

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Ingrid Jurková

Regulace vnitrobuněčného pH v bakteriálních buňkách

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika

2006

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

V Praze dne

Obsah

1 Úvod	5
1.1 Stavba bakteriální buňky.....	5
1.2 <i>Escherichia coli</i>	6
1.3 Membránový transport.....	7
1.4 Fluorescence.....	9
1.5 Metody měření vnitrobuněčného pH.....	10
2 Vnitrobuněčné pH	13
2.1 pH homeostáza a její význam pro buňku. Změny vnitrobuněčného pH.....	13
2.2 Souvislost vnitrobuněčného pH s růstem a metabolismem buňky.....	14
3 Mechanismy regulace vnitrobuněčného pH <i>E. coli</i>	15
3.1 Vnitrobuněčné pH <i>E. coli</i>	15
3.2 Mechanismus pH homeostázy v zásaditém vnějším prostředí.....	17
3.3 Mechanismus pH homeostázy v kyselém vnějším prostředí.....	19
4 Experimentální část	21
4.1 Použitá metoda a postup měření.....	21
4.2 Výsledky měření a diskuze.....	23
4.2.1 Fluorescence pHluorinu.....	23
4.2.2 Kalibrace fluorescence pHluorinu.....	27
4.2.3 Vnitřní pH bakterií.....	28
5 Závěr	32
5.1 Regulace vnitrobuněčného pH <i>E. coli</i>	32
5.2 Shrnutí naměřených výsledků.....	32
Literatura	33
Seznam používaných zkratk	39

Název práce: Regulace vnitrobuněčného pH v bakteriálních buňkách

Autor: Ingrid Jurková

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.

e-mail vedoucího: eva.urbankova@mff.cuni.cz

Abstrakt: Regulace vnitrobuněčného pH patří mezi evolučně nejstarší homeostatické mechanismy. Stálá hodnota vnitřního pH zajišťuje optimální podmínky pro řadu důležitých buněčných funkcí. Navzdory intenzivnímu úsilí se doposud u žádné skupiny organismů nepodařilo najít úplný popis všech způsobů kontroly a regulace vnitrobuněčného pH. Cílem naší práce bylo vypracovat rešerši o mechanismech regulace vnitrobuněčného pH *E. coli* a využít fluorescenci pHluorinu (mutantu zeleného fluorescenčního proteinu GFP, citlivého na pH) k měření závislosti vnitrobuněčného pH na vnějším pH a na koncentraci draslíku v pufru. Výsledky našeho měření potvrzují, že za přítomnosti draslíku v okolním prostředí se *E. coli* dokáže lépe vyrovnat s nízkým vnějším pH, přičemž s jeho rostoucí koncentrací se vnitrobuněčné pH zvyšuje. Schopnost regulace vnitrobuněčného pH použitého bakteriálního kmenu nebyla výrazně ovlivněna expresí *MNTH* a neliší se od schopnosti regulace pH běžných kmenů *E. coli*.

Klíčová slova: vnitrobuněčné pH, pH homeostáza, *Escherichia coli*, membránový transport, fluorescence

Title: Regulation of intracellular pH in bacterial cells

Author: Ingrid Jurková

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.

Supervisor's e-mail adress: eva.urbankova@mff.cuni.cz

Abstract: Regulation of intracellular pH belongs among evolutionarily oldest homeostatic mechanisms. A constant value of the internal pH ensures optimal conditions for a lot of important cellular functions. Despite intensive effort a complete description of all mechanisms controlling and regulating intracellular pH was not found so far for any group of organisms. The goal of our work was to make a background research about the regulation of intracellular pH in *E. coli* and to measure the dependence of intracellular pH on the extracellular pH and on the concentration of potassium in the buffer using fluorescence of pHluorin (a pH-sensitive mutant of the Green Fluorescent Protein GFP). Our results confirm that the ability of *E. coli* to cope with a low extracellular pH is higher in the presence of potassium, while the intracellular pH increases with its growing concentration in the buffer. The ability of the studied bacterial strain to regulate intracellular pH was not considerably affected by the expression of the *MNTH* and does not differ from the ability of pH regulation observed in common *E. coli* strains.

Key words: intracellular pH, pH homeostasis, *Escherichia coli*, membrane transport, fluorescence

Kapitola 1

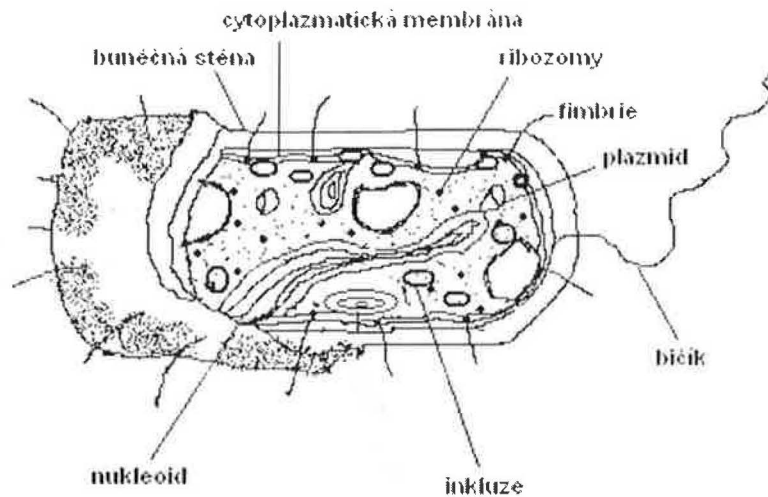
Úvod

1.1 Stavba bakteriální buňky

Bakteriální buňka je buňkou prokaryotickou [1 str.41, 2, 3 str.19]. Její stavba je schematicky znázorněna na obr. č.1. Prostor buňky je zcela vyplněn viskózním, koncentrovaným roztokem nazývaným cytoplazma [3 str.19]. Na rozdíl od eukaryotické buňky, která obsahuje jádro, je genetická informace prokaryotické buňky uložena v nukleoidu, což je jediná dvoušroubovnice molekuly DNA (cirkulární) na bílkovinném nosiči [1 str.43, 2, 3 str.19]. Kromě toho obsahuje cytoplazma bakterií i malé, do kruhu uzavřené molekuly DNA, nazývané plazmidy, které nesou doplňkovou genetickou informaci. V cytoplazmě prokaryotické buňky se dále nachází několik set až několik tisíc tělísek, zvaných ribozomy, na kterých probíhá syntéza bílkovin [1 str.44, 2, 3 str.19]. Dále se v cytoplazmě mohou vyskytovat inkluze, které fungují jako zásobárna uhlíku a energie [1 str.45, 2]. Nejběžnějším typem bakteriálních inkluzí jsou zrníčka glykogenu a poly- β -hydroxymáselné kyseliny [1 str.45]. Důležitou součástí buňky je semipermeabilní cytoplazmatická membrána, která odděluje vnitřní prostředí buňky od vnějšího a obsahuje transportní proteiny, které zajišťují buňce výměnu energie a látek nezbytných pro její život [1 str.41, 2, 3 str.19]. Základ cytoplazmatické membrány tvoří lipidová dvojvrstva, v níž hydrofobní konce lipidů míří dovnitř membrány a jejich polární hlavičky směřují ven [4 str.526, 5 str.139]. Nad cytoplazmatickou membránou většiny prokaryotických buněk se nachází buněčná stěna [1 str.42, 2, 3 str.19]. V případě gram-pozitivních bakterií obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanu, kterou lze obarvit pomocí Gramova barvení. Gram-negativní bakterie mají v buněčné stěně naopak pouze velmi tenkou peptidoglykanovou vrstvu, nad níž je ještě vnější membrána, složená z fosfolipidů, bílkovin a lipopolysacharidů [1 str. 43, 2]. Některé bakterie mohou k usnadnění pohybu používat fimbrie či pohyblivé bičíky [1 str.46, 2, 3 str.19].

Během svého života prochází buňka několika růstovými fázemi. Během první z nich, označované jako lag-fáze, zvětšují buňky svůj objem, syntetizují všechny důležité látky a zvyšují svou metabolickou aktivitu. V průběhu exponenciální fáze

dochází k dělení buněk a tím i k exponenciálnímu nárůstu jejich počtu. Třetí fáze bývá označovaná jako stacionární a nastává proto, že se buňky přestanou dělit například kvůli nedostatku živin či životního prostoru. Posledním stádiem je pak postupné odumírání buněk [2].



Obr. č. 1 – Bakteriální buňka. [2]

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (dále jen *E. coli*) je v současné době nejvíce prostudovanou bakterií [2]. Lze ji totiž poměrně snadno izolovat a kultivovat (případně i geneticky upravovat) [6, 2], navíc má její výzkum velký význam pro lékařství, ekologii a biotechnologie [2]. Poprvé byla popsána Theodorem Escherichem v roce 1885, po kterém později dostala své jméno [2, 7]. Až roku 1935 byla *E. coli* poprvé spojena s výskytem průjmového onemocnění, do té doby byla považována za neškodnou. V roce 1997 byl rozluštěn její úplný genom [2]. Od začátku dvacátého století je *E. coli* díky svému výskytu v lidském zažívacím traktu používána jako hlavní indikátor znečištění vody odpadními látkami [2, 7].

Dle taxonomického systému patří *E. coli* do nadříše Prokaryota, říše Eubacteria (eubakterie), podříše Bacteria (bakterie), oddělení Gracilicutes (gramnegativní bakterie), třídy Gamma Proteobacteria, řádu Enterobacteriales, rodiny Enterobacteraceae a rodu *Escherichia* [7]. Bakterie z rodiny Enterobacteriaceae jsou

gramnegativní, fakultativně anaerobní organismy tyčinkového tvaru, jsou chemotrofní a vykazují jak respirativní tak fermentativní metabolismus [2, 7]. Jsou velmi rozšířené, vyskytují se ve vodě, v půdě i v rostlinách a také v lidském a zvířecím zažívacím traktu [2]. Mohou však být i původci četných onemocnění rostlin, zvířat a lidí; konkrétně některé patogenní kmeny *E. coli* mohou u člověka způsobit infekci močových cest, novorozeneckou meningitidu a střevní choroby [2, 7].

E. coli je dobře uzpůsobená pro život v nejrůznějších podmínkách, dokáže přežít za přítomnosti kyslíku a díky schopnosti fermentace i bez něj [2].

1.3 Membránový transport

Prokaryotická buňka má ve srovnání s buňkou eukaryotickou malou velikost, čímž dosahuje velkého poměru svého povrchu vzhledem ke svému objemu. Má tudíž relativně veliký kontakt s vnějším prostředím, což jí usnadňuje látkovou výměnu s okolím [1 str.41]. Transport živin, anorganických iontů a produktů metabolismu přes cytoplazmatickou membránu je nezbytným předpokladem pro správné fungování buňky. Přes cytoplazmatickou membránu nejsnáze procházejí nenabitě, malé molekuly, ostatní látky musejí být přeneseny některým z membránových transportních systémů [5 str.24]. Probíhá-li tok přenášené látky ve směru poklesu jejího elektrochemického potenciálu $\Delta\mu$ a nevyžaduje-li tudíž dodání energie, označujeme ho jako pasivní [1 str.70, 4 str.532]. Do této skupiny patří například přenos látek difuzí, kdy se nabitě molekuly samovolně pohybují ve směru gradientu elektrochemického potenciálu. Rychlost difuze závisí především na velikosti částic a na jejich elektrickém náboji [1 str.70]. Jako usnadněnou difuzi nebo také jako pasivní přenašečový transport označujeme difuzi, usnadněnou přítomností transportních bílkovin v cytoplazmatické membráně [1 str.72]. Přenos iontů přes cytoplazmatickou membránu umožňuje několik rozdílných mechanismů [4 str.529]. Hydrofobní ionty přes ni mohou prostupovat díky jejich rozpustnosti v nepolárním prostředí, nacházejícím se uvnitř membrány [4 str.530]. Transport iontů může probíhat i pomocí iontových nosičů, takzvaných ionoforů [4 str.530, 8, 9], které tvoří komplexy s jednomocnými ionty a poté procházejí skrz membránu spolu s nimi [4 str.530].

Dalším způsobem je přenos iontově selektivním transmembránovým kanálem, spojujícím obě strany hydrofobní oblasti membrány [4 str.531]. Závise-li transport látky i na jiné energii, než na rozdílu elektrochemického potenciálu přenášené látky mezi oběma stranami membrány, označujeme ho jako aktivní [1 str.72, 4 str.532]. Potřebná energie musí být dodána speciálním membránovým proteinům, které jsou potom schopny přenést látku proti spádu jejího elektrochemického potenciálu. Pomocí aktivního přenosu (označovaného jako sekundárně aktivní [10]) mohou být současně přenášeny i dvě částice, jedna po směru spádu $\Delta\mu$ a druhá proti němu [1 str.72]. Pokud jsou částice přenášeny stejným směrem, označujeme membránový protein, který transport zprostředkovává, jako symporter, jsou-li přenášeny v opačných směrech, nazývá se příslušný protein antiporter [1 str.72, 10]. Velké částice jsou do buňky přenášeny pomocí cytózy [1 str.73].

Prokaryotické buňky si tvoří na plazmatické membráně elektrochemický gradient protonů, takzvanou protonmotivní sílu (obvykle značenou Δp) [6, 11, 12], kterou využívají jednak k tvorbě ATP (pomocí F-ATPázy), jednak jako hnací sílu pro transport různých látek [11,12,13]. Protonmotivní síla je složena z gradientu náboje (membránového potenciálu $\Delta\Psi$, vznikajícího v důsledku rozdílné koncentrace iontů uvnitř a vně buňky [5 str.155]) a z gradientu pH (ΔpH , rozdíl pH uvnitř a vně buňky) [9, 12, 13]. Pro její velikost platí:

$$\Delta p = \Delta\Psi - Z\Delta pH \quad (1)$$

kde $Z = 2,303 RTF^{-1}$ ($= 59$ při $25^{\circ}C$) (2) převádí transmembránový rozdíl pH na mV [9, 12, 13]. Protonmotivní síla je tvořena buď proteiny dýchacího řetězce (pokud bakterie respiruje) - podobně jako je tomu v mitochondriích u eukaryotických buněk - nebo obrácením funkce F-ATPázy, kdy je pro transport protonů hydrolyzováno ATP [14]. Při reakcích, vedoucích k jejímu vzniku, jsou protony přenášeny přes membránu o velmi nízké vodivosti a kapacitě, což vede k vytvoření membránového potenciálu. Je-li tok protonů částečně kompenzován tokem dalších iontů, dojde i ke tvorbě gradientu pH [9]. Jelikož vnitrobuněčné pH (pH_i) zůstává přibližně konstantní, je při nízkém vnějším pH (pH_o) hlavní složkou protonové hybné síly gradient pH, přičemž asi od pH_o 7,8 je její hlavní složkou membránový potenciál [12, 15- 17].

1.4 Fluorescence

Fluorescence patří spolu s fosforescencí mezi luminiscenční jevy [18]. Dostane-li se fluorescenční molekula po absorpci fotonu do excitovaného stavu, emituje následně s jistou pravděpodobností jiný foton o nižší energii (vyšší vlnové délce), čímž se dostane zpět do základního stavu [5 str.38, 18-22]. Rozdíl energií absorbovaného a emitovaného fotonu je potom přeměněn na vibrační energii nebo na teplo [19]. Ocitne-li se molekula po absorbování fotonu v jiném než prvním excitovaném stavu, dostane se před emisí fotonu pomocí vibračních relaxačních procesů na nejnižší excitovanou energetickou hladinu [18]. Závislost intenzity emitovaného záření (při konstantní emisní vlnové délce) na excitační vlnové délce je označována jako fluorescenční excitační spektrum, závislost intenzity emitovaného záření na emisní vlnové délce (při konstantní excitační vlnové délce) jako fluorescenční emisní spektrum [21, 22]. Jelikož emise se vždy uskutečňuje z nejnižšího excitovaného stavu, nezávisí emisní spektrum na excitační vlnové délce ani na energii excitujících fotonů [5 str.41, 21, 23 str.6]. Od fosforescence se fluorescence odlišuje kratší dobou, která uplyne mezi pohlcením a vyzářením fotonu [17, 23 str.1]. Zatímco u fluorescence se tato doba pohybuje okolo 10^{-8} s, u fosforescence nabývá hodnot větších než 10^{-3} s [23 str.1]. Fluorescenční emisní spektrum má podobný tvar jako fosforescenční, pouze je posunuto ke kratším vlnovým délkám [5 str.41].

Efektivnost fluorescence bývá vyjadřována pomocí kvantového fluorescenčního výtěžku Φ , který je definován jako podíl emitovaných a absorbovaných fotonů [5 str.47, 18-20, 23 str.10]. Vyjadřuje tak vlastně pravděpodobnost toho, že dojde k fluorescenci. Kvantový výtěžek závisí na koncentraci, pH, teplotě, polaritě rozpouštědla a eventuální přítomnosti dalších příměsí [18]. Další často používanou veličinou je fluorescenční doba života τ , udávající čas, po který zůstane molekula v excitovaném stavu, než emituje foton [18, 19, 23 str.1, str.10, str.51]. Jelikož koncentrace takovýchto excitovaných molekul ve fluorescenčním vzorku většinou klesá exponenciálně, lze fluorescenční dobu života formálně definovat jako dobu, po které poklesne původní hodnota fluorescenční intenzity na hodnotu e^{-1} (asi na 37%) [18]. V biofyzice je fluorescence používána hlavně při výzkumu struktury a dynamiky proteinů, nukleových kyselin a buněčných organel, s její pomocí lze měřit

i vnitrobuněčné pH a koncentrace iontů uvnitř buněk [5 str.7, str.173, 18, 19, 22]. Mezi hlavní výhody fluorescenčních měřicích metod patří jejich vysoká citlivost, díky níž k měření postačuje nízká koncentrace fluorescenční látky ve vzorku [5 str.1-2, 22], a možnost sledování velmi rychlých změn měřených veličin [5 str.174, 22]. Během měření navíc nedochází k poškozování vzorků ani ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů [5 str.2, 22]. Velkou výhodou při zkoumání biologických vzorků je i to, že je lze sledovat za jejich přirozených podmínek [5 str.2].

Fluorescenční látky lze rozdělit na fluorescenční značky, sloužící ke kovalentnímu označení zkoumané molekuly, a na fluorescenční sondy, jejichž fluorescence závisí na určitém parametru vnějšího prostředí, například na jeho pH. Fluorescenční sondy by měly vykazovat co nejvyšší kvantový fluorescenční výtěžek, aby byl jejich fluorescenční signál snadno rozlišitelný od signálu pozadí [5 str.3]. Pokud se při změně studované veličiny posouvá sledované fluorescenční spektrum (ať už emisní, nebo excitační), lze měřit poměr intenzity fluorescence při dvou vybraných vlnových délkách. Potom nezávisí získané výsledky na koncentraci fluorescenční látky [5 str.184, 22]. To je obzvláště výhodné při měření se živými buňkami, jelikož uvedená koncentrace nemusí být ve všech buňkách stejná [22].

1.5 Metody měření vnitrobuněčného pH

Při určování vnitrobuněčného pH se obvykle měří akumulace testovacích látek v buňkách (nejčastěji slabých kyselin a zásad) nebo změny vnitrobuněčných vlastností (např. fluorescenčních) [11]. Další možnou metodou je měření pH_i pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) [17, 24].

Při určování ΔpH jsou většinou používány radioaktivně značené nebo fluorescenční slabé kyseliny, pro jejichž neutrální formu je buněčná membrána propustná a ΔpH určuje míru jejich akumulace v buňkách [24]. Pokud je tento gradient malý, je lepší zkoumat nejen přenos slabých kyselin, ale i přenos slabých zásad, aby se vyloučila možnost, že buňka obsahuje transportní systém pro nabitou formu testovací látky. Např. u *E. coli* byla pozorována desetinásobná akumulace kyseliny salicylové a acetylsalicylové při pH_o 8, z čehož vyplývá, že tyto kyseliny mohly být akumulovány transportním systémem. V souladu s tímto tvrzením bylo

pozorováno, že jejich vysoké koncentrace snižují jak $\Delta\Psi$ tak ΔpH bakteriálních buněk. U některých kmenů *E. coli* pravděpodobně mohou být aktivně transportovány i acetáty [10]. Pokud používáme k měření pH_i kyseliny, dosáhneme přesnějších výsledků, budou-li se naměřené hodnoty pH pohybovat nad hodnotami jejich pK . Při určování pH_i pomocí slabých zásad je nejpoužívanější látkou methyamin, dále lze použít například dimethylamin, benzylamin, ethanolamin a dopamin [11].

Fluorescenční sondy citlivé na pH jsou hojně využívány pro studium organel i celých buněk [18, 22]. První typ těchto sond se vyznačuje vysokou afinitou pro proton, po jehož navázání změní své fluorescenční vlastnosti, například kvantový fluorescenční výtěžek, fluorescenční dobu života, či polohu spektra [5 str.7, str.174, 18, 21, 22]. Ze spektroskopicky změřeného poměru koncentrací fluorescenční sondy před navázáním iontu a po jeho navázání pak můžeme určit koncentraci tohoto iontu, z poměru koncentrací nedisociované a disociované formy fluorescenční sondy ve vzorku lze zjistit jeho pH [5 str.175]. Při měření vnitrobuněčného pH jsou nejpoužívanějšími sondami fluorescein, pyranin a jejich deriváty. Fluorescein je k měření pH ideální zejména díky jeho stabilní hodnotě pK , lze jej použít v rozmezí pH od 1,0 do 8,0 [22 str.196-197]. Od fluoresceinu byly odvozeny i další používané fluorescenční sondy, (např. 5-(a 6)-karboxyfluorescein (CF), 2',7'-bis-(karboxyethyl)-5-(a 6)-karboxy-fluorescein (BCECF), chlormethylfluorescein (CMF), naftofluorescein (SNARF, SNAFL), azidofluorescein), lišící se od něj hodnotou pK [5 str.197, str.202]. Používaným derivátem pyraninu je 1,3-dihydropyren-6,8-disulfonová kyselina (DHPDS), která se na rozdíl od něj vyznačuje dobrou stabilitou pK [5 str.202]. Mezi další fluorescenční sondy, používané pro měření pH, patří deriváty 7-hydroxykumarinu [5 str.204] nebo 1,4-dihydroxyftalonitril (1,4-DHPN) [5 str.205].

Druhým typem sond jsou tzv. redistribuční fluorescenční sondy. Jelikož po vstupu těchto sond do buněk dochází ke změně jejich fluorescenčních vlastností (např. díky jejich navázání na proteiny či v důsledku zhášení fluorescence), lze změřením změny fluorescenční intenzity určit vnitrobuněčné pH. Nevýhodou této metody je dosud zcela neobjasněný princip zhášení fluorescence uvnitř buněk a také to, že k němu často dochází pouze částečně [5 str.229]. Jako redistribuční sondy lze při měření pH použít například 9-aminoakridin (9AA) nebo 9-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-6-chloro-2-methoxyakridin (atebrin) [5 str.231]. Excitační ani emisní spektra redistribučních sond na pH nezávisí [5 str.230].

Při použití fluorescenční metody k měření vnitřního pH živých buněk nastává problém, jak do nich dostat fluorescenční sondu způsobem, který by je nepoškodil a příliš neovlivnil jejich vlastnosti. Schopnost molekul sondy projít přes cytoplazmatickou membránu je totiž ovlivněna jejich nábojem, velikostí a schopností se vázat na membránové proteiny, samovolně membránou procházejí pouze malé, nenabitě a mírně lipofilní molekuly [5 str.19]. Řešením může být použití tzv. prekurzorů, tj. látek, které dokáží projít membránou a uvnitř buňky se pomocí enzymatické reakce změnit ve fluorescenční sondu, pro kterou je cytoplazmatická membrána nepropustná [5 str.23]. Jako prekurzory jsou často používány estery, které mohou jako elektricky neutrální, lipofilní molekuly snadno projít skrz cytoplazmatickou membránu do buňky, kde jsou následně rozštěpeny esterázami na fluorescenčně aktivní látky [5 str.190]. Molekulám sondy lze vstup do buněk umožnit i tím, že na krátkou chvíli porušíme cytoplazmatickou membránu pomocí mechanických, chemických či elektrických metod [5 str.23]. Potíže při použití fluorescenčních sond může způsobovat i jejich výtok z buněk v důsledku vysoké permeability cytoplazmatické membrány, jejího narušení při vpravování sondy do buňky nebo přenosu molekul sondy pomocí pasivních či aktivních membránových transportních systémů [5 str.30, 11]. Výše zmíněné problémy odpadají při použití fluorescenčních proteinů, jelikož jsou syntetizovány přímo v buňce a podmínky jejich exprese lze regulovat typem plazmidu. Příkladem fluorescenčního proteinu je zelený fluorescenční protein GFP (Green Fluorescent Protein), obsažený v genomu medúzy *Aequorea victoria* [18, 19, 25-27]. Mutant tohoto proteinu, který je citlivý na pH, se označuje jako pHluorin [25]. Jeho hlavní výhodou je v tom, že jeho fluorescenční odpověď na pH je rychlá a dá se měřit poměrově [25, 27], navíc není toxický. Kromě měření pH_i je protein GFP používán i ke zkoumání celé řady důležitých vnitrobuněčných procesů, často se jeho pomocí fluorescenčně značí konkrétní proteiny [25, 26].

Při určování pH_i pomocí NMR je kromě horší dostupnosti metody problémem to, že podmínky těchto měření se většinou neshodují s obvyklými podmínkami růstu bakterií, jelikož je při měření potřeba vysoká hustota buněk [24]. Ke zkoumání pH_i lze použít například rezonanci fosforu ^{31}P [17].

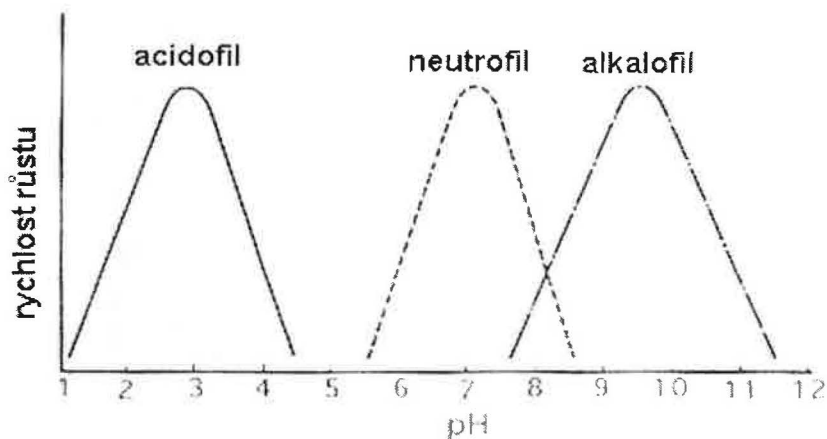
Kapitola 2

Vnitrobuněčné pH

2.1 pH homeostáza a její význam pro buňku. Změny vnitrobuněčného pH

Kontrola a regulace vnitrobuněčného pH patří spolu s regulací osmotického tlaku a buněčného objemu mezi evolučně nejstarší homeostatické funkce [28]. Všechny organismy si své vnitřní pH udržují v úzkém rozmezí hodnot, aby tak zajistily optimální podmínky například pro dýchání, dělení buněk, syntézu proteinů a nukleových kyselin či metabolické procesy a s nimi související činnost cytoplazmatických enzymů [17, 29-31]. Zachovávat si stálé pH_i je pro buňku velmi důležité, jelikož i malé odchylky od jeho optimální hodnoty mohou vést k velkým změnám těchto významných buněčných funkcí [29]. Dle pH_o prostředí, ve kterém se bakterie vyskytují, je lze rozdělit na acidofilní, neutrofilní a alkalofilní (viz. obr. č.2), přičemž každý organismus se v daném prostředí snaží udržet si vnitřní pH blízké neutrálnímu. Regulovaná hodnota pH_i alkalofilních organismů je tedy nižší než hodnota vnějšího pH_o , u acidofilních organismů je tomu naopak. Neexistuje ovšem jediná optimální hodnota pH_i , které by chtěly všechny organismy dosáhnout, také mechanismy regulace pH_i se u jednotlivých organismů liší [11].

Navzdory intenzivnímu výzkumu se doposud u žádné skupiny organismů nepodařilo najít úplný popis všech způsobů kontroly a regulace vnitřního pH [11, 32, 33]. Neznáme ani mechanismy, které buňka využívá k rozpoznání vnějšího pH a svého vnitřního pH, popřípadě gradientu pH, ačkoliv je jasné, že tyto mechanismy musí existovat, má-li buňka být schopna reagovat na pH a jeho změny [34].



Obr.č. 2 – *Závislost rychlosti růstu na vnějším pH pro acidofilní, neutrofilní a alkalofilní bakterie.* Většina bakterií je schopna růst při v rozmezí přibližně tří jednotek pH, všechny tři růstové křivky vykazují osovou symetrii [2].

2.2 Souvislost vnitrobuněčného pH s růstem a metabolismem buňky

Základní životní procesy spojené s růstem a metabolismem jsou významným faktorem, souvisejícím se změnami cytoplazmatického pH. Při narušení pH homeostázy například ustává dělení buněk, ke kterému pak znovu dochází až po jejím opětovném obnovení [31]. Bylo pozorováno, že pH media, ve kterém bakterie rostou, může ovlivnit jejich metabolismus [11, 24]. Nachází-li se buňky v kyselém vnějším prostředí, dochází k dekarboxylaci a ke tvorbě zásaditých aminů, vnější prostředí s vysokým pH vede naopak k deaminaci a fermentaci k produkci kyselin [24, 35]. Bylo ukázáno, že růst *E. coli* na kyselých substrátech vede k neutralizaci media, což svědčí o tom, že její metabolismus spotřebovává protony [11]. Nepřítomnost kyslíku určitým způsobem omezuje metabolické možnosti buňky a navíc má za následek zvýšenou produkci slabých kyselin, vzniklých fermentací. V počátečních stádiích růstu dochází k tvorbě fermentačních produktů i u buněk dobře zásobených kyslíkem [35]. Jelikož ve fermentujících organismech vede produkce těchto fermentačních kyselin a jejich následná akumulace v buňkách k poklesu pH homeostázy, umějí některé organismy přeměňovat tyto kyselé produkty na neutrální [11]. O tom, že u anaerobních organismů fungují dodatečné mechanismy

kontrolující a regulující pH_i , které nejsou aktivní u organismů, rostoucích za přítomnosti kyslíku [35], svědčí například to, že fermentující organismy vykazují větší rozmezí hodnot pH_i , během kterých jsou schopny růstu, než respirující organismy [11]. Typ buněčného metabolismu má vliv i na velikost protonmotivní síly. Ta má u respirujících buněk *E. coli* hodnotu vyšší než 200 mV [11, 16], zatímco u fermentujících buněk nabývá menších hodnot, jelikož se skládá pouze z gradientu pH o velikosti přibližně 70 mV [36].

Kapitola 3

Mechanismy regulace vnitrobuněčného pH

E. coli

3.1 pH homeostáza *E. coli*

E. coli je schopna růst při vnějším pH 5,5 až 9,0 a zachovávat si přitom vnitřní pH v rozmezí od 7,4 do 7,8 [15-17, 24, 34, 37, 38]. Její homeostatický systém se tedy musí umět vypořádat se změnou pH_o směrem k zásaditým i kyselým hodnotám [11, 34]. Buňka si dokáže udržet stabilní pH_i především proto, že cytoplazmatická membrána je relativně nepropustná pro protony, navíc má nízkou permeabilitu i pro kationty obecně. Dalším důvodem stability pH_i je poměrně vysoká pufrační kapacita cytoplazmy [11,39]. Krátkodobé selhání pH homeostázy bylo u rostoucích buněk *E. coli* pozorováno pouze po náhlých velkých skocích v hodnotě vnějšího pH [17, 31] a po přidání slabých kyselin nebo zásad při konstantním pH_o [31].

Mezi hlavní mechanismy umožňující kontrolovaným způsobem zvyšovat či snižovat pH_i patří aktivní transport H^+ a OH^- , jejich biochemická produkce a využití pufrů, obsažených v cytoplazmě [11]. Ke vzniku gradientu pH , směřujícího dovnitř, je třeba, aby bylo z buňky vylučováno víc protonů, než kolik se dostane dovnitř. Tento transport protonů zajišťují především primární protonové pumpy, poháněné

přenosem elektronů (proteiny dýchacího řetězce) nebo hydrolýzou ATP (F-ATPáza) [30, 39]. Protože elektrická kapacita membrány je pouze omezená, musí být pro vznik gradientu pH, směřujícího dovnitř, v buňce akumulovány ještě další pozitivní náboje. Má-li naopak vzniknout gradient pH směřující ven, musí do buňky vstupovat více protonů, než se dostane ven, přičemž musí být vyloučeny i další pozitivní náboje [17]. Základem tvorby gradientu pH je tedy snížení nadměrného membránového potenciálu přítokem kationtů nebo výtokem aniontů [11].

Transport protonů může probíhat i společně s vtokem kationtů prostřednictvím kation-protonových antiporterů. Ty vyměňují kationty uvnitř buněk (především Na^+ a K^+) za vnější protony, což vede k okyselení cytoplazmy [11]. Může však nastat situace, kdy je koncentrace kationtů v buňce tak nízká, že může antiporter fungovat pouze omezeně a je potřeba kationty doplnit, aby mohlo okyselování pokračovat. Musíme proto brát v úvahu spíše oběh kationtů než pouze jejich vylučování [11, 12]. Jelikož je nejdůležitějším buněčným kationtem draslík, je jeho absorpce, mající za následek výtok protonů z buňky, zřejmě významným faktorem způsobujícím zvyšování pH_i [10, 12, 16, 24, 40, 41]. Podobně lze očekávat, že faktory, které stimulují transport draslíku (např. zvýšení osmotického tlaku), mohou dočasně ovlivnit i pH_i [11]. Obecně platí, že antiportní systémy podílející se na pH homeostáze by měly být vybaveny senzorem, zjišťujícím hodnoty vnějšího a vnitřního pH. Musejí být také schopny reagovat na tyto informace konformačními změnami své struktury, vedoucími ke změně jejich aktivity [24, 42]. Ta ve většině případů roste exponenciálně s tím, jak se cytoplazmatické pH vzdaluje od optimální hodnoty [29].

Dalším procesem, majícím za následek změnu pH_i , je produkce kyselin a solí v cytoplazmě, která může snižovat či zvyšovat vnitrobuněčné pH v závislosti na typu metabolismu a druhu živin [30, 35, 38]. V omezené míře dokáží změny pH vyrovnat i cytoplazmatické pufrý [11, 39], přičemž pufrční kapacita cytoplazmy je u všech organismů velmi podobná a nezávisí na typu jejich metabolismu ani na rozmezí pH, vhodného k růstu [11].

3.2 Mechanismus pH homeostázy v zásaditém vnějším prostředí

Porozumění mechanismům, které umožňují bakteriím přežít a růst v zásaditém vnějším prostředí, má význam pro epidemiologii patogenních bakterií, průmyslovou výrobu i ekologii [24, 38]. Životu v tomto prostředí se bakterie přizpůsobovaly například zvětšením počtu či aktivity transportních systémů a enzymů, které zvyšují příjem protonů, změnami metabolismu vedoucími k produkci kyselin a změnami buněčného povrchu, jež přispívají k udržení protonů uvnitř buňky [24].

Překročí-li vnější pH_o hodnotu 7,8, snaží se buňka okyselovat svou cytoplazmu přijímáním protonů výměnou za vnitřní kationy, přičemž využívá především sodík-protonový a draslík-protonový antiporter [11, 12, 16, 34]. Především tyto dva antiportní systémy totiž umožňují výměnu membránového potenciálu za gradient pH [12]. Buňka se také začne snažit udržet přijaté protony uvnitř cytoplazmy, například pomocí syntézy ATP [24].

K^+ je hlavním cytoplazmatickým kationtem rostoucích bakteriálních buněk [40], jeho koncentrace v buňce se pohybuje od 300 mM do 500 mM [41]. Hraje důležitou roli při aktivaci některých enzymů [39,40], udržování správného osmotického tlaku [40, 41, 43] a v neposlední řadě i při regulaci vnitrobuněčného pH [10, 12, 16, 24, 40, 41]. Draslík-protonový antiporter KHA umožňuje buňce zbavit se vnitrobuněčných iontů K^+ výměnou za vnější protony. Tato výměna probíhá v poměru 1:1, což znamená, že antiporter je elektroneutrální [10]. Optimální aktivitu vykazuje draslík-protonový antiporter při pH 7,2 až 8,2, klesne-li pH pod 7,0, je jeho aktivita značně omezena [10, 12]. Kromě draslíku může antiporter zřejmě vyměňovat protony i za další jednomocné kationy, například Na^+ nebo Rb^+ . Jelikož v buňce existuje dost výkonných mechanismů pro příjem draslíku, hlídajících, aby jeho koncentrace byla vždy vyšší uvnitř buňky než v jejím okolí [10], je hlavní funkcí draslík-protonového antiportneru zřejmě regulace vnitrobuněčného pH [10-12]. Tuto domněnku potvrzuje například to, že po vložení do zásaditého prostředí začnou buňky vylučovat draslík. Bylo také ukázáno, že ačkoliv po přidání draslíku do buněk zůstávala protonová hybná síla přibližně konstantní, došlo ke změnám velikostí membránového potenciálu a gradientu pH [12]. Úkolem draslík-protonového antiportneru je tedy okyselovat vnitřek buněk, inkubovaných při zásaditém pH_o , a

zabránit nadměrné alkalizaci dýchajících buněk, u nichž dochází vlivem vylučování protonů dýchacím řetězcem ke zvyšování vnitrobuněčného pH. Tyto protony se tedy mohou pomocí draslík-protonového antiporteru vrátit zpět do buňky [16].

V *E. coli* se nacházejí dva antiportery, které jsou schopny vyměňovat Na^+ nebo Li^+ za H^+ - EcNhaA [24, 35, 42, 44] a EcNhaB [44]. Dalším podobným antiporterem je ChaA, který zprostředkovává výměnu H^+ za Ca^{2+} a Na^+ [10, 44]. Pro pH homeostázu je nejdůležitějším z nich antiport EcNhaA [42, 44]. Účastní se regulace vnitrobuněčného pH [24, 42, 44], obsahu sodíku v buňkách a buněčného objemu [44]. Navíc je nepostradatelný pro růst při zásaditém pH za přítomnosti Na^+ [24, 42, 44], umožňuje buňce se vyrovnat s přítomností pro ni toxického kationu Li^+ [42, 44] a přežít ve slaném prostředí. Nejvýznačnější vlastností tohoto antiporteru je výrazná závislost jeho aktivity na pH – při pH nižším než 6,5 nevykazuje žádnou aktivitu, v rozmezí pH 6,5 až 8,5 vzroste jeho aktivita o tři řády a při pH vyšším než 9,0 se již dále nemění. Jelikož EcNhaA vyměňuje H^+ za Na^+ v poměru 2:1, je při každé výměně přenášen i jeden kladný náboj a antiporter je tedy elektrogenní [24, 42, 44]. Díky tomu, že počet protonů, které se elektrogenním sodík-protonovým antiporterem dostanou do buňky, je větší než počet vyloučených iontů Na^+ , dochází k toku kladných nábojů do buňky. Bylo prokázáno, že ačkoliv antiporter EcNhaA podporuje schopnost růstu *E. coli* při zásaditém pH za přítomnosti Na^+ , druhý sodík-protonový antiporter, EcNhaB, se touto schopností nevyznačuje. Lze předpokládat, že to souvisí s mírně se lišící elektrogenicitou uvedených antiporterů, EcNhaB totiž vyměňuje protony za sodíkové kationy v poměru 1,5:1. Nabývá-li vnější pH hodnot nižších než 9, hraje hlavní roli při zásadité pH homeostáze antiport EcNhaA. Překročí-li však vnější pH_o uvedenou hodnotu, nebo upravíme-li geneticky bakteriální buňku tak, že se v její cytoplasmatické membráně EcNhaA nenachází, přebírá tuto roli transportér EcMdfA, díky kterému si buňka dokáže zachovat konstantní hodnotu pH_i až do pH_o 10. Narozdíl od EcNhaA umožňuje totiž EcMdfA vyměňovat za protony nejenom sodné, ale i draselné ionty a může tudíž využívat i gradient K^+ , směřující ven z buňky [24]. Senzorem, pomocí něhož dokáže EcNhaA rozpoznat vnější pH, je N-konec helixu IX [45]. Ten dává povel ke konformačním změnám antiportu, vedoucím ke zvýšení či snížení jeho aktivity [24, 42, 44].

Nemůžeme vyloučit ani to, že na zásadité pH homeostáze *E. coli* mají podíl i jiné, doposud pouze málo prozkoumané transportní systémy. Problémem při jejich identifikaci je souvislost stresu, do kterého se bakterie dostane v zásaditém vnějším

prostředí, s dalšími stresujícími okolnostmi. Se zvyšujícím se vnějším pH se například zvyšuje toxicita Na^+ , která navíc závisí i na vnitrobuněčné koncentraci draslíku. Zásadité vnější pH může souviset i se stresem vyvolaným vysokou teplotou. Ta totiž u mnoha bakterií více změní propustnost buněčné stěny pro protony než pro ionty Na^+ . Zásaditý stres má souvislost i se změnami osmotického tlaku uvnitř buňky, jelikož řada jednomocných kation-protonových antiporterů hraje roli právě při jeho regulaci. Zásadité pH_o je stresující i pro enzymy, zajišťující syntézu buněčné stěny. Díky uvedeným souvislostem není vždy jednoduché určit, je-li zkoumaný mechanismus součástí pH homeostatického systému, nebo odpovídá-li na jiné stresující vnější vlivy [24].

3.3 Mechanismus pH homeostázy v kyselém vnějším prostředí

Schopnost vyrovnat se s kyselým vnějším prostředím umožňuje *E. coli* především přežít v trávicím traktu svého hostitele [38, 46-54], kde se může setkat jak s extrémně kyselým prostředím (pH_o menší než 3), tak s přítomností slabých kyselin [48, 55]. Jelikož jsou slabé kyseliny používány jako konzervační látky, má výzkum kyselého pH homeostázy bakterií význam i v potravinářském průmyslu [32, 39, 53, 55-58]. Na rozdíl od silných kyselin mohou slabé kyseliny ve své nenabitě formě volně procházet přes cytoplazmatickou membránu a následně disociovat uvnitř buňky, čímž dochází ke zvýšení počtu protonů v cytoplazmě a tím ke snížení vnitrobuněčného pH [39, 43, 59]. Anionty, vzniklé v buňce, navíc vedou ke zvýšení osmotického tlaku, což může společně s nízkým pH_i vést k zastavení růstu buněk [43].

Ačkoliv při vnějším pH nižším než 4,4 už není *E. coli* schopna růstu, dokáže přežít i při vnějším pH 2 [37, 47-49, 51, 54]. K tomu, aby si dokázala udržet stálou hodnotu svého vnitřního pH i v tomto kyselém vnějším prostředí, jí slouží tři geneticky a fyziologicky rozdílné systémy [32, 33, 46-48, 51, 53-55, 59], z nichž každý dosahuje maximální aktivity za jiných podmínek [33, 37, 48, 53]. Rozhodující jsou zde především vnější podmínky růstu buněk [53], jako například přítomnost kyslíku či koncentrace okolních iontů [37]. První z těchto systémů vyžaduje v médiu

přítomnost argininu [33, 47, 48, 50, 51, 53, 55, 59] a dle [33] je aktivní jen ve stacionární fázi buněk, druhý systém potřebuje glutamát [33, 47, 48, 50-53, 55, 59]. Činnost těchto dvou systémů je založena na tom, že spotřebuje-li buňka za nízkého vnitrobuněčného pH pomocí dekarboxylace příslušné aminokyseliny proton, dojde pomocí membránových antiportů k výměně vzniklých produktů za další aminokyseliny [47, 48, 50, 54]. Zmíněnými antiporty jsou arginin-agmatinový antiport, vyměňující vnitrobuněčný agmatin vzniklý dekarboxylací argininu za vnější arginin v poměru 2:1, a antiport, vyměňující vnější glutamát za vnitrobuněčnou γ -aminomáselnou kyselinu vznikající jeho dekarboxylací [47, 48, 50]. Protony, které se dostanou za kyselého vnějšího pH do buňky, jsou tedy pomocí popsaných mechanismů spotřebovávány a vylučovány ven, čímž je zabraňováno poklesu vnitřního pH [33, 48]. Měření membránového potenciálu $\Delta\Psi$ nasvědčují tomu, že tyto dva systémy rovněž pomáhají měnit polaritu $\Delta\Psi$ (z negativní na pozitivní), což snižuje protonmotivní sílu a zabraňuje poklesu pH_i . Tuto strategii používají pro přežití v kyselém vnějším prostředí i acidofilní organismy [54]. První dva výše popsané systémy se uplatňují u fermentujících buněk [50, 51]. Třetí systém, nazývaný oxidativní [33, 47-51, 53, 55], není schopen fungovat za přítomnosti glukózy [33, 53, 59] a po svém aktivování nevyžaduje přítomnost aminokyselin v médiu [59]. Jeho činnost byla pozorována pouze u dýchajících buněk [55] a je schopen regulovat pH i ve stacionární fázi růstu [53, 54, 59]. Jak tento systém dokáže buňku chránit před vlivy kyselého vnějšího prostředí nevíme [33, 46, 48, 54]. Systém závislý na glutamátu je ze všech tří systémů nejefektivnější při regulaci pH_i za přítomnosti slabých kyselin. Při extrémních podmínkách, tj. při vnějším pH 2,5, zůstává stále nejefektivnějším systémem ten vyžadující glutamát, následován systémem vyžadujícím arginin a oxidativním systémem. Při pH_o 2,0 už vykazují činnost pouze první dva systémy [55], přičemž nejefektivnějším stále zůstává systém závislý na glutamátu [48]. Zdá se, že sodík-protonový a draslík-protonový antiporter k regulaci vnitřního pH za extrémně kyselých vnějších podmínek nepřispívají. S pH_o 3 se *E. coli* dokáže vyrovnat i bez použití systémů požadujících glutamát či arginin [51]. Dle [47] jsou všechny tři výše popsané systémy, zajišťující buňce regulaci vnitrobuněčného pH v kyselém vnějším prostředí, aktivní pouze ve stacionární fázi růstu.

Bylo prokázáno, že růst v mírně kyselém vnějším prostředí či dočasné vystavení kyselému vnějšmu prostředí snižuje odolnost bakterií vůči vysokému vnějšmu pH a naopak zvyšuje jejich schopnost vyrovnat se s nízkým pH [39, 56, 59, 60]. Tuto odolnost posiluje i růst buněk za nedostatku živin. Ten totiž vyvolává syntézu proteinů, chránících buňku před řadou nepříznivých vnějších vlivů [32]. Jakmile byly jednou systémy umožňující bakterii přežít při kyselém vnějším pH aktivovány, neklesne jejich aktivita ani po dlouhodobém skladování v chladu [55, 56]. Bakterie, obsažené v jídle, tedy stále mohou přežít v trávicím traktu a způsobit onemocnění [55]. Jsou-li ovšem buňky vystaveny působení extrémně kyselého vnějšího prostředí příliš dlouho, dojde k postupnému narušení jejich pH homeostázy [17]. Jelikož k syntéze proteinů v *E. coli* zřejmě nedochází při teplotách nižších než 8°C, měla by inkubace buněk při těchto teplotách zabránit vzniku proteinů, odpovědných za schopnost buňky vyrovnat se s kyselými vnějšími podmínkami [32].

Kapitola 4

Experimentální část

4.1 Použitá metoda a postup měření

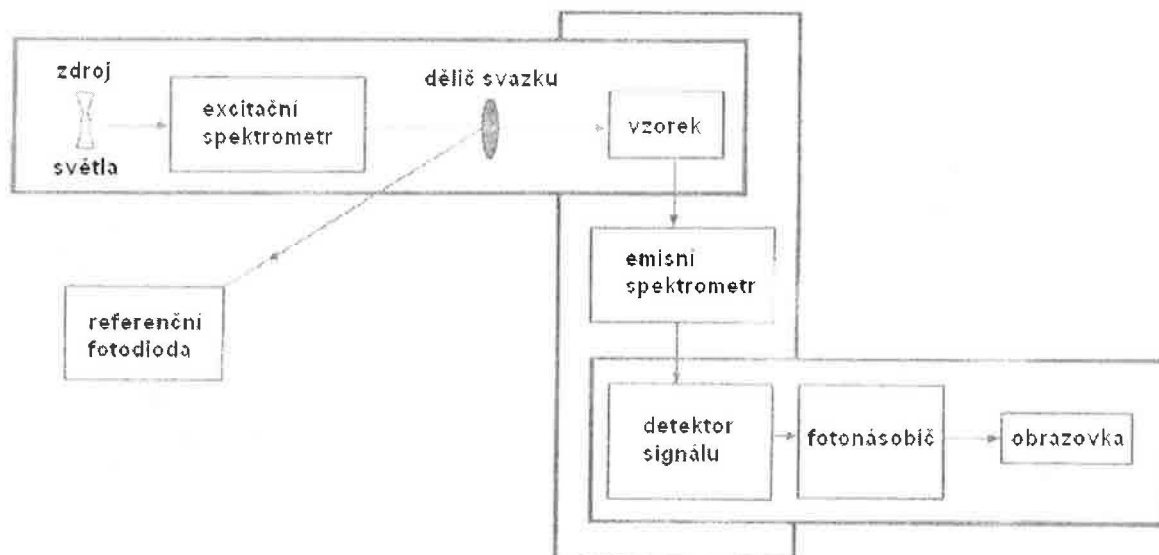
Jelikož se laboratoř zabývá výzkumem symporteru MntH, který přenáší protony společně s dvojmocnými kovy, používali jsme při měření vnitrobuněčného pH bakteriální kmen totožný s pokusy, v nichž se tento transport měří. Jedná se o kmen *E. coli* DH11S *mntH* (s deletovaným genem pro MntH) rezistentní na kanamycin, transformovaný plazmidem pGBM6-pHL, nesoucím gen pro pHluorin a zajišťujícím rezistenci na spectinomycin, a plazmidem pBAD s genem pro MntH, který zároveň nese gen pro rezistenci na ampicillin. Expresí pHluorinu je konstitutivní (není ji třeba indukovat), expresí *MNTH* z plazmidu je třeba indukovat přidáním arabinosy.

Ke kultivaci bakterií jsme použili kultivační médium Luria Bertani (LB), obsahující 1% Bacto-trypton, 0,5% Bacto-yeast extract a 0,5% NaCl (s 1,5% bacto-

agarem pro pevné médium). Do pevného média jsme přidali 0,015% kanamycinu, 0,05% ampicillinu a 0,05% spectinomycinu.

Do 2 ml kultivačního média LB jsme pomocí očkovací kličky zaočkovali jednu kolonii z misky a nechali třepat přes noc při teplotě 37°C. Následující den jsme suspenzi zředili stokrát do většího objemu. Po dalších dvou hodinách třepání jsme přidali 0,06% L-arabinosu, načež jsme nechali vzniklý roztok třepat ještě jednu hodinu.

Při měření jsme používali čtyři typy pufrů (pufr s 50 mM Na₂HPO₄ bez obsahu draslíku, pufr s 50 mM K₂HPO₄, neobsahující sodík, dále pufr s 33 mM Na₂HPO₄ a 17 mM K₂HPO₄ a pufr s 33 mM K₂HPO₄ a 17 mM Na₂HPO₄), jejichž pH jsme nastavovali přidáváním kyseliny citronové. Ve vybraném pufru jsme bakterie dvakrát promyli, centrifugaci jsme prováděli po dobu jedné minuty rychlostí 10 000 otáček za minutu. Vzniklou suspenzi jsme smíchali s příslušným pufrem tak, abychom dosáhli celkového objemu 3 ml a optické hustoty při 600 nm 0,2. Tu jsme určovali digitálním přístrojem Novaspec III. Pomocí fluorometru Fluoromax-2 jsme měřili poměr intenzit emise pHluorinu (u 520 nm) při dvou různých excitačních vlnových délkách (410 nm a 470 nm) a excitační a emisní spektrum pHluorinu. Při poměrovém měření intenzit jsme naměřené hodnoty průměrovali přes časový interval 3-5 minut. Schéma použitého fluorometru je na obr. č.3. Jeho základními částmi jsou zdroj excitačního světla (xenonová výbojka), místo pro umístění kyvety se vzorkem a detektor (fotonásobič pracující v režimu čítání jednotlivých fotonů). Ke změně excitační a emisní vlnové délky slouží excitační a emisní mřížkový monochromátor [5 str.71]. Naměřená fluorescenční intenzita vyjadřuje počet kvant záření emitovaných při určité vlnové délce za jednotku času [5 str.72].

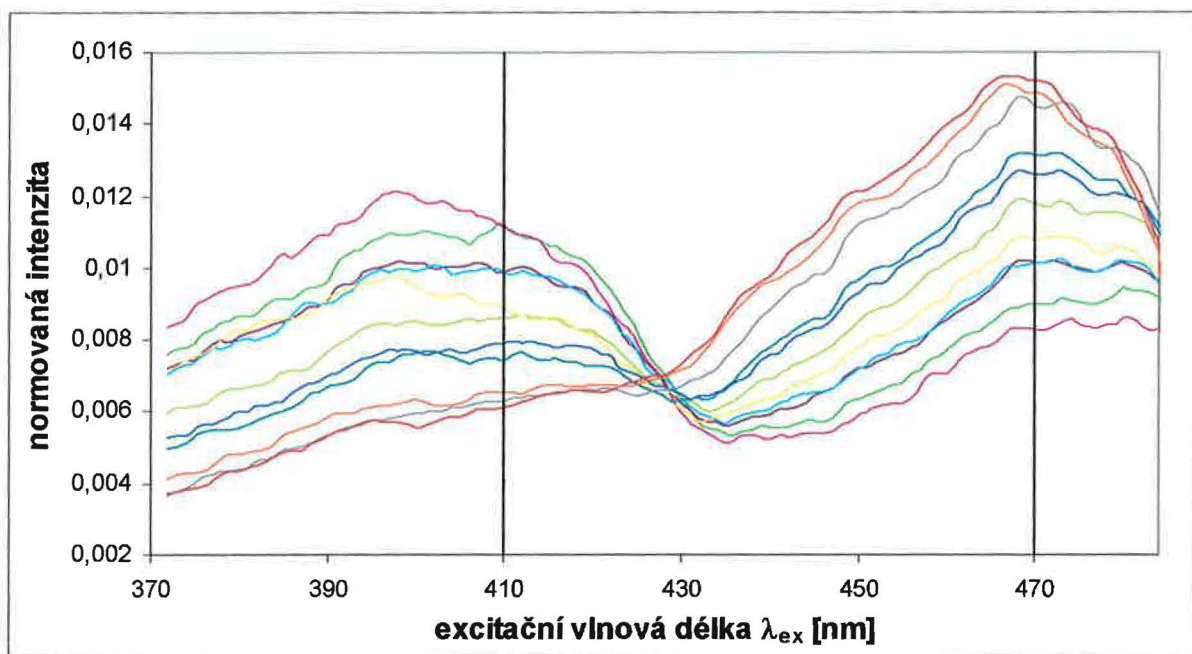


Obr. č.3 – Schéma fluorometru Fluoromax-2.

4.2 Výsledky měření a diskuze

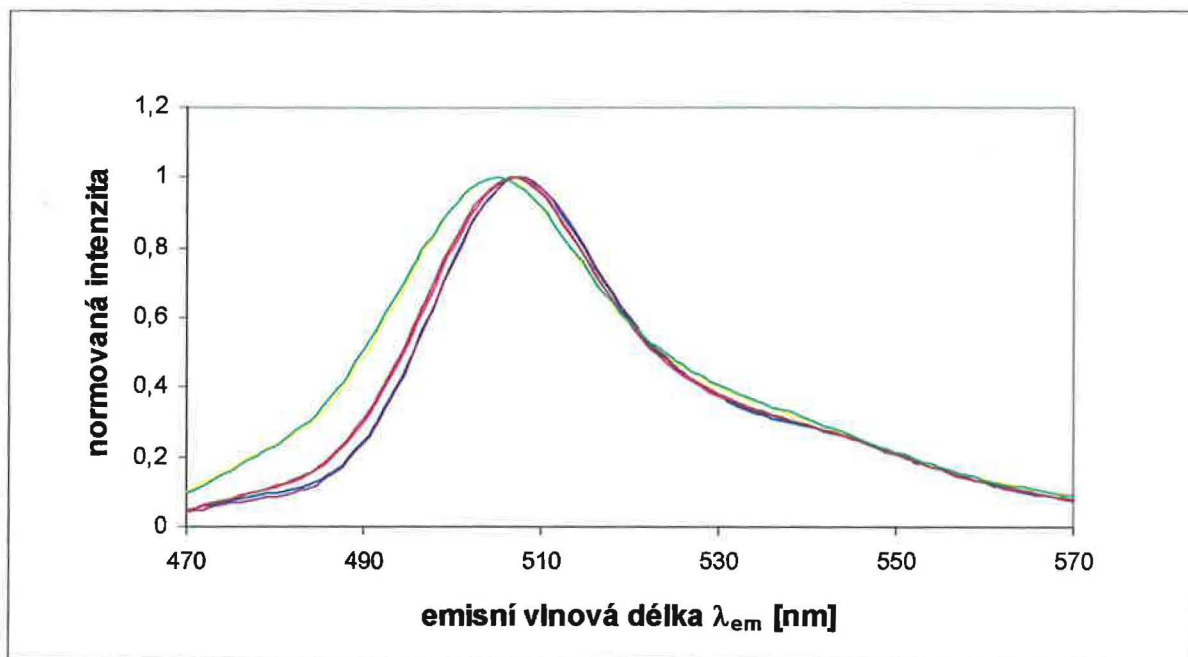
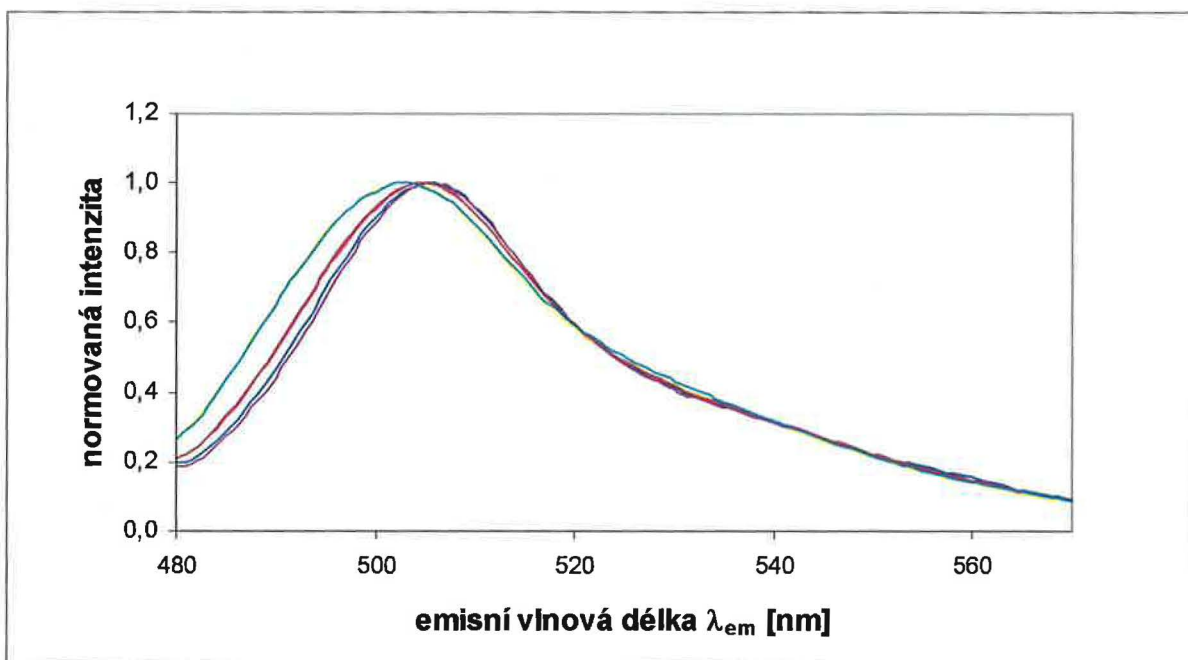
4.2.1 Fluorescence pHluorinu

Při měření spekter pHluorinu v bakteriích jsme použili pufrů s 50 mM Na_2HPO_4 a 50 mM K_2HPO_4 o různém pH, přičemž vyrovnání vnějšího a vnitřního pH jsme dosáhli přidáním protonoforu karbonylkyanid-m-chlorfenylhydrazonu (dále CCCP) [61]. V naměřené sadě excitačních spekter (graf č.1) vidíme příspěvky dvou spektrálních pásů, které odpovídají protonované a deprotonované formě pHluorinu [62]. O tom svědčí i existence izobestického bodu, kterému přísluší excitační vlnová délka 428 nm. Maxima jednotlivých pásů jsou při excitačních vlnových délkách okolo 400 nm (deprotonovaná forma) a 470 nm (protonovaná forma).

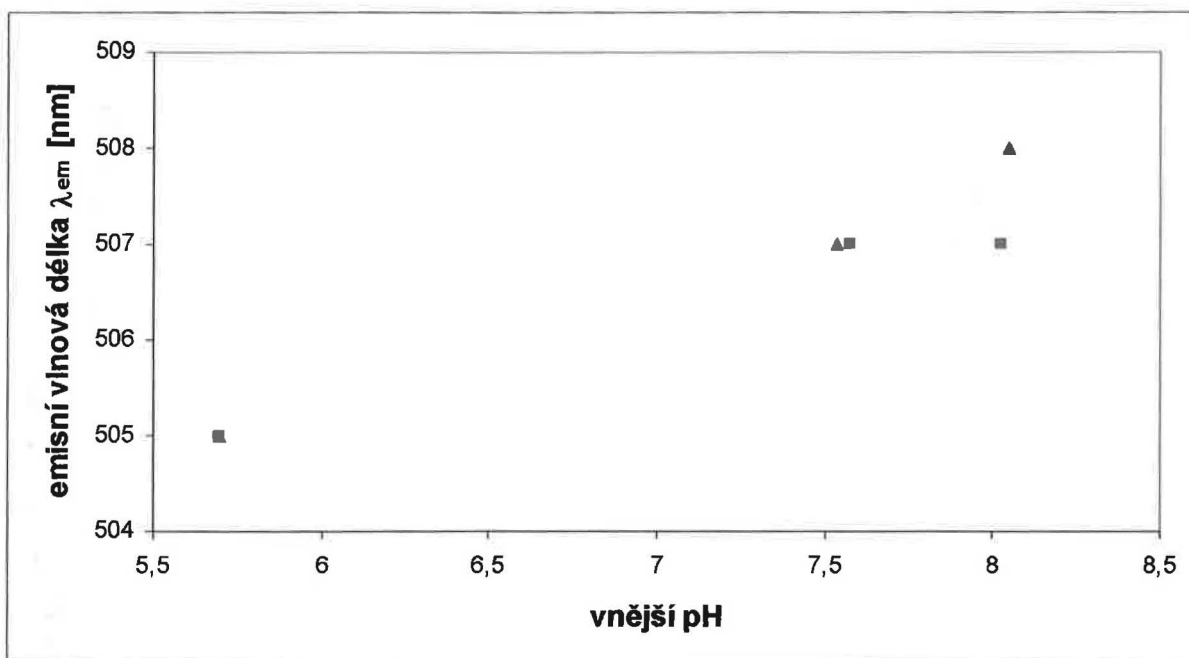


Graf č.1 – Excitační spektrum pHluorinu. Na svislé ose je vynesena intenzita, normovaná na plochu pod spektrem. Dvěma svislými čarami jsou označeny excitační vlnové délky, při kterých jsme měřili fluorescenční intenzitu pHluorinu během měření vnitřního pH. Excitační spektra jsme měřili na vzorcích: — pH 8,03, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 8,05, 50 mM K₂HPO₄, — pH 7,58, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 7,54, 50 mM K₂HPO₄, — pH 7,09, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 7,07, 50 mM K₂HPO₄, — pH 6,65, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 6,67, 50 mM K₂HPO₄, — pH 6,09, 50 mM K₂HPO₄, — pH 5,70, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 5,70, 50 mM K₂HPO₄. Do všech vzorků jsme přidali 20 μM CCCP.

Emisní spektra pHluorinu v bakteriích (graf č.2) jsme měřili pro dvě excitační vlnové délky (410 nm a 470 nm) na vzorcích s 50 mM Na₂HPO₄ a 50 mM K₂HPO₄ o různých hodnotách pH. Pro vyrovnání vnitřního a vnějšího pH jsme do vzorků přidali CCCP. Je vidět, že pro určitou excitační vlnovou délku a hodnotu pH nezávisí tvar emisních spektrálních pásů na přítomnosti kationtů draslíku a sodíku v pufru. Jelikož s klesajícím pH dochází k mírnému rozšíření spektrálních pásů, nemají před dosažením maximální intenzity fluorescenčního záření všechny shodný průběh, zatímco v červené části spektra mají téměř stejný tvar nezávisle na pH. S klesajícím pH lze pozorovat mírný posun polohy maxima spektrálních pásů ke kratším vlnovým délkám (graf č.3).

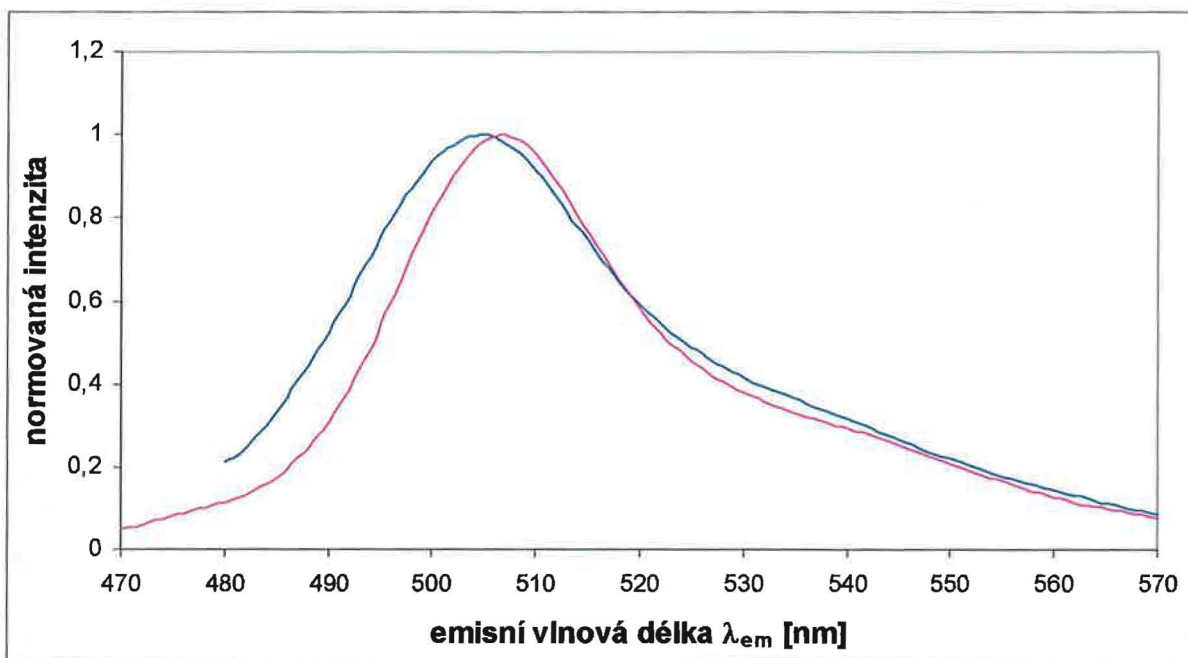
A**B**

Graf č.2 - Emisní spektra pHluorinu při excitační vlnové délce 410 nm (A) a 470 nm (B). Na svislé ose je vynesena intenzita, normovaná podle intenzity v maximu. Obě sady emisních spekter jsme měřili na vzorcích: — pH 8,03, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 8,05, 50 mM K₂HPO₄, — pH 7,09, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 7,07, 50 mM K₂HPO₄, — pH 5,70, 50 mM Na₂HPO₄, — pH 5,70, 50 mM K₂HPO₄. Do vzorků jsme přidali 20 μM CCCP.



Graf č.3 – Závislost emisní vlnové délky odpovídající maximu emisního spektrálního pásu pHluorinu na pH při excitační vlnové délce 410 nm. K měření jsme použili pufr s ▲ 50 mM K₂HPO₄ a ■ 50 mM Na₂HPO₄, do vzorků jsme přidali 20 μM CCCP.

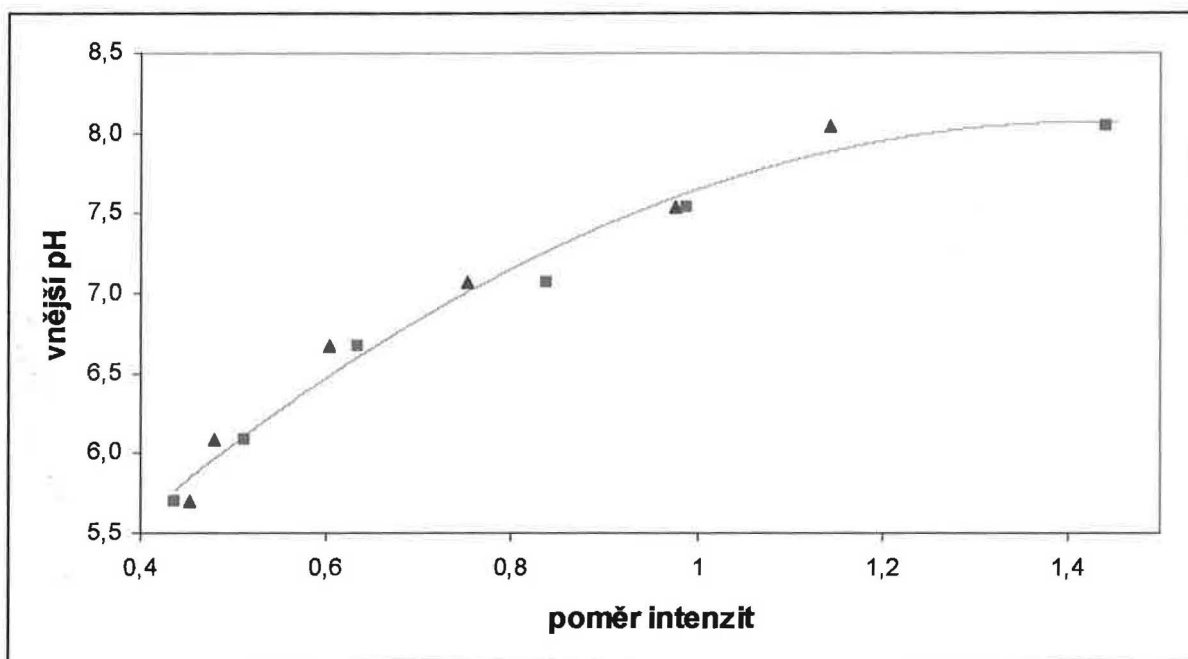
Srovnáme-li emisní spektra pHluorinu pro různé excitační vlnové délky (410 nm pro excitaci deprotonované formy a 470 nm pro excitaci deprotonované formy), zjistíme, že se mírně liší (graf č.4). Pro spektrální pás naměřený při excitační vlnové délce 470 nm platí, že jeho šířka je větší než šířka pásu získaného při excitační vlnové délce 410 nm a jeho maximum je vůči maximu intenzity druhého pásu posunuto ke kratším vlnovým délkám.



Graf č.4 – Porovnání tvaru emisních spekter pro dvě různé hodnoty excitační vlnové délky. K měření jsme použili pufr o pH 7,07, obsahující 50 mM K₂HPO₄ a 20 μM CCCP. Spektrální čáry jsme získali pro excitační vlnovou délku — 410 nm a — 470 nm.

4.2.2 Kalibrace fluorescence pHluorinu

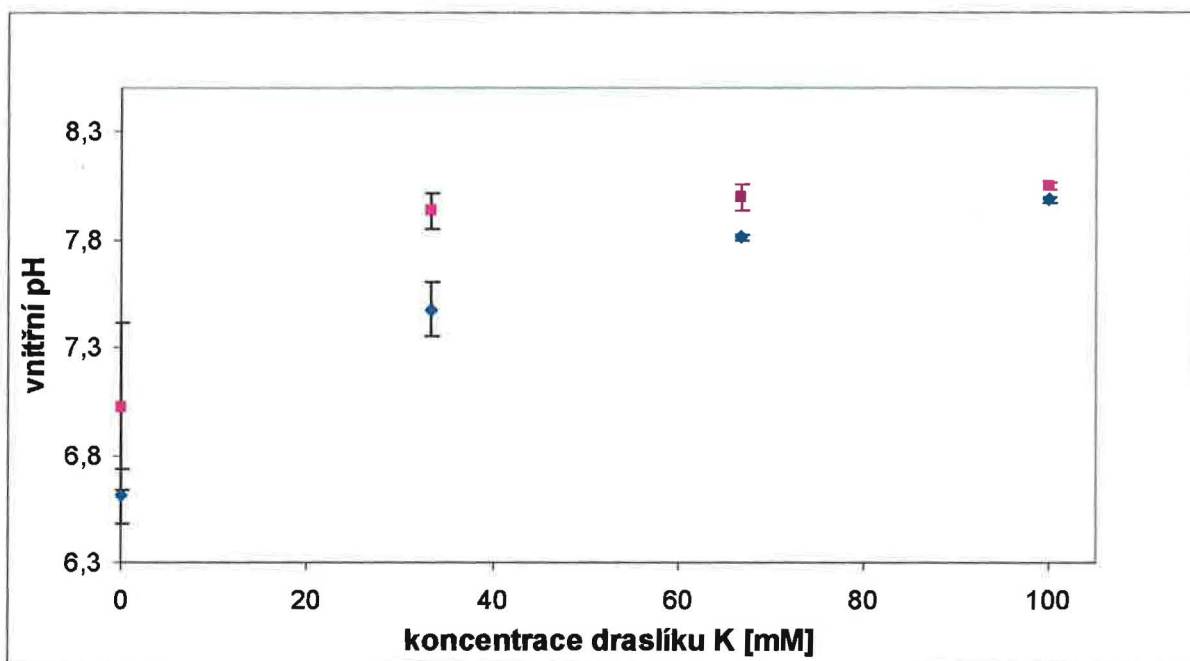
Pro měření pH byl použit poměr fluorescenčních intenzit změřených při dvou excitačních vlnových délkách (410 nm a 470 nm) pro emisní vlnovou délku 520 nm, při níž se protínají emisní spektra dvou forem pHluorinu. Kalibrační křivku ukazuje graf č.5, sada vzorků je totožná s grafem č.1. Kalibrační vztah jsme získali aproximací závislosti poměru fluorescenčních intenzit na pH polynomem druhého řádu ve tvaru $y = -2,4x^2 + 6,8x + 3,3$. Tento vztah jsme použili při zpracování všech dále uvedených výsledků měření. Lineární kalibrace fluorescence pHluorinu, naměřená r. 2004 v Praze ve tvaru $y = 0,6x - 3,3$, se od námi získané kalibrace odlišuje zejména v oblasti nízkých hodnot pH, kde pro daný poměr intenzit dává menší pH.



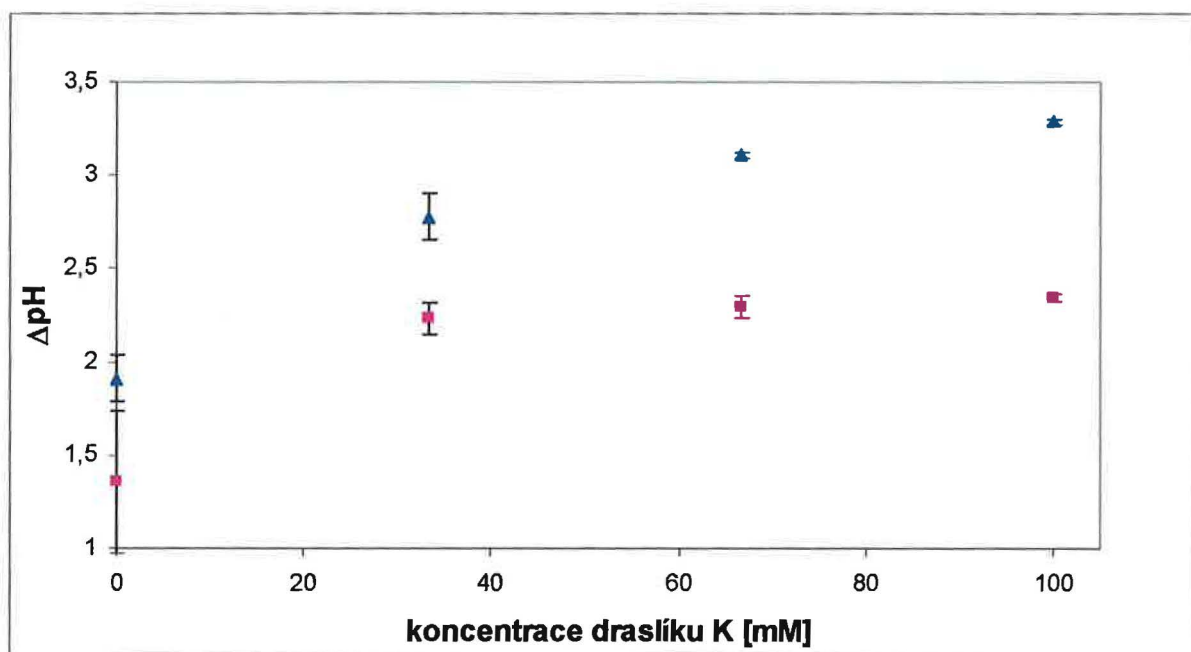
Graf č.5 – *Kalibrace pHluorinu*. K měření jsme použili pufrы s ▲ 50 mM K_2HPO_4 a ■ 50 mM Na_2HPO_4 , do vzorků jsme přidali 20 μ M CCCP. Naměřenou závislost jsme aproximovali — polynomem druhého řádu ve tvaru $y = -2,4x^2 + 6,8x + 3,3$.

4.2.3 Vnitřní pH bakterií

V experimentech jsme se zaměřili na regulaci vnitřního pH za podmínek kyselého stresu (tj. vnější pH bylo nižší než je optimální hodnota pH_i). Bakterie byly inkubovány ve vybraných pufrách řádově desítky minut (za aerobních podmínek - středně intenzivního míchání). Následující grafy ukazují výsledky měření vnitřního pH bakterií pro různé koncentrace draselných a sodných iontů v pufru a různé hodnoty vnějšího pH. Z grafu č.6 je vidět, že s rostoucí koncentrací draslíku v pufru se zvyšuje schopnost bakterií udržet si vyšší vnitrobuněčné pH. Pro pufr s pH_o 5,7 nabývá pH_i vždy větší hodnoty než pro pufr pH_o 4,7. Rozdíl těchto dvou hodnot se však se zvyšující koncentrací draslíku zmenšuje. Se zvětšující se koncentrací draslíku v pufru roste i gradient pH, který naopak nabývá větších hodnot pro pufr s pH 4,7 (graf č.7).

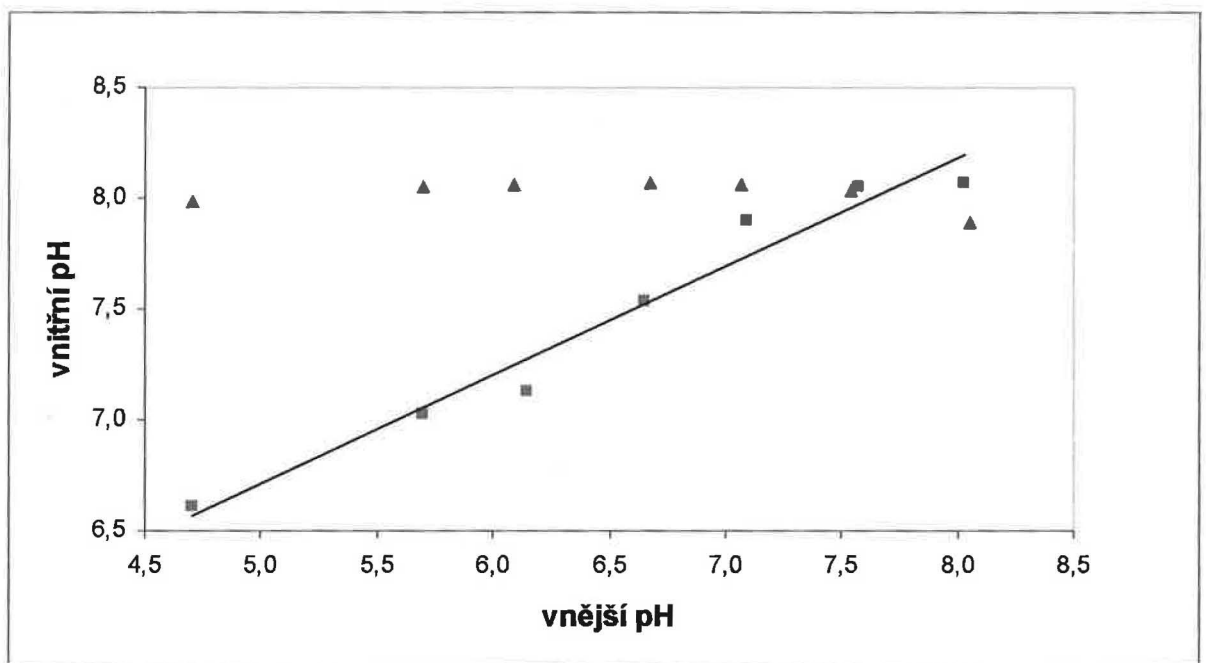


Graf č.6 - Závislost vnitrobuněčného pH na koncentraci draslíku v pufru. K měření jsme použili pufrы o ▲ pH 4,7 a ■ pH 5,7. Každý ze znázorněných bodů jsme získali jako aritmetický průměr čtyř naměřených hodnot, uvedenou chybu jsme spočítali jako jejich směrodatnou odchylku.



Graf č.7 - Závislost gradientu pH na koncentraci draslíku v pufru. Gradient pH jsme počítali jako rozdíl vnitrobuněčného a vnějšího pH. K měření jsme použili pufrы o pH ▲ 4,7 a ■ pH 5,7. Znázorněná chyba představuje směrodatnou odchylku čtyř naměřených hodnot vnitřního pH.

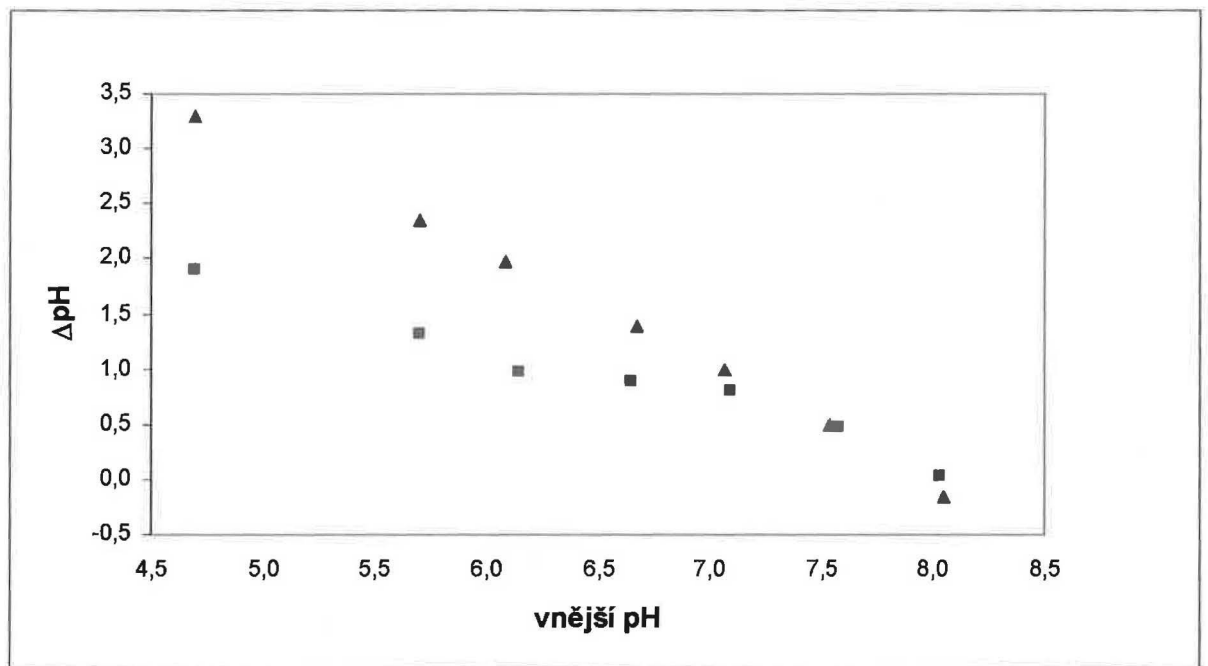
Zatímco v přítomnosti draslíku (100 mM) v okolí si buňka při vnějším pH 4,7 až 8,0 dokáže udržet stálou hodnotu vnitrobuněčného pH (přibližně 8,0) nezávisle na pH tohoto pufru, v přítomnosti sodíku (100 mM) vnitrobuněčné pH se zvyšujícím se pH_o roste (od 6,5 při pH_o 4,7 do 8,0 při pH_o 8,0) až ke stejné optimální hodnotě, jako v prvním případě (graf č.8). Za přítomnosti draslíku ve vnějším prostředí se tedy buňka dokáže s nízkým pH_o vyrovnat daleko lépe než v případě, že se v pufru nacházejí pouze sodíkové ionty. Obě námi naměřené závislosti vnitrobuněčného pH na vnějším pH jsou ve velmi dobrém souladu s výsledky měření, které jsou uvedeny v člancích [13, 15, 34, 36, 63].



Graf č.8 - Závislost vnitřního pH na pH pufru. K měření jsme použili pufrы s \blacktriangle 50 mM K_2HPO_4 a \blacksquare 50 mM Na_2HPO_4 . Závislostí vnitřního pH na vnějším pH pufru s 50 mM Na_2HPO_4 jsme proložili regresní přímkou ve tvaru $pH_i = 0,5 pH_o + 4,3$.

Jak ukazuje graf č.9, nejstrmější tvar má závislost gradientu pH na vnějším pH pro pufr s 50 mM K_2HPO_4 . Gradient pH nejprve nabývá hodnoty téměř 3,5, s rostoucím vnějším pH se pak postupně snižuje, až je jeho hodnota přibližně rovna nule. Přepočítáním gradientu pH na mV podle převodního vztahu (2) zjistíme, že při pH_o 4,7 nabývá ΔpH hodnoty asi 200 mV, což je přibližná velikost Δp bakteriálních buněk. Vzhledem k publikovaným hodnotám Δp [11, 16] to potvrzuje, že při nízkém

pH je protonmotivní síla tvořena převážně gradientem pH. V nepřítomnosti draselných iontů si buňka není schopna udržet tak velký gradient pH, který v pufru s 50 mM Na_2HPO_4 nabývá nejprve téměř poloviční hodnoty gradientu v pufru obsahujícím 50 mM K_2HPO_4 . Tento jejich rozdíl se však s rostoucím vnějším pH postupně snižuje, až se při vnějším pH přibližně 8,0 oba setkají na nulové hodnotě. Naměřená závislost gradientu pH na vnějším pH se shoduje s výsledky měření z článků [15, 17, 36]. Také vnější pH, při kterém poklesne gradient pH na nulu, souhlasí s hodnotou 7,5 až 8,0, uvedenou v [17].



Graf č.9 - Závislost gradientu pH na pH pufru. K měření jsme použili pufrы s \blacktriangle 50 mM K_2HPO_4 a \blacksquare 50 mM Na_2HPO_4 . Gradient pH jsme spočetli jako rozdíl vnitřního a vnějšího pH.

Kapitola 5

Závěr

5.1 Regulace vnitrobuněčného pH *E. coli*

Výzkum pH homeostázy *E. coli* má význam v lékařství, v potravinářském průmyslu i ekologii [2]. Navzdory intenzivnímu úsilí se však doposud nepodařilo objasnit všechny mechanismy, které tento organismus používá k regulaci svého vnitrobuněčného pH [11, 32, 33]. *E. coli* patří mezi neutrofilní organismy a je tudíž schopna růst při vnějším pH 5,5 až 9,0 a zachovávat si přitom vnitřní pH v rozmezí od 7,4 do 7,8 [15-17, 24, 34, 37, 38]. Mezi hlavní mechanismy regulace jejího cytoplazmatického pH patří aktivní transport protonů, uskutečňovaný pomocí primárních protonových pump a antiportních transportních systémů, produkce kyselin a zásad spojená s metabolismem a využití cytoplasmických pufrů [11]. Pro zásaditou pH homeostázu mají největší význam draslík-protonový a sodík-protonový antiporter [11, 12, 16, 34], nemůžeme však vyloučit ani vliv dalších, doposud málo prozkoumaných transportních systémů [24]. Regulaci vnitrobuněčného pH v kyselém vnějším prostředí zajišťují tři rozdílné systémy [32, 33, 46-48, 51, 53-55, 59] – oxidativní systém [33, 47-51, 53, 55], systém, který ke své činnosti potřebuje arginin [33, 47, 48, 50, 51, 53, 55, 59] a systém vyžadující glutamát [33, 47, 48, 50-53, 55, 59], přičemž každý z nich dosahuje maximální aktivity za jiných podmínek [33, 37, 48, 53]. S jejich pomocí je *E. coli* schopna přežít až při vnějším pH 2 [37, 47-49, 51, 54].

5.2 Shrnutí naměřených výsledků

Pomocí fluorometru jsme měřili poměr intenzity fluorescenčního záření pHluorinu, exprimovaného v bakteriálních buňkách *E. coli*, exprimujících symporter MntH. S využitím naměřené kalibrace (graf č.5) pHluorinu jsme tak získali závislost vnitřního pH (resp. gradientu pH) na vnějším pH a na koncentraci draslíku v pufru. Výsledky těchto měření, které ukazují grafy č.6 až č.9, jsou v dobrém souladu s hodnotami, uvedenými v [13, 15, 17, 34, 36, 63]. Schopnost regulace vnitrobuněčného pH

použitého bakteriálního kmenu nebyla tudíž ovlivněna expresí *MNTH* a výrazně se neliší od schopnosti regulace pH běžných kmenů *E. coli*. V grafech č.1 a č.2 je zobrazena naměřená závislost excitačních a emisních spekter pHluorinu na vnějším pH a na přítomnosti draselných a sodných iontů v pufru.

Literatura

- [1] Berger J. (1996): Buněčná a molekulární biologie. Tobiáš, Havlíčkův Brod.
- [2] <http://www.textbookofbacteriology.net>
- [3] Jelínek J., Zicháček V. (1998): Biologie pro gymnázia. Nakladatelství Olomouc, Olomouc.
- [4] Vodrážka Z. (1982): Fyzikální chemie pro biologické vědy. Academia, Praha.
- [5] Slavík J. (1994): Fluorescent probes in Cellular and Molecular Biology. CRC Press.
- [6] <http://www.micron.ac.uk/organisms/eco.html>
- [7] http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- [8] Ahmed S., Booth I. R. (1981): The effects of partial and selective reduction in the components of the proton-motive force on lactose uptake in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **200**, 583-589.
- [9] Ahmed S., Booth I. R. (1983): The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **212**, 105-112.
- [10] Brey R. N., Rosen B. P., Sorensen E. N. (1980): Cation/Proton Antiport Systems in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 39-44.
- [11] Booth I. R. (1985): Regulation of Cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews* **49**, 359-378.

- [12] Kroll R. G., Booth I. R. (1981): The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **198**, 691-698.
- [13] Ahmed S., Booth I. R. (1981): Quantitative measurement of the proton-motive force and its relation to steady state lactose accumulation in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **200**, 573-581.
- [14] Maloney P. C., Kashket E. R., Wilson T. H. (1974): A Protonmotive Force Drives ATP Synthesis in Bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 3896-3900.
- [15] Booth I. R., Mitchell W. J., Hamilton W. A. (1979): Quantitative Analysis of Proton-Linked Transport Systems. *Biochemical Journal* **182**, 687-696.
- [16] Kashket E. R. (1985): Effects of K^+ and Na^+ on the Proton Motive Force of Respiring *Escherichia coli* at Alkaline pH. *Journal of Bacteriology* **163**, 423-429.
- [17] Slonczewski J. L., Rosen B.P., Alger J. R., Macnab R. M. (1981): pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by ^{31}P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6271-6275.
- [18] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>
- [19] <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence>
- [20] <http://www.scienceworld.wolfram.com>
- [21] <http://probes.invitrogen.com>
- [22] <http://www.pti-nj.com/fluorescence.html>
- [23] Lakowicz J. R. (1983): Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.

- [24] Padan E., Bibi E., Ito M., Krulwich T. A. (2005): Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta* **1717**, 67-88.
- [25] Kneen M., Farinas J., Li Y., Verkman A.S. (1998): Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular pH Indicator. *Biophysical Journal* **74**, 1591-1599.
- [26] Miesenböck G., De Angelis D. A., Rothman J. E. (1998): Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195.
- [27] Olsen K. N., Budde B. B., Siegumfeldt H., Rechinger K. B., Jakobsen M., Ingmer H. (2002): Noninvasive Measurement of Bacterial Intracellular pH on a Single-Cell Level with Green Fluorescent Protein and Fluorescence Ratio Imaging Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4145-4147.
- [28] Alvarez-Leefmans F. J., Herrera-Pérez J. J., Márquez M. S., Blanco V. M. (2006): Simultaneous measurement of water volume and pH in single cells using BCECF and fluorescence imaging microscopy. *Biophysical Journal*, **90**, 608-618.
- [29] Lane M. (2001): Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* **55**, 225-236.
- [30] Sanders D., Slayman C. L. (1982): Control of Intracellular pH. *J. Gen. Physiol.* **80**, 377-402.
- [31] Schuldinger S., Agmon V., Brandsma J., Cohen A., Friedman E., Padan E. (1986): Induction of SOS Functions by Alkaline Intracellular pH in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **168**, 936-939.
- [32] Arnold K. W., Kaspar C. W. (1995): Starvation- and Stationary-Phase-Induced Acid Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2037-2039
- [33] Tucker D. L., Tucker N., Conway T. (2002): Gene Expression Profiling of the pH Response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**, 6551-6558.

- [34] Kroll R. G., Booth I. R. (1983): The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **216**, 709-716.
- [35] Yohannes E., Barnhart D. M., Slonczewski J. L. (2004): pH-Dependent Catabolic Protein Expression during Anaerobic Growth of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **186**, 192-199.
- [36] Kashket E. R. (1981): Effects of Aerobiosis and Nitrogen Source on the Proton Motive Force in Growing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Cells. *Journal of Bacteriology* **146**, 377-384.
- [37] Hersh B. M., Farooq F. T., Barstad D. N., Blankenhorn D. L., Slonczewski J. L. (1996): A Glutamate-Dependent Acid Resistance Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **178**, 3978-3981.
- [38] Stancik L. M., Stancik D. M., Schmidt B., Barnhart D. M., Yoncheva Y. N., Slonczewski J. L. (2002): pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**, 4246-4258.
- [39] Benjamin M. M., Datta A. R. (1995): Acid Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1669-1672.
- [40] Bakker E. P., Booth I. R., Dinnbier U., Epstein W., Gajewska A. (1987): Evidence for Multiple K⁺ Export Systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 3743-3749.
- [41] Bossemeyer D., Borchard A., Dosch D. C., Helmer G. C., Epstein W., Booth I. R., Bakker E. P. (1989): K⁺-transport Protein TrkA of *Escherichia coli* Is a Peripheral Membrane Protein That Requires Other *trk* Gene Products for Attachment to the Cytoplasmic Membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 16403-16410.

- [42] Zuber D., Krause R., Venturi M., Padan E., Bamberg E., Fendler K. (2005): Kinetics of charge translocation in the passive downhill uptake mode of the Na^+/H^+ antiporter NhaA of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1709**, 240-250.
- [43] Roe A. J., McLaggan D., Davidson I., O'Byrne C., Booth I. R. (1998): Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids. *Journal of Bacteriology* **180**, 767-772.
- [44] Padan E., Tzuberly T., Herz K., Kozachov L., Rimon A., Galili L. (2004): NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na^+/H^+ antiporter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1658**, 2-13.
- [45] Hunte C., Screpanti E., Venturi M., Rimon A., Padan E., Michel H. (2005): Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**, 1197-1202.
- [46] Bhagwat A. A., Chan L., Han R., Tan J., Kothary M., Jean-Gilles J., Tall B. D. (2005): Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Based on Acid Resistance Phenotypes. *Infection and Immunity* **73**, 4993-5003.
- [47] Castanie-Cornet M., Foster J. W. (2001): *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp *cis*-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadB* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology* **147**, 709-715.
- [48] Castanie-Cornet M., Penfound T. A., Smith D., Elliot J. F., Foster J. W. (1999): Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 3525-3535.
- [49] Gorden J., Small P. L. C. (1993): Acid Resistance in Enteric Bacteria. *Infection and Immunity* **61**, 364-367.
- [50] Iyer R., Williams C., Miller Ch. (2003): Arginine-Agmatine Antiporter in Extreme Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6556-6561.

- [51] Lin J., Lee I. S., Frey J., Slonczewski J. L., Foster J. W. (1995): Comparative Analysis of Extreme Acid Survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**, 4097-4104.
- [52] Ma Z., Richard H., Foster J. W. (2003): pH-Dependent Modulation of Cyclic AMP Levels and GadW-Dependent Repression Of RpoS Affect Synthesis of the GadX Regulator and *Escherichia coli* Acid Resistance. *Journal of Bacteriology* **185**, 6852-6859.
- [53] Price S. B., Wright J. C., DeGraves F. J., Castanie-Cornet Marie-Pierre, Foster John W. (2004): Acid Resistance Systems Required for Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Gastrointestinal Tract and in Apple Cider Are Different. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4792-4799.
- [54] Richard H., Foster J. W. (2004): *Escherichia coli* Glutamate- and Arginine-Dependent Acid Resistance Systems Increase Internal pH and Reverse Transmembrane Potential. *Journal of Bacteriology* **186**, 6032-6041.
- [55] Lin J., Smith M. P., Chapin K. C., Baik H. S., Bennett G. N., Foster J. W. (1996): Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3094-3100.
- [56] Berry E. D., Cutter C. N. (2000): Effects of Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on Efficacy of Acetic Acid Spray Washes To Decontaminate Beef Carcass Tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1493-1498.
- [57] Clavero M. R. S., Beuchat L. R. (1996): Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Broth and Processed Salami as Influenced by pH, Water Activity, and Temperature and Suitability of Media for Its Recovery. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2735-2740.

- [58] Conner D. E., Kotrola J. S. (1995): Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Acidic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 382-358.
- [59] Bearson S., Bearson B., Foster J. W. (1997): Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **147**, 173-180.
- [60] Sato M., Machida K., Arikado E., Saito H., Kakegawa T., Kobayashi H. (2000): Expression of Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli* Growing at Acidic pH. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 943-947.
- [61] Diez-Gonzales F., Russell J.B. (1997): Effects of carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and acetate on *Escherichia coli* O157:H7 and K-12: uncoupling versus anion accumulation. *FEMS Microbiology Letters* **151**, 71-76.
- [62] Miesenbock G., De Angelis D.A., Rothman J.E. (1998): Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195.
- [63] Hickey E. W., Hirshfield I. N. (1990): Low-pH-Induced Effects on Patterns of Protein Synthesis and on Internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1038-1045.

Seznam používaných zkratek:

CCCP - karbonylkyanid-m-chlorfenylhydrazon
E.coli – *Escherichia coli*
 GFP – Green Fluorescent Protein
 MntH - Manganese transport H⁺-dependent
 pH_i – vnitřní pH
 pH_o – vnější pH
 ΔpH – gradient pH
 Δp – protonmotivní síla
 Δμ – elektrochemický potenciál
 ΔΨ – membránový potenciál