

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



HOMEOSTÁZA VNITROBUNĚČNÉHO PH V PATOGENNÍCH KVASINKÁCH

CANDIDA ALBICANS* A *CANDIDA GLABRATA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Marie Kodedová, Ph.D., RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Hradec Králové 2020

Lucie Winterová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

Tato diplomová práce byla vypracována v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. v rámci projektu GA ČR 16-03398S a projektů MŠMT LQ1604 Národní program udržitelnosti II (Projekt BIOCEV-FAR) a „BIOCEV“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

Poděkování

Ráda bych poděkovala především RNDr. Marii Kodedové, Ph.D. za veškeré konzultace týkající se této diplomové práce, věcné připomínky, ochotný a vstřícný přístup a trpělivost. Dále děkuji Mgr. Hance Elicharové, Ph.D. za veškerý čas strávený v laboratoři během výzkumu a její cenné rady, a RNDr. Haně Sychrové, DrSc., že mi umožnila vytvořit tuto práci v celé její šíři na svém oddělení, i za její neméně důležité komentáře a podněty. Stejně tak bych chtěla poděkovat všem kolegům z Oddělení membránového transportu FGÚ AV ČR za jejich ochotu pomoci a skvělou náladu na pracovišti. Další poděkování patří prof. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D. za zaštitění této práce z pozice vedoucího.

Neméně důležité poděkování pak patří mé rodině, která mě podporovala nejen při tvorbě této práce, ale během celého dosavadního studia, a také Jardíku Kolihovi za pomoc s formálními úpravami, a především za to, že vždy trpělivě stojí při mně.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Winterová

Školitel: Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultantky: RNDr. Marie Kodedová, Ph.D., RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Název diplomové práce: **Homeostáza vnitrobuněčného pH v patogenních kvasinkách *Candida albicans* a *Candida glabrata***

Diplomová práce se věnuje studiu vlivu kultivačních podmínek na homeostázu vnitrobuněčného pH u kmenů kvasinek *Candida albicans* a *Candida glabrata* s delecemi membránových transportérů kationtů alkalických kovů *Cacnh1Δ* a *Cgtrk1Δ*. Hodnoty vnitrobuněčného pH byly měřeny pomocí pHluorinu, varianty zeleného fluorescenčního proteinu, exprimovaného v cytosolu buněk obou druhů kvasinek. Fluorescence exprimovaného pHluorinu byla ověřena pomocí fluorescenčního mikroskopu a byla stanovena závislost intenzity fluorescence pHluorinu na hodnotě vnitrobuněčného pH vytvořením kalibrační křivky. V rámci této diplomové práce byl zjištěn vliv složení kultivačního média (zejména různého zdroje dusíku) a vliv působení antimykotik (flukonazolu, klotrimazolu, amfotericinu B a terbinafinu) na hodnoty vnitrobuněčného pH obou kandid. Porovnáním s kontrolními kmeny byly zjištěny vlivy delecí *Cacnh1Δ* a *Cgtrk1Δ* na změny některých fyziologických parametrů, jako je schopnost a rychlost růstu za různých kultivačních podmínek nebo hodnoty vnitrobuněčného pH. Byla také stanovena různá citlivost jednotlivých druhů kvasinek vůči různým antimykotikům, přičemž *C. glabrata* vykazovala vyšší odolnost na všechna použitá antimykotika oproti *C. albicans*.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Winterová

Supervisor: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Consultants: RNDr. Marie Kodedová, Ph.D., RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Title of diploma thesis: **Intracellular pH homeostasis in pathogenic yeast *Candida albicans* and *Candida glabrata***

The thesis examines the influence of culture conditions on intracellular pH homeostasis in *Candida albicans* and *Candida glabrata* yeast strains with deletions of alkali-metal-cation membrane transporters, *Cacnh1Δ* and *Cgtrk1Δ*. Intracellular pH was measured with the use of pHluorin: a variant of a green fluorescent protein which had been expressed in the cytosol of both yeast species. Fluorescence of the expressed pHluorin was confirmed by a fluorescence microscopy and a calibration curve was created to determine the dependence of fluorescence intensity of pHluorin on intracellular pH. This thesis further demonstrates impact of medium composition (especially different nitrogen sources) and antifungal agents (fluconazole, clotrimazole, amphotericin B and terbinafine) on intracellular pH values in both yeasts. The effects of *Cacnh1Δ* and *Cgtrk1Δ* mutations were established on certain physiological parameters, such as the growth speed under different culture conditions or the intracellular pH value. Furthermore, the different susceptibility of yeast species to various antifungal agents was also determined, *C. glabrata* exhibited higher resistance to all tested antifungals compared to *C. albicans*.

Obsah

1. Seznam zkratek	11
2. Úvod.....	13
3. Teoretická část	14
3.1 Kvasinky.....	14
3.1.1 <i>Candida albicans</i>	15
3.1.2 <i>Candida glabrata</i>	16
3.1.3 Kandidózy.....	18
3.2 Antimykotika.....	20
3.2.1 Ergosterol.....	21
3.2.2 Další cíle antimykotik.....	24
3.3 Vnitrobuněčné pH a mechanismy jeho udržení.....	25
3.3.1 H ⁺ -ATPáza.....	25
3.3.2 Transportéry kationtů alkalických kovů	26
3.4 Měření vnitrobuněčného pH pomocí pHluorinu	31
4. Cíle práce	34
5. Experimentální část.....	35
5.1 Materiál.....	35
5.1.1 Mikroorganismy.....	35
5.1.2 Chemikálie	35

5.1.3	Roztoky	37
5.1.4	Pufry	37
5.1.5	Kultivační média	38
5.1.6	Pomůcky a přístroje.....	40
5.2	Metody	41
5.2.1	Stanovení optické hustoty (OD ₆₀₀) suspenze buněk.....	41
5.2.2	Kultivace buněk.....	41
5.2.3	Fluorescenční mikroskopie.....	42
5.2.4	Měření kalibračních křivek pro stanovení vnitrobuněčného pH	42
5.2.5	Měření vnitrobuněčného pH.....	45
5.2.6	Kapkové testy	47
5.3	Statistická analýza.....	48
6.	Výsledky.....	49
6.1	Ověření fluorescence exprimovaného pHluorinu	49
6.2	Konstrukce kalibrační křivky.....	50
6.2.1	Stanovení optimálních podmínek inkubace buněk s digitoninem.....	50
6.2.2	Závislost fluorescenční odpovědi pHluorinu na vnitrobuněčném pH _{in} (kalibrační křivka)	50
6.3	Vliv složení kultivačního média na pH _{in} kvasinek.....	52
6.4	Vliv působení antimykotik na vnitrobuněčné pH _{in}	55

6.4.1	Flukonazol	56
6.4.2	Klotrimazol	58
6.4.3	Amfotericin B	61
6.4.4	Terbinafin.....	64
7.	Diskuse.....	66
8.	Závěr	72
9.	Literatura.....	73

1. Seznam zkratek

AAs	Aminokyseliny
Acu	Transportní systém (z angl. Alkali cation uptake)
Amf	Amfotericin B
ATP	Adenosintrifosfát
CapH	SC5314 pHluorin
CapHcnh1Δ	SC5314 <i>cnh1Δ</i> pHluorin
CaWT	SC5314
CgK	ATCC 2001 <i>cnh1::FRT::CNH1-SAT1</i>
CgpH	ATCC 2001 [pGRB 2.2]
CgpHtrk1Δ1	ATCC 2001 <i>trk1Δ</i> [pGRB2.2] klon 1
CgpHtrk1Δ2	ATCC 2001 <i>trk1Δ</i> [pGRB2.2] klon 2
CgTrk1	Transportní systém (z angl. Transport of K ⁺) u <i>C. glabrata</i>
CgWT	ATCC 2001
Cnh1	Transportní systém (z angl. <i>Candida</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
DHA	Transportní systém (z angl. Drug:H ⁺ antiporter)
DMSO	Dimetylsulfoxid
Ena	Transportní systém (z angl. Efflux of natrium)
EtOH UV	Etanol pro UV spektroskopii
Flu	Flukonazol
GFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. Green Fluorescent Protein)
Gly	Glycin
Hak	Transportní systém (z angl. High affinity K ⁺ transporter)
I ₃₉₅	Intenzita emise vzorků s vlnovou délkou 508 nm při excitaci zářením s vlnovou délkou 395 nm
I ₄₇₅	Intenzita emise vzorků s vlnovou délkou 508 nm při excitaci zářením s vlnovou délkou 475 nm
Klot	Klotrimazol
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
Nat	Nourseotricin
Nha	Transportní systém (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
OD ₆₀₀	Optická hustota měřená při 600 nm

PBS	Fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
pH _{in}	Vnitrobuněčné pH
Pma1	Transportní systém (z angl. Plasma membrane H ⁺ -ATPase)
R _{395/475}	poměr celkových intenzit emise s vlnovou délkou 508 nm z čistého příspěvku pHluorinu při excitaci zářením s vlnovou délkou 395 a 475 nm
Ser	Serin
TEA	Trietanolamin
Terb	Terbinafin
Tok	Transportní systém (z angl. Transport outward K ⁺)
Trk	Transportní systém (z angl. Transport of K ⁺)
Tyr	Tyrosin
w/o	Bez (z angl. Without)
YAT	Transportní systém (z angl. Yeast Amino acid Transport)
YNB	Růstové médium (z angl. Yeast Nitrogen Base)
YNB-F ^{pH}	Růstové médium bez draslíku a fluorescenčních složek pro měření pH
YNB ^{pH}	Růstové médium bez fluorescenčních složek pro měření pH
YPD	Růstové médium (z angl. Yeast Peptone Dextrose)

2. Úvod

Kvasinkové infekce zaznamenaly během posledních let významný nárůst a jsou častou příčinou závažných systémových infekcí hospitalizovaných pacientů a osob s chronickým onemocněním oslabujícím imunitní systém. Za tyto infekce je v největší míře zodpovědný rod *Candida*, nejčastěji zastoupený druhy *Candida albicans* a *Candida glabrata* (Silva et al. 2011). V současné terapii kandidóz se vyskytuje několik skupin antimykotických léčiv. Žádná z nich však nedisponuje ideálními vlastnostmi a léčba je často doprovázena řadou nežádoucích účinků. Ty jsou zapříčiněny částečně nespecifickým působením těchto látek na cílové struktury hostitelských buněk. Společný eukaryotický původ lidských a kvasinkových buněk vývoj nových antimykotik znesnadňuje a cílem současného výzkumu je nalézt takové struktury, které jsou specifické pouze pro buňky patogenu a jejichž přítomnost je zároveň pro životaschopnost těchto patogenů kritická (Roemer a Krysan 2014). Specifické enzymy a transportéry kvasinek, lišící se strukturou a mechanismem od těch lidských, jsou slibným cílem budoucí antimykotické léčby, která by díky vysoké specifitě účinku neovlivňovala funkce hostitelových buněk a zamezila vzniku nežádoucích účinků. Stěžejním předpokladem pro život každé živé buňky je schopnost udržovat si stále vnitrobuněčné prostředí. Mezi nejdůležitější vlastnosti buněk, ovlivňující množství fyziologických procesů, patří homeostáza vnitrobuněčného pH úzce související s homeostázou kationtů alkalických kovů. Z těchto kationtů jsou pro buňku obzvláště důležité kationty draselné a jejich vysokou koncentraci musí být buňky schopné udržovat i v měnících se vnějších podmínkách. Delece některého ze specifických transportérů těchto iontů může mít za následek nerovnováhu v buněčných parametrech, zhoršenou schopnost růstu nebo zvýšenou citlivost buněk vůči vnějším vlivům. Pro druh *C. glabrata* je velice důležitý transportér Trk1 jakožto jediný membránový importér draselných iontů u tohoto druhu kvasinek. Studium jeho funkcí je prvotním předpokladem pro možný budoucí výzkum inhibitorů tohoto transportéru, potenciálně použitelných jako nová antimykotická léčiva (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

3. Teoretická část

3.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy. Spolu s plísněmi patří do říše hub, která zaujímá přibližně 7 % všech eukaryotických druhů na Zemi. I přes to, že spolu netvoří jednotnou taxonomickou skupinu, patří většina kvasinek mezi askomycety, tedy do třídy vřeckovýtrusných hub (Kocková-Kratochvílová 1990, Mayer et al. 2013)

Mezi kvasinky řadíme druhy od výhradně saprofytických až po potenciální původce onemocnění lidí, zvířat a rostlin. Nejčastěji se však jedná o organismy nepatogenní. Některé druhy jsou používány k přípravě pekařského droždí, nebo se využívá jejich kvasných pochodů ve vinařském či pivovarnickém odvětví. Mezi nejznámější nepatogenní zástupce patří kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Díky své jednobuněčné a poměrně jednoduché struktuře je využívána, podobně jako některé další kvasinky, jako modelový organismus k výzkumným účelům. Množství fyziologických procesů u ní totiž probíhá stejně jako u složitějších vyšších eukaryot. Její výhodou je kromě snazší manipulace také vysoká rychlost množení nebo přítomnost plazmidu, který je vhodným nástrojem genového inženýrství (Klaban 2011).

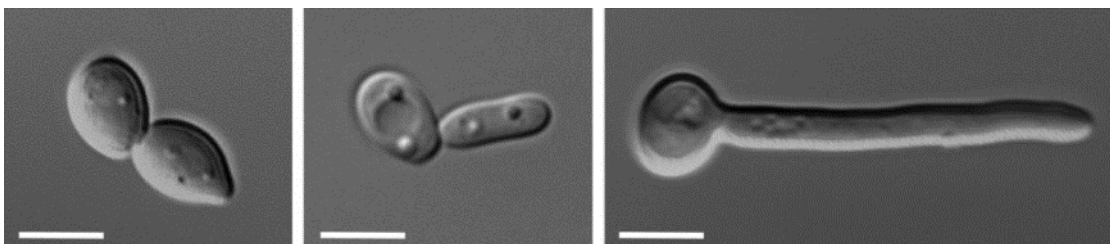
I přes převažující výskyt nepatogenních druhů kvasinek byl v posledních 30 letech zaznamenán významný nárůst mykotických infekcí (Silva et al. 2011). Někteří jejich původci infikují ročně miliardy lidí, mají na svědomí extrémně vysokou úmrtnost a schopnost vyvolat fatální infekce u stejného počtu lidí jako například malárie nebo tuberkulóza (Brunke a Hube 2012). Mezi nejčastější příčiny mykotických infekcí patří především kvasinky rodu *Candida*, a to i přes to, že tento rod zahrnuje jen malé procento patogenních druhů. Většina z nich totiž není schopna růst při teplotě okolo 37 °C a nedokáže tedy úspěšně kolonizovat lidské tělo (Silva et al. 2011). Za kandidózy, tedy infekce způsobené kvasinkami rodu *Candida*, je pak v 92 % případů zodpovědných pouze 5 nejčastěji se vyskytujících druhů, a to *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei* (Turner a Butler 2014, Pappas et al. 2015). K tomuto výčtu během posledních let přibyl také globálně rozšířený druh *Candida auris*, který je díky mnohačetné lékové rezistenci a vysoké mortalitě předmětem intenzivního výzkumu (Spivak a Hanson 2018). Převážná většina

kandid patří mezi komenzály lidského těla, které se asymptomaticky vyskytují u velkého procenta lidské populace (Mayer et al. 2013). Jedná se tedy o patogeny oportunní, k propuknutí infekce dojde až v případě nerovnováhy mezi obrannými mechanismy člověka a virulentními faktory kvasinky.

3.1.1 *Candida albicans*

C. albicans je polymorfní diploidní kvasinka. Vyskytuje se jednak ve stádiu pučících buněk, jednak ve formě vláknitých pseudohyf či hyf, viz Obr. 1 (Vilaa et al. 2017). U člověka může asymptomaticky osidlovat kůži, sliznice nebo gastrointestinální či urogenitální trakt. Časté jsou její nálezy například ve sputu, výtěrech zvukovodů, vaginálních sekretech, v moči nebo ve stolici (Klaban 2011). Její přítomnost v lidském těle bez současného vyvolání infekce je zajišťována a kontrolována obrannými mechanismy imunitního systému člověka, a to především mukózními povrchy nebo bakteriálním mikrobiomem (Dantas et al. 2016). Porušení některé z těchto ochranných bariér nebo převaha virulentních faktorů kvasinky může vyvolat její přemnožení s přechodem do patogenity a následným propuknutím infekce (Vilaa et al. 2017). *C. albicans* je nejčastější oportunní patogen všech kvasinkových infekcí, je izolována u 50 – 70 % infikovaných pacientů (Cataldi et al. 2016) a reprezentuje 80 % všech kandidóz (Silva et al. 2011). Její vysoká patogenita je zapříčiněna řadou virulentních faktorů.

Jedním z nich je schopnost filamentace do podoby hyf (Vilaa et al. 2017), na které se podílí mimo jiné také pH prostředí. V nižších hodnotách ($\text{pH} < 6$) převažuje kvasinková forma, přičemž ve vyšších hodnotách ($\text{pH} > 7$) dochází k růstu hyf (Mayer et al. 2013). Zatímco kvasinkové stádium se účastní brzké fáze infekce, napomáhá adhezi k povrchům, diseminaci do krevního řečiště a dalších orgánů, hyfální stádium má schopnost invazivně napadat tkáň a orgány hostitele (Vilaa et al. 2017). *C. albicans* zároveň dokáže po obsazení epitelu vyvolávat silnou imunitní odpověď, ničit obranné makrofágy, poškozovat hostitelovy tkáň a odebírat z nich potřebné mikro- a makroživiny (Brunke a Hube 2012).



Obr. 1: Znárodnění polymorfismu kvasinky *C. albicans*. Kvasinková pučící forma (vlevo), stádium pseudohyfy (uprostřed) a hyfy (vpravo). Měřítko: 5 μ m. Převezato a upraveno podle (Bates 2018).

Dalším virulentním faktorem je tvorba biofilmů. Jedná se o skupiny těsně spojených buněk, propojených extracelulární matrix, přilehlých k různým povrchům, a to jak biotickým (orální nebo vaginální mukózní povrchy, tkáň apod.), tak abiotickým (intravenózní a močové katetry, protetické pomůcky, biomateriály, kontaktní čočky, chlopenní, kloubní nebo zubní náhrady apod.). Tyto biofilmy jsou často rezistentní nejen k hostitelově imunitnímu systému, ale i k antimykotické léčbě. Mají také, díky extracelulární matrix, zvýšenou odolnost k chemickým i fyzikálním vlivům, a představují tudíž často závažný klinický problém (Gulati a Nobile 2016, Nobile a Johnson 2015). *C. albicans* je úspěšným patogenem i díky schopnosti adaptace na měnící se podmínky prostředí, jako jsou hodnoty pH, hladiny kyslíku a oxidu uhličitého nebo množství přítomných živin. Je také schopna využívat různé zdroje uhlíku v závislosti na části těla, ve které se právě nachází (Dantas et al. 2016).

3.1.2 *Candida glabrata*

V posledních desetiletích se výskyt infekcí způsobených *nealbicans* druhy významně zvýšil a jejich narůstající role se dostala do popředí zájmů. Vedle dominujícího druhu *C. albicans* bylo ve vzorcích izolovaných od 77 pacientů nalezeno dalších 80 druhů z rodu *Candida*, z nichž nejčastěji zastoupeným byl druh *C. glabrata* (Cataldi et al. 2016). Vysoká prevalence tohoto druhu je dána především zvýšenou rezistencí vůči velkému počtu antimykotik. Ta může být způsobena tvorbou biofilmů, které následně znemožňují penetraci léčiva do buněk, mutacemi genů kódujících různé kroky v dráze syntézy ergosterolu, jakožto častého cíle antimykotik, nebo i zvýšenou expresí transportních systémů snižujících vnitrobuněčnou koncentraci léčiva (Silva et al. 2011, Lv et al. 2016). Rezistence se následně

klinicky projeví neustupujícími symptomy infekce i po aplikaci antimykotik v jinak běžně dostačujících MIC (minimálních inhibičních koncentracích) (Silva et al. 2011).

C. glabrata je druhým nejčastějším původcem kandidóz. Opět se jedná o komenzála lidského těla schopného za určitých okolností přejít do patogenní formy a vyvolat infekci. Ačkoliv o ní mluvíme jako o kandidě, je z fylogenetického hlediska mnohem více příbuzná kvasince *S. cerevisiae*. Ve skupině *Saccharomycetaceae* se totiž vyskytují převážně druhy, které často ani lidské tělo neosidlují a *C. glabrata* tak zůstává jedním z mála patogenů této vývojové větve. I přes společné taxonomické zařazení můžeme mezi těmito dvěma kvasinkami nalézt mnohé rozdílnosti. Oproti druhu *S. cerevisiae* je totiž *C. glabrata* schopna velmi dobře růst při teplotách okolo 37 °C, je více rezistentní vůči stresovým podmínkám, schopna přežít i při nedostatku živin a částečná odlišnost ve složení a stavbě buněčné stěny, která obsahuje širokou škálu adhezínů, jí napomáhá lépe přilnout k povrchům (Bolotin-Fukuhara a Fairhead 2014, Gabaldón a Carreté 2015). Po adhezi je schopna tvořit biofilm vysoce rezistentní k antimykotikům (Llopis-Torregrosa et al. 2019). Její přítomnost ve střevě svědčí také o její schopnosti přizpůsobovat se omezenému množství kyslíku, využívat různé zdroje uhlíku (Bolotin-Fukuhara a Fairhead 2014) nebo rychle reagovat na změny pH (Llopis-Torregrosa et al. 2019).

Navzdory schopnosti infikovat člověka se však *C. glabrata* chová odlišně od ostatních patogenních kandid (Bolotin-Fukuhara a Fairhead 2014). Rozdílnost ve fylogenezi nasvědčuje, že evoluční vývoj vedoucí k patogenezi musel být u jednotlivých druhů zcela odlišný a schopnost infikovat člověka se u nich vyvinula nezávisle na sobě (Gabaldón a Carreté 2015, Brunke a Hube 2012). Oproti druhu *C. albicans* se jedná o haploidní organismus. *C. glabrata* také není schopna v hostiteli tvořit hyfy ani pseudohyfy, čímž postrádá jeden z důležitých virulentních faktorů (Gabaldón a Carreté 2015). Díky absenci této invazivní růstové formy nezpůsobuje extenzivní epitelové poškození a nevyvolává tak silnou imunitní odpověď hostitele (Brunke a Hube 2012). Patří tudíž ve svém rodu mezi méně virulentní zástupce. Pokud však infekci vyvolá, dokáže se velmi rychle šířit a disponuje vysokou úmrtností (Healey et al. 2016). Vedle zmíněné rezistence může být jednou z příčin vysoké úmrtnosti také schopnost setrvávat po interakci s imunitním systémem uvnitř makrofágů a takto se i nadále množit (Bolotin-Fukuhara a Fairhead 2014,

Gabaldón a Carreté 2015), čímž může dojít i k invazi do krevního řečiště a dalších orgánů (Brunke a Hube 2012). Stále častěji se u ní také vyvíjí mnohačetná léková rezistence, tedy odolnost ke dvěma a více skupinám léčiv naráz (Healey et al. 2016).

3.1.3 Kandidózy

Rostoucí počet infekcí rodu *Candida* v posledních letech je paradoxně způsoben především modernizací medicíny. Výskyt těchto onemocnění ovlivňuje pokrok v oblasti chemoterapie a transplantace, vyšší počet pacientů na jednotkách intenzivní péče a jejich dlouhodobější hospitalizace, prodlužující se průměrný věk populace, množství pacientů s chronickým onemocněním oslabujícím imunitní systém, jako je HIV nebo leukemie, rozšířené používání invazivních technologií, implantátů a protéz, nebo také užívání širokospektrých antibiotik a antimykotik (Hartl et al. 2012, Cataldi et al. 2016). Patogenní efekt kandid může být způsoben ať už přímým napadením živé tkáně, produkcí mykotoxinů, nebo i nepřímo vyvoláním různých forem alergií (Hartl et al. 2012). Tyto infekce se však u zdravých jedinců vyskytují jen vzácně a k jejich propuknutí je často zapotřebí přítomnost alespoň jednoho z rizikových faktorů. Mezi ně obecně patří stavy doprovázené oslabenou imunitou jako výše zmíněná chronická onemocnění, imunosuprese po transplantacích, chemoterapie, léčba kortikoidy, antibiotiky nebo antimykotiky či diabetes mellitus. Kandidózy pak můžeme dělit na lehčí povrchové a závažnější systémové (Candidiasis 2020).

Povrchové kandidózy

Na kůži napadají kandidy nejčastěji oblasti mezi prsty, především u nohou (Klaban 2011). Častou slizniční formou je kandidóza ústní dutiny. Může se také jednat o kandidózu oropharyngeální, spojenou s napadením hrtanu, nebo po rozšíření na jícen o kandidózu esophageální. Mezi symptomy patří bělavé moučné skvrny na dásních a jazyku (odtud pojmenování *Candida*, z latinského *candidus* = bílý, *C. albicans* pak v překladu bílý bílý), v češtině známé také pod pojmem moučnivka (Klaban 2011, Klaban 2005). Může se také projevat začerváním, bolestí při polykání až ztrátou chuti. Kromě zmíněných predispozičních faktorů jsou rizikové také pacienti s astmatem, léčbou nebo onemocněním způsobující sucho v ústech, kuřáci nebo lidé používající zubní náhrady. Léčba je nejčastěji

lokální, a to klotrimazolem, mikonazolem nebo nystatinem. U závažnějších infekcí lze podat orálně flukonazol (Candidiasis 2020).

Další formou povrchové kandidózy je forma vulvovaginální. Za 90 % těchto infekcí je zodpovědná *C. albicans*, přestože výskyt *nealbicans* původců, s převažujícím druhem *C. glabrata*, stále roste. Tato kandidóza se projevuje svěděním, bolestivostí při pohlavním styku nebo močením nebo abnormálním vaginálním výtokem. Rizikovým faktorem je mimo jiné těhotenství nebo užívání hormonální antikoncepce (Candidiasis 2020). *C. albicans* bývá často přítomna i ve vodách bazénů, čímž může dojít k přenosu (Klaban 2011). Jedná se o hojně se vyskytující onemocnění, přibližně 75 % žen se alespoň jednou za život s takovou infekcí setká, 40 – 50 % ji pak během života prodělá vícekrát, přičemž až 5 % žen trpí rekurentní infekcí (Vilaa et al. 2017, Mayer et al. 2013). Léčba probíhá především s pomocí přípravků s lokálním účinkem, tedy krémů nebo globulí s obsahem klotrimazolu nebo mikonazolu, které jsou i volně prodejné. U těžších infekcí je opět možná dávka orálního flukonazolu (Candidiasis 2020).

Kandidy jsou také zodpovědné za 10 % všech infekcí močového traktu hospitalizovaných pacientů. Až v 50 % případů jsou způsobené druhy *nealbicans*, přičemž *C. glabrata* je zde nejčastěji zastoupeným patogenem. Velká část pacientů vykazuje asymptomatickou kandidurii, tedy výskyt mikroorganismů v moči bez příznaků infekce. Občasně se však mohou vyvinout potíže nižšího močového ústrojí, a to převážně u pacientů se zavedeným katetrem. Vzestup infekce na vyšší orgány např. ledviny je vzácný a vyskytuje se pouze v přítomnosti obstrukce nebo po zavedení stentu. Kandidózy močového ústrojí jsou nejčastěji léčeny amfotericinem B nebo flukonazolem (Fidel Jr. et al. 1999).

Kromě výše uvedených infekcí se po napadení dýchacích cest může také vyvinout kandidóza respiračního ústrojí neboli kandidová bronchitida, případně může dojít i k postižení plicního parenchymu (Klaban 2011).

Systémové kandidózy

Vedle povrchových infekcí se mohou kandidy rozšířit krevním řečištěm a postihnout i hlouběji uložené tkáně a orgány. Tím vyvolávají daleko závažnější, systémové kandidózy,

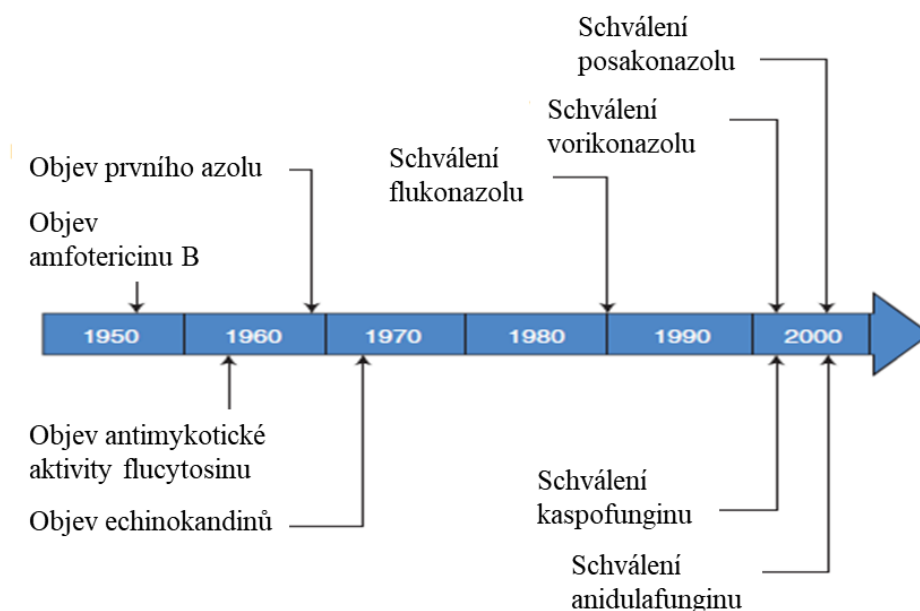
nejčastěji se vyskytující u hospitalizovaných pacientů (Candidiasis 2020). Zaujímají až okolo 9 % všech nozokomiálních infekcí, tedy infekcí vzniklých v nemocničním prostředí, a jsou, spolu s rodem *Enterococcus*, třetím nejčastějším organismem nalezeným v krvi hospitalizovaných pacientů (Wisplinghoff et al. 2004). Zvyšující se výskyt těchto infekcí může být dán jednak lepšími diagnostickými metodami, jednak také adaptací těchto organismů k nehostinným vnějším vlivům a jejich schopností disponovat vysokou mírou odolnosti k používaným antimykotikům. Stále větším problémem se vedle kvasinky *C. albicans* stávají velmi rezistentní *nonalbicans* druhy. Tyto infekce pak vykazují vysokou morbiditu i mortalitu (Cataldi et al. 2016).

K rozvoji systémových infekcí dochází v případě, kdy se *Candida* dostane z asymptomaticky osidlované části lidského těla do krevního řečiště, nebo dojde vlivem užívání širokospektrých antibiotik k potlačení přirozené mikroflóry a následně k přemnožení kvasinky. Rizikové jsou tedy především pacienti na jednotkách intenzivní péče, lidé s poškozenou gastrointestinální mukózní bariérou vlivem traumatu nebo operace, pacienti s centrálními žilními katetry, totální parenterální výživou, s oslabeným imunitním systémem, neutropenií, selháním ledvin nebo hemodialýzou (Mayer et al. 2013, Candidiasis 2020). Symptomy těchto infekcí jsou těžko rozeznatelné, často spojené s příznaky jiného vážného onemocnění. Jsou tedy velmi často nespecifické, od zimnice nebo horečky neustupující po léčbě antibiotiky po rozvinutí sepse, která může vést až k septickému šoku. K léčbě se nejčastěji podávají nejúčinnější intravenózní antimykotika, jako flukonazol, amfotericin B nebo echinokandiny (Fidel Jr. et al. 1999, Candidiasis 2020).

3.2 Antimykotika

Společný eukaryotický původ kvasinkové a lidské buňky značně komplikuje snahu o vývoj ideálního antimykotika. Představa o nalezení takového léčiva spočívá v jeho schopnosti působit pouze na buňku patogenu bez současného zasažení buněk vlastního organismu, a tím i v minimalizaci toxických účinků pro člověka. Pokroku ve vývoji antimykotik tedy předchází studie takových struktur a metabolických drah patogenu, které se liší od lidských. Žádná z dnes používaných skupin antimykotik však nedisponuje ideálními vlastnostmi a léčba je často doprovázena řadou nežádoucích účinků. Vývoj nových

léčiv postupuje velice pomalu, dvě ze tří nejpoužívanějších skupin byly představeny před více než 40 lety (viz Obr. 2), a terapeutické možnosti jsou daleko pozadu vůči klinickým potřebám, odrážejícím zvyšující se incidenci závažných mykotických infekcí navíc komplikovaných stále častěji se vyskytující rezistencí (Roemer a Krysan 2014).



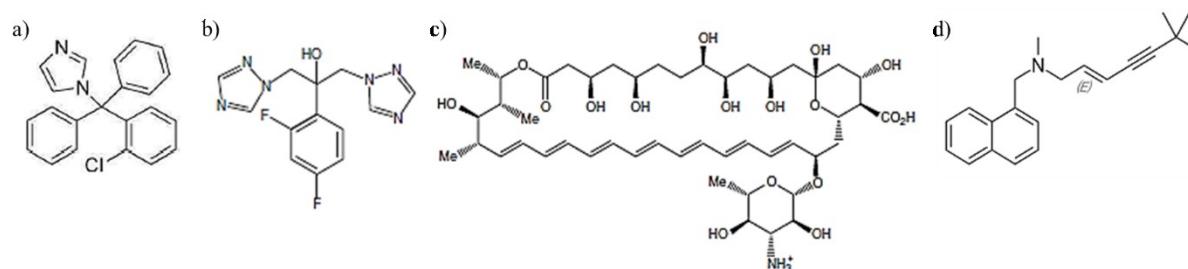
Obr. 2: Schéma zobrazující důležité milníky vývoje antimykotik. Převzato a upraveno podle (Roemer a Krysan 2014).

Mezi nejčastější cíle současné antimykotické terapie patří ergosterol v cytoplasmatické membráně kvasinek a dráha jeho syntézy, syntéza β -glukanů obsažených v buněčné stěně nebo také pochody probíhající uvnitř buněčného jádra.

3.2.1 Ergosterol

Steroly patří mezi základní složky buněčných membrán. Napomáhají udržovat jejich heterogenitu, zajišťují jejich integritu, rigiditu a fluiditu. Nejdůležitějším sterolem kvasinkových organismů je ergosterol. Je syntetizován v endoplasmatickém retikulu, skladován v lipidových kapénkách (lipid droplets) a kromě cytoplasmatické membrány je obsažen také v membránách některých organel, jako jsou peroxisomy, mitochondrie nebo

vakuoly (Lv et al. 2016). Vzorce vybraných zástupců antimykotik působících na ergosterol jsou zobrazeny na Obr. 3.



Obr. 3: Chemické vzorce vybraných zástupců antimykotik a) flukonazol, b) klotrimazol, c) amfotericin B, d) terbinafin. Převzato a upraveno podle (Ramos et al. 2016, Roemer a Krysan 2014).

Azolová antimykotika

K zajištění integrity buněčné membrány je důležitá prostorová asymetrie molekul sterolů, způsobená chybějícími C4 methylovými skupinami. To je v biosyntéze ergosterolu, stejně jako u syntézy cholesterolu v lidských buňkách, umožněno cytochrom P450 dependentním enzymem, C14 α demetylázou. Inhibice tohoto kroku s převažující afinitou vůči kvasinkovému cytochromu P450 vede nejen k nedostatku ergosterolu pro správnou funkci buněčné membrány, ale také k akumulaci nefunkčních prekurzorů vedoucí ke změně struktury a vlastností membrány (Ghannoum a Rice 1999). Na tomto principu funguje nejdůležitější skupina antimykotik, a to antimykotika azolová. Jedná se o léčiva syntetického původu a lze je na základě počtu dusíků v pětičlenném kruhu dělit na imidazoly (2 N) a triazoly (3 N). Starší imidazolové deriváty zahrnují klotrimazol, ketokonazol, bifonazol a mikonazol. Jedná se především o topické přípravky disponující vysokou schopností penetrace. Nejčastěji používaný zástupce, klotrimazol, je hojně využíván k léčbě vaginálních infekcí nebo plísni nohou a je možné jej zakoupit i ve volném prodeji. Novější triazolová antimykotika patří mezi standard této skupiny léčiv a u některých forem systémových mykóz dokonce nahradily do té doby nejpoužívanější amfotericin B (Hartl et al. 2012, Dixon a Walsh 1998). Vedle nejdůležitějšího zástupce, flukonazolu, zahrnuje tato skupina také itrakonazol, vorikonazol a posakonazol. Jedná se o nejdůležitější skupinu syntetických systémových antimykotik. Oproti ostatním látkám mají širší spektrum účinku a vyžadují také

nižší MIC. Zároveň jsou v porovnání s imidazolovými antimykotiky ještě specifitější vůči cytochromu P450 kvasinek oproti lidskému, což má za následek jejich sníženou toxicitu. Flukonazol je u mnoha systémových infekcí lékem volby. Díky své nízké lipofilitě a slabé vazbě na plazmatické proteiny vykazuje dobrou distribuci do vodných kompartmentů včetně cerebrospinální tekutiny. Vedle intravenózního podání se také snadno absorbuje orálně (Sheehan et al. 1999). Jeho nevýhodou je však stále narůstající rezistence (Vilaa et al. 2017). Itrakonazol lze oproti tomu podávat pouze orálně. V porovnání s flukonazolem se jedná o lipofilnější látku s vyšší vazbou na plazmatické proteiny, čímž je schopen dosahovat vyšších koncentrací v tukových tkáních a exsudátech (Sheehan et al. 1999). Nežádoucí účinky nejsou u azolových antimykotik tak časté, jako je tomu například u polyenů. Po delším užívání se ale kromě nauzey a zvracení objevuje také riziko velmi závažné jaterní toxicity. Časté jsou u nich také interakce s jinými léčivy (Dixon a Walsh 1998).

Polyeny

Od roku 1950 až do objevu azolových antimykotik byly polyeny první volbou léčby systémových mykotických infekcí. Jedná se o látky přírodního původu produkované bakteriemi rodu *Streptomyces* (Hartl et al. 2012). Nejdůležitějším zástupcem je amfotericin B. Má široké spektrum účinku a je používán především pro léčbu život ohrožujících mykóz (Dixon a Walsh 1998). Vytváří hydrofobní vazby s ergosterolem v membráně kvasinek za vzniku pórů. Jejich přítomnost pak vede ke změně permeability membrány, úniku vitálních cytosolických komponent z buňky a následně i k její smrti. Ačkoliv jsou polyeny nejúčinnějšími látkami v boji proti kandidózám, jejich použití je kvůli množství nežádoucích účinků omezené. Kromě úzkého terapeutického indexu vykazují hepatotoxicitu nebo nefrotoxicitu s nebezpečím rozvoje renálního selhání (Vilaa et al. 2017). Jelikož lze amfotericin B podávat pouze intravenózně, může způsobovat i vedlejší účinky v podobě zimnice nebo plebitid, související s aplikací infuze (Dixon a Walsh 1998). Částečného snížení toxicity se ale podařilo dosáhnout vytvořením liposomálních forem, tvorbou lipidových komplexů nebo koloidních disperzí. Tyto technologické úpravy jsou však mnohem více finančně náročné než konvenční amfotericin B, a tedy i méně používané (Vilaa et al. 2017). Mezi další zástupce patří nystatin a natamycin (primaricin) (Hartl et al. 2012). Nystatin byl vůbec prvním objeveným antimykotikem, má široké spektrum účinku, kvůli své

toxicitě je však limitován pouze na vnější topické užití. Natamycin se používá k léčbě povrchových infekcí oka (Dixon a Walsh 1998).

Allylaminy a morfoliny

Allylaminy, zahrnující terbinafin a naftifin, jsou látky syntetického původu blokující časnou fázi syntézy ergosterolu, a to inhibicí enzymu skvalenepoxidázy. Dojde tak nejen k nedostatečné produkci ergosterolu, ale také k akumulaci skvalenu v membráně, kde ve vyšších koncentracích působí toxicky. Dalším inhibitorem syntézy ergosterolu je morfolinový derivát amorolfín (Hartl et al. 2012).

3.2.2 Další cíle antimykotik

Mezi další cíle antimykotik patří buněčná stěna. Ta má díky obsahu mananu, chitinu a α - a β -glukanů složení unikátní pro zástupce říše hub. Cílením na tyto struktury je eliminováno nebezpečí zasažení buněk lidského těla a jedná se tedy o nejbezpečnější antimykotika. Všechny dosud používané látky působící na úrovni buněčné stěny jsou zaměřeny na syntézu β -glukanů. Takovým příkladem jsou jedny z nejnovějších antimykotik, echinokandiny, specifické inhibitory glukansyntázy. Jedná se o inhibitory nekompetitivní, působící cytologické a strukturální změny buněčné stěny, které mají za následek zhoršený růst hyf, ztluštělou buněčnou stěnu a neschopnost rozmnožování (Ghannoum a Rice 1999). Mezi zástupce patří kaspofungin, mikafungin a anidulafungin (Silva et al. 2011).

Na úrovni jádra působí flucytosin, který je transportován specifickou cytosinovou permeázou do kvasinkové buňky, kde je přeměněn na falešné substráty a inhibuje tak syntézu DNA. Dále je také v podobě nefunkčního nukleotidu inkorporován do RNA, čímž inhibuje syntézu RNA a proteinů. Dalším příkladem je přírodní antibiotikum griseofulvin poškozující dělicí vřeténka, a tím inhibující mitózu kvasinkových buněk (Silva et al. 2011).

Na principu inhibice přenosu prekurzorů přes cytoplazmatickou membránu účinkuje ciklopirox. Má za následek narušení syntézy DNA, RNA i proteinů, ve vyšších koncentracích může narušit i permeabilitu buněčné membrány (Hartl et al. 2012).

3.3 Vnitrobuněčné pH a mechanismy jeho udržení

Jako všechny živé buňky, musí být i kvasinky schopny reagovat na stále se měnící podmínky okolního prostředí, zachovávat si životně důležité funkce a fyziologické parametry. Jedním z nich jsou i koncentrace různých iontů, jako například protonů (pH) nebo kationtů alkalických kovů.

Udržování optimálního vnitrobuněčného pH je jeden z předpokladů průběhu základních buněčných funkcí, jako je redoxní potenciál nebo transport iontů a nutrientů přes cytoplazmatickou membránu i v rámci jednotlivých organel. Koncentrace protonů uvnitř buňky je také zásadní pro enzymovou kinetiku, jelikož dochází k ionizaci postranních řetězců aminokyselin v proteinech, a tím k ovlivnění jejich struktury, rozpustnosti a aktivity. Změny v pH tak ovlivňují víceméně všechny biochemické procesy v buňce. Jelikož se hodnota pH také liší mezi organelami, příkladem může být zásaditější prostředí mitochondrií (pH 7,5) oproti cytosolu (pH 7,2), musí docházet k jejímu udržování pomocí regulované sítě komplexních reakcí, pufovacích mechanismů a membránových transportních systémů (Oriji et al. 2009, Marešová et al. 2010). Tyto transporty jsou v buňce navzájem úzce propojené a přenos jednoho iontu může vzápětí ovlivnit pohyb několika dalších.

3.3.1 H^+ -ATPáza

Gradient protonů přes cytoplazmatickou membránu je využíván v buňkách kvasinek jako hnací síla potřebná k transportu dalších iontů a živin. Tento elektrochemický gradient je tedy nutné stále vytvářet pomocí přenosu protonů, a to i proti jejich koncentračnímu gradientu. K tomu kvasinkám slouží H^+ -ATPáza Pma1 (plasma membrane H^+ -ATPase), nacházející se v cytoplazmatické membráně. Ta při spotřebě ATP, činící až 20 % všech buněčných zásob, vylučuje protony ven z buňky (Ariño et al. 2019). Tento gradient může být v buňce využit k dalším transportním procesům, vedoucím například k odstranění nežádoucích a často toxických monovalentních kationtů alkalických kovů nebo antimykotik. Kromě cytoplazmatické membrány existují u kvasinek také strukturně odlišné mitochondriální F_0F_1 ATPázy, nebo V-ATPázy, přítomné v membránách vakuol, Golgiho aparátu a dalších organel (Ariño et al. 2010). Ty pomáhají udržovat elektrochemický

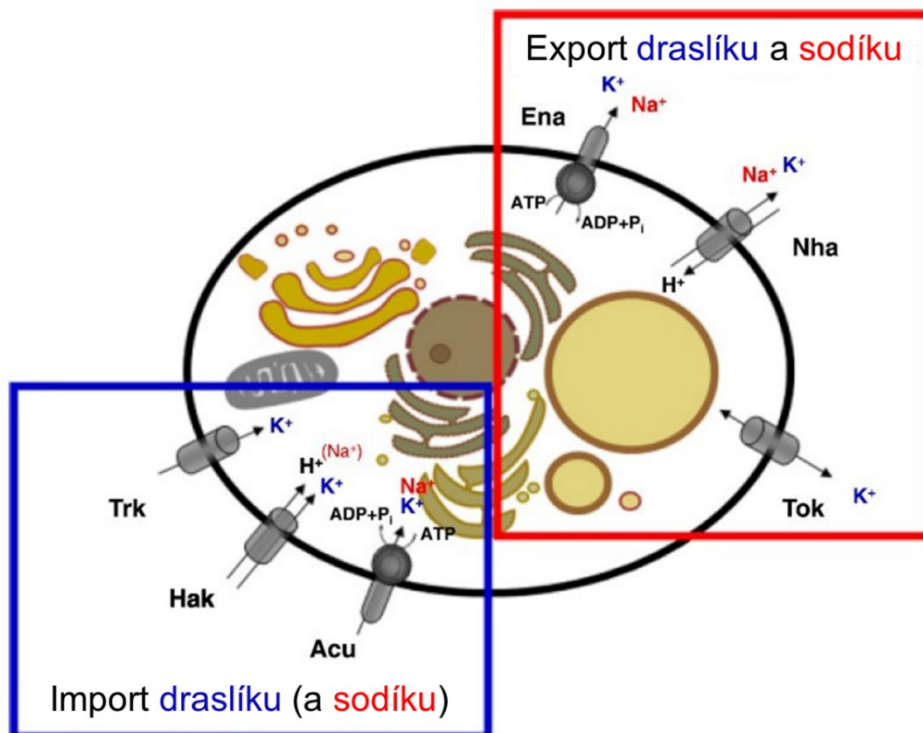
potenciál membrán vnitrobuněčných kompartmentů, a hrají tedy také kritickou roli v mnoha fyziologických procesech, včetně homeostázy iontů (Ramos et al. 2016).

Vedle protonových pump se na udržování vnitrobuněčného pH velkou měrou podílí také transportéry kationtů alkalických kovů (Marešová et al. 2010).

3.3.2 Transportéry kationtů alkalických kovů

Hlavním a nejdůležitějším intracelulárním mikronutrientem pro všechny živé buňky je draslík, který zajišťuje mnohé vitální fyziologické funkce. Přispívá k homeostáze vnitrobuněčného pH, stabilizaci membránového potenciálu, regulaci buněčného objemu a turgoru, syntéze proteinů a tím i aktivitě mnoha enzymů. Dále přispívá ke kompenzaci negativního náboje makromolekul jako RNA, DNA nebo polyfosfátů a k růstu a dělení buněk (Llopis-Torregrosa et al. 2019). Změny v jeho množství působí defekty především na úrovni metabolismu. Vnitrobuněčná koncentrace draselných kationtů se u kvasinek pohybuje v rozmezí 200 – 300 mM (Ariño et al. 2010) a schopnost udržovat tyto hodnoty v měnících se vnějších podmínkách, a navzdory vysokým koncentračním gradientům i v okolním prostředí chudém na jeho přítomnost, je esenciální předpoklad pro život buňky (Caro et al. 2019, Llopis-Torregrosa et al. 2016). Tuto homeostázu zajišťuje několik transmembránových transportérů a kanálů, znázorněných na Obr. 4.

V případě nadbytku toxických sodných, ale i jiných kationtů alkalických kovů v buňce, je možná jejich sekvestrace do různých organel, především vakuol, nebo úplné odstranění ven z buňky. To může probíhat pomocí aktivního transportu ATPázou Ena (efflux of natrium), systémem antiportu vyměňujícím kationty alkalických kovů za protony Nha (Na⁺/H⁺ antiporter), nebo membránovým kanálem Tok (transport outward K⁺) (Ramos et al. 2011). Většinu času se však kvasinky potýkají s nedostatkem potřebných draselných kationtů, jelikož osidlují především prostředí s nízkými koncentracemi K⁺. Pro přijímání draselných iontů přes cytoplazmatickou membránu jsou v buňce přítomné transportní systémy: Trk (transport of K⁺), Hak (high affinity K⁺ transporter) a Acu (alkali cation uptake) (Elicharová et al. 2016).



Obr. 4: Typy transportérů draselných a/nebo sodných kationtů přítomné u kvasinek. Modře ohraničený import iontů do buňky, zastoupený systémy Trk, Hak a Acu. Červeně ohraničený export iontů z buňky, zastoupený systémy Ena a Nha, a draselným kanálem Tok. Převzato a upraveno podle (Ramos et al. 2011).

3.3.2.1 Importéry

Tři výše zmíněné draselné importéry, lišící se v mechanismu přenosu, jsou u jednotlivých druhů kvasinek zastoupeny různě, jak je nastíněno v Tab. 1 (Elicharová et al. 2016). Některé kvasinky obsahují pouze Trk, ať už v jedné, nebo ve dvou kopiích, většina druhů má Trk spolu se systémem Hak, a jen u velmi málo druhů, např. *C. albicans*, můžeme nalézt všechny tři typy transportérů (Ramos et al. 2011).

Tab. 1: Přítomnost/absence jednotlivých transportérů pro import draslíku u vybraných druhů kvasinek (Ramos et al. 2011)

	Trk1	Trk2	Hak1	Acu1
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	-
<i>C. albicans</i>	+	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-

U druhu *S. cerevisiae* nalezneme pouze jeden ze tří výše uvedených importérů, a to ve dvou kopiích, tedy Trk1 a Trk2 (Ariño et al. 2019).

C. albicans disponuje všemi třemi typy těchto přenašečů (Trk1, Hak1, Acu1) a je tedy na nedostatek draselných iontů v prostředí méně náchylná. Tento arsenál transportérů jí napomáhá v růstu hyf, zjednodušuje proliferaci do hostitelských tkání a orgánů s nižšími koncentracemi draselných kationtů a pomáhá jí také přizpůsobit se různým hodnotám pH prostředí. Oproti laboratorním podmínkám, kde tato kvasinka upřednostňuje spíše kyslejší pH, musí totiž při kolonizaci hostitele tolerovat neutrální až mírně bazické pH lidské krve (pH 7,4) a měnit se pH napříč orgánovými soustavami, například mezi ústní dutinou (pH 6,7) a vaginální mukózou (pH 4). Tyto transportéry jsou tedy zodpovědné i za míru virulence (Ramos et al. 2016).

C. glabrata jako jedna z mála kvasinek obsahuje ve své buňce gen pro pouze jeden draselný importér, Trk1 (Caro et al. 2019). Citlivost k malému množství draselných iontů v prostředí je tedy u tohoto druhu mnohem vyšší. Už při lehce limitních koncentracích $K^+ < 1$ mmol/l roste *C. glabrata* mnohem hůře v porovnání s druhem *C. albicans*, který je schopný dobře zvládat i koncentrace 15 μ mol/l (Elicharová et al. 2016).

Trk

TRK je nejlépe prozkoumaná a popsaná rodina kvasinkových importérů draslíku. Trk funguje na principu uniporteru poháněného membránovým potenciálem, vytvářeným aktivitou dříve zmíněné protonové pumpy Pma1. Trk se jako jediný typ přenašečů vyskytuje ve všech dosud studovaných druzích kvasinek (Ariño et al. 2019) a můžeme ho nalézt také u bakterií a rostlin. V *S. cerevisiae* byl popsán během 80. a 90. let, následně se podařilo sekvenovat oba kódující geny a byly vytvořeny mutantní kvasinkové kmeny (Ariño et al. 2019). Trk vykazuje mnohonásobně vyšší afinitu k draselným kationtům oproti ostatním alkalickým kovům. Díky tomu neumožňuje import toxických sodných nebo lithných iontů i při jejich vyšších vnějších koncentracích (Caro et al. 2019). Zároveň zvyšuje i toleranci buňky vůči různým stresovým podmínkám prostředí (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

Ztráta nebo inhibice funkce tohoto transportéru má pro kvasinku *C. glabrata* pleiotropní efekt. Kromě ovlivnění základních buněčných funkcí, jako je hladina vnitrobuněčného pH nebo membránového potenciálu, dojde také ke změně povrchových vlastností, zvýšené hydrofobicitě a adhezenční kapacitě buněčné stěny, zvýšené citlivosti vůči pH prostředí a kationickým léčivům, snížené virulenci a jednodušší likvidaci buněk kandidy pomocí makrofágů hostitelova imunitního systému (Llopis-Torregrosa et al. 2019, Llopis-Torregrosa et al. 2016). CgTrk1 se tak jeví jako potenciální cíl léčiv mykotických infekcí způsobených druhem *C. glabrata*. Kmen s delecí genu pro tento transportér byl použit pro účely experimentální části této diplomové práce.

Sekundární funkcí Trk, vedle importu draselných kationtů, je export aniontů jako Cl^- , I^- , Br^- , SCN^- , NO_3^- . Zároveň se podílí na vyvolání programované buněčné smrti prostřednictvím kontroly homeostázy vápníku, na regulaci vnitrobuněčného pH nebo udržování membránového potenciálu (Ariño et al. 2019).

Acu a Hak

Acu ATPáza zprostředkovává příjem především draselných a částečně i sodných kationtů za spotřeby ATP. Ze všech kvasinkových transportérů draselných kationtů se vyskytuje nejvzácněji a díky tomu je také nejméně popsána. Vysokoafinitní přenašeče typu Hak fungují jako symportéry draselných iontů a protonů. K jejich expresi dochází u některých kvasinkových druhů především v době nedostatku draselných kationtů (Ariño et al. 2019).

3.3.2.2 Exportéry

Na rozdíl od draselných iontů, které jsou v buňkách akumulovány proti koncentračnímu gradientu až do poměrně vysokých hodnot, je sodík spolu s dalšími toxickými kationty alkalických kovů udržován v buňkách v co možná nejmenší koncentraci.

Té jsou buňky schopny docílit účinnou diskriminací příslušných nežádoucích iontů už na úrovni importu. Kvasinky totiž pro příjem těchto iontů nemají v membránách specifické transportní systémy. K přenosu Na^+ do buňky dochází pouze kompetitivní inhibicí selektivního importu draselných kationtů, přičemž s mnohem nižší afinitou. Koncentrace

sodných iontů musí být v okolním prostředí několikanásobně vyšší. I při vnějších koncentracích $\text{Na}^+ : \text{K}^+ = 100 : 1$ je buňka stále schopna diskriminovat sodné ionty a transportovat dovnitř pouze ionty draselné. Až při koncentraci 700 : 1 dochází ke vstupu signifikantního množství sodných kationtů do buňky, přičemž k udržení elektroneutality musí ekvivalentní množství draselných kationtů buňku opustit. Jakmile vnitrobuněčná koncentrace sodných kationtů vyrovná koncentraci kationtů draselných, dojde k inhibici mnoha buněčných pochodů, zastavení růstu a při postupně zvyšující se koncentrací sodných iontů buňka umírá. Toxicita sodíku inhibuje důležité enzymatické funkce a při jeho vysokých vnějších koncentracích dochází také k osmotickému stresu (Ariño et al. 2010).

Vysoké vnitrobuněčné koncentrace sodných kationtů v cytosolu jsou kvasinky schopné snižovat jejich sekvestrací do vakuol a jiných organel (Ariño et al. 2010). Nejúčinnějším způsobem je úplné odstranění těchto přebytečných iontů ven z buňky pomocí účinných transportérů pro kationty alkalických kovů. K tomu kvasinkám slouží dva transportéry, Ena ATPáza a Nha antiporter (Ramos et al. 2016).

Ena ATPáza

Ena ATPáza funguje na principu aktivního transportu. Využívá hydrolýzu ATP k přenosu iontů přes cytoplazmatickou membránu, a to především sodných, lithných, ale i nadbytečných draselných iontů, proti jejich elektrochemickému gradientu (Ariño et al. 2019).

Nha antiporter

Nha antiportery patří do rodiny transportních systémů fungujících na principu výměny kationtů alkalických kovů za protony, čímž je buňka schopná se od těchto iontů, především sodných, detoxifikovat. Jelikož jsou přenosy jednotlivých iontů v buňce navzájem propojené, je i aktivita tohoto transportéru provázána s aktivitou Trk systémů. To dokazuje také ovlivnění funkce Trk předchozí delecí genu pro Nha antiporter (Ariño et al. 2010). Na rozdíl od živočišných buněk, které spotřebovávají Na^+ gradient vznikající z Na^+/K^+ -ATPázy k vypuzení přebytečných protonů ven z buňky, a tím k regulaci vnitrobuněčného pH, mikroorganismy a rostliny naopak využívají gradient protonů vytvořený H^+ -ATPázou Pma1 jako hnací sílu k pumpování nežádoucích, nebo v případě K^+ nadbytečných kationtů

alkalických kovů ven z buňky (Ariño et al. 2019). Funkce protonové pumpy je tedy pro efektivitu Nha antiporteru stěžejním předpokladem.

Cnh1, Nha antiporter u druhu *C. albicans*, exportuje z buňky kromě Na^+ a K^+ také Li^+ a Rb^+ , čímž značně zvyšuje toleranci kandidy vůči vysokým vnějším koncentracím těchto iontů. Vzhledem k tomu, že detoxifikace od sodných a lithných iontů je mnohem více zprostředkována Ena ATPásou, je za nejdůležitější funkci Cnh1 u tohoto druhu považována homeostáza draselných kationtů spolu s homeostázou vnitrobuněčného pH (Kinclová et al. 2001, Kinclová-Zimmermannová a Sychrová 2007, Ariño et al. 2019). Výzkum vlivu Cnh1 na udržování vnitrobuněčného pH, zprostředkovaný delecí odpovídajícího genu u druhu *C. albicans*, je jedním z předmětů experimentální části této diplomové práce.

3.4 Měření vnitrobuněčného pH pomocí pHluorinu

Metod pro měření vnitrobuněčné koncentrace protonů existuje mnoho. Příkladem může být používání mikroelektrod, ^{31}P nukleární magnetická rezonance, injektování buněk pyraninem pomocí elektroporace (Marešová et al. 2010) nebo radioaktivně značené slabé kyseliny nebo zásady prostupující skrz buněčnou membránu. Většina z nich však vyžaduje složitou manipulaci s buňkami, která je často časově náročná a také při ní může dojít k ovlivnění naměřených hodnot a k nepřesnosti výsledků. Zároveň tyto techniky nebývají organelově specifické a získané hodnoty jsou tak jen odrazem průměrných hodnot pH buňky jako celku (Oriji et al. 2009).

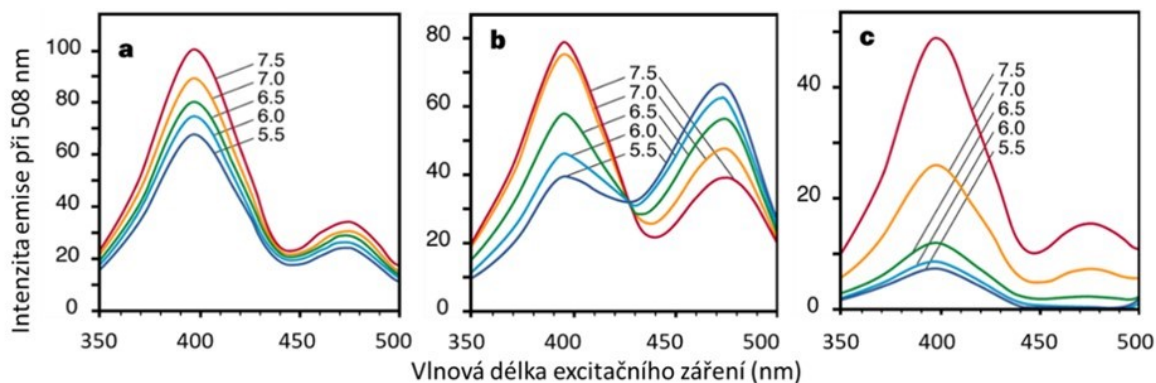
Značné výhody v měření pH poskytuje použití fluorescenčních metod v čele s variantami odvozenými od GFP, green fluorescent proteinu, objeveného roku 1961. Tento protein byl izolován jako vedlejší produkt aequorinu, ze stejného druhu medúzy *Aequorea victoria*, při studiu její bioluminiscence (Shimomura 2005). Jedná se o protein se specifickým uspořádáním aminokyselin serinu, tyrosinu a glycinu (Ser65, Tyr66, Gly67), které společně vytváří takzvaný chromofor zodpovědný za luminiscenci. Postupující výzkum genu kódujícího tento protein, jeho izolace a sekvenování následně umožnilo vytvářet jeho obměny a další varianty s výhodnějšími vlastnostmi (Miesenböck et al. 1998). Důležitost GFP od jeho objevu postupně narůstala a dnes se jedná o široce používaný proteinový marker (Shimomura 2005). Příkladem jeho použití je analýza dynamiky proteinů, kdy lze po fúzi

GFP s buněčnými proteiny sledovat jejich polohu v čase. Lze také studovat jednotlivé interakce mezi proteiny nebo pohyby endocytických a exocytických vezikul v buňce (Mahon 2011).

GFP vytváří dvě alternativní proteinové konformace a při excitaci zářením o vlnové délce 350 – 500 nm emituje světlo o 508 nm. Excitační spektrum vykazuje dva píky (viz Obr. 5) v závislosti na stavu Tyr66. V protonovaném stavu nalezneme excitační maximum při vlnové délce 395 nm, v deprotonovaném stavu pak při 475 nm. S klesajícím pH klesá i intenzita emise světla v obou těchto maximech a jejich vzájemný poměr se nemění (Miesenböck et al. 1998).

K využití GFP jako pH senzoru bylo třeba obměnit jeho strukturu. Mutagenezí v bakterii *Escherichia coli* a substitucemi aminokyselinových zbytků v okolí chromoforu byly vytvořeny dvě třídy pH senzitivních fluorescenčních proteinů, takzvaných pHluorinů, eliptického a ratiometrického (poměrného) (Miesenböck et al. 1998). Eliptický pHluorin při snižujícím se pH graduálně ztrácí fluorescenci a liší se tedy v intenzitě záření. Ratiometrický v závislosti na pH mění svou spektrální vlnovou délku a intenzita záření se liší pouze mezi jednotlivými excitačními maximy (Rodó et al. 2012, Miesenböck et al. 1998).

Ratiometrický pHluorin má, stejně jako původní nemodifikovaný GFP, bimodální excitační spektrum s píky na vlnových délkách 395 a 475 nm a emisním maximem při 509 nm. S klesajícími hodnotami pH je jeho intenzita emise při excitaci na 395 nm snížena, s odpovídajícím nárůstem při excitaci na 475 nm (Mahon 2011). Při rostoucím pH se postupně intenzita emise při excitaci na 395 nm zvyšuje, s odpovídajícím snížením na 475 nm. Výslednou veličinou je poměr intenzit emise záření při excitaci o obou vlnových délkách maxim (I_{395}/I_{475}), který klesá s klesající hodnotou pH. Stejně jako u GFP jsou tato dvě maxima dána protonací a deprotonací chromoforu, konkrétně Tyr66 (Miesenböck et al. 1998).



Obr. 5: Závislost excitačních spekter na okolním pH. a) nemodifikovaný GFP, b) ratiometrický pHluorin, c) eliptický pHluorin. Převzato a upraveno podle (Miesenböck et al. 1998).

Vzhledem k tomu, že pHluorin mění intenzitu fluorescence v závislosti na hodnotě pH, může být využíván jako neinvazivní pH indikátor pro měření koncentrace protonů v buňkách (Rodó et al. 2012), a to v hodnotách pH 5,5 – 7,5 (Miesenböck et al. 1998). Mezi hlavní výhody této metody oproti jiným, dříve používaným technikám, patří kromě neinvazivnosti také rychlost a plynulost měření (Martinez II et al. 2012). Po vnesení a expresi genu pro pHluorin lze fluorescenčně měřit hodnoty pH *in vivo*, a to nejen ve tkáních nebo buňkách, ale i v jednotlivých organelách (Miesenböck et al. 1998). Tímto způsobem bylo například možné, po expresi pHluorinu v cytosolu a mitochondriální matrix u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, pozorovat rozdíly v hodnotách pH mezi těmito kompartmenty (Orji et al. 2009). pHluorin se po úpravě do více sbalené konformace podařilo použít k dříve neúspěšnému měření pH v endoplazmatickém retikulu (Reifenrath a Boles 2018). S novým pH senzorem na bázi pHluorinu bylo také možné monitorovat hodnoty pH v Golgiho aparátu (Deschamps et al. 2020).

4. Cíle práce

Předmětem této diplomové práce je studium homeostázy vnitrobuněčného pH u druhů *Candida albicans* a *Candida glabrata* v závislosti na různých vnějších podmínkách a na deleci membránových transportérů kationtů alkalických kovů *Cacnh1Δ* a *Cgtrk1Δ*.

Cíle této diplomové práce jsou u obou kandid definovány hlavními úkoly:

1) Změřit hodnoty vnitrobuněčného pH jednotlivých kmenů v závislosti na použitém kultivačním médiu a zdroji dusíku

2) Stanovit vliv delece uvedených membránových transportérů na naměřené hodnoty vnitrobuněčného pH v těchto médiích

3) Změřit hodnoty vnitrobuněčného pH v závislosti na působení vybraných antimykotik v konkrétním médiu

K naplnění hlavních úkolů je potřeba:

- Ověřit správnost exprese pHluorinu u kmenů s integrovaným genem pro tento fluorescenční protein
- Stanovit závislost intenzity fluorescence pHluorinu na hodnotách vnitrobuněčného pH vytvořením kalibrační křivky
- Vybrat vhodné koncentrace antimykotik pro stanovení vlivu těchto antimykotik na vnitrobuněčné pH obou druhů kvasinek pomocí kapkových testů

5. Experimentální část

5.1 Materiál

5.1.1 Mikroorganismy

V předkládané diplomové práci byly použity kvasinkové kmeny uvedené v Tab. 2. U kmenů exprimujících pHluorin byl gen kódující tento fluorescenční protein buď vložen přímo do genomu *C. albicans*, nebo byl tento gen vnesen do buněk *C. glabrata* na plasmidu spolu s genem pro rezistenci vůči nourseotricinu.

Tab. 2: Kmeny kvasinek s příslušnými zkratkami používanými pro účely této diplomové práce

Druh	Genotyp	Zkratka kmene	Zdroj/reference
<i>C. albicans</i>	SC5314	CaWT	Jones et al. 2004
	SC5314 pHluorin	CapH	Llopis-Torregrosa, nepublikováno
	SC5314 <i>cnh1</i> Δ pHluorin	CapH <i>cnh1</i> Δ	Llopis-Torregrosa, nepublikováno
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001	CgWT	ATCC sbírka
	ATCC 2001 <i>cnh1</i> Δ:: <i>FRT</i> :: <i>CNHI-SATI</i>	CgK	Krauke a Sychrová 2011
	ATCC 2001 [pGRB 2.2]	CgpH	Llopis-Torregrosa et al. 2016
	ATCC 2001 <i>trk1</i> Δ [pGRB2.2] klon 1	CgpH <i>trk1</i> Δ1	Llopis-Torregrosa et al. 2016
	ATCC 2001 <i>trk1</i> Δ [pGRB2.2] klon 2	CgpH <i>trk1</i> Δ2	Llopis-Torregrosa et al. 2016

5.1.2 Chemikálie

Použité chemikálie včetně výrobce uvádí Tab. 3 na následující straně.

Tab. 3: Seznam použitých chemikálií včetně výrobce

Chemikálie	Výrobce
Agar	Dr. Kulich Pharma
Amfotericin B	Sigma-Aldrich
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Lach-Ner
Destilovaná voda	FGÚ laboratoř
D-glukóza	Lach-Ner
Digitonin	Sigma-Aldrich
Dimetyl sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etanol	Lach-Ner
Etanol pro UV spektroskopii	Lach-Ner
Flukonazol (2 mg/ml flukonazol ve fyziologickém roztoku)	Fresenius Kabi
Fyziologický roztok (0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich
Hydroxid amonný (vodný roztok amoniaku min. 25 %)	Lach-Ner
Chlorid draselný KCl	Lach-Ner
Imerzní olej	Olympus
Klotrimazol	Sigma-Aldrich
Kyselina citrónová (monohydrát)	Lach-Ner
L-prolin	Sigma-Aldrich
Nourseotricin clonNAT	Wernerbioagents GmbH
PBS (phosphate buffered saline), 10× koncentrovaný	Sigma-Aldrich
Síran amonný (NH ₄) ₂ SO ₄	Lach-Ner
Terbinafin	Sigma-Aldrich
Trietanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich
YNB (Yeast Nitrogen Base) w/o AAs (bez aminokyselin)	Difco
YNB-F ^{pH}	Formedium
YNB ^{pH}	MP Biomedicals
YPD agar	Formedium
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) broth	Formedium

5.1.3 Roztoky

Roztoky antimykotik byly připraveny rozpuštěním pevného podílu léčiva v daném rozpouštědle, tedy roztok amfotericinu B v DMSO, klotrimazolu v etanolu pro UV spektroskopii a terbinafinu v destilované vodě. Roztok flukonazolu vznikl naředěním zásobního roztoku zakoupeným fyziologickým roztokem.

Zásobní roztok nourseotricinu vznikl rozpuštěním pevného podílu nourseotricinu v destilované vodě na koncentraci 200 mg/ml, byl sterilizován filtrací (filtry Millex pro sterilizaci roztoků s velikostí pórů 0,2 μm) a uchováván při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok digitoninu vznikl rozpuštěním pevného podílu digitoninu v destilované vodě při teplotě $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ na koncentraci 5 mg/ml, byl sterilizován filtrací (filtry Millex pro sterilizaci roztoků s velikostí pórů 0,2 μm) a uchováván při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jednoho týdne.

5.1.4 Pufry

Pufr PBS

Naředěním původního koncentráту PBS destilovanou vodou byl vytvořen roztok o finální koncentraci jednotlivých složek:

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Pufry citrát-fosfátové

Citrát-fosfátové pufry byly vytvořeny dle McIlvaina pufrovacího systému (Elving et al. 1956) mísením 0,2 M vodného roztoku Na₂HPO₄.12H₂O a 0,1 M vodného roztoku monohydrátu kyseliny citronové. Poměry mísení jednotlivých složek byly zvoleny dle (Elving et al. 1956) v závislosti na požadované hodnotě pH, viz Tab. 4. Výsledné hodnoty pH byly stanoveny pomocí pH metru Jenway jako průměr ze tří měření.

Tab. 4: Složení jednotlivých pufrů o daných hodnotách pH a jejich výsledné hodnoty pH změřené pomocí pH metru

Požadované pH	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	0,1 M kyselina citronová (ml)	Výsledné pH
5,6	11,6	8,4	5,640 ± 0,005
6,0	12,63	7,37	6,050 ± 0,008
6,4	13,85	6,15	6,420 ± 0,009
6,6	14,55	5,45	6,590 ± 0,009
6,8	15,45	4,55	6,78 ± 0,01
7,0	16,47	3,53	7,010 ± 0,008
7,2	17,39	2,61	7,22 ± 0,01
7,6	18,73	1,27	7,63 ± 0,01

5.1.5 Kultivační média

Ke kultivaci buněk byla použita pevná a tekutá média. Jednotlivé složky médií byly rozpuštěny v destilované vodě. Pro přípravu pevných médií byl do roztoků přidáván 2 % agar. Výjimkou bylo pevné YPD médium, které bylo připravováno přímo ze zakoupeného YPD agaru. Složení kultivačních médií je uvedeno v Tab. 5.

Buňky byly kultivovány v kompletním médiu YPD, popř. v minimálních médiích YNB, YNB^{pH} nebo YNB-F^{pH} při 30 °C. Média označená indexem ^{pH} neobsahovala fluorescenční složky (riboflavin a kyselinu listovou) a byla určena pro měření vnitrobuněčného pH_{in}. Médium YNB-F^{pH} obsahovalo pouze velmi malé množství K⁺ (cca 15 μM). Do médií byl dle potřeby přidán KCl nejčastěji o koncentraci 100 mM v případě druhu *C. glabrata*, jehož kmeny bez Trk1 transportéru nejsou schopné růstu v nízkých koncentracích draselných iontů, a u druhu *C. albicans* o koncentraci 10 mM (pokud není uvedeno jinak). Média YPD a YNB byla sterilizována horkou parou v autoklávu 20 minut při 121 °C a 120 kPa. Média YNB^{pH} a YNB-F^{pH} byla sterilizována filtrací (filtry Steritop pro sterilizaci roztoků s velikostí pórů 0,2 μm).

Do kultivačních médií kmenů *CgK*, *CgpH*, *CgpHtrk1Δ1* a *CgpHtrk1Δ2* byl po sterilizaci přidáván nourseotricin ve finální koncentraci 200 µg/ml, u médií značeno zkratkou Nat.

Tab. 5: Kultivační média a jejich složení.

Médium	Složení	
	pro <i>C. albicans</i>	pro <i>C. glabrata</i>
YPD	YPD broth 50 g/l	YPD broth 50 g/l
		100 mM KCl *
		Nourseotricin 200 µg/ml *
pevné YPD	YPD agar 70 g/l	YPD agar 70 g/l
		100 mM KCl *
		Nourseotricin 200 µg/ml *
YNB	YNB w/o AA 6,7 g/l	YNB w/o AA 6,7 g/l
	Glukóza 2 %	Glukóza 2 %
		Nourseotricin 200 µg/ml *
YNB ^{pH}	YNB ^{pH} 1 g/l	YNB ^{pH} 1 g/l
	Glukóza 2 %	Glukóza 2 %
	L-prolin 0,1 % / síran amonný 4 g/l	L-prolin 0,1 % / síran amonný 4 g/l
	pH upraveno na 5,8 pomocí TEA/ NH ₄ OH	
		100 mM KCl
		Nourseotricin 200 µg/ml *
YNB-F ^{pH}	YNB-F ^{pH} 1,75 g/l	YNB-F ^{pH} 1,75 g/l
	Glukóza 2 %	Glukóza 2 %
	L-prolin 0,1 % / síran amonný 4 g/l	L-prolin 0,1 % / síran amonný 4 g/l
	pH upraveno na 5,8 pomocí TEA/ NH ₄ OH	
	10 mM KCl	100 mM KCl
		Nourseotricin 200 µg/ml *

* přidáno dle potřeby

5.1.6 Pomůcky a přístroje

Seznam použitých pomůcek a přístrojů uvádí Tab. 6

Tab. 6: Seznam pomůcek a přístrojů včetně výrobce

Pomůcky a přístroje	Výrobce
Analytické váhy ALJ120-4	KERN
Aplikátor Replica plater	Sigma-Aldrich
Autokláv 2540 EL	Tuttnauer
Skleněné kuličky, průměr 3 mm	Sartorius
Centrifuga 5810 R	Eppendorf
96 jamkové mikrotitrační destičky	Anicrin
Filtry Millex pro sterilizaci roztoků – 0,2 µm	Merck
Filtry Steritop pro sterilizaci roztoků – 0,2 µm	Merck
Fluorescenční mikroskop	Olympus
Fotoaparát PC1210 DC7	Canon
Hlubokomrazicí box	Sanyo
Injekční stříkačka	Chirana
Orbitální inkubátor Minitron	INFORS HT
Orbitální inkubátor NB 205	N – BIOTEK
Kahan plynový typ Z-1	Kavalier
Kónické zkumavky	JET Biofil
Kyvety pro spektrofotometrii	Kartell
Laboratorní sklo	Merci
Laboratorní váhy	EG 220 - 3NM
Laminární box	LABOX
Laminární box TopSafe 1.2	BioAir
Lednice	Ardo
Magnetická míchačka	IKA
Magnetická míchačka s ohřevem	VELP Scientifica
Membránová vývěva N86KN.18	KNF LAB
Mikrobiologický inkubátor INCU-line	VWR

Pomůcky a přístroje	Výrobce
Očkovací kličky	Biologix
Párátka plochá	Dipro Proseč
Petriho misky průměr 90 mm, objem 20 ml	GAMA
pH metr	Jenway
Plastové centrifugační zkumavky	Merci
Plastové mikrozkušavky 1,5; 2,0; 5,0 ml	Eppendorf
Reader Cytation 3	BioTek
Sada dávkovacích pipet Eppendorf	Eppendorf
Sada pipet Pipetman	Gilson
Spektrofotometr BioPhotometr	Eppendorf
Sterilizační páska	Wipak
Vortex Mini vortex lab dancer vario	IKA
Zamrazovací zkumavky	Thermo Fisher Scientific
Zkušavky sterilní plastové 12 ml	Simport

5.2 Metody

5.2.1 Stanovení optické hustoty (OD_{600}) suspenze buněk

Optická hustota (denzita) buněčné kultury byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm na přístroji Spektrofotometr BioPhotometr Eppendorf. Měřená suspenze byla vždy naředěna na $OD_{600} = 0 - 0,8$, kdy je optická hustota přímo úměrná koncentraci buněk, a následně přepočítána na reálnou hodnotu.

5.2.2 Kultivace buněk

Buněčné kultury kvasinek byly uchovávány v zamrazovacích zkumavkách v 30 % glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kvasinky byly přeneseny sterilními párátky na pevná média YPD nebo YPD Nat s přidávkem 100 mM KCl a kultivovány při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h a poté uchovávány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za účelem kultivace v tekutých médiích bylo malé množství takto čerstvě napěstovaných buněk přeneseno pomocí sterilního párátko nebo kličky do 5 ml média v kuželových baňkách dle Erlenmeyera a inkubováno za stálého třepání při 30 °C do druhého dne. Část této suspenze byla následně přenesena do 10 ml čerstvého média tak, aby po dvou děleních (á 2 h) v exponenciální fázi růstu dosahovala kultura cílových hodnot OD₆₀₀ (pro *C. albicans* OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6; pro *C. glabrata* OD₆₀₀ = 1,5 – 2,0). Objem baněk vždy odpovídal nejméně pětinásobku objemu kultivačního média.

5.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Buňky kmenů *Ca*WT, *Cap*H a *Cg*WT byly kultivovány podle kapitoly 5.2.2 v médiu YNB-F^{PH} s přídatkem 50 mM KCl, k buňkám kmene *Cgp*H byl do média navíc přidán nourseotricin. 5 µl buněčné suspenze bylo pipetováno na podložní sklíčko a překryto krycím sklíčkem. Po nanesení imerzního oleje byly vzorky pozorovány v mikroskopu Olympus AX70 s digitální kamerou DP70. Fotografie byly pořízeny použitím Nomarského kontrastu a buňky exprimující pHluorin byly fotografovány při fluorescenční vizualizaci hranolem U-MWB s excitačním filtrem 450 – 480 nm. Fotografie byly upraveny v programech Gimp a Inkscape.

5.2.4 Měření kalibračních křivek pro stanovení vnitrobuněčného pH

Stanovení optimální koncentrace digitoninu a doby inkubace buněk v jeho přítomnosti pomocí výsevového testu

Inkubace buněk v přítomnosti digitoninu, působícího částečnou permeabilizaci cytoplazmatické membrány, byla použita pro kalibraci za účelem vyrovnání pH_{in} (vnitrobuněčného pH) buněk a pH pufrů o známých hodnotách. Výsevový test sloužil k nalezení odpovídající koncentrace digitoninu a doby jeho působení, která buňky permeabilizuje pouze částečně a nedojde zároveň k nechtěnému úniku vnitrobuněčného obsahu včetně pHLuorinu do okolního prostředí.

Buňky kmenů *Ca*WT, *Cap*H a *Cg*WT byly kultivovány v médiu YNB-F^{PH} s přídatkem 50 mM KCl, buňky kmene *Cgp*H navíc s přídatkem nourseotricinu, do exponenciální fáze růstu na požadované OD₆₀₀ (viz kapitola 5.2.2). Buněčné suspenze

byly v centrifugačních zkumavkách odstředěny (3 min, 4000 otáček/min, 25 °C), supernatanty slity a buňky resuspendovány v 10 ml PBS, přičemž tento postup byl znovu zopakován. Objem buněčné suspenze z každé zkumavky byl rovnoměrně rozdělen do pěti kónických zkumavek. Do každé z nich bylo přidáno množství zásobního roztoku digitoninu odpovídající požadovaným finálním koncentracím (0, 300 a 600 µg/ml digitoninu) a inkubováno po daný čas (10 či 15 min).

Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky dvakrát po sobě centrifugovány za stejných podmínek (viz výše), přičemž poprvé byly resuspendovány ve 2 ml PBS, podruhé ve 200 µl PBS. Koncentrované buněčné suspenze byly nanесeny na pevná YPD média, kmen Cg_pH na YPD médium s přidavkem nourseotricinu, a pomocí skleněných kuliček rovnoměrně vysety. Kontrola výsledku probíhala po 24, 48 a 72 hodinách inkubace buněk při 30 °C.

Kalibrace

Buňky kmenů CaWT a CapH byly kultivovány (viz kapitola 5.2.2) v médiu YNB-F^{PH} do exponenciální fáze růstu OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6. Kvasinky *C. glabrata* byly kultivovány v 6× větším objemu než kvasinky *C. albicans*. Kmen CgWT byl kultivován v médiu YNB-F^{PH} a kmen Cg_pH v médiu YNB-F^{PH} s přidavkem nourseotricinu do exponenciální fáze růstu OD₆₀₀ = 1,5 (vyšší hodnoty OD₆₀₀ a objem kultivačního média u *C. glabrata* byl zvolen na základě nedostatečné intenzity fluorescence Cg_pH oproti kontrolnímu CgWT po prvotním měření v readeru Cytation 3). Buněčné suspenze byly v centrifugačních zkumavkách dvakrát po sobě odstředěny (3 min, 4000 otáček/min, 25 °C), supernatanty slity a buňky resuspendovány v 10 ml PBS. 1 ml buněčné suspenze kmenů CaWT a CgWT byl odebrán za účelem odečtení autofluorescence buněk bez přítomnosti pHluorinu. Do zkumavek byl přidán digitonin v požadované koncentraci. Po uplynutí potřebné doby inkubace byly buněčné suspenze centrifugovány (3 min, 4000 otáček/min, 0 °C). U kmenů exprimujících pHluorin byl odebrán supernatant sloužící jako kontrola, zda tento fluorescenční protein neunikl z buněk do okolí. Zbýlý tekutý podíl byl slit a buňky resuspendovány v 5 ml PBS, centrifugovány za stejných podmínek, supernatanty slity a kvasinky resuspendovány v 1 ml PBS. Dále byla napipetována 96 jamková mikrotitrační destička, přičemž na každý druh kvasinky připadla její polovina, viz Obr. 6.

	1	2	3	4	5	6
A	5,64	90 μ l kalibračního pufru + 10 μ l buněčné suspenze C_pH s digitoninem			100 μ l supernatantu z C_pH s digitoninem	100 μ l suspenze C_WT bez digitoninu
B	6,05					
C	6,42					
D	6,59					
E	6,78				90 μ l PBS + 10 μ l buněčné suspenze C_WT s digitoninem	
F	7,01					
G	7,22					
H	7,63					

Obr. 6: Polovina 96 jamkové mikrotitrační destičky pro měření kalibračních křivek závislosti intenzity fluorescence na pH_{in} , popsáno obecně pro oba kvasinkové druhy (za C_lze doplnit jak Ca, tak Cg). Sloupce 1 – 4 obsahují 4 totožné paralely v každém řádku, kdy je do každé jamky přidáno 90 μ l pufru o dané hodnotě pH a 10 μ l buněčné suspenze kmene exprimujícího pHluorin. Jamky 5A – 5D obsahují 100 μ l supernatantu odebraného po inkubaci buněk s digitoninem. Jamky 6A – 6D obsahují 100 μ l buněčné suspenze kmene neexprimujícího pHluorin v PBS, tyto buňky nepodstoupily inkubaci s digitoninem. V jamkách 5E – 5H a 6E – 6H bylo do 90 μ l PBS přidáno 10 μ l buněčné suspenze kmene neexprimujícího pHluorin sloužící k odečtení autofluorescence buněk bez pHluorinu C_WT (blank).

Po desetiminutové inkubaci pro vyrovnání hodnot pH_{in} s pH pufrů při laboratorní teplotě byla změřena intenzita emitované fluorescence v readeru Cytation 3 se softwarem Gen5 verze 3.02 při vlnové délce 508 nm po excitaci zářením o vlnových délkách 395 a 475 nm (I_{395} a I_{475}). Z 8 jamek pro C_WT (blank) byl vytvořen průměr výsledných intenzit v obou hodnotách ($\varnothing I_{395wt}$ a $\varnothing I_{475wt}$). V příslušné intenzitě byl daný průměr odečten od každé hodnoty C_pH v sloupcích 1 – 4 ($I_{395pH} - \varnothing I_{395wt}$ a $I_{395pH} - \varnothing I_{475wt}$). Pro každou jamku byl spočten odpovídající poměr intenzit $R_{395/475}$, a tyto hodnoty pro každý řádek odpovídající dané hodnotě pH zprůměrovány ($\varnothing R_{395/475}$). Výsledných 8 hodnot bylo vyneseno do grafu pro kalibrační křivku s hodnotami pH pufrů na ose x a poměrů intenzit na ose y. Polynomickou regresí třetího stupně v MS Excel 2010 byla získána kalibrační křivka.

Tento postup byl proveden celkem čtyřikrát pro druh *C. albicans* a šestkrát pro druh *C. glabrata*. Z výsledných hodnot pro každý druh byly získány průměrné hodnoty určující finální kalibrační křivku a její rovnici.

5.2.5 Měření vnitrobuněčného pH

Vliv složení média

Pro měření vlivu složení kultivačních médií na hodnotu vnitrobuněčného pH u jednotlivých kmenů byly kmeny *CaWT*, *CapH*, *CapHcnh1Δ*, *CgK*, *CgpH*, *CgpHtrk1Δ1* a *CgpHtrk1Δ2* kultivovány v médiích YNB^{pH} a YNB-F^{pH} obsahující jako zdroj dusíku L-prolin, nebo síran amonný (viz 5.2.2). Obě varianty média YNB-F^{pH} pro kultivaci všech kmenů *C. albicans* obsahovaly 10 mM KCl. U druhu *C. glabrata* byl do všech médií přidán KCl v koncentraci 100 mM a také nourseotricin s výjimkou kmene *CgWT*. Složení jednotlivých médií uvádí Tab. 7.

Tab. 7: Složení jednotlivých kultivačních médií používaných pro měření vnitrobuněčného pH

	YNB-F ^{pH} prolin	YNB-F ^{pH} NH ₄ ⁺	YNB ^{pH} prolin	YNB ^{pH} NH ₄ ⁺
<i>CaWT</i> , <i>CapH</i> , <i>CapHcnh1Δ</i>	10 mM KCl			-
<i>CgWT</i>	100 mM KCl			
<i>CgK</i> , <i>CgpHtrk1Δ1</i> , <i>CgpHtrk1Δ2</i>	100 mM KCl + 200 μg/l nourseotricin			

Po dosažení cílových hodnot OD₆₀₀ byly jednotlivé buněčné suspenze pipetovány do mikrotitrační destičky v objemu 100 μl na jamku, vždy 2 sloupce po 8 jamkách pro danou variantu. Pro celou destičku byla totožně s měřením kalibrační křivky (5.2.4) v readeru Cytation 3 změřena intenzita emitované fluorescence. Pro každou jamku byl získán odpovídající poměr intenzit R_{395/475}, tyto poměry byly zprůměrovány a z rovnice kalibrační křivky byla vypočtena odpovídající hodnota pH. Tento postup byl osmkrát zopakován pro *C. albicans* a třikrát pro *C. glabrata* a výsledné hodnoty byly získány jako průměr jednotlivých měření.

Vliv antimykotik

Pro měření změn vnitrobuněčného pH kvasinkových buněk po jejich vystavení působení antimykotik bylo zvoleno médium YNB-F^{pH} prolin a byla zvolena následující škála

léčiv, obsahující široce používané zástupce daných skupin s různými mechanismy účinku, zmíněné v kapitole 3.2:

Flukonazol – triazolová antimykotika

Klotrimazol – imidazolová antimykotika

Amfotericin B – polyeny

Terbinafin – allylaminy

Buňky byly kultivovány v přítomnosti flukonazolu, terbinafinu a klotrimazolu až do dosažení cílové hodnoty OD₆₀₀ (viz 5.2.2). Poté byly jednotlivé buněčné suspenze nanášeny po sloupcích do mikrotitrační destičky v objemu 100 µl na jamku. V případě okamžitých přídavek antimykotik byla daná látka přidávána v požadované koncentraci do jamek s předem napipetovanými buňkami vždy 6 minut před změřením, v případě rozpouštědel pak ve stejném objemu (µl) jako odpovídající roztok antimykotika. Pro každý kmen se pak jednalo o následující varianty:

Kultivace v médiu bez přidaných antimykotik

Kultivace s flukonazolem

Okamžitý přídavek flukonazolu

Okamžitý přídavek fyziologického roztoku

Okamžitý přídavek amfotericinu B

Okamžitý přídavek DMSO

Kultivace s terbinafinem

Okamžitý přídavek terbinafinu

Kultivace s klotrimazolem

Okamžitý přídavek klotrimazolu

Okamžitý přídavek etanolu pro UV spektroskopii

Výsledky byly naměřeny v readeru Cytation 3 a zpracovány stejně jako u měření vlivu složení média.

5.2.6 Kapkové testy

Kapkové testy byly prováděny za účelem porovnání citlivosti jednotlivých kmenů k antimykotikům a určení minimálních inhibičních koncentrací. Kultivace kmenů probíhala na pevném médiu YNB-F^{PH} prolin s přidavkem draselných iontů (10 mM KCl pro druh *C. albicans*, 100 mM KCl pro druh *C. glabrata*) a odpovídajícího množství roztoku antimykotika.

Buněčné suspenze kultivované dle bodu 5.2.2., byly naředěny na hodnotu OD₆₀₀ = 1 a pipetovány do 96 jamkové mikrotitrační destičky v objemu 165 µl na jamku, a to pod sebe do sloupce, aby každému kmeni odpovídal jeden řádek, viz Obr. 7.

	1	2	3	4	5
<i>CaWT</i>	165 µl buněčné suspenze OD ₆₀₀ = 1	135 µl vody + 15 µl ze sloupce 1	135 µl vody + 15 µl ze sloupce 2	135 µl vody + 15 µl ze sloupce 3	135 µl vody + 15 µl ze sloupce 4
<i>CapH</i>					
<i>CapHcnh1Δ</i>					
<i>CgK</i>					
<i>CgpH</i>					
<i>CgpHtrk1Δ1</i>					
<i>CgpHtrk1Δ2</i>					

Obr. 7: Schéma ředění buněk v mikrotitrační destičce pro kapkový test.

V jamkách dalších 4 sloupců byly destilovanou vodou naředěny tyto buněčné suspenze vždy v poměru 1:10 oproti sloupci předchozímu. Každému kmeni tak v destičce připadl jeden řádek s klesající koncentrací buněk v řadě od OD₆₀₀ = 1 do 1 × 10⁻⁴. Těchto 5 suspenzí bylo následně sterilně přeneseno pomocí aplikátoru Replica plater na připravené YNB-F^{PH} prolin agarové misky v podobě kapek. Po zaschnutí byly misky inkubovány při 30 °C a pravidelně fotograficky dokumentovány pomocí fotoaparátu PC1210 DC7 Canon po 24 hodinách do stavu, kdy nebyly pozorovány rozdíly dvou po sobě jdoucích focení, ve většině případů po dobu 5 dní. Obrázky byly zpracovány v programech Gimp a Inkscape.

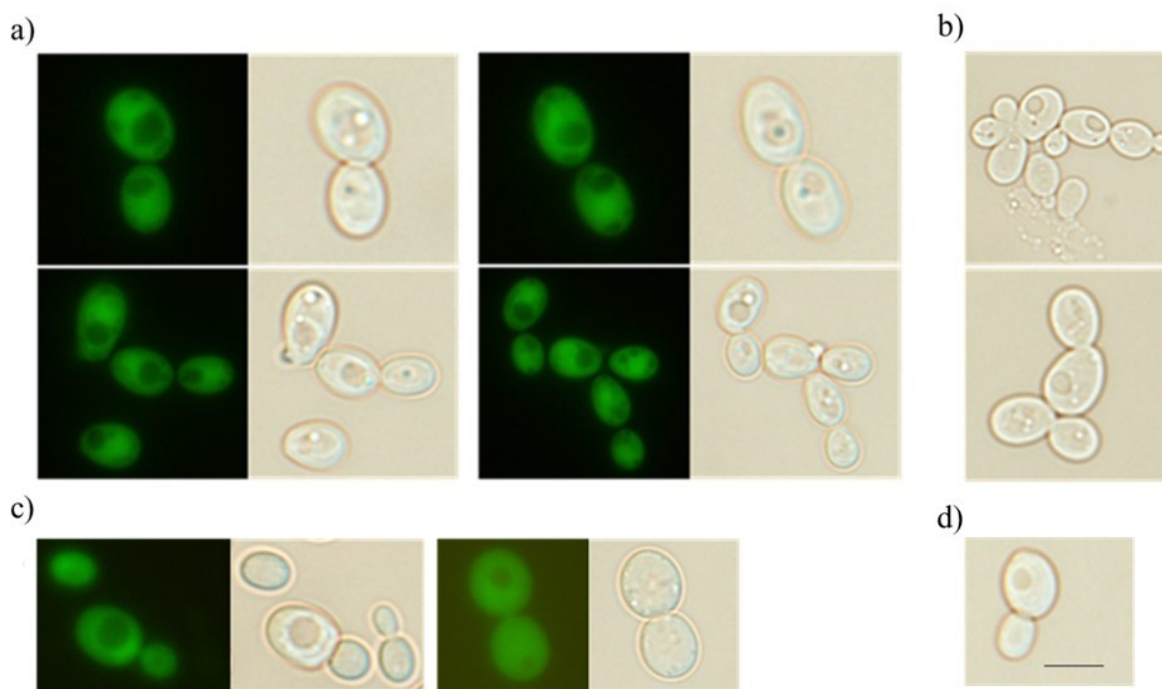
5.3 Statistická analýza

Před výpočty jednotlivých průměrných hodnot byly z jednotlivých souborů dat vyřazeny odlehlé výsledky významně zvyšující směrodatnou odchylku (hrubé chyby měření). Aritmetické průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny v programu MS Excel. Pro další statistické zpracování dat byl využit program SigmaPlot 13.0 (t-test, ANOVA a následný Holm-Sidakův test).

6. Výsledky

6.1 Ověření fluorescence exprimovaného pHluorinu

Správná exprese pHluorinu byla u jednotlivých kmenů ověřena a zdokumentována pomocí fluorescenčního mikroskopu viz Obr. 8. Na základě viditelné fluorescence u buněk kmenů *CapH* a *CgpH* byla potvrzena exprese pHluorinu v cytosolu, přičemž vakuoly zůstávají ztmavené. U kmenů *CaWT* a *CgWT* nebyla po excitaci zářením pozorovaná fluorescence (fotograficky nedokumentováno). Pro pozorování morfologie buněk bylo využito Nomarského kontrastu.



Obr. 8: Mikroskopické snímky jednotlivých kmenů *C. albicans* a *C. glabrata*: a) *CapH*, b) *CaWT*, c) *CgpH*, d) *CgWT* s viditelnou fluorescencí lokalizovanou v cytosolu u kmenů exprimujících pHluorin (vlevo). Vpravo snímky buněk pořízených pomocí Nomarského kontrastu. Měřítko: 5 μm .

6.2 Konstrukce kalibrační křivky

6.2.1 Stanovení optimálních podmínek inkubace buněk s digitoninem

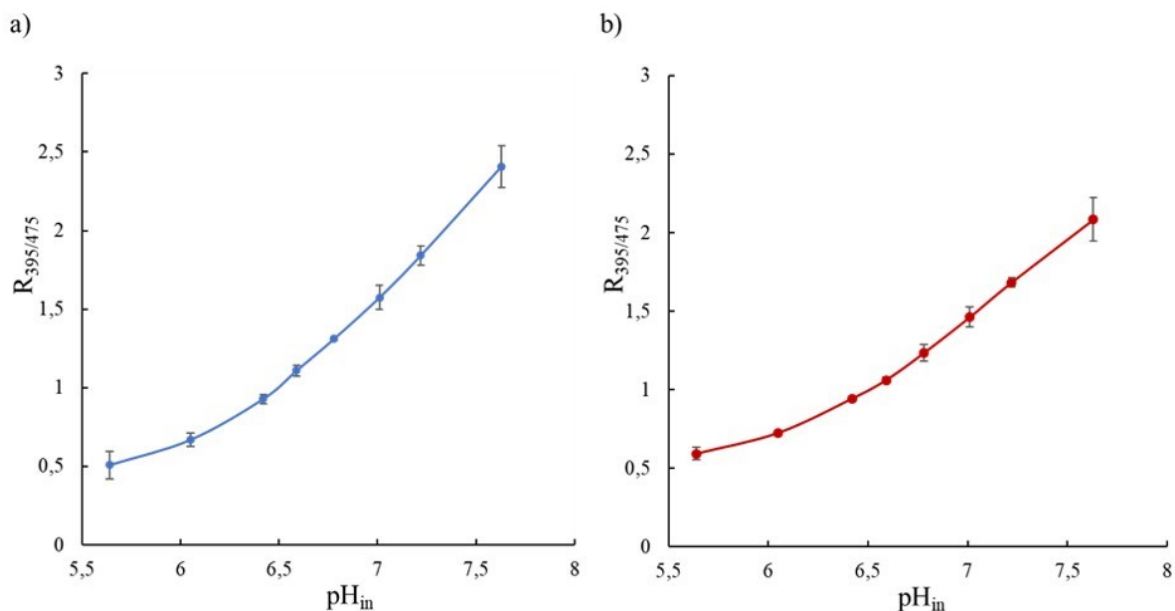
Před měřením kalibračních křivek byl proveden výsevový test u buněk, které byly inkubovány v přítomnosti digitoninu a byla sledována schopnost růstu těchto buněk v porovnání s kontrolními buňkami, které nepodstoupily inkubaci s digitoninem. Testované koncentrace a doby působení digitoninu byly odvozeny od podmínek uvedených v publikaci (Llopis-Torregrosa et al. 2016), v níž byly buňky inkubovány s digitoninem v koncentraci 600 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 15 minut. Ani v jedné ze čtyř testovaných variant (300 a 600 $\mu\text{g/ml}$, čas inkubace 10 a 15 minut) u žádného z kmenů *C. albicans* a *C. glabrata* nebyly pozorovány narostlé kolonie v porovnání s plně narostlou kontrolou. Pro samotné měření kalibračních křivek byla na základě výsledku výsevového testu pro všechny kmény zvolena nejnižší a nejšetnější z výše uvedených koncentrací digitoninu a nejkratší čas inkubace, tedy 300 $\mu\text{g/ml}$ digitoninu a inkubace 10 minut.

6.2.2 Závislost fluorescenční odpovědi pHluorinu na vnitrobuněčném pH_{in} (kalibrační křivka)

Kontrola správnosti průběhu inkubace buněk v přítomnosti digitoninu byla provedena porovnáním intenzity fluorescence supernatantu odebraného od buněk kmenů *CapH* a *CgpH* a intenzity fluorescence buněčných suspenzí kmenů *CaWT* a *CgWT* (autofluorescence) a kmenů *CapH* a *CgpH* (fluorescence pHluorinu) odpovídajícího druhu. Intenzita fluorescence supernatantu u žádného z uvedených kmenů nebyla vyšší než fluorescence příslušných buněčných suspenzí kmenů *CaWT* a *CgWT*. U kmene *CapH* byla intenzita fluorescence mnohonásobně větší než u kmene *CaWT*, přičemž se zároveň v jednotlivých řádcích sloupců 1 – 4 (viz Obr. 6) na základě zvyšujícího se pH pufrů úměrně zvyšovala, což potvrdilo úspěšnost vyrovnání pH_{in} na hodnotu pH příslušného kalibračního pufru. Při prvním pokusu o měření kalibrace nebyl pozorován rozdíl v intenzitě fluorescence buněčné suspenze kmene *CgpH* oproti kmeni *CgWT*. Nízká intenzita fluorescence v buňkách *C. glabrata* byla zdůvodněna povahou exprese pHluorinu, kdy je gen pro tento fluorescenční protein přítomný nikoliv v genomu jako u *C. albicans*, ale v plasmidu. Pro další měření byla u druhu *C. glabrata* zvýšena koncentrace buněk z $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,6$ na $\text{OD}_{600} = 1,5 - 2,0$.

Kvasinky *C. glabrata* mají vnesen gen pro pHluorin na plasmidu, který obsahuje také gen pro rezistenci k nourseotricinu. Přítomnost nourseotricinu v kultivačním médiu vytváří selekční tlak a dovoluje růst pouze kvasinkám s tímto plasmidem. Jelikož měření pH_{in} probíhá přímo v kultivačním médiu, bylo nutné ověřit, zda nourseotricin neovlivňuje intenzitu naměřené fluorescence pHluorinu, např. nevykazuje vlastní fluorescenci. Byly změřeny a následně porovnány intenzity fluorescence u buněk kmene CgWT kultivovaných v médiu YNB a YNB s přidáním nourseotricinem. Rozdíly v intenzitách fluorescence nebyly pozorovány, přítomnost nourseotricinu v médiu tudíž naměřené hodnoty neovlivňuje.

Měření vnitrobuněčného pH_{in} pro určení kalibrační křivky probíhalo vždy ve třech opakováních. Zprůměrováním naměřených hodnot poměrů intenzit fluorescence ($R_{395/475}$) pro každou hodnotu pH a vynesemím těchto hodnot do grafu v MS Excel byly získány kalibrační křivky (viz Obr. 9) a jejich rovnice.



Obr. 9: Kalibrační křivky závislosti poměru intenzit emitované fluorescence registrované na vlnové délce 508 nm při excitaci zářením s vlnovými délkami 395 a 475 nm ($R_{395/475}$), na hodnotě vnitrobuněčného pH_{in} . Data jsou prezentována jako aritmetické průměry tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka. a) Kalibrační křivka pro kvasinku *C. albicans*, b) kalibrační křivka pro kvasinku *C. glabrata*.

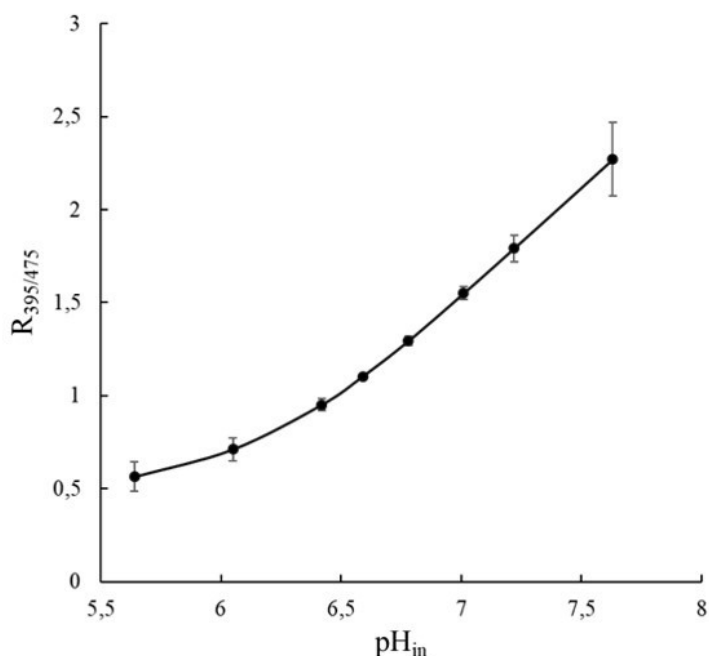
Použitím MS Excel byla vypočtena rovnice kalibrační křivky pro jednotlivé druhy, a to:

$$\text{pro } C. \textit{albicans}: \quad R_{395/475} = -0.0837\text{pH}_{\text{in}}^3 + 1.9798\text{pH}_{\text{in}}^2 - 14.175\text{pH}_{\text{in}} + 32.505$$

$$\text{pro } C. \textit{glabrata}: \quad R_{395/475} = -0.1368\text{pH}_{\text{in}}^3 + 2.9511\text{pH}_{\text{in}}^2 - 20.197\text{pH}_{\text{in}} + 45.211$$

Kalibrační křivky pro oba druhy byly porovnány a byla vytvořena výsledná kalibrační křivka ze vzájemně zprůměrovaných hodnot (Obr. 10) a vypočtena univerzální rovnice kalibrační křivky:

$$R_{395/475} = -0.1561\text{pH}_{\text{in}}^3 + 3.353\text{pH}_{\text{in}}^2 - 22.804\text{pH}_{\text{in}} + 50.587$$

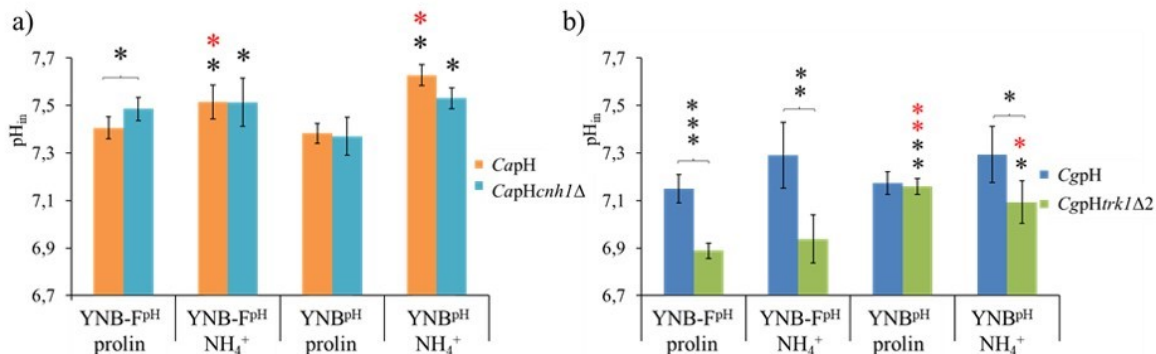


Obr. 10: Výsledná kalibrační křivka závislosti poměru intenzit emitované fluorescence pHluorinu při excitaci zářením s vlnovými délkami 395 a 475 nm ($R_{395/475}$) na hodnotě vnitrobuněčného pH_{in} . Data jsou prezentována jako aritmetické průměry hodnot obou kandid \pm směrodatná odchylka.

6.3 Vliv složení kultivačního média na pH_{in} kvasinek

Při kultivaci buněk v médiích YNB-F^{pH} prolin, YNB-F^{pH} NH_4^+ , YNB^{pH} prolin a YNB^{pH} NH_4^+ bylo možné na základě měření hodnot OD_{600} všech kmenů pozorovat nejrychlejšího dosažení cílových hodnot OD_{600} u buněk kultivovaných v médiu YNB-F^{pH}

s přidavkem prolinu. Dalo by se usuzovat, že testované kmeny *C. albicans* a *C. glabrata* vykazují rychlejší růst v přítomnosti organického zdroje dusíku, v tomto případě prolinu, oproti anorganickému NH_4^+ .



Obr. 11: a) Vnitrobuněčné pH_{in} kvasinek *C. albicans* a vliv delece *cnh1Δ* na vnitrobuněčné pH_{in} po kultivaci v médiích o různém složení a s různým zdrojem dusíku: YNB-F^{pH} prolin, YNB-F^{pH} NH_4^+ , YNB^{pH} prolin a YNB^{pH} NH_4^+ . Data jsou prezentována jako aritmetické průměry nezávislých měření \pm směrodatná odchylka (pro *C. albicans* $n = 5$, pro *C. glabrata* $n = 3$). Hvězdičkami jsou vyznačeny hladiny statistické významnosti rozdílů v pH_{in} mezi týmiž kmeny kultivovanými v jednotlivých médiích. Signifikantní rozdíl pH_{in} kmene kultivovaného v daném médiu vůči témuž kmeni kultivovanému v médiu YNB^{pH} prolin (*), nebo v médiu YNB-F^{pH} prolin (*). b) Sledování vlivu delece *trk1Δ* na vnitrobuněčné pH_{in} kvasinek *C. glabrata* po kultivaci v médiích s různým zdrojem dusíku: YNB-F^{pH} prolin, YNB-F^{pH} NH_4^+ , YNB^{pH} prolin a YNB^{pH} NH_4^+ . Hvězdičkami jsou vyznačeny signifikantní rozdíly v pH_{in} mezi kmeny kultivovanými v daných médiích vůči témuž kmeni kultivovanému v médiu YNB-F^{pH} prolin (*), nebo v médiu YNB-F^{pH} NH_4^+ (*). Svorkou je znázorněn signifikantní rozdíl ve vnitrobuněčném pH_{in} kmenů *cnh1Δ* nebo *trk1Δ2* vůči příslušnému rodičovskému kmeni. * nebo *, $P < 0,05$. ** nebo **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Na základě porovnání naměřených hodnot na Obr. 11a je možné konstatovat, že po kultivaci buněk *C. albicans* v médiích s přidavkem NH_4^+ je dosaženo vyššího vnitrobuněčného pH_{in} oproti odpovídajícímu médiu s přidavkem prolinu. U média YNB-F^{pH} je tento rozdíl viditelný především u kmene *CapH*, kde se jedná o staticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$; znázorněný *). U média YNB^{pH} je tento rozdíl statisticky významný pro oba kmeny ($P \leq 0,05$; znázorněný *).

Hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} buněk *C. albicans*, kultivovaných v jednotlivých variantách médií YNB-F^{pH} a YNB^{pH} se shodným zdrojem dusíku vůči sobě navzájem signifikantní rozdíly ani u jednoho kmene nevykazují.

Naměřené hodnoty pH_{in} obou kmenů *C. albicans* po kultivaci v médiu YNB-F^{pH} NH_4^+ byly statisticky významně vyšší ($P \leq 0,05$; znázorněno *) oproti pH_{in} buněk kultivovaných v médiu YNB^{pH} prolin.

Nepřítomnost transportéru *Cnh1* u kmene *CapHcnh1* Δ vykazuje v různých médiích rozdílný vliv na hodnotu pH_{in} (Obr. 11a). Po kultivaci buněk v médiu YNB-F^{pH} prolin bylo naměřeno signifikantně vyšší pH_{in} ($P \leq 0,05$; znázorněno *) u kmene *CapHcnh1* Δ v porovnání s kmenem *CapH*. V tomtéž médiu (YNB-F^{pH}) s anorganickým zdrojem dusíku však nebyl pozorován žádný rozdíl. U média YNB^{pH} byly hodnoty pH_{in} u obou kmenů v případě varianty obsahující prolin vyrovnané, u varianty s amonnými ionty byly hodnoty pH_{in} u kmene *CapHcnh1* Δ nižší oproti kmeni *CapH*, avšak bez statistické významnosti. Tento trend se tedy mění v závislosti na použitém médiu a vliv delece *cnh1* Δ na vnitrobuněčné pH_{in} není prokazatelný.

Pro zpracování výsledků a porovnání vlivu delece příslušného transportéru na hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} u kmenů *C. glabrata* v různých kultivačních podmínkách byl z obou klonů kmene *trk1* Δ na základě stabilnějších naměřených hodnot pro všechny experimenty vybrán klon 2. Z Obr. 11b je zřejmé, že buňky kmene *Cgph* kultivované v médiích s přídavkem NH_4^+ dosahují v obou médiích vyššího vnitrobuněčného pH_{in} oproti odpovídajícímu médiu s přídavkem prolinu, přičemž se však nejedná o rozdíly statisticky signifikantní. U kmene *Cgptrk1* Δ 2 tento trend nebyl pozorován.

Hodnoty pH_{in} buněk *Cgph* po kultivaci v médiích YNB-F^{pH} a YNB^{pH} s tímtož zdrojem dusíku byly v rámci chyby měření shodné. Ani mezi hodnotami pH_{in} buněk *Cgph* kultivovaných v ostatních médiích nebyl naměřen signifikantní rozdíl. Kmen *Cgptrk1* Δ 2 vykazoval pro oba zdroje dusíku v médiu YNB^{pH} vyšší hodnoty pH_{in} v porovnání s médiem YNB-F^{pH} , přičemž vůči oběma variantám média YNB-F^{pH} byly naměřeny signifikantní rozdíly, jak v médiu YNB^{pH} prolin ($P < 0,01$; značeno ** a **), tak i v médiu YNB^{pH} NH_4^+ ($P < 0,05$; značeno * a *), viz Obr. 11b.

Delece *trk1Δ* omezí vstup draselných iontů do buňky, přičemž tento zpomalený tok K^+ musí být kompenzován H^+ -ATPázou a projeví se na množství protonů uvnitř buňky, tudíž i vnitrobuněčném pH_{in} . U kmene *CgpHtrk1Δ2* bylo ve všech médiích naměřeno nižší pH_{in} v porovnání s kmenem *CgpH*, rozdíly byly signifikantní při kultivaci buněk v médiích YNB-F^{pH} prolin ($P < 0,001$; značeno *** nad svorkou), YNB-F^{pH} NH_4^+ ($P < 0,01$; značeno ** nad svorkou) a YNB^{pH} NH_4^+ ($P < 0,05$; značeno * nad svorkou), viz Obr. 11b.

Porovnáním naměřených hodnot pH_{in} pro obě kandidy (viz Obr. 11) bylo možné konstatovat, že po kultivaci ve všech médiích má *C. albicans* výsledné pH_{in} vyšší než *C. glabrata*.

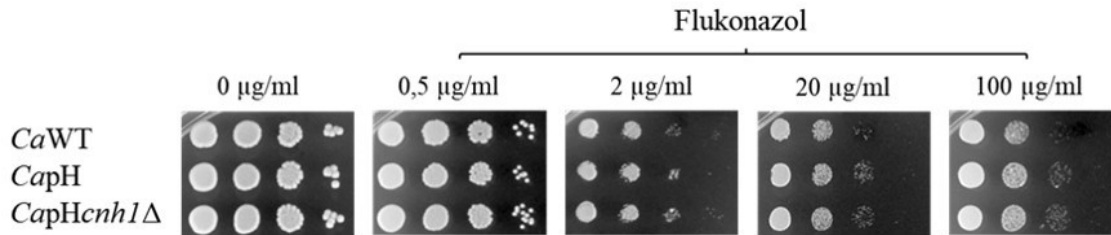
6.4 Vliv působení antimykotik na vnitrobuněčné pH_{in}

Pro určení vlivu působení antimykotik na vnitrobuněčné pH_{in} kvasinek bylo nejprve zapotřebí nalézt vhodnou koncentraci antimykotika, která není pro buňky smrtící. Kapkové testy posloužily k určení takové koncentrace antimykotika, která ovlivní růst buněk jen mírně a buňky jsou v přítomnosti takovéto koncentrace antimykotika ještě schopné růst. Finální koncentrace byly pro každou kandidu zvoleny individuálně a jsou uvedené vždy v příslušné kapitole.

Z jednotlivých kapkových testů je u všech léčiv patrná vyšší odolnost buněk druhu *C. glabrata* ve srovnání s druhem *C. albicans*, což znamenalo také vyšší zvolené koncentrace používané pro měření vnitrobuněčného pH_{in} .

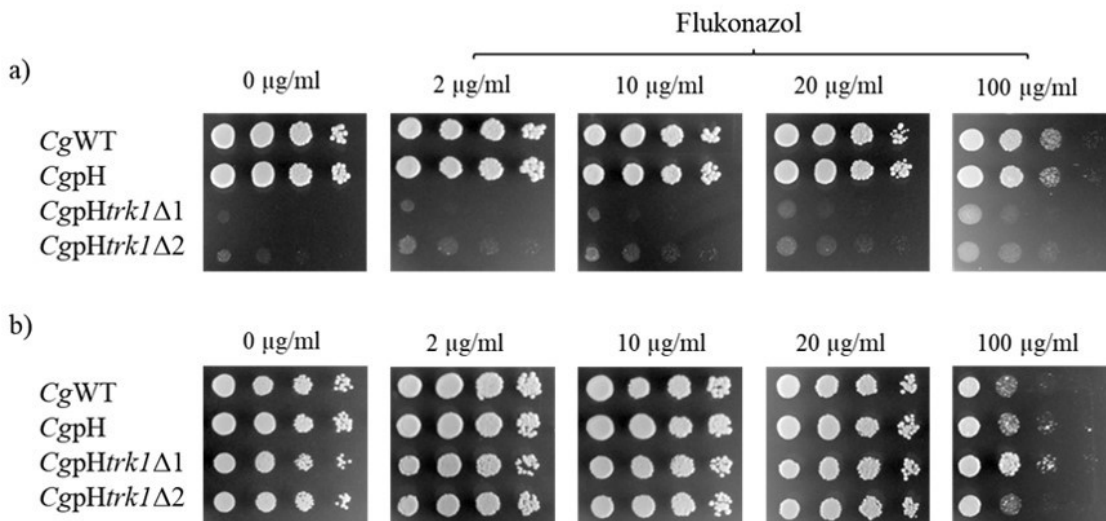
Pro všechny kapkové testy a měření vnitrobuněčného pH_{in} bylo zvoleno médium YNB-F^{pH} prolin, do kterého byl přidáván KCl v koncentracích 10 mM, nebo 100 mM (koncentrace uvedeny vždy v příslušné kapitole). Do kultivačních médií kvasinky *C. glabrata* byl navíc přidáván nourseotricin (200 $\mu\text{g/ml}$).

6.4.1 Flukonazol



Obr. 12: Vliv flukonazolu na růst kvasinky *C. albicans* v médiu obsahujícím 10 mM KCl, fotografováno 2. den kultivace při 30 °C.

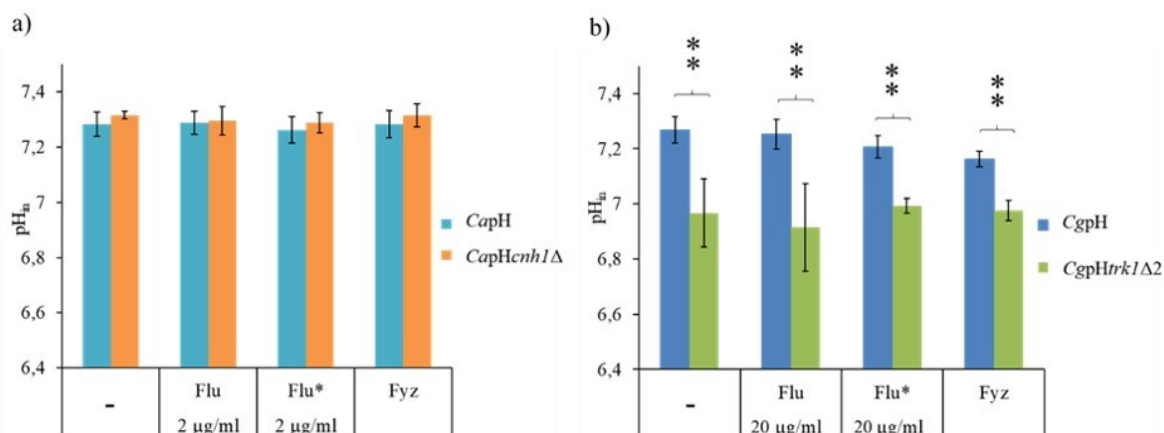
Z kapkových testů na Obr. 12 je viditelný zhoršující se růst buněk v závislosti na zvyšující se koncentraci flukonazolu. Delece *cnh1Δ* nemá na růst kvasinky *C. albicans* v přítomnosti flukonazolu vliv. Na základě kapkového testu byla zvolena koncentrace flukonazolu pro další experimenty u *C. albicans* 2 µg/ml.



Obr. 13: Vliv flukonazolu na růst kvasinek *C. glabrata* v médiu obsahujícím a) 10 mM KCl, b) 100 mM KCl. Kapkový test byl vyfotografován 2. den kultivace při 30 °C.

Na Obr. 13 je znázorněna závislost růstu druhu *C. glabrata* na koncentraci flukonazolu při různých koncentracích KCl. Na Obr. 13a je patrná neschopnost růstu kmenů s delecí *trk1Δ* v přítomnosti nízké koncentrace KCl (10 mM) v porovnání s koncentrací 100 mM (Obr. 13b), kde je schopnost růstu těchto kmenů srovnatelná s kmeny CgWT a CgpH. Při vyšších koncentracích flukonazolu se schopnost růstu kmenů s delecí *trk1Δ*

i přes nízké koncentrace draselných iontů mírně zlepšuje (viz Obr. 13a). Také růst kmenů *CgWT* a *CgpH* je v přítomnosti 100 $\mu\text{g/ml}$ flukonazolu a 10 mM KCl vydatnější než při 10 \times vyšší koncentraci KCl. Z kapkových testů byla zvolena koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$ flukonazolu pro měření vlivu tohoto antimykotika na vnitrobuněčné pH_{in} *C. glabrata*.



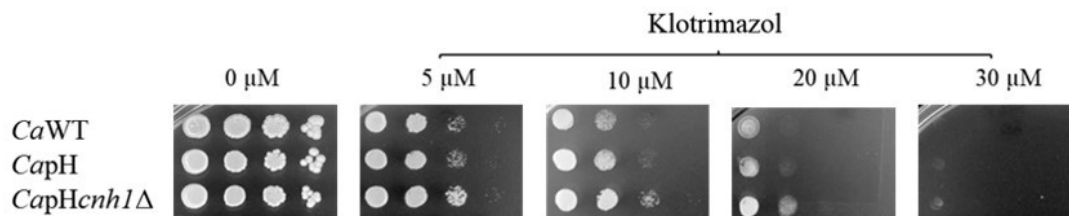
Obr. 14: Vliv inkubace buněk v přítomnosti flukonazolu (Flu), okamžitého přídavku flukonazolu (Flu*) a okamžitého přídavku fyziologického roztoku (Fyz) na vnitrobuněčné pH_{in} v porovnání s kontrolou (-) kultivovanou v čistém médiu u druhu: a) *C. albicans*, b) *C. glabrata*. a) Buňky *C. albicans* byly kultivované v médiu s 10 mM KCl. Koncentrace flukonazolu byla 2 $\mu\text{g/ml}$. b) Buňky *C. glabrata* byly kultivované v médiu se 100 mM KCl. Koncentrace flukonazolu byla 20 $\mu\text{g/ml}$. Fyziologický roztok byl v obou případech přidáván v objemu shodném s objemem přidávaného flukonazolu. Data jsou prezentována jako aritmetické průměry tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka. Hvězdičkami nad svorkou jsou vyznačeny hladiny statistické významnosti rozdílů v pH_{in} mezi jednotlivými kmeny za stejných podmínek, ** $P < 0,01$.

Z naměřených hodnot pH_{in} buněk vystavených uvedeným podmínkám (viz Obr. 14a) nejsou u jednotlivých kmenů druhu *C. albicans* pozorovány žádné rozdíly. Kmen s delecí *cnh1Δ* v porovnání s kmenem *CapH* vykazuje mírně vyšší hodnoty pH_{in} . Tyto rozdíly však nejsou statisticky signifikantní.

Na Obr. 14b je u druhu *C. glabrata* pro kmen *CgpH* patrný mírný pokles v hodnotách pH_{in} po přidání flukonazolu, avšak největší vliv na pH_{in} buněk měl okamžitý přídavek samotného fyziologického roztoku. U kmene s delecí *trk1Δ* jsou hodnoty pH_{in} po působení flukonazolu i fyziologického roztoku srovnatelné s kontrolou. Hodnoty pH_{in} se navzájem u obou kmenů signifikantně liší a kmen *CgpHtrk1Δ2* vykazuje hodnoty pH_{in} nižší než kmen

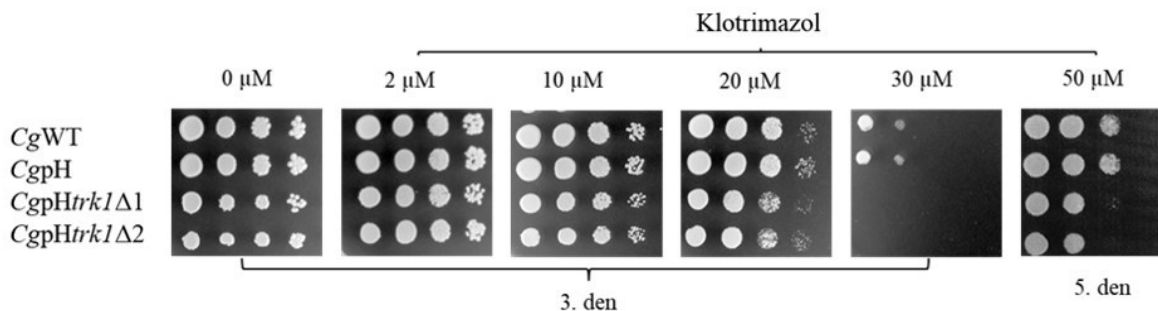
CgpH, a to s hladinou statistické významnosti pro všechny uvedené podmínky $P < 0,01$ (znázorněno ** nad svorkou).

6.4.2 Klotrimazol



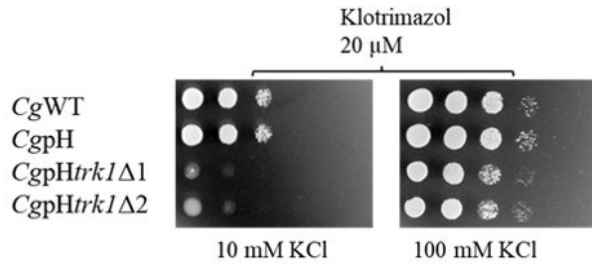
Obr. 15: Vliv klotrimazolu na růst kvasinky *C. albicans* v médiu s přidaným 10 mM KCl. Kapkový test byl vyfotografován 3. den kultivace při 30 °C.

Se zvyšující se koncentrací klotrimazolu je z kapkových testů na Obr. 15 patrný pokles růstu buněk všech kmenů kvasinky *C. albicans*. Kmen *CapHcnh1Δ* vykazuje mírně zlepšenou schopnost růstu při vyšších koncentracích klotrimazolu, která je patrná u koncentrací 10 a 20 μM. Na základě kapkového testu byl zvolen 20 μM klotrimazol pro měření vlivu tohoto antimykotika na vnitrobuněčné pH_{in} kvasinek *C. albicans*.



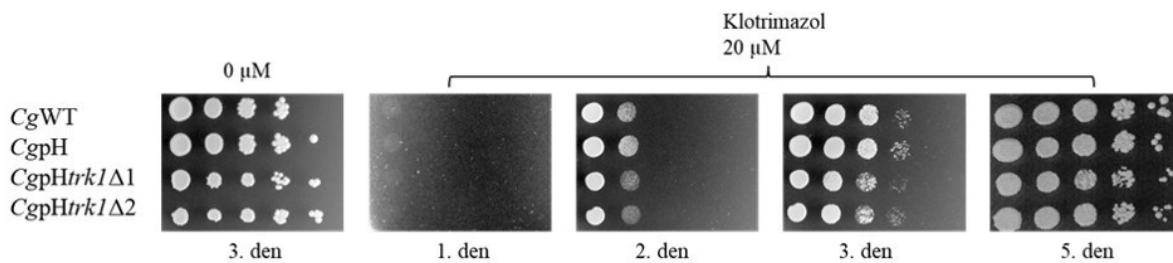
Obr. 16: Vliv klotrimazolu na růst buněk *C. glabrata*. Médium obsahovalo přídavek 100 mM KCl.

Na Obr. 16 je viditelný pokles růstu buněk všech kmenů kvasinky *C. glabrata* v závislosti na rostoucí koncentraci klotrimazolu, přičemž delece *trk1Δ* u kmenů *CgpHtrk1Δ1* a *CgpHtrk1Δ2* způsobuje zvýšenou citlivost vůči vyšším koncentracím antimykotika, která je patrná od koncentrace 20 μM. Pro stanovení vlivu klotrimazolu na pH_{in} kvasinek *C. glabrata* byla na základě kapkového testu zvolena koncentrace klotrimazolu 30 μM.



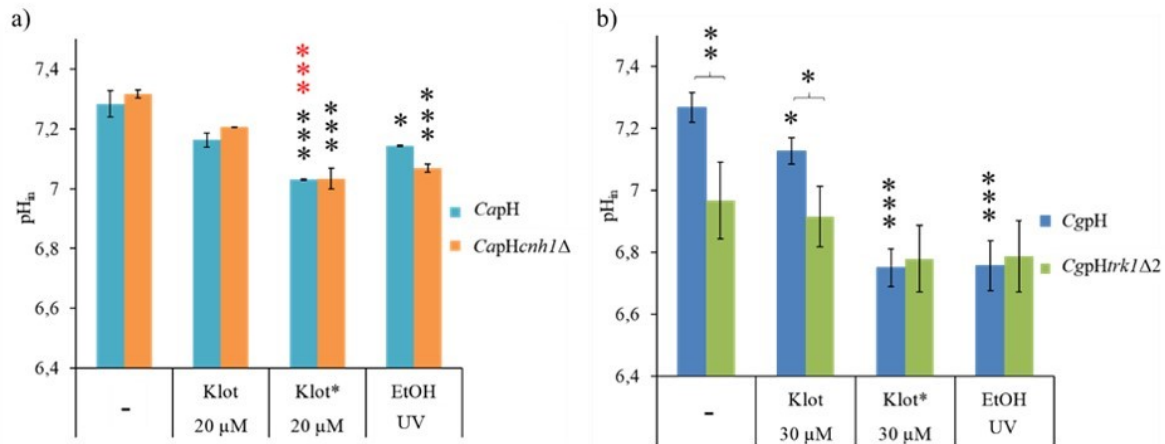
Obr. 17: Kapkový test zachycující vliv koncentrace KCl v přítomnosti 20 μM klotrimazolu na růst druhu *C. glabrata*. Snímky byly pořízeny 3. den kultivace při 30 °C.

Na Obr. 17 je porovnán růst buněk v přítomnosti klotrimazolu o koncentraci 20 μM a různých koncentracích draselných kationtů. Vyšší koncentrace KCl napomáhá růstu buněk všech kmenů, přičemž delece *trk1Δ* zvyšuje citlivost kmenů vůči klotrimazolu v obou koncentracích KCl.



Obr. 18: Časový vývoj růstu buněk *C. glabrata* v přítomnosti 20 μM klotrimazolu. Médium obsahovalo 100 mM KCl.

Srovnání míry nárůstu kmenů při stejné koncentraci klotrimazolu v čase na Obr. 18 ukazuje, že i přes počáteční inhibici růstu buněk (1. den) je u všech kmenů viditelný postupný nárůst od 2. až po 5. den kultivace, kdy dosáhnou jednotlivé kolonie velikosti, která je srovnatelná s velikostí kolonií na kontrolní misce již po 3 dnech kultivace.

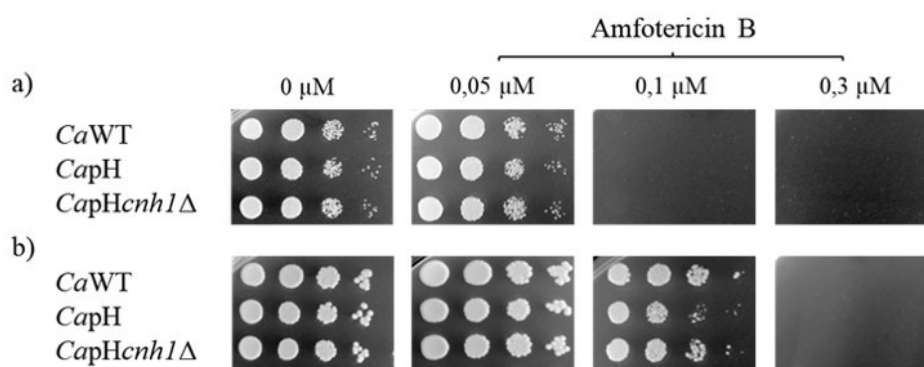


Obr. 19: Vliv inkubace buněk v přítomnosti klotrimazolu (Klot), okamžitého přidavku klotrimazolu (Klot*) a okamžitého přidavku etanolu (EtOH UV) na vnitrobuněčné pH_{in} v porovnání s kontrolou kultivovanou v čistém médiu u druhu: a) *C. albicans*, b) *C. glabrata*. a) Buňky *C. albicans* byly kultivované v médiu s 10 mM KCl. Koncentrace klotrimazolu byla 20 μM. b) Buňky *C. glabrata* byly kultivované v médiu se 100 mM KCl. Koncentrace klotrimazolu byla 30 μM. Etanol byl v obou případech přidáván v objemu shodném s objemem přidávaného klotrimazolu. Data jsou prezentována jako aritmetické průměry tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka. Hvězdičkami jsou vyznačeny hladiny statistické významnosti rozdílů v pH_{in} daného kmene vystavenému vlivu příslušných podmínek * vůči kontrole, * vůči rozpouštědлу. * nad svorkou značí signifikantní rozdíly mezi kmeny při stejných podmínkách, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Na Obr. 19a je u buněk *C. albicans* kultivovaných v přítomnosti klotrimazolu i buněk, k nimž byl klotrimazol, popřípadě etanol, přidán bezprostředně před měřením patrný pokles hodnot pH_{in} v porovnání s kontrolou, přičemž největší vliv je viditelný u okamžitého přidavku klotrimazolu. Hodnoty pH_{in} kmene *CapH* po okamžitém přidavku klotrimazolu vykazovaly statisticky signifikantní rozdíly vůči odpovídající kontrole (P < 0,001; znázorněno ***) i vůči hodnotám pH_{in} buněk po okamžitém přidavku samotného etanolu, v němž byl klotrimazol rozpouštěn (P < 0,001; znázorněno ***). Kmen *CapHcnh1Δ* vykazoval signifikantní rozdíly jen vůči kontrole (P < 0,001; znázorněno ***). Zároveň je viditelný signifikantní pokles pH_{in} obou kmenů po přidání etanolu v porovnání s kontrolními buňkami, kdy pro kmen *CapH* se jedná o hodnotu P < 0,05 (znázorněno *) a pro kmen *CapHcnh1Δ* o hodnotu P < 0,001 (znázorněno ***).

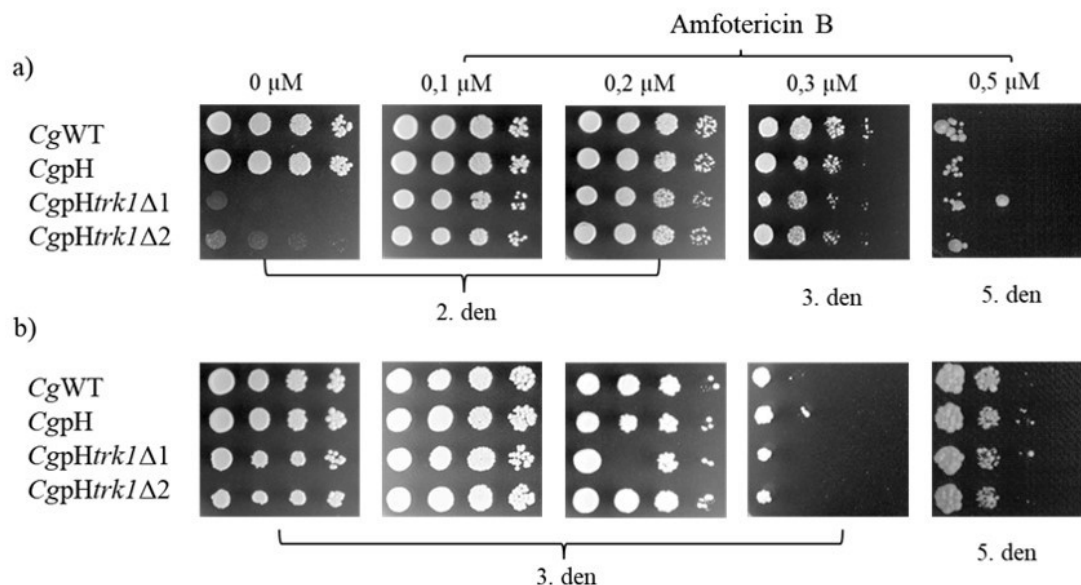
Obr. 19b znázorňuje pokles hodnot pH_{in} buněk *C. glabrata* kultivovaných s klotrimazolem a také buněk, k nimž byl klotrimazol či etanol přidán až před samotným měřením pH_{in} v porovnání s kontrolními buňkami. U kmene CgpH je tento rozdíl statisticky významný pro kultivaci s klotrimazolem ($P < 0,05$; znázorněno *) i pro okamžitý přídavek klotrimazolu ($P < 0,001$; znázorněno ***) a etanolu ($P < 0,001$; znázorněno ***). Vliv delece *trk1Δ* na hodnoty pH_{in} v porovnání s kmenem CgpH byl kromě kontroly pozorován u buněk kultivovaných v přítomnosti klotrimazolu s významností ($P < 0,05$; znázorněno *). V ostatních podmínkách byla naměřená hodnota pH_{in} srovnatelná s kmenem CgpH.

6.4.3 Amfotericin B



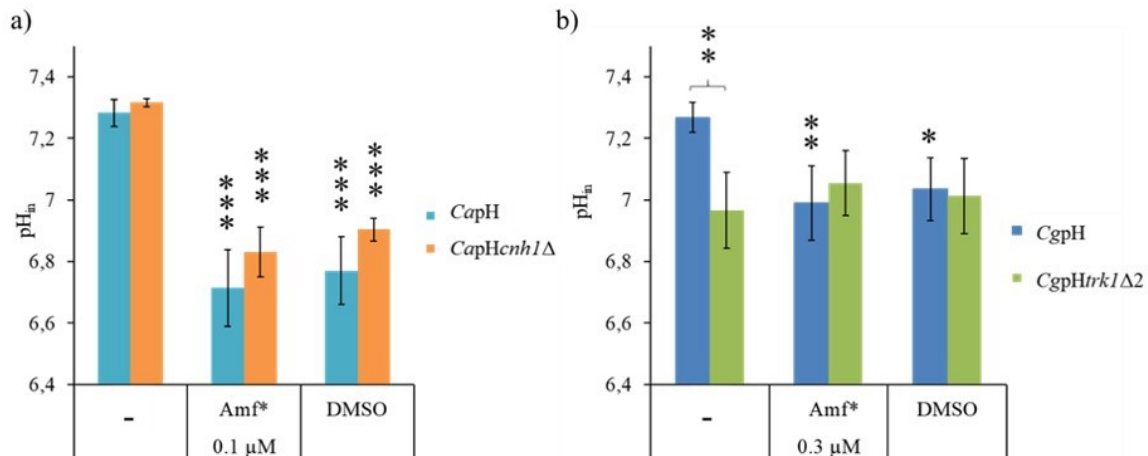
Obr. 20: Vliv amfotericinu B na růst buněk *C. albicans* v médiu obsahujícím 10 mM KCl. Kapkový test byl fotografován a) 1. den, b) 2. den kultivace při 30 °C.

Na kapkových testech na Obr. 20 lze porovnat růst buněk jednotlivých kmenů *C. albicans* v závislosti na rostoucí koncentraci amfotericinu B v čase. Vyšší koncentrace antimykotika inhibují růst buněk všech kmenů. Po uplynutí 24 h kultivace s 0,1 μM amfotericinem B nebyly patrné kolonie u žádného z kmenů. Po 48 hodinách však můžeme pozorovat silný nárůst kolonií všech kmenů. Amfotericin B prodlužuje identicky lag fázi všech testovaných kmenů *C. albicans*, tudíž delece *cnh1Δ* nemá vliv na schopnost růstu v přítomnosti amfotericinu B. Na základě kapkových testů byla pro měření vnitrobuněčného pH_{in} *C. albicans* zvolena 0,1 μM koncentrace amfotericinu B.



Obr. 21: Vliv přítomnosti amfotericinu B na růst buněk *C. glabrata* v médiích s různým obsahem KCl: a) 10 mM KCl, b) 100 mM KCl.

Na Obr. 21 lze na kontrolních miskách pozorovat sníženou schopnost růstu kmenů *C. glabrata* s delecí *trk1Δ* na médiu s 10 mM KCl (Obr. 21a). Tato schopnost se však v přítomnosti amfotericinu B znovu objevuje a u koncentrace 0,3 μ M amfotericinu B je v tomto typu média dokonce větší, než u téže koncentrace antimykotika v médiu se 100 mM KCl. Obdobný jev byl pozorován také u kmenů CgWT a CgpH. Porovnáním jednotlivých kmenů při vyšších koncentracích draselných kationtů nebyl pozorován vliv delece *trk1Δ* na odolnost vůči amfotericinu B oproti ostatním kmenům a růst všech kmenů se s rostoucí koncentrací antimykotika zhoršuje. Částečný nárůst kolonií lze pozorovat 5. den v přítomnosti 0,5 μ M amfotericinu B. Pro měření vnitrobuněčného pH_{in} *C. glabrata* byla zvolena 0,3 μ M koncentrace amfotericinu B.

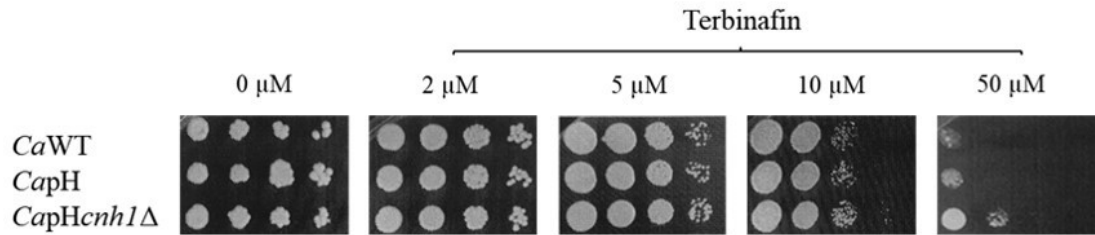


Obr. 22: Vliv okamžitého přidavku amfotericinu B (Amf*) a dimetylsulfoxidu (DMSO) na vnitrobuněčné pH_{in} v porovnání s kontrolou u druhu: a) *C. albicans*, buňky byly kultivované v médiu s 10 mM KCl. Koncentrace amfotericinu B byla 0,1 μM; b) *C. glabrata*, buňky byly kultivované v médiu se 100 mM KCl. Koncentrace amfotericinu B byla 0,3 μM. DMSO byl v obou případech přidáván v objemu shodném s objemem přidávaného amfotericinu B. Data jsou prezentována jako aritmetické průměry tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka. Hvězdičkami jsou vyznačeny hladiny statistické významnosti rozdílů v pH_{in} odpovídajícího kmene vystavenému vlivu daných podmínek * vůči kontrole, * nad svorkou porovnány příslušné kmeny vůči sobě, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Na Obr. 22a můžeme pozorovat signifikantní pokles hodnot pH_{in} po přidavku amfotericinu B u obou kmenů *C. albicans*, *CapH* (P < 0,001; znázorněno ***) a *CapHcnh1Δ* (P < 0,001; znázorněno ***). Stejně signifikantní pokles hodnot je u obou kmenů pozorován také po přidavku samotného rozpouštědla (P < 0,001; znázorněno ***). Ve všech podmínkách má kmen *CapHcnh1Δ* vyšší pH_{in} než kmen *CapH*, tyto rozdíly však nejsou statisticky významné.

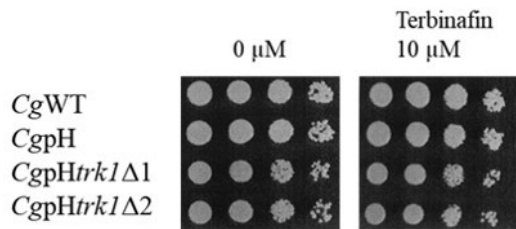
Přídavek amfotericinu B má statisticky významný vliv (P < 0,01; znázorněno **) na pokles pH_{in} kmene *CgpH* (Obr. 22b). Ke snížení hodnot pH_{in} kmene *CgpH* dochází i v případě přidavku samotného DMSO (P < 0,05; znázorněno *). Na rozdíl od kmene *CgpH* mutantní kmen bez transportéru *Trk1* nevykazuje významně rozdílné hodnoty v pH_{in} po přidání amfotericinu B či DMSO oproti kontrole.

6.4.4 Terbinafin



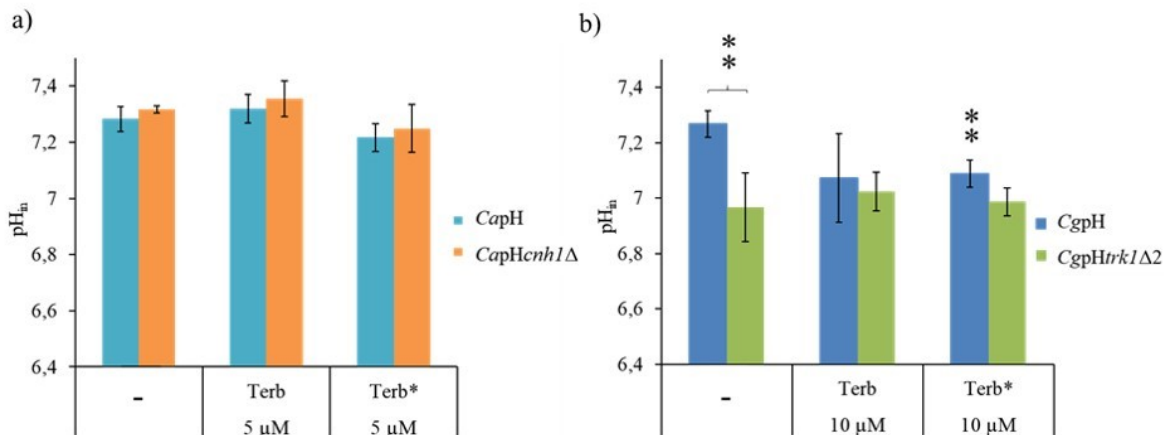
Obr. 23: Vliv terbinafinu na růst buněk *C. albicans* v médiu obsahujícím 10 mM KCl. Kapkový test byl vyfotografován po 2 dnech kultivace při 30 °C.

Z kapkových testů na Obr. 23 je patrná inhibice růstu buněk v závislosti na rostoucí koncentraci terbinafinu. Kmen s delecí *cnh1Δ* vykazuje při koncentraci terbinafinu 50 μM lehce zvýšenou toleranci a lepší schopnost růstu ve srovnání s divokým kmenem. Na základě kapkového testu byla zvolena 5 μM koncentrace terbinafinu pro měření pH_{in} *C. albicans*.



Obr. 24: Vliv přítomnosti terbinafinu na růst buněk *C. glabrata* v médiu se 100 mM KCl. Snímky kapkového testu byly pořízeny po 2 dnech kultivace při 30 °C.

Delece *trk1Δ* neměla vliv na citlivost buněk *C. glabrata* vůči terbinafinu (Obr. 24). Pro měření vnitrobuněčného pH_{in} *C. glabrata* byla zvolena 10 μM koncentrace terbinafinu.



Obr. 25: Vliv kultivace v přítomnosti terbinafinu (Terb) a okamžitého přídávku terbinafinu (Terb*) na vnitrobuněčné pH_{in} v porovnání s kontrolou kultivovanou v čistém médiu u druhu: a) *C. albicans*, buňky byly kultivované v médiu s 10 mM KCl. Koncentrace terbinafinu byla 5 μM; b) *C. glabrata*, buňky byly kultivované v médiu se 100 mM KCl. Koncentrace terbinafinu byla 10 μM. Data jsou prezentována jako aritmetické průměry tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka. Hvězdičkami (***) je vyznačen statisticky významný rozdíl v pH_{in} odpovídajícího kmene vystaveného vlivu daných podmínek vůči kontrole, ** nad svorkou značí porovnání kmenů ve stejných podmínkách vůči sobě, ** P < 0,01.

Na Obr. 25a je u obou kmenů *C. albicans* možné pozorovat mírné zvýšení pH_{in} po kultivaci v přítomnosti terbinafinu a naopak mírný pokles pH_{in} po okamžitém přídávku terbinafinu, přičemž žádný z těchto rozdílů není statisticky signifikantní. Delece *cnh1Δ* způsobila ve všech podmínkách mírně zvýšené pH_{in} oproti kmenu *CapH*, nejedná se však o statisticky významné hodnoty.

U kmene *CgpH* (viz Obr. 25b) je možné jak při kultivaci s terbinafinem, tak při jeho bezprostředním přidání před měřením pH_{in} pozorovat pokles hodnot pH_{in}, který je statisticky významný zejména v případě okamžitého přídávku terbinafinu (P < 0,01; značeno **). U kmene s delecí *trk1Δ* nejsou patrné rozdíly v naměřených hodnotách pH_{in} při kultivaci s terbinafinem, ani po jeho okamžitém přidání oproti kontrole. V porovnání s kmenem *CgpH* vykazoval kmen *CgpHtrk1Δ2* nižší hodnoty pH_{in} ve všech podmínkách, tyto rozdíly však nebyly statisticky významné.

7. Diskuse

Specifické enzymy a transportéry kvasinek lišící se ve struktuře a mechanismu od těch hostitelových natolik, že jsou pro buňky patogenů unikátní, jsou slibným cílem budoucí antimykotické léčby, která by díky vysoké specifitě neovlivnila funkce hostitelových buněk a zamezila projevu nežádoucích účinků (Llopis-Torregrosa et al. 2019). Příkladem takového cíle by mohla být inhibice pro kvasinky specifických draselných transportérů, která by omezila vstup těchto esenciálních iontů do buněk a vyústila ve špatnou životaschopnost nebo smrt buněk (Elicharová et al. 2016). Na základě dřívějších výzkumů membránových transportérů a jejich funkcí se předpokládá, že *C. glabrata* obsahuje v cytoplazmatické membráně pouze jeden druh specifického transportéru draselných iontů, Trk1, čímž je jeho přítomnost pro životaschopnost této kvasinky kritická (Caro et al. 2019). Delecí příslušného genu pro tento transportér dochází ke snížené schopnosti růstu v limitujících vnějších koncentracích draselných iontů (pod 100 mM KCl) (Llopis-Torregrosa et al. 2016). To potvrdily i kapkové testy, kde nebyly kmeny s delecí *trk1Δ* v porovnání s kontrolními kmeny schopny růst při koncentracích 10 mM KCl (viz Obr. 13a). Při kultivaci v médiu s přidaným 100 mM KCl delece *trk1Δ* růst buněk neovlivňovala a tyto buňky si byly schopny import draslíku zajistit pomocí jiných nesespecifických transportních systémů (viz Obr. 13b). Kontrolní kmeny nevykazovaly rozdíly v růstu mezi oběma použitými koncentracemi KCl a byly tak schopny se vnějšími koncentracemi těchto iontů lépe přizpůsobit (viz Obr. 13).

Vliv delece transportéru *trk1Δ* můžeme u druhu *C. glabrata* pozorovat nejen v prostředí s nedostatkem draselných iontů, ale také při dostatečných vnějších koncentracích K^+ , a to díky kompetici s jinými ionty o příslušné transportéry. Buňky s delecí *trk1Δ* vykazovaly při nelimitních vnějších koncentracích draselných iontů (100 mM KCl) rozdíly v rychlosti růstu v závislosti na použitém zdroji dusíku v kultivačních médiích. Měření hodnot OD_{600} potvrdilo vliv použitého zdroje dusíku, kdy cílových hodnot OD_{600} dosahovaly dříve buňky kultivované v médiu s prolinem v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu s obsahem síranu amonného (viz kapitola 6.3), neboť draselné ionty jsou při nelimitních vnějších koncentracích importovány do buněk pomocí nesespecifického transportéru, který slouží primárně pro transport iontů amonných (Llopis-Torregrosa et al. 2016). Při vyšších koncentracích amonných iontů v kultivačním médiu dochází ke kompetici draselných iontů

o příslušný transportér s ionty amonnými, a ty tak zpomalují import draselných iontů do buněk. To má za následek pomalejší růst. V případě použití prolinu jako zdroje dusíku je prolin do buněk přenášen pomocí transportéru YAT (Yeast Amino acid Transport) pro aminokyseliny, a draslík může být přenášen ve větší míře nespecifickým transportem určeným primárně pro amonné ionty (Ramos et al. 2016, Llopis-Torregrosa et al. 2016).

Vliv použitého zdroje dusíku v kultivačním médiu byl pozorován také u druhu *C. albicans* a kontrolního kmene druhu *C. glabrata*, u kterých se projeví rozdíly v naměřených hodnotách vnitrobuněčného pH_{in} . Po kultivaci v přítomnosti amonných iontů byly naměřené hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} buněk vyšší v porovnání s kultivací v přítomnosti prolinu (Obr. 11). Vysvětlení může souviset s povahou přenosu obou zmíněných dusíkatých látek, kdy přenos aminokyselin probíhá pomocí sekundárního transportu YAT, umožněného hnací silou protonů, kterou vytváří Pma1 H^+ -ATPáza (Ramos et al. 2016). Při importu aminokyselin, v tomto případě prolinu, dochází současně i k importu protonů a jejich zvýšená koncentrace uvnitř buněk má za následek nižší hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} .

Omezeným importem draselných kationtů díky delecí *trk1Δ* je ovlivněn také transport ostatních iontů včetně transportu protonů, což se projeví na hodnotě vnitrobuněčného pH_{in} (Llopis-Torregrosa et al. 2016). Při sníženém vstupu draselných iontů do buňky dochází k hyperpolarizaci membrány a změně membránového potenciálu, charakterizovaného negativním nábojem na vnitřní straně buněčné membrány (Ariño et al. 2019). Tento náboj je kompenzován sníženým exportem protonů z buňky regulovaným H^+ -ATPázou, čímž dochází k signifikantnímu snížení vnitrobuněčného pH_{in} u kmene s delecí *trk1Δ* v porovnání s rodičovským kmenem (Navarrete et al. 2010). Naměřené hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} u kmene s delecí *trk1Δ* byly v porovnání s kontrolním kmenem nižší ve všech případech, a to nezávisle na složení kultivačního média (viz kapitola 6.3).

Rozdíly v hodnotách vnitrobuněčného pH_{in} buněk s delecí *trk1Δ* kultivovaných v médiích YNB^{pH} a YNB-F^{pH} mohou být dány různou koncentrací draselných iontů v obou médiích (Caro et al. 2019). Zatímco médium YNB-F^{pH} obsahuje jen minimální množství draselných iontů ($< 15 \mu\text{M K}^+$), v médiu YNB^{pH} je základní koncentrace 15 – 20 mM KCl.

Vzhledem k tomu, že do obou médií bylo přidáno stejné množství KCl (100 mM), byl obsah draselných iontů v médiu YNB^{pH} o 15 – 20 mM vyšší. Tím mohlo dojít k snadnějšímu importu draselných iontů a snížení potřeby buněk kompenzovat negativní náboj vnitřní strany buněčné membrány. Vyšší export protonů pak mohl být příčinou vyšších naměřených hodnot vnitrobuněčného pH_{in} buněk tohoto kmene kultivovaných v médiu YNB^{pH} v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu YNB-F^{pH} (viz Obr. 11).

Delece *Cacnh1Δ* vedla jen k lehkému zvýšení hodnot vnitrobuněčného pH_{in} v porovnání s kontrolním kmenem (viz kapitoly 6.3 a 6.4). Cnh antiporter vyměňuje v případě nadbytku kationtů alkalických kovů (Na⁺) v buňce tyto ionty za protony (Kinclová-Zimmermannová a Sychrová 2007). Takovéto výměny zvyšují koncentraci protonů uvnitř buňky a s tímto přenosem tedy klesá vnitrobuněčné pH_{in}. Zvýšená koncentrace protonů je kompenzována H⁺-ATPázou, která tyto protony za spotřeby ATP vyloučí ven a udržuje tak hnací sílu potřebnou pro export dalších nežádoucích iontů (Ariño et al. 2019). Zvýšené hodnoty pH_{in} mohou být u kmene s delecí *cnh1Δ* dány právě sníženým importem protonů do buňky jinak zprostředkovaným tímto transportérem. Vzhledem k tomu, že buňky nebyly vystaveny vysoké koncentraci kationtů alkalických kovů, kterých by bylo potřeba se výměnou za protony zbavovat, byly pozorovány v hodnotách pH_{in} mezi kmenem s delecí *cnh1Δ* a kontrolním kmenem pouze nesignifikantní rozdíly. Delece tohoto transportéru u druhu *C. albicans* tedy nepředstavovala za zvolených kultivačních podmínek pro tuto kvasinku takové rozdíly ve fyziologických parametrech jako delece *trk1Δ* u druhu *C. glabrata*.

Porovnáním intenzit fluorescence pHluorinu u druhů *C. albicans* a *C. glabrata* bylo zjištěno, že povaha umístění genu pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu pHluorinu má na intenzitu jeho fluorescence značný vliv. Buňky *C. albicans* vykazovaly silnější signál oproti buňkám *C. glabrata* měřeným při stejných hodnotách OD₆₀₀ (viz kapitola 6.2.2). Buňky *C. albicans* měly gen pro pHluorin vložený přímo v genomu a příslušný fluorescenční protein byl exprimován silněji. U buněk druhu *C. glabrata* byl gen pro pHluorin vložen do plasmidu. U obou kvasinek se zároveň podařilo ověřit přítomnost exprimovaného pHluorinu v cytosolu, což poskytlo možnost měření hodnot vnitrobuněčného pH_{in} pouze v tomto kompartmentu a výsledné hodnoty nebyly zkresleny hodnotami pH dalších organel,

například mitochondrií či vakuol, v nichž je hodnota pH odlišná (viz Obr. 8) (Orij et al. 2009, Orij et al. 2011).

Stále větší problém v terapii kvasinkových infekcí představují především *nealbicans* druhy, které často vykazují mnohačetnou lékovou rezistenci k používaným antimykotikům (Silva et al. 2012). Sníženou citlivost kvasinek *C. glabrata* vůči antimykotikům se podařilo ověřit kapkovými testy, z nichž bylo patrné, že je *C. glabrata* schopná růst někdy i v přítomnosti mnohonásobně vyšších koncentrací antimykotik než *C. albicans*, čemuž odpovídaly i různě zvolené koncentrace antimykotik pro měření vlivu těchto látek na pH_{in} kvasinek (viz kapitola 6.4).

Všechna testovaná antimykotika měla jako společný cíl působení ergosterol obsažený v cytoplazmatické membráně či dráhu jeho syntézy (Roemer a Krysan 2014). Chybějící ergosterol v buněčné membráně narušuje její strukturu a vlastnosti a může také docházet k ovlivnění funkcí membránových transportérů. Tyto změny vedou při použití dostatečných koncentrací antimykotik k nerovnováze v buněčných parametrech a zastavení růstu a dělení buněk nebo jejich smrti (Lv et al. 2016). Sledovaný vliv antimykotik na vnitrobuněčné pH_{in} byl vzhledem k různým mechanismům účinku odlišný.

Flukonazol byl zvolen jako zástupce triazolových antimykotik, který je široce používanou látkou a standardem v léčbě systémových infekcí. Inhibuje enzym Erg11, což vede k depleci ergosterolu v membráně, čímž je ovlivněna funkce mnoha membránových transportérů. Flukonazol je velmi často spojen s rezistencí a sníženou citlivostí některých druhů kvasinek (Ghannoum a Rice 1999). To se prokázalo pomocí kapkových testů u druhu *C. glabrata*, pro nějž byly použité koncentrace 10× vyšší než u druhu *C. albicans*, který je vůči flukonazolu citlivější (viz Obr. 12 a Obr. 13). Zvolené koncentrace flukonazolu nevyvolávaly v porovnání s kontrolou žádné změny v pH_{in} buněk ani u jednoho druhu. Změny nebyly pozorovány ani u buněk po okamžitém přidavku flukonazolu nebo čistého fyziologického roztoku (Obr. 14). Pro budoucí experimenty by bylo třeba zvážit použití vyšších koncentrací flukonazolu.

Klotrimazol byl zvolen jako zástupce imidazolových antimykotik, který se používá především pro léčbu kožních a vaginálních infekcí (Hartl et al. 2012). Klotrimazol u obou

druhů snížil hodnotu vnitrobuněčného pH_{in} (viz Obr. 19). U obou kmenů druhu *C. albicans* došlo po jejich kultivaci v přítomnosti klotrimazolu k lehkému nesignifikantnímu snížení hodnot pH_{in} . Oproti tomu okamžité přidání klotrimazolu mělo silnější a signifikantní vliv na naměřené hodnoty pH_{in} buněk. Obdobných výsledků bylo dosaženo i u druhu *C. glabrata*, kde větší pokles hodnot pH_{in} byl zaznamenán u buněk kontrolního kmene, u něhož se tato hodnota vyrovnala hodnotám buněk s delecí *trk1Δ*. Snížené hodnoty pH_{in} vlivem působení klotrimazolu by mohly být vysvětleny tím, že dochází ke změnám složení cytoplazmatické membrány, která již dále neposkytuje účinnou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím (Lv et al. 2016). Může docházet k úniku draselných iontů do prostředí ve směru koncentračního gradientu. Tento převažující negativní náboj uvnitř buňky je vyrovnáván sníženou funkcí H^+ -ATPázy, tedy sníženým exportem protonů a jejich vyšší koncentrace v buňce pak způsobí snížené vnitrobuněčné pH_{in} .

Amfotericin B byl zvolen jakožto fungicidní antimykotikum s odlišným mechanismem účinku od azolových antimykotik. Vazbou na ergosterol v buněčné membráně v ní vytváří póry, čímž dochází k úniku buněčného obsahu výměnou za vstup látek z prostředí (Hartl et al. 2012). U všech kmenů s výjimkou kmene s delecí *trk1Δ* byl zaznamenán pokles hodnot vnitrobuněčného pH_{in} (Obr. 22). To může být způsobeno, podobně jako v případě klotrimazolu, unikem draselných iontů skrze póry vytvořené amfotericinem B a zvýšeným zadržováním protonů v buňce.

Zajímavým výsledkem bylo, že se podobné snížení hodnot vnitrobuněčného pH_{in} jako po přidání klotrimazolu a amfotericinu B projevilo také po přidání samotných rozpouštědel. Pro další pokusy by bylo třeba otestovat vliv klotrimazolu s použitím jiného rozpouštědla a některé ve vodě rozpustné formy amfotericinu B, popřípadě podrobněji prozkoumat vliv etanolu a DMSO na vnitrobuněčné pH_{in} obou kandid.

Terbinafin je zástupce allylaminů, který inhibuje syntézu ergosterolu a způsobuje jeho nedostatek, a naopak nahromadění nežádoucího skvalenu v plazmatické membráně (Hartl et al. 2012). U druhu *C. albicans* nebyl zjištěn žádný vliv působení terbinafinu na vnitrobuněčné pH_{in} (viz Obr. 25a). Pro budoucí experimenty by bylo třeba zvolit vyšší koncentraci terbinafinu. V případě druhu *C. glabrata* terbinafin vyvolal snížení hodnot pH_{in}

u kontrolního kmene, u kmene s delecí *trk1*Δ zůstala nízká hodnota pH_{in} nezměněna (viz Obr. 25b). To může být vysvětleno stejným mechanismem jako v případě klotrimazolu a amfotericinu B.

Dalším vysvětlením sníženého pH_{in} buněk po působení antimykotik by mohl být jeden z mechanismů rezistence. Mechanismem rezistence u kandidů může být vedle tvorby biofilmů, omezení vstupu antimykotik do buněk změnou vlastností buněčné membrány nebo mutací v cílových enzimech také exprese pump, které snižují vnitrobuněčnou koncentraci léčiva (Silva et al. 2011, Lv et al. 2016). Tento mechanismus je pozorován především u azolových antimykotik. Příkladem takovýchto transportérů jsou DHA antiportery (Drug:H⁺ Antiporter), které využívají hnací sílu protonů k vyloučení molekul léčiva z buněk (Cannon et al. 2009). Jelikož antimykotika díky lipofilní povaze a malé velikosti molekuly procházejí pasivní difúzí nebo kanály do buněk, jsou buňky nuceny tyto látky vyloučit. Kvasinky dokážou pomocí těchto antiporterů vyloučit příslušné molekuly léčiva výměnou za protony a s tímto přísunem protonů může souviset současný pokles vnitrobuněčného pH_{in} .

Budoucí měření by se měla zaměřit na poskytnutí jednoznačnějších a signifikantních informací ohledně vlivu testovaných podmínek na hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} , a to především testováním vlivu použitých rozpouštědel, která ovlivňovala měření, a vyšším počtem přesnějších pokusů vedoucích ke snížení velikosti směrodatných odchylek v jednotlivých výsledcích.

8. Závěr

Tato diplomová práce se věnovala měření vnitrobuněčného pH_{in} druhů *Candida albicans* a *Candida glabrata*, vystavených různým vnějším vlivům. K provedení těchto měření bylo nutné nejprve ověřit správnost exprese pHluorinu u kmenů s integrovaným genem pro tento fluorescenční protein a následně stanovit závislost intenzity fluorescence pHluorinu na hodnotách vnitrobuněčného pH_{in} sestavením kalibrační křivky a vypočtením její rovnice. Dále byly měřeny hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} buněk kultivovaných v médiích o různém složení s různými zdroji dusíku a tyto hodnoty následně porovnávány u kmenů s delecí příslušných membránových transportérů vůči buňkám kontrolním. Tato měření potvrdila vliv koncentrace draselných iontů na vnitrobuněčné pH_{in} kmenů s delecí *trk1Δ*, které vykazovaly mnohem nižší hodnoty v porovnání s kontrolními kmeny, a vliv použitého zdroje dusíku na vnitrobuněčné pH_{in} ostatních kmenů, kdy bylo v přítomnosti amonných iontů naměřené pH_{in} vyšší. Pomocí kapkových testů byly dále stanoveny vhodné koncentrace antimykotika flukonazolu, klotrimazolu, amfotericinu B a terbinafinu pro zjištění vlivu těchto antimykotik na pH_{in} . Kvasinky *C. glabrata* byly významně odolnější vůči působení všech látek v porovnání s druhem *C. albicans*. Měřením vnitrobuněčného pH_{in} po kultivaci buněk v prostředí s těmito antimykotiky a také po okamžitém přidavku antimykotik a samotných rozpouštědel bezprostředně před měřením byl zjištěn různý vliv těchto látek na jednotlivé kmeny. Zatímco u kmene s delecí *trk1Δ* nebyly pozorovány velké rozdíly v naměřeném vnitrobuněčném pH_{in} , u kontrolního kmene *C. glabrata* docházelo v přítomnosti některých antimykotik k signifikantnímu snížení naměřených hodnot pH_{in} . U některých antimykotik byl také pozorován vliv rozpouštědel na hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} . Závěrem lze říci, že delece *trk1Δ* působí u kvasinek *C. glabrata* za určitých podmínek významné změny v homeostáze vnitrobuněčného prostředí, jako jsou koncentrace iontů nebo hodnoty vnitrobuněčného pH_{in} , a tudíž je tento membránový transportér vzhledem ke své důležitosti pro tuto patogenní kvasinku vhodným cílem pro vývoj nových antimykotik.

9. Literatura

Ariño J, Ramos J, Sychrová H. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast* 2019;36:177-93.

Ariño J, Ramos J, Sychrová H. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:95-120.

Bates S. *Candida albicans* Cdc15 is essential for mitotic exit and cytokinesis. *Sci Rep* 2018;8:8899.

Bolotin-Fukuhara M, Fairhead C. *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast* 2014;31:279-88.

Brunke S, Hube B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol* 2013;15:701-8.

Cannon RD, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:291-321.

Caro G, Bieber J, Ruiz-Castilla FJ, Michán C, Sychrová H, Ramos J. Trk1, the sole potassium-specific transporter in *Candida glabrata*, contributes to the proper functioning of various cell processes. *World J Microbiol Biotechnol* 2019;35:124.

Cataldi V, Di Campli E, Fazii P, Traini T, Cellini L, Di Giulio M. *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Med Mycol* 2017;55:624-34.

da Silva Dantas A, et al. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 2016;34:111-8.

Deschamps A, Colinet A, Zimmermannová O, Sychrová H, Morsomme P. A new pH sensor localized in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae* reveals unexpected roles of Vph1p and Stv1p isoforms. *Sci Rep* 2020;10:1881.

Diakov TT, Tarsio M, Kane PM. Measurement of vacuolar and cytosolic pH *in vivo* in yeast cell suspensions. *J Vis Exp* 2013;74:50261.

Dixon DM, Walsh TJ. Antifungal Agents. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 76.

Elicharová H, Hušeková B, Sychrová H. Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium, *FEMS Yeast Res* 2016;16:fow039.

Elving PJ, Markowitz JM, Rosenthal I. Preparation of buffer systems of constant ionic strength. *Anal Chem* 1956;28:1179-80.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:80-96.

Gabaldón T, Carreté L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2016;16:fov110.

Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-17.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect* 2016;18:310-21.

Hartl J, Doležal M, Miletín M, Opletalová V, Zimčík P. *Farmaceutická chemie IV*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2012:35-47.

Healey KR, et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat Commun* 2016;7:11128.

Jones T, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7329-34.

Kinclová O, Potier S, Sychrová H. The *Candida albicans* Na⁺/H⁺ antiporter exports potassium and rubidium, FEBS Lett 2001;504:11-5.

Kinclová-Zimmermannová O, Sychrová H. Plasma-membrane Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*. Microbiology 2007;153:2603-12.

Klaban V. Ekologie mikroorganismů. Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů. 1. vyd. Praha: Galén, 2011:92-412.

Klaban V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Praha: Galén, 2005:102-105.

Kocková-Kratochvílová A. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990:106-121.

Krauke Y, Sychrová H. Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*, FEMS Yeast Res 2011;11:29-41.

Llopis-Torregrosa V, Hušeková B, Sychrová H. Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. PloS One 2016;11:e0153374.

Llopis-Torregrosa V, et al. Trk1-mediated potassium uptake contributes to cell-surface properties and virulence of *Candida glabrata*. Sci Rep 2019;9:7529.

Lv QZ, Yan L, Jiang YY. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. Virulence 2016;7:649-59.

Mahon M J. pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. Adv Biosci Biotechnol 2011;2:132-7.

Marešová L, Hošková B, Urbánková E, Chaloupka R, Sychrová H. New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. Yeast 2010;27:317-25.

Martinez KA II, et al. Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:3706-14.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013;4:119-28.

Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998;394:192-5.

Navarrete C, et al. Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 2010;10:508-17.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol* 2015;69:71-92.

Orij R, Brul S, Smits GJ. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:933-944.

Orij R, Postmus J, Beek AT, Brul S, Smits GJ. *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiol* 2009;155:268-278.

Pappas PG, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016;62:e1-50.

Pineda Rodó A, Váchová L, Palková Z. *In vivo* determination of organellar pH using a universal wavelength-based confocal microscopy approach. *PloS One* 2012;7:e33229.

Ramos J, Ariño J, Sychrová H. Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 2011;317:1-8.

Ramos J, Sychrová H, Kschischo M. Yeast Membrane Transport. *Adv Exp Med Biol* 2016;892.

Reifenrath M, Boles E. A superfolder variant of pH-sensitive pHluorin for *in vivo* pH measurements in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 2018;8:11985.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a019703.

Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:40-79.

Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 2005;217:3-15.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:288-305.

Spivak ES, Hanson KE. *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. *J Clin Microbiol* 2018;56:e01588-17.

Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a019778.

Vila T, Romo JA, Pierce CG, McHardy SF, Saville SP, Lopez-Ribot JL. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence* 2017;8:150-8.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.

Candidiasis. In: *Centers for Disease Control and Prevention web site*. Poslední revize: 18. 2. 2020. Dostupné na URL: <https://www.cdc.gov/fungal/index.html>. Přístup 1. 3. 2020