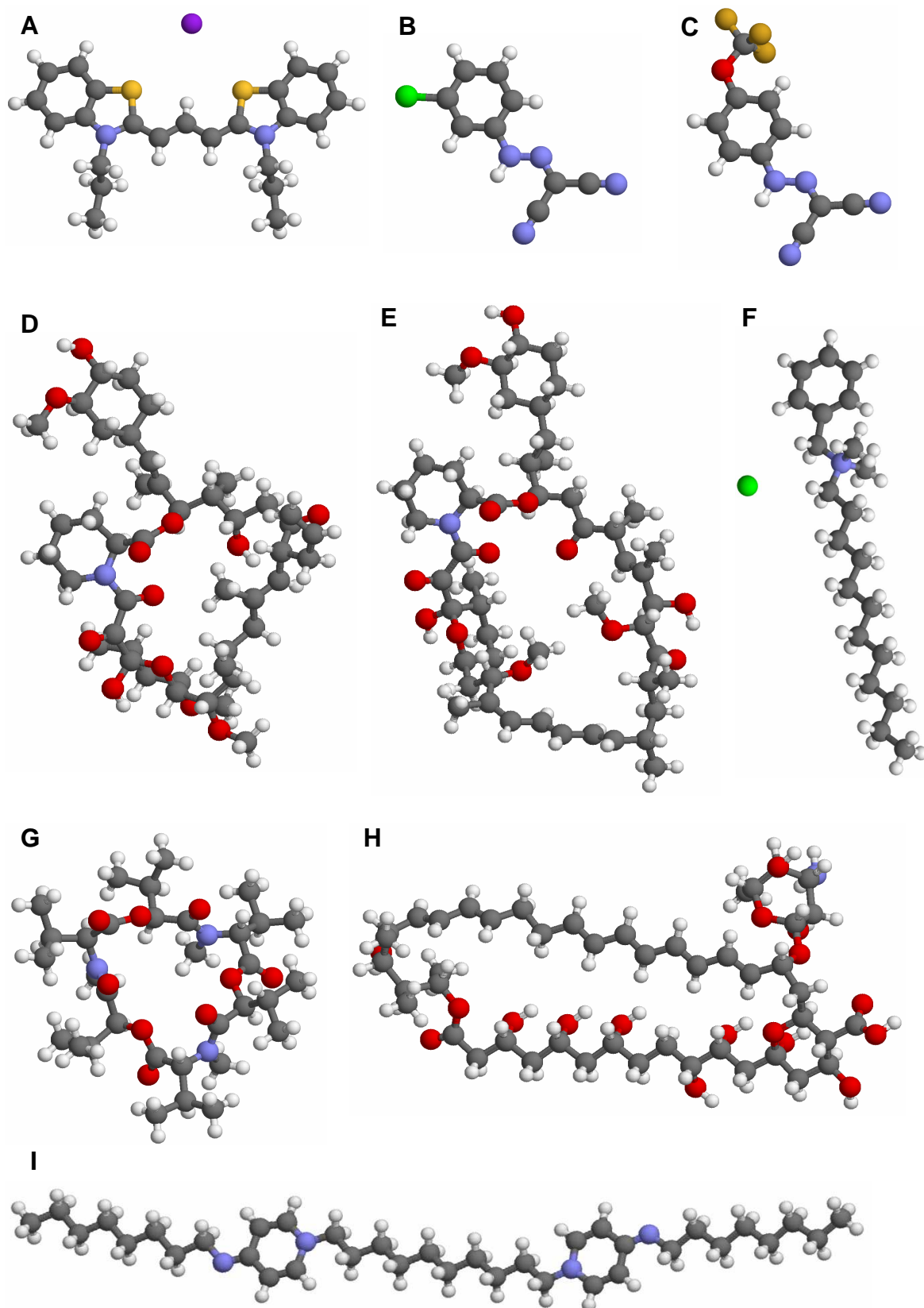
Chemikálie	Výrobce
etanol pro UV spektroskopii	Lachema
DMF (N,N-dimetylformamid pro UV spektroskopii)	Fluka
DMSO (dimetylsulfoxid)	Fluka, Sigma
BIO LA TEST Glukosa liquid 1000	Pliva-Lachema Diagnostika, s.r.o.

Gramicidin A neobsahoval více než 5 % příměsi gramicidinu C, roztok gramicidinu A však ztrácel časem svou účinnost, proto jsme jeho zásobní roztok používali nanejvýš jeden týden od přípravy. Podle údajů výrobce byl podobně nestabilní účinek nystatinu (viz také studie (135)), jeho plná účinnost byla garantována pouze tři

dny od rozpuštění. Nově syntetizované látky ze skupiny AMG (*Akademia Medyczna Gdańsk*) byly citlivé na světlo, proto jsme je před ním důsledně chránili.

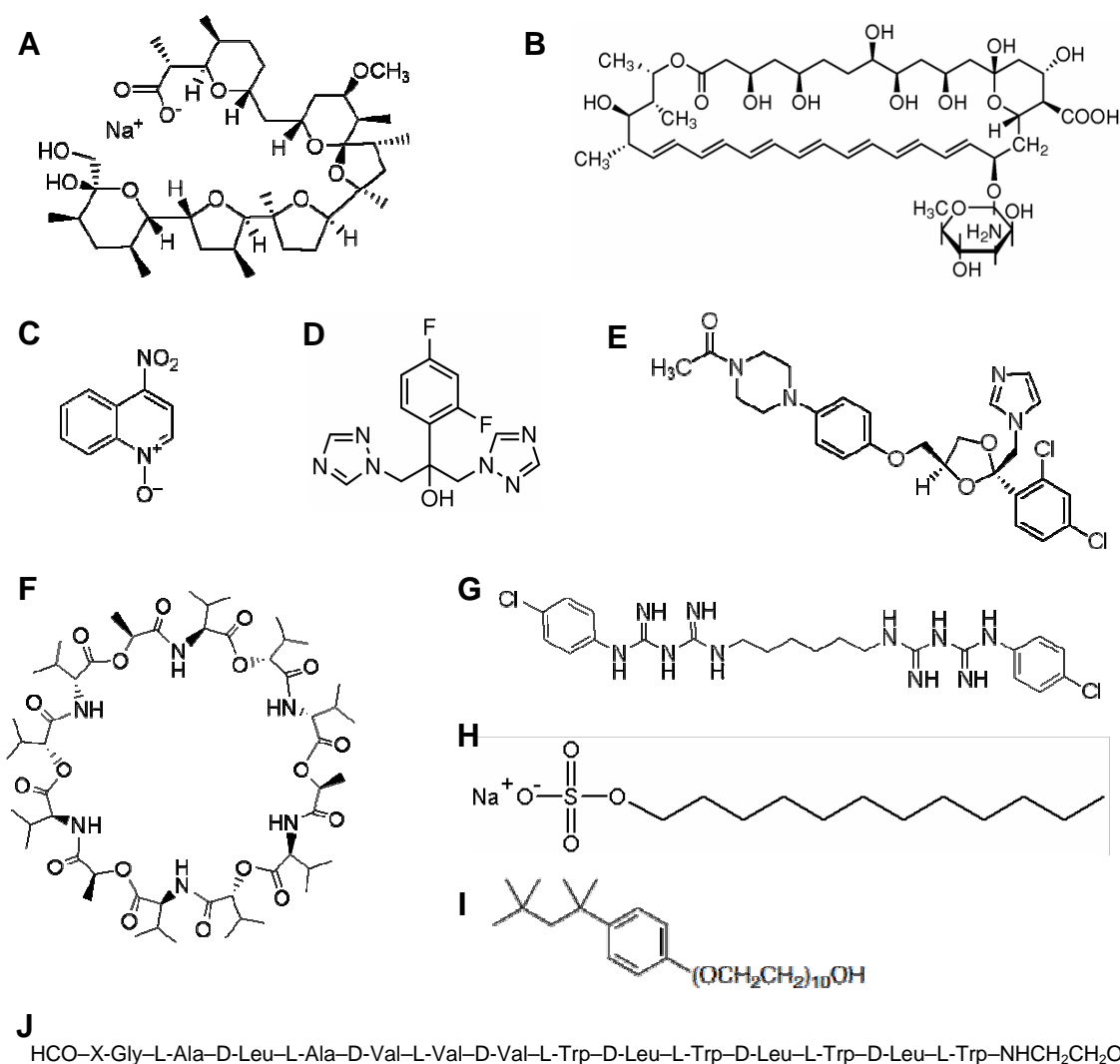
Tabulka 2-3: Přehled zkoumaných látek a fluorescenčních sond

Chemikálie	M <sub>w</sub> [g.mol <sup>-1</sup> ]	Výrobce	Rozpouštědlo	
nigericin (sodná sůl) ze <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	746,9	Sigma	etanol	
NQO ( <i>N</i> -nitrochinolin- <i>N</i> -oxid)	190,17	Supelco		
FK506 (takrolimus)	804,03	LC		
rapamycin (sirolimus)	914,19	Laboratories		
enniatin B	639,8	Alexis Biochemicals	DMSO	
valinomycin	1111,32	Fluka		
gramicidin A z <i>Bacillus brevis</i>	1880	Sigma		
flukonazol	306,27			
ketokonazol	531,43			
nystatin	926,10			
amfotericin B	924,08			
amfotericin B (Fungizone)	924,08			
chlorhexidin dihydrochlorid	578,37			
Triton X-100	625			
SDS (sodiumdodecylsulfát)	288,38		Serva	destilovaná voda
BAC (benzalkoniumchlorid) (50 % roztok)	337,0		Fluka	
ODDC (oktenidindihydrochlorid)	623,0	Schülke & Mayr GmbH		
CCCP (karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon)	204,6	Sigma	DMF	
FCCP (karbonylkyanid 4-(trifluorometoxy) fenylhydrazon)	254,17			
diS-C <sub>3</sub> (3) (3,3'-dipropylthiokarbocyanin jodid)	520,5	Fluka	etanol	
DM-11	308,0	Technická univerzita ve Wroclavi	destil. voda	
MRAL-12	417,0		etanol	
MRAL-14	445,0			
MRG-12	349,5			
MRG-14	377,5			
PP-11	347,5			
PPAL-12	415,0			
PPAL-14	443,0			
PPG-12	347,5			
PPG-14	375,5			
PY-11	333,5			
PYAL-12	401,0			
PYAL-14	429,0			
PYG-12	387,0			
PYG-14	415,0			



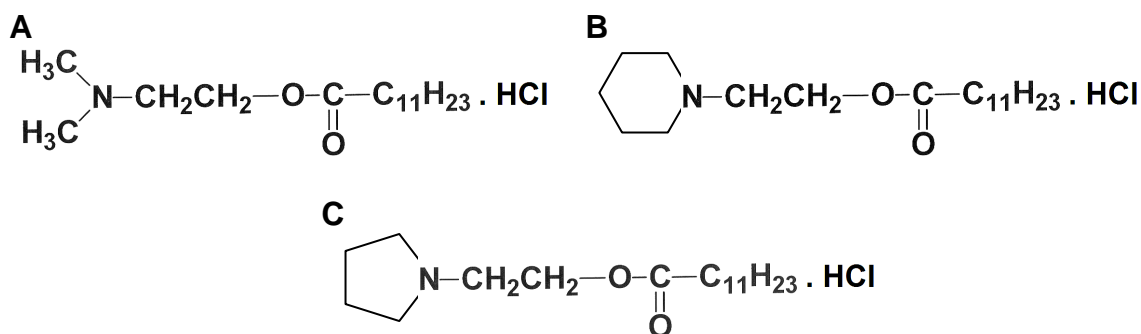
**Obr. 2-1** Chemické struktury zkoumaných látek. **(A)** fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3), **(B)** CCCP, **(C)** FCCP, **(D)** FK506, **(E)** rapamycin, **(F)** BAC, **(G)** enniatin B, **(H)** nystatin, **(I)** ODDC. Barevná konvence prvků: vodík – bílý, uhlík – šedý, dusík – modrý, kyslík – červený, fluor – žlutohnědý, síra – žlutá, chlor – zelený, jod – fialový.



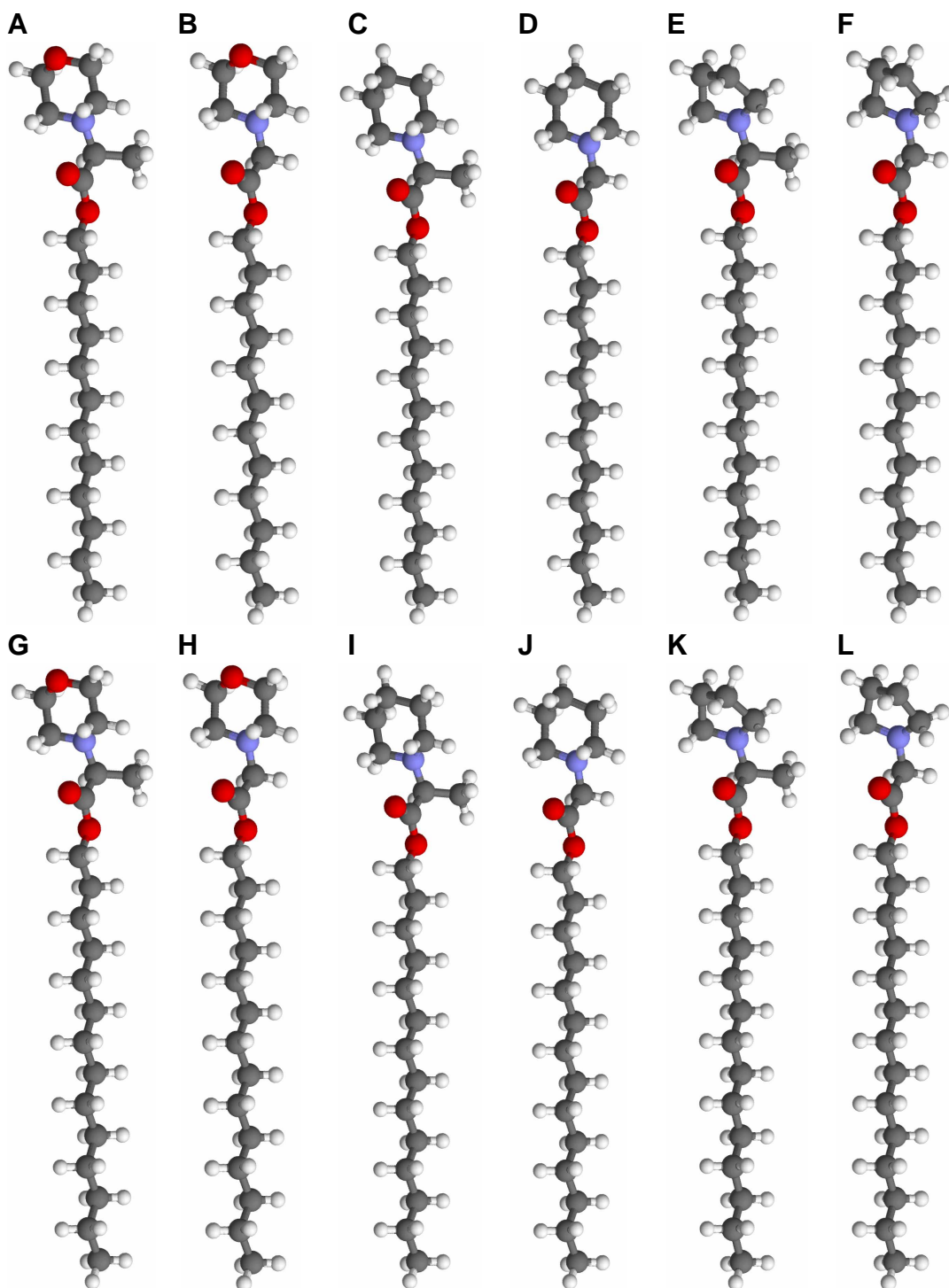


**Obr. 2-2** Strukturální vzorce vybraných látek. **(A)** Nigericin, **(B)** amfotericin B, **(C)** NQO, **(D)** flukonazol, **(E)** ketokonazol, **(F)** valinomycin, **(G)** chlorhexidin, **(H)** SDS, **(I)** Triton X-100, **(J)** gramicidin A.

Lyzozomotropní látky (obr. 2-3 a 2-4, tabulka 2-3), které inhibují činnost vakuolární ATPázy, případně dalších ATPáz a tím blokují životní pochody kvasinek (114,117,119,121,136), byly syntetizovány na Technické univerzitě ve Wroclavi (Oddělení chemie, prof. S. Witek) a laskavě darovány Dr. A. Krasowskou.



**Obr. 2-3** Strukturální vzorce lyzozomotropních látek **(A)** DM-11, **(B)** PP-11, **(C)** PY-11.



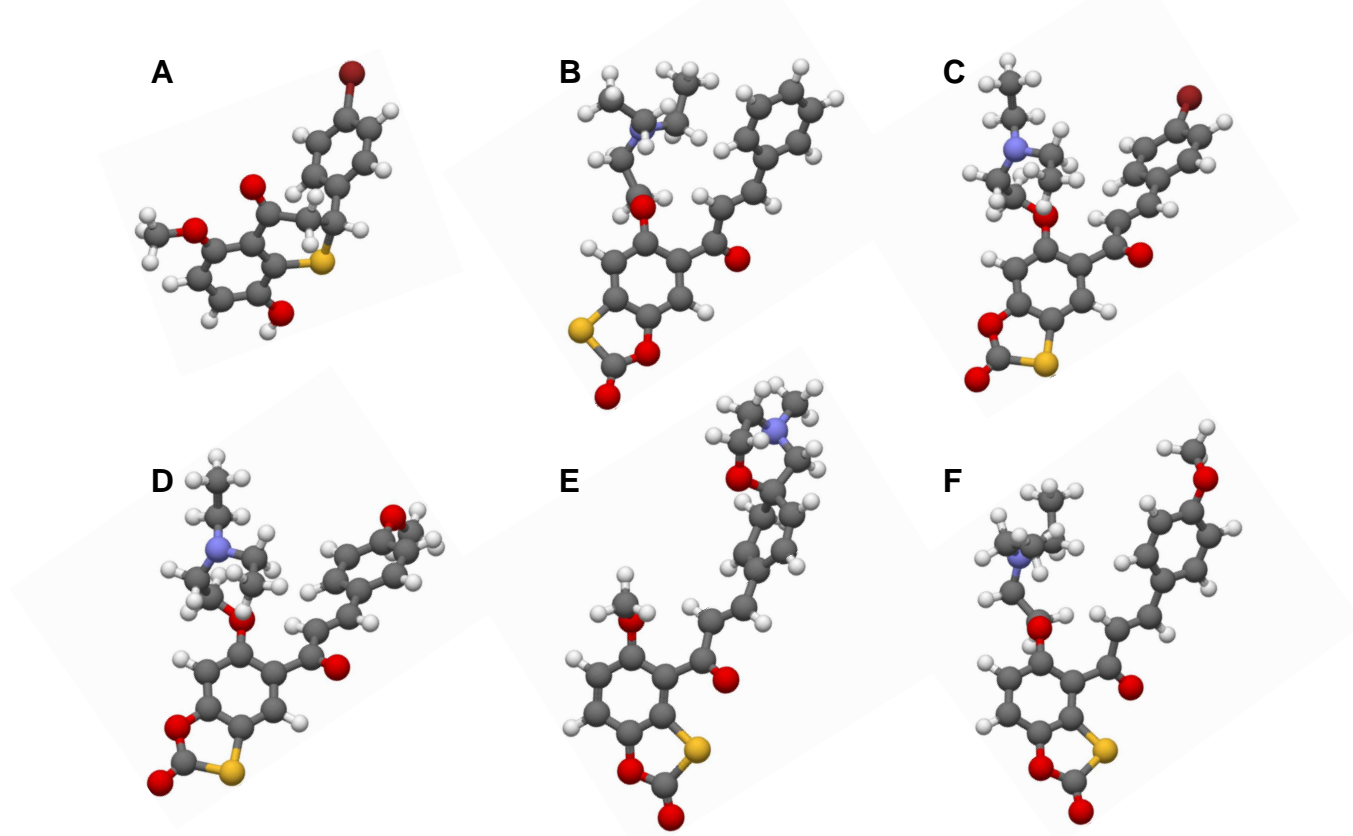
**Obr. 2-4** Struktury zkoumaných lysozomotropních látek. **(A)** MRAL-12, **(B)** MRG-12, **(C)** PPAL-12, **(D)** PPG-12, **(E)** PYAL-12, **(F)** PYG-12, **(G)** MRAL-14, **(H)** MRG-14, **(I)** PPAL-14, **(J)** PPG-14, **(K)** PYAL-14, **(L)** PYG-14. Barevná konvence prvků: vodík – bílý, uhlík – šedý, dusík – modrý, kyslík – červený<sup>1</sup>.

Struktury nově syntetizovaných chalconových derivátů (tabulka 2-4) zachycuje obr. 2-5.

<sup>1</sup> Struktury molekul na obr. 2-4 a obr. 2-5 byly optimalizovány pomocí programu Gaussian.

Tabulka 2-4: Nově syntetizované chalconové deriváty

Chemikálie	M <sub>w</sub> [g.mol <sup>-1</sup> ]	Výrobce	Rozpouštědlo
AMG-116	328,33	Medical University of Gdańsk	DMSO
AMG-129	397,13		
AMG-142	476,03		
AMG-144	427,15		
AMG-148	399,11		
AMG-154	344,43		



**Obr. 2-5** Struktury zkoumaných látek. (A) AMG-116, (B) AMG-129, (C) AMG-142, (D) AMG-144, (E) AMG-148, (F) AMG-154. Barevná konvence prvků: vodík – bílý, uhlík – šedý, dusík – modrý, kyslík – červený, síra – žlutá, brom – červenohnědý.

## 2.2. Kultivační média a roztoky

- **Kultivační médium YP**

kvasinkový extrakt      10 g  
 pepton                      10 g  
 destilovaná voda      1000 ml

- **40 % glukóza**

glukóza                      40 g  
 destilovaná voda      60 ml

- **YPD agar 1 %**

kvasinkový extrakt	10 g
pepton	10 g
agar	10 g
glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- **YPG agar 2 %**

kvasinkový extrakt	10 g
pepton	10 g
agar	20 g
glycerol	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- **YPGE agar 1 %**

kvasinkový extrakt	10 g
pepton	10 g
agar	10 g
glycerol	20 g
destilovaná voda	1000 ml

Po sterilizaci a zchladnutí agaru na cca 50°C jsme přidali 20 ml etanolu.

- **10 mM citrát-fosfátový pufr (C-P pufr)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	3,6 g
destilovaná voda	1000 ml

Přidáním vhodného množství koncentrovaného roztoku kyseliny citrónové jsme nastavili pH C-P pufru na hodnotu pH = 6,0.

- **Minimální médium pro kmen BY4741**

kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin a bez síranu amonného	1,7 g
síran amonný	5 g
kompletní aminokyselinová směs	0,79 g
glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- **Minimální médium pro kmeny BY4741[YEpmc 181] a BY4741[YEpmDR1HIS]**

kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin a bez síranu amonného	1,7 g
síran amonný	5 g
aminokyselinová směs bez leucinu	0,69 g
glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- **Minimální médium pro kmen W303-1A**

kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin a bez síranu amonného	1,7 g
síran amonný	5 g
kompletní aminokyselinová směs	0,79 g
adenin	0,02 g
glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- **Minimální médium pro kmeny W303-1A[YEpmc 181] a W303-1A[YEpmDR1HIS]**

kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin a bez síranu amonného	1,7 g
síran amonný	5 g
aminokyselinová směs bez leucinu	0,69 g
adenin	0,02 g
glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

• **Složení kvasinkového dusíkového základu bez aminokyselin a bez síranu amonného**

<b>Vitamíny [<math>\mu\text{g.l}^{-1}</math>]</b>		<b>Minerály [<math>\text{g.l}^{-1}</math>]</b>	
biotin	2	dihydrogenfosforečnan draselný	1
pantotenát vápenatý	400	síran hořečnatý bezvodý	0,5
kyselina listová	2	chlorid sodný	0,1
inozitol	2000	chlorid vápenatý bezvodý	0,1
kyselina nikotinová	400		
kyselina p-aminobenzoová	200		
pyridoxin.HCl	400		
riboflavin	200		
tiamin.HCl	400		
<b>Stopové prvky [<math>\mu\text{g.l}^{-1}</math>]</b>			
kyselina boritá	500		
síran měďnatý	40		
jodid draselný	100		
chlorid železitý	200		
síran manganatý	400		
molybdenan sodný	200		
síran zinečnatý	400		

• **Složení aminokyselinových směsí [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]**

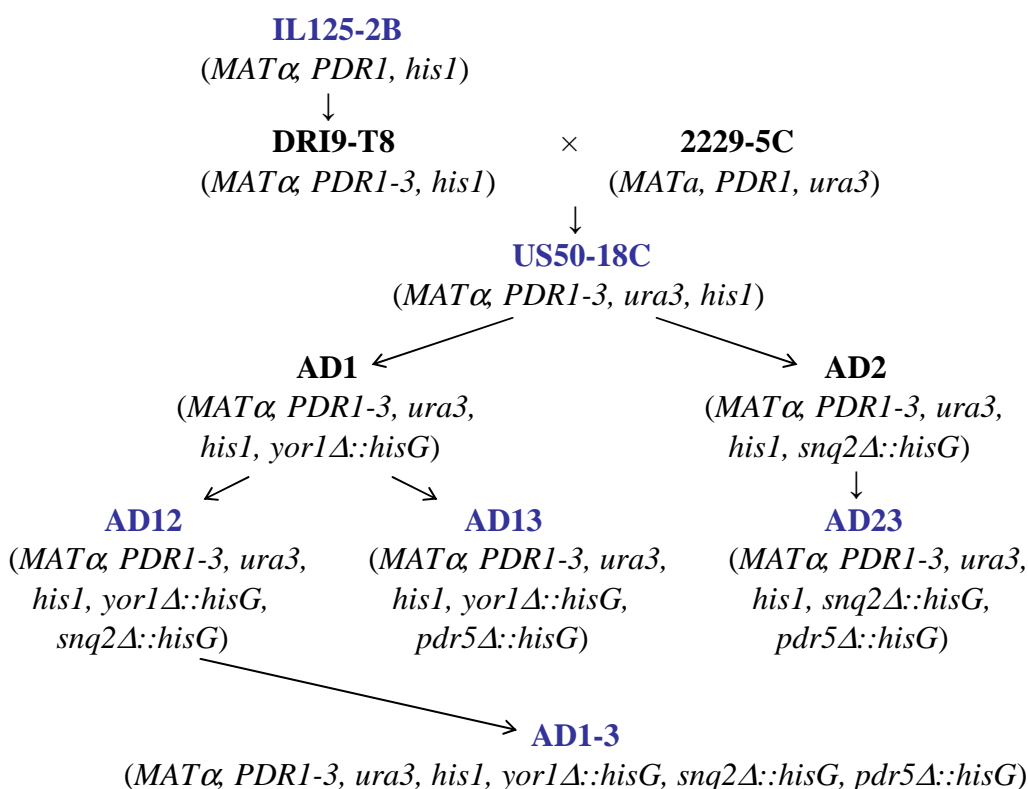
<b>Aminokyselinová směs</b>	<b>kompletní</b>	<b>bez leucinu</b>
adenin	10	10
L-arginin	50	50
L-kyselina asparagová	80	80
L-histidin.HCl	20	20
L-izoleucin	50	50
L-leucin	100	0
L-lyzin.HCl	50	50
L-metionin	20	20
L-fenylalanin	50	50
L-treonin	100	100
L-tryptofan	50	50
L-tyrozin	50	50
uracil	20	20
valin	140	140

## 2.3. Sada použitých kvasinkových kmenů

Rodičovský kmen US50-18C a jeho isogenní mutanty (tabulka 2-5, obr. 2-6) mají nadprodukcí transkripčních aktivátorů Pdr1p a Pdr3p. Přítomnost alely *PDR1-3* způsobuje nadprodukcí pump zabraňující poklesu aktivity těchto pump na konci diauxického posuvu, kdy buňky přecházejí na respirační metabolismus, a aktivita pump typická pro diauxické buňky se z velké části uchová. Kmeny označené hvězdičkou v tabulce 2-5 byly laskavě darovány prof. A. Goffeau, Chaire Internationale Blaise Pascal, Lab. Genet. Mol., École Normale Supérieure, Paříž a prof. M. Ghislain, Université Catholique de Louvain, Faculté des sciences Agronomiques, Louvain-la-Neuve, Belgique (28).

Tabulka 2-5: Kmeny kvasinek *S. cerevisiae* a jejich genetické charakteristiky

Kmen	Genotyp	Důsledek
US50-18C*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1-3, ura3, his1</i>	nadprodukce pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p
AD12*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, snq2<math>\Delta</math>::hisG</i>	nadprodukce pumpy Pdr5p
AD13*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>	nadprodukce pumpy Snq2p
AD23*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1-3, ura3, his1, snq2<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>	nadprodukce pumpy Yor1p
AD1-3*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1-3, ura3, his1, yor1<math>\Delta</math>::hisG, snq2<math>\Delta</math>::hisG, pdr5<math>\Delta</math>::hisG</i>	deletované pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p
IL125-2B*	<i>MAT<math>\alpha</math>, PDR1, his1</i>	divoký kmen
BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, met15<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0</i>	divoký kmen
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0</i>	divoký kmen
W303-1A	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, can1-100, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, mal10</i>	divoký kmen



**Obr. 2-6** Genetické vztahy mezi studovanými kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. Kmen US50-18C vznikl zkřížením kmene DRI9-T8, jehož rodičovským kmenem je IL125-2B, a kmene 2229-5C. Několikanásobné delece v US50-18C byly provedeny postupně opakovaným použitím *hisG-URA3-hisG* kazety, plazmidů pro deleci genů *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1* a následnou selekcí *ura3* auxotrofního znaku prostřednictvím 5-fluorocytové kyseliny (28,137).

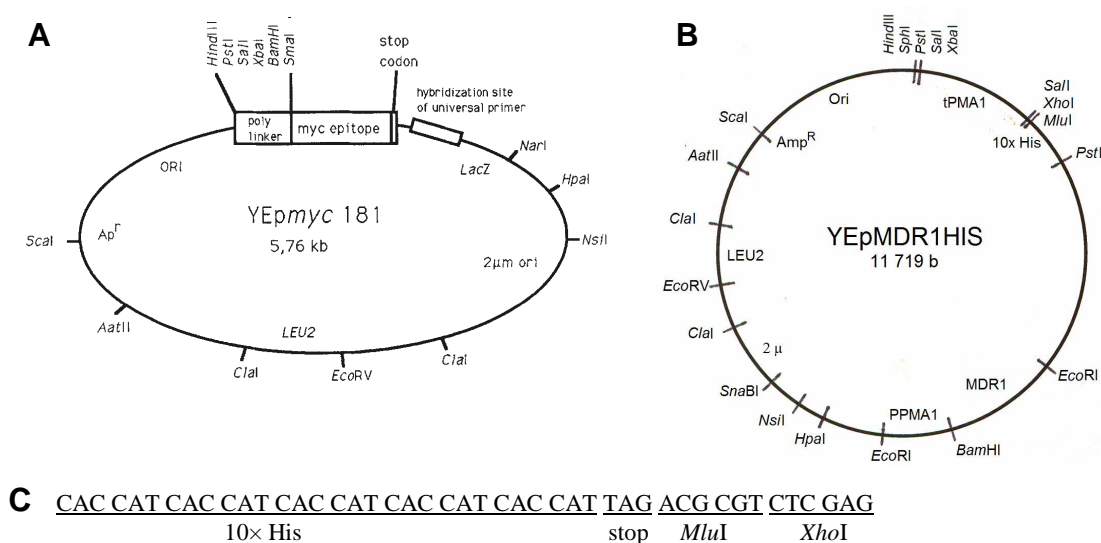
### 2.3.1. Příprava kmenů nesoucích plazmid s lidským P-gp

Do buněk kmenů BY4741 a W303-1A jsme na pracovišti RNDr. Hany Sychrové, DrSc. (Fyziologický ústav AV ČR) vložili kontrolní plazmid YE $\mu$ myc 181 (obr. 2-7A) a plazmid nesoucí gen pro lidský P-glykoprotein YE $\mu$ MDR1HIS (obr. 2-7B). Nově transformované kmeny jsou zapsané v tabulce 2-6. Oba kvasinkové kmeny i DNA kontrolního plazmidu nám laskavě poskytla RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

YE $\mu$ myc 181 (138) je kvasinkový multikopiový vektor odvozený z YE $\mu$ lac 181. YE $\mu$ myc 181 obsahuje:

- 1) Selekcí markry a replikační počátky jak pro *Escherichia coli*, tak pro *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2) Sekvenci kódující c-myc epitop následovanou stop kodonem. Tento epitop, část lidského c-myc proteinu, se používá k tvorbě rekombinantních proteinů, které lze detekovat pomocí c-myc monoklonální protilátky 9E10.
- 3) Šest specifických restrikčních míst umožňujících snadné vložení zkoumaného genu.
- 4) Univerzální komplementární sekvenci primeru pro snadné sekvenování fúzních spojení.

YE $\mu$ MDR1HIS (139) je LEU2 2- $\mu$ m plazmid obsahující konstitutivní PMA1 promotorovou oblast, MDR1 otevřený čtecí rámec s C-koncovým 10 $\times$  histidinovým přívěskem (obr. 2-7C) a PMA1 transkripční terminační sekvencí. Tento plazmid nám daroval doc. Marwan K. Al-Shawi, Ph.D. (University of Virginia Health Sciences Center, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, Charlottesville, Virginia).



**Obr. 2-7** Mapy plazmidů vložených do buněk kmenů BY4741 a W303-1A. **(A)** Mapa kontrolního kvasinkového plazmidu (138). **(B)** Mapa kvasinkového plazmidu nesoucího lidský P-glykoprotein. Multikopiový 2 $\mu$  plazmid, který je selektovatelný pomocí LEU2. P-gp je exprimován pod kontrolou silně konstitutivního PMA1 promotoru. MDR1 otevřený čtecí rámec je následován 10 histidinovými kodony (histidinový přívěšek) před stop kodonem a lemován PMA1 transkripční terminační sekvencí. **(C)** Detail histidinové sekvence plazmidu YE $\mu$ MDR1HIS.

Před samotnou transformací kvasinkových buněk jsme plazmidovou DNA namnožili v bakteriích *E. coli*. Papírek, na němž jsme obdrželi plazmid YE $\mu$ MDR1HIS, jsme ponořili do 50  $\mu$ l roztoku TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5), promíchali a po 30 min jsme roztokem s uvolněnou DNA transformovali bakterie elektroporací. Obdobně jsme postupovali s plazmidem YE $\mu$ myc 181.

Tabulka 2-6: Nově vytvořené kmeny kvasinek *S. cerevisiae*

Kmen	Charakteristika
BY4741[YE $p_{myc}$ 181]	kontrolní kmen bez P-glykoproteinu
BY4741[YE $p_{MDR1HIS}$ ]	kmen s nadprodukcí P-glykoproteinu
W303-1A[YE $p_{myc}$ 181]	kontrolní kmen bez P-glykoproteinu
W303-1A[YE $p_{MDR1HIS}$ ]	kmen s nadprodukcí P-glykoproteinu

V ledu jsme nechali roztát hustou buněčnou suspenzi kompetentních buněk *Escherichia coli* (kmen XL Blue) zamrazenou v glycerolu na  $-80^{\circ}\text{C}$  a spolu s ní jsme vychladili i elektroporační kyvety a LB médium (0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % baktotrypton, 1 % NaCl, pH 7,0). V elektroporačních kyvetách jsme opatrně promíchali 40  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze s 1 či 3  $\mu\text{l}$  plazmidové DNA (YE $p_{myc}$  181, YE $p_{MDR1HIS}$ ), kontrolní kyveta neobsahovala žádnou DNA.

Elektroporaci jsme prováděli jedním pulzem (1250 V, 8 ms) elektroporátorem Jouan GHT 1278-B. Okamžitě po elektroporaci jsme vzorky naředili 100  $\mu\text{l}$  ledového LB média a inkubovali je 10 min při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$ . Poté jsme bakterie (cca 140  $\mu\text{l}$ ) vyseli na misky s LB-Amp agarem (0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % baktotrypton, 1 % NaCl, 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicilin, 2 % agar, pH 7,0) a kultivovali 24 h při  $37^{\circ}\text{C}$ .

Do 4 ml LB-Amp média (0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % baktotrypton, 1 % NaCl, 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicilin, pH 7,0) jsme zaočkovali jednotlivé kolonie *E. coli* XL Blue[YE $p_{myc}$  181] a XL Blue[YE $p_{MDR1HIS}$ ]. Po 16 h růstu při  $37^{\circ}\text{C}$  jsme ze čtyř vzorků bakteriální suspenze izolovali plazmidovou DNA YE $p_{myc}$  181 (0,128  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 0,093  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) a YE $p_{MDR1HIS}$  (0,127  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 0,128  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; koncentraci a čistotu DNA jsme stanovili spektrofotometricky z poměrů  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  a  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  na přístroji BioPhotometer Eppendorf). Experimentální postup izolace DNA jsme schematicky znázornili na obr. 2-8.

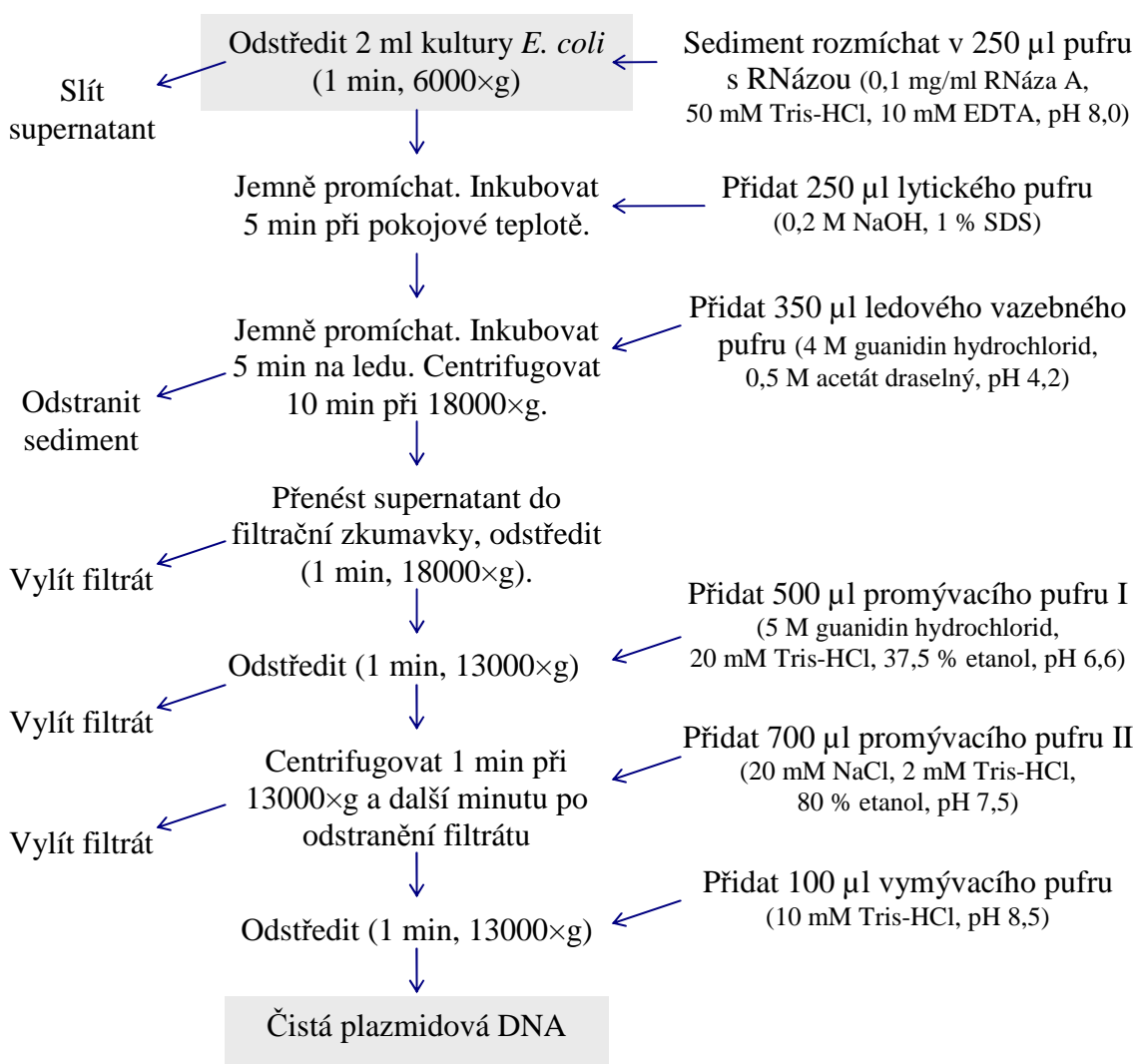
K izolaci jsme použili High Pure Plasmid Isolation Kit od firmy Roche, který je založen na alkalické dezintegraci a rozpadu buněk. Plazmidovou DNA jsme postupně uvolňovali z buněk, zatímco chromozomální DNA bakterií se zachytila v troskách buněčné stěny. Zároveň jsme odstranili bakteriální RNA RNázou A. Buněčný lyzát jsme neutralizovali a přidali k němu velké množství soli, abychom vytvořili vhodné podmínky pro navázání DNA. Chromozomální DNA utvořila sraženinu se zbytky buněk. Poté, co jsme centrifugací roztok vyčistili od buněčného odpadu a chromozomální DNA, přenesli jsme supernatant obsahující plazmidovou DNA do polypropylenových centrifugačních zkumavek se dvěma vrstvami hustě spletených skleněných vláken. Plazmidová DNA se v přítomnosti soli (guanidin hydrochloridu) specificky navázala na povrch skleněných vláken ve filtračních zkumavkách. Jelikož je tento vazebný proces specifický pro nukleové kyseliny, byla navázaná plazmidová DNA již prostá od všech kontaminujících buněčných složek. Čistou plazmidovou DNA jsme následně uvolnili vymývacím pufrem.

Velikost molekul DNA (vyloučení polámání) a čistotu (absenci RNA) jsme ověřili elektroforézou v 1 % agarózovém gelu. Pohyblivost nukleových kyselin v agarózovém gelu závisí na koncentraci agarózy a na velikosti a formě DNA. V elektrickém poli se nukleové kyseliny, které při daném pH 8 mají záporný náboj, pohybují gelem rychlostí nepřímo úměrnou své molekulární hmotnosti.

V 7,5  $\mu\text{l}$  destilované vody, 1  $\mu\text{l}$  restriční endonukleázy *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* či *BamHI* a 1,5  $\mu\text{l}$  příslušného pufru (viz tabulka 2-7) jsme 2 h při pokojové teplotě inkubovali vzorky (5  $\mu\text{l}$ ) čisté plazmidové DNA YE $p_{MDR1HIS}$ , obdobně jsme štěpili DNA YE $p_{myc}$  181 restriční endonukleázou *EcoRV*. Ve 35 ml TAE pufru (4,84 g Tris,



0,372 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 1,35 ml kyseliny octové na 1000 ml destilované vody) jsme rozežřáli 0,35 g agarózy, po vychladnutí na cca 50°C jsme roztok obarvili ethidium bromidem (0,5 µg/ml) a zalili jím hřebínky v nádobce na odlévání gelu. Ztuhlý gel jsme pokryli vrstvou TAE pufru tak, aby byl zcela ponořený, vyjmuli z něj hřebínky a do vytvořených jamek nanесли vzorky plazmidové DNA (15 µl) a DNA z bakteriofága λ štěpenou enzymem *Hind*III (5 µl; Takara Bio Inc.) jako standard.



**Obr. 2-8** Schéma izolace plazmidové DNA z bakterií *E. coli* pomocí soupravy od firmy Roche.

Abychom mohli umístit vzorky na gel ponořený v tekutině, bylo třeba vzorky smíchat s nanášecím roztokem. Ten obsahoval 1 % SDS, 50 % glycerol a 0,02 % bromfenolovou modř umožňující sledování migrace. Tento roztok zastavil enzymatickou reakci a dovolil usazení vzorků na dno startovacích jamek. Objem nanášecího roztoku, který bylo nutné přidat k jednotlivým vzorkům, činil zhruba čtvrtinu až pětinu objemu samotného vzorku. Po nanesení vzorků jsme zapnuli zdroj stejnosměrného napětí (90 V) a nechali probíhat elektroforézu po dobu 2 h. Gel jsme vyfotografovali pod UV světlem (obr. 2-9).

Štěpením DNA YEpMDR1HIS restriční endonukleázou *Eco*RV by podle informací od doc. Marwana K. Al-Shawiho, Ph.D. a obr. 2-7B měl vzniknout pouze jeden fragment o velikosti 11,7 kb. Avšak z obr. 2-9B (4) a (5) vyplývá, že výsledkem jsou dva fragmenty. Enzymy *Eco*RI, *Pst*I a *Bam*HI však rozštěpily DNA plazmidu

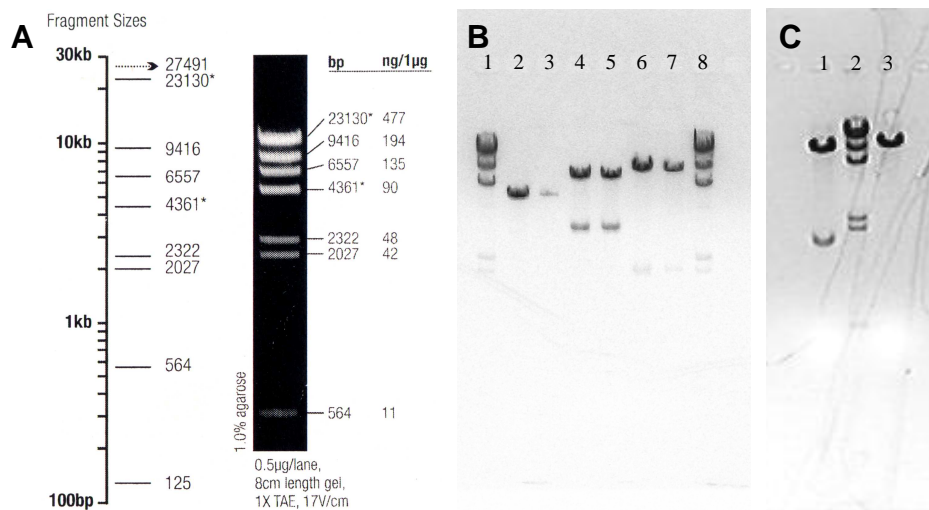
podle očekávání (obr. 2-9B a C) a lze tedy předpokládat, že plazmid YEpMDR1HIS nebyl poškozen (nevznikly nežádoucí zlomy) a došlo pouze k chybnému zakreslení sekvencí štěpených restrikční endonukleázou *EcoRV* v ručně malovaném nákresu od doc. Al-Shawiho.

Tabulka 2-7: Restrikční endonukleázy s příslušnými pufrů pro štěpení DNA (vše od firmy Fermentas)

Restrikční endonukleáza a štěpená sekvence	Reakční pufr	Rozpouštědlo
<i>EcoRI</i> 5'...G <sup>↓</sup> A A T T C...3' 3'...C T T A A <sub>↓</sub> G...5'	Pufr <i>EcoRI</i> <sup>+</sup> : 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,02 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA	10 mM Tris-HCl (pH 7,4 při 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 50 % glycerol
<i>EcoRV (Eco32I)</i> 5'...G A T <sup>↓</sup> A T C...3' 3'...C T A <sub>↓</sub> T A G...5'	Pufr R <sup>+</sup> : 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA	
<i>PstI</i> 5'...C T G C A <sup>↓</sup> G...3' 3'...G <sub>↓</sub> A C G T C...5'	Pufr 0 <sup>+</sup> : 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA	
<i>BamHI</i> 5'...G <sup>↓</sup> G A T C C...3' 3'...C C T A G <sub>↓</sub> G...5'	Pufr <i>BamHI</i> : 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA	

Získanou plazmidovou DNA jsme transformovali kvasinkové buňky kmenů BY4741 a W303-1A. Kvasinky obou kmenů jsme 16 h aerobně kultivovali v 80 ml bohatého média (1 % kvasinkový extrakt, 2 % pepton, 2 % glukóza) při teplotě 30°C. Buňky jsme po celou dobu přípravy na elektroporaci uchovávali v ledu. Promyli jsme je sterilní destilovanou vodou (4 min, 3200 ot./min), rozmíchali v 8 ml 25 mM DL-dithiothreitolu (Sigma) a třepali 15 min při laboratorní teplotě. Poté jsme je odstředili, promyli ledovou sterilní destilovanou vodou, posléze i ledovým elektroporačním pufrem TpEB (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 270 mM sacharóza, pH 7,5). Takto připravené kvasinky jsme resuspendovali v 800 µl TpEB a rozdělili do elektroporačních kyvet, v nichž jsme 100 µl kvasinkové suspenze opatrně promíchali s 3 µl, tj. 0,384 µg plazmidové DNA (YEpmyc 181, YEpMDR1HIS), kontrolní kyveta neobsahovala žádnou DNA.

Elektroporaci jsme prováděli jedním pulzem (625 V, 24 ms) elektroporátorem Jouan GHT 1278-B. Okamžitě po elektroporaci jsme vzorky naředili 100 µl ledové sterilní destilované vody a inkubovali je 15 min při laboratorní teplotě. Poté jsme kvasinky (200 µl) vyseli na misky s vhodným YNB agarem podle auxotrofie kmenů (0,67 % kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin, 2 % glukóza, 2 % agar, 20 µg/ml histidin, 20 µg/ml metionin, 20 µg/ml uracil pro kmeny BY4741[YEpmyc 181] a BY4741[YEpMDR1HIS], nebo 0,67 % kvasinkový dusíkový základ bez aminokyselin, 2 % glukóza, 2 % agar, 20 µg/ml adenin, 20 µg/ml histidin, 20 µg/ml tryptofan, 20 µg/ml uracil pro kmeny W303-1A[YEpmyc 181] a W303-1A[YEpMDR1HIS]) a kultivovali je při 30°C. Po třech dnech růstu jsme kolonie přečárkovali a kultivovali dalších 48 h při 30°C.



**Obr. 2-9** Elektroforéza DNA fragmentů plazmidů YEpmDR1HIS a YEpmc 181 na agarózovém gelu. (A) Standard s udáním velikostí a ng množství DNA jednotlivých fragmentů v 1 µg λ DNA/HindIII Marker, 2. (B) (1) Standard: λ DNA štěpená HindIII, (2, 3) vzorky YEpmc181 štěpené enzymem EcoRV (5,7 kb), (4, 5) enzym EcoRV rozštěpil vzorky YEpmDR1HIS na 2 fragmenty, (6, 7) vzorky YEpmDR1HIS štěpené endonukleázou EcoRI (2,1 kb a 9,6 kb), (8) standard. (C) (1) Vzorek YEpmDR1HIS štěpený enzymem PsI (2,0 kb a 9,7 kb), (2) standard λ DNA/HindIII, (3) DNA YEpmDR1HIS rozštěpená enzymem BamHI (11,7 kb).

V následujících kapitolách jsme s ohledem na větší přehlednost popsali pouze přípravu vzorků a metody měření pro kmeny AD12, AD13, AD23, AD1-3, US50-18C, IL125-2B, BY4742 a W303-1A pěstované v bohatých médiích. Obdobně jsme zacházeli s kmeny BY4741[YEpmc 181], BY4741[YEpmDR1HIS], W303-1A[YEpmc 181], W303-1A[YEpmDR1HIS] a s netransformovanými kmeny BY4741 a W303-1A jen s přihlédnutím k požadavkům, které jsou kladeny na složení jejich růstových médií (tj. minimální média, viz kapitola 2.2) a vyplývají z genotypů zmiňovaných kmenů.

## 2.4. Příprava a uchovávání kvasinkových kultur

### 2.4.1. Příprava a uchovávání zásobních kvasinkových kultur

Buněčné kultury jsme uchovávali při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  v médiu obsahujícím 60 g glycerolu, 10 g glukózy, 2 g peptonu, 1 g kvasinkového extraktu na 100 ml. Sterilní kličkou jsme kvasinky přenesli na misky s 1 % YPD agarem a kultivovali dva dny při teplotě  $30^{\circ}\text{C}$  v inkubátoru Raven 2. Misky s kvasinkovými kulturami jsme uchovávali při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$  maximálně po dobu jednoho měsíce.

### 2.4.2. Příprava vzorků pro měření

Do 10 ml YP média s 2 % glukózou (YPD médium) jsme pomocí sterilní kličky přenesli malé množství zásobní kultury. Buňky jsme aerobně kultivovali v reciproké třepací lázni 24 h při  $30^{\circ}\text{C}$ .

Malý objem (1 – 10  $\mu$ l) inokula jsme zaočkovali do 10 ml čerstvého YPD média a buňky jsme kultivovali v třepací lázni při 30°C dokud nedosáhly požadované exponenciální fáze růstu. Nebo jsme do YPD média přidali takové množství inokula, aby výsledná koncentrace buněk byla  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml (odpovídající hodnota  $OD_{578} = 0,2$ )<sup>1</sup>. Kvasinky jsme kultivovali v třepací lázni po dobu 22 h při 30°C, čímž jsme získali buňky v post-diauxické fázi růstu. Buňky jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (1 min, 3000 ot./min, Heraeus Instruments Megafuge 1.0) a resuspendovali v C-P pufru (pH 6,0) na  $OD_{578} = 0,1$ .

## 2.5. Měření růstových křivek

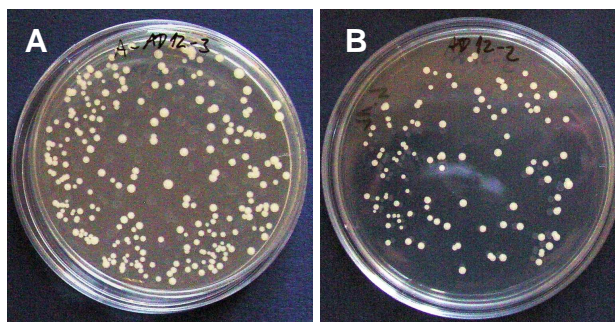
Při měření růstových křivek jsme po zaočkování 50 ml YPD média inokulem příslušného kmene kvasinek odečítali hodnoty  $OD_{578}$  narostlé kultury v hodinových intervalech po dobu 40 až 45 hodin. Vzorky buněčných suspenzí jsme ředili 10 – 25 $\times$ , abychom měřili OD v lineárním rozsahu přístroje Novaspec II, tj.  $OD_{578} < 0,4$ . Růstovou křivku jsme získali vynesáním naměřených hodnot  $OD_{578}$  v závislosti na době růstu kultury.

## 2.6. Biologické metody

Biologické testy (výsevový a zónový test) jsme prováděli ve sterilním prostředí za použití sterilního materiálu.

### 2.6.1. Výsevový test

Buňky jsme připravili podle kapitoly 2.4.2. Kvasinky z exponenciální fáze růstu jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (2 min, 2800 ot./min) a naředili C-P pufrém na  $OD_{578} = 0,1$ . Poté jsme buněčnou suspenzi rozdělili po 1 ml do mikrozku mávek typu Eppendorf. Jeden vzorek sloužil jako kontrola, do ostatních vzorků jsme přidali zkoumané látky o zvolených koncentracích. Buňky jsme za občasného míchání inkubovali s danými látkami při pokojové teplotě.



**Obr. 2-10** Výsledek výsevového testu. (A) Kontrolní vzorek. (B) Na misku byly vysety buňky, které byly vystaveny účinku zkoumané látky.

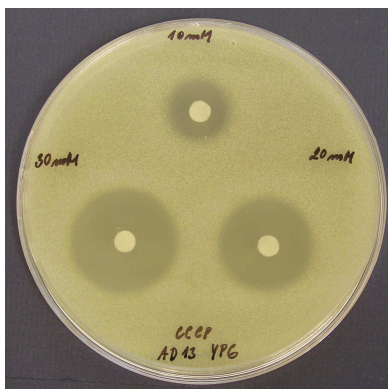
<sup>1</sup> Optickou hustotu jsme měřili na vlnové délce  $\lambda = 578$  nm ( $OD_{578}$ ) na spektrofotometru Novaspec II.

Zpravidla každých 10 min jsme 10  $\mu$ l vzorku stokrát naředili v destilované vodě, 10  $\mu$ l buněčné suspenze jsme nanесли na Petriho misku (průměr 6 cm) s 1 % YPD agarem a rozetřeli sterilní hokejkou. Vzorky jsme vysívali na tři misky, abychom získali větší statistický soubor. Po 48 h kultivace při 30°C v inkubátoru Raven 2 jsme stanovili počet kolonií. Množství přežívajících buněk vystavených účinku testované látky v porovnání s kontrolním vzorkem vypovídá o letálním účinku zkoumané látky na buňky (neschopnost tvořit kolonie). Výsledek výsevového testu je zobrazen na obr. 2-10.

## 2.6.2. Zónový test

Pomocí zónových testů jsme zjišťovali, zda jsou látky substráty pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p. Buňky jsme kultivovali podle kapitoly 2.4.2. Kvasinky z post-diauxické fáze růstu jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (2 min, 2800 ot./min) a resuspendovali v C-P pufru (pH 6,0). Poté jsme do 1 % YPD nebo 1 % YPGE agarů přidali takový objem kvasinkové suspenze, aby výsledná koncentrace buněk byla  $2,5 \cdot 10^6$  buněk/ml. Na Petriho misku (průměr 10 cm) s pevným 2 % YPG agarem jsme nanесли 1 % agar se zaočkovanou kulturou (teplota agaru by měla být přibližně 45°C). Misky jsme ponechali 20 min pootevřené, na ztuhlý povrch agarů jsme umístili kolečka z filtračního papíru, na která jsme nanесли 2  $\mu$ l zkoumané látky.

Abychom určili, zda je látka schopná inhibovat odstraňování známého substrátu (nigericin pro Pdr5p a Yor1p, NQO pro Snq2p) pumpami, nanесли jsme dvě látky na totéž kolečko. Testovanou látku (taktéž 2  $\mu$ l) jsme přidali 15 min po aplikaci známého substrátu. Po dvou dnech růstu při 30°C v inkubátoru Raven 2 jsme misky vyfotografovali a změřili velikosti růstových inhibičních zón. Ukázka výsledku zónového testu je na obr. 2-11.



**Obr. 2-11** Výsledek zónového testu. Velikost zóny se zvětšuje v závislosti na rostoucí koncentraci zkoumané látky.

## 2.7. Stanovení obsahu glukózy v živných médiích během růstu kvasinkových kultur

Ke stanovení obsahu glukózy v tekutých médiích a v pevných půdách jsme využili komerčně dostupnou soupravu určenou k enzymatickému stanovení glukózy

v séru, plazmě a moči BIO LA TEST Glukosa liquid 1000, její složení je uvedeno v tabulce 2-8.

V přítomnosti glukosaoxidázy je glukóza oxidována na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje v přítomnosti peroxidázy s 4-aminoantipyrinem a fenolem za vzniku chinoniminového barviva. Intenzita vzniklého růžového zbarvení je úměrná koncentraci glukózy.

Tabulka 2-8: Složení a výkonnostní charakteristiky činidla k enzymatickému stanovení glukózy (BIO LA TEST Glukosa liquid 1000, Pliva-Lachema Diagnostika, s.r.o.)

Složení		Výkonnostní charakteristiky	
fosfátový pufr (pH 7,5)	250 mmol/l	linearita:	do 22 mmol/l
fenol	5 mmol/l	mez detekce:	0,05 mmol/l
4-aminoantipyrin	0,5 mmol/l	dolní mez	0,16 mmol/l
glukosaoxidáza	> 167 $\mu$ kat/l	stanovitelnosti:	
peroxidáza	> 16,7 $\mu$ kat/l	pracovní rozsah:	0,16 – 22 mmol/l

Výrobce doporučuje provádět měření v 1 cm kyvetě při vlnové délce 500 nm či 546 nm. Po smíchání vzorku a reakční směsi v objemovém poměru 1/101 se vzorek inkubuje 10 min při 37°C, nebo 20 min při 20 – 25°C, během 60 min by se měla změřit absorbance vzorku. Výkonnostní charakteristiky činidla udávané výrobcem jsou zapsány v druhé části tabulky 2-8.

V následujících dvou kapitolách jsou popsány námi vyvinuté postupy, jimiž je možno změřit pomocí činidla BIO LA TEST Glukosa liquid 1000 spotřebu glukózy během růstu kvasinkových kultur jak v kapalných médiích, tak v pevných půdách. Lze tak např. přesně stanovit okamžik vyčerpání glukózy z živného média, změnu metabolismu z převážně fermentativního na oxidativní a přechod kultury do diauxické fáze růstu. Nebo lze za použití činidla určit růstovou fázi u kultur rostoucích na agaru a synchronizovat tak růst jednotlivých kmenů např. při zónových testech, což je jinak jen obtížně proveditelné.

### 2.7.1. Měření koncentrace glukózy v tekutých médiích

Kvasinky jsme kultivovali podle kapitoly 2.4.2., po zaočkování 50 ml YPD média inokulem příslušného kmene jsme v hodinových intervalech odebírali vzorky kultury (100  $\mu$ l) do mikrozkuhavek. Okamžitě jsme vzorky buněčných suspenzí odstředili a smíchali 10  $\mu$ l supernatantu s 1 ml činidla BIO LA TEST Glukosa liquid 1000. Po 20 min inkubace při laboratorní teplotě jsme reakční směs 2 $\times$  naředili destilovanou vodou a změřili absorbanci roztoku při 546 nm (500 nm) na absorpčním spektrometru Novaspec II. Aktuální koncentraci glukózy v živném médiu jsme určili z kalibrační křivky.

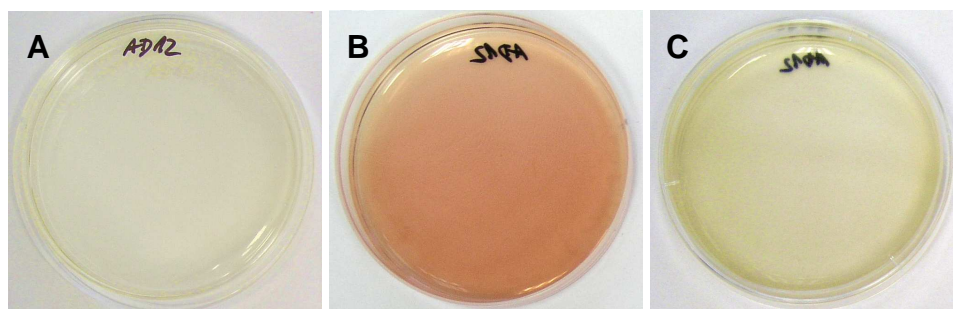
### 2.7.2. Stanovení obsahu glukózy v pevných půdách

Buňky jsme kultivovali podle kapitoly 2.4.2. Kvasinky z post-diauxické fáze růstu jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (2 min, 2800 ot./min) a resuspendovali v C-P pufru (pH 6,0). Poté jsme do 1 % YPD agaru přidali takový objem kvasinkové suspenze, aby výsledná koncentrace buněk byla 2,5.10<sup>6</sup> buněk/ml. Na několik Petriho misek (průměr 6 cm) jsme nalili 5 ml agaru se zaočkovanou kulturou. Po zatuhnutí



agaru jsme misky kultivovali v inkubátoru při 30°C, v přibližně hodinových intervalech jsme odebírali jednotlivé misky pro stanovení spotřeby glukózy během růstu kvasinkové kultury.

Na Petriho misku jsme nanесли 1 ml reakčního činidla, po 20 min inkubace při laboratorní teplotě jsme 200  $\mu$ l z reakční směsi 10 $\times$  naředili destilovanou vodou a změřili absorbanci roztoku při 546 nm. Na obr. 2-12 je předvedeno stanovení spotřeby glukózy kvasinkovými kulturami během růstu na pevných půdách.



**Obr. 2-12** Ukázka stanovení obsahu glukózy v pevných půdách. (A) Miska se zaočkovanou kulturou před stanovením obsahu glukózy. (B) Důkaz přítomnosti glukózy v živném médiu na počátku růstu kultury. (C) Po 21 h růstu kultury již není přítomna žádná glukóza v živném médiu.

## 2.8. Stanovení míry permeability plazmatické membrány buněk pomocí UV absorpce

Míru a časový vývoj poškození plazmatické membrány způsobené různými depolarizujícími či permeabilizujícími látkami jsme stanovovali podle toho, zda po jejich účinku vytékaly z buněk skrz narušenou membránu molekuly ATP (adenosin 5-trifosfát; absorpční maximum  $\lambda = 260$  nm), nebo dokonce peptidy či proteiny obsahující aromatické aminokyseliny (detekovatelné okolo 280 nm). Absorpční spektra jsme měřili v spektrálním rozsahu 190 – 400 nm v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm a s korekcí na destilovanou vodu absorpčním spektrofotometrem Varian Cary 50.

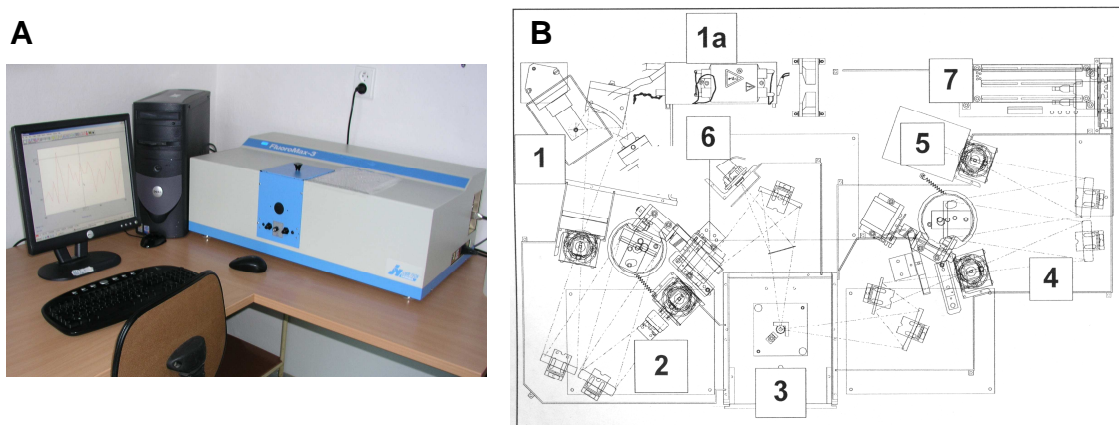
Kvasinky jsme napěstovali a promyli podle kapitoly 2.4.2., na OD = 0,1 jsme je však naředili v destilované vodě nikoli v C-P pufru. Po přidání testované látky k buněčné suspenzi jsme z ní postupně odebírali v několikaminutových intervalech vzorky (3 nebo 20 ml), které jsme odstředili a 2 ml supernatantu jsme podrobili přímému měření absorpce.

Jestliže však látka, jejíž účinek na plazmatickou membránu jsme chtěli studovat, silně absorbovala záření v klíčové oblasti 250 – 300 nm, museli jsme ji před samotným měřením absorpce ze vzorku odstranit. Proto jsme sediment připravený podle výše popsaného postupu z 20 ml kvasinkové suspenze resuspendovali v 1,5 ml čisté destilované vody, po 10 min inkubace jsme buňky opět odstředili a změřili absorpční spektrum supernatantu doplněného destilovanou vodou v poměru 2:1. Tím jsme zajistili, že z buněk unikaly molekuly ATP (a jiných metabolitů) po konstantní dobu, množství uniklých látek bylo závislé nejen na rozsahu poškození membrány (velikosti a četnosti poruch v plazmatické membráně), ale i na zbývajících zásobách ATP v buňce.

## 2.9. Měření barvení buněk fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3)

### 2.9.1. Metoda barvicích křivek

Buňky jsme připravili podle kapitoly 2.4.2. Potenciometrickou sondu diS-C<sub>3</sub>(3) ( $10^{-5}$  M zásobní roztok v etanolu) jsme přidávali k 3 ml kvasinkové suspenze (v plastových květech PMMA, optická dráha 1 cm) na konečnou koncentraci  $2 \cdot 10^{-8}$  M. Emisní spektra jsme měřili při pokojové teplotě každé 3 – 5 min na spektrofluorimetru Fluoromax – 3 (JobinYvon – skupina HORIBA) vybaveném xenonovou lampou (obr. 2-13). Excitační vlnová délka byla 531 nm, emisní oblast 560 – 590 nm, změření jednoho spektra trvalo 20 s, rozptýlené záření jsme eliminovali oranžovým skleněným filtrem s cutoff vlnovou délkou 540 nm.



**Obr. 2-13** (A) Spektrofluorimetr Fluoromax – 3. (B) Schéma uspořádání optických prvků ve spektrofluorimetru Fluoromax – 3, (1) xenonová lampy, (1a) zdroj energie xenonové lampy, (2) excitační monochromátor, (3) vzorkový prostor, (4) emisní monochromátor, (5) detektor signálu (fotonásobič), (6) referenční detektor (fotodiody a modul sbírající proud), (7) regulátor přístroje napojený na počítač.

Rychlost a rozsah nahromadění sondy uvnitř buněk, tzv. barvicí křivka, popisuje závislost vlnové délky fluorescenčního emisního maxima  $\lambda_{\max}$  nebo intenzity  $I_{\max}$  na čase od přidání fluorescenční sondy k buněčné suspenzi (31,140). Účinek testovaných látek jsme studovali na základě porovnání barvicích křivek kontrolních vzorků a buněk ovlivněných danou látkou. Metodu barvicích křivek jsme použili ve dvou různých variantách – buď jsme zkoumanou látku přidali k obarveným buňkám po 20 min barvení vzorků (*diS-C<sub>3</sub>(3) assay* → diSA), nebo jsme ji přidali ke kvasinkové suspenzi již několik minut (5 – 20 min) před začátkem měření barvicí křivky (*diS-C<sub>3</sub>(3) assay before* → diSAB). Vzorky jsme občas jemně promíchali. Experimentální uspořádání nám dovoľovalo měřit až dvanáct barvicích křivek současně.

Komunikaci mezi počítačem a spektrofluorimetrem zajišťoval program DataMax a program HUGO vyvinutý Mgr. Tomášem Hendrychem, Ph.D. Program HUGO třídil naměřená spektra podle příslušnosti k jednotlivým vzorkům a ukládal je chronologicky podle času změření. Dále tento program umožňoval zpracování dat; naměřené spektrum proložil polynomem 3. stupně metodou nejmenších čtverců, vyloučil body, které se lišily o více než 10 % od naitované hodnoty, poté okolí maxima ( $\pm 8$  nm) opět proložil polynomem a z jeho parametrů vypočetl maximum  $\lambda_{\max}$ . Z takto



stanovených hodnot  $\lambda_{\max}$  po sobě jdoucích spekter sestavil barvicí křivky. Program dovoľoval i prohlížení spekter a ruční opravy vypočtených hodnot  $\lambda_{\max}$  (141).

## **2.9.2. Měření časově závislého účinku látek na kvasinky pomocí fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3)**

Buňky jsme připravili podle kapitoly 2.4.2. Kvasinky nejčastěji z post-diauxické fáze růstu jsme naředili C-P pufrem na  $OD_{578} = 0,1$ , pro jeden experiment bylo zapotřebí 400 - 500 ml buněčné suspenze v závislosti na počtu vzorků. Před začátkem samotného experimentu jsme odebrali čtyři kontrolní vzorky, jejichž barvicí křivky se měřily po celou dobu trvání experimentu. Jeden ze vzorků sloužil jako kontrola a do zbylých vzorků jsme přidali zkoumanou látku o zvolených koncentracích.

Buněčnou suspenzi jsme rozdělili na čtyři díly – na kontrolu a tři vzorky, do nichž jsme přidali zkoumanou látku o třech různých koncentracích (popřípadě různé látky). Po přidání látky jsme buněčné suspenze míchali magnetickými míchadly a v několikaminutových intervalech z nich odebírali vzorky po 10 ml. V centrifugačních zkumavkách jsme je 10× naředili destilovanou vodou a centrifugovali 1 minutu při 3000 ot./min. Supernatant jsme odsáli a buňky opět naředili C-P pufrem na  $OD_{578} = 0,1$ .

Ke 2,5 ml takto připravené kvasinkové suspenze jsme přidali fluorescenční sondu diS-C<sub>3</sub>(3) na konečnou koncentraci  $2 \cdot 10^{-8}$  M, vzorky jsme občas jemně promíchali a změřili jejich barvicí křivky (podle kapitoly 2.9.1.). Obvykle jsme ke vzorkům přidávali ve 45. minutě barvení tzv. CD koktejl (5  $\mu$ M CCCP + 10  $\mu$ M DM-11). Z průběhu barvicích křivek mezi 20. a 45. minutou jsme stanovili hodnotu  $\lambda_{\max}$  ve 40. minutě barvení,  $\lambda_{\max/40}$ , jejíž časová závislost je vynesena v grafech spolu s hodnotou  $\lambda_{\max/CD}$  (průměrná hodnota barvení po přidání CD koktejlu).

## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1. Specifikace úkolů disertační práce

Nadměrné používání antibiotik, antimykotik, ale i dezinfekčních přípravků v posledních desetiletích vedlo k vývoji mikrobiální rezistence vůči těmto látkám. V současné době představuje léková rezistence velice závažný medicínský problém především při léčbě mikrobiálních infekcí u pacientů se sníženou imunitou spjatou s AIDS, s transplantacemi orgánů a kostní dřeně, komplikuje však i léčbu rakoviny. Příčinou mnohačetné lékové rezistence je odstraňování léčiva z buňky membránovými transportéry – MDR pumpami. Řešením této situace je vývoj nových léků, které by nebyly substráty těchto pump, nebo nalezení jejich účinných inhibitorů. Takovéto inhibitory by bylo možné podávat pacientům spolu s konvenčními léky na léčbu bakteriálních a kvasinkových infekcí či nádorů. V konečném důsledku by kombinovaná terapie mohla vést k používání léků v nižších koncentracích a omezení jejich případných negativních vedlejších účinků.

Jinou alternativu v boji s lékovou rezistencí představují tzv. povrchově aktivní látky, jejichž cílem jsou povrchové struktury patogenních buněk. Permeabilizací cytoplazmatické membrány či narušením buněčné stěny způsobují rychlou smrt buněk, a minimalizují tak možnost vzniku rezistence v důsledku vnitrobuněčné modifikace léku nebo jeho cíle, popřípadě jeho odstranění MDR pumpami.

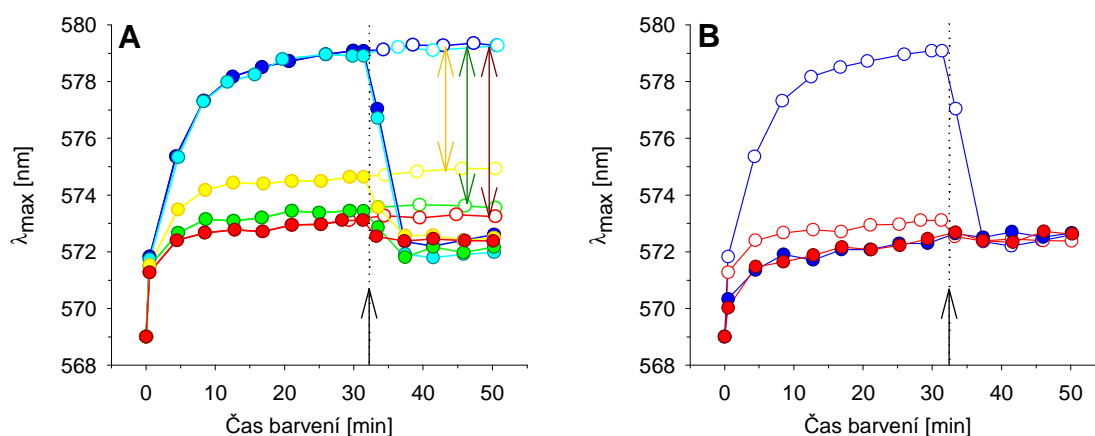
Hlavním úkolem první části předkládané disertační práce bylo hledání nových inhibitorů MDR pump Pdr5p a Snq2p pomocí metody barvicích křivek, která byla vyvinuta v uplynulých letech na Fyzikálním ústavu UK. Tato fluorescenční metoda (*diS-C<sub>3</sub>(3) assay* → diSA) využívá potenciometrickou fluorescenční sondu diS-C<sub>3</sub>(3), která je substrátem Pdr5p a Snq2p, a dovoluje sledovat s vysokou citlivostí a v reálném čase nejen změny v aktivitě obou pump, ale i případný dopad zkoumaných látek na membránový potenciál kvasinek. Metodu barvicích křivek se nám podařilo dále rozvinout díky objevení diagnostického nástroje, tzv. CD koktejlu, který nám umožňuje snadno rozpoznat buňky s permeabilizovanou membránou od intaktních buněk (hyperpolarizovaných, depolarizovaných, s inhibovanými MDR pumpami). Část této kapitoly je věnována i vyhledávání účinných inhibitorů H<sup>+</sup>-ATPázy, která je taktéž vhodným cílem antimykotik, jelikož její správná funkce je nezbytná pro život kvasinkových buněk. Otestovali jsme skupinu strukturálně podobných látek ve snaze najít společné rysy molekul, které jsou rozhodující pro inhibici činnosti jak H<sup>+</sup>-ATPázy, tak Pdr5p a Snq2p.

V následující kapitole 3.3. jsme se zabývali studiem mechanismu účinku povrchově aktivních látek. Vyvinuli jsme metodu (*diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay* → diS-TDEA), pomocí níž je možné detailně detekovat průběh působení povrchově aktivních látek na kvasinky. Buňky jsou vystaveny působení zkoumané látky pouze po jistý čas, poté je látka z buněčné suspenze odstraněna a kvasinky jsou obarveny fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3). Díky tomuto jednoduchému principu můžeme nejen sledovat průběh poškození buněčné stěny a membrány kvasinek povrchově aktivními látkami, ale i účinky různých látek na aktivitu H<sup>+</sup>-ATPázy (kapitola 3.4.) a interakci MDR inhibitorů s cílovými proteiny (kapitola 3.5.). Naskýtá se nám tak jedinečný pohled na interakci substrátu/inhibitoru s MDR transportním proteinem a na strukturu jeho vazebného místa.

Závěrečná část disertační práce popisuje nové aplikace diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescenční metody. Kvasinkové transportéry Pdr5p a Snq2p vykazují jistou sekvenční podobnost s pumpami Cdr1p a Cdr2p patogenní kvasinky *C. albicans* i se savčím P-glykoproteinem. Navíc řada substrátů/inhibitorů pumpy Pdr5p interaguje i s P-glykoproteinem. Zajímalo nás tedy, zda jedním z těchto sdílených substrátů je i naše fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3). Poslední kapitolu jsme věnovali zkoumání skupiny strukturně podobných nově syntetizovaných látek, u nichž byla zaznamenána schopnost ovlivňovat aktivitu Cdr1p a Cdr2p u *C. albicans*.

## 3.2. Vyhledávání inhibitorů pump Pdr5p a Snq2p pomocí metody barvicích křivek

Všechny současné systémy pro vyhledávání nových inhibitorů Pdr5p jsou založeny na stejném principu – rozdílne akumulaci testovacího substrátu v buňkách s nadprodukcí pumpy Pdr5p v přítomnosti a v nepřítomnosti inhibitorů. Inhibitory způsobují stejné nahromadění testovacího substrátu uvnitř těchto buněk jako u isogenního kmene postrádajícího pumpu Pdr5p. Ani v případě naší fluorescenční metody tomu není jinak.



**Obr. 3-1** Dvojí uspořádání metody barvicích křivek. (A) Detekce aktivity pump Pdr5p a Snq2p. Rozdíl barvicích křivek exponenciálních buněk kmenů bez aktivních pump AD1-3 (modré) či AD23 (tyrkysové symboly) a kmenů s aktivními pumpami AD12 (Pdr5p; zelené symboly), AD13 (Snq2p; žluté symboly) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p; červené symboly) udává aktivitu MDR pump, její velikost zobrazují příslušné barevné šipky. Šipka spolu s tečkovanou čarou označuje okamžik přidání tzv. CD koktejlu (5  $\mu$ M CCCP a 10  $\mu$ M DM-11) k buňkám (plné symboly). (B) Ekvivalence výsledků metody diSAB (plné symboly), při níž byl CD koktejl přidán k buňkám kmenů AD1-3 (modré) a US50-18C (červené symboly) 10 min před přidáním sondy, a diSA (prázdné symboly), v níž přidání CD koktejlu k již obarveným buňkám vyznačuje šipka a tečkovaná čára.

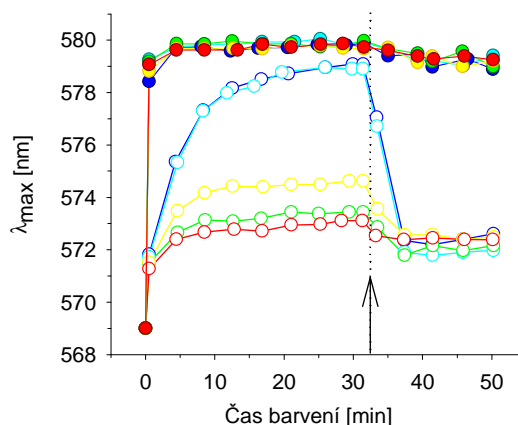
Naše fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3), která pasivně vstupuje do buněk v závislosti na velikosti membránového potenciálu, je zároveň substrátem pump Pdr5p a Snq2p kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Metoda barvicích křivek využívá rozdílne akumulace sondy diS-C<sub>3</sub>(3) v buňkách kmenů s pumpami Pdr5p a/nebo Snq2p (kmeny AD12, AD13 a US50-18C) oproti buňkám, u nichž byly geny *PDR5* a *SNQ2* deletovány (kmeny AD1-3 a AD23) (obr. 3-1A). K popisu vnitrobuněčné koncentrace diS-C<sub>3</sub>(3) byl vybrán parametr  $\lambda_{\max}$  – vlnová délka maxima fluorescenčního emisního signálu (viz

kapitola 2.9.). Rostoucí vnitrobuněčná koncentrace je doprovázena postupným posuvem  $\lambda_{\max}$  směrem k delším vlnovým délkám (červený posuv); naopak odstraňování sondy pumpami vede ke snížení vnitrobuněčné koncentrace a modrému posuvu (128).

Buňky kmenů AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p, Snq2p) se barví mnohem méně než buňky kmenů AD1-3 a AD23, protože sonda je z nich aktivně odstraňována pumpami (129,130). Jelikož je membránový potenciál těchto pěti isogenních mutantů nacházejících se ve stejné růstové fázi totožný (129), je rozdíl v barvení odrazem aktivity daných pump (obr. 3-1A).

Důležitou součástí našeho měřicího protokolu se stal tzv. CD koktejl skládající se z protonoforu CCCP a inhibitoru  $H^+$ -ATPázy DM-11. Jeho přidání k intaktním již obarveným buňkám vede k výrazné depolarizaci, jež se projeví prudkým poklesem  $\lambda_{\max}$  (obr. 3-1A). Depolarizujeme-li buňky CD koktejlem dříve než je obarvíme sondou diS-C<sub>3</sub>(3) (*diS-C<sub>3</sub>(3) assay before* → diSAB; obr. 3-1B), dosáhneme téže konečné hodnoty  $\lambda_{\max}$  jako v případě, kdy CD koktejl přidáme až k obarveným buňkám (*diS-C<sub>3</sub>(3) assay* → diSA). To tedy znamená, že studované látky můžeme k buňkám přidávat *před*, ale i *po* jejich obarvení fluorescenční sondou, záleží čistě na naší volbě. Speciálním případem, kdy je výhodnější uplatnit právě diSAB postup, jsme se zaobírali v kapitole 3.6.2.

V případě permeabilizovaných buněk je situace zcela odlišná (obr. 3-2). Permeabilizované buňky se vyznačují nulovým membránovým potenciálem a masivním únikem kationtů z cytosolu, který významně zvyšuje vazebnou kapacitu cytosolových komponent pro sondu, to vede k výraznému posuvu  $\lambda_{\max}$  směrem k delším vlnovým délkám ihned po přidání sondy (126). Navíc u permeabilizovaných buněk nehrají MDR pumpy žádnou roli, barvicí křivky všech pěti kmenů jsou identické bez ohledu na přítomnost pump (obr. 3-2). A co je nejdůležitější, přidání CD koktejl k permeabilizovaným buňkám nezpůsobuje na rozdíl od intaktních buněk pokles v barvení.

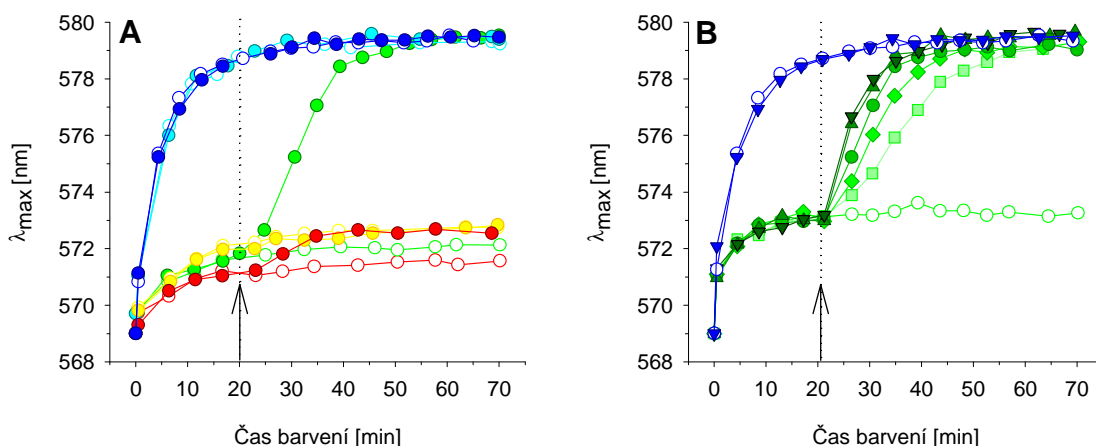


**Obr. 3-2** Permeabilizace buněk tepelným šokem (plné symboly) před přidáním sondy k buňkám kmenů AD12 (zelené), AD13 (žluté), AD23 (tyrkysové), AD1-3 (modré) a US50-18C (červené symboly). Kontrolní intaktní buňky – prázdné symboly. Šipka s tečkovanou čarou označuje přidání CD koktejl.

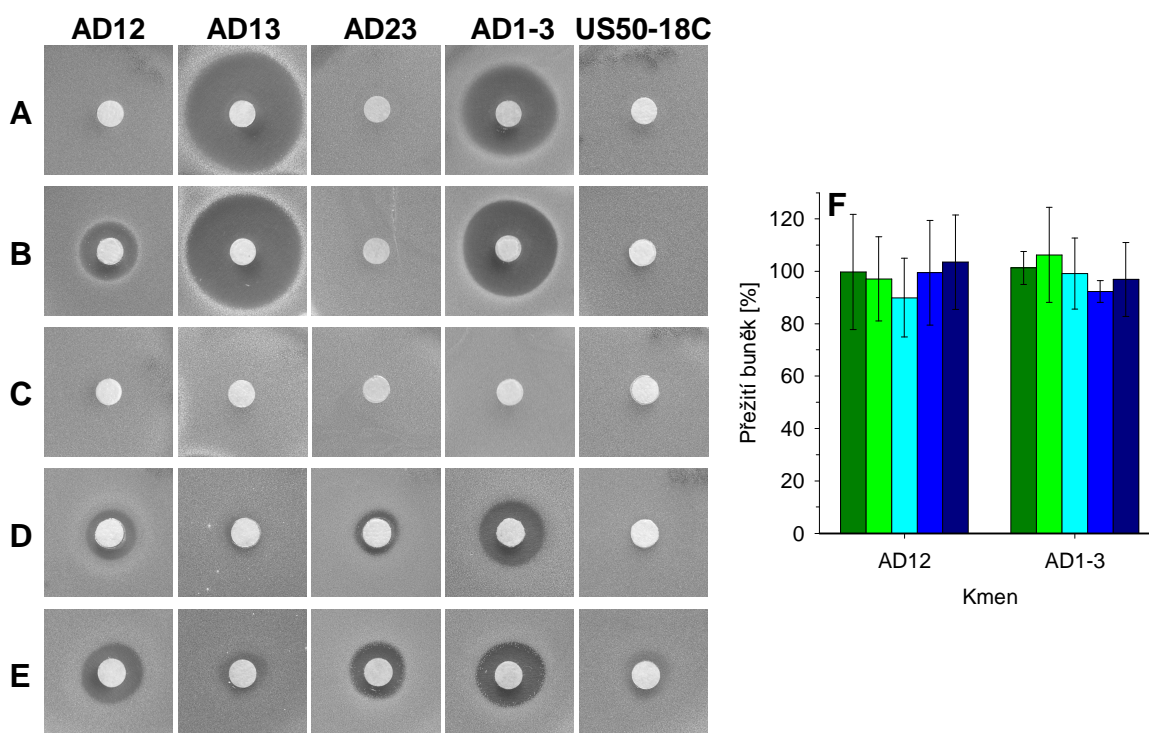
### 3.2.1. Látky interagující s pumpou Pdr5p

Použitelnost naší fluorescenční metody pro vyhledávání nových inhibitorů MDR pump jsme demonstrovali na příkladu známého inhibitoru (substrátu) pumpy Pdr5p – imunosupresantu FK506 (22,23,142). Přidání 5  $\mu$ M FK506 k buňkám kmenů AD1-3 a AD23 postrádajícím pumpy Pdr5p a Snq2p nezpůsobuje žádné změny v barvení, tudíž tato látka neovlivňuje membránový potenciál kvasinek (obr. 3-3A), zatímco přidání

FK506 k buňkám kmene AD12 vede ke splynutí barvicí křivky s křivkou negativní kontroly AD1-3 (a AD23). To svědčí o inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p.

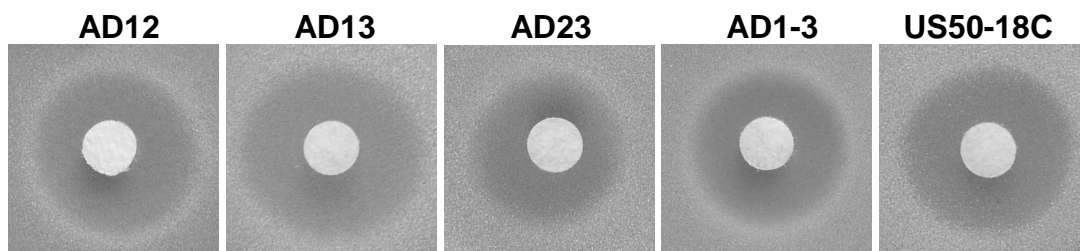


**Obr. 3-3** FK506 inhibuje činnost pumpy Pdr5p. (A) Barvicí křivky raně exponenciálních buněk AD1-3 (modré), AD23 (tyrkysové), AD12 (zelené), AD13 (žluté) a US50-18C (červené symboly), ke kterým byla ve 20. minutě přidána 5  $\mu\text{M}$  FK506. Prázdné symboly představují kontrolní vzorky bez FK506. (B) Barvicí křivky buněk AD12 (zelené symboly) po přidání různých koncentrací FK506 (prázdná kolečka – 0  $\mu\text{M}$  FK506; čtverečky – 1  $\mu\text{M}$  FK506; kosočtverečky – 3  $\mu\text{M}$  FK506; plná kolečka – 5  $\mu\text{M}$  FK506; trojúhelníčky – 7  $\mu\text{M}$  FK506; obrácené trojúhelníčky – 10  $\mu\text{M}$  FK506) a AD1-3 (modrá kolečka – bez FK506; obrácené trojúhelníčky – 10  $\mu\text{M}$  FK506). Šipky s tečkovanými čarami vyznačují přidání FK506.



**Obr. 3-4** FK506 neovlivňuje přežívání buněk. (A - E) Inhibiční zóny<sup>1</sup> kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti různých látek: (A) 20 mM nigericin (substrát Pdr5p a Yor1p), (B) 20 mM nigericin a 50 mM FK506, (C) 50 mM FK506, (D) 1,5 mM NQO a 50 mM FK506, (E) 1,5 mM NQO (substrát Snq2p). (F) Přežívání buněk AD12 a AD1-3 vystavených působení 1  $\mu\text{M}$  (tmavě zelené sloupce), 3  $\mu\text{M}$  (zelené sloupce), 7  $\mu\text{M}$  (tyrkysové sloupce), 30  $\mu\text{M}$  (modré sloupce) a 393  $\mu\text{M}$  FK506 (tmavě modré sloupce).

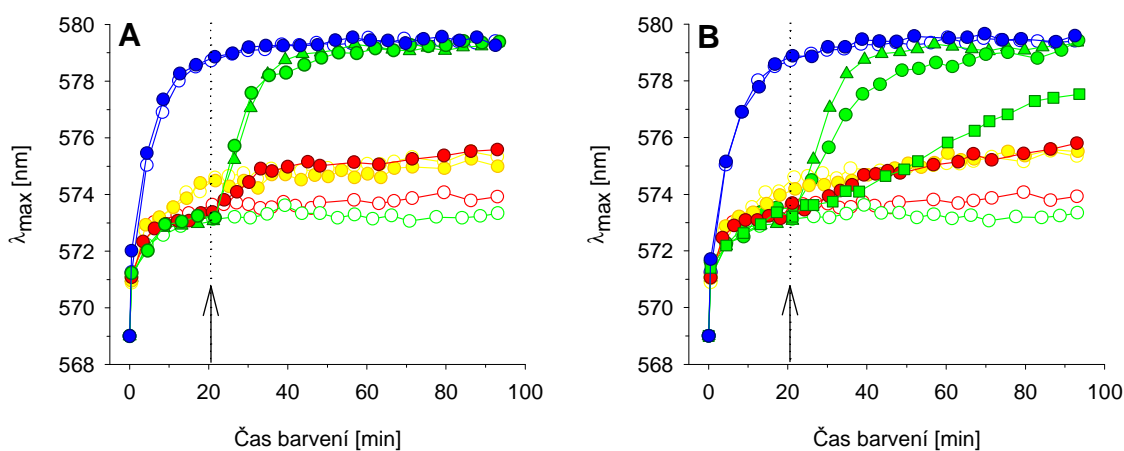
<sup>1</sup> Všechny zónové testy byly prováděny s použitím YPD svrchního agaru, pokud není výslovně uvedeno u obrázku použit jiného typu svrchního agaru.



**Obr. 3-5** Rapamycin zastavuje buněčný cyklus kvasinek v G1 fázi nezávisle na činnosti MDR pump. Inhibiční zóny kmenů AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p), AD23 (Yor1p), AD1-3 (bez pump), US50-18C (Pdr5p, Snq2p, Yor1p) v přítomnosti 20  $\mu\text{M}$  rapamycinu.

Barvicí křivka buněk AD13, které mají pouze pumpu Snq2p, není na rozdíl od buněk AD12 ovlivněna přidáním FK506 (obr. 3-3A), FK506 tedy nemá žádný vliv na aktivitu pumpy Snq2p. U rodičovského kmene US50-18C majícího obě pumpy způsobuje FK506 nárůst  $\lambda_{\text{max}}$  na úroveň obarvení buněk AD13 v důsledku inhibice pumpy Pdr5p (obr. 3-3A). Jasně jsme tak prokázali, že makrocyclický lakton FK506 interaguje výhradně s pumpou Pdr5p.

Jak je vidět na obr. 3-3B, rychlost barvení buněk AD12 roste v závislosti na koncentraci FK506. Při 7  $\mu\text{M}$  a vyšší koncentraci FK506 již není barvení buněk AD12 dále závislé na koncentraci látky a barvicí křivky se stávají rovnoběžnými s těmi pozorovanými u negativní kontroly, tj. barvení buněk je dáno pouze membránovým potenciálem (31). Jinými slovy tato koncentrace je dostatečná pro okamžitý inhibiční efekt. Při nízkých koncentracích FK506 nastává inhibice postupně, jak látka prochází skrz buněčnou stěnu.



**Obr. 3-6** Porovnání inhibičního účinku enniatinu B a rapamycinu s vlivem FK506 na MDR pumpy. Barvicí křivky AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly) buněk ze střední exponenciální fáze. (A) Barvicí křivky bez přidání inhibitorů (prázdná kolečka) a s 5  $\mu\text{M}$  enniatinem B (plná kolečka) v porovnání s účinkem 5  $\mu\text{M}$  FK506 u buněk AD12 (trojúhelníčky). (B) Barvicí křivky bez inhibitorů (prázdná kolečka) a s 20  $\mu\text{M}$  rapamycinem (plná kolečka). Zelené čtverečky představují buňky kmene AD12 s 5  $\mu\text{M}$  rapamycinem a trojúhelníčky reprezentují 5  $\mu\text{M}$  FK506. Šipky s tečkovanými čarami označují okamžik přidání látek.

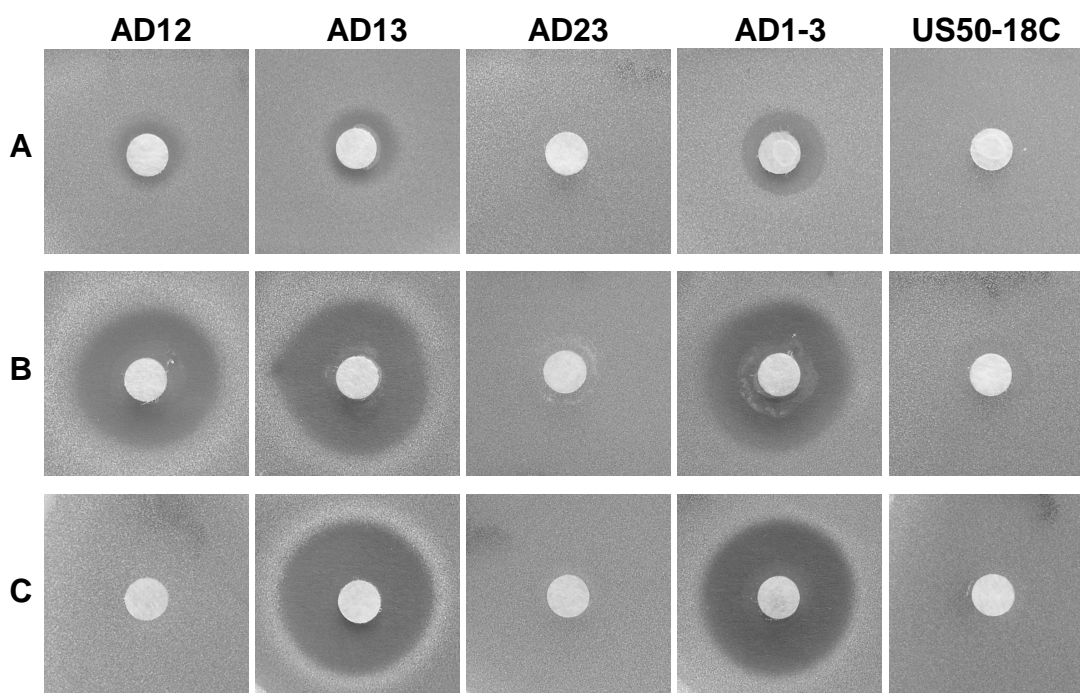
Pomocí metody barvicích křivek můžeme určit minimální koncentraci látky, při níž nastává okamžitá a úplná inhibice. Pro praktické uplatnění inhibitorů MDR pump, je však důležité také vědět, zda inhibitor má vliv na funkci a integritu membrány. Prvotní indikátor takovýchto vedlejších efektů je změna membránového potenciálu. Metoda barvicích křivek umožňuje nejen detekovat inhibici pump, ale nezávisle zjišťovat i vliv látky na membránový potenciál. Látka může u obarvených buněk s nulovou aktivitou



pump vyvolat změny v  $\lambda_{\max}$  – modrý posuv naznačuje depolarizaci plazmatické membrány, zatímco červený posuv je projevem hyperpolarizace nebo permeabilizace membrány. FK506 je příkladem ideálního inhibitoru Pdr5p, nijak neovlivňuje membránový potenciál, což vypovídá o jejím minimálním dopadu na funkci a integritu membrány.

O FK506 je známo, že inhibuje transport některých aminokyselin (převážně tryptofanu, ale i histidinu a leucinu) (22,23,143), ale ani při vysokých koncentracích neovlivňuje přežívání našich tryptofan-prototrofních kmenů ve výsevových a v zónových testech (obr. 3-4). FK506 netvoří žádné inhibiční zóny (obr. 3-4C), důvodem však není špatná difúze agarem, jak se lze přesvědčit z obr. 3-4B, který dokazuje inhibici pumpy Pdr5p. Mimoto zónový test potvrdil, že FK506 neinteraguje ani s pumpou Snq2p, ani s Yor1p.

Účinek FK506 na kvasinky jsme porovnali s působením enniatinu B, nedávno objeveného inhibitoru pumpy Pdr5p (144), a rapamycinu, strukturního analogu FK506 (obr. 2-1). Rapamycin nebyl dosud testován jako substrát (inhibitor) MDR pump kvasinek, ale je o něm známo, že stejně jako FK506 interaguje s lidským P-glykoproteinem (145). Vliv rapamycinu na MDR pumpy nelze zkoumat konvenčními biologickými metodami založenými na množení buněk (obr. 3-5), neboť rapamycin nevratně zastavuje růst *S. cerevisiae* v G1 fázi buněčného cyklu (146) i ve velmi nízkých koncentracích (tvoří růstové inhibiční zóny i při desetkrát nižší koncentraci, než jaká byla použita na obr. 3-5) bez ohledu na činnost pump.



**Obr. 3-7** Enniatin B je substrátem pumpy Yor1p a kompetitivním inhibitorem pumpy Pdr5p. Inhibiční zóny kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti různých látek: (A) 50 mM enniatin B, (B) 50 mM enniatin B v kombinaci s 20 mM nigericinem, (C) 20 mM nigericin (známý substrát Pdr5p a Yor1p).

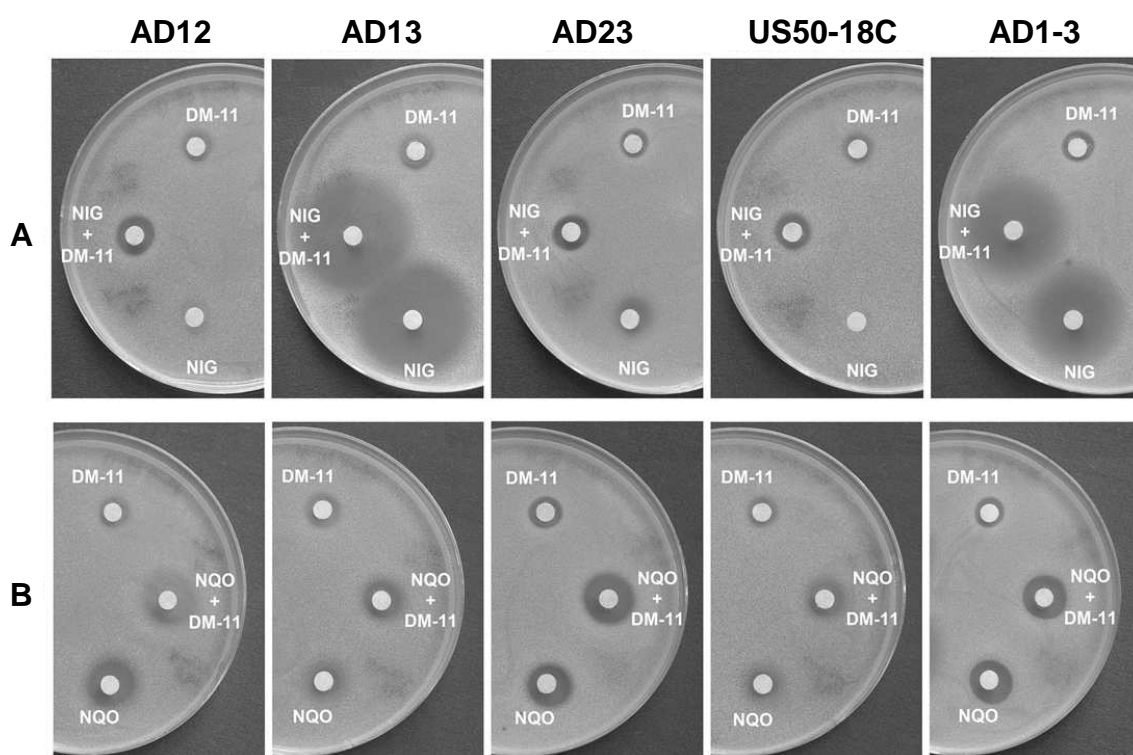
Zatímco inhibiční účinek enniatinu B a FK506 je při téže koncentraci (5  $\mu$ M) prakticky identický (obr. 3-6A), rapamycin inhibuje pumpu Pdr5p mnohem pomaleji i při čtyřnásobné koncentraci (obr. 3-6B). Stejně tak jako FK506 neovlivňuje ani jedna z těchto dvou látek činnost pumpy Snq2p či velikost membránového potenciálu (obr. 3-6).

S ohledem na strukturální podobnost FK506 a rapamycinu (145) lze předpokládat stejně rychlý průchod obou látek skrz buněčnou stěnu, pomalejší barvení v případě rapamycinu je pak výsledkem jeho slabší schopnosti inhibovat transport sondy pumpou Pdr5p. Je zřejmé, že metodu barvicích křivek můžeme využít nejen k rychlému nalezení inhibitorů pump Pdr5p a Snq2p, ale i k vzájemnému porovnání účinností jednotlivých inhibitorů.

Zónový test ukázal, že enniatin B kompetitivně inhibuje transport nigericinu, substrátu pump Pdr5p a Yor1p, pumpou Pdr5p (obr. 3-7B), nikoli však pumpou Yor1p, přestože je enniatin B substrátem také této pumpy, jak vyplývá z obr. 3-7A. Pravděpodobně obsazují enniatin B a nigericin totéž vazebné místo v Pdr5p, ale nikoli v Yor1p (24). Pumpa Yor1p má podobnou organizaci domén jako lidský P-glykoprotein. I když je uspořádání domén pumpy Pdr5p reverzní oproti dříve zmíněným transportérům, sdílí Pdr5p s P-glykoproteinem řadu inhibitorů. Lze tedy očekávat, že by se enniatin B mohl vázat na lidský P-glykoprotein stejně jako FK506 a inhibovat mnohačetnou lékovou rezistenci v rakovinných buňkách.

### 3.2.2. Látky, které nemají vliv na aktivitu pump Pdr5p a Snq2p

Nezbytnou součástí vývoje naší fluorescenční metody bylo ověření, zda mohou látky neinteragující s pumpami ovlivňovat membránový potenciál, aniž by narušovaly schopnost pump transportovat sondu diS-C<sub>3</sub>(3). Pro tento účel jsme zvolili lyzozomotropní látku DM-11, o níž je známo, že inhibuje činnost kvasinkové plazmatické H<sup>+</sup>-ATPázy (136).

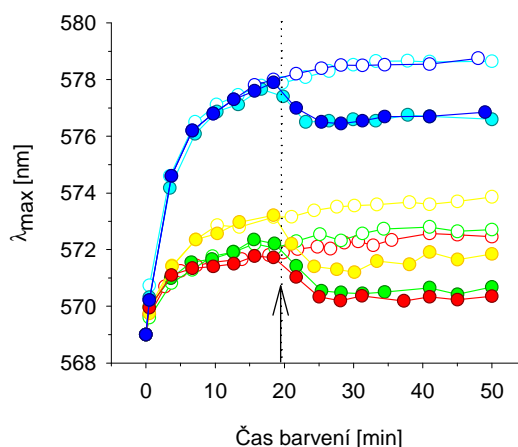


**Obr. 3-8** DM-11 není ani substrátem, ani inhibitorem žádné z trojice pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p. V zónovém testu jsme použili YPGE svrchní agar. **(A)** Růstové inhibiční zóny kmenů s různými pumpami (AD12, AD13, AD23 a US50-18C) a AD1-3 (negativní kontrola) vystavených působení 30 mM DM-11, 20 mM nigericinu (NIG; substrát Pdr5p a Yor1p), a jejich kombinaci. **(B)** Inhibiční zóny kmenů AD12, AD13, AD23, US50-18C a AD1-3 v přítomnosti DM-11 (30 mM), NQO (3,26 mM; substrát Snq2p) a jejich kombinace.



Někteří autoři (25,121) uvádějí, že delece genů *PDR5*, *SNQ2* a *YOR1* zvyšuje citlivost buněk k DM-11, neboli že tato látka je substrátem pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p. Naše data však tento závěr vyvracejí, DM-11 neinteraguje s žádnou z pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p ani jako substrát, ani jako inhibitor (obr. 3-8). Inhibiční zóny vytvořené v přítomnosti DM-11 a nigericinu (obr. 3-8A), substrátu Pdr5p a Yor1p, či NQO (obr. 3-8B), substrátu Snq2p, jsou podobně velké jako zóny samotných látek, čili DM-11 není inhibitor těchto pump. DM-11 není ani substrátem žádné z trojice pump, neboť tvoří stejně velké inhibiční zóny u všech kmenů.

Fluorescenční měření (obr. 3-9) prozrazuje, že DM-11 skutečně snižuje membránový potenciál ve stejné míře u kmenů majících pumpy Pdr5p anebo Snq2p (AD12, AD13, US50-18C) jako u kmenů, které je postrádají (AD1-3, AD23). DM-11 tedy neovlivňuje aktivitu pump, tj. jejich schopnost odstraňovat sondu z buněk a pokles  $\lambda_{\max}$  po přidání DM-11 odráží pouze rozsah inhibice  $H^+$ -ATPázy.



**Obr. 3-9** Inhibitor  $H^+$ -ATPázy DM-11 snižuje membránový potenciál buněk, avšak neovlivňuje aktivitu pump Pdr5p a Snq2p. Barvicí křivky buněk AD12 (zelené), AD13 (žluté), AD23 (tyrkysové), AD1-3 (modré) a US50-18C (červené symboly) ze střední exponenciální fáze. Prázdné symboly – bez DM-11; plné symboly – 10  $\mu$ M DM-11. Šipka spolu s tečkovanou čarou označuje čas přidání DM-11.

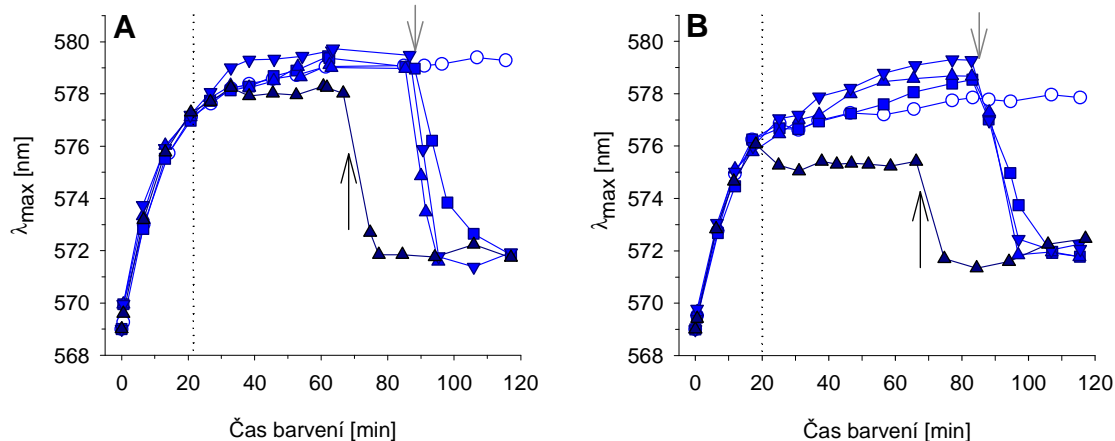
### 3.2.3. Vliv CCCP a FCCP na kvasinkové buňky

#### 3.2.3.1. Protonofor CCCP aktivuje $H^+$ -ATPázu v plazmatické membráně kvasinek

Protonofor CCCP se často používá k posouzení stavu buněk (134), na rozdíl od permeabilizovaných buněk narušuje CCCP protonový gradient intaktních buněk a způsobuje tak výraznou depolarizaci jejich membrán. Přidání různých koncentrací CCCP k buňkám AD1-3 ze střední exponenciální fáze překvapivě nevyvolalo žádný pokles v barvení (obr. 3-10A), ba naopak u nejvyšší koncentrace jsme pozorovali slabý nárůst v  $\lambda_{\max}$ . Tento koncentračně závislý nárůst v barvení je ještě zřetelnější u pozdně exponenciálních buněk (obr. 3-10B), které mají nižší membránový potenciál (130).

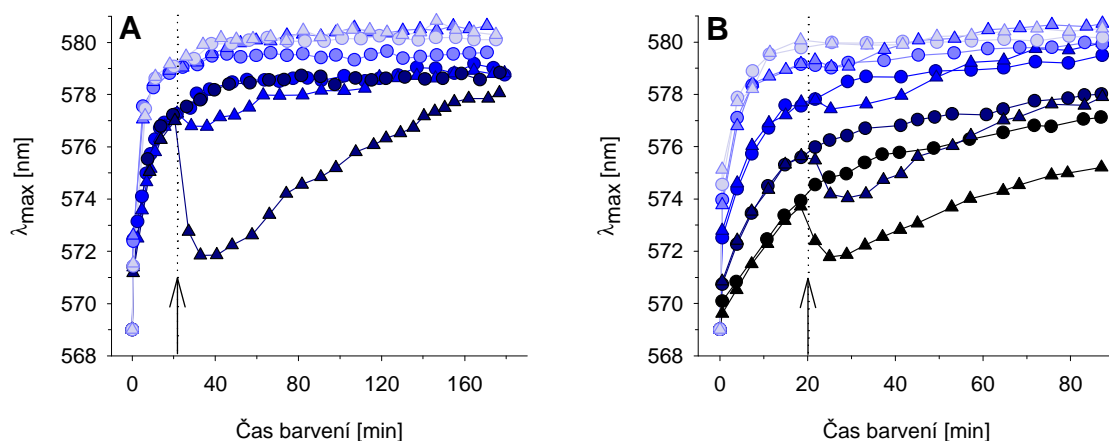
Nejpravděpodobnějším vysvětlením tohoto jevu je zvýšení membránového potenciálu (hyperpolarizace membrány). CCCP patří mezi lipofilní slabé kyseliny (147), které okyselují vnitřní prostředí buňky a tím rychle indukují aktivaci  $H^+$ -ATPázy.  $H^+$ -ATPáza může být aktivována řadou látek – glukózou (97), slabými kyselinami (99), mastnými kyselinami se středně dlouhými řetězci (148) a právě protonoforem CCCP (149). Spoluúčast inducibilní pumpy Pdr12p, která odstraňuje anionty slabých kyselin z cytosolu, můžeme vyloučit, protože odstraňování aniontů CCCP by samo o sobě

nezvýšilo membránový potenciál (27,150). Navíc naše kultivační a experimentální podmínky prakticky zabraňují výskytu tohoto transportéru v plazmatické membráně (27). Indukce Pdr12p, regulovaná War1p transkripčním faktorem (151) (ale ne Pdr1p a Pdr3p (27)), je pozorována pouze při stresu způsobeném některými slabými organickými kyselinami (152).



**Obr. 3-10** Protonofor CCCP aktivuje  $H^+$ -ATPázu. (A) Vliv přidání CCCP a DM-11 (nezávisle na pořadí) na barvení buněk kmene AD1-3 ze střední exponenciální fáze růstu. Modré symboly představují účinek 1  $\mu$ M CCCP (čtverečky), 5  $\mu$ M CCCP (trojúhelníčky) a 10  $\mu$ M CCCP (obrácené trojúhelníčky) přidaného ve 20. minutě (tečkovaná čára), následně přidání 10  $\mu$ M DM-11 označuje šedá šipka. Tmavě modré trojúhelníčky zobrazují přidání 10  $\mu$ M DM-11 ve 20. minutě a následně 5  $\mu$ M CCCP (černá šipka), kolečka reprezentují kontrolní vzorek bez látek. (B) Vliv CCCP a DM-11 na barvení pozdně exponenciálních buněk kmene AD1-3. Symboly mají stejný význam jako v části (A).

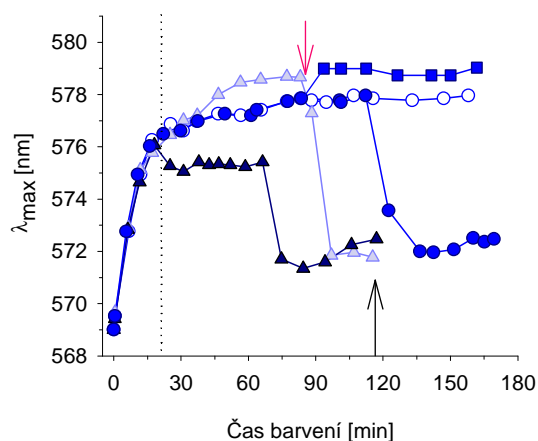
Důkazem aktivace  $H^+$ -ATPázy protonoforem je i skutečnost, že předchozí inhibice  $H^+$ -ATPázy látkou DM-11 zamezí nárůstu  $\lambda_{max}$  po přidání CCCP. V tomto případě nevyvolá CCCP u exponenciálních buněk hyperpolarizaci membrány v důsledku aktivace enzymu, nýbrž její výraznou depolarizaci. Výsledná úroveň barvení  $\lambda_{max}$  je nezávislá na pořadí přidání obou látek (obr. 3-10).



**Obr. 3-11** Aktivace  $H^+$ -ATPázy vyvolaná CCCP je závislá na stáří kultury a na okolním pH. (A) Šipka spolu s tečkovanou čarou udává čas přidání 5  $\mu$ M CCCP (trojúhelníčky) k buňkám kmene AD1-3 z rané exponenciální fáze (OD = 2,5; bledě modré symboly), ze střední exponenciální fáze (OD = 4,0; světle modré symboly), z pozdní exponenciální fáze (OD = 4,5; modré symboly) a z post-diauxické fáze růstu (OD = 7,0; tmavě modré symboly). Kolečka – bez CCCP. (B) Závislost aktivace  $H^+$ -ATPázy u pozdně exponenciálních buněk kmene AD1-3 na pH CP pufru: pH = 4 (černé symboly), pH = 5 (tmavě modré symboly), pH = 6 (modré symboly), pH = 7 (světle modré symboly), pH = 8 (bledě modré symboly). Šipka spolu s tečkovanou čarou označuje přidání 5  $\mu$ M CCCP (trojúhelníčky). Kolečka – vzorky bez CCCP.

Z obr. 3-10 vyplývá, že je účinek CCCP závislý nejen na jeho koncentraci, ale i na stáří buněk. Zajímali jsme se o další faktory, které jej mohou ovlivnit. Testovali jsme vliv růstové fáze buněk a pH okolního prostředí na rychlost a míru aktivace  $H^+$ -ATPázy. Zatímco účinek  $5 \mu M$  CCCP se u post-diauxických buněk projeví hlubokou depolarizací spojenou s přenosem protonů do buňky a pozvolnou aktivací  $H^+$ -ATPázy – téže úrovně membránového potenciálu jako u kontroly je dosaženo až po 3 hodinách měření (obr. 3-11A), u exponenciálních buněk je  $H^+$ -ATPáza aktivována téměř okamžitě a nelze tak pozorovat ani přechodnou depolarizaci plazmatické membrány (obr. 3-10, obr. 3-11A). Obr. 3-11B dokumentuje vliv pH pufru na barvicí křivky kvasinek z téže růstové fáze vystavených působení  $5 \mu M$  CCCP.

Aktivace  $H^+$ -ATPázy indukovaná CCCP je velice důležitým poznatkem, neboť CCCP se běžně používá jako diagnostický nástroj k zjištění integrity buněk. Z experimentů na obrázcích 3-10 a 3-11 vyplývá, že je třeba obezřetně volit experimentální podmínky (koncentrace protonoforu, růstová fáze buněk, pH pufru), při nichž lze, byť v omezeném časovém měřítku, použít samotný CCCP k posouzení integrity buněk. Obecně by však CCCP neměl být používán sám, ale spíše v kombinaci s DM-11 nebo jiným inhibitorem  $H^+$ -ATPázy. Obr. 3-12 ilustruje rozdílné odpovědi intaktních pozdně exponenciálních buněk a buněk permeabilizovaných tepelným šokem na současné přidání  $5 \mu M$  CCCP a  $10 \mu M$  DM-11 (tzv. CD koktejlu). Přidání CD koktejlu k permeabilizovaným buňkám zůstává oproti intaktním buňkám bez odezvy v barvení. Interakce sondy s komponentami permeabilizovaných buněk již není závislá na membránovém potenciálu (126).



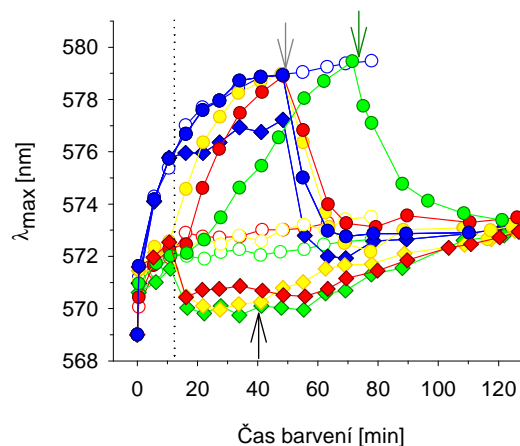
**Obr. 3-12** Rozpoznání intaktních a permeabilizovaných buněk pomocí současného přidání CCCP a DM-11. Černá šipka označuje přidání  $5 \mu M$  CCCP +  $10 \mu M$  DM-11 k intaktním pozdně exponenciálním buňkám AD1-3 (plná kolečka) i k buňkám, které byly permeabilizovány tepelným šokem (čtverečky) v čase vyznačeném červenou šipkou. Prázdná kolečka znázorňují kontrolní vzorek bez přidání látek, zbylé křivky byly pro srovnání převzaty z obr. 3-10B (světle modré trojúhelníčky –  $5 \mu M$  CCCP následované  $10 \mu M$  DM-11; tmavě modré trojúhelníčky – látky v opačném pořadí).

### 3.2.3.2. CCCP a FCCP jsou substráty jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p

Přidání CCCP k buňkám kmenů AD12, AD13 a US50-18C majícím pumpy Pdr5p a/nebo Snq2p způsobuje různě rychlý nárůst v  $\lambda_{max}$  vedoucí až ke splnutí jejich barvicích křivek s křivkami negativní kontroly AD1-3 (obr. 3-13). Tento efekt můžeme přisoudit rozdílné schopnosti CCCP inhibovat transport sondy pumpami Pdr5p a Snq2p. Ačkoliv aktivita obou pump je srovnatelná, neboť úroveň obarvení kmenů AD12 a AD13 je totožná, je rychlost nárůstu  $\lambda_{max}$  v případě buněk AD13 majících pouze pumpu Snq2p mnohem vyšší než rychlost pozorovaná u kmene AD12 (Pdr5p). Reakce buněk

rodičovského kmene US50-18C s nadprodukcí obou pump je kombinací těchto dvou rychlostí. Následné přidání DM-11 k buňkám vystaveným účinku CCCP ukazuje, že buňky jsou intaktní a chovají se jako negativní kontrola.

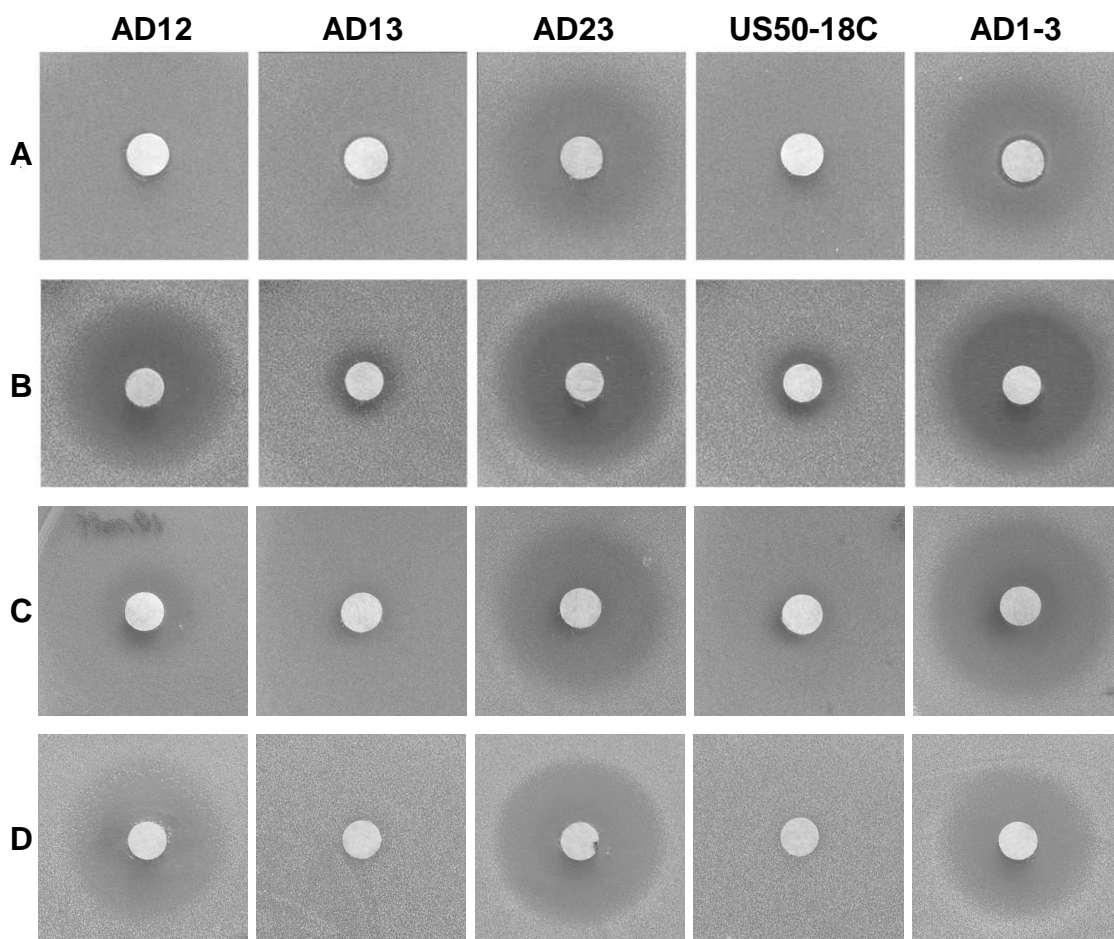
Vedle aktivace  $H^+$ -ATPázy, která se samozřejmě odehrává i v buňkách majících MDR pumpy, představuje inhibice transportu sondy pumpami Pdr5p a Snq2p další významné zjištění o účincích CCCP na kvasinkové buňky. Inhibici transportu sondy diS-C<sub>3</sub>(3) oběma pumpami můžeme pozorovat i v buňkách, v nichž jsme nejprve zabránili aktivaci  $H^+$ -ATPázy pomocí DM-11 (obr. 3-13), i v tomto případě je přidání CCCP doprovázeno u všech kmenů s aktivními pumpami Pdr5p anebo Snq2p nárůstem  $\lambda_{max}$  na úroveň negativní kontroly AD1-3.



**Obr. 3-13** CCCP inhibuje transport fluorescenční sondy pumpou Pdr5p i Snq2p nezávisle na aktivitě  $H^+$ -ATPázy. Vliv CCCP a DM-11 (bez ohledu na pořadí přidání) na barvení buněk kmenů AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly) ze střední exponenciální fáze. Prázdné symboly – kontrolní vzorky bez látek; plná kolečka – 5  $\mu$ M CCCP přidán k buňkám ve 12. minutě (tečkovaná čára) následovaný 10  $\mu$ M DM-11 (čas přidání DM-11 u kmenů AD13, AD1-3 a US50-18C značí šedá šipka, u kmene AD12 pak zelená šipka); kosočtverečky – přidání 10  $\mu$ M DM-11 ve 12. minutě následuje 5  $\mu$ M CCCP (černá šipka).

Abychom zjistili, jak CCCP inhibuje transport sondy pumpami, provedli jsme zónové testy (obr. 3-14) s oběma typy svrchních agarů (viz kapitoly 2.2. a 2.6.2.). Při růstu v YPD agaru využívají buňky z kvasitelný zdroj uhlíku (glukózu) a aktivita jejich pump je vysoká (130) (obr. 3-14A). Jelikož je účinek CCCP silně závislý na růstové fázi kultury (viz obr. 3-11), bylo nezbytné pomocí metody popsané v kapitole 2.7.2. synchronizovat růstové fáze všech kmenů v okamžiku fotografování zónových testů. U žádného z kmenů s aktivními pumpami Pdr5p anebo Snq2p (AD12, AD13, US50-18C) se na rozdíl od kmenů AD23 a AD1-3 nevytvořily růstové inhibiční zóny, to jasně vypovídá o tom, že CCCP je substrátem jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p. Na obr. 3-14B, kde YPGE agar obsahuje nezkvasitelný zdroj uhlíku (153), jsou růstové inhibiční zóny kmenů majících pumpu Snq2p (AD13, US50-18C) výrazně menší než ty u kmenů AD1-3 a AD23. Ačkoliv jsou zóny kmenů AD12 a AD1-3 v tomto případě téměř stejně velké, liší se svou „průhledností“. Nepatrná odlišnost ve vzhledu zón kmenů AD12 a AD1-3 není způsobena nízkou aktivitou Pdr5p v buňkách AD12 (v porovnání s Snq2p v AD13), neb nigericin je za stejných růstových podmínek stále efektivně odstraňován z buněk (viz obr. 3-8A), nýbrž slabší afinitou pumpy Pdr5p k CCCP, tj. CCCP je mnohem silnějším substrátem Snq2p než Pdr5p.

Tento výsledek poukazuje na nové důležité uplatnění naší fluorescenční metody. Nejenže metoda umožňuje zjistit, zda daná látka inhibuje transport sondy pumpami Pdr5p a Snq2p, ale dokáže i rozpoznat, v jaké míře látka působí na jednotlivé pumpy.



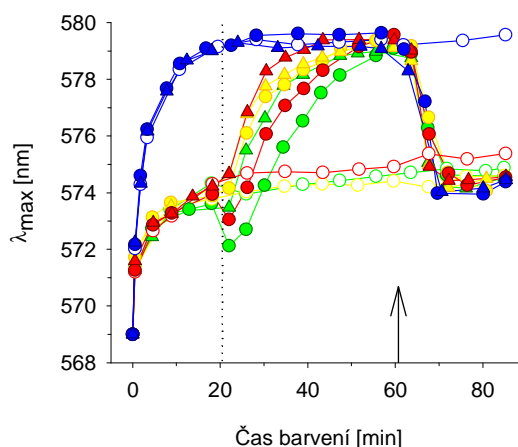
**Obr. 3-14** CCCP a FCCP jsou substráty jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p. (A, C) Růstové inhibiční zóny vytvořené v YPD svrchním agaru u kmenů majících různé pumpy (AD12, AD13, AD23 a US50-18C) a u negativní kontroly AD1-3 v přítomnosti (A) 10 mM CCCP a (C) 10 mM FCCP. (B, D) Inhibiční zóny vytvořené v YPGE krycím agaru u kmenů exprimujících různé pumpy (AD12, AD13, AD23, US50-18C) a u kmene AD1-3 (negativní kontroly) vystavených účinku (B) 5 mM CCCP a (D) 1 mM FCCP.

Molekula karbonylkyanidu 4-(trifluorometoxy)fenylhydrazonu (FCCP) je strukturně velice blízká molekule CCCP, karbonylkyanidu 3-chlorofenylhydrazonu (viz obr. 2-1B,C). Kladli jsme si proto otázku, zda je účinek této látky totožný s působením CCCP na kvasinkové buňky, popřípadě jak jej ovlivnila tato drobná modifikace molekuly.

Ze zónových testů s použitím YPD svrchního agaru je patrný pouze rozdíl mezi inhibičními zónami kmene AD12 v přítomnosti 10 mM FCCP (obr. 3-14C) a 10 mM CCCP (obr. 3-14A), zóny kmenů AD13, AD23, US50-18C a AD1-3 jsou obdobné u obou látek. Již za těchto růstových podmínek lze říci, že FCCP je stejně jako CCCP slabším substrátem Pdr5p než Snq2p. O tomto závěru se můžeme dále přesvědčit, použijeme-li YPGE svrchní agar, v němž je rozdíl ve velikosti zón kmenů AD12 a AD13 ještě zřetelnější (obr. 3-14D). Za povšimnutí však stojí, že v přítomnosti nezkrasitelného zdroje uhlíku (YPGE agar) tvoří 1 mM FCCP stejně velké zóny jako 5 mM CCCP, a tedy FCCP ovlivňuje přežívání kvasinek výrazněji než CCCP.

Z obr. 3-15 vyplývá, že FCCP inhibuje transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) oběma MDR pumpami lépe než CCCP, neboť nárůst  $\lambda_{\max}$  je po přidání 5  $\mu$ M FCCP k buňkám kmenů AD12, AD13 a US50-18C strmější oproti průběhu barvicích křivek buněk, jež byly vystaveny téže koncentraci CCCP. Následná aplikace DM-11 k buňkám ovlivněným oběma protonofory ukazuje, že buňky jsou intaktní a chovají se jako negativní kontrola.





**Obr. 3-15** FCCP inhibuje transport fluorescenční sondy pumpami Pdr5p a Snq2p lépe než CCCP. Barvicí křivky buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly) z rané exponenciální fáze růstu. Ve 20. minutě (tečkovaná čára) byl k buňkám přidán 5  $\mu\text{M}$  CCCP (plná kolečka) či 5  $\mu\text{M}$  FCCP (trojúhelníčky) a následně 10  $\mu\text{M}$  DM-11 (šipka). Prázdné symboly představují kontrolní vzorky bez látek.

### 3.2.4. Vliv lyzozomotropních látek na aktivitu $\text{H}^+$ -ATPázy a MDR pump

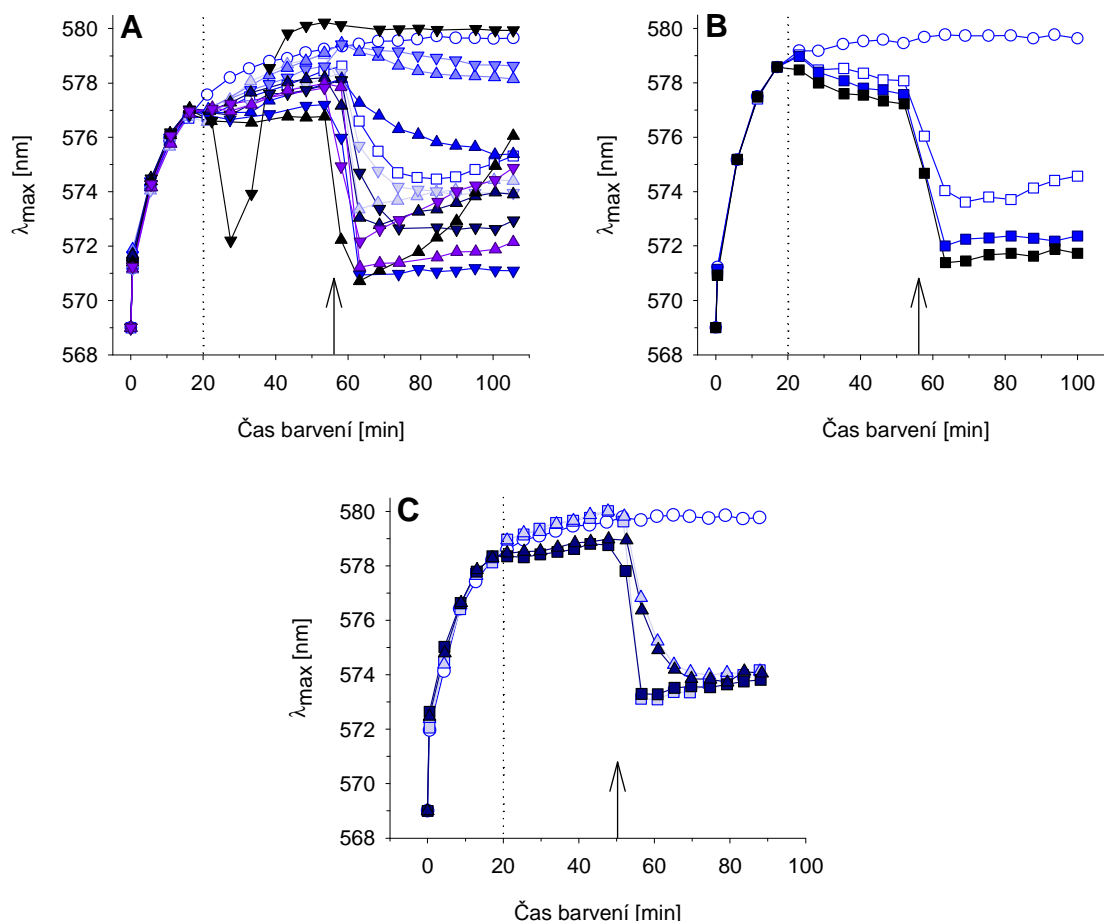
Neprotonovaná forma lyzozomotropních látek, které jsou povětšinou slabé báze, snadno proniká buněčnými membránami a protonovaná forma se hromadí v buněčných organelách s kyselým vnitřním pH – ve vakuolách, v lyzozomech nebo v endozomech. Když koncentrace lyzozomotropní látky v organelle dosáhne kritické micelární koncentrace, začne látka působit jako detergent a zničí její membránu. To má za následek výtok hydrolytických enzymů do buňky a její autolýzu (113). O mechanismu účinku těchto látek podrobněji pojednává kapitola 1.3.3.4.

Jak jsme se přesvědčili v předešlé kapitole, je metoda barvicích křivek schopná postihnout vliv jemných strukturálních rozdílů molekul – poloha/záměna jediného nevelkého substituentu – na mechanismus účinku jednotlivých sloučenin (CCCP versus FCCP). Tato metoda se tudíž jeví jako vhodný nástroj pro vyhledávání optimálních molekulárních struktur ať už inhibitorů MDR pump, či inhibitorů plazmatické  $\text{H}^+$ -ATPázy, esenciálního enzymu kvasinek. U některých členů skupiny lyzozomotropních látek (obr. 2-3 a 2-4, tabulka 2-3), které jsme studovali v této kapitole, byla popsána schopnost inhibovat činnost nejen vakuolární ATPázy, ale i plazmatické  $\text{H}^+$ -ATPázy kvasinek (114,117,119,121,136).

Otestovali jsme skupinu patnácti strukturálně příbuzných lyzozomotropních látek, mezi něž patří již dříve zmíněná látka DM-11, za účelem nalezení efektivních inhibitorů plazmatické  $\text{H}^+$ -ATPázy. K realizaci tohoto záměru jsme použili raně exponenciální buňky AD1-3, které mají vysoký membránový potenciál (130) a u nichž po přidání CD koktejlu (5  $\mu\text{M}$  CCCP + 10  $\mu\text{M}$  DM-11) zůstává úroveň barvení vyšší než v ostatních růstových fázích (obr. 3-16). Zajistili jsme si tak dostatečně rozsáhlé „měřicí okno“ pro porovnávání inhibičních schopností daných látek. Jako standard jsme zvolili 10  $\mu\text{M}$  DM-11, součást osvědčeného CD koktejlu.

Všechny zkoumané látky způsobují pokles  $\lambda_{\text{max}}$  v důsledku inhibice  $\text{H}^+$ -ATPázy, propad v barvení se umocní, přidáme-li k buňkám protonofor CCCP (na obr. 3-16A je zachycena reakce kvasinek na látky s  $n = 12$  a  $n = 14$ , na obr. 3-16B s  $n = 11$ , kde  $n$  je počet atomů C v řetězci). Zdá se, že rozhodujícím faktorem není délka řetězce, ale druh

funkční skupiny. Účinnost stoupá v řadě MR < DM < PP < PY, v dané skupině jsou vždy efektivnější látky bez methylového substituentu. Nejlepší inhibitor H<sup>+</sup>-ATPázy je PPG-14, způsobuje nejhlubší a trvale udržitelnou depolarizaci, na opačné straně škály stojí MRAL-14 a MRAL-12. Jak PP-11, tak PY-11 jsou účinnější než DM-11 a na rozdíl od DM-11 jsou schopny dlouhodoběji udržet nízkou aktivitu H<sup>+</sup>-ATPázy, neboť nedochází k opětovnému nárůstu barvení po přidání CCCP, který by ji jinak aktivoval.



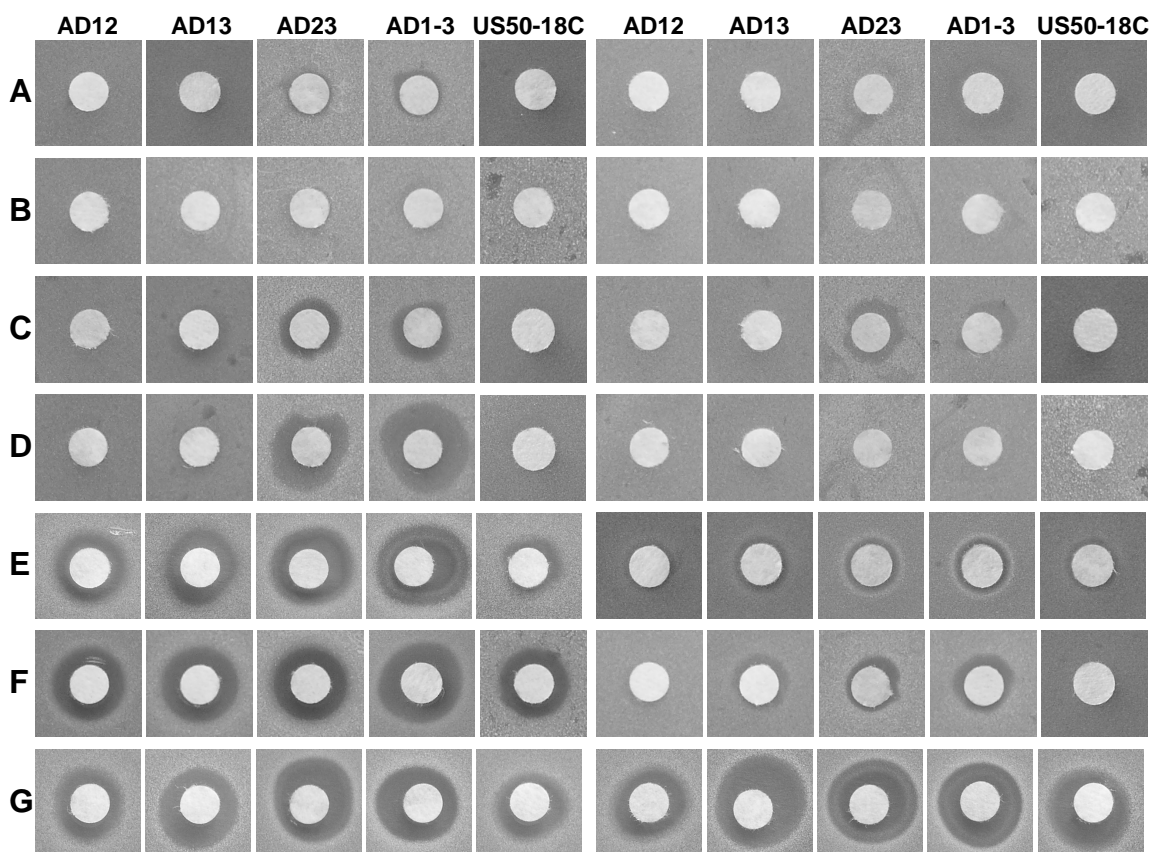
**Obr. 3-16** Porovnání vlivu lysozomotropních látek na aktivitu H<sup>+</sup>-ATPázy. (A) K raně exponenciálním buňkám AD1-3 byly ve 20. minutě barvení (tečkovaná čára) přidány lysozomotropní látky o koncentraci 10 μM (bílé čtverečky – DM-11, bledě modré symboly – MRG-n, světle modré symboly – MRAL-n, modré symboly – PPG-n, tmavě modré symboly – PPAL-n, černé symboly – PYG-n, fialové symboly – PYAL-n, trojúhelníčky – n = 12, obrácené trojúhelníčky – n = 14). Šipka označuje přidání 5 μM CCCP. Bílá kolečka – kontrolní vzorek bez látek. (B) K raně exponenciálním buňkám AD1-3 bylo ve 20. minutě barvení (tečkovaná čára) přidáno 10 μM DM-11 (bílé čtverečky), 10 μM PP-11 (modré čtverečky), 10 μM PY-11 (černé čtverečky). Šipka označuje přidání 5 μM CCCP. Kolečka – vzorek bez látek. (C) K raně exponenciálním buňkám AD1-3 byl ve 20. minutě barvení (tečkovaná čára) přidán 5 μM CCCP (světle modré symboly) a v 50. minutě (šipka) 10 μM MRG-12 (světle modré čtverečky) a 10 μM DM-11 (světle modré trojúhelníčky). Obrácené pořadí látek zobrazují tmavě modré symboly (čtverečky – 10 μM MRG-12 a posléze 5 μM CCCP, trojúhelníčky – 10 μM DM-11 a následně 5 μM CCCP). Kolečka – kontrolní vzorek bez látek.

Po přidání 10 μM PYG-14 jsme sice zaznamenali vůbec nejhlubší depolarizaci ze všech testovaných látek, ale ta velmi rychle přechází v permeabilizaci buněk. V případě 10 μM PYG-12 nastává permeabilizace až po přidání 5 μM CCCP (obr. 3-16A).

MRG-12 vyvolává u raně exponenciálních buněk AD1-3 stejný pokles v λ<sub>max</sub> jako DM-11 (obr. 3-16C), avšak následné přidání CCCP způsobuje v kombinaci

s MRG-12 strmější propad v barvení než s DM-11, byť je výsledná úroveň obarvení buněk u obou lyzozomotropních látek totožná. Podobně jako DM-11 inhibuje MRG-12  $H^+$ -ATPázu, a to nezávisle na pořadí přidání jejího inhibitoru a aktivátoru (CCCP).

Je-li zásahové místo inhibitoru  $H^+$ -ATPázy skryto uvnitř buňky či plazmatické membrány, neměla by být látka substrátem MDR pump, aby mohla inhibovat  $H^+$ -ATPázu stejně silně v buňkách bez aktivních pump i s jejich nadprodukcí. O tom, zda je látka substrátem pump Pdr5p, Snq2p či Yor1p, však nelze jednoznačně rozhodnout na základě výsledků zónových testů (obr. 3-17), protože společným rysem těchto patnácti látek je jejich slabá difúze agarem, díky níž tvoří malé, často jen prstencové inhibiční zóny, výjimkou není ani jejich naprostá absence, i když použité koncentrace několiknásobně přesahují letální koncentrace zjištěné pomocí výsevového testu. Lyzozomotropní látky jsme tedy otestovali v koncentračním rozmezí 5 – 20  $\mu$ M pomocí metody barvicích křivek. Výsledky shrnují obrázky 3-18, 3-19, 3-20 a 3-21, kde je pro danou skupinu strukturně příbuzných látek zvolena jednotná koncentrace tak, aby byly účinky látek na pumpy Pdr5p a Snq2p nejlépe viditelné.

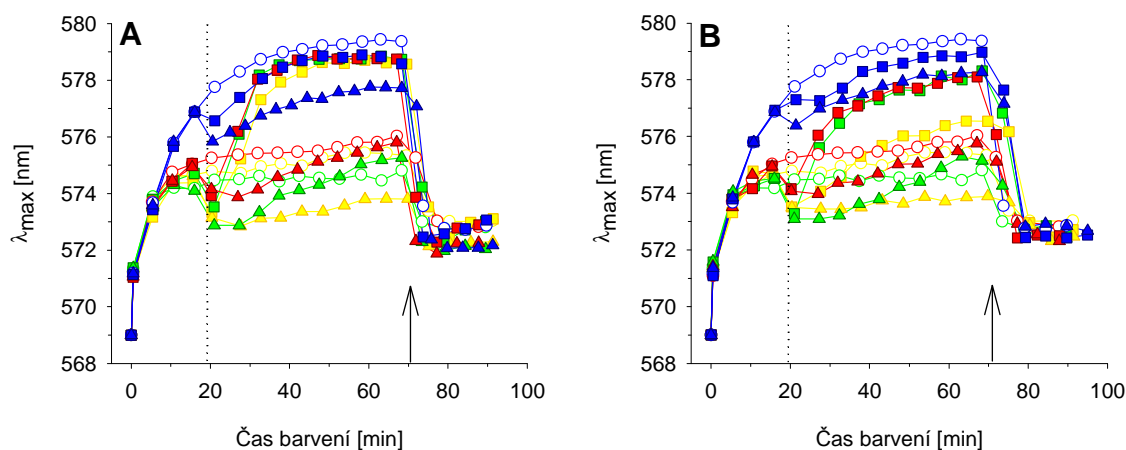


**Obr. 3-17** Zónové testy skupiny strukturně podobných lyzozomotropních látek. Růstové inhibiční zóny kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C vystavených působení různých látek: (A) vlevo 50 mM MRG-12, vpravo 50 mM MRG-14, (B) vlevo 50 mM MRAL-12, vpravo 5,4 mM MRAL-14, (C) vlevo 50 mM PPG-12, vpravo 9,6 mM PPG-14, (D) vlevo 50 mM PPAL-12, vpravo 50 mM PPAL-14, (E) vlevo 50 mM PYG-12, vpravo 70 mM PYG-14, (F) vlevo 50 mM PYAL-12, vpravo 50 mM PYAL-14, (G) vlevo 50 mM PP-11, vpravo 50 mM PY-11.

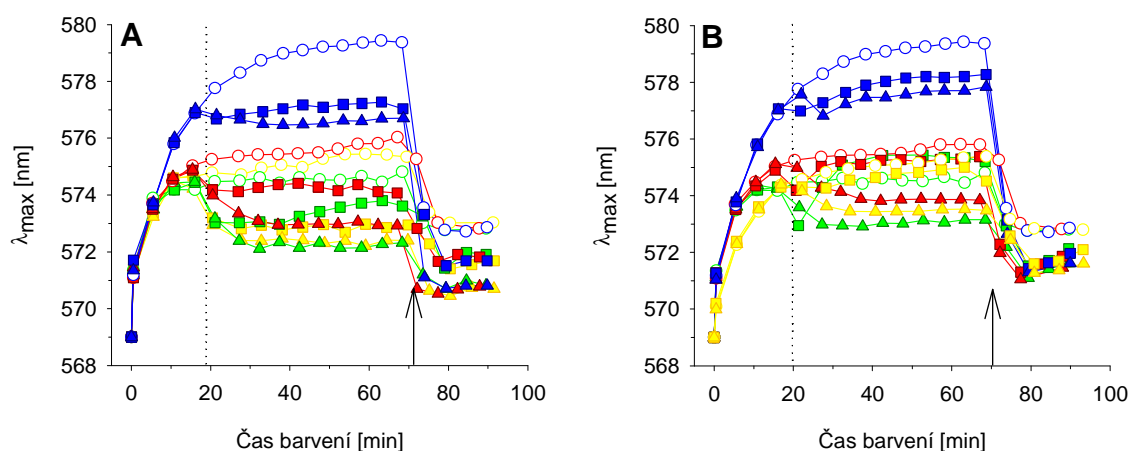
Přidání 20  $\mu$ M MRG-12 k exponenciálním buňkám kmenů AD12, AD13 a US50-18C vede k posunu  $\lambda_{max}$  do červena v důsledku inhibice transportu sondy oběma pumpami (obr. 3-18A), přičemž MRG-12 lépe inhibuje transport sondy pumpou Pdr5p než Snq2p. Výsledky zónových testů na obr. 3-17A potvrzují, že je MRG-12 substrátem



obou pump. MRAL-12 je taktéž silnějším inhibítozem Pdr5p než Snq2p (obr. 3-18B), avšak na rozdíl od MRG-12 nenastává při dané koncentraci plná inhibice ani jedné z pump, neboť nepozorujeme splynutí barvicích křivek kmenů AD12, AD13 či US50-18C s negativní kontrolou AD1-3. Navíc je MRAL-12 méně účinným inhibítozem Snq2p než MRG-12. MRG-14 (obr. 3-18A) i MRAL-14 (obr. 3-18B) jsou slabými substráty pouze Pdr5p.



**Obr. 3-18** Vliv MRG-n a MRAL-n na kvasinky. Barvicí křivky exponenciálních buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly). Ve 20. minutě (tečkovaná čára) bylo k buňkám přidáno (A) 20  $\mu\text{M}$  MRG-12 (čtverečky) nebo 20  $\mu\text{M}$  MRG-14 (trojúhelníčky), (B) 20  $\mu\text{M}$  MRAL-12 (čtverečky) nebo 20  $\mu\text{M}$  MRAL-14 (trojúhelníčky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez látek. Šipka označuje přidání CD koktejlu.



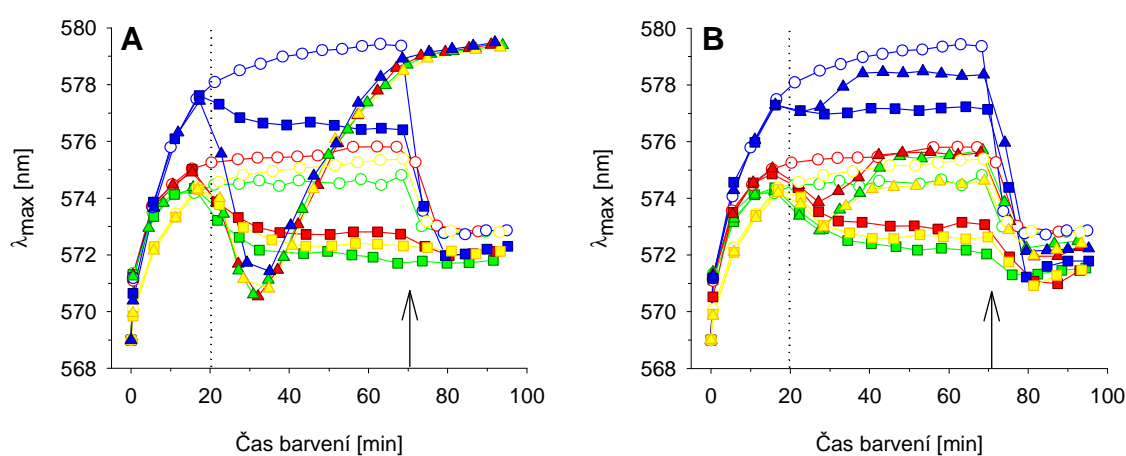
**Obr. 3-19** Vliv PPG-n a PPAL-n na kvasinky. Barvicí křivky exponenciálních buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly). Ve 20. minutě (tečkovaná čára) bylo k buňkám přidáno (A) 10  $\mu\text{M}$  PPG-12 (čtverečky) nebo 10  $\mu\text{M}$  PPG-14 (trojúhelníčky), (B) 10  $\mu\text{M}$  PPAL-12 (čtverečky) nebo 10  $\mu\text{M}$  PPAL-14 (trojúhelníčky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez látek. Šipka označuje přidání CD koktejlu.

Zatímco 10  $\mu\text{M}$  PPG-12 inhibuje transport sondy jen pumpou Pdr5p (obr. 3-19A), tak 10  $\mu\text{M}$  PPAL-12 omezuje transport sondy oběma pumpami, přičemž výrazněji v případě Pdr5p (obr. 3-19B). Látky PPG-14 a PPAL-14 neovlivňují transport sondy pumpami, leč výsledky zónových testů PPG-14 (obr. 3-17C) nasvědčují, že je tato látka substrátem Pdr5p a Snq2p.

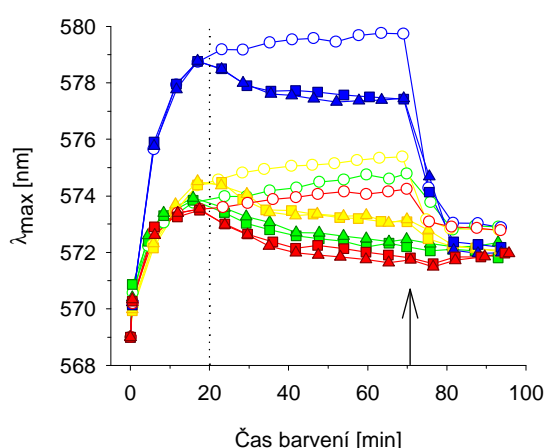
PYG-12 a PYAL-12 nejsou substráty ani jedné z pump, jak vyplývá ze stejné velkého poklesu barvení u všech kmenů v důsledku inhibice  $\text{H}^+$ -ATPázy (obr. 3-20) a

zónových testů (obr. 3-17E a F). Tatáž 5  $\mu\text{M}$  koncentrace PYG-14 způsobuje zdaleka nejhlubší depolarizaci ze všech testovaných lyzozomotropních látek, ale tento efekt je pouze dočasný a po krátké době přechází v permeabilizaci (obr. 3-20A). Ta nastává u všech kmenů v tentýž okamžik, ani PYG-14 tedy není substrátem Pdr5p nebo Snq2p. PYG-14 se zdá být nadějnou antifungální látkou, na kvasinkové buňky útočí hned na několika frontách – inhibuje plazmatickou  $\text{H}^+$ -ATPázu a permeabilizuje membránu a navíc není substrátem MDR pump, které by mohly negativně ovlivnit jeho účinnost. Jediným substrátem MDR pump, konkrétně Pdr5p, z této skupiny látek je PYAL-14 (obr. 3-20B a obr. 3-17F).

PP-11 a PY-11 jsou lepšími inhibitory  $\text{H}^+$ -ATPázy než DM-11 (obr. 3-16B), obdobně jako DM-11 nejsou substráty Pdr5p, Snq2p či Yor1p (obr. 3-21 a obr. 3-17G) a mohou být tudíž používány v kombinaci s CCCP v situacích, kdy nelze využít DM-11 kvůli vzájemné interakci s testovanou látkou.



**Obr. 3-20** Vliv PYG-*n* a PYAL-*n* na kvasinky. Barvicí křivky exponenciálních buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly). Ve 20. minutě (tečkovaná čára) bylo k buňkám přidáno (A) 5  $\mu\text{M}$  PYG-12 (čtverečky) nebo 5  $\mu\text{M}$  PYG-14 (trojúhelníčky), (B) 5  $\mu\text{M}$  PYAL-12 (čtverečky) nebo 5  $\mu\text{M}$  PYAL-14 (trojúhelníčky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez látek. Šipka označuje přidání CD koktejlu.



**Obr. 3-21** Vliv PP-11 a PY-11 na kvasinky. Barvicí křivky exponenciálních buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly). Ve 20. minutě (tečkovaná čára) bylo k buňkám přidáno 10  $\mu\text{M}$  PP-11 (čtverečky) nebo 10  $\mu\text{M}$  PY-11 (trojúhelníčky). Kolečka představují kontrolní vzorky bez látek. Šipka označuje přidání CD koktejlu.

### 3.3. Stanovení mechanismu a rychlosti účinku povrchově aktivních látek na kvasinky

Ideální antimykotika by měla specificky interagovat s buněčnými cíly, které se nenacházejí ve vyšších eukaryotech (46,47), aby se předešlo výskytu nežádoucích vedlejších účinků. V současné době je k dispozici pouze skrovný počet antimykotik (viz kapitola 1.1.), proto je stále žádoucí hledání nových antifungálních látek s různými mechanismy působení, které by vyřešily problémy s lékovou rezistencí a toxicitou (3,48,53,54,154). Povrchově aktivní látky mohou minimalizovat toxicitu, indukci MDR pump a vznik lékové rezistence způsobené vnitrobuněčnou modifikací léčiva či jeho cíle (8,155).

Vyvinuli jsme metodu, která s vysokou citlivostí a v reálném čase detekuje poškození buněk způsobené povrchově aktivními látkami. Naše diS-TDEA metoda (*diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay*) sleduje akumulaci fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3) v buňkách poté, co byly vystaveny časově omezenému působení povrchově aktivní látky. Metoda využívá rozdíl mezi barvicími křivkami intaktních (včetně hyperpolarizovaných a depolarizovaných) a permeabilizovaných buněk. Lipofilní kladně nabitá redistribuční sonda diS-C<sub>3</sub>(3) snadno proniká skrz plazmatickou membránu, hromadí se uvnitř buněk v závislosti na velikosti membránového potenciálu a váže se na buněčné konstituenty měnící své fluorescenční parametry ( $\lambda_{max}$ ). V intaktních buňkách bývá dosaženo rovnovážné hodnoty obarvení mezi 20. a 40. minutou barvení. Fluorescenční odpověď diS-C<sub>3</sub>(3) je zásadně ovlivněna činností MDR pump, Pdr5p a Snq2p, které aktivně odstraňují barvivo z buněk (130).

Permeabilizované buňky nejsou schopny udržovat membránový potenciál, mimoto se vyznačují masivním únikem iontů z cytosolu, který výrazně zvyšuje vazebnou kapacitu cytosolových komponent pro sondu (126). To vede k dramatickému nárůstu  $\lambda_{max}$ . Navíc v permeabilizovaných buňkách nehrají MDR pumpy žádnou roli; barvicí křivky buněk s pumpami i bez nich jsou identické. Intaktní buňky můžeme snadno odlišit od permeabilizovaných buněk pomocí CD koktejlu, kombinace protonoforu CCCP a inhibitoru H<sup>+</sup>-ATPázy DM-11 (156), protože permeabilizované buňky na CCCP nereagují.

V této práci jsme charakterizovali mechanismus účinku povrchově aktivních látek z řad detergentů (SDS a Triton X-100), pórotvorných antibiotik (gramicidin A, nystatin a amfotericin B) i komerčně používaných dezinfekčních prostředků (ODDC, chlorhexidin a BAC). Je všeobecně známo, že povrchově aktivní látky mohou ovlivnit strukturu membrány, i když jejich místo působení není přímo spojeno s buněčnou membránou. Organizace látek a jejich interakce s buněčnými membránami mohou vést např. ke změně v membránové propustnosti, k solubilizaci nebo tvarové deformaci membrány a dokonce až k buněčné lyzi (157).

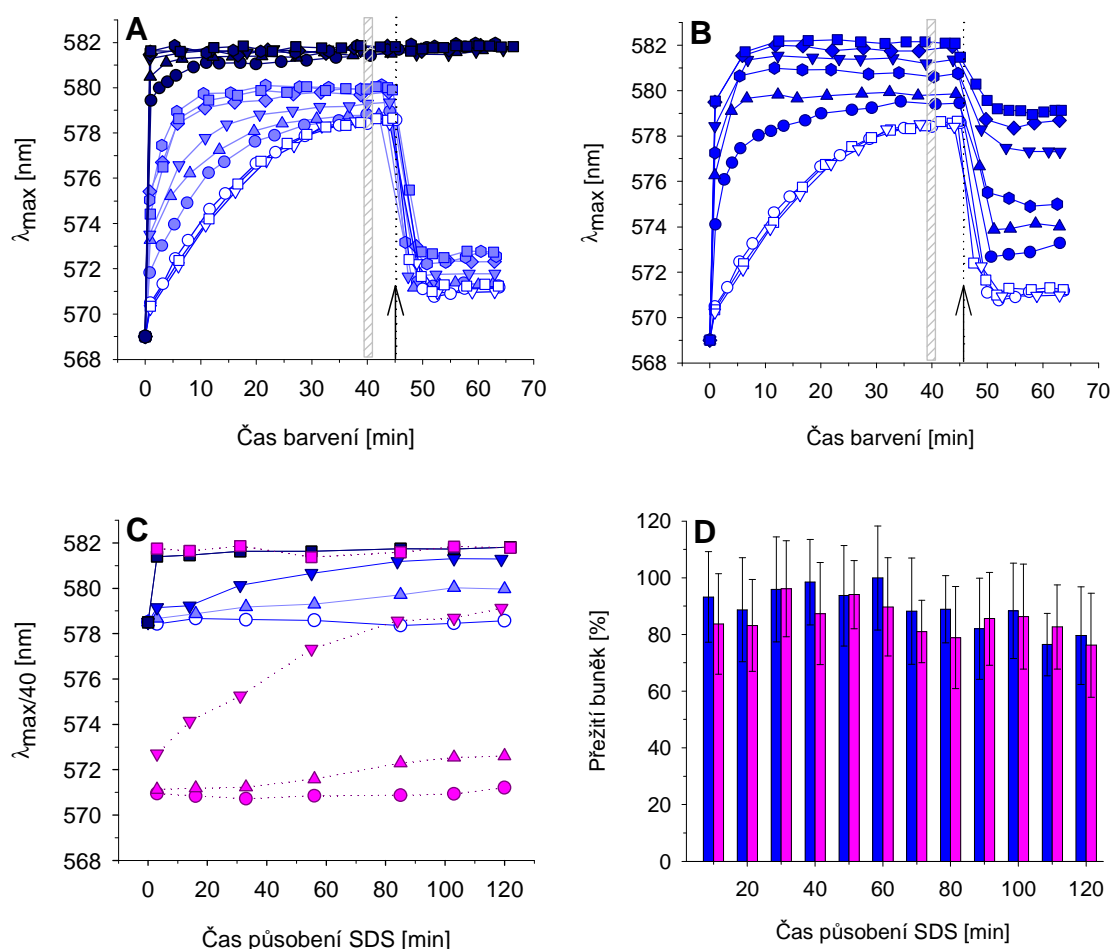
#### 3.3.1. Vliv detergentů na obalové struktury kvasinek

##### 3.3.1.1. Koncentračně závislý účinek SDS na kvasinky

Záporně nabitý syntetický detergent SDS (dodecyl sulfát sodný) je považován za efektivní solubilizátor integrálních membránových proteinů z biologických membrán. Při nízkých koncentracích, při nichž ještě nenastává solubilizace, se SDS inkorporuje do

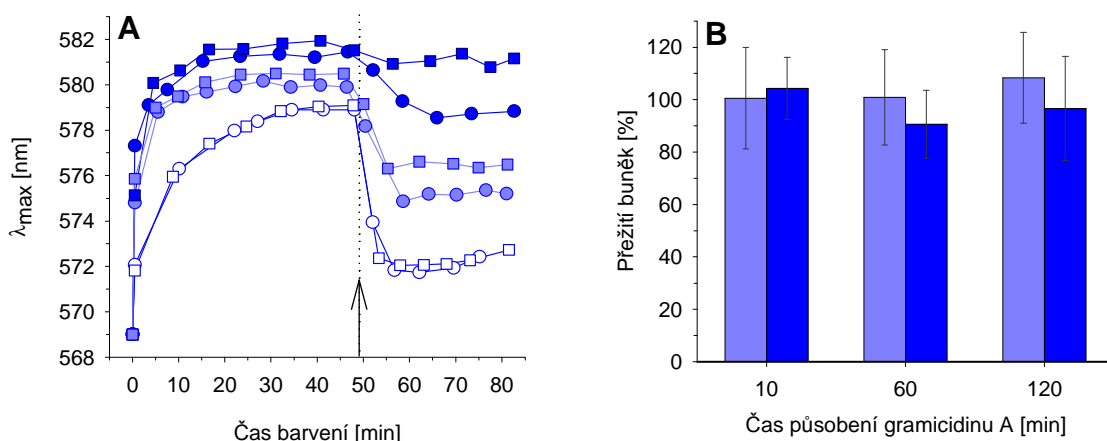
membrány a v závislosti na koncentraci narušuje membránovou strukturu nebo ji permeabilizuje natolik, že z buňky začnou unikat látky do okolního prostředí (158,159).

Koncentrace diS-C<sub>3</sub>(3) se v intaktních buňkách AD1-3 postrádajících hlavní MDR pumpu Pdr5p a Snq2p zvyšuje podle velikosti jejich membránového potenciálu (obr. 3-22A a B) (130,156). Dosažení rovnováhy tohoto potenciálově závislého barvení znázorněného jako časově závislý nárůst fluorescenčního emisního maxima ( $\lambda_{\max}$ ) trvá díky bariérové funkci buněčné stěny přibližně 30 min (31). Přidání CD koktejlu k plně obarveným buňkám vede k hlubokému propadu hodnoty  $\lambda_{\max}$  svědčící o rozsáhlé depolarizaci membrány. Po celý čas měření se barvicí křivky kontrolních buněk, které nejsou vystaveny působení žádné látky, nemění, buňky tedy nejsou nijak ovlivněny dvouhodinovou inkubací v CP pufru.



**Obr. 3-22** Koncentračně závislý účinek SDS na post-diauxické buňky AD1-3. **(A)** Buňky byly vystaveny působení 0 mM (bílé symboly), 0,8 mM (světle modré symboly) nebo 5 mM SDS (tmavě modré symboly) po různou dobu (kolečka – 3 min, trojúhelníčky – 15 min, obrácené trojúhelníčky – 55 min, kosočtverečky – 85 min, šestiúhelníky – 100 min, čtverečky – 120 min), než byla látka odstraněna. Pro 0 mM SDS jsou zobrazeny jen některé časy. **(B)** Buňky byly vystaveny působení 1,5 mM SDS (modré symboly) po různou dobu (kolečka – 3 min, trojúhelníčky – 15 min, šestiúhelníčky – 30 min, obrácené trojúhelníčky – 55 min, kosočtverečky – 85 min, čtverečky – 120 min). Bílé symboly přísluší kontrolním vzorkům. Šedě šrafované obdélníky demonstrují odvození hodnoty  $\lambda_{\max}/40$  v části (C). Šípky a tečkované čáry označují přidání CD koktejlu (5  $\mu$ M CCCP + 10  $\mu$ M DM-11). **(C)** Časová závislost  $\lambda_{\max}/40$  na různých koncentracích SDS (bílé a modré symboly). Kolečka – 0 mM, trojúhelníčky – 0,8 mM, obrácené trojúhelníčky – 1,5 mM, čtverečky 5 mM SDS. Růžové symboly označují odpovídající průměrné hodnoty  $\lambda_{\max}$  po přidání CD koktejlu ( $\lambda_{\max}/CD$ ). **(D)** Přežívání buněk po působení 1,5 mM SDS (modré sloupce) a týchž buněk, které byly po působení 1,5 mM SDS vystaveny na 20 min účinkům CD koktejlu (5  $\mu$ M CCCP + 10  $\mu$ M DM-11) (růžové sloupce).

Z barvicích křivek na obr. 3-22 vyplývá, že účinek SDS na buňky se vyvíjí v závislosti na jeho koncentraci a čase působení. Již po 3 popřípadě 15 min působení SDS o koncentraci 0,8 mM, při níž všechny buňky přežívají i dvouhodinovou expozici, pozorujeme rychlejší počáteční barvení než u kontrolních buněk (obr. 3-22A), detergent zvyšuje propustnost buněčné stěny a umožňuje tak i rychlejší ustavení rovnovážné hodnoty barvení, která je totožná s hodnotou kontrolních buněk. S prodloužením doby působení SDS (barvicí křivky jsou ukázány pro 55, 85, 100 a 120 min) se ještě více urychluje počáteční barvení a postupně navyšuje rovnovážná hodnota barvení, která se od 85 min již nemění. U těchto delších expozic působí CD koktejl pokles  $\lambda_{\max}$  na vyšší hodnotu než u kontrolních buněk; rozdíl v  $\lambda_{\max}/\text{CD}$  (průměr  $\lambda_{\max}$  po přidání CD koktejlu) odpovídá nárůstu rovnovážné hodnoty obarvení v závislosti na době působení látky. Tento tvar barvicích křivek je charakteristický pro buňky, u nichž se stupňuje hyperpolarizace díky výtoku kationtů jiných než protonů (převážně  $\text{K}^+$ ) z cytosolu. Takto nabudovaná část membránového potenciálu však není citlivá na CD koktejl. Dospěli jsme k závěru, že 0,8 mM SDS vytváří v membráně úzké kanály nebo trhlinky. Ty dovolují pouze omezený výtok kationtů z cytosolu, jaký neovlivňuje vazebnou kapacitu buněčných komponent pro sondu (126).



**Obr. 3-23** Vývoj hyperpolarizace membrán post-diauxických buněk ADI-3 v závislosti na koncentraci a době působení gramicidinu A. **(A)** Buňky byly vystaveny účinku 0  $\mu\text{M}$  (bílé symboly), 1  $\mu\text{M}$  (světle modré symboly) a 3  $\mu\text{M}$  gramicidinu A (modré symboly) po dobu 5 min (kolečka) a 60 min (čtverečky) před jeho odstraněním. Šipka s tečkovanou čarou vyznačuje čas přidání CD koktejlu. **(B)** Přežívání ADI-3 buněk vystavených působení 1  $\mu\text{M}$  (světle modré sloupce) a 3  $\mu\text{M}$  gramicidinu A (modré sloupce).

Při téměř dvojnásobné koncentraci SDS (1,5 mM), při níž stále přežívá přibližně 90 % buněk, dochází ke zvýraznění všech efektů, tj. k dalšímu urychlení vstupu sondy do buněk v důsledku rozvolnění buněčné stěny a k navýšení hodnoty membránového potenciálu. Ačkoliv příspěvek rychle a intenzivně se barvicích permeabilizovaných buněk činí jen  $\sim 10\%$ , rozdíly mezi hodnotami  $\lambda_{\max}/\text{CD}$  kontrolních buněk a kvasinek vystavených účinkům 1,5 mM SDS se již neshodují s rozdíly mezi hodnotami  $\lambda_{\max}/40$  příslušejícími těmto buňkám, jak tomu je u 0,8 mM SDS, nýbrž je přesahují (obr. 3-22B a C). Tato odezva na CD koktejl je typická pro vzorky, v nichž postupně přibývá permeabilizovaných buněk s prodlužující se dobou působení látky (134). Dodatečné poškození buněk CD koktejlem vedoucí k jejich permeabilizaci jsme vyloučili, jelikož se přežívání buněk vystavených účinkům samotného 1,5 mM SDS a SDS s CD koktejlem neliší (obr. 3-22D). Jediným přijatelným vysvětlením se zdá být ztráta protonového příspěvku membránového potenciálu (vzniklé póry v membráně patrně umožňují průchod  $\text{H}^+$  z vnějšího prostředí do buněk, kde je pH méně kyselé než vně) a nabudování membránového potenciálu pomocí draselných kationtů. Jak už bylo řečeno

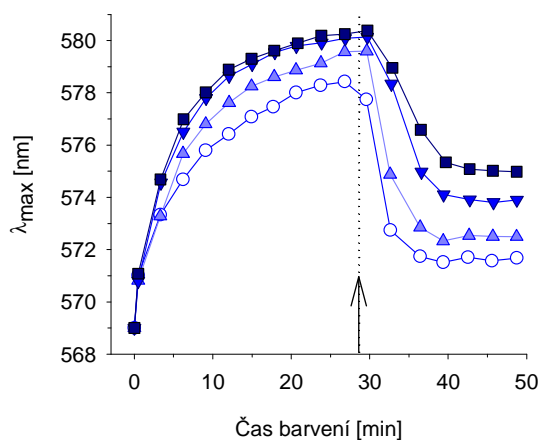
dříve, tato část membránového potenciálu však není citlivá na CD koktejl. Podobné výsledky získáme, nahradíme-li SDS  $K^+$ -ionoforem gramicidinem A (obr. 3-23), o němž je známo, že dovoluje průchod nejen  $K^+$ , ale také  $H^+$ .

Barvicí křivky zachycující vliv 5 mM SDS (obr. 3-22A) na kvasinky, pro něž je i krátké tříminutové působení této koncentrace detergentu letální, mají zcela jiný ráz než křivky vystihující účinky 0,8 mM či 1,5 mM SDS. Pozorovaný velice rychlý červený posuv  $\lambda_{max}$  je příznačný pro buňky s porušenými nebo plně permeabilizovanými membránami a také velmi často svědčí o poškození buněčné stěny (jako po teplotním šoku (126,128,156)). Tyto permeabilizované buňky neodpovídají na přidání CD koktejlu, protože ztratily membránový potenciál (156).

Komplexní pohled na mechanismus působení studované látky na kvasinky nám může poskytnout graf časových závislostí  $\lambda_{max}/40$  ( $\lambda_{max}$  ve 40. minutě barvení) a  $\lambda_{max}/CD$ , jaký je zobrazen na obr. 3-22C. Tento jednoduchý graf jasně vykresluje membránovou hyperpolarizaci (0,8 mM SDS) i kompletní permeabilizaci (5 mM SDS), a dokonce situaci, kdy v sobě proces hyperpolarizace membrány zahrnuje také změnu podílů jednotlivých iontů k výsledné hodnotě membránového potenciálu (1,5 mM SDS). Je zřejmé, že sledování časového vývoje účinku látek je daleko mocnějším nástrojem pro stanovení mechanismu účinku dané látky než pouhé změření jedné osamocené barvicí křivky, neboť umožňuje nahlédnout hlouběji do dějů probíhajících na plazmatické membráně.

### 3.3.1.2. Triton X-100 nepoškozuje buněčnou stěnu kvasinek na rozdíl od SDS

Triton X-100 je zástupce neutrálních (nenabitých) detergentů, které se využívají k šetrné izolaci integrálních proteinů z biologických membrán (160). Tento detergent způsobuje i ve vysokých koncentracích (20 mM) pouhou hyperpolarizaci plazmatické membrány kvasinek, aniž by jakkoliv poškodil jejich buněčnou stěnu (obr. 3-24). Tím se zcela zásadně liší od SDS. Koncentrace 5 mM, která postačuje toliko k hyperpolarizaci membrány, v případě SDS způsobuje kompletní permeabilizaci buněk již po 3 min působení. Na rozdíl od SDS se hyperpolarizace nezvětšuje s délkou působení Tritonu X-100, ale pouze v závislosti na jeho koncentraci, o čemž svědčí i vějířovitý pokles barvení po přidání CD koktejlu, který je charakteristický pro buňky, u nichž je únik vzrůstajícího množství  $K^+$  doprovázen ztrátou protonového příspěvku membránového potenciálu, viz také obr. 3-22B a 3-23A.



**Obr. 3-24** Účinek Tritonu X-100 na post-diauxické buňky AD1-3. Buňky byly 20 min vystaveny vlivu 0 mM (kolečka), 1,7 mM (trojúhelníčky), 5 mM (obrácené trojúhelníčky) a 20 mM Tritonu X-100 (čtverečky). Šipka s tečkovanou čarou vyznačuje přidání CD koktejlu.



### 3.3.2. Určení efektivností nystatinu a dvou forem amfotericinu B v permeabilizaci kvasinkových membrán

Nystatin a ostatní polyenová antibiotika jsou amfifilní sloučeniny patřící do skupiny tzv. povrchově aktivních látek. Nystatin se váže na ergosterol a tvoří stabilní póry, které jsou příčinou permeabilizace buněk a úniku esenciálních cytoplasmatických komponent ven z buňky (161), podrobnosti lze nalézt v kapitole 1.3.2.1.

Barvicí křivky jsou notně závislé na délce působení nystatinu. Po tříminutovém působení 60  $\mu\text{M}$  nystatinu dosahuje barvení nízké rovnovážné úrovně  $\lambda_{\text{max}}$  (obr. 3-25A). Přidání CD koktejlu k těmto buňkám způsobí pokles  $\lambda_{\text{max}}$  na stejnou hodnotu jako u kontroly. Tato nízká úroveň barvení a odpověď na CD koktejl, podobná reakci intaktních kontrolních buněk, je typická pro depolarizované buňky s nízkým membránovým potenciálem. Krátký čas, po který jsou buňky vystaveny vlivu nystatinu, zřejmě nepostačuje ke kompletnímu navázání nystatinu na ergosterol, a tak se utvoří jen několik málo membránových porů, jimiž vyteče pouze nepatrné množství kationtů, které znatelně nezmění vazebnou kapacitu cytosolu (126). Barvicí křivky po delším působení nystatinu (15 – 120 min) jsou naopak posunuty do červené části spektra, což je příznačné pro permeabilizované buňky, které nereagují na CD koktejl. V permeabilizovaných buňkách postupně zvyšují vytékající ionty vazebnou kapacitu cytosolu pro sondu a posouvají  $\lambda_{\text{max}}$  směrem k delším vlnovým délkám. Přechod od depolarizace k plné permeabilizaci u různých koncentrací nystatinu zachycuje obrázek 3-25B. Kvůli lepší přehlednosti jsou v grafu vyobrazeny pouze hodnoty  $\lambda_{\text{max/CD}}$  pro nulovou a 60  $\mu\text{M}$  koncentraci nystatinu.

Zatímco v případě 60  $\mu\text{M}$  nystatinu nastává kompletní permeabilizace po 50 minutách, dosažení téhož efektu s 40  $\mu\text{M}$  nystatinem vyžaduje 60 – 80 minut a pro koncentraci 20  $\mu\text{M}$  nepostačuje ani 120 minut. Dlouhé časy potřebné pro úplnou permeabilizaci se dobře shodují se závěry, které učinil Van Leeuwen se svými kolegy (162) při studiu účinku nystatinu na konidie *Penicillium discolor*.

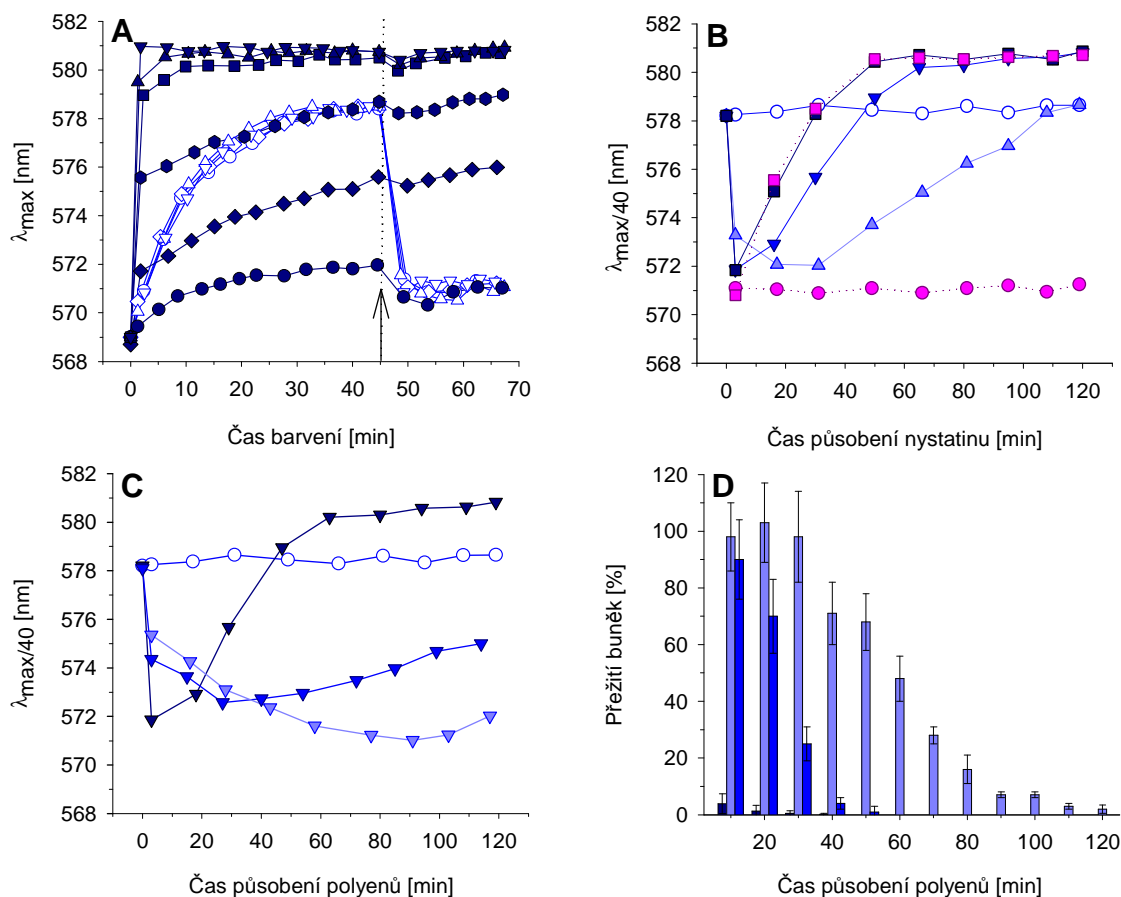
Očividně můžeme metodou diS-TDEA zjistit jak mechanismus, tak rychlost působení povrchově aktivních látek. Jsme schopni detekovat změny sahající od slabé depolarizace až po úplnou permeabilizaci membrány. V porovnání s tím neposkytuje výsevový test prováděný za stejných podmínek žádnou informaci o mechanismu účinku látky krom té, že buňky přežívají velmi sporadicky i krátké působení nystatinu (obr. 3-25D).

V současné době je amfotericin B jediný polyen, který se používá pro léčbu systémových mykóz. Podobně jako nystatin tvoří membránové póry nebo kanály, jimiž vytéká buněčný obsah ven, a to je pro buňky letální (161). Obrázek 3-25C porovnává časovou závislost  $\lambda_{\text{max/40}}$  buněk ošetřených 40  $\mu\text{M}$  amfotericinem B a nystatinem. Po krátkodobém působení nystatinu jsou kvasinky částečně depolarizované, po 60 min jsou však zcela permeabilizované. Obě formy amfotericinu B (v DMSO nebo ve vodě) jsou v tomto ohledu mnohem méně efektivní než nystatin. 40  $\mu\text{M}$  amfotericin B rozpuštěný ve vodě (Fungizone) způsobuje mírnou, během dvou hodin se postupně prohlubující, depolarizaci. 40  $\mu\text{M}$  amfotericin B (v DMSO) působí podobnou depolarizaci během prvních 40 minut, ta je následována pomalým nárůstem  $\lambda_{\text{max/40}}$ , vypovídajícím o nezanedbatelném vlivu vyteklých kationtů na vazebnou kapacitu cytosolu pro sondu.

Tyto pomalejší efekty obou forem amfotericinu B se odrážejí ve zvýšeném přežívání buněk oproti nystatinu (obr. 3-25D). Zatímco v případě nystatinu je přežívání buněk zanedbatelné od samého počátku měření, u amfotericinu B buňky přežívají v hojném počtu až do okamžiku, kdy se hodnoty  $\lambda_{\text{max/40}}$  na obr. 3-25C počínají obracet



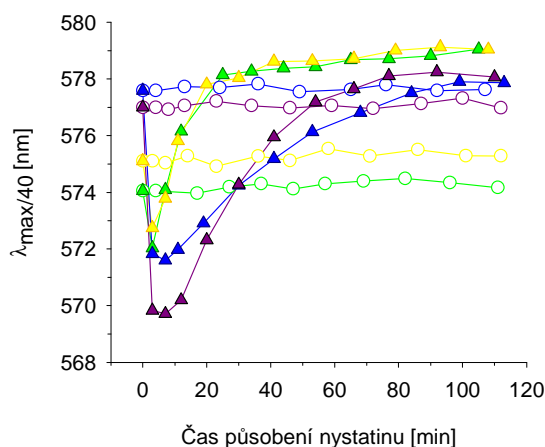
vzhůru (40 min u amfotericinu B rozpuštěného v DMSO a 100 min u micelárního amfotericinu B rozpuštěného ve vodě).



**Obr. 3-25** Permeabilizace AD1-3 buněk polyeny. **(A)** Buňky byly vystaveny působení 0  $\mu\text{M}$  (bílé symboly) nebo 60  $\mu\text{M}$  nystatinu (tmavě modré symboly) po dobu 3 min (kolečka), 15 min (kosočtverečky), 30 min (šestiúhelníky), 50 min (čtverečky), 95 min (trojúhelníčky), 120 min (obrácené trojúhelníčky), než byl nystatin odstraněn. V případě 0  $\mu\text{M}$  nystatinu nejsou zobrazeny barvicí křivky pro všechny časy. Šipka s tečkovanou čarou označuje přidání CD koktejlu. **(B)** Časová závislost  $\lambda_{max/40}$  různých koncentrací nystatinu (bílé a modré symboly; kolečka – 0  $\mu\text{M}$ , trojúhelníčky – 20  $\mu\text{M}$ , obrácené trojúhelníčky – 40  $\mu\text{M}$ , čtverečky – 60  $\mu\text{M}$  nystatin). Růžové symboly odpovídají hodnotám  $\lambda_{max/CD}$  po přidání CD koktejlu k buňkám vystaveným vlivu 0 a 60  $\mu\text{M}$  nystatinu. **(C)** Časová závislost  $\lambda_{max/40}$  dvou forem 40  $\mu\text{M}$  amfotericinu B (obrácené trojúhelníčky; modré – v DMSO, světle modré – ve vodě) v porovnání s 40  $\mu\text{M}$  nystatinem (tmavě modré obrácené trojúhelníčky) a s kontrolou bez látek (bílá kolečka) z obr. 3-25B. **(D)** Přežívání buněk po působení 40  $\mu\text{M}$  nystatinu (tmavě modré sloupce), 40  $\mu\text{M}$  amfotericinu B rozpuštěného v DMSO (modré sloupce) a 40  $\mu\text{M}$  amfotericinu B rozpuštěného ve vodě (světle modré sloupce).

Jak jsme se přesvědčili na příkladu strukturně blízkých polyenů, diS-TDEA metoda oplývá mimořádnou citlivostí, díky níž jsme schopni studovat nejen rozličné deriváty, ale i účinky těžce chemické substance na různé kvasinkové kmeny. Zajímavý fenomén představuje reakce čtveřice kmenů AD12, AD13, AD1-3 a IL125-2B na nystatin. Průběh časových závislostí  $\lambda_{max/40}$  kmenů AD12 (Pdr5p) a AD13 (Snq2p) je překvapivě rychlý v porovnání s kmenem AD1-3 nemajícím tyto dvě pumpy, uvážili, že tyto kmeny se liší pouze delecí genů *PDR5*, *SNQ2* a *YORI* (28) a podle obr. 3-30B není nystatin substrátem ani jedné z pump. Navíc kdyby byl nystatin substrátem Pdr5p a Snq2p, bylo by jeho působení činností pump naopak zbrzděno. V plazmatické membráně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byly popsány jak oblasti bohaté na

ergosterol, tak s nízkým obsahem ergosterolu. Každá z těchto domén je domovem pro jisté druhy proteinů (163). Přítomnost transportních proteinů Pdr5p a Snq2p v těchto raftech má pravděpodobně vliv na organizaci sterolů v blízkém okolí, vzniklé uspořádání je zřejmě příhodnější pro formování nystatinových pórů, a proto probíhá permeabilizace u kmenů AD12 a AD13 přibližně čtyřikrát rychleji než v buňkách kmene AD1-3. Na obr. 3-26 je též zakreslena křivka patřící post-diauxickým buňkám divokého kmene IL125-2B, který je blízkým příbuzným zmiňované trojice kmenů (viz obr. 2-6). O kmenech s přirozenou regulací exprese MDR pump je známo, že přechodem do post-diauxické fáze růstu exprese MDR pump prudce klesá k nule (132). Časová závislost  $\lambda_{\max/40}$  kmene IL125-2B se proto podobá spíše kmeni AD1-3 než AD12 či AD13.



**Obr. 3-26** Permeabilizace post-diauxických buněk různých kmenů nystatinem. Buňky AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD1-3 (modré symboly), IL125-2B (fialové symboly) byly inkubovány bez nystatinu (kolečka), anebo s 60  $\mu$ M nystatinem (trojúhelníčky). Toto měření bylo prováděno s nystatinem o jiné výrobce deklarované enzymatické účinnosti než obr. 3-25.

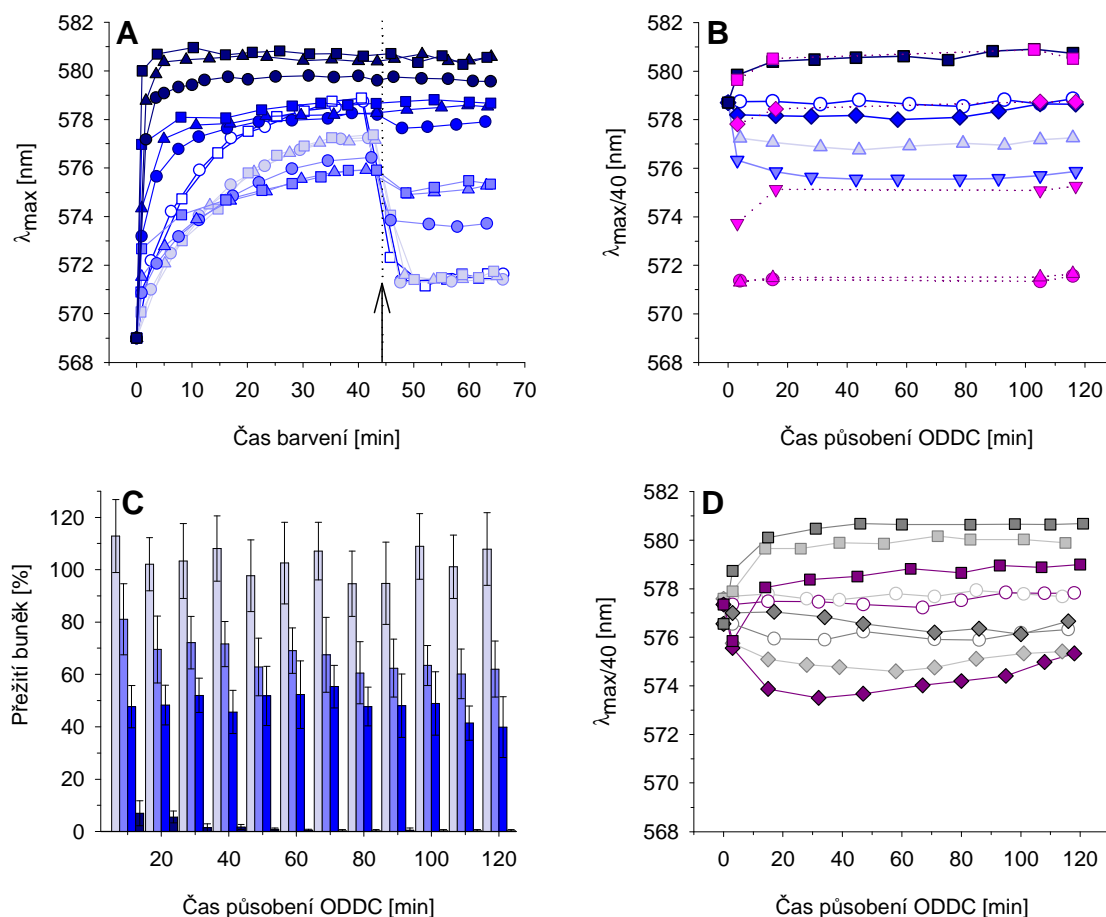
### 3.3.3. Porovnání účinků komerčních biocidů

Otestovali jsme trojici kladně nabitých antiseptických látek, jež díky svému náboji ochotně reagují s cytoplazmatickou membránou kvasinek. Metodou diS-TDEA jsme stanovili mechanismus a rychlost účinku zástupců třech tříd antiseptik: oktenidinu dihydrochloridu z řady bispyridinaminů, chlorhexidinu jako představitele bisguanidinů a kvartérní amoniové soli benzalkonium chloridu (164).

#### 3.3.3.1. Oktenidin dihydrochlorid (ODDC)

ODDC je vysoce efektivní povrchová antimikrobiální látka tvořící necytotoxické komplexy na cílovém místě – pokožce či sliznici. Vazba ODDC na záporně nabitě mikrobiální povrchy způsobuje protržení buněčné membrány. Antimikrobiální efekt ODDC proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím a houbám je připisován jeho silné přilnavosti k membránovým lipidům a interakci s polysacharidy v buněčné stěně bez nepříznivého vlivu na lidské epitelové nebo poraněné tkáně (164,165).

Obrázek 3-27A zachycuje barvicí křivky buněk vystavených čtyřem koncentracím ODDC po dobu 3, 15 a 120 min. Tyto koncentrace (0,1; 0,5; 1 a 3  $\mu$ M) nejlépe vykreslují koncentrační závislost účinku ODDC. Nápadným rysem je prudkost efektu pramenící z rychlé a silné přilnavosti ODDC k buněčným povrchům.



**Obr. 3-27** Účinek ODDC na *S. cerevisiae*. (A) Buňky AD1-3 byly vystaveny vlivu 0  $\mu\text{M}$  (bílé symboly), 0,1  $\mu\text{M}$  (bledě modré symboly), 0,5  $\mu\text{M}$  (světle modré symboly), 1  $\mu\text{M}$  (modré symboly) či 3  $\mu\text{M}$  ODDC (tmavě modré symboly) po různou dobu (kolečka – 3 min, trojúhelníčky – 15 min, čtverečky – 120 min). Pro 0  $\mu\text{M}$  ODDC jsou vyobrazeny pouze dvě barvicí křivky (3 a 120 min). Šipka s tečkovanou čarou udává čas přidání CD koktejlu. (B) Časová závislost  $\lambda_{\text{max}/40}$  ODDC o různých koncentracích (bílé a modré symboly; kolečka – 0  $\mu\text{M}$ , trojúhelníčky – 0,1  $\mu\text{M}$ , obrácené trojúhelníčky – 0,5  $\mu\text{M}$ , kosočtverečky – 1  $\mu\text{M}$ , čtverečky – 3  $\mu\text{M}$  ODDC). Odpovídající růžové symboly představují hodnoty  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  po přidání CD koktejlu k buňkám AD1-3. (C) Přežití AD1-3 buněk po působení 0,1  $\mu\text{M}$  (bledě modré sloupce), 0,5  $\mu\text{M}$  (světle modré sloupce), 1  $\mu\text{M}$  (modré sloupce) nebo 3  $\mu\text{M}$  ODDC (tmavě modré sloupce). (D) Účinek 0  $\mu\text{M}$  (kolečka), 1  $\mu\text{M}$  (kosočtverečky) a 3  $\mu\text{M}$  ODDC (čtverečky) na divoké kmeny *S. cerevisiae* W303-1A (světle šedé symboly), BY4742 (tmavě šedé symboly) a IL125-2B (fialové symboly).

Barvicí křivky buněk vystavených 0,1  $\mu\text{M}$  ODDC se v podstatě nemění po celou dobu experimentu (obr. 3-27A). To naznačuje rychlou, ale omezenou depolarizaci bez jakéhokoliv přispění permeabilizace.

Po 3 min působení 0,5  $\mu\text{M}$  ODDC se ve vzorku vyskytuje malá frakce plně permeabilizovaných buněk a ostatní buňky jsou depolarizované, soudě podle nízké rovnovážné hodnoty po 40 min barvení a odpovědi na CD koktejl (156). Podíl plně depolarizovaných buněk nemůžeme spolehlivě určit kvůli jejich nepatrnému příspěvku k barvení a jejich chybějící odezvě na CD koktejl; jsou to tzv. skryté buňky. Patnáctiminutová expozice vede k nárůstu počtu permeabilizovaných buněk, jak je vidět ze slabší odpovědi na CD koktejl. Podobnost barvicích křivek po 15 a 120 min působení 0,5  $\mu\text{M}$  ODDC (identická rovnovážná hodnota a odpověď na CD koktejl) je důkazem toho, že se kompletní účinek ODDC projeví do 15 min. Strmější počáteční nárůst v barvení buněk po 120 min působení signalizuje zvýšenou propustnost buněčné stěny pro sondu.

Množství permeabilizovaných buněk se dále navýšilo po působení 1  $\mu\text{M}$  ODDC, navíc po 15 a 120 min již nebyla patrná žádná reakce na CD koktejl. Rovnovážné hodnoty obarvení však nejsou maximální, to znamená, že ve vzorku jsou přítomny kromě plně permeabilizovaných i zcela depolarizované buňky.

Po 3 min působení nejvyšší koncentrace 3  $\mu\text{M}$  ODDC je většina buněk plně permeabilizována. S prodlužujícími se expozičními časy se barvicí křivky posouvají dále do červena a procento plně permeabilizovaných buněk nabývá 100 %. Poškození buněčné stěny a membrány je vskutku rozsáhlé, neboť metodou popsanou v kapitole 2.8 lze po působení 3  $\mu\text{M}$  ODDC detekovat výtoku ATP (a jiných metabolitů absorbujících záření o vlnové délce 260 nm) a již po krátkodobém účinku 7  $\mu\text{M}$  ODDC doprovází unikající ATP i proteiny či peptidy (změna absorpce v okolí  $\lambda = 280$  nm). Ostatní výše zmíněné povrchově aktivní látky byly schopné vyvolat nanejvýš výtoku ATP.

Časové závislosti  $\lambda_{\text{max}/40}$  a  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  hodnot vykreslují bleskový účinek ODDC; výsledného efektu, buď depolarizace, nebo úplné permeabilizace, je dosaženo během 15 min (obr. 3-27B).

Fluorescenční výsledky jsou v souladu s výsevovým testem (obr. 3-27C). Studie na divokých kmenech W303-1A, BY4742 a IL125-2B (obr. 3-27D) dokládá, že je 3  $\mu\text{M}$  ODDC schopné navodit kompletní permeabilizaci během 15 min jak u buněk AD1-3, tak u různých divokých kmenů, tj. mechanismus účinku ODDC je zcela univerzální. ODDC se jeví jako ideální příklad povrchově aktivní antifungální látky; působí rychle a je efektivní při nízkých koncentracích. Pomocí diS-TDEA metody tedy můžeme nejen zjistit mechanismus účinku širokého spektra látek, ale i jejich nejnižší efektivní koncentrace, které jsou aplikovatelné na řadu kvasinkových druhů, pravděpodobně i patogenních.

Velkou předností ODDC je jeho neúčast na mikrobiální rezistenci. ODDC není substrátem žádné z hlavních MDR pump *S. cerevisiae* (obr. 3-30D) a dokonce se ani nepředpokládá vznik mikrobiální rezistence vůči této rychle působící povrchově aktivní látce (165).

### 3.3.3.2. Chlorhexidin

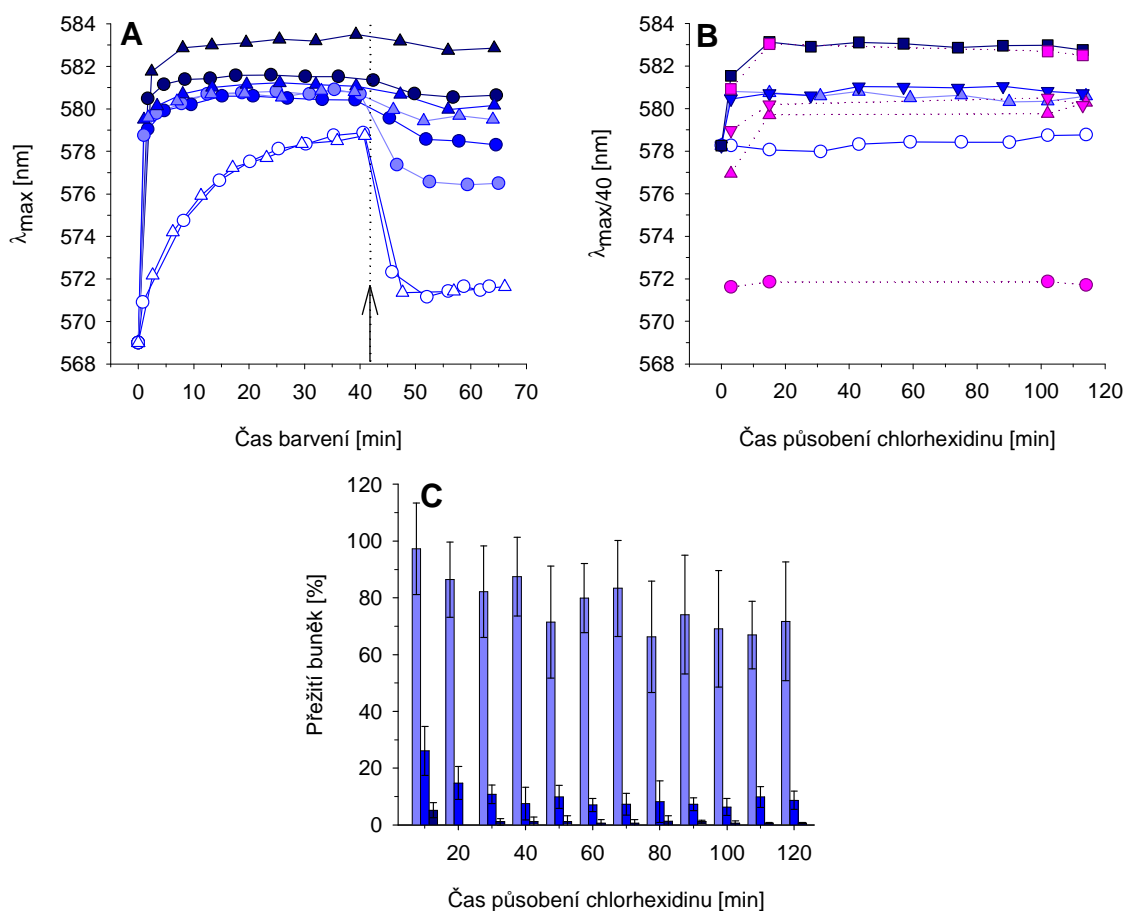
Chlorhexidin je antiseptikum s dlouhou tradicí, používá se v klinické praxi od 50. let 20. století, naproti tomu ODDC je vyhledávaným desinfekčním prostředkem teprve posledních 20 let. Chlorhexidin je hydrofobní a lipofilní látka, jež interaguje s membránovými fosfolipidy, jeho vysoká intracelulární koncentrace je pro buňky letální, neboť sráží cytoplazmatický obsah. Díky tomu našel uplatnění zejména v zubním lékařství (166) v boji s širokým spektrem Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií, taktéž je ceněn jako antimykotikum obzvláště proti *C. albicans* (167,168). Jeho antimikrobiální aktivitu umocňuje hydroxid vápenatý (169).

Kladně nabitá molekula chlorhexidinu interaguje s fosfátovými skupinami v buněčné stěně (167), to činí buněčnou stěnu propustnější pro samotný chlorhexidin i fluorescenční sondu. Toto poškození buněčné stěny se projeví překotným počátečním barvením buněk (obr. 3-28A). V nízkých koncentracích (1  $\mu\text{M}$ ) vyvolává chlorhexidin hyperpolarizaci membrány v důsledku výtoku  $\text{K}^+$  z cytosolu (podobnou odpověď na CD koktejl jsme zachytili po působení SDS na obr. 3-22B, nebo gramicidinu A na obr. 3-23A). Ač se průběh barvicích křivek (obr. 3-28A), respektive časových závislostí  $\lambda_{\text{max}/40}$  (obr. 3-28B), pro 1  $\mu\text{M}$  a 3  $\mu\text{M}$  chlorhexidin liší jen minimálně, z odpovědí na CD koktejl je zřejmé, že přerozdělení příspěvků iontů ( $\text{H}^+$  a  $\text{K}^+$ ) k membránovému potenciálu probíhá při trojnásobné koncentraci chlorhexidinu rychleji. Celkově postupuje tento proces u chlorhexidinu svižněji než u gramicidinu A při týchž

koncentracích (1 a 3  $\mu\text{M}$ ). Výrazný pokles v přežívání buněk vystavených účinkům 3  $\mu\text{M}$  chlorhexidinu (obr. 3-28C) můžeme přisoudit zejména rozsáhlejšímu poškození buněčné stěny, která je esenciální pro množení buněk.

Po 3 min působení 7  $\mu\text{M}$  chlorhexidinu jsou téměř všechny buňky permeabilizovány, přesto po 15 min pozorujeme nezvyklý červený posuv barvení na přibližně 583 nm (obr. 3-28A a B), který jsme dosud nezaznamenali u žádné jiné chemikálie a jež je odrazem koagulace bílkovin v cytosolu kvasinek (168). Ta je zřejmě příčinou onoho netypického posuvu emisního signálu do červené oblasti spektra.

Z naměřených dat vyplývá, že chlorhexidin nemůže soupeřit s ODDC co do rychlosti, ani efektivnosti permeabilizace kvasinkových buněk. Tyto závěry potvrzují testy obou látek na různých druzích patogenních bakterií a *C. albicans* (170). Udává se, že pro dosažení baktericidního a fungicidního efektu je nutná až desetkrát vyšší koncentrace chlorhexidinu oproti ODDC (164,165).

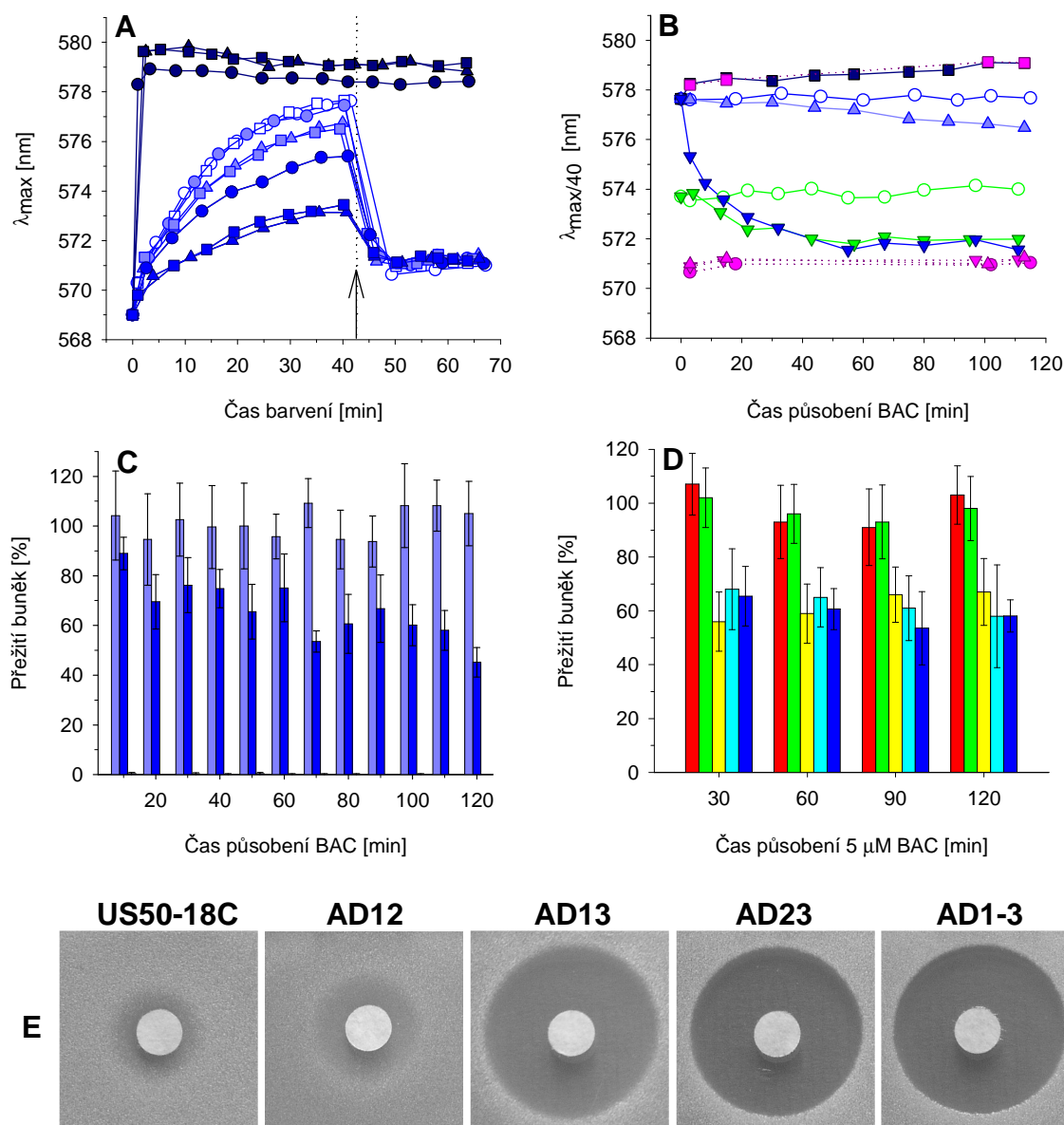


**Obr. 3-28** Účinek chlorhexidinu na kvasinky. (A) Post-diauxické buňky AD1-3 byly vystaveny působení 0  $\mu\text{M}$  (bílé symboly), 1  $\mu\text{M}$  (světle modré symboly), 3  $\mu\text{M}$  (modré symboly) a 7  $\mu\text{M}$  chlorhexidinu (tmavě modré symboly) po dobu 3 min (kolečka) nebo 15 min (trojúhelníčky). Šipka a tečkovaná čára označují čas přidání CD koktejlu. (B) Časová závislost  $\lambda_{\text{max}/40}$  u různých koncentrací chlorhexidinu (bílé a modré symboly; kolečka - 0  $\mu\text{M}$ , trojúhelníčky - 1  $\mu\text{M}$ , obrácené trojúhelníčky - 3  $\mu\text{M}$ , čtverečky - 7  $\mu\text{M}$  chlorhexidin). Příslušné růžové symboly znázorňují hodnoty  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  po přidání CD koktejlu. (C) Přežití AD1-3 buněk po účinku 1  $\mu\text{M}$  (světle modré sloupce), 3  $\mu\text{M}$  (modré sloupce) a 7  $\mu\text{M}$  chlorhexidinu (tmavě modré sloupce).

### 3.3.3.3. Benzalkonium chlorid (BAC)

Benzalkonium chlorid se používá jako antimikrobiální látka v klinické praxi od roku 1935. Patří mezi povrchově aktivní kvartérní amoniové sloučeniny, jež jsou

primárně zaměřeny na cytoplazmatické membrány bakterií a kvasinek. Kvartérní amoniové soli procházejí buněčnou stěnou a interagují s plazmatickou membránou, způsobují tak únik jednoduchých látek z cytosolu, uvnitř buněk uvolňují autolytické enzymy, které degradují proteiny a nukleové kyseliny (171,172).

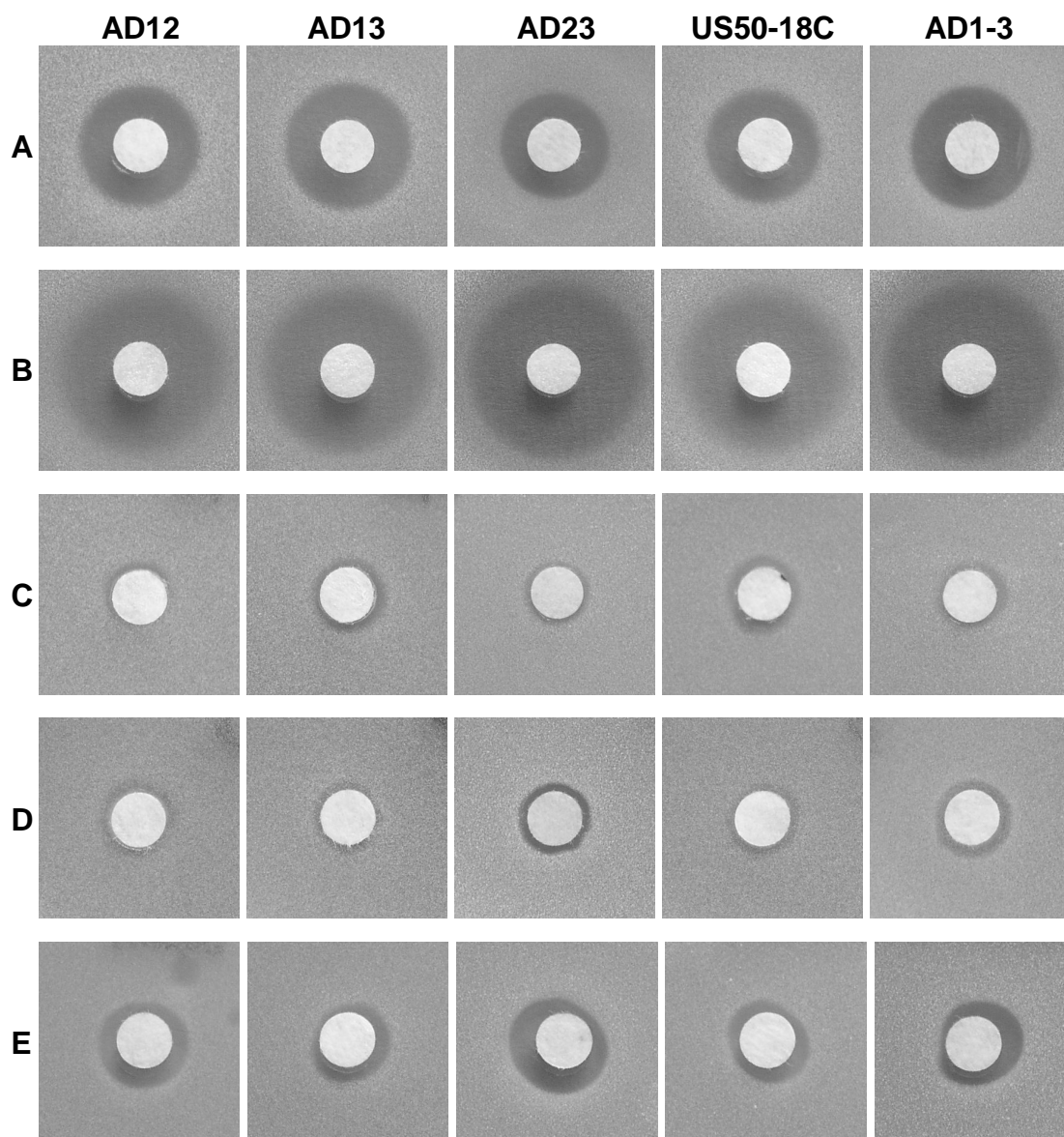


**Obr. 3-29** BAC ovlivňuje nejen plazmatickou membránu, ale i některé cytoplazmatické komponenty kvasinek. (A) Buňky byly vystaveny účinku 0  $\mu$ M (bílé symboly), 1  $\mu$ M (světle modré symboly), 5  $\mu$ M (modré symboly) nebo 50  $\mu$ M BAC (tmavě modré symboly) po různou dobu (kolečka – 15 min, trojúhelníčky – 60 min, čtverečky – 120 min), než byl BAC odstraněn. Šipka a tečkovaná čára označují přidání CD koktejlu. (B) Časová závislost  $\lambda_{max/40}$  při různých koncentracích BAC před (modré symboly) a po (růžové symboly) přidání CD koktejlu k buňkám AD1-3 v porovnání s vlivem 5  $\mu$ M BAC na buňky AD12 (zelené symboly). Kolečka – 0  $\mu$ M, trojúhelníčky – 1  $\mu$ M, obrácené trojúhelníčky – 5  $\mu$ M, čtverečky – 50  $\mu$ M BAC. (C) Přežívání buněk AD1-3 vystavených působení 1  $\mu$ M (světle modré sloupce), 5  $\mu$ M (modré sloupce) a 50  $\mu$ M BAC (tmavě modré sloupce – přežívání blízké nebo rovné nule). (D) Přežívání buněk ošetřených 5  $\mu$ M BAC (US50-18C – červené sloupce, AD12 – zelené sloupce, AD13 – žluté sloupce, AD23 – tyrkysově sloupce, AD1-3 – modré sloupce). (E) Růstové inhibiční zóny kmenů US50-18C, AD12, AD13, AD23 a AD1-3 v přítomnosti 15 mM BAC.

Červený posuv barvicích křivek a nulová odezva na CD koktejl prozrazuje převahu permeabilizovaných buněk po působení 50  $\mu$ M BAC, zbylé buňky jsou plně



depolarizované (obr. 3-29A a B). Tyto buňky však nejsou životaschopné (obr. 3-29C). V případě 1 a 5  $\mu\text{M}$  BAC nastává koncentračně závislá depolarizace, jež je mnohem pomalejší než ta vyvolaná 0,1  $\mu\text{M}$  ODDC. Po přidání CD koktejlu se kvasinky chovají stejně jako nedotčené kontrolní buňky, tj. žádné buňky nejsou permeabilizované (obr. 3-29A a B). Zatímco dvouhodinové působení 1  $\mu\text{M}$  BAC přežívají všechny buňky, 5  $\mu\text{M}$  BAC redukuje přežívání přibližně na 60 % (obr. 3-29C), a to navzdory nepřítomnosti buněčné permeabilizace.



**Obr. 3-30** SDS, nystatin, amfotericin B, ODDC a chlorhexidin nejsou substráty Pdr5p, Sng2p a Yor1p. Růstové inhibiční zóny kmenů s různými pumpami (AD12, AD13, AD23 a US50-18C) a negativní kontroly AD1-3 v přítomnosti: **(A)** 1 M SDS, **(B)** 20 mM nystatinu, **(C)** 10 mM amfotericinu B rozpuštěného ve vodě, **(D)** 15 mM ODDC, **(E)** 30 mM chlorhexidinu.

Nabízí se hned několik vysvětlení, proč je podíl přežívajících buněk po působení 5  $\mu\text{M}$  BAC v rozporu s počtem permeabilizovaných buněk detekovaných pomocí diS-TDEA metody. BAC může

- 1) způsobovat hlubokou depolarizaci, která natolik naruší plazmatickou membránu, až dojde k poklesu přežívání buněk;



- 2) poškozovat buněčnou stěnu způsobem, který brání buněčnému rozmnožování;
- 3) zasáhnout intracelulárně a inhibovat metabolismus kvasinek.

Pomocí diS-TDEA metody nelze zjistit poškození buněčné stěny v situaci, kdy jsou buňky zároveň depolarizované, jak je tomu právě u benzalkonium chloridu. Podobně nepostihnutelná je i hluboká destruktivní depolarizace a metabolická inhibice.

Abychom získali lepší představu o mechanismu, jakým BAC zabíjí, podrobili jsme jeho účinkům sadu isogenních kvasinkových kmenů lišících se v zastoupení jednotlivých MDR pump. Jak je vidět na obr. 3-29E, BAC je substrátem Pdr5p (narozdíl od ostatních povrchově aktivních látek – viz obr. 3-30). Pouze kmeny US50-18C a AD12, které mají pumpu Pdr5p, jsou schopné růst v blízkosti terčů, kde je koncentrace benzalkonium chloridu dost vysoká na zastavení růstu kmenů, které tuto pumpu postrádají. Kmeny US50-18C a AD12 vykazují plné přežívání, jsou-li vystaveny 5  $\mu\text{M}$  BAC (obr. 3-29D), na rozdíl od kmenů bez Pdr5p. Ačkoliv je přežívání AD12 a AD1-3 po působení benzalkonium chloridu různé (obr. 3-29D), má BAC stejný depolarizující dopad na oba kmeny (obr. 3-29B). Nižší úroveň barvení kontrolních buněk AD12 je tedy způsobena odstraňováním sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pumpou Pdr5p (obr. 3-29B) (156). Tato data hovoří ve prospěch metabolické inhibice, tj. při nízkých koncentracích benzalkonium chloridu hraje poškození membrány v jeho toxicitě minoritní úlohu.

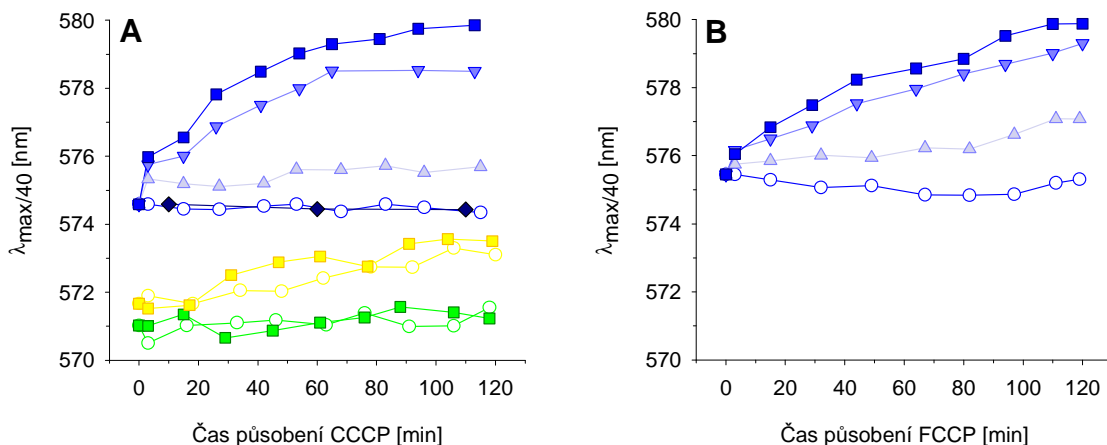
Mechanismus účinku některých běžně používaných biocidů není dodnes zcela znám. Látky se indikují ve vysokých koncentracích, které způsobují inaktivaci řady enzymů nebo permeabilizaci buněk a které mohou napáchat zbytečné škody na okolní tkáni. Použijeme-li naopak nízké koncentrace biocidů, můžeme prostřednictvím diS-TDEA metody podhalit řadu tajemství týkajících se událostí, které předcházejí smrti buněk. Tyto nové poznatky by mohly přispět k optimalizaci dávkování antiseptických přípravků.

### 3.4. Studium účinku látek ovlivňujících aktivitu kvasinkové H<sup>+</sup>-ATPázy

Doposud jsme prostřednictvím diS-TDEA metody zkoumali interakce povrchově aktivních látek s buněčnou stěnou a plazmatickou membránou jako s takřka homogenními strukturami, diS-TDEA metoda nám však nabízí i mnohem detailnější pohled. Tuto metodu lze využít ke studiu velice jemných interakcí látek s konkrétními proteiny v plazmatické membráně, např. s H<sup>+</sup>-ATPázou a s MDR pumpami Pdr5p a Snq2p. Můžeme sledovat stopy, které po sobě zanechají látky poté, co je odstraníme z okolního prostředí a zjistit tak, zda aktivace či inhibice daného proteinu je skutečně trvalá.

Nejprve se pokusíme zodpovědět otázku, jak se časově omezený kontakt kvasinkových buněk s látkami aktivujícími H<sup>+</sup>-ATPázu odrazí na velikosti jejich membránového potenciálu. Pro demonstraci tohoto jevu využijeme buňky AD1-3 z pozdní exponenciální fáze, kdy je aktivita H<sup>+</sup>-ATPázy poněkud nižší (130). Protonofor CCCP okyseluje vnitřní prostředí buňky, a tím rychle indukuje aktivaci H<sup>+</sup>-ATPázy, blíže kapitola 3.2.3.1. U buněk AD1-3 postrádajících MDR pumpu Pdr5p a Snq2p pozorujeme postupný nárůst barvení v závislosti na koncentraci CCCP a době, po kterou byly buňky vystaveny jeho účinku (obr. 3-31A). Zatímco 1  $\mu\text{M}$  CCCP vyvolává u buněk AD1-3 jen slabou hyperpolarizaci, která se téměř nemění po celou

dobu experimentu, aktivace  $H^+$ -ATPázy po působení 5 a 10  $\mu M$  CCCP s časem sílí. Pro porovnání je v tomto grafu zakreslen i účinek 10 mM glukózy, která je také schopna aktivovat kvasinkovou  $H^+$ -ATPázu (97). Na rozdíl od CCCP se však ihned po odstranění stimulu – glukózy – z buněčné suspenze navrací aktivita  $H^+$ -ATPázy, a s ní i velikost membránového potenciálu, na běžnou úroveň a hodnoty  $\lambda_{max/40}$  se shodují s hodnotami příslušnými kontrolním buňkám. I jiný protonofor, karbonylkyanid 4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon (FCCP), jež je strukturně velice blízký CCCP, karbonylkyanidu 3-chlorofenylhydrazonu (viz obr. 2-1B a C) mohutně aktivuje  $H^+$ -ATPázu pozdně exponenciálních buněk AD1-3 (obr. 3-31B). Zdá se, že při těchto koncentracích obou látek probíhá tento jev u FCCP o něco málo pomaleji.



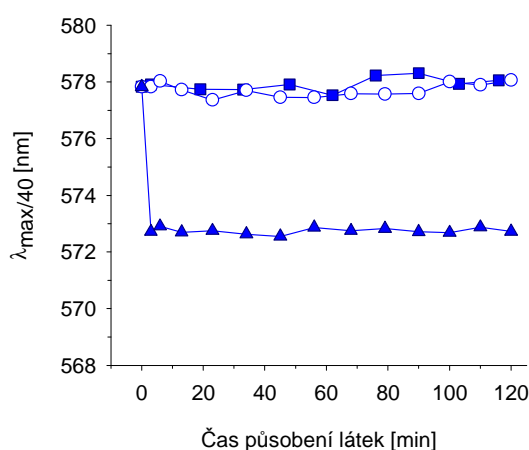
**Obr. 3-31** CCCP a FCCP aktivují  $H^+$ -ATPázu. (A) Buňky z pozdní exponenciální fáze kmenů AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly) a AD1-3 (modré symboly) byly vystaveny působení 0  $\mu M$  (kolečka), 1  $\mu M$  (trojúhelníčky), 5  $\mu M$  (obrácené trojúhelníčky) a 10  $\mu M$  CCCP (čtverečky). Pro porovnání je vyobrazen účinek 10 mM glukózy na buňky AD1-3 (kosočtverečky). V případě kmenů AD12 a AD13 je pro přehlednost zobrazen pouze účinek 10  $\mu M$  CCCP. (B) Časová závislost  $\lambda_{max/40}$  různých koncentrací 0  $\mu M$  (kolečka), 1  $\mu M$  (trojúhelníčky), 5  $\mu M$  (obrácené trojúhelníčky) a 10  $\mu M$  FCCP (čtverečky) u pozdně exponenciálních buněk AD1-3.

V kapitole 3.2.3.2. jsme ukázali, že je CCCP substrátem Pdr5p i Snq2p a že je schopný plně inhibovat transport fluorescenční sondy oběma pumpami již při koncentraci 5  $\mu M$  (obr. 3-13). Inhibice transportu sondy diS-C<sub>3</sub>(3) MDR pumpami se v tomto případě projevila splynutím barvicích křivek kmenů AD12 (Pdr5p) a AD13 (Snq2p) s barvicí křivkou negativní kontroly AD1-3. Nejenže při použití diS-TDEA metody nepozorujeme splynutí barvicích křivek kmenů AD12, AD13 a AD1-3, ale dokonce ani rozdíl mezi hodnotami  $\lambda_{max/40}$  buněk kmenů AD12 a AD13 vystavených účinkům nulové a 10  $\mu M$  koncentrace CCCP neodpovídá rozdílu hodnot  $\lambda_{max/40}$  u kmene AD1-3 (obr. 3-31A), CCCP tedy neinhibuje transport sondy pumpami, ani nehyperpolarizuje membránu těchto kmenů.

Princip diS-TDEA metody spočívá v odstranění „volných“ molekul zkoumané látky z okolního prostředí popřípadě z povrchových vrstev kvasinkových buněk, zejména z buněčné stěny, CCCP je však lipofilní sloučenina, tudíž jeho úplné odstranění nemusí být tak snadné. Pumpy Pdr5p a Snq2p zřejmě dokážou z plazmatických membrán buněk AD12, respektive AD13 odstranit i ty zbývající molekuly CCCP, které u buněk AD1-3 vyvolávají aktivaci  $H^+$ -ATPázy, neboli přítomnost pump může ochránit buňky kmenů AD12 a AD13 před vlivem CCCP na činnost jejich  $H^+$ -ATPázy. Zároveň můžeme CCCP prohlásit za ryzí substrát obou pump; transport sondy inhibuje zjevně čistě kompetitivně, neboť po jeho odstranění

z vnějšího prostředí opustí molekuly CCCP i vazebná místa obou pump a dále již nikterak neovlivňují transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3).

Pomocí diS-TDEA metody můžeme samozřejmě studovat i opačný děj – inhibici H<sup>+</sup>-ATPázy. Na obr. 3-32 je porovnán účinek dvou inhibitorů H<sup>+</sup>-ATPázy (viz kapitola 3.2.4), zablokování H<sup>+</sup>-ATPázy prostřednictvím 10 μM DM-11 je naprosto vratný proces, hodnoty λ<sub>max/40</sub> se po odstranění DM-11 z prostředí zcela shodují s hodnotami buněk, které nebyly vystaveny vlivu žádného inhibitoru, oproti tomu 1 μM PYG-14 inhibuje činnost tohoto enzymu trvale. Jelikož je správná funkce H<sup>+</sup>-ATPázy naprosto nepostradatelná pro přežití kvasinkových buněk, činí tato blesková plná inhibice protonové pumpy, projevující se hlubokou depolarizací v grafu 3-32, z PYG-14 zajímavou antifungální látkou.



**Obr. 3-32** Porovnání síly dvou inhibitorů H<sup>+</sup>-ATPázy na post-diauxických buňkách AD1-3. Kolečka – bez látek, čtverečky – 10 μM DM-11, trojúhelníčky – 1 μM PYG-14.

### 3.5. Interakce MDR inhibitorů s cílovými proteiny

Přes veškerou snahu a intenzivní dlouholetý výzkum je interakce MDR inhibitorů s cílovými proteiny obestřena řadou záhad. Dodnes se nepodařilo jednoznačně objasnit i tak zásadní problémy, jakými je počet vazebných míst MDR transportérů, afinita proteinů k různým substrátům, jejich vliv na rychlost hydrolyzy ATP či interakční faktory mezi jednotlivými látkami, které zpětně ovlivňují afinitu pump k substrátům.

Transport látek MDR pumpami může být hodnocen jako náhodné navázání dvou substrátů; zda je vazba dvou substrátů nezávislá anebo závislá udává jejich interakční faktor, který mimo jiné vypovídá o tom, jak tyto látky redukuje své „skutečné“ afinity. Tato teorie neklade žádné nároky na uspořádání a fyzickou blízkost vazebných pozic. Na interakci substrátů lze však stejně tak dobře nahlížet jako na prostorovou interakci molekul substrátů, kdy k sobě dvě nezávislá vazebná místa velmi těsně přiléhají a vazba první molekuly substrátu vytváří prostorové překážky pro přístup molekul druhé látky a částečně tak blokuje její navázání a snižuje efektivní afinitu (173).

Obecně můžeme interakce látek s MDR pumpami rozčlenit do těchto kategorií:

- 1) čistě kompetitivní inhibice
- 2) čistě nekompetitivní inhibice

3) různé typy smíšených inhibicí, při nichž dochází ke změně afinit, rychlostí transportu a disociačních konstant komplexů proteinů s inhibitory. Poslední třída v sobě zahrnuje řadu kombinací, protože interakční parametry se mohou měnit nezávisle.

### 3.5.1. Kompetitivní inhibice dvou substrátů versus reálná inhibice pump

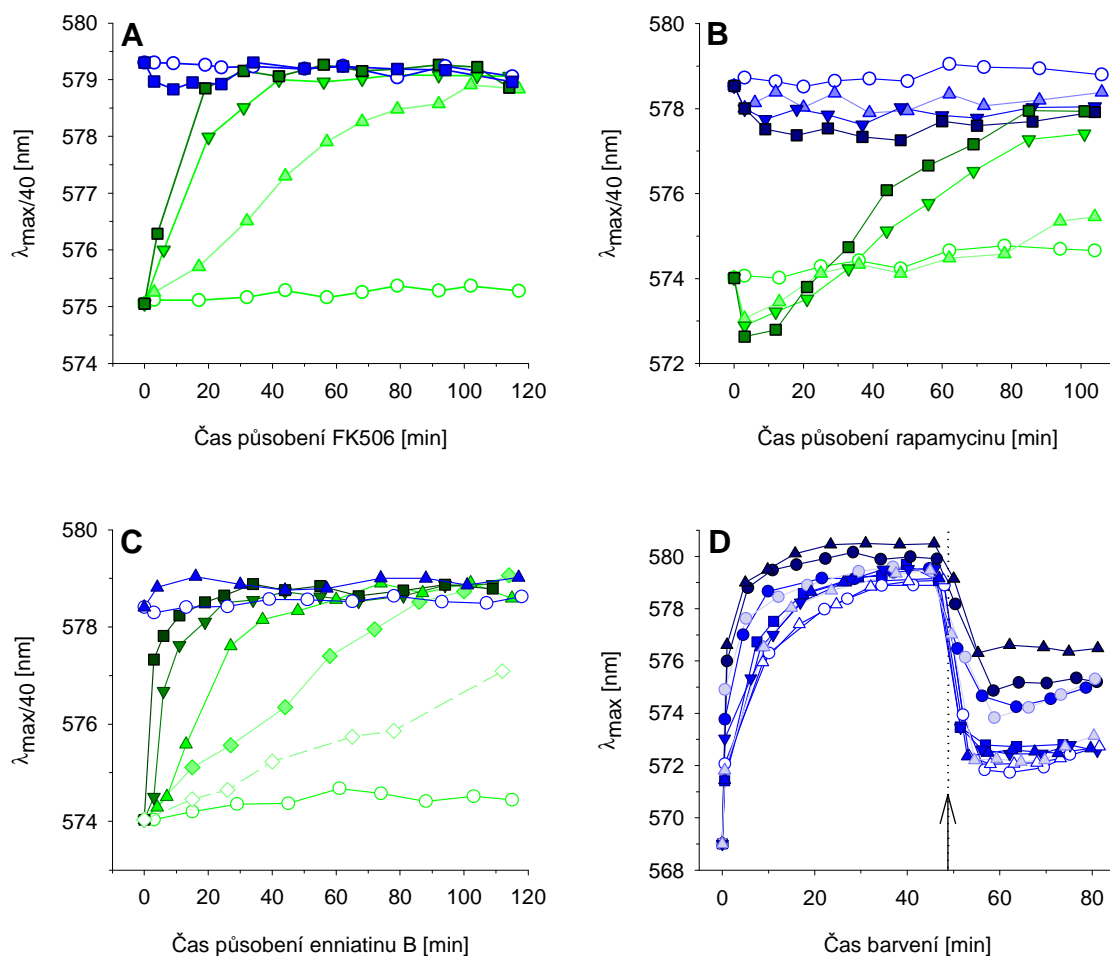
Jak už předznamenala předešlá kapitola, můžeme pomocí diS-TDEA metody rozhodnout, o jaký typ inhibice MDR pump se jedná. Substráty čili kompetitivní inhibitory, které se vyznačují vysokou disociační konstantou či naopak nízkou afinitou, snadno opouštějí vazebné místo pumpy a po jejich odstranění z média již nepozorujeme žádnou kompetitivní inhibici transportu sondy pumpami tak, jako tomu bylo v případě CCCP (obr. 3-31A).

V kapitole 3.2.1. jsme představili trojici látek (FK506, její strukturální analog rapamycin a enniatin B) inhibující transport sondy pumpou Pdr5p, všechny tři sloučeniny v různé míře inhibují transport fluorescenční sondy i poté, co je odstraníme z média (obr. 3-33A, B a C). Jejich přetrvávající inhibiční účinek pravděpodobně pramení z vysoké afinity nebo pomalého transportu z buněk. Zdá se, že tyto látky jsou nejen inhibitory Pdr5p, ale i jejími substráty, jak ostatně o FK506 předpokládal už Egner s kolegy (23). Můžeme je tedy pokládat spíše než za reálné inhibitory za vysokoafinitní substráty Pdr5p, které jsou schopné po dlouhou dobu okupovat vazebné místo pumpy.

Rychlost s jakou se křivky rovnovážných hodnot barvení ( $\lambda_{\max/40}$ ) buněk AD12 vystavených působení těchto látek přibližují ke křivkám kmene AD1-3 vypovídá o inhibičním potenciálu látek při daných koncentracích. Zatímco rapamycin (obr. 3-33B) značně zaostává ve schopnosti inhibovat pumpu Pdr5p za FK506 (obr. 3-33A) a enniatinem B (obr. 3-33C) podobně jako na obr. 3-6 (účinek 30  $\mu\text{M}$  rapamycinu je porovnatelný s působením 1  $\mu\text{M}$  FK506 či 0,5  $\mu\text{M}$  enniatinu B), je nyní jasně zřetelný rozdíl mezi FK506 a enniatinem B. Enniatin B je přibližně dvakrát efektivnější inhibitor než FK506, například 0,5  $\mu\text{M}$  enniatin B docílí plné inhibice Pdr5p ve stejný okamžik jako 1  $\mu\text{M}$  FK506.

Klinicky používané imunosupresanty FK506 a rapamycin, sekundární metabolity různých druhů *Streptomyces*, blokují aktivaci T-buněk, čímž potlačují imunitní systém po transplantacích orgánů. Mechanismus, s jakým FK506 brání imunitní reakci, se velmi podobá její antifungální aktivitě. FK506, ale i rapamycin se v kvasinkových buňkách váží na FKBP12 (*FK506 binding protein*), jenž je z 54 % identický se svým lidským protějškem, a inhibují jeho enzymovou aktivitu (146,174,175). Přes veškerou strukturální i funkční podobnost obou látek vyvolává pouze rapamycin znatelnou depolarizaci, kterou můžeme pozorovat u kmene AD1-3 po celou dobu trvání experimentu a u kmene AD12 během prvních 20 až 30 minut měření, než ji překryje zvýšené barvení v důsledku inhibice transportu sondy pumpou Pdr5p (obr. 3-33B). Tento pokles ve velikosti membránového potenciálu je pravděpodobně výsledkem činnosti FKBP12-rapamycinového komplexu, který inhibuje aktivitu TORC1. *TOR (target of rapamycin)* kóduje dva velké komplexy, TORC1 a TORC2, které v kvasinkových buňkách koordinují řadu aspektů buněčného růstu, mimo jiné regulují syntézu proteinů na několika úrovních včetně aktivity vysokoafinitních transportérů aminokyselin a zastavují růst kvasinek v G1 fázi buněčného cyklu (146). Této schopnosti rapamycinu se využívá nejen při léčbě rakoviny, ale i v boji

s vláknitými houbami a kvasinkami. Ba původně byl rapamycin izolován z půdní bakterie *Streptomyces hygroscopicus* na Rapa Nui (Velikonoční ostrov, odtud pochází také jeho jméno) v roce 1975 jako antimykotikum a až o desetiletí později byly objeveny jeho imunosupresivní a protirakovinové funkce (176,177).



**Obr. 3-33** Účinky různých inhibitorů pumpy Pdr5p na kvasinky z post-diauxické fáze růstu. **(A)** Buňky kmenů AD12 (Pdr5p; zelené symboly) a AD1-3 (negativní kontrola; modré symboly) byly vystaveny po omezenou dobu působení 0  $\mu\text{M}$  (kolečka), 1  $\mu\text{M}$  (trojúhelníčky), 3  $\mu\text{M}$  (obrácené trojúhelníčky) a 7  $\mu\text{M}$  FK506 (čtverečky). U buněk AD1-3 je pro přehlednost zobrazen pouze účinek 7  $\mu\text{M}$  FK506. **(B)** Časová závislost  $\lambda_{\max/40}$  buněk AD12 (zelené symboly) a AD1-3 (modré symboly) vystavených účinkům 0  $\mu\text{M}$  (kolečka), 5  $\mu\text{M}$  (trojúhelníčky), 15  $\mu\text{M}$  (obrácené trojúhelníčky) a 30  $\mu\text{M}$  rapamycinu (čtverečky). **(C)** Vliv různých koncentrací enniatinu B (kolečka – 0  $\mu\text{M}$ , kosočtverečky – 0,5  $\mu\text{M}$ , trojúhelníčky – 1  $\mu\text{M}$ , obrácené trojúhelníčky – 3  $\mu\text{M}$ , čtverečky – 7  $\mu\text{M}$  enniatin B) na buňky AD12 (zelené symboly) a AD1-3 (modré symboly). U buněk AD1-3 je pro přehlednost zobrazen pouze účinek 1  $\mu\text{M}$  enniatinu B. Pro srovnání je uveden účinek 0,5  $\mu\text{M}$  FK506 na buňky AD12 (bílé kosočtverečky). **(D)** Enniatin B je draselný ionofor. Buňky AD1-3 byly vystaveny působení 1  $\mu\text{M}$  enniatinu B (modré symboly), 1  $\mu\text{M}$  valinomycinu (světle modré symboly) a 1  $\mu\text{M}$  gramicidinu A (tmavě modré symboly) po dobu 5 min (kolečka) nebo 60 min (trojúhelníčky) a 10  $\mu\text{M}$  enniatinu B po dobu 5 min (čtverečky) a 60 min (obrácené trojúhelníčky). Bílá kolečka (5 min) a trojúhelníčky (60 min) zachycují barvicí křivky buněk neovlivněných žádnou látkou. Šipka spolu s tečkovanou čarou označuje čas přidání CD koktejlu.

Ze zmiňované trojice kompetitivních inhibitorů je enniatin B bezpochyby tím nejefektivnějším (obr. 3-33C), jeho předností je vysokoafinitní interakce s pumpou Pdr5p a nízká disociační konstanta. Za povšimnutí stojí i mírně zvýšené hodnoty  $\lambda_{\max/40}$  čili jemná hyperpolarizace membrány buněk AD1-3 vystavených jeho působení oproti kontrolním buňkám. Tato hyperpolarizace je důsledkem výtoku  $\text{K}^+$  z buněk, enniatin B

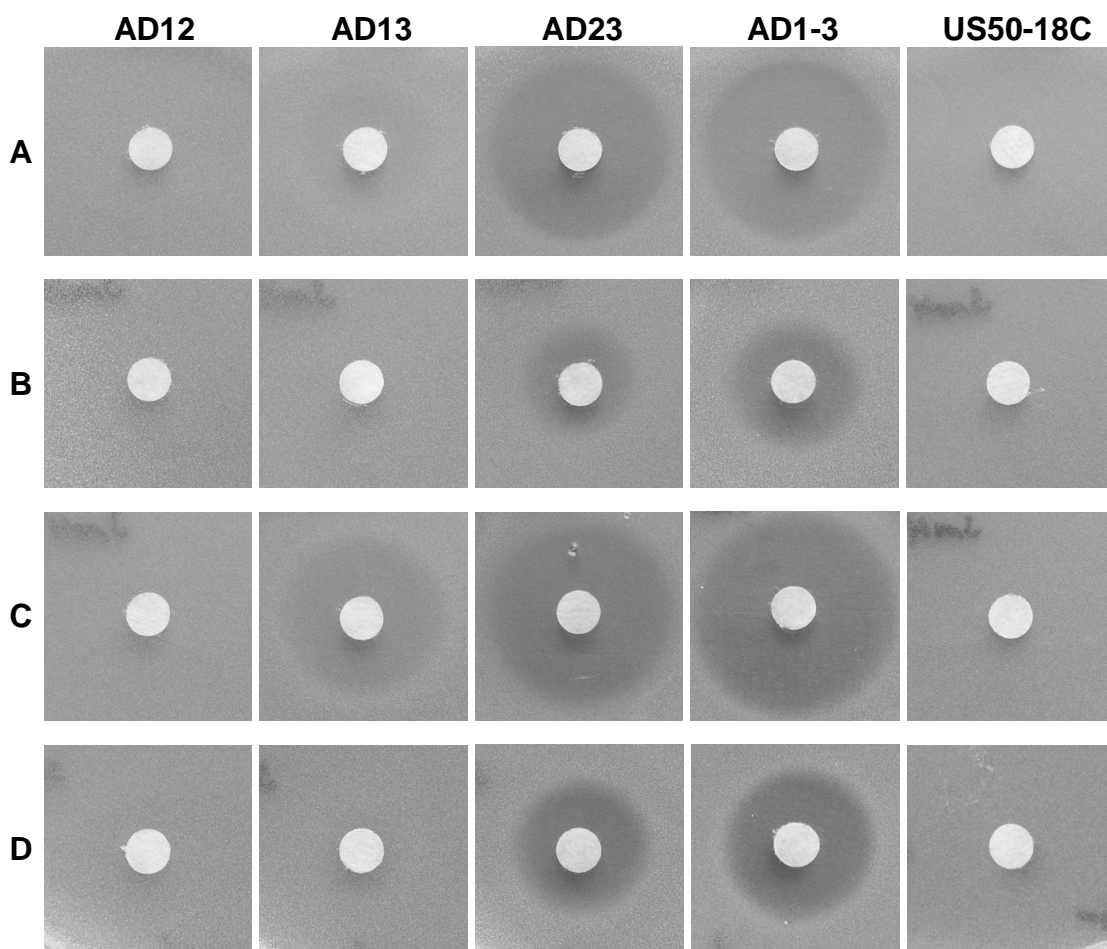
je totiž ionoforové antibiotikum s vysokou selektivitou pro kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin ( $K^+ > Ca^{2+} \geq Na^+ > Mg^{2+} > Li^+$ ) (178). Lipofilní molekuly enniatinu B tvoří s kationty komplexy v poměru 1:1, 2:1 či 3:2, které usnadňují iontům průchod přes membránu (179,180). Pravděpodobnost vzniku uspořádání 3:2 je mnohem menší než předchozích dvou. Díky pružnosti cyklohexadepsipeptidového řetězce enniatinu B se mohou kationty usadit uprostřed jeho prstence (komplex 1:1), objemnější kationty pak sevřou molekuly enniatinu B mezi sebe za vzniku komplexů 2:1 nebo 3:2, proto enniatin B nevyniká takovou iontovou selektivitou jako jiný cyklický ionofor, valinomycin, který je schopen transportovat pouze kationty dobře padnoucí do jeho dutiny (178).

Porovnáme-li účinky enniatinu B s valinomycinem, draselným přenašečem, a s gramicidinem A, antibiotikem produkovaným půdními bakteriemi *Bacillus brevis* během sporulace<sup>1</sup>, jehož dimery tvoří membránové kanály či póry propustné pro jednomocné kationty (181), zjistíme, že se tvar barvicích křivek (včetně reakce na CD koktejl) po 5 a 60 min působení 1  $\mu$ M enniatinu B zcela shoduje s barvicími křivkami buněk AD1-3 vystavených vlivu valinomycinu o téže koncentraci, kdežto gramicidin A vyvolává intenzivnější hyperpolarizaci plazmatické membrány (obr. 3-33D). Přestože jsou si odpovědi buněk na CD koktejl po 5 min působení 1  $\mu$ M enniatinu B, 1  $\mu$ M valinomycinu a 1  $\mu$ M gramicidinu A podobné, s prodlužujícím se časem odezva na CD koktejl u gramicidinu A slábne, zatímco v případě enniatinu B i valinomycinu se přibližuje k reakci kontrolních buněk. Také samotný vzhled barvicích křivek buněk vystavených vlivu 1  $\mu$ M enniatinu B a valinomycinu se postupně navrácí k podobě barvicích křivek kontrolních buněk, i když stále přetrvává vyšší rovnovážná hodnota barvení. Ztráta draselných kationtů je zřejmě rychle kompenzována protony, neboť membránový potenciál buněk vystavených působení enniatinu B a valinomycinu je opět citlivý k CD koktejl. Jelikož se účinek 10  $\mu$ M enniatinu B po 5 a 60 min shoduje s vlivem, jaký zanechá na kvasinkách hodinový kontakt s 1  $\mu$ M enniatinem B, lze předpokládat, že existuje jistý práh, jehož překročení spustí zmiňovaný kompenzační proces. Patrně však existuje i horní mez, kterou v našem případě představuje gramicidin A, zatímco gramicidinovými kanály proudí až  $10^7$  iontů za sekundu (182), ionofory přenašečového typu (valinomycin a enniatin B) nejsou sto zajistit zdaleka tak masivní únik draselných kationtů z buněk. Pomocí diS-TDEA metody jsme tedy schopni rozeznat přibližnou stechiometrii transportu draselných kationtů neboli rozpoznat, zda se jedná o přenašečový nebo kanálový typ ionoforu. Bez zajímavosti není ani pozorování přelévání příspěvků  $K^+$  a  $H^+$  gradientů k celkové velikosti membránového potenciálu po vnějším zásahu.

### 3.5.2. Vliv flukonazolu a ketokonazolu na transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pumpami Pdr5p a Snq2p

Flukonazol a ketokonazol jsou výrazně silnější substráty pumpy Pdr5p než Snq2p (obr. 3-34A a C). Předpokládáme-li, že se obě látky pohybují agarem s toutéž lehkostí, jinými slovy jejich difúze není ničím brzděna, naznačují obdobné velikosti zón kmenů AD23 a AD1-3 v přítomnosti 3 mM flukonazolu (obr. 3-34B) a 300  $\mu$ M ketokonazolu (obr. 3-34D), že je ketokonazol přibližně desetkrát účinnější antimykotikum než flukonazol.

<sup>1</sup> Gramicidin byl pojmenován podle své schopnosti hubit Gram-pozitivní bakterie. Patří mezi vůbec první objevená antibiotika, v klinické praxi se používá od roku 1939 (182).

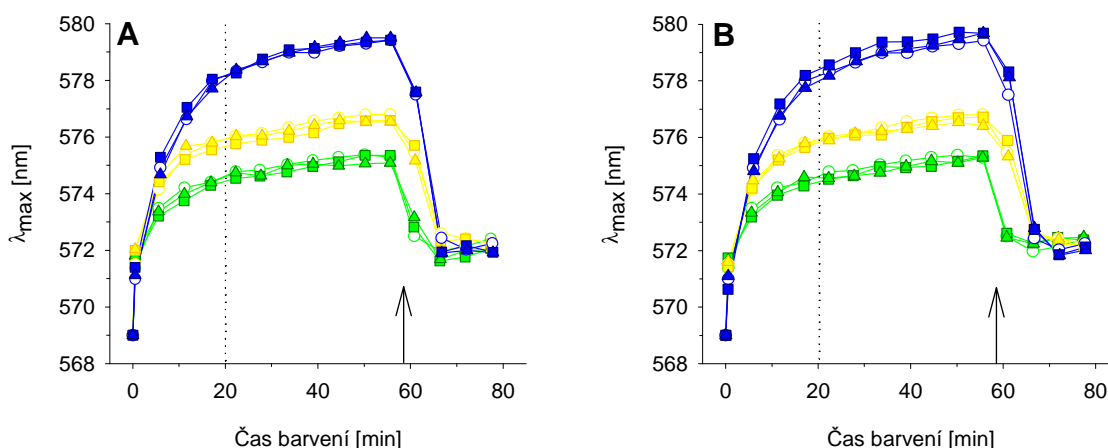


**Obr. 3-34** Flukonazol a ketokonazol jsou substráty jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p. Růstové inhibiční zóny kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti (A) 15 mM flukonazolu, (B) 3 mM flukonazolu, (C) 3 mM ketokonazolu a (D) 300  $\mu$ M ketokonazolu.

Přesto to všechno flukonazol (zástupce triazolů) a ketokonazol (představitel imidazolů), dvě známá antimykotika, neovlivňují transport sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pumpami Pdr5p a Snq2p ani při koncentracích 20  $\mu$ M (obr. 3-35), které tisícnásobně převyšují použitou koncentraci fluorescenční sondy ( $2 \cdot 10^{-8}$  M). Ač jsou tyto látky ve značném nadbytku nad fluorescenční sondou, nejsou schopny zaujmout takovou polohu ve vazebném místě pump, aby zabránily navázání sondy (v případě diSAB) či ji vytěsnily z vazebného místa (při diSA experimentech). Oba azoly se pravděpodobně váží do jiného vazebného místa Pdr5p i Snq2p než fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3) a jsou transportovány společně s ní. Tento nezávislý transport dvou substrátů není u MDR pump nikterak výjimečný, byl pozorován např. u Pdr5p (24,153) i u P-glykoproteinu (173,183,184), u obou těchto pump se předpokládá existence až třech vazebných míst. Podstatně méně informací je v současné době známo o struktuře vazebného místa proteinu Snq2p.

Nabízí se nám tak zcela nové uplatnění naší fluorescenční metody – prostřednictvím různých substrátů se můžeme dozvědět ledascos o zákonitostech fungování transportu cizorodých látek MDR pumpami. Můžeme zjistit, jaký dopad mají různé chemické modifikace molekuly substrátu na jeho schopnost inhibovat transport sondy pumpami či které látky jsou transportovány prioritně. To by mohlo přispět k objasnění struktury vazebného místa/míst nejen Pdr5p, ale i Snq2p.





**Obr. 3-35** Flukonazol ani ketokonazol neinhibují transport fluorescenční sondy pumpami. Barvicí křivky post-diauxických buněk kmenů AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly) a AD1-3 (modré symboly). (A) 20  $\mu$ M flukonazol byl přidán k buňkám o 10 min dříve než sonda (čtverečky) nebo ve 20. minutě barvení (trojúhelníčky); kolečka – bez flukonazolu. (B) 20  $\mu$ M ketokonazol byl přidán k buňkám 10 min před sondou (čtverečky) nebo 20 min po ní (trojúhelníčky); kolečka – bez ketokonazolu. Šipky vyznačují přidání CD koktejlu.

## 3.6. Nové aplikace diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescenční metody

Pdr5p je funkční homolog savčích P-glykoproteinů (P-gp) účastnících se rezistence nádorů vůči chemoterapeutikům a taktéž funkční ortholog ABC transportérů patogenních kvasinek, např. Cdr1p a Cdr2p z *Candida albicans*, či CgCdr1p z *Candida glabrata*, které jsou zodpovědné za rezistenci těchto kvasinek vůči azolovým antimykotikům v klinické praxi. V následujících kapitolách se proto budeme zabývat možným rozšířením naší fluorescenční metody právě do těchto oblastí.

### 3.6.1. Kvasinky produkující lidský P-glykoprotein jako model pro studium MDR v nádorových buňkách

Rezistence k nejrůznějším chemoterapeutikům představuje závažný problém v léčbě rakoviny, který je spjat s přítomností MDR pump z rodiny ABC proteinů, obzvláště P-glykoproteinu (P-gp, MDR1 nebo ABCB1), MRP1 (ABCC1) a BCRP/ABCP/MXR (ABCG2) transportérů. V současné době je z těchto proteinů nejlépe prostudovaný P-gp. Podobně jako ostatní ABC proteiny se skládá ze dvou membránových domén, každá je tvořena šesti transmembránovými  $\alpha$ -šroubovicemi, a dvou domén vázících nukleotidy, které hydrolyzují ATP, a tím zajišťují energii pro transport látek (185). Obě ATP vázící místa jsou katalyticky aktivní a střídají se v zajišťování hydrolyzy ATP, v daném čase je však aktivní pouze jedno z nich (186).

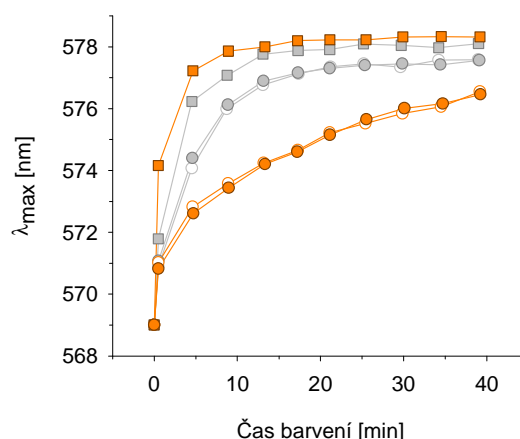
Schopnost P-gp transportovat úžasnou paletu strukturně rozmanitých léčiv, přírodních produktů a peptidů z něj činí bezesporu fascinující protein hodný naší pozornosti. Panují však jisté neshody o tom, zda se za touto schopností skrývá několik vazebných míst nebo jedna velká flexibilní vazebná kapsa. Tak jako tak, se rozlišují dvě funkční vazebná místa; *H*, které váže Hoechst 33342 a kolchicin, a *R*, jež selektivně

interaguje s rhodaminem 123 a anthracykliny jako je doxorubicin a daunorubicin, a třetí vazebné místo, které má pozitivní allosterický vliv na transport látek prostřednictvím *H* i *R* (184). Mimoto se P-gp vyznačuje širokou flipázovou aktivitou, přemisťuje řadu fosfolipidů a jednoduchých glykosfingolipidů z vnitřního do vnějšího listu plazmatické membrány (185).

Fyziologická role P-gp proteinu není zcela známa, pravděpodobně chrání lidské buňky před cytotoxickými látkami z prostředí a potravy. Nicméně P-gp může být dvojsečným mečem. Zatímco nás chrání před exogenními toxiny, ovlivňuje i účinnost léčiv během chemoterapie. Zvýšená exprese *MDR1* genu v rakovinových buňkách značně komplikuje léčbu, protože tento 170 kDa P-gp transportuje řadu léčiv, která se užívají v boji s touto zákeřnou nemocí (145,186,187).

Kladli jsme si otázku, zda by fluorescenční sonda diS-C<sub>3</sub>(3) nemohla být také jedním ze substrátů P-glykoproteinu a zda bychom tedy nemohli hledat účinné inhibitory tohoto transportéru, tak jak jsme to doposud činili v případech kvasinkových pump Pdr5p a Snq2p. Lidský P-gp sdílí jistou substrátovou specifitu s Pdr5p v *Saccharomyces cerevisiae*, např. imunosupresanty FK506 či rapamycin jsou substráty obou pump (145). Proto jsme do kvasinkových buněk BY4741 a W303-1A vložili multikopiový plazmid YEpMDR1HIS nesoucí lidský P-glykoprotein (139) a kontrolní plazmid YEpmyc 181. Procedura je podrobně popsána v kapitole 2.3.1.

Expres lidského *MDR1* genu vedla u obou nových kvasinkových kmenů k výraznému zpomalení růstu a tudíž k prodloužení exponenciální fáze růstu ve srovnání s kmeny bez plazmidu i s kontrolním plazmidem i o více než deset hodin. Expres tohoto poměrně velkého proteinu v tak velkém množství (multikopiový plazmid se silným promotorem z *PMA1*) tedy neúměrně zatěžovala organismus kvasinek. Prvotní fluorescenční měření (obr. 3-36) nenaznačují, že by sonda diS-C<sub>3</sub>(3) byla substrátem P-glykoproteinu. Pro jednoznačné vyvrácení tohoto předpokladu by bylo zapotřebí sestavit vyrovnanější systém, v němž by nebyl *MDR1* gen tak vydatně exprimován. Přítomnost P-gp v membráně stávajících kmenů totiž zřejmě negativně ovlivnila její složení ve smyslu její prostupnosti pro sondu, neboť došlo k urychlení barvení buněk s P-glykoproteinem a jak je známo změny v membránové fluiditě mohou ovlivnit aktivitu P-glykoproteinu, který je citlivý na složení lipidů, i rychlost difúze substrátů uvnitř dvojvrstvy k jejich vazebnému místu v P-gp (184).



**Obr. 3-36** Barvicí křivky kvasinek s lidským P-glykoproteinem. Barvicí křivky kmenů odvozených od kmene BY4741 (oranžové symboly) a kmene W303-1A (šedé symboly). Prázdná kolečka představují divoké kmene BY4741 a W303-1A, plná kolečka symbolizují kmene s kontrolním plazmidem YEpmyc 181, čtverečky reprezentují kmene s plazmidem YEpMDR1HIS.

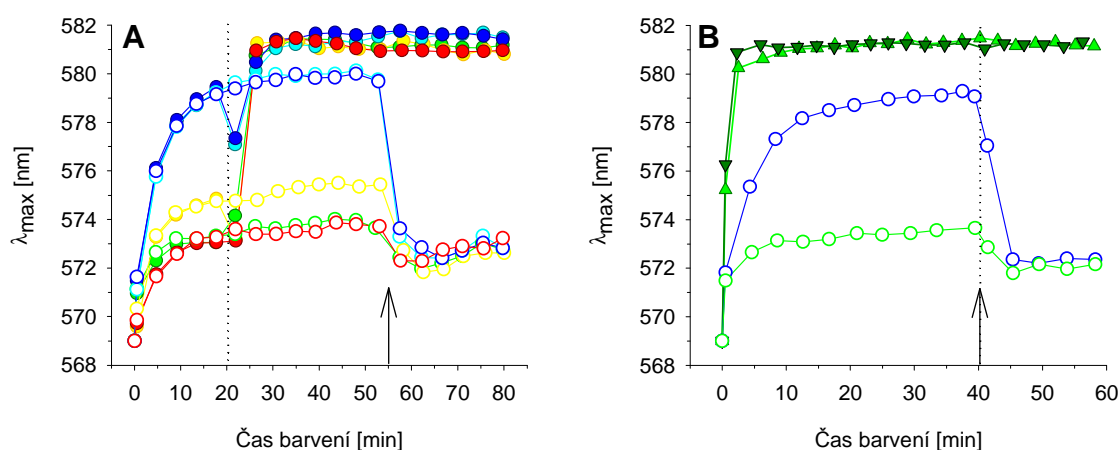
### 3.6.2. Kvasinky *S. cerevisiae* jako model pro studium mechanismu účinku nově syntetizovaných antifungálních látek proti patogenním kvasinkám

Chalkony, ať už přírodního, nebo syntetického původu, vykazují podobně jako ostatní flavonoidy množství různých biologických efektů včetně antibakteriálních, antifungálních a protirakovinných (188-192). Mezi chalkonovými deriváty se najdou takové, které inhibují činnost MDR transportéru Pdr5p *S. cerevisiae* (193) nebo enzymů podílejících se na biosyntéze základních stavebních kamenů buněčné stěny kvasinek,  $\beta$ -1,3-glukanu a chitinu (194).

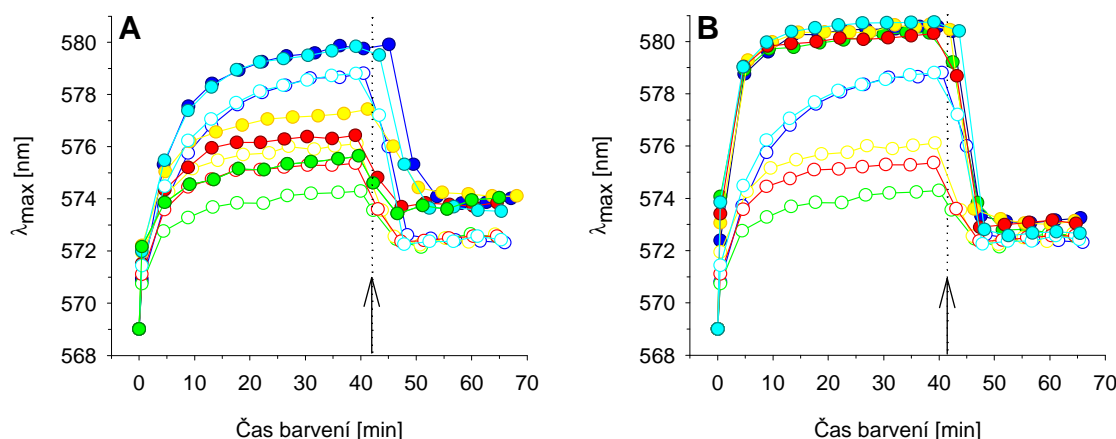
Tabulka 3-1: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) *Candida albicans* (viz příloha 7)

Sloučenina	MIC [ $\mu$ M]
AMG-116	> 780
AMG-129	161
AMG-142	269
AMG-144	75
AMG-148	20
AMG-154	186

Nepatogenní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsme využili jako model pro studium mechanismu účinku několika chalkonových derivátů, které byly syntetizovány s cílem potlačovat mnohačetnou lékovou rezistenci u kmenů *Candida albicans* s nadprodukcí MDR transportérů Cdr1p, Cdr2p nebo Mdr1p. Tyto kvasinkové kmeny byly izolovány z pacientů, kteří byli léčeni flukonazolem. Chalkonové deriváty byly současně testovány i na těchto patogenních kvasinkách ve spolupráci s mgr inž. Izabelou Łackou (Katedra farmaceutické technologie a biochemie, Politechnika Gdańska), minimální inhibiční koncentrace látek shrnuje tabulka 3-1.

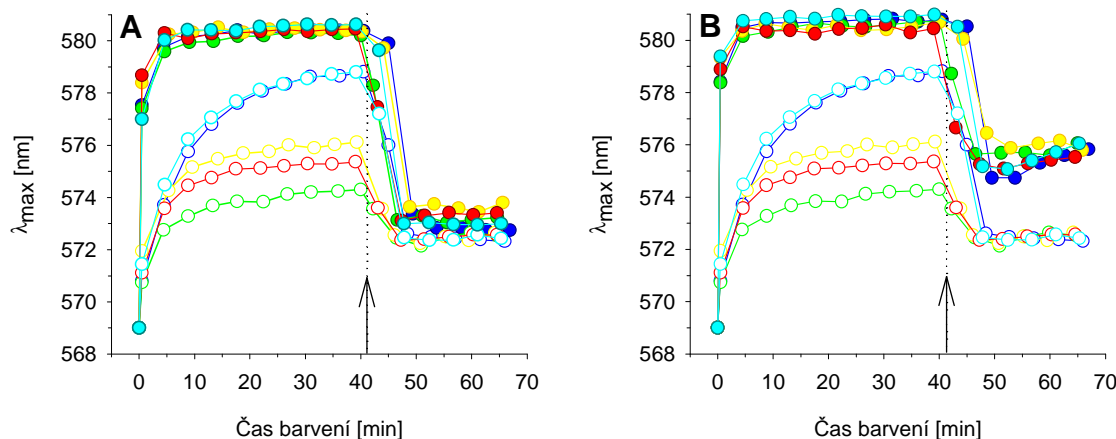


**Obr. 3-37** Metoda diSAB je při studiu povrchově aktivních látek výhodnější než tradiční metoda diSA. (A) Barvicí křivky (diSA) buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD23 (tyrkysové symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly), k nimž bylo přidáno 7  $\mu$ M ODDC (plné symboly) ve 20. minutě (tečkovaná čára). Prázdné symboly – bez ODDC. Šipka označuje přidání CD koktejlu. (B) K buňkám kmene AD12 (zelené symboly) bylo přidáno 7  $\mu$ M ODDC 6 min (trojúhelníčky) a 20 min (obrácené trojúhelníčky) před přidáním sondy (diSAB). Prázdné symboly – bez ODDC; pro porovnání je uvedena i barvicí křivka intaktních buněk kmene AD1-3 (modré symboly). Šipka a tečkovaná čára vyznačují přidání CD koktejlu.



**Obr. 3-38** AMG-116 neinhibuje transport fluorescenční sondy pumpami na rozdíl od AMG-154. Barvicí křivky post-diauxických buněk kmenů AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD23 (tyrkysové symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly). (A) 5  $\mu\text{M}$  AMG-116 bylo přidáno k buňkám o 10 min dříve než sonda (plné symboly); prázdné symboly – bez AMG-116. (B) Buňky byly obarveny sondou diS-C<sub>3</sub>(3) až po 10 min působení 10  $\mu\text{M}$  AMG-154 (plné symboly); prázdné symboly – bez AMG-154. Šipky s tečkovanými čarami vyznačují přidání CD koktejlu.

Jelikož byl u některých chalkonů zaznamenán vliv na stavbu buněčné stěny, zvolili jsme pro jejich studium diSAB uspořádání fluorescenční metody, kdy je zkoumaná látka přidávána k buňkám v několikaminutovém předstihu před fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3). Tímto postupem lze snadno detekovat poškození buněčné stěny a hyperpolarizaci membrány na rozdíl od klasické varianty metody (viz obr. 3-37), kdy se látka přidává k již obarveným buňkám, a nelze přesně rozhodnout, zda je skokový nárůst barvení dílem pouhé permeabilizace membrány, či k němu přispívá i porušení buněčné stěny, popřípadě do jaké míry. Mimoto technické provedení diSAB je méně náročné než v případě diS-TDEA metody.

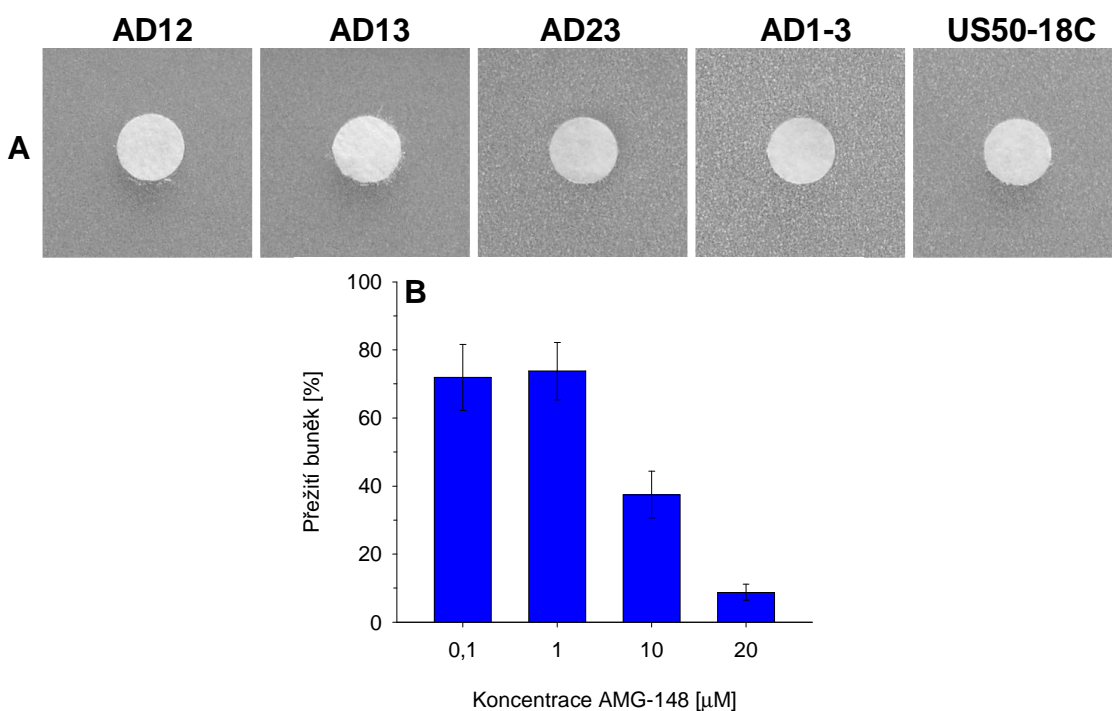


**Obr. 3-39** Koncentračně závislý účinek AMG-148 na povrchové struktury kvasinek. Barvicí křivky post-diauxických buněk kmenů AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD23 (tyrkysové symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly), ke kterým bylo přidáno (A) 0,1  $\mu\text{M}$  AMG-148, nebo (B) 1  $\mu\text{M}$  AMG-148, 10 min před přidáním fluorescenční sondy (plné symboly). Prázdné symboly – 0  $\mu\text{M}$  AMG-148. Šipky spolu s tečkovanými čarami vyznačují přidání CD koktejlu.

V závislosti na koncentraci a malých změnách v chemické struktuře způsobují všechny testované chalkonové deriváty různě velkou hyperpolarizaci membrány, největší efekt byl zaznamenán u buněk vystavených působení AMG-148 a AMG-154.

Naopak vliv AMG-129 na membránový potenciál se začíná projevovat až při relativně vysokých koncentracích 40  $\mu\text{M}$  a 80  $\mu\text{M}$ .

AMG-116 vyvolává stejně velký červený posun barvicích křivek kmenů AD12, AD13, US50-18C i AD1-3 a AD23 (obr. 3-38A), neinhibuje tedy transport sondy pumpami Pdr5p a Snq2p. Zvýšená úroveň barvení buněk, která se zachovává i po přidání CD koktejlu, je dána hyperpolarizací membrány v důsledku výtoku  $\text{K}^+$  z cytosolu. Naopak po 10 min působení 10  $\mu\text{M}$  AMG-154 dosahují buňky všech kmenů velmi rychle téže rovnovážné hodnoty (obr. 3-38B), která je však výrazně vyšší než u kontrolních buněk. Splynutí barvicích křivek všech kmenů v této oblasti spektra a následná reakce na CD koktejl jsou příznačné pro kombinaci hyperpolarizace membrány (AD23 a AD1-3) s plnou inhibicí obou pump (AD12, AD13 a US50-18C). Míra hyperpolarizace při 10  $\mu\text{M}$  AMG-154 je srovnatelná s 0,1  $\mu\text{M}$  AMG-148, AMG-154 však nijak nepoškozuje buněčnou stěnu na rozdíl od AMG-148.

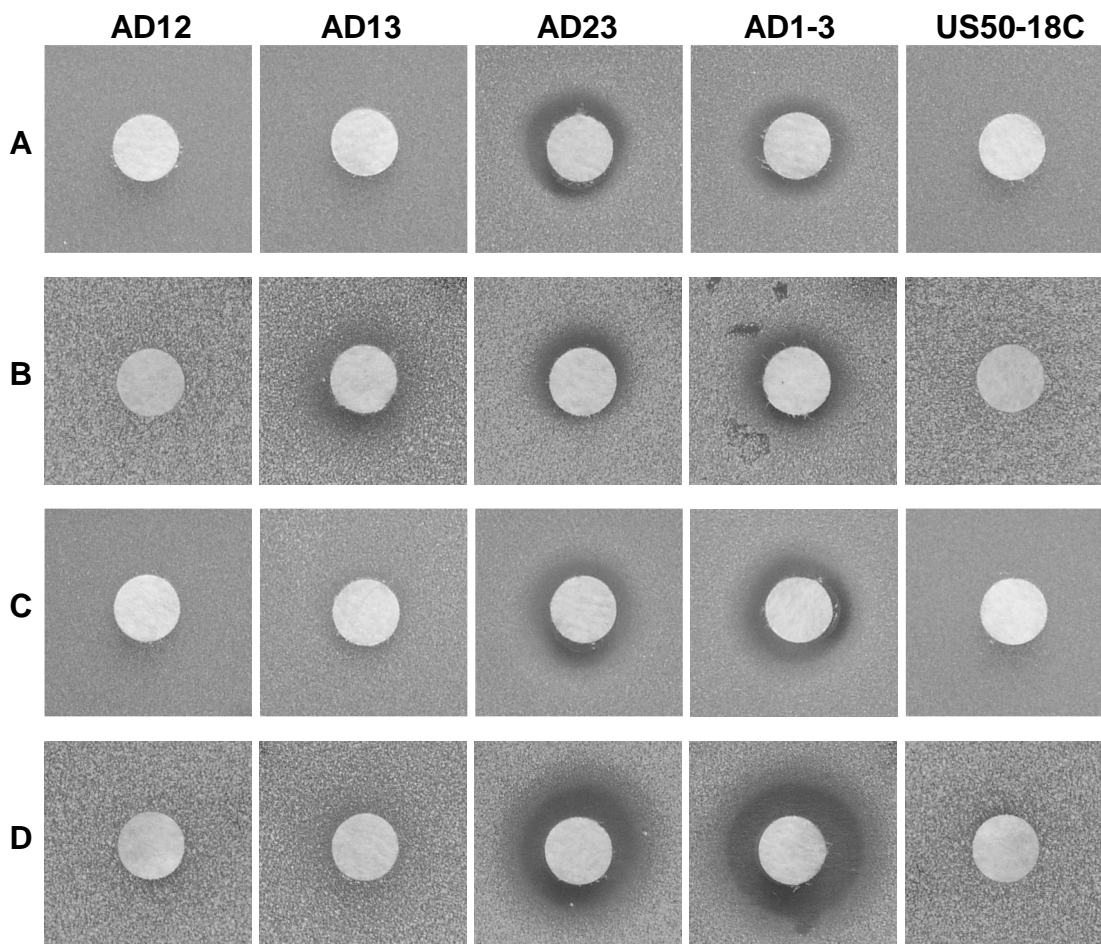


**Obr. 3-40** AMG-148 netvoří růstové inhibiční zóny, přestože je použita koncentrace letální. (A) Absence růstových inhibičních zón u kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti 3 mM AMG-148. (B) Přežívání buněk kmene AD1-3 v závislosti na koncentraci AMG-148.

Nejúčinnější látka, AMG-148, narušuje plazmatickou membránu a buněčnou stěnu kvasinek při velice nízkých koncentracích (0,1  $\mu\text{M}$ ). AMG-148 činí buněčnou stěnu prostupnější pro sondu a umožňuje tak téměř okamžité ustavení rovnovážné hodnoty barvení (obr. 3-39), která je vyšší než u kontrolních buněk. Odpověď na CD koktejl u buněk s 0,1  $\mu\text{M}$  AMG-148 se podobá reakci kontrolních buněk (obr. 3-39A), ale v případě 1  $\mu\text{M}$  AMG-148 již odezva výrazně slábne (obr. 3-39B). Tento vývoj barvicích křivek je charakteristický pro buňky, u nichž se stupňuje hyperpolarizace díky výtoku kationtů (převážně  $\text{K}^+$ ) z cytosolu. Zvyšujeme-li dále koncentraci látky, trhlinky v buněčné stěně a membráně se rozšiřují a počínají vytékat i rozměrnější molekuly např. ATP (měřeno postupem popsaným v kapitole 2.8.). Navíc AMG-148 inhibuje činnost jak pumpy Pdr5p, tak Snq2p, jelikož barvicí křivky kmenů AD12, AD13 a US50-18C splývají s křivkami negativních kontrol AD23 a AD1-3. AMG-148 také ovlivňuje syntézu polymerů buněčné stěny,  $\beta$ -1,3-glukanu a chitinu (195). Oba enzymy



syntetizující  $\beta$ -1,3-glukan i chitin jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně stejně jako MDR transportéry Pdr5p a Snq2p. AMG-148 netvoří růstové inhibiční zóny (obr. 3-40A) navzdory tomu, že je daná koncentrace pro kvasinkové buňky letální, jak jsme se přesvědčili pomocí výsevového testu (obr. 3-40B), tato látka tedy nedifunduje agarem.

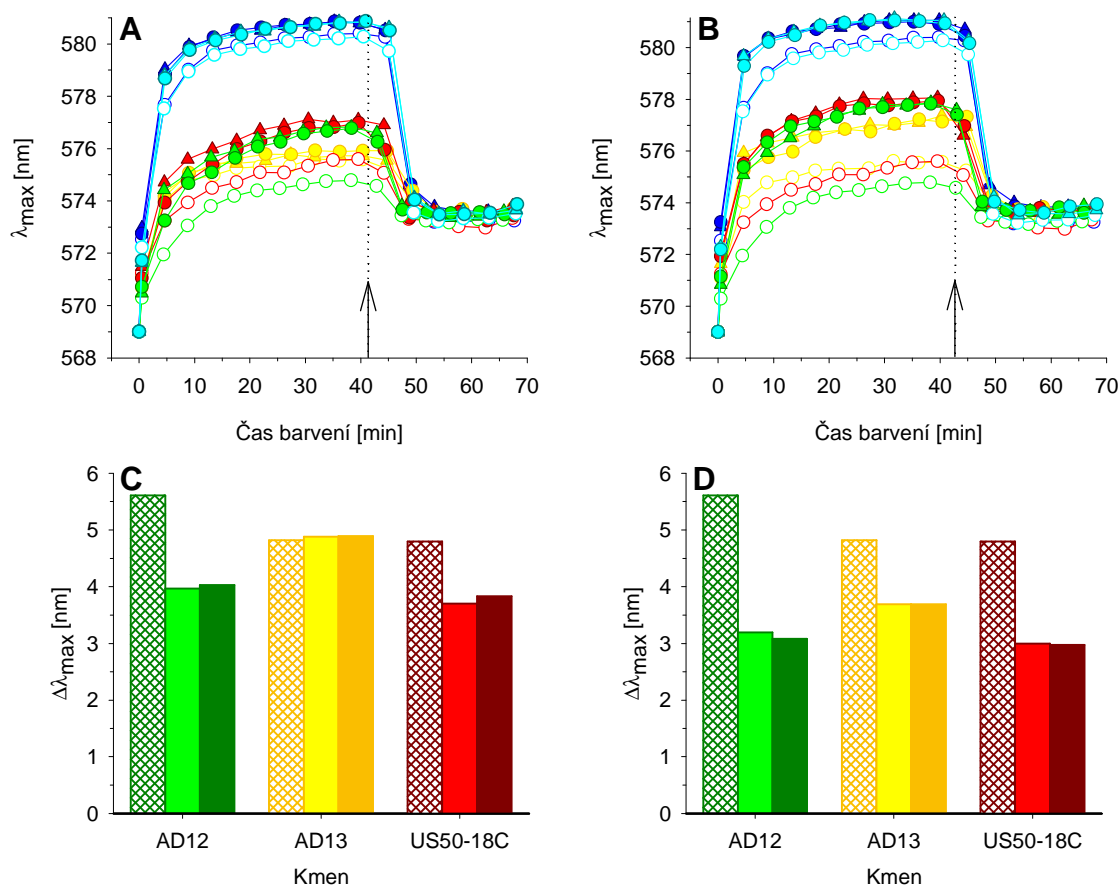


**Obr. 3-41** AMG-142 je slabším substrátem Snq2p než Pdr5p na rozdíl od AMG-144. (A, B) Růstové inhibiční zóny vytvořené u kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti 3 mM AMG-142 (A) v YPD svrchním agaru a (B) v YPGE svrchním agaru. (C, D) Inhibiční zóny vytvořené u kmenů AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v přítomnosti 3 mM AMG-144 (C) v YPD svrchním agaru a (D) v YPGE krycím agaru.

Z půl tuctu zkoumaných chalkonových derivátů jsou pouze dva schopné volné difúze agarem a tvorby růstových inhibičních zón, AMG-142 a AMG-144 (obr. 3-41). Při růstu v YPD agaru využívají buňky zkvasitelný zdroj uhlíku (glukózu) a aktivita jejich pump je vysoká (130) (obr. 3-41A a C), u žádného kmene s aktivními pumpami Pdr5p anebo Snq2p (AD12, AD13, US50-18C) se za těchto podmínek na rozdíl od kmenů AD23 a AD1-3 netvoří růstové inhibiční zóny, to znamená, že jsou obě látky substráty jak Pdr5p, tak Snq2p. Růst buněk v YPGE agaru (obr. 3-41B a D) obsahujícím nezqvasitelný zdroj uhlíku odkryává rozdíly mezi těmito blízkými chalkonovými deriváty lišícími se pouze náhradou  $-Br$  (AMG-142; obr. 2-5C) skupinou  $-OCH_3$  (AMG-144; obr. 2-5D). Inhibiční zóna u kmene AD13 v přítomnosti 3 mM AMG-142 (nikoli však AMG-144) naznačuje, že je tato látka slabším substrátem Snq2p než Pdr5p.

AMG-142 i AMG-144 stejně jemně hyperpolarizují plazmatickou membránu kvasinek (obr. 3-42), při 10  $\mu$ M koncentraci jsou obě látky schopné částečně inhibovat

transport sondy pumpou Pdr5p (obr. 3-42A a C), vliv na transport diS-C<sub>3</sub>(3) pumpou Snq2p se zřetelně projevuje až při dvojnásobné koncentraci látek (obr. 3-42B a D). Oba deriváty jsou jednoznačně silnějšími substráty Pdr5p než Snq2p a jejich účinnost je totožná. Záměna výše zmíněného substituentu tedy neovlivňuje ani transport sondy MDR pumpami, ani rozsah hyperpolarizace membrány, z tohoto pohledu se zdá být substituent v této poloze nepodstatný. Proto lze naprostou neúčinnost látky AMG-129, která postrádá jakýkoliv postranní řetězec v této pozici, přisoudit výměně umístění atomů síry a kyslíku v jednom z cyklů (obr. 2-5B).



**Obr. 3-42** AMG-142 a AMG-144 lépe inhibují transport sondy pumpou Pdr5p než Snq2p. Barvicí křivky buněk AD12 (zelené symboly), AD13 (žluté symboly), AD23 (tyrkysové symboly), AD1-3 (modré symboly) a US50-18C (červené symboly), ke kterým bylo přidáno (A) 10  $\mu$ M AMG-142 (trojúhelníčky), nebo 10  $\mu$ M AMG-144 (plná kolečka), (B) 20  $\mu$ M AMG-142 (trojúhelníčky), či 20  $\mu$ M AMG-144 (plná kolečka), 10 min před přidáním fluorescenční sondy. Prázdná kolečka – bez látek. Šipky spolu s tečkovanými čarami vyznačují přidání CD koktejlu. (C) Změna aktivity pump kmenů AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po přidání 10  $\mu$ M AMG-142 (světlé sloupce) a 10  $\mu$ M AMG-144 (tmavé sloupce). Počáteční aktivitu pump vyjadřují šrafované sloupce. (D) Změna aktivity pump kmenů AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po přidání 20  $\mu$ M AMG-142 (světlé sloupce) a 20  $\mu$ M AMG-144 (tmavé sloupce). Počáteční aktivitu pump vyjadřují šrafované sloupce. Výklad postupu určování aktivity pump ( $\Delta\lambda_{max}$ ) podává obr. 3-1A.

Klíčem k téměř zázračné všestranné účinnosti AMG-148 je nejspíše výraznější modifikace struktury molekuly oproti ostatním testovaným derivátům, než by se na první pohled mohlo zdát. Ač se AMG-148 (obr. 2-5E) odlišuje od AMG-154 (obr. 2-5F), látky s toutéž základní kostrou, pouze záměnou dvou substituentů, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> za –OCH<sub>3</sub> a –OCH<sub>3</sub> za –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (189,195), při molekulárně dynamické simulaci vyšlo najevo, že rovnovážná konformace molekuly AMG-148 obsahuje nový cyklus (optimalizováno pomocí programu Gaussian). Při



vývoji nových antimykotik z řad chalkonových derivátů by proto bylo vhodné dále rozvíjet tuto strukturu, jež v sobě skrývá výjimečnou účinnost.

# Závěr

V poslední době se stále častěji setkáváme s případy lékové rezistence, kdy u pacientů přetrvávají bakteriální či houbové infekce navzdory patřičné antimikrobiální terapii. Rostoucí výskyt rezistentních kmenů patogenních kvasinek a plísní, při jejichž léčbě selhávají dosud známé medikamenty, i poměrně malý počet systémových antimykotik s řadou vážných vedlejších účinků si žádá neustálé hledání nových efektivnějších a vůči pacientovi šetrnějších léčiv. Ačkoliv je naprosto zřejmá potřeba nových látek, vývoj na tomto poli je pomalý a nepředvídatelný. Nová léčiva musí od svého objevení projít dlouhou řadou testů, jež mají stanovit jejich mechanismus účinku, možná rizika pro pacienty, způsob a frekvenci dávkování, vstřebávání a odbourávání v lidském organismu, ale také případné interakce se současně podávanými léčivy. Základní výzkum tohoto typu a především klinické zkoušky jsou neuvěřitelně nákladné, díky tomu i ty nejslibnější preparáty bývají zřídka uvedeny do klinické praxe dříve než za patnáct let od svého objevení.

Při pátrání po nových druzích antimykotik je kladen důraz na omezení možného vzniku lékové rezistence, proto jsou upřednostňovány rychle působící fungicidní látky napadající esenciální struktury na povrchu houbových buněk – buněčnou stěnu a plazmatickou membránu. Tyto povrchově aktivní látky dokážou zabít kvasinkové buňky, aniž by do nich musely proniknout, a tudíž se nemohou stát ani terčem jejich obranných systémů, včetně MDR pump.

V průběhu doktorského studia jsme vyvinuli novou fluorescenční metodu, která by mohla významně urychlit a zefektivnit počáteční stádia výzkumu antimykotik. Tato rychlá, snadno proveditelná a finančně nenáročná metoda umožňuje nejen vyhledávat nadějně látky, ale také současně stanovit přesné mechanismy jejich účinku a minimální účinné koncentrace. Obrovskou výhodou této metody je její všestrannost – umožňuje detailně detekovat průběh působení tzv. povrchově aktivních látek na kvasinky, ale i studovat interakce inhibitorů MDR pump, Pdr5p a Snq2p, s cílovými proteiny, nebo účinky různých látek na aktivitu  $H^+$ -ATPázy, životně důležitého enzymu kvasinek.

Prostřednictvím naší diS-TDEA metody využívající potenciometrickou fluorescenční sondu diS-C<sub>3</sub>(3) můžeme v reálném čase sledovat děje, které předcházejí smrti buněk, počínaje depolarizací plazmatické membrány, přes její hyperpolarizaci až po úplnou permeabilizaci. Zároveň jsme schopni zachytit poškození buněčné stěny a v kombinaci s biologickými metodami určit, zda je toto poškození povrchových struktur kvasinek dominantní příčinou nízkého přežívání buněk, či zda jen nedoprovází inhibici některých esenciálních vnitrobuněčných pochodů. Při použití tzv. CD koktejlu jsme navíc sto rozpoznat, je-li příčinou hyperpolarizace plazmatické membrány aktivace  $H^+$ -ATPázy, nebo únik  $K^+$  skrze mírně narušenou membránu, a dokonce zda množství vyteklých draselných kationtů odpovídá úrovni činnosti přenašečového nebo kanálového typu ionoforu.

Jinou alternativu v boji s mnohačetnou lékovou rezistencí představují inhibitory MDR pump, které by bylo možné podávat pacientům společně s konvenčními antibiotiky či antimykotiky, jež jsou leckdy substráty těchto pump, a docílit tak dostatečné vnitrobuněčné koncentrace léčiva. V konečném důsledku by kombinovaná terapie mohla vést k používání léků v nižších koncentracích a omezení jejich případných negativních vedlejších účinků. Pro rychlé vyhledávání nových inhibitorů MDR pump můžeme využít metodu barvicích křivek (diSA), popřípadě její modifikaci diSAB, a pomocí diS-TDEA metody pak určit, jestli je daná látka skutečným, nebo

pouze kompetitivním inhibitorem, tj. substrátem, a další parametry popisující interakci substrátu s vazebným místem MDR pump jako je minimální inhibiční koncentrace nutná k plné inhibici transportéru, disociační konstanta či afinita.

Kromě studování mechanismu účinku známých látek z řad imunosupresantů, ionoforových antibiotik, polyenů, detergentů a antiseptických látek jsme se věnovali i testování nově syntetizovaných látek, mezi nimiž jsme našli vhodné adepty pro rozšíření dosud ne příliš početné skupiny antimykotik – látky inhibující jak  $H^+$ -ATPázu, tak MDR pumpy Pdr5p a Snq2p, ale také látky narušující buněčnou stěnu a permeabilizující plazmatickou membránu kvasinek ve velice nízkých koncentracích.

Výsledky disertační práce byly publikovány v renomovaných časopisech (přílohy 1 a 2) a také na několika mezinárodních konferencích (přílohy 3 – 8). Momentálně se připravuje ve spolupráci s polskými kolegy publikace mapující účinky chalkonových derivátů na kvasinky *S. cerevisiae* a *C. albicans*.

# Seznam použité literatury

1. TAYLOR, LH., LATHAM, SM., and WOOLHOUSE, MEJ. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, July 2001, vol. 356, no. 1411, p. 983-989.
2. PFALLER, MA., and DIEKEMA, DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, January 2007, vol. 20, no. 1, p. 133-163.
3. MONK, BC., and GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science*, July 2008, vol. 321, no. 5887, p. 367-369.
4. DOLEŽAL, M., a BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství*, 2006, roč. 2, č. 1, s. 10-14.
5. GOFFEAU, A., BARRELL, BG., BUSSEY, H., et al. Life with 6000 genes. *Science*, October 1996, vol. 274, no. 5287, p. 563-567.
6. GOFFEAU, A. Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Letters*, August 2000, vol. 480, no. 1, p. 37-41.
7. LIU, M., HEALY, MD., DOUGHERTY, BA., et al. Conserved fungal genes as potential targets for broad-spectrum antifungal drug discovery. *Eukaryotic Cell*, April 2006, vol. 5, no. 4, p. 638-649.
8. MONK, BC., NIIMI, K., LIN, S., et al. Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January 2005, vol. 49, no. 1, p. 57-70.
9. GEORGOPAPADAKOU, NH., and WALSH, TJ. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, February 1996, vol. 40, no. 2, p. 279-291.
10. WHITE, TC., MARR, KA., and BOWDEN, RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, April 1998, vol. 11, no. 2, p. 382-402.
11. GHANNOUM, MA., and RICE, LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, October 1999, vol. 12, no. 4, p. 501-517.
12. PRASAD, R., PANWAR, SL., and SMRITI. Drug resistance in yeasts – an emerging scenario. *Advances in Microbial Physiology*, 2002, vol. 46, p. 155-201.
13. MCKEEGAN, KS., BORGES-WALMSLEY, MI., and WALMSLEY, AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*, 2002, vol. 10, no. 10, Suppl., p. S8-S14.
14. PAULSEN, IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology*, October 2003, vol. 6, no. 5, p. 446-451.
15. PAULSEN, IT., BROWN, MH., and SKURRAY, RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, December 1996, vol. 60, no. 4, p. 575-608.
16. HIGGINS, CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, April 2007, vol. 446, no. 7137, p. 749-757.
17. SCHÜLLER, C., BAUER, BE., and KUCHLER, K. Inventory and evolution of fungal ABC protein genes. In HOLLAND, IB., COLE, SPC., KUCHLER, K., and HIGGINS, CF. (ed.) *ABC proteins: from bacteria to man*. London: Academia Press, 2003. ISBN 0-12-352551-9. Chap. 14, p. 279-293.

18. ERNST, R., KLEMM, R., SCHMITT, L., et al. Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps. *Methods in enzymology*, 2005, vol. 400, p. 460-484.
19. JUNGWIRTH, H., and KUCHLER, K. Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters*, February 2006, vol. 580, no. 4, p. 1131-1138.
20. PRASAD, R., and PANWAR, S. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Current science*, January 2004, vol. 86, no. 1, p. 62-73.
21. BAUER, BE., WOLFGER, H., and KUCHLER, K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, December 1999, vol. 1461, no. 2, p. 217-236.
22. EGNER, R., ROSENTHAL, FE., KRALLI, A., et al. Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Molecular Biology of the Cell*, February 1998, vol. 9, no. 2, p. 523-543.
23. EGNER, R., BAUER, BE., and KUCHLER, K. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Molecular Microbiology*, 2000, vol. 35, no. 5, p. 1255-1263.
24. GOLIN, J., AMBUDKAR, SV., and MAY, L. The yeast Pdr5p multidrug transporter: How does it recognize so many substrates? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, April 2007, vol. 356, no. 1, p. 1-5.
25. KOLACZKOWSKI, M., KOLACZOWSKA, A., ŁUCZYŃSKI, J., et al. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microbial Drug Resistance*, Fall 1998, vol. 4, no. 3, p. 143-158.
26. DECOTTIGNIES, A., KOLACZKOWSKI, M., BALZI, E., et al. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, April 1994, vol. 269, no. 17, 12797-12803.
27. PIPER, P., MAHÉ, Y., THOMPSON, S., et al. The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal*, August 1998, vol. 17, no. 15, 4257-4265.
28. DECOTTIGNIES, A., GRANT, AM., NICHOLS, JW., et al. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *The Journal of Biological Chemistry*, May 1998, vol. 273, no. 20, p. 12612-12622.
29. BOWMAN, SM., and FREE, SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, August 2006, vol. 28, no. 8, p. 799-808.
30. KLIS, FM., BOORSMA, A., and DE GROOT, PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, February 2006, vol. 23, no. 3, p. 185-202.
31. GÁŠKOVÁ, D., BRODSKÁ, B., HEŘMAN, P., et al. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C<sub>3</sub>(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, September 1998, vol. 14, no. 13, p. 1189-1197.
32. GOZALBO, D., ELORZA, MV., SANJUAN, R., et al. Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. *Pharmacology & Therapeutics*, November 1993, vol. 60, no. 2, p. 337-345.
33. GEORGOPAPADAKOU, NH., and TKACZ, JS. The fungal cell wall as a drug target. *Trends in Microbiology*, March 1995, vol. 3, no. 3, p. 98-104.
34. LATGÉ, J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, October 2007, vol. 66, no. 2, p. 279-290.

35. LIPKE, PN., and OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, August 1998, vol. 180, no. 15, p. 3735-3740.
36. SHAW, JA., MOL, PC., BOWERS, B., et al. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *The Journal of Cell Biology*, July 1991, vol. 114, no. 1, p. 111-123.
37. SILVERMAN, SJ., SBURLATI, A., SLATER, ML., et al. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, July 1988, vol. 85, no. 13, p. 4735-4739.
38. CABIB, E. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January 1991, vol. 35, no. 1, p. 170-173.
39. GAUGHRAN, JP., LAI, MH., KIRSCH, DR., et al. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *Journal of Bacteriology*, September 1994, vol. 176, no. 18, p. 5857-5860.
40. MCCARTHY, PJ., TROKE, PF., and GULL, K. Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, April 1985, vol. 131, no. 4, p. 775-780.
41. YADAN, J-C., GONNEAU, M., SARTHOU, P., et al. Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: role of peptide permeases. *Journal of Bacteriology*, December 1984, vol. 160, no. 3, p. 884-888.
42. GOODAY, GW. Biosynthesis of the fungal wall – mechanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, February 1977, vol. 99, no. 2, p. 1-11.
43. KANG, MS., and CABIB, E. Regulation of fungal cell wall growth: A guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1→3)-β-D-glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, August 1986, vol. 83, no. 16, p. 5808-5812.
44. MOL, PC., PARK, H-M., MULLINS, JT., et al. A GTP-binding protein regulates the activity of (1→3)-β-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, December 1994, vol. 269, no. 49, p. 31267-31274.
45. COWEN, LE., and STEINBACH, WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell*, May 2008, vol. 7, no. 5, p. 747-764.
46. CARRILLO-MUÑOZ, AJ., GIUSIANO, G., EZKURRA, PA., et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, June 2006, vol. 19, no. 2, p. 130-139.
47. ODDS, FC., BROWN, AJP., and GOW, NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, June 2003, vol. 11, no. 6, p. 272-279.
48. DIDOMENICO, B. Novel antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, October 1999, vol. 2, no. 5, p. 509-515.
49. ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, June 2008, vol. 25, no. 2, p. 101-106.
50. CHEN, SCA., and SORRELL, TC. Antifungal agents. *The Medical Journal of Australia*, October 2007, vol. 187, no. 7, p. 404-409.
51. BASTERT, J., SCHALLER, M., KORTING, HC., et al. Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and

- immunocompromised hosts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, February 2001, vol. 17, no. 2, p. 81-91.
52. DAUM, G., LEES, ND., BARD, M., et al. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, December 1998, vol. 14, no. 16, p. 1471-1510.
  53. GEORGOPAPADAKOU, NH. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, October 1998, vol. 1, no. 5, p. 547-557.
  54. ONYEWU, C., and HEITMAN, J. Unique applications of novel antifungal drug combinations. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, January 2007, vol. 6, no. 1, 3-15.
  55. MARTY, A., and FINKELSTEIN, A. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. *The Journal of General Physiology*, April 1975, vol. 65, no. 4, p. 515-526.
  56. BRAJTBURG, J., POWDERLY, WG., KOBAYASHI, GS., et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, February 1990, vol. 34, no. 2, p. 183-188.
  57. SILVA, L., COUTINHO, A., FEDOROV, A., et al. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. *Biophysical Journal*, May 2006, vol. 90, no. 10, p. 3625-3631.
  58. ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, February 2002, vol. 49, Suppl. S1, p. 7-10.
  59. WOODS, RA. Nystatin-resistant mutants of yeast: alterations in sterol content. *Journal of Bacteriology*, October 1971, vol. 108, no. 1, p. 69-73.
  60. DICK, JD., MERZ, WG., and SARAL, R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 1980, vol. 18, no. 1, p. 158-163.
  61. SOKOL-ANDERSON, M., SLIGH, JE., ELBERG, S., et al. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 1988, vol. 32, no. 5, p. 702-705.
  62. WALSH, TJ., MELCHER, GP., RINALDI, MG., et al. *Trichosporon beigeli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1990, vol. 28, no. 7, p. 1616-1622.
  63. TIPHINE, M., LETSCHER-BRU, V., and HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transplant Infectious Disease*, December 1999, vol. 1, no. 4, p. 273-283.
  64. REUBEN, A., ANAISSIE, E., NELSON, PE., et al. Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September 1989, vol. 33, no. 9, p. 1647-1649.
  65. CLARK, JM., WHITNEY, RR., OLSEN, SJ., et al. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 1991, vol. 35, no. 4, p. 615-621.
  66. GROLL, AH., MICKIENE, D., PETRAITIS, V., et al. Comparative drug disposition, urinary pharmacokinetics, and renal effects of multilamellar liposomal nystatin and amphotericin B deoxycholate in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 2003, vol. 47, no. 12, p. 3917-3925.



67. HANSON, LH., and STEVENS, DA. Comparison of antifungal activity of amphotericin B deoxycholate suspension with that of amphotericin B cholesteryl sulfate colloidal dispersion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, February 1992, vol. 36, no. 2, p. 486-488.
68. HOSTETLER, JS., CLEMONS, KV., HANSON, LH., et al. Efficacy and safety of amphotericin B colloidal dispersion compared with those of amphotericin B deoxycholate suspension for treatment of disseminated murine cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 1992, vol. 36, no. 12, 2656-2660.
69. JANOFF, AS., BONI, LT., POPESCU, MC., et al. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, August 1988, vol. 85, no. 16, p. 6122-6126.
70. OLSON, JA., ADLER-MOORE, JP., JENSEN, GM., et al. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January 2008, vol. 52, no. 1, p. 259-268.
71. ADLER-MOORE, J., and PROFFITT, RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, February 2002, vol. 49, Suppl. S1, p. 21-30.
72. HERVÉ, M., DEBOUZY, JC., BOROWSKI, E., et al. The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A <sup>31</sup>P-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*, April 1989, vol. 980, no. 3, p. 261-272.
73. BAGINSKI, M., RESAT, H., and BOROWSKI, E. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, December 2002, vol. 1567, no. 1-2, p. 63-78.
74. COUTINHO, A., and PRIETO, M. Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. *Biophysical Journal*, May 2003, vol. 84, no. 5, 3061-3078.
75. COUTINHO, A., SILVA, L., FEDOROV, A., et al. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophysical Journal*, November 2004, vol. 87, no. 5, p. 3264-3276.
76. ZHANG, L., ZHANG, Y., ZHOU, Y., et al. Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, June 2002, vol. 49, no. 6, p. 905-915.
77. HAPALA, I., KLOBUČNÍKOVÁ, V., MAZÁŇOVÁ, K., et al. Two mutants selectively resistant to polyenes reveal distinct mechanisms of antifungal activity by nystatin and amphotericin B. *Biochemical Society Transactions*, November 2005, vol. 33, no. 5, p. 1206-1209.
78. FROMTLING, RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*, April 1988, vol. 1, no. 2, p. 187-217.
79. HITCHCOCK, CA., DICKINSON, K., BROWN, SB., et al. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 $\alpha$ -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *The Biochemical Journal*, March 1990, vol. 266, no. 2, p. 475-480.
80. KELLY, SL., LAMB, DC., BALDWIN, BC., et al. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase, and inhibition by azole

- antifungal agents. *The Journal of Biological Chemistry*, April 1997, vol. 272, no. 15, p. 9986-9988.
81. KRAUSOVÁ, L., GRIM, J. a PÁVEK, P. Azolová antimykotika: mechanizmy lékových interakcí. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2009, roč. 23, č. 2, s. 86-89.
  82. VANDEN BOSSCHE, H., MARICHAL, P., ODDS, FC., et al. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 1992, vol. 36, no. 12, p. 2602-2610.
  83. KELLY, SL., LAMB, DC., CORRAN, AJ. et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, February 1995, vol. 207, no. 3, p. 910-915.
  84. CANNON, RD., LAMPING, E., HOLMES, AR., et al. *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*, October 2007, vol. 153, no. 10, p. 3211-3217.
  85. RYDER, NS. Mechanism of action and biochemical selectivity of allylamine antimycotic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988, vol. 544, p. 208-220.
  86. IWATANI, W., ARIKA, T., and YAMAGUCHI, H. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 1993, vol. 37, no. 4, p. 785-788.
  87. LORENZ, RT., and PARKS, LW. Physiological effects of fenpropimorph on wild-type *Saccharomyces cerevisiae* and fenpropimorph-resistant mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, August 1991, vol. 35, no. 8, p. 1532-1537.
  88. PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, March 2000, vol. 1469, no. 1, p. 31-42.
  89. LECCHI, S., NELSON, CJ., ALLEN, KE., et al. Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase leads to glucose-dependent activation. *The Journal of Biological Chemistry*, December 2007, vol. 282, no. 49, p. 35471-35481.
  90. MORSOMME, P., SLAYMAN, CW., and GOFFEAU, A. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, November 2000, vol. 1469, no. 3, p. 133-157.
  91. FERNANDES, AR., and SÁ-CORREIA, I. Transcription patterns of *PMA1* and *PMA2* genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast*, February 2003, vol. 20, no. 3, p. 207-219.
  92. MONK, BC., MASON, AB., KARDOS, TB., et al. Targeting the fungal plasma membrane proton pump. *Acta Biochimica Polonica*, 1995, vol. 42, no. 4, p. 481-496.
  93. PERLIN, DS., SETO-YOUNG, D., and MONK, BC. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of fungi. A candidate drug target? *Annals of the New York Academy of Sciences*, November 1997, vol. 834, p. 609-617.
  94. SETO-YOUNG, D., MONK, B., MASON, AB., et al. Exploring an antifungal target in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*, June 1997, vol. 1326, no. 2, p. 249-256.
  95. BRANDÃO, RL., DE MAGALHÃES-ROCHA, NM., ALIJO, R., et al. Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and cellular proton extrusion in the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, August 1994, vol. 1223, no. 1, p. 117-124.
96. GARCÍA-ARRANZ, M., MALDONADO, AM., MAZÓN, MJ., et al. Transcriptional control of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, July 1994, vol. 269, no. 27, p. 18076-18082.
  97. SERRANO, R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*, June 1983, vol. 156, no. 1, p. 11-14.
  98. ERASO, P., and GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Letters*, November 1987, vol. 224, no. 1, p. 187-192.
  99. CARMELO, V., SANTOS, H., and SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, April 1997, vol. 1325, no. 1, p. 63-70.
  100. SYCHROVÁ, H., and KOTYK, A. Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*, April 1985, vol. 183, no. 1, p. 21-24.
  101. STRATFORD, M., and ANSLOW, PA. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid preservative". *Letters in Applied Microbiology*, October 1998, vol. 27, no. 4, p. 203-206.
  102. ERASO, P., and PORTILLO, F. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, April 1994, vol. 269, no. 14, p. 10393-10399.
  103. PORTILLO, F., ERASO, P., and SERRANO, R. Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by direct mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Letters*, August 1991, vol. 287, no. 1,2, p. 71-74.
  104. PEREIRA, MBP., TISI, R., FIETTO, LG., et al. Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, June 2008, vol. 8, no. 4, p. 622-630.
  105. SOUZA, MAA., TRÓPIA, MJ., and BRANDÃO, RL. New aspects of the glucose activation of the H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, October 2001, vol. 147, no. 10, p. 2849-2855.
  106. TRÓPIA, MJM., CARDOSO, AS., TISI, R., et al. Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, May 2006, vol. 343, no. 4, p. 1234-1243.
  107. CAPOBIANCO, JO., ZAKULA, D., COEN, ML., et al. Anti-*Candida* activity of cispentacin: the active transport by amino acid permeases and possible mechanisms of action. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, February 1993, vol. 190, no. 3, p. 1037-1044.
  108. SINGH, P., RATHINASAMY, K., MOHAN, R., et al. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *Life*, June 2008, vol. 60, no. 6, p. 368-375.
  109. GUPTA, AK., and PLOTT, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. *International Journal of Dermatology*, July 2004, vol. 43, Suppl. 1, p. 3-8.
  110. HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Praktické lékařství*, 2010, roč. 6, č. 4, 182-186.

111. KLESZCZYŃSKA, H., BONARSKA, D., ŁUCZYŃSKI, J., et al. Hemolysis of erythrocytes and erythrocyte membrane fluidity changes by new lysosomotropic compounds. *Journal of Fluorescence*, March 2005, vol. 15, no. 2, p. 137-141.
112. MUROI, M., TAKASU, A., YAMASAKI, M., et al. Folimycin (Concanamycin A), an inhibitor of V-type H<sup>+</sup>-ATPase, blocks cell-surface expression of virus-envelope glycoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, June 1993, vol. 193, no. 3, p. 999-1005.
113. KRASOWSKA, A., CHMIELEWSKA, L., ŁUCZYŃSKI, J., et al. The dual mechanism of the antifungal effect of new lysosomotropic agents on the *Saccharomyces cerevisiae* RXII strain. *Cellular & molecular biology letters*, 2003, vol. 8, no. 1, p. 111-120.
114. LACHOWICZ, TM., WITEK, S., ŁUCZYŃSKI, J., et al. N-substituted aminoethylesters of fatty acid as lysosomotropic substances. *Folia microbiologica*, 1997, vol. 42, no. 3, p. 231-232.
115. OBŁAK, E., LACHOWICZ, TM., ŁUCZYŃSKI, J., et al. Comparative studies of the biological activities of lysosomotropic aminoesters and quaternary ammonium salts on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & molecular biology letters*, 2001, vol. 6, no. 4, p. 871-880.
116. OBŁAK, E., LACHOWICZ, TM., ŁUCZYŃSKI, J., et al. Lysosomotropic N,N-dimethyl  $\alpha$ -aminoacid n-alkyl esters and their quaternary ammonium salts as plasma membrane and mitochondrial ATPases inhibitors. *Cellular & molecular biology letters*, 2002, vol. 7, no. 4, p. 1121-1129.
117. LACHOWICZ, TM., WITEK, S., ŁUCZYŃSKI, J., et al. Aminoethyl esters of fatty acids as model lysosomotropic substances. *Folia microbiologica*, 1996, vol. 41, no. 1, p. 102-105.
118. OBŁAK, E., ADAMSKI, R., and LACHOWICZ, TM. pH-dependent influence of a quaternary ammonium salt and an aminoester on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ultrastructure. *Cellular & molecular biology letters*, 2003, vol. 8, no. 1, p. 105-110.
119. LACHOWICZ, TM., KRASOWSKA, A., ŁUCZYŃSKI, J., et al. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in wild type and mutants of *Saccharomyces cerevisiae* treated by some lysosomotropic drugs. *Folia microbiologica*, 1998, vol. 43, no. 2, p. 201-203.
120. KRASOWSKA, A., CHMIELEWSKA, L., ADAMSKI, R., et al. The sensitivity of yeast and yeast-like cells to new lysosomotropic agents. *Cellular & molecular biology letters*, 2004, vol. 9, no. 4A, p. 675-683.
121. WITEK, S., KOLACZKOWSKI, M., LACHOWICZ, TM., et al. "Soft" lysosomotropic compounds as new substrates of the yeast PDR network. *Folia Microbiologica*, 1998, vol. 43, no. 2, p. 214-216.
122. PLÁŠEK, J., a GÁŠKOVÁ, D. Fluorescenční sondy a měření membránového potenciálu. *Československý časopis pro fyziku*, 2006, roč. 56, č. 5, s. 332-339.
123. PLÁŠEK, J., and SIGLER, K. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, April 1996, vol. 33, no. 2, p. 101-124.
124. GÁŠKOVÁ, D., DECORBY, A., and LEMIRE, BD. DiS-C<sub>3</sub>(3) monitoring of *in vivo* mitochondrial membrane potential in *C. elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, March 2007, vol. 354, no. 3, p. 814-819.
125. VEČERĚ, J., HEŘMAN, P., and HOLOUBEK, A. Diffusion membrane potential in liposomes: setting by ion gradients, absolute calibration and monitoring of fast

- changes by spectral shifts of diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence maximum. *Biochimica et Biophysica Acta*, April 1997, vol. 1325, no. 2, p. 155-164.
126. GÁŠKOVÁ, D., ČADEK, R., CHALOUPKA, R., et al. Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C<sub>3</sub>(3) in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, March 2001, vol. 1511, no. 1, p. 74-79.
  127. NOVO, D., PERLMUTTER, NG., HUNT, RH., et al. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*, January 1999, vol. 35, no. 1, p. 55-63.
  128. GÁŠKOVÁ, D., BRODSKÁ, B., HOLOUBEK, A., et al. Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C<sub>3</sub>(3) assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, May 1999, vol. 31, no. 5, p. 575-584.
  129. GÁŠKOVÁ, D., ČADEK, R., CHALOUPKA, R., et al. Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, August 2002, vol. 34, no. 8, p. 931-937.
  130. ČADEK, R., CHLÁDKOVÁ, K., SIGLER, K., et al. 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*, October 2004, vol. 1665, no. 1-2, p. 111-117.
  131. MALÁČ, J., SIGLER, K., and GÁŠKOVÁ, D. Glucose-induced MDR pump resynthesis in respiring yeast cells depends on nutrient level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, November 2005, vol. 337, no. 1, p. 138-141.
  132. MALÁČ, J., URBÁNKOVÁ, E., SIGLER, K., et al. Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, December 2005, vol. 37, no. 12, p. 2536-2543.
  133. EMINGER, M., GÁŠKOVÁ, D., BRODSKÁ, B., et al. Effect of killer toxin K1 on yeast membrane potential reported by the diS-C<sub>3</sub>(3) probe reflects strain- and physiological state-dependent variations. *Folia Microbiologica*, 1999, vol. 44, no. 3, p. 283-288.
  134. CHLÁDKOVÁ, K., HENDRYCH, T., GÁŠKOVÁ, D., et al. Effect of biocides on *S. cerevisiae*: relationship between short-term membrane affliction and long-term cell killing. *Folia Microbiologica*, 2004, vol. 49, no. 6, p. 718-724.
  135. OSTROSKY-ZEICHNER, L., BAZEMORE, S., PAETZNICK, VL., et al. Differential antifungal activity of isomeric forms of nystatin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, October 2001, vol. 45, no. 10, p. 2781-2786.
  136. WITEK, S., GOFFEAU, A., NADER, J., et al. Lysosomotropic aminoesters act as H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in yeast. *Folia Microbiologica*, 1997, vol. 42, no. 3, p. 252-254.
  137. BALZI, E., CHEN, W., ULASZEWSKI, S., et al. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, December 1987, vol. 262, no. 35, p. 16871-16879.
  138. REISDORF, P., MAARSE, AC., and DAIGNAN-FORNIER, B. Epitope-tagging vectors designed for yeast. *Current Genetics*, February 1993, vol. 23, no. 2, p. 181-183.

139. FIGLER, RA., OMOTE, H., NAKAMOTO, RK., et al. Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, April 2000, vol. 376, no. 1, p. 34-46.
140. DENKSTEINOVÁ, B., GÁŠKOVÁ, D., HEŘMAN, P., et al. Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence. *Folia Microbiologica*, 1997, vol. 42, no. 3, p. 221-224.
141. HENDRYCH, T. *Ovlivnění činnosti membránových transportních systémů kvasinek stresovými faktory*. Praha, 2010. 124 s. Disertační práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy. Fyzikální ústav UK. Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.
142. KRALLI, A., and YAMAMOTO, KR. An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones. *The Journal of Biological Chemistry*, July 1996, vol. 271, no. 29, p. 17152-17156.
143. HEITMAN, J., KOLLER, A., KUNZ, J., et al. The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, August 1993, vol. 13, no. 8, p. 5010-5019.
144. HIRAGA, K., YAMAMOTO, S., FUKUDA, H., et al. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, March 2005, vol. 328, no. 4, p. 1119-1125.
145. ARCECI, RJ., STIEGLITZ, K., and BIERER, BE. Immunosuppressants FK506 and rapamycin function as reversal agents of the multidrug resistance phenotype. *Blood*, September 1992, vol. 80, no. 6, p. 1528-1536.
146. DE VIRGILIO, C., and LOEWITH, R. Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, October 2006, vol. 25, no. 48, p. 6392-6415.
147. KASIANOWICZ, J., BENZ, R., and MCLAUGHLIN, S. The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 1984, vol. 82, no. 2, p. 179-190.
148. STRATFORD, M., and ANSLOW, PA. Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, August 1996, vol. 142, no. 1, 53-58.
149. DOS PASSOS, JB., VANHALEWYN, M., BRANDÃO, RL., et al. 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, July 1992, vol. 1136, no. 1, p. 57-67.
150. PIPER, P., CALDERON, CO., HATZIXANTHIS, K., et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, October 2001, vol. 147, no. 10, p. 2635-2642.
151. KREN, A., MAMNUN, YM., BAUER, BE., et al. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, March 2003, vol. 23, no. 5, p. 1775-1785.
152. PAPADIMITRIOU, MNB., RESENDE, C., KUCHLER, K., et al. High Pdr12 levels in spoilage yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) correlate directly with sorbic acid levels in the culture medium but are not sufficient to provide cells with

- acquired resistance to the food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, January 2007, vol. 113, no. 2, p. 173-179.
153. KOLACZKOWSKI, M., VAN DER REST, M., CYBULARZ-KOLACZKOWSKA, A., et al. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *The Journal of Biological Chemistry*, December 1996, vol. 271, no. 49, p. 31543-31548.
  154. BARRETT, D. From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica et Biophysica Acta*, July 2002, vol. 1587, no. 2-3, p. 224-233.
  155. MONK, BC., and HARDING, DRK. Peptide motifs for cell-surface intervention: application to anti-infective and biopharmaceutical development. *Biodrugs*, 2005, vol. 19, no. 4, p. 261-278.
  156. HENDRYCH, T., KODEDOVÁ, M., SIGLER, K., et al. Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *Biochimica et Biophysica Acta*, March 2009, vol. 1788, no. 3, p. 717-723.
  157. HAĆ-WYDRO, K., KAPUSTA, J., JAGODA, A., et al. The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic. A Langmuir monolayer study. *Chemistry and Physics of Lipids*, December 2007, vol. 150, no. 2, p. 125-135.
  158. HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, August-November 2008, vol. 41, no. 3-4, p. 205-264.
  159. LE MAIRE, M., CHAMPEIL, P., and MØLLER, JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, November 2000, vol. 1508, no. 1-2, p. 86-111.
  160. BHAIRI, SM., and MOHAN, C. Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. San Diego: Calbiochem, 2007, 50 p.
  161. ZOTCHEV, SB. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current Medicinal Chemistry*, February 2003, vol. 10, no. 3, p. 211-223.
  162. VAN LEEUWEN, MR., GOLOVINA, EA., and DIJKSTERHUIS, J. The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *Journal of Applied Microbiology*, June 2009, vol. 106, no. 6, p. 1908-1918.
  163. VAN DER REST, ME., KAMMINGA, AH., NAKANO, A., et al. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, June 1995, vol. 59, no. 2, p. 304-322.
  164. Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt). Octenidine dihydrochloride: a new topical antimicrobial for local treatment of skin, mucous membranes and wounds [online]. Norderstedt, Germany, [cit. 2009-03-18]. Dostupné z URL <<http://www.schulke-mayr.co.uk/sa%20news%20archive/Resources/octenidoss.pdf>>
  165. HÜBNER, N-O., SIEBERT, J., and KRAMER, A. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2010, vol. 23, no. 5, p. 244-258.
  166. JONES, CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000*, October 1997, vol. 15, p. 55-62.
  167. MOHAMMADI, Z., and ABBOTT, PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*, April 2009, vol. 42, no. 4, p. 288-302.
  168. ELLEPOLA, ANB., and SAMARANAYAKE, LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Diseases*, January 2001, vol. 7, no. 1, p. 11-17.



169. AL-NAZHAN, S., and AL-OBAIDA, M. Effectiveness of a 2 % chlorhexidine solution mixed with calcium hydroxide against *Candida albicans*. *Australian Endodontic Journal*, December 2008, vol. 34, no. 3, p. 133-135.
170. KOBURGER, T., HÜBNER, N-O., BRAUN, M., et al. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, August 2010, vol. 65, no. 8, p. 1712-1719.
171. DAY, S., LALITHA, P., HAUG, S., et al. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. *The British Journal of Ophthalmology*, January 2009, vol. 93, no. 1, p. 116-119.
172. MCDONNELL, G., and RUSSELL, AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, January 1999, vol. 12, no. 1, p. 147-17.
173. LUGO, MR., and SHAROM, FJ. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. *Biochemistry*, October 2005, vol. 44, no. 42, p. 14020-14029.
174. ODOM, A., DEL POETA, M., PERFECT, J., et al. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January 1997, vol. 41, no. 1, p. 156-161.
175. ROTONDA, J., BURBAUM, JJ., CHAN, HK., et al. Improved calcineurin inhibition by yeast FKBP12-drug complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, April 1993, vol. 268, no. 11, p. 7607-7609.
176. WONG, GK., GRIFFITH, S., KOJIMA, I., et al. Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolylrapamycin, 32-desmethyrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *The Journal of Antibiotics*, May 1998, vol. 51, no. 5, p. 487-491.
177. MITA, MM., MITA, A., and ROWINSKY, EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biology & Therapy*, July/ August 2003, vol. 2, no. 4, Suppl. 1, p. S169-S177.
178. KAMYAR, M., RAWNDUZI, P., STUDENIK, CR., et al. Investigation of the electrophysiological properties of enniatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, September 2004, vol. 429, no. 2, p. 215-223.
179. LEVY, D., BLUZAT, A., SEIGNEURET, M., et al. Alkali cation transport through liposomes by the antimicrobial fusafungine and its constitutive enniatins. *Biochemical Pharmacology*, December 1995, vol. 50, no. 12, p. 2105-2107.
180. UHLIG, S., JESTOI, M., and PARIKKA, P. *Fusarium avenaceum* – The North European situation. *International Journal of Food Microbiology*, October 2007, vol. 119, no. 1-2, p. 17-24.
181. WALLACE, BA. Recent advances in the high resolution structures of bacterial channels: gramicidin A. *Journal of Structural Biology*, 1998, vol. 121, no. 2, p. 123-141.
182. KHANDELIA, H., IPSEN, JH., and MOURITSEN, OG. The impact of peptides on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, July-August 2008, vol. 1778, no. 7-8, p. 1528-1536.
183. DEY, S., RAMACHANDRA, M., PASTAN, I., et al. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, September 1997, vol. 94, no. 20, p. 10594-10599.

184. SHAPIRO, AB., FOX, K., LAM, P., et al. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. *European journal of biochemistry/FEBS*, February 1999, vol. 259, no. 3, p. 841-850.
185. SHAROM, FJ., LUGO, MR., and ECKFORD, PDW. New insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Journal of Bioenergetics and Membranes*, December 2005, vol. 37, no. 6, p. 481-487.
186. RAMACHANDRA, M., AMBUDKAR, SV., CHEN, D., et al. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry*, April 1998, vol. 37, no. 14, p. 5010-5019.
187. LOO, TW., and CLARKE, DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *The Journal of Membrane Biology*, August 2005, vol. 206, no. 3, p. 173-185.
188. SVETAZ, L., TAPIA, A., LÓPEZ, SN., et al. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, June 2004, vol. 52, no. 11, p. 3297-3300.
189. KONIECZNY, MT., KONIECZNY, W., SABISZ, M., et al. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. *European Journal of Medicinal Chemistry*, May 2007, vol. 42, no. 5, p. 729-733.
190. KONIECZNY, MT., KONIECZNY, W., SABISZ, M., et al. Synthesis of isomeric, oxathiolone fused chalcones, and comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, May 2007, vol. 55, no. 5, p. 817-820.
191. KARAMAN, İ, GEZEGEN, H., GÜRDERE, MB., et al. Screening of biological activities of a series of chalcone derivatives against human pathogenic microorganisms. *Chemistry & Biodiversity*, February 2010, vol. 7, no. 2, p. 400-408.
192. SOLANKEE, A., KAPADIA, K., ĆIRIĆ, A., et al. Synthesis of some new S-triazine based chalcones and their derivatives as potent antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, February 2010, vol. 45, no. 2, p. 510-518.
193. CONSEIL, G., DECOTTIGNIES, A., JAULT, JM., et al. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, June 2000, vol. 39, no. 23, p. 6910-6917.
194. LÓPEZ, SN., CASTELLI, MV., ZACCHINO, SA., et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, August 2001, vol. 9, no. 8, p. 1999-2013.
195. ŁĄCKA, I., KONIECZNY, MT., BUŁAKOWSKA, A., et al. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. *Mycoses*, 2010, p. 1-8.

# Seznam tabulek

- Tabulka 1-1: Mechanismus působení některých klinicky používaných antifungálních látek
- Tabulka 1-2: Přehled ABC proteinů v *Saccharomyces cerevisiae*
- Tabulka 1-3: Zařazení antimykotik podle místa účinku
- Tabulka 1-4: Nejznámější preparáty amfotericinu B (AMB) a nystatinu vhodné pro intravenózní podávání polyenů a jejich střední jednorázové smrtelné dávky (LD<sub>50</sub>) pro myši
- Tabulka 1-5: Příklady redistribučních sond
- Tabulka 2-1: Složky kultivačních médií a roztoků
- Tabulka 2-2: Rozpouštědla a činidla pro stanovení koncentrace glukózy v médiích
- Tabulka 2-3: Přehled zkoumaných látek a fluorescenčních sond
- Tabulka 2-4: Nově syntetizované chalkonové deriváty
- Tabulka 2-5: Kmeny kvasinek *S. cerevisiae* a jejich genetické charakteristiky
- Tabulka 2-6: Nově vytvořené kmeny kvasinek *S. cerevisiae*
- Tabulka 2-7: Restrikční endonukleázy s příslušnými pufry pro štěpení DNA
- Tabulka 2-8: Složení a výkonnostní charakteristiky činidla k enzymatickému stanovení glukózy
- Tabulka 3-1: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) *Candida albicans*

# Seznam použitých zkratek

5FC	<u>5</u> - <u>f</u> luoro <u>c</u> ytosin (flucytosin)
5FU	<u>5</u> - <u>f</u> luoro <u>u</u> racil
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ADP	<u>a</u> denosine <u>d</u> iphosphate
AIDS	<u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> ndrome
ALDP	<u>a</u> drenoleukodystrophy <u>p</u> rotein
AMB	<u>a</u> mfotericin <u>B</u>
AMG	<u>A</u> kademia <u>M</u> edyczna <u>G</u> dańsk
ATP	<u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate
BAC	<u>b</u> enzalkonium <u>c</u> hlorid
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
C	<u>c</u> ytoplazma
CCCP	<u>c</u> arbonyl cyanide 3- <u>c</u> hlorophenylhydrazone
CD koktejl	5 $\mu$ M <u>C</u> CCP + 10 $\mu$ M <u>D</u> M-11
CFTR	<u>c</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane <u>c</u> onductance <u>r</u> egulator
CoA	<u>c</u> oenzym <u>A</u>
C-P	<u>c</u> itrate- <u>p</u> hosphate
diSA	<u>d</u> iS-C <sub>3</sub> (3) <u>a</u> ssay
diSAB	<u>d</u> iS-C <sub>3</sub> (3) <u>a</u> ssay <u>b</u> efore
diS-C <sub>3</sub> (3)	3,3'- dipropylthiokarbocyanin jodid
diS-TDEA	<u>d</u> iS-C <sub>3</sub> (3) <u>t</u> ime- <u>d</u> ependent <u>d</u> rug <u>e</u> xposure <u>a</u> ssay
DMF	N,N- <u>d</u> imetylformamid
DMSO	<u>d</u> imetylsulfoxid
DNA	<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid
E	<u>e</u> ndosom
FCCP	<u>c</u> arbonyl cyanide <u>p</u> -(trifluoromethoxy) <u>p</u> henylhydrazone
FKBP12	<u>F</u> K506 <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u>12</u>
G	<u>G</u> olgiho váčky
GlcNAc	<u>N</u> - <u>a</u> cetylglucosamine
GPI	<u>g</u> lycosylphosphatidylinositol
IC <sub>50</sub>	koncentrace látky způsobující 50 % inhibici aktivity H <sup>+</sup> -ATPázy
IPP	<u>i</u> sopentenyl <u>p</u> rophosphate
LB	médium (0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % baktotrypton, 1 % NaCl, pH 7,0)
LB-Amp	kapalné médium (0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % baktotrypton, 1 % NaCl, 100 $\mu$ g/ml ampicilin, pH 7,0), LB-Amp agar obsahuje 2 % agaru
LD <sub>50</sub>	jednorázová letální dávka léčiva usmrcující 50 % pokusných zvířat
M	<u>m</u> itochondrie
MATE	<u>m</u> ultidrug <u>a</u> nd <u>t</u> oxic <u>c</u> ompound <u>e</u> xtrusion
MIC	<u>m</u> inimum <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration
MDR	<u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance
MFS	<u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily
MRP	<u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance- <u>r</u> elated <u>p</u> rotein
NBD	<u>n</u> ucleotide- <u>b</u> inding <u>d</u> omain
NQO	<u>N</u> - <u>n</u> itroquinoline- <u>N</u> - <u>o</u> xide
NTE	<u>N</u> - <u>t</u> erminal <u>e</u> xtension
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity

ODDC	oktenidindihydrochlorid
P450 <sub>DM</sub>	cytochrom P450 dependentní lanosterol C-14 demetyláza
PDR	<i>pleiotropic drug resistance</i>
P-gp	P-glykoprotein
P <sub>i</sub>	fosfát
PM	plazmatická membrána
PMS	<i>proton motive force</i>
R	regulační doména
Rib	ribozom
RLI	<i>RNase L inhibitor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RND	<i>resistance-nodulation-cell division</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SMR	<i>small multidrug resistance</i>
TAE	pufr (4,84 g Tris, 0,372 g EDTA-Na <sub>2</sub> , 1,35 ml kyseliny octové na 1 litr destilované vody)
TE	roztok 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5
TMS	transmembránový segment
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
TORC2	<i>target of rapamycin complex 2</i>
TpEB	pufr (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM MgCl <sub>2</sub> , 270 mM sacharóza, pH 7,5)
YEF3	<i>yeast elongation factor 3</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YP	kultivační médium (1 % kvasinkový extrakt, 1 % pepton)
YPD	kapalné médium (1 % kvasinkový extrakt, 1 % pepton, 2 % glukóza), agar obsahuje navíc 1 % agaru
YPG	agar (1 % kvasinkový extrakt, 1 % pepton, 2 % agar, 2 % glycerol)
YPGE	agar (1 % kvasinkový extrakt, 1 % pepton, 1 % agar, 2 % glycerol, 2 % etanol)
$\lambda_{\max}$	vlnová délka fluorescenčního emisního maxima
$\lambda_{\max/40}$	$\lambda_{\max}$ ve 40. minutě barvení buněk
$\lambda_{\max/CD}$	průměrná hodnota $\lambda_{\max}$ po přidání CD koktejlu

# Přílohy

## Publikace

1. Hendrych, T., **Kodedová, M.**, Sigler, K., Gášková, D. (2009): Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**, 717-723.
2. **Kodedová, M.**, Sigler, K., Lemire, B. D., Gášková, D. (2011): Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells. *BioTechniques* **50**, 58-63.

## Konferenční příspěvky

3. Drietomská, A., **Kodedová, M.**, Hendrych, T., Sigler, K., Gášková, D.: Testing the effect of lysosomotropic compounds on *Saccharomyces cerevisiae*. *35<sup>th</sup> Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovensko, 18. 5. 2007; ISSN 1336-4839, str. 82; poster
4. Gášková, D., Hendrych, T., **Kodedová, M.**, Sigler, K.: A novel screening system for identification of inhibitors of *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5 and Snq2. *26<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Braga, Portugalsko, 8. 9. 2008; str. 50; přednáška
5. **Kodedová, M.**, Drietomská, A., Hendrych, T., Sigler, K., Gášková, D.: Fast estimation of modes of action of antimicrobials on 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, 24. a 26. 9. 2009; ISBN 978-953-96567-9-3, str. 38; přednáška a poster
6. **Kodedová, M.**, Sigler, K., Gášková, D.: Real-time monitoring of action of surface-active antifungal drugs on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the drug removal diS-C<sub>3</sub>(3) assay. *9<sup>th</sup> International Mycological Congress: The Biology of Fungi*. Edinburgh, Velká Británie, 5. 8. 2010; P4.283; poster – cena za nejlepší poster
7. Łącka, I., **Kodedová, M.**, Gášková, D., Milewski, S.: Mode of action of chalcone derivatives on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *28<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Gurgaon, Indie, 24. 9. 2010; str. 57; poster
8. Gášková, D., **Kodedová, M.**, Sigler, K.: Real-time identification of basic events underlying the action of surface-active antifungals on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *28<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Gurgaon, Indie, 26. 9. 2010; str. 31; přednáška

## Referát o výsledcích práce, který tvoří samostatnou přílohu:

- **Kodedová, M.,** Hendrych, T., Gášková, D.: The time dependence of effect of chemical stressors on *Saccharomyces cerevisiae* can be influenced by cell wall. *16<sup>th</sup> Annual Conference of Doctoral Students - WDS 2007*, Praha, Česká republika, 7. 6. 2007; přednáška





## Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p

Tomáš Hendrych<sup>a</sup>, Marie Kodedová<sup>a</sup>, Karel Sigler<sup>b</sup>, Dana Gášková<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Microbiology, CR Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 September 2008

Received in revised form 28 November 2008

Accepted 3 December 2008

Available online 11 December 2008

#### Keywords:

Yeast MDR pump

Pump inhibitor

Fluorescence probe diS-C<sub>3</sub>(3)

Membrane potential

### ABSTRACT

We have developed a novel screening method that measures the kinetics and potencies of inhibitors of the yeast multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. The assay uses the potentiometric fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3) (as a benchmark substrate of both pumps) to distinguish drugs with minimal effects on plasma membrane potential as a marker of side-effects on membrane function and integrity. Using FK506, its structural analog rapamycin and enniatin B, we showed that our assay can also be used to determine the minimum drug concentration causing an immediate inhibitory effect and to compare the inhibitory potencies of the drug on the two pumps. We found that the protonophore CCCP effectively inhibits the transport of diS-C<sub>3</sub>(3) by both pumps and confirmed the activation of membrane H<sup>+</sup>-ATPase by CCCP.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Major clinical problems in the treatment of cancer are caused by multidrug resistance (MDR) proteins which expel a variety of structurally and functionally unrelated anticancer drugs from the cells [1–3]. Most inhibitors of MDR proteins, especially those targeting P-glycoprotein exhibit cytotoxicity [4–6].

The major multidrug exporters of *S. cerevisiae* are the full-size ABC transporters Pdr5p and Snq2p. They show limited sequence similarity with mammalian P-glycoprotein and have a reverse order of their transmembrane and nucleotide-binding domains [7]. Despite these differences, Pdr5p interacts with many of the same substrates and inhibitors as P-glycoprotein [8–14]. Thus, yeast Pdr5p can be used to screen for compounds that may be effective inhibitors of P-glycoprotein. Various benchmark substrates of Pdr5p, such as rhodamines [11], cycloheximide and cerulenin [15], antifungal azoles [13,16], steroids [14] and others [17,18] have been used in various screening models and methodologies that have evolved for identification and characterization of inhibitors/substrates of the pump [11,13,15–17,19].

New efficient inhibitors of MDR pumps found by screening in yeast may be useful therapeutically in conjunction with current drugs to combat yeast and bacterial infections and/or malignancies. Combination therapies may result in the usage of drugs at lower concentrations.

All current yeast screening systems for identifying new inhibitors of Pdr5p are based on the same principle — different accumulation of a benchmark substrate in cells overexpressing Pdr5p (either due to the presence of the *PDR1-3* allele or the presence of a plasmid) in the presence and absence of

inhibitors. A lesser amount of the benchmark substrate accumulates in the absence of inhibitors, while the presence of inhibitors facilitates increased accumulation within cells on the level of an isogenic Pdr5p-deficient strain.

A number of compounds have been found to efficiently reduce Pdr5p's ability to export its benchmark substrates [8,11,13,16,19–22]. Some of them, such as FK506, which have been assumed to be noncompetitive inhibitors [10,14,15], were later found to be Pdr5p substrates. Their inhibitory effects are caused by a low efflux rate or a higher affinity for the pump than the benchmark substrate [23].

The main goal of these screening systems is the identification of Pdr5p inhibitors. However, they also lead to a better understanding of substrate/pump interactions by providing insight into the structure of the Pdr5p substrate binding site, the sizes and chemical properties of substrates [17,18] and the effects of mutations on Pdr5p function [10,23,24].

Our fluorescence method uses the potentiometric fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3) as a benchmark substrate. diS-C<sub>3</sub>(3) is a substrate for Pdr5p and for Snq2p [25]. Our screening system allows us to monitor with high sensitivity and in real time changes in the activities of both pumps. Furthermore, screening is performed on cells in well-defined physiological states, does not require any pretreatment or preincubation and allows us to monitor effects on cellular membrane potentials. We present here an efficient strategy for identifying pump inhibitors with minimal side effects on membrane potential or membrane integrity.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Yeast strains

Yeast strains used in this study were *S. cerevisiae* US50-18C (*MATα*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*) and its mutants AD1-3 (*MATα*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*,

\* Corresponding author. Tel.: +420 221911348; fax: +420 224922797.  
E-mail address: [gaskova@karlov.mff.cuni.cz](mailto:gaskova@karlov.mff.cuni.cz) (D. Gášková).



*yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG*, AD12 (*MATα, PDR1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG*), AD13 (*MATα, PDR1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, pdr5Δ::hisG*) and AD23 (*MATα, PDR1-3, ura3, his1, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG*) [26].

## 2.2. Media and cell growth conditions

Yeast was precultured in YPD medium (1% yeast extract, 1% bacto-peptone, 2% glucose) at 30 °C for 24 h. A small volume (1–10 μl) of inoculum was added to 10 ml fresh YPD medium and the main culture was grown until it had reached the desired phase of exponential growth.

## 2.3. Fluorescence measurement of diS-C<sub>3</sub>(3) accumulation in cells

Cells from the exponential growth phase were harvested, washed twice with double-distilled water and resuspended in citrate-phosphate (CP) buffer of pH 6.0 to OD<sub>578</sub>=0.1. The potentiometric probe diS-C<sub>3</sub>(3) (10<sup>-5</sup> M stock solution in ethanol) was added to 3 ml of yeast cell suspension to a final concentration of 2 × 10<sup>-8</sup> M and fluorescence emission spectra of the cell suspensions were measured every 2–5 min on FluoroMax - 3 spectrofluorimeter (JobinYvon - groupe HORIBA) equipped with a xenon lamp. Excitation wavelength was 531 nm, fluorescence range 560–590 nm, duration of one spectral scan 20 s, scattered light was eliminated by orange glass filter with a cutoff wavelength at 540 nm.

The rate and extent of intracellular probe accumulation, a so-called staining curve, records the dependence of fluorescence emission maximum wavelength λ<sub>max</sub> on the time of staining [27,28]. When appropriate, a tested compound (inhibitor/substrate) was added to a different final concentration during the diS-C<sub>3</sub>(3) assay (usually after 20 min of staining). The samples were kept at room temperature and occasionally gently stirred.

## 2.4. Drug susceptibility assay

Disc diffusion tests were performed as previously described [12] to determine if compounds are substrates of Pdr5p, Snq2 and Yor1p. Briefly, yeast cells grown to post-diauxic phase in liquid YPD medium were washed twice with distilled water and resuspended in CP buffer (pH 6.0). Then they were diluted into top agar (seeded with 2.5 × 10<sup>6</sup> cells/ml) and poured onto YPG plates (2% agar, 1% yeast extract, 1% peptone, 2% glycerol). Two types of top agar were used in this study: (1) 1% YPD agar (1% agar, 1% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose) and (2) 1% YPGE (1% agar, 1% yeast extract, 1% peptone, 2% glycerol, 2% ethanol). The compounds dissolved in

ethanol, DMSO, DMF or as aqueous solutions (2 μl) were spotted onto Whatman paper discs lying on the top of the agar. After 2 days at 30 °C, the plates were photographed and the size of the growth inhibition zones measured.

To determine if a compound is able to inhibit the extrusion of a known substrate (nigericin for Pdr5p and Yor1p, 4-NQO for Snq2p) by the pumps we used a 'double addition' mode of the disc diffusion test. The tested compound (DM-11) was added 15 min after the known substrate.

## 2.5. Chemicals

The following materials were purchased from the respective companies: diS-C<sub>3</sub>(3) (3,3'-dipropylthiacarboxycyanine), DMSO and DMF (Fluka), yeast extract (Serva), bacto-peptone (Oxoid), glucose (Penta, Czech Republic), citric acid and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (reagent grade) (Lachema, Czech Republic), agar (Dr. Kulich Pharma, Czech Republic) and glycerol (Lach-Ner, Czech Republic). MDR pump substrates or inhibitors, lysosomotropic compound and protonophore used in this study were obtained from the following sources: FK506 and rapamycin (LC Laboratories), enniatin B (Alexis Biochemicals), nigericin from *Streptomyces hygroscopicus* and CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) (Sigma), 4-NQO (N-nitroquinoline 1-oxide) (Supelco). The lysosomotropic compound DM-11 (2-dodecanyloxyethyl-dimethylammonium chloride) was synthesized in the laboratory of Prof. S. Witek (Univ. Wrocław) [29] and kindly provided by Dr. A. Krasowska.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Validity of the diS-C<sub>3</sub>(3) screening assay for identifying inhibitors of Pdr5 and Snq2 pumps

Our fluorescence assay is based on comparing the accumulation of the benchmark pump substrate diS-C<sub>3</sub>(3) in Pdr5p- and/or Snq2p-expressing cells (strains AD12, AD13 and US50-18C) versus Pdr5p- and Snq2p-deficient cells (strains AD1-3 and AD23 taken as negative controls) [25,30] in the absence of an inhibitor and after its addition.

The accumulation of diS-C<sub>3</sub>(3) in control and inhibitor-treated cells is recorded as the dependence of the fluorescence emission maximum wavelength (λ<sub>max</sub>) on time (see Materials and methods). λ<sub>max</sub>(t) reflects the intracellular probe concentration at given time t [31]. Increasing intracellular concentrations are accompanied by a gradual shift of λ<sub>max</sub> towards longer wavelengths (a red shift); probe efflux results in a decreased intracellular concentration and a blue shift [32].

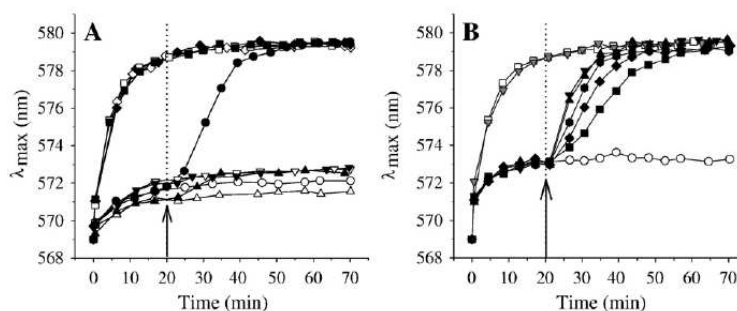


Fig. 1. Inhibitory effect of FK506 on Pdr5p. (A) Staining curves of early exponential cells of AD1-3 (squares), AD23 (diamonds), AD12 (circles), AD13 (inverted triangles) and US50-18C (triangles). Empty symbols – no FK506 added; full symbols – 5 μM FK506 added at 20 min. (B) Staining curves of AD12 cells after the addition of different FK506 concentrations (empty circles – no FK506; full squares – 1 μM; full diamonds – 3 μM; full hexagons – 5 μM; full triangles – 7 μM; full inverted triangles – 10 μM FK506) and AD1-3 cells (empty squares – no FK506; grey inverted triangles – 10 μM FK506). Arrows with dotted lines indicate FK506 addition.

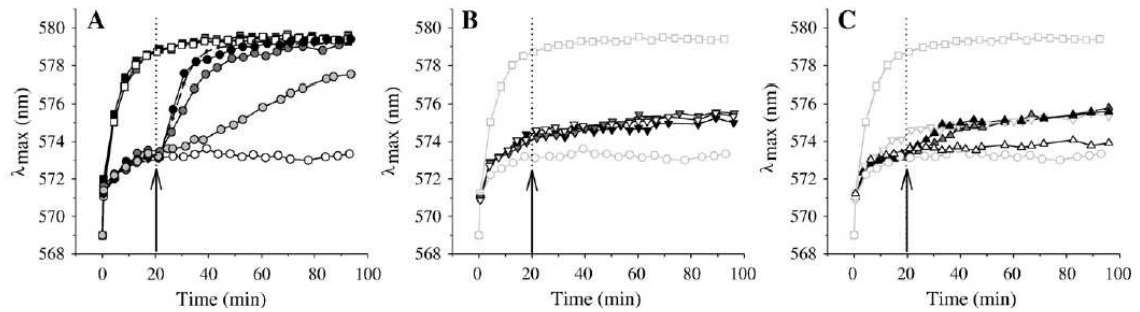


Fig. 2. Comparison of action of enniatin B and rapamycin with the effect of FK506 on MDR pumps. (A) Staining curves of AD1–3 (squares) and AD12 (circles) mid-exponential cells. Empty symbols – no inhibitor added; 5  $\mu$ M enniatin B (full symbols), 5  $\mu$ M rapamycin (light grey symbols) and 20  $\mu$ M rapamycin (dark grey symbols) added at 20 min. Dashed line with crosses – 5  $\mu$ M FK506 for comparison. (B) Staining curves of AD1–3 (inverted triangles) cells. Empty symbols – no inhibitor added; 5  $\mu$ M enniatin B (full symbols) and 20  $\mu$ M rapamycin (dark grey symbols) added at 20 min. Staining curves of AD1–3 (empty grey squares) and AD12 (empty grey circles) shown for comparison. (C) Staining curves of US50–18C (triangles) cells. Empty symbols – no inhibitor added; 5  $\mu$ M enniatin B (full symbols) and 20  $\mu$ M rapamycin (dark grey symbols) added at 20 min. Staining curves of AD1–3 (empty grey squares), AD12 (empty grey circles) and AD13 (empty grey inverted triangles) shown for comparison. Arrows with dotted lines indicate drug addition.

### 3.1.1. Drugs that affect Pdr5p

A comparison of staining curves (Fig. 1A) reveals that pump-expressing cells (strains AD12, AD13 and US50–18C) from an exponentially growing culture have a lower intracellular concentration of diS-C<sub>3</sub>(3) than pump-deficient mutants (AD1–3 and AD23) used as negative controls. Because the membrane potentials of pump-deficient and pump-expressing cells in the same phase of growth are identical [25], the differences in intracellular concentrations of diS-C<sub>3</sub>(3) reflect probe efflux from the cells by the pumps.

The usefulness of diS-C<sub>3</sub>(3) assay for studying the pump inhibition potency of drugs was tested with FK506, a known inhibitor/substrate of the Pdr5 pump [10,14,23]. Addition of 5  $\mu$ M FK506 to negative control (AD1–3, AD23) cells does not cause any change in staining (no effect on membrane potential) (Fig. 1A), while its addition to Pdr5p-

expressing AD12 cells leads to the convergence of the staining curve with that of negative control AD1–3 (and AD23) cells. This indicates the inhibition of probe efflux by Pdr5p.

In contrast to AD12, the staining curve for AD13 cells, which only express Snq2p, is unaffected by the addition of FK506 (Fig. 1A), indicating that FK506 has no effect on Snq2p activity.

FK506 addition to parent US50–18C cells having both Pdr5p and Snq2p causes a  $\lambda_{max}$  increase to the staining level of AD13 cells as a result of Pdr5p inhibition (Fig. 1A). Hence the fluorescence assay clearly shows that FK506 interacts only with Pdr5p.

As seen in Fig. 1B, the speed with which the probe concentrations in the AD12 cells reaches the similar levels as the pump-deficient cells increases with increasing concentration of FK506. At 7  $\mu$ M and higher the staining is no longer dependent on drug concentration and the

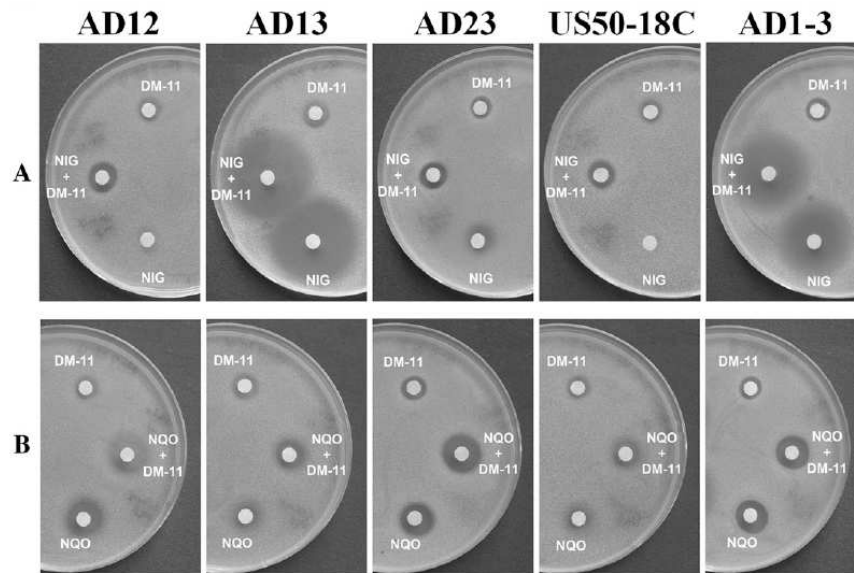


Fig. 3. DM-11 does not interact with Pdr5p, Snq2p and Yor1p either as a substrate or as an inhibitor. (A) Growth inhibition zones measured in a disc diffusion test using YPGE top agar in variously pump-expressing strains (AD12, AD13, AD23 and US50–18C) and the negative control AD1–3 exposed to nigericin (NIG, 20 mM; a substrate of Pdr5p and Yor1p), DM-11 (30 mM) and their combinations. (B) Growth inhibition zones measured in a disc diffusion test using YPGE top agar in variously pump-overproducing strains (AD12, AD13, AD23 and US50–18C) and the negative control AD1–3 exposed to 4-NQO (NQO, 3.26 mM; a substrate of Snq2p), DM-11 (30 mM) and their combinations.



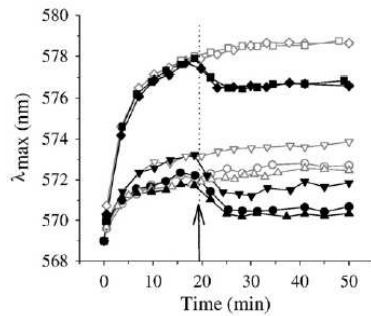


Fig. 4.  $\text{H}^+$ -ATPase inhibitor DM-11 lowers the membrane potential of cells but has no influence on the activity of Pdr5p and Snq2p. Staining curves of mid-exponential cells of negative controls AD1–3 (squares) and AD23 (diamonds), and pump-expressing AD12 (circles), AD13 (inverted triangles) and US50-18C (triangles). Empty symbols – no DM-11 added; full symbols – 10  $\mu\text{M}$  DM-11 added at 20 min. Arrow with dotted line indicates DM-11 addition.

staining curves become parallel with that observed for a negative control. This indicates that the staining is given only by membrane potential [28]. In other words, this concentration is sufficient for an immediate inhibitory effect. The slower change in staining at low FK506 concentrations indicates that inhibition of Pdr5p occurs gradually as the drug passes through the cell wall.

Our assay can determine the minimum drug concentration at which immediate and complete inhibition occurs.

In determining the usefulness of MDR pump inhibitors, it is also important to determine whether the inhibitor has effects on membrane function and integrity. The first indicator of such side-effects is a membrane potential change. Our method permits not only detection of the pump inhibition by a drug but, independently, also reveals the effect of the drug on membrane potential. As shown previously in prestained cells with zero pump activity [33], addition of drugs can result in changes in  $\lambda_{\text{max}}$ . A blue shift indicates plasma membrane depolarization, while a red shift may signify hyperpolarization or membrane permeabilization. The absence of membrane potential changes after the addition of FK506 points to its minimal influence on membrane function and integrity.

No growth inhibition zones and no difference in survival between control and FK506-treated cells were observed in disc diffusion and plating tests (data not shown). Thus FK506, which is known to inhibit

the transport of some amino acids (predominantly tryptophan) [10,23,34] does not affect cell survival of our tryptophan prototrophic strains, even at high concentrations.

We compared the actions of several inhibitors on the pumps to FK506. Enniatin B is a recently discovered inhibitor of Pdr5p [19]. Rapamycin is a structural analog of FK506 that acts on *S. cerevisiae* cells by irreversibly arresting cell in the G1 phase of the cell cycle [35]. Rapamycin has not been tested as a substrate/inhibitor of MDR pumps in yeast but has been shown to interact with the mammalian P-glycoprotein [36].

As seen in Fig. 2A, the inhibitory effect of enniatin B is virtually identical to that of FK506. Inhibition of Pdr5p by 5  $\mu\text{M}$  rapamycin is much slower than by 5  $\mu\text{M}$  FK506. Inhibition by rapamycin is still slower at a 4-fold higher concentration. Like FK506, neither of the two drugs affects the Snq2 pump (Fig. 2B, C) and membrane potential (Fig. 2A). In view of the structural similarity of FK506 and rapamycin [36], the rate of passage of both agents through the cell wall barrier should be similar. The slower staining with 5  $\mu\text{M}$  rapamycin therefore shows that its ability to inhibit Pdr5p is lower than that of FK506.

These data demonstrate that our method can be used to compare the potencies of different inhibitors towards MDR pumps. It should be noted that the assay assesses *in situ* and *in vivo* pump inhibition, which depends on both pump inhibition and permeability through the cell wall. These effects can be quantified by using a suitable parameter. Given the complex phenomena described here, the quantification will be the subject of a forthcoming study.

### 3.1.2. Compounds that have no effect on pump activity

As an integral part of assessing the usefulness of our method we show that compounds that do not interact with the pumps do not affect the ability of the pumps to transport diS-C<sub>3</sub>(3) but can only affect membrane potential. As such compound we used the lysosomotropic compound DM-11, which was shown to inhibit the activity of yeast plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase [29].

Some authors [12, 37] reported that cells deleted in *PDR5*, *SNQ2* and *YOR1* become sensitive to DM-11, which thus seems to be a substrate of Pdr5p, Snq2p and Yor1p. On the other hand, our data show that DM-11 clearly does not interact with Pdr5p, Snq2p and Yor1p either as a substrate or as an inhibitor. As seen in the disc diffusion test on pump-expressing cells (Fig. 3), the zones of inhibition formed in the presence of Pdr5p and Yor1p substrate nigericin (Fig. 3A) or the Snq2p substrate 4-NQO (Fig. 3B) plus DM-11 are similar in size to the individual compounds. DM-11 is therefore

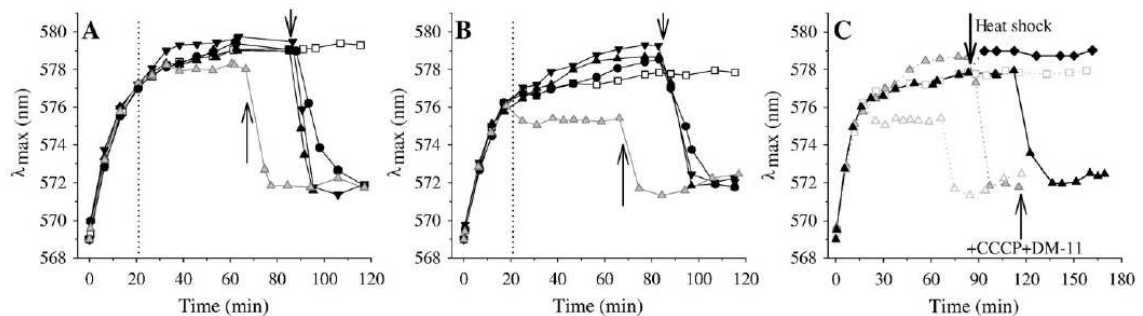
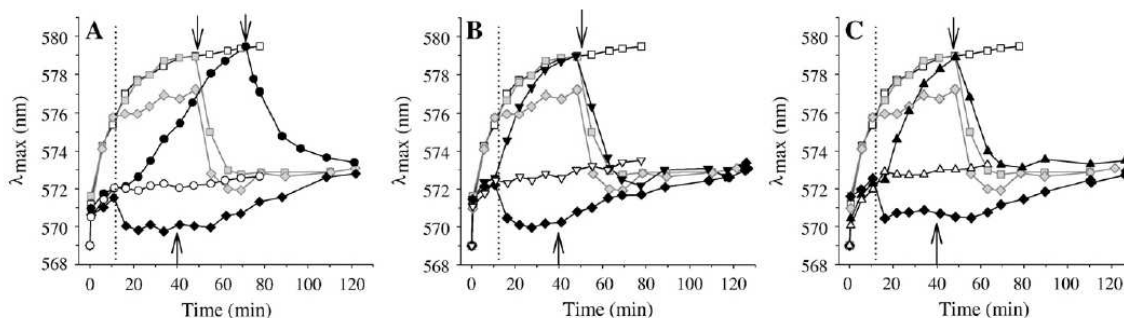


Fig. 5. The protonophore CCCP causes activation of  $\text{H}^+$ -ATPase. (A) Effect of CCCP and DM-11 additions (irrespective of the sequence) on staining of early-exponential AD1–3 cells. Empty squares – no compound added; 1  $\mu\text{M}$  CCCP (full circles), 5  $\mu\text{M}$  CCCP (full triangles) and 10  $\mu\text{M}$  CCCP (full inverted triangles) added at 20 min (dotted line) followed by 10  $\mu\text{M}$  DM-11 (downward arrow). The staining curve after addition of 10  $\mu\text{M}$  DM-11 at 20 min (light grey triangles) followed by 5  $\mu\text{M}$  CCCP (upward arrow) is shown for comparison. (B) Effect of CCCP and DM-11 additions (irrespective of the sequence) on staining of late-exponential AD1–3 cells. Symbols as in panel A. (C) Effect of CCCP addition together with DM-11 (cocktail) on staining of late-exponential AD1–3 cells. Full triangles – 5  $\mu\text{M}$  CCCP plus 10  $\mu\text{M}$  DM-11 added to intact cells, full diamonds – addition of the cocktail to heat-shock-exposed cells. Upward arrow indicates cocktail addition to both variants. Downward arrow indicates heat-shock pretreatment. Dotted lines with empty or grey symbols are taken from panel B for comparison (empty triangles – 10  $\mu\text{M}$  DM-11 followed by 5  $\mu\text{M}$  CCCP; grey triangles – opposite sequence; empty squares – no addition).





**Fig. 6.** CCCP inhibits diS-C<sub>3</sub>(3) transport by both Pdr5p and Sng2p independent of H<sup>+</sup>-ATPase activity. (A) Effect of CCCP and DM-11 additions (irrespective of the sequence) on staining of mid-exponential Pdr5p-expressing AD12 cells and negative control AD1–3 cells. Empty circles – no compound added to AD12 cells; full circles – 5  $\mu$ M CCCP added at 12 min to AD12 cells (dotted line) followed by 10  $\mu$ M DM-11 (second downward arrow); full diamonds – 10  $\mu$ M DM-11 added at 12 min to AD12 cells followed by 5  $\mu$ M CCCP (upward arrow). Empty squares – no compound added to AD1–3 cells; grey squares – 5  $\mu$ M CCCP added at 12 min to AD1–3 cells followed by 10  $\mu$ M DM-11 (first downward arrow); grey diamonds – 10  $\mu$ M DM-11 added at 12 min to AD1–3 cells followed by 5  $\mu$ M CCCP (first downward arrow). (B) Effect of CCCP and DM-11 additions (irrespective of the sequence) on staining of mid-exponential Sng2p-expressing AD13 cells compared with negative control AD1–3 cells. Empty inverted triangles – no compound added to AD13 cells; full inverted triangles – 5  $\mu$ M CCCP added at 12 min to AD13 cells (dotted line) followed by 10  $\mu$ M DM-11 (downward arrow); full diamonds – 10  $\mu$ M DM-11 added at 12 min to AD13 cells followed by 5  $\mu$ M CCCP (upward arrow). Staining curves and symbols for AD1–3 cells are the same as in panel A (C) Effect of CCCP and DM-11 additions (irrespective of the sequence) on staining of mid-exponential Pdr5p- and Sng2p-expressing US50-18C cells compared with negative control AD1–3 cells. Empty triangles – no compound added to US50-18C cells; full triangles – 5  $\mu$ M CCCP added at 12 min to US50-18C cells (dotted line) followed by 10  $\mu$ M DM-11 (downward arrow); full diamonds – 10  $\mu$ M DM-11 added at 12 min to US50-18C cells followed by 5  $\mu$ M CCCP (upward arrow). Staining curves and symbols for AD1–3 cells are the same as in panel A.

not an inhibitor of these pumps. Moreover, the identical zone size caused by DM-11 in the triple pump deletant AD1–3 and in pump-expressing strains AD12, AD13, AD23 and US50-18C indicates that DM-11 is not a substrate of Pdr5p, Sng2p or Yor1p.

Fluorescence measurements (Fig. 4) reveal that the effect of DM-11 indeed involves lowering of the membrane potential in negative controls (AD1–3, AD23). The decrease in  $\lambda_{\max}$  after the addition of DM-11 reflects the extent of inhibition of the H<sup>+</sup>-ATPase. Cells of Pdr5p- and/or Sng2p-expressing strains in the same growth phase display the same drop in staining relative to the DM-11 untreated controls. Hence DM-11 does not affect the activity of the pumps, i.e. their ability to export the probe from the cells.

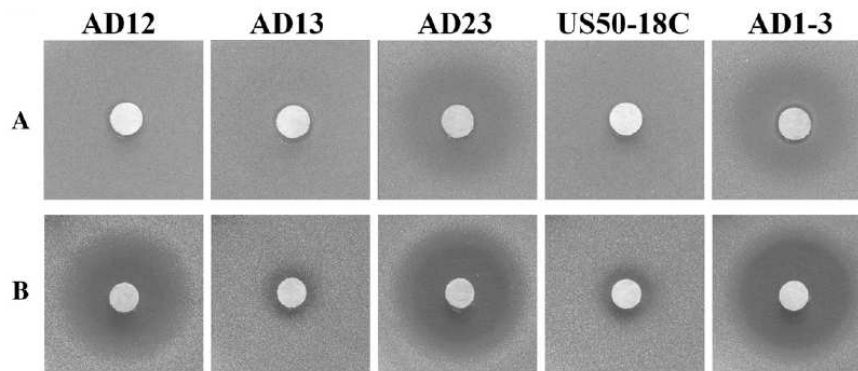
### 3.2. Protonophore CCCP causes activation of H<sup>+</sup>-ATPase and interacts with both Pdr5p and Sng2p

In early exponential AD1–3 cells, in which the probe accumulates solely according to membrane potential, addition of different concentrations of CCCP does not cause any decrease in staining (Fig. 5A). The highest concentration even causes a slight increase in

$\lambda_{\max}$ . This is surprising since the protonophore should dissipate membrane potential and cause depolarization.

The increase in staining after CCCP addition is still more striking in late exponential cells (Fig. 5B) that have a lower membrane potential [25]. This increase in staining is concentration-dependent, i.e. the same staining level is attained faster at a higher CCCP concentration.

The most likely explanation for this increase in staining is an increase in membrane potential. CCCP is a lipophilic, weak acid [38] that causes intracellular acidification and induces a rapid activation of the H<sup>+</sup>-ATPase. Activation of the H<sup>+</sup>-ATPase has been reported by weak acids [39] and by medium chain fatty acids [40]. A CCCP-induced activation of this enzyme has been described by dos Passos et al. [41]. The participation of the inducible pump Pdr12p, which recognizes CCCP as a substrate (Goffeau, A., personal communication), can be excluded because the export of CCCP anions should not increase the membrane potential [42,43]. In addition, our cultivation and experimental conditions practically exclude a high level of this transporter in the plasma membrane [42]. Induction of Pdr12p, regulated by the War1p transcription factor [44] (but not by Pdr1p and Pdr3p [42]), is observed only under stress caused by some weak organic acids [45].



**Fig. 7.** CCCP is a substrate of both Pdr5p and Sng2p. (A) Growth inhibition zones measured in a disc diffusion test using YPD top agar in variously pump-expressing strains (AD12, AD13, AD23 and US50-18C) and negative control AD1–3 exposed to 10 mM CCCP. (B) Growth inhibition zones measured in a disc diffusion test using YPGE top agar in variously pump-expressing strains (AD12, AD13, AD23 and US50-18C) and the negative control AD1–3 exposed to 5 mM CCCP.



In support of our hypothesis that CCCP activates the H<sup>+</sup>-ATPase, we note that prior inhibition of the H<sup>+</sup>-ATPase with DM-11 prevents the increase in  $\lambda_{\max}$  by a subsequent addition of CCCP. Rather, addition of CCCP leads to a marked depolarization and the staining level is the same as attained with the opposite sequence of additions (Fig. 5A, B).

The CCCP-induced activation of the H<sup>+</sup>-ATPase is an important observation because CCCP is commonly used as a diagnostic tool to indicate cell integrity. CCCP should not be used as the sole marker of cell integrity, but rather it should be used in combination with DM-11 or another H<sup>+</sup>-ATPase blocker. We illustrate the use of DM-11 plus CCCP for determining cell integrity in Fig. 5C. The staining profile of late exponential cells after the simultaneous addition of DM-11 and CCCP (taken from Fig. 5B) is compared to the response of heat shocked cells. In contrast to intact cells, cocktail addition to the heat shocked cells does not cause any drop in the high cell staining. This indicates the membrane-potential-independent interaction of the probe with the components of permeabilized cells [33].

CCCP addition to Pdr5p- and/or Snq2p-expressing cells causes a variably fast increase in  $\lambda_{\max}$  and a convergence of their staining curves with that of the negative control AD1–3 (Fig. 6). We can attribute this effect to a differential ability of CCCP to inhibit probe transport by the two pumps. Although the activity of the two pumps is comparable (the staining levels for strains AD12 and AD13 are practically the same), the rate of  $\lambda_{\max}$  increase in the case of AD13 cells having only Snq2p is much higher than the rate observed in the AD12 strain (Pdr5p). We can attribute this effect to a different ability of CCCP to inhibit the probe transport by the two pumps. The rate of staining observed with strain US50-18C (overproducing both pumps) is a combination of these two effects. Subsequent addition of DM-11 to CCCP-treated cells shows that the cells are intact and behave as a negative control.

This is another important finding in addition to the H<sup>+</sup>-ATPase activation, which of course takes place also in the Pdr5p- and/or Snq2p-overproducing strains. The CCCP-induced inhibition of probe transport by both pumps is documented in Pdr5p- and/or Snq2p-overproducing cells in which an activation of H<sup>+</sup>-ATPase had been prevented by DM-11 (Fig. 6). Even in this case the addition of CCCP is accompanied in all strains by  $\lambda_{\max}$  increase to the level of negative control.

To determine how CCCP inhibits probe export by the pumps, we performed disc diffusion tests (Fig. 7) using both types of top agar (see Materials and methods). In YPD agar, the cells will be growing on a fermentable carbon source and pump activity will be high [25] (Fig. 7A). The absence of zones in Pdr5p- and/or Snq2p-expressing strains AD12, AD13 and US50-18C in contrast to AD1–3 and AD23 clearly shows that CCCP is a substrate of both Pdr5p and Snq2p. In Fig. 7B, where YPGA agar contains a non-fermentable carbon source [11,12], CCCP is a much weaker substrate of Pdr5p than of Snq2p. The growth inhibition zones for strains having Snq2p (AD13, US50-18C) are much smaller than those for AD1–3 and AD23. The zones for AD12 and AD1–3 have almost the same size but a different “clarity”. The negligible difference in the appearance of zones for AD12 and AD1–3 is not given by an extremely low level of Pdr5p in AD12 cells (in comparison with that of AD13) because under the same growth conditions nigericin is still effectively expelled from the cells (see Fig. 3A).

The finding that CCCP interacts with both Pdr5p and Snq2p points to another important diagnostic application of our fluorescence screening system. Namely, the method makes it possible not only to detect if a compound inhibits the probe transport by both pumps but can also document the different ability of the compound to inhibit each of the pumps.

#### Acknowledgements

We thank Ms. Ivana Benešová for excellent technical assistance and Prof. Bernard D. Lemire for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Youth and Sports (Research Concepts MSM0021620835 and AV0Z50200510

and Research Center 1M0570) and from the Grant Agency of Charles University (grant 7674/2007).

#### References

- [1] P. Borst, Genetic mechanisms of drug resistance. A review, *Acta Oncol.* 30 (1991) 87–105.
- [2] J.A. Endicott, V. Ling, The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 137–171.
- [3] M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385–427.
- [4] A. Di Pietro, G. Conseil, J.M. Perez-Victoria, G. Dayan, H. Baubichon-Cortay, D. Trompier, E. Steinfelds, J.M. Jault, H. de Wet, M. Maitrejean, G. Comte, A. Boumendjel, A.M. Mariotte, C. Dumontet, D.B. McIntosh, A. Goffeau, S. Castans, F. Gamarro, D. Barron, Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 307–322.
- [5] V. Lecureur, O. Fardel, A. Guillouzo, The antiprogesterone drug RU 486 potentiates doxorubicin cytotoxicity in multidrug resistant cells through inhibition of P-glycoprotein function, *FEBS Lett.* 355 (1994) 187–191.
- [6] H. Thomas, H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein, *Cancer Control* 10 (2003) 159–165.
- [7] B. Rogers, A. Decottignies, M. Kolaczowski, E. Carvajal, E. Balzi, A. Goffeau, The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3 (2001) 207–214.
- [8] G. Conseil, A. Decottignies, J.M. Jault, G. Comte, D. Barron, A. Goffeau, A. Di Pietro, Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry* 39 (2000) 6910–6917.
- [9] G. Conseil, J.M. Perez-Victoria, J.M. Jault, F. Gamarro, A. Goffeau, J. Hofmann, A. Di Pietro, Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity, *Biochemistry* 40 (2001) 2564–2571.
- [10] R. Egner, F.E. Rosenthal, A. Kralli, D. Sanglard, K. Kuchler, Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter, *Mol. Biol. Cell* 9 (1998) 523–543.
- [11] M. Kolaczowski, M. van der Rest, A. Cybularz-Kolaczowska, J.P. Soumillion, W.N. Konings, A. Goffeau, Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31543–31548.
- [12] M. Kolaczowski, A. Kolaczowska, J. Luczynski, S. Witek, A. Goffeau, *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.* 4 (1998) 143–158.
- [13] M. Kolaczowski, K. Michalak, N. Motohashi, Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance, *Int. J. Antimicrob. Agents* 22 (2003) 279–283.
- [14] A. Kralli, K.R. Yamamoto, An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17152–17156.
- [15] K. Hiraga, A. Wanigasekera, H. Sugi, N. Hamanaka, K. Oda, A novel screening for inhibitors of a pleiotropic drug resistant pump, Pdr5, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 1589–1595.
- [16] K. Niimi, D.R. Harding, R. Parshot, A. King, D.J. Lun, A. Decottignies, M. Niimi, S. Lin, R.D. Cannon, A. Goffeau, B.C. Monk, Chemoprevention of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1256–1271.
- [17] J. Golín, S.V. Ambudkar, M.M. Gottesman, A.D. Habib, J. Szczepanski, W. Ziccardi, L. May, Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5963–5969.
- [18] L. Hanson, L. May, P. Tuma, J. Kveen, P. Mehl, M. Ferenz, S.V. Ambudkar, J. Golín, The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter, *Biochemistry* 44 (2005) 9703–9713.
- [19] K. Hiraga, S. Yamamoto, H. Fukuda, N. Hamanaka, K. Oda, Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328 (2005) 1119–1125.
- [20] G. Conseil, J.M. Perez-Victoria, J.M. Renoir, A. Goffeau, A. Di Pietro, Potent competitive inhibition of drug binding to the *Saccharomyces cerevisiae* ABC exporter Pdr5p by the hydrophobic estradiol-derivative RJ49953, *Biochim. Biophys. Acta* 1614 (2003) 131–134.
- [21] A. Wanigasekera, K. Hiraga, N. Hamanaka, K. Oda, Purification and some properties of an inhibitor for a yeast pleiotropic drug resistant pump from *Kita-satospora* sp. E-420, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2353–2357.
- [22] S. Yamamoto, K. Hiraga, A. Abiko, N. Hamanaka, K. Oda, A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 622–628.
- [23] R. Egner, B.E. Bauer, K. Kuchler, The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 1255–1263.
- [24] A.C. Tutulan-Cunita, M. Mikoshi, M. Mizunuma, D. Hirata, T. Miyakawa, Mutational analysis of the yeast multidrug resistance ABC transporter Pdr5p with altered drug specificity, *Genes Cells* 10 (2005) 409–420.
- [25] R. Čadek, K. Chládková, K. Sigler, D. Gášková, 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, *Biochim. Biophys. Acta* 1665 (2004) 111–117.



- [26] A. Decottignies, A.M. Grant, J.W. Nichols, H. de Wet, D.B. McIntosh, A. Goffeau, ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12612–12622.
- [27] B. Denkstejnová, D. Gášková, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, J. Plášek, K. Sigler, Monitoring of membrane potential changes in *S. cerevisiae* by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence, *Folia Microbiol. (Praha)* 42 (1997) 221–224.
- [28] D. Gášková, B. Brodská, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, K. Sigler, O. Benada, J. Plášek, Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C<sub>3</sub>(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14 (1998) 1189–1197.
- [29] S. Witek, A. Goffeau, J. Nader, J. Luczyński, T.M. Lachowicz, B. Kuta, E. Oblak, Lysosomotropic aminoesters act as H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in yeast, *Folia Microbiol. (Praha)* 42 (1997) 252–254.
- [30] D. Gášková, R. Čadek, R. Chaloupka, V. Vacata, J. Gebel, K. Sigler, Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 931–937.
- [31] J. Plášek, R.E. Dale, K. Sigler, G. Laskay, Transmembrane potentials in cells: a diS-C<sub>3</sub>(3) assay for relative potentials as an indicator of real changes, *Biochim. Biophys. Acta* 1196 (1994) 181–190.
- [32] D. Gášková, B. Brodská, A. Holoubek, K. Sigler, Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C<sub>3</sub>(3) assay, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 575–584.
- [33] D. Gášková, R. Čadek, R. Chaloupka, J. Plášek, K. Sigler, Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C<sub>3</sub>(3) in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (2001) 74–79.
- [34] J. Heitman, A. Koller, J. Kunz, R. Henriquez, A. Schmidt, N.R. Movva, M.N. Hall, The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 5010–5019.
- [35] J. Heitman, N.R. Movva, M.N. Hall, Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast, *Science* 253 (1991) 905–909.
- [36] R.J. Arceci, K. Stieglitz, B.E. Bierer, Immunosuppressants FK506 and rapamycin function as reversal agents of the multidrug resistance phenotype, *Blood* 80 (1992) 1528–1536.
- [37] S. Witek, M. Kolaczowski, T.M. Lachowicz, A. Kolaczowska, J. Luczyński, A. Goffeau, "Soft" lysosomotropic compounds as new substrates of the yeast PDR network, *Folia Microbiol. (Praha)* 43 (1998) 214–216.
- [38] J. Kasianowicz, R. Benz, S. McLaughlin, The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes, *J. Membr. Biol.* 82 (1984) 179–190.
- [39] C.D. Holyoak, M. Stratford, Z. McMullin, M.B. Cole, K. Crimmins, A.J. Brown, P.J. Coote, 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.* 62 (1996) 3158–3164.
- [40] C.A. Viegas, P.F. Almeida, M. Cavaco, I. Sá-Correia, The H<sup>+</sup>-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 779–783.
- [41] J.B. dos Passos, M. Vanhalewyn, R.L. Brandão, 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* 1136 (1992) 57–67.
- [42] P. Piper, Y. Mahé, S. Thompson, R. Pandjaitan, C. Holyoak, R. Egner, M. Mühlbauer, P. Coote, K. Kuchler, The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast, *EMBO J.* 17 (1998) 4257–4265.
- [43] P. Piper, C.O. Calderon, K. Hatzixanthis, M. Mollapour, Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives, *Microbiology* 147 (2001) 2635–2642.
- [44] A. Kren, Y.M. Mammun, B.E. Bauer, C. Schüller, H. Wolfer, K. Hatzixanthis, M. Mollapour, C. Gregori, P. Piper, K. Kuchler, War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 1775–1785.
- [45] M.N.B. Papadimitriou, C. Resende, K. Kuchler, S. Brul, High Pdr12 levels in spoilage yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) correlate directly with sorbic acid levels in the culture medium but are not sufficient to provide cells with acquired resistance to the food preservative, *Int. J. Food Microbiol.* 113 (2007) 173–179.



# Reports

## Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells

Marie Kodedová<sup>1</sup>, Karel Sigler<sup>2</sup>, Bernard D. Lemire<sup>3</sup>, and Dana Gášková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Microbiology, CR Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, and <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

BioTechniques 50:58-63 (January 2010) doi 10.2144/000113568

Keywords: fluorescent dye diS-C<sub>3</sub>(3); membrane potential; surface-active drug; cell permeabilization

Supplementary material for this article is available at [www.BioTechniques.com/article113568](http://www.BioTechniques.com/article113568).

New antifungal agents are needed to treat life-threatening fungal infections, particularly with the development of resistance. Surface-active antifungals have the advantages of minimizing host toxicity and the emergence of drug resistance. We have developed a time-dependent drug exposure assay that allows us to rapidly investigate the mechanism of surface-active antifungal drug action. The assay uses a multidrug pump-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae* and the potentiometric dye 3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide [diS-C<sub>3</sub>(3)] and can assess whether cells are depolarized, hyperpolarized, or permeabilized by drug exposure. In this work, we investigated the mechanisms of action of five surface-active compounds: SDS, nystatin, amphotericin B, octenidine dihydrochloride, and benzalkonium chloride. The diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay can be used to identify the mechanisms of action of a wide range of drugs. It is a fast and cost-effective method for screening drugs to determine their lowest effective concentrations.

Increased use of antifungal agents has resulted in the development of resistance to these drugs, which has become an important problem for many infectious diseases. The frequency and types of life-threatening fungal infections have increased dramatically as a result of immunosuppression associated with AIDS, organ transplantation, and cancer treatments (1–3).

Ideally, antifungals should interact with specific fungal targets that are absent in higher eukaryotes (4,5). However, the management of fungal infections is complicated by undesirable side effects and by the limited array of available antifungals (6,7). New antifungal agents with different mechanisms of action are urgently needed to overcome the problems of drug resistance and toxicity (8–12). Surface-active agents can minimize toxicity, the induction of drug efflux pumps, and the emergence of drug resistance caused by intracellular drug or target modification (13–15).

A battery of experimental tools is available for studying the activities of drugs. These include measurements of cell viability, minimum inhibitory concentrations (16), killing kinetics (13), fluorescent dye uptake or leakage (16), or the leakage

of intracellular constituents (16–18). Alternatively, microscopic examination of drug-exposed cells can reveal the type of cell damage generated by the drug (17).

We have developed an assay that detects the damaging events of surface-active drugs in real time, with high sensitivity. Our time-dependent drug exposure assay monitors the accumulation of 3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide [diS-C<sub>3</sub>(3)] by cells after their exposure to a surface-active antifungal compound, and then after its removal. The assay utilizes the striking difference in diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence curves of intact (including hyperpolarized and depolarized) and permeabilized cells. diS-C<sub>3</sub>(3), a lipophilic, cationic redistribution dye, easily passes through the plasma membrane and accumulates in the cells in response to the membrane potential (where the intracellular voltage is negative). It binds to the cell constituents, changing its fluorescence parameters. Dye uptake can thus be estimated directly from simple fluorescence characteristics, such as the position of the spectral maximum  $\lambda_{\max}$  (19). At equilibrium, which is typically reached in intact yeast cells within 30–40 min, the ratio of intracellular to extracellular dye is

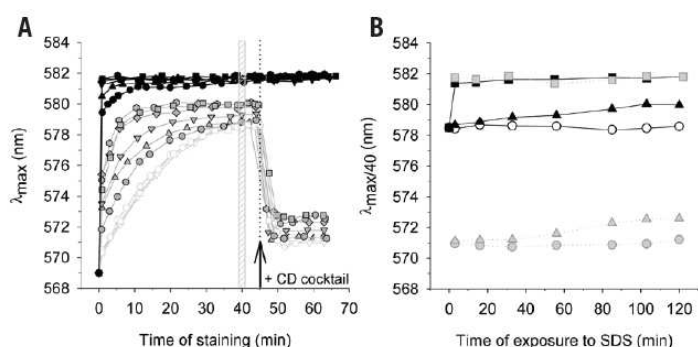
determined by the value of the membrane potential. It is important to note that the fluorescence response of diS-C<sub>3</sub>(3) to membrane potential is critically affected by the action of the multidrug-resistant (MDR) pumps, Pdr5p and Snq2p, which actively expel the dye from cells (20).

Permeabilized cells cannot maintain a membrane potential and are characterized by a massive outflow of cations from the cytosol, which significantly enhances the probe binding capacity of the cytosolic components (21). This leads to a fast and marked increase in  $\lambda_{\max}$ . Moreover, in permeabilized cells, the MDR pumps do not play a role; the staining curves of pump-free and pump-competent cells are identical.

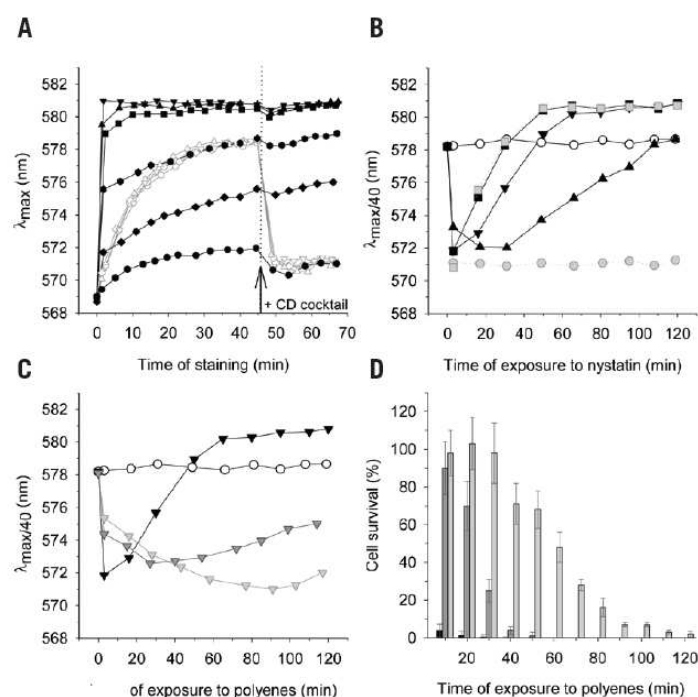
Cell integrity is revealed by the use of the protonophore carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) in combination with 2-dodecanoyloxyethyl-dimethylammonium chloride (DM-11), an H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor (22). Intact cells can easily be distinguished from permeabilized cells, because the fluorescence of permeabilized cells is insensitive to the protonophore.

In this work, we characterized the modes of action of five surface-active compounds [SDS, nystatin, amphotericin B,





**Figure 1.** Dose-dependent effects of SDS on the AD1-3 cell membrane. (A) Cells were treated with 0 mM (open symbols), 0.8 mM (gray symbols), or 5 mM SDS (black symbols) for 3 min (circles), 15 min (triangles), 55 min (inverted triangles), 85 min (diamonds), 100 min (hexagons), or 120 min (squares) before washing the drug away. Not all time points are shown for the 0 mM SDS. The gray cross-hatched rectangle highlights the time point from which the  $\lambda_{\max/40}$  values in panel B are derived. The arrow and dotted line indicate the addition of 5  $\mu\text{M}$  CCCP plus 10  $\mu\text{M}$  DM-11 (CD cocktail). (B) Time dependence of  $\lambda_{\max/40}$  at different concentrations of SDS (black and white symbols; circles, 0 mM; triangles, 0.8 mM; squares, 5 mM). The gray symbols indicate corresponding average  $\lambda_{\max}$  values after the addition of CD cocktail ( $\lambda_{\max/CD}$ ).



**Figure 2.** Permeabilization of AD1-3 cells by polyenes. (A) Cells were treated with 0  $\mu\text{M}$  (open symbols) or 60  $\mu\text{M}$  nystatin (black symbols) for 3 min (circles), 15 min (diamonds), 30 min (hexagons), 50 min (squares), 95 min (triangles), 120 min (inverted triangles) before washing the drug away. Not all time points are shown for the 0  $\mu\text{M}$  nystatin. The arrow and dotted line indicate the addition of CD cocktail. (B) Time dependence of  $\lambda_{\max/40}$  at different concentrations of nystatin (white and black symbols; circles, 0  $\mu\text{M}$ ; triangles, 20  $\mu\text{M}$ ; inverted triangles, 40  $\mu\text{M}$ ; squares, 60  $\mu\text{M}$ ). The dotted lines (gray symbols) indicate corresponding  $\lambda_{\max/CD}$  values after CD cocktail addition (shown 0 and 60  $\mu\text{M}$  nystatin). (C) Time dependence of  $\lambda_{\max/40}$  for two forms of 40  $\mu\text{M}$  amphotericin B (inverted triangles; dark gray, in DMSO; gray, in water) compared with 40  $\mu\text{M}$  nystatin (black inverted triangles) and drug-free control (white circles) from panel B. (D) Cell viability after exposure to 40  $\mu\text{M}$  nystatin (black bars), 40  $\mu\text{M}$  amphotericin B (in DMSO, dark gray bars), or 40  $\mu\text{M}$  amphotericin B (in water, gray bars).

octenidine dihydrochloride (ODDC), and benzalkonium chloride (BAC)].

## Materials and methods

### Chemicals

The following materials were purchased: diS-C<sub>3</sub>(3), DMSO, and dimethyl formamide (DMF) (Fluka, Prague, Czech Republic), yeast extract (Serva, Heidelberg, Germany), bacto-peptone (Oxoid, Brno, Czech Republic), glucose (Penta, Prague, Czech Republic), ethanol for UV spectroscopy, glycerol, citric acid and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O (reagent grade; Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic), and agar (Dr. Kulich, Pharma, Hradec Králové, Czech Republic). The antifungals and protonophore were obtained from the following sources: nystatin, amphotericin B (solubilized), amphotericin B (from *Sireptomycetes* sp.), and CCCP (Sigma, Prague, Czech Republic); BAC (Fluka); ODDC (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Germany); SDS (Serva). DM-11 was synthesized in the laboratory of Stanislaw Witek (Wroclaw University, Wroclaw, Poland) (23) and kindly provided by Anna Krasowska.

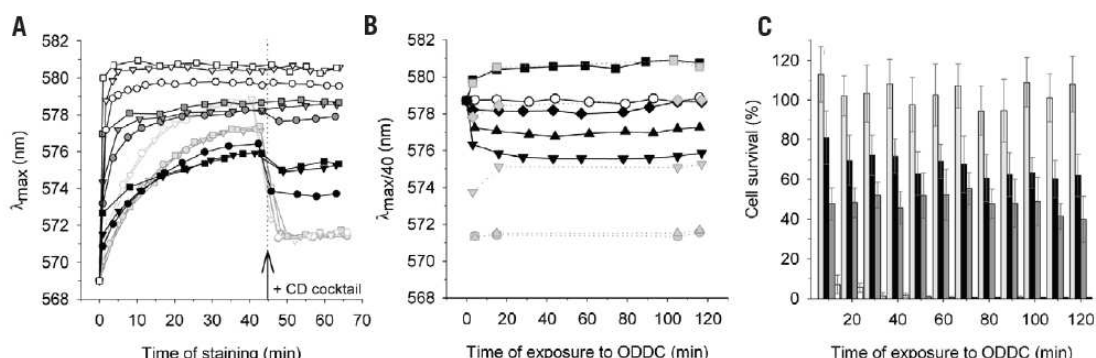
### Yeast strains, media, and cell growth conditions

The *S. cerevisiae* strains AD1-3 (*MATa*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*, *yor1Δ::hisG*, *snq2Δ::hisG*, *pdr5Δ::hisG*), AD12 (*MATa*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*, *yor1Δ::hisG*, *snq2Δ::hisG*), AD13 (*MATa*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*, *yor1Δ::hisG*, *pdr5Δ::hisG*), and AD23 (*MATa*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*, *snq2Δ::hisG*, *pdr5Δ::hisG*) are derived from the parent strain US 50-18C (*MATa*, *PDR1-3*, *ura3*, *his1*) (24).

Yeast precultures were grown in yeast extract, peptone, and dextrose (YPD) medium (1% yeast extract, 1% bacto-peptone, 2% glucose) at 30°C for 24 h. A small inoculum of 200–300  $\mu\text{L}$  was added to 10 mL fresh YPD medium and allowed to reach the desired phase of growth.

### Time-dependent drug exposure assay

Postdiauxic phase cells were harvested, washed twice with double-distilled water, and resuspended in 10 mM citrate-phosphate (CP) buffer, pH 6.0, to an OD<sub>578</sub> of 0.1. The cell suspension was divided into four equal parts. One was a drug-free control and underwent the same washing procedure as cells exposed to drug. Drug exposure was performed at room temperature with gentle stirring. Aliquots (10 mL) were removed at different times (usually 3–120 min), washed twice to remove the drug, and resuspended in buffer to OD<sub>578</sub> of 0.1.



**Figure 3.** Dose-dependent effects of ODDC on AD1-3 cells. (A) Cells were treated with 0  $\mu\text{M}$  (open gray symbols), 0.1  $\mu\text{M}$  (filled light gray symbols), 0.5  $\mu\text{M}$  (black symbols), 1  $\mu\text{M}$  (dark gray symbols), or 3  $\mu\text{M}$  (open black symbols) ODDC for different times (circles, 3 min; inverted triangles, 15 min; squares, 120 min) before washing the drug away. Only two time points are shown for 0  $\mu\text{M}$  ODDC. The arrow and dotted line indicate the addition of CD cocktail. (B) Time dependence of  $\lambda_{\text{max}/40}$  at different concentrations of ODDC (white and black symbols; circles, 0  $\mu\text{M}$ ; triangles, 0.1  $\mu\text{M}$ ; inverted triangles, 0.5  $\mu\text{M}$ ; diamonds, 1  $\mu\text{M}$ ; squares, 3  $\mu\text{M}$ ). The dotted lines (gray symbols) indicate  $\lambda_{\text{max}/40}$  values after CD cocktail addition. (C) Cell viability after exposure to 0.1  $\mu\text{M}$  (light gray bars), 0.5  $\mu\text{M}$  (black bars), 1  $\mu\text{M}$  (dark gray bars), or 3  $\mu\text{M}$  (white bars) ODDC.

**Fluorescence measurement of diS-C<sub>3</sub>(3) staining**

Aliquots (3-mL) of drug-treated cells were labeled with diS-C<sub>3</sub>(3) at a final concentration of  $2 \times 10^{-8}$  M ( $10^{-5}$  M stock solution in ethanol). Staining curves recorded the dependence of the diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence emission maximum wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) on the time of staining (19,25). Fluorescence emission spectra from 560–590 nm were recorded every 2–5 min on a FluoroMax-3 spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon, Edison, New Jersey, USA) equipped with a xenon lamp. The excitation wavelength was 531 nm, and the scan duration was 20 s. Scattered light was eliminated with an orange glass filter with a cutoff wavelength at 540 nm. In each experiment, CD cocktail (5  $\mu\text{M}$  CCCP plus 10  $\mu\text{M}$  DM-11) was added (usually after 45 min of staining). Samples were kept at room temperature and occasionally gently stirred.

**Plating tests**

To determine cell viability, washed, post-diauxic, or exponential cells were incubated with drug at room temperature with occasional gentle stirring. Every 10 min, 10  $\mu\text{L}$  cells were

diluted 1000-fold to stop the action of the drug, and 3–5 replicate aliquots were plated on 1% YPD agar (1% agar, 1% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose) and incubated for 2 days at 30°C. For control samples, the number of colonies per plate was ~200.

**Drug susceptibility assay**

To determine if BAC is a substrate of the Pdr5p, Snq2p, or Yor1p transporters, disc diffusion tests were performed as described (22). BAC, as an aqueous solution (2  $\mu\text{L}$ ), was spotted onto Whatman paper discs on the agar surface. After 2 days at 30°C, the plates were photographed, and the sizes of the growth inhibition zones were measured.

**Results and discussion**

**Dose-dependent action of SDS on the yeast cell membrane**

The anionic detergent SDS is a harsh but efficient solubilizer of integral membrane proteins. At low concentrations, before solubilization occurs, SDS incorporates into the membrane and may perturb or permeabilize the membrane, releasing aqueous solutes to the cell exterior (26,27).

AD1-3 cells lacking the major MDR pumps Pdr5p and Snq2p accumulate diS-C<sub>3</sub>(3) according to their membrane potential (Figure 1A) (20,22). Staining is recorded as the time-dependent increase of the fluorescence emission maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and takes ~30 min to reach equilibrium due to the cell wall barrier (19). Addition of CD cocktail to fully stained cells leads to the drop of  $\lambda_{\text{max}}$  to a level near that of free dye, indicating a marked membrane depolarization. Staining curves of control cells remained unchanged over the time of the assay, indicating that the cells were not influenced by incubation in CP buffer.

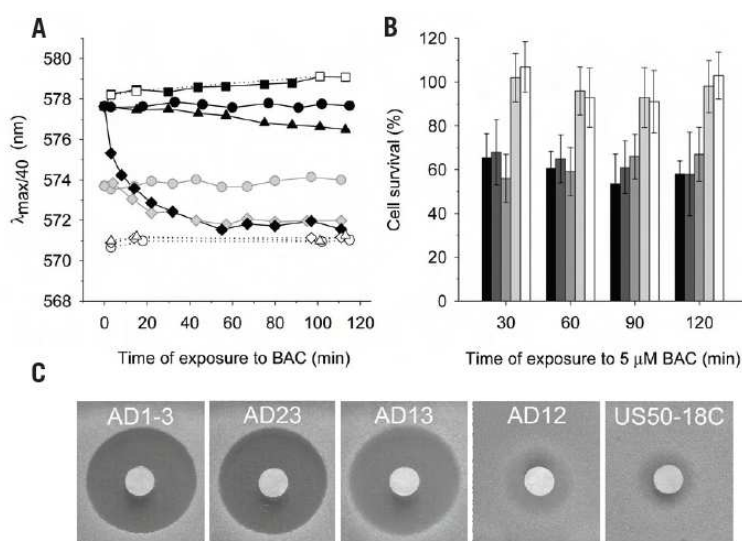
The staining curves were markedly affected by SDS in a time- and concentration-dependent manner, indicating changes in diS-C<sub>3</sub>(3) uptake. At 0.8 mM SDS, a concentration at which 100% of the cells survive a 2-h exposure (not shown), the staining curves for 3- and 15-min exposures revealed higher initial rates of staining than untreated cells (Figure 1A). SDS increased permeability of the cell wall, allowing a faster establishment of the same equilibrium level of staining as in untreated cells. Longer exposure times led to much faster initial rates of staining (staining curves are shown for 55-, 85-, 100-, and 120-min exposures) and to a gradual increase in the equilibrium level of staining. Exposure times longer than 85 min did not produce higher levels of equilibrium staining. For these longer exposures, addition of CD cocktail caused a drop of  $\lambda_{\text{max}}$  to a value that is higher than that of controls; the difference in  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  (average  $\lambda_{\text{max}}$  after the addition of CD cocktail) corresponds to the exposure time-dependent increase in equilibrium staining levels. This staining pattern is typical of cells that are progressively more hyperpolarized due to an outflow of cations other than protons.

**Future of BIOTECH OPTICS.**

- Precision Filters, Aspheres, Objectives and more
- Over 22,700 Optics Available in Volume
- Request your FREE catalog!

**eo Edmund**  
optics | worldwide  
856.547.3488 | www.edmundoptics.com





**Figure 4.** BAC affects both the plasma membrane and some cytoplasmic components of cells. (A) Time dependence of  $\lambda_{\max/40}$  at different concentrations of BAC before (filled symbols) and after (open symbols) the addition of CD cocktail to pump deficient AD1-3 cells (black symbols) and comparison with the effect of 5  $\mu\text{M}$  BAC on Pdr5p-containing AD12 cells (gray symbols). BAC concentrations: circles, 0  $\mu\text{M}$ ; triangles, 1  $\mu\text{M}$ ; diamonds, 5  $\mu\text{M}$ ; squares, 50  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\max/CD}$  values after CD cocktail addition (dotted lines) are shown only for AD1-3 cells. (B) Cell viability after exposure to 5  $\mu\text{M}$  BAC (AD1-3, black bars; Yor1p-containing AD23, dark gray bars; Snq2p-containing AD13, medium gray bars; AD12, light gray bars; parent strain US 50-18C, white bars). (C) Growth inhibition zones of AD1-3, AD23, AD13, AD12, and US 50-18C cells exposed to 15 mM BAC in a disc diffusion assay.

Similar staining curves can be obtained by replacing SDS with the  $\text{K}^+$  ionophore gramicidin A (data not shown). We conclude that at 0.8 mM SDS, small channels or leaks are formed that allow the outflow of cations from the cytosol without affecting the diS-C<sub>3</sub>(3) binding capacity of cell constituents (21).

When using 5 mM SDS, a lethal concentration for even a 3-min exposure, the staining curves revealed a very rapid red-shifting. Red-shifting is typical of cells with disrupted or fully permeabilized membranes and is often indicative of cell wall damage [as in after heat shock (21,22,28)]. These cells did not respond to the addition of CD cocktail, indicating they had lost membrane potential due to permeabilization (22).

The time- and concentration-dependent effects of a drug can be easily assessed by plotting the  $\lambda_{\max/40}$  values ( $\lambda_{\max}$  at 40 min of staining) and the  $\lambda_{\max/CD}$  values against the time of exposure (Figure 1B). This simple plot can reveal membrane hyperpolarization (0.8 mM SDS) and complete permeabilization (5 mM SDS).

#### Dose-dependent action of nystatin on yeast cells

Nystatin is a polyene antifungal agent that binds to ergosterol and forms stable pores, resulting in cell permeabilization and

the leakage of cytoplasmic components (29,30).

The staining curves of nystatin-treated cells depended on the length of exposure. After a 3-min exposure to 60  $\mu\text{M}$  nystatin, staining reached a low equilibrium  $\lambda_{\max}$  level (Figure 2A). Addition of CD cocktail caused  $\lambda_{\max}$  to decrease to that of CD cocktail-treated controls. This low staining level and the response to CD cocktail similar to that of intact control cells are typical of depolarized cells with a low membrane potential. Short exposures to nystatin are probably insufficient for the complete binding of nystatin to ergosterol and likely induce few membrane leaks with negligible effect on the cell's dye-binding capacity (21). In contrast, longer exposures (15–120 min) result in red-shifting, which is typical of permeabilized cells that do not respond to CD cocktail. In permeabilized cells, ions flow out of the cytosol, gradually enhancing the probe binding capacity of the cytosolic components and shifting  $\lambda_{\max}$  toward longer wavelengths. The transition from depolarization to full permeabilization was revealed by the dependence of the  $\lambda_{\max/40}$  value on the time of exposure (Figure 2B). For the sake of clarity, only the  $\lambda_{\max/CD}$  plots for the 0 and 60  $\mu\text{M}$  nystatin are shown.

With 60  $\mu\text{M}$  nystatin, complete permeabilization occurred after 50 min, while with 40  $\mu\text{M}$  nystatin, it required 60–80 min and was not complete even after 120 min with 20  $\mu\text{M}$  nystatin.

As shown above, the diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay can be used to evaluate the mechanism and speed of action of surface-active drugs. The assay can detect changes ranging from slight membrane depolarization to complete membrane permeabilization. In comparison, cell viability assays performed under the same conditions revealed only low levels of survival after short exposures to nystatin, providing little insight into the drug's mode of action (Figure 2C; 40  $\mu\text{M}$  nystatin).

#### Permeabilization of AD1-3 cells by two forms of amphotericin B

Amphotericin B is the only polyene antifungal currently approved for systemic use. Like nystatin, it forms pores or channels that cause leakage of cellular components and ultimately, cell death (31). Figure 2B compares the time-dependence of  $\lambda_{\max/40}$  for cells treated with 40  $\mu\text{M}$  amphotericin B and nystatin. Nystatin partially depolarized cells at short exposure times, but they were fully permeabilized (red-shifted) after 60 min. Both forms of amphotericin B (in DMSO or water) were markedly less effective at permeabilizing cells than nystatin. Amphotericin B (40  $\mu\text{M}$  in water) caused a mild, progressive depolarization over 2 h. Amphotericin B (40  $\mu\text{M}$  in DMSO) caused a similar depolarization during the first 40 min, but this was followed by a slow increase in  $\lambda_{\max/40}$ , indicating ion outflow.

These slower effects of amphotericin B are reflected by increased cell survival relative to nystatin-treated cells (Figure 2C). For both forms of amphotericin B, exposure times longer than the times at which the  $\lambda_{\max/40}$  begins to increase (40 min for amphotericin B in DMSO and 100 min for amphotericin B in water) corresponded to negligible cell survival.

#### Dose-dependent action of ODDC

ODDC is an efficient topical antimicrobial agent that forms noncytotoxic complexes at the site of action. ODDC binds to negatively charged microbial surfaces, resulting in disruption of the cell membrane. It strongly adheres to lipid components of microbial cell membranes without adversely affecting human epithelia or wound tissue (32).

Figure 3A shows the staining curves of cells exposed to four concentrations of ODDC (0.1, 0.5, 1, and 3  $\mu\text{M}$ ). The striking



feature is its rapidity resulting from its fast and strong adherence to cell surfaces.

With exposure to 0.1  $\mu\text{M}$  ODDC, the staining curves remained essentially unchanged with longer exposure times (Figure 3A). This indicated a fast but limited depolarization without permeabilization.

The staining curve for the 3-min exposure to 0.5  $\mu\text{M}$  ODDC was indicative of a small fraction of the cells being fully permeabilized with the remainder being depolarized, as indicated by the reduced equilibrium value attained after 40 min and the response to CD cocktail (22). The contribution of fully depolarized cells cannot be reliably distinguished, because of their negligible contribution to staining and their lack of response to CD cocktail; they are “hidden cells.” Exposure for 15 min led to an increase in the fraction of permeabilized cells, as seen from the weaker response to CD cocktail. The similarity of the 15- and 120-min staining curves indicated that the action of ODDC was completed within 15 min. The steeper initial rise in cell staining of the 120-min exposure indicated increased permeability of the dye across the cell wall.

At 1  $\mu\text{M}$  ODDC, the fractions of permeabilized cells were higher, and there was no response to CD cocktail for the 15- and 120-min exposures. Equilibrium staining levels were not maximal, suggesting only fully permeabilized and fully depolarized cells were present.

At 3  $\mu\text{M}$  ODDC, the 3-min staining curve indicated that most, but not all cells were fully permeabilized (the curve is not completely red-shifted). Longer exposure times resulted in full permeabilization.

The dependence of the  $\lambda_{\text{max}/40}$  and  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  values on the exposure time clearly illustrates ODDC’s rapid action; depolarization or full permeabilization was reached  $\leq 15$  min (Figure 3B).

The results of the diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay are supported by the cell viability assay (Figure 3C). ODDC is an ideal example of a surface-active antifungal agent; it acts rapidly and is effective at low concentrations. The diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay can be used to identify the mechanisms of drug action and as a fast, cost-effective screening method for determining the lowest effective concentrations of such drugs.

#### Effect of BAC on yeast

BAC is a cationic, quaternary ammonium compound (QAC) that primarily targets the cytoplasmic membranes of bacteria and yeasts. QACs are surface active, penetrate into the cell wall, and interact with the plasma membrane to cause leakage of low molecular weight materials. They also act

intracellularly by promoting the release of autolytic enzymes (33,34).

At 50  $\mu\text{M}$  BAC, the red-shifted staining and the lack of response to CD cocktail indicated that most of the cells were permeabilized, and the remainder were totally depolarized (Figure 4A). None of these cells were viable (data not shown). At 1 and 5  $\mu\text{M}$  BAC, there was a concentration-dependent cell depolarization, which was slower than with 0.1  $\mu\text{M}$  ODDC. The response to CD cocktail indicated that no cells were permeabilized;  $\lambda_{\text{max}/\text{CD}}$  values were the same as for untreated cells (Figure 4A). All cells exposed to 1  $\mu\text{M}$  BAC survived (data not shown), while exposure to 5  $\mu\text{M}$  BAC reduced survival to  $\sim 60\%$  after 120 min (Figure 4B), despite the absence of cell permeabilization.

Several reasons may explain why the proportion of cells surviving exposure to 5  $\mu\text{M}$  BAC did not correspond with the number of permeabilized cells detected by the diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay. First, BAC may cause deep depolarization that ultimately disorganizes the membrane and reduces cell survival. Second, BAC may cause damage to the cell wall, which precludes cell reproduction. Third, BAC may act intracellularly and inhibit metabolism. None of these mechanisms is detectable by the diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay.

To gain insight into the mechanism of BAC toxicity, we used a set of mutants isogenic to AD1-3, but deleted in only one MDR pump. As shown in Figure 4C, BAC was a substrate of Pdr5p (in contrast to other compounds—see the disc assays in Supplementary Figure S1). Only the parent strain U.S.50-18C and AD12, which also possess the Pdr5p pump, were capable of growth near the disc where the BAC concentration was high enough to stop the growth of other strains. These strains showed full survival when exposed to 5  $\mu\text{M}$  BAC (Figure 4B), in contrast to Pdr5p-deficient strains. Although the survivals of AD1-3 and AD12 to BAC exposure are different (Figure 4B), BAC has the same membrane depolarizing effects on both strains (Figure 4A). The lower diS-C<sub>3</sub>(3) staining of control AD12 cells is caused by Pdr5p-dependent dye export (Figure 4A) (22). These data clearly show a dominant role for metabolic inhibition rather than membrane damage in BAC toxicity.

The mechanisms of effect of some biocides in current use are not completely understood, except that at high concentrations they cause cell permeabilization or inactivate a number of enzymes. We show here that insight into a drug’s mechanism of action can be easily and rapidly gained by our

diS-C<sub>3</sub>(3) time-dependent drug exposure assay when performed at low biocide concentrations. The assay can reveal the contributions of surface-active or intracellular effects on cell viability at different biocide concentrations and exposure times.

## Acknowledgments

We thank Ivana Benešová and Tomáš Hendrych for excellent technical assistance. We acknowledge André Goffeau (Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium) for the isogenic mutant strains. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Youth and Sports (Research Concepts MSM0021620835 and AV0Z50200510 and Research Center 1M0570), as well as from the Czech Science Foundation (grant no. 205/10/1121).

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## References

- Anaissie, E. 1992. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin. Infect. Dis.* 14(Suppl 1):S43-S53.
- Marr, K.A. and R.A. Bowden. 1999. Fungal infections in patients undergoing blood and marrow transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 1:237-246.
- Warnock, D.W. 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* 48:1-12.
- Carrillo-Muñoz, A.J., G. Giusiano, P.A. Ezkurra, and G. Quindós. 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* 19:130-139.
- Odds, F.C., A.J.P. Brown, and N.A.R. Gow. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11:272-279.
- Anderson, J.B., N. Ricker, and C. Sirjusingh. 2006. Antagonism between two mechanisms of antifungal drug resistance. *Eukaryot. Cell* 5:1243-1251.
- Cowen, L.E. and W.J. Steinbach. 2008. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot. Cell* 7:747-764.
- Barrett, D. 2002. From natural products to clinically useful antifungals. *Biochim. Biophys. Acta* 1587:224-233.
- DiDomenico, B. 1999. Novel antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:509-515.
- Georgopapadakou, N.H. 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:547-557.
- Monk, B.C. and A. Goffeau. 2008. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* 321:367-369.
- Onyewu, C. and J. Heitman. 2007. Unique applications of novel antifungal drug combinations. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 6:3-15.



13. Benincasa, M., M. Scocchi, S. Pacor, A. Tossi, D. Nobili, G. Basaglia, M. Buseti, and R. Gennaro. 2006. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:950-959.
14. Monk, B.C. and D.R.K. Harding. 2005. Peptide motifs for cell-surface intervention: application to anti-infective and biopharmaceutical development. *BioDrugs* 19:261-278.
15. Monk, B.C., K. Niimi, S. Lin, A. Knight, T.B. Kardos, R.D. Cannon, R. Parshot, A. King, et al. 2005. Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:57-70.
16. Cox, S.D., C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warming, and S.G. Wyllie. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88:170-175.
17. Bennis, S., F. Chami, N. Chami, T. Bouchikhi, and A. Remmal. 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Let. Appl. Microbiol.* 38:454-458.
18. Janderová, B., D. Gášková, and O. Bendová. 1995. Consequences of *Sporidiobolus pararoseus* killer toxin action on sensitive cells. *Folia Microbiol. (Praha)* 40:165-167.
19. Gášková, D., B. Brodská, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, K. Sigler, O. Benada, and J. Plášek. 1998. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C<sub>3</sub>(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1189-1197.
20. Čadek, R., K. Chládková, K. Sigler, and D. Gášková. 2004. 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1665:111-117.
21. Gášková, D., R. Čadek, R. Chaloupka, J. Plášek, and K. Sigler. 2001. Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C<sub>3</sub>(3) in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1511:74-79.
22. Hendrych, T., M. Kodedová, K. Sigler, and D. Gášková. 2009. Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:717-723.
23. Witek, S., A. Goffeau, J. Nader, J. Luczyński, T.M. Lachowicz, B. Kuta, and E. Oblak. 1997. Lysosomotropic aminoesters act as H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in yeast. *Folia Microbiol. (Praha)* 42:252-254.
24. Decottignies, A., A.M. Grant, J.W. Nichols, H. de Wet, D.B. McIntosh, and A. Goffeau. 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J. Biol. Chem.* 273:12612-12622.
25. Denksteinová, B., D. Gášková, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, J. Plášek, and K. Sigler. 1997. Monitoring of membrane potential changes in *S. cerevisiae* by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence. *Folia Microbiol. (Praha)* 42:221-224.
26. Heerklotz, H. 2008. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* 41:205-264.
27. le Maire, M., P. Champeil, and J.V. Moller. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508:86-111.
28. Gášková, D., B. Brodská, A. Holoubek, and K. Sigler. 1999. Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C<sub>3</sub>(3) assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:575-584.
29. Bolard, J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864:257-304.
30. Zotchev, S.B. 2003. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr. Med. Chem.* 10:211-223.
31. Baginski, M. and J. Czub. 2009. Amphotericin B and its new derivatives—mode of action. *Curr. Drug Metab.* 10:459-469.
32. Hübner, N.O., J. Siebert, and A. Kramer. 2010. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23:244-258.
33. Day, S., P. Lalitha, S. Haug, A.W. Fothergill, V. Cevallos, R. Vijayakumar, N.V. Prajna, N.R. Acharya, et al. 2009. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. *Br. J. Ophthalmol.* 93:116-119.
34. McDonnell, G. and A.D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147-179.

Received 31 August 2010; accepted 21 October 2010.

Address correspondence to Dana Gášková, Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic. e-mail: gaskova@karlov.mff.cuni.cz.

To purchase reprints of this article, contact: [carmelitag@fosterprinting.com](mailto:carmelitag@fosterprinting.com)



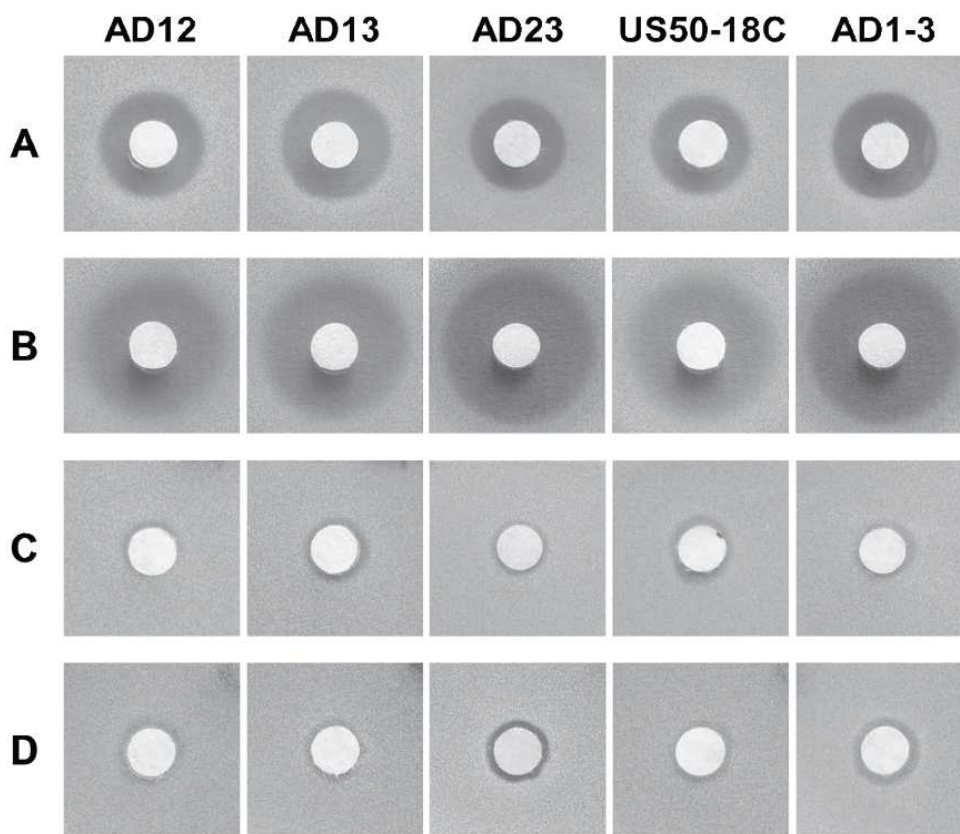
## Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells

Marie Kodedová<sup>1</sup>, Karel Sigler<sup>2</sup>, Bernard D. Lemire<sup>3</sup>, and Dana Gášková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Microbiology, CR Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, and <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

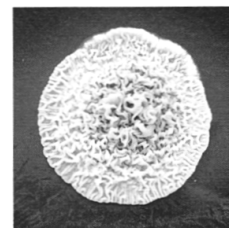
*BioTechniques* 50:XXX-XXX (January 2010) doi 10.2144/000113568

Keywords: fluorescent dye diS-C<sub>3</sub>(3); membrane potential; surface-active drug; cell permeabilization



**Supplementary Figure S1. SDS, nystatin, amphotericin B, and ODDC are not substrates of Pdr5p, Snq2p, and Yor1p.** Growth inhibition zones measured in a disc diffusion assay using YPD top agar in variously pump-expressing strains (AD12, AD13, AD23, and US 50-18C) and negative control AD1-3 exposed to: (A) 1 M SDS, (B) 20 mM nystatin, (C) 10 mM amphotericin B in water, and (D) 15 mM ODDC.

# 35<sup>TH</sup> ANNUAL CONFERENCE ON YEASTS



ISSN 1336-4839



P37

## TESTING THE EFFECT OF LYSOSOMOTROPIC COMPOUNDS ON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Drietomská A.<sup>1</sup>, Kodedová M.<sup>1</sup>, Hendrych T.<sup>1</sup>, Sigler K.<sup>2</sup>, Gášková D.<sup>1</sup><sup>1</sup> Charles University, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Acad. Sci. Czech Republic, Videňská 1083, 142 20 Prague 4

Using a set of 5 isogenic mutant strains, we tested the effects of a set of 12 aminoesters of fatty acids belonging to two structural groups, which have been previously classed among lysosomotropic antifungals (LA), on membrane potential and the activity of Pdr5p, Snq2p and Yor1p MDR pumps in *S. cerevisiae* by a newly developed assay - a combination of the diS-C<sub>3</sub>(3) method and biological tests [1]. Depending on their chemical structure and concentration, the LA displayed several effects: (a) membrane depolarization, (b) interaction with MDR pumps, and (c) membrane damage leading to cell permeabilization. Membrane depolarization was observed with nearly all LA while only 3 of the tested compounds interacted with the MDR pumps. Relatively small changes in chemical structure (length of the aliphatic chain, character and substitution of the aminoester moiety of the molecule) led to considerable differences in the mode and magnitude of effects on the cells. A correlation was observed between the structure of LA and their diffusibility in agar.

Supported by Research Concepts MSM0021620835 and AV0Z50200510 and grant 1M0570 of the Ministry of Education, CR.

[1] Gášková D, Chládková-Moquin K., Hendrych T., Maláč J., Sigler K.: *23th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, p. 28, New Delhi, India, 2005.

# 26th SMYTE

small meeting on yeast transport and energetics

braga  
portugal

6 to 9 september 2008



centro de biologia molecular e ambiental



universidade do minho  
escola de ciências  
departamento de biologia

## A NOVEL SCREENING SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF INHIBITORS OF *S. CEREVISIAE* MULTIDRUG RESISTANCE PUMPS Pdr5 AND Snq2

*Gásková D.<sup>(1)</sup>, Hendrych T.<sup>(1)</sup>, Kodedová M.<sup>(1)</sup> and Sigler K.<sup>(2)</sup>*

<sup>(1)</sup>Institute of Physics, Charles University, Prague, Czech Republic <sup>(2)</sup>Institute of Microbiology, CR Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

Presenting author's email: [gaskova@karlov.mff.cuni.cz](mailto:gaskova@karlov.mff.cuni.cz)

The similarity of MDR pump substrates in yeast and mammalian cells calls for constructing new yeast screening systems for testing pump inhibitors; the inhibitors found by the yeast screening system may be applicable to mammalian cells. All current yeast screening systems for identifying potential inhibitors are based on the accumulation of a benchmark substrate; its amount taken up by cells with the MDR pumps in the presence and absence of inhibitors is compared. In case of substrates effluxed by the pumps, less substrate is accumulated in the absence of inhibitors, while the presence of inhibitors facilitates increased accumulation within cells to the level of an isogenic pump-free strain. Our diS-C<sub>3</sub>(3) screening assay makes it possible to monitor with high sensitivity changes in the activity of two major MDR pumps Pdr5p and Snq2p, of which our fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3) is a benchmark substrate. The method permits monitoring of pump activity changes in real time immediately after adding potential inhibitors. Using a known modulator of transport activity of Pdr5p, FK506, as a model compound, we confirmed the sensitivity of the assay. Using different substrates of Pdr5p and Snq2p, we showed its potential suitability for analyzing structure-function relationships of substrates and their transport inhibition potency.

Supported by Research Concepts MSM 0021620835 and AV0Z50200510, Grant Agency of Charles Univ. 7674/2007 and Research Center 1M0570.



# CESAR 2009

CENTRAL EUROPEAN SYMPOSIUM ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE



OP 7

ISBN  
978-953-96567-9-3

Oral Presentations - Laboratory methods in diagnosis of antimicrobial resistance

**Fast estimation of modes of action of antimicrobials on yeast  
*Saccharomyces cerevisiae*: from MDR pump inhibition with a minimal effect on  
membrane potential up to cell permeabilization**

Marie Kodedová<sup>1</sup>, Andrea Drietomská<sup>1</sup>, Tomáš Hendrych<sup>1</sup>, Karel Sigler<sup>2</sup>, Dana Gášková<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5,  
121 16 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Acad. Sci. Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

[gaskova@karlov.mff.cuni.cz](mailto:gaskova@karlov.mff.cuni.cz)

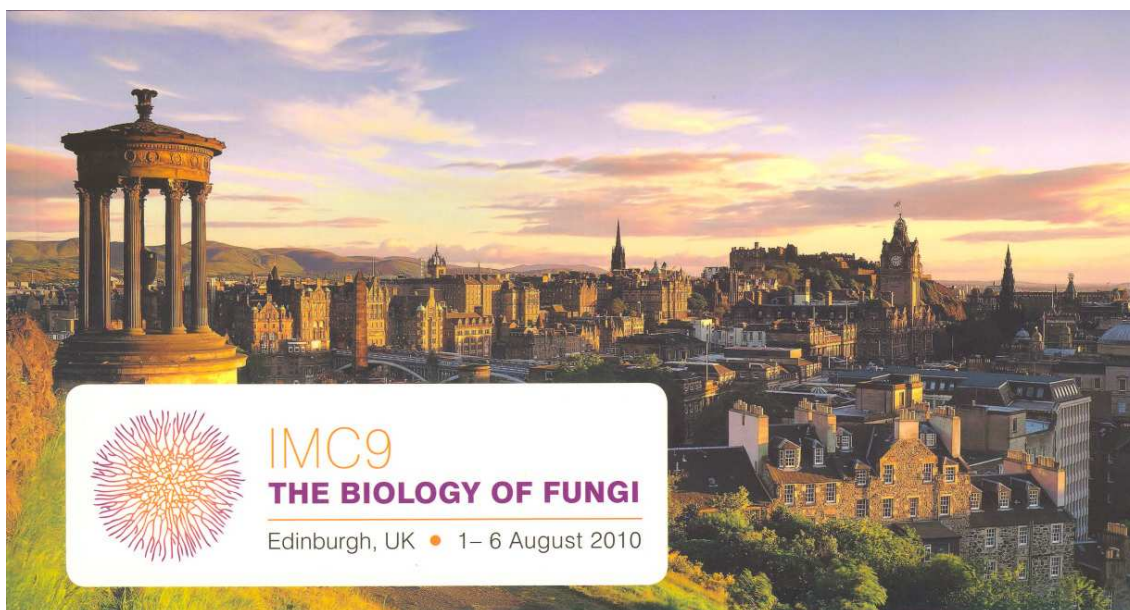
The current increased use of antifungal agents has resulted in the development of resistance to these drugs. Search for new antifungals with acceptable toxicity and with different mechanisms of action overcoming the (mainly multidrug) resistance is thus underway. One of the ways of circumventing the pathogen's intracellular resistance mechanisms is to use drugs that target directly the cell surface structures, i.e. are surface-active, resulting in cell permeabilization.

Our fluorescence method is based on the use of the potentiometric fluorescent probe diS-C<sub>3</sub>(3) as a benchmark substrate. DiS-C<sub>3</sub>(3) is a substrate for two major *S. cerevisiae* MDR pumps, Pdr5p and Snq2p. It allows us to monitor with high sensitivity and in real time changes in the activities of both pumps and also in membrane potential. We present here an efficient strategy for identifying pump inhibitors with minimal side effects on membrane potential or membrane integrity, and compare the potencies of different inhibitors towards MDR pumps. New efficient inhibitors of MDR pumps could potentially be used in conjunction with current antimicrobials that are MDR pump substrates.

The method is also suited for detecting cells permeabilized by surface active drugs. In contrast to intact cells, simultaneous addition of CCCP plus DM-11 (H<sup>+</sup>-ATPase blocker) to the permeabilized cells does not cause any drop in the high cell staining. This indicates the membrane-potential-independent interaction of the probe with the components of permeabilized cells.

The screening is performed on cells in well-defined physiological state and does not require any pretreatment or preincubation.

Supported by Research Concepts MSM 0021620835 and AV0Z50200510, Grant Agency of Charles University 7674/2007 and 4351/2009, and Research Center 1M0570.



[P4.283]

**Real-time monitoring of action of surface-active antifungal drugs on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: The drug removal diS-C<sub>3</sub>(3) assay**

M. Kodedová<sup>\*1</sup>, K. Sigler<sup>2</sup>, D. Gášková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University, Czech Republic, <sup>2</sup>Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic

New antifungal agents circumventing the pathogen's resistance by the direct damage of yeast cell surface structures and with acceptable toxicity are urgently needed. Some bioactive compounds in current use in high concentrations are known to cause disruption of cell membrane, however, a more detailed knowledge of their mechanism of action can be helpful in finding the lowest efficient concentration.

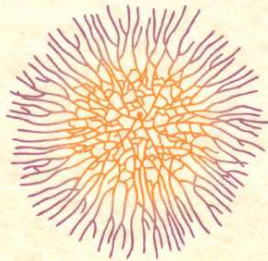
Our diagnostic drug removal diS-C<sub>3</sub>(3) assay provides a powerful means for inferring the mechanism of action of surface-active drugs because it detects with high sensitivity the range and sequence of individual events in yeast damage in real time. It is based on a striking difference between diS-C<sub>3</sub>(3) staining curves of **intact** (comprising hyperpolarized and depolarized) and **permeabilized** cells in different stages of progressing ion outflow from the cytosol. An additional diagnostic tool of our assay indispensable for distinguishing different kinds of damage to the cells is the response to the addition of protonophore CCCP in combination with H<sup>+</sup>-ATPase blocker.

By using known agents with different mechanisms of cell permeabilization, we present here this efficient strategy for identifying mechanism of damage to the cell surface structures and compare its potency with possibility of plating test.

Supported by MSM0021620835, AV0Z50200510, GACR205/10/1121 and 1M0570.

Keywords: fluorescence probe diS-C<sub>3</sub>(3), permeabilization of cell membrane, antifungal drugs, yeast *Saccharomyces cerevisiae*





# IMC9 THE BIOLOGY OF FUNGI

Edinburgh, UK • 1 – 6 August 2010

## Best Poster Award 2010

### Poster Session 4 Winner Pathogenesis and Disease Control Theme

For an outstanding contribution at the

**9<sup>th</sup> International Mycological Congress**

Held in Edinburgh, Scotland, UK from 1-6 August 2010

Presented to

**Marie Kodedová**

For the contribution

**Real-time monitoring of action of surface-active antifungal drugs on the yeast *saccharomyces cerevisiae*: The drug removal DiS-C<sub>3</sub>(3) assay**



*L. Boddy*  
Prof. Lynne Boddy  
(BMS President)

*Nick Read*  
Prof. Nick Read  
(Chair of the IMC9 Organizing Committee)







P9

### Mode of action of chalcone derivatives on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Łacka, Izabela<sup>1</sup>; Kodedová, Marie<sup>2</sup>; Gášková, Dana<sup>2</sup> and Milewski, Sławomir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland and <sup>2</sup>Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

Chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) of natural or synthetic origin, like other flavonoids, exhibit a number of different biological effects, including antimicrobial and anticancer activity. It has been shown that some of the chalcone derivatives inhibit the drug extrusion activity of the yeast drug transporter Pdr5p and it is also known that the mode of antifungal action of some chalcones is related to their effect on the fungal cell wall (1), (2).

Using a set of five isogenic mutant strains, we tested the effects of six oxathiolone fused chalcone derivatives, on membrane potential and the activity of Pdr5p, Snq2p and Yor1p MDR pumps in *Saccharomyces cerevisiae* by the fluorescence diS-C<sub>3</sub>(3) method and disc diffusion test. Depending on their concentration and small changes in chemical structure, all chalcone derivatives caused hyperpolarization of the membrane, the biggest effect was shown in cells treated with AMG-148 and AMG-154. The most effective compound, AMG-148, perturbed the membrane in the concentration-dependent manner, starting from the very low level (0.1 μM) by forming very narrow leaks which allowed outflow of cations (predominantly K<sup>+</sup>) from the cytosol. Moreover, AMG-148 caused damage of the cell wall. This effect was probably caused by inhibition of membrane enzymes – chitin and β(1→3)glucan synthase. Most of the tested compounds also inhibited transport of the fluorescence probe by Pdr5p and Snq2p pumps.

#### References:

1. Conseil G et al., (2000) *Biochemistry* 39, 6910-6917.
2. Lopez, SN et al., (2001) *Bioorg Med Chem*, 9, 1999-2013.



Transport and Antifungal Drug

T23

**Real-time identification of basic events underlying the action of surface-active antifungals on the yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Gášková, Dana<sup>1</sup>; Kodedová, Marie<sup>1</sup> and Sigler, Karel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic and <sup>2</sup> Institute of Microbiology, Acad. Sci. Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4

Ideally, antifungals should interact with specific targets present in the fungal cells and absent in higher eukaryotes. This is often not true and management of fungal infections is thus markedly limited by undesirable side effects of the antifungals and also by the rapid development of drug resistance against most of the currently used antifungal drugs, such as fluconazole etc. The discovery of new antifungal agents with different mechanisms of action overcoming the problem of resistance to current anti-infective drug therapies and with acceptable toxicity is thus urgently needed. One of the ways of circumventing intracellular resistance mechanisms of the yeast is to use drugs that target directly the cell surface structures, i.e. are surface-active. Both cell wall and membrane can be attacked, resulting ultimately in cell permeabilization and death. This mode of action can reduce opportunities for adverse effects, or the emergence of drug resistance caused by intracellular drug and target modification and by the induction of drug efflux pumps.

We developed a technique for detecting with high sensitivity and in real time the range, sequence and persistence of individual events in yeast damage by surface-active drugs. We monitor the evolution of diS-C<sub>3</sub>(3) staining of cells after their variously long exposure to a surface-active antifungal compound and its removal by multiple washing. For distinguishing different kinds of damage to the cells we use the differences between the diS-C<sub>3</sub>(3) staining of **intact** (though hyperpolarized and/or depolarized) and **permeabilized** cells. An indispensable diagnostic tool of our assay indicating cell integrity is the use of protonophore CCCP in combination with H<sup>+</sup>-ATPase blocker DM-11.

By using known agents with different mechanisms of cell permeabilization, we present here this efficient strategy for identifying the mechanism of damage to the cell surface structures.

*Supported by Research Concepts MSM 0021620835 and AV0Z50200510, Czech Science Foundation grant 205/10/1121, and Research Center 1M0570.*