MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ FAKULTA
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

David Babuka

Analýza zotavování membránového potenciálu kvasinek za stresových podmínek vyvolaných protonoforem CCCP

Fyzikální ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval 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 28.7.2016 David Babuka

Název práce: *Analýza zotavování membránového potenciálu kvasinek za stresových podmínek vyvolaných protonoforem CCCP*

Autor: *David Babuka*

Katedra: *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí diplomové práce: *prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc., Fyzikální ústav UK*

Abstrakt: *Diplomová práce se zabývá studiem odezvy vnitrobuněčného pH kvasinkových buněk na různá vnější prostředí, především ve vztahu k protonoforu karbonylkyanidu m-chlorophenylhydrazonu, CCCP. K měření vnitrobuněčného pH kvasinkových buněk jsme využívali geneticky kódovanou fluorescenční sondu poměrový pHluorin. S využitím metody synchronně skenovaných fluorescenčních spekter jsme byli schopni měřit vnitrobuněčné pH buněk s vysokou přesností. Jako součást těchto experimentů jsme studovali také jak vliv iontové síly pufrů buněčných suspenzí na povrchový potenciál kvasinek, tak vliv anorganické soli KCl na depolarizaci membrán kvasinek a acidifikaci cytosolu vyvolanou protonoforem CCCP. Zkoumali jsme jednak přímo změny cytosolického pH a jednak jsme toto naměřené pH používali jako indikátor procesů a stavu prostředí mimo buňku. K nejvýznamnějším výsledkům této práce patří vyvinutí nové metody monitorování velikosti povrchového potenciálu kvasinek pomocí titračních křivek acidifikace cytosolu vyvolané protonoforem CCCP.*

Klíčová slova: *CCCP, povrchový náboj, pHluorin, vnitrobuněčné pH*

Title: *The analysis of membrane potential recovery in yeast under CCCP-induced stress*

Author: *David Babuka*

Department: *Institute of Physics of Charles University*

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

Abstract: *The master's thesis is focused on the study of response of the intracellular pH of the yeast cells on various external environments, primarily in a relation to the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP. To measure the intracellular pH of the yeast cells we used a genetically coded fluorescent probe the ratiometric pHluorin. Using the method of synchronously scanned fluorescent spectra we were able to measure the intracellular pH of the cells with high precision. As a part of these experiments we also studied the influence of ionic strength of the cell suspensions buffers on the surface potential as well as the influence of the mineral salt KCl on the depolarization of the yeast membranes and cytosolic acidification induced by the protonophore CCCP. We examined the changes of cytosolic pH as such but we also used the measured pH as an indicator of the processes and the state of environment outside the cell. One of the most notable outcomes of this thesis is a new method of monitoring the value of the surface potential of the yeast cells by measuring the titration curves of cytosolic acidification induced by the protonophore CCCP.*

Keywords: *CCCP, surface charge, pHluorin, intracellular pH*

Chtěl bych zde upřímně poděkovat svému vedoucímu, panu prof. RNDr. Jaromíru Pláškovi, CSc. za trpělivost a přátelské a odborné vedení, které byly pro úspěšné dokončení této práce zcela nepostradatelné. Mé poděkování patří také Mgr. Ivě Jančíkové a Mgr. Jakubovi Zahumenskému za pomoc a rady, kterých se mi od nich dostalo a samozřejmě bych chtěl poděkovat také všem ostatním z oddělení biofyziky za příjemné prostředí a vše co pro mě během mého studia a vypracování této práce udělali. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také své rodině a přátelům za nekonečnou podporu a pochopení.

Obsah

1 Úvod 1

1.1 Studované buněčné systémy 1

1.2 Iontové kanály 2

1.3 Řízení kanálů 2

1.4 Mechanismus transmembránového přenosu protonů protonoforem CCCP . 4

1.5 Povrchový náboj a Gouy-Chapmanova teorie 6

1.6 Experimentální metody 7

1.7 Měření změn membránového potenciálu 7

1.8 Měření pH cytosolu kvasinek 8

2 Materiál a metody 10

2.1 Chemikálie a materiál 10

2.2 Pufry 10

2.3 Růstová média 11

2.4 Buněčné kmeny 12

2.5 Kultivace buněk 12

2.6 Měření fluorescence 13

2.7 Příprava vzorků na měření 14

3 Výsledky 15

3.1 Úvodní měření a zkoumání chování systému 15

3.2 Vliv koncentrace protonoforu CCCP na vnitrobuněčné pH kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 16

3.3 Závislost protonoforem CCCP způsobené acidifikace cytosolu kvasinek na pH pufru 19

3.4 Vlivu iontové síly roztoků na povrchový potenciál a potvrzení závěrů pomocí Gouy-Chapmanovy teorie 24

3.5 Vliv extracelulárního pH na pH intracelulární při absenci CCCP 26

4 Diskuse výsledků 28

5 Závěr 31

6 Seznam literatury 32

7 Přílohy 35

Příloha 1 - Postup zpracování surových SSF spekter v programu SigmaPlot 11 ... 35

Příloha 2 - Článek založený na diplomové práci 41

1 Úvod

1.1 Studované buněčné systémy

Tato diplomová práce se primárně zabývá iontovou rovnováhou v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Jelikož jsou kvasinky jedny z nejjednodušších eukaryotických organismů, jsou vhodnými modelovými organismy pro experimenty zaměřující se na buněčnou biologii a výsledky na nich získané se dají za určitých podmínek zobecnit i pro složitější eukaryotické organismy včetně člověka [1-4]. Další výhodou těchto kvasinek je jejich snadné pěstování a poměrně bezpečná práce s nimi.

Kvasinkové buňky musejí být při svém růstu schopny přizpůsobit se velkým změnám podmínek v prostředí, které zahrnují měnící se osmotický tlak, změny pH nebo koncentrace solí a mnohé další veličiny. Aby si udržely rovnováhu vnitřního prostředí, tzv. homeostázu, musí dynamicky regulovat transport iontů z buňky a do buňky. Tato iontová výměna zásadně ovlivňuje a je ovlivňována dvěma parametry úzce svázanými se stavem buňky a to vnitrobuněčným pH a membránovým elektrickým potenciálem ($\Delta\Psi$), které mají významný vliv na průběh mnoha procesů v kvasinkových buňkách.

V návaznosti na svoji bakalářskou práci jsem v této diplomové práci prováděl výzkum na mutantních kmenech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jelikož genom těchto kvasinek je v současnosti již dobře zmapován a jejich buňky se vyskytují i v haploidní formě, je možné relativně snadno manipulovat s jejich geny, potlačit expresi některých či naopak vložit jiné. Použité mutantní kmeny byly BY4741 a BY4741+pHluorin. Pro tyto mutanty máme již vypracovanou metodiku pěstování, experimentální postupy a optimalizace prováděných měření, které nám umožňují spolehlivě a rychle měřit velké objemy dat.

1.2 Iontové kanály

Současný stav znalostí iontových transportních proteinů z plazmatické membrány *Saccharomyces cerevisiae* (jako jsou ATPázy, symportéry, antiportéry a kanály s různými specifitami substrátů a užívající rozličné mechanismy), je shrnut v přehledech [5, 6].

Schopnost kvasinkových buněk udržovat iontovou rovnováhu je umožněna pumpou Pma1p (H^+-ATPása), která je zakotvena v membráně a generuje elektrochemický gradient protonů H^+ napříč plasmatickou membránou. Přesun protonů je hnán takzvanou protonmotivní silou. Tato síla se skládá z membránového potenciálu (jenž souvisí s negativním nábojem existujícím uvnitř buňky) a koncentračního gradientu protonů H^+, který lze také vyjádřit jako gradient pH. Nerovnoměrné rozložení koncentrace iontů K^+ a Na^+ je zapříčiněno existencí systémů, jejichž funkcí je transmembránový transport těchto iontů.

Existující znalosti o iontových transportérech a kanálech v membránách kvasinek, včetně jejich exprese, transportní aktivity, regulace a funkce, byly získány pomocí výzkumů prováděných na isogenních mutantních kmenech odvozených z rodičovského kmene BY4741, kterým byly deletovány geny pro jednotlivé transportní systémy nebo jejich kombinace [7]. I přes rozsáhlý výzkum provedený v této oblasti není stále jasné, jak jednotlivé transportní systémy spolupracují při udržování homeostázy včetně stabilního membránového potenciálu a vnitrobuněčného pH. Za udržování této rovnováhy jsou zodpovědné kanály Tok1p vylučující K^+ z buňky. Tento kanál se otevře, když se membránový potenciál ($\Delta\Psi$) stane kladnějším než Nernstův rovnovážný potenciál K^+ což způsobuje odtok K^+ z buňky a tento pak zpětně stabilizuje membránový potenciál [8-10]

1.3 Řízení kanálů

Všechny iontové toky přes buněčnou membránu jsou nějakým způsobem řízeny transmembránovým gradientem konkrétních iontů. Bohužel přímá měření nám umožňují určit pouze celkovou koncentraci iontů v buněčném médiu, zatímco okamžitá lokální koncentrace iontů v blízkosti vnějšího povrchu membrány zůstává

neznámá. To může způsobit určité komplikace při interpretaci experimentů zabývajících se vnitrobuněčnou iontovou rovnováhou.

Buněčné membrány mohou mít také záporný náboj na povrchu (obvykle opačný na protějších stranách) se kterým souvisí existence negativního povrchového potenciálu [11]. Lokální koncentrace kationtů na membránovém povrchu pak díky tomu může být významně zvýšena v porovnání s hodnotou jejich celkové koncentrace v buněčném médiu.

V blízkosti membrán buněk s buněčnou stěnou, což je i případ kvasinek, je přítomen dodatečný lokální náboj vytvořený negativně nabitými skupinami makromolekul buněčné stěny [12]. Dřívější výzkumy ukázaly, jak významnou roli může negativní povrchový potenciál hrát v nejrůznějších membránových procesech. Je proto překvapující, že tyto práce byly prakticky zapomenuty a v pozdějších studiích týkajících se iontové homeostázy kvasinek nebyla věnována potřebná pozornost možnému vlivu negativního povrchového potenciálu na transmembránový transport iontů. Určitý zájem o roli povrchového potenciálu se v nedávné době projevil v některých specifických oblastech buněčné biologie, například v souvislosti s příjmem iontů, toxicitou kovů [13], buněčnou adhezí [14] nebo vazbou peptidů k modelovým membránám [15].

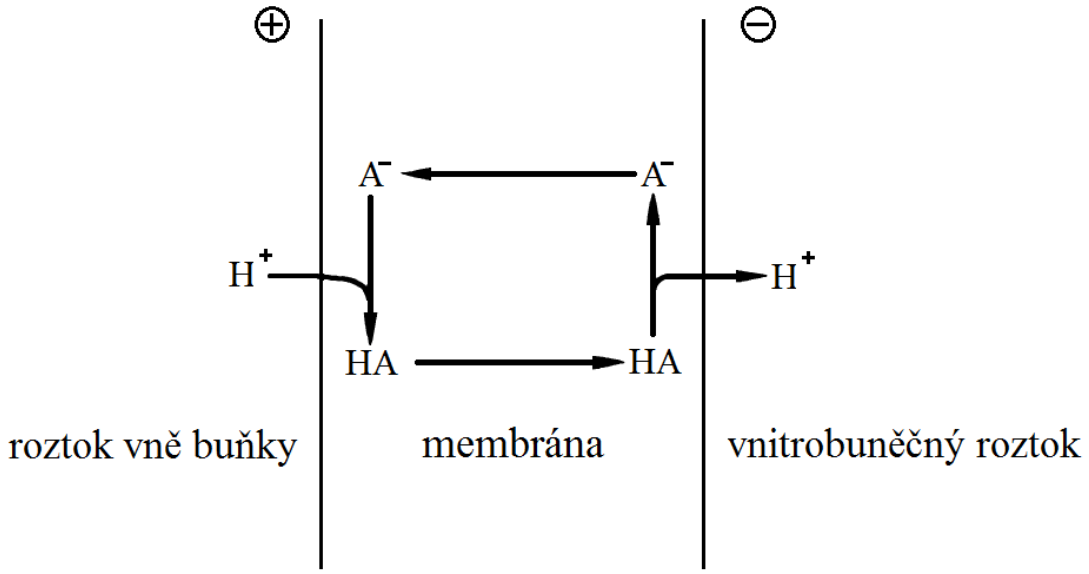
Prokazatelný nezájem vědců zabývajících se kvasinkami o možnou úlohu povrchového potenciálu se dá vysvětlit tím, že chybí metody, jež by umožňovaly snadno a spolehlivě monitorovat jeho velikost. Nejobvyklejším způsobem získávání informací o povrchovém potenciálu v okolí oblastí s transportními kanály je elektroforetická metoda měření ζ-potenciálu buněk. Nicméně hodnoty ζ-potenciálu nejsou spolehlivou mírou povrchového potenciálu v případě buněk se stěnou, v níž se nachází záporný náboj [12]. Jako indikátory změn povrchového potenciálu lze použít také některé fluorescenční sondy, jako například 7-hydroxycoumarin, [16] nebo 9-aminoacridine [17]. Nicméně obě zmíněné metody mají pouze omezenou spolehlivost a je tedy zřejmé, že vypracování nové metody monitorování povrchového potenciálu by mohlo být oním impulzem potřebným k obnovení výzkumu tohoto přehlíženého jevu a jeho možného vlivu na udržování iontové rovnováhy v kvasinkách.

1.4 Mechanismus transmembránového přenosu protonů protonoforem CCCP

Tato kapitola byla sepsána na základě souhrnné práce [18]. Pro podrobnější informace, experimentální důkazy a širší diskusi o protonoforech odkazuji čtenáře na ni. V mé diplomové práci jsme zkoumali vliv slabé kyseliny karbonylkyanidu m-chlorophenylhydrazonu, CCCP, na membránový potenciál a vnitrobuněčné pH kvasinkových buněk. V následující části se zabýváme dosud popsaným mechanismem, kterým CCCP na buňky působí.

CCCP patří mezi slabé kyseliny, které mohou přenášet protony přes umělé lipidové dvojvrstvy a biologické membrány. Látky s touto vlastností se proto běžně nazývají protonofory. Obecně se předpokládá, že protonofory umožňují pasivní transport protonů přes membránu ve směru snižujícího se elektrochemického gradientu [19]. Za povšimnutí stojí, že všechny slabé kyseliny fungující jako protonofory mají π-elektrony, které delokalizují náboj aniontů a zvyšují jejich rozpustnost v médiích s nízkými dielektrickými konstantami, jako jsou například plazmatické membrány.

CCCP přenáší protony přes lipidovou dvojvrstvu mechanismem, který je ilustrován na Obr. 1. V práci [18], z níž jsme tento obrázek upravili, je uvedeno několik podmínek, které zjednodušují uvažované procesy. Tyto úvahy nicméně nijak nenarušují platnost popisovaného modelu pro naše experimenty. Konkrétně se jedná o úvahy, že na obou stranách membrány jsou identické roztoky, které jsou dostatečně pufrované na to, aby tok protonů významně neovlivnil pH a předpokládá se také, že elektrický odpor membrány je mnohem větší než odpor roztoku, což je velmi rozumný předpoklad.



Obr. 1: Mechanismus fungování protonoforu CCCP na rozhraní dvou roztoků oddělených plazmatickou membránou

Celý mechanismus se z hlediska chemie dá popsat jedinou rovnicí a to

$$A^- + H^+ \rightleftharpoons HA \qquad (1)$$

Tato rovnice popisuje procesy, které nastávají na levé a pravé straně membrány z Obr. 1. Celý proces přenosu protonů se pak odehrává následujícím způsobem. Referujeme-li se k Obr. 1, pak na levé straně membrány (vně buňky) je ustavena disociační rovnováha mezi nedisociovanou formou (HA) a disociovanou anionickou formou (A^-) s protony H^+. Tato rovnováha závisí na pH prostředí (roztoku na levé straně membrány/vně buňky) a na disociační konstantě pK_A kyseliny, v našem případě se konkrétně jedná o CCCP, jehož standardní hodnota pK_A uváděná pro vodní roztoky je 6,09 [18]. Ze strany, na níž je vyšší koncentrace CCCP v nedisociované HA formě, difundují nedisociované molekuly CCCP skrz nepolární prostředí membrány na druhou (pravou) stranu membrány. Na pravé straně membrány, tedy na rozhraní s vnitřním prostředím buňky, dochází k disociaci HA dle rovnice (1) na proton H^+ a anion A^-. Tato disociace probíhá v závislosti na vnitrobuněčném pH buňky. Vzniklé anionty CCCP jsou pak elektrostatickým působením difúzního membránového potenciálu vypuzovány z buňky. Celkovým výsledkem tohoto procesu je pohyb protonů z prostředí vně buňky do vnitrobuněčného prostoru, což má za následek změnu vnitrobuněčného pH [18].

1.5 Povrchový náboj a Gouy-Chapmanova teorie

Biologické membrány obvykle nesou na svém povrchu náboj, který pochází od polárních hlaviček fosfolipidů, nabitých aminokyselin, membránových proteinů a nabitých cukrů na membránových glykoproteinech. Tento náboj vytváří elektrické pole, které působí na ionty v okolním prostředí přitažlivými či odpudivými silami. Velikost a síla působení tohoto pole se zvyšuje se se zvyšující se hustotou povrchového náboje a snižuje s rostoucí iontovou silou okolního roztoku [20]. Toto je velmi důležitý poznatek pro naši práci, jelikož jej využíváme v našich experimentech pro ověření přítomnosti a působení povrchového náboje. Vliv povrchového náboje na prostorové rozdělení rozpuštěných iontů v okolním roztoku je možné popsat teorií vytvořenou Gouyem a Chapmanem [21, 22].

Vliv vzniklého pole na rozložení iontů v blízkosti buňky popisujeme skrze elektrický potenciál pole vytvořeného povrchovými náboji. Tento potenciál, kterému říkáme povrchový potenciál, je samozřejmě ovlivňován i ionty nacházejícími se v blízkosti povrchu. Za předpokladu, že náboj na povrchu buňky je rovnoměrně rozprostřený s nábojovou hustotou σ, můžeme povrchový potenciál ψ_s určit z rovnice

$$A\sigma = \sqrt{C}\,\sinh\frac{zF\psi_S}{2RT} \tag{2}$$

v níž A je konstanta závislá na teplotě a dielektrické konstantě roztoku, C je průměrná koncentrace symetrického elektrolytu (elektrolytu obsahujícího stejné množství aniontů jako kationtů) jehož ionty nesou náboj z, T je termodynamická teplota, R je molární plynová konstanta a F Faradayova konstanta. Konstanta A je definovaná jako $A = 1/(8N\varepsilon_r\varepsilon_0 kT)^{1/2}$, kde N je Avogadrova konstanta, ε_r je relativní permitivita a ε_0 je permitivita vakua [20].

Poměr mezi povrchovou c_s a celkovou c_∞ koncentrací kladně nabitých iontů v roztoku je závislý na povrchovém potenciálu ψ_s tak, jak to popisuje Boltzmannova rovnice [20]

$$c_S = c_\infty e^{-\frac{zF\psi_S}{RT}} \tag{3}$$

1.6 Experimentální metody

Na základě dlouholetého výzkumu prováděného vedoucím mé diplomové práce, byly vytvořeny a zdokonaleny dvě níže popsané techniky využívající fluorescenční sondy k monitorování potenciálu plazmatické membrány a cytosolického pH kvasinkových buněk v suspenzi. Tyto metody a z nich především metoda měření cytosolického pH byly úhelným kamenem pro vypracování celé této diplomové práce.

1.7 Měření změn membránového potenciálu

Elektrický potenciál plazmatické membrány kvasinkových buněk může být monitorován s pomocí fluorescenčních sond náležejících do rodiny redistribučních (pomalých) barviv jako jsou například anionické oxonoly [23] a kationické karbokyaniny [24] přičemž je možné použít několik různých experimentálních technik [25]. V oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu UK byla nedávno vypracována a otestována nová metoda umožňující kvantifikovat změny potenciálu plazmatické membrány kvasinek v jednotkách milivoltů za použití fluorescenční sondy 3,3'-dipropylthiadikarbokyaninu jodidu, diS-C_3(3), která je odlišná od příbuzné, nicméně více známé karbokynaninové barvy diS-C_3(5) [26]. Sonda diS-C_3(3) byla také použita zcela jiným způsobem, než byl popsán v pracích publikovaných jinými laboratořemi [27], kde používali mnohem vyšší koncentrace barviva.

Výše zmíněná nová metoda využívá spektrálního posuvu emise, který je spojen s navázáním sondy diS-C_3(3) akumulované v buňkách na makromolekuly cytosolu. Díky tomuto spektrálnímu posuvu o velikosti pouhých 13 nm je možné rozložit fluorescenční spektra měřená v buněčných kulturách metodou synchronního skenování na komponentu odpovídající akumulované sondě a komponentu odpovídající sondě, která zůstává vně buněk. Poměr intenzit těchto dvou složek, který je za vhodně zvolených experimentálních podmínek přímo úměrný relativní míře akumulace sondy v buňkách, lze pak skrze Nernstovu rovnici převést na rozdíly hodnot membránových potenciálů mezi porovnávanými stavy buněk [26].

1.8 Měření pH cytosolu kvasinek

Výsledky uvedené v této diplomové práci byly získány pomocí modifikace standardního protokolu pro měření vnitrobuněčného pH v kvasinkách za využití poměrové sondy pHluorin, kterou byly tyto kvasinky obarveny jako geneticky kódovaným fluorescenčním proteinem [28]. V naší metodě je klasický záznam excitačního spektra nahrazen synchronním skenováním excitace i emise za podmínky konstantního rozdílu $\Delta\lambda$ (offsetu) mezi jejich vlnovými délkami. Hlavní výhodou záznamu spekter synchronně skenované fluorescence (SSF) je možnost oddělit plochý autofluorescenční profil od ostrých píků fluorescence pHluorinu.

Tímto způsobem jsme nyní schopni redukovat zdlouhavé a časově náročné série měření autofluorescenčního pozadí v pracných experimentech prováděných na kvasinkových buňkách udržovaných v různých fyziologických podmínkách. Díky tomu jsme mohli provést studie založené na velkém množství variabilních parametrů, které nás zajímaly, a přitom opakovat téměř každé měření v triplikátu, což nám dává dostatečnou schopnost statisticky vyhodnotit významnost naměřených dat. Typicky to znamená, že experimentální hodnoty pH v buněčném cytosolu kvasinek můžeme naměřit se standardní odchylkou menší nebo rovnou 0,02 jednotky pH v případech technického triplikátu a menší nebo rovnou 0,05 jednotky pH v případě tří nezávislých buněčných kultur.

Ve výsledcích mluvíme jak o měřeném cytosolickém pH tak o okyselení neboli acidifikaci cytosolu. Tyto dvě veličiny spolu úzce souvisí. Acidifikací cytosolu se rozumí rozdíl mezi hodnotami pH cytosolu po přidání CCCP a před přidáním CCCP. Jelikož po přidání CCCP hodnota pH cytosolu klesá, je hodnota acidifikace záporná veličina. Titrační křivky závislosti změn cytosolického pH na pH pufrů, v nichž jsme pozorovali efekt přidání CCCP, jsou analyzovány pomocí míry acidifikace. Odpovídající hodnoty pH cytosolu nebyly pro studium efektu CCCP vhodné, neboť i samotná hodnota pH cytosolu kvasinek před přidáním CCCP mírně závisí na pH prostředí.

Jelikož získání interpretovatelných výsledků z naměřených surových SSF spekter vyžaduje určité úpravy naměřených dat zahrnující odečtení autofluorescenčních SSF spekter a využití kalibrační rovnice, uvádíme v Příloze 1 námi používaný postup tohoto zpracování, který je spolu s templátovým souborem pro SigmaPlot11 k dispozici na ResearchGate pro veřejný přístup.
https://www.researchgate.net/publication/303783575_SP11template

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie a materiál

název (zkratka)	**výrobce**
MES hydrate (MES)	Sigma
triethanolamine (TEA)	Sigma
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Sigma
Brent supplement mix - uracil (BSM - ura)	Formedium
ammonium sulfate	Sigma - Aldrich
D-(+)-Glucose	Sigma
agar	Dr. Kulich Pharma s.r.o.
choline chloride	Sigma
potassium chloride (KCl)	Sigma
carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)	Fluka
3,3′-dipropylthiadicarbocyanine iodide (DiS-C_3(3))	Fluka
dimethylformamide (DMF)	Fluka
ethyl alcohol	Lach-Ner

Tab. 1: Seznam chemikálií použitých při experimentech

2.2 Pufry

Pro má měření bylo velmi důležité mít dobře definované a stabilní pH prostředí v němž se nacházely zkoumané kvasinkové buňky. Za účelem dosažení tohoto požadavku jsem využíval 25 mM pufr MES-TEA, jehož složení popisuji v Tab. 2. Při přípravě jsem MES hydrát rozpustil v destilované vodě na požadovanou koncentraci, což mi dalo prostředí o přibližné hodnotě pH 3,3. Poté bylo pH tohoto roztoku za stálého měření nastaveno na požadovanou hodnotu postupným přidáváním TEA. V průběhu experimentů jsem při hledání vhodného nastavení podmínek použil pufry s širokým rozmezím hodnot pH 5,7 - 9,3.

látka	množství [g/l]
MES hydrate	4,881
TEA	---*

Tab. 2**:** Složení pufrů

*alkalická komponenta, TEA, byla přidávána v malém množství podle požadovaného pH

2.3 Růstová média

Jako kultivační médium pro zkoumané kvasinkové buňky jsem ve své práci používal minimální živné médium založené na YNB. Celkové použité složení je uvedeno v Tab. 3. Toto médium jsem použil, jelikož jeho kompozice je přesně definována a tudíž při experimentech nedochází k odchylkám způsobeným fluktuujícím složením růstového média.

látka	**množství [g/l]**
YNB	6,7
ammonium sulfát	5
glukóza	20
BSM - uracil	1,535
agar*	20

Tab. 3: Složení růstového média YNB pro kultivaci kvasinkových buněk

Při přípravě YNB média jsem amonium sulfát a glukózu rozpustil v příslušném množství destilované vody a tento roztok sterilizoval autoklávováním. Z YNB a destilované vody jsem vytvořil 10x koncentrovaný zásobní roztok. Zásobní roztok aminokyselin BSM-ura jsem připravil v 50x koncentrované formě, která se osvědčila jako daleko lépe připravitelná než dříve používaná 100x koncentrovaná forma. Oba zásobní roztoky byly sterilizovány mikrofiltrací, aby nebyly sloučeniny v nich narušeny vysokou teplotou autoklávování. Nakonec byly všechny tři zásobní roztoky smíchány v předepsaných poměrech. Množství destilované vody při přípravě každé části výsledného média bylo upraveno tak, aby výsledné koncentrace odpovídaly popisu z Tab. 3. Při přípravě pevného média pro kultivaci na Petriho miskách, byl do autoklávovaného roztoku navíc přidán agar.

2.4 Buněčné kmeny

Experimentální část práce jsem prováděl na dvou mutantních kmenech *Saccharomyces cerevisiae*, které jsem použil již ve své bakalářské práci a které byly zvoleny v návaznosti na předchozí studie [29, 30], které se zabývaly přesným definováním a optimalizací experimentálních metod, jež jsme v práci využívali. Použité kmeny nesou označení BY4741 a BY4741+pHluorin. Genotyp kmene BY4741 je MATa, his3Δ0, leu2 Δ0, met15Δ0, ura3Δ0. Kmen BY4741+pHluorin je variantou kmene BY4741, přičemž do jeho genomu byl pomocí plazmidu přidán gen pro fluorescenční protein pHluorin. Kmen BY4741 sloužil v mých experimentech především jako kontrola autofluorescenčního pozadí pro SSF měření vnitrobuněčného pH.

Jako selekční marker pro zachování exprimace fluorescenčního proteinu v kmeni BY4741+pHluorin nesou použité kvasinkové kmeny na pHluorinovém plazmidu také mutaci ura3Δ0, která zajišťuje, že jen kvasinky schopné pHluorin produkovat, přežijí na použitém médiu bez uracilu.

2.5 Kultivace buněk

Pěstování buněk probíhalo podle protokolu použitého již v mé bakalářské práci [31]. Pro přehlednost jej zde uvádíme.

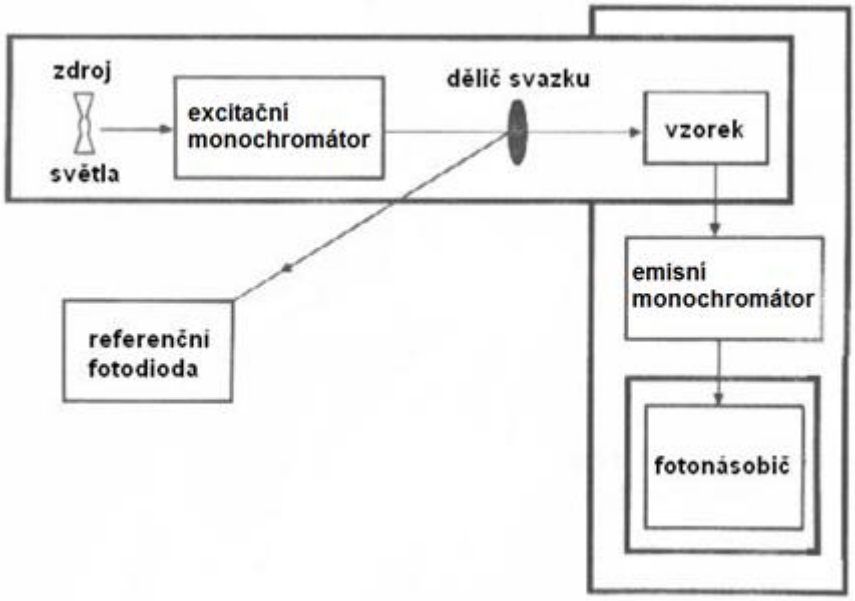
Buňky byly ze zásobních konzerv prezervovaných v -70°C očkovací kličkou sterilně přeneseny na pevné médium v Petriho misce a poté dva až tři dny inkubovány v inkubátoru Incucell (BMT Medical Technology s.r.o.) za 30°C. Takto vypěstované buňky jsem pomocí očkovací kličky sterilně přenesl do tekutého média v Erlenmeyerově baňce a pěstoval v třepačce na vodní bázi za teploty 30°C po dobu přibližně 24 hodin. Tímto postupem jsem získal zásobní inokulum.

Pro měření jsem ve sterilním prostředí laminárního boxu z připraveného zásobního inokula pipetou očkoval vzorky do tekutého média v Erlenmeyerově baňce a zaočkované vzorky jsem pak nechal růst v třepačce za stejných podmínek jako inokula. Očkované množství inokula a doba růstu byly vždy upraveny tak, aby buňky dosáhly v době měření postexponenciální fáze růstu. V časové škále to tedy znamenalo přibližně 18-24 hodin.

2.6 Měření fluorescence

Pro měření svých experimentů jsem využíval přístroj FluoroMax-3 (Horiba - Jobin Yvon). Jedná se o spektrofluorometr se dvěma mřížkovými monochromátory a vysokotlakou xenonovou výbojkou jako zdrojem excitačního záření. Fluorescence je detekována v L-formátu pod pravým úhlem vůči směru budícího záření.

Schéma přístroje je vyobrazeno na Obr. 2. Měření jsem prováděl v polymethylmetakrylátových kyvetách 1×1 cm o objemu 3 ml (Kartell, Itálie).



Obr. 2: Schéma přístroje FluoroMax-3 použitého při fluorescenčních měřeních. Upraveno z [32].

Experimentální nastavení pro snímání SSF spekter při zkoumání pH_{in} bylo optimalizováno pro zkrácení času a zvýšení přesnosti oproti mé bakalářské práci. SSF spektra pHluorinu jsem měřil při offsetech $\Delta\lambda = 30$ nm pro pás s excitačním maximem u 470 nm a $\Delta\lambda = 110$ nm pro pás s excitačním maximem u 390 nm. Tyto offsety odpovídají Stokesovým posuvům daných pásů vůči excitačnímu záření. Akvizici jsme prováděli v nastavení tří průměrovaných měření. Tento postup zmenšuje vliv náhodných fluktuací intensity fluorescence (zejména fluktuací spojených s tvorbou a uvolňováním vzduchových bublinek na stěnách kyvet) na výsledný poměr signál/šum v měřených spektrech. Použitý skenovací krok byl 1 nm

a integrační doba 0,2 s. Excitační i emisní štěrbiny monochromátorů byly nastaveny na šířku 3 nm.

Pro snímání SSF spekter při zkoumání změn $\Delta\Psi$ bylo použito stejné experimentální nastavení jako v práci [26]. Offset byl nataven na 13 nm a skenovaná spektrální oblast excitačního spektra byla 520 - 590 nm. Akvizici jsme prováděli v nastavení sedmi průměrovaných měření a to ze stejného důvodu jako u měření pH. Použitý skenovací krok byl 5 nm a integrační doba 0,5 s. Excitační i emisní štěrbiny monochromátorů byly nastaveny na šířku 2,3 nm.

2.7 Příprava vzorků na měření

Po úspěšné kultivaci buněk podle postupu popsaného v kapitole 2.5 jsem buňky pro měření obecně připravoval následujícím způsobem. Nejprve jsem slil růstové médium s buňkami do zkumavky a v ní jej pak odstředil v centrifuze (Megafuge 1.0, Heraeus instruments) při 3000 rpm působících po 2 minuty. Poté jsem odlil ze zkumavky supernatant a k usazeným buňkám přidal 25 mM pufr MES-TEA v přibližně třetinovém objemu oproti vylitému supernatatu, čímž jsem dosáhl optimálního zahuštění buněčné zásoby pro přidávání do vzorků.

Jednotlivá měření byla prováděna za různých podmínek, jelikož jsme hledali optimální rozmezí pH, koncentrace jednotlivých chemikálii a celkové experimentální nastavení pro získání přehledných a vypovídajících dat. Všechna měření jsme se však snažili držet v rozmezí následujícího postupu: Do kyvet jsem připravil pufr MES-TEA 25 mM s požadovaným pH a případně roztok cholin chloridu s KCl či NaCl a glukózou. Do takto připravených kyvet jsem poté dle časového rozpisu, který sloužil k zajištění shody experimentálních podmínek u všech vzorků, přidával buňky na OD $\approx$ 0,4, tak že se v daném roztoku nacházely alespoň 3 minuty (standardně 7,5 minuty) před měřením spekter.

Další postup, úpravy a případné dodatečné přimíchávání chemikálii již závisely individuálně na použitém experimentálním postupu.

3 Výsledky

3.1 Úvodní měření a zkoumání chování systému

Experimentální část této diplomové práce zahrnovala intenzivní práci v období šesti měsíců, během nějž jsme provedli přes 1800 měření SSF spekter zhruba 900 buněčných suspenzí připravených z přibližně 80 buněčných kultur. Z velké části se jednalo o hledání optimálních koncentrací buněčných suspenzí z hlediska poměru signálu pHluorinu k pozadí pocházejícímu od pufru a pak optimalizaci časových harmonogramů pro realizaci rozsáhlých titračních sérií. Zejména optimalizace časových harmonogramů představuje skrytou část práce, kterou v podstatě není možné do prezentovaných výsledků zahrnout. V této diplomové práci proto uvádíme pouze konečné výsledky tohoto rozsáhlého úsilí, které považujeme za publikovatelné v solidních vědeckých časopisech, přičemž část z nich již úspěšně prochází recenzním řízením, viz Příloha 2.

V počátečních fázích měření jsme zjišťovali, jak buněčná suspenze kvasinkových buněk reaguje za rozličných podmínek na přidání CCCP. Jako proměnné faktory, na kterých mohou záviset změny vnitrobuněčného pH po přidání CCCP, jsme zkoumali vliv různých koncentrací CCCP, pH prostředí, přítomnosti glukózy a anorganických solí. Na výsledcích těchto úvodních měření jsme pak založili další měření, která uvádíme v následujících odstavcích a kapitolách.

Podle původního zadání diplomové práce jsme měli zkoumat také rychlost odezvy vnitrobuněčného pH na přidání CCCP. Po naměření prvních sérií časového vývoje se však ukázalo, že toto měření v našich laboratorních podmínkách nemůžeme provést, jelikož měřitelná odezva nastávala v časech kratších než 3 sekundy, což je přibližně doba od přidání CCCP, během níž jsme schopni vložit vzorek do spektrometru a spustit měření. Jakékoliv dynamické efekty tedy proběhly rychleji, než jsme byli schopni je začít měřit.

Prověřili jsme také vliv, který má promývání kvasinkových buněk při přípravě vzorků na reprodukovatelnost a výsledné hodnoty měření. Ukázalo se, že není rozdíl mezi hodnotami intracelulárního pH naměřenými po jednom a po dvou promytích buněčné kultury. Jedním promytím v tomto případě myslíme centrifugaci

buněk následovanou slitím supernatantu a resuspendování buněk v 25 mM pufru MES-TEA. V dalších měřeních jsme proto používali pouze jednou promyté buněčné suspenze, což nám umožnilo zkrátit dobu přípravy vzorků, což bylo důležité, jelikož vzhledem k počtu vzorků a měření, které jsme prováděli, bylo potřeba zkrátit čas přípravy i měření na minimum, jinak by nebylo možné získat dostatečné množství dat.

3.2 Vliv koncentrace protonoforu CCCP na vnitrobuněčné pH kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Podle plánu práce jsme zkoumali závislost acidifikace cytosolu na koncentraci protonoforu CCCP přidaného do buněčné suspenze. Tyto pokusy jsme prováděli v prostředí 25 mM pufru MES-TEA o třech různých pH a to jak za přítomnosti 2% glukózy tak bez ní.

Měření jsme nejprve provedli pro koncentrace CCCP do 25 μM, přičemž výsledky těchto měření jsou zobrazeny v Grafu 2. Následně jsme provedli ještě podrobnější zkoumání pro koncentrace CCCP nižší než 10 μM, jehož výsledky jsou znázorněny v Grafu 1. Tímto měřením jsme eliminovali vliv bodů naměřených pro vyšší koncentrace CCCP na směrnici pro nižší koncentrace a získali tak pro ně přesnější reprezentaci.

Jak je vidět z obou sad měření, v souladu s předpoklady pozorujeme, že cytosolické pH se snižuje spolu se zvyšující se koncentrací CCCP v roztoku. Pozorované směrnice závislosti acidifikace na koncentraci CCCP jsou v téměř celém rozsahu měření lineární, přičemž pro sadu měření s nižšími koncentracemi pozorujeme, že směrnice naměřené v přítomnosti glukózy i bez ní jsou pro jednotlivá pH pufrů téměř shodné. To naznačuje, že okyselení není ovlivňováno dalšími pochody. Toto je důležitý poznatek, který nám ukazuje, že na polohu sigmoid v následujících titračních experimentech a polohu jejich inflexních bodů má hlavní vliv koncentrace CCCP vně buněk, nikoli další procesy podílející se na ustavení koncentrace protonů v cytosolu v ustáleném stavu.

Linearita závislosti vnitrobuněčného pH na koncentraci CCCP v buněčné suspenzi je pro nás také velmi důležitá, jelikož nám v dalších měřeních umožňuje spojit naměřené změny vnitrobuněčného pH s koncentrací neutrální formy CCCP

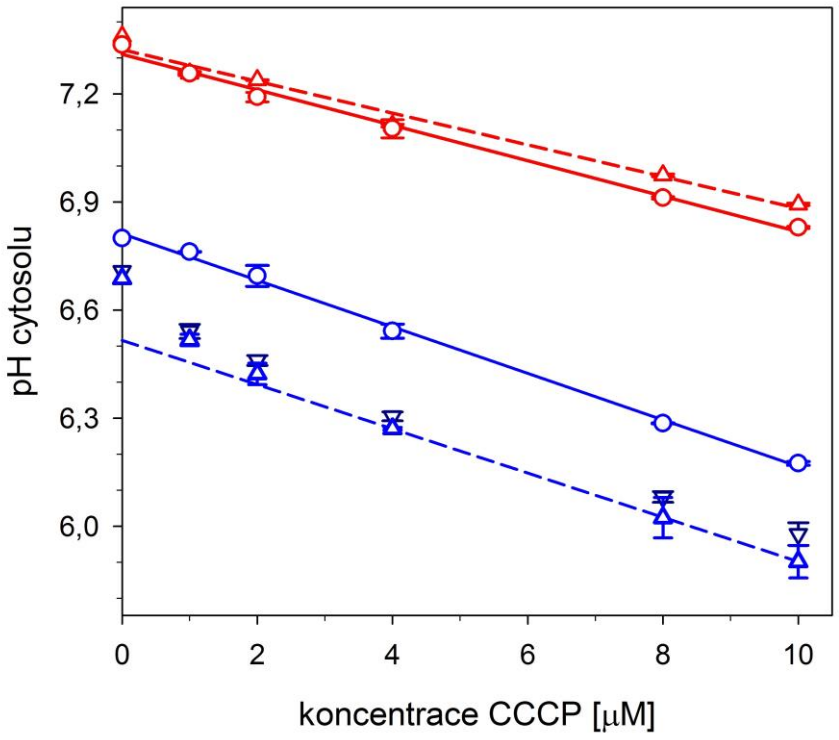
vstupující do buněčného prostoru a bez nelineárního zkreslení tímto způsobem odečítat změnu pH na povrchu buněk oproti pH pufru.

Z měření během několika různých dní na více vzorcích jsme zjistili, že určené směrnice závislostí vnitrobuněčného pH na koncentraci CCCP se mohou mírně lišit, což může souviset s rozdílnými hodnotami koncentrace zbytkového ATP v buňkách a s tím související aktivitou pump Pma1 nebo V-ATPázy. Tyto odchylky mezi jednotlivými vzorky mohou být způsobeny odlišnou dobou kultivace, která mohla být ± 1,5 hodiny, což se při sériích měření trvajících déle jak 12 hodin může snadno stát.

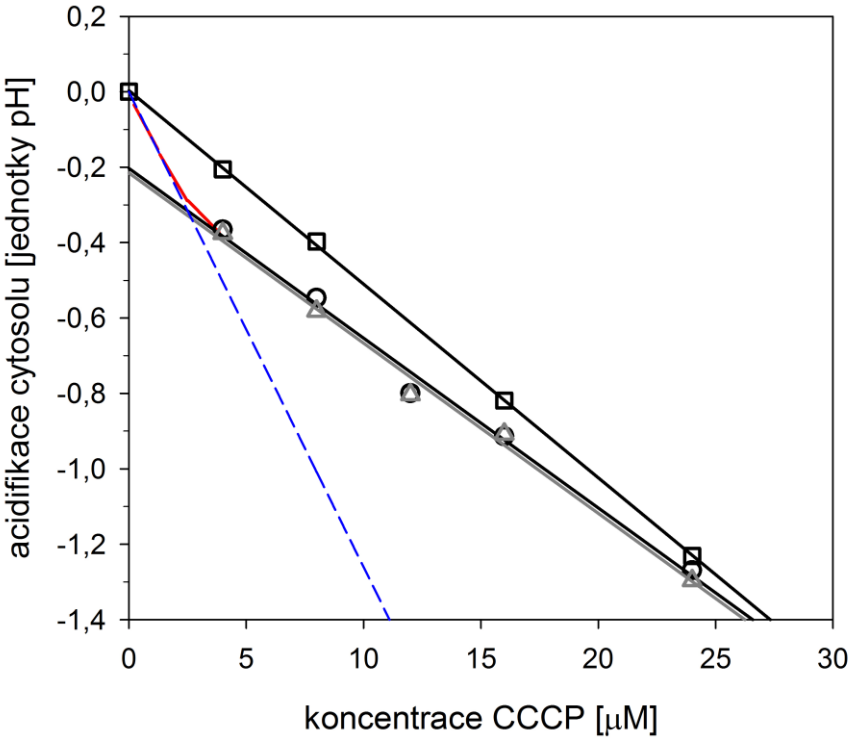
Jedinou odchylkou od lineární závislosti pozorujeme pro buňky bez přítomnosti glukózy při pH 6,5 a 7,3 při koncentracích CCCP nižších než 4 μM, jak je názorně vidět v Grafu 1. Toto zvláštní chování jsme předpokládali již při měřeních ve vyšších koncentracích, kdy vypočtená lineární regrese pro pH 6,5 a 7,3 neprocházela v dostatečné blízkosti bodu [0,0]. V Grafu 2 proto naznačujeme průběh, který by závislost mohla za rozumných předpokladů mít. Toto odlišné chování systému jsme podrobněji nezkoumali, jak rozebíráme v diskusi.

Výsledky měření ve vyšších koncentracích CCCP nám ukazují, že rozdíly ve vnitrobuněčných pH naměřených pro různá pH pufrů nejsou tak velké jako pro nižší koncentrace CCCP. To znamená, že závislost acidifikace na pH prostředí má při vyšších koncentracích CCCP méně strmou směrnici a tedy rozdíl acidifikací mezi dvěma různými pH pufrů je méně výrazný. Kdybychom tedy v měření titračních křivek, jež následovalo po těchto měřeních, použili vysoké koncentrace CCCP, měli bychom problém s jejich fitováním, jelikož by se zkrátily ve směru osy acidifikace a roztáhly ve směru osy pH pufrů, čímž by začaly připomínat lineární závislost místo sigmoidální.

Na základě těchto závěrů jsme tedy jako optimální koncentraci CCCP pro další pokusy zvolili rozmezí 5 až 10 μM CCCP, při těchto koncentracích je acidifikace již dostatečně velká a máme tedy dobrý poměr signál šum, zatímco stále pozorujeme dostatečný rozdíl mezi výsledky získanými při stejných koncentracích CCCP za různých pH pufrů. Navíc v tomto rozmezí koncentrací máme potvrzenou lineární závislost mezi acidifikací kvasinkového cytosolu a koncentrací CCCP přidaného do buněčné suspenze, význam čehož jsme zmínili výše.



Graf 1: Graf závislosti pH kvasinkového cytosolu na koncentraci CCCP. Při měření byly použity sady buněčných suspenzí s různými pH: 6,5 (trojúhelníky obrácené nahoru), 7,3 (trojúhelníky obrácené dolů) a 8,5 (kruhy). Všechna data byla získána jako technické duplikáty, přičemž chybové úsečky zobrazené v grafu představují standartní odchylku od průměrné hodnoty. Měření proběhlo za přítomnosti glukózy (červeně zobrazená data) i bez ní (modře zobrazená data). Pro hladovějící buňky v pufru o pH 6,5 vyhovuje lineární regrese zobrazená přerušovanou čárou pouze datům naměřeným pro koncentrace CCCP větší nebo rovné 4 μM.



Graf 2: Závislost acidifikace cytosolu kvasinkových buněk na koncentraci CCCP v buněčné suspenzi. Při měření byly použity sady buněčných suspenzí s různými pH: 6,5 (kruhy), 7,3 (trojúhelníky) a 8,5 (čtverce). Zobrazena jsou pouze měření provedená bez přítomnosti glukózy. Lineární regrese určené pro sady měření s pH 6,3 a 7,5 protínají svislou osu v blízkosti hodnoty -0,2 oproti předpokládanému bodu 0, proto je červenou linkou vyznačen předpokládaný tvar závislosti v oblasti bez naměřených bodů a směrnice lineární závislosti pro chování v blízkosti nulové koncentrace CCCP

3.3 Závislost protonoforem CCCP způsobené acidifikace cytosolu kvasinek na pH pufru

Jak jsme diskutovali v teoretickém úvodu, vliv CCCP na acidifikaci cytosolu buněk je ovlivněn disociační rovnováhou CCCP, která je závislá na pH prostředí, v němž se molekuly CCCP nachází. Závislost acidifikace cytosolu vyvolané působením CCCP na pH pufru v buněčné suspenzi jsme zkoumali měřením za použití 25 mM pufru MES-TEA bez přítomnosti glukózy za použití konstantní koncentrace CCCP 6 μM. V prvních měřeních, jsme tuto závislost zkoumali za použití pufrů s rozsahem pH 6,1 až 9,3. Výsledky tohoto měření jsou zobrazeny v Grafu 3.

Díky tomu, že používáme koncentraci CCCP, která leží v oblasti, pro niž jsme potvrdili lineární závislost změn pH buněčného cytosolu na koncentraci CCCP, můžeme v tomto měření předpokládat lineární závislost mezi naměřeným pH a koncentrací neutrální formy CCCP vstupující do buněčného prostoru. Změřené pH nám tedy slouží jako signál vypovídající o disociační rovnováze CCCP na povrchu buněčné membrány, která je závislá na pH v tomto prostoru.

Naměřenou závislost představující titrační křivku CCCP jsme byli schopni fitovat sigmoidální závislostí odpovídající rovnici

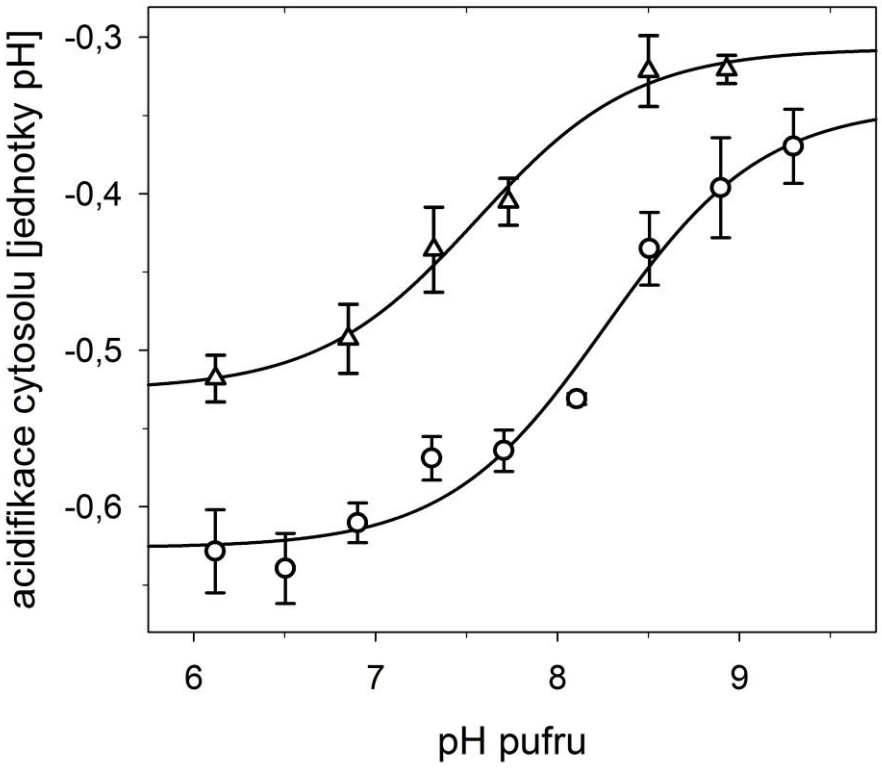
$$pH_{in} = A + \frac{B}{1+10^{pH_{střed}-pH_{pufr}}} \quad (4)$$

v němž A a B jsou konstanty a $pH_{střed}$ je pH pufru v inflexním bodě křivky. Stejnou sigmoidální funkcí, i když bez posunu po svislé ose o konstantu A, lze reprezentovat křivku popisující disociační rovnováhu CCCP. Toto odpovídá mechanismu působení CCCP, jak jsme jej zmínili v teoretickém úvodu (do buňky proniká pouze neutrální forma CCCP a její poměr k celkovému množství CCCP přidanému do buněčné suspenze odpovídá disociační rovnováze řízené pH prostředí, v němž se molekuly nacházejí).

Inflexní bod křivky odpovídající stavu, kdy je koncentrace disociované formy CCCP rovna koncentraci nedisociované formy, odpovídá $pH_{střed}$ = 8,26 ± 0,12. Hodnota pH náležející tomuto stavu je běžně pro kyseliny (jako je CCCP) označováno jako pK_A. Hodnota pK_A pro CCCP ve vodním prostředí je však standardně uváděna jako 6,09 [18]. Pozorujeme tedy rozdíl přibližně 2,2 jednotek pH. To naznačuje, že pH v oblasti, kde dochází k ustavení rovnováhy disociované a nedisociované formy CCCP, která následně ovlivňuje měřené pH cytosolu, je značně odlišné od pH pufru, v němž se buňky nacházejí.

Toto pozorování by se dalo vysvětlit přítomnosti negativního povrchového náboje a jemu odpovídajícího negativního povrchového potenciálu, který vede ke zvýšení lokální koncentrace protonů na povrchu buněčné membrány a tím ke zvýšení kyselosti prostředí v této oblasti. Abychom ověřili přítomnost tohoto povrchového náboje a potenciálu, provedli jsme další měření závislosti acidifikace cytosolu za konstantní koncentrace 6 μM CCCP v 25 mM pufrech MES-TEA s rozpětím pH 6,1 až 8,9. Při těchto měřeních jsme oproti původním zvýšili iontovou sílu roztoku přidáním 5 mM KCl a 145 mM cholin chloridu, což by mělo mít za následek

zeslabení efektu povrchového potenciálu, jak diskutujeme v teoretickém úvodu. Výsledky těchto měření jsou také zobrazeny v Grafu 3. Pozorujeme zjevný pokles $pH_{střed}$ o 0,7 jednotky pH na hodnotu $pH_{střed}$ = 7,56 ± 0,10. Tímto měřením jsme tedy potvrdili přítomnost povrchového potenciálu a jeho vliv na změnu pH u povrchu buněčné membrány zkoumaných kvasinek.



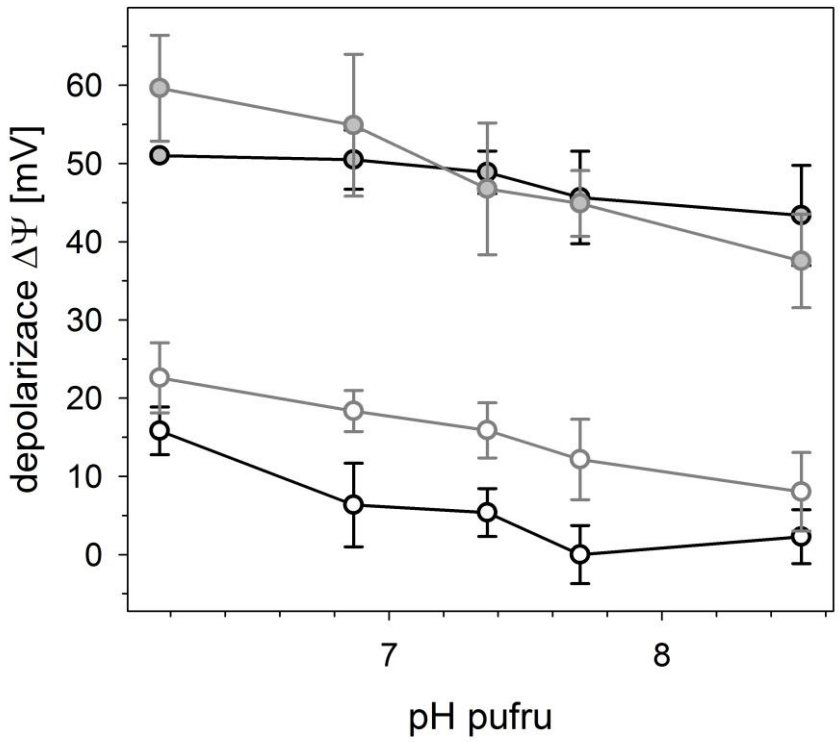
Graf 3: Závislost protonoforem CCCP způsobené acidifikace cytosolu kvasinek na pH pufru. Měření byla provedena v prostředích o různé iontové síle: body znázorněné kruhy byly naměřeny v prostředí o nízké iontové síle 25 mM pufru MES-TEA, body znázorněné trojúhelníky byly naměřeny v prostředí o vysoké iontové síle 25 mM pufru MES-TEA, 5 mM KCl a 145 mM cholin chloridu. Zobrazená data a chybové úsečky jsou výsledkem měření triplikátů.

Na působení CCCP, tak jak je popisujeme v teoretickém úvodu, musí mít vliv také membránový potenciál, jelikož při každém transportním cyklu protonů do buňky probíhá vypuzení aniontu CCCP ven z buňky. Toto vypuzení by mělo být závislé na velikosti negativního difuzního potenciálu plasmatické membrány. Proto by její depolarizace měla ovlivnit také míru acidifikace buněčného cytosolu.

Provedli jsme tedy měření acidifikace vyvolané přidáním CCCP v několika 25 mM pufrech MES-TEA o různých pH, přičemž jsme se snažili vyvolat depolarizaci buněčné membrány kvasinek přidáním KCl o koncentraci 150 mM.

Napřed jsme však ověřili, že po přidání 150 mM KCl do buněčné suspenze skutečně dochází k výraznému poklesu membránového potenciálu. Námi použitá metoda měření pomocí redistribuční fluorescenční sondy diS-C_3(3) však umožňuje stanovit pouze rozdíly membránových potenciálů oproti vhodně vybranému referenčnímu bodu, nikoliv jejich hodnoty absolutní. V případě míry depolarizace plasmatické membrány presentované na Grafu 4 je tímto referenčním bodem akumulace sondy v buňkách naměřená ve vzorcích s nízkou koncentrací KCl (5mM) a pH = 7,7. Iontová síla byla přidáním 145 mM cholin chloridu v těchto suspenzích dorovnána na hodnotu stejnou jako v suspenzích se 150 mM KCl. Depolarizaci jsme měřili jak s 10 μM CCCP, tak bez něj, a to v triplikátech (ve dvou vzorcích buněk s pHluorinem a jedné kontrole bez něj). Jelikož membránový potenciál je záporný a při depolarizaci se přibližuje kladným hodnotám, uvádíme zde hodnotu depolarizace jako kladnou veličinu.

Pozorujeme, že použité koncentrace KCl způsobují depolarizaci buněčné membrány kvasinek. Ukázalo se také, že mírnou depolarizaci membránového potenciálu způsobuje i samotné CCCP. Jeho efekt je nicméně mnohem slabší než efekt 150 mM KCl.

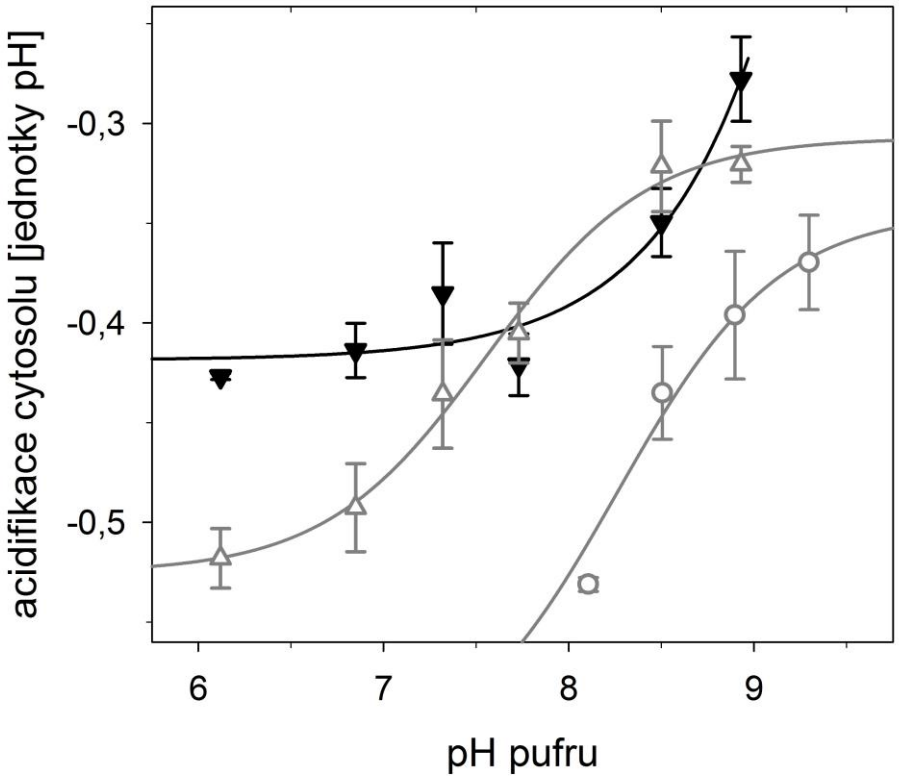


Graf 4: Závislost depolarizace membránového potenciálu kvasinkových buněk na pH pufru. Data s černými linkami znázorňují měření bez CCCP, data s šedými linkami pak měření s 10 μM CCCP. Data s prázdnými kolečky představují měření s 5 mM KCl v roztoku a data s plnými kolečky představují měření se 150 mM KCl v roztoku.

Potvrdili jsme tedy, že přidáním 150 mM KCl do buněčné suspenze jsme schopni vyvolat výraznou depolarizaci difuzního membránového potenciálu, o velikosti kolem 30 mV, přičemž tato hodnota prakticky nezávisí na pH suspenze. To znamená, že depolarizační efekt vzniklý přidáním 150 mM KCl můžeme využít ke zkoumání vlivu snížení membránového potenciálu na titrační křivky závislosti acidifikace cytosolu vyvolané působením CCCP na pH pufru. Provedli jsme tedy měření závislosti acidifikace cytosolu za konstantní koncentrace 6 μM CCCP v 25 mM pufrech MES-TEA s rozpětím pH 6,1 až 8,9. Při těchto měřeních jsme zachovali stejnou iontovou sílu jako při zkoumání vlivu povrchového potenciálu, avšak použili jsme plných 150 mM KCl. Výsledky tohoto měření jsou zobrazeny v Grafu 5, kde pro srovnání uvádíme také výsledky z Grafu 3.

Dle naměřených dat dochází v depolarizovaných buňkách k mnohem slabší acidifikaci než v nedepolarizovaných. To odpovídá předpokladu, že depolarizovaná buňka nevylučuje anionty CCCP tak rychle a nedochází k tak intenzivnímu okyselení

cytosolu jeho působením. V souladu s modelem jsme tedy potvrdili, že acidifikace kvasinek protonoforem CCCP závisí také na velikosti membránového potenciálu.



Graf 5: Závislost protonoforem CCCP způsobené acidifikace cytosolu kvasinek na pH pufru za depolarizace membránového potenciálu 150 mM KCl. Měření byla provedena v prostředích o různé iontové síle: body znázorněné kruhy byly naměřeny v prostředí o nízké iontové síle 25 mM pufru MES-TEA, body znázorněné trojúhelníky směřujícími nahoru byly naměřeny v prostředí o vysoké iontové síle 25 mM pufru MES-TEA, 5 mM KCl a 145 mM cholin chloridu a body znázorněné trojúhelníky směřujícími dolů byly také naměřeny v prostředí o vysoké iontové síle 25 mM MES-TEA a 150 mM KCl. Zobrazená data a chybové úsečky jsou výsledkem měření triplikátů.

3.4 Vlivu iontové síly roztoků na povrchový potenciál a potvrzení závěrů pomocí Gouy-Chapmanovy teorie

Z našich dosavadních měření vyplývá, že přítomnost povrchového potenciálu u kvasinkových buněk významně ovlivňuje pH na povrchu těchto buněk, které se výrazně liší od celkového pH roztoku. Pomocí Gouy-Chapmanovy teorie, jejíž nejdůležitější závěry jsme shrnuli v teoretickém úvodu, můžeme na základě našich

měření provést srovnání získaných výsledků na kvantitativní úrovni, čímž bychom chtěli demonstrovat robustnost použitých metod a naměřených údajů.

Jelikož z měření známe pH pufru a jemu odpovídající pH na povrchu buněčné membrány (6,09), můžeme snadnou aplikací definice pH

$$pH = -\log[H_3O^+] \tag{5}$$

(přičemž splňujeme předpoklad zředěného vodného roztoku a tedy rovnosti aktivity a koncentrace látky) určit koncentrace protonů ve volném prostoru roztoku c_∞ a na povrchu buněk c_s. Konkrétní hodnoty pH pufrů při dosažení pH 6,09 na povrchu buněk a k nim náležející koncentrace c_s a c_∞ uvádíme v Tab. 4. Vypočtené koncentrace pak můžeme spolu s rovnicí (3) využít k určení hodnoty povrchového potenciálu.

Konkrétně pro naše měření jsme určili, že buňky v roztoku o nízké iontové síle (tedy v roztoku 25 mM MES-TEA) mají povrchový potenciál -130 mV a buňky v roztoku o vysoké iontové síle (tedy v roztoku 25 mM MES- TEA, 5 mM KCl a 145 mM cholin chloridu) mají povrchový potenciál -88 mV.

Takto získané hodnoty povrchového potenciálu můžeme použít spolu s rovnicí

$$A\sigma = \sqrt{C}\,\sinh\frac{zF\psi_S}{2RT} \tag{2}$$

k určení hodnoty hustoty povrchového náboje přenásobené konstantou A, kterou nevyjadřujeme. Pomocí výpočtu jsme tedy určili hodnoty $A\sigma$, které také uvádíme v Tab. 4. Porovnáním zjišťujeme, že určené nábojové hustoty se liší jen asi o 14%, což odpovídá přirozenému předpokladu, že nábojová hustota na povrchu buněk je stabilní za podmínek, s nimiž jsme pracovali, a nemění se vlivem změny iontové síly roztoku.

	$pH_{střed}$	c_s [nM]	c_∞ [nM]	Aσ
nízká iontová síla	8,26 ± 0,12	813	5,50	30,5
vysoká iontová síla	7,56 ± 0,10	813	27,5	34,9

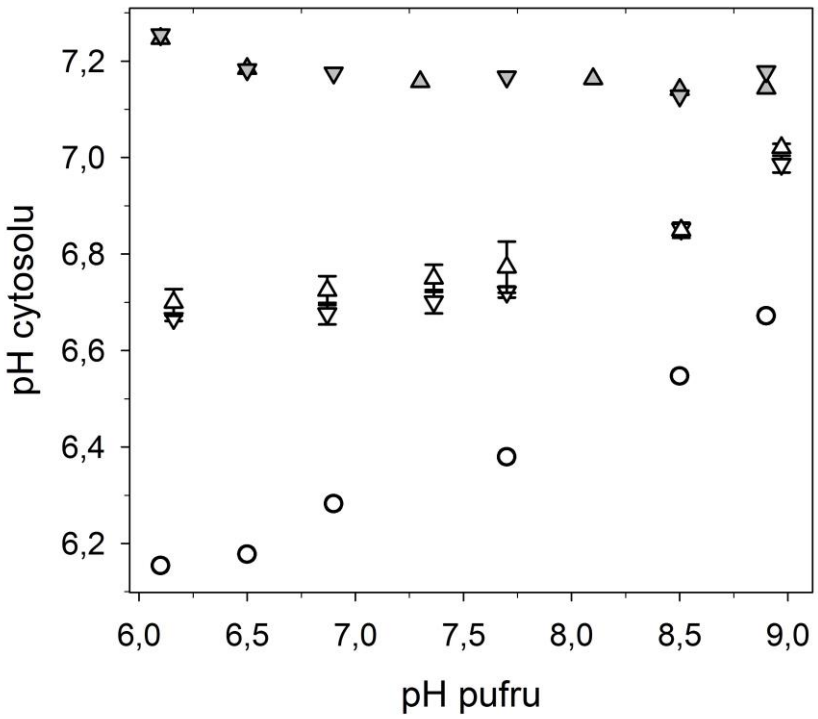
Tab. 4: Naměřené hodnoty $pH_{střed}$ a jejich směrodatné odchylky, jim odpovídající koncentrace protonů u povrchu buňky c_s a ve volném pufru c_∞ a vypočtené hodnoty Aσ

3.5 Vliv extracelulárního pH na pH intracelulární při absenci CCCP

Zkoumali jsme také vliv glukózy na schopnost kvasinek udržovat stabilní vnitřní prostředí. Provedli jsme měření v 25 mM pufrech MES-TEA o pH v rozmezí 6,1 až 8,9 za přítomnosti 2% glukózy i bez ní, bez přítomnosti CCCP a měřili jsme série jak bez KCl tak s ním. Z měření jsme získali výsledky, které jsou zobrazeny v Grafu 6.

Buňky, které mají k dispozici zdroj energie, 2% glukózu, dokáží udržovat téměř konstantní pH svého cytosolu v blízkosti hodnoty 7,2 v celém zkoumaném rozsahu vnějšího pH pufrů. Bez glukózy již kvasinky podléhaly změnám vnějšího pH více kdy pro zkoumaný rozsah vnějšího pH pufrů se vnitrobuněčné pH kvasinkových buněk zvyšovalo v rozsahu přibližně od 6,2 do 6,6.

Měření prováděná na buňkách bez glukózy jsou hůře reprodukovatelná pravděpodobně kvůli různým zásobám ATP v jednotlivých vzorcích, jak již bylo diskutováno dříve. I tak nicméně pozorujeme, že pro pH vyšší hodnoty než 7,5 je pozorovatelná zjevná tendence protonů vytékat ven z buněk, neboť za těchto podmínek se s rostoucím pH pufrů mírně zvyšuje cytosolické pH. Toto zvýšení cytosolického pH svědčí o tom, že gradient elektrochemického potenciálu protonů při těchto měřeních byl takový, že poháněl jejich pasivní difúzi ven z buňky. Acidifikace cytosolu vyvolaná CCCP je spojena s opačným tokem protonů zpět do buňky. To znamená, že CCCP možná přenáší protony proti gradientu jejich elektrochemického potenciálu díky energii spojené s transportem aniontů CCCP v elektrickém poli spojeném s membránovým potenciálem.



Graf 6: Závislost pH cytosolu na pH pufru. Měření probíhalo v 25mM pufrech MES-TEA bez přítomnosti CCCP v několika sériích s odlišnými podmínkami: plné šedé trojúhelníky jsou data získaná z buněk energizovaných 2% glukózy v roztoku, kruhy představují data z buněk bez glukózy v roztoku a prázdné trojúhelníky znázorňují data z buněk bez glukózy a s KCl v roztoku - prázdné trojúhelníky směřující nahoru byly v prostředí s 5 mM KCl a 145 mM cholin chloridu a prázdné trojúhelníky směřující dolů byly v prostředí se 150 mM KCl. Měření s KCl byla prováděna formou duplikátů, což nám umožnilo určit také chybové úsečky jako střední odchylky průměru.

4 Diskuse výsledků

V naší práci jsme zkoumali, jak působí protonofor CCCP na kvasinkové buňky studovaných kmenů. Toto působení jsme studovali především ve vztahu k cytosolickému pH buněk, jež jsme měřili synchronně skenovanou fluorescenční spektroskopií na buňkách obsahující geneticky kódovanou fluorescenční sondu poměrový pHluorin.

V úvodních experimentech jsme zjistili, že s použitím nám dostupných metod měření časového vývoje vnitrobuněčného pH ihned po přidání CCCP do buněčné suspenze nedostaneme vypovídající data týkající se kinetiky změn cytosolického pH po aplikaci CCCP, jelikož proces ustavení rovnováhy probíhá rychleji, než jsme schopni manipulovat se vzorkem a spustit měření. K provedení měření by tedy bylo za potřebí velmi specifického experimentálního zařízení umožňujícího plynulé sledování fluorescence pHluorinu ve vzorku a současně přimíchání požadované koncentrace CCCP přímo do měřeného vzorku, to vše za podmínky zachování stabilní hustoty buněk, rovnoměrného rozdělení CCCP v prostředí a zabránění vzniku rušivých vlivů, jako například vzduchových bublinek.

Naše další zkoumání se tedy omezilo na buněčné suspenze s CCCP v ustáleném stavu. Z měření závislosti acidifikace cytosolického pH na koncentraci CCCP jsme určili, že tato závislost je na většině studovaného rozsahu lineární. Pouze pro koncentrace CCCP nižší než 4 μM a pro pH pufrů 6,5 a 7,3 jsme pozorovali odchylku od této lineární závislosti. V této oblasti by podle naměřených dat měla směrnice studované závislosti značně zvyšovat svou strmost, aby splnila přirozený předpoklad nulové acidifikace při nulové koncentraci CCCP. Podrobněji jsme se však tímto chováním závislosti nezabývali, jelikož k popisu by bylo třeba vytvořit detailní model dynamické rovnováhy mezi všemi procesy výměny protonů mezi cytosolem a pufrem. O to jsme se zatím nepokoušeli, protože jsme nepřišli na spolehlivý způsob, jak platnost takového modelu kvantitativně ověřovat.

Linearity závislosti v koncentracích vyšších než 4 μM jsme využili při interpretaci pozdějších měření, jelikož jestliže je lineárně závislé naměřené pH cytosolu na koncentraci CCCP v roztoku a stejně tak je na celkové koncentraci CCCP lineárně závislá i koncentrace neutrální formy CCCP vstupující do buňky, jejíž poměr je vůči celkové koncentraci dán disociační rovnováhou a pH na povrchu buňky kde k disociaci dochází, pak je možné dát do vztahu lineární závislosti i

naměřené vnitrobuněčné pH a koncentraci neutrální formy CCCP - což nám dává nepřímou informaci o pH určujícím disociační rovnováhu, tedy pH na povrchu buňky.

Na měření koncentrační závislosti acidifikace jsme pak přímo navázali při měření závislosti acidifikace vyvolané protonoforem CCCP na pH pufru v buněčné suspenzi. Z tohoto měření jsme dostali titrační křivky, jejichž inflexní body odpovídající pH, při němž je v prostředí stejná koncentrace disociovaných a nedisociovaných molekul CCCP, byly posunuty oproti předpokládanému pKa protonoforu CCCP ve vodních roztocích o více jak dvě jednotky níže. Toto odpovídá situaci, kdy pH na povrchu buněk, kde dochází k disociaci, je oproti celkovému pH pufru v suspenzi o tyto 2,2 jednotky kyselejší. Jako příčinu takového rozdílu mezi pH na povrchu a pH pufru jsme identifikovali negativní povrchový náboj, jehož působením byly k povrchu přitahovány protony, jejichž koncentrace definitoricky určují pH prostředí. Zmíněnou roli negativního náboje jsme potvrdili měřením se změněnou iontovou silou roztoku, což je obvyklý způsob dokazování vlivu povrchového potenciálu.

V souladu s Gouy-Chapmanovou teorií jsme na základě naměřených dat provedli výpočty a dostali kvantitativní souhlas získaných výsledků. Z měření titračních křivek při různých iontových silách roztoků jsme získali dvě odlišná $pH_{střed}$. Z těchto $pH_{střed}$, ze známých iontových sil a skutečného pH u povrchu buněk, které se muselo pro $pH_{střed}$ rovnat pK_A protonoforu CCCP 6,09 jsme určili nejprve koncentraci protonů ve volném roztoku a u povrchu buňky, z nich pak hodnotu povrchových potenciálů a z nich pak relativní poměr hodnot hustoty povrchového náboje pro dva odlišné případy iontové síly roztoků. Jelikož takto určené hustoty povrchového náboje se lišily jen o 14%, dosáhli jsme velice dobré shody mezi nimi a usuzujeme tedy, že naše postupy byly korektní.

Nepředpokládaným, ale o to významnějším výsledkem naší práce je návrh metody, která umožňuje měřit lokální povrchový potenciál buněk, což doposud nebylo možné. Předpokládáme, že princip této metody, demonstrovaný s použitím protonoforu CCCP, bude možné aplikovat i na studium acidifikace cytosolu kvasinek vyvolané působením dalších slabých kyselin. Z praktického hlediska bude mít největší význam studium vlivu slabých kyselin používaných jako konzervanty.

Při našich zkoumáních jsme narazili také na zvláštnost, jež odporuje předpokladům, které učinili někteří výzkumníci v minulosti. V pracích [33-35] bylo využito předpokladu, že po aplikaci CCCP k různým buňkám se pH cytosolu bude rovnat pH pufru, v němž jsou buňky suspendovány. Na základě tohoto předpokladu pak využili CCCP při generování kalibrační křivky pro měření intracelulárního pH. Toto bylo založeno na skutečnosti, že CCCP dokáže redukovat gradient protonmotivní síly v mitochondriích a tím odpřáhnout respiraci od fosforylace [36, 37] a na tom, že tento lipofilní odpřahovač zvyšuje elektrickou vodivost modelových lipidových membrán [38].

My jsme však pozorovali něco jiného. Nejprve je třeba si povšimnout výsledků zobrazených na Grafu 6. Podle nich dochází u buněk bez glukózy při vyšších vnějších pH pufrů k vytékání protonů z buněk. Pro ta samá pH pufrů však CCCP stále způsobuje acidifikaci buněčného cytosolu. To znamená, že za přítomnosti CCCP směřuje celkový tok protonů i pro vysoká pH do buňky a nikoliv ven z ní. CCCP je tedy, jak se zdá, schopné transportovat protony proti jejich elektrochemickému gradientu.

5 Závěr

V této diplomové práci jsme detailně zkoumali působení protonoforu CCCP na kvasinkové buňky a především pH jejich cytosolu, za různých podmínek.

Z našich měření vyplývá, že k ustavení rovnovážného stavu po přidání CCCP dochází ve velmi krátkém časovém úseku do 5ti sekund. Přidání CCCP do zkoumané buněčné suspenze způsobuje okyselení cytosolu přítomných kvasinkových buněk, přičemž velikost tohoto okyselení je přímo úměrná dodané koncentraci CCCP. V rozsahu koncentrací 4 - 24 μM CCCP jsme potvrdili, že tato závislost má lineární charakter, přičemž směrnice této závislosti není ovlivněna tím, zda je nebo není aktivní Pma1 ATPáza, jak ukázalo srovnání měření s glukózou a bez ní.

Dále jsme při pozorování závislosti protonoforem CCCP způsobené acidifikace cytosolu kvasinek na pH pufru zjistili, že naměřené titrační křivky neodpovídají svou polohou inflexního bodu standardně uváděné hodnotě pK_A CCCP 6,09, ale že jsou posunuty o 2,2 jednotky pH do kyselejších hodnot. To nás vedlo k podrobnějšímu zkoumání a zjištění, že změnu pH u povrchu kvasinkových buněk, kde dochází k ustavení disociační rovnováhy CCCP relevantní pro okyselení cytosolu, má na svědomí záporný povrchový náboj. Přítomnost tohoto náboje a jím podmíněného povrchového potenciálu jsme potvrdili pokusy v roztocích s různou iontovou silou. Námi získané údaje jsou v dobré shodě s Gouy-Chapmanovou teorií povrchového potenciálu a náboje, jak jsme také kvantitativně předvedli.

Měřením titračních křivek CCCP za přítomnosti 150 mM KCl, které způsobuje prokazatelnou depolarizaci kvasinkové membrány, jsme dokázali také závislost funkce CCCP na velikosti difuzního membránového potenciálu.

Srovnáním chování cytosolického pH kvasinkových buněk v pufrech o různých pH bez glukózy a v přítomnosti CCCP i bez ní, jsme došli k závěru, že CCCP je schopno přesouvat protony i proti jejich elektrochemickému gradientu, což je závěr, který by měl být brán v potaz při dalším využití tohoto protonoforu.

Chtěli bychom zde také zmínit skutečnost, že náš výzkum a tato diplomová práce posloužily jako základ pro dva vědecké články, z nichž jeden, který uvádíme v Příloze 2, je v době odevzdání této diplomové práce v recenzním řízení v časopise Scientic Reports ve formě revidované verze reagující na připomínky recenzentů.

6 Seznam literatury

1. Hoffman, M. (1992) Yeast biology enters a surprising new phase. Science. **255**, 1510-1511.
2. Frohlich, K. U., and F. Madeo. (2001) Apoptosis in yeast: a new model for aging research. Exp Gerontol. **37**, 27-31.
3. Wolfe, D. M., and D. A. Pearce. (2006) Channeling studies in yeast - Yeast as a model for channelopathies? Neuromolecular Med. **8**, 279-306.
4. Mattiazzi, M., U. Petrovic, and I. Krizaj. (2012) Yeast as a model eukaryote in toxinology: A functional genomics approach to studying the molecular basis of action of pharmacologically active molecules. Toxicon. **60**, 558-571.
5. Rodriguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. Biochim Biophys Acta. **1469**, 1-30.
6. Cyert, M. S., and C. C. Philpott. (2013) Regulation of Cation Balance in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. **193**, 677-713.
7. Petrezselyova, S., J. Ramos, and H. Sychrova. (2011) Trk2 transporter is a relevant player in K+ supply and plasma-membrane potential control in Saccharomyces cerevisiae. Folia Microbiol (Praha). **56**, 23-28.
8. Fairman, C., X. L. Zhou, and C. Kung. (1999) Potassium uptake through the TOK1 K+ channel in the budding yeast. J Membr Biol. **168**, 149-157.
9. Bertl, A., J. Ramos, J. Ludwig, H. Lichtenberg-Frate, J. Reid, H. Bihler, F. Calero, P. Martinez, and P. O. Ljungdah. (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of trk1, trk2 and tok1 null mutations. Mol Microbiol. **47**, 767-780.
10. Zahradka, J., and H. Sychrova. (2012) Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. FEMS Yeast Res. **12**, 439-446.
11. Hans-Jürgen, B., G. Karlheinz, and K. Michael. (2003) Physics and Chemistry of Interfaces. Wiley VHC Verlag.
12. Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981) Ion transport in yeast. Biochim Biophys Acta. 88 -127.
13. Wang, P., D. M. Zhou, T. B. Kinraide, X. S. Luo, L. Z. Li, D. D. Li, and H. L. Zhang. (2008) Cell Membrane Surface Potential (psi(0)) Plays a Dominant Role in the Phytotoxicity of Copper and Arsenate. Plant Physiol. **148**, 2134-2143.
14. Gordiyenko, O. I., M. O. Anikieieva, S. L. Rozanova, S. Y. Kovalenko, I. F. Kovalenko, and E. O. Gordiyenko. (2015) Development of a model to investigate red blood cell surface characteristics after cryopreservation. Cryo Letters. **36**, 221-226.
15. Rao, Y., S. J. J. Kwok, J. Lombardi, N. J. Turro, and K. B. Eisenthal. (2014) Label-free probe of HIV-1 TAT peptide binding to mimetic membranes. Proc Natl Acad Sci U S A. **111**, 12684-12688.

16. Kraayenhof, R., G. J. Sterk, and H. Sang. (1993) Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. Biochemistry. **32**, 10057-10066.

17. Theuvenet, A. P. R., W. M. H. Van De Wijngaard, J. W. Vanderijke, and G. Borst-Pauwels. (1984) Application of 9-aminoacridine as a probe of the surface potential experienced by cation transporters in the plasma membrane of yeast cells. Biochim Biophys Acta. **775**, 161-168.

18. McLaughlin, S. G. A., and J. P. Dilger. (1980) Transport of protons across membranes by weak acids. Physiol Rev. **60**, 825-863.

19. Hopfer, U., Lehninge.Al, and T. E. Thompson. (1968) Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. **59**, 484-90.

20. McLaughlin, S. (1977) Electrostatic Potentials at Membrane-Solution Interfaces. Curr. Top. Membr. Trans. **9**, 71–144.

21. Gilson, M., and D. A. Beard. (2000) Introduction to continuum electrostatics. Biophysics Textbook Online.

22. Jackson, M. B. (2006) Molecular and Cellular Biophysics. 285 - 294

23. Hernlem, B., and S. S. Hua. (2010) Dual Fluorochrome Flow Cytometric Assessment of Yeast Viability. Curr Microbiol. **61**, 57-63.

24. Madrid, R., M. J. Gomez, J. Ramos, and A. Rodriguez-Navarro. (1998) Ectopic potassium uptake in trk1 trk2 mutants of Saccharomyces cerevisiae correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. J Biol Chem. **273**, 14838-14844.

25. Plasek, J., and K. Sigler. (1996) Slow fluorescent indicators of membrane potential: A survey of different approaches to probe response analysis. J Photochem Photobiol B. **33**, 101-124.

26. Plasek, J., D. Gaskova, H. Lichtenberg-Frate, J. Ludwig, and M. Hofer. (2012) Monitoring of real changes of plasma membrane potential by diS-C_3(3) fluorescence in yeast cell suspensions. J Bioenerg Biomembr. **44**, 559-569.

27. Pena, A., S. Uribe, J. P. Pardo, and M. Borbolla. (1984) The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. Arch Biochem Biophys. **231**, 217-225.

28. Plasek, J., A. Melcrova, and D. Gaskova. (2015) Enhanced Sensitivity of pHluorin-Based Monitoring of Intracellular pH Changes Achieved through Synchronously Scanned Fluorescence Spectra. Anal Chem. **87**, 9600-9604.

29. Vodáková, A. (2013) Měření změn vnitrobuněčné koncentrace iontů v mikroorganismech. Diplomová práce, MFF UK

30. Plasek, J., D. Gaskova, J. Ludwig, and M. Hoefer. (2013) Early changes in membrane potential of Saccharomyces cerevisiae induced by varying extracellular K+, Na+ or H+ concentrations. J Bioenerg Biomembr. **45**, 561-568.

31. Babuka, D. (2014) Response of plasma membrane potential and intracellular pH of yeast to changes in the concentration of extracellular K^+. Bakalářská práce, MFF UK

32. Jančíková, I. (2010) Stechiometrie transportu membránovým transportním proteinem MntH bakterie E. coli. Diplomová práce, MFF UK

33. Olsen, K. N., B. B. Budde, H. Siegumfeldt, K. B. Rechinger, M. Jakobsen, and H. Ingmer. (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. Appl Environ Microbiol. **68**, 4145-4147.

34. Plant, P. J., M. F. Manolson, S. Grinstein, and N. Demaurex. (1999) Alternative mechanisms of vacuolar acidification in H+-ATPase-deficient yeast. J Biol Chem. **274**, 37270-37279.

35. Vitiello, S. P., J. W. Benedict, S. Padilla-Lopez, and D. A. Pearce. (2010) Interaction between Sdo1p and Btn1p in the Saccharomyces cerevisiae model for Batten disease. Hum Mol Genet. **19**, 931-942.

36. Mitchell, P. (2011) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biochim Biophys Acta. **1807**, 1507-1538.

37. Terada, H. (1981) The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. Biochim Biophys Acta. **639**, 225-242.

38. Liberman, E. A., and V. P. Topaly. (1968) Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes. Biochim Biophys Acta. **163**, 125-36.

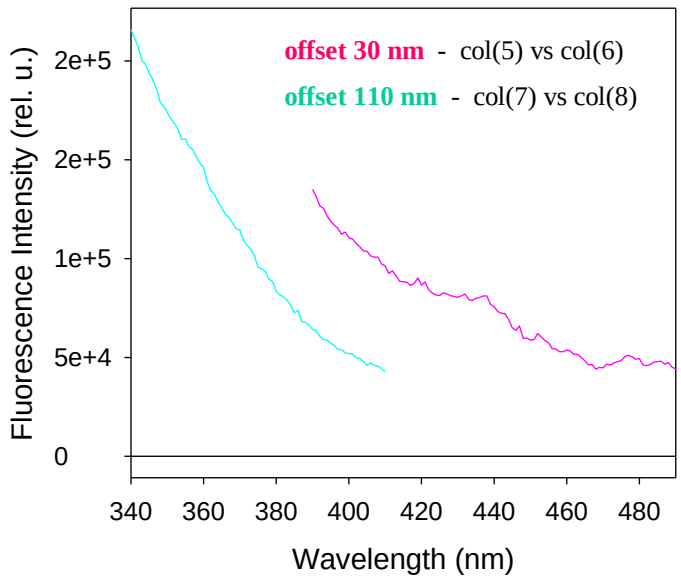
7 Přílohy

Příloha 1 - Postup zpracování surových SSF spekter v programu SigmaPlot 11

Conversion of raw SSF spectra measured in the suspensions of pHluorin stained cells to pH_{cyt} values. Notes on the use of SigmaPlot 11 template *pH_Supplement.jnb*

Step 1: Insertion of background spectra measured with control cells to the *pH_Supplement.jnb* teplate

Replace the data in columns **5** – auto30_lmbd, **6** - auto30_mean, **7** – auto110_lmbd and **8** - auto30_mean with the autofluorescence background spectra of a control sample without pHluorin, as measured under conditions identical with those of the experiment to be carried out with pHluorine stained cells. In particular, this concerns buffer composition cell concentration of the cell suspension. Note that some added reagents, like e.g. protonophore CCCP, may also influence the background spectra.



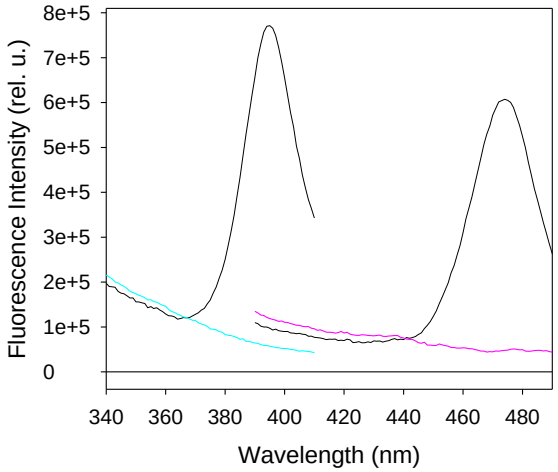
Step 2: Insertion of raw SSF spectra measured in the suspensions of pHluorin stained cells.

offset 30 nm

columns 1 – pHluo30_lmbd and 2 - pHluo30

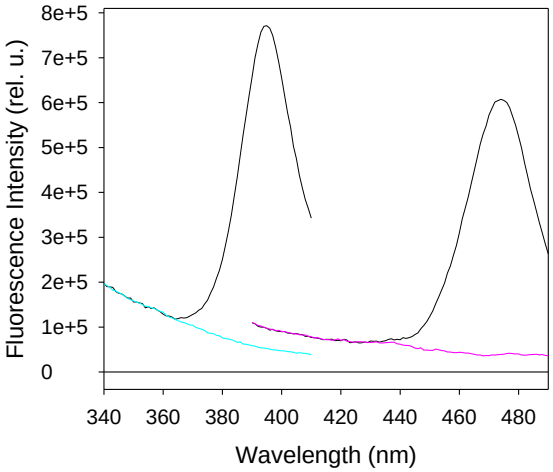
offset 110 nm

columns 3 – pHluo110_lmbd and 4 – pHluo110



Step 3: Fitting of the intensity of background spectra to the values displayed in the SSF spectra of pHluorin stained cells

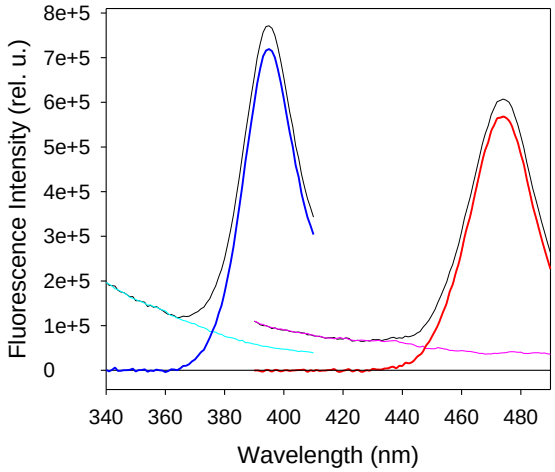
Choose the Transforms menu, then User-Defined Transform command. When the User-Defined Transform dialog box appears, open the file *BackgroundCorr.xfm*. Note that the file included into this Supporting information must be modified first to match the particular setting of your spectrofluorimeter. See Appendix A.



Step 4: Subtraction of backgroud from the raw SSF spectra, calculation of the ratio of peak intensities, and determination of cytosolic pH

In the User-Defined Transform dialog box, open the file *pH_Assess.xfm*. Note that the file included into this Supporting information must be modified first to match the particular setting of your spectrofluorimeter and your calibration curve. See Appendix B.

If the result of correction for background autofluorescence, displayed to the left of a main pHluorin peak, differs considerably from the zero line, you obviously failed to collect right background spectra.



Then you should repeat the control experiment, otherwise the assessed pH_{cyt} values may suffer from a systematic error. If the background correction is satisfactorily completed, **read the assessed pH_{cyt} value** shown in column 14, row 10.

Comments on required modifications of the *BackgroundCorr.xfm* transform

This *BackgroundCorr.xfm* transform file (as well as the file *pH_Assess.xfm* file described below) was created for the processing of SSF spectra taken with a Fluoromax 3 spectrofluorimeter operated with following settings: excitation and emission slit widths of 3 nm; scanning range 390 – 490 and 340 – 410 nm for the offset of 30 and 110 nm, respectively; scan step 1 nm. For other details see Plasek et al. Anal. Chem. 2015, 87, 9600−9604

List of *BackgroundCorr.xfm* commands

'ratio of raw SSF spectra to the spectra of background fluorescence from a control sample'

col(9)=col(2)/col(6)

col(10)=col(4)/col(8)

Note: Data for the offset of 30 and 110 nm are displayed in col(10) and col(9), respectively.

'assessment of multiplicative correction coefficients'

cell(11,2)=0

for i = 1 to **46** do

cell(11,2)=cell(11,2)+cell(9,i)

end for

cell(11,2)=cell(11,2)/**46**

cell(11,4)=0

for k = 1 to **23** do

cell(11,4)=cell(11,4)+cell(10,k)

end for

cell(11,4)=cell(11,4)/**23**

Note: For the offset of 30 nm, the mean value of the ratio of background intensities is calculated for the spectral range 390 – 435 nm; cells (9,1) to (9,46). For the offset of 110 nm, the mean is calculated for the spectral range 340 – 462 nm; cells (10,1) to (10,23). The mean values calculated in this way are stored in col(11) - CorrCoeff. If

you need for some reason do use slightly different spectral ranges, do not forget to change accordingly the above red-marked parameters in your new *BackgroundCorr.xfm* transform file.

'fitting of the background fluorescence from a control sample to'
'the background displayed in the raw SSF spectra of cells with pHluorin'
col(6)=1*col(6)*cell(11,2)
col(8)=1*col(8)*cell(11,4)

Note: The background fluorescence from a control sample are multiplied by correction coefficients stored in in col(11).

Comments on the required modifications of the pH_Assess.xfm transform

List of *pH_Assess.xfm* commands

'subtraction of the background fluorescence from the raw SSF spectrum of cells with pHluorin'
col(12) = col(2)-col(6)
col(13) = col(4)-col(8)

'assessment of peak intensities in the background-corrected SSF spectra'
cell(14,2) = (cell(12,**81**)+cell(12,**82**)+cell(12,**83**)+cell(12,**84**)+cell(12,**85**)+
+cell(12,**86**))/**6**
cell(14,4) = (cell(13,**54**)+cell(13,**54**)+cell(13,**55**)+cell(13,**56**)+cell(13,**58**))/**5**

Note: For the 110 nm offset, the peak intensities in the background-corrected SSF spectra are determined as mean fluorescence intensities over the excitation wavelength interval of 392−396 nm. For the 30 nm offset, the width of averaging interval is increased to 6 nm (470 - 475 nm), because with this offset the position of SSF peak is slightly pH dependent.

The actual position of the maxima of SSF peaks of pHluorine fluorescence may slightly vary if different slit widths are used, and/or as a result of different

spectral sensitivity of a particular spectrofluorimeter. If this happens, the above the above red-marked parameters in your *pH_Assess.xfm* transform file must me also modified.

'calculation of the ratio of SSF peak intensities measured with different offsets, R(110/30)'

cell(14,6) = cell(14,4)/cell(14,2)

'conversion of R(110/30) to pHcyt'

cell(14,10) = **4.3791+ 2.9025*cell(14,6) - 0.9589*cell(14,6)^2 + 0.1413*cell(14,6)^3**

Note: Insert your own calibration equation.

Příloha 2 - Článek založený na diplomové práci

A novel method for assessment of local pH at the periplasmic side of yeast plasma membrane

Jaromír Plášek[1*], David Babuka[1], Dana Gášková[1], Iva Jančíková[1], Jakub Zahumenský[1], and Milan Hoefer[2]

[1] Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Ke Karlovu 3, 12116 Prague, Czech Republic

[2] University of Bonn, Institute of Cellular and Molecular Botany, Kirschallee 1, 53115 Bonn, Germany

*** plasek@karlov.mff.cuni.cz**

Yeast cells exhibit a negative surface potential due to negative charges at the cell membrane surface. Consequently, local concentrations of cations at the periplasmic membrane surface may be significantly increased compared to their bulk environment. However, in cell suspensions only bulk concentrations of cations can be measured directly. Here we present a method enabling the assessment of local pH at the periplasmic membrane surface, which can be directly related to the underlying cell surface potential. In this proof of concept study using *Saccharomyces cerevisiae* cells with episomally expressed pH reporter, pHluorin, intracellular acidification induced by the addition of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was measured using synchronously scanned fluorescence spectroscopy (SSF). The analysis of titration curves revealed that the pH at the periplasmic surface of *S. cerevisiae* cells was about two units lower than the pH of bulk medium. This pH difference was significantly decreased by increasing the ionic strength of the bulk medium. The cell surface potential was estimated to amount to -130 mV.

Ionic fluxes across cell membranes are controlled by the electrochemical transmembrane gradients of the particular ions. Unfortunately, only their bulk concentrations in aqueous medium can be directly determined while local ion concentrations close to the periplasmic surface of the plasma membrane remain unknown[1, 2]. Particularly, the local concentrations of cations may be significantly increased compared to the bulk medium due to the negative electrical potential difference between the periplasmic cell membrane surface and the bulk aqueous phase, the so-called cell surface potential[3-5]. This issue was addressed more than three decades ago by McLaughlin, Borst-Pauwels and others[1, 6-9], who demonstrated

the important role of the negative cell surface potential in many membrane processes, including the control of ion fluxes across the plasma membrane.

Although the theory of cell surface potential phenomena found consideration in several textbooks, they received little attention in practice, especially in yeast physiology. The two comprehensive reviews by Kramer and Borst-Pauwels[8, 10] have never even been cited. However, during the past decade, there has been an increasing interest in the role of the cell surface potential in several areas of cell biology. A few examples of such studies concern the uptake of toxic metal ions in plants[11, 12], cell adhesion[13], binding of peptides to model membranes[14], effect of antibacterial agents[15], biological energy conversion[16] and lateral heterogeneity of pH along the p-side of mitochondrial cristae[17].

The long-lasting apparent lack of interest in the phenomena related to the cell surface potential might be just a simple consequence of the absence of an easy and reliable method to monitor this important membrane parameter. Information about the surface potential is normally obtained via measuring the zeta-potential of the cells. However, its experimental value could be misleading for cells with a cell wall bearing a negative charge[18, 19]. With chromatophores of purple phototrophic bacteria, the carotenoid spectral shift was employed to indicate changes of electrical field across the plasma membrane[20]. Fluorescent probes, like 7-hydroxycoumarin[21] or 9-aminoacridine[19], were also used as indicators of the cell surface potential. However, the use of these chromatophores requires a calibration based on zeta-potential data. Thus, introduction of a new indicator of the cell surface potential, both its existence and magnitude, may be a strong impulse to revive intensive research in this field.

Recently, we have decided to analyze the cytosolic acidification in the yeast *S. cerevisiae* induced by the addition of the protonophore CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) under the conditions of varying pH in the aqueous phase of cell suspensions. Surprisingly, we have found a pronounced difference between the pKa value of 6.09 published for aqueous CCCP solutions[22] and its apparent value revealed by sigmoidal acidification curves. This unexpected finding turned into a new method for the assessment of periplasmic pH and consequently of the cell surface potential that is presented in this paper.

RESULTS

CCCP-induced acidification of yeast cytosol increases linearly with the total concentration of the protonophore in *Saccharomyces cerevisiae* cell suspensions

In the view of the proposed mechanism by which CCCP transports protons across cell membranes[22], the dependence of CCCP-induced acidification of yeast cell cytosol (i.e., the difference between pH_{cyt} values measured after and before adding CCCP, respectively) on the total concentration of CCCP in cell suspensions was analyzed. Particular attention was given to the relative fraction of neutral CCCP molecules which changes with pH of their aqueous environment. As expected, pH_{cyt} decreased with the protonophore concentration (**Fig. 1**). For CCCP concentrations $\gtrsim 2$ μM there was a linear relation between pH_{cyt} and the CCCP concentration, with nearly equal slopes for all three pH_{buff} values tested, i.e., 6.5, 7.3 and 8.5. The pH_{cyt} difference between any two straight lines in **Figure 1** is fairly constant. Obviously, the ratio of this difference to the measured acidification decreases naturally with increasing CCCP concentration. Therefore, the CCCP concentration of 5 μM was used in the following acidification experiments. At this concentration the degree of CCCP-induced cytosolic acidification was already high enough while the difference between pH_{cyt} values observed at varying pH_{buff} was still sufficiently extensive".

CCCP-induced acidification of *Saccharomyces cerevisiae* cell cytosol indicates the local pH_{per} at the periplasmic side of plasma membrane

The degree of CCCP-induced cytosolic acidification, ΔpH_{cyt} (defined as the difference between pH_{cyt} values in cells without and with CCCP), was determined at varying pH values in bulk yeast suspensions, pH_{buff}. Reference pH_{cyt} values measured in the absence of CCCP were practically independent of pH_{buff} up to 8.5 (pH_{cyt} = 6.66-6.71 ± 0.04), then they increased linearly to pH_{cyt} = 6.91 ± 0.03 at pH_{buff} = 9.3.

Surprisingly, the cytosolic pH_{cyt} was also found to be fairly independent of pH_{buff} between the values of 5 and 7, i.e., ± 1 pH unit around the pK_a value of CCCP in aqueous solutions (pK_a = 6.09). However, a marked dependence of ΔpH_{cyt} on pH_{buff} was found when the range of pH_{buff} was shifted towards alkaline values (up to pH_{buff} = 9.25). The titration curve of ΔpH_{cyt} versus pH_{buff}, measured for starving yeast cells suspended in a series of 25mM MES-TEA buffers is shown in

Figure 2. This curve can be successfully fitted by nonlinear regression ($R^2 = 0.98$) to a sigmoidal function

$$pH_{cyt} = A + \frac{B}{1+10^{pH_{mid}-pH_{buff}}} \quad (1)$$

where *A* and *B* are constants and pH_{mid} is the pH_{buff} value of the inflection midpoint of the sigmoid. If a similar fitting procedure is applied to the absolute values of ΔpH_{cyt}, $|\Delta pH_{cyt}|$, the sign in the exponent must be changed, since the absolute values are always positive, leading to

$$|pH_{cyt}| = A + \frac{B}{1+10^{pH_{buff}-pH_{mid}}}. \quad (2)$$

Note that, apart from the constant term *A*, this sigmoidal function matches a titration curve describing the fraction of undissociated weak acid molecules in aqueous solutions (see for example ref. [23]). This is consistent with the CCCP mechanism of action (the transport of H^+ into the cells involves the transmembrane diffusion of undissociated CCCP molecules), as well as with our finding that $|\Delta pH_{cyt}|$ increases linearly with the total CCCP concentration in the cell suspension.

The observed inflexion midpoint value was $pH_{mid} = 8.26 \pm 0.12$, i.e., about 2.2 pH units higher than the pK_a of CCCP in aqueous buffers. Consequently, the ambient pH_{per} that controls the degree of CCCP dissociation at the periplasmic side of *S. cerevisiae* plasma membrane must be considerably more acidic than the pH_{buff} in the bulk cell suspension. Such a difference between the ambient pH_{per} at the cell surface and the bulk pH_{buff} is expected when there is a negative cell surface potential, ψ_s, responsible for an enhanced concentration of H^+ in the vicinity of the cell membrane. To test this conclusion another set of titration curves, ΔpH_{cyt} versus pH_{buff}, was collected under the condition when the cell surface potential was reduced by increased ionic strength of the bulk cell suspensions (for basic information about the expected effect of buffer ionic strength on the surface potential, see e.g., ref.1). Indeed, addition of 145 mM choline chloride and 5 mM KCl to another 25mM MES-TEA buffer series caused a drop of pH_{mid} by 0.7 pH units to 7.56 ± 0.10. This confirms the key role of the cell surface potential in

generation of the observed difference between the bulk pH_{buff} and the effective pH_{per} values in the vicinity of the cell membrane surface.

Estimation of the size of the cell surface potential in *Saccharomyces cerevisiae*

Our conclusion concerning the *S. cerevisiae* cell surface potential, ψ_s, and the local pH_{per} at the cell surface can be further supported by examination of the quantitative correlation between the observed effect of ionic strength and the predictions of the Gouy-Chapman theory[1]. In particular, the observed difference between the bulk pH_{buff} and cell surface pH_{per} values can be converted to corresponding H^+ concentrations in buffer and at the cell surface, respectively. These are mutually related through the Boltzmann factor that involves ψ_s. The ψ_s values calculated in this way were -130 and -88 mV in the plain 25mM MES-TEA buffer and after increasing its ionic strength to 175 mM, respectively (for details see Supplementary Information). Moreover, relative values of the effective surface charge density, σ, estimated for the above two conditions differ by only 14 %. This result is in reasonable agreement with the expected constancy of the surface charge density which cannot vary in response to a mere change in the ionic strength of the washed cells suspensions.

DISCUSSION

In this study using *Saccharomyces cerevisiae* cells with episomally expressed pH reporter, pHluorin, intracellular acidification induced by the addition of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was measured using synchronously scanned fluorescence spectroscopy (SSF). The original idea of the described work came from the known mechanism by which CCCP, like other weak acids, transports protons into the cell cytosol[22, 24]. Briefly, the neutral undissociated form of CCCP enters the cell cytosol by simple diffusion according to its transmembrane concentration gradient. Once inside, CCCP dissociates into a proton and its anion resulting in cytosolic acidification. $CCCP^-$ anions are then extruded to the periplasmic space driven by the electric field of the membrane potential (negative inside). There $CCCP^-$ anions associate with protons to an extent

controlled by the periplasmic pH_{per} and neutral CCCP molecules enter another proton transfer cycle.

In the course of the attempts to assess the ambient pH_{per} at the periplasmic cell surface it was crucial to prove that there is a linear dependence of the level of cell acidification on the used CCCP concentration (**Fig. 1**). Following this verification it was justified to assume that the steady-state cytosolic acidification responded linearly to the concentration of undissociated CCCP at the periplasmic cell surface that is controlled by the local pH_{per}. The observed difference between experimental pH_{mid} values of the titration curves and the pKa of CCCP in aqueous solutions was then plausibly interpreted as evidence for the periplasmic pH_{per} being considerably lower than the pH_{buff} in the bulk cell suspension. The exchange of protons between vacuole and cell cytosol may obviously also partake in the steady-state pH_{cyt} value. However, it is unlikely to affect the pH_{mid} value that is controlled by the dissociation equilibrium of CCCP in the periplasmic space.

The conclusion concerning the evidence for pH_{per} considerably different from pH_{buff} was further supported by observing the expected effect of increased ionic strength on CCCP induced cytosolic acidification (**Fig. 2**) and thus on the cell surface potential. In particular, when treated in terms of the Gouy-Chapman theory of cell surface potentials, the difference between respective ψ_s values assessed for cell suspensions of different ionic strengths led to consistent estimates of surface charge density. As no alternative direct method for the quantitative determination of pH_{per} and ψ_s in yeast is available, the above compatibility of measured pH_{per} data and Gouy-Chapman theory is the main argument to justify the solidity of obtained numerical values.

Further advantage of the presented procedure for assessment of ambient periplasmic pH_{per} in cell suspensions against existing indirect methods of monitoring ψ_s consists in that it directly reflects several physiologically relevant consequences of this important, yet up to this point experimentally elusive, physical characteristic of cell membranes. In addition to the measured enhancement of H^+ concentration at the plasma membrane surface, ψ_s exhibits similar attracting power also on other cations such as K^+. Consequently, the real concentration gradient of K^+ across the plasma membrane in *S. cerevisiae* may be significantly lower than has been considered so far.

The necessary prerequisite for employment of the described method in general is a reliable monitoring of cytosolic pH. Where possible the use of genetically encoded pHluorin is advantageous. In some cases, however, other extrinsic pH-sensitive fluorochromes might be suitable. As the presented method does not involve any feature exclusive to yeast cells, we expect it to attract attention of researchers dealing with other microorganisms or cell types as well. Note that not only CCCP, but also other weak acids may cause cytosolic acidification with a qualitatively similar dependence on the pH (and ionic strength) of the extracellular medium, of course, with different pH_{mid} values according to the actual pK_a value of the particular weak acid. This issue clearly goes beyond the scope of the current proof-of-concept study. However, it deserves attention in future research to examine biological effects of weak acids on yeast and other cells.

METHODS

Yeast strains. Used *Saccharomyces cerevisiae* strains used were derived from BY4741 (MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0; EUROSCARF): a strain transformed with episomally expressed ratiometric pHluorin in cell cytosol and a control strain with empty plasmid[25]. The strains were kindly provided by Dr. Hana Sychrova (Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague).

Yeast growth and sample preparation. Cells were grown in synthetic yeast nitrogen base medium (0.67% YNB without amino acids, 2% glucose and auxotrophic supplements). Brent supplement mixture of amino acids (BSM-ura) was added to the final concentration of 1.5 mg/ml. The cells were harvested in the post-diauxic phase of growth (≈ 18 – 22 hours), washed twice with MES-TEA buffer (25 mM MES hydrate, pH adjusted by TEA to 6.8) and finally suspended in MES-TEA buffers of defined pH to the concentration ≈ 2.7×10^6 cells/ml (OD = 0.4 at 578 nm), as measured with Cellometer Vision CBA image cytometer (Nexcelom Biosciences) and Novaspec III spectrophotometer (Amersham Biosciences), respectively. Only data measured with starving post-diauxic yeast cells are presented in this proof of concept paper.

Fluorescence spectroscopy and the processing of pHluorin emission. Fluorescence spectra of cell suspensions were measured in disposable 1×1 cm UV-grade fluorometric cuvettes (Kartell, Italy) using a Fluoromax-3 spectrofluorometer

(Jobin-Yvon Horiba). The response of pHluorin emission to the changes in pH_{cyt} was analyzed using the synchronous scanning of fluorescence, SSF[26]. For each sample two SSF spectra were recorded using offsets of 30 and 110 nm (with both slit widths set to 2 nm) which are related to the two distinct bands found in the standard excitation spectra of pHluorin fluorescence. The key feature of these SSF spectra is a clear and reproducible distinction between the pHluorin fluorescence and cell autofluorescence, as shown in ref. 26. On this basis, the number of control measurements with the pHluorin-free strain could be reduced considerably. Hence, large series of titration experiments could be carried out under equal physiological conditions.

The correction of raw SSF spectra for the autofluorescence background and the assessment of peak intensities (followed by the calculation of their ratio and its conversion to pH_{cyt} value) were performed with SigmaPlot 11 graphing software (Systat Software, Germany). For the convenience of researchers who are using this software, time-saving SigmaPlot 11 templates for processing SSF spectra of pHluorin stained cells are available at ResearchGate, as Supplementary resources to our paper[26] (https://www.researchgate.net/publication/303783575_SP11template).

Analysis of the CCCP-induced acidification of yeast cytosol. 10mM CCCP stock solution in DMSO (from Sigma-Aldrich and Fluka, respectively) was added to the suspensions of starving yeast cells (washed cells were resuspended in 25mM MES-TEA buffers without glucose) to the desired final CCCP concentration. In the assays of CCCP-induced acidification of yeast cytosol, a reference pH_{cyt} value in untreated cell suspensions was measured first. CCCP was then added and the change of pHluorin fluorescence recorded after 12 min of incubation. This choice of delay time is just the result of technical limitations imposed by running large titration series. The steady-state intensity of pHluorin fluorescence was achieved in less than five seconds after adding CCCP to a cell suspension for any of the two SSF offsets and any CCCP concentration.

All data given in the figures are results of biological triplicates (arithmetic means ± standard errors).

REFERENCES

1. McLaughlin, S. Electrostatic Potentials at Membrane-Solution Interfaces. *Curr. Top. Membr. Trans.* **9**, 71–144 (1977).
2. Jackson, M.B. *Molecular and Cellular Biophysics* (Cambridge University Press, New York; 2006).
3. Bernhardt, I. & Ellory, J.C. in *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease.* (eds. I. Bernhardt & J.C. Ellory) 83 - 109 (Springer-Verlag, Heidelberg; 2003).
4. Butt, H.-J., Graf, K. & Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces.* (Wiley VHC Verlag, Weinheim; 2003).
5. Butt, H.-J. & Kappl, M. *Surface and Interfacial Forces.* (Wiley VHC Verlag, Weinheim; 2009).
6. Borst-Pauwels, G.W.F.H. Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 88 -127 (1981).
7. Gage, R.A., Vanwijngaarden, W., Theuvenet, A.P.R., Borst-Pauwels, G.W.F.H. & Verkleij, A.J. Inhibition of Rb^+ uptake in yeast by Ca2+ is caused by a reduction in the surface potential and not in the Donnan potential. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 1-8 (1985).
8. Kramer, R. Modulation of membrane protein function by surface potential. *Methods Enzymol.* **171**, 387-394 (1989).
9. Theuvenet, A.P.R. & Borst-Pauwels, G.W.F.H. Effect of surface potential on Rb^+ uptake in yeast. The effect of pH. *Biochim. Biophys. Acta* **734**, 62-69 (1983).
10. Borst-Pauwels, G.W.F.H. Ion transport in yeast including lipophilic ions. *Methods Enzymol.* **174**, 603-616 (1989).
11. Wang, P. et al. Cell membrane surface potential (psi(0)) plays a dominant role in the phytotoxicity of copper and arsenate. *Plant Physiol.* **148**, 2134-2143 (2008).
12. Wang, P., Kinraide, T.B., Zhou, D.M., Kopittke, P.M. & Peijnenburg, W. Plasma Membrane Surface Potential: Dual Effects upon Ion Uptake and Toxicity. *Plant Physiol.* **155**, 808-820 (2011).
13. Gordiyenko, O.I. et al. Development of a model to investigate red blood cell surface characteristics after cryopreservation. *Cryo Letters* **36**, 221-226 (2015).
14. Rao, Y., Kwok, S.J.J., Lombardi, J., Turro, N.J. & Eisenthal, K.B. Label-free probe of HIV-1 TAT peptide binding to mimetic membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12684-12688 (2014).
15. Halder, S. et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* **4** (2015).
16. Mulkidjanian, A.Y., Heberle, J. & Cherepanov, D.A. Protons @ interfaces: Implications for biological energy conversion. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 913-930 (2006).

17. Rieger, B., Junge, W. & Busch, K.B. Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F0F1 ATP-synthase in folded mitochondrial membranes. *Nat. Commun.* **5** (2014).
18. Borst-Pauwels, G.W.F.H. Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 88 -127 (1981).
19. Theuvenet, A.P.R., Vandewijngaard, W.M.H., Vanderijke, J.W. & Borstpauwels, G. Application of 9-aminoacridine as a probe of the surface potential experienced by cation transporters in the plasma membrane of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **775**, 161-168 (1984).
20. Matsuura, K., Masamoto, K., Itoh, S. & Nishimura, M. Effect of surface potential on the intramembrane electrical field measured with carotenoid spectral shift in chromatophores from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* **547**, 91-102 (1979).
21. Kraayenhof, R., Sterk, G.J. & Sang, H. Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. *Biochemistry* **32**, 10057-10066 (1993).
22. McLaughlin, S.G.A. & Dilger, J.P. Transport of protons across membranes by weak acids. *Physiol. Rev.* **60**, 825-863 (1980).
23. Truchot, J.-P. *Comparative aspects of extracellular acid-base balance.* (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg; 1987).
24. Fernandez-Nino, M. et al. The Cytosolic pH of Individual Saccharomyces cerevisiae Cells Is a Key Factor in Acetic Acid Tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7813-7821 (2015).
25. Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R. & Sychrova, H. New applications of pHluorin - measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**, 317-325 (2010).
26. Plasek, J., Melcrova, A. & Gaskova, D. Enhanced sensitivity of pHluorin-based monitoring of intracellular pH changes achieved through synchronously scanned fluorescence spectra. *Anal. Chem.* **87**, 9600-9604 (2015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. P. developed the study concept, processed and interpreted the data and wrote the manuscript, D. B. performed fluorescence measurements and analyzed data, D. G. and I. J. were responsible for cell culturing and prepared samples for fluorescence measurements, J. Z. performed preliminary experiments and wrote the manuscript, M. H. interpreted the data and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This publication was supported by The Ministry of Education, Youth and Sports - Institutional Support for Long-term Development of Research Organizations - Charles University, Faculty of the and by the Grant Agency of Charles University in Prague: GAUK 456213 and 1072313. The collaboration of the two Universities was supported by a travel grant to the University of Bonn from the German Academic Exchange Service (DAAD, Bonn).

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

FIGURES AND FIGURE CAPTIONS

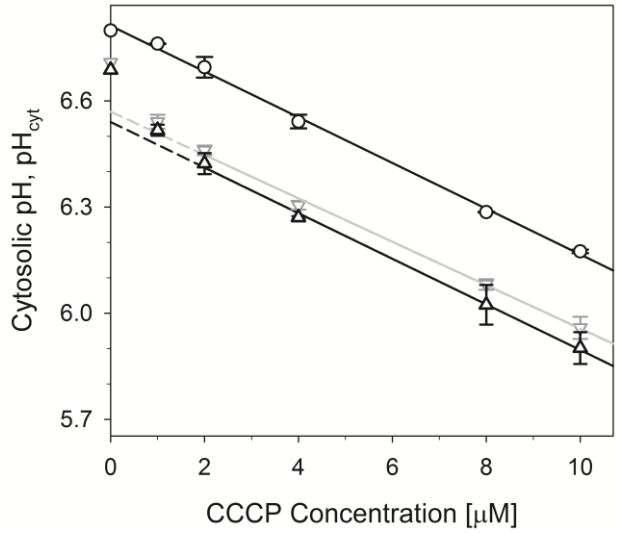


Figure 1

Dependence of CCCP-induced acidification of cytosol in starving *S. cerevisiae* cells on the protonophore concentration. This experiment was carried out in media of pH_{buff} = 6.5 (triangles up), 7.3 (triangles down), and 8.5 (circles). For cells in media of pH = 6.5 and 7.3 the linear regression fits only for CCCP concentrations ≥ 2 μM..

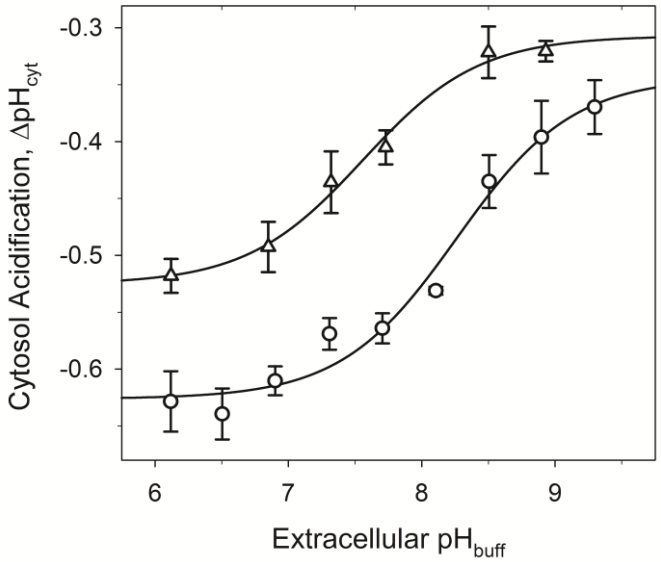


Figure 2

Dependence of CCCP-induced acidification of cytosol in starving *S. cerevisiae* cells on the bulk pH_{buff} of cell suspension. Cell suspensions were incubated in plain 25mM MES-TEA buffer (circles) and in 25mM MES-TEA buffer with 145 mM choline chloride and 5 mM KCl (triangles). CCCP concentration was 6 μM.