

**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tomáš Bartl

**Studium membránových transportních procesů u kvasinek
pomocí potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3)**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Aplikovaná fyzika

Praha 2017

Kopie zadání

Chtěl bych na tomto místě poděkovat vedoucí práce Daně Gáškové za skvělé vedení a přístup, dále pak Ivě Jančíkové za pomoc s kultivací a za orientaci v laboratoři, a nakonec Jakobovi Záhumenskému, který mě seznámil se spektroskopickými metodami.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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 má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne

podpis

Název práce: Studium membránových transportních procesů u kvasinek pomocí potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3)

Autor: Tomáš Bartl

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: V membránách kvasinek existuje celá řada transportérů. Některé jsou zodpovědné za přísun živin do buněk, jiné za vylučování odpadních a cizorodých látek ven z buněk nebo za transport malých anorganických iontů a protonů přes membránu. V této práci byla studována činnost specifických transportních proteinů, tzv. MDR pump, které jsou zodpovědné za odstraňování cizorodých látek/léků z buněk. Pomocí série mutantních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (AD12, AD1-3 a AD1-8) lišících se zastoupením jednotlivých MDR pump v jejich plazmatické membráně byl zkoumán vliv různých chemických látek na změnu intracelulární koncentrace potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3), která je aktivně odstraňována z buněk některými z těchto pump. Sledováním účinku glukózy a 2-deoxyglukózy byl prokázán aktivní příspěvek nejenom hlavní MDR pumpy, Pdr5p, ale také dalších pump ke snižování intracelulární koncentrace sondy. Bylo zjištěno, že zatímco glukóza zvyšuje aktivitu těchto pump při odstraňování sondy z cytosolu, přidání 2-deoxyglukózy způsobuje naopak jejich inhibici. K inhibici pump rovněž docházelo účinkem hexanolu nikoliv však protonoforu CCCP. Výsledky byly doplněny o studium vlivu testovaných látek na vnitrobuněčné pH.

Klíčová slova: kvasinky, sonda diS-C₃(3), pHluorin, MDR pumpy

Title: Study of membrane transport processes in yeast using potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3)

Author: Tomáš Bartl

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Dana Gášková, CSc., Institute of Physics of Charles University

Abstract: Yeast membranes contain a number of transporters. Some are responsible for flow of nutrients to the inside of the cell, others for disposing of waste and foreign substances and some for transport of small ions or protons across the membrane. The focus of this work is on the activity of specific transport membrane proteins, so-called MDR pumps, which are responsible for transport of foreign substances or drugs, out of the cell. Using the series of mutant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (AD1-3, AD1-8 and AD12) differentiated in the presence of specific MDR pumps in their membrane, an influence of various chemical substances on the intracellular concentration of the potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3), which is actively being transported out of the cell by some of the MDR pumps, was observed. By the examination of the effect of 2-deoxyglucose we proved the active contribution of not only the main MDR pump, Pdr5p, but also of some other pumps, in lowering the intracellular probe concentration. It was observed that whereas glucose is raising the activity of said pumps in removing the probe from cytosol, the addition of 2-deoxyglucose leads to their inhibition. The inhibition was also caused by the addition of hexanol and CCCP protonophor. Results were accompanied by the measurement of the influence of the examined chemicals on the intracellular pH.

Keywords: yeast, diS-C₃(3) probe, pHluorin, MDR pumps

Obsah

1. Úvod	3
1.1. Kvasinky	4
1.1.1. Struktura.....	4
1.1.2. Rozmnožování	5
1.1.3. Růst kvasinkových kultur	7
1.1.4. Membránový transport.....	8
1.2. Fluorescence	10
1.2.1. Princip fluorescence.....	10
1.2.2. Spektrofluorimetrie	12
1.2.3. Sonda diS- C ₃ (3)	12
1.2.4. pHluorin	14
2. Metody a materiály	15
2.1. Kvasinkové kmeny.....	15
2.2. Kultivační média a roztoky	16
2.3. Chemikálie	16
2.4. Kultivace kvasinek.....	18
2.5. Měření růstových křivek	18
2.6. Měření akumulace sondy diS-C ₃ (3) v buňkách	18
2.7. Měření vnitrobuněčného pH	19
3. Výsledky a diskuse	21
3.1. Charakterizace mutantních kmenů <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pomocí jejich růstového profilu	21
3.2. Vliv delece membránových pump na akumulaci sondy uvnitř buněk	24
3.3. Měření vnitrobuněčného pH	31
4. Závěr	33
Literatura	34
Přílohy	36
Matlab skripty	36

1. Úvod

Tato práce se zabývá zkoumáním transportních procesů v membránách kvasinek jakožto modelového organismu. Kvasinky, v tomto případě konkrétně rod *Saccharomyces cerevisiae*, jsou jednobuněčné eukaryotní organismy z říše hub [1], které jsou svojí stavbou velice podobné buňkám rostlinným i živočišným. Již tisíciletí jsou lidmi využívány v potravinářském průmyslu při výrobě alkoholických nápojů či chleba a jejich kultivace je velice snadná a je dobře prozkoumána. Navíc je již zmapován celý genom *S. cerevisiae* [2] a různé nástroje umožňují jejich genovou modifikaci. Ze těchto důvodů jsme pro studium transportních procesů vybrali právě kvasinky *S. cerevisiae* a jejich mutantní kmeny, které mají deletovány geny kódující specifické transportní proteiny neboli pumpy, schopné odstraňovat z buněk cizorodé látky, které do ní pronikly. Tyto pumpy vylučují z buněk široké spektrum různých strukturně a funkčně odlišných látek, léků, a jsou proto zodpovědné za fenomén zvaný „mnohočetná léková rezistence“ (anglicky Multi-Drug Resistance). Odtud vyplývá i jejich název, MDR pumpy. Jsou přítomny ve všech buňkách, v bakteriích, kvasinkách i v živočišných buňkách včetně lidských a představují tak hlavní klinický problém při léčení kvasinkových a bakteriálních infekcí a/nebo rakoviny.

Jako experimentální metodu pro studium činnosti MDR pump jsme zvolili spektrofluorimetrii, která umožňuje měření fluorescence ze suspenze buněk, které vykazují buď vlastní fluorescenci, anebo ke kterým je zvnějšku přidána fluorescenční sonda. V práci jsme použili potenciometrickou fluorescenční sondu diS-C₃(3), jež se po vstupu do buňky váže na látky v cytosolu, čímž dochází ke změně jejich spektrálních vlastností. Druhou použitou fluorescenční značkou byl pHluorin, zelený fluorescenční protein citlivý na pH, který je přímo produkován geneticky modifikovanými kvasinkami. V kyselém prostředí (pH 5-6) pHluorin téměř nefluoreskuje, avšak s pH rostoucím do neutrálních hodnot se intenzita jeho fluorescence zvyšuje [3]. Po kalibraci je tak možné kvantitativně určit hodnotu vnitrobuněčného pH.

1.1. Kvasinky

Kvasinky jsou kromě výše uvedených vlastností charakterizovány také nepohlavním rozmnožováním (u *Saccharomyces cerevisiae* pučením) a většina kmenů i schopností fermentace neboli kvašení, jakožto metody zpracovávání uhlíku. Pučení je proces, při kterém se na původní buňce vytvoří pupen, všechny orgány se rozdělí a jejich části se přesunou do pupenu. Následně se pupen začne zaškrcovat, až se úplně oddělí a vznikne nová samostatná buňka. Fermentace je pak dějem, při kterém kvasinky rozkládají cukry na ethanol a oxid uhličitý. Na rozdíl od buněčného dýchání nevyžaduje přísun kyslíku. Je jednodušší, ale výrazně méně efektivní.

1.1.1. Struktura

Některé rody kvasinek vytvářejí pouzdro, složitou strukturu polysacharidů na vnější straně buněčné stěny. Není však známo, k čemu pouzdro slouží kromě pozorování snížené dehydratace a tvorby sliznatých kolonií. Rod *Saccharomyces* pouzdro nevytváří [4].

Buněčná stěna kvasinek se liší od stěn rostlinných i bakteriálních buněk. Má tloušťku 150 - 400 nm a tvoří ji především polysacharidy a proteiny. Odlišností je pak především přítomnost asi 2 % chitinu. Ten se vyskytuje převážně rovnoměrně, hromadí se však v místě jizev, trvalých struktur v místě pučení. Podle počtu jizev na buněčné stěně lze určit kolikrát se již kvasinka rozmnožila.

Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána. Ta nevykazuje oproti jiným buňkám výraznější rozdíly, jedná se o lipidovou dvojvrstvu s přítomností různých proteinů sloužících jako transportéry (též pumpy, přenašeče) [4]. Množství a druh těchto transportérů je možno ovlivnit genovou modifikací a na mutantních kmenech lze sledovat změny transportu látek přes membránu a určit tak funkci jednotlivých přenašečů.

Jádro kvasinek je tak výrazné, že ho lze často pozorovat přímo v živých buňkách fázově-kontrastním mikroskopem. Obsahuje jadérko s prekurzory pro rRNA [4] a 16 málo spiralizovaných chromozomů [2].

Tak jako každá buňka, i kvasinky obsahují mitochondrie, a to i přes převážně anaerobní způsob získávání energie. Jejich počet závisí na dostupnosti glukózy a životní fázi buňky, pohybuje se v rozmezí od 3 % celkového objemu v mladých

buňkách při dostatku živin a roste až k 10 % objemu u buněk starších nebo při nedostatku glukózy [4].

S rostlinnými buňkami sdílejí kvasinky přítomnost vakuol. Jejich počet se během života buňky může měnit, především v průběhu rozmnožování se vakuola dělí na více menších a jejich část pak odchází do pupenu. Vakuoly u kvasinek zastupují funkci zásobárny aminokyselin, bází, fosfátu a vápenatých iontů, a dále také plní funkci udržování vnitrobuněčného pH. Obsah vakuol má pH nižší než cytosol a transportéry v jejich membránách tak mohou v případě nutnosti dorovnávat změny cytosolického pH [4].

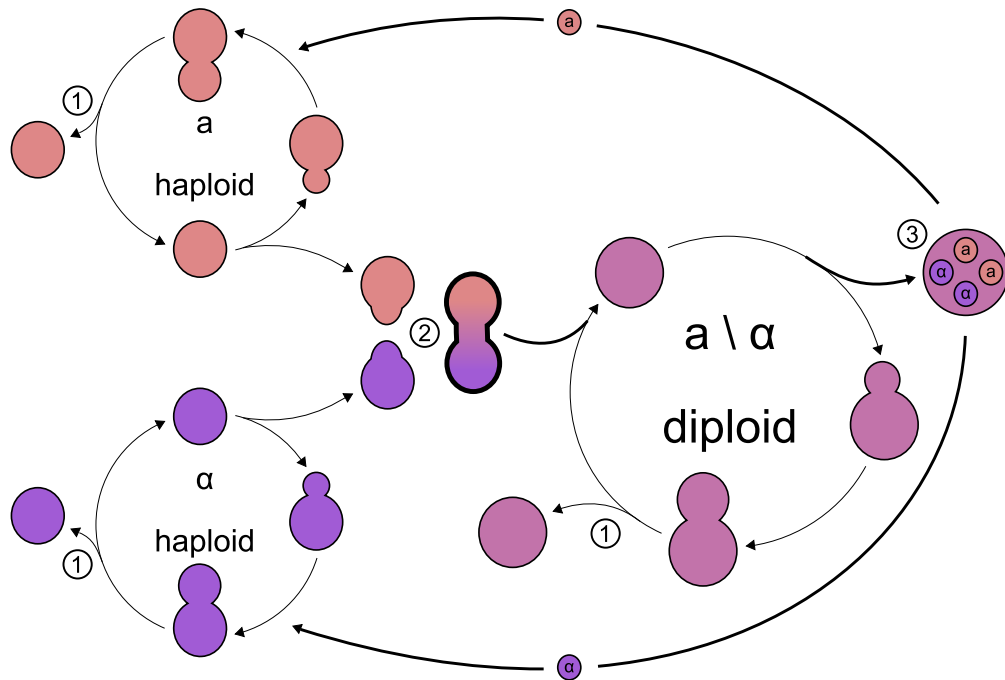
Zásobárnu enzymů představují peroxizomy – malé membránou obklopené vakuoly. Nejvýraznější jsou u kvasinek, které dokážou zpracovávat methanol (tzv. metylotrofní) na formaldehyd a peroxid vodíku. V peroxizomech se u nich nachází velké množství enzymů methanoxidáza a dihydroxacetonsyntáza, které mohou dokonce krystalizovat. V případě obnovení přísunu glukózy dochází k inhibici činnosti enzymů, jejich odbourání a zmenšení peroxizomů na nepatrnou úroveň [4].

Poslední významnou součástí stavby kvasinek je cytoskelet. Soustava mikrotubulů, aktinových políček a filament zajišťuje buňce schopnost měnit tvar a přesouvat za pomoci proteinových motorů organely uvnitř svého objemu. Toto je obzvláště důležité ve fázi pučení, kdy je potřeba do odlehlé části buňky přesunout části všech organel, včetně jádra. Mikrotubuly spolu s aktinovými políčky zajišťují i zvětšování a růst pupenu. Síť mikrotubulů zpravidla začíná spojením v jaderném plaku (obdoba centrozomu u živočišných buněk, která neobsahuje centrioly) v blízkosti jádra a vede až k membráně, kde jsou mikrotubuly ukotveny [4].

1.1.2. Rozmnožování

Kvasinky mohou podstupovat jak pohlavní, tak nepohlavní rozmnožování. Nepohlavní rozmnožování probíhá mitózou a buněčný cyklus je tedy následující: začátek tvorby pupene a zdvojení jaderného plaku (S fáze), rozdělení jaderných plaků na opačné strany jádra a polarizace všech organel (G2 fáze), organely se rozdělí a jádro se protáhne mezi pupenem a mateřskou buňkou (M fáze), dojde k oddělení pupene a jak mateřská, tak dceřiná buňka začínají opět hromadit živiny na další dělení (G1 fáze). U kvasinek existuje několik tzv. diagnostických znaků, což jsou morfologické změny, podle kterých lze vizuálně jednoznačně určit fázi buněčného cyklu (například přítomnost pupenu nebo jizva po oddělení pupenu) [4].

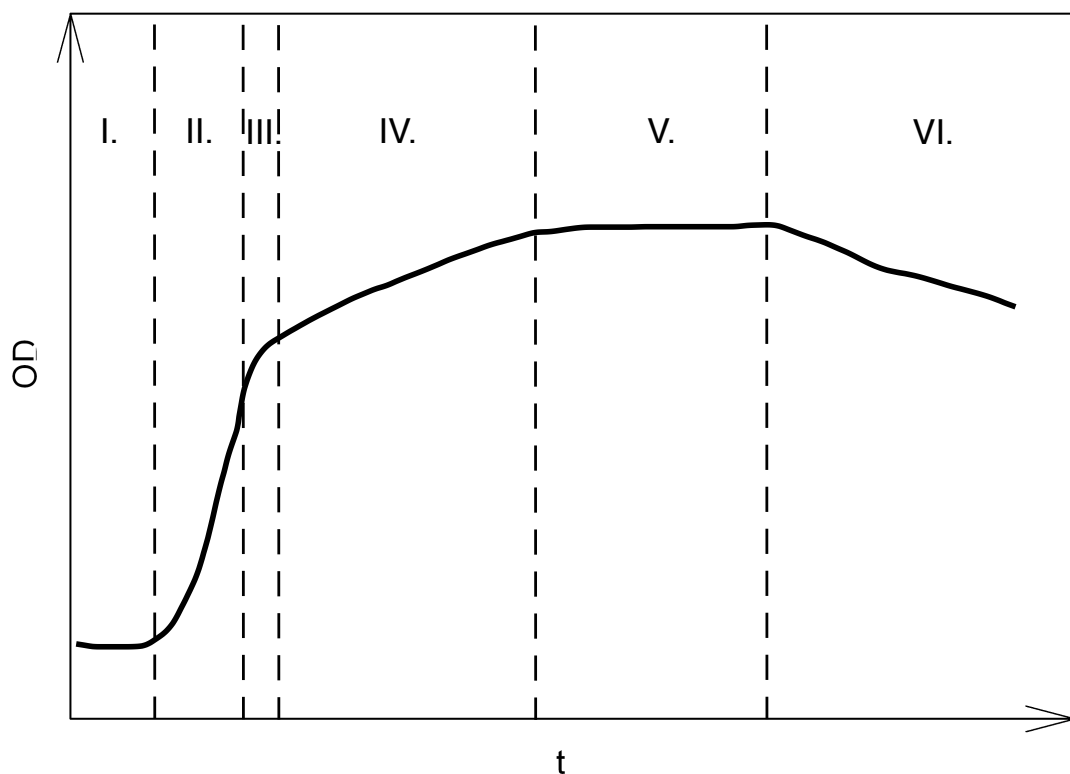
Za vhodných podmínek může dojít i k pohlavnímu rozmnožení. Při něm dojde ke konjugaci dvou různých haploidních buněk (u kvasinek tedy existuje jednoduchá sexuální diferenciacce a/α) za vzniku diploidní zygoty. Ta může dále pučet nebo podstoupit sporulaci spojenou s meiotickým dělením jádra a tedy vznikem 4 haploidních buněk – dvou a a dvou α [4]. Životní cyklus kvasinek popisuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Životní cyklus kvasinek *S. cerevisiae*. Rozmnožování je možné nepohlavně pučením (1) nebo za vhodných podmínek pohlavně, za vzniku diploidní zygoty (2), ta může buď dále pučet, nebo podstoupit sporulaci a vzniknou 4 haploidní buňky (3).

1.1.3. Růst kvasinkových kultur

Kvasinkové kultury je možné pěstovat jak na pevném, tak v kapalném médiu. Pevné médium se hodí pro experimenty výsevové, kde se opticky pozoruje růst kultur, naopak kapalně médium se hodí pro fluorescenční měření. Růst kultur v kapalném médiu lze charakterizovat tzv. **růstovou křivkou** (závislostí počtu buněk na době kultivace), která charakterizuje jednotlivé fáze vývoje kultury kvasinek. První je tzv. **lag-fáze**, kdy buňky získávají nutrienty a nemnoží se, následuje **fáze exponenciálního růstu**, kdy se buňky velmi rychle (exponenciálně) množí a spotřebovávají cukr ze svého okolí. Po spotřebování cukru dochází k pozastavení růstu a adaptaci na jiné zdroje uhlíku, především ethanol vzniklý v exponenciální části, a jeho oxidativní zpracování. Tato fáze se nazývá **diauxická**. Po adaptaci nastává fáze **postdiauxická**, kdy se buňky opět dělí, avšak pomaleji než ve fázi exponenciální. Nakonec nastává fáze **stacionární**, kdy jsou veškeré živiny spotřebovány a buňky se tak přestanou množit, a následně nastává fáze **odumírání**. Teoretický průběh růstové křivky znázorňuje Obrázek 2 [4].



Obrázek 2: Teoretický průběh růstové křivky kvasinek. Fáze: I. – lag, II. – exponenciální, III. – diauxická, IV. – postdiauxická, V. – stacionární, VI. – odumírání

1.1.4. Membránový transport

Buněčné membrány nejsou pouze fyzickým ohraničením buněk, ale mají i funkci propouštět určité látky podle své vlastní potřeby, nebo v případě organelových membrán podle potřeby jednotlivých organel. Živé organismy jsou schopné přežívat v nepříznivém množství prostředí, avšak jejich vnitřní procesy mohou probíhat pouze za omezených podmínek. Je proto důležité, aby buňka byla schopna přizpůsobit se těmto vnějším podmínkám a udržet si svůj vnitřní stav, tzv. homeostázu. Jedním z nejdůležitějších procesů, které k tomu slouží, je právě membránový transport.

Malé hydrofobní a malé nenabitě molekuly mohou skrz membrány zpravidla procházet volnou difuzí. Větší molekuly pak mohou procházet pouze díky činnosti transportních proteinů zakotvených v membráně. Tento tzv. zprostředkovaný transport můžeme dále dělit na aktivní a pasivní. Pasivní zprostředkovaný transport probíhá vždy ve směru koncentračního spádu a bývá nazýván také jako usnadněná difuze. Tento proces je realizován tzv. kanály nebo přenašeči. Hlavním rozdílem mezi volnou a usnadněnou difuzí je její rychlost – usnadněná difuze je rychlejší, ale vykazuje saturační charakteristiku, při níž jsou všechny přenašeče v membráně obsazeny a rychlost je tak maximální. Dalším rozdílem je pak možnost inhibice usnadněné difuze [5]. Příkladem pasivního zprostředkovaného transportu je přenos glukózy do erytrocytů.

Pro aktivní zprostředkovaný transport (zkráceně aktivní transport), při kterém dochází k transportu látek proti jejich koncentračnímu gradientu, je vyžadován přísun energie. Energie může být dodána buď přímo hydrolýzou ATP, pak hovoříme o **primárně** aktivním transportu, nebo může být dodána ve formě koncentračního či elektrochemického gradientu jiné látky, jejíž přesun ve směru gradientu pohání přesun původní látky proti směru svého koncentračního gradientu. V tomto případě se jedná o **sekundárně** aktivní transport [1].

Primární transportéry (ATPázy – spotřebovávají ATP) hrají důležitou roli v několika procesech: (1) při udržování gradientu protonů a iontů a tedy tvorbě membránového potenciálu, (2) při odstraňování cizorodých látek ven z buňky MDR pumpami a (3) pro tvorbu protonového gradientu využitelného při sekundárním transportu. Kvasinky mají asi sto různých genů kódujících ATPázy [1], z nichž hlavní jsou cytoplazmatická H^+ -ATPáza (Pma1p) a vakuolární V-ATPáza, které

zajišťují přenos H^+ protonů ven z cytosolu (ven z buňky nebo dovnitř vakuoly) a udržují tak optimální cytosolární pH [1].

Sekundární transportéry využívají energii protonového gradientu vytvořeného primárními transportéry a dodávají buňce nebo organelám potřebnou výživu, jako třeba aminokyseliny, fosfáty nebo sulfáty. Fungují v režimu tzv. symportů nebo antiportů, při symportu proudí obě látky stejným směrem, naopak při antiportu proudí každá z látek směrem opačným. Nejznámějším příkladem sekundárního transportéru je ATP-syntáza v mitochondriích, využívající protonový gradient k syntéze ATP [1].

Jednou z forem primárních transportérů jsou i MDR pumpy. Jedná se o ABC (ATP-Binding Cassete) proteiny, které odstraňují cizorodé a nebezpečné látky z cytosolu do vakuoly nebo do extracelulárního prostoru. U kvasinek *S. cerevisiae* se jedná především o tři hlavní MDR pumpy lokalizované v plazmatické membráně, Pdr5p, Snq2p a Yor1p, jejichž substráty se z velké části překrývají, avšak existují i substráty specifické pouze pro jednu z pump [6].

1.2. Fluorescence

Transportní procesy na membránách kvasinek je možno neinvazivně studovat pomocí fluorescence.

1.2.1. Princip fluorescence

Elektrony v látce můžeme excitovat do vyššího energetického stavu, tyto elektrony budou následně relaxovat zpět a přebytečná energie se může uvolnit například vyzářením fotonu. Hovoříme pak o zářivém přechodu a jevu zvaném luminiscence. Luminiscenci můžeme podle podstaty excitovaného stavu rozdělit na fluorescenci a fosforescenci. Pokud je excitovaný stav singletní (excitovaný elektron má opačný spin než druhý elektron v původním orbitalu), je přechod do relaxovaného stavu povolený, doprovází ho emise fotonu, probíhá řádově 10^{-8} s a hovoříme o fluorescenci. Pokud je ale excitovaný stav tripletní, tedy excitovaný elektron má stejný spin jako jeho párový elektron v původním orbitalu, je relaxační přechod zakázán a foton je emitován až po delším čase v řádech 10 až 10^3 s a jedná se o fosforescenci. Látky, které jsou schopné fluorescence, nazýváme fluorofory. Spektrum fotonů, které je fluorofor schopen absorbovat se jmenuje excitační spektrum, zatímco spektrum vyzářených fotonů je spektrem emisním [7].

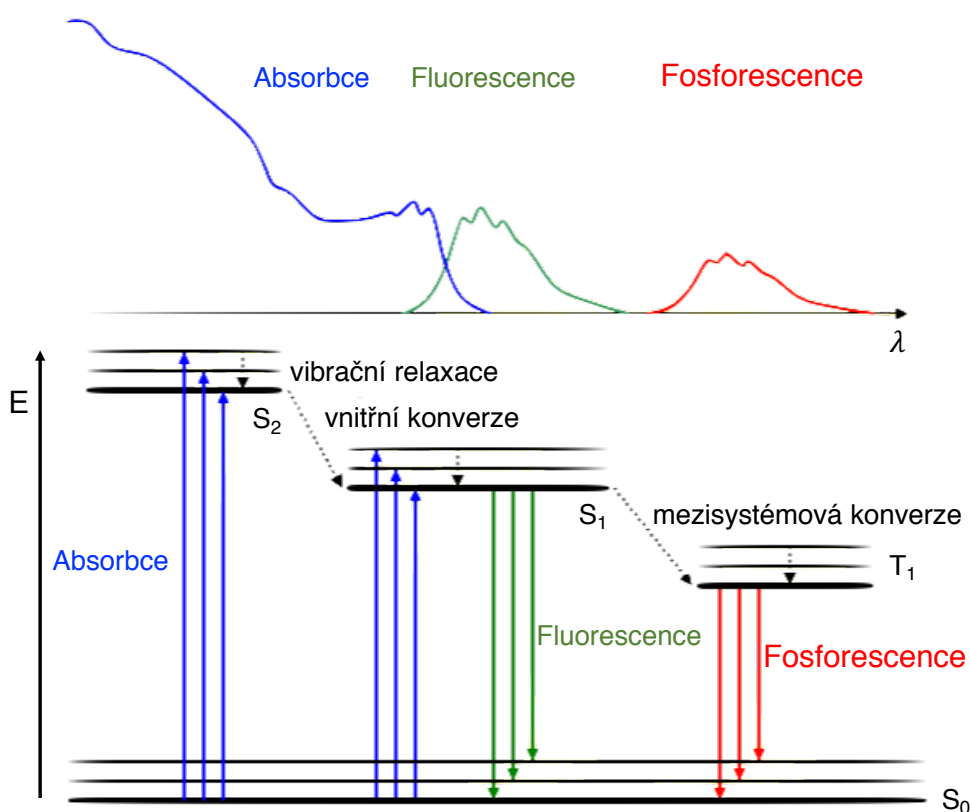
Pro znázornění elektronových přechodů se využívají tzv. Jablonského diagramy. Typický Jablonského diagram je znázorněn na Obrázku 3. Singletní nultý, první a druhý stav jsou označeny S_0 , S_1 a S_2 , tripletní pak analogicky T_1 (vyšší nejsou znázorněny). Každý stav je pak ještě rozdělen na několik vibračních hladin označených čísly 0, 1, 2 atd. Jednotlivé druhy přechodů jsou znázorněny vertikálními čarami, aby se dal najevo jejich okamžitý charakter [7].

Při absorpci fotonu může dojít k excitaci elektronu zpravidla na některou z vyšších vibračních hladin v S_1 nebo S_2 . Odsud elektrony velmi rychle relaxují do nejnižší vibrační hladiny v S_1 procesem zvaným vnitřní konverze. Tento jev je důvodem, proč emisní spektrum vypadá stejně pro různé energie z excitačního spektra. Z nejnižší hladiny S_1 pak elektrony již zářivým přechodem spadnou do základního stavu S_0 , většinou do jeho vyšších vibračních hladin, odkud již elektrony vnitřní konverzí relaxují na základní stav. Vyzářené fotony nazýváme fluorescence. Alternativně u elektronu může při excitaci dojít k mezisystémové konverzi a ke změně spinu, molekula tak přejde do tripletního stavu T_1 . Odtud je přechod do S_0

zakázaný a proto trvá o 8 až 11 řádů déle (elektrony mohou potenciálovou bariéru díky tunelovému jevu překonat.) Výsledné záření nazýváme fosforescence a zpravidla mívá delší vlnovou délku než fluorescence [7].

Jak je patrné z Jablonského diagramu, fluorescenční přechod má zároveň nižší energii než přechod absorpční. Tento rozdíl se jmenuje Stokesův posuv na počest jeho objevitele Sira G. G. Stokese [7].

Fluorofory se dělí do dvou kategorií: vnitřní a vnější. Vnitřní jsou takové, které se již ve zkoumaném vzorku vyskytují (jako například námi použitý pHluorin produkovaný samotnými kvasinkami), zatímco vnější je nutné ke zkoumanému vzorku přidat (například potenciometrická sonda diS- C₃(3).) [7]



Obrázek 3: Jablonského diagram. Diagram znázorňuje možné elektronové přechody v látce a jejich spektra

1.2.2. Spektrofluorimetrie

Přístroj měřící fluorescenční spektra se nazývá spektrofluorimetr. Standardně obsahuje zdroj světla (např. xenonová výbojka), jehož paprsek následně doputuje na excitační monochromátor a excitační štěrbinou vstupuje do komory se vzorkem. Ještě před vstupem do komory bývá část svazku odvedena do vlastního detektoru jakožto reference. Pro eliminaci kontaminace emisního paprsku excitačním probíhá měření emisního paprsku ve směru kolmém k paprsku excitačnímu. Emisní paprsek vystupuje z komory přes emisní štěrbinu do emisního monochromátoru a pak přes fotonásobič do detektoru.

Měření může probíhat v několika módech. Zaprvé je možné měřit **emisní spektrum** při konstantní excitační vlnové délce, což je nejběžnější způsob měření. Za druhé je možno měřit intenzitu emise jedné konkrétní vlnové délky v závislosti na proměnné excitační vlnové délce, výsledkem je pak tzv. **excitační spektrum**. Třetí, avšak ne poslední možností je synchronní sken, kdy se udržuje konstantní pouze rozdíl mezi excitační a sledovanou emisní vlnovou délkou.

Přesnost měření lze ovlivnit nastavením obou štěrbin. Čím užší štěrbin, tím lepší spektrální rozlišení, ale tím horší intenzita signálu. Před každým měřením je potřeba monochromátory kalibrovat. Excitační monochromátor jednoduše zkalibrujeme změřením spektra samotné lampy, emisní pak můžeme zkalibrovat za pomoci fluorescence či rozptylu ve známé látce, například ve vodě.

1.2.3. Sonda diS- C₃(3)

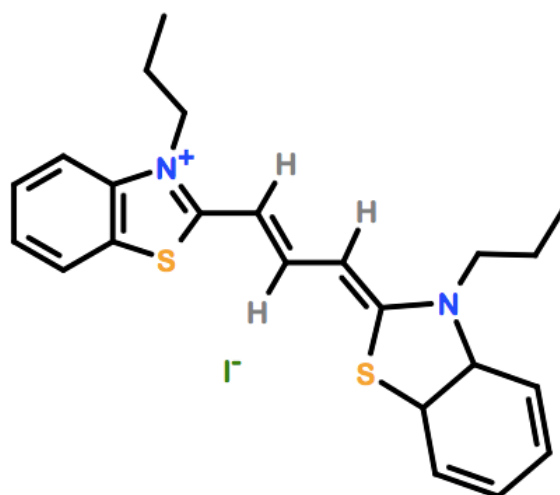
DiS- C₃(3), je zkratka používaná pro fluorescenční sondu 3,3'-dipropylthiakarboocyanin jodid nebo přesněji (2Z)-3-propyl-2-[(E)-3-(3-propyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)prop-2-enyliden]-1,3-benzothiazol jodid (struktura viz Obrázek 4), sumárním vzorcem C₂₃H₂₅IN₂S₂ [8]. Jedná se o jodidovou sůl, která se ve vodném prostředí disociuje na „aktivní“ formu, tj. na kladně nabitou sondu. Díky přítomnosti hydrofobních uhlovodíkových postranních řetězců, jsou tyto kationty schopny snadno procházet lipidní částí membrány do buňky. Protože se jedná o kladně nabitou molekulu, dochází po přidání sondy do média k její akumulaci v buňkách, neboť hnací silou pro její vstup do buňky je nejenom její koncentrační gradient (původní koncentrace v buňce je totiž nulová), ale také existence membránového potenciálu, tedy elektrického napětí přes membránu, které je na vnitřní straně membrány záporné. Celkovou sílu, která žene tuto nabitou

molekulu do buňky, nazýváme elektrochemický gradient. Pronikání do buňky probíhá do té doby, než dojde k vyrovnání elektrochemických potenciálů molekul sondy vně a uvnitř buněk. Přerozdělování (redistribuce) koncentrace sondy přes membránu do rovnováhy trvá sekundy až minuty. V termodynamické rovnováze lze vztah mezi koncentrací sondy uvnitř buněk c_{in} a velikostí membránového potenciálu $\Delta\psi$ pro danou koncentraci sondy v médiu c_{out} popsat Nernstovou rovnicí:

$$\Delta\psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}} \quad (1),$$

kde z je počet nábojů, F Faradayova konstanta, R plynová konstanta a T značí absolutní teplotu.

Princip měření membránového potenciálu buněk je tedy založen na stanovení poměru koncentrací sondy vně a uvnitř buňky. Jak bylo zjištěno, u kvasinek *S. cerevisiae* je sonda diS-C₃(3), vstupující do buněk v závislosti na velikosti jejich membránového potenciálu, současně aktivně odstraňována z buněk MDR pumpami, Pdr5p a Snq2p. To znamená, že její intracelulární koncentrace neodpovídá velikosti membránového potenciálu buněk, ale je nižší. Vzhledem k tomu, že membránový potenciál buněk není ovlivněn činností těchto pump, je tedy stejný jako u buněk „bezpumpového“ kmene, je diference mezi barvením pumpových a bezpumpových mutantů odrazem aktivního odstraňování sondy z buněk, tj. aktivity MDR pump [9].



Obrázek 4: Struktura fluorescenční sondy diS- C₃(3). [8]

1.2.4. pHluorin

Mutant zeleného fluorescenčního proteinu (GFP - green fluorescent protein), který je citlivý na změny pH, existuje ve dvou variantách - jako eliptický a poměrný. S přirozeně se vyskytujícím GFP sdílejí duální maximum excitace na 395 nm a 475 nm. Eliptický při pH jdoucí od 7,5 až k 5,5 postupně ztrácí intenzitu fluorescence z obou excitačních vlnových délek. U poměrného pHluorinu pak při stejně klesajícím pH klesá excitace z 395 nm a naopak roste excitace z 475 nm [3]. Toho využívá námi použitá metoda synchronního skenování s offsety 30 nm a 110 nm [10], z jejichž rozdílu intenzit lze po kalibraci určit aktuální pH v roztoku.

2. Metody a materiály

2.1. Kvasinkové kmeny

Během měření jsme používali čtyři mutantní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou pro přehled uvedeny v Tabulce 1 spolu s jejich genovými modifikacemi.

Kmen	Genotyp	Efekt
AD1-3	MAT α , PDR1-3, ura3, his1, yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG, pdr5 Δ ::hisG	deletované pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p
AD1-8	MAT α , PDR1-3, ura3, his1, yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG, pdr5 Δ ::hisG, pdr10 Δ ::hisG, pdr11 Δ ::hisG, ycf1 Δ ::hisG, pdr3 Δ ::hisG, pdr15 Δ ::hisG;	deletované pumpy Pdr5p, Snq2p, Yor1p a další
AD12	MAT α , PDR1-3, ura3, his1, yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG	nadprodukce pumpy Pdr5p
AD1-3 +pHluorin	Viz AD1-3 + přidán gen pro tvorbu pHluorinu	deletované pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p + pH citlivá fluorescence

Tabulka 1: Přehled použitých mutantních kmenů *S. cerevisiae*.

2.2. Kultivační média a roztoky

Roztok/médium	Složení	
YPD agar	Kvasinkový extrakt	20 g
	Pepton	10 g
	Glukóza	20 g
	Agar	20 g
	Destilovaná voda	1000 ml
YPD médium	Kvasinkový extrakt	20 g
	Pepton	10 g
	Glukóza	20 g
	Destilovaná voda	1000 ml
C-P pufr (10 mM)	Destilovaná voda	1000 ml
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3,6 g
	Kyselina citronová	titrována na požadovaného pH = 6

Tabulka 2: Použité roztoky a média a jejich složení

2.3. Chemikálie

Pro vyvolání změn membránového potenciálu nebo vnitrobuněčného pH byly použity chemikálie D-glukóza (zkráceně GLC), 2-deoxy-D-glukóza (2DG), hexanol (HexOH) a karbonyl kyanid-*m*-chlorfenylylhydrazon (CCCP). Všechny byly přidávány ze zásobních roztoků a jejich molekulová hmotnost a dodavatel jsou uvedeny v Tabulce 3 spolu se všemi ostatními chemikáliemi použitými během experimentů.

Látka	MW [g/mol]	Dodavatel
Kvasinkový extrakt		Sigma
Pepton		Sigma
Agar		RNDr. Jan Kulich s.r.o.
D-glukóza	180,16	Sigma
Hydrogendifosforečnan disodný dodekahydrát	358,14	Sigma
Kyselina citronová	192,13	Penta
diS-C ₃ (3)	520,5	Molecular Probes
BLT Glukoza Liquid 1000		Erba-Lachema
2-deoxy-D-glukóza	164,16	Sigma
CCCP	204,62	Serva
Hexanol	102,17	Sigma
Octan sodný	82,03	Sigma
Chlorid sodný	58,44	Sigma
Azid sodný	65,01	Fluka
Hydroxid sodný	40	Sigma
Kyselina chlorovodíková	36,46	Sigma

Tabulka 3: Použité chemikálie a jejich molekulová hmotnost a dodavatel

2.4. Kultivace kvasinek

Kvasinky byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, odtud byly přeneseny na YPD agar v miskách a 24 hodin kultivovány v inkubátoru při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Misky pro tvorbu inokul byly přechovávány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálně po dobu jednoho měsíce. Inokula byla vytvořena přenesením buněk sterilní kličkou z agaru do 10 ml YPD média a 24 hodin nechána v třepací lázni opět při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z inokul pak bylo před měřením přeneseno malé množství suspenze do čistého YPD média a buňky byly podle potřeb měření kultivovány v třepací lázni, dokud nedosáhly požadované růstové fáze.

2.5. Měření růstových křivek

Pro měření růstových křivek se již od okamžiku zaočkování v pravidelných časových intervalech odebírají vzorky a určuje se jejich OD (optical density – optická hustota, absorbance) při 578 nm. K tomu bylo využito spektrofotometru Amerschan Biosciences Novaspec III. Pro zajištění měření v měřitelném rozsahu přístroje byly vzorky 30 krát zředěny a naměřená hodnota pak ekvivalentně vynásobena. Zároveň s odebráním vzorku pro zjištění OD byl odebrán druhý vzorek pro zjištění obsahu glukózy v roztoku. Toho bylo docíleno odstředěním odebraného vzorku a smísením 10 μl supernatantu s 1 ml činidla BLT Glukosa Liquid 1000 obsahujícím oxidázu glukózy, peroxidázu a 4-aminoantipyrin. Po 20 minutách se pak roztok zabarví úměrně obsahu glukózy a můžeme tak také změřit jeho OD a spolu s OD kvasinek je vynést do grafu v závislosti na čase. Úbytek glukózy by měl nastat spolu s koncem exponenciální fáze růstu kvasinek.

2.6. Měření akumulace sondy diS-C₃(3) v buňkách

Pro měření fluorescence byly buňky kultivovány do exponenciální fáze a odebrán kontrolní vzorek jako v kapitole 2.5. Buněčná suspenze byla následně dvakrát promyta 10 ml destilované vody a nakonec byly omyté buňky rozmíchány do 3 ml C-P pufru ohřátého na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. K odstředění byla použita centrifuga MPW-350R v nastavení na 3000 otáček za minutu po dobu 2 minut. Z tohoto „zásobního“ roztoku kvasinek bylo následně namícháno dostatečné množství buněčné suspenze v C-P pufru s hodnotou OD = 0,13. Pak již byla suspenze napipetována po 3 ml do kyvet s optickou dráhou 1 cm.

Měření akumulace sondy uvnitř buněk bylo provedeno na spektrofluorimetru FluroMax-3 výrobce HORIBA Jobin Yvon v módu získávání emisního spektra v rozmezí 560 nm až 590 nm a s excitací na hodnotě 531 nm. Začátkem měření bylo přidání 6 μ l sondy ze zásobního roztoku. Po přibližně 15 – 40 minutách byly přidány různé chemikálie. Vzorky byly uchovávány v pokojové teplotě a po každém měření jemně zamíchány. Emisní spektra byla měřena v pravidelných intervalech a vždy bylo zaznamenáno jejich maximum. Rychlost a rozsah akumulace, tzv. **barvicí křivka**, je závislostí polohy fluorescenčního maxima λ_{max} na čase. Aktivita MDR pump je určena jako rozdíl barvicích křivek po ustanovení rovnováhy mezi kmeny pumpovými a bezpumpovými [11].

2.7. Měření vnitrobuněčného pH

Buňky byly kultivovány a připraveny podobně jako pro měření akumulace sondy, avšak pro měření pH je potřeba OD suspenze o hodnotě 0,4. Stejný spektrofluorimetr byl nastaven do módu synchronního skenování a na každém vzorku byly provedeny dva skeny, jeden s offsetem 30 nm (skenované rozmezí 380 nm až 490 nm) a druhý s offsetem 110 nm (rozmezí 340 nm až 440 nm). Nejprve je potřeba odečíst autofluorescenci kvasinkového kmene AD1-3 bez pHlorinu a následně z dvojice spekter s různými offsety musíme získat poměr hodnot pevně umístěného maxima (410 nm pro offset 110 nm a 470 nm pro offset 30 nm). Výsledný poměr $R_{110/30}$ je po kalibraci možné přímo převést na hodnotu pH.

Kalibrace byla provedena tvorbou sady 15 pufrů s pH v rozsahu 4,7 až 7,4 a rozmícháním buněk v těchto pufrch. Tato sada pufrů byla vytvořena právě z C-P pufru o pH = 6 přidáním KCl na koncentraci 50 mM, NaCl na 50 mM, NaN₃ na 10 mM a CH₃COONa na 200 μ M a následné titraci NaOH respektive HCl pro získání požadovaných pH. Jejich pH bylo měřeno za pomoci pHmetru WTW inoLab pH 7310.

Spektra byla získávána v pravidelných časových intervalech a po přibližně 15 minutách byly přidány chemikálie a sledována jejich odezva. Celá metoda je převzata z [10].

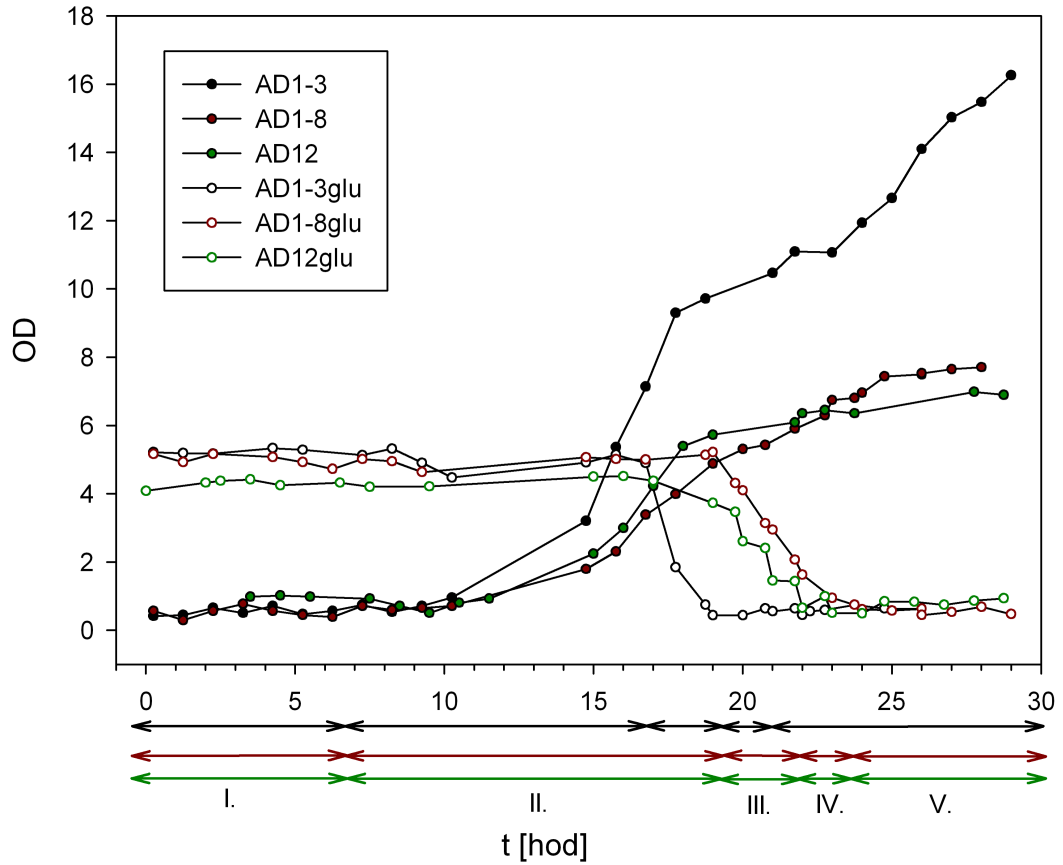
Pro zpracování velkého množství naměřených spekter jsem vytvořil skript v programu Matlab, který vybere potřebná data a jehož výstupem je již přímo graf závislosti pH na čase. Obdoba tohoto skriptu byla použita i k vytvoření kalibrační křivky. Kódy obou skriptů jsou v elektronické podobě v části Přílohy.

3. Výsledky a diskuse

3.1. Charakterizace mutantních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* pomocí jejich růstového profilu

K základním charakteristikám, které citlivě odrážejí vliv mutací rodičovského kmene patří **průběh růstu kultury (růstová křivka)**. Tento průběh lze stanovit pomocí zjištění nárůstu počtu buněk v pravidelných časových intervalech od zaočkování kultury, viz kapitola 2.5. Měření růstových křivek všech tří mutantních kmenů (AD12, AD1-3 a AD1-8), lišících se počtem deletovaných genů pro MDR pumpu, probíhalo současně. Jak je patrné z Grafu 1, existují mezi jednotlivými kmeny v důsledku těchto mutací podstatné rozdíly v růstu. Nejlépe rostou buňky kmene AD1-3, což je evidentní jak z rychlosti nárůstu OD, tak z hodnot OD, do nichž kvasinkové kmeny dorůstají po delší době kultivace (cca 30 hodin). U tohoto kmene je také nejrychleji dosaženo diauxie, jak je zřejmé z doby, kdy dojde k vyčerpání glukózy z růstového média. Obsah glukózy je rovněž uveden v Grafu 1. Stanovení obsahu glukózy v suspenzi umožňuje daleko přesněji než pouhé měření OD detekovat přechod mezi exponenciální růstovou fází a diauxickým posunem. Pravá exponenciální fáze končí v okamžiku, kdy obsah glukózy v médiu začne klesat. Tento pokles je doprovázen zpomalením růstu kultury, což je typickým rysem pozdní exponenciální fáze. Po úplném vyčerpání glukózy přechází růst kultury do diauxie a následně do fáze postdiauxické. Stacionární fázi a odumírání jsme již neměřili. Pomalejší růst kmenů AD12 a AD1-8 a dosažení nižších hodnot OD po 30 hodinách kultivace v porovnání s kmenem AD1-3 je charakterizován rovněž pozdějším vyčerpáním glukózy z růstového média. V případě buněk AD12, které mají exprimovanou MDR pumpu Pdr5p, souvisí tento fenomén zřejmě s její činností. Naproti tomu u kmene AD1-8, který má deletován větší počet genů kódujících MDR pumpu (7 genů – viz kapitola 2.1), je možné, že v rámci těchto mutací došlo k zásahu do esenciálních pochodů buněčného metabolismu.

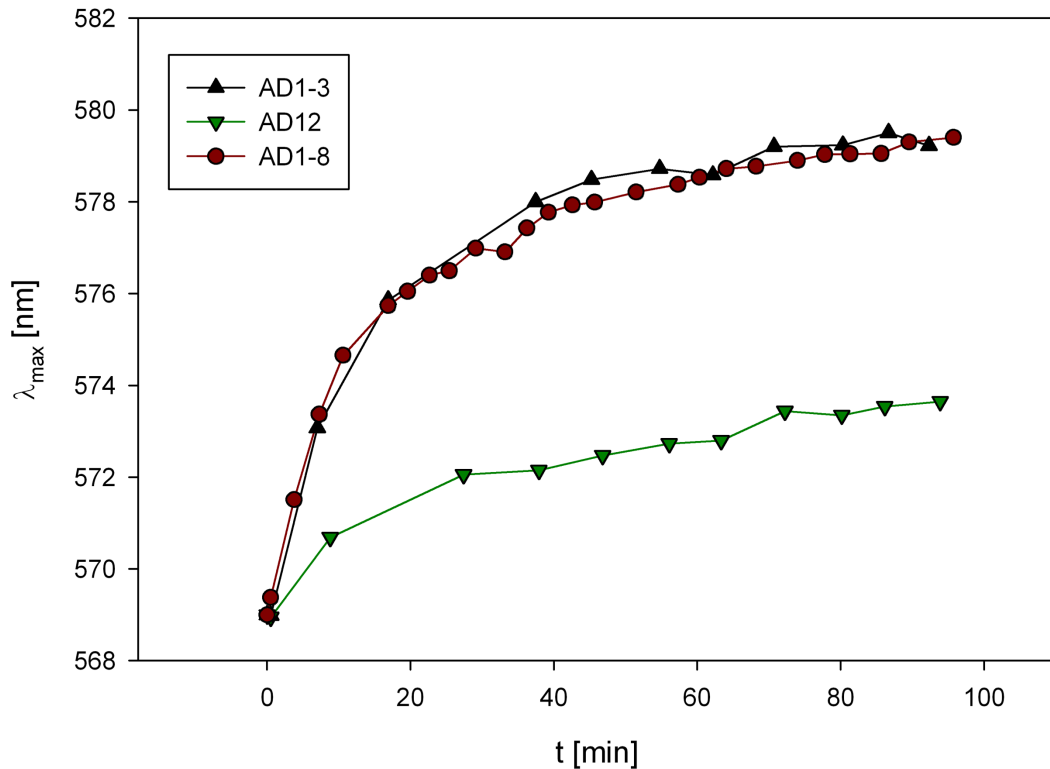
Pro porovnání rozdílů v životních projevech buněk jednotlivých mutantních kmenů v různých fázích růstu (např. rozdíly ve velikosti membránového potenciálu, v aktivitě MDR pump) je potřeba mít na zřeteli jejich odlišné růstové charakteristiky. Jinými slovy, pro posouzení vlivu mutací na např. membránový potenciál je nutné pro dosažení stejné růstové fáze kultivovat jednotlivé kmeny po různou dobu.



Graf 1: Růstové křivky mutantních kmenů *S. cerevisiae* (černá - AD1-3, červená AD1-8, zelená - AD12) se znázorněním jejich růstových fází (I. lag fáze, II. exponenciální fáze, III. pozdní exponenciální fáze, IV. diauxická fáze, V. postdiauxická fáze. Stacionární fáze a odumírání již není znázorněno.) Prázdnými kolečky je pak znázorněn obsah glukózy v suspenzi.

3.2. Vliv delece MDR pump na akumulaci sondy uvnitř buněk

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda u kvasinek *S. cerevisiae* neexistují ještě jiné MDR pumpy, kromě Pdr5p a Snq2p [9], které by aktivně snižovaly intracelulární koncentraci potenciometrické sondy diS-C₃(3). Za tímto účelem bylo provedeno měření akumulace sondy v buňkách u kmenů s odlišným zastoupením MDR pump v jejich plazmatické membráně. Konkrétně se jednalo o kmen AD12 (přítomnost Pdr5p), který sloužil jako pozitivní kontrola, kmen AD1-3 (delece tří hlavních MDR pump Pdr5p, Snq2p a Yor1p) a kmen AD1-8, který má deletované nejenom tyto tři hlavní MDR pumpy, ale navíc i pumpy Pdr10p, Pdr15p, Pdr11p a Ycf1p. Podle očekávání se buňky AD12 barví podstatně méně vzhledem k buňkám AD1-3 a AD1-8 v důsledku aktivního odstraňování sondy pumpou Pdr5p, zobrazeno v Grafu 2. Barvení buněk AD1-3 a AD1-8 se výrazně neliší, což ale neumožňuje jednoznačně vyloučit, že se ostatní MDR pumpy neúčastní odstraňování sondy z buněk. Při akumulaci sondy totiž hrají důležitou úlohu dva protichůdné jevy: (1) velikost membránového potenciálu a (2) aktivita MDR pump. Může tedy teoreticky nastat situace, kdy ke splynutí barvicích křivek dvou kmenů dojde v důsledku vysokého membránového potenciálu a vysoké aktivity pump u jednoho kmene a nízkého membránového potenciálu a nízké (popř. nulové) aktivity pump u druhého kmene.



Graf 2: Barvicí křivky jednotlivých mutantních kmenů

3.3. Vliv přidání glukózy a 2-deoxyglukózy na aktivitu MDR pump

Abychom mohli zjistit, která z možností pro buňky kmenů AD1-3 a AD1-8 (stejný membránový potenciál a stejná aktivita MDR pump versus různý membránový potenciál a různá aktivita MDR pump) je pravdivá, provedli jsme experiment, ve kterém jsme cíleně buňkám dodali energii ve formě ATP (přidání glukózy, GLC) nebo naopak vyčerpali ATP (přidání 2-deoxyglukózy, 2DG, které vede k zablokování glykolýzy).

Jak je patrné z Grafu 3, přidání 10 mM 2DG k buňkám AD12 vede k nárůstu polohy maxima λ_{\max} , což spolu s minimálním efektem 2DG na buňky AD1-3 svědčí o snížení aktivity pumpy Pdr5p, vzhledem k její aktivitě u kontrolních buněk, v důsledku postupného vyčerpání ATP v buňkách. Tento rozdíl je také zobrazen v Grafu 4.

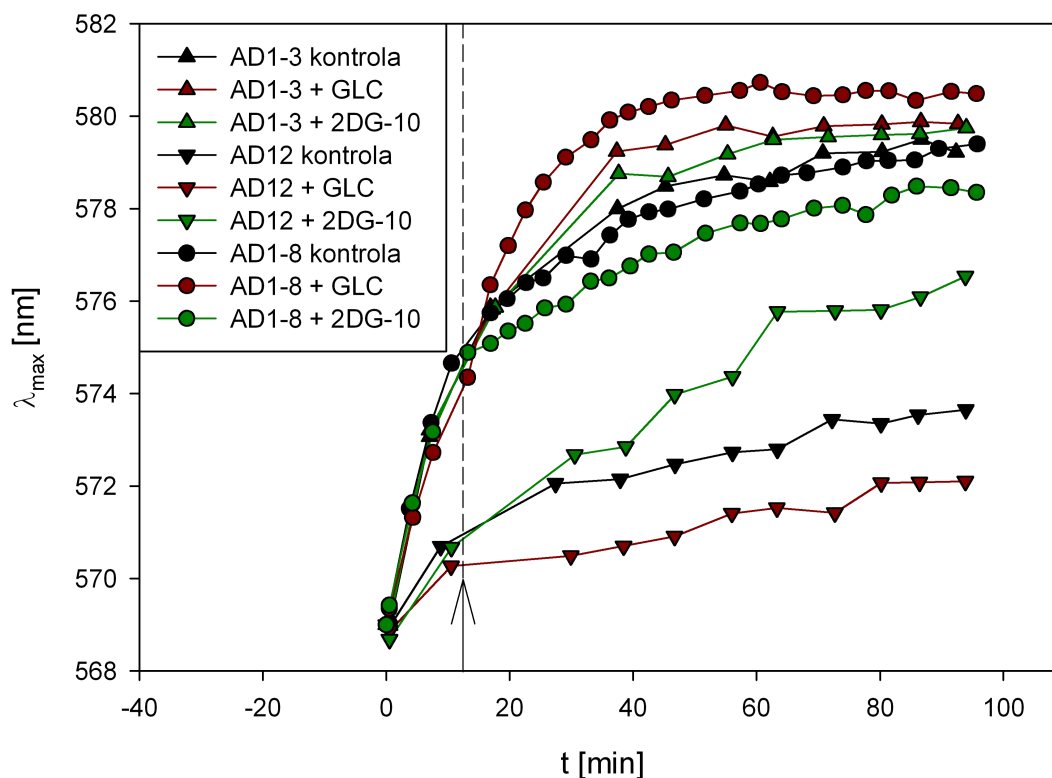
Na rozdíl od toho, přidání GLC k buňkám AD12 vede ke snížení barvení buněk vzhledem ke kontrole, což spolu s nárůstem barvení buněk AD1-3 svědčí o zvýšení aktivity Pdr5p v důsledku dodání ATP (Graf 3 a Graf 4). Je potřeba si

uvědomit, že po přidání GLC k buňkám dochází k aktivaci H^+ -ATPázy (hyperpolarizaci), jejíž rozsah je u obou kmenů stejný, tj. nezávisí na přítomnosti pumpy Pdr5p. To nás opravňuje k tvrzení, že pozorovaná diference v λ_{max} mezi AD1-3 a AD12 odráží skutečně zvýšenou aktivitu pumpy Pdr5p.

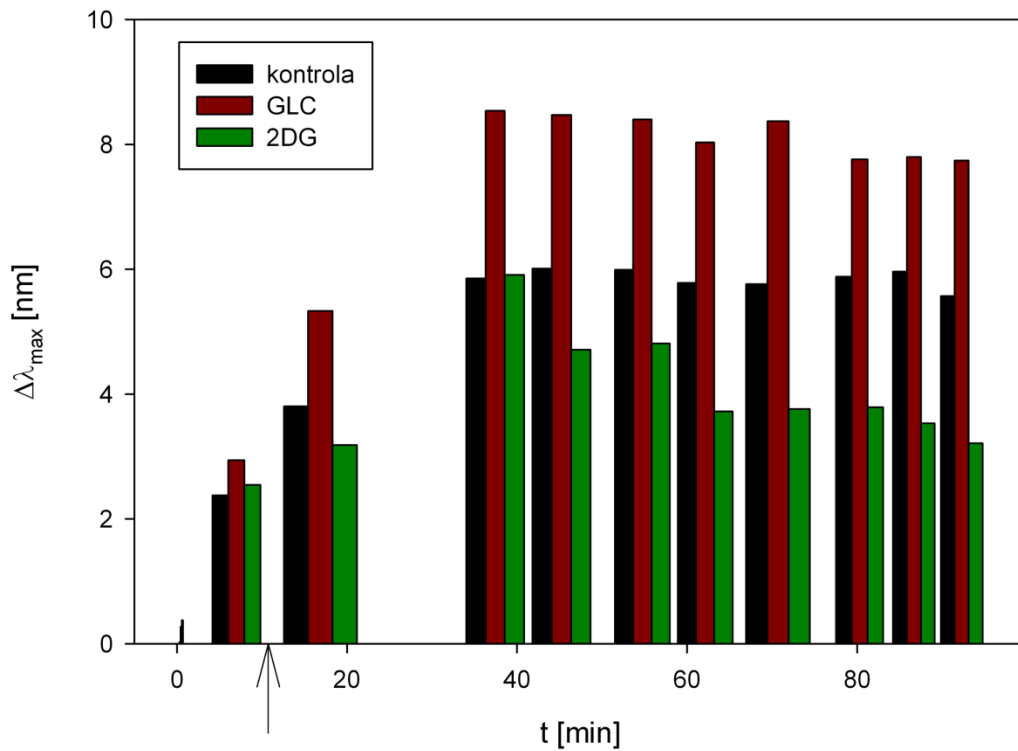
Přidání GLC k buňkám AD1-8 způsobuje výrazný nárůst barvení oproti kontrole který je rozsáhlejší než ten, který byl pozorován u buněk AD1-3 (Graf 3). Vzhledem k tomu, že rozsah hyperpolarizace membrány po přidání GLC je nezávislý na přítomnosti MDR pump (viz výše) a že v buňkách AD1-8 je zastoupeno podstatně méně různých druhů MDR pump než u buněk AD1-3, lze pozorovanou diferencí mezi barvením buněk AD1-3 a AD1-8 přisoudit (podobně jako v případě Pdr5p) zvýšené aktivitě některé z MDR pump přítomných pouze u buněk AD1-3, např. Pdr10p a/nebo Pdr15p. Jinými slovy, zatímco z identického barvení buněk obou kmenů bez přidání GLC nelze učinit jednoznačný závěr o případném příspěvku dalších MDR pump k intracelulární koncentraci sondy, zvýšení jejich aktivity pomocí GLC umožnilo zaznamenat jejich aktivní odstraňování sondy z cytosolu.

Pro potvrzení naší hypotézy, že buňky AD1-8 s nízkou, popř. nulovou, aktivitou pump mají nižší membránový potenciál buněk než buňky AD1-3 s vysokou aktivitou pump, byla k buňkám obou kmenů přidána 2DG. Její přidání k buňkám totiž v důsledku postupného vyčerpání intracelulárního ATP způsobí inhibici všech MDR pump přítomných v membránách buněk (stejně jako v případě Pdr5p u buněk AD12). Barvení buněk obou kmenů je v tomto případě dáno pouze aktuální hodnotou jejich membránového potenciálu. Jak je patrné z Grafu 3, přidání 10 mM 2DG k buňkám AD1-8 má za následek jejich nižší barvení vzhledem ke kontrole (depolarizace), což je možné přisoudit snížení aktivity H^+ -ATPázy, generující membránový potenciál, v důsledku nedostatku energie pro její činnost. Na druhou stranu, po přidání 10 mM 2DG k buňkám AD1-3 není pozorována prakticky žádná změna v jejich barvení oproti kontrole. Vzhledem k tomu, že k barvení buněk nepřispívají žádné MDR pumpy, které jsou u tohoto kmene přítomné (jsou inhibovány 2DG), a že jejich barvení je vyšší než u buněk AD1-8 po působení 2DG, lze konstatovat, že membránový potenciál buněk AD1-3 je vyšší, než u buněk AD1-8. Abychom měli úplnou jistotu, že koncentrace 2DG (10 mM) je dostatečná k inhibici MDR pump, tj. že zvyšování koncentrace 2DG nevede k dalšímu nárůstu v barvení buněk, byl účinek 10 mM 2DG na buňky všech tří kmenů porovnán s dvakrát vyšší koncentrací (20 mM 2DG), Graf 5. Z prakticky identického barvení

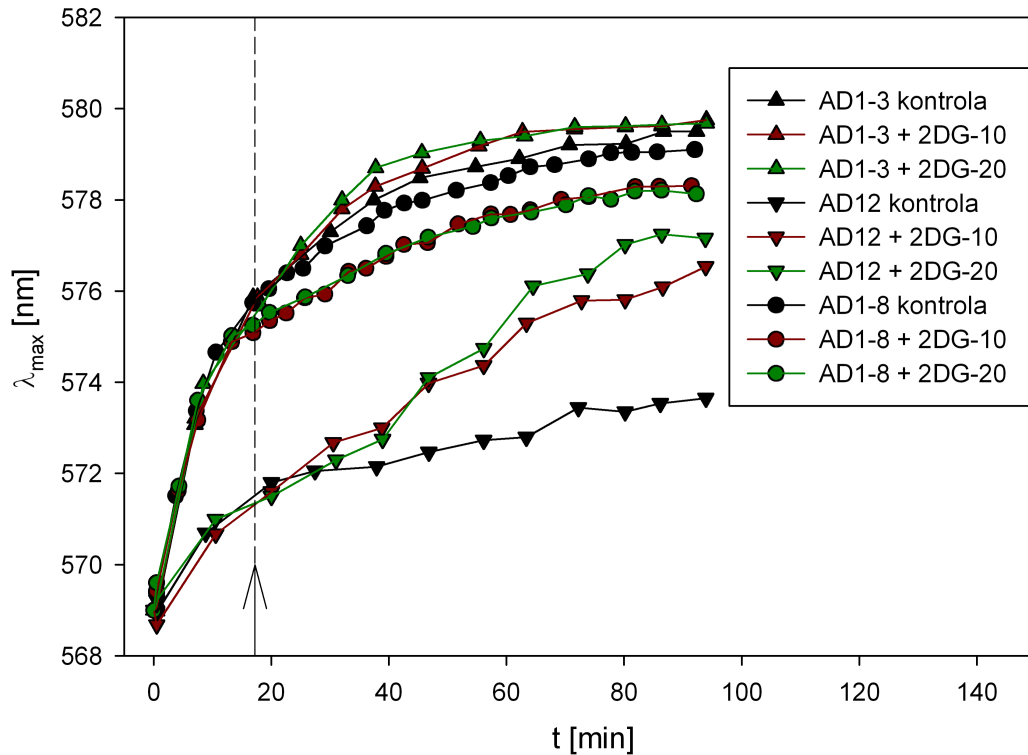
buněk všech tří kmenů vystavených účinku 10 mM a 20 mM 2DG jasně vyplývá, že koncentrace 2DG zvolená pro posouzení rozdílů v membránovém potenciálu buněk kmenů AD1-3 a AD1-8 je zcela dostatečná pro inhibici MDR pump.



Graf 3: Barvicí křivky jednotlivých mutantních kmenů bez (černě) a po přidáním glukózy (10 mM) – červeně a 2-deoxyglukózy (10 mM) – zeleně. Šipka značí okamžik přidání látek v 15. minutě barvení.



Graf 4: Časová závislost rozdílů v barvení buněk AD1-3 a AD12 ($\Delta\lambda_{\max}$) po přidání glukózy (10 mM) a 2-deoxyglukózy (10 mM). Šipka znázorňuje přidání látek v 15. minutě barvení buněk



Graf 5: Porovnání barvicích křivek všech tří mutantních kmenů po přidání 10 mM (červeně) a 20 mM (zeleně) 2-deoxyglukózy. Šipka indikuje čas přidání 2DG.

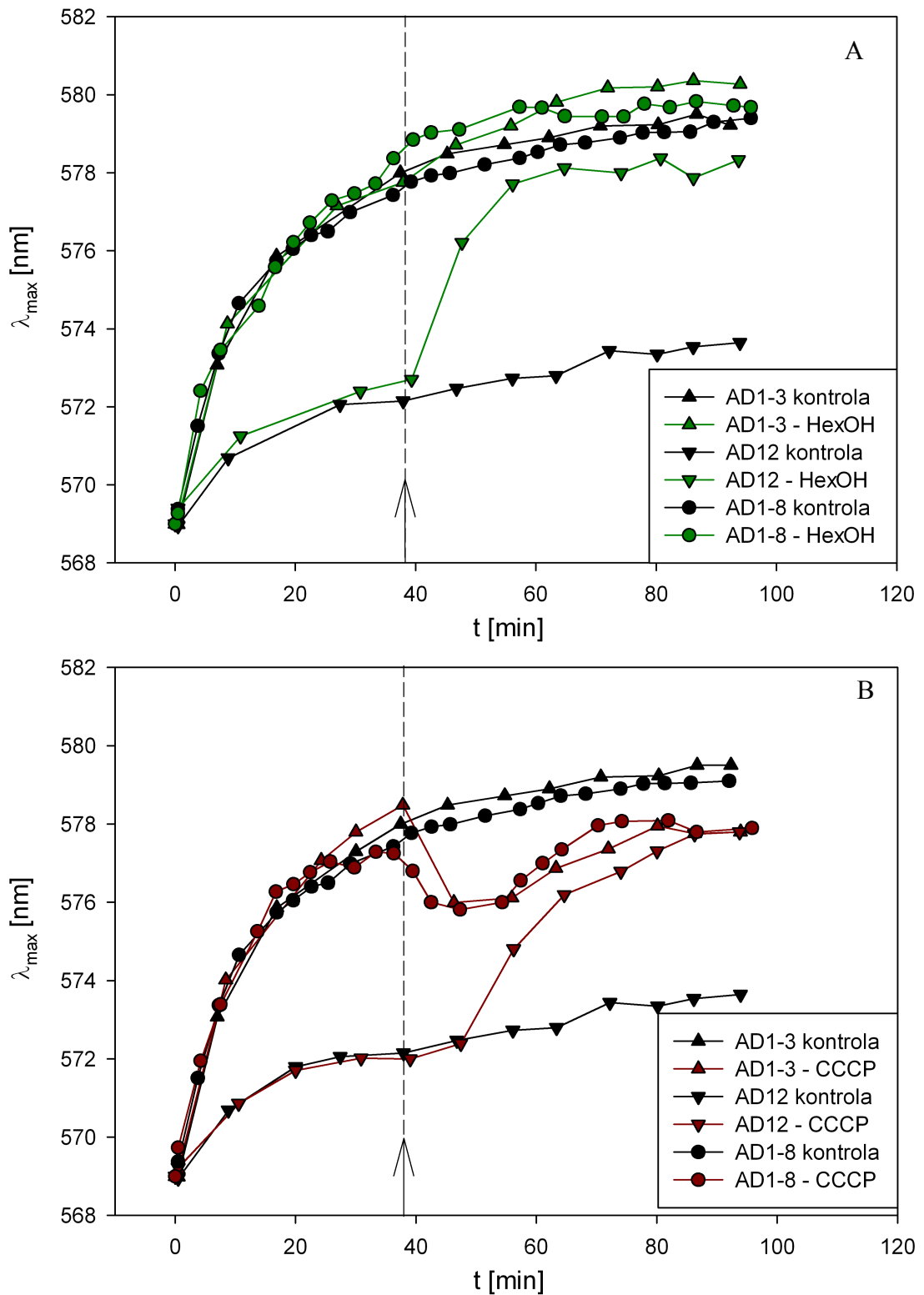
3.4. Vliv přidání hexanolu a protonoforu CCCP na aktivitu MDR pump

Vzhledem k tomu, že inhibice MDR pump způsobená vyčerpáním ATP po přidání 2DG je relativně pomalý proces, testovali jsme rovněž účinek dalších dvou látek (hexanol a protonofor CCCP), u kterých bylo dokázáno již dříve, že způsobují rychlou inhibici transportu sondy pumpami Pdr5p a Snq2p. Zatímco hexanol inhibuje činnost pump v důsledku přímé interakce s plazmatickou membránou [12], protonofor CCCP, který jako substrát pro obě výše zmíněné pumpy kompetitivně inhibuje transport sondy oběma pumpami [13].

Z porovnání barvení buněk AD12 a AD1-3 po přidání 0,07% hexanolu v Grafu 6A je zřejmé, že jeho účinkem dochází k inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky [12]. V této publikaci byl nárůst v barvení buněk kmene AD1-3 po aplikaci hexanolu přisouzen jeho hyperpolarizačnímu účinku spojenému s pravděpodobným ovlivněním permeability membrány pro malé anorganické ionty (např. výtok K^+). Jak je patrné z grafu, je rozsah hyperpolarizace menší u buněk AD1-8 než u AD1-3. Vzhledem k tomu, že hexanol pravděpodobně účinně inhibuje činnost různých MDR pump, nejenom Pdr5p a Snq2p [12], znamená to, že vyšší barvení buněk AD1-3 je, podobně jako při působení 2DG, důsledkem jejich vyššího membránového potenciálu vzhledem k AD1-8.

Přidání protonoforu CCCP k buňkám AD12 a AD1-3 dokumentuje již dříve pozorovanou kompetitivní inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p [13]. Konkrétně, přidání 10 μ M CCCP k buňkám AD12 je doprovázeno nárůstem λ_{max} do červené oblasti spektra vedoucí ke splynutí barvicích křivek AD12 a AD1-3, pozorováno v Grafu 6B. Navíc, bezprostředně po přidání protonoforu k buňkám AD1-3 dochází k poklesu λ_{max} , který je odrazem rychlé a rozsáhlé depolarizace membrány. Tento pokles je pouze přechodný, po cca 10 minutách od přidání protonoforu, začne docházet k opětovnému nárůstu v barvení a ustavení nové rovnovážné hodnoty membránového potenciálu. Příčinou opětovného zvyšování membránového potenciálu při působení CCCP je aktivace H^+ -ATPázy v důsledku výrazné acidifikace cytosolu, viz dále kapitola 3.5, [14]. Přidání protonoforu CCCP k buňkám AD1-8 prakticky kopíruje profil barvení buněk AD1-3. Na rozdíl od předcházejících experimentů, není v tomto případě patrný rozdíl mezi rovnovážným

barvením buněk obou kmenů. Pravděpodobným vysvětlením identické intracelulární koncentrace sondy u obou kmenů je, že CCCP neinhibuje činnost MDR pump přítomných u kmene AD1-3, tj. není jejich substrátem. To by znamenalo, že stejně jako při splývání barvicích křivek kontrol obou kmenů je i toto splynutí důsledkem jejich odlišného membránového potenciálu a různé aktivity MDR pump.



Graf 6: Barvicí křivky jednotlivých mutantních kmenů po přidání (A) hexanolu (0,07%) a (B) po přidání CCCP (10 μ M) – zeleně. Šipka značí okamžik přidání látek ve 38. minutě barvení.

3.5. Vliv testovaných látek na vnitrobuněčné pH

Abychom získali více informací o působení testovaných látek na buňky, provedli jsme sérii experimentů, při kterých jsme sledovali, jakým způsobem ovlivňují vnitrobuněčné pH (pH_i). Měření změn vnitrobuněčného pH je totiž velmi často použito jako doplňková metoda při měření změn membránového potenciálu. Změny intracelulárního pH účinkem testovaných látek byly měřeny na kmenu AD1-3 s exprimovaným GFP proteinem [14].

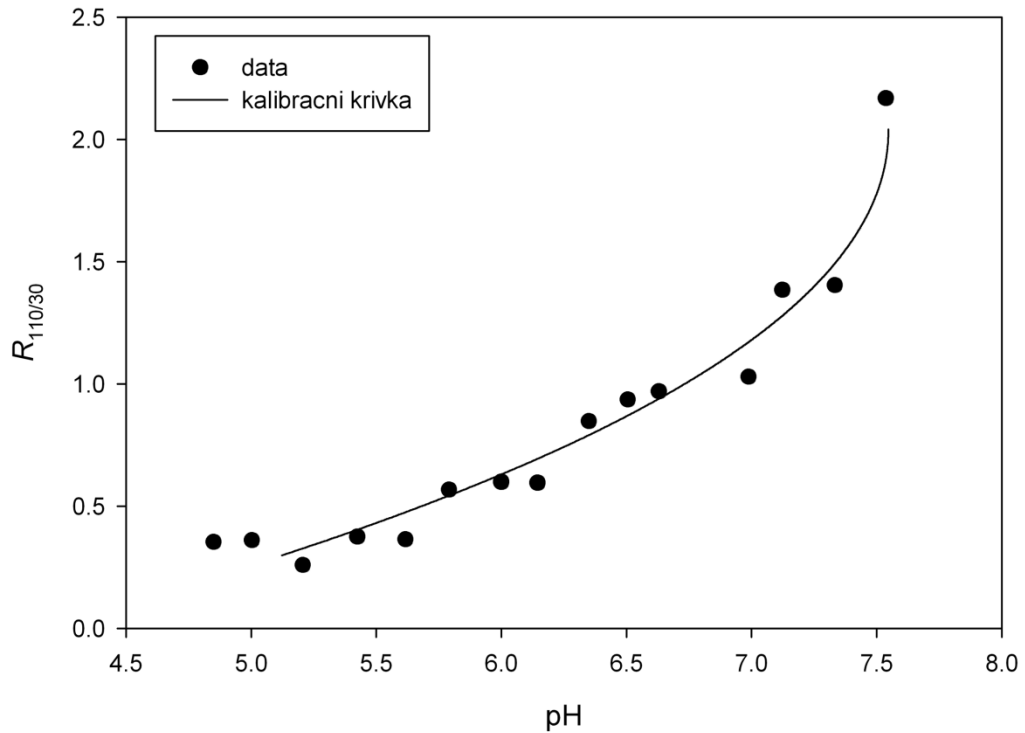
Nejprve bylo potřeba naměřit kalibrační křivku převodu poměru fluorescenčních intenzit na pH. Pro potřeby měření bylo předpokládáno, že pH kalibračního pufru se rovná vnitrobuněčnému pH. Pro každou hodnotu pH byla provedena tři měření, která byla následně zprůměrována. Výsledná závislost byla proložena polynomem třetího stupně v programu Matlab na výslednou rovnici kalibrační křivky

$$\text{pH} = 0,0638 R_{110/30}^3 - 1,0791 R_{110/30}^2 + 3,6128 R_{110/30} + 4,1344 \quad (2)$$

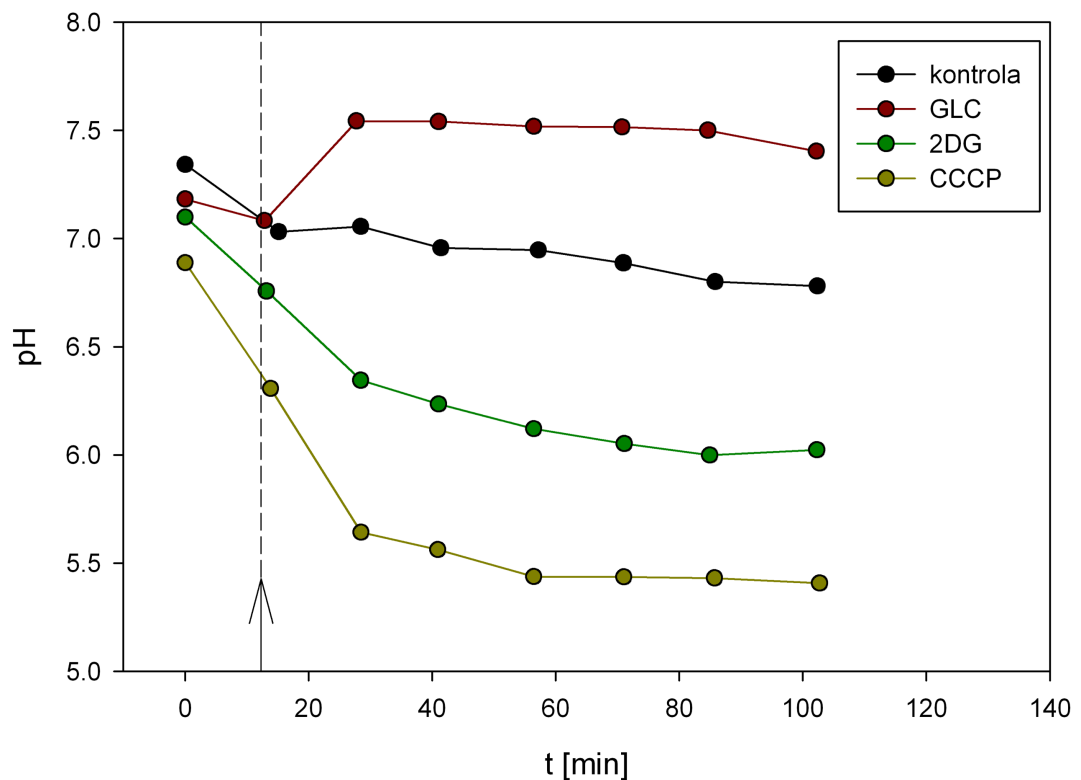
Naměřené hodnoty i kalibrační křivka jsou uvedeny v Grafu 7.

Získaná kalibrace byla využita pro vyhodnocení naměřených spekter vlivu vybraných látek (GLC, 2DG a CCCP) na vnitrobuněčné pH. Vliv hexanolu na intracelulární pH nebyl testován z časových důvodů. Nicméně lze očekávat, že jeho vliv na pH_i bude minimální, jak indikuje jeho zanedbatelný účinek na extracelulární pH i při vyšších koncentracích [12].

Jak je vidět z Grafu 8, naměřené hodnoty potvrzují všechny naše předchozí předpoklady. Přidání glukózy vede k alkalizaci cytosolu v důsledku zvýšené aktivity H^+ -ATPázy, Naopak po přidání 2DG a protonoforu CCCP dochází k acidifikaci vnitřního prostředí, přičemž acidifikace je rozsáhlejší po přidání CCCP. Pozorovaný rozdíl v pH_i je logickým důsledkem rozsáhlého transportu protonů do buněk protonoforem. V případě účinku 2DG je acidifikace způsobena nemožností H^+ -ATPázy exportovat protony z buněk díky nedostatku ATP.



Graf 7: Naměřené hodnoty poměru fluorescenčních maxim na vnitrobuněčném pH a proložený polynom třetího stupně.



Graf 8: Závislost vnitrobuněčného pH na čase po přidání testovaných látek. Přidané látky: GLC (10 mM) – červeně, 2-deoxyglukóza (10 mM) – zeleně CCCP (10 μ M) – žlutě a kontrola do které nebyla přidána žádná látka je černě. Šipka značí okamžik přidání látek v 15. minutě barvení.

4. Závěr

Tato práce obsahuje základní úvod do studia transportních procesů v membránách kvasinek. Poskytuje základní informace o struktuře kvasinek a jejich životním cyklu a zaměřuje se na membránové přenašeče, především tzv. MDR pumpy, které mají na starost odčerpávat z buněk cizorodé látky. Popsány jsou rovněž principy kultivace kvasinek a pro tři mutantní kmeny kvasinek *S. cerevisiae* jsou experimentálně změřeny jejich charakteristické růstové křivky.

Těžištěm celé práce je měření akumulace sondy v buňkách s různým zastoupením MDR pump v plazmatické membráně, a to jak bez, tak v přítomnosti vybraných látek (stresorů).

Prokázali jsme, že sonda diS-C₃(3) je substrátem nejenom pro MDR pumpu Pdr5p (a také Snq2p), ale také pro další pumpy, které jsou přítomny v membránách kvasinek AD1-3, nikoliv však AD1-8. Tento důkaz vyplynul z testování vlivu glukózy, 2-deoxyglukózy a hexanolu na akumulaci sondy v buňkách jednotlivých mutantních kmenů.

Dále jsme zjistili, že protonofor CCCP není substrátem pro studované MDR pumpy, s výjimkou Pdr5p, neovlivňuje tudíž jejich aktivitu.

V druhé části práce byly výsledky získané pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3) doplněny měřením vnitrobuněčného pH. Získaná kalibrační křivka převodu naměřených spekter na hodnotu vnitrobuněčného pH může být v budoucnu použitelná pro další studenty, kteří se budou zabývat touto problematikou.

Literatura

1. **Ramos, J., Sychrová, H. a Kschicho, M.** Yeast Membrane Transport. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013, Sv. 892.
2. **Goffeau, A., et. al.** Life with 6000 genes. *Nature*. 1996, Sv. 274, 5287, stránky 546-567.
3. **Miesenböck, Gero, Angelis, Dino A. De a Rothman, James E.** Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 1998, Sv. 394, stránky 192-195.
4. **Janderová, B. a Bendová, O.** *Úvod do biologie kvasinek*. Praha : Nakladatelství Karlonium, 1999.
5. **Alberts, Bruce, et. al.** *Molecular Biology of the Cell*. Sixth Edition. New York : Garland Science, 2015. stránky 597-640.
6. **Rogers, Bruce, et. al.** The Pleiotropic Drug ABC Transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001, Sv. 3, 2, stránky 207-2014.
7. **Lakowicz, Joseph R.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Baltimore : Springer, 2006.
8. **Information, National Center for Biotechnology.** PubChem Compound Database. *CID=16212850*. [Online] [Citace: 11. July 2017.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16212850>.
9. **Čadek, R., et. al.** Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, Sv. 1665, 1-2, stránky 111-117.
10. **Plášek, J., Melcrová, A. a Gášková, D.** Enhanced Sensitivity of pHluorin-Based Monitoring of Intracellular pH Changes Achieved through Synchronously Scanned Fluorescence Spectra. *Analytical chemistry*. 2015, Sv. 87, 19, stránky 9600-9604.
11. **Denksteinová, B., et. al.** Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C3(3) fluorescence. *Folia Microbiol.* 1997, Sv. 43, 3, stránky 221-224.

12. **Gášková, D., et. al.** Alcohols are inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* multidrug-resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *FEMS Yeast Res.* 2013, Sv. 13, stránky 782-795.

13. **Hendrych, T., et. al.** Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *Biochim Biophys Acta.* 2009, Sv. 1778, 3, stránky 717-723.

14. **Zahumenský, Jakub.** *Disertační práce.* Praha, 2017.

15. **Gášková, D., et. al.** Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C3(3) in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001, Sv. 1511, stránky 74-79.

Přílohy

Matlab skripty

Na přiloženém CD jsou umístěny dva skripty pro program Matlab (přípona .m). Oba skripty vyžadují spektra v textové podobě, se jmény souborů organizovanými následovně: kyveta č. 1, první měření – A1.txt pro offset 110 nm a B1.txt pro 30 nm. Druhé měření pak má soubory A2 a B2, druhá kyveta má soubory C1 a D1 resp. C2 a D2 pro druhé měření. Analogicky pak musí být pojmenována všechna spektra. Dále musí být ve složce dostupná spektra autofluorescence ve formátu .dat jako auto30.dat a auto110.dat. Výstupem je graf závislosti pH na čase a série grafů se surovými spektry pro jednotlivé kyvety pro ověření správné funkčnosti (polohy maxim, odečtu autofluorescence.)

Výstupem kalibračního skriptu je pouze vektor poměrů $R_{110/30}$, který je pak potřeba přiřadit odpovídajícím hodnotám pH pufrů a následně nafitovat polynomem třetího řádu.