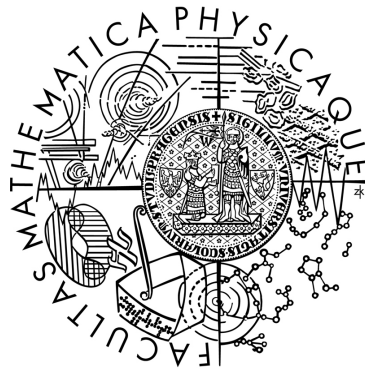


Univerzita Karlova v Praze

Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Kateřina Mudroňová

### **Srovnání vybraných karbocyaninových fluorescenčních sond z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek**

Fyzikální ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Jako malá jsem chtěla být astronautkou. Přála jsem si cestovat ke hvězdám a neznámým světům, objevovat nové věci. Z vesmírného cestování však po letech nezbylo víc než touha po volnosti a svobodě. A volnost i svobodu jsem nakonec našla ve studiu na MFF UK. Ráda bych zde poděkovala všem, kteří svou existencí a činy přispěli k vytvoření této práce a pomáhali mi ve studiu.

Mé velké díky patří panu profesorovi Jaromíru Pláškoví a paní docentce Daně Gáškové za jejich cenné rady a motivaci k dalším experimentům a laborantce Ivaně Benešové za neocenitelnou pomoc při přípravě vzorků k měření. Dále děkuji celému oddělení biofyziky za vytváření neopakovatelně přátelského prostředí. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě ve studiu podporují.



Obrázek 0.0: Haiku věnované všem, kteří mi pomohli, byť o tom mnohdy ani netušili.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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 5. 4. 2013

Kateřina Mudroňová

**Název práce:** Srovnání vybraných karbocyaninových fluorescenčních sond z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek

**Autor:** Bc. Kateřina Mudroňová

**Ústav:** Fyzikální ústav UK

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

**Abstrakt:** Membránový potenciál je jednou z nejdůležitějších charakteristik živé buňky. Jednou z možností monitorování jeho změn je použití karbocyaninových fluorescenčních sond. V rámci této práce byly metodou synchronně skenované fluorescence prozkoumány vlastnosti několika sond. Z nich byly vybrány tři vhodné látky pro další experimenty jako doplněk k sondám diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5), které představují standardní sondy používané v oddělení biofyziky FÚUK. Konkrétně se jedná o sondy diOC<sub>3</sub>(3), diIC<sub>1</sub>(3) a diIC<sub>2</sub>(5). Byla porovnána rychlost jejich akumulace v buňkách *S. cerevisiae*, na základě které jsme zjišťovali, zda jsou substráty MDR pump. Dále se tato práce zabývá otázkou ekvivalence výsledků obdržených pomocí různých fluoroforů a jejich vzájemného ovlivňování. Pro tyto účely byla zvolena dvojice sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5), pomocí nichž byl zkoumán vliv acidifikace na membránový potenciál kvasinek *S. cerevisiae*. Bylo zjištěno, že informace o depolarizaci získané pomocí odlišných sond, se dobře shodují.

**Klíčová slova:** membránový potenciál, kvasinky, *S. cerevisiae*, fluorescenční sondy

**Title:** The comparison of the performance of selected carbocyanine dyes in fluorescent probing of yeast cell membrane potential

**Author:** Bc. Kateřina Mudroňová

**Department:** Institut of Physics, Charles University of Prague

**Supervisor:** prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc., Institut of Physics, Charles University of Prague

**Abstract:** The membrane potential is one of the most important parameters of the living cell. It can be measured using carbocyanine fluorescent probes. In this thesis we examined parameters of several dyes of this family. For further experiments three of them were chosen – diOC<sub>3</sub>(3), diIC<sub>1</sub>(3) a diIC<sub>2</sub>(5) as a supplement to diSC<sub>3</sub>(3) and diSC<sub>3</sub>(5), which represent standard probes used at biophysical department of Institut of Physics. We compared the rates of their accumulation in *S. cerevisiae* cells to determine if they were MDR pumps' substrates. The other goal of this work was to decide whether the results obtained using different probes are equivalent and to determine if the presence of a probe affects the spectral characteristics of another. For this purpose we have chosen diSC<sub>3</sub>(3) and diSC<sub>3</sub>(5). With those dyes we examined the influence of the acidification on membrane potential of the yeast *S. cerevisiae*. We showed that the information on depolarization obtained using both probes were matching very well.

**Keywords:** membrane potential, yeast, *S. cerevisiae*, fluorescent probes

# Obsah

<b>Úvod .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>7</b>
<b>1. 1 Kvasinková buňka .....</b>	<b>7</b>
1. 1. 1 Buněčná stěna.....	8
1. 1. 2 Cytoplasmatická membrána .....	8
1. 1. 3 Jádro.....	9
1. 1. 4 Mitochondrie .....	9
1. 1. 5 Vakuola .....	9
1. 1. 6 Peroxisomy.....	10
1. 1. 7 Cytoskelet .....	10
1. 1. 8 Proteinové pumpy .....	10
1. 1. 9 Kvasinková kultura v kapalném médiu .....	11
1. 1. 10 Buněčný cyklus a rozmnožování kvasinek.....	13
<b>1. 2 Fluorescence.....</b>	<b>14</b>
<b>1. 3 Membránový potenciál a intracelulární pH.....</b>	<b>17</b>
1. 3. 1 Fyzikálně-chemický popis.....	17
1. 3. 2 Metody měření membránového potenciálu.....	18
1. 3. 3 Intracelulární pH .....	19
1. 3. 4 Měření intracelulárního pH.....	19
1. 3. 5 Význam pH pro buňku.....	20
1. 3. 6 Udržování intracelulárního pH .....	20
<b>1. 4 Lipofilní redistribuční sondy .....</b>	<b>21</b>
1. 4. 1 Základní popis .....	21
1. 4. 2 Vliv buněčné stěny a plasmatické membrány.....	23
1. 4. 3 Akumulace sondy v mitochondriích.....	24
1. 4. 4 Vliv MDR pump .....	24
<b>1. 5 Synchronně skenovaná fluorescence .....</b>	<b>24</b>
1. 5. 1 Základní princip metody .....	25
<b>2. Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
<b>2. 1 Chemikálie a materiál .....</b>	<b>27</b>
2. 1. 1 Fluorescenční sondy.....	27
2. 1. 2 Média .....	29
2. 1. 3 Rozpouštědla a další použité látky.....	30
2. 1. 4 Kmeny kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a jejich genetické charakteristiky.....	30
<b>2. 2 Příprava kvasinkových kultur a experimentální postupy.....</b>	<b>30</b>
2. 2. 1 Příprava zásobních kvasinkových kultur .....	30
2. 2. 2 Příprava vzorků pro měření .....	31
2. 2. 3 Měření fluorescence .....	31
<b>3. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>32</b>

<b>3. 1 Spektra fluorescenčních sond .....</b>	<b>32</b>
<b>3. 2 Měření s živými buňkami .....</b>	<b>38</b>
<b>3. 3 Aplikace získaných poznatků .....</b>	<b>42</b>
<b>4 Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura a zdroje .....</b>	<b>49</b>

## Úvod

Jednou ze základních podmínek vzniku a existence života, jak jej známe dnes na planetě Zemi, je existence biologických membrán. Nejenže oddělují vnitřní prostředí buňky od vnějšího a zprostředkovávají komunikaci buňky s okolním světem i transport živin a škodlivých látek, ale díky jejich existenci může vznikat membránový potenciál, který pohání naprostou většinu buněčných pochodů, ať už přímo, nebo zprostředkovaně. Díky rozdílné koncentraci iontů vně a uvnitř membrán jsou živé buňky schopné syntetizovat ATP, zbavovat se škodlivých látek a metabolitů nebo přijímat z okolí živiny. Pomocí gradientu draslíkových a sodíkových iontů vznikají nervové vzruchy v buňkách nervového systému. Nefunguje-li dobře plasmatická membrána, buňka není schopna dlouhodobě přežít a vytvářet membránový potenciál, z toho důvodu je jeho hodnota jedním z nejdůležitějších parametrů buněk.

Existuje mnoho způsobů, jak měřit membránový potenciál a jeho změny, tato práce jej zkoumá pomocí karbocyaninových fluorescenčních sond a snaží se rozšířit použití metody synchronně skenované fluorescence a rozkladu spekter, která je vyvinutá pro barvivo diSC<sub>3</sub>(3), na jiná karbocyaninová barviva.

Jako modelový organismus používáme různé kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, pivovarských kvasinek z říše *Fungi*. Jsou to nejjednodušší eukaryotické buňky, jejich organely jsou však velice podobné organelám buněk vyšších organismů včetně savčích. V roce 1996 se *Saccharomyces cerevisiae* stala prvním eukaryotním organismem, jehož genom byl kompletně osekvenován. Jejich kultivace není náročná časově ani finančně a jejich používání neodporuje etickým zásadám. Některé z kvasinek jsou navíc patogenní, což je další důvod k jejich bližšímu zkoumání, neboť kvasinkové infekce mají významný dopad na kvalitu nejen lidského života. Výše uvedené vlastnosti kvasinek z nich dělají ideální modelové organismy a získané poznatky jsou více či méně použitelné v dalších fázích výzkumu lékařského, farmaceutického, potravinářského či kosmetického.

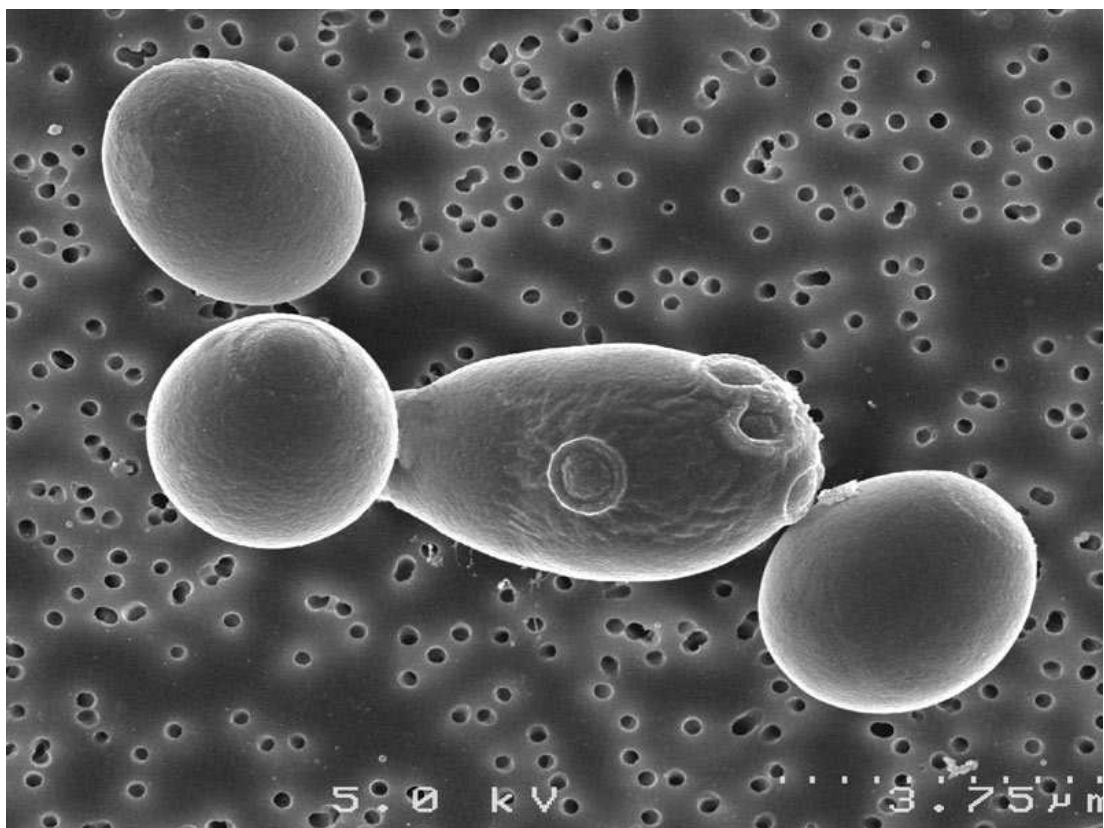


Zároveň však s kvasinkami musíme pracovat citlivě, jako s živými organismy, neboť jak řekl Douglas Adams, anglický spisovatel: „If you try and take a cat apart to see how it works, the first thing you have on your hands is a non-working cat.“

## 1. Teoretická část

### 1. 1 Kvasinková buňka

Kvasinky patří mezi eukaryota. Většinou existují jako jednobuněčné organismy, za jistých podmínek se však mohou vyskytovat i ve formě mycelií či pseudomycelií, a tak existovat i jako mnohobuněčný objekt. Pseudomycelia vytváří například kvasinky rodu *Candida* či *Trichosporon*, pravá mycelia můžeme pozorovat u kvasinek rodu *Saccharomyces*. Tyto útvary kvasinky vytváří zejména kvůli lepšímu využití zdrojů živin a existuje vztah mezi patogenitou a schopností vytvářet mycelia.



Obrázek 1.1: Kvasinky rodu *S. cerevisiae*, u střední buňky můžeme pozorovat několik jizev [1]

### **1. 1. 1 Buněčná stěna**

Na rozdíl od buněk savčích mají kvasinky buněčnou stěnu. Je to struktura o tloušťce 150-400 nm. Hlavní rozdíl mezi buněčnou stěnou kvasinkových a rostlinných buněk spočívá v jejich chemickém složení a v existenci jizev, které vznikají pouze při dělení kvasinek. Struktura a chemické složení buněčné stěny jsou nejlépe známy u *S. cerevisiae*, na které jsou také prováděny všechny experimenty této práce. Všechny následující údaje se proto budou týkat právě této kvasinky.

Buněčná stěna může tvořit až 30 % suché váhy buňky a jejími hlavními složkami jsou polysacharidy a proteiny. Přibližně 60 % hmotnosti buněčné stěny tvoří polymery glukózy – glukany, asi 40 % glykosylované proteiny – mananproteiny, zbývajících několik procent tvoří chitin. Zastoupení jednotlivých složek závisí na kultivačních podmínkách i na růstové fázi.

Glukany jsou složkou, která je zodpovědná za udržení tvaru buňky, v buněčné stěně jsou zpravidla zastoupeny dvěma typy – fibrilárním  $\beta$ -1,3-glukanem a amorfním  $\beta$ -1,6-glukanem. Mananproteiny se vyskytují ve střední vrstvě buněčné stěny a pravděpodobně se podílejí na její struktuře. Jsou často větvené a určují antigenní vlastnosti kvasinek. Chitin je v buněčné stěně zastoupen nerovnoměrně, nachází se zejména v oblasti jizev. Protože jizev v průběhu života buňky přibývá, zvyšuje se i zastoupení chitinu v buněčné stěně. Za specifických podmínek může v buněčné stěně vytvářet síťovitou strukturu a jeho podíl může výrazně vzrůst. Toto nastává například při přechodu buňky z kvasinkové formy na mycelární. Všechny komponenty buněčné stěny jsou navzájem spojeny kovalentními vazbami. Jizvy mají kruhovitý tvar a jsou dobře barvitelné fluorescenčními barvivy. Pravděpodobně během života buňky nemění tvar ani velikost. Pokud kvasinka pučí pokaždé z jiného místa, lze podle počtu jizev určit počet dělení a odhadnout její stáří. [5]

### **1. 1. 2 Cytoplasmatická membrána**

Jako všechny buňky jsou i kvasinky od vnějšího prostředí odděleny cytoplasmatickou membránou. Ta je tvořena lipidovou dvouvrstvou, která se za fyziologických podmínek nachází z větší části v tekutém stavu připomínajícím

kapalné krystaly. V lipidní matrici se nachází řada integrálních i periferních proteinů, které zprostředkovávají přenos živin, metabolitů a iontů přes membránu, katalyzují řadu reakcí a fungují jako receptory, jež předávají buňce signály o stavu vnějšího okolí. Hlavními lipidovými složkami membrán jsou fosfolipidy, sfingolipidy a steroly.

### **1. 1. 3 Jádro**

Jádro je obaleno dvojitou membránou, ve které se nachází ribozomy a jaderné póry, a u některých kvasinek je tak výrazné, že je lze pozorovat ve fázovém mikroskopu. Obsahuje DNA a bílkoviny s ní asociované, genetická informace *S. cerevisiae* se nachází na šestnácti chromozomech.

### **1. 1. 4 Mitochondrie**

Počet a tvar mitochondrií v kvasinkové buňce je podmíněn jejím stářím, fyziologickým stavem a řadou dalších faktorů, jako jsou vnější podmínky či genetické predispozice. U plně respirujících buněk mohou zaujímat i více než 10% celkového objemu buňky, se zvyšující se koncentrací glukózy v okolí klesá potřeba respirace a s ní i počet mitochondrií. Na rozdíl od živočišných buněk mohou kvasinky existovat i s nefunkčními mitochondriemi, tj. mitochondriemi, jimž zcela chybí DNA. Během života buňky mohou fúzovat či tvořit mitochondriální síť. [5]

### **1. 1. 5 Vakuola**

Stejně jako počet, tvar a velikost mitochondrií jsou i charakteristiky vakuol ovlivněny řadou faktorů. Kvasinky ve stacionární fázi mají zpravidla jednu velkou vakuolu, množící se buňky disponují větším počtem menších vakuol. Vnitřní objem vakuoly je ohraničen membránou, kterou označujeme jako tonoplast.

Její funkce nespočívá pouze ve skladování živin, podílí se i na řadě zásadních procesů v buňce. Pomáhá udržovat homeostazi vnitrobuněčného pH a představuje obdobu lysozomů živočišných buněk. [5]

### 1. 1. 6 Peroxisomy

Peroxisomy jsou organely obklopené membránou. Obsahují enzymy potřebné pro řadu reakcí, zejména pak oxidaci různých substrátů jako jsou mastné kyseliny či v některých případech metanol.

### 1. 1. 7 Cytoskelet

Množství základních cytoskeletálních složek, tubulinu a aktinu, je v buňkách *S. cerevisiae* výrazně menší než živočišných buňkách, i přesto se však pro studium charakteristik cytoskeletu *S. cerevisiae* využívá hojně.

Cytoskeletální síť kvasinek obsahuje mikrotubuly, aktinová políčka, filamenta a lamina v jádře. Část mikrotubulů a aktinu je asociována s proteiny. Tyto komponenty hrají svou nezastupitelnou roli v buněčném dělení, pohybech organel a změnách tvaru buňky. Zásadním způsobem také usnadňuje transport látek buňkou.  
[5]

### 1. 1. 8 Proteinové pumpy

Proteinové pumpy se rozdělují do dvou hlavních kategorií v závislosti na způsobu, kterým získávají energii ke své činnosti. Prvním typem jsou primárně aktivní transportéry, které získávají energii hydrolýzou ATP. Ty se řadí do skupiny ABC proteinů – obsahují ATP vazebnou kazetu (**ATP Binding Cassette**).

Druhým typem jsou sekundárně aktivní transportéry, které využívají elektrochemického gradientu. Odstraňují molekuly cizorodých látek a metabolity z cytosolu, zatímco do buněk přenášejí potřebné živiny či kationty. U bakteriálních buněk se vyskytují převážně proteinové pumpy druhého typu, u buněk eukaryotních naopak ABC proteiny. Tyto pumpy mohou být umístěny i na membráně vakuoly, kam v případě potřeby mohou transportovat potenciálně nebezpečné látky, které jsou v ní potom zneškodněny. Samozřejmě potenciálně nebezpečná jsou pro buňky i léčiva a existence podobných obranných mechanismů může značně komplikovat léčbu řady onemocnění. Kvasinky disponují řadou tzv. MDR pump (**multidrug resistance pumps**). Substrátová specifita těchto proteinů je velmi rozsáhlá a

překrývá se, často jsou kromě léků jejich substráty i různé fluorofory, na což je nutné brát při experimentech zřetel.

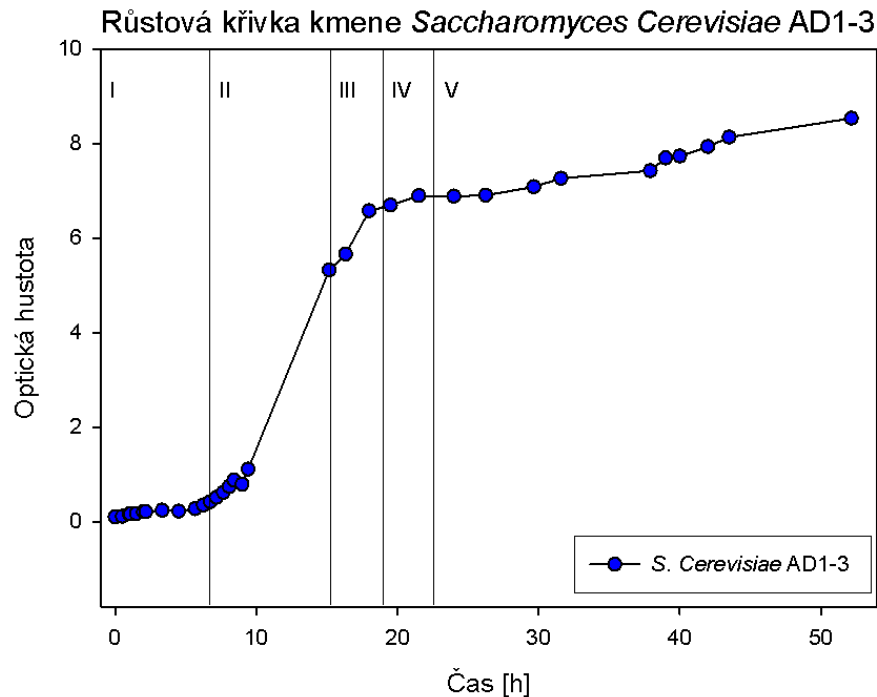
Nejdůležitějšími a nejlépe prostudovanými transportéry typu ABC u *S. cerevisiae* jsou proteiny Pdr5p a Snq2p. [14] Jsou navzájem homologní ve 40% aminokyselin a jejich činnost lze studovat za použití mutantů, u nichž byly geny těchto pump deletovány. [8]

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* AD1-3, který byl používán v průběhu všech měření této práce, má deletované geny pro syntézu třech nejdůležitějších pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p, dovoluje tedy zkoumat rozložení fluorescenční sondy bez zkreslení, které by bylo způsobeno jejím odstraňováním.

### **1. 1. 9 Kvasinková kultura v kapalném médiu**

Růst kvasinkové kultury v kapalném médiu se projevuje zákalem a při statické kultivaci buňky sedimentují na dně nádoby. Kvasinky s větší potřebou kyslíku se rozmnožují na povrchu média a tvoří slizký povlak, tzv. mázdru. V laboratorních podmínkách se kvasinky zpravidla kultivují za stálé teploty v třepacích lázních, čímž se předchází vzniku mázdry nebo sedimentaci.

Růst kvasinkových kultur je charakterizován růstovými křivkami, což je graf závislosti počtu buněk na čase. Existence kultury je rozdělena do několika fází a buňky kultury v různých fázích růstu mají rozdílné charakteristiky, což je nutné při experimentech zohlednit. Buněčná kultura nacházející se v exponenciální fázi je zpravidla citlivější vůči různým podnětům z okolí, a proto může být její použití při mnoha experimentech výhodné.



**Graf 1.1: Růstová křivka *S. cerevisiae* AD1-3.** Jedná se o mutantní kmen, který byl používán v experimentech. Je vidět, že růst kultury lze podle rychlosti přírůstku buněk rozdělit na několik úseků: I – lag fáze, II – exponenciální fáze, III – pozdní exponenciální fáze, IV – diauxická fáze, V – postdiauxická fáze.

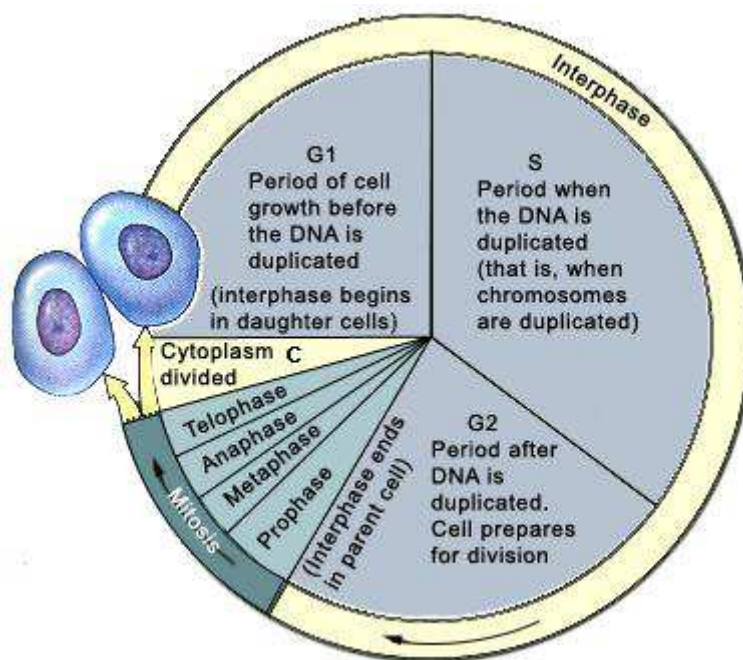
Po přidání buněk do kapalného média s definovaným množstvím glukózy se kultura nachází několik hodin v lag fázi. Během této doby se kvasinky přizpůsobují novému prostředí, shromažďují živiny a připravují se na dělení. Počet buněk kultury se nezvyšuje, zvětšuje se pouze objem jednotlivých buněk. Poté se buňky kultury začnou rychle množit a jejich počet se každé dvě hodiny přibližně zdvojnásobí. Kultura se nachází v exponenciální fázi. Dceřiné buňky jsou menší, neboť nestíhají dorůstat do plné velikosti. V této fázi jsou buňky nejcitlivější vůči různým podnětům z okolí. Doba trvání exponenciální fáze závisí na množství glukózy v médiu. S její snižující se koncentrací se dělení buněk zpomaluje, kultura se krátkou dobu nachází v pozdní exponenciální fázi, po úplném vyčerpání glukózy se dělení buněk zcela zastaví. Tomuto úseku říkáme diauxická fáze. Během několika hodin se kvasinky přizpůsobí svůj metabolismus k využívání méně výhodného zdroje uhlíku, zpracovávají zejména glycerol a etanol. Po této adaptaci kultura začne opět pomalu

růst a tato fáze se nazývá postdiauxická. Po jisté době jsou však vyčerpány i sekundární zdroje uhlíku a růst kultury se opět zastaví – nastává stacionární fáze. Kvasinky se připravují na stres, prodělávají mnohé změny, výrazně se snižuje syntéza proteinů a jejich buněčná stěna tloustne. Pokud buňkám neumožníme přístup k novému využitelnému zdroji uhlíku, jejich počet se vlivem stresu hladověním začne snižovat a nastane fáze odumírání. [5]

### **1. 1. 10 Buněčný cyklus a rozmnožování kvasinek**

Buněčným cyklem nazýváme časový úsek od vzniku buňky po její dělení, tedy úsek mezi dvěma časově nejbližšími děleními. Čas trvání jednoho cyklu nazýváme generační doba. Celý cyklus dělíme do několika interfází a jednotlivé fáze jsou ukončeny kontrolními uzly, jejichž úkolem je ověření, zda je buňka zcela připravena postoupit do další fáze cyklu. Jakmile je zjištěno poškození buňky, pomocí signálních mechanismů dojde buď k pozastavení cyklu, dokud není poškození opraveno, nebo k řízené destrukci buňky, tzv. apoptóze. K apoptóze buněk dochází zejména u vyšších organismů, pro které je dokonalá souhra všech buněk zásadním elementem pro přežití celého společenství.

Buněčný cyklus začíná G1 fází (G = growth). Buňka roste, tvoří proteiny, připravuje zásoby nukleotidů a enzymů pro replikaci DNA. Na konci této fáze se nachází první kontrolní uzel. Postup do S fáze je podmíněn řadou podmínek a nejsou-li splněny, buněčný cyklus se zastaví. Buňka však v tomto okamžiku může zahájit alternativní program, haploidní buňky v blízkosti sexuálního partnera mohou konjugovat, diploidní buňky mohou zahájit sporulaci, a pokud se buňka nachází v prostředí chudém na živiny, může vstoupit do stacionární fáze. Jestliže však vnitřní i vnější podmínky umožňují dělení, buňka vstoupí do S fáze (S = synthesis). V této fázi se replikuje DNA. Po úspěšné replikaci nastává G2 fáze, kdy se zdvojují jednotlivé organely a tvoří se struktury potřebné pro dělení. Poté nastává samotné dělení buňky, M fáze (M = mitosis). Výsledkem jsou dvě funkční buňky o stejném počtu chromozomů. *S. cerevisiae* se dělí nerovnoměrně, to znamená, že velikost mateřské a dceřiné buňky je rozdílná. [5]



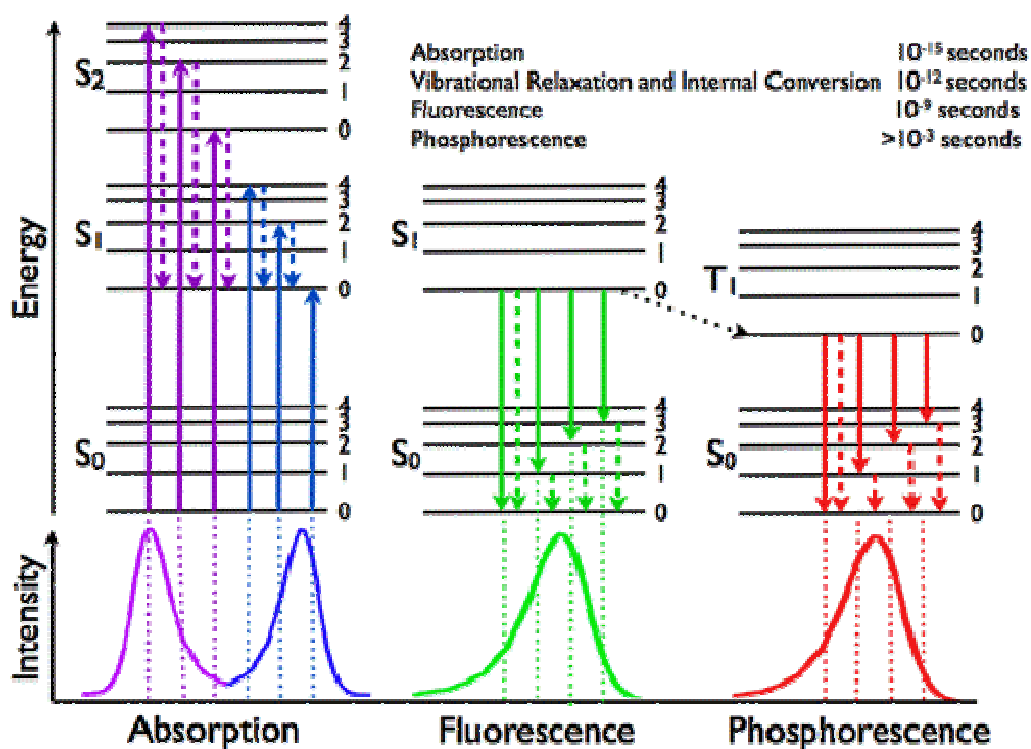
Obrázek 1.2: Schematické znázornění buněčného cyklu eukaryotických buněk. [2]

## 1. 2 Fluorescence

V případě, že vlastní záření tělesa výrazně převažuje nad jeho tepelným zářením, nastává jev zvaný luminiscence. Podstatou tohoto jevu je návrat excitovaných elektronů na jejich základní hladiny a s tím spojené vyzáření přebytečné energie ve formě fotonu.

Luminiscenci můžeme rozdělit na elektroluminiscenci, fotoluminiscenci, radioluminiscenci, chemiluminiscenci či další druhy luminiscence podle zdroje excitační energie. Fluorescence patří mezi fotoluminiscenční záření a je vyvolána buď účinkem jiného dopadajícího záření, nebo proudem dopadajících částic. Pokud vlivem dopadajícího záření dojde k přechodu molekuly z excitovaného stavu do stavu základního, mluvíme o stimulované emisi. Elektronové přechody je možné popsat zjednodušeným schématem – Jablonského diagramem (1.3).





Obrázek 1.3: Jablonského diagram znázorňující fotoluminiscenční děje [3]

Excitující záření je absorbováno velice rychle, střední doba absorpce je přibližně  $10^{-15}$  s. Pokud je látce dodáno víc energie, než potřebuje pro přechod do stavu  $S_1$  (první singletní stav), během  $10^{-12}$  s relaxuje do nejnižšího vibračního stavu  $S_1$ . Z tohoto stavu může fluorofor přejít do jednoho z vibračních stavů hladiny  $S_0$  (základní singletní stav), vyzáří přitom foton, jehož vlnová délka je daná rozdílem jednotlivých energetických hladin. Vyzáření energie tímto způsobem označujeme jako fluorescenci. Střední doba fluorescence je řádově  $10^{-9}$  s. Někdy může molekula přeskočit ze stavu  $S_1$  do stavu  $T_1$  (první tripletní stav). Přechod ze stavu  $T_1$  do stavu  $S_0$  je zakázaný výběrovými pravidly, nazývá se fosforescence a doba života v tomto stavu je tedy velmi dlouhá, zpravidla delší než  $10^{-3}$  s.

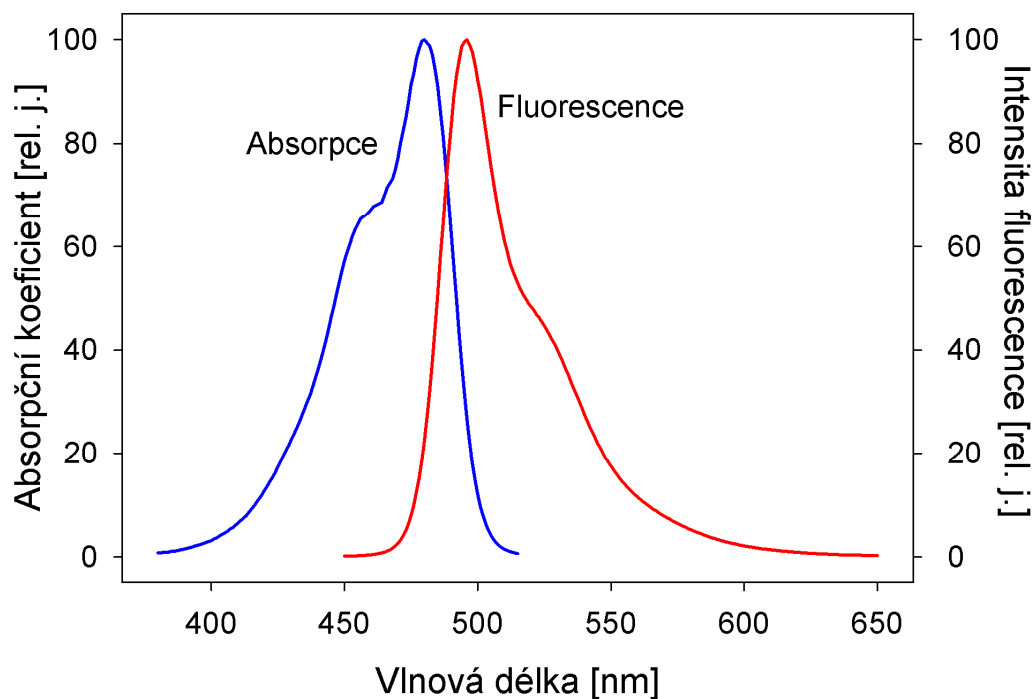
Excitované stavy jsou charakterizovány střední dobou života, kterou lze určit podle vztahu:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_n}, \quad (1)$$

kde  $k_r$  představuje rychlostní konstantu zářivého přechodu  $S_1 \rightarrow S_0$  a  $k_n$  rychlostní konstantu všech nezářivých přechodů. Pro popis fluorescence dále zavádíme její kvantový výtěžek, který je definován následujícím vztahem [9]:

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_n} = k_r \tau. \quad (2)$$

Rozdíl energetických stavů  $S_0$  a  $S_1$  může být ovlivněn různými faktory – pH okolí, chemickým okolím fluoroforu či jinými vlivy. Tato fluorescenční citlivost látek na různé podmínky z některých molekul činí ideální fluorofory.



Obrázek 1.4: Absorpční a emisní spektrum fluoroforu a Stokesův posun.

Pro velké množství fluoroforů platí, že emisní a absorpční spektra jsou zrcadlově symetrická, jak je znázorněno na obrázku 1.4. Je to způsobeno tím, že absorpce i emise z ekvivalentních vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Rozdíl mezi maximy obou spekter nazýváme Stokesův posun.

## 1. 3 Membránový potenciál a intracelulární pH

### 1. 3. 1 Fyzikálně-chemický popis

Veškeré živé buňky jsou od vnějšího prostředí odděleny plasmatickou membránou. Kromě bariérové funkce je jejími dalšími významnými úkoly udržování koncentračního gradientu malých iontů, zejména  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  a  $H^+$ . V důsledku rozdílné koncentrace vniká na obou stranách plasmatické membrány oblišné elektrické potenciály, jejichž rozdíl nazýváme membránový potenciál. Jeho existence je zcela zásadní pro udržení osmotické rovnováhy a slouží také jako zdroj energie k transportu živin do buňky. V chloroplastech a mitochondriích jeho existence umožňuje syntézu ATP, který je energetickým platidlem buňky.

Vznik koncentračního gradientu iontů a tím i membránového potenciálu je umožněn elektrogenními iontovými pumpami. Výslednou hodnotu membránového potenciálu však neurčují tyto pumpy, nýbrž selektivní iontové kanály. Jsou to právě tyto kanály a jejich permeabilita, které nastavují hodnotu klidového potenciálu pomocí ustálených hodnot iontových proudů. Zjednodušenou situaci, kdy uvažujeme pouze jeden typ iontů, lze popsat Nernstovou rovnicí:

$$\Psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[c_o]}{[c_i]}, \quad (3A)$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta,  $T$  termodynamická teplota,  $z$  náboj jednoho iontu,  $F$  Faradayova konstanta a  $[c_{i,o}]$  zastupuje koncentraci iontů vně a uvnitř membrány (in, out). Tato rovnice však popisuje membránu, která je propustná pouze pro jeden typ iontu, což je pro některé případy nedostačující. Membránový potenciál reálné membrány je lépe popsán rovnicí:

$$\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+}[Na_o^+] + P_{K^+}[K_o^+] + P_{Cl^-}[Cl_i^-] + P_{H^+}[H_o^+]}{P_{Na^+}[Na_i^+] + P_{K^+}[K_i^+] + P_{Cl^-}[Cl_o^-] + P_{H^+}[H_i^+]}, \quad (4)$$

kde  $[X_{o,i}]$  jsou koncentrace různých iontů vně a uvnitř membrány a  $P_x$  zastupuje relativní permeabilitu membrány pro daný iont. Tato rovnice ovšem zahrnuje pouze příspěvek pasivních iontových proudů. V reálných případech musíme počítat s tím,

že membránový potenciál se může lišit o příspěvek spojený s činností iontových pump.

### 1. 3. 2 Metody měření membránového potenciálu

Membránový potenciál je jednou z nejdůležitějších charakteristik živých buněk. Lze jej měřit klasickým způsobem, a to pomocí mikroelektrody zapíchnuté do buňky. Tato metoda má však svá mnohá úskalí. Jedním z nich je riziko zkratování buněčné membrány z důvodu nedokonalého kontaktu elektrody a povrchu buňky, dále jsou podobná měření časově náročná a lze takto změřit jen malé množství buněk. Navíc je tato metoda nepoužitelná pro studium buněčných organel, například mitochondrií, kvůli velkému průměru elektrody. Otázkou zůstává, zda stres způsobený znehybněním a samotným měřením nezkrasí výsledky experimentu.

Mnohem vhodnější je tedy použít některou z nepřímých metod měření membránového potenciálu založených na redistribuci malých lipofilních kationtů, které snadno pronikají plasmatickou membránou a akumulují se v buňce tak dlouho, dokud není dosaženo elektrochemické rovnováhy. Rovnovážný stav koncentrací těchto kationtů vně a uvnitř buňky lze popsat Nernstovou rovnicí (3A), kterou je možné přepsat do tvaru:

$$\frac{[c_i]}{[c_o]} = e^{-\frac{zF\Psi}{RT}} . \quad (3B)$$

Jedná se o poměr rovnovážné koncentrace vně a uvnitř buňky. Změna těchto koncentrací by však nebylo pozorovatelná a jejich změření by nebylo možné, kdyby se po interakci sondy se strukturami uvnitř buňky neposunula vlnová délka emitovaného záření. Emisní maximum sond, s kterými v rámci této práce bylo experimentováno, se po navázání na proteiny posunulo v řádu desítek nanometrů směrem k červenému konci spektra. Tento fakt spolu s výrazným zvýšením kvantového výtěžku, ke kterému uvnitř buněk dochází, nám dovoluje provést

rozklad spekter do jednotlivých složek a pomocí jejich poměru určit membránový potenciál.

### 1. 3. 3 Intracelulární pH

Téměř všechny procesy v živých buňkách jsou závislé na pH a mikroorganismy, jako například kvasinky, reagují jeho změnami na extracelulární podmínky. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti umožňují přenášeným signálům velkou rychlost a je možné jím regulovat více procesů najednou. [15] Hodnota pH je definována jako záporný dekadický logaritmus počtu protonů ve vodě. Studujeme-li však komplexní systém, kterým buňka je, tato definice je nedostačující. Nemůžeme totiž cytosol prohlásit za blízky vodě, do hry zde vstupuje řada faktorů, které znemožňují jednoduché určení pH. Intracelulární proteiny disponují velkým množstvím postranních skupin, které mohou být protonovány či deprotonovány, je nutné též počítat s různými metabolity. Například koncentrace anorganického fosfátu  $P_i$  se v kvasinkových buňkách pohybuje kolem 50 mM. [16] Také koncentrace iontů  $HCO_3^-$  v buňkách není zanedbatelná. Tyto látky hrají v živých buňkách nezbytnou úlohu pufru. Náhlý pokles intracelulárního pH způsobí protonaci hydrogenuhličitanových iontů, které se potom rozkládají na vodu a oxid uhličitý. Pokud je pH v buňce neutrální, je většina molekul v buňce ve formě iontů, aby nedocházelo k jejich úniku přes plasmatickou membránu.

### 1. 3. 4 Měření intracelulárního pH

Abychom tedy mohli určit intracelulární pH, je nutné uvážit výše zmíněné problémy a znát relativní protonaci všech slabých kyselin a zásad uvnitř buňky. Dále je nutné zjistit  $pK_a$  všech postranních skupin proteinů. Zde narážíme na další problém, který nám může určení pH zkomplikovat, a tím je terciární struktura proteinů. Hodnoty  $pK_a$  jednotlivých skupin se liší v závislosti na tom, zda je daná aminokyselina na povrchu proteinu, či uvnitř.

Některé z oblíbených metod k určení relativní protonace využívají nukleární magnetickou resonanci, rovnovážné rozložení radioaktivně značených slabých kyselin či fluorescenční sondy citlivé na pH, jako je například C.SNARF-1 nebo

fluorescein. [17] Nevýhodou některých z těchto metod je nezbytnost rozsáhlé manipulace s buňkami, která má nezanedbatelný vliv na intracelulární pH. [18] Dále pak některé metody nemohou určit pH v rámci buňky. Uvážíme-li, jak zásadní význam pro živou buňku má rozdíl pH mitochondrií a cytosolu, tento nedostatek může být poměrně neopomenutelný.

Byla vyvinuta metoda měření intracelulárního pH pomocí fluorescenčního proteinu pHluorinu. Pomocí jednoduché mutace je možné připravit buňky exprimující tento protein. Avšak ani tato metoda není dokonalá – měření je možné provádět pouze v omezeném rozpětí pH a navíc sama produkce pHluorinu může vést ke změnám vnitrobuněčného pH. [19]

### **1. 3. 5 Význam pH pro buňku**

Jak již bylo zmíněno výše, intracelulární pH ovlivňuje celou řadu procesů. Na tomto místě některé z nich alespoň krátce uvedu. Hodnota pH ovlivňuje skládání proteinů, stejně jako aktivitu již složených bílkovin. Většina proteinů je aktivní pouze v úzkém rozmezí pH. Změny pH mohou jejich aktivitu inhibovat, extrémní výkyvy mohou proteiny dokonce denaturovat. Pomocí pH může tedy buňka regulovat signální kaskády či syntézu proteinů. [15]

Změny pH ovlivňují také interakce mezi polárními hlavičkami fosfolipidů, a tím i formování lipidových struktur a jejich interakce. Transport proteinů z endoplasmatického retikula závisí přímo na gradientu pH. V neposlední řadě je třeba zmínit nezanedbatelný podíl vodíkových iontů na celkovou velikost membránového potenciálu.

### **1. 3. 6 Udržování intracelulárního pH**

Kvasinkové buňky se snaží udržovat neutrální pH různými způsoby. Nejdůležitější z nich je čerpání protonů  $H^+$ -ATPázami.  $H^+$ -ATPáza je jeden z nejvíce exprimovaných transmembránových proteinů. Jeho produkce závisí na množství dostupných zdrojů uhlíku. Kromě  $H^+$ -ATPázy v plasmatické membráně se na homeostáze podílí také vakuolární  $H^+$ -ATPáza (V-ATPáza). Ta jednak pomáhá čerpáním protonů udržovat vnitrobuněčné pH, ale také na vakuolární membráně

buduje napětí, které slouží k pohánění dalších procesů. Kvasinky, jejichž geny pro syntézu V-ATPázy byly deletovány, byly sice životaschopné, avšak pouze v prostředí o pH 3 – 7. Divoký kmen *S. cerevisiae* je schopný růst v rozsahu pH 2,5 – 8,5. Mutantní kmen také vykazoval odlišný fenotyp v jiných znacích, byl například citlivější na koncentraci vápenatých iontů. Minoritní podíl na udržování homeostáze má také Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter. [15]

## 1. 4 Lipofilní redistribuční sondy

### 1. 4. 1 Základní popis

Standardní interpretace vztahu membránového potenciálu a množství akumulované látky je založena na předpokladu, že její rovnovážné koncentrace vně a uvnitř buňky podléhají Nernstově rovnici (3B). V běžných experimentech založených na prostém monitorování intensity fluorescence sondy však samotná Nernstova rovnice nemůže dostatečně kvantifikovat fluorescenční odezvu sondy na změny membránového potenciálu, navíc takové experimenty potom vyžadují těžkopádnou kalibraci. Jeden z oblíbených postupů například spoléhá na kalibrační křivky získané z buněčných suspenzí kultivovaných v přítomnosti valinomycinu za rozdílné koncentrace iontů K<sup>+</sup>.

Jak tedy dostatečně přesně popsat systém buňky, aby bylo možné využít fluorescenčních sond pro určení velikosti membránového potenciálu? Jedním z klíčových předpokladů je dostatečně nízká koncentrace sondy, aby bylo možné předpokládat, že koncentrace jejích molekul vázaných na proteiny v cytosolu je přímo úměrná koncentraci sondy volné. Dále je nezbytné, aby měřená buněčná suspenze byla řídká, potom je celkový buněk zanedbatelný oproti celému objemu suspenze, a tudíž je zanedbatelný i fluorescenci volné sondy v cytosolu vzhledem k fluorescenci volné sondy v médiu. Experimenty provedené s fluorescenční sondou diSC<sub>3</sub>(3) ukázaly, že intenzita její fluorescence se v přítomnosti intracelulárních objektů několikanásobně zvyšuje a její emisní maximum se posouvá k červenému konci spektra.

Dále předpokládáme, že všechna vazebná místa v cytosolu jsou identická s asociační konstantou  $K_a$  a jejich množství  $n[P]_0$  odpovídá koncentraci proteinů ve vzorku  $[P]_0$ . Vztah mezi rovnovážnou celkovou koncentrací sondy uvnitř buňky  $c_{in}$  a vázanou  $c_{bound}$  může být v tomto zjednodušeném modelu popsán vztahem:

$$K_a = \frac{c_{bound}}{c_{in}(n[P]_0 - c_{bound})}. \quad (5A)$$

Jestliže množství přidaného fluoroforu je dostatečně malé, aby platilo, že  $n[P]_0 \gg c_{bound}$ , je možné vztah (5A) zjednodušit na tvar:

$$\frac{c_{bound}}{c_{in}} = n[P]_0 K_a. \quad (5B)$$

Nezbytným požadavkem umožňujícím převedení naměřených spekter na změny membránového potenciálu je tedy přímá úměrnost mezi  $c_{bound}$  a  $c_{in}$ . Potom může být poměr mezi nernstovskou a nenernstovskou akumulací popsán koeficientem  $k_b$ , který zastupuje průměrnou vazebnou kapacitu zkoumaných buněk. Použitím tohoto koeficientu obdržíme následující vztah pro koncentraci vázané sondy  $c_{bound}$ :

$$c_{bound} = k_b c_{in}. \quad (6)$$

Vztah (3B) můžeme potom upravit do tvaru:

$$c_{bound} = k_b c_{out} e^{\frac{F\Delta\Psi}{RT}}, \quad (7)$$

což nám umožňuje vztáhnout naměřená spektra k membránovému potenciálu buněk.

Po odečtení fluorescence pozadí od naměřených dat obdržíme spektrum, které se skládá ze čtyř složek: (i) fluorescence volné sondy v médiu, (ii) fluorescence sondy navázané na povrch buněk, (iii) fluorescence sondy navázané na intracelulární proteiny a (iv) fluorescence volné sondy v cytosolu. Ve správně navržených



experimentech můžeme zanedbat fluorescenci volné sondy v cytosolu, pokud je objem buněk vzhledem k celkovému objemu vzorku malý, a s vázanou sondou potom pracujeme podle vztahu (7). Množství sondy navázané na povrch buňky je také zanedbatelné vzhledem k celkovému množství fluoroforu navázaného na intracelulární proteiny, tento fakt byl demonstrován pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy zkoumané buňky nevykazovaly žádný zřetelný okraj. Důsledkem těchto přiblížení můžeme vztáhnout intenzitu zbývajících dvou složek (i) a (iii) přímo ke koncentracím fluoroforu vně a uvnitř buňky. [4]

Naměřené spektrum je potom lineární kombinací dvou nezávislých složek, a to fluorescence sondy vně a uvnitř buňky, poměr těchto referenčních spekter je zjištěna metodou pokus-omyl, a to pomocí optimalizace, která je založena na odečítání spektra volné sondy od spekter sondy v různých roztocích proteinu nebo buněčných suspenzí různé koncentrace. Po získání modelových spekter jej lze do těchto komponent rozložit podle vztahu:

$$F(\lambda) = AF_F(\lambda) + BF_B(\lambda), \quad (8)$$

kde  $F_F$  je spektrum volné a  $F_B$  spektrum vázané sondy,  $A$  a  $B$  označují koeficienty zastoupení jednotlivých složek v celkovém spektru. Před samotným rozkladem do jednotlivých složek je však nezbytné od změřeného spektra odečíst autofluorescenci vzorku změřenou před přidáním fluoroforu, která musí být měřena zvlášť pro každý vzorek.

#### **1. 4. 2 Vliv buněčné stěny a plasmatické membrány**

Jistou nepřesnost do experimentů může vnést akumulace kladně nabitě sondy v záporně nabitých buněčných stěnách. Tento příspěvek, ač malý, nemusí být vždy zanedbatelný a někdy je třeba provést příslušné korekce. Vlivem potenciálu buněčné stěny, Donnanova potenciálu, se z membránového potenciálu stává efektivní membránový potenciál, na němž má pravděpodobně nezanedbatelný podíl negativní náboj plasmatické membrány a buněčné stěny. Tento fakt je i přes

svou důležitost často opomíjen, může se však projevit, pokud jsou při experimentech používány různé pufrů. Potenciál buněčné membrány je extrémně citlivý na iontovou sílu média, v kterém jsou buňky uchovávány, nicméně pokud udržujeme iontovou sílu konstantní po celou dobu experimentu, příspěvek k celkovému membránovému potenciálu se nemění. [4]

#### **1. 4. 3 Akumulace sondy v mitochondriích**

Po vstupu do buňky se sonda může dále redistribuovat i do mitochondrií. Ačkoliv je jejich objem vzhledem k celkovému objemu malý, jejich příspěvek k celkové fluorescenci vázané sondy je nezanedbatelný z důvodu jejich vysokého membránového potenciálu. To je dalším důvodem, proč je nutné při experimentech dbát na dostatečně nízkou koncentraci sondy – je třeba zabránit jejímu zhášení v důsledku tvoření agregátů uvnitř mitochondrií a dále je nutné, aby v nich nedocházelo k nenernstovkové akumulaci. Nicméně za předpokladu, že během experimentu se nemění počet mitochondrií ani jejich membránový potenciál, není třeba aplikovat žádné složité korekce. Tento jev lze také zásadně omezit používáním fermentujících buněk, jejichž mitochondrie jsou výrazně méně aktivní. [4]

#### **1. 4. 4 Vliv MDR pump**

Ke každé sondě citlivé na membránový potenciál je třeba přistupovat jako k možnému substrátu MDR pump. Tento fakt je třeba mít na paměti zejména tehdy, pracujeme-li s buňkami, jejichž geny pro syntézu MDR pump nebyly deletovány, nebo funkce samotných pump nebyla inhibována jinak. Bohužel jejich činnost není ještě zcela prozkoumána. [4]

### **1. 5 Synchronně skenovaná fluorescence**

Metoda synchronně skenované fluorescence spočívá v udržování konstantního rozdílu mezi excitační a emisní vlnovou délkou. Byla vyvinuta za účelem zvýšení selektivity luminiscenční spektroskopie. Má řadu výhod včetně zúžení spektrálních pásů nebo snížení doby akvizice.

I když tradiční metody fluorescenční spektroskopie mají vysokou citlivost, v případě experimentů na komplexnějších vzorcích narážejí na problém

neuspokojivé interpretace naměřených dat. Biofyzikální měření, stejně jako analýza neznámých látek, která mohou být potenciálními xenobiotiky, však na spektroskopická měření z velké části spoléhají. Poprvé byla tato metoda aplikována na ropné oleje a polycyklické aromatické uhlovodíky [6].

### 1. 5. 1 Základní princip metody

V konvenční fluorescenční spektroskopii získáváme emisní spektra, jestliže monitorujeme emisní vlnovou délku  $\lambda_{em}$ , zatímco excitační vlnová délka  $\lambda_{exc}$  zůstává konstantní. Obdobným způsobem je možné získat excitační spektra, v tomto případě naopak měníme excitační vlnovou délku  $\lambda_{exc}$  a sledujeme intenzitu konstantní emisní vlnové délky  $\lambda_{em}$ . Synchronně skenovaná fluorescence oba tyto způsoby elegantním způsobem kombinuje a mění současně emisní i excitační vlnovou délku, přičemž rozdíl mezi  $\lambda_{em}$  a  $\lambda_{exc}$  zůstává konstantní. Na první pohled by se mohlo zdát, že neustálé změny excitační energie jsou víc než nežádoucí, nicméně tomu tak není.

Uvažujme fluoreskující vzorek excitovaný zářením dané vlnové délky  $\lambda'$  a  $E_M(\lambda)$ , které je jeho emisním spektrem. Zaznamenaný fluorescenční signál na dané vlnové délce  $\lambda$  o intenzitě  $I_\lambda$ , která závisí na  $E_M(\lambda)$ , je také přímo úměrný spektrálnímu vyzařování  $R_{\lambda'}$ , které je emitováno při excitaci vlnovou délkou  $\lambda'$ :

$$I(\lambda) = kR_{\lambda'}E_M(\lambda), \quad (9)$$

kde  $k$  je vhodná konstanta. Uvážíme-li platnost známého Lambert-Beerova zákona pro dostatečně řídké vzorky, můžeme  $R_{\lambda'}$  vyjádřit ve tvaru:

$$R_{\lambda'} = k'Y_L(\lambda')I_0(\lambda')\varepsilon(\lambda')[c]d, \quad (10)$$

kde  $Y_L$  je kvantový výtěžek fluorescence,  $I_0$  intenzita excitačního záření,  $\varepsilon$  molární extinkční koeficient,  $[c]$  koncentrace vzorku,  $d$  tloušťka vzorku a  $k'$  experimentálně získaná konstanta. Měřené excitační spektrum  $E_X(\lambda')$  je přímo úměrné veličinám závislým pouze na vlnové délce  $\lambda'$ :

$$E_X(\lambda') = k''Y_L(\lambda')I_0(\lambda')\varepsilon(\lambda'), \quad (11)$$

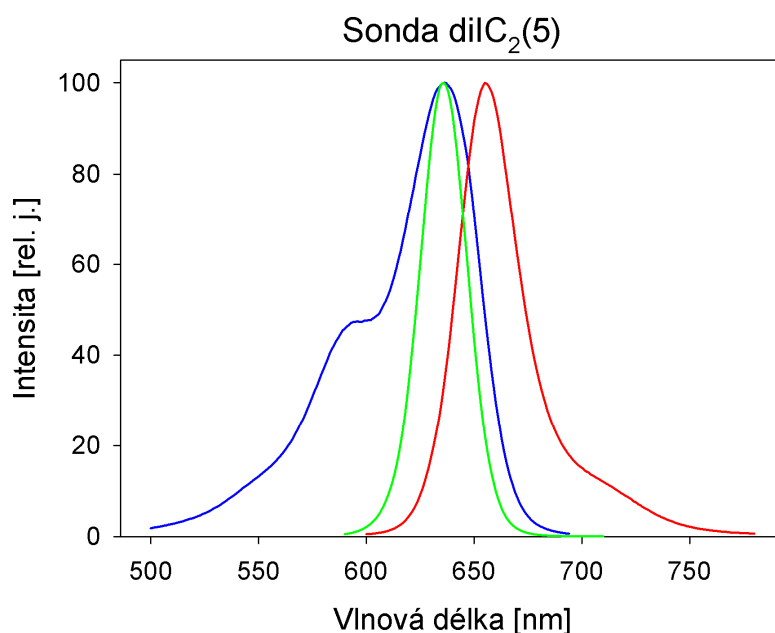
kde  $k''$  je konstanta. Zkombinováním vztahů (9), (10) a (11) získáme vztah pro intenzitu synchronní fluorescence  $I_S$  jako funkci  $\lambda$  a  $\lambda'$ :

$$I_S(\lambda', \lambda) = K[c]dE_X(\lambda')E_M(\lambda), \quad (12A)$$

přičemž  $K=k.k'.k''^{-1}$ . Důležitou podmínkou je konstantní rozdíl  $\lambda$  a  $\lambda'$ . Tento vztah lze vyjádřit výmluvnějším způsobem jako:

$$I_S(\lambda', \lambda) = K[c]dE_X(\lambda - \Delta\lambda)E_M(\lambda). \quad (12B)$$

Pokud je navíc rozdíl  $\Delta\lambda$  (offset) roven Stokesovu posunu, výsledkem měření je jediný úzký pás, který je mnohem intenzivnější než samotné excitační či emisní spektrum (obrázek 1.5). Ze vztahu (12B) je totiž zřejmé, že synchronně skenovaná fluorescence je jejich součinem. [7] Excitační záření zde hraje roli multiplikativního parametru emisního záření. Vhodnou volbou parametru  $\Delta\lambda$  je možné zvýšit selektivitu a potlačit nežádoucí artefakty včetně autofluorescence vzorku.



Obrázek 1.5: Porovnání normovaných spekter sondy dilC<sub>2</sub>(5). Na grafu vidíme excitační spektrum (modré), emisní spektrum (červené) a synchronní (zelené). Offset při měření synchronního spektra byl nastaven na hodnotu 15 nm, což je velikost Stokesova posunu.

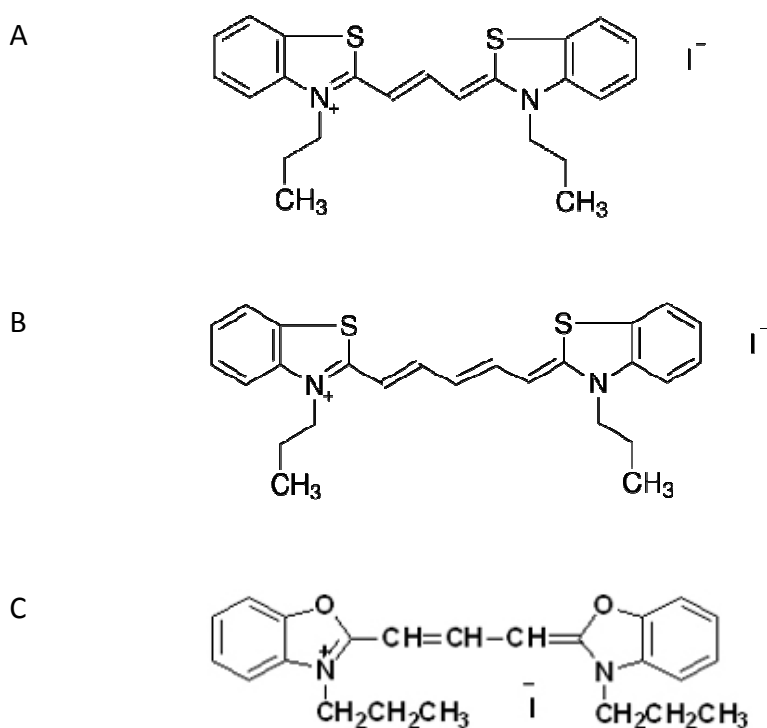
Metoda synchronně skenované fluorescence selhává pouze v případě, je-li ve zkoumané oblasti slabý signál  $E_x(\lambda')$  a zároveň i  $E_M(\lambda')$ . Avšak i v případě velice komplexních vzorků je možné změnou rozdílu  $\lambda$  a  $\lambda'$  z celého spektra vybírat pouze určité úseky, přičemž signál z ostatních oblastí je potlačen. [6]

## 2. Materiál a metody

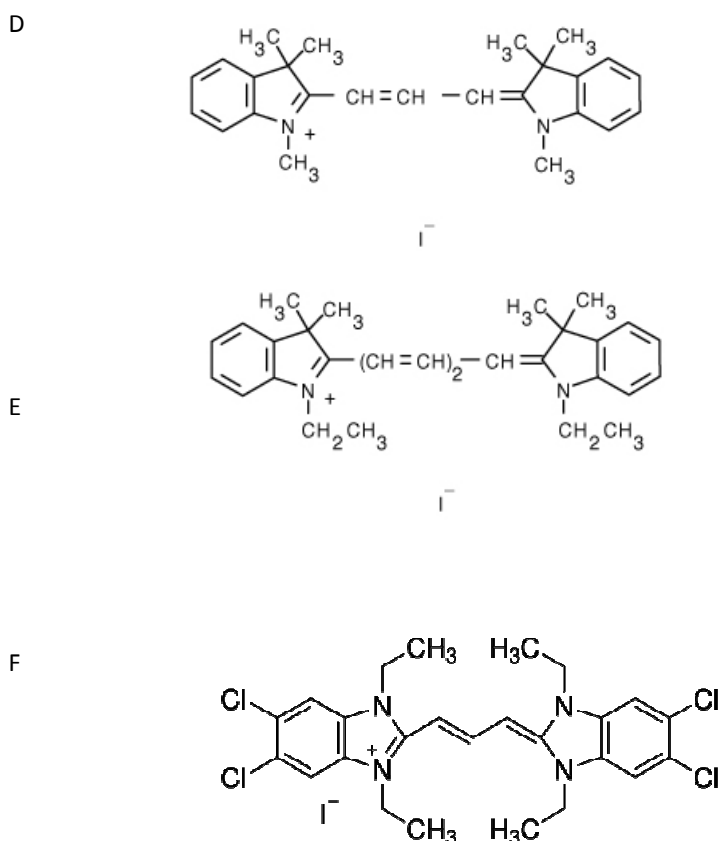
### 2. 1 Chemikálie a materiál

#### 2. 1. 1 Fluorescenční sondy

V rámci této práce jsme pracovali s následujícími fluorofory: diSC<sub>3</sub>(3), diSC<sub>3</sub>(5), diIC<sub>1</sub>(3), diIC<sub>2</sub>(5), diOC<sub>3</sub>(3) a JC-1.



Obrázek 2.1: Strukturní vzorce fluorescenčních sond: A) DiSC<sub>3</sub>(3) [12], B) DiSC<sub>3</sub>(5) [12], DiOC<sub>3</sub>(3) [13]



Obrázek 2.1: Strukturální vzorce fluorescenčních sond: D) DiIC<sub>1</sub>(3), E) DiIC<sub>2</sub>(5), F) JC-1 [12].

Barviva DiI, DiO, DiS, DiD a DiR, jak je můžeme pro jednoduchost nazývat, jsou malé lipofilní kationty, které patří do skupiny tzv. redistribučních fluorescenčních sond membránového potenciálu. Fluorescence těchto na prostředí citlivých barviv se výrazně zvyšuje, když se inkorporují do membrán nebo se naváží na proteiny uvnitř buňky, přičemž ve vodním prostředí fluoreskují relativně slabě. Jejich extinkční koeficienty jsou vysoké a fluorescence závisí na polaritě prostředí, v okolí proteinů se vlnová délka jejich emisního maxima zpravidla posouvá k červenému konci spektra. Jakmile jsou přidány k buněčné suspenzi, difundují dovnitř buněk a po jisté době se ustanoví rovnováha podle Nernstovy rovnice (1B) v závislosti na velikosti membránového potenciálu a činnosti proteinových pump, pokud jsou v plasmatické membráně buněk přítomny. [11] Fluorofory, které byly v rámci této práce studovány, jsou popsány v tabulce 2.1 níže.

Tabulka 2.1: Přehled použitých fluoroforů

Označení	Systematický název	M[g.mol <sup>-1</sup> ]	Dodavatel
diSC <sub>3</sub> (3)	3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide	520	Sigma-Aldrich
diSC <sub>3</sub> (5)	3,3'-dipropylthiadibocarbocyanine iodide	547	Sigma-Aldrich
diiC <sub>1</sub> (3)	1,1',3,3',3'-hexamethylindocarbocyanine iodide	484	Molecular Probes, INC
diiC <sub>2</sub> (5)	1,1'-diethyl-3,3',3'-indodicarbocyanine iodide	538	Molecular Probes, INC
diOC <sub>3</sub> (3)	3,3'-dipropylloxacarbocyanine iodide	488	Molecular Probes, INC
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidocarbocyanine iodide	652	Molecular Probes, INC

## 2. 1. 2 Média

V průběhu experimentů byla použita řada kultivačních médií, která byla připravena způsobem popsáným v tabulce 2.2.

Tabulka 2.2: Použitá média a pufrы

### YPD agar 1%

kvasničný extrakt	10 g
Pepton	10 g
agar	10 g
glukóza	10 g
destilovaná voda	1000 ml

### YP kultivační médium

kvasničný extrakt	10 g
pepton	10 g
destilovaná voda	1000 ml

### 25mM MES-TEA pufr – pH 6,2\*

MES	2,44 g
TEA	2,5 ml
destilovaná voda	500 ml

\*V případě potřeby nižšího pH byl takto připravený pufr titrován HCl, v opačném případě jsme jej titrovali TEA, dokud nebylo dosaženo dané hodnoty pH.

### 2. 1. 3 Rozpouštědla a další použité látky

Tabulka 2.3: Další použité látky

Název	Dodavatel
Kvasničný extrakt	Serva
Pepton	Oxoid
Agar	RNDr. Jan Kulich s.r.o.
D-glukóza bezvodá	PENTA
MES hydrát	Sigma-Aldrich
TEA (triethanolamin)	Sigma-Aldrich
Etanol pro UV spektroskopii	Lach-Ner
Destilovaná voda	
Bovine Albumin	
FK506	

\*nebo také tacrolimus, fujimycin; 10 mM roztok v etanolu pro UV spektroskopii

### 2. 1. 4 Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a jejich genetické charakteristiky

Tabulka 2.4: Přehled použitých kmenů *S. cerevisiae*

Kmen	Genotyp	Důsledek
AD12	MATa, PDR1-3, ura3, his1, yor1D::hisG, snqSD::hisG	nadprodukce pumpy Pdr5p
AD1-3	MATa, PDR1-3, ura3, his1, yor1D::hisG, snqSD::hisG, pdr5D::hisG	deletované pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p
US50-18C	MATa, PDR1-3, ura3, his1	nadprodukce pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p

## 2. 2 Příprava kvasinkových kultur a experimentální postupy

### 2. 2. 1 Příprava zásobních kvasinkových kultur

Buněčné kultury jsou uchovávány při teplotě -80°C v médiu obsahujícím 60 g glycerolu, 10 g glukózy, 2 g peptonu a 1 g kvasničného extraktu na 100 ml média. Poté jsou sterilní kličkou přeneseny na misku s 1% YPD agarem a 48 hodin kultivovány v inkubátoru při teplotě 30°C. Takto připravené misky s kvasinkovými kulturami jsou uchovávány při teplotě 4°C maximálně po dobu třiceti dnů.



## **2. 2. 2 Příprava vzorků pro měření**

Do 10 ml YPD média s 2% glukózou bylo pomocí sterilní kličky přeneseno malé množství zásobní kvasinkové kultury. Buňky byly kultivovány v třepací lázni při teplotě 30°C po dobu 24 hodin.

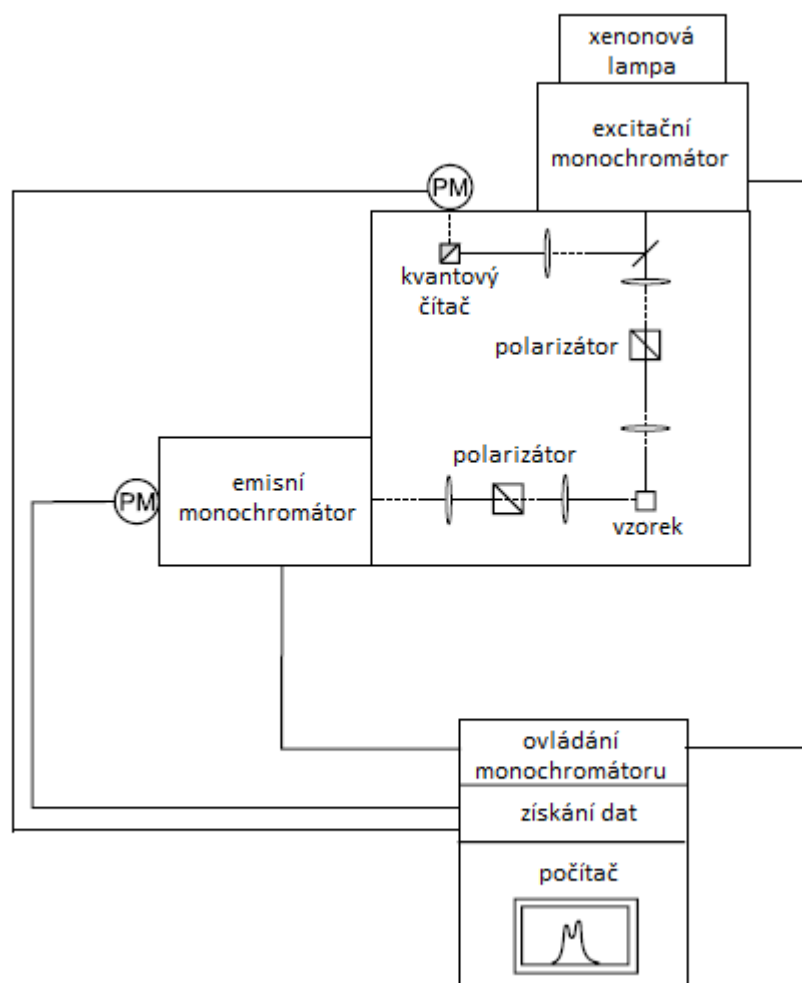
V závislosti na hustotě buněk v takto vzniklém inokulu bylo jeho malé množství přeočkováno do čerstvého YPD média a buňky byly kultivovány v třepací lázni při teplotě 30°C, dokud kultura nedosáhla požadované fáze. Pro experimenty této práce jsme používali buňky v exponenciální fázi růstu.

Po změření optické hustoty byly buňky dvakrát centrifugovány na centrifuze Megafuge 1.0 Heraeus Instruments a resuspendovány v MES-TEA pufru o pH 6,2. Poté bylo malé množství buněčné suspenze přidáno do 3 ml MES-TEA pufru či vody v kyvetě tak, aby výsledná optická hustota byla 0,1. Tato veličina byla měřena pomocí spektrometru Novaspec 2 při vlnové délce 578 nm. V případě některých experimentů byl použit přístroj Novaspec 3, a tehdy bylo nutné zjištěnou optickou hustotu dělit koeficientem 2,55.

## **2. 2. 3 Měření fluorescence**

Všechna fluorescenční měření byla prováděna pomocí spektrofluorimetru Fluoromax 3. Zdrojem excitačního záření byla xenonová lampa emitující záření vhodné pro měření v rozsahu přibližně 200 – 800 nm.

Záření prochází nejprve excitačním monochromátorem, který z něj vybírá vhodnou excitační vlnovou délku. Následně záření dopadá na kyvetu se vzorkem. Fluorescence je zaznamenávána ve směru kolmém na směr šíření excitačního záření. Poté, co fluorescenční záření projde emisním monochromátorem, je jeho intenzita změřena pomocí fotonásobiče. Monochromátory jsou ovládány počítačem, což umožňuje automatické skenování vlnových délek.



Obrázek 2.1 : Schéma spektrofluorimetru [9]

Před každým měřením byla provedena kalibrace přístroje podle spektra xenonové výbojky, která má na vlnové délce 467 nm emisní maximum. Byl měřen také Rayleighův rozptyl vody, jehož maximum se nachází na vlnové délce 550 nm.

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Spektra fluorescenčních sond

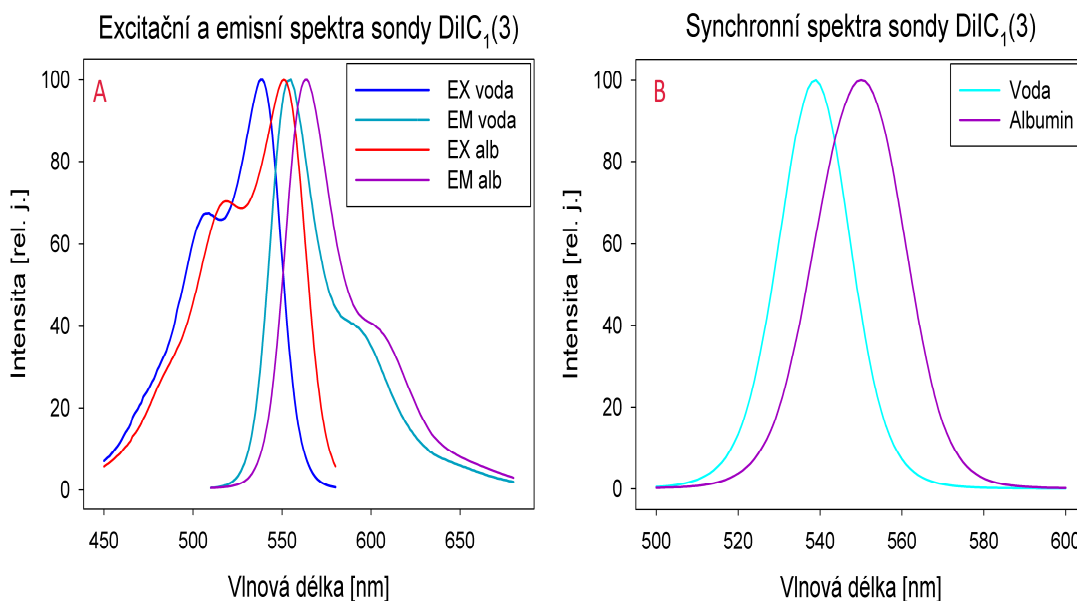
Petra Matunová v rámci své bakalářské práce zkoumala charakteristiky sondy diSC<sub>3</sub>(5). [10] Naměřila emisní a excitační spektra tohoto fluoroforu a zjistila

modelová spektra, pomocí kterých je možné rozložit experimentální data podle vztahu (8), jak je popsáno v kapitole 1. 4. 1. Tyto výsledky jsme v rámci diplomové práce ověřili.

Poté jsem změřila emisní a excitační spektra několika dalších sond, aby bylo možné z nich vybrat nejvhodnější fluorofory pro další experimenty. Jelikož při interakci karbocyaninových barviv s albuminem se pozorují podobné spektrální změny jako po interakci s cytosolem po vstupu těchto barviv do buněk, při tipování vhodných barviv jsme prováděli pouze měření spekter vybraných barviv ve vodných roztocích a v roztocích albuminu. Při práci s albuminem je při vhodných koncentracích roztoků zaručený vysoký a dobře definovaný poměr mezi vázanou a volnou sondou. Naproti tomu v případě buněčných suspenzí tento poměr závisí i na fyziologickém stavu buněk, což je při prostém testování spektrálních vlastností barviv zbytečná technická komplikace.

První zkoumanou sondou byla sonda  $\text{DiIC}_1(3)$ . 4  $\mu\text{M}$  fluorofor ve vodě a v 2% roztoku albuminu byl excitován zářením o vlnové délce 490 nm. Bylo změřeno, že emisní maximum sondy  $\text{DiIC}_1(3)$  ve vodě se nachází na hodnotě 553 nm, v albuminu se tato hodnota posouvá na 564 nm.

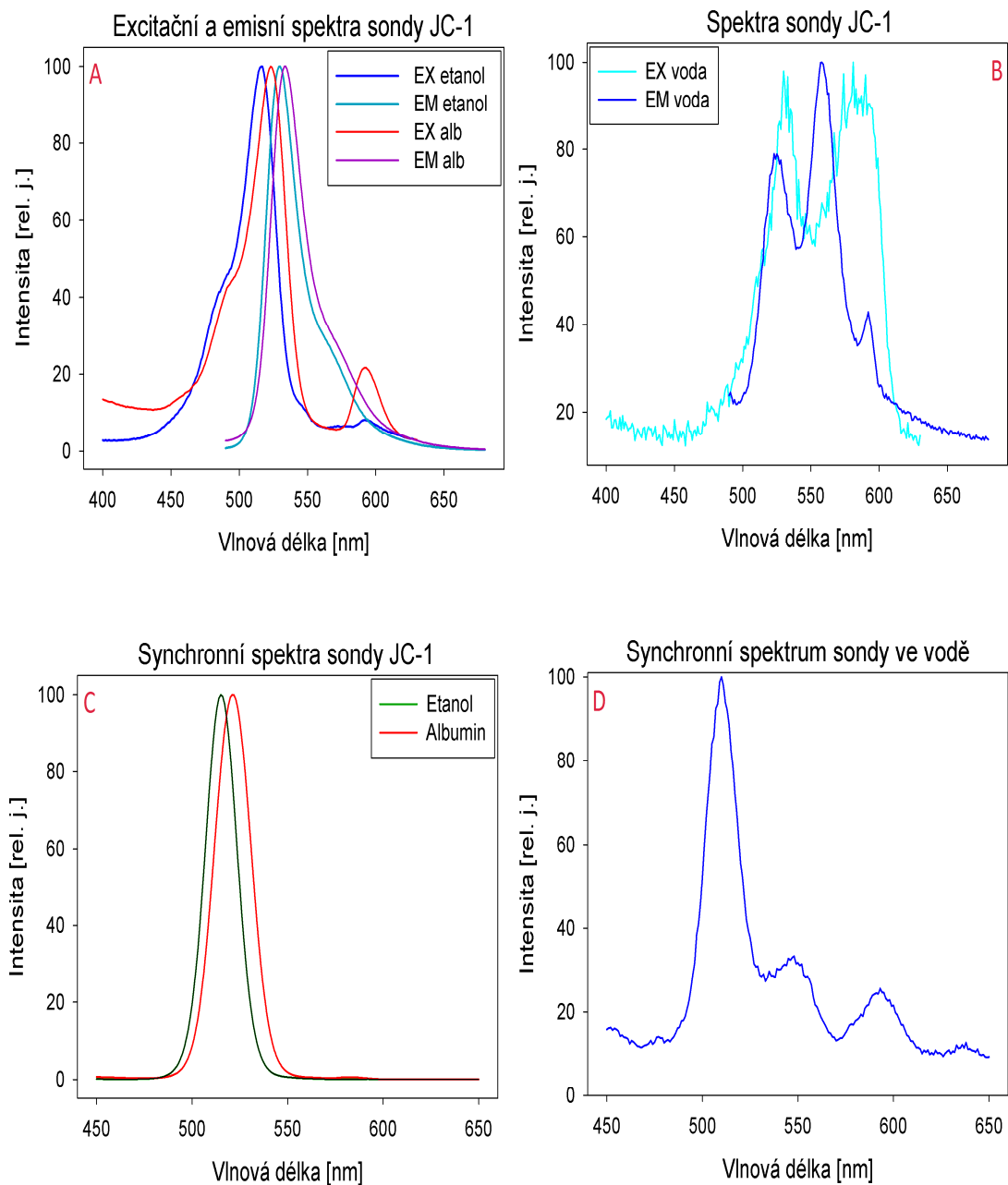
Poté bylo měřeno excitační spektrum, přičemž sledována byla emise záření vlnové délky 600 nm. Excitační maximum volné sondy se nachází na hodnotě 538 nm, vázané na 551 nm.



**Graf 3.1: Emisní, excitační a synchronní spektra fluorescenční sondy DiIC<sub>1</sub>(3).** Emisní a excitační spektra 4  $\mu$ M roztoku sondy DiIC<sub>1</sub>(3) byla měřena ve vodě (— a —, graf 3.1A), poté v roztoku 2% albuminu (— a —, graf 3.1A). Následně byla změřena synchronní spektra ve vodě i v roztoku albuminu (— a —, graf 3.1B).

Stokesův posun tedy činí 15 nm, tato hodnota byla také nastavena jako offset, konstantní rozdíl mezi vlnovou délkou emise a excitace, pro měření synchronních spekter. Z grafu 3.1B je patrný dostatečný rozdíl mezi spektry volného a vázaného fluoroforu. Sonda má také dostatečný kvantový výtěžek ve vodě i v roztoku 2% albuminu, což ji činí vhodným kandidátem pro další experimenty. I kratší doba akvizice nám dovoluje získat dobře interpretovatelná data a rozdíl mezi emisním maximem volné a vázané sondy je srovnatelný s rozdílem emisních maxim již používaného fluoroforu DiSC<sub>3</sub>(3).

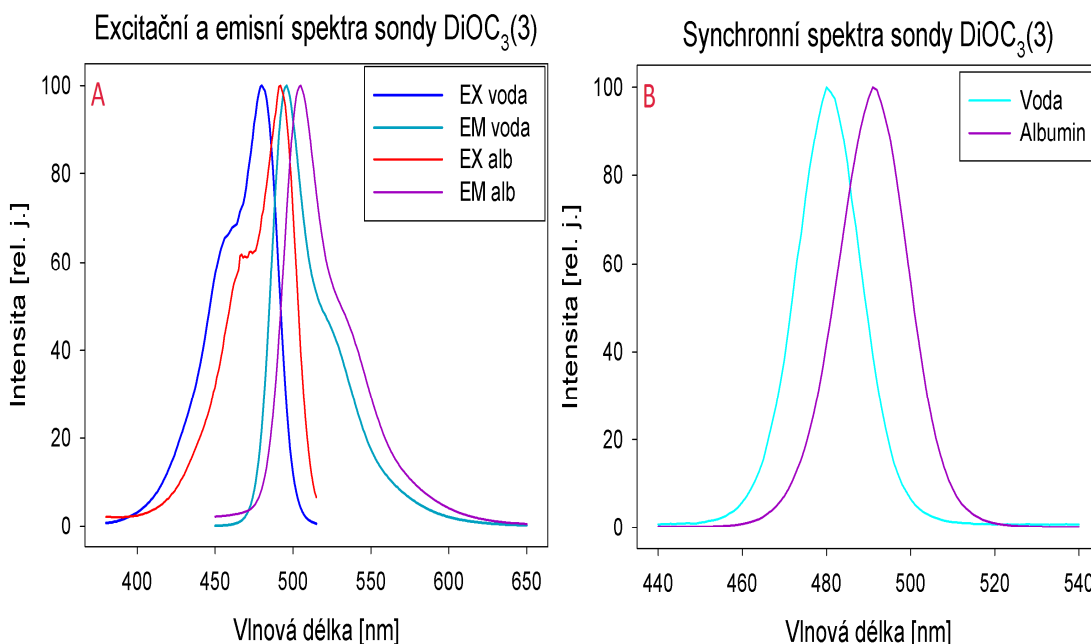
Další zkoumanou sondou byla JC-1. V grafu 3.2A je možné sledovat druhý excitační pás o nižší energii, je důsledkem tvoření agregátů sondy v polárním prostředí. Této vlastnosti sondy JC-1 se využívá při měření membránového potenciálu mitochondrií, kdy je zjišťován poměr intenzit obou pásů, my se však tímto způsobem zabývat nebudeme.



**Graf 3.2: Emisní, excitační a synchronní spektra fluorescenční sondy JC-1.** Emisní a excitační spektra 4  $\mu$ M roztoku sondy JC-1 byla měřena v etanolu (— a —, graf 3.2A), v 2% roztoku albuminu (— a —, graf 3.2A) a ve vodě (— a —, graf 3.2B). Následně byla změřena synchronní spektra v etanolu, v 2% roztoku albuminu (— a —, graf 3.2C) a ve vodě (—, graf 3.2D).

Pro měření synchronních spekter byl poté zvolen offset 15 nm. V grafu 3.2C jsou vykreslena spektra sondy v etanolu a v roztoku albuminu, v grafu 3.2D ve vodě.

Poměr signálu a šumu synchronních spekter změřených ve vodném prostředí při dostatečně krátké době akvizice by však byl nevýhodný. Spektra sondy v etanolu by byla dobře zpracovatelná, nicméně etanol ve vyšších koncentracích je pro buňky toxický, a proto s touto sondou nebudeme dále pracovat.



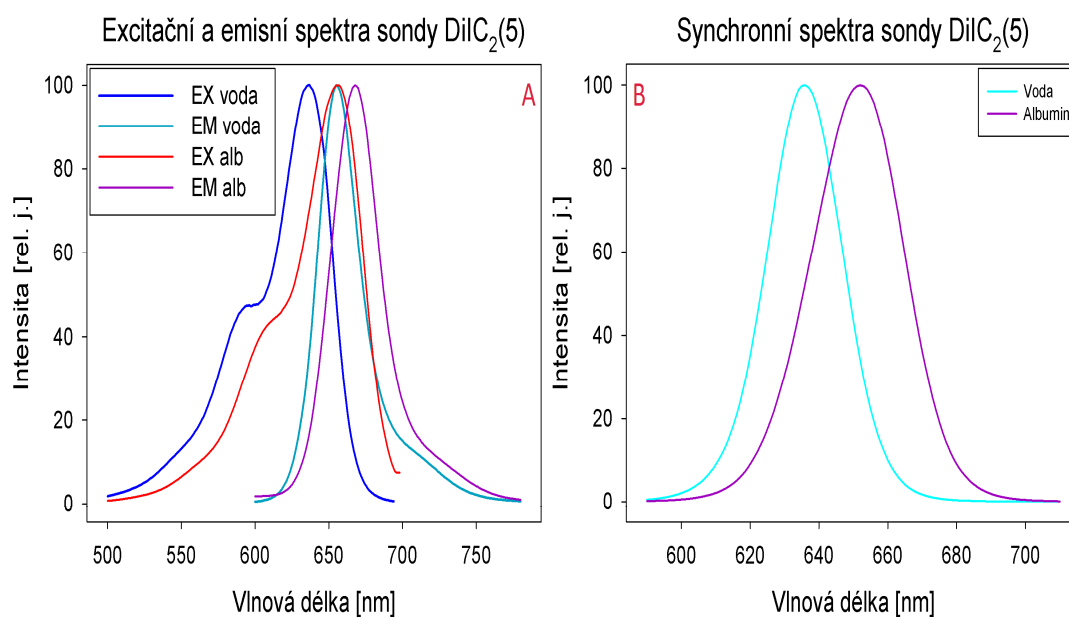
**Graf 3.3: Emisní, excitační a synchronní spektra fluorescenční sondy DiOC<sub>3</sub>(3).** Emisní a excitační spektra 4  $\mu$ M roztoku sondy DiOC<sub>3</sub>(3) byla měřena ve vodě (— a —, graf 3.3A), poté v roztoku 2% albuminu (— a —, graf 3.3A). Následně byla změřena synchronní spektra ve vodě i v roztoku albuminu (— a —, graf 3.3B).

Vzorek byl excitován zářením o vlnové délce 430 nm. Zjistili jsme emisní maxima sondy DiOC<sub>3</sub>(3) ve vodě a v albuminu – 496 a 505 nm.

Poté jsme měřili excitační spektra, přičemž sledována byla emise záření vlnové délky 535 nm. Excitační maximum volné sondy se nachází na hodnotě 480 nm, po interakci s proteinem se posouvá na 492 nm.

Synchronní spektra byla měřena s offsetem 15 nm. Z grafu 3.3B je patrný dostatečný rozdíl mezi spektry volné a vázané sondy, tento fakt spolu s dostatečným kvantovým výtěžkem z DiOC<sub>3</sub>(3) činí vhodný fluorofor k dalším

experimentům. Rozdíl mezi emisním maximem volné a vázané sondy je téměř stejný jako rozdíl emisních maxim DiSC<sub>3</sub>(3).



**Graf 3.4: Emisní, excitační a synchronní spektra fluorescenční sondy DiIC<sub>2</sub>(5).** Emisní a excitační spektra 4  $\mu$ M roztoku sondy DiIC<sub>2</sub>(5) byla měřena ve vodě (— a —, graf 3.4A), poté v roztoku 2% albuminu (— a —, graf 3.4A). Následně byla změřena synchronní spektra ve vodě i v roztoku albuminu (— a —, graf 3.4B).

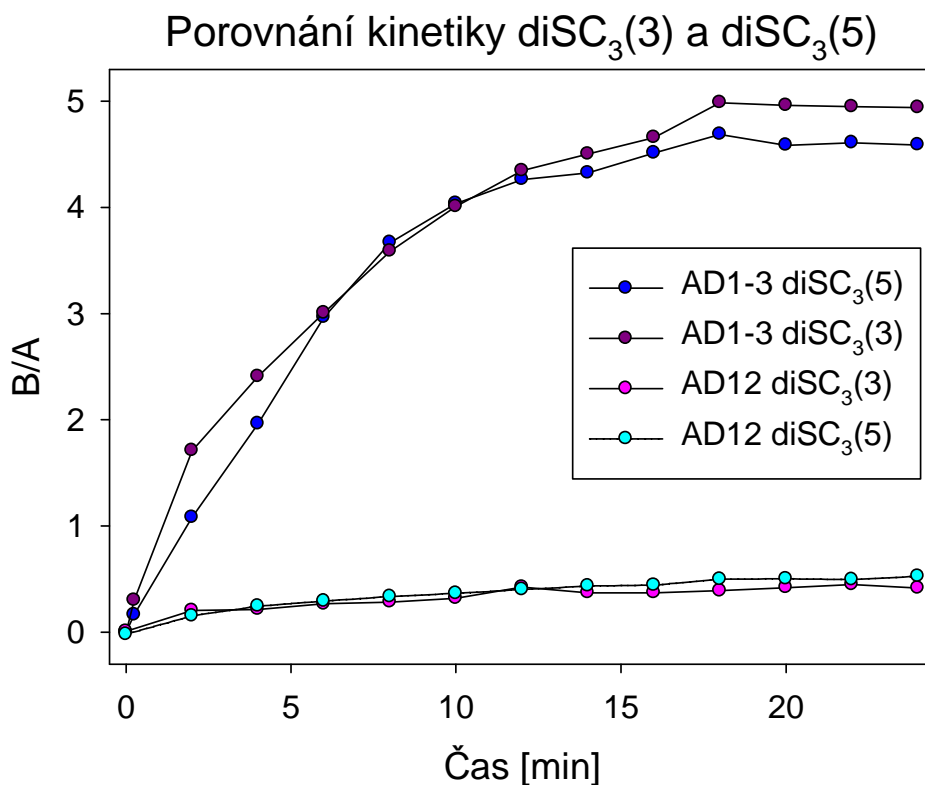
Vzorek jsme excitovali zářením o vlnové délce 550 nm. Zjistili jsme emisní maxima sondy DiIC<sub>2</sub>(5) ve vodě a v albuminu – 655 a 668 nm.

Následně jsme změřili excitační spektra, přičemž sledována byla emise záření vlnové délky 705 nm. Excitační maximum volné sondy se nachází na hodnotě 636 nm, po interakci s albuminem se posunulo na hodnotu 655 nm.

Synchronní spektra jsme měřili s offsetem 20 nm. Z grafu 3.4B je patrný dostatečný rozdíl mezi spektry volné a vázané sondy. Kvantový výtěžek ve vodném prostředí je také dostatečný, sonda DiIC<sub>2</sub>(5) je tedy vhodným fluoroforem k dalším experimentům.

### 3. 2 Měření s živými buňkami

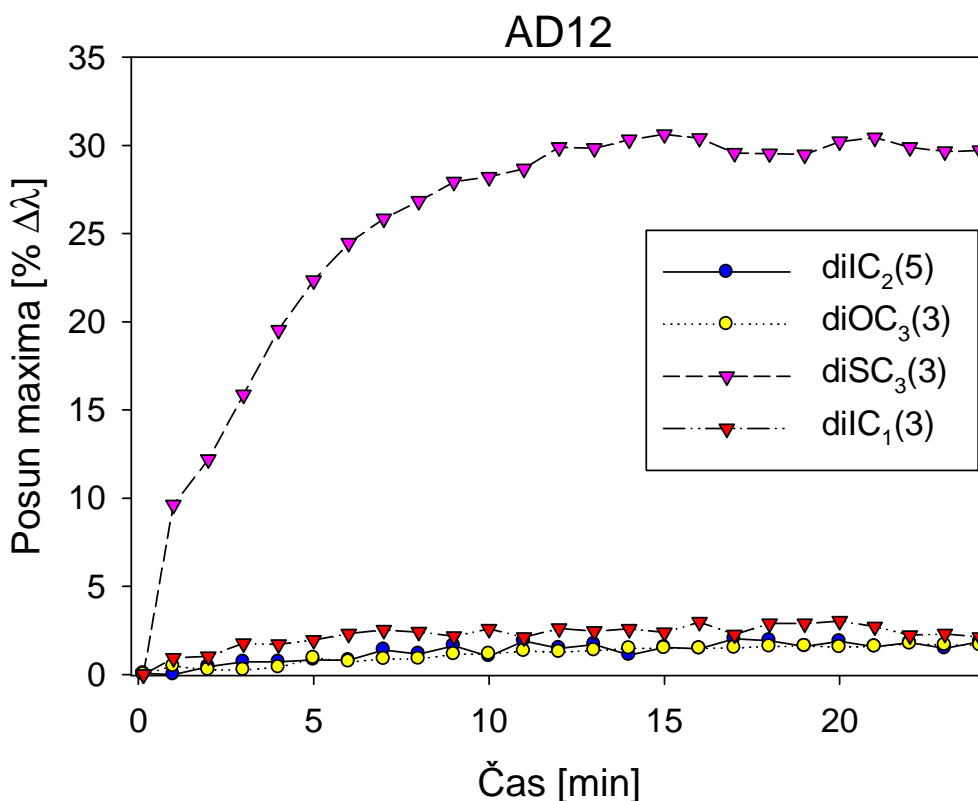
Pro stanovení základních charakteristik jednotlivých fluoroforů, bylo nutné změřit kinetiku jejich akumulace v živých buňkách, abychom určili, zda jsou substráty stejných pump jako fluorescenční sonda diSC<sub>3</sub>(3). V případě sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5), u nichž byla modelová spektra k dispozici, jsme dělali rozklady na relativní intensity volné a vázané složky, konkrétně representované poměrem B/A. U ostatních sond jsme dospěli k závěru, že k porovnání toho, jak efektivně jsou odstraňovány pumpami z buněk, stačí prosté sledování polohy emisního maxima, které je jednoznačnou a dobře měřitelnou funkcí poměru B/A. Tyto experimenty probíhaly na buňkách kmene *S. cerevisiae* US, AD12 a AD1-3, jejichž genotyp je popsán v tabulce 2.4.



**Graf 3.5: Porovnání rychlosti akumulace sondy diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5).** Experiment probíhal na buňkách *S. cerevisiae* AD1-3 (OD kultury 6,44; —●— pro diSC<sub>3</sub>(3) a —●— pro diSC<sub>3</sub>(5)) a *S. cerevisiae* 12 (OD kultury 2,25; —●— pro diSC<sub>3</sub>(3) a —●— pro diSC<sub>3</sub>(5)) v MES-TEA pufru o pH 6,18. Bezprostředně po přidání buněk do kyvety byla změřena autofluorescence vzorku. 2,5 min poté bylo k 3 ml vzorku přidáno 6 μl 2.10<sup>-5</sup> M sondy. Vzorky pro měření byly připraveny tak, aby jejich výsledná OD byla 0,1.



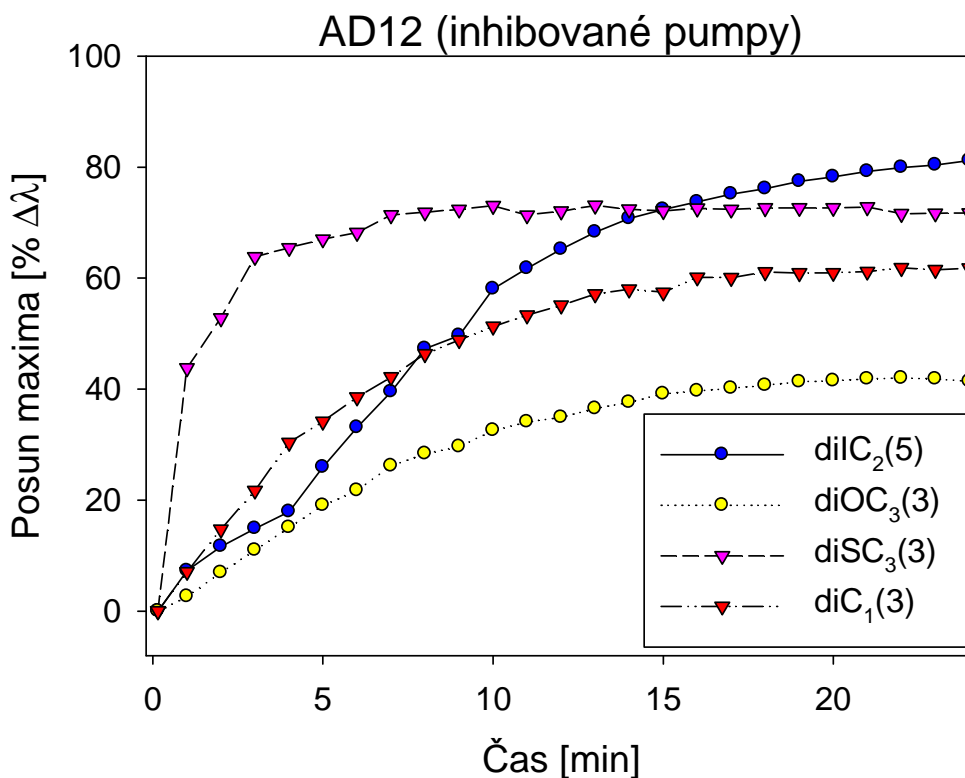
Z grafu 3.5 je vidět, že časový profil akumulace obou sond ve zkoumaných buňkách je prakticky shodný. Kmen *S. cerevisiae* AD12, jenž se vyznačuje nadprodukcí pump Pdr5p, akumuluje obě sondy shodně, stejným způsobem se akumulují obě sondy také v buňkách *S. cerevisiae* AD1-3, který má deletované pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p. Tyto výsledky podkládají tvrzení, že sondy diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5) jsou substrátem pumpy Pdr5p ve stejné míře.



**Graf 3.6: Porovnání akumulace jednotlivých sond v buňkách *S. cerevisiae* AD12.** K vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2 a 150 μl 40% roztoku glukózy o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6 μl  $2 \cdot 10^{-5}$  M sondy. Experiment byl prováděn se sondami DiIC<sub>2</sub>(5) (—●—), DiOC<sub>3</sub>(3) (····●····), DiSC<sub>3</sub>(3) (—▼—) a DiIC<sub>1</sub>(3) (····▼····). Posun maxima jsou absolutní hodnoty vztažené k maximálnímu posunu emisního maxima příslušné sondy ve vodě a v albuminu. Vzorky pocházely z kultury o OD 1,25.

Graf 3.6 demonstruje, že sondy DiIC<sub>2</sub>(5), DiOC<sub>3</sub>(3) a DiIC<sub>1</sub>(3) jsou substrátem pumpy Pdr5p ve znatelně vyšší míře, než sondy DiSC<sub>3</sub>(3). Zatímco v případě sondy DiSC<sub>3</sub>(3) došlo v rovnováze k posunu maxima směrem k červenému konci spektra o

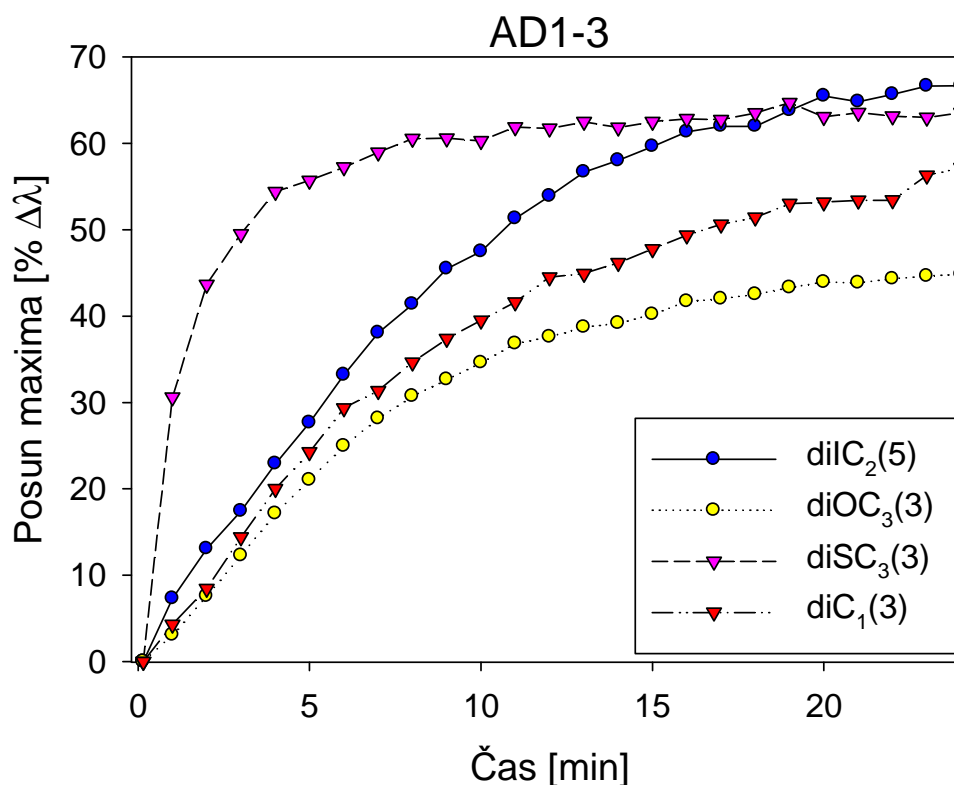
25 - 30 % maximálního posunu, v případě ostatních sond tato hodnota nedosahuje ani 5 %. Maximální posun je v případě výsledků v grafech 3.6, 3.7 a 3.8 rozdíl vlnové délky emisního maxima vzorku ve vodě a v 2% roztoku albuminu.



**Graf 3.7: Porovnání akumulace jednotlivých sond v buňkách *S. cerevisiae* AD1-3.** K vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2, 150 μl 40% roztoku glukózy a 3 μl 10 mM inhibitoru pump FK506 o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6 μl  $2 \cdot 10^{-5}$  M sondy. Experiment byl prováděn se sondami DiIC<sub>2</sub>(5) (—●—), DiOC<sub>3</sub>(3) (····●····), DiSC<sub>3</sub>(3) (—▼—) a DiIC<sub>1</sub>(3) (····▼····). Posun maxima jsou absolutní hodnoty vztažené k maximálnímu posunu emisního maxima příslušné sondy ve vodě a v albuminu.

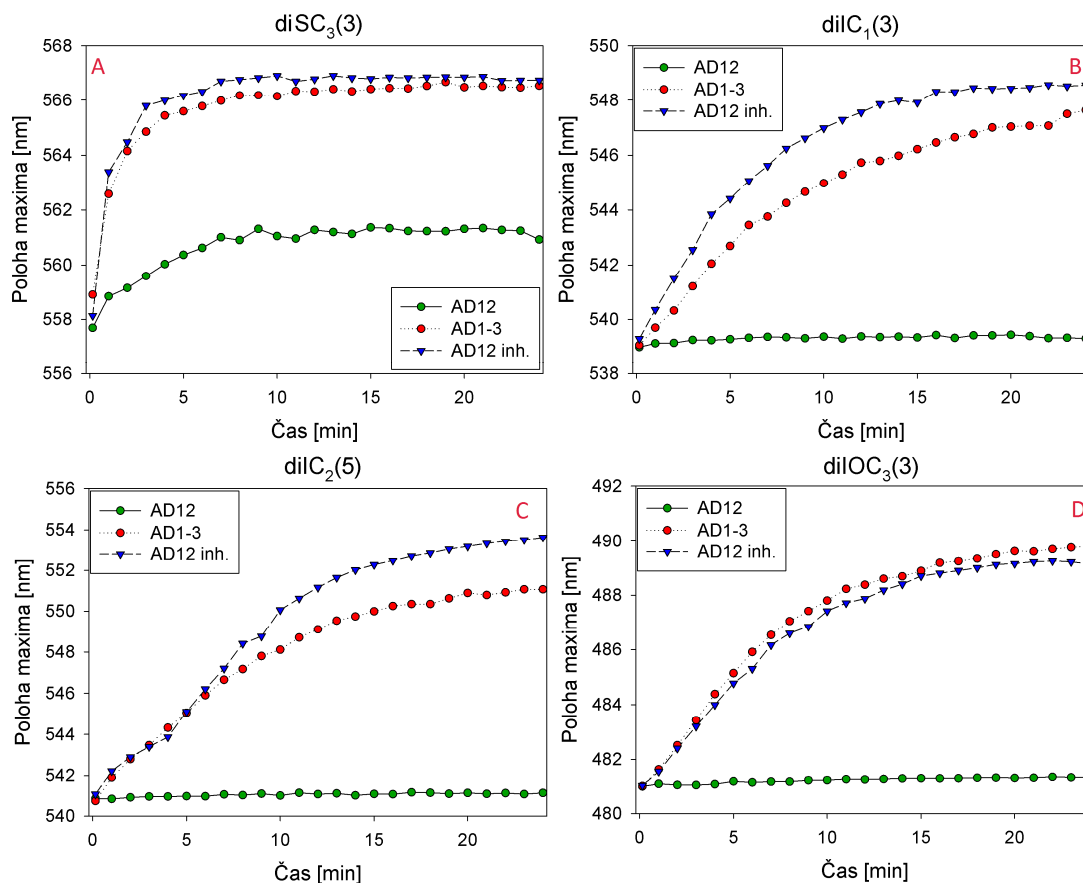
Z grafu 3.7 vidíme, že v případě, že byly MDR pumpy inhibovány, došlo v případě všech sond vyjma DiOC<sub>3</sub>(3) k posunu maxima v rovnováze o cca 60 % maximálního posunu. Rozdíl v posunu maxima při experimentu se sondou DiOC<sub>3</sub>(3) není možné vysvětlit nedostatečným množstvím podaného inhibitoru pump, ke kterému mohlo dojít z nedbalosti kvůli jeho malému množství nebo z důvodu dalšího dělení kvasinek v zásobní suspenzi buněk, neboť, jak je vidět z grafu 3.9D,

který náleží ke stejnému experimentu, sonda se akumuluje stejně v buňkách AD1-3 i v AD12 s inhibovanými pumpami.



**Graf 3.8: Porovnání akumulace jednotlivých sond v buňkách *S. cerevisiae* AD1-3.** K vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2 a 150 μl 40% roztoku glukózy o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6 μl  $2 \cdot 10^{-5}$  M sondy. Experiment byl prováděn se sondami DiIC<sub>2</sub>(5) (—●—), DiOC<sub>3</sub>(3) (····●····), DiSC<sub>3</sub>(3) (—▼—) a DiC<sub>1</sub>(3) (····▼····). Posun maxima jsou absolutní hodnoty vztažené k maximálnímu posunu emisního maxima příslušné sondy ve vodě a v albuminu. Vzorky pocházely z kultury o OD 1,25.

Z grafu 3.8 vidíme, že relativní posun maxima fluorescence v rovnovážném stavu činí 50 – 60 % maximálního posunu. K tomuto experimentu byly použity buňky kmene *S. cerevisiae* AD1-3, jimž byly deletovány pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p.

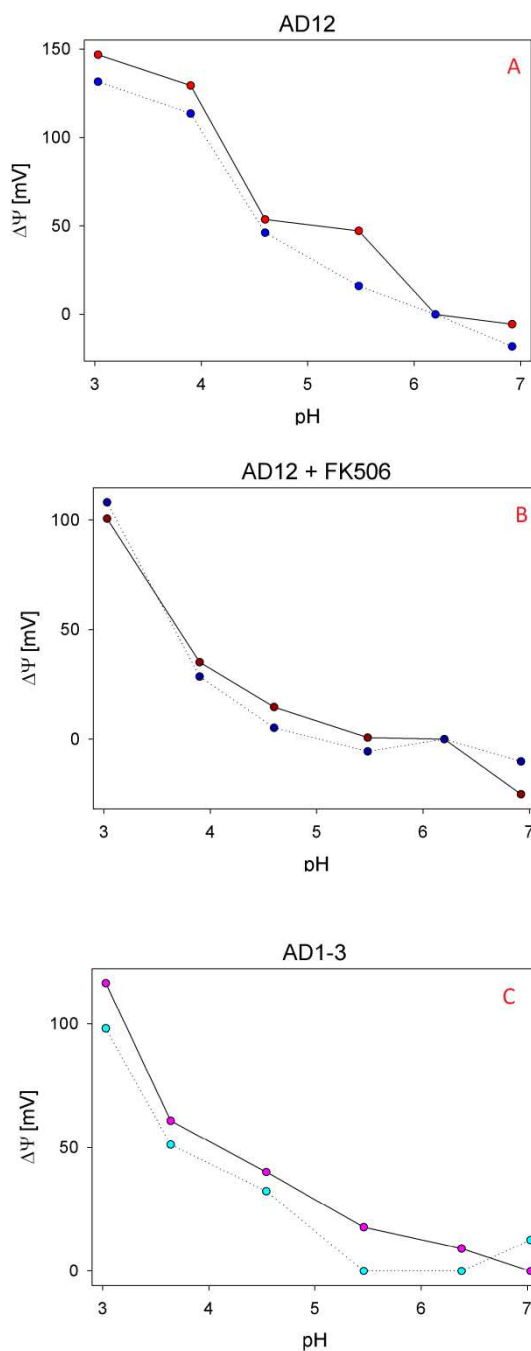


**Graf 3.9: Porovnání kinetiky akumulace jednotlivých fluoroforů v buňkách *S. cerevisiae* AD1-3 (—●—), *S. cerevisiae* AD12 (—●—) a *S. cerevisiae* AD12 s inhibovanými pumpami (—▼—).** K vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2 a 150  $\mu$ l 40% roztoku glukózy o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6  $\mu$ l  $2.10^{-5}$  M sondy. Poloha maxima je udávána v absolutních hodnotách.

Graf 3.9 shrnuje experiment provedený se čtyřmi fluorofory. Je vidět, že kinetika akumulace sond DiSC<sub>3</sub>(3) a DiOC<sub>3</sub>(3) má v případě *S. cerevisiae* AD1-3 a AD12 s inhibovanými pumpami shodný průběh, v případě sond DiIC<sub>1</sub>(3) a DiIC<sub>2</sub>(5) dochází k drobným odlišnostem. Sondy diIC<sub>2</sub>(5), diIC<sub>1</sub>(3) a diOC<sub>3</sub>(3) jsou zřejmě daleko lepšími substráty MDR pump než diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5).

### 3. 3 Aplikace získaných poznatků

Dříve získaných poznatků o sondě diSC<sub>3</sub>(5) jsme se rozhodli využít ke studiu vlivu acidifikace na membránový potenciál kvasinek. K tomuto experimentu jsme opět využili metodu synchronně skenované fluorescence a změřená modelová spektra. [10]



**Graf 3.10: Porovnání velikosti změn membránového potenciálu změřených pomocí sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5).**

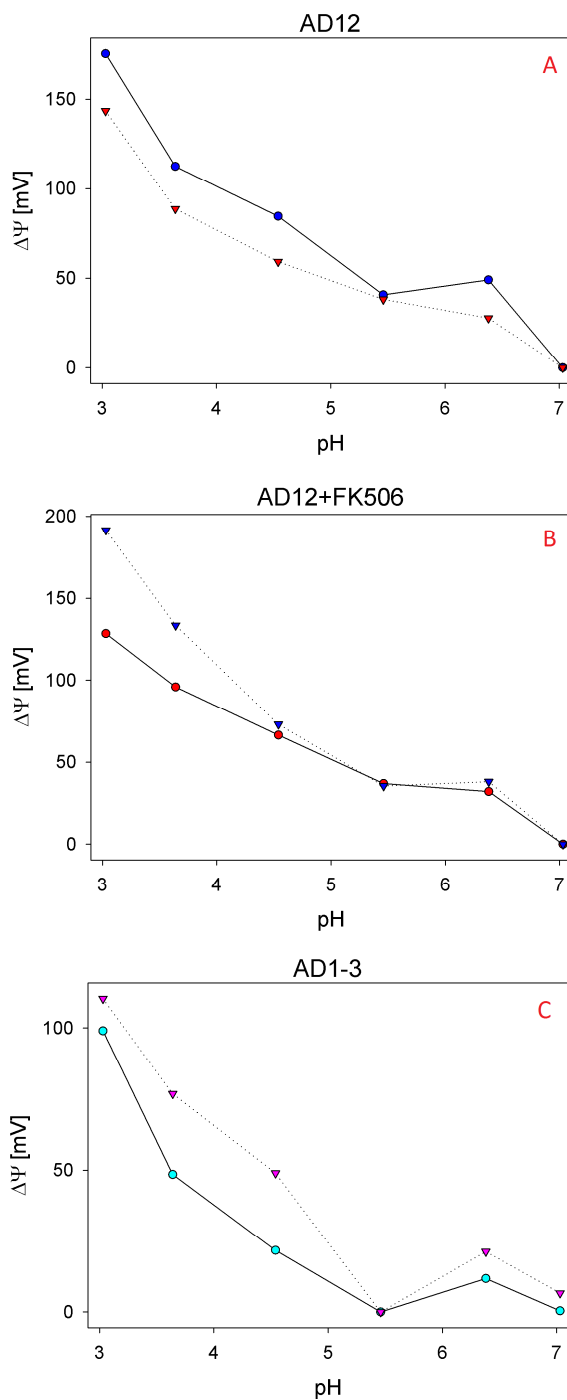
Ke vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2, 150 μl 40% roztoku glukózy a v případě 3.10B 3 μl FK506 o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6 μl 2.10<sup>-5</sup> M sondy, pokaždé byla pouze jedna sonda v jednom vzorku.

A) *S. cerevisiae* AD12, OD kultury 1,23; diSC<sub>3</sub>(5) —●—, diSC<sub>3</sub>(3) .....●.....

B) *S. cerevisiae* AD12 s inhibovanými pumpami, OD kultury 1,23; diSC<sub>3</sub>(5) .....●....., diSC<sub>3</sub>(3) —●—,

C) *S. cerevisiae* AD1-3, OD kultury 3,16; diSC<sub>3</sub>(5) —●—, diSC<sub>3</sub>(3) —▼—.

Z grafu 3.10 je vidět, že změny membránového potenciálu změřené pomocí obou sond si odpovídají. Dále jsme pomocí obou sond zkoumali změny membránového potenciálu v případě, že byly ke vzorkům přidány obě sondy zároveň.



**Graf 3.11: Porovnání velikosti změn membránového potenciálu změřených pomocí sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5).**

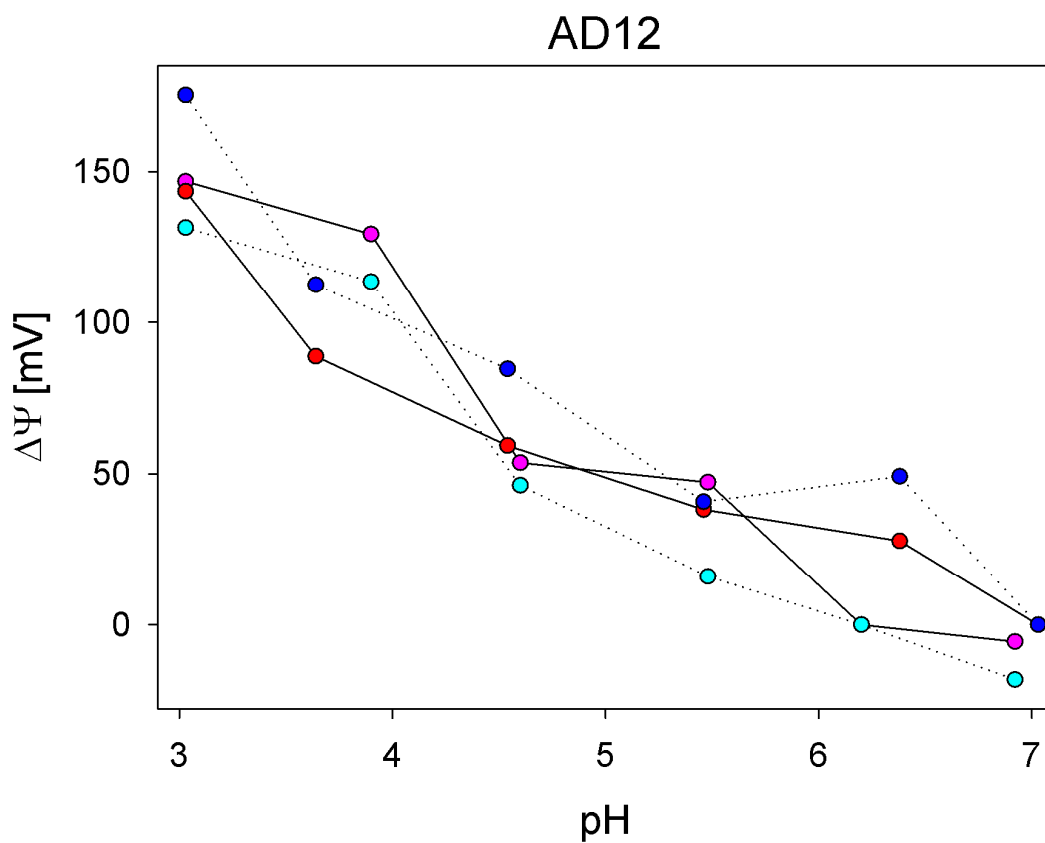
Ke vzorkům buněčné suspenze s 2,85 ml MES-TEA pufru o pH 6,2, 150 μl 40% roztoku glukózy a v případě 3.10B 3 μl FK506 o celkové OD 0,1 bylo 4,5 min po přidání buněk vpraveno 6 μl 2.10<sup>-5</sup> M sondy, pokaždé byly přidány obě sondy do každého vzorku.

A) *S. cerevisiae* AD12, OD kultury 1,46; diSC<sub>3</sub>(5) —●—, diSC<sub>3</sub>(3) ···▼···,

B) *S. cerevisiae* AD12 s inhibovanými pumpami, OD kultury 3,97; diSC<sub>3</sub>(5) —▼—, diSC<sub>3</sub>(3) ···●···,

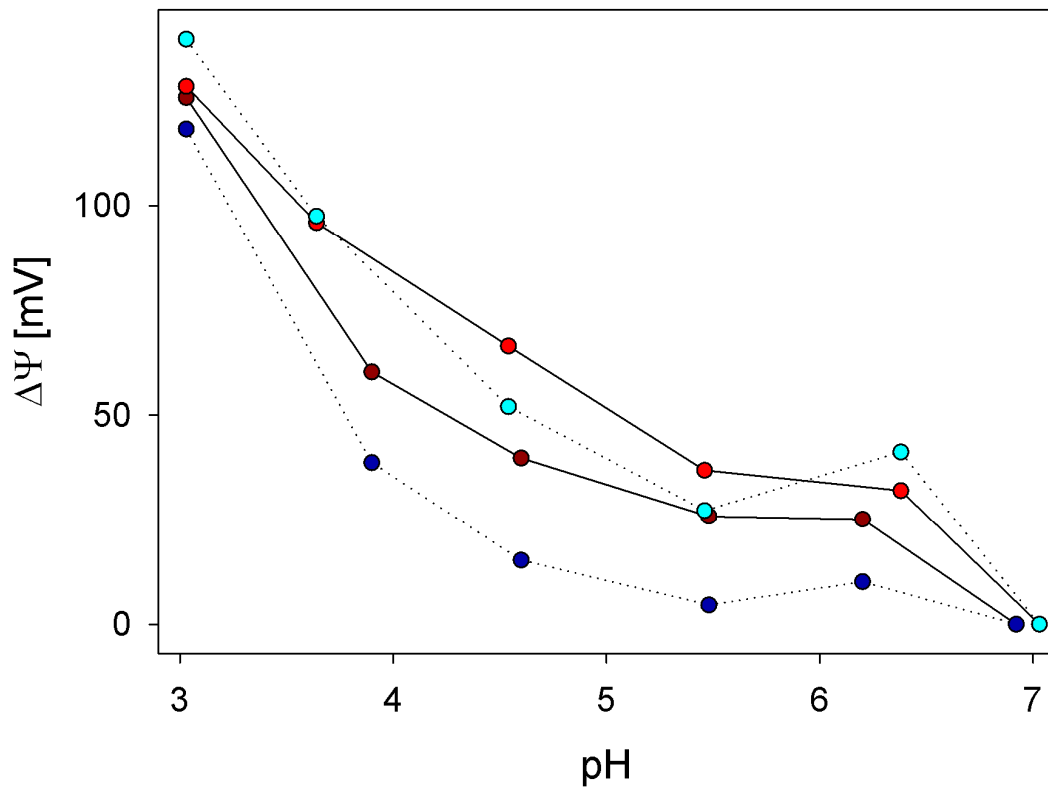
C) *S. cerevisiae* AD1-3, OD kultury 3,16; diSC<sub>3</sub>(5) —●—, diSC<sub>3</sub>(3) —●—.

Z grafu 3.11 vidíme, že i když do vzorku přidáme oba fluorofory zároveň, obdržíme ekvivalentní výsledky.



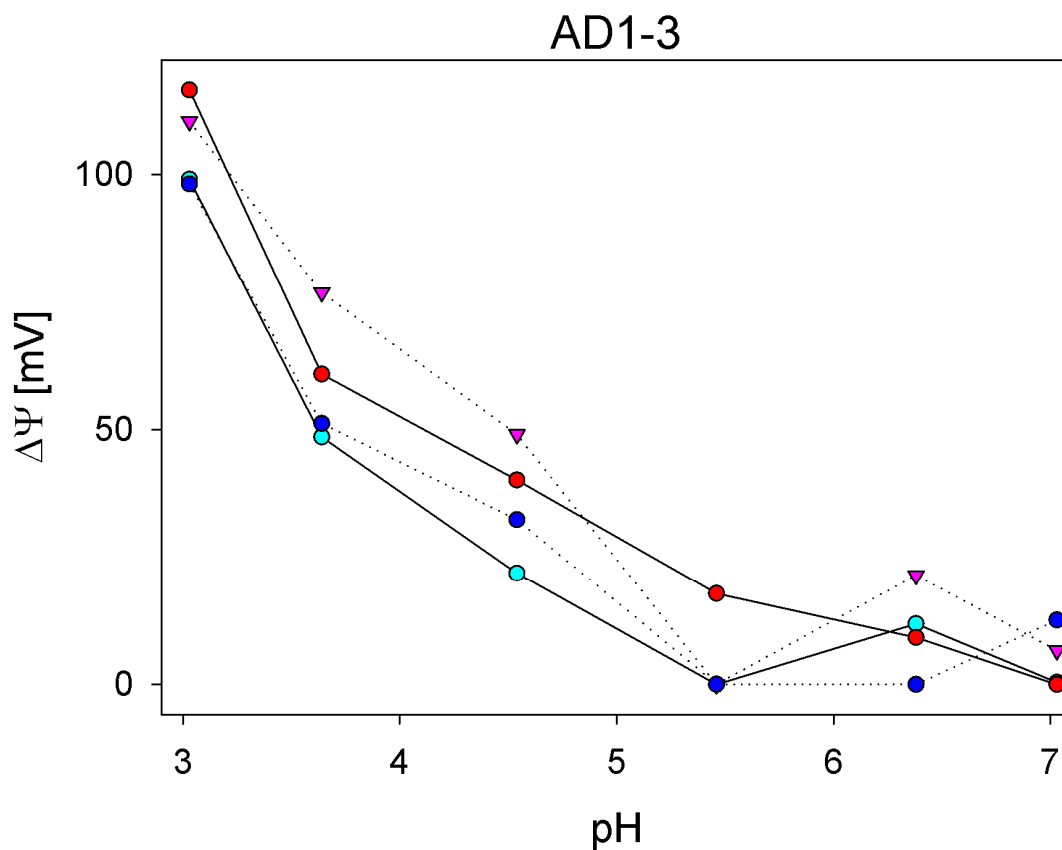
**Graf 3.12: Srovnání velikosti změn membránového potenciálu změřených pomocí sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5) přidaných ke vzorku *S. cerevisiae* AD12 najednou (OD kultury 1,46) a zvlášť (OD kultury 1,23). Sondy přidané současně - diSC<sub>3</sub>(5): —●—, diSC<sub>3</sub>(3): .....●..... a sondy přidané zvlášť do dvou identických buněčných suspenzí - diSC<sub>3</sub>(5) : —●—, diSC<sub>3</sub>(3) : —●—. Vzorky byly připraveny tak, aby jejich výsledná OD s 2,85 μl pufru a 150 μl 40% glukózy byla 0,1.**

## AD12 + FK506



**Graf 3.13: Srovnání velikosti změn membránového potenciálu změřených pomocí sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5) přidáných ke vzorku *S. cerevisiae* AD12 s inhibovanými pumpami najednou (OD kultury 3,97) a zvlášť (OD kultury 1,23). Sondy přidané současně - diSC<sub>3</sub>(5): —●—, diSC<sub>3</sub>(3): .....●..... a sondy přidané zvlášť - diSC<sub>3</sub>(5) : .....●....., diSC<sub>3</sub>(3): —●—. Vzorky byly připraveny tak, aby jejich výsledná OD s 2,85 μl pufru a 150 μl 40% glukózy byla 0,1.**





**Graf 3.14:** Srovnání velikosti změn membránového potenciálu změřených pomocí sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5) přidaných ke vzorku *S. cerevisiae* AD1-3 najednou a zvlášť (OD kultury 3,16). Sondy přidané současně - diSC<sub>3</sub>(5): —●—, diSC<sub>3</sub>(3): —▼— a sondy přidané zvlášť - diSC<sub>3</sub>(5) : .....●....., diSC<sub>3</sub>(3): .....▼...... Vzorky byly připraveny tak, aby jejich výsledná OD s 2,85 μl pufru a 150 μl 40% glukózy byla 0,1.

Z grafu 3.12, 3.13 a 3.14 je patrné, že velikost změny membránového potenciálu získaná pomocí jedné sondy je nezávislá na přítomnosti druhé sondy. Uvážíme-li navíc, že s výjimkou 3.14 měření probíhala na různých vzorcích, můžeme tuto metodu určování změn membránového potenciálu považovat za spolehlivou.

## 4 Závěr

Nejprve byla prostudována literatura týkající se membránového potenciálu buněk a postupům jeho měření. Zvláštní pozornost byla věnována metodě synchronně skenované fluorescence.

Pro experimenty byly vybrány některé z dostupných karbocyaninových sond, konkrétně DiSC<sub>3</sub>(5), DiOC<sub>3</sub>(3), DiIC<sub>2</sub>(5), DiIC<sub>1</sub>(3) a JC-1. Byla změřena jejich emisní, excitační a synchronní spektra ve vodě a v 2% roztoku albuminu, aby bylo možné odhadnout jejich charakteristiky v prostředí živých buněk. Z těchto čtyř látek byly pro další experimenty vybrány tři - DiOC<sub>3</sub>(3), DiIC<sub>2</sub>(5) a DiIC<sub>1</sub>(3), sonda JC-1 se pro experimenty s živými buňkami ukázala být nevhodná, neboť kvůli své vysoké hydrofobicitě nemá dostatečný kvantový výtěžek ve vodném prostředí.

Výsledky jsou rozhodně zajímavé. Bylo ukázáno, že některé sondy karbocyaninové řady jsou zřejmě lepšími substráty MDR pump než sondy diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5). Podobný časový profil akumulace všech zkoumaných sond nás opravňuje se domnívat, že dalšími experimenty bude možné dokázat jejich použitelnost při měření membránového potenciálu kvasinek a jeho změn. Domníváme se, že po získání modelových spekter bude možné použít stejnou metodiku jako pro sondu diSC<sub>3</sub>(3).

Dále jsme měřili vliv acidifikace na membránový potenciál kvasinek. Ukázali jsme, že měření změn membránového potenciálu pomocí dvou různých sond diSC<sub>3</sub>(3) a diSC<sub>3</sub>(5) dává velice podobné výsledky. To naznačuje, že metoda, která byla vyvinuta v biofyzikálním oddělení, je dostatečně objektivní a nezávislá na použití konkrétní sondy diSC<sub>3</sub>(3). Navíc jsme zjistili, že obdržíme velice podobné výsledky, i když jsou ve vzorku přítomny obě sondy zároveň, což nabízí široké možnosti dalšího využití. Ověření metodiky pro další sondu kromě diSC<sub>3</sub>(3) nám dává naději, že podobnými experimenty s dalšími sondami karbocyaninové řady docílíme podobných výsledků. Bylo by jistě zajímavé a hodnotné v těchto experimentech pokračovat.

## Literatura a zdroje

- [1] INSTITUT ROSELL, *Saccharomyces boulardii*. <http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=60&idLangue=2>
- [2] TUTORVISTA, Introduction to Cell Cycle. <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/cell-reproduction/cell-cycle.php>
- [3] PHOTOBIOLOGY, Basic Photophysics. <http://www.photobiology.info/Visser-Rolinski.html>
- [4] J. Plášek, D. Gášková, H. Lichtenberg-Fraté, J. Ludwig, M. Höfer. *Monitoring of real changes of plasma membrane potential by diS-C<sub>3</sub>(3) fluorescence in yeast cell suspensions*. J Bioenerg Biomembr. 2012 Oct;44(5):559-69. doi: 10.1007/s10863-012-9458-8. Epub 2012 Jul 19.
- [5] JANDEROVÁ, Blanka, BENDOVIÁ, Olga. *Biologie kvasinek*. Nakladatelství Karolinum, Praha 1999.
- [6] Tuan Vo-Dinh. *Multicomponent Analysis by Synchronous Luminescence Spectroscopy*. Analytical Chemistry, vol. 50, no. 3, March 1978
- [7] J. Plášek, D. Gášková, J. Večeř, K. Sigler. *Use of Synchronously Excited Fluorescence to Assess the Accumulation of Membrane Potential Probes in Yeast Cells*. Folia Microbiol. 45 (3), 225 – 229 (2000)
- [8] KODEDOVÁ, Marie. *Studium činnosti mikrobiálních MDR pump pomocí fluorescenčních sond: stanovení účinku potenciálních inhibitorů*. Praha, 2011. Disertační práce MFF UK.
- [9] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, ISBN: 3-527-60024-8
- [10] MATUNOVÁ, Petra. *Srovnání fluorescenčních sond diS-C<sub>3</sub>(3) a diS-C<sub>3</sub>(5) z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek*. Praha, 2012. Bakalářská práce. MFF UK.
- [11] ASSAY BIO TECH, diSC<sub>3</sub>(5). <http://www.assaybiotech.com/productcenter/kits-substrates/Z0207.html>
- [12] SIGMA-ALDRICH, diSC<sub>3</sub>(5), diSC<sub>3</sub>(3), JC-1. <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>

[13] SETAREH BIOTECH, diOC<sub>3</sub>(3). <http://www.setarehbiotech.com/details.cfm?ProdID=507&main=0>

[14] T. Hendrych, M. Kodedová, K. Sigler, D. Gášková. *Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the S. cerevisiae multidrug resistant pumps Pdr5p and Snq2p*. Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 717-723

[15] R. Orij, S. Brul, G. J. Smits. *Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast*, Biochimica et Biophysica Acta 1810 (2011) 933–944

[16] K. van Eunen, J. Bouwman, P. Daran-Lapujade, J. Postmus, A.B. Canelas, F.I.Mensonides, R. Orij, I. Tuzun, J. van den Brink, G.J. Smits, W.M. van Gulik, S. Brul, J.J.Heijnen, J.H. deWinde, M.J. de Mattos, C. Kettner, J. Nielsen, H.V.Westerhoff, B.M. Bakker. *Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology*, FEBS J. 277 (2010) 749–760

[17] R.S. Haworth, B.D. Lemire, D. Crandall, E.J. Cragoe Jr., L. Fliegel. *Characterisation of proton fluxes across the cytoplasmic membrane of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1098 (1991) 79–89

[18] J. Karagiannis, P.G. Young. *Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in Schizosaccharomyces pombe*. J. Cell Sci. 114 (2001) 2929–2941

[19] G. Miesenbock, D.A. De Angelis, J.E. Rothman. *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*. Nature 394 (1998) 192–195.