

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Lenka Beranová

### **Studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných kovů**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, biofyzika a chemická fyzika

Chtěla bych poděkovat RNDr. Romanovi Chaloupkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a RNDr. Evě Urbánkové, Ph.D. za pomoc při experimentech i při psaní práce. Oběma bych chtěla poděkovat zvláště za trpělivost a přátelský přístup. Dále děkuji Mgr. Věře Ňuňukové za pomoc při některých měřeních a Prof. Mathieu Cellier a Pascalovi Courville (INRS - Institut Armand - Frappier, Laval, QC, Kanada) za poskytnutí nepublikovaných dat.

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

V Praze dne 20. 4. 2007

Lenka Beranová

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>7</b>
2.1	Biologické membrány.....	7
2.2	Membránový transport.....	8
2.3	Biologická role dvojmocných kovových iontů.....	8
2.4	Rodina membránových transportních proteinů Nramp.....	9
2.4.1	Transportéry Nramp u savců.....	10
2.4.2	Transportéry Smf v kvasinkách.....	11
2.4.3	Bakteriální transportní proteiny MntH.....	11
2.5	Transportér MntH bakterie <i>E. coli</i> ( <i>EcoliA</i> ).....	11
2.6	Experimentální metody vhodné pro studium funkce transportních proteinů Nramp.....	14
2.6.1	Metody vhodné ke studiu funkce proteinů MntH.....	16
<b>3</b>	<b>Experimentální metody a materiál</b> .....	<b>18</b>
3.1	Seznam použitých roztoků.....	18
3.2	Použité bakteriální kmeny.....	19
3.2.1	Pěstování bakterií.....	19
3.2.2	Stanovení růstové křivky.....	20
3.3	Fluorescenční měření.....	21
3.4	Fluorescenční sonda fura-2.....	21
3.4.1	Měření fluorescenční odezvy fura-2 na $Me^{2+}$ v roztoku.....	23
3.5	Elektroporace.....	23
3.6	Barvení bakterií <i>E. coli</i> fluorescenční sondou fura-2-AM.....	24
3.7	Příprava sféroplastů a jejich barvení fura-2-AM.....	25
3.8	Měření transportu protonů proteinem MntH indukovaného $Me^{2+}$ .....	27
3.8.1	Popis transportu pomocí rovnice Michaelise a Mentenové.....	28
3.8.2	Arrheniova aktivační energie.....	28
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b> .....	<b>30</b>
4.1	Měření transportu $Me^{2+}$ <i>in vivo</i> .....	30
4.1.1	Vliv $Me^{2+}$ na fluorescenční odezvu fura-2.....	30
4.1.2	Barvení bakterií sondou fura-2 pomocí elektroporace.....	34
4.1.3	Barvení bakterií fluorescenční sondou fura-2-AM.....	39
4.1.4	Barvení sféroplastů sondou fura-2-AM.....	39
4.1.5	Shrnutí a diskuse kapitoly 4.1. ....	40
4.2	MntH bakterie <i>E. coli</i> – vztah struktury a funkce.....	42
4.2.1	Vliv teploty na transport protonů indukovaný $Cd^{2+}$ .....	42
4.2.2	Studium vztahu struktury a funkce MntH bakterie <i>E. coli</i> .....	46
4.2.3	Aktivační energie transportu protonů indukovaného $Mn^{2+}$ .....	52
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>56</b>

**Název práce:** Studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných kovů

**Autor:** Lenka Beranová

**Katedra (ústav):** Fyzikální ústav UK

**Vedoucí diplomové práce:** RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

**e-mail vedoucího:** roman.chaloupka@mff.cuni.cz

**Abstrakt:** Tato práce se zabývá studiem funkce membránového transportního proteinu MntH bakterie *E. coli*. Transport dvojmocných kovových iontů ( $\text{Me}^{2+}$ ) zprostředkovaný tímto sekundárně aktivním transportérem je symportem  $\text{Me}^{2+}$  s protony. Metodologická část popisuje vývoj metody, která by umožnila studovat transport  $\text{Me}^{2+}$  tímto proteinem pomocí fluorescenční sondy fura-2 citlivé na  $\text{Me}^{2+}$ , které jsou substrátem MntH. Byly zvoleny jednak elektroporace, jednak použití chemicky modifikované sondy (fura-2-AM) k barvení buněk a též jejich sféroplastů. Bylo zjištěno, že použití fura-2 je k monitorování transportu  $\text{Me}^{2+}$  v *E. coli* nevhodné, neboť efektivní průnik fluorescenční sondy do bakterií je možno zajistit jen za cenu použití experimentálních podmínek, které silně narušují fyziologický stav buněk i vlastní transportní aktivitu MntH. Druhá část je zaměřena na studium vztahu struktura-funkce metodou založenou na sledování transportu protonů indukovaného  $\text{Me}^{2+}$  pomocí GFP citlivého na změny pH. Z průběhů kinetik transportu divokým typem MntH za různých teplot byly určeny konstanty  $K_m$  a  $V_{max}$  a jejich teplotní závislosti. Byl studován transport zprostředkovaný proteiny nesoucí specifické jednobodové mutace a jeho teplotní závislost s cílem určit míru ovlivnění funkčnosti transportéru příslušnou mutací. Pomocí změřených aktivačních energií transportu byla charakterizována některá aminokyselinová residua sekvence MntH, která zřejmě hrají klíčovou úlohu v transportu  $\text{Me}^{2+}$  a protonů.

**Klíčová slova:** membránový transport, MntH, Nramp, dvojmocné kovové iony, GFP

**Title:** Study of Function of Bacterial Divalent Metal Ions Transporters

**Author:** Lenka Beranová

**Department:** Institute of Physics of Charles University

**Supervisor:** RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

**Supervisor's e-mail address:** roman.chaloupka@mff.cuni.cz

**Abstract:** This study concerns functional characterization of bacterial membrane transport protein MntH from *E. coli*. It is a secondary active transporter – symporter of divalent metal ions ( $\text{Me}^{2+}$ ) and protons. The methodological part of this work describes development a method useful for monitoring the  $\text{Me}^{2+}$  transport mediated by MntH using fluorescent probe fura-2. We used electroporation and also chemically modified form of this probe (fura-2-AM) for probe loading into bacteria and spheroplasts. It was found that this probe is not suitable for monitoring MntH activity in *E. coli* since effective probe loading can be achieved only using experimental methods affecting physiological conditions of the cells and thus transport activity of the protein. The second part of the work focuses on the MntH structure-function relationship. It is based on monitoring the proton transport mediated by MntH using a pH-sensitive GFP. We characterized the transport kinetics and its temperature dependence for wild-type MntH. We studied transport mediated by transporters with specific single-point mutations and determined the activation energy of the transport. Transport properties of some residues playing a key role in the  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  transport were described.

**Keywords:** membrane transport, MntH, Nramp, divalent metal ions, GFP

# 1 Úvod

Biologické membrány patří mezi klíčové buněčné struktury. Plní funkci bariéry mezi vnitřkem a vnějškem buňky, ohraničují jednotlivé organely a probíhá na nich celá řada fyziologicky významných procesů. Jsou jedním ze základních předpokladů existence živých buněk a ve svém důsledku i života vůbec. Mezi nejdůležitější procesy probíhající na biologických membránách patří transport, který je zajišťován nejrůznějšími transportními proteiny.

Dvojmocné kovové ionty jsou životně nezbytné pro všechny živé organismy, neboť se účastní mnoha biochemických reakcí jako kofaktory různých enzymů. Významnou součástí metabolismu dvojmocných kovových iontů je právě jejich transport přes plasmatickou membránu i přes membrány některých organel, který je u bakterií, kvasinek, rostlin i živočichů zajišťován mimo jiné i transportními proteiny z rodiny Nramp/MntH. Informace o mechanismu transportu a funkci těchto transportérů jsou zatím relativně omezené zejména u bakteriálních MntH, především kvůli nedostatku vhodných experimentálních metod.

Tato diplomová práce se zabývá studiem funkce bakteriálních transportérů dvojmocných kovových iontů náležejících k rodině transportních proteinů Nramp/MntH, konkrétněji studiem proteinu MntH bakterie *Escherichia coli* pomocí fluorescenční spektroskopie *in vivo*. Cílem diplomové práce bylo jednak vyvinout fluorescenční metodu pro měření intracelulární koncentrace dvojmocných kovů ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) v bakteriích, která by umožnila sledovat transport dvojmocných kationtů transportérem MntH, jednak studovat vliv vybraných jednobodových mutací na transport proteinem MntH, s cílem získat detailnější informace o vztahu mezi jeho strukturou a funkcí.

Teoretická část popisuje základní poznatky o biologických membránách a membránovém transportu, roli dvojmocných kovových iontů v živých organismech a shrnuje dosud známé informace o transportních proteinech studované rodiny, přičemž klade důraz na poznatky o bakteriálních transportních proteinech této rodiny. Nedílnou součástí je rovněž popis základních principů experimentálních metod používaných ke studiu membránových transportérů Nramp v eukaryotních i prokaryotních modelových systémech. V experimentální části jsou popsány metody, které jsme použili na obarvení bakterií fluorescenční sondou, která je vhodná na detekci dvojmocných kationtů, také tam lze nalézt diskusi úspěšnosti těchto postupů. Dále jsou uvedeny výsledky studia transportu protonů proteinem MntH a proteiny s jednobodovými mutacemi za různých teplot, včetně vyhodnocení aktivační energie

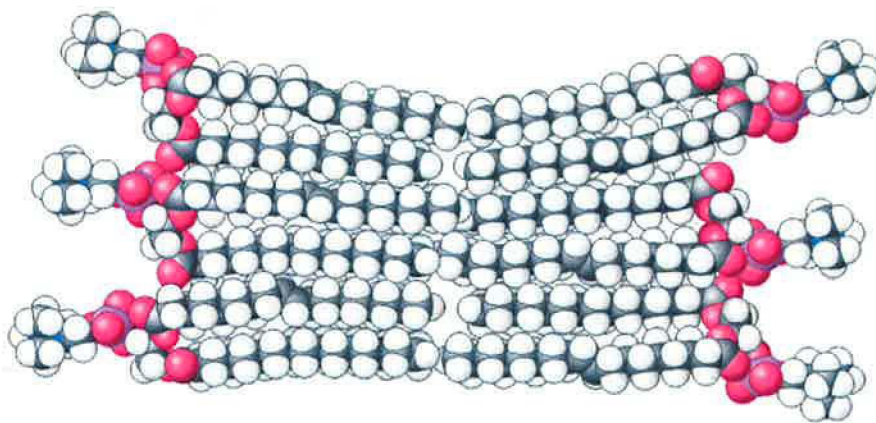
transportu. V závěrečné kapitole jsou stručně zrekapitulovány a diskutovány nejdůležitější závěry této práce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Biologické membrány

Plasmatická membrána je nejdůležitější buněčná struktura oddělující vnitřek buňky od vnějšího prostředí. Umožňuje buňce díky své semipermeabilitě udržovat koncentrace různých látek v cytosolu odlišné od koncentrací vně buňky. U eukaryotních buněk navíc membrány oddělují i lumen jednotlivých organel od cytosolu a stejně jako na vyšší úrovni membrána plasmatická umožňují v jednotlivých organelách udržovat složení odlišné od složení cytosolu. Biologická membrána se skládá z membránových lipidů a z celé řady proteinů, které plní různé funkce – signalizační, transportní, katalytické či strukturální (1).

Univerzálním základem struktury biologických membrán zodpovědným za jejich obecné vlastnosti je dvojná vrstva složená z membránových lipidů, které mají amfifilní charakter. Jejich molekuly drží při sobě hydrofobní interakcí. Nepochopitelně části molekul (řetězce vyšších mastných kyselin) tvoří hydrofobní jádro membrány, zatímco polární hlavičky molekul jsou vystavené vodnímu prostředí na okraji membrány (viz obrázek 1). Molekuly lipidů se mohou pohybovat v rovině membrány. V různých biologických membránách se liší zastoupení jednotlivých druhů lipidů (fosfolipidy s různými mastnými kyselinami i polárními hlavičkami, sfingolipidy, glykolipidy, steroly), což ovlivňuje například fluiditu membrány, svým složením se liší i vnitřní a vnější část dvojvrstvy.



**Obrázek 1:** Základní struktura biomembrány - fosfolipidová dvojvrstva (2)

Lipidová dvojná vrstva s hydrofobním jádrem je propustná jen pro malé nepochopitelně molekuly, jako je např. molekula kyslíku nebo oxidu uhličitého, v menší míře jí také mohou procházet voda a další malé polární molekuly. Naopak je prakticky nepropustná pro větší

polární molekuly a ionty. Veškerý transport látek přes biologické membrány je s výjimkou nespecifické permeace zajišťován membránovými transportními proteiny.

## 2.2 Membránový transport

Membránové transportní proteiny umožňují specifický přenos nejrůznějších látek, jako jsou ionty, cukry, aminokyseliny nebo nukleotidy, přes membránu. Z hlediska mechanismu transportu je možné je rozdělit na kanály a přenašeče. Selektivní **kanály** jsou proteiny, které vytváří v membráně pór, kterým může procházet transportovaná látka výhradně ve směru svého elektrochemického gradientu, jedná se tedy o transport pasivní. Tyto proteiny se specializují zejména na transport anorganických iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nebo  $\text{Cl}^-$ ). Naopak **přenašeče** zajišťují transport tím způsobem, že se na substrát navážou a transportují jej na druhou stranu membrány díky sérii konformačních změn, jimiž během transportního cyklu projdou. Přenašeče mohou látky přenášet jak ve směru elektrochemického gradientu, potom jde o pasivní transport, tak proti směru elektrochemického gradientu, potom se jedná o transport aktivní.

Aktivní transport jakožto endergonický proces musí být, aby mohl probíhat, spřažen s nějakým exergonickým procesem, který mu dodá potřebnou energii. V případě tzv. primárně aktivního transportu se jedná nejčastěji o spojení s hydrolyzou ATP. Sekundárně aktivní transport využívá spřažení transportu s transportem jiné látky, která je naopak přenášena ve směru svého elektrochemického gradientu. V takovém případě se může jednat buď o symport, pokud obě látky projdou na stejnou stranu membrány, anebo o antiport, pokud dojde k výměně jedné látky za druhou. Nejčastějším zdrojem energie pro transport významných metabolitů je elektrochemický gradient různých iontů, např. protonů. Ostatně ionty a jejich transport hrají velmi důležitou roli v mnoha základních biologických procesech.

## 2.3 Biologická role dvojmocných kovových iontů

Přechodné kovy mají nezastupitelnou úlohu v metabolismu všech živých buněk, zejména při nejrůznějších oxidačně-redukčních reakcích, díky tomu, že se mohou vyskytovat v různých oxidačních stavech. V živých organismech se vyvinul složitý systém regulace zahrnující procesy příjmu, transportu, uchovávání a vylučování těchto kovů. Podstatnou součástí tohoto systému je právě transport kovů přes biomembrány - ať už plasmatickou nebo membrány ohraničující vnitrobuněčné organely.



Železo, měď, mangan nebo zinek plní v metabolismu buněk mnoho funkcí. Železo a měď tvoří aktivní místa metaloenzymů katalyzujících přenos elektronů (např. plastocyaniny, stellacyaniny a cytochromy) probíhající například při dýchání a fotosyntéze, oxidační reakce či oxygenace (např. tyrosinasa, ceruloplasmin, katalasa, peroxidasa a cytochrom p-450). Jsou součástí látek přenášejících kyslík (např. hemoglobin). Přechodné kovy se rovněž účastní redoxních reakcí, které umožňují buňkám bránit se oxidativnímu stresu, např. superoxid dismutasa může obsahovat jako kofaktor železo, mangan či měď. Některé přechodné kovy, jako mangan, kobalt a zinek, se chovají jako Lewisovy kyseliny a tvoří aktivní místa enzymů katalyzujících hydrolytické reakce (např. peptidasa a fosfatasa obsahující zinek), hydratace, fosforylace (kinasa obsahující mangan) a karboxylační reakce (karboxylasa obsahující mangan). Zinek je kromě toho součástí enzymů účastnících se metabolismu DNA (3).

Dvojmocné kovové ionty mohou mít v živých organismech také nepříznivé účinky, ať už jde o nezbytné kovy jako železo a měď anebo například o kadmium. Mohou se účastnit reakcí vytvářejících volné radikály, vážou se na thiolové skupiny proteinů apod. (4).

Regulace metabolismu přechodných kovů je tedy pro živé organismy nezbytně důležitá. Selhání některého z článků systému příjmu, transportu a vylučování kovů má pro organismus závažné důsledky, což dokládají následující příklady. Dysfunkce proteinu Nramp2, který je zodpovědný za vstřebávání železa na apikální membráně buněk střevního epitelu, způsobuje anémii (5). Selhání regulačních mechanismů metabolismu železa způsobuje dědičnou chorobu hemochromatosu s řadou patologických příznaků spojených s nadměrným množstvím železa v organismu (6). S abnormálním příjmem železa souvisí i další nemoci, jako je aterosklerosa, Alzheimerova a Parkinsonova choroba (7).

## **2.4 Rodina membránových transportních proteinů Nramp**

Proteiny Nramp (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein), jiným označením SLC11 (**S**o**L**ute **C**arrier **11**), tvoří rodinu membránových transportních proteinů přenášejících dvojmocné kovové ionty ( $Me^{2+}$ ). Dle klasifikace TCDB (Transport Classification Database) představují skupinu transportních proteinů 2.A.55. Transportují poměrně širokou skupinu substrátů, např.  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  nebo  $Cd^{2+}$ . Substrátem tohoto transportéru nejsou ionty  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ . Jedná se o sekundárně aktivní transport, při němž je využíván elektrochemický gradient protonů, popřípadě i jiných iontů (8).

Transportéry Nramp se vyskytují v různých typech organismů od bakterií přes kvasinky, živočichy až po člověka.

## 2.4.1 Transportéry Nramp u savců

U savců a jiných čtyřnožců (např. žab a ptáků) byly identifikovány dva paralogní geny *Nramp1* a *Nramp*; dosud se je nepodařilo identifikovat u ryb, které mají jednu nebo více kopií genu sekvenčně podobného *Nramp2* (8).

Protein Nramp2 (SLC11A2, DMT1, DCT1) zprostředkovává absorpci železa a ostatních  $Me^{2+}$  na buněčné membráně. Je exprimován na apikální membráně buněk epitelu dvanácterníku, kde je zodpovědný za transport železa přijatého potravou. Zároveň je také důležitou součástí systému příjmu železa v periferních tkáních – v membráně endosomů transportuje do cytoplasmy železo, které se uvolní vlivem nízkého pH z transferrinu. Výskyt proteinu Nramp2 byl zjištěn také v ledvinách. (5, 9).

Druhý paralogní protein – Nramp1 (alias SLC11A1) je exprimován na fagosomální membráně vyzrálých profesionálních fagocytů, kde zajišťuje obranu organismu odčerpáváním dvojmocných kovových iontů ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) z fagocytické vakuoly obsahující bakterie. Pro bakterie jsou tyto ionty přechodných kovů životně důležité a snížení jejich dostupnosti limituje jejich přežití a dělení (8, 10). Funkce Nramp1 je komplementární k funkci systému enzymů, které produkují aktivní formy kyslíku a vystavují mikroby oxidativnímu stresu (11), neboť železo a mangan jsou mimo jiné kofaktory enzymů, které pomáhají bakteriím bránit se právě před oxidativním stresem. Součástí imunitní odezvy na infekci vnitrobuněčnými parazity je pravděpodobně „soutěž“ o dvojmocné kovové ionty mezi transportními proteiny Nramp1 fagocytu a MntH transportéry bakterií (taktéž z rodiny Nramp).

Fyziologický význam membránových transportních proteinů Nramp podtrhuje i spojitost některých chorob s polymorfismy genů *Nramp*. Mutace pozměňující funkční expresi Nramp2 byly nalezeny u pacientů trpících těžkými formami narušení homeostáze železa, jako je např. mikrocytární anemie (12, 13). Genetické studie na krysích a myších modelech ukazují, že exprese funkčního proteinu Nramp2 nad určitou kritickou mez je naprosto nezbytná pro přežití organismu (5, 14-17). Mutace v genu *Nramp1* u myší způsobuje náchylnost k infekci intracelulárními parazity (18), zejména k mykobakteriálním infekcím (19-22). Funkce transportéru Nramp1 může souviset s některými autoimunitními chorobami (8).

## 2.4.2 Transportéry Smf v kvasinkách

V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytují tři proteiny typu Nramp: Smf1p, Smf2p a Smf3p. První z nich transportuje mangan na úrovni plasmatické membrány, druhý umožňuje příjem manganu z váčků vzniklých při endocytóze (23, 24). Smf3p je exprimovaný na membráně vakuoly a zprostředkovává uvolnění zásob železa (25). Vzhledem k tomu, že umožňují heterologní expresi, jsou kvasinky oblíbeným modelovým systémem pro studium transportérů Nramp z různých organismů. Funkční exprese proteinu Nramp studovaného organismu v kvasinkovém kmenu s nefunkčními *Smf* geny, který kvůli nefunkčním *Smf* genům není schopen růstu v přítomnosti chelátorů, způsobí v přítomnosti chelátorů komplementaci (23).

## 2.4.3 Bakteriální transportní proteiny MntH

Předpokládá se, že proteiny Nramp vznikly v prokaryotních organismech. Funkční homology pojmenované MntH (**M**anganese **P**roton-**d**e**p**endent **T**ransporter) byly popsány jak v gram-positivních, tak v gram-negativních bakteriích (26-29), což naznačuje možnost genového přenosu z endosymbiotické organely bakteriálního původu do eukaryotního jádra.

Fyziologickým substrátem bakteriálních transportérů je zřejmě především mangan. Funkce těchto transportérů může souviset s patogenitou některých mikroorganismů (30).

Bakteriální transportní proteiny MntH vykazují neočekávanou rozmanitost sekvencí. Analýza sekvencí MntH odhalila existenci tří základních fylogenetických skupin: MntH A, B a C, což je známkou evolučních změn v rámci této rodiny. Výsledky sekvenční analýzy naznačují i možnost horizontálního přenosu genů *Nramp* z eukaryot na prokaryota (31, 32).

Sekvence proteinů MntH A, mezi něž patří i transportér bakterie *E. coli*, je velmi blízká sekvenci bakteriálního „předka“, z nějž se pravděpodobně vyvinuly eukaryotní transportní proteiny této rodiny (31). Transportní protein MntH bakterie *E. coli* představuje tedy atraktivní prototypický model proteinů Nramp, který je možno využít ke studiu mechanismu transportu v rámci této konzervované rodiny (33).

## 2.5 Transportér MntH bakterie *E. coli* (EcoliA)

Transportní protein EcoliA byl identifikován a popsán v roce 2000 jako transportér dvojmocných kovových kationtů s širokou substrátovou specificitou transportující  $Mn^{2+}$ ,

$\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  (28), následně byla určena jeho transmembránová topologie (33) a byly provedeny první studie vztahu mezi jeho strukturou a funkcí (34, 35).

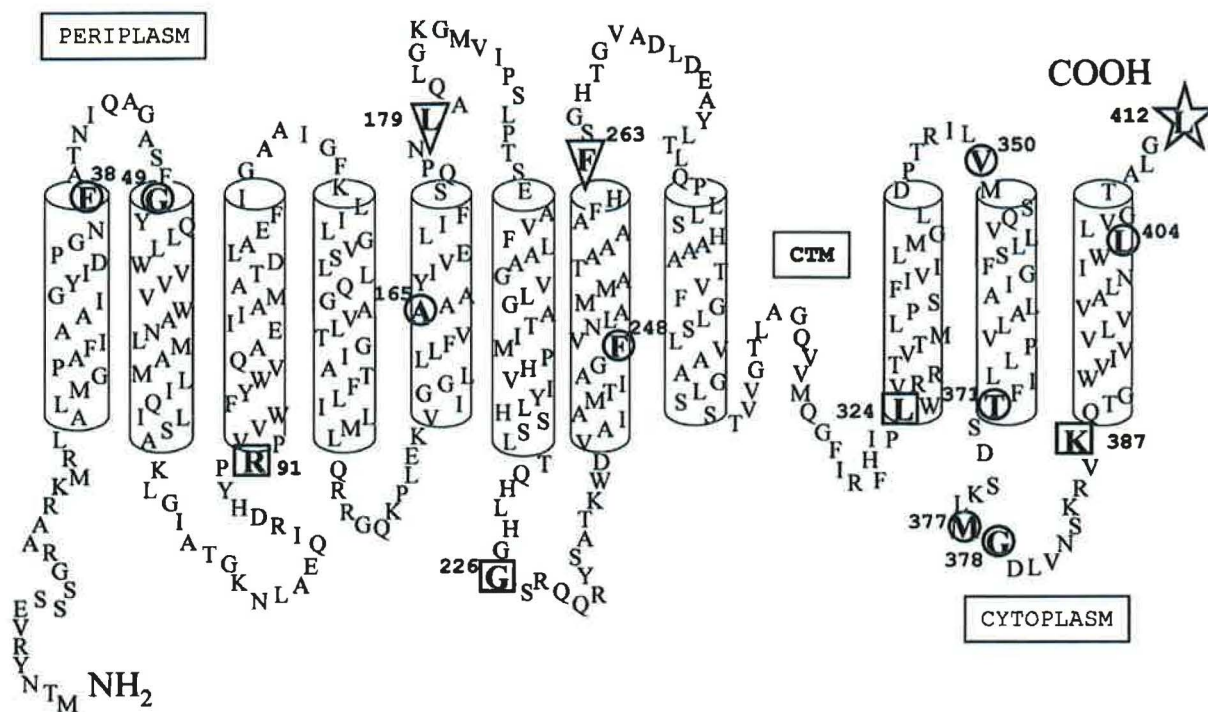
Transportér MntH se nachází v plasmatické membráně *E. coli*, vnější membrána této bakterie je pro ionty a malé molekuly propustná. Transmembránová topologie MntH byla zkoumána kombinací výpočetních a experimentálních metod. Výpočetními metodami založenými na několika různých vzájemně komplementárních přístupech (36-39) byla předpovězena konsensní transmembránová topologie MntH (viz obrázek 2) s N-koncem proteinu umístěným v cytoplasmě, 11 transmembránovými doménami a C-koncem umístěným v periplasmě (33), která je ve velmi dobré shodě s transmembránovou topologií eukaryotních proteinů Nramp (40).

Výsledné konstrukty fúze *mntH* s geny pro  $\beta$ -laktamasu resp. chloramfenikolacetyltransferasu, jakožto spolehlivými ukazateli periplasmatického respektive cytoplasmatického umístění, byly následně použity k experimentálnímu ověření validity takto získaného modelu transmembránové topologie MntH (33). Aktivita těchto enzymů závisí na tom, na které straně membrány se enzym nachází, a tudíž lze podle aktivity příslušných fúzních proteinů určit orientaci jednotlivých transmembránových domén zkoumaného proteinu. Sekrece  $\beta$ -laktamasy způsobuje rezistenci na ampicillin výhradně v periplasmě, zatímco chloramfenikolacetyltransferasa způsobuje rezistenci na chloramfenikol v cytoplasmě (41, 42).

Bylo zjištěno, že transmembránová topologie EcoliA je zřejmě společná jak pro eukaryotní, tak pro prokaryotní proteiny z rodiny Nramp. N-konec se nachází na vnitřní straně membrány, následuje 11 či 12 transmembránových domén, C-konec je potom v závislosti na počtu transmembránových domén umístěn buď v cytoplasmě nebo vně buňky (33).

Další dvě práce (34, 35) se v návaznosti na určení transmembránové topologie transportéru MntH bakterie *E. coli*, zabývaly sledováním vztahu mezi strukturou a funkcí tohoto proteinu pomocí studia proteinů MntH nesoucích specifické bodové mutace.

Haemig a Brooker (34) zkoumali ovlivnění transportu radioaktivního substrátu ( $^{54}\text{Mn}^{2+}$ ) mutací aminokyselin, které jsou invariantní v určité skupině bakteriálních MntH homologů. Ze zkoumaných aminokyselin se ukázaly pro transportní funkci proteinu nejdůležitější aminokyseliny na C-konci transmembránové domény 1 (Asp<sup>34</sup>, Gly<sup>36</sup>, Asn<sup>37</sup>) a v transmembránové doméně 3, zejména na jejím C-konci (Asp<sup>109</sup>, Glu<sup>112</sup>).



Obrázek 2: Transmembránová topologie transportéru MntH bakterie *E. coli* (33)

Ve druhé studii (35) provedli autoři podstatně cílenější výběr potenciálně klíčových residuí v sekvenci EcoliA; zaměřili se na mutace residuí, která jsou invariantní v celé rodině Nramp transportérů, ale odlišná a současně invariantní v tzv. „outgroup“ – tedy ve skupině proteinů, které jsou příbuzné proteinům Nramp (sekvence identické z cca 30%), ale nemají již stejnou transportní funkci. Aminokyselinová residua Asp<sup>34</sup>, Asn<sup>37</sup>, His<sup>211</sup> a Asn<sup>401</sup> v sekvenci EcoliA byla nahrazena odpovídajícími residui z „outgroup“ – Gly, Thr, Tyr a Gly, zároveň byly studovány další konzervativnější substituce. U všech mutantních proteinů byla zjišťována míra exprese na membráně a ovlivnění jejich transportní funkce v porovnání s transportérem divokého typu EcoliA několika vzájemně komplementárními metodami. Transport dvojmocných kovů byl sledován jednak nepřímo pomocí zónových testů, jednak přímo pomocí hmotnostní spektrometrie. Zároveň byly pomocí pHlorinu (zeleného fluorescenčního proteinu citlivého na pH) studovány změny vnitrobuněčného pH uvnitř buňky vyvolané přidáním substrátu MntH, byl tedy sledován ko-transport protonů a dvojmocných kovových iontů.

Tato studie potvrdila důležitost aminokyselin na C-konci 1. transmembránové domény. Mutant D34G vykazoval sníženou citlivost vůči kovům v porovnání s divokým typem a žádný transport protonů. Protein N37T byl méně stabilní v membráně, nevykazoval citlivost růstu při zónovém testu s manganem a transport protonů bylo možno sledovat pouze

při přidání vysoké koncentrace kadmia. Záměna His<sup>211</sup> za tyrosin z outgroup snížila citlivost transportéru ke kovům v zónových testech. Transport protonů byl pozorován pouze po přidání kadmia (zato s větší intenzitou než u divokého typu). Při mutaci H211A byly transportní funkce zachovány poněkud lépe. Pro porovnání, záměna jiného histidinu v transmembránové doméně 6 (H216R) zcela znemožnila transport protonů indukovaný Me<sup>2+</sup>. Mutace N401G v transmembránové doméně 11 vedla k podobné citlivosti ke kovům jako u divokého typu (navíc byla zvýšená citlivost k manganu), zvýšenému transportu protonů indukovanému kadmiem a naopak sníženému transportu protonů indukovanému jinými kovy (tento jev bylo možno zeslabit zvýšením vnějšího pH). Hmotnostní spektroskopii byl u tohoto mutantu oproti divokému typu detekován zvýšený příjem kadmia i manganu. Při záměně Asn<sup>401</sup> za threonin, což je změna konzervativnější, se mutant choval podobně jako mutant N401G. To znamená, že pro transportní funkci je pravděpodobně nezbytný přímo asparagin.

Uvedená studie ukázala, že residua Asn<sup>37</sup> a His<sup>211</sup> mají roli jak strukturní, tak funkční, přičemž pravděpodobně přímo interagují s dvojmocnými kovovými ionty. Získaná data rovněž demonstrují důležitost Asp<sup>34</sup> a dvou histidinových residuí v šesté transmembránové doméně (His<sup>211</sup> a His<sup>216</sup>) pro transportní funkci. Asn<sup>401</sup> a jedenáctá transmembránová doména obecně hrají důležitou roli pro transport protonů proteinem MntH indukovaný dvojmocnými kovovými ionty (35). Data získaná studiem prokaryotního MntH bakterie *E. coli* jsou ve velmi dobrém souladu s poznatky získanými o eukaryotním transportním proteinu Nramp2, které demonstrují důležitost první a šesté transmembránové domény pro jeho správnou funkci (5, 43).

## **2.6 Experimentální metody vhodné pro studium funkce transportních proteinů Nramp**

V současné době existuje poměrně široká škála metod umožňujících studium funkce transportních proteinů z rodiny Nramp, mezi něž patří například elektrofyziologické metody, studium komplementace u kvasinek s deletovanými *Smf* geny, transport radioaktivně značeného substrátu a v neposlední řadě i použití fluorescenčních sond citlivých na dvojmocné kovové ionty.

1. Elektrofyziologickými metodami studia funkce proteinů Nramp (44) je možné sledovat elektrické proudy přes plasmatickou membránu vyvolané transportem iontů ve vhodném modelovém organismu. Jako model jsou často používána vajíčka

- drápatky *Xenopus laevis*, která exprimují studované transportní proteiny. Jsou výhodná pro svoji velikost a nutriční soběstačnost - na jejich membráně je jen málo transportních systémů (9).
2. Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s deletovanými geny pro transportéry Smf (25, 45), patřícími rovněž do rodiny Nramp transportérů, nejsou schopny růstu na zásaditém médiu v přítomnosti chelátorů dvojmocných kovových iontů (23). Funkční exprese studovaného proteinu Nramp způsobí komplementaci. Rozsah obnovení růstu kvasinek za těchto podmínek je možno ztotožnit s mírou funkčnosti zkoumaného proteinu.
  3. Transport iontů lze sledovat přímo, pokud použijeme radioaktivně značený substrát, např.  $^{55}\text{Fe}^{2+}$  nebo  $^{54}\text{Mn}^{2+}$  (46), následně buněčnou kulturu rychle zcentrifugujeme či zfiltrujeme a posléze provedeme kvantifikaci množství substrátu akumulovaného uvnitř buněk. Tato metoda na rozdíl od použití fluorescenčních sond citlivých na dvojmocné ionty neumožňuje sledování kinetiky transportu v reálném čase.
  4. Další metoda pro sledování transportu dvojmocných kovů, která má oproti použití radioaktivně značeného substrátu nesporné výhody, spočívá v použití fluorescenčního barviva citlivého na koncentraci dvojmocných kovových iontů (46). Barviva calcein a fura-2 reagují na jejich přítomnost zhasením fluorescence nebo změnou excitačního spektra (47).

Výše popsané metody byly s úspěchem použity v celé řadě studií - např. (5, 44, 48) - pro studium funkce eukaryotních transportních proteinů z rodiny Nramp. Použití těchto metod - zejména elektrofyziologických a fluorescenčních, které jsou schopny poskytnout detailnější informace o funkci daného transportéru - je však v případě prokaryotních transportérů z rodiny Nramp spojeno s podstatnými omezeními danými velikostí a strukturou bakteriálních buněk. Heterologní exprese prokaryotních MntH v eukaryotním modelovém organismu je extrémně obtížná, ne-li nemožná, zatímco bakteriální buněčný model je vzhledem k malým rozměrům pro elektrofyziologická měření nevhodný. Použití fluorescenčních sond v prokaryotních buňkách je komplikováno přítomností dalších povrchových struktur, jako je buněčná stěna či u gram-negativních bakterií vnější membrána, které ztěžují efektivní průnik fluorescenčních sond do cytosolu. Naproti tomu eukaryotní buňky je možno relativně snadno obarvit vhodnou fluorescenční sondou (fura-2, calcein), pokud použijeme acetoxymethylester příslušného fluorescenčního barviva (calcein-AM, fura-2-AM), který volně prochází přes

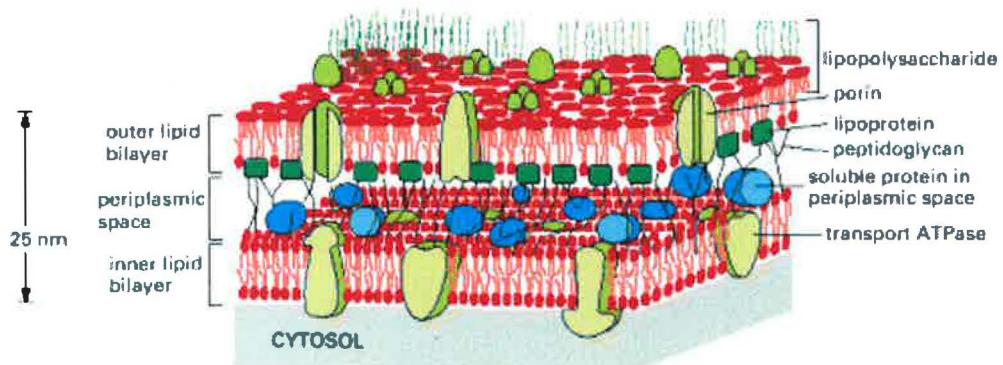
plasmatickou membránu; modifikující chemická skupina je následně uvnitř buňky odštěpena díky přítomnosti nesespecifických esterás (47).

Množství dostupných informací o eukaryotních transportérech Nramp podstatně převyšuje množství poznatků o prokaryotních MntH, jednou z příčin je bezesporu i nedostatek vhodných experimentálních metod. Jedním z cílů této práce bylo proto nalezení vhodné metody zajišťující průnik fluorescenčního barviva do gram-negativní bakterie *E. coli* a optimalizace použití této fluorescenční sondy pro charakterizaci transportní funkce MntH.

### 2.6.1 Metody vhodné ke studiu funkce proteinů MntH

Prvním testem funkčnosti transportního proteinu MntH jsou obvykle zónové testy. Na misku s pevným médiem, na kterém jsou rovnoměrně rozprostřené bakterie exprimující studovaný transportér, se umístí disk napuštěný roztokem soli testovaného dvojmocného kovu. Kolem disku se vytvoří zóna, ve které bakterie nenarostou kvůli toxickému účinku kovů. Její velikost závisí na tom, zda a do jaké míry je daný transportér funkční (33). V zónových testech lze také využít speciální kmeny bakterií, který při určité restriktivní teplotě není schopen růstu bez přidání dvojmocných kovů do média. Bylo zjištěno, že hyperexprese proteinu MntH může tuto vlastnost eliminovat (28).

Pro přímé sledování transportu dvojmocných kovů lze, podobně jako u eukaryot, použít radioizotopy, případně množství přetransportovaného substrátu určit pomocí hmotnostní spektroskopie po rychlém zfiltrování buněk (35). Použití fluorescenčních sond umožňuje na rozdíl od těchto metod sledování transportní funkce MntH v reálném čase, naráží však na problémy s průnikem fluorescenčního barviva do buněk.



Obrázek 3: Povrchové struktury bakterie *E. coli* (1)

Gram-negativní bakterie, mezi něž patří i *Escherichia coli*, mají totiž kromě vnitřní plasmatické membrány na povrchu buňky ještě vnější lipidovou membránu, jejíž vnější vrstva



je tvořena lipopolysacharidy a buněčnou stěnou, která se nachází mezi vnější a plasmatickou membránou a je tvořena vrstvou peptidoglykanu – viz obr. 3. Systém těchto povrchových struktur představuje mnohem složitější bariéru než jednoduchá plasmatická membrána eukaryotních buněk. Vnější membrána je díky pórům, které obsahuje, propustná pro ionty a látky o malé molekulové hmotnosti, ne však pro látky s vyšší molekulovou hmotností, jako jsou např. fluorescenční sondy. Další bariéru pro průnik fluorescenčních sond představuje peptidoglykan, který se nachází v mezimembránovém – periplasmatickém prostoru. Vybraná fluorescenční sonda vhodná pro detekci dvojmocných iontů (viz kap. 3.4, obr. 6) je navíc záporně nabitá, a tudíž neprochází membránou, která je hydrofobní, navíc by kvůli zápornému náboji musela jít proti směru membránového potenciálu. V literatuře byly dosud popsány pouze dvě metody (viz kap. 3.5-6) pro usnadnění průniku fluorescenčních barviv do bakteriálních buněk: elektroporace (49) a použití AM-formy příslušného barviva (50).

Fluorescenční metodou vhodnou ke sledování transportní aktivity MntH, která elegantním způsobem obchází nutnost dopravit fluorescenční barvivo do cytoplasmy, je použití geneticky kódované fluorescenční sondy – zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Jedná se o GFP citlivý na pH – pHluorin (51, 52), který může být použit pro sledování transportu protonů indukovaného dvojmocnými kovovými ionty, neboť MntH je symportérem protonů a dvojmocných kovových iontů (33, 35).

## **3 Experimentální metody a materiál**

### **3.1 Seznam použitých roztoků**

- **Luria-Bertani médium pro pěstování bakterií (tzv. LB médium)**
  - 10 g Bacto-trypton, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl v 1 l destilované vody
- **antibiotika**
  - spektinomycin 100  $\mu\text{g/ml}$  (finální koncentrace v médiu)
  - kanamycin 30  $\mu\text{g/ml}$
  - ampicillin 100  $\mu\text{g/ml}$
- **L-arabinóza**
  - finální koncentrace 0,06 %
- **elektroporační pufr**
  - 1 mM HEPES, 10 % glycerol, pH 7,2
- **citrát-fosfátové pufr pro fluorescenční měření pH 6-8**
  - směs 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- **citrát-fosfátové pufr pro fluorescenční měření pH 4,7-5,5**
  - směs 25 mM kyseliny citrónové a 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_{4a}$
- **pufr A**
  - 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 se 100 mM KCl a 1 mM  $\text{MgSO}_4$
- **0,12 M Tris/HCl pH 8,0**
- **0,01 M fosfátový pufr pH 7**
  - směs 0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- **fluorescenční sonda fura-2**
  - 1 mM zásobní roztok v destilované vodě nebo elektroporačním pufru
- **fluorescenční sonda fura-2-AM**
  - 1 mM zásobní roztok připravený v dimetylformamidu nebo dimetylsulfoxidu vždy čerstvě před měřením
- **kovy**

- různé koncentrace solí CdCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>
- **další použité látky**
  - EDTA, MgSO<sub>4</sub>, Pluronic F127, lysozym, hovězí sérový albumin (BSA)

## 3.2 Použité bakteriální kmeny

Veškerá měření byla prováděna na bakteriálních kmenech odvozených od mateřského kmene *E. coli* DH11S  $\Delta$ *mntH*, tzn. s vlastním MntH nefunkčním. Podle typu experimentu byly bakterie transformovány plasmidem pBAD nesoucím gen pro MntH divokého typu *E. coli*, případně s jednobodovými mutacemi, či prázdným plasmidem pBAD představujícím negativní kontrolu, dále plasmidem pGBM6-pHL (33) nesoucím gen kódující pHLuorin – viz tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled použitých kmenů *E. coli*

Kmen	pGBM6-pHL	<i>MntH</i> na pBAD	mutace MntH
<i>E. coli</i> s pHL	ano	ano	ne, divoký typ
pBAD s pHL	ano	ne	prázdný plasmid
D34G s pHL	ano	ano	Asp <sup>34</sup> → Gly
N37T s pHL	ano	ano	Asn <sup>37</sup> → Thr
H211Y s pHL	ano	ano	His <sup>211</sup> → Tyr
N250T s pHL	ano	ano	Asn <sup>250</sup> → Thr
N401T s pHL	ano	ano	Asn <sup>401</sup> → Thr
<i>E. coli</i> bez pHL	ne	ano	ne, divoký typ
pBAD bez pHL	ne	ne	prázdný plasmid

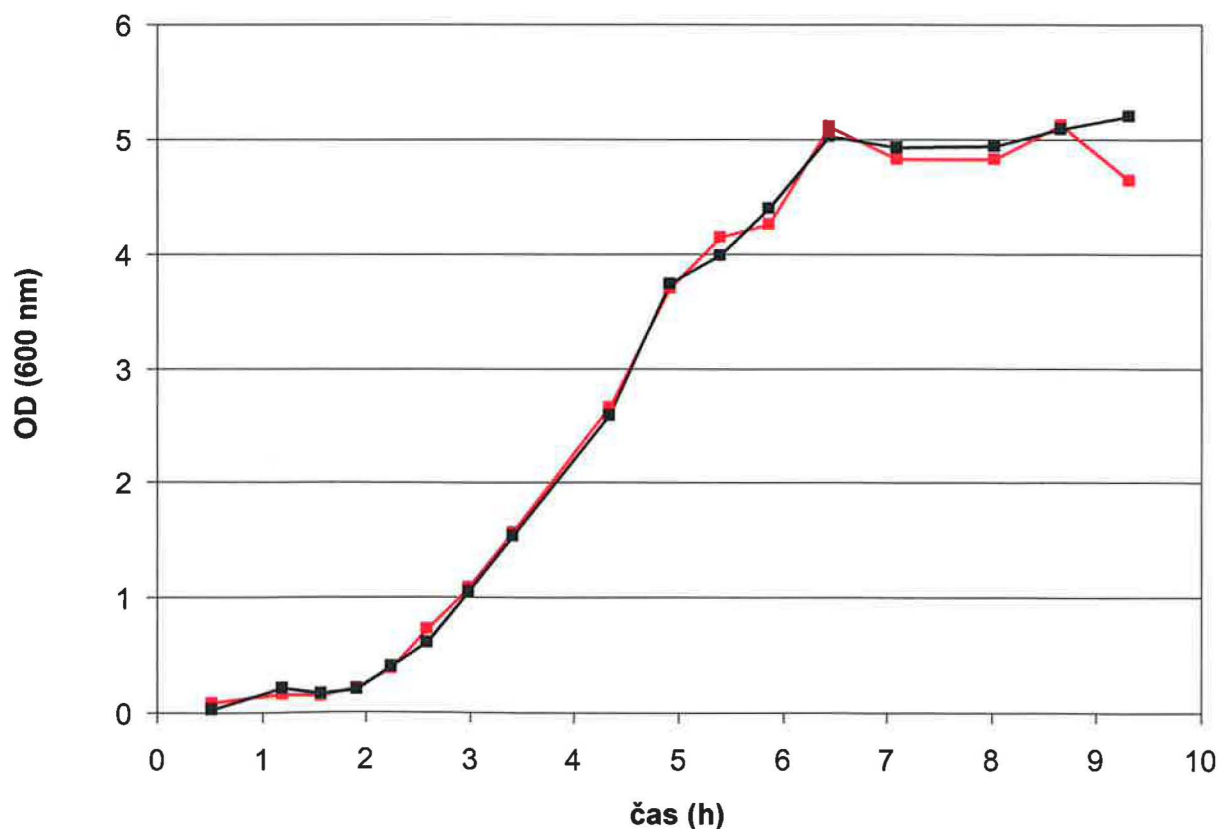
### 3.2.1 Pěstování bakterií

Při pěstování bakterií jsme používali sterilní materiál a pracovali výhradně sterilně. Bakterie byly zaočkovány z kolonie na pevném médiu a pěstovány přes noc v LB médiu. Do média byla přidána příslušná antibiotika (30 µg/ml kanamycin, 100 µg/ml ampicillin a 100 µg/ml spektinomycin), aby byly selektovány kmeny nesoucí příslušné plasmidy. Mateřský

kmen *E. coli* DH11S  $\Delta mntH$  je rezistentní vůči kanamycinu, geny pro resistenci na ampicillin se nacházejí na plasmidu pBAD, pro resistenci vůči spektinomycinu na plasmidu pGBM6-pHL. Bakteriální prekultura byla inkubována přes noc při 37°C a 250 rpm. Ráno byla kultura ve stacionární fázi přidána v poměru 1:100 do čerstvého média s příslušnými antibiotiky. Bakterie byly kultivovány 2 hodiny, poté byla přidána 0,06 % L-arabionóza, která indukuje expresi MntH proteinu. Po 1 hodině kultivace v přítomnosti arabinózy byly buňky sklizeny, tzn. vždy v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 3.2.2, obr. 4).

### 3.2.2 Stanovení růstové křivky

Při měření růstové křivky bakterií byla bakteriální prekultura připravena, jak je popsáno výše. Prekultura byla následně přidána do čerstvého média s antibiotiky v poměru 1:100. Bakteriální kultura byla kultivována při 37°C a 250 rpm, přičemž v určitých časových intervalech byl sterilně odebrán vzorek a stanovena jeho optická hustota. Optická hustota byla měřena na vlnové délce 600 nm absorpčním spektrometrem Novaspec III (Amersham Biosciences).



Obrázek 4: Růstová křivka bakterií *E. coli* (kmen EcoliA s pFluorinem) – 2 měření

Naměřili jsme pro ilustraci růstovou křivku *E. coli* pro jeden z kmenů (viz obr. 4), růstové křivky ostatních kmenů použitých v této práci se od této křivky prakticky neliší. Bakteriální kultura v době sklizně pro spektroskopická měření (po 3 hodinách růstu) je v raně exponenciální fázi, do stacionární fáze přechází asi po 6-7 hodinách růstu (viz obr. 4).

### 3.3 Fluorescenční měření

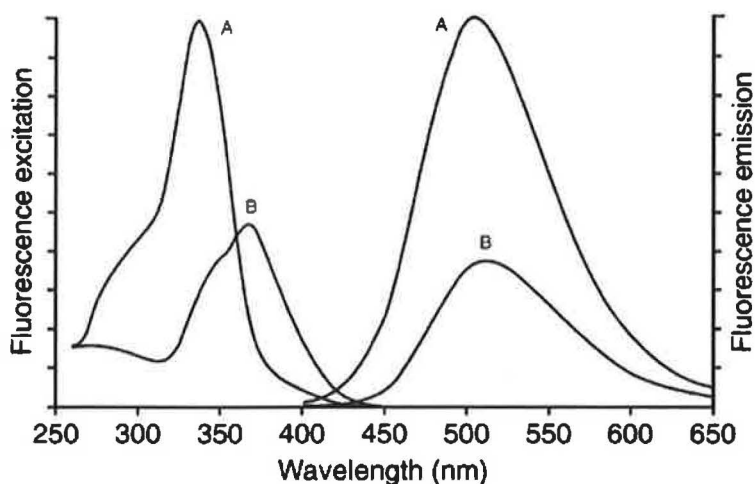
Fluorescenční měření byla prováděna na spektrofluorimetru FluoroMax-2 (Jobin-Yvon SPEX) vybaveném xenonovou lampou, jakožto zdrojem excitačního záření. Fluorescenční signál byl vždy korigován na spektrum vyzařování lampy. Excitační a emisní vlnové délky pro jednotlivé typy měření jsou uvedeny v tabulce č.2.

**Tabulka 2: Parametry fluorescenčních měření**

Typ měření	Signál		Excitace	Emise
Excitační spektrum fura-2			250 – 500 nm	510 nm
Poměrové měření fura-2	S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	340 nm	520 nm
		S <sub>2</sub>	380 nm	520 nm
Poměrové měření pHluorin	S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	410 nm	520 nm
		S <sub>2</sub>	470 nm	520 nm

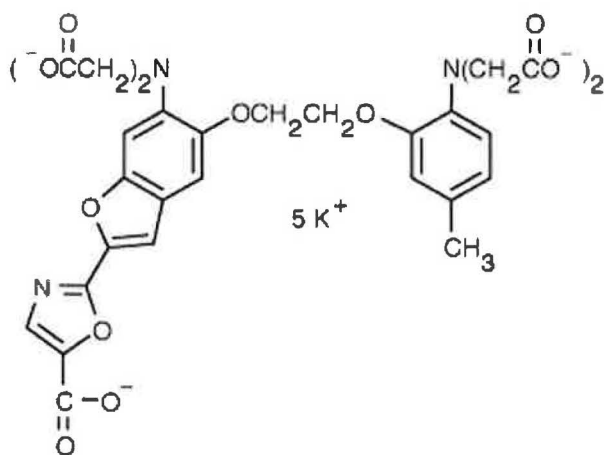
### 3.4 Fluorescenční sonda fura-2

Fura-2 je fluorescenční indikátor citlivý na přítomnost vápníku, který je možno excitovat v UV oblasti. Vzhledem k tomu, že při měření excitačních spekter umožňuje poměrové měření, neboť po navázání vápenatého iontu dochází k posuvu maxima absorpce směrem ke kratším vlnovým délkám (obr. 5), je poměrně široce využíván zejména ve fluorescenční mikroskopii.



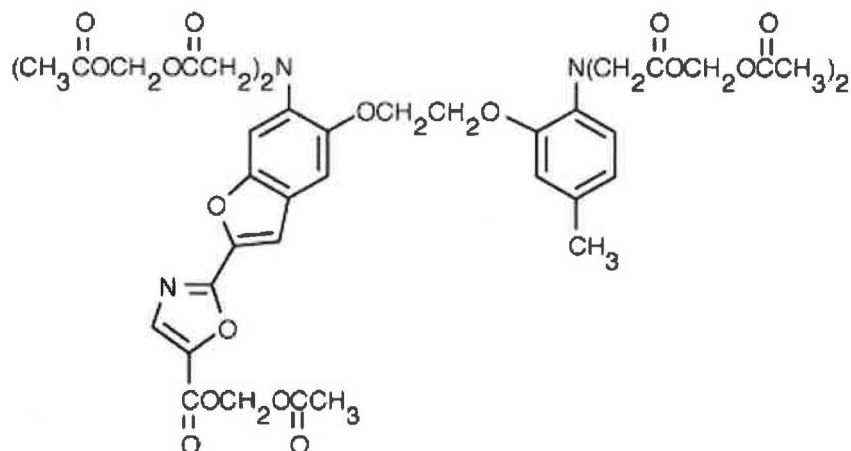
**Obrázek 5:** Excitační (emise na 510 nm) a emisní (excitace na 340 nm) spektrum fluorescenční sondy fura-2 saturované  $\text{Ca}^{2+}$  (A) a bez  $\text{Ca}^{2+}$  (B) v pufru pH 7,2 (47)

Fluorescenční sonda fura-2 (obr. 6) je pro vápník v porovnání s hořčíkem vysoce selektivní, nicméně váže jiné dvojmocné a trojmocné kationty se signifikantně vyšší afinitou, což umožňuje, aby byla použita pro měření jejich koncentrací. Ze spektroskopického hlediska některé ionty (např.  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Sr}^{2+}$ ) imitují efekt vápníku, zatímco jiné (např.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$ ) zhášejí fluorescenci této fluorescenční sondy (47). Pozorovatelný efekt širokého spektra dvojmocných iontů, který může být při měření intracelulárních koncentrací vápníku zdrojem nežádoucí interference, je pro účely monitorování funkce MntH naopak výhodou, neboť by měl umožnit sledování koncentrace všech iontů, které jsou substrátem tohoto transportního proteinu. Fluorescenční sonda fura-2 už byla ostatně použita ke sledování transportu kobaltu transportním proteinem Nramp2 v eukaryotních buňkách (5).



**Obrázek 6:** Fluorescenční sonda fura-2

Pro nabité látky, jako je i fluorescenční sonda fura-2, je plasmatická membrána buněk neprostupná, a proto se používá její chemické modifikace – esterifikace (obr. 7), která eliminuje náboj fluorescenční sondy, čímž umožní její efektivní průchod přes plasmatickou membránu. Acetoxymethylesterové skupiny navázané na karboxyly fluorescenční sondy jsou po průchodu membránou uvnitř buňky rozštěpeny nescifickými esterasami, čímž uvolní aktivní formu fluorescenční sondy. Modifikovaná forma fura-2-AM (obr. 7) sice vykazuje fluorescenci, jejíž spektrum je vůči volné fura-2 posunuté, ale na rozdíl od volné aktivní formy fura-2 na dvojmocné ionty změnou spektra nereaguje.



Obrázek 7: Fura-2-AM

### 3.4.1 Měření fluorescenční odezvy fura-2 na $\text{Me}^{2+}$ v roztoku

Základní charakterizace fluorescenční odezvy fura-2 na jednotlivé dvojmocné kovové ionty byla provedena v citrát-fosfátovém pufru pH 4,7 s 1  $\mu\text{M}$  fura-2. Během titrace dvojmocnými kovy ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  nebo  $\text{Fe}^{2+}$ ) byla měřena excitační spektra po jednotlivých koncentračních krocích. Veškeré testované ionty byly přidávány s výjimkou železa ve formě chloridové soli. Zásobní roztok  $\text{FeSO}_4$  byl připraven vždy bezprostředně před měřením, aby železo nezoxidovalo.

## 3.5 Elektroporace

Elektroporace je fyzikální metodou, při níž vlivem elektrického pole dochází k přechodné permeabilizaci biologických membrán. V membráně buněk, na než jsou aplikovány krátké pulsy silného elektrického pole, se vytvoří přechodné póry, které umožní

průchod látek, pro něž je jinak membrána nepropustná, z vnějšího prostředí do buňky. Elektroporace je postupem běžně používaným při genetické transformaci buněk.

Tisa a Adler (49) použili elektroporaci k obarvení bakterií *E. coli* barvivem fura-2, pomocí něhož sledovali změny vnitrobuněčné koncentrace vápníku při chemotaxi. Buňky promyli v elektroporačním pufru (1mM Hepes, pH 7,2, 10% glycerol) a resuspendovali v tomtéž pufru na OD<sub>590</sub> (optickou hustotu při 590 nm) 2-6. Buňky uchovávali na ledě. Fura-2 (25-100 μM) byla přidána k 200 μl suspensi buněk. Aplikovali jeden puls elektrického pole o kapacitě 25 μF a intenzitě 5 kV/cm při 200 Ω p dobu 4-6 ms. Koncentrace barviva uvnitř buněk po elektroporaci byla údajně podobná jako vnější koncentrace. Poté byly bakterie inkubovány 15 minut v použitém přefiltrovaném médiu. Werthén a Lundgren (53) aplikovali podobný postup na bakterie *Serratia liquefaciens*.

Příprava buněk pro elektroporaci v našich experimentech v zásadě kopírovala jediný původní dosud publikovaný protokol (49). Elektroporace byla prováděna sérií vysokonapěťových pulsů na zařízení, které již dříve popsal Večeř a kol. (54). Bakterie (18 ml) byly zcentrifugovány, dvakrát promyty v elektroporačním pufru a resuspendovány ve 400 μl elektroporačního pufru. Do elektroporačních kyvet (vzdálenost elektrod 2 mm) jsme napipetovali 50 μl bakterií a 50 μl 1 mM fura-2. Po elektroporaci byly bakterie resuspendovány v 0,5 ml původního použitého média a inkubovány 20 minut při 37 °C a 250 rpm. Následně jsme suspensi zcentrifugovali, promyli bakterie dvakrát v citrát-fosfátovém pufru pH 4,7 a resuspendovali v tomtéž pufru na optickou hustotu 0,2, čímž byly vzorky připraveny k fluorescenčnímu měření.

### **3.6 Barvení bakterií *E. coli* fluorescenční sondou fura-2-AM**

Barvení bakterií *Escherichia coli* látkou fura-2-AM popsali Gangola a Rosen (50). Bakterie inkubovali s trishydroxymethylaminomethanem (Tris) a EDTA, které permeabilizují vnější membránu gram-negativních bakterií tím, že odstraňují dvojmocné ionty (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), které stabilizují lipopolysacharidovou vrstvu (55). Buňky ve stacionární fázi (100 ml) byly zcentrifugovány, promyty v 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 se 100 mM KCl a 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pufr A) a resuspendovány v 3 ml 0,12 M Tris-HCl, pH 8,0. Suspenze byla přidána do 50 ml teplého (37°C) roztoku 0,12 M Tris-HCl, pH 8,0 s 0,2 mM EDTA a inkubována 2 min při 37°C. Pak byla reakce zastavena přidáním 1mM MgCl<sub>2</sub>. Buňky byly zcentrifugovány, promyty v pufru A, resuspendovány ve 2 ml pufru A a inkubovány s 5 μM fura-2-AM při



37°C, poté promyty v pufru A. Při inkubaci s fura-2-AM 2 hodiny byla intenzita fluorescence dostatečná a všechna fura-2-AM byla hydrolyzována. Její koncentrace v buňkách byla 70 - 95  $\mu\text{M}$ .

Různými experimentálními podmínkami pro barvení bakterie *Selenomonas ruminantium* látkou fura-2-AM se zabývali Nakamura a kol.(56). Zjistili, že na obarvení neměla dostačující vliv ani permeabilizace pomocí EDTA, ani lysozymem. Nepomohlo ani použití emulgátoru Pluronic F127, který zvyšuje rozpustnost acetoxymetylesteru v inkubačním médiu při použití u eukaryotních buněk, ani použití BSA (hovězí sérový albumin). Uspokojivého výsledku se jim podařilo dosáhnout až kombinací Pluronic F127, BSA a EDTA. Stacionární kultura bakterií byla promyta a resuspendována v pufru A (složení viz výše). Buňky byly inkubovány 120 minut s 50  $\mu\text{M}$  EDTA. Fura-2-AM byla promíchána s Pluronic F127 a přidána do inkubačního média s 2 % BSA na finální koncentraci 5  $\mu\text{M}$  fura-2-AM a 0,02% Pluronic F127. Po dalších 120 minutách byly buňky promyty v pufru A. Tato doba stačila na hydrolýzu acetoxymetylesteru sondy fura-2.

Pro náš experiment jsme použili protokol (50) modifikovaný přidáním Pluronicu F127 a BSA (56). 50 ml bakteriální kultury jsme zcentrifugovali, dvakrát promyli v 50 ml pufru A a resuspendovali v 1,5 ml 0,12 M Tris. Suspensi jsme přidali do 0,12 M Tris s 1 mM EDTA ohřátého na 37°C. Buňky jsme inkubovali 5 minut při 37°C a 250 rpm. Přidali jsme 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , bakterie jsme zcentrifugovali, promyli ve 25 ml pufru A a resuspendovali ve 2 ml pufru A s 2 % BSA. K 1 ml buněk jsme přidali 5  $\mu\text{l}$  4 % Pluronic F127 a 5  $\mu\text{l}$ , respektive 25  $\mu\text{l}$  1 mM sondy fura-2-AM rozpuštěné v dimethylformamidu (finální koncentrace 5  $\mu\text{M}$  fura-2-AM, respektive 25  $\mu\text{M}$  fura-2-AM a 0,02 % Pluronic F127) a směs inkubovali 100 min. Suspensi jsme promíchali s pufrem A a zcentrifugovali ji, poté dvakrát promyli v citrát-fosfátovém pufru pH 4,7. V tomtéž pufru jsme resuspendovali buňky na OD 0,2 pro fluorescenční měření.

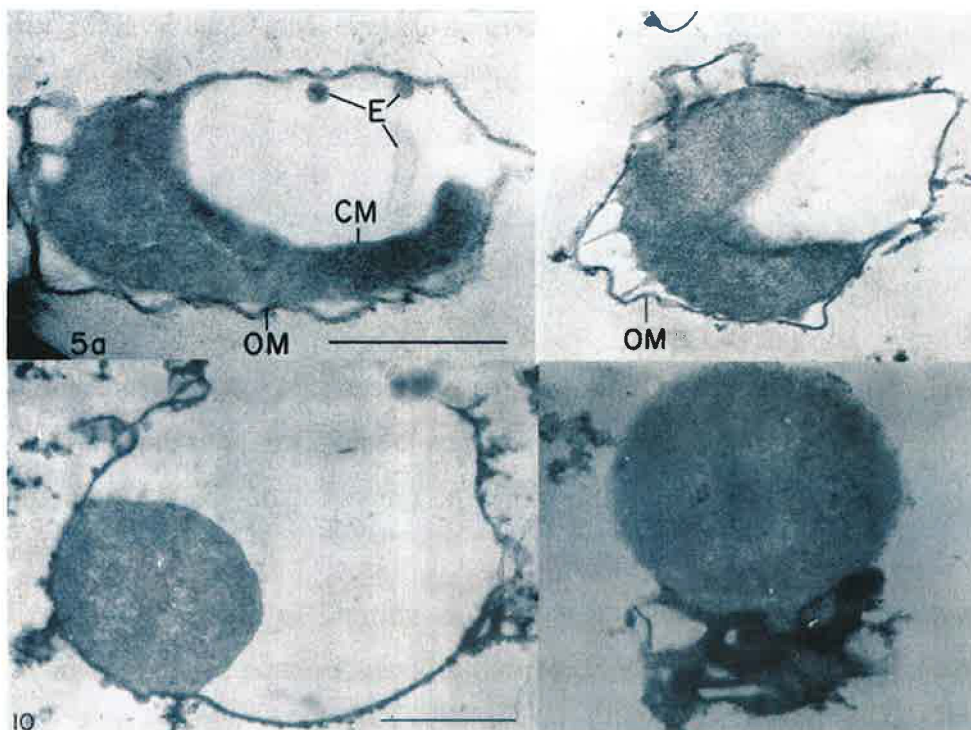
### **3.7 Příprava sféroplastů a jejich barvení fura-2-AM**

Jednou z možností, jak se vyrovnat s barvením gram-negativních bakterií, které mají složité povrchové struktury, je použití jejich sféroplastů. Sféroplasty jsou buňky pouze s vnitřní membránou, mají sférický tvar a jsou citlivé k osmotickému šoku.

Birdsell a Cota-Robles (57) detailně popsali tvorbu sféroplastů bakterie *E. coli*. Buňky v různých fázích sledovali elektronovým mikroskopem a světelným mikroskopem s fázovým

kontrastem. Nejprve buňky promyli a resuspendovali v 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0 s 0,5 M sacharózou ( $5 \cdot 10^8$  buněk na ml). Byl přidán lysozym na finální koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  a buňky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 až 10 minut, poté naředěny 1:1 pufrem Tris. K suspensi byla přidána EDTA na finální koncentraci 1 mM. Po 10 – 15 minutách bylo dokončeno formování sféroplastů.

Inkubace buněk s 0,5 M sacharózou způsobí plasmolýzu. Přidaný lysozym narušuje peptidoglykanovou vrstvu. Buňky po tomto zásahu byly osmoticky citlivé. Cytoplasma měla srpkovitý tvar, vznikla velká plasmolytická vakuola. Vnější membrána si zachovala tvar před plasmolýzou – buňky měly stále tyčinkovitý tvar – viz obr. 8A, B. Na to, aby buňka získala sférický tvar, bylo nutné zmenšit koncentraci sacharózy (naředění pufrem 1:1). Po přidání EDTA se narušila vnější membrána (obr. 8C) a vznikly sféroplasty ohraničené plasmatickou membránou se skroucenými zbytky vnější membrány (obr. 8D).



**Obrázek 8:** Tvorba sféroplastů - (A) bakterie po plasmolýze 0,5 M sacharózou, (B) po inkubaci s lysozymem, (C) a (D) po inkubaci s EDTA (57)

Tento postup s určitými modifikacemi aplikovali Sullivan a kol. (58) pro tvorbu sféroplastů, dále využitých pro zkoumání plasmatické membrány pomocí AFM (atomic force microscopy). Místo Tris-HCl použili fosfátový pufr, pH 7,0, lysozym použili v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a bakterie s ním inkubovali 1 - 2 hodiny, EDTA byla použita v koncentraci 10 mM. Po

vytvoření sféroplastů (určeno světelnou mikroskopií) byly buňky promyty ve fosfátovém pufru s 0,25 M sacharózou.

Při našich experimentech jsme zcentrifugovali 20 ml bakteriální kultury, promyli v 20 ml 0,01 M fosfátovém pufru pH 7,0 a resuspendovali v 10 ml téhož pufru s 0,5 M sacharózou. Přidali jsme lysozym na finální koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Inkubovali jsme 10 min při 37°C a 250 rpm. Suspensi jsme naředili 1:1 0,01 M fosfátovým puftrem bez sacharózy, přidali jsme EDTA na finální koncentraci 1 mM a inkubovali 10 minut při pokojové teplotě. K sféroplastům jsme přidali 0,5 – 5  $\mu\text{M}$  sondu fura-2-AM rozpuštěnou v dimetylsulfoxidu a inkubovali 15-20 min při 37°C a 250 rpm. Sféroplasty jsme stočili, promyli v 50 mM citrát-fosfátovém pufru s 0,25 sacharózou a resuspendovali v tomtéž roztoku na OD 0,2 pro fluorescenční měření.

Pro kontrolní měření bez fura-2-AM s bakteriemi s pHLuorinem jsme bakterie po inkubaci s EDTA zkontrolovali pod mikroskopem, pak jsme suspensi zcentrifugovali, sféroplasty promyli v 50 mM citrát-fosfátovém pufru s 0,25 sacharózou a připravili pro fluorescenční měření transportu protonů, jak je uvedeno níže.

### **3.8 Měření transportu protonů proteinem MntH indukovaného $\text{Me}^{2+}$**

Vzhledem k tomu, že transportní protein MntH transportuje společně dvojmocné kovové ionty a protony, lze pomocí změn vnitrobuněčného pH indukovaného přidáním kovového substrátu ke studovanému systému přímo charakterizovat transportní funkci studovaného MntH (33, 35).

Excitační spektrum pHLuorinu se mění v závislosti na koncentraci protonů v jeho bezprostředním okolí - z poměru intenzity fluorescence při excitaci 410 nm a 470 nm (emise měřená na 520 nm) lze určit podle kalibrační křivky pH uvnitř buněk. Pro kalibraci fluorescenční odezvy pHLuorinu se používá kyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), který vyrovnává pH vně a uvnitř buněk (51, 52).

10 ml bakteriální kultury (kmen s plasmidem pro pHLuorin) jsme zcentrifugovali a dvakrát promyli v 10 ml citrát-fosfátovém pufru pH 5,0 ohřátého/ochlazeného přibližně na teplotu, při které jsme chtěli sledovat transport. Bakterie jsme resuspendovali v tomtéž pufru a nastavili na optickou hustotu 0,2 při 600 nm. Kyvety se suspensí bakterií jsme vložili do termostatu a nechali vytemperovat. Měřili jsme poměr intenzit fluorescence při excitaci 410 a

470 nm na počátku měření a pak v závislosti na čase po přidání dvojmocného kovu. Kyvety byly udržovány na konstantní teplotě jak ve spektrometru, kde byly omývané vodou z termostatu, tak mezi jednotlivými měřeními, kdy byly umístěny v nádobce termostatu. Z poměru intenzit jsme podle kalibrační přímky [1] určili pH uvnitř buněk.

$$\text{pH} = 1,689 \cdot R_{410/470} + 5,649 \quad [1]$$

Z rozdílu pH před přidáním kovu a v daných časových intervalech po přidání kovu jsme vypočítali změnu koncentrace protonů v nM [2].

$$\Delta[\text{H}^+](\text{nM}) = (10^{-\text{pH}} - 10^{-\text{pH}_0}) \cdot 10^9 \quad [2]$$

### **3.8.1 Popis transportu pomocí rovnice Michaelise a Mentenové**

Na transport přes membránu membránovým proteinem je možné se dívat jako na reakci katalyzovanou enzymem. Substrátem v této reakci je přenášená látka na jedné straně membrány, produktem je tato látka na straně druhé. Proto můžeme transport popsat rovnicí Michaelise a Mentenové [3] a určit konstanty  $V_{\text{max}}$  a  $K_m$  (59).

$$v = \frac{V_{\text{max}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad [3]$$

V případě, kdy sledujeme tok protonů přes membránu indukovaný dvojmocným kovem, vystupuje v této rovnici jako koncentrace substrátu koncentrace dvojmocného kovu v suspensi buněk a jako rychlost reakce změna koncentrace protonů uvnitř buňky v určitém čase po přidání kovu.

### **3.8.2 Arrheniova aktivační energie**

Transport můžeme charakterizovat také pomocí Arrheniovy aktivační energie, která vyjadřuje energetickou bariéru chemické reakce (v tomto případě transportu). Je možné ji určit z teplotní závislosti transportu podle rovnice [4] (60):

$$k_r = Ae^{-(\Delta E_a / RT)} \quad [4]$$

V našich experimentech jsme dosadili za rychlostní konstantu  $k_r$  reakce změnu koncentrace protonů uvnitř buňky v co možná nejkratším čase po přidání dvojmocného kovu.

Aktivační energii jsme určili z Arrheniova grafu - na ose x je reciproká hodnota teploty a na ose y logaritmus naměřené hodnoty změny koncentrace protonů - jako směrnici přímky proložené naměřenými body.

## 4 Výsledky a diskuse

Jak již bylo výše zmíněno, hlavním cílem této diplomové práce bylo studium transportní funkce bakteriálních sekundárně aktivních transportních proteinů MntH, které zprostředkovávají symport dvojmocných kovových iontů společně s protony. S ohledem na povahu transportu zprostředkovávaného MntH se dá k dané problematice přistoupit dvojím způsobem: sledovat přímo transport dvojmocných kovových iontů, nebo transport protonů indukovaný těmito ionty. Díky tomu má výsledková část této diplomové práce dvě části, jednu převážně metodologickou (kapitola 4.1), zabývající se vývojem a optimalizací fluorescenční metody pro sledování transportu dvojmocných kovových iontů, a druhou (kapitola 4.2), která používá již etablované metody pro sledování transportu protonů (33) pro získání poznatků o vztahu struktury a funkce transportních proteinů MntH.

### 4.1 Měření transportu $\text{Me}^{2+}$ in vivo

Pro sledování transportu  $\text{Me}^{2+}$  byla vybrána fluorescenční sonda fura-2, která má excitační spektrum citlivé na tyto dvojmocné ionty a která již byla s úspěchem použita pro sledování transportu kobaltu do eukaryotních buněk (46). Nicméně u bakterií bylo třeba překonat problém s jejich povrchovými strukturami - vnější membránou a buněčnou stěnou, které brání průniku sondy do buněk. Optimalizace fluorescenční metody pro měření transportu  $\text{Me}^{2+}$  měla tedy několik význačných etap. Nejprve bylo třeba podrobně proměřit fluorescenční odezvu sondy fura-2 na všechny dvojmocné kovové ionty, které jsou substrátem MntH, jelikož je známo, že fura-2 reaguje na přítomnost dvojmocných iontů dvěma odlišnými způsoby (viz kapitola 3.4). Následovalo hledání takové techniky, kterou by bylo možné dosáhnout obarvení cytosolu bakterií touto sondou dostatečného pro sledování transportu  $\text{Me}^{2+}$ . Dle dostupné literatury existují v zásadě pouze dvě metody: jednak elektroporační techniky (49, 54), jednak barvení buněk *E. coli* pomocí acetoxymetylesteru fluorescenční sondy fura-2-AM (50). Alternativně je možno uvažovat i o odstranění povrchových struktur bakterií *E. coli*, tzn. pokusit se barvit sféroplasty bakterií.

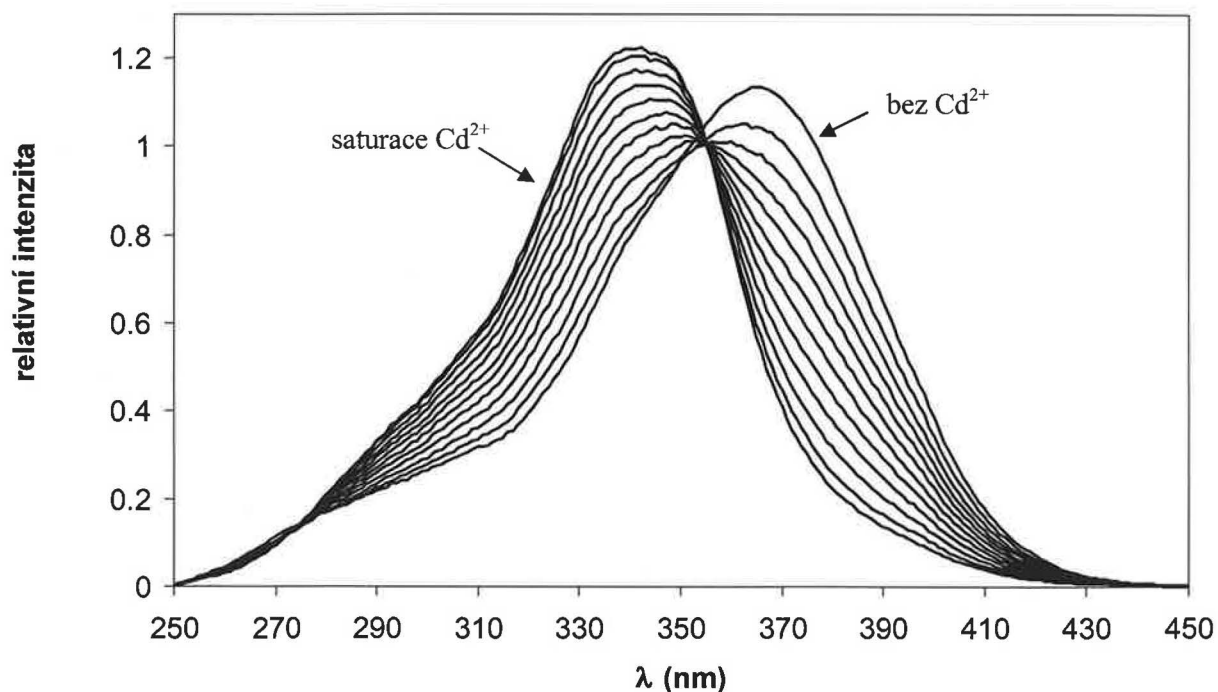
#### 4.1.1 Vliv $\text{Me}^{2+}$ na fluorescenční odezvu fura-2

Fluorescenční sonda fura-2 se používá především k detekci vápenatých iontů. V přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  se její excitační spektrum posouvá k nižším vlnovým délkám (viz obr. 5).

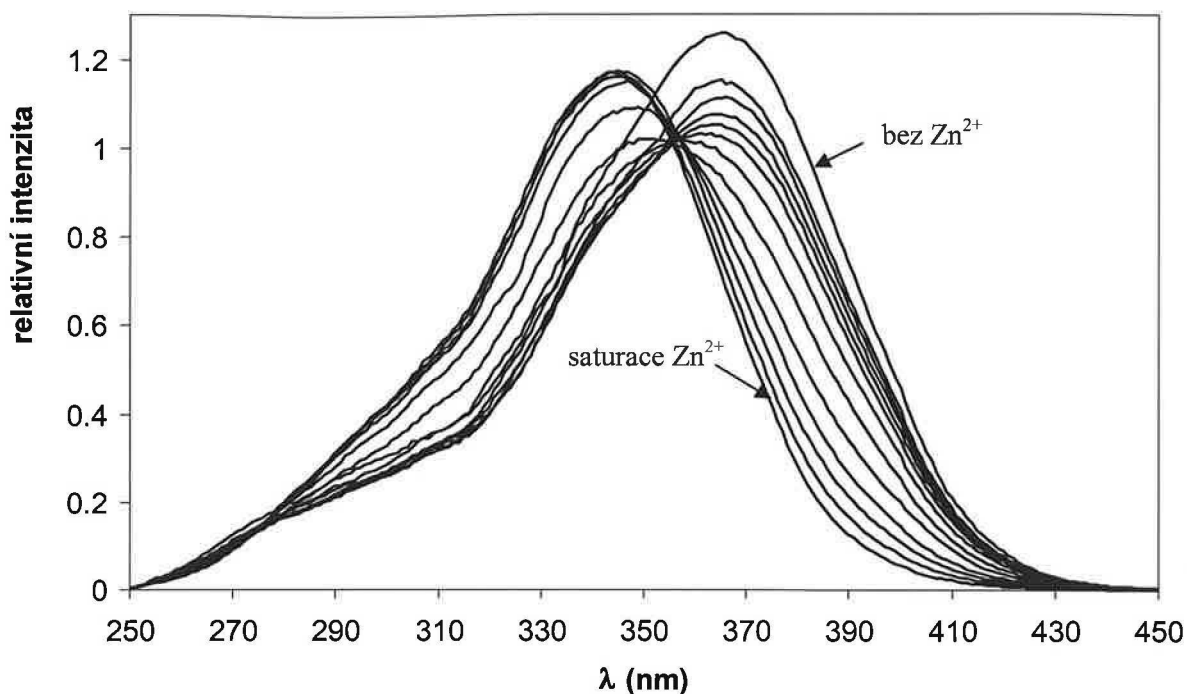
Ověřovali jsme, jak ovlivňují její fluorescenční spektrum jiné dvojmocné ionty, které jsou substráty transportního proteinu MntH ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ ).

Zjistili jsme, že v závislosti na koncentraci  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  se posouvá excitační spektrum fura-2 podobně jako u vápníku (viz obr. 9 a 10). Pro detekci těchto kovů je možné využít poměrové měření – poměr intenzity fluorescence při excitaci 340 nm, resp. 380 nm (viz. kapitola 3.3). Na rozdíl od efektu kadmia či zinku přítomnost  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  způsobuje zhášení fluorescence (viz obr. 11 - 13) a poměrového měření není tudíž možno využít.

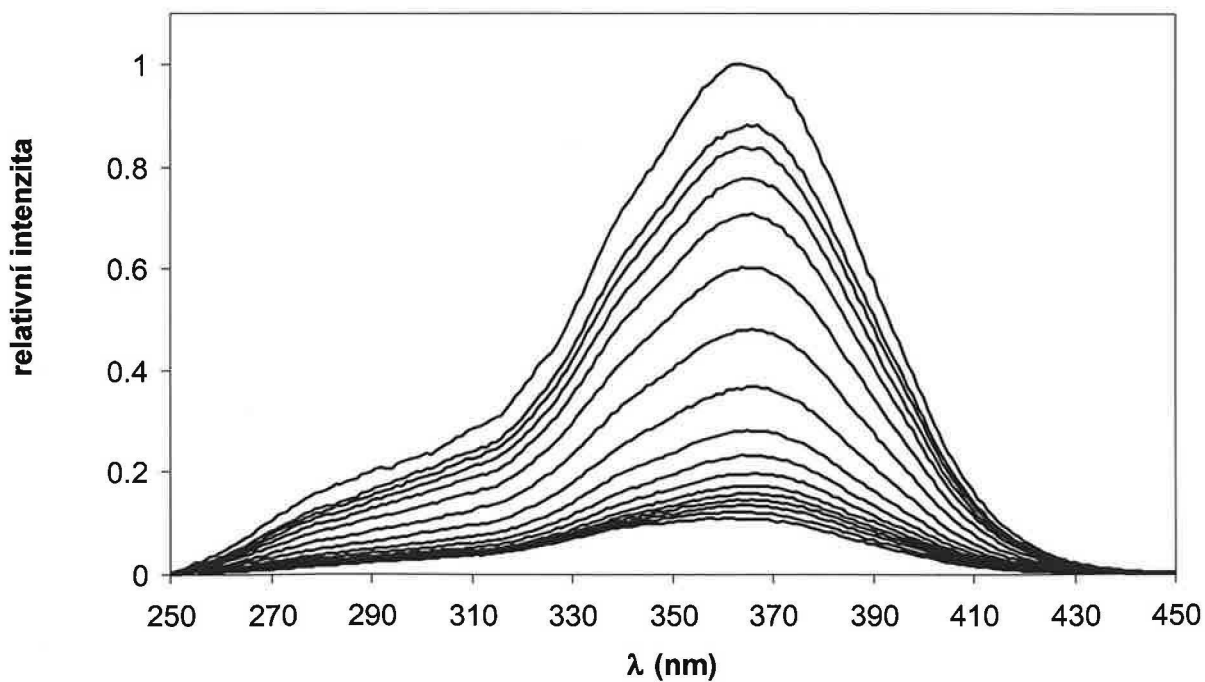
Proměřené odezvy fluorescenční sondy na jednotlivé dvojmocné kovové ionty v pufru jasně ukazují, že použití fura-2 pro měření koncentrace kadmia, zinku, kobaltu, železa a manganu, a tedy i pro sledování zvyšování jejich koncentrace způsobené vlivem transportní funkce proteinu MntH, by mělo být v principu možné. Z dat zjištěných titrací fura-2 jednotlivými dvojmocnými kovovými ionty rovněž vyplývá, že kalibrační křivka fluorescenční odezvy fura-2 musí být stanovena pro každý ze sledovaných iontů individuálně.



**Obrázek 9:** Vliv  $\text{Cd}^{2+}$  na excitační spektrum fura-2 (1  $\mu\text{M}$ ), koncentrace  $\text{Cd}^{2+}$ : 0  $\mu\text{M}$ ; 0,10  $\mu\text{M}$ ; 0,20  $\mu\text{M}$ ; 0,29  $\mu\text{M}$ ; 0,38  $\mu\text{M}$ ; 0,48  $\mu\text{M}$ ; 0,57  $\mu\text{M}$ ; 0,65  $\mu\text{M}$ ; 0,74  $\mu\text{M}$ ; 0,83  $\mu\text{M}$ ; 0,91  $\mu\text{M}$ ; 0,99  $\mu\text{M}$

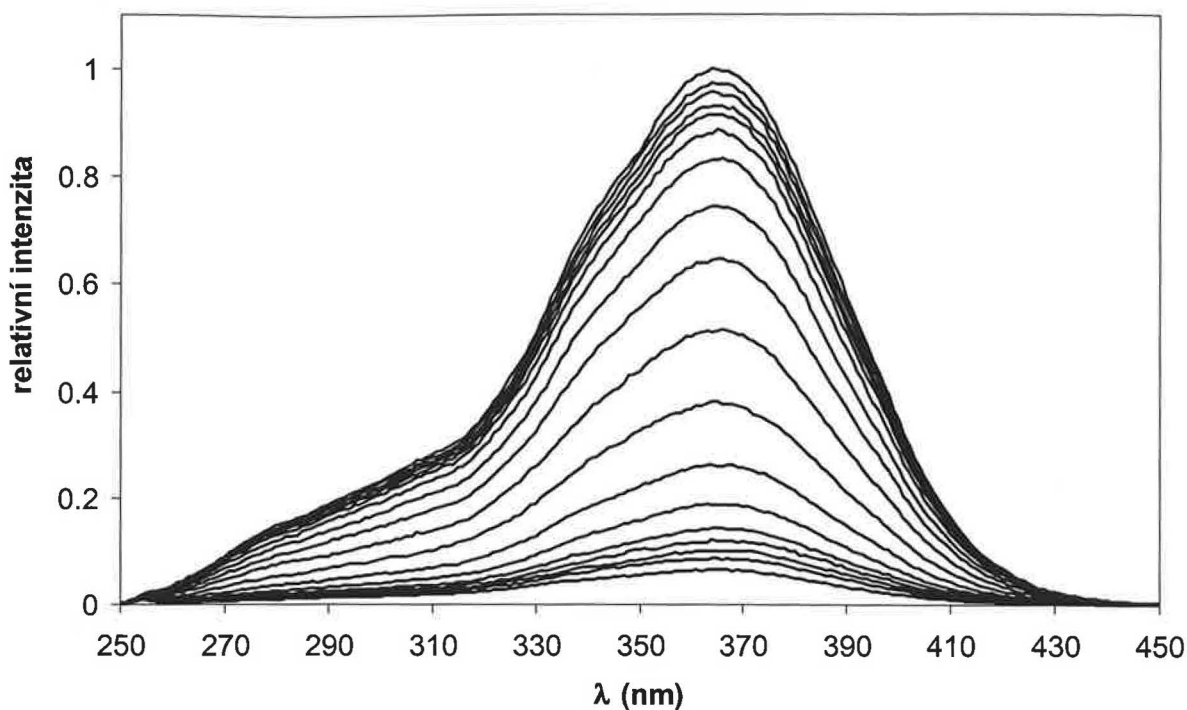


**Obrázek 10:** Vliv  $Zn^{2+}$  na excitační spektrum fura-2 ( $1 \mu M$ ), koncentrace  $Zn^{2+}$ :  $0 \mu M$ ;  $0,1 \mu M$ ;  $0,2 \mu M$ ;  $0,4 \mu M$ ;  $0,8 \mu M$ ;  $1,5 \mu M$ ;  $3,0 \mu M$ ;  $5,8 \mu M$ ;  $11 \mu M$ ;  $22 \mu M$ ;  $43 \mu M$ ;  $84 \mu M$ ;  $650 \mu M$

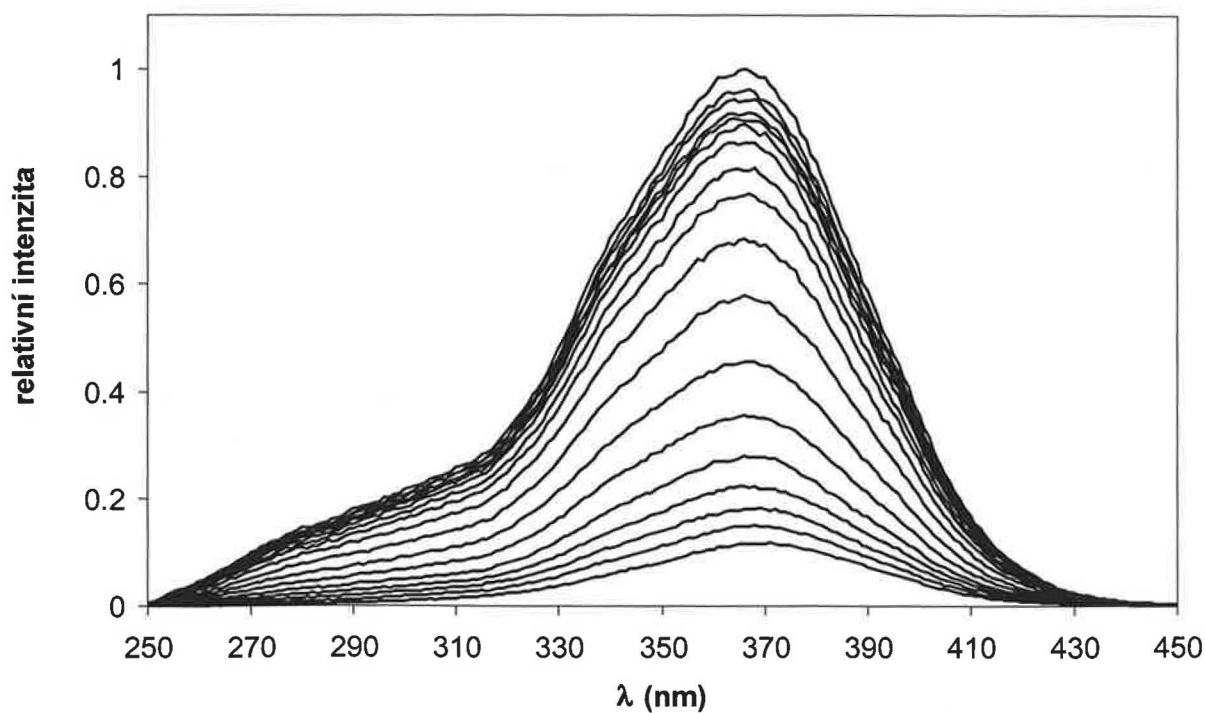


**Obrázek 11:** Zhášení  $Mn^{2+}$  fluorescence fura-2 ( $1 \mu M$ ) - excitační spektrum, koncentrace  $Mn^{2+}$ :  $0 \mu M$ ;  $0,1 \mu M$ ;  $0,2 \mu M$ ;  $0,4 \mu M$ ;  $0,8 \mu M$ ;  $1,5 \mu M$ ;  $3,0 \mu M$ ;  $5,8 \mu M$ ;  $11 \mu M$ ;  $22 \mu M$ ;  $43 \mu M$ ;  $84 \mu M$ ;  $170 \mu M$ ;  $330 \mu M$ ;  $650 \mu M$ ;  $1,3 \text{ mM}$ ;  $2,6 \text{ mM}$





**Obrázek 12:** Zhášení  $\text{Co}^{2+}$  fluorescence fura-2 ( $1 \mu\text{M}$ ) - excitační spektrum, koncentrace  $\text{Co}^{2+}$ :  $0 \mu\text{M}$ ;  $0,1 \mu\text{M}$ ;  $0,2 \mu\text{M}$ ;  $0,4 \mu\text{M}$ ;  $0,8 \mu\text{M}$ ;  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $3,0 \mu\text{M}$ ;  $5,8 \mu\text{M}$ ;  $11 \mu\text{M}$ ;  $22 \mu\text{M}$ ;  $43 \mu\text{M}$ ;  $84 \mu\text{M}$ ;  $170 \mu\text{M}$ ;  $330 \mu\text{M}$ ;  $650 \mu\text{M}$ ;  $1,3 \text{ mM}$ ;  $2,6 \text{ mM}$ ;  $5,0 \text{ mM}$



**Obrázek 13:** Zhášení  $\text{Fe}^{2+}$  fluorescence fura-2 ( $1 \mu\text{M}$ ) - excitační spektrum, koncentrace  $\text{Fe}^{2+}$ :  $0 \mu\text{M}$ ;  $0,1 \mu\text{M}$ ;  $0,2 \mu\text{M}$ ;  $0,4 \mu\text{M}$ ;  $0,8 \mu\text{M}$ ;  $1,5 \mu\text{M}$ ;  $3,0 \mu\text{M}$ ;  $5,8 \mu\text{M}$ ;  $11 \mu\text{M}$ ;  $22 \mu\text{M}$ ;  $43 \mu\text{M}$ ;  $84 \mu\text{M}$ ;  $170 \mu\text{M}$ ;  $330 \mu\text{M}$ ;  $650 \mu\text{M}$ ;  $1,3 \text{ mM}$ ;  $2,6 \text{ mM}$ ;  $5,0 \text{ mM}$

## **4.1.2 Barvení bakterií sondou fura-2 pomocí elektroporace**

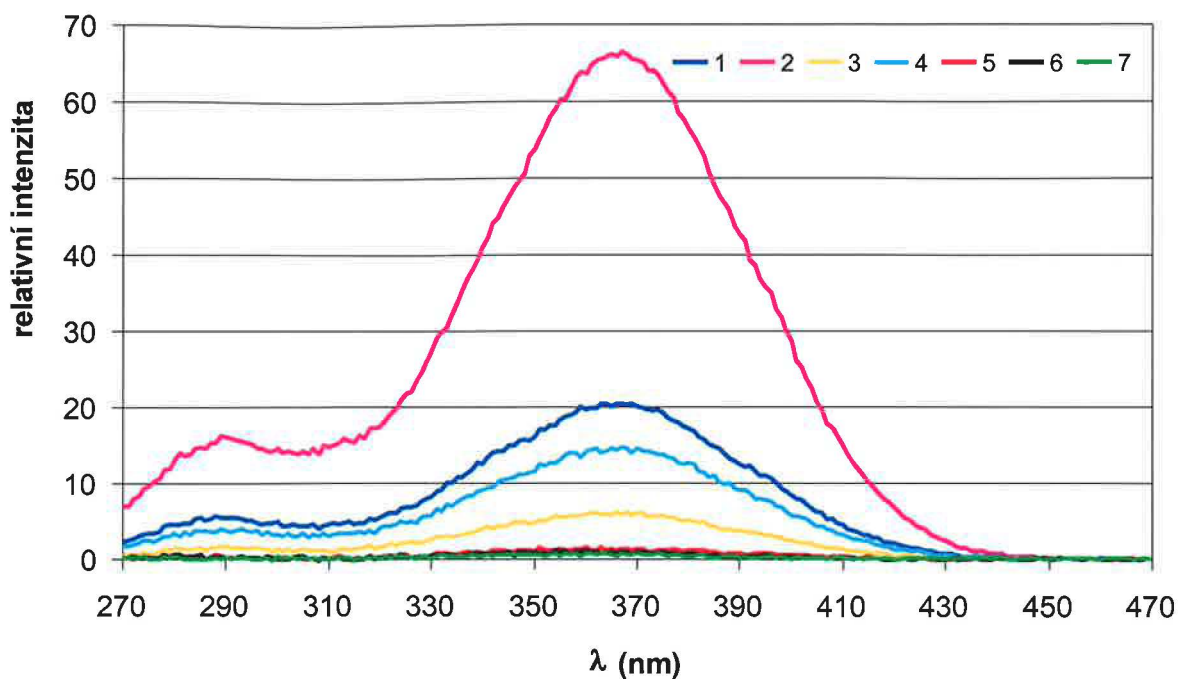
K barvení buněk pomocí elektroporace byla zvolena metoda krátkých pulsů (54), jelikož klasický elektroporační protokol (49) neposkytoval dostatečné obarvení cytosolu pro účely měření transportu zprostředkovaného MntH (Chaloupka a Cellier, nepublikovaná data).

Při hledání vhodných elektroporačních podmínek jsme postupovali následujícím způsobem. V první fázi bylo třeba prověřit širší spektrum experimentálních podmínek (různá délka pulsu, opakovací frekvence, napětí, celková délka elektroporace) a najít takové, při kterých bakterie elektroporované v roztoku fura-2 po promytí suspense bakterií dostatečně fluoreskovaly. Následně bylo třeba prověřit, zda je za takovýchto elektroporačních podmínek možno sledovat transport zprostředkovaný proteinem MntH, a případně tyto elektroporační podmínky mírně modifikovat. Testování vhodnosti daných podmínek probíhalo dvojnásobným způsobem: buď pomocí odpovídající kontroly exprimující kromě EcolIA i pHluorin, nebo porovnáním odezvy fura-2 – jednak v buňkách exprimujících EcolIA, jednak v buňkách nesoucích jen prázdný plasmid – na přidání substrátu ( $\text{Cd}^{2+}$ ) k buněčné kultuře v suspensi. Prověřili jsme i reakci fluorescenční sondy na následné přidání chelátorů dvojmocných kovových iontů.

K prvním měřením jsme použili kmen EcolIA (bez pHluorinu). V prvním pokusu jsme měnili frekvenci (5 Hz, 50 Hz), délku pulsu (1  $\mu\text{s}$ , 10  $\mu\text{s}$ , 20  $\mu\text{s}$ , 50  $\mu\text{s}$ , 100  $\mu\text{s}$ ) a délku elektroporace (20 s – 5 min) při napětí 1800–1900V. Z osmi vyzkoušených kombinací jsme našli jednu (frekvence 50 Hz, délka pulsu 50  $\mu\text{s}$ , délka elektroporace 1 min), při které byla naměřená intenzita výrazně odlišná od kontroly, která byla elektroporována bez přítomnosti barviva fura-2.

V dalším měření jsme zkusili rozpustit barvivo místo v destilované vodě v elektroporačním pufru. Zkoušeli jsme frekvence 50 Hz, 25 Hz, 10 Hz a 5 Hz, délka pulsu byla u všech vzorků 50  $\mu\text{s}$ , elektroporovali jsme vždy 30 nebo 60 s při napětí 1800-2200V.

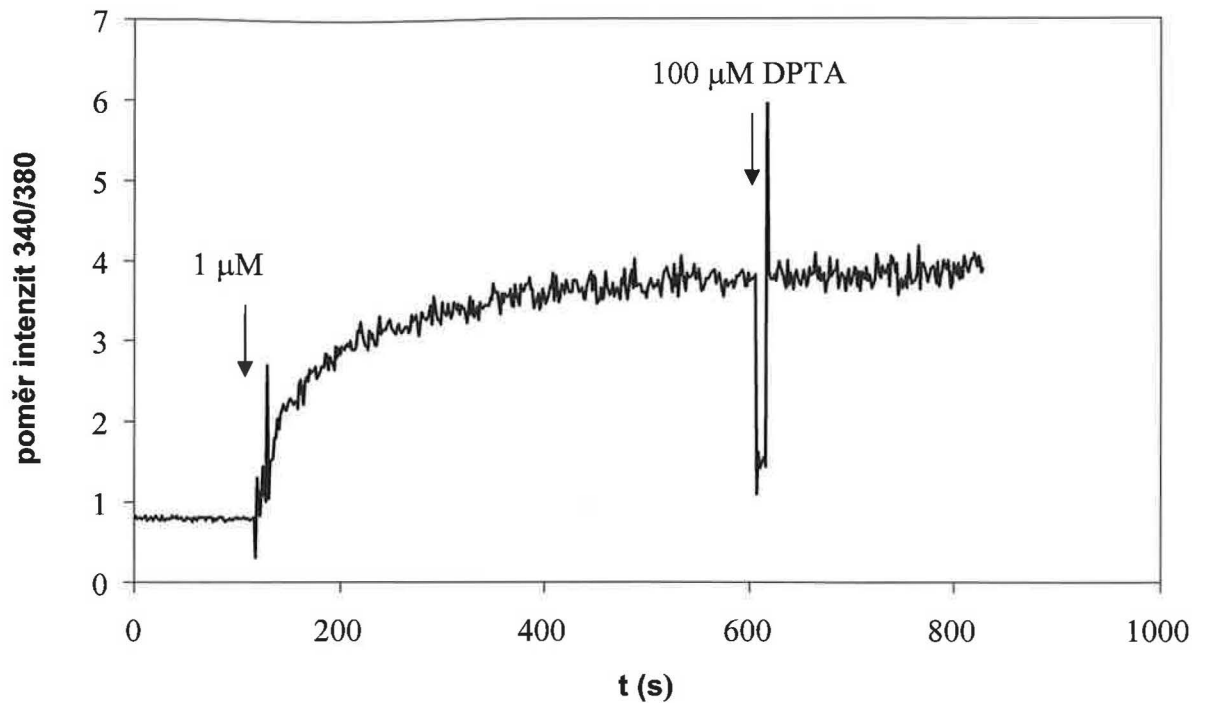
Naměřená excitační spektra jsou uvedena v obrázku 14. Intenzita je vždy vydělena intenzitou v místě, kde již není signál od barviva (průměr hodnot u 480 až 485 nm) - pro zkorigování mírně rozdílných OD jednotlivých vzorků. Od spekter je odečteno spektrum kontrolního vzorku, který byl elektroporovaný (50 Hz, 60 s) bez fluorescenční sondy. Zjistili jsme, že při nízkých frekvencích (5 a 10 Hz) je obarvení bakterií nedostatečné.



**Obrázek 14:** Vliv frekvence elektroporačních pulsů na obarvení, délka pulsu 50 μs; 1 - 50 Hz, 30 s; 2 - 50 Hz, 60 s; 3 - 25 Hz, 30 s; 4 - 25 Hz, 60 s; 5 - 10 Hz, 30 s; 6 - 10 Hz, 60 s; 7 - 5 Hz, 60 s

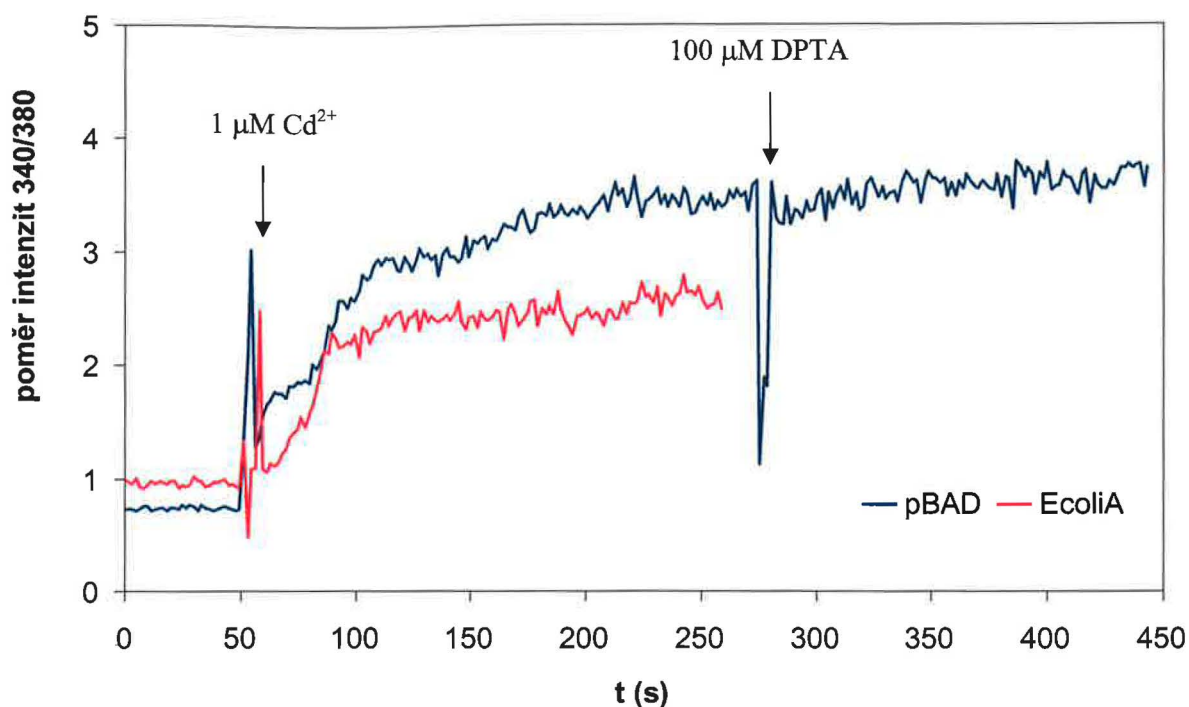
U vybraného vzorku (frekvence 50 Hz, délka elektroporace 30 s) bylo provedeno testovací poměrové měření (viz obr. 15). Přidali jsme 1 μM Cd<sup>2+</sup> (finální koncentrace) a poté 100 μM chelátor DPTA. Po přidání kadmia byla vidět výrazná změna poměru – posunutí excitačního spektra k nižším vlnovým délkám, což značí, že se kadmium pravděpodobně dostalo k fluorescenčnímu barvivu, přidání chelátoru DPTA, který neprochází membránou, tuto změnu nezvrátilo.

Předchozí nadějně výsledky však bylo třeba ověřit. V dalším měření jsme elektroporovali jak aktivní kmen *EcoliA*, tak kmen pouze s prázdným plasmidem pBAD. Elektroporační podmínky: frekvence 50 nebo 25 Hz, délka elektroporace 30 nebo 60 s, délka pulsu 50 μs, napětí cca 2000 V. Při podmínkách 50 Hz, 30 s a 25 Hz, 60 s byla intenzita fluorescence dostatečná, při 25 Hz, 30 s buňky svítily méně, ale nejméně dvakrát víc než u vzorků s elektroporační frekvencí 10 a 5 Hz z předchozího měření. Poměrně výrazně se lišila intenzita fluorescence u dvou různých vzorků (*EcoliA* a pBAD) se stejnými elektroporačními podmínkami.



**Obrázek 15:** Poměrové měření – vliv přidání  $\text{Cd}^{2+}$  a DPTA u aktivního kmene EcoliA (délka pulsu 50  $\mu\text{s}$ , frekvence 50 Hz, délka elektroporace 30 s)

Se vzorky jsme provedli také poměrové měření. Na obr. 16 je srovnání vlivu  $\text{Cd}^{2+}$  na fluorescenci barviva – porovnání aktivního kmene EcoliA a negativní kontroly pBAD bez transportéru MntH (elektroporační podmínky délka pulsu 50 Hz, délka elektroporace 60 s, frekvence 25 Hz). Zjistili jsme, že spektrum fluorescenčního barviva po přidání kadmia se bohužel výrazně změnilo nejen u kmene s transportérem MntH (EcoliA), ale i u negativní kontroly pBAD. Znamená to, že zjištěná změna neodpovídá transportu transportním proteinem MntH. Kadmium se zřejmě dostalo dovnitř buněk i u kmene bez transportéru MntH, což potvrzuje i fakt, že po přidání chelátoru se poměr intenzit fluorescence nezměnil. Buňky zůstaly zřejmě poškozené elektroporací a kadmium může pronikat dovnitř. Jinou možností je, že fluorescenční barvivo zůstalo v periplasmatickém prostoru. Změna poměru intenzit byla vidět u obou kmenů i u vzorků s nižší intenzitou fluorescence a mírnějšími elektroporačními podmínkami (puls 50  $\mu\text{s}$ , frekvence 25 Hz, délka elektroporace 30 s).



**Obrázek 16:** Poměrové měření – porovnání kmenů EcoliA a pBAD (délka pulsu 50  $\mu$ s, frekvence 25 Hz, délka elektroporace 60 s)

Intenzitu elektroporace jsme se snažili zmírnit a zkusit tak předejít poškození bakterií. Snížili jsme délku pulsu. Elektroporační podmínky: délka pulsu 10, 20 nebo 40  $\mu$ s po dobu 60 s nebo délka pulsu 20 či 40  $\mu$ s po dobu 30s, frekvence 50 Hz, napětí cca 2000 V. Pokus jsme opět dělali jak s kmenem EcoliA, tak s kmenem pBAD. Výsledkem bylo, že i za těchto podmínek u všech vzorků bez transportéru MntH byla vidět změna excitačního spektra po přidání kadmia. U některých vzorků byla navíc velmi nízká intenzita fluorescence.

Pokračovali jsme ve zkoumání velmi krátkých elektroporačních pulsů. Abychom zvětšili intenzitu fluorescence, zkusili jsme naopak prodloužit celkovou dobu elektroporace. Zjistili jsme, že při podmínkách 50 Hz, 2000 V, délka pulsu 5  $\mu$ s, délka elektroporace 300 s, respektive délka pulsu 10  $\mu$ s, délka elektroporace 150 s, byla intenzita fluorescence zcela nedostačující.

Vliv elektroporace na buňky jsme se alternativně snažili zmírnit snižováním napětí. Zjistili jsme, že při snížení napětí na 1000 V (délka pulsu 50  $\mu$ s, frekvence 50 Hz, délka elektroporace 30 s) byla intenzita fluorescence dost malá a při napětí 600 V nebyly bakterie obarvené vůbec. Při napětí 1500 V byla intenzita fluorescence také poměrně malá, ale zkusili jsme s ní dále pracovat. Prodloužili jsme dobu elektroporace a intenzita fluorescence pak byla dostačující. Bohužel u těchto vzorků byla opět vidět změna spektra po přidání kadmia i u

kmene bez transportéru MntH. Pouze u nejkratší doby elektroporace 30 s tato změna nebyla patrná, ale bylo to pravděpodobně způsobeno kontaminací zbytkovými dvojmocnými kovy (excitační spektrum fura-2 bylo posunuté k nižším vlnovým délkám ještě před přidáním  $\text{Cd}^{2+}$ ), s kterou jsme měli při práci se vzorky s nízkou intenzitou fluorescence problémy. Tento vliv jsme eliminovali přidáním 1 mM EDTA do média při sklizni vypěstovaných bakterií a do prvního promytí jak před elektroporací, tak po ní. Výsledkem bylo, že i při poměrně nízké intenzitě fluorescence bylo vidět vliv přidání  $\text{Cd}^{2+}$ , bohužel však jak u kmene s transportérem MntH, tak u kmene s prázdným plasmidem pBAD.

Abychom eliminovali nepříznivý vliv elektroporace na buňky, prodloužili jsme dobu, po kterou se bakterie mohou po elektroporaci regenerovat. Provedli jsme elektroporaci již po 2 hodinách pěstování bakterií (sterilně), teprve poté jsme přidali L-arabinózu (indukce syntézy proteinu MntH) a další hodinu jsme nechali bakterie růst. Elektroporační podmínky: délka pulsu 50  $\mu\text{s}$ , frekvence 50 Hz nebo 25 Hz, délka elektroporace 30 s, napětí cca 2000 V. Ani při těchto podmínkách jsme ovšem nedosáhli lepších výsledků, i pro kmen bez transportéru MntH byla opět vidět změna excitačního spektra po přidání kadmia.

Paralelně s elektroporačním barvením barvivem fura-2 jsme pro některé experimentální podmínky zkoušeli kontrolní elektroporaci bez barviva. Použili jsme buňky s pHluorinem a sledovali transport protonů. Transport protonů byl u všech elektroporovaných vzorků podstatně nižší než u vzorku, který nebyl elektroporován. Poměrně dobře byl transport zachován (asi poloviční oproti neelektroporanému vzorku) u experimentálních podmínek - délka pulsu 5  $\mu\text{s}$ , frekvence 50 Hz, délka elektroporace 300 s, respektive délka pulsu 50  $\mu\text{s}$ , frekvence 12,5 Hz, délka elektroporace 30 s. Při délce pulsu 5  $\mu\text{s}$  ani při malých elektroporačních frekvencích (viz obr. 9 – frekvence 10 Hz) se nám však při experimentech s fura-2 nepodařilo buňky obarvit dostatečně.

Při elektroporačních experimentech se nám podařilo najít experimentální podmínky (délku pulsu, frekvenci pulsů, napětí, celkovou délku elektroporace), při kterých bakterie elektroporované v roztoku fura-2 po promytí suspence bakterií dostatečně fluoreskovaly. V těchto experimentech byla po přidání  $\text{Cd}^{2+}$  ke vzorku dobře vidět změna excitačního spektra. Bohužel tato změna byla vidět jak u kmene bakterií, které exprimují transportní protein MntH, tak u kmene bez tohoto proteinu (pouze s prázdným plasmidem pBAD) - u bakterií představujících negativní kontrolu. Pozorovaná změna fluorescenční odezvy fura-2 tedy nemůže odpovídat transportu  $\text{Cd}^{2+}$  zprostředkovanému proteinem MntH. Nepodařilo se nám tedy najít takové nastavení experimentu, při kterém by byla dostatečná fluorescence

vzorku a zároveň se fluorescenční spektrum neměnilo po přidání  $\text{Cd}^{2+}$  k suspenzi buněk kmene, který nemá v membráně transportér MntH.

### **4.1.3 Barvení bakterií fluorescenční sondou fura-2-AM**

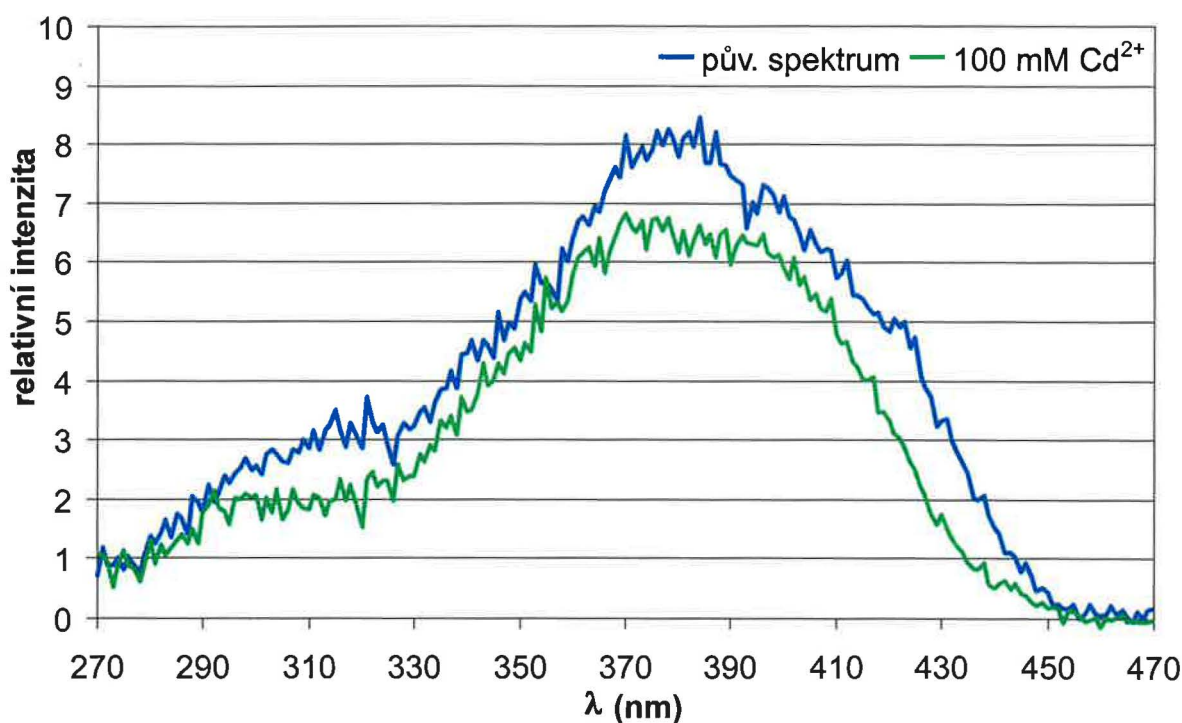
Další testovanou možností bylo barvení bakterií acetoxymetylesterelem barviva fura-2 dle dříve publikovaného protokolu Gangoly a Rosena (50). Jelikož se použitým postupem bakteriální buňky sondou fura-2 obarvit dostatečně nepodařilo, přistoupili jsme k modifikaci původního protokolu podle Nakamury a kol. (56). Při barvení gram-negativních bakterií *Selenomonas ruminantium* autoři aplikovali Tris a EDTA, hovězí sérový albumin a detergent Pluronic. Ani tyto modifikace však nevedly ke kýženému cíli. Vyzkoušeli jsme také protokol použitý v článku Hiaroky a Kimbary (61) aplikovaný na bakterie *Comamonas testosteroni* (promytí bakterií v 10 mM HEPES), ale ani tímto způsobem se nám nepodařilo bakterie obarvit. Proto jsme přistoupili k odstranění vnějších obalových struktur bakterií, tzn. k práci se sféroplasty.

### **4.1.4 Barvení sféroplastů sondou fura-2-AM**

Nejprve jsme se pokusili vytvořit sféroplasty z bakterií EcoliA s pHluorinem, abychom zjistili, jestli odstranění vnějších vrstev bakterií bude nějak negativně ovlivňovat transport protonů transportním proteinem MntH. Sledovali jsme transport protonů u sféroplastů pomocí pHluorinu v citrát fosfátovém pufru pH 4,7 s 0,25 M sacharózou. 1000 s po přidání substrátu MntH ( $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ) byla změna koncentrace protonů asi 40 nM, tj. asi poloviční hodnota než u intaktních bakterií. Nicméně bylo možno konstatovat, že transportér v plasmatické membráně sféroplastů je pravděpodobně funkční.

Sféroplasty jsme dále barvili sondou fura-2-AM. Při dvacetiminutové inkubaci s  $5 \mu\text{M}$  fura-2-AM se nám sféroplasty podařilo obarvit v dostatečné míře. Nicméně přidání kadmia ke vzorku s transportérem MntH ovlivnilo pouze intenzitu fluorescence, ale k předpokládanému posuvu spektra nedošlo. Fluorescenční spektrum mělo jiný tvar než spektrum volné fura-2 v elektroporovaných buňkách (maximum cca 367 nm), bylo posunuté k větším vlnovým délkám (střed pásu cca 380 nm). Pozorovaný efekt je pravděpodobně způsoben tím, že v buňkách nedošlo k plnému rozložení acetoxymethylesteru pomocí nespecifických esteraz; v buňkách tedy kromě fura-2 fluoreskuje také fura-2-AM, která není citlivá na dvojmocné kovové ionty.

Abychom snížili množství nerozložené fura-2-AM uvnitř buněk, snížili jsme její koncentraci v inkubačním médiu. Intenzita fluorescence byla potom výrazně nižší a závisela na koncentraci fura-2-AM v inkubačním roztoku. Ovšem spektra opět nebyla citlivá na přidání kadmia. Na obr. 17 je spektrum získané inkubací sféroplastů s 2  $\mu\text{M}$  fura-2-AM a vliv přidání kadmia. Spektra jsou zkorigovaná (vydělením průměrem hodnot pro 480 – 485 nm původního spektra) a je od nich odečtené spektrum kontrolního vzorku sféroplastů, který nebyl inkubovaný s barvivem. Buňky se tedy ani touto metodou nepodařilo obarvit tak, aby bylo možné sledovat transport.



Obrázek 17: Sféroplasty obarvené v roztoku 2 mM fura-2-AM, vliv přidání 100 mM  $\text{Cd}^{2+}$  (1000 s po přidání)

#### 4.1.5 Shrnutí a diskuse kapitoly 4.1.

Fluorescenční sonda fura-2 je sice principiálně vhodná ke sledování změn vnitrobuněčné koncentrace kadmia, manganu, zinku, kobaltu a železa (kapitola 4.1.1), ovšem ztížený průnik sondy do cytosolu buněk (kapitoly 4.1.2 – 4.1.4) je zásadní překážkou jejího použití pro monitorování změn koncentrace těchto dvojmocných kovových iontů způsobených činností transportního proteinu MntH.

Elektroporační barvení bakteriálních buněk se ukázalo za určitých podmínek jako dostatečně efektivní, ale buď se při elektroporaci barvivo dostane pouze do periplasmatického prostoru a na jeho fluorescenční vlastnosti má tedy vliv přidání kadmia i u bakterií bez



transportéru MntH, anebo jsou buňky po elektroporaci poškozené; plasmatická membrána je zřejmě po elektroporaci propustná pro ionty. Oproti tomu se barvení bakterií chemicky modifikovanou sondou fura-2-AM ukázalo jako zcela neúčinné, což je možno přičíst na vrub přítomnosti vnější membrány a buněčné stěny u gram-negativních bakterií, k nimž patří i bakterie *E. coli*. Odstraníme-li tyto obalové struktury, tzn. pracujeme-li se sféroplasty *E. coli*, tak sice dosáhneme obarvení jejich cytosolu, ale bohužel je v cytosolu přítomna nejen fura-2, ale ve stejné či vyšší míře i nerozložená fura-2-AM nereagující na  $\text{Me}^{2+}$ , což je velmi pravděpodobně způsobeno nepřítomností (anebo přinejmenším nedostatečnou aktivitou) nespecifických esteráz ve sféroplastech bakterie *E. coli* (62).

Nepodařilo se nám tedy najít vhodnou experimentální metodu pro obarvení bakterií fluorescenční sondou fura-2, kterou by bylo možné využít pro studium struktury a funkce transportéru MntH v bakteriích *E. coli*. Z kontrolních experimentů, v nichž byla sledována transportní aktivita MntH pomocí pHluorinu a její ovlivnění elektroporací či přípravou sféroplastů, vyplývá, že všechny dostupné metody barvení jsou pravděpodobně poměrně invazivní a ovlivňují fyziologický stav modelového organismu.

Použití pHluorinu (geneticky kódované fluorescenční sondy na měření vnitrobuněčného pH) ke studiu transportní funkce MntH by ovšem mohlo být metodologickou inspirací při hledání vhodných alternativ pro sledování transportu  $\text{Me}^{2+}$  zprostředkovaného MntH v bakteriích. V nedávné době byly popsány geneticky kódované fluorescenční sondy rovněž na bázi GFP, které umožňují měření vnitrobuněčné koncentrace vápníku (63- 65). Jsou to fúzní proteiny kombinující vlastnosti proteinu obsahujícího vazebné místo pro vápník, obvykle kalmodulinu, a jednoho či dvou fluorescenčních proteinů. Jeden typ těchto sond je založen na Försterově rezonančním přenosu energie (FRET). Přítomnost vápníku změní konformaci systému, čímž dojde ke změně vzdálenosti mezi fluorofory, na niž je FRET velmi citlivý (63, 65). Druhý používaný typ sestává z cirkulárně permutovaného fluorescenčního proteinu a proteinu vážícího vápník, konformační změna při interakci s vápníkem změní fluorescenční vlastnosti proteinu, které je možno jednoduše sledovat (64).

Doposud byly sice sondy tohoto typu použity výhradně pro detekci vnitrobuněčné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , ale existují relativně dobré předpoklady, že by tyto sondy mohly reagovat i na změnu koncentrace jiných dvojmocných kovových iontů; například kadmium má iontový poloměr velmi blízký iontovému poloměru vápníku (66). Ostatně fura-2 reaguje na kadmium stejným způsobem jako na vápník (47) pravděpodobně z toho důvodu, že oba ionty sdílejí stejné vazebné místo.

## 4.2 MntH bakterie *E. coli* – vztah struktury a funkce

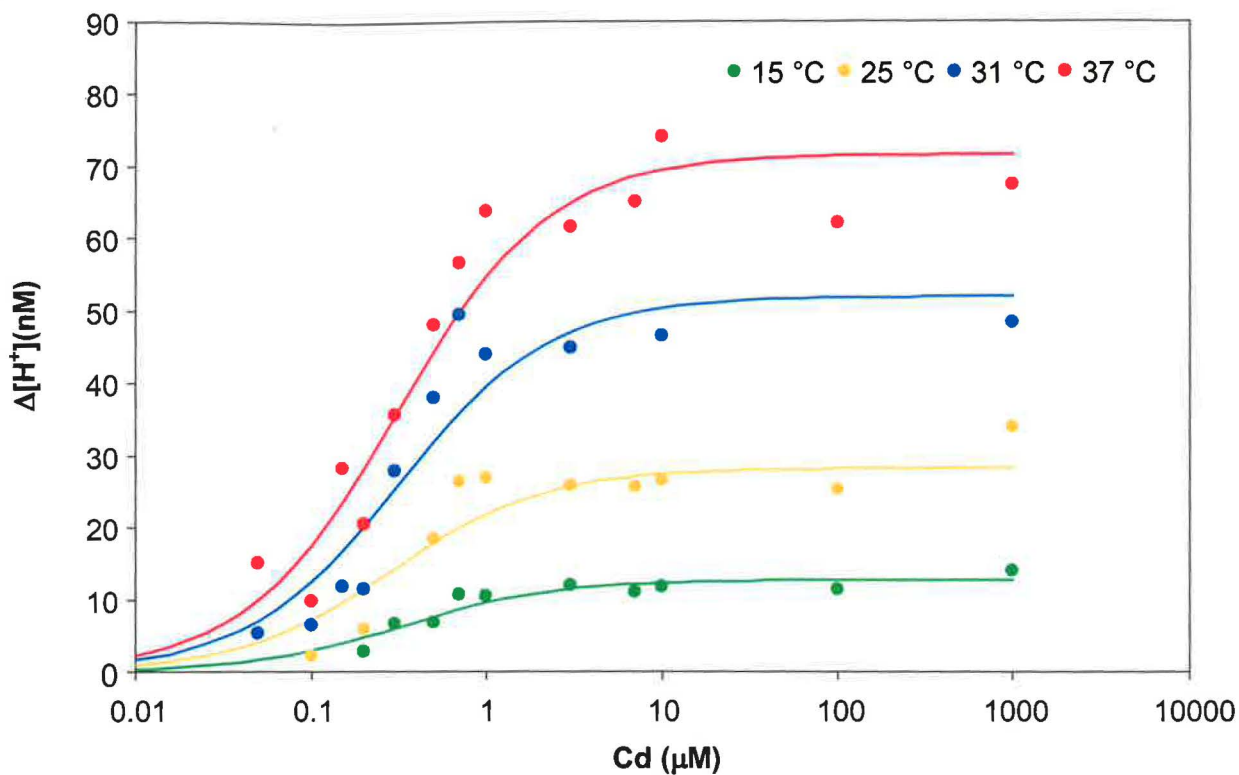
Tato část diplomové práce se již zabývá vlastním studiem transportního proteinu MntH bakterie *E. coli*, zejména vztahu mezi strukturou tohoto transportního proteinu a jeho funkcí. K podrobné charakterizaci transportní funkce MntH bylo použito zeleného fluorescenčního proteinu citlivého na pH, jímž je možno studovat transport protonů indukovaný přítomností kovového substrátu (33, 35). Výhodou této již dobře zavedené metody je to, že na rozdíl od použití fluorescenční sondy fura-2 není potřeba buňky složitě barvit, neboť fluorescenční protein se syntetizuje přímo uvnitř bakterií.

Byl studován vliv teploty na transport protonů indukovaný  $\text{Me}^{2+}$  divokým typem transportéru MntH (*EcoliA*) a transportéry s vybranými bodovými mutacemi. Cílem bylo jednak zvýšit citlivost metody, jednak určit Arrheniovu aktivační energii transportu protonů, jakožto důležitý ukazatel, který může poskytnout cenné informace o ovlivnění funkce proteinu danou bodovou mutací. K podrobnější charakterizaci byly vybrány jednak mutace již dříve studované (D34G, N37T, H211Y a N401T) (35), jednak nová bodová mutace splňující kritérium specifičnosti pro rodinu Nramp – N250T.

### 4.2.1 Vliv teploty na transport protonů indukovaný $\text{Cd}^{2+}$

Nejprve jsme studovali podrobně kinetiku transportu protonů indukovaného  $\text{Cd}^{2+}$  divokým typem transportéru MntH z bakterie *E. coli* (*EcoliA*). Zjišťovali jsme u něj závislost transportu protonů na koncentraci kovového substrátu ( $\text{Cd}^{2+}$ ) za různých teplot s cílem určit, zda se studovaný transportér chová podle kinetiky Michaelise a Mentenové (kapitola 3.8.1), eventuálně jaký vliv má změna teploty na konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$  charakterizující transport, a zda je zvýšením teploty možno zvýšit citlivost metody.

V grafech 18 a 19 zobrazujících výsledné kinetiky jsou vyneseny střední hodnoty získané zpravidla z 2 – 3 nezávislých měření, transport byl měřen vždy 500 a 1000 s po přidání kovového substrátu. Souborem všech naměřených dat byly proloženy křivky odpovídající kinetice Michaelise a Mentenové, zjistili jsme, že data odpovídají této závislosti. Určili jsme konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$ . Příslušné  $K_m$  a  $V_{\max}$  (a jejich závislost na teplotě) jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4, pomocí takto získaných hodnot  $K_m$  a  $V_{\max}$  byly naměřenými daty proloženy křivky v grafech 18 a 19.

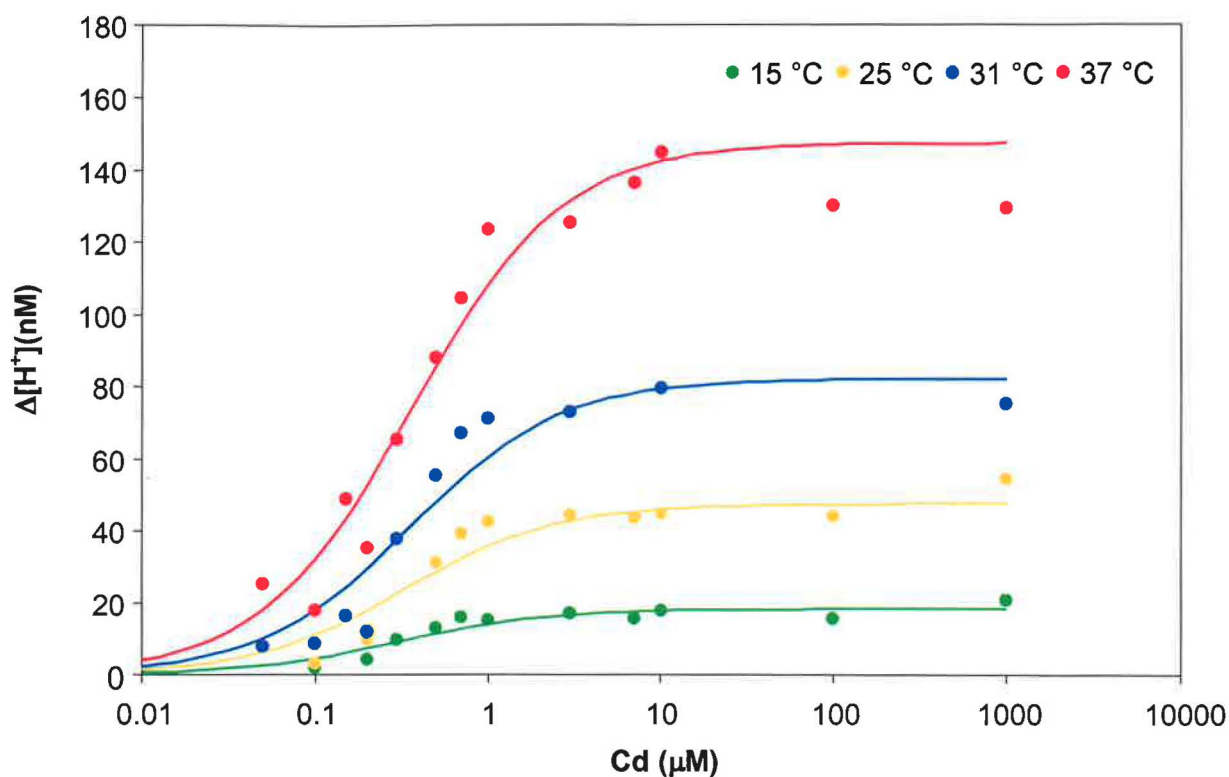


Obrázek 18: Transport protonů 500 s po přidání  $\text{Cd}^{2+}$  za různých teplot

Změny koncentrace protonů pro kontrolní vzorek bez přidání  $\text{Cd}^{2+}$  byly u všech teplot zanedbatelné, max. 4 nM v 1000 s. Jako negativní kontrolu jsme změřili též transport s kmenem pBAD bez transportéru MntH při teplotě 37 °C. Maximální změna koncentrace protonů v 1000. s nepřesahovala 5 nM.

Tabulka 3: Konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$  pro transport v 500 s

Teplota	$K_m$ (μM)	$V_{\max}$ (nM)
37 °C	$0,31 \pm 0,07$	$72 \pm 3$
31 °C	$0,32 \pm 0,10$	$52 \pm 5$
25 °C	$0,29 \pm 0,11$	$28 \pm 2$
15 °C	$0,3 \pm 0,3$	$13 \pm 3$



Obrázek 19: Transport protonů 1000 s po přidání  $\text{Cd}^{2+}$  za různých teplot

Chyba měření námi určených konstant  $K_m$  je poměrně vysoká zvláště u teploty 15 °C, což je způsobeno relativně velkým rozptylem naměřených dat. Při této teplotě je totiž velikost transportu velmi malá a naměřená hodnota transportu příliš nepřevyšuje hodnotu získanou při proměrování transportu protonů negativní kontrolou – kmenem bez proteinu MntH.

Tabulka 4: Konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$  pro transport v 1000 s

Teplota	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (nM)
37 °C	$0,36 \pm 0,07$	$148 \pm 6$
31 °C	$0,36 \pm 0,08$	$82 \pm 5$
25 °C	$0,33 \pm 0,10$	$47 \pm 3$
15 °C	$0,3 \pm 0,3$	$18 \pm 4$

Co se týče chyby určení  $V_{\max}$ , odhadujeme z rozptylu hodnot získaných při jednotlivých měřeních, že v případě teploty 15 °C a částečně i u teploty 37 °C bude skutečná chyba větší, než je hodnota chyby uvedená v tabulkách 3 a 4 (určená při prokládání příslušné

křivky všemi naměřenými daty). Na velký rozptyl dat má zřejmě vliv hlavně rozdílnost počátečních pH jednotlivých měřených vzorků, případně jiné faktory charakterizující celkový stav bakteriální kultury

Po aplikaci dvojitě výběrového Studentova t-testu s rovností rozptylů na naměřená data je možno konstatovat, že hodnota Michaelisovy konstanty –  $K_m$ , kterou jsme z naměřených dat určili, je  $0,3 \mu\text{M}$  a v rámci chyby měření se nemění v závislosti na teplotě. Naopak maximální rychlost –  $V_{\text{max}}$  je na teplotě výrazně závislá a mění se v rozmezí  $13 - 72 \text{ nM}$  (v čase  $500 \text{ s}$ ), resp.  $20 - 150 \text{ nM}$  (v čase  $1000 \text{ s}$  po přidání substrátu).

Bylo zjištěno, že mezi hodnotami  $V_{\text{max}}$  pro teplotu  $25^\circ \text{C}$  a hodnotami  $V_{\text{max}}$  pro ostatní měřené teploty je statisticky významný rozdíl – dosažené hodnoty významnosti pro transport v čase  $500 \text{ s}$  jsou  $P_{25-15} = 5,3 \%$ ,  $P_{25-31} = 0,5 \%$ ,  $P_{25-37} = 0,0 \%$ . Zvolená hladina významnosti je  $5 \%$ . Je tedy vidět, že rozdíly v hodnotě  $V_{\text{max}}$  pro jednotlivé teploty jsou signifikantní, pouze pro teplotu  $15^\circ \text{C}$  je rozdíl méně rozlišitelný, což odpovídá výše diskutované chybě měření. Provedeme-li totéž porovnání v  $1000$ . sekundě, docházíme k obdobným výsledkům.

Naproti tomu mezi hodnotou  $K_m$  pro teplotu  $25^\circ \text{C}$  a hodnotami  $K_m$  pro ostatní měřené teploty není statisticky významný rozdíl. Dosažená hodnota významnosti pro  $500 \text{ s}$ :  $P_{25-15} = 41 \%$ ,  $P_{25-31} = 86 \%$ ,  $P_{25-37} = 100 \%$ . Test tedy ověřil náš výsledek, že  $K_m$  se v našem měřeném rozsahu teplot nemění. Podobně jako u maximální rychlosti i zde jsou data v  $500$ . a  $1000$ . sekundě navzájem v souladu.

Jelikož pro transport  $\text{Cd}^{2+}$  transportérem MntH bakterie *E. coli* nebyly zatím v odborné literatuře publikovány žádné bližší údaje, je naše měření  $K_m$  jejím historicky prvním určením. Konstanta  $K_m = 0,3 \mu\text{M}$  pro transport protonů indukovaný kadmíem, kterou jsme určili z našich měření u *E. coli*, je prakticky shodná s dříve publikovanou konstantou určenou za teploty  $37^\circ \text{C}$  pro transport radioaktivně značeného manganu  $K_m = 0,3 \mu\text{M}$  (34) pro též transportér a blíží se hodnotě  $K_m$  pro mangan publikované jinými autory (29). Transportní aktivita MntH měřená prostřednictvím změn koncentrace protonů je tedy za předpokladu neproměnné stechiometrie  $\text{H}^+/\text{Mn}^{2+}$  stejně dobrou mírou transportní aktivity proteinu jako přímé měření změn koncentrace kovového substrátu. Navíc z výše uvedeného vyplývá, že Michaelisovy konstanty pro transport  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  jsou zřejmě dosti podobné, což by mohlo znamenat, že pro kadmium má transportér podobnou afinitu jako pro mangan. Tuto hypotézu podporuje rovněž článek (29), kde byla studována inhibice transportu radioaktivního manganu a železa různými kovy včetně kadmia. Výsledky této studie naznačují, že  $\text{Cd}^{2+}$  inhibuje

transport radioaktivního manganu podobně jako mangan sám, tudíž tyto dva kovy se vůči *E. coli* chovají velmi podobně, přinejmenším mají blízké inhibiční konstanty  $K_i$ .

Nezjistili jsme žádnou závislost konstanty  $K_m$  na teplotě v teplotním rozmezí 15 – 37°C, což je velmi zajímavý fakt, neboť u enzymů (a tedy i transportérů) se obecně předpokládá existence teplotního optima. Dá se tedy předpokládat, že Michaelisova konstanta  $K_m$ , která za určitých podmínek představuje afinitu transportéru k substrátu, by na teplotě záviset měla. Námi proměřené teplotní rozmezí se pravděpodobně nachází v oblasti teplot, kde se tato charakteristika transportu nemění nebo je její změna nerozlišitelná v rámci chyby měření.

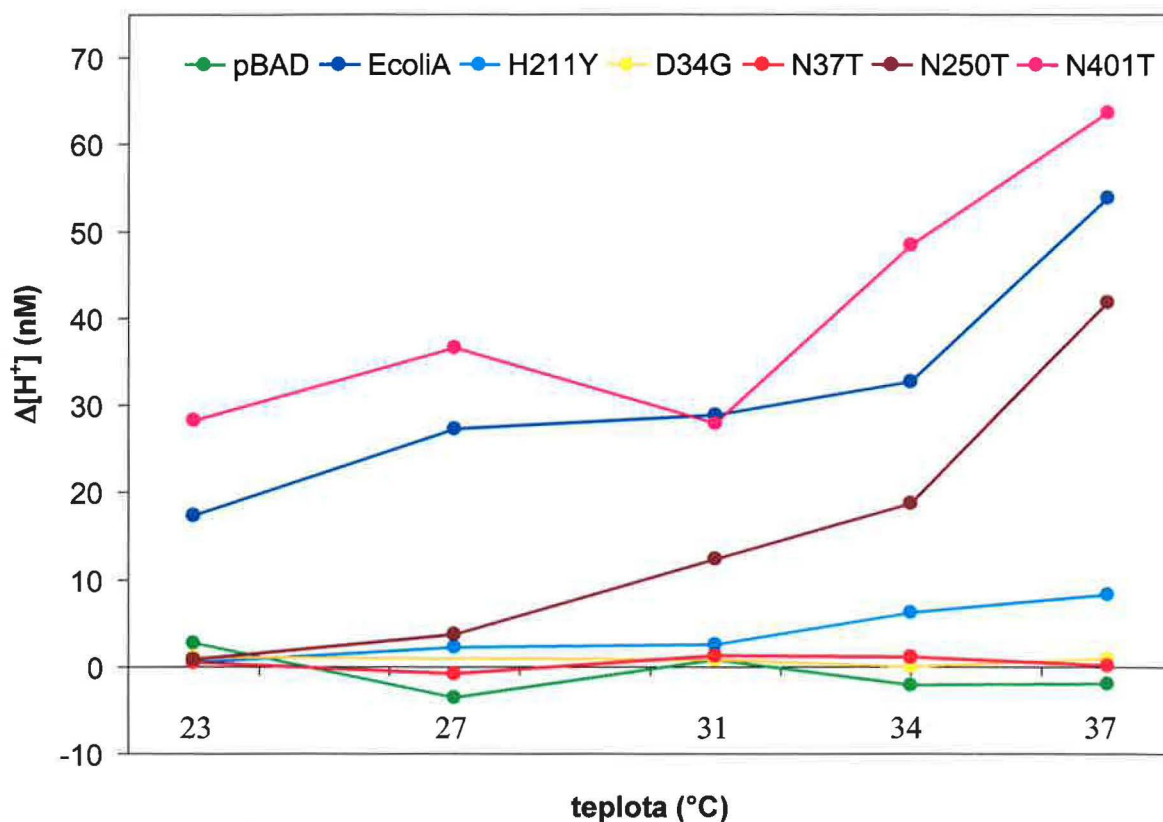
Naopak konstanta  $V_{max}$  je na teplotě výrazně závislá. Za teploty 37°C, která je pro bakterie *E. coli* fyziologická, je transport protonů zhruba třikrát větší než při pokojové teplotě, při nižších teplotách se účinnost transportu naopak snižuje. Zcela v souladu s námi naměřenými teplotními charakteristikami Kehres (29) uvádí, že u kmene *Salmonella enterica* ssp. *Typhimurium* došlo u transportu manganu při zvýšení teploty z pokojové teploty na 37°C ke zvýšení  $V_{max}$  o 50 %.

Fakt, že za teploty 37°C, která je pro bakterie fyziologická, nastává velký nárůst aktivity transportu, je velmi významný z hlediska metodologického. Vzhledem k tomu, že změna koncentrace protonů v buňkách u negativních kontrol (vzorek bez přidání kadmia nebo kmen bez transportéru MntH) se při této teplotě výrazně nezvyšuje, zvětšuje se tímto několikanásobně rozsah měřených hodnot, a tedy i citlivost metody. To je příznivé zvláště pro strukturně-funkční studie, kdy se zkoumá funkčnost transportérů pozměněných jednobodovou mutací, které často transportují v daleko menší míře než divoký typ transportního proteinu. Měření za vyšších teplot by tedy mohlo umožnit charakterizaci i takových transportérů, které za běžných podmínek vykazovaly nulovou transportní aktivitu. Právě studiem funkce transportních proteinů s význačnými jednobodovými mutacemi jsme se zabývali v další části práce.

#### **4.2.2 Studium vztahu struktury a funkce MntH bakterie *E. coli***

Dali jsme si za cíl změřit teplotní závislost transportu u několika mutantních proteinů a určit aktivační energii, jakožto důležitou veličinu charakterizující transport. Pro tuto studii byly vybrány proteiny s těmito bodovými mutacemi: D34G, N37T, H211Y, N250T a N401T. Aminokyselinová rezidua, která byla v těchto mutantních proteinech nahrazena, jsou invariantní v rodině Nramp, ale v příbuzných proteinech, které nemají stejnou funkci (tzv.

outgroup) jsou místo nich jiná, taktéž invariantní residua (viz. kapitola 2.5) – proto je pravděpodobné, že jsou funkčně důležitá (35). Původní aminokyselinová residua byla zaměněna právě za jejich protějšky z outgroup (mutace D34G, N37T, H211Y, N250T), případně za jinou aminokyselinu (N401T); mutace asparaginu na threonin byla vybrána pro srovnání jako konzervativnější než záměna asparaginu za glycin z outgroup (35). Kromě kmenů bakterií s těmito mutacemi v proteinu MntH byly studovány bakterie exprimující divoký typ transportéru (EcoliA) jako pozitivní kontrola a kmeny nesoucí prázdný plasmid bez transportéru MntH (pBAD) jako negativní kontrola.



**Obrázek 20:** Závislost transportu na teplotě pro různé mutantní proteiny, 250 s po přidání 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$

Výsledky jsou uvedeny v grafu 20. Jde o změnu koncentrace protonů v buňkách 250 s po přidání 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Z naměřených dat je vidět, že transportní protein s mutacemi N37T a D34G je, co se týče transportu protonů, zcela nefunkční. Studované proteiny vykazovaly 1000 s po přidání kadmia změnu koncentrace protonů nejvýše 7 nM, což není možno s ohledem na obdobné výsledky s negativní kontrolou považovat za signifikantní změnu. To se dobře shoduje s publikovanými výsledky (35), kdy byl transport protonů proteinů s těmito bodovými mutacemi měřen za pokojové teploty. V této studii nebyl u

mutantního kmenu D34G zjištěn žádný transport protonů signifikantně se lišící od negativní kontroly, pro mutantní kmen N37T byl zjištěn transport protonů pouze snížený a pouze při vysoké koncentraci kadmia. Naším měřením jsme tyto výsledky potvrdili a navíc jsme zjistili, že transport protonů těmito mutantními proteiny nelze zlepšit ani zvýšením teploty. Bylo tedy potvrzeno, že residua Asp<sup>34</sup> a Asn<sup>37</sup> z 1. transmembránové domény proteinu MntH jsou důležitá pro funkci tohoto proteinu.

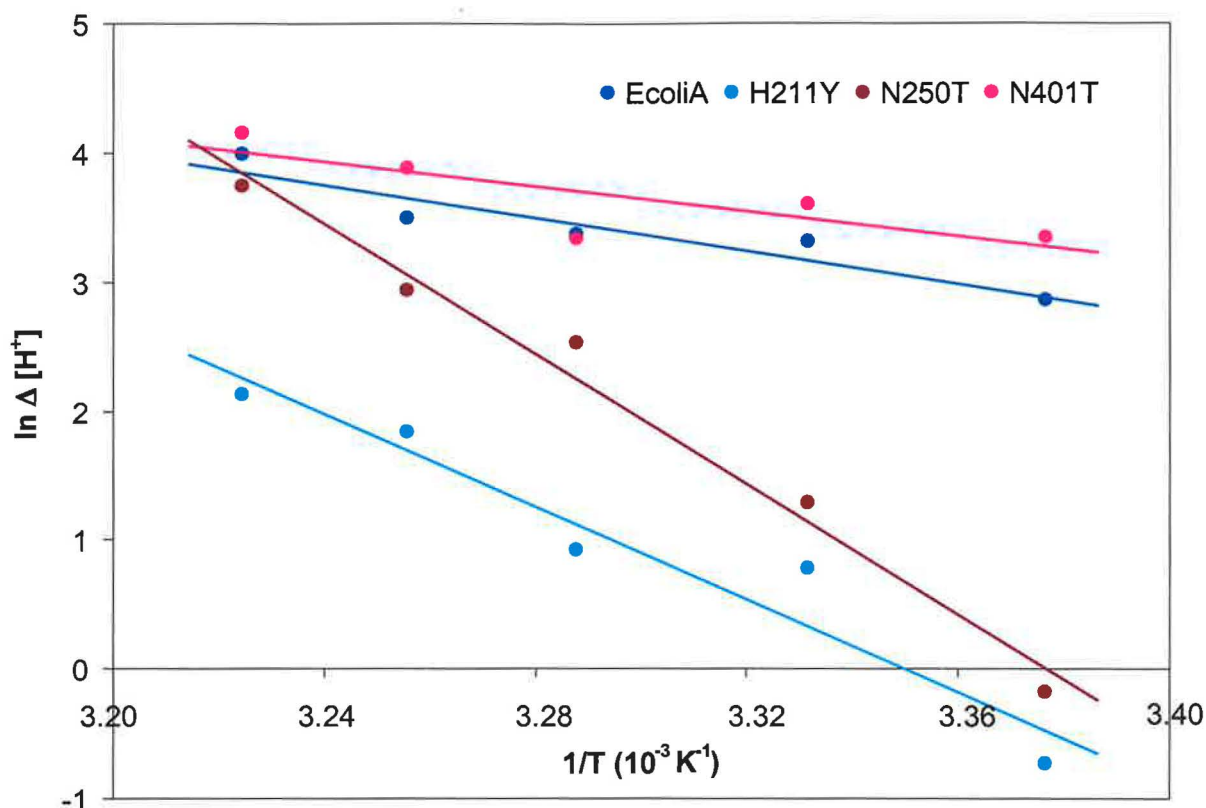
Protein s mutací N401T byl aktivní pro transport protonů i za pokojové teploty, což je rovněž ve shodě s publikovanými daty, přičemž se zvýšením teploty se transport zvýšil. Protein nesoucí mutaci H211Y byl za pokojové teploty neaktivní (průměrný transport 3 nM při 23 °C 1000 s po přidání kadmia) a protein s mutací N250T aktivní jen velmi málo (průměrný transport 7 nM při 23 °C 1000 s po přidání kadmia), ale při zvýšení teploty došlo ke zvýšení transportu u obou kmenů. U kmene H211Y se tak transport za pokojové teploty liší od publikovaných dat (35), kde transport protonů byl funkční i za pokojové teploty dokonce více než u divokého typu. Nicméně tento rozpor je pouze zdánlivý, protože v publikovaném experimentu byly použity vyšší koncentrace kadmia, což je možno interpretovat tak, že daná mutace zřejmě ovlivňuje  $K_m$  a  $V_{max}$ .

Co se týče přesnosti určených hodnot, musíme konstatovat, že naměřená data měla velký rozptyl. Na výsledky mohlo mít vliv také to, že počáteční pH vzorků před přidáním kadmia se lišilo jak pro jednotlivé kmeny, tak pro jednotlivé pokusy. U některých měření při nižších teplotách bylo počáteční pH poměrně vysoké (zvláště u kmenů H211Y a N250T) a zasahovalo do oblasti, kde už pravděpodobně nelze zcela oprávněně použít lineární kalibraci (viz rovnice č. 1 v kapitole 3.8), což mohlo vnést do výsledků určitou chybu. Mohla by to být eventuelně další příčina toho, že transport kmenem H211Y za pokojové teploty se liší od publikovaných hodnot.

Pro kmeny, které vykazovaly alespoň za vyšších teplot transport protonů odlišný od negativní kontroly (H211Y, N250T, N401T a EcoliA), jsme podle rovnice [4] v kapitole 3.8.2 určili aktivační energii transportu (obr. 21). Počítali jsme ji ze změřeného transportu protonů 250 s po přidání Cd<sup>2+</sup>, protože v tomto nejkratším možném čase se stanovená rychlost nejvíce blíží rychlostní konstantě transportu, a tedy nejlépe odpovídá smyslu rovnice [4] v kapitole 3.8.2. Na obrázku č. 21 jsou vyneseny střední hodnoty transportní aktivity pro jednotlivé transportní proteiny při různých teplotách získané vždy ze tří nezávislých měření. Chybové úsečky nejsou v grafu pro přehlednost uvedeny. Těmito středními hodnotami je proložena

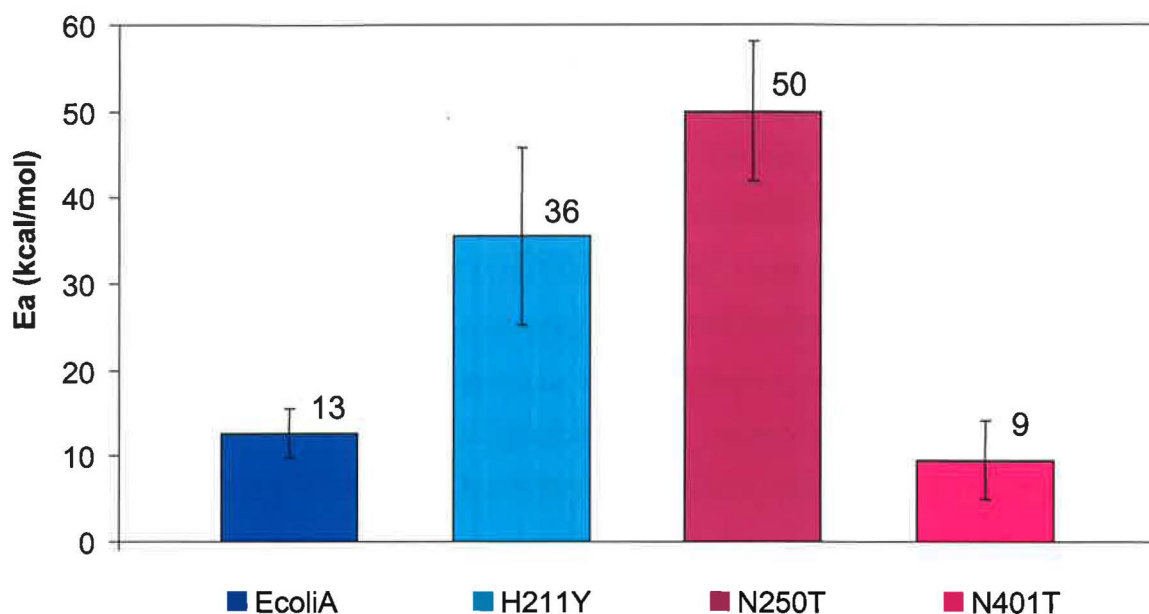


přímka, z jejíž směrnice je možno podle rovnice [4] v kapitole 3.8.2 určit aktivační energii transportu.

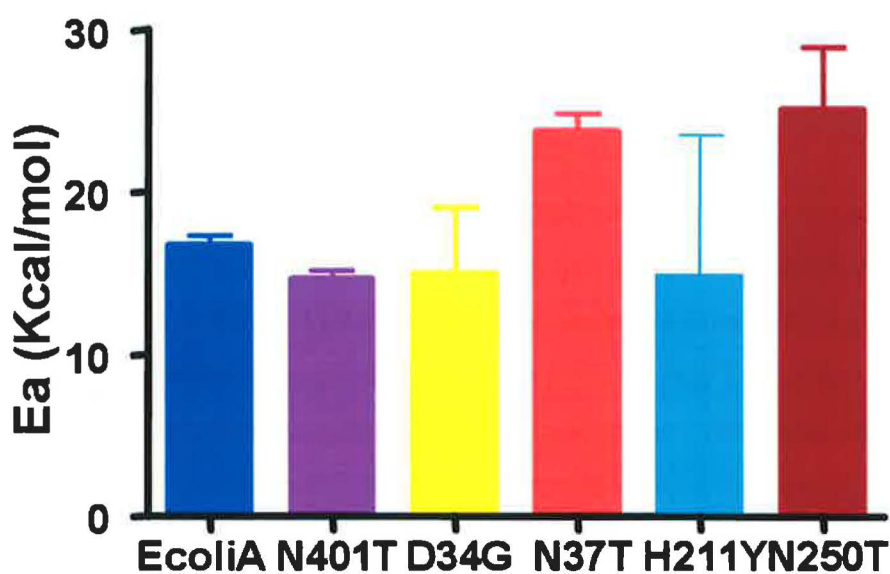


**Obrázek 21:** Arrheniův graf – určení aktivační energie pro jednotlivé transportní proteiny lineární regresí aktivit transportu v 250 s po přidání 10 μM Cd<sup>2+</sup> při různých teplotách

Pomocí Studentova t-testu jsme zjistili, že mutantní kmen N401T má aktivační energii transportu srovnatelnou s divokými typem transportéru, naopak mutantní kmeny H211Y a N250T mají aktivační energii vyšší (viz obr. 22). Rozdíl aktivační energie transportu divokého typu EcoliA a kmenů H221Y respektive N250T je statisticky významný. Dosažená hladina významnosti je nižší ( $P_{\text{EcoliA-H211Y}} = 1,1 \%$  respektive  $P_{\text{EcoliA-N250T}} = 0,3 \%$ ) než zvolená hladina významnosti 5 %, zatímco rozdíl mezi aktivační energií transportu pro divoký typ transportéru EcoliA a pro kmen nesoucí mutaci N401T není statisticky významný ( $P_{\text{EcoliA-N401T}} = 29 \%$ ).



Obrázek 22: Aktivační energie transportu protonů pro jednotlivé transportní proteiny



Obrázek 23: Aktivační energie získané sledováním akumulace radioaktivního  $Cd^{2+}$

Aktivační energie transportu protonů indukovaného 10  $\mu M$  kadmíem, které jsme určili, jsme měli možnost srovnat s daty naměřenými za stejných podmínek pomocí sledování akumulace radioaktivního  $Cd^{2+}$  (obr. 23). Aktivační energie byly určeny z množství kadmia

akumulovaného v buňkách krátce po přidání 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (Courville a Cellier, nepublikovaná data).

Aktivační energie divokého typu EcoliA určená z transportu protonů se přibližně shoduje s hodnotou určenou za stejných podmínek sledováním akumulace radioaktivního kadmia. Tato zajímavá informace by mohla být jedním z klíčů k získání dalších podrobnějších poznatků o mechanismu transportu proteinem MntH, například stechiometrii transportu  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  či funkci jednotlivých význačných aminokyselinových residuí. Porovnávání aktivačních energií pro transport protonů a pro transport dvojmocných kovových iontů získaných pomocí těchto dvou komplementárních metod za různých experimentálních podmínek (například pH) by mohlo bezesporu přinést další velmi důležité informace.

Aktivační energie transportu proteinu s mutací N401T je u dat získaných oběma metodami srovnatelná s aktivační energií transportu u divokého typu. Hodnota aktivačních energií pro protein nesoucí mutaci N250T je signifikantně vyšší u dat získaných oběma metodami než hodnota pro protein divokého typu, z čehož je možno usuzovat, že residuum  $\text{Asn}^{250}$  nacházející se v sedmé transmembránové doméně MntH bakterie *E. coli* je důležité jak pro transport protonů, tak pro transport dvojmocných kovových iontů - například proto, že hraje důležitou strukturní roli. O roli tohoto residua v transportní funkci proteinu MntH nebylo dosud nic známo. Hodnota aktivační energie pro transport protonů proteinem s mutací H211Y je vyšší než u divokého typu, což naznačuje, že toto residuum hraje důležitou roli při transportu protonů, což je ve shodě s publikovanými daty (35).

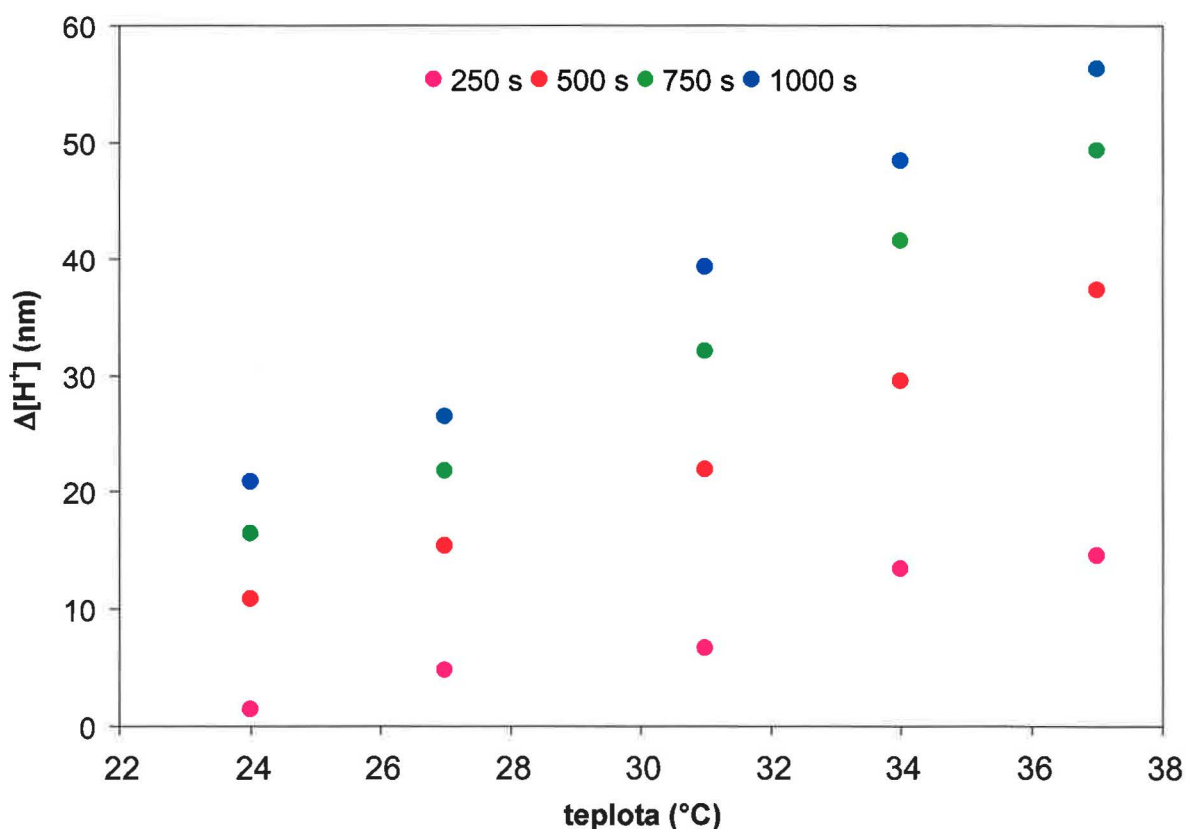
Ze srovnání obou experimentálních metod vyplývá další zajímavý fakt. Transportní proteiny s mutacemi D34G a N37T, které se ukázaly pro transport protonů zcela neaktivní, vykazovaly transport při měření akumulace radioaktivního kadmia. Aktivační energie pro protein D34G byla podobná jako u divokého typu, u proteinu N37T poněkud vyšší (viz obr. 23). U těchto mutantů byla již dříve zjištěna citlivost ke kadmiu v zónových testech, ale nebyl zjištěn příjem kadmia detekovaného hmotnostní spektroskopií po rychlé filtraci buněk inkubovaných s tímto kovem (35), zřejmě kvůli nedostatečné citlivosti metody. Transport dvojmocných kovových iontů transportními proteiny D34G a N37T zůstává tedy funkční, i když v menší míře než u divokého typu, nicméně transport protonů těmito mutantními proteiny je zřejmě zcela nefunkční, nebo přinejmenším velmi silně poškozený. Klíčová role  $\text{Asp}^{34}$  pro transport kovových iontů byla již popsána jak u prokaryotního MntH bakterie *E. coli* (34, 35) tak u eukaryotního proteinu Nramp2 (5) (v tomto případě se jedná o ekvivalentní residuum  $\text{Asp}^{86}$ ), ale zjištění, že primárně ovlivňuje spíše transport protonů, je

zcela nové. Jelikož je toto residuum nacházející se v první transmembránové doméně proteinu klíčové pro transport protonů, mohlo by být i vzhledem k elektrickému náboji, který nese, součástí permeační dráhy pro protony.

### 4.2.3 Aktivační energie transportu protonů indukovaného $Mn^{2+}$

Transport protonů transportním systémem MntH, který lze sledovat pomocí pHluorinu, se výrazně liší podle toho, jakým kovem je indukován. Při použití  $Mn^{2+}$ , který je pro transportní protein MntH fyziologickým substrátem, je transport protonů u divokého typu menší než při použití  $Cd^{2+}$ , což omezuje možnost porovnání takto indukovaného transportu například ve strukturně-funkční studiích proteinů s mutacemi. Studovali jsme proto transport indukovaný manganem divokým typem transportéru MntH za různých teplot, abychom zjistili, zda se při vyšších teplotách transport protonů zvýší. Určili jsme také aktivační energii transportu.

Změny koncentrace protonů v různých časech po přidání 1mM manganu jsou znázorněny v grafu 24. Z naměřených hodnot plyne, že transport protonů je teplotně závislý, což znamená, že zvýšením teploty je možno zvýšit citlivost metody.



Obrázek 24: Transport protonů indukovaný manganem v závislosti na teplotě

Z naměřených hodnot pro transport 250 s po přidání kovu jsme určili aktivační energii transportu indukovaného 1mM  $\text{Mn}^{2+}$   $E_a = 32 \pm 4$  kcal/mol. Tato hodnota je vyšší než aktivační energie pro transport indukovaný 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  – viz obr. 17 ( $E_a = 13 \pm 3$  kcal/mol). Ovšem pro získanou aktivační energii transportu indukovaného manganem bohužel nemáme žádné relevantní srovnání, žádná hodnota nebyla dosud publikována a naměřené hodnoty pro mangan a kadmium nebyly získány za stejných podmínek.

Navíc vzhledem k časové náročnosti experimentů prováděných při různých teplotách pocházejí data, z nichž jsme určovali aktivační energii transportu protonů indukovaného přidáním manganu, pouze z jednoho měření, a proto je třeba považovat takto získanou hodnotu aktivační energie prozatím spíše za orientační. Při teplotě 37°C jsme ovšem provedli více experimentů, průměrná transportní aktivita 1000 sekund po přidání manganu z pěti naměřených hodnot byla potom  $42 \pm 18$  nM, což je v porovnání s experimenty za pokojové teploty (35) prakticky zdvojnásobení citlivosti metody.

## 5 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem sekundárně aktivního membránového transportního proteinu MntH bakterie *E. coli*, který zajišťuje symport dvojmocných kovových iontů a protonů na plasmatické membráně bakteriálních buněk. Věnovali jsme se dvěma tematickým oblastem. V první části práce jsme se pokusili vyvinout metodu pro sledování transportu dvojmocných kovových iontů pomocí fluorescenčního barviva citlivého na dvojmocné kovové ionty. Ve druhé části jsme použili metodu, kterou je možné sledovat transport protonů monitorováním vnitrobuněčného pH pomocí zeleného fluorescenčního proteinu, pro studii vztahu struktury a funkce membránového proteinu MntH.

Ověřili jsme, že fluorescenční sonda fura-2 je principiálně vhodná na detekci změn koncentrace dvojmocných kovových iontů, které jsou substrátem transportéru MntH, v roztoku. Nicméně ztížený průnik do bakteriální buňky způsobený přítomností vnější membrány a buněčné stěny je zásadní překážkou pro její použití *in vivo*. Elektroporačními experimenty se nám podařilo buňky dostatečně obarvit, ale fluorescenční sonda byla přítomna pravděpodobně pouze v periplasmatickém prostoru, nebo byly buňky po elektroporaci poškozené, neboť sonda reagovala na přidání  $\text{Me}^{2+}$  i u buněk, v kterých nebyl exprimován transportér MntH. Inkubací bakterií s acetoxymethylesterem sondy (fura-2-AM), který může volně procházet plasmatickou membránou, se nepodařilo získat dostatečnou koncentraci sondy uvnitř buněk - zřejmě kvůli přítomnosti vnější membrány buňky. V poslední fázi jsme zkoušeli tuto vnější membránu z bakterií odstranit a pomocí fura-2-AM obarvit bakteriální sféroplasty. Ani tento přístup se neukázal jako vhodný, protože esterifikovaná fluorescenční sonda pravděpodobně do sféroplastů pronikla, ale nebyla rozložena na funkční formu nespécifickými esterasami, a tedy fluorescenční spektrum sondy nebylo citlivé na změnu koncentrace dvojmocných kovových iontů.

Použití této fluorescenční sondy pro sledování transportu *in vivo* v bakteriích *E. coli* se tedy ukázalo jako nevýhodné. Další vývoj metod pro detekci dvojmocných iontů by mohl být směřován na experimenty na nebuněčných modelových systémech, jako jsou např. membránové vesikuly. Zajímavou alternativou pro monitorování transportu dvojmocných iontů *in vivo* by se mohlo stát použití geneticky kódované fluorescenční sondy. Modifikované fluorescenční proteiny se zatím používají na detekci vápníku, ale existuje předpoklad, že je bude možné použít i pro detekci jiných dvojmocných iontů, např. kadmia, které je substrátem transportéru MntH.

V druhé části diplomové práce jsme se zabývali studiem funkce transportéru MntH metodou, která právě fluorescenčního proteinu (GFP) využívá k měření změn vnitrobuněčného pH. Jde o dobře zavedenou metodu využívající GFP citlivé na pH ke sledování transportu protonů transportérem MntH. Studovali jsme jak transport divokým typem transportéru, tak proteinem s jednobodovými mutacemi.

Pro divoký typ jsme změřili závislost transportu protonů indukovaného kadmíem a manganem na teplotě. Zjistili jsme, že oproti pokojové teplotě se transport protonů za teploty 37 °C, která je pro bakterie fyziologická, několikanásobně zvyšuje. To znamená výrazné zvýšení citlivosti této metody, které bude pravděpodobně možné s výhodou využít při strukturně-funkčních studiích. Určili jsme aktivační energii transportu protonů divokým typem transportéru indukovaného 10 μM kadmíem  $E_a = 13 \pm 3$  kcal/mol a 1 mM manganem  $E_a = 32 \pm 4$  kcal/mol. Zjistili jsme rovněž, že u transportéru divokého typu se pro transport protonů indukovaných  $\text{Cd}^{2+}$  konstanta  $K_m$  v rozmezí 15 – 37 °C nemění, zatímco  $V_{max}$  s teplotou roste.

Transport protonů proteiny s jednobodovými mutacemi jsme měřili také za různých teplot. Všechny studované mutace jsou funkčně důležité, každá ovšem poněkud jiným způsobem. Zjistili jsme, že proteiny s mutacemi D34G a N37T nejsou schopny protony transportovat ani za pokojové teploty, ani za vyšších teplot. To znamená, že residua Asp<sup>34</sup> a Asn<sup>37</sup> jsou pro správnou funkci transportéru nesporně důležitá. Ze srovnání s daty získanými pomocí akumulace radioaktivního substrátu –  $\text{Cd}^{2+}$  plyne, že tato rezidua jsou důležitá hlavně pro transport protonů. Pro proteiny s mutacemi H211Y, N250T a N401T jsme určili aktivační energii transportu. Protein N401T má aktivační energii srovnatelnou s divokým typem transportéru. Protein N250T má aktivační energii vyšší než divoký typ jak pro transport protonů, tak pro transport kadmia, Asn<sup>250</sup> může tedy zastávat například strukturní roli. Potvrdili jsme také důležitost residua His<sup>211</sup> pro transport protonů.

Na závěr je možno konstatovat, že práce přinesla jednak metodologické poznatky, z nichž některé budou využity v dalším studiu transportních proteinů z rodiny Nramp v bakteriálním modelovém systému, jednak některé nové poznatky o vztahu struktury a funkce transportního proteinu MntH bakterie *E. coli*, který vzhledem ke svým vlastnostem představuje dobrý prototyp proteinů studované rodiny.

## 6 Literatura

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell 4th ed.* Garland Science, New York and London.
2. Stryer, L., Berg, J. M., and Tymoczko, J. L. (2002) *Biochemistry, 5th ed.* W.H. Freeman & Co Ltd, New York.
3. Bhattacharya, P. K. (2005) *Metal Ions in Biochemistry* Alpha Science International Ltd., Harrow.
4. Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
5. Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J., and Gros, P. (2003) Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6, *Blood* 101, 3699-3707.
6. Camaschella, C. (2005) Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders, *Blood* 106, 3710-3717.
7. Moos, T. and Morgan, E. H. (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012, 14-26.
8. Courville, P., Chaloupka, R., and Cellier, M. F. M. (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters, *Biochemistry and Cell Biology* 84, 960-978.
9. Nevo, Y. and Nelson, N. (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 609-620.
10. Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., and Gros, P. (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane, *J. Exp. Med.* 192, 1237-1248.
11. Karupiah, G., Hunt, N. H., King, N. J., and Chaudhri, G. (2000) NADPH oxidase, Nramp1 and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response, *Rev. Immunogenet.* 2, 387-415.
12. Beaumont, C., Delaunay, J., Hetet, G., Grandchamp, B., de, M. M., and Tchernia, G. (2006) Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload, *Blood* 107, 4168-4170.
13. Lam-Yuk-Tseung, S., Touret, N., Grinstein, S., and Gros, P. (2005) Carboxyl-terminus determinants of the iron transporter DMT1/SLC11A2 isoform II (-IRE/1B) mediate internalization from the plasma membrane into recycling endosomes 3, *Biochemistry* 44, 12149-12159.



14. Fleming, M. D., Trenor, C. C., III, Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., and Andrews, N. C. (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene, *Nat. Genet.* 16, 383-386.
15. Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., and Andrews, N. C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1148-1153.
16. Su, M. A., Trenor, C. C., Fleming, J. C., Fleming, M. D., and Andrews, N. C. (1998) The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2, *Blood* 92, 2157-2163.
17. Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A. O., Drenzo, C., Robine, S., and Andrews, N. C. (2005) Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver, *J Clin. Invest* 115, 1258-1266.
18. Papp, K. M., Kehres, D., and Maguire, M. (2004) Manganese and iron transport by prokaryotic Nramp family transporters, in *The Nramp Family* (Cellier, M. and Gros, P., Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
19. Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P., Whittle, H. C., and Hill, A. V. (1998) Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans, *N. Engl. J. Med.* 338, 640-644.
20. Stienstra, Y., van der Werf, T. S., Oosterom, E., Nolte, I. M., van der Graaf, W. T., Etuafu, S., Raghunathan, P. L., Whitney, E. A., Ampadu, E. O., Asamoah, K., Klutse, E. Y., te Meerman, G. J., Tappero, J. W., Ashford, D. A., and van der, S. G. (2006) Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NRAMP1) D543N polymorphism, *Genes Immun.* 7, 185-189.
21. Li, H. T., Zhang, T. T., Zhou, Y. Q., Huang, Q. H., and Huang, J. (2006) SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis, *Int. J Tuberc. Lung Dis.* 10, 3-12.
22. Greenwood, C. M., Fujiwara, T. M., Boothroyd, L. J., Miller, M. A., Frappier, D., Fanning, E. A., Schurr, E., and Morgan, K. (2000) Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family, *Am. J. Hum. Genet.* 67, 405-416.
23. Cohen, A., Nelson, H., and Nelson, N. (2004) Metal-ion transporters: from yeast to human diseases, in *The Nramp Family* (Cellier, M. and Gros, P., Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
24. Luk, E., Jensen, L., and Culotta, V. C. (2004) The role of yeast Nramp metal transporter in manganese and iron homeostasis, in *The Nramp Family* (Cellier, M. and Gros, P., Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
25. Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters, *Mol. Cell Biol.* 20, 7893-7902.

26. Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D., and Krishna, S. (1999) Mycobacterium tuberculosis expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family, *J. Exp. Med.* 190, 717-724.
27. Que, Q. and Helmann, J. D. (2000) Manganese homeostasis in Bacillus subtilis is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins, *Mol. Microbiol.* 35, 1454-1468.
28. Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. (2000) Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter, *Mol. Microbiol.* 35, 1065-1078.
29. Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., and Maguire, M. E. (2000) The NRAMP proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen, *Mol. Microbiol.* 36, 1085-1100.
30. Papp-Wallace, K. M. and Maguire, M. E. (2006) Manganese transport and the role of manganese in virulence, *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 187-209.
31. Cellier, M. F., Bergevin, I., Boyer, E., and Richer, E. (2001) Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters, *Trends Genet.* 17, 365-370.
32. Richer, E., Courville, P., Bergevin, I., and Cellier, M. F. (2003) Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria, *J. Mol. Evol.* 57, 363-376.
33. Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., and Cellier, M. F. M. (2004) Determination of Transmembrane Topology of the Escherichia coli Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog, *J. Biol. Chem.* 279, 3318-3326.
34. Haemig, H. A. and Brooker, R. J. (2004) Importance of conserved acidic residues in mntH, the Nramp homolog of Escherichia coli, *J. Membr. Biol.* 201, 97-107.
35. Chaloupka, R., Courville, P., Veyrier, F., Knudsen, B., Tompkins, T. A., and Cellier, M. F. (2005) Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo, *Biochemistry* 44, 726-733.
36. Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology, *Biochemistry* 33, 3038-3049.
37. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *J. Mol. Biol.* 305, 567-580.
38. Rost, B., Fariselli, P., and Casadio, R. (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy, *Protein Sci.* 5, 1704-1718.
39. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

40. Cellier, M., Belouchi, A., and Gros, P. (1996) Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp*, *TIG 12*, 201-204.
41. Broome-Smith, J. K. and Spratt, B. G. (1986) A vector for the construction of translational fusions to TEM beta-lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology, *Gene 49*, 341-349.
42. Zelazny, A. and Bibi, E. (1996) Biogenesis and topology of integral membrane proteins: characterization of lactose permease-chloramphenicol acetyltransferase hybrids, *Biochemistry 35*, 10872-10878.
43. Cohen, A., Nevo, Y., and Nelson, N. (2003) The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ..
44. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., and Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature 388*, 482-488.
45. Portnoy, M. E., Jensen, L. T., and Culotta, V. C. (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast, *Biochem. J 362*, 119-124.
46. Forbes, J. R. and Gros, P. (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane, *Blood 102*, 1884-1892.
47. Haugland, R. P. (2005) *The Handbook (A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies)*, 10th ed. Invitrogen Corp..
48. Mackenzie, B. and Hediger, M. A. (2004) SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1, *Pflugers Arch. 447*, 571-579.
49. Tisa, L. S. and Adler, J. (1995) Cytoplasmic free-Ca<sup>2+</sup> level rises with repellents and falls with attractants in *Escherichia coli* chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92*, 10777-10781.
50. Gangola, P. and Rosen, B. P. (1987) Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem. 262*, 12570-12574.
51. Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature 394*, 192-195.
52. Olsen, K. N., Budde, B. B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B., Jakobsen, M., and Ingmer, H. (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.

53. Werthen, M. and Lundgren, T. (2001) Intracellular Ca(2+) mobilization and kinase activity during acylated homoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia liquefaciens*, *J Biol Chem* 276, 6468-6472.
54. Vecer, J., Holoubek, A., and Herman, P. (2004) Manipulation of intracellular pH by electroporation: an alternative method for fast calibration of pH in living cells, *Anal. Biochem.* 329, 348-350.
55. Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane, *Microbiol. Rev.* 56, 395-411.
56. Nakamura, I., Nakai, Y., and Izumi, H. (1996) Use of fura-2/AM to measure intracellular free calcium in *Selenomonas ruminantium*, *Tohoku J Exp. Med.* 179, 291-294.
57. Birdsall, D. C. and Cota-Robles, E. H. (1967) Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 93, 427-437.
58. Sullivan, C. J., Morrell, J. L., Allison, D. P., and Doktycz, M. J. (2005) Mounting of *Escherichia coli* spheroplasts for AFM imaging, *Ultramicroscopy* 105, 96-102.
59. Van Winkle, L. J. (1999) *Biomembrane Transport* Academic Press, San Diego.
60. Marangoni, A. G. (2003) *Enzyme kinetics: a modern approach* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
61. Hiraoka, Y. and Kimbara, K. (2002) Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2031-2035.
62. Jones, H. E., Holland, I. B., Baker, H. L., and Campbell, A. K. (1999) Slow changes in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium, *Cell Calcium* 25, 265-274.
63. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R. Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2135-2140.
64. Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., and Miyawaki, A. (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3197-3202.
65. Palmer, A. E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S. A., Lev-Ram, V., Baker, D., and Tsien, R. Y. (2006) Ca(2+) indicators based on computationally redesigned calmodulin-Peptide pairs, *Chem. Biol.* 13, 521-530.
66. Brož, J., Roskovec, V., and Valouch, M. (1980) *Fyzikální a matematické tabulky* SNTL, Praha.